

**T.C.**  
**Ondokuz Mayıs Üniversitesi**  
**Tıp Fakültesi**  
**Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı**

**TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN KAROTİD VENÖZ BAYPAS GREFT  
MODELİNDE İNTİMAL HİPERPLAZİ GELİŞİMİNE KLOPİDOGREL,  
KALSİYUM DOBESİLAT, NEBİVOLOL ve ATORVASTATİN'in ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. SEMİH MURAT YÜCEL**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Yrd. Doç. Dr. MUZAFFER BAHÇIVAN**

**SAMSUN / 2008**

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>II</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>III</b>
<b>KISALTMALAR</b>	<b>IV</b>
<b>ÖZET</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VII</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Kan Damarlarının Morfolojisi:</b>	<b>3</b>
<b>2.1.1. Tunika İntima :</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2. Tunika Media :</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3. Tunika Adventisya :</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Trombositler :</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Vasküler Endotelin Fonksiyonları :</b>	<b>6</b>
<b>2.4. Nitrik Oksit ( NO) :</b>	<b>7</b>
<b>2.5. İntimal Hiperplazi :</b>	<b>10</b>
<b>2.6. İntimal Hiperplazi Gelişim Hipotezleri :</b>	<b>11</b>
<b>2.6.1. Hasara Karşı Yanıt :</b>	<b>11</b>
<b>2.6.2. Adaptif-Reaktif Yeniden Şekillenme :</b>	<b>11</b>
<b>2.7. İntimal Hiperplazinin Fizyopatolojisi :</b>	<b>12</b>
<b>2.8. İntimal Hiperplazinin Histopatolojisi :</b>	<b>13</b>
<b>2.9. Deney Protokolünde Kullanılan Farmakolojik Ajanlar :</b>	<b>16</b>
<b>2.9.1. Klopidoğrel :</b>	<b>16</b>
<b>2.9.2. Kalsiyum Dobesilat :</b>	<b>16</b>
<b>2.9.3. Nebivolol :</b>	<b>17</b>
<b>2.9.4. Atorvastatin :</b>	<b>17</b>
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>18</b>
<b>4. BULGULAR</b>	<b>27</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>35</b>
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>42</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>44</b>

## TABLO LİSTESİ

**Tablo I:** Endotelden sentezlenen ve salgılanan başlıca mediatörler

**Tablo II:** Deneysel çalışmalarda intimal hiperplazi ve restenoz gelişimini engellemek amacıyla kullanılan bazı ajanlar

**Tablo III:** Tüm grupların ortalama intima ve media kalınlıkları, intima / media oranları

**Tablo IV:** Kontrol grubunun intimal kalınlıklarının diğer gruplarla karşılaştırılması

**Tablo V:** Kontrol grubunun medial kalınlıklarının diğer gruplarla karşılaştırılması

**Tablo VI:** Kontrol grubunun intima / media oranlarının diğer gruplarla karşılaştırılması

## ŞEKİL LİSTESİ

**Şekil 1:** Arter ve ven duvarının yapısı

**Şekil 2:** Nitrik Oksit sentezi

**Şekil 3:** Vasküler hasar sonrası intimal hiperplazi gelişim mekanizması

**Şekil 4:** Operasyonda kullanılan cerrahi aletler

**Şekil 5:** Operasyon esnasında deneğin pozisyonu ve cilt insizyonu

**Şekil 6:** Üstte dönülmüş karotis arter ve altta venotomi yapılmış jügüler ven

**Şekil 7:** İris bistürisi ile yapılan proksimal karotis arteriotomi

**Şekil 8:** Operasyon sonunda venöz baypas greft modeli

**Şekil 9:** Postoperatif 28. günde arterialize olmuş jügüler ven grefti

**Şekil 10:** Karotis arteriografide; proksimal karotis artere verilen kontrast madde venöz baypas greft vasıtasıyla distal karotis arteryel sistemi doldurmakta

**Şekil 11:** Doppler USG’de proksimal ve distal anastomozdan geçen akımlar

**Şekil 12:** Doppler USG’de ven greftinden distal karotis artere geçen arteryel kan akımı paterni

**Şekil 13:** Kalsiyum Dobesilat grubu (Hematoksilen Eozin x10)

**Şekil 14:** Atorvastatin grubu (Hematoksilen Eozin x10)

**Şekil 15:** Kontrol grubu (Hematoksilen Eozin x10)

**Şekil 16:** Klopidoğrel grubu (Hematoksilen Eozin x10)

**Şekil 17:** Nebivolol grubu (Hematoksilen Eozin x10)

**Şekil 18:** Tüm grupların intimal kalınlıklarının karşılaştırılması

**Şekil 19:** Tüm grupların medial kalınlıklarının karşılaştırılması

**Şekil 20:** Tüm grupların intima / media oranlarının karşılaştırılması

## KISALTMALAR

- ADP:** Adenozin difosfat  
**ATP:** Adenozin trifosfat  
**bFGF:** Basic fibroblast growth factor  
**BH<sub>4</sub>:** 5,6,7,8-tetrahidrobiyopterin  
**cAMP:** Siklik adenozin monofosfat  
**cGMP:** Siklik guanozin monofosfat  
**EDRF:** Endothelium derivated relaxing factor  
**EGF:** Epidermal growth factor  
**ePTFE:** Expanded polytetrafluoroethylene  
**HDL:** Yüksek dansiteli lipoprotein  
**HMG-koA:** Hidroksimetilglutaril ko-enzimA  
**LDL:** Düşük dansiteli lipoprotein  
**NADP-H:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat  
**NO:** Nitrik oksit  
**NO<sub>2</sub>:** Nitrit  
**NO<sub>3</sub>:** Nitrat  
**NOS:** Nitrik oksit sentaz  
**OMÜ:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi  
**PDGF:** Platelet derivated growth factor  
**PGI<sub>2</sub>:** Prostosiklin  
**PTKA:** Perkütan translüminal koroner anjioplasti  
**SPSS:** The Statistical Package for Social Scienses  
**TGF-β:** Transforming growth faktör-β  
**VLDL:** Çok düşük dansiteli lipoprotein  
**vWF:** von Willebrand Faktör

# TAVŞANLARDA OLUŞTURULAN KAROTİD VENÖZ BAYPAS GREFT MODELİNDE İNTİMAL HİPERPLAZİ GELİŞİMİNE KLOPIDOGREL, KALSİYUM DOBESİLAT, NEBİVOLOL ve ATORVASTATİN'in ETKİSİ

## ÖZET

### Amaç:

Vasküler rekonstrüktif girişimler sonrası restenoz gelişiminde önemli sebeplerden birisi intimal hiperplazidir. Bu çalışmanın amacı; tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan venöz baypas greft modelinde intimal hiperplazi gelişimini engellemede klopidogrel, kalsiyum dobesilat, nebivolol ve atorvastatin'in etkinliğinin araştırılmasıdır.

### Gereç ve Yöntem:

40 adet Yeni Zellanda cinsi erkek tavşan kullanılarak her grupta 8 denek olacak şekilde 5 grup oluşturuldu. Tavşanlarda karotis arter oklüzyonu oluşturularak bu segmentin proksimali ile distali arasına jügüler ven grefti ile baypas yapıldı. Deneklere oral yolla günlük 2.5mg/kg klopidogrel (Grup 2), 100 mg/kg kalsiyum dobesilat (Grup 3), 0.5 mg/kg nebivolol (Grup 4) ve 2.5 mg/kg atorvastatin (Grup 5) verildi. Kontrol grubuna (Grup 1) herhangi bir ilaç verilmedi. Postoperatif 28. günde çalışma tamamlanarak denekler sakrifiye edildi. Arterialize olmuş jügüler ven greftleri histopatolojik inceleme amacıyla çıkartıldı. İntima ve media kalınlıkları ölçüldü, intima / media oranları hesaplandı.

### Bulgular:

Çalışma sonunda toplam 40 adet venöz baypas greftinin açıklık oranları % 90 idi. İntimal kalınlıklar; Grup 1'de  $95.12 \pm 9.93 \mu\text{m}$ , Grup 2'de  $42.87 \pm 6.95 \mu\text{m}$ , Grup 3'de  $46.50 \pm 9.02 \mu\text{m}$ , Grup 4'de  $34.12 \pm 5.64 \mu\text{m}$  ve Grup 5'de  $48.37 \pm 6.16 \mu\text{m}$  olarak ölçüldü. Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'in intimal kalınlıklarının Grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi ( $p=0.001$ ). Grup 4'ün ortalama intimal kalınlığı, Grup 3 ( $p=0.007$ ) ve Grup 5'e ( $p=0.002$ ) göre anlamlı düzeyde daha azdı. Medial kalınlıklar; Grup 1'de  $126.62 \pm 13.53 \mu\text{m}$ , Grup 2'de  $94.00$

$\pm 6.00 \mu\text{m}$ , Grup 3'de  $101.50 \pm 13.52 \mu\text{m}$ , Grup 4'de  $90.50 \pm 9.69 \mu\text{m}$ , Grup 5'de  $101.37 \pm 7.99 \mu\text{m}$  olarak ölçüldü. Grup 2, Grup 4, Grup 5 ( $p=0.001$ ) ve Grup 3'ün ( $p=0.009$ ) medial kalınlıklarının Grup 1 ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi.

### **Sonuç:**

Tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan karotis arter venöz baypas greft modelinde 4 haftalık klopidogrel, kalsiyum dobesilat, nebivolol ve atorvastatin tedavisinin jügüler ven greftinde intimal hiperplazi gelişimini engellemede etkin olduğu saptandı.

### **Anahtar Kelimeler:**

Venöz baypas greft, intimal hiperplazi, klopidogrel, kalsiyum dobesilat, nebivolol, atorvastatin

# THE EFFECT OF CLOPIDOGREL, CALCIUM DOBESILATE, NEBIVOLOL AND ATORVASTATIN ON THE INTIMAL HYPERPLASIA DEVELOPMENT ON THE VENOUS BYPASS GRAFTS MODEL FORMED IN RABBITS

## ABSTRACT

### Objective:

One of the main reasons for restenosis development after the vascular reconstructive procedures is intimal hyperplasia. The aim of this study is to investigate the effect of clopidogrel, calcium dobesilate, nebivolol and atorvastatin in hindering the intimal hyperplasia development in an experimental venous bypass graft model formed in rabbits.

### Material and Methods:

Forty male New Zealand rabbits was used for the study. Rabbits were divided 4 study and 1 control group, containing 8 subjects in each group. After constituting carotid artery occlusion in rabbits, a bypass was performed with jugular vein graft between the proximal and the distal segments of the occluded carotid artery. Daily 2.5 mg/kg clopidogrel (Group 2), 100 mg/kg calcium dobesilate (Group 3), 0.5 mg/kg nebivolol (Group 4) and 2.5 mg/kg atorvastatin (Group 5) was administered to subjects orally. The control group (Group 1) didn't receive any medication. The subjects were sacrificed on postoperative 28th day. The arterialized jugular vein grafts were extracted for histopathological examinations. Intima and media thicknesses were measured and intima / media ratios were calculated.

### Results:

The patency rate of the 40 venous bypass grafts in total, at the end of the study was 90%. The intimal thickness measurements were as follows:  $95.12 \pm 9.93 \mu\text{m}$  in Group 1,  $42.87 \pm 6.95 \mu\text{m}$  in Group 2,  $46.50 \pm 9.02 \mu\text{m}$  in Group 3,  $34.12 \pm 5.64 \mu\text{m}$  in Group 4, and  $48.37 \pm 6.16 \mu\text{m}$  in Group 5. It was detected that the intimal thickness measurements of Groups 2, 3, 4, 5 were significantly less compared to Group 1



( $p=0.001$ ). It was also found that the intimal thickness measurements of Group 4 were significantly less compared to Group 3 ( $p=0.007$ ) and Group 5 ( $p=0.002$ ). Medial thickness measurements were as follows:  $126.62 \pm 13.53 \mu\text{m}$  in Group 1,  $94.00 \pm 6.00 \mu\text{m}$  in Group 2,  $101.50 \pm 13.52 \mu\text{m}$  in Group 3,  $90.50 \pm 9.69 \mu\text{m}$  in Group 4,  $101.37 \pm 7.99 \mu\text{m}$  in Group 5. The medial thickness measurements of Groups 2, 4, 5 ( $p=0.001$ ) and Group 3 ( $p=0.009$ ) were significantly thinner compared to Group 1.

**Conclusion:**

As a conclusion, it was decided that, four-week treatment of clopidogrel, calcium dobesilate, nebivolol and atorvastatin in an experimental model of carotid venous bypass graft formed in rabbits, was effective in preventing the intimal hyperplasia development.

**Key words:**

Venous bypass graft, intimal hyperplasia, clopidogrel, calcium dobesilate, nebivolol, atorvastatin

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda tıkaçıcı damar hastalıklarının girişimsel veya cerrahi yöntemlerle tedavisinde önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Girişimsel radyoloji, invaziv kardiyoloji ve kardiyovasküler cerrahi klinikleri tarafından uygulanan prodesürler tüm dünyada binlerce hastaya uygulanmaktadır. Perkütan transluminal balon anjioplasti (PTKA), endovasküler stent implantasyonu, endarterektomi-patchplasti, Fogarty balon tromboembolektomi, vasküler anastomoz, venöz baypas greft ve arteriovenöz fistül-greft oluşturulması bu işlemlerin başlıcalarıdır. Tıkalı arteriyel segmentin distalinin kanlandırılarak ilgili organın fonksiyonlarının ve canlılığının idamesi veya kalıcı bir hemodiyaliz girişim yolu elde edebilmek amacıyla uygulanan tüm bu işlemler sonucu % 20-50 gibi yüksek oranlara varabilen restenoz gelişimi sebebiyle başarısızlık gözlenebilmektedir (1,2). Sonuç olarak miyokard infarktüsü, stroke, ilgili ekstremitenin kaybı, hemodiyaliz girişim yolunun yitilmesi ve ölüme kadar uzanan birçok komplikasyon karşımıza çıkabilmektedir. Bu durumlarda girişimsel ve cerrahi müdahalelerinin tekrarlanma gereği ortaya çıkması hastane giderlerinin artmasına yol açmaktadır.

Tıkaçıcı damar patolojilerinde uygulanan girişimsel ve cerrahi tedaviler sonrası meydana gelen restenozun en önemli sebeplerden birisi intimal hiperplazidir (3-5). İntimal hiperplazi; damarda meydana gelen her türlü hasar ve hemodinamik strese karşı normal adaptif iyileşme yanıtı olarak tanımlanabilir (4,6). Vasküler endotel tabakası normalde salgıladığı çeşitli mediatörlerle sürekli antikoagülan bir yüzey oluşturarak kan akımının devamlılığını sağlar (7). Ancak endotelde hasar geliştiği zaman bu antikoagülan, homeostatik özellikleri kaybolur ve kan elemanları için prokoagülan bir yüzey haline gelir. Endotel hasarı olan bölgeye trombositlerin kümelenmesi ve degranülasyonu ile düz kas hücre tabakasında proliferasyon, migrasyon ve ekstraselüler matriks proteinlerinde artış meydana gelir. İntimal hiperplazi formasyonu olarak tanımlanan bu süreç vasküler okluziv hastalıkların tedavisi amacıyla uygulanan birçok girişimsel ve cerrahi müdahale sonrası karşımıza restenoz sebebi olarak çıkabilmektedir.

Günümüze kadar intimal hiperplazi oluşumunun durdurulabilmesi veya yavaşlatılabilmesini sağlamak amacıyla yapılan çalışmalarda birçok farmakolojik ajan ve cerrahi teknik denenmiştir. Antiplatelet ajanlar, antikoagülanlar, anjiotensin

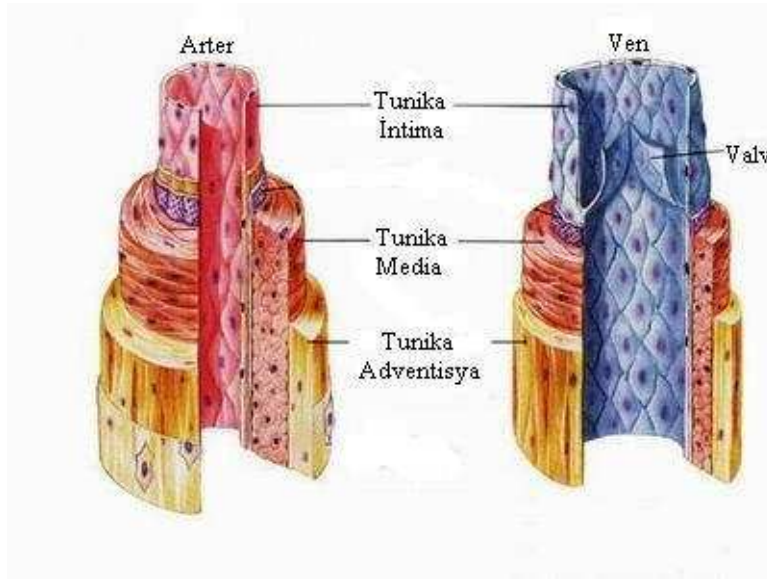
konverting enzim inhibitörleri, immünsüpresifler, antiinflamatuvarlar, kortikosteroidler, antihiperlipidemikler, kalsiyum kanal antagonistleri, antioksidanlar ve antisense oligonükleotidler bunlardan bazılarıdır (3,5). Bu ajanlar ve daha birçok yöntem ile damar endotel hasarı sonrası gelişen intimal hiperplazinin neden olduğu restenoz oluşumu birçok deneysel çalışmada incelenmiştir. Günümüzde moleküler tıbbi biyolojideki gelişmeler yardımı ile özellikle hayvan deneylerinde birçok olumlu sonuçlar alınmakla beraber henüz insanlar üzerinde bu amaçla kullanılacak ve etkinliği kesin kanıtlanmış bir ajan veya yöntem bulunamamıştır (4-6).

