

70786

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

**DACRON® VE ePTFE (POLYTETRAFLUOROETHYLENE) VASKÜLER
PROTEZLERİN AKIM YÜZEYLERİNDE FİBRONEKTİN BİRİKİMİNİN
KALİTATİF VE KANTİTATİF OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Kıvanç METİN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Öztekin OTO**

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimime başladığım 1992 yılının Ekim ayında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesinin kapısından ilk defa girdiğimde, önümde uzun ve zor bir yol olduğunu düşünmüştüm. Yıllar hızla geçti. Bu yolda her gün yeni bir şeyler öğrenerek, yeni insanlar tanıyarak ve dostlar kazanarak ilerledim. Bugün geriye baktığımda güzel günler geçirdiğimi ve meslek yaşantımın ilk deneyimlerini burada kazandığımı görüyorum.

Kalp ve damar cerrahisini bana sevdiren, öğreten ve bu çalışmayı yapma fikrinin doğmasında ve gerçekleşmesinde bana yardımcı olan hocam Prof.Dr.Öztekin Oto'ya teşekkürlerimi sunuyorum. İhtiyaç duyduğum her anda yardım ve desteklerini esirgemeyen, Doç.Dr.Ünal Açikel, Doç.Dr.Eyüp Hazan, Yard.Doç.Dr.Baran Uğurlu, Yard.Doç.Dr. Hüdaî Çatalyürek, Yard.Doç.Dr. Nejat Sarıosmanoğlu ve Uzm.Dr.Erdem Silistreli'ye teşekkür ediyorum. Altı yıl içinde beraber çalışma mutluluğunu tattığım, kendilerini tanımaktan dolayı her zaman kendimi şanslı sayacağım, değerli dostlarım, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği'nin sevgili asistanlarına tek tek teşekkür ederim. Kliniğimizin tüm çalışanlarına birlikte geçirdiğimiz zor ama güzel yıllar için teşekkür ederim.

Bu çalışmanın bütün aşamalarında yardım ve katkılarını sunan Prof. Dr. Gül Güner, Doç. Dr. Meral Koyuncuoğlu, Veteriner Dr. Levent Durukan ve Uzm. Dr. Yasemin Baskın'a teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan eşıme ve aileme, özverilerinin sonucunu gösterebilmenin kıvancıyla şükranlarımı sunuyorum.

Dr. Kıvanç METİN



İÇİNDEKİLER

- Özet
- Summary
- Giriş
- Tarihçe
- Amaç
- Materyal ve Metod
 - Operasyon
 - Postoperatif bakım
 - Biyopsi
 - Kalitatif ve kantitatif inceleme yöntemleri
 - Kantitatif değerlendirme
 - Kalitatif değerlendirme
- Sonuçlar
 - Kantitatif analiz sonuçları
 - Kalitatif değerlendirme
- Tartışma
 - Sentetik vasküler protezlere genel bakış
 - Dacron® Vasküler Protezler'in İyileşme ve Neointima tabakası oluşturma özellikleri ve Klinik Sonuçları
 - ePTFE Vasküler Protezler'in İyileşme ve Neointima tabakası oluşturma özellikleri ve Klinik Sonuçları
 - Greft yetersizliği nedenleri nelerdir?
 - Fibronektin (FN) molekülünün yapısal özellikleri ve biyolojik fonksiyonları
- Sonuç
- Literatür

DACRON VE PTFE (POLYTETRAFLUOROETHYLENE)
VASKÜLER PROTEZLERİN AKIM YÜZEYLERİNDE
FİBRONEKTİN BİRİKİMİNİN KALİTATİF VE KANTİTATİF
OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI: DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

▪ **Özet:**

Vasküler cerrahide sentetik prostetik greftlerin düşük akım hızı ve yüksek akım direnci karşısında erken tıkanmaları önemli bir sorundur. Bu konuda yapılmış olan bir çok in vitro çalışma greft materyalinin kendisinden kaynaklanan nedenleri aydınlatmaktan uzak kalmaktadır. Fibronektinin endotelial hücre adezyon ve migrasyonunu hızlandırıcı etkisi ışığında, bugün en fazla tercih edilen sentetik greftlerin objektif olarak karşılaştırılması amacıyla bu çalışma planlandı. Deneklerin sağ femoral arterlerine Dacron® (Hemashield®), sol femoral arterlerine ise ePTFE (Gore Tex®) vasküler greftler ile by-pass anastomozları yapıldı. Altı hafta sonra çıkartılan greftlerin neointimal yüzeylerinde kalitatif ve kantitatif olarak fibronektin (FN) birikimi değerlendirildi. Sonuç olarak PTFE greftlerde, Dacron®'a oranla