Biz bu çalışmamızda; tavşanlarda oluşturulan karotis arter venöz baypas greft modelinde intimal hiperplazi gelişimini önlemede klopidogrel, kalsiyum dobesilat, nebivolol ve atorvastatinin etkinliğini araştırmayı planladık. Çalışma protokolümüzün pratik, tekrarlanabilir, maliyeti az ve cerrahi teknik açısından klinikte yapılan aorto-koroner baypas ve femoro-popliteal baypas modeline benzer özellikte olmasından dolayı venöz baypas greft modelini tercih ettik.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kan Damarlarının Morfolojisi:

Vücudumuzdaki kan damarları lokalizasyonları ve görevlerine göre bazı farklılıklar içermelerine rağmen benzer özelliktedirler. Sürekli yüksek basınçta maruz kalan kan damarlarının duvar kalınlıkları daha düşük basınç altında çalışan damarlardan daha fazladır. Klasik tabakalardan oluşan damar duvarı yapısı arterlerde daha belirgin olmakla beraber kapiller damarlar ve venlerde daha basit konfigürasyondadır. Aynı anatomik seyirdeki venlerin çapları arterlerden daha fazla iken arterlerin duvar kalınlıkları daha fazladır. Ayrıca arterlerden farklı olarak venlerin çoğunda intima katlantısından oluşan ve kanın tek yönlü hareketine izin veren biküspid valvler vardır (8). Kan damarları içten dışa doğru 3 ana tabaka (Tunika intima, media, adventisya) içerir (9) (Şekil 1).



**Şekil 1:** Arter ve ven duvarının yapısı

(Kaynak: <http://www.sci.sdsu.edu/class/bio590/pictures/lect5/artery-vein.jpeg>)

#### 2.1.1. Tunika İntima:

Damar duvarının en iç tabakası tunika intimadır. Devamlı, tek katlı poligonal hücreler içeren endotel tabakasından oluşan luminal yüzey ile internal elastik lamina arasında bulunur. Bu alan oldukça dardır ve az miktarda düzensiz yapıda düz kas hücresi, lökositler ve fibriller içerir. Endotel tabakası bazal lamina üzerine oturur. Bazal

lamina kesintisiz katlanabilir ve nispeten özelleşmiş konnektif bir doku formu yapısındadır. Endotel tabakası internal elastik lamina ile yer yer sıkı bağlantılar içerir. Bu bağlantılar çeşitli travmalara karşı deendotelizasyonu engellerler. Endotel hücrelerinin membranları negatif yüklüdür ve benzer şekilde negatif yüke sahip eritrosit membranlarını yüzeylerinden uzaklaştırmaya çalışırlar. Endotel hücreleri kimyasal sinyallerin iletimini kolaylaştırırlar. Salgıladığı çeşitli mediatörler ile damar düz kas tabakasının tonüsünü ayarlarlar (10-12).

### **2.1.2. Tunika Media :**

Tunika media; düz kas hücre tabakaları, proteoglikanlar, kollajen-elastin fibrillerinden oluşan ve internal elastik lamina ile adventisya arasında uzanan damar duvarı katmanıdır. Kapiller ve postkapiller venüllerde belirgin bir media tabakası bulunmazken onun yerini perisitler almıştır. Matriks ve fibröz elementler düz kas hücrelerince sentezlenirler. Düz kas hücre tabakası sayısı küçük damarlarda 2-4 adet iken bu sayı büyük müküler arterlerde 40'a kadar yükselebilir. Venlerin duvarlarında daha az miktarda düz kas hücresi bulunur ve çoğunda tunika intima ve media arasında belirgin bir sınır yoktur. Media ile adventisya arasındaki sınırı eksternal elastik lamina oluşturur ve bu da arterlerde daha belirgindir. Medianın düz kas hücre tabakası her biri ortak bir bazal membran ile çevrelenmiş sıralı hücre gruplarından oluşur. Böylece aşırı gerilmeye karşı hücre gruplarının bir arada tutulması sağlanır. Aorta ve ana dalları gibi büyük arterler elastik arterler olarak sınıflandırılırlar. İçerdikleri zengin elastik lifler sayesinde kardiyak sistol-diyastol süresince komplians ve elastik geri tepme yeteneğine sahiptirler. Elastik arterlerin dalları olan daha küçük çaplı müküler arterler ise media tabakasında daha az elastik lifler (elastin, kollajen) içerirken, elastik arterlerden daha fazla düz kas hücre tabakası içerirler. Bu arterler çaplarını kolaylıkla değiştirerek vazokontrüksiyon/vazodilatasyon yapabilirler ve periferik vasküler direnç, kan basıncının ayarlanmasında önemli bir role sahiptirler (10-12).

### **2.1.3. Tunika Adventisya :**

Tunika adventisya; fibroblastlar, yağ hücreleri, lenfatik damarlar, vaso vasorumlar, miyelinsiz sinir sonlanmaları, longitudinal yerleşimli tip I kollajen lifleri, elastik lifleri içeren ve ilgili organın bağ dokusu ile devamlılık gösterebilen bir yapıdır.

Kollajen ve elastik lifler, kesilen damar ucunun kolaylıkla büzülerek kan kaybını minimuma indirebilmesi amacıyla longitudinal dizilmişlerdir. Vaso vasorumlar damarların besleyici damarlarıdır. Büyük arterlerin duvarlarında difüzyonla beslenme yeterli olamayacağından dolayı adventisya ve medianın perfüzyonu bu damarlarca sağlanır. Özellikle düz kas hücre lamel sayısı 29'un üzerinde olan arterlerin duvarlarında gözlenirler. Vaso vasorumlar venlerde arterlerden daha sık görülür. Bu da venöz kanda besin ve oksijen azlığı ile açıklanabilir. Pulmoner venler ve vena cavalı gibi kalbe yakın damarların duvarlarında kardiyak kas hücreleri yer alır. Duvarlarında düz kas hücresi taşıyan birçok damar transmitter olarak norepinefrin kullanan vasomotor sinirler ile innerve olur. Venlerde bu sinirler hem adventisya hem de mediada sonlanırlarken arterlerde bu sinirler mediaya yeterince ulaşamazlar ancak innervasyon yoğunluğu ise arterlerde daha fazladır (10,13).

## **2.2. Trombositler :**

Trombositler disk biçiminde ve 2-4 µm çapında nükleus içermeyen kan hücreleridir. Kemik iliğinde bulunan ve poliploid dev hücreler olan megakaryositler tarafından üretilirler. Kan dolaşımındaki ortalama yaşam süreleri 10 gündür. Her 1mm<sup>3</sup> kanda ortalama 150.000-450.000 adet trombosit bulunur. Trombositlerin membran dış yüzeylerinde bulunan glikozaminoglikan ve glikoproteinden zengin manto tabakası adezyonu kolaylaştırır. Trombositlerin sitoplazmalarında granüller, az sayıda mitokondri, dış yüzeye bağlantılı kanaliküler sistemler, ribozomlar ve glikojen partikülleri bulunur. Trombosit sitoplazmasında başlıca 3 farklı granül bulunur. Bunlar; elektron yoğun (delta) granüller, spesifik alfa granüller ve lambda granüllerdir. Işık mikroskopisi ile gözlenebilenler genelde alfa granüllerdir. Elektron yoğun granüller 250-300 nm çaptadırlar. Kalsiyum, adenzin difosfat (ADP), adenzin trifosfat (ATP), pirofosfat ve plazmadan depoladıkları serotonini ihtiva ederler. Alfa granüller ise biraz daha büyük çaptadırlar (300-500 nm) ve fibrinojen, platelet derived growth factor (PDGF), fibronektin gibi bazı proteinler ihtiva ederler. En küçük çaplı granüller (175-250 nm) ise lizozomal enzimler içeren lambda granülleridir. Damar duvar hasarı ile aktive olan trombositlerin başlıca fonksiyonları; adezyon, sekresyon (degranülasyon) ve agregasyondur. Endotel hasarı sonrası açığa çıkan kollajen ile trombositlerin adezyonu sahip oldukları GIa, GIb, GIIb, GIIIa reseptörleri ile sağlanır. GIa direkt

olarak adhezyonu tetiklerken, GIIb ve GIIIa ise von Willebrand Faktör (vWF) ile etkileşerek adhezyona katkıda bulunurlar. Adhezyonu takiben trombositler diğer trombositler ile temas yüzeyini artırmak amacıyla psödopodlar oluştururlar. Trombositler degranülasyon ile salgıladıkları Tromboksan A2 ve ADP yardımıyla agregasyonu başlatırlar. Bu aşamadan sonra 10'dan fazla sayıda plazma proteini belli bir sıra ile aktive olarak koagülasyon kaskadı uyarılmış olur. Protrombinin trombine dönüşümü ve ardından fibrinojenin fibrine dönüşümünü içeren zincirleme reaksiyonlar sonucu pıhtı oluşumu tamamlanır. Trombositler sahip oldukları tüm bu özelliklerinden dolayı vasküler endotel hasarı sonrası intimal hiperplazi gelişiminde ilk ve en önemli basamaklardan birini oluştururlar (3,10).

### **2.3. Vasküler Endotelin Fonksiyonları :**

Vasküler endotel tabakası; kan damarı duvarı ile içerisinde akan kan dokusu arasında bulunan ve tek sıra endotel hücrelerinden oluşmuş fonksiyonel endokrin bir organdır. Yetişkin insanlarda tüm vasküler endotel tabakası ~ 10<sup>13</sup> endotel hücresi içerir (14). Önceden endotel tabakasının kan damarlarının iç yüzeyini örten basit bir yarı geçirgen membran özelliğinde olduğu zannediliyordu. Ancak günümüzde biliyoruz ki; endotel tabakası sentezlediği ve salgıladığı birçok mediatörler vasıtasıyla vasküler homeostazda önemli rolü olan bir organdır (15). Endotel hücreleri; hücre proliferasyonu, vazoaaktivite, inflamatuvar reaksiyonlar, enzimatik aktivite ve homeostazda önemli rol alırlar. Bu nedenle endotel disfonksiyonunun tromboz ve düz kas hücre proliferasyonu ile seyreden tıkaçıcı damar hastalıkların patogenezinde etkili olduğu düşünülmektedir. Normal damar endoteli antikoagülan (heparan sülfat), antitrombotik (prostosiklin, nitrik oksit) ve fibrinolitik (doku plazminojen aktivatörü) aktiviteye sahiptir ve bu özellikleri sayesinde üzerinde akan kan tabakası için nonadhesiv bir yüzey oluşturur. Vasküler endotel tabakasında çeşitli sebeplerle disfonksiyon geliştiğinde normal endotel fonksiyonu altında hassas bir terazinin antitrombotik, vazodilatör, antiinflamatuvar ve büyüme inhibitörleri lehine olan dengesi protrombotik, vazokonstrüktör, büyüme uyarıcıları ve proinflamatuvar reaksiyonların baskın olduğu yöne doğru bozulur (16). Endotel tabakası bu hassas dengeyi ayarlayan birçok mediatör sentezler ve salgılar (Tablo I). Endotel disfonksiyonun en sık gözlenen sonucu aterosklerozdur. Ateroskleroz tüm dünya üzerinde önde gelen mortalite

sebepleri olan kardiovasküler ve serebrovasküler hastalıkların en önemli sebebidir. İntimal hiperplazi ve buna bağlı gelişen restenoz ise bu aterosklerotik lezyonların tedavi sonuçlarını olumsuz yönde etkileyen ve endotel disfonksiyonu ile ilişkili, henüz tam çözümlenememiş çok önemli bir sağlık sorunudur. Endotel disfonksiyonu ayrıca vazospazm ve tromboza eğilimi de artırır.

**Tablo I:** Endotelden sentezlenen ve salgılanan başlıca mediatörler

Histamin	Major Histocompatibility antigen II
Heparan Sülfat	İntracellular adhesion molecule
Nitrik Oksit	Vascular adhesion molecule
Prostosiklin	Doku Faktörü
Endotelin	Trombomodulin
Platelet Derivated Growth Factor	Serbest Radikaller
Anjiotensin Converting Enzim	von Willebrand Faktör
Lökotrienler	Platelet endothelial cell adhesion molecule
Doku Plazminojen Aktivatörü	Plazminojen aktivatör inhibitör 1
Platelet Activating Factor	E-Selektin, P-Selektin
Anjiotensin II	Prostoglandin H2

#### 2.4. Nitrik Oksit ( NO ) :

1980 yılında ilk kez Furchgott tarafından Endothelium Derivated Relaxing Factor (EDRF) olarak tanımlanmıştır. Yazar buna kaynak olan çalışmasında; endotel tabakası korunmuş tavşan aortasında noradrenalin ile oluşturulan vazokonstriksiyonun asetilkoline maruz kalmakla vazodilatör yanıtı dönüştüğünü ancak bu vazodilatör yanıtın endotel devamlılığının bozulduğu durumda gerçekleşemediğini belirtmiştir. Buradan yola çıkarak nonprostanoid yapıda ve vazodilatör etkisi olan EDRF isimli maddenin varlığına ışık tutmuştur (17). Bundan birkaç yıl sonra (1986-Ignarro) bu maddenin endotelden salgılanan Nitrik Oksit (NO) olduğu anlaşılmıştır (18). Nitrik oksit, L-Arginin'in guanidin N terminalinden Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi yardımı



ile sentezlenir (Şekil 2). NO; immünite, sinir iletimi, vasküler tonusun regülasyonu gibi birçok sistem üzerinde etkileri olan bir hücre içi habercisidir. NOS'un 3 tipi vardır. Bunlar; iNOS (inducible), nNOS (nöronal), ve eNOS (endotelial)'dur. iNOS makrofajlar, lökositler, damar düz kas hücrelerinde bulunur ve sitokinler tarafından uyarılabilir. nNOS nöronal hücrelerde sentezlenir ve hafıza fonksiyonlarının korunmasında etkilidir. eNOS ise endotele özgüdür ve sürekli olarak bazal bir NO sentezi yapar. NOS L-Arginin analogları ile inhibe olur. NOS'un inhibisyonu vazokonstrüksiyon ve hipertansiyona yol açabilir. NOS aktivasyonu endotel hücresindeki kalsiyum (Ca<sup>++</sup>) konsantrasyonu ile ilişkilidir. Ancak iNOS kalsiyumdan bağımsız çalışır. iNOS tarafından aşırı miktarda NO sentezinin indüklenmesi toksik etkilere yol açabilir. Ca<sup>++</sup> kalmoduline bağımlıdır. Ayrıca NOS aktivitesi için NADPH ve 5,6,7,8-tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) de gereklidir. Endotel hücrelerince sentezlenen NO difüzyon ile damar düz kas hücrelerine ulaşır, sitozolik bir enzim olan solubl guanilat siklazı stimüle ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) yapımını tetikler, sonuçta hücre içi Ca<sup>++</sup> seviyesi azaltılarak vazodilatasyon gerçekleşir. Endotel sadece düz kas hücrelerine değil damar lümenine doğru da NO salgılar. Düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe eder. Trombositlerin ve lökositlerin adezyonunu inhibe eder. NO ve prostosiklin (PGI<sub>2</sub>) sinerjistik etkileri ile trombosit agregasyonun en önemli inhibitörleridirler. Kan akımının damar duvarında oluşturduğu shear stress fiziksel uyarıcı olarak etki ederek lokal NO salınımına neden olur. NO salınımını uyarıcı endojen kimyasallar ise şunlardır: Katekolaminler, vazopressin, histamin, bradikinin, ADP, serotonin ve trombin. Trombosit agregasyonu sonucu serotonin ve ADP ile birlikte salınan trombin NO salınımını uyarır ve vazodilatasyon ile birlikte mikroagregatların dolaşımından uzaklaştırılmasını kolaylaştırır (19,20).

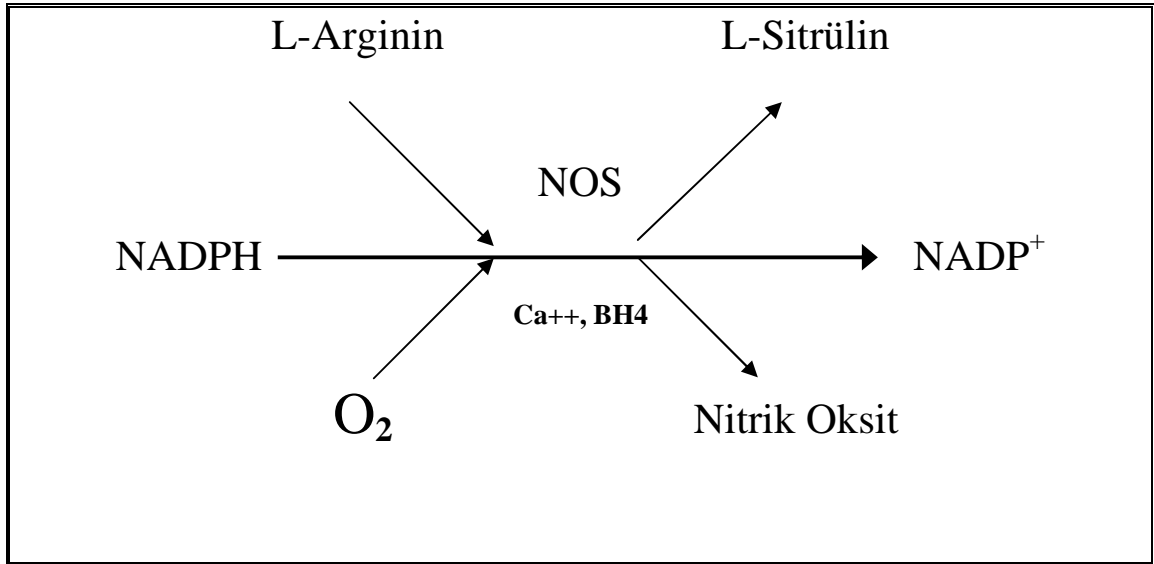
Vasküler endotel fonksiyonlarının idamesi için çok önemli bir mediatör olan NO bunun yanı sıra immünomodülasyon, renal fonksiyonları koruyucu, antioksidan ve bronkodilatasyon gibi organizma için yararlı birçok etkiye sahiptir. Ancak NO birçok yararlı etkilerinin yanı sıra sitotoksik bazı etkilere de sahiptir. Endotoksik-septik şokta aşırı miktarda NO salınımı mortalite riskini artırır. Ayrıca epileptik hastalarda ve iskemik serebral patolojilerde nörotoksisite riskini artırır. Diğer bazı toksik etkileri şunlardır: DNA hasarı, toksik metaller ve radyasyonun zararlı etkilerinde artış (21). NO yarı ömrü birkaç saniye olan kararsız bir bileşiktir. Guanilat enzimini aktive ettikten

sonra nitrite (NO<sub>2</sub>) dönüşerek önce plazmaya ardından eritrositlere geçer. Hemoglobin ile reaksiyona girerek nitrata (NO<sub>3</sub>) indirgenir. Oluşan nitrat ise plazmaya karışarak böbrekler yolu ile atılır (22).

Vasküler patolojilerin tedavisine yönelik uygulanan perkütan veya cerrahi birçok girişim sonrası minimal de olsa mutlaka endotel hasarı ortaya çıkmaktadır. Endotel kaybının olduğu ve bu nedenle yukarıda bahsettiğimiz endotelin koruyucu fonksiyonlarını yitirildiği bu bölgede hızla trombositlerin birikimi gözlenir. Salınan birçok mediatör ile düz kas hücre proliferasyonu, migrasyonu ve ekstraselüler matriks artışı ile birlikte intimal kalınlaşma meydana gelir.

Birçok deneysel çalışmada endotel hasarı sonrası NO veya donörlerinin kullanılması ile sonuçta intimal hiperplaziye kadar uzanan bu fizyopatolojik sürecin baskılanabildiği tespit edilmiştir (23,24).

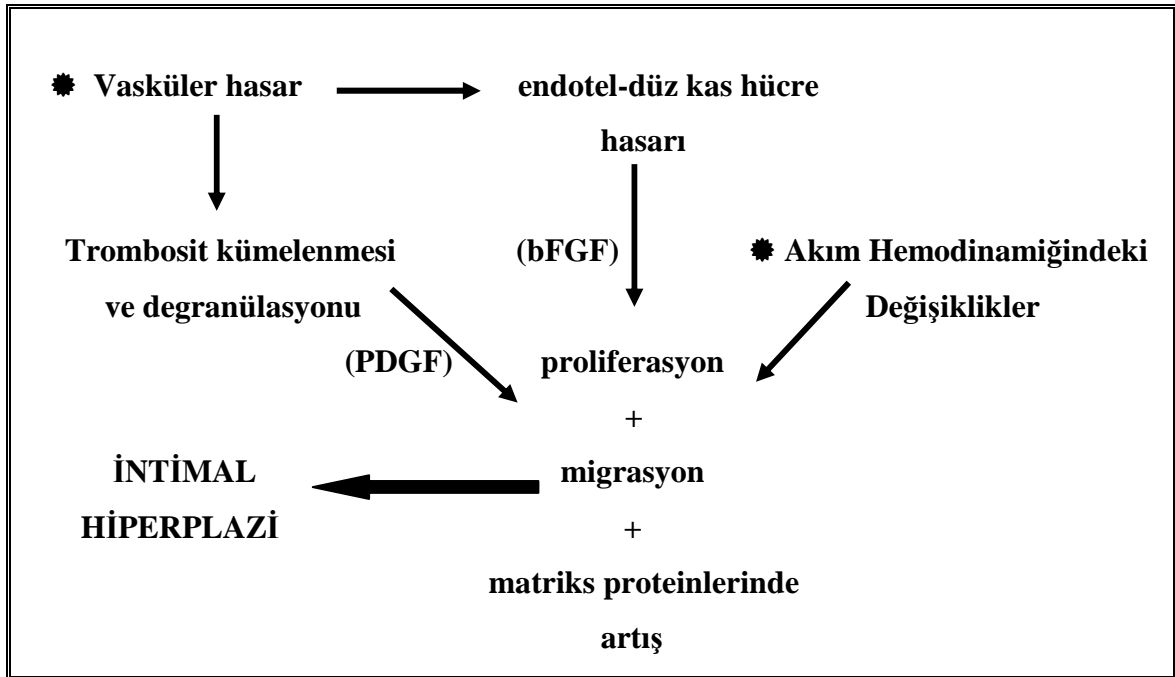
NO; sağlam vasküler endotel tabakası tarafından salgılanan ve endotel fonksiyonları, kan akımı hemodinamiği üzerine birçok koruyucu etkileri (antiagregan, antiadeziv, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antimigratuvar) olan, vasküler rekonstrüktif girişimler sonrası gelişebilecek restenozların engellenmesinde etkin olabilecek bir mediatördür.



**Şekil 2:** Nitrik Oksit sentezi. NADP-H: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

## 2.5. İntimal Hiperplazi :

İntimal hiperplazi; organizmadaki damarların her türlü hasar ve hemodinamik strese karşı normal adaptif iyileşme yanıtıdır. Vasküler hasar sonrası gelişen intimal hiperplaziyi tetikleyen mekanizma; trombosit kümelenmesi ve degranülasyonunu takiben düz kas hücre proliferasyonu, migrasyonu ve ekstraselüler matriks proteinlerinde artıştır (Şekil 3). Erken çocukluk döneminde bazı arterlerde akım hemodinamiğine adaptasyon amacıyla fizyolojik intimal kalınlaşma görülebilir (25). Ayrıca ductus arteriosusun kapanması fizyolojik intimal hiperplazinin bir örneğidir (26). Klinik uygulamalarda karşılaşılan patolojik intimal hiperplazi ise; invaziv ve cerrahi vasküler rekonstrüktif girişimlerin orta-uzun dönem yetersizliklerinin (restenoz) en önemli sebeplerindendir. Bu yönde yapılan birçok çalışmada vasküler rekonstrüktif girişimler sonrası uzun dönemde intimal hiperplazi gelişimine bağlı restenoz oranları %20-50 gibi yüksek oranlarda bildirilmektedir (1,2,27).



Şekil 3 : Vasküler hasar sonrası intimal hiperplazi gelişim mekanizması

## **2.6. İntimal Hiperplazi Gelişim Hipotezleri :**

Vasküler endotel hasarı ve akım hemodinamiğindeki değişiklikler sonucu oluşan intimal hiperplazinin moleküler düzeyde gelişim mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bu yönde yapılan birçok in vitro ve in vivo çalışmalar sonucu intimal hiperplazi gelişimi açısından iki ana hipotez üzerinde durulmaktadır:

- 1) Hasara Karşı Yanıt
- 2) Adaptif-Reaktif Yeniden Şekillenme

### **2.6.1. Hasara Karşı Yanıt :**

Bu hipotezde; herhangi bir sebeple gelişen endotel hasarını takiben trombositlerin kümelenmesi ve degranülasyonu ile salınan birçok mitojenik faktörün tetiklediği düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde durulmaktadır (28). İn vivo ve in vitro birçok deneysel çalışmada farklı fiziksel veya kimyasal yöntemlerle oluşan endotel hasarı ile intimal hiperplazi gelişimi sağlanarak, verilen birçok ajan ile de bu patolojik süreç sınırlanmaya çalışılmıştır. Hayvan deneyi modellerinde olumlu sonuçlar alınmasına rağmen insanlar üzerinde kesin etkinliği kanıtlanmış bir çalışma yoktur.

### **2.6.2. Adaptif-Reaktif Yeniden Şekillenme :**

Kan akımı hemodinamiğindeki bölgesel veya sistemik değişimlerin damar duvarı üzerinde oluşturduğu yapısal ve/veya fonksiyonel değişikliklerin vurgulandığı bir diğer hipotez ise adaptif-reaktif yeniden şekillenme (reaktif-adaptive remodelling) hipotezidir (29). Hipertansiyon arterlerin duvar kalınlığında artışa yol açabilir. Kan basıncının bu etkisini açıklamak amacıyla verilebilecek en iyi örnek doğum sonrası aorta ve pulmoner arterin duvarlarında görülen değişikliklerdir. Bilindiği gibi intrauterin dönemde bu iki arterin basınçları eşittir. Ancak doğumu takiben yapılan ilk solunumun ardından fonksiyonel hale gelen akciğer dokusu ile birlikte pulmoner vasküler rezistans tedricen düşerken aort basıncında artış meydana gelir. Yüksek rezistanslı periferik arteriyel sisteme kan iletmeye çalışan aortanın duvar kalınlığı artar (30).

Darlık gösteren arterial patolojilerin giderilmesi ve kan akımının artırılması amacıyla uygulanan baypas greft, anjioplasti, endarterektomi gibi birçok işlem kan akımı hemodinamiğinde önemli değişikliklere yol açabilir. Akım dinamiğindeki bu

değişiklikler ise duvar kopma stresi (Wall shear stress), duvar gerilme stresi (Wall tensile stress), doku vibrasyonu ve komplansta önemli değişimlere yol açar. Oluşan bu yeni akım hemodinamiği ve bunun etkilediği yukarıdaki faktörler neticesinde düz kas hücre proliferasyonu-migrasyonu uyarılarak intimal hiperplazi formasyonu gelişebileceği varsayılmaktadır (29). Bununla birlikte akım hemodinamiğindeki değişikliklere adaptif amaçlı gelişen bu intimal kalınlaşmanın da tam olarak engellenebildiği bir klinik çalışma henüz mevcut değildir.

## **2.7. İntimal Hiperplazinin Fیزیopatolojisi :**

Vasküler patolojilerin tedavisi amacıyla uygulanan girişimsel veya cerrahi müdahaleler sonucu endotel tabakasında hasar gelişen ve/veya akım hemodinamiğinde önemli değişiklikler meydana gelen arterler veya arteryel sisteme implante edilen ven greftlerinin duvar yapılarında intimal hiperplazi ile sonuçlanabilen adaptif bir iyileşme süreci başlar. Arteryel sistemde bu patolojik süreç özellikle akım hemodinamiğinin ani değişikliğe maruz kaldığı bifurkasyon bölgeleri (karotid bifurkasyo), vasküler anastomoz alanları gibi yerlerde daha sık gözlenir (31).

Günümüzde aterosklerotik arteryel lezyonların baypas edilmesi amacıyla otojen ven greftleri hem koroner hem de periferik arteryel sisteme rutin olarak implante edilmektedirler. Ancak bu greftlerin açıklık oranları özellikle hayati önemi olan koroner arteryel sistemde arteryel greftler ile kıyaslandıklarında daha kötüdür (32,33). Erken dönemde oklüzyon sebebi daha çok teknik sebeplere bağlı tromboz gelişimidir. Orta ve uzun dönemde ise arteryel sisteme implante edilmiş olan ven greftleri maruz kaldıkları çeşitli travma ve hemodinamik değişikliklere yanıt olarak arteryalize olmaya çalışırlar. Ancak bu süreç her zaman kendini sınırlayamaz ve duvar kalınlaşması greft stenozlarına yol açabilir. Bu nedenle kullanılacak otojen ven greftlerinde sonradan gelişebilecek greft stenozu riskini azaltabilmek amacıyla dikkat edilecek birçok husus vardır. Venlerin duvar yapıları arterlerden farklıdır. Normalde venler arterlerden daha düşük basınçlı kan akımına maruz kalırlar ve bu nedenle venlerin duvarları arterlerden daha incedir. Bu özelliklerinden dolayı venler arteryel sisteme implante edildiklerinde maruz kaldıkları sistemik kan basıncına karşı arterler kadar dayanıklı olamayabilirler. Ayrıca ven duvarında lipid geri emilimi ve lipid yapımının daha fazla olmasının yanında lipid yıkımının da daha yavaş olması nedeniyle özellikle aterosklerotik,

hiperkolesterolemik hastalarda kullanılan ven greftlerinde uzun dönemde stenoz gelişme riski daha yüksektir. Ven greftlerinin arteriyel kan akımına karşı dayanıklı olabilmesi için bu greftlerin buldukları dokudan serbestleştirme aşamasından başlayan bir dizi önlemler altında çıkartılmaları ve arterlere anastomoz edilmeleri gerekir. Ven greftleri hazırlanırken mümkün olduğunca az travmatize edilmelidirler. Aşırı traksiyon ve çok yüksek basınçla dilatasyondan kaçınılmalıdır. Ven greftleri hazırlanırken cerrahi aletler ile endotel hasarı oluşturmamaya dikkat edilmelidir. Ven greftleri doku canlılıklarını olabildiğince koruyabilmeleri için in situ olarak içerisinde kendi kan akımı olacak şekilde hazırlanıp anastomoz aşamasından kısa bir süre önce kesilerek çıkarılabilir. Böylece ven greft dokusunun iskemik kalma süresi minimuma indirilerek arteriyel sisteme implante edildiğinde oluşabilecek iskemi-reperfüzyon hasarı azaltılmaya çalışılır. Hazırlanan greftlerin arteriyel sisteme anastomoz edilene kadar saklanma koşulları da greft korunmasında önem arzeder. % 0,9'luk sodyum klorür içeren basit solüsyonlar asidik pH'ya sahiptirler. Bu nedenle bu solüsyonlar içerisinde saklanan greftlerde endotel hasarı riski daha yüksektir. Ringer laktat gibi daha fizyolojik pH düzeylerine sahip solüsyonlar ve bunlara eklenebilecek heparin, papaverin gibi ajanlarla endotel hasarı ve erken dönem greft spazmı ve tromboz riski azaltılmaya çalışılabilir. Ven greftinin artere anastomozu sırasında anastomoz hattında sütürasyona ve aşırı gerginliğe bağlı gelişebilecek endotel hasarı da greftin açıklığını tehlikeye sokabilir (34-38).

## **2.8. İntimal Hiperplazinin Histopatolojisi :**

Herhangi bir hasara maruz kalmamış bir damar duvarının iç yüzeyi, üzerinde akan kan dokusu için antikoagülan bir yüzey oluşturan tek katlı endotel tabakası ile döşelidir. Bir embolektomi balon kateterinin arter lümeni içerisinde şişirilip çekilmesi, ileri derecede aterosklerotik bir artere uygulanan ve endotel tabakasının neredeyse tamamının çıkarıldığı endarterektomi prosedürü, kalıcı bir hemodiyaliz yolu oluşturmak amacıyla yapılan arteriovenöz fistül anastomozu, otojen ven greftleri ile yapılan baypaslar ve anjioplasti balon kateter-stent girişimleri gibi birçok vasküler girişim bu endotel tabakasının bütünlüğünü bozabilir. Neticede oluşan endotel hasarı ile başlayan ve salgılanan birçok mediatör ile tetiklenen bir dizi zincirleme reaksiyonlar sonrası düz kas hücrelerinin migrasyonu, proliferasyonu ve ekstraselüler matriks birikimi intimal

hiperplaziye yol açabilir. Endotel hasarını takiben öncelikle damar duvarının subendotelyal dokularının açığa çıktığı bu bölge trombosit tabakası ile örtülür. Daha sonra günler içerisinde trombositler rejenere olmuş endotel tabakası ile yer değiştirirler. Bu aşamada trombositler glikoprotein yapısındaki membran reseptörleri, fibrin, kollajen, trombospondin ve endotelden salgılanan von Willebrand faktör yardımı ile kendi adhezyonlarını tetiklerler. Kümelenen trombositler bu aşamadan sonra degranülasyon ile stoplazmalarında bulunan granüller içerisindeki Tromboxan A<sub>2</sub>, serotonin, ADP, PDGF, transforming growth faktör- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), epidermal growth faktör (EGF) gibi vazoaktif, trombotik ve mitojenik özellikli olan mediatörleri salgırlar. Bu aşamada endotel hasarı olan bölgeye doğru komşu intakt endotel sahalarından bir miktar endotel hücre göçü de olmaktadır. Trombositlerden salınan ve düz kas hücreleri ve endotel hücreleri için mitojenik özellikleri olan mediatörler yardımı ile öncelikle hasarlı damar duvarının mediasında bu mitojenik aktiviteye yanıt olarak düz kas hücre çoğalması meydana gelir. Ardından bu çoğalan düz kas hücreleri intimaya doğru göç eder ve bol miktarda ekstraselüler matriks proteini üretirler. Endotel ve düz kas hücrelerinde depolanan basic fibroblast growth faktör (bFGF) endotel hasarına yanıt olarak salınarak medial düz kas hücre proliferasyonunu tetikler (39-42). bFGF antikorları kullanılan deneysel çalışmalarda düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonun baskılanabildiği tespit edilmiştir (43).

Birçok deneysel çalışmada; farklı cerrahi ve kateter teknikleri ile endotel hasarı veya akım hemodinamiğinde değişiklikler oluşturularak tetiklenen intimal hiperplazi oluşumunu baskılayabilmek amacıyla çeşitli tedavi yöntemleri denenmiştir. Antiagregan etkili ilaç tedavilerinden gen transferine kadar değişen geniş bir yelpazede kullanılan birçok yöntem ile hayvan deneylerinde olumlu sonuçlar alınmıştır. İn vivo ve in vitro düzeyde yapılan deneysel çalışmalarda intimal hiperplazi ve restenozu azaltmak amacıyla kullanılan farmakolojik ajanlar etki mekanizmalarına göre Tablo II'de sıralanmıştır.

**Tablo II:** Deneysel çalışmalarda intimal hiperplazi ve restenoz gelişimini engellemek amacıyla kullanılan bazı ajanlar

<b><u>FARMAKOLOJİK AJANLAR</u></b>	<b><u>ETKİ MEKANİZMASI</u></b>
<b>Antiplateletler:</b> Asetilsalisilik asit, Klopidoğrel, Dipiridamol, Tiklopidin	Trombosit fonksiyonlarının inhibisyonu
<b>Antikoagülanlar:</b> Warfarin, Heparin, Enoxoparin, Hirudin, Argatroban	Koagülasyon kaskadının inhibisyonu
<b>ACE inhibitörleri:</b> Cilazapril, Enalapril, Kaptopril	Düz kas hücrelerine antiproliferatif ve vasküler recoil-remodelingi engelleyici etki
<b>Virüsler:</b> Virulansı zayıflatılmış HSV-1	Düz Kas Hücrelerine Sitotoksik Etki
<b>Antioksidanlar:</b> Probuçol, Ascorbic asid, $\alpha$ -Tocopherol	Lipid oksidasyonu ve reaktif oksijen moleküllerinin inhibisyonuyla endotel koruyucu etki
<b>Balık Yağları:</b>	PDGF ve diğer sitokinlerin üretiminin, platelet agregasyonunun engellenmesi
<b>Radyoterapi:</b> Eksternal Radyoterapi, Brakiterapi	Sitotoksik, antiproliferatif etki
<b>Kalsiyum Kanal Antagonistleri:</b> Diltiazem, Verapamil, Nifedipin	Düz kas hücreleri üzerine vasküler recoil-remodelingi engelleyici etki
<b>İmmünsüpresif-Antiinflamatuvarlar:</b> Kortikosteroidler, Kolşisin, Tacrolimus, Siklosporin, Rapamicin, Tranilast	Düz kas hücreleri üzerine antiproliferatif etki, sitokin üretiminin engellenmesi
<b>Antineoplastik:</b> Paclitaxel	Antiproliferatif etki
<b>Angiopeptin:</b>	Growth hormon salınımının inhibisyonu
<b>Antisense Oligonükleotidler:</b>	Büyüme faktörlerinin inhibisyonu ile antiproliferatif etki
<b>HMG-koA Redüktaz İnhibitörleri:</b> Atorvastatin, Pravastatin, Lovastatin	Antiinflamatuvar, antiproliferatif, antiagregan, direk endotel koruyucu etki



Biz de deney protokolümüzde kullanacağımız farmakolojik ajanların seçiminde klinik pratikte kullanımıyla önemli yan etkileri olabilecek ajanlardan ziyade (antineoplastik, immünsüpresif, radyoterapi) aterosklerotik vasküler patolojiler nedeniyle cerrahi ve girişimsel yöntemlerle tedavi edilen hastalarda rutin kullanımına girmiş veya girebilecek ajanları (klopidogrel, kalsiyum dobesilat, nebivolol ve atorvastatin) tercih ettik.

## **2.9. Deney Protokolünde Kullanılan Farmakolojik Ajanlar:**

### **2.9.1. Klopidogrel :**

Tienopiridin grubundan selektif, irreversible bir ADP reseptör antagonistidir. Aynı gruptan olan ticlopidine kıyasla daha hızlı/yüksek etkinlik ve daha az yan etkiye (nötropeni, agranülositoz) sahiptir. Klinikte; iskemik akut koroner sendromların engellenmesi ve tedavisinde, koroner arterler başta olmak üzere aterosklerotik vasküler lezyonların balon anjioplasti-stent veya cerrahi müdahale (endarterektomi, baypas greft) ile tedavisi sonrası restenozların engellenmesinde, iskemik serebrovasküler olayların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Oral yolla alımı sonrası hızla emilir, antitrombotik etkisi 3-7 günde tam olarak oluşur. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %98'dir. Karaciğerden hızlıca metabolize olur. Yaklaşık olarak eşit oranda idrar ve feçesle atılır. Gastrointestinal sistem üzerine yan etkileri asetilsalisilik asite kıyasla oldukça azdır. Karaciğer yetmezliği olan hastalarda kullanılmamalıdır (44-46).

### **2.9.2. Kalsiyum Dobesilat :**

Kalsiyum dobesilat; klinikte kronik venöz yetmezlik, diyabetik retinopati ve mikroanjiopatilerin tedavisinde kullanılan sentetik bir ilaçtır. Ayrıca yapılan çalışmalarda antioksidan, endotel fonksiyonlarının regülasyonu ve antiagregan etkilerinin de olduğu gösterilmiştir. Antioksidan etkisi ile kapiller permeabiliteyi azaltır, lenfatik drenajı artırır ve ayrıca kan viskozitesini azaltır. Deneysel çalışmalarda nitrik oksit sentaz aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir. Kalsiyum dobesilat antiagregan etkinliğini adenilat siklaz enziminin aktivasyonu ile siklik adenosin monofosfat (cAMP) üzerinden gerçekleştirebilmektedir. Oral yolla alınımını takiben 6 saatte plazma pik seviyesine ulaşır. Kalsiyum dobesilatın yarılanma ömrü 5 saattir. Metabolize olmadan idrar yolu ile atılır (47,48).

### **2.9.3. Nebivolol :**

3. kuşak selektif, lipofilik bir  $\beta$ -blokerdir. Diğer klasik  $\beta$ -blokerlerden farklı olarak daha yüksek selektif etkinliği olan  $\beta_1$  adrenerjik reseptör antagonistidir. İntrinsik sempatomimetik aktivitesi ve membran stabilize edici özellikleri yoktur. Vasküler NO salınımını artırarak vazodilatasyon yapar. Ayrıca endotelin-1 salınımını azaltır. Esansiyel hipertansiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Oral yoldan emilimi hızlıdır ve ortalama 1 saatte plazma seviyesi pik değerine ulaşır. %90'nın üzerinde plazma proteinlerine bağlanabilme özelliği vardır. İlacın tama yakın bir kısmı birkaç gün içerisinde feçes ve idrar ile atılır. Antianjinal, antiaritmik ve sol ventrikül fonksiyonlarını koruyucu etkileri olduğu tespit edilmiştir. Yapılan birçok deneysel çalışmada nebivololün vazodilatör etkinliğinin yanında vasküler düz kas hücre proliferasyonunu da engellediği tespit edilmiştir (49,50).

### **2.9.4. Atorvastatin :**

Atorvastatin sentetik, lipofilik bir statindir. Diğer statinler gibi hidroksimetilglutaril ko-enzimA (HMG-koA) redüktaz inhibitörüdür. Hiperkolesterolemi tedavisinde etkinliği kanıtlanmış bir ajandır. Düşük dansiteli lipoprotein (LDL)-kolesterol başta olmak üzere total kolesterol, çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL)-kolesterol, trigliserid düzeylerini düşürmesinin yanı sıra yüksek dansiteli lipoprotein (HDL)-kolesterol düzeylerini de artırır. Oral yolla alınımını takiben %30'u emilir. Biyoyararlanımı %14'tür. %90'a yakın oranlarda plazma proteinlerine bağlanır. Atorvastatin sitokrom P450 enzim sistemi ile metabolize edilir ve kısmen etkili orto-parahidroksillenmiş aktif metabolitlerine dönüştürülür. Karaciğer yetmezliği olan hastalarda doz azaltılması önerilir. Atorvastatin dahil diğer statinlerle yapılan birçok çalışmada bu ilaçların kardiovasküler sistem üzerine koruyucu etkilerinin sadece plazma kolesterol seviyelerini düşürücü etkilerine bağlı olmadığı, bunun yanında birçok pleiotropik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu ilaçların başlıca pleiotropik etkileri şunlardır: LDL oksidasyonu üzerine etki, antiinflamatuvar etki (C-reaktif protein düzeylerini azaltır), plak stabilizasyonu, endotel üzerine direk etki (NO salınımını artırır, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltır), düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine etki, trombotik faktörler (NO sentaz aktivitesini tetikleyerek trombosit agregasyonunu inhibe eder), tümör büyümesi üzerine etki, immün sistem üzerine etki (51-54).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi (OMÜ) Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde, ağırlıkları 2500-3000gr arasında değişen 40 adet Yeni Zellanda cinsi sağlıklı erkek tavşan üzerinde gerçekleştirilmiştir. OMÜ araştırma fonunca desteklenen ve OMÜ Deney Hayvanları Etik Kurul onayı ile gerçekleştirilen bu çalışmada kullanılan hayvanların temini ve çalışma süresi boyunca bakımı üniversitemiz tıbbi ve cerrahi araştırma merkezince sağlanmıştır. Deneklerin bakımı; yeterli güneş ışığı alabilen, ortalama 20°C sıcaklıkta, aktif havalandırma tertibatı olan odalarda ve özel kafeslerde yapıldı. Denekler rastgele seçilerek her grupta 8 adet tavşan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

#### **Grup 1 ( Kontrol grubu, n=8):**

Bu gruptaki 8 tavşanda eksternal ligasyon ile karotis arter oklüzyonu oluşturularak bunun proksimali ve distali arasındaki karotis arter segmentinde jügüler ven grefti kullanılarak venöz baypas greft modeli oluşturuldu. 4 hafta boyunca takip edilen deneklere herhangi bir ilaç verilmedi.

#### **Grup 2 ( Klopidoğrel grubu, n=8):**

Grup 1'deki gibi oluşturulan karotis arter oklüzyonunu takiben jügüler ven grefti ile karotid-karotid venöz baypas greft modeli oluşturulan bu gruptaki deneklere postoperatif ilk günden itibaren 4 hafta boyunca günde bir kez gavaj şeklinde oral yolla 2,5 mg/kg klopidoğrel (Plavix, Sanofi-Aventis) verildi.

#### **Grup 3 ( Kalsiyum Dobesilat grubu, n=8):**

Grup 1'deki gibi oluşturulan karotis arter oklüzyonunu takiben jügüler ven grefti ile karotid-karotid venöz baypas greft modeli oluşturulan bu gruptaki deneklere postoperatif ilk günden itibaren 4 hafta boyunca günde bir kez gavaj şeklinde oral yolla 100 mg/kg kalsiyum dobesilat (Doxium, Abdi İbrahim) verildi.

**Grup 4 ( Nebivolol grubu, n=8):**

Grup 1'deki gibi oluşturulan karotis arter oklüzyonunu takiben jüğüler ven grefti ile karotid-karotid venöz baypas greft modeli oluşturulan bu gruptaki deneklere postoperatif ilk günden itibaren 4 hafta boyunca günde bir kez gavaj şeklinde oral yolla 0,5 mg/kg nebivolol ( Vasoxen, İ.E. Ulagay) verildi.

**Grup 5 (Atorvastatin grubu, n=8):**

Grup 1'deki gibi oluşturulan karotis arter oklüzyonunu takiben jüğüler ven grefti ile karotid-karotid venöz baypas greft modeli oluşturulan bu gruptaki deneklere postoperatif ilk günden itibaren 4 hafta boyunca günde bir kez gavaj şeklinde oral yolla 2,5 mg/kg atorvastatin (Ator, Sanovel) verildi.

**3.1. Anestezi Tekniği:**

Tüm deneklere anestezik etkili intravenöz 10mg/kg Ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı) ve kas gevşetici olarak intramüsküler 3mg/kg Xylazine (Rompun, Bayer) yapılarak anestezi sağlandı. Ortalama 2,5 saat olan operasyon süresi boyunca yaklaşık 40 dakikada bir ilaç dozlarının yarısı tekrarlandı. Cilt insizyonunu takiben tüm tavşanlara tek doz intravenöz 150 U/kg heparin (liquemine flk., Roche) ve tek doz intramüsküler 10mg/kg Cefazolin-Na (Cefamezin, Eczacıbaşı) uygulandı.

**3.2. Cerrahi Teknik:**

Tavşanlar yukarıda belirtilen şekilde yapılan anestezi uygulamasını takiben supine pozisyonda ve servikal ekstansiyonda ameliyat masasına tespit edildi. Deneklerin boyun bölgelerinde elektrikli traş makinesi ile gerekli temizlik yapıldı. Polyvinylpyrrolidone iod (Batticon, Adeka) ile uygun asepsi ve antisepsi sağlandı. Steril şartlar altında; boyun bölgesinde karotis arter ve jüğüler vene ulaşabilmek amacıyla orta hattın 1,5 cm sağ lateralinden 5 cm'lik vertikal cilt kesisi yapıldı. Hassas doku makası kullanılarak yapılan diseksiyon ile servikal fascia geçilerek jüğüler ven ve bunun hemen medialinde karotis artere ulaşıldı. Her iki damarın yakın komşuluğundaki önemli nörolojik yapılar korundu. Jüğüler venin serbest greft olarak kullanılacağı segmentteki yan dalları 4/0 serbest ipek sütürler ile bağlanarak kesildi. Jüğüler ven greftinin uzunluğu minimum 2,5 cm olacak şekilde arteriotomi ve venotomi lokalizasyonları

belirlendi. Ardından ılık serum fizyolojik ile ıslatılmış ince serbest ipek sütürler ile proksimalde ve distalde arter ile ven çift kat dönülerek asıldı. İris bistürisi ve potts makası yardımı ile öncelikle proksimalde yaklaşık 3 mm uzunluğunda arteriotomi ve venotomi yapıldı. Ardından 9/0 polipropilen sütür kullanılarak proksimalde jügüler ven karotis artere uę-yan anastomoz edildi. Klempaj amaçlı dönülen ipek sütürler gevşetilerek karotis arterden jügüler ven grefti iğerisine pulsatil kan akımının geğişi kontrol edildi. Ardından tekrar askı sütürleri gerildi ve distalde de jügüler ven karotis artere aynı şekilde uę-yan anastomoz edildi. Uygun şekilde hava çıkarımını takiben askı sütürleri gevşetildi. Kanama kontrolü yapıldı. Jügüler ven grefti üzerinde alınan pulsasyon kontrol edildi ve her iki anastomozun ortasındaki segmentte karotis artere 4/0 serbest ipek sütür ile eksternal ligasyon uygulandı. Tekrar jügüler ven grefti ve distal anastomoz sonrası segmentteki karotis arter üzerinde yeterli pulsasyon olduğu kontrol edildi. Ciltaltı dokusu ve cilt insizyonu uygun şekilde kapatıldı. Operasyon sonunda tüm denekler ortalama 3 saat süreyle normal hareket kabiliyetlerini yeniden kazanana kadar hipotermiden korunarak izole edildi.

Kontrol Grubu dışındaki tüm tavşanlara postoperatif 5. saatten itibaren günde bir kez gavaj şeklinde oral yolla iğme sularına karıştırılan ilaçlar verildi. Postoperatif 3 gün süreyle bütün tavşanlara Batticon ile yara pansumanı yapıldı. Deneklere günlük vizitler yapılarak genel aktivite düzeyleri, insizyon yerleri ve beslenmeleri kontrol edildi. Ayrıca günlük vizitlerde insizyon sahalarında elle ve mini doppler cihazı ile pulsasyon kontrolü yapıldı.

Jügüler ven baypas greftlerinin akımlarını demonstratif olarak gösterebilmek amacıyla kontrol grubundan 1 tavşana karotis arteriografi ve klopidogrel-atorvastatin gruplarından 1'er tavşana arteryel doppler ultrasonografi yapıldı.

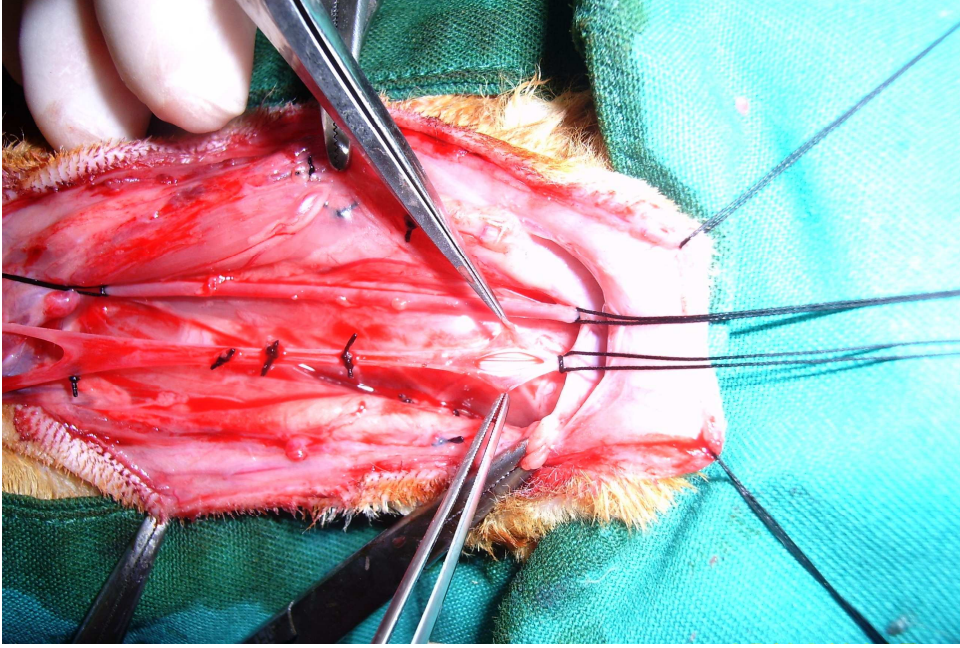


**Şekil 4:** Operasyonda kullanılan cerrahi aletler

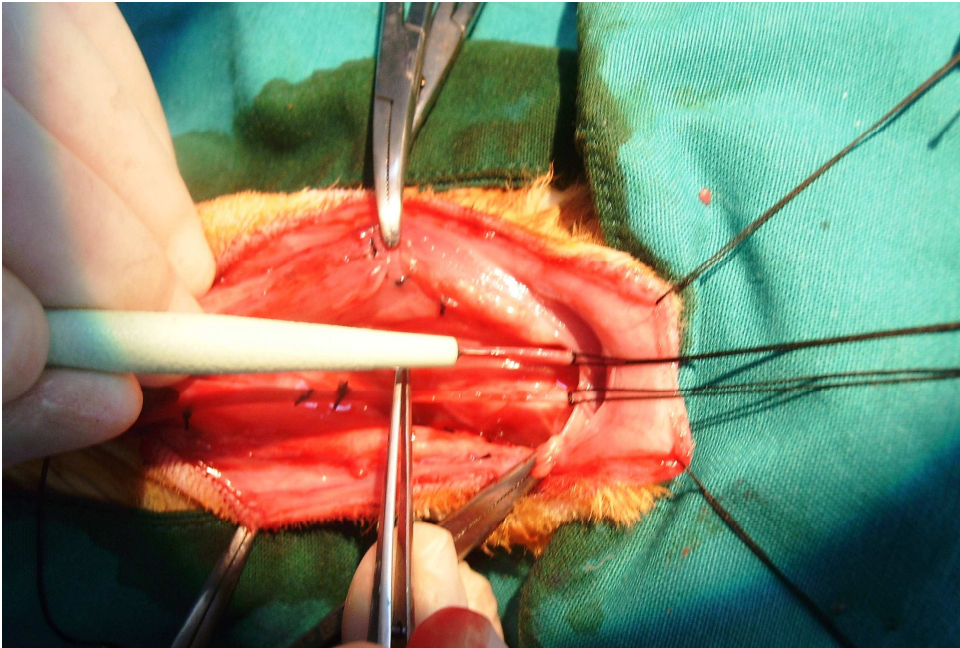


**Şekil 5:** Operasyon esnasında deneğin pozisyonu ve cilt insizyonu

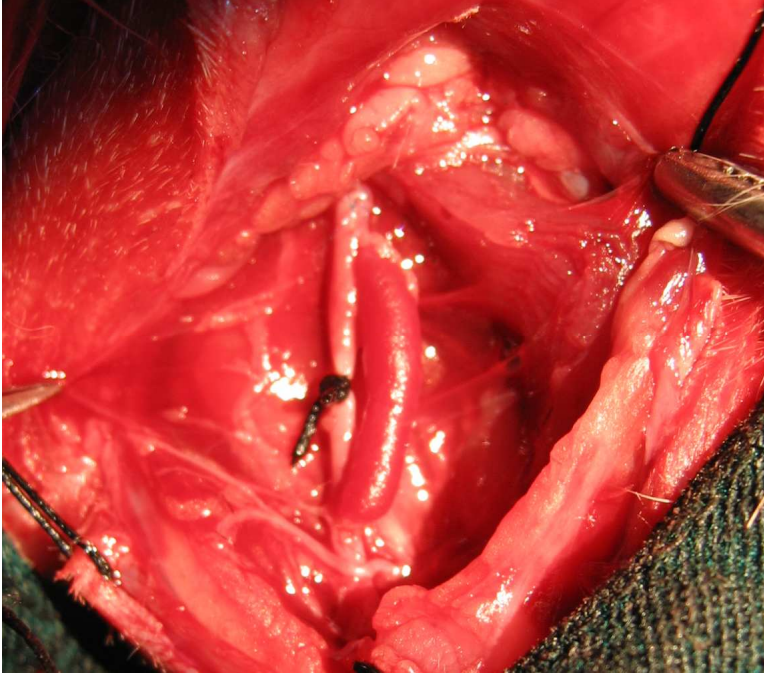




**Şekil 6:** Üstte dönülmüş karotis arter ve altta venotomi yapılmış jüğüler ven



**Şekil 7:** İris bistürisi ile yapılan proksimal karotis arteriotomi



**Şekil 8:** Operasyon sonunda venöz baypas greft modeli

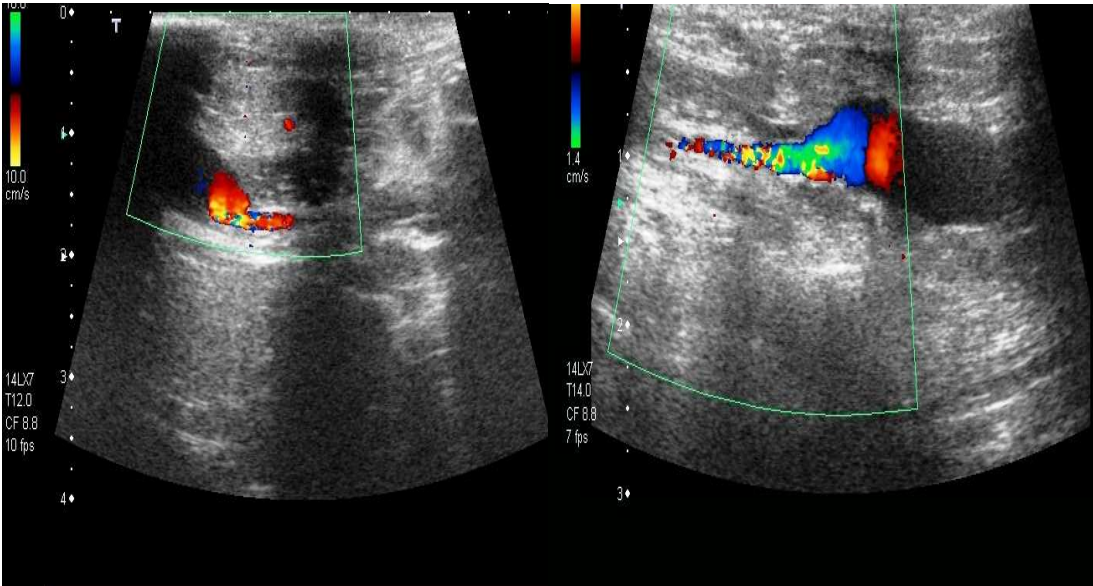


**Şekil 9:** Postoperatif 28. günde arterialize olmuş jügüler ven grefti

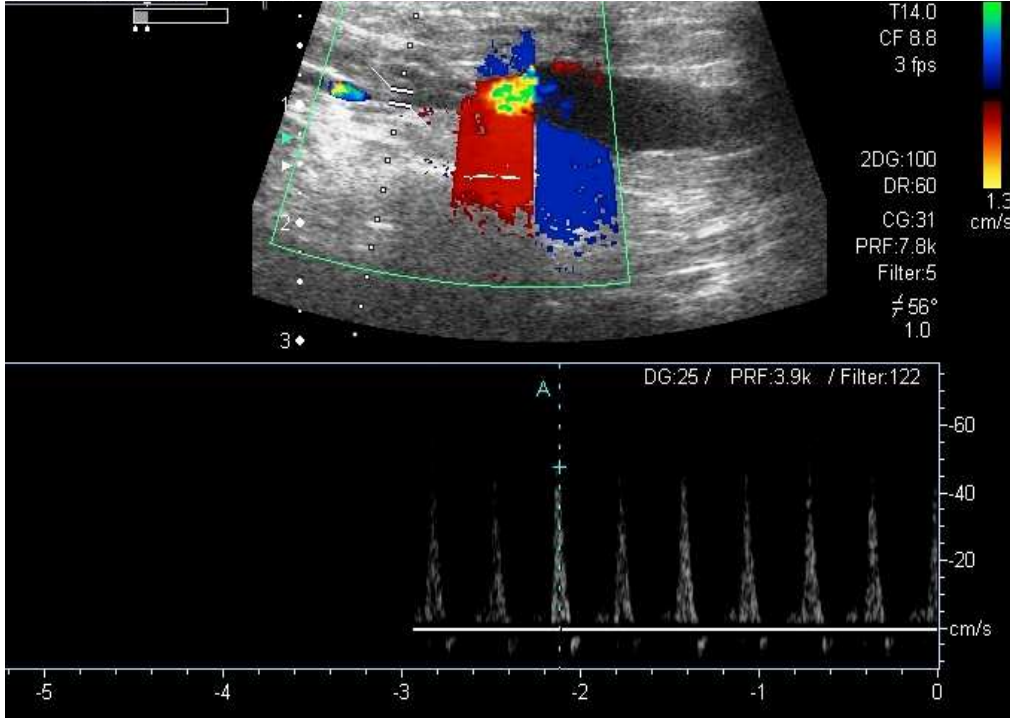




**Şekil 10:** Karotis arteriografide; proksimal karotis artere verilen kontrast madde venöz baypas greft vasıtasıyla distal karotis arteryel sistemi doldurmakta



**Şekil 11:** Doppler USG'de proksimal ve distal anastomozdan geçen akımlar



**Şekil 12:** Doppler USG’de ven greftinden distal karotis artere geçen arteriyel kan akımı paterni

### 3.3. Histopatolojik İnceleme:

Postoperatif 4. haftanın sonunda bütün deneklere aynı şekilde genel anestezi uygulanarak boyun bölgesindeki eski insizyonları daha geniş bir alanda tekrar açıldı. Arterialize olmuş pulsatil jüğüler ven greftlerinin kolaylıkla palpe edilebildiği görüldü. Dikkatli bir diseksiyon ile yapışıklıklar giderilerek anastomozların 1’er cm öncesi ve sonrasında karotis arter ve jüğüler ven greftleri serbestleştirildi. Akımlar kontrol edildi. Her iki anastomoz hattının uzağından karotis arter bağlandı. Daha sonra venöz baypas greft modeli geniş bir damar sinir paketi şeklinde çıkartıldı. Denekler sakrifiye edildi. Proksimal anastomoz öncesindeki karotis arter lümeni içerisinde %10’luk formaldehit infüzyonu ile lümenler irriga edildi. Venöz baypas greft modelini içeren damar sinir paketlerinden alınan doku örnekleri 24 saat tamponlanmış nötral formalinle tespit edildi. Parafin bloklar hazırlandı. 4-6 µm’lik kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen Eozin, Verhoff’un elastik boyası ile boyandı. Preperatlar renkli video kameralı ve bilgisayar destekli mikroskop (Zeiss, Axiophot, Germany) altında incelendi. Image Analysis System programı kullanılarak damar lümeni ile internal elastik lamina arasında

kalan damar duvarı tabakası intimal kalınlık olarak ölçüldü. İnternal ve eksternal elastik laminalar arasındaki damar duvarı tabakası medial kalınlık olarak ölçüldü ve intima / media oranları hesaplandı.

#### **3.4. İstatistiksel Analiz:**

5 grupta toplam 40 adet denekten alınan veriler kaydedildi. Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Verilerin değerlendirilmesinde SPSS ( The Statistical Package for Social Scienses) 10.0 istatistik paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki farkların karşılaştırılmasında Kruskal Vallis varyans analiz testi kullanıldı ve  $P<0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grupların kendi aralarındaki ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi kullanıldı.  $P<0.01$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Denekler postoperatif 28 gün takip edilerek çalışma tamamlandı. Deneklerin tamamı uygulanan anestezi protokolünü tolere ettiler. Postoperatif takiplerde deneklerin hiçbirinde yara yerlerinde müdahale gerektirecek bir hematoma veya enfeksiyon bulgusuna rastlanılmadı. Nebivolol grubundan bir tavşan intraoperatif kanama sebebiyle kaybedildi ve 1 yeni denek eklenerek çalışmaya devam edildi. Çalışma protokolü oluşturma aşamasında literatür taraması yapılarak kullanılacak farmakolojik ajanların denekler tarafından tolere edilebileceği ve yeterli etkinliğe sahip olabileceği düşünülen ilaç dozları hesaplandı. Nebivolol grubundaki tüm tavşanlar günlük 0,5mg/kg ilaç dozunu tolere ettiler. Kalsiyum dobesilat grubundaki deneklerin tamamı günlük 100mg/kg ilaç dozunu tolere ettiler. Ancak atorvastatin ve klopidogrel tedavisi uygulanan deneklerden her iki gruptaki ilk 2 denek postoperatif 3. günde iştahsızlık, günlük aktivitelerinde belirgin yavaşlama ve diare bulgularını takiben kaybedildi. Yapılan postmortem incelemelerde bu 4 deneğin tümünün karaciğer dokusunda makroskobik ve mikroskobik düzeyde multipl nonspesifik nekroz alanları saptandı. Bu patolojik bulgular dışında ise diğer organlarda mortalite sebebi olabilecek bir patolojiye rastlanılmadı. Bu 4 deneğin ilaç intoksikasyonuna bağlı karaciğer yetmezliği ile kaybedildiği düşünüldü. Bunun üzerine günlük 10mg/kg olan klopidogrel ve atorvastatin dozları 2.5 mg/kg'a düşüldü. Çalışmaya dahil edilen 4 yeni denek ile birlikte diğer denekler de bu ilaç dozlarını tolere ettiler. Mortalite gözlenen 5 deneğin yerine çalışmaya dahil edilen yeni denekler dahil toplam 40 denek ile çalışma protokolü postoperatif 28. günün sonunda tamamlandı. Günlük vizitlerle deneklerin greft akımları elle ve mini el doppleri ile kontrol edildi. Kontrol grubu, atorvastatin grubu, klopidogrel grubu ve kalsiyum dobesilat grubundan 1'er adet olmak üzere toplam 4 denekte greft oklüzyonu olduğu tespit edildi. Nebivolol grubunda ise 28. günün sonunda hiç greft oklüzyonu gözlenmedi. Toplam 40 adet venöz baypas greftinin 4. haftanın sonunda açıklık oranları % 90 idi.

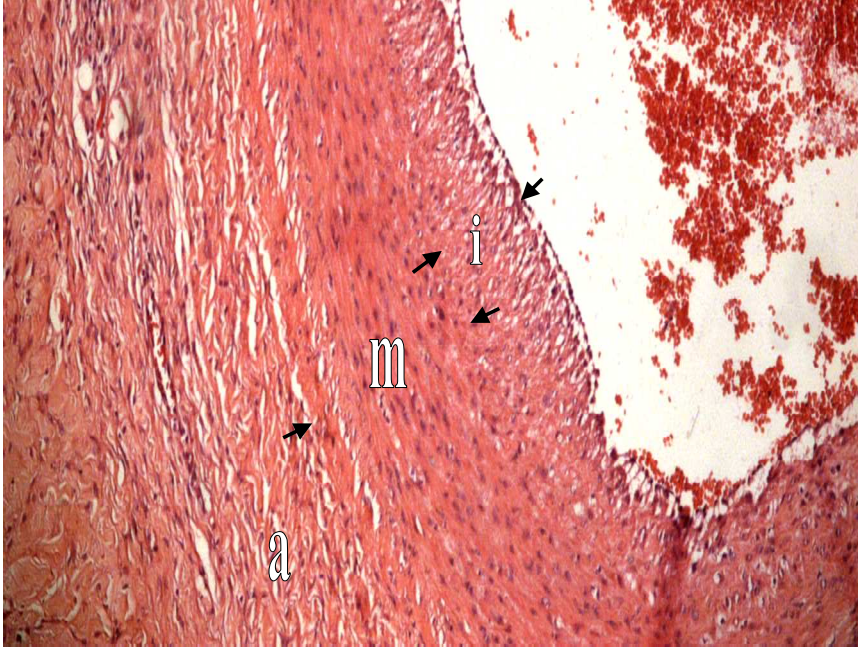
İntimal kalınlıklar; Grup 1'de  $95.12 \pm 9.93 \mu\text{m}$ , Grup 2'de  $42.87 \pm 6.95 \mu\text{m}$ , Grup 3'de  $46.50 \pm 9.02 \mu\text{m}$ , Grup 4'de  $34.12 \pm 5.64 \mu\text{m}$  ve Grup 5'de  $48.37 \pm 6.16 \mu\text{m}$  olarak ölçüldü (Tablo III). Yapılan ikili karşılaştırmalarda farmakolojik tedavi uygulanan Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'in intimal kalınlıklarının Grup 1'e göre

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi (p=0.001) (Tablo IV). Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'in kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırmalarda Grup 4'ün intimal kalınlıklarının Grup 3 (p=0.007) ve Grup 5'e göre (p=0.002) anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi .

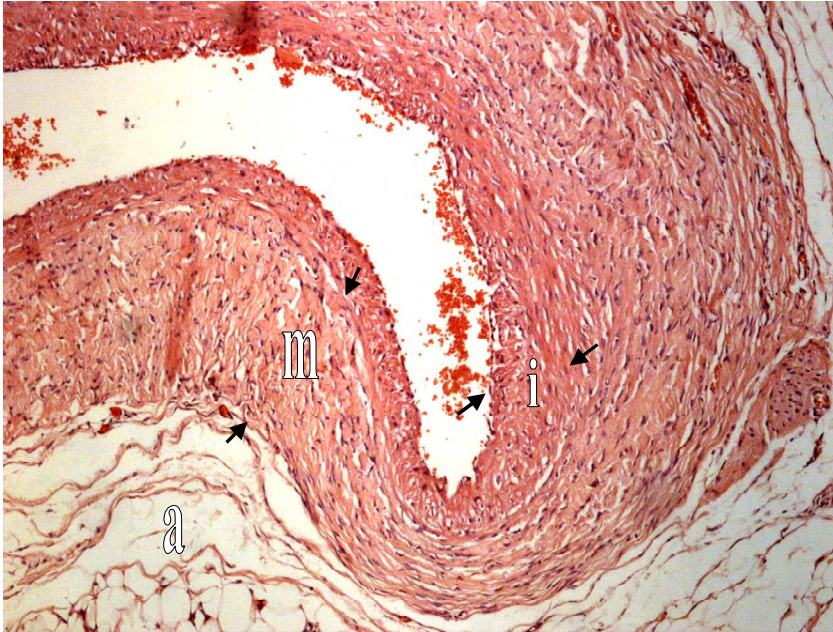
Medial kalınlıklar; Grup 1'de  $126.62 \pm 13.53 \mu\text{m}$ , Grup 2'de  $94.00 \pm 6.00 \mu\text{m}$ , Grup 3'de  $101.50 \pm 13.52 \mu\text{m}$ , Grup 4'de  $90.50 \pm 9.69 \mu\text{m}$ , Grup 5'de  $101.37 \pm 7.99 \mu\text{m}$  olarak ölçüldü (Tablo III). Grup 2, Grup 4 ve Grup 5'in medial kalınlıklarının Grup 1 ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi (p=0.001). İstatistiksel olarak diğer gruplara nazaran daha az anlamlı olmakla beraber Grup 3'ün medial kalınlıklarının da Grup 1'e göre anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi (p=0.009) (Tablo V). Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'in medial kalınlıklar açısından kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırmalarda gruplar arasında anlamlı düzeyde fark olmadığı tespit edildi.

İntima / media oranları; Grup 1'de  $0.75 \pm 0.097$ , Grup 2'de  $0.46 \pm 0.099$ , Grup 3'de  $0.46 \pm 0.096$ , Grup 4'de  $0.37 \pm 0.030$ , Grup 5'de  $0.47 \pm 0.064$  olarak ölçüldü (Tablo III). Grup 2, Grup 4 ve Grup 5'in intima / media oranlarının Grup 1 ile kıyaslandığında anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi (p=0.001) Diğer tedavi gruplarına nazaran daha az anlamlı olmakla beraber Grup 3'ün intima / media oranlarının da Grup 1'e göre anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi (p=0.002) (Tablo VI). Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5'in kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırmalarda sadece Grup 4'ün intima / media oranlarının Grup 5'e (p=0.002) göre anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi.



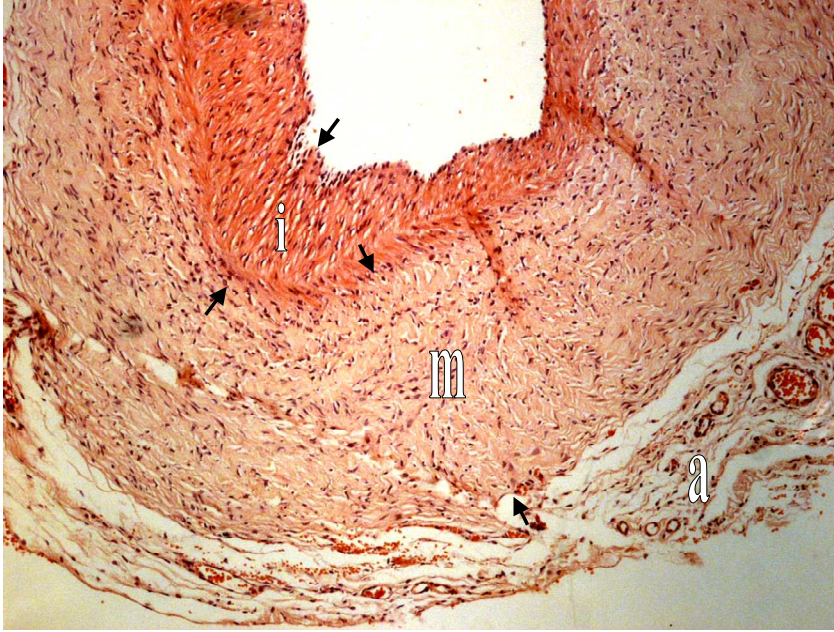


**Şekil 13:** Kalsiyum Dobesilat grubu (Hematoksilen Eozin x10)  
(i: intima, m: media, a: adventisya)



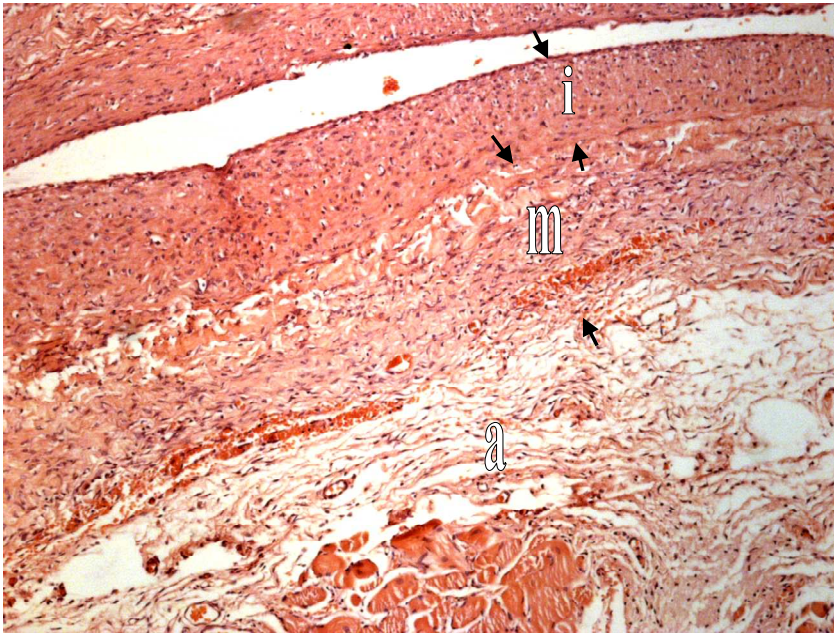
**Şekil 14:** Atorvastatin grubu (Hematoksilen Eozin x10)  
(i: intima, m: media, a: adventisya)





**Şekil 15:** Kontrol grubu (Hematoksilen Eozin x10)

(i: intima, m: media, a: adventisya)



**Şekil 16:** Klopidoğrel grubu (Hematoksilen Eozin x10)

(i: intima, m: media, a: adventisya)



**Şekil 17:** Nebivolol grubu (Hematoksilen Eozin x10)

(i: intima, m: media, a: adventisya)

**Tablo III:** Tüm grupların ortalama intima ve media kalınlıkları, intima / media oranları

GRUPLAR	İntima ( $\mu\text{m}$ )	Media ( $\mu\text{m}$ )	İntima / Media
Grup1 (Kontrol)	$95.12 \pm 9.93$	$126.62 \pm 13.53$	$0.75 \pm 0.097$
Grup 2 (Klopidogrel)	$42.87 \pm 6.95$	$94.00 \pm 6.00$	$0.46 \pm 0.099$
Grup 3 (K.Dobesilat)	$46.50 \pm 9.02$	$101.50 \pm 13.52$	$0.46 \pm 0.096$
Grup 4 (Nebivolol)	$34.12 \pm 5.64$	$90.50 \pm 9.69$	$0.37 \pm 0.030$
Grup 5 (Atorvastatin)	$48.37 \pm 6.16$	$101.37 \pm 7.99$	$0.47 \pm 0.064$



**Tablo IV :** Kontrol grubunun intimal kalınlıklarının diğer gruplarla karşılaştırılması

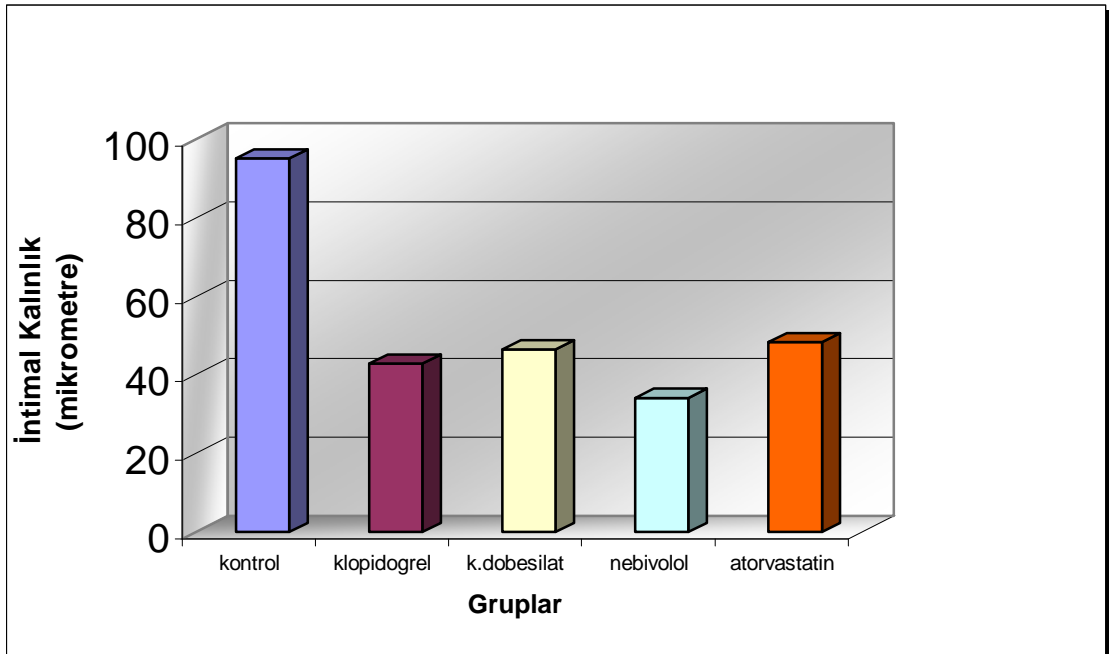
<b>GRUPLAR</b>	<b>İntima (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Kontrol Grubu ile Karşılaştırma (P değeri)</b>
Grup1 (Kontrol)	95.12 $\pm$ 9.93	
Grup 2 (Klopidogrel)	42.87 $\pm$ 6.95	P = 0.001
Grup 3 (K.Dobesilat)	46.50 $\pm$ 9.02	P = 0.001
Grup 4 (Nebivolol)	34.12 $\pm$ 5.64	P = 0.001
Grup 5 (Atorvastatin)	48.37 $\pm$ 6.16	P = 0.001

**Tablo V:** Kontrol grubunun medial kalınlıklarının diğer gruplarla karşılaştırılması

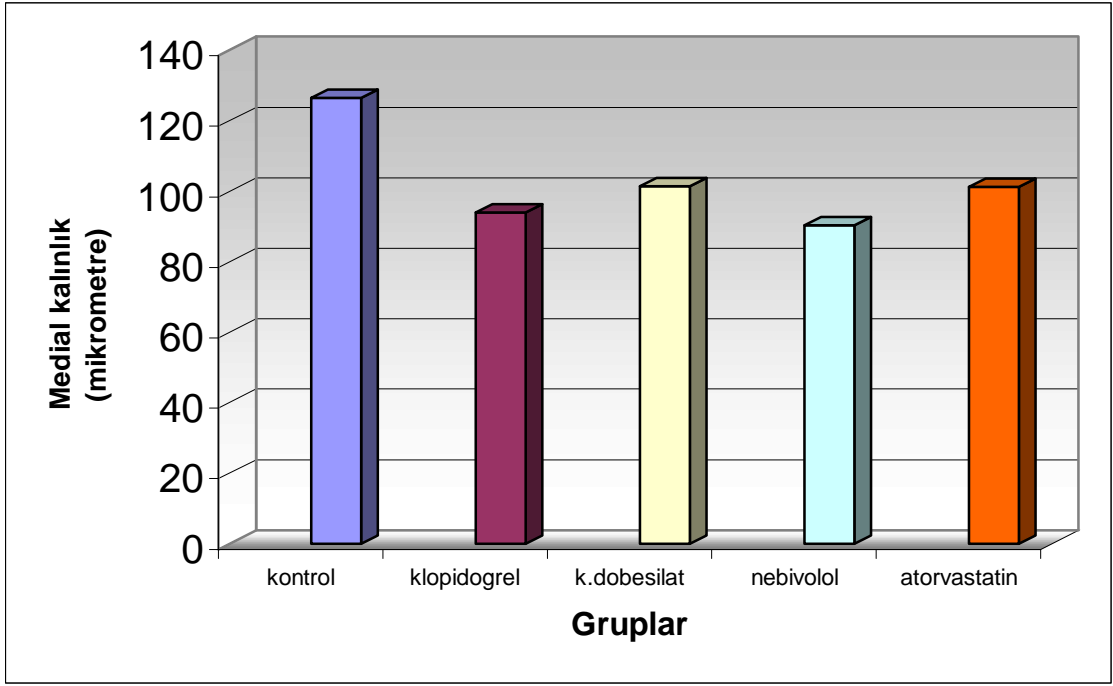
<b>GRUPLAR</b>	<b>Media (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Kontrol Grubu ile Karşılaştırma (P değeri)</b>
Grup1 (Kontrol)	126.62 $\pm$ 13.53	
Grup 2 (Klopidogrel)	94.00 $\pm$ 6.00	P = 0.001
Grup 3 (K.Dobesilat)	101.50 $\pm$ 13.52	P = 0.009
Grup 4 (Nebivolol)	90.50 $\pm$ 9.69	P = 0.001
Grup 5 (Atorvastatin)	101.37 $\pm$ 7.99	P = 0.001

**Tablo VI:** Kontrol grubunun intima / media oranlarının diğer gruplarla karşılaştırılması

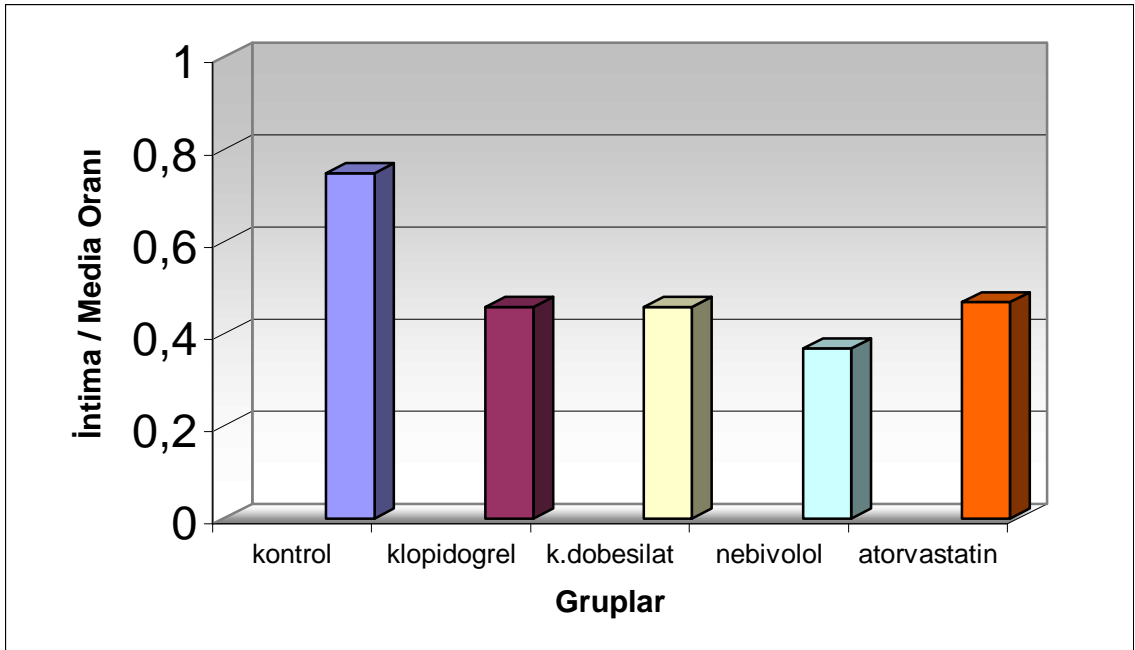
<b>GRUPLAR</b>	<b>İntima / Media</b>	<b>Kontrol Grubu ile Karşılaştırma (P değeri)</b>
Grup1 (Kontrol)	0.75 ± 0.097	
Grup 2 (Klopidogrel)	0.46 ± 0.099	P = 0.001
Grup 3 (K.Dobesilat)	0.46 ± 0.096	P = 0.002
Grup 4 (Nebivolol)	0.37 ± 0.030	P = 0.001
Grup 5 (Atorvastatin)	0.47 ± 0.064	P = 0.001



**Şekil18:** Tüm grupların intimal kalınlıklarının karşılaştırılması



Şekil 19: Tüm grupların medial kalınlıklarının karşılaştırılması



Şekil 20: Tüm grupların intima / media oranlarının karşılaştırılması

## 5. TARTIŞMA

Tıkayıcı damarsal patolojilerin giderilebilmesi amacıyla çeşitli girişimsel ve cerrahi tedavi yöntemleri günümüzde birçok merkezde başarıyla uygulanabilmektedir. Ancak bu vasküler rekonstrüktif tedavi yöntemlerinin başarı oranları erken-geç dönemde gelişebilecek tromboz ve restenoza bağlı olarak azalmaktadır. Perkütan translüminal koroner anjioplasti uygulanan hastalarda 6 ay içerisinde restenoz görülme oranı yaklaşık %30-40'dır (55). Restenoz gelişimini engellemek amacıyla geliştirilen ilaç kaplı stent uygulamalarını içeren geniş hasta katılımlı çalışmalarda, restenoz oranlarının azalmakla beraber halen %6-20 civarında olduğu bildirilmektedir (56,57). Aterosklerotik vasküler patolojilerin giderilmesi amacıyla ven grefti kullanılarak uygulanan çeşitli cerrahi tedavi yöntemlerinden (koroner arter baypas, periferik arter baypas, endarterektomi-patchplasti) sonra ise orta ve uzun dönemde %20-50 arası değişen oranlarda restenoz gelişebilmektedir (1,4,24). Tüm bu girişimsel ve cerrahi tedavi yöntemlerinin restenoz gelişimi sebebiyle yetersiz kalması ise; ekstremité amputasyonu, miyokard infarktüsü, inme, hemodiyaliz yolunun kaybı ve en önemlisi ölümlle sonuçlanabilecek sorunlara yol açabilmektedir.

Vasküler rekonstrüktif girişimler sonrası gelişen restenozların önemli bir kısmının sebebi intimal hiperplazi gelişimidir. Bilindiği gibi girişimsel ve cerrahi tedavi yöntemleri dahil her türlü travma damar duvarında hasar oluşturmaktadır. Buna yanıt olarak, endotel hasarı gelişen bölge hızlıca trombositler tarafından kaplanır. Trombositler salgıladıkları birçok mediatör ile kendi adhezyon ve agregasyonlarının yanı sıra düz kas hücre çoğalmasını tetiklerler. Bu aşamada hızlıca çoğalmaya başlayan düz kas hücreleri aynı zamanda intimaya doğru göç ederler. Düz kas hücreleri bu artmış proliferasyon ve migrasyon aktivileri ile beraber bol miktarda ekstraselüler matriks proteini üretirler.

Son yıllarda yapılan birçok deneysel çalışmada, vasküler hasar sonrası gelişen intimal hiperplazinin oluşum mekanizması büyük ölçüde aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ancak vasküler rekonstrüktif girişimlerin uzun dönemde başarısızlıkla sonuçlanmasında önemli sebeplerin başında gelen intimal hiperplaziyi engelleyebilmek amacıyla birçok farmakolojik ajan ve yöntem denenmesine rağmen etkinliği kesin kanıtlanmış bir tedavi yöntemi henüz mevcut değildir.

Tavşanlar üzerinde yapılan bir balon hasarı modelinde reendotelizasyonun 3. günde başladığı ve intimal hiperplazi formasyonunun ise 1. ayın sonunda maksimum seviyeye ulaştığı belirtilmiştir (58). Daha güncel birçok deneysel çalışmada da intimal hiperplazi gelişiminin 4. haftanın sonunda değerlendirildiğini tespit ettik (59). Biz de bu veriler ışığı altında oluşturduğumuz venöz bypass greft modelinde intimal hiperplazi gelişimini 4. haftanın sonunda değerlendirmeyi uygun bulduk. Ayrıca denekler arasında yaş ve vücut ağırlığından kaynaklanabilecek farklılıkların çalışılan vasküler yapıların anatomik büyüklüklerinde sonuçları etkileyecek boyutta önemli farklar yaratmaması amacıyla birbirine çok yakın yaş ve ağırlıkta denekler seçildi. Literatürde östrojen hormonunun intimal hiperplazi gelişimini etkileyebileceği yönünde çalışmalara rastladığımız için özellikle bu faktörü ortadan kaldırmak amacıyla sadece erkek tavşanlar çalışmaya dahil edildi (60,61).

Hücre kültürü çalışmalarında endotel ve düz kas hücreleri tarafından birçok mitojenik mediatörün salgılandığı tespit edilmiştir. Bunlardan bFGF ve PDGF en önemlileridir. Bu iki faktör media düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonun en önemli tetikleyicileridirler (62). bFGF ancak endotel hasarı sonrası düz kas hücreleri üzerinde proliferatif etkiye sahiptir. Edelman ve arkadaşları buna yönelik yaptıkları bir çalışmada; intakt ve balon hasarı ile deendotelizasyon oluşturulmuş rat karotis arterlerinde eksojen verilen bFGF'nin etkilerini karşılaştırmışlar. Endotel hasarı oluşturulmayan deneklerde eksojen bFGF verilmesinin düz kas hücre proliferasyonunu ve buna bağlı olarak intimal hiperplazi gelişimini tetiklemediğini ancak balon hasarı oluşturulan rat karotis arterlerinde eksojen bFGF uygulamasının düz kas hücre proliferasyonunu ve intimal kalınlaşmayı artırdığını tespit etmişlerdir (63).

Hayvan ve insan vasküler düz kas hücreleri üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda nitrik oksit ve bunun salınımını artırarak etki eden nebirolün bFGF'nin tetiklediği düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonunu ve PDGF'ün tetiklediği düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (64,65). Biz de oluşturduğumuz venöz bypass greft modelinde 4 haftalık 0.5mg/kg oral nebirol tedavisinin jüğüler ven greftindeki intimal hiperplazi oluşumunu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde baskıladığını tespit ettik.

Nabel çalışmasında; rekombinant PDGF gen transferi yapılmış balon hasarı modelinde; 3. haftanın sonunda kontrol grubuna kıyasla PDGF gen transferi yapılan

grupta intimal kalınlaşmanın daha fazla olduğunu tespit etmiştir (66). Bir diğer deneysel çalışmada; rat karotis arterinde balon hasarı modeli oluşturulması sonrası verilen çinko tedavisinin intimal hiperplazi oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir (67).

Kalsiyum dobesilat ile yapılan bir çalışmada; tavşan aortasında endotel hasarı modeli oluşturulmasını takiben uygulanan kalsiyum dobesilatın relaksasyonu artırıcı ve endotel fonksiyonlarını koruyucu etkileri olduğu tespit edilmiştir (68). Parés-Herbuté in vitro hücre kültürü ortamında rat aortasının düz kas hücre proliferasyonuna kalsiyum dobesilatın etkinliğini araştırmış ve 7 gün süreyle 30-200mg/kg/gün kalsiyum dobesilat uygulaması sonucu düz kas hücre proliferasyonunda doza bağımlı bir azalma olduğunu ve ayrıca kalsiyum dobesilatın NO sentaz aktivitesini artırarak NO üretimini artırdığını ve LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etkilerinin de olduğunu belirtmektedir (69). Biz de deney protokolümüzde bu doz aralığının yaklaşık ortalaması olan 100mg/kg oral kalsiyum dobesilat tedavisinin 4. haftanın sonunda venöz bypass greftinde intimal hiperplaziyi anlamlı şekilde baskıladığını tespit ettik.

İlk kez 1978 yılında Karayannacos eksternal polyeater destek materyallerinin neointimal hiperplaziyi engellemede faydalı olabileceklerini vurgulamıştır (70). Ven baypas greftlerinde İH gelişiminde arteriyel sisteme implantasyonlarından sonraki ilk 1 aylık süreç çok önemli olduğundan eksternal support materyallerine bağlı uzun dönem enfeksiyon-inflamasyon gibi riskleri azaltmak amacıyla “ absorbable external sheat “ler gündeme gelmiştir. Vijayan ve arkadaşları bu fikri baz alarak domuzlarda yaptıkları bir deneysel çalışmada; bilateral karotis arterlere safen ven interpozisyonu yapmışlar ve tek taraflı olarak ven greftlerinin etrafına 8 mm’lik polyglactin stent kılıf yerleştirmişlerdir. 1.-6. ayın sonunda yapılan histopatolojik incelemelerde absorbabl stent kılıf yerleştirilen taraftaki ven greftlerinde neointimal ve medial kalınlaşmanın kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmış olduğunu tespit etmişlerdir (71).

İmmünsüpresif ajanlar vasküler girişimler sonrası restenoz gelişimini önlemede sistemik veya lokal yöntemlerle kullanılmaktadırlar. Jahnke ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; leflunomide analogu olan FK778’in (5-15 mg/kg) oral yolla kullanımının vasküler hasar sonrası neointima formasyonu üzerine etkisi araştırılmış. Toplam 38 adet erkek ratın infraabdominal aortasına ilk aşamada perivasküler manüplasyon ve inflamasyon ile vasküler hasarı tetiklemek amacıyla silikon kaf yerleştirilmiş. 21 gün sonra aortik kaf çıkartılıp karotis arter yolu ile ulaşılan bu aortik segmente 2F katater

ile endotel hasarı oluşturmak amacıyla balon dilatasyon uygulanmıştır. 3 hafta sonra alınan örneklerde yüksek doz FK778 uygulanan ratlarda kontrol grubuna göre neointima formasyonu gelişiminde anlamlı düzeyde azalma saptanmış (72). Arteriovenöz diyaliz greftlerinde intimal hiperplazi gelişimini engellemede antineoplastik ajanların etkinliğini araştırmaya yönelik yapılan bir çalışmada; domuzlarda karotis arter ile jüğüler ven arasına Paclitaxel emdirilmiş expanded Polytetrafluoroethylene (ePTFE) greft yerleştirilerek A-V greft modeli oluşturulmuş. 6. haftanın sonunda yapılan histopatolojik incelemelerde kontrol grubuna kıyasla Paclitaxel grubunda intimal hiperplazi gelişiminin anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiş (73).

Birçok kanıt gecikmiş re-endotelizasyonun in-stent trombozisin sebebi olabileceğini desteklemektedir. Probucol nadir kullanılan lipid düşürücü bir ajandır; Hayvan çalışmalarında re-endotelizasyonu artırarak neointimal kalınlaşmayı inhibe ettiği gösterilmiştir ve insanlarda koroner anjioplasti sonrası restenozu inhibe eden bir oral ilaçtır. Tanous ve arkadaşları; tavşan iliyak arterlerinde 3F Fogarty katater ile endotel hasarı oluşturulduktan sonra bu arterlere 2,5 mm çapında balon eşliğinde 8 mm'lik stent yerleştirmişler ve kontrol grubu ile karşılaştırmak amacıyla diğer gruptaki tavşanlara probucol tedavisi uygulamışlar. Çalışma sonunda yapılan incelemelerde; kontrol grubuna kıyasla probucol grubunda in-stent re-endotelizasyondaki artış ile birlikte, ortalama luminal stenoz, makrofaj birikimi ve in-stent tromboziste anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir (74).

İyonize radyasyon kromozomal DNA'nın çekirdek yapısında hasar oluşturarak hücre bölünmesini engeller. Tümöral oluşumlar dışında aşırı fibroblastik aktivite sonucu gelişen keloid dokusu oluşumunun da radyoterapi ile önlenebileceği anlaşıncı, iyonize radyasyonun vasküler rekonstrüktif girişimler sonrası gelişen restenozun önlenmesinde de kullanılabileceği fikri doğmuştur. İlk kez 1964'te Friedman ve arkadaşları deneysel olarak ratlarda iyonize radyasyon ile aterosklerotik lezyon oluşumunun engellenebileceğini bildirmişlerdir. Günümüzde artan sıklıkta yapılan çalışmalarda özellikle koroner arter stent restenozlarının tedavisinde brakiterapinin olumlu sonuçlar verdiği bildirilmektedir. (75-77) .

NO donörlerinin intimal hiperplazi gelişimini engelleyebileceği birçok çalışmada vurgulanmaktadır. Kown ve arkadaşları; bir deneysel çalışmada NO

prekürsörü olan L-Arginine'nin polymerlerinin venöz interpozisyon greft modelinde neointimal hiperplazi gelişiminde etkilerini araştırmışlar. Toplam 42 adet Yeni Zellanda tipi tavşanın jugüler venleri kontrlaterale karotis arterlerine interpoze edilmiş. Kontrol grubu dışındaki tavşanların bu venöz greftleri arterial sisteme implantasyon öncesi 15 dk süreyle intraluminal olarak 10-100 µmol/L dozlarında L-Arginine polymer 5,7,9'a maruz bırakılmış. 28 gün sonra örnekler alınmış; L-Arginine polymerlerinin, İntima/media oranlarını doza bağımlı olarak azalttığı ve 100 µmol/L L-Arginine polymer 9 uygulanan grupta kontrol grubuna oranla ven segmentlerinde anlamlı düzeyde daha yüksek NO seviyeleri saptanmıştır (24).

Sigaranın ateroskleroz ve endotel disfonksiyonu patogenezinde etkisi çok uzun yıllardır bilinmektedir (78). Sigara kullanımı ayrıca aterosklerotik vasküler lezyonlara uygulanan rekonstrüktif girişimlerin başarı oranlarını da düşürmektedir. Bu yönde yapılan bir deneysel çalışmada; karotid endarterektomi modeli oluşturulan ratlarda sigara dumanına maruziyetin homosistein düzeylerini ve intimal hiperplazi oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir (79).

Chandrasekar ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda proinflamatuvar ve proaterojenik etkili bir sitokin olan IL-18'in düz kas hücre proliferasyonunu stimüle ettiğini göstermişlerdir (80). Aynı yazarın bir diğer çalışmasında; insan vasküler düz kas hücrelerinde atorvastatin uygulaması ile IL-18 bağımlı düz kas hücre migrasyonunun ve matriks metalloproteinaz 9 aktivitesinin inhibe edilebildiği, bundan yola çıkarak restenoz ve aterosklerozun progresyonunu hafifletmede etkili olabileceği vurgulanmıştır (81). Yamanouchi ise bir çalışmasında; karotis arterlerine jugüler ven interpozisyonu yaptığı tavşanlara 4 hafta süreyle 10mg/kg pravastatin tedavisi uygulayarak intimal hiperplazi gelişimini araştırmış. Hidrofilik bir statin olan pravastatinin pleiotropik etkileri ile intimal hiperplazi gelişimini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde baskıladığı tespit edilmiş (82). Biz de çalışmamızda önemli pleiotropik etkileri olan atorvastatini kullanmayı tercih ettik. Doz ayarlaması maksadıyla yaptığımız literatür taramasında; atorvastatinin tavşanlarda sistemik etkilerinin incelendiği çalışmalarda tercih edilen etkin ve güvenli doz aralığının 2.5-10mg/kg/gün olduğunu tespit ettik (83-85). 10mg/kg/gün oral atorvastatin tedavisi ile çalışmamıza başladık. Ancak ilk 2 denekte bu ilaç dozlarında postoperatif 3. günde ilaç intoksikasyonuna bağlı mortalite gözlemlendi. Atorvastatin dozu 2.5mg/kg/gün'e düşürüldü ve diğer denekler bu dozları tolere ettiler.



Bu dozda atorvastatin tedavisiyle arteriyel sisteme implante edilen jügüler ven greftinde intimal hiperplazi gelişiminin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde baskılandığı tespit edildi.

Bledsoe ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; karotid endarterektomi modeli oluşturulan ratlarda klopidogrel ile kombine verilen pravastatinin, kontrol grubu ile kıyaslandığında C-reaktif protein düzeylerinde ve intimal hiperplazi gelişiminde anlamlı düzeyde azalma sağladığı tespit edilmiştir (86). Bunun yanında aynı yazarın rat karotid endarterektomi modelini içeren başka bir deneysel çalışmasında ise klopidogrel tedavisinin intimal hiperplazi gelişimini engellemede etkili olmadığı belirtilmektedir (87). Herbert ve arkadaşları oluşturdukları tavşan karotis arter hasarı modelinde 3 haftalık 25mg/kg/gün oral klopidogrel tedavisinin trombosit agregasyonu ve düz kas hücre proliferasyonunu anlamlı bir şekilde baskıladığını ve bu etkinliğin doz ile yakın ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (88). Zurbrügg ve arkadaşları tarafından deneysel olarak oluşturulan bir venöz bypass greft modelinde; aspirin + klopidogrel kullanımının tek başına aspirin kullanımına kıyasla ven greftinde düz kas hücre proliferasyonu ve intimal hiperplazi gelişimini daha etkin bir şekilde engellediği vurgulanmıştır (89). Biz de deney protokolümüzde tedavi gruplarımızdan birini yüksek düzeyde etkinliği ve güvenilirliği olduğu bilinen yeni kuşak antiagregan klopidogrel ile oluşturmayı planladık. Doz tespiti için yaptığımız literatür incelemesinde klopidogrel'in tavşanlarda sistemik kullanımının etkilerinin incelendiği çalışmalarda 1-25/mg/kg/gün dozları arasında etkin ve güvenle kullanıldığını gözlemledik (88,90). Bunun üzerine klopidogrel dozunu 10mg/kg/gün olarak uygulamaya karar verdik. Ancak atorvastatin ile gözlenen çok benzer klinik bulgular ile klopidogrel tedavisi uygulanan ilk 2 denekte ilaç intoksikasyonuna bağlı mortalite gözlemlendi. İlaç dozu 2.5mg/kg/gün'e düşürülerek çalışmaya diğer deneklerle devam edildi ve bu dozda herhangi bir komplikasyon görülmedi. Çalışmamızın sonunda klopidogrel tedavisi uygulanan tavşanlarda kontrol grubuna kıyasla jügüler ven greftlerinde intimal hiperplazi bulgularında anlamlı düzeyde azalma tespit edildi.

Deney protokolümüzde tedavi gruplarını oluşturduğumuz ajanlar, sahip oldukları kendilerine özgü veya birçok ortak etki mekanizmaları ile venöz bypass greftinde intimal hiperplazi gelişimini baskılamada etkili olmuşlardır. Yeni kuşak antiagreganların en sık tercih edilenlerinin başında gelen klopidogrel bilinen yüksek

antiplatelet etkinliğinin yanı sıra düz kas hücre proliferasyonu üzerine inhibitör etkisi ile intimal hiperplazi gelişimini baskılamada etkili bulundu. Klinikte daha çok venöz patolojilerin tedavisinde kullanılan kalsiyum dobesilatın başka çalışmalarda ortaya konan antioksidan, endotel fonksiyonlarının regülasyonu, antiagregan, düz kas hücreleri üzerine antiproliferatif etki ve nitrik oksit sentaz aktivitesini artırıcı etkileri ile arteryel sisteme implante ettiğimiz ven greftinde intimal hiperplaziyi baskıladığını gözlemledik. Yeni jenerasyon  $\beta$ -blokerlerden biri olan nebivololün birçok çalışmada saptanan vasküler NO salınımını artırıcı, vazodilatör, endotelin-1 salınımının inhibisyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine inhibitör etkileri ile oluşturduğumuz venöz baypas greft modelinde intimal hiperplazi oluşumunu büyük ölçüde baskıladığı gözlendi. Aterosklerotik vasküler hastalıkların tedavisinde rutin kullanıma girmiş oldukça etkili bir antihiperlipidemik ajan olan atorvastatinin bunun yanında sahip olduğu diğer pleiotropik etkileri (antiinflamatuvar, endotel koruyucu, NO salınımını artırıcı, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonunun inhibisyonu, antiagregan) ile jügüler ven baypas greft modelimizde intimal hiperplazi gelişimini baskılamada etkin olduğunu gözlemledik.

Tıkayıcı damar hastalıkları çok yüksek mortalite ve morbidite oranları ile tüm dünyada çok geniş hasta popülasyonlarını etkilemektedir. Bunların tedavisi amacıyla perkütan veya cerrahi vasküler rekonstrüktif girişimler çok yaygın olarak uygulanmaktadır. Ancak restenoz bu tedavi yöntemlerinin orta ve uzun dönem başarı oranlarını önemli ölçüde azaltmaktadır. Restenozun önde gelen sebeplerinden intimal hiperplazi bu yönde çözüm bekleyen ciddi bir problem olmaya devam etmektedir. Bu sorunun ortadan kaldırılabilmesi amacıyla deney protokolümüzde kullandığımız yöntem ve farmakolojik ajanlar dahil diğer tüm tedavi modalitelerinin geniş çaplı hayvan çalışmaları ve bunların neticesinde oluşturulacak geniş hasta katılımlı klinik çalışmalarda uygulanması gerektiği kanısındayız.

## 6. SONUÇLAR

1. Toplam 40 adet Yeni Zellanda cinsi erkek tavşanda jüğüler ven grefti kullanılarak karotid-karotid venöz baypas greft modeli oluşturuldu. Atorvastatin ve Klopidoğrel gruplarında ilk 2 denekte ilaç intoksikasyonuna bağı mortalite gözlendi ve ilaç dozları %75 azaltıldı. Diğler denekler bu dozları tolere ettiler.
2. Arteriyel sisteme implante edilen jüğüler ven greftlerinde 4. hafta sonunda gelişen intimal hiperplazi düzeyleri hesaplandı. Elde edilen veriler kontrol grubuyla ve tedavi gruplarının kendi aralarında karşılaştırmalı olarak incelendi.
3. Klopidoğrel, Kalsiyum Dobesilat, Nebivolol ve Atorvastatin tedavisi uygulanan grupların (Grup 2,3,4,5) intimal kalınlıklarının kontrol grubu (Grup 1) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğı tespit edildi ( $p=0.001$ ).
4. Klopidoğrel, Nebivolol ve Atorvastatin tedavisi uygulanan grupların (Grup 2,4,5) medial kalınlıklarının kontrol grubu (Grup 1) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğı tespit edildi ( $p=0.001$ ). Diğler tedavi gruplarına nazaran istatistiksel olarak daha az anlamlı olmakla beraber Kalsiyum Dobesilat grubunun (Grup 3) medial kalınlıklarının da kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha az olduğı tespit edildi ( $p=0.009$ ).
5. Klopidoğrel, Nebivolol ve Atorvastatin tedavisi uygulanan grupların (Grup 2,4,5) intima / media oranlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğı tespit edildi ( $p=0.001$ ). Diğler tedavi gruplarına nazaran istatistiksel olarak daha az anlamlı olmakla beraber Kalsiyum Dobesilat grubunun (Grup 3) intima / media oranlarının da

kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi ( $p=0.002$ ).

6. Farmakolojik ilaç tedavisi uygulanan Grup 2,3,4,5'teki tavşanların arterialize olmuş jüğüler ven greftlerinden elde edilen veriler bu dört grubun kendi aralarında ikili gruplar halinde karşılaştırıldı. Grup 4'ün intimal kalınlıklarının Grup 3 ( $p=0.007$ ) ve Grup 5'e ( $p=0.002$ ) göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi. Grup 2,3,4,5'in medial kalınlıklar açısından kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırmalarda gruplar arasında anlamlı düzeyde fark olmadığı tespit edildi. Grup 4'ün intima / media oranlarının Grup 5'e ( $p=0.002$ ) göre anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edildi. Grup 2,3 ve 5'in kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırmalarda her 3 parametre açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.
7. Vasküler endotel hasarı ve akım hemodinamiğinde değişiklikler yaratmak amacıyla arteriyel sisteme implante edilen tavşan jüğüler ven greftinde; 4 haftalık oral klopidogrel, kalsiyum dobesilat, nebivolol ve atorvastatin tedavilerinin intimal hiperplazi gelişimini kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde baskıladığı tespit edildi.

## 7. KAYNAKLAR

1. Angelini GD, Newby AC. The future of saphenous vein as a coronary artery bypass conduit. *Eur Heart J* 1989;10:273-280.
2. Chan P, Munro E, Patel M, Betteridge L, Schachter M, Sever P, Wolfe J. Cellular biology of human intimal hyperplastic stenosis. *Eur J Vasc Surg* 1993;7:129-135.
3. Garas SM, Huber P, Scott NA. Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions. *Pharmacology & Therapeutics* 2001;92:165-178.
4. Tessier DJ, Komalavilas P, Liu B, Kent CK, Thresher JS, Dreiza CM, Panitch A, Joshi L, Furnish E, Stone W, Fowl R, Brophy CM. Transduction of peptide analogs of the small heat shock-related protein HSP20 inhibits intimal hyperplasia. *Journal of Vascular Surgery* 2004;40:106-114.
5. Nigri GR, Kossodo S, Waterman P, Fungaloi P, LaMuraglia GM. Free radical attenuation prevents thrombosis and enables photochemical inhibition of vein graft intimal hyperplasia. *Journal of Vascular Surgery* 2004;39:843-49.
6. Lin PH, Chen C, Bush RL, Yao Q, Lumsden AB, Hanson SR. Small-caliber heparin-coated ePTFE grafts reduce platelet deposition and neointimal hyperplasia in a baboon model. *Journal of Vascular Surgery* 2004;39:1322-1328.
7. Lucher TF. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *J Myocard Ischemia* 1995;7 suppl 1:15-20.
8. Rhodin JAG. Architecture of the vessel wall. In: *Handbook of Physiology. Section 2: Cardiovascular System. Vol 2.* American Physiologicay Society, 1980.
9. <http://www.sci.sdsu.edu/class/bio590/pictures/lect5/artery-vein.jpeg>
10. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Dolaşım Sistemi.Temel Histoloji.* Barış Kitabevi,1993:254-72.
11. Zarins C, Glagov S. Artery wall pathology in atherosclerosis. Rutherford RB (Editor). *Vascular Surgery* 4. Baskı. Philadelphia USA W.B. Saunders Co.1995:204-21.

12. Haimovici H, De Palma RG. Atherosclerosis: Biologic and surgical considerations. In: Haimovici H, ed. Vascular Surgery. Principles and Techniques. Fourth Edith. Cambridge-Massachusetts, USA Blackwell Science Inc. 1996;127-57.
13. Ross R. The circulatory system. In: McGee JO, Isaacson PG, Wright NA eds. Oxford Textbook of Pathology. New York, USA Oxford Universty Press 1992;795-8.
14. Gimbrone MA. Vascular endothelium: Nature's blood container. In Gimbrone MA Jr (ed.) Vascular endothelium in homeostasis and thrombosis. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1986:1-13.
15. Petty RG, Pearson JD. Endothelium-the axis of vascular health and disease. J R Coll Physicians 1989;23:92-101.
16. Rubanyi GM: The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. J Cardiovasc Pharmacol 1993;22 suppl 14:1-4.
17. Furchott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-6.
18. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. Nature 1987;327:524-6.
19. Webb D, Vallance P. Endothelial function in hypertension. Nitric oxide and hypertension: Physiology and pathophysiology. Eds. Vallance P, Moncada S. Springer, NY, 1997.
20. Vanhoutte PM, Perrault LP, Vilaine JP. Endothelial dysfunction and vascular disease. The endothelium and clinical practice. Eds. Rubanyi GM, Dzau VJ, Dekker M. NY, 1997.
21. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. Free Radic Biol Med 1998;25:434-56.
22. Önder MR, Barutçuoğlu B. Endotel. 2. Baskı,Levent Ofset Basım A.Ş. 2007:15.
23. Okazaki J, Komori K, Kawasaki K, Eguchi D, Ishida M, Sugimachi K. L-Arginine inhibits smooth muscle cell proliferation of vein graft intimal

- thickness in hypercholesterolemic rabbits. *Cardiovascular Research* 1997;36:429-36.
24. Kown MH, Yamaguchi A, Jahncke CL, Miniati D, Murata S, Grunenfelder J, Koransky ML, Rothbard JB, Robbins RC. L-Arginine polymers inhibit the development of vein graft neointimal hyperplasia. *J Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2001;121:971-80.
  25. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB. A definition of the intima of human arteries and atherosclerosis-prone regions. *Circulation* 1992;85:391-405.
  26. Kirklin JW, Barrat-Boyes BG. Patent ductus arteriosus. Morphology of normal ductal closure. In: Kirklin JV, Barrat-Boyes ed. *Cardiac Surgery*. Second Edith. New York USA Churchill Livingstone Inch. 1993;841-59.
  27. Franklin SM, Faxon DP. Pharmacological prevention of restenosis after coronary angioplasty: review of randomized clinical trials. *Coronary Artery Disease* 1993;4:232-42.
  28. Zubilewicz T, Wronski J, Bourriez A, Terlecki P, Guinault AM, Muscatelli-Groux B, Michalak J, Méllière D, Becquemin JP, Allaire E. Injury in vascular surgery-the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit* 2001;7:316-24.
  29. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1988;112:1018-31.
  30. Leung DYM, Glagov S, Mathews MB. Elastin and collagen accumulation in rabbit ascending aorta and pulmonary trunk during postnatal growth: correlation of cellular synthetic response with medial tension. *Circ Res* 1977;41:316-23.
  31. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res* 1983; 53:502-14.
  32. Lytle BW, Loop FD, Cosgrove DM, Ratliff NB, Easley K, Taylor PC. Long-term (5 to 12 years) serial studies of internal mammary artery and saphenous vein coronary bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985;89:248-58.

33. Cameron A, Davis KB, Green G, Schaff HV. Coronary bypass surgery with internal thoracic artery grafts-Effect on survival over a 15-year period. *N Engl J Med* 1996;334:216-9.
34. Grondin CM, Campeau L, Lesperance J, Solymoss BC, Vouhe P, Castonguay YR, Meere C, Bourassa MG. Atherosclerotic changes in coronary vein grafts six years after operation. Angiographic aspect in 110 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1979;77:24-31.
35. Larson RM, McCann RL, Hagen PO, Fuchs JC, Mitchener JS. Structural and biochemical alterations in canine venous autografts. *J Surg Res* 1978;25:380-8.
36. Larson RM, McCann RL, Hagen PO, Dixon SH, Fuchs JC. Effects of experimental hypertension and hypercholesterolemia on the lipid composition of the aorta. *Surgery* 1977;82:794-800.
37. Malone JM, Kischer CW, Moore WS. Changes in venous endothelial fibrinolytic activity and histology with in vitro venous distention and arterial implantation. *Am J Surg* 1981;142:178-82.
38. Angelini GD, Breckenridge IM, Williams HM, Newby AC. A surgical preparative technique for coronary bypass grafts of human saphenous vein which preserves medial and endothelial functional integrity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;94:393-8.
39. George JN, Nurden AT, Philips DR. Molecular defects in interaction of platelets with the vessel wall. *N Eng J Med* 1984;311:1084
40. Bowen-Pope DF, Ross R, Seifert RA. Locally acting growth factors for muscular muscle cells: Endogenous synthesis and release from platelets. *Circulation* 1985;72:735.
41. Clowes AW. Pathologic intimal hyperplasia as a response to vascular injury and reconstruction In: Rutherford RB ed. *Vascular Surgery*. Fourth Edith. Philadelphia, USA W.B. Saunders Co. 1995;285-93.
42. Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;40: 107-16.
43. Mattar SG, Hanson SR, Pierce FG. Local infusion of FGF-Saporin reduces intimal hyperplasia. *J Surg Res* 1996;60:339-44.



44. Jarvis B, Simpson K. Clopidogrel: A review of its use in the prevention of atherothrombosis. *Drugs* 2000;60:347-77.
45. Christopher P, Cannon MD. Thrombin inhibitors in acute myocardial infarction. *Cardiology Clinics* 1996;13:421-33.
46. Berger PB, Bell MR, Rihal CS, Ting H, Barsness G, Garratt K, Bellot V, Mathew V, Melby S, Hammes L, Grill D, Holmes DR Jr. Clopidogrel versus ticlopidine after intracoronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1891-4.
47. Michal M, Gotti C. Effect of calcium dobesilate on platelet function. *Thromb Res* 1988;51:593-605.
48. Bozkurt AK, Yıldırım M. Editörler. Kronik venöz yetersizlik İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No: 56. Nobel Tıp Kitabevleri. 2007:91.
49. Kuroedov A, Cosentino F, Luscher TF. Pharmacological mechanisms of clinically favorable properties of a selective beta(1)-adrenoceptor antagonist, nebivolol. *Cardiovasc Drug Rev* 2004;22:155-68.
50. Mangrella M, Rossi F, Fıcı F. Pharmacology of nebivolol. *Pharmacological Research* 1998;38:419-31.
51. Aytekin S, Özyedek Z. Statinlerin pleiotropik etkileri. *Türk Kardiyoloji Seminerleri* 2003;3:632-45.
52. Bellosta S, Ferri N, Arnaboldi L, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care* 2000;23 suppl 2:B72-8.
53. Viigimaa M, Valkman R. Lipid-lowering and antiaggregatory efficacy of atorvastatin in coronary heart disease patients with combined hyperlipidemia, abstract. *Atherosclerosis* 1999;144 Suppl 1:24.
54. Jialal I, Stein D, Balis D. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors therapy on C-reactive protein levels, abstract *Circulation* 2000;102 Suppl.:II-833.
55. Callif RM, Fortin DF, Frid DJ, Harlan WR 3rd, Ohman EM, Bengtson JR, Nelson CL, Tchong JE, Mark DB, Stack RS. Restenosis after coronary angioplasty: an overview. *J Am Coll Cardiol* 1991;17:2-13.

56. Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Angiolillo DJ, Gomez-Hospital JA, Alfonso F, Hernandez-Antolin R, Goicolea J, Banuelos C, Escaned J, Moreno R, Fernandez C, Fernandez-Aviles F, Macaya C. Randomized comparison of sirolimus-eluting stent versus standard stent for percutaneous coronary revascularization in diabetic patients: The diabetes and sirolimus eluting stent (DIABETES) trial. *Circulation* 2005;112:2175-83.
57. Ge L, Iakovou I, Cosgrave J, Chieffo A, Montorfano M, Michev I, Airolidi F, Carlino M, Melzi G, Sangiorgi GM, Corvaja N, Colombo A. Immediate and mid-term outcomes of sirolimus-eluting stent implantation for chronic total occlusions. *Eur Heart J* 2005;26:1056-62.
58. More RS, Underwood MJ, Brack MJ, Gershilck AH. A time sequence of vessel wall changes in an experimental model of angioplasty. *J Pathol* 1994;172:281-92.
59. Dowd MB, Hemmrich K, Morrison WA. L-arginine reduces neointimal hyperplasia in cold-stored arterial allografts in a rabbit low-flow-through model. *J Reconstr Microsurg* 2007;23:301-9.
60. Ishibahshi T, Obayashi S, Sakamoto S, Aso T, Ishizaka M, Azuma H. Estrogen replacement effectively improves the accelerated intimal hyperplasia following balloon injury of carotid artery in the ovariectomized rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:37-45.
61. Watanabe T, Miyahara Y, Akishita M, Nakaoka T, Yamashita N, Iijima K, Kim H, Kozaki K, Ouchi Y. Inhibitory effect of low-dose estrogen on neointimal formation after balloon injury of rat carotid artery. *European Journal of Pharmacology* 2004;502:265-70.
62. Steed DL, Webster Marshall. Growth factors and wound healing In: Haimovici H, ed. *Vascular Surgery. Principles and Techniques*. Fourth Edith. Cambridge-Massachusetts, USA Blackwell Science Inc. 1996;230-36.
63. Edelman ER, Nugent AM, Smith LT, Karnovsky MJ. Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries. *J Clin Invest* 1992;89:465-73.
64. Brehm BR, Wolf SC, Bertsch D, Klaussner M, Wesselborg S, Schüler S, Schulze-Osthoff K. Effects of nebivolol on proliferation and apoptosis of human

- coronary artery smooth muscle and endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2001;49:430-9.
65. Alfke H, Kleb B, Klose KJ. Nitric oxide inhibits the basic fibroblast growth factor-stimulated migration of bovine vascular smooth muscle cells in vitro. *Vasa* 2000; 29:99-102.
66. Nabel E, Yang Z, Liptay S, San H, Gordon D, Haudenschild CC, Nabel GJ. Recombinant platelet derived growth factor B gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia in vivo. *J Clin Invest* 1993;91:1822-9.
67. Berger M, Rubinraut E, Barshack I, Roth A, Keren G, George J. Zinc reduces intimal hyperplasia in the rat carotid injury model. *Atherosclerosis* 2004;175:229-34.
68. Ruiz E, Tejerina T. Calcium dobesilate increases endothelium-dependent relaxation in endothelium-injured rabbit aorta. *Pharmacol Res* 1998;38:361-6.
69. Parés-Herbuté N, Fliche E, Monnier L. Involvement of Nitric Oxide in the Inhibition of Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation by Calcium Dobesilate. *Int J Angiol.* 1999;8:5-10.
70. Karayannacos PE, Hostetler JR, Bond MG, Kakos GS, Williams RA, Kilman JW, Vasko JS. Late failure in vein grafts: mediating factors in subendothelial fibromuscular hyperplasia. *Ann Surg* 1978;187:183-8.
71. Vijayan V, Shukla N, Johnson JL, Gadsdon P, Angelini GD, Smith FCT, Baird R, Jeremy JY. Long-term reduction of medial and intimal thickening in porcine saphenous vein grafts with a polyglactin biodegradable external sheath. *Journal of Vascular Surgery* 2004;40:1011-19.
72. Jahnke T, Schäfer FKW, Bolte H, Rector L, Schäfer PJ, Brossmann J, Fändrich F, Hedderich J, Heller M, Hülsbeck SM. 2005 Dr. Gary J. Becker Young Investigator Award: Periprocedural oral administration of the leflunomide analogue FK778 inhibits neointima formation in a double-injury rat model of restenosis. *J Vasc Interv Radiol* 2005;16:903-10.
73. Lee BH, Nam HY, Kwon T, Kim SJ, Kwon GY, Jeon HJ, Lim HJ, Lee WK, Park JS, Ko JY, Kim DJ. Paclitaxel –coated expanded polytetrafluoroethylene haemodialysis grafts inhibit neointimal hyperplasia in porcine model of graft stenosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21:2432-8.

74. Tanous D, Bräsen JH, Choy K, Wu BJ, Kathir K, Lau A, Celermajer DS, Stocker R. Probucol inhibits in-stent thrombosis and neointimal hyperplasia by promoting re-endothelialization. *Atherosclerosis* 2006;189:342-9.
75. Kovalic JJ, Perez CA. Radiation therapy following keloidectomy: a 20-year experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989;17:77-80.
76. Friedman M, Felton L, Byers S. The antiatherogenic effect of iridium 192 upon the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 1964;186-92.
77. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med* 1997;336:1697-1703.
78. Tokgözoğlu L. Aterotromboz ve korunma. *Türk Kardiyoloji Seminerleri* 2004;4:204-13.
79. Davis JA, Brown AT, Chen H, Wang Y, Poirier LA, Eidt JF, Cruz CP, Moursi MM. Cigarette smoke increases intimal hyperplasia and homocysteine in a rat carotid endarterectomy. *J Surg Res* 2004;121:69-75.
80. Chandrasekar B, Mummidi S, Valente AJ, Patel DN, Bailey SR, Freeman GL, Hatano M, Tokuhisa T, Jensen LE. The pro-atherogenic cytokine interleukin-18 induces CXCL16 expression in rat aortic smooth muscle cells via MyD88, interleukin-1 receptor-associated kinase, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, c-Src, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, c-Jun N-terminal kinase, and activator protein-1 signaling. *J Biol Chem* 2005;280:26263-77.
81. Chandrasekar B, Mummidi S, Mahimainathan L, Patel DN, Bailey SR, Imam SZ, Greene WC, Valente AJ. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. *J Biol Chem* 2006;281:15099-109.
82. Yamanouchi D, Banno H, Nakayama M, Sugimoto M, Fujita H, Kobayashi M, Kuwano H, Komori K. Hydrophilic statin suppresses vein graft intimal hyperplasia via endothelial cell-tropic Rho-kinase inhibition. *Journal of Vascular Surgery* 2005;42:757-64.

83. Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Díaz C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:2057-64.
84. Auerbach BJ, Krause BR, Bisgaier CL, Newton RS. Comparative effects of HMG-CoA reductase inhibitors on apo B production in the casein-fed rabbit: atorvastatin versus lovastatin. *Atherosclerosis.* 1995;115:173-80.
85. Maeso R, Aragoncillo P, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Diaz C, Hernández G, Lahera V, Cachofeiro V. Effect of atorvastatin on endothelium-dependent constrictor factors in dyslipidemic rabbits. *Gen Pharmacol.* 2000;34:263-72.
86. Bledsoe SL, Barr JC, Fitzgerald RT, Brown AT, Faas FH, Eidt JF, Moursi MM. Pravastatin and clopidogrel combined inhibit intimal hyperplasia in a rat carotid endarterectomy model. *Vasc Endovascular Surg* 2006;40:49-57.
87. Bledsoe SL, Brown AT, Davis JA, Chen H, Eidt JF, Moursi MM. Effect of clopidogrel on platelet aggregation and intimal hyperplasia following carotid endarterectomy in the rat. *Vascular* 2005;13:43-9.
88. Herbert JM, Tissinier A, Defreyn G, Maffrand JP. Inhibitory effect of clopidogrel on platelet adhesion and intimal proliferation after arterial injury in rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993;13:1171-9.
89. Zurbrügg HR, Musci M, Sängler S, Gutersohn A, Mülling C, Wellnhofer E, Schaffner T, Hetzer R. Prevention of venous graft sclerosis with clopidogrel and aspirin combined with a mesh tubing in a dog model of arteriovenous bypass grafting. *Eur J Vas Endovasc Surg* 2001;22:337-41.
90. Herbert JM, Dol F, Bernat A, Falotico R, Lalé A, Savi P. The antiaggregating and antithrombotic activity of clopidogrel is potentiated by aspirin in several experimental models in the rabbit. *Thromb Haemost* 1998;80:512-8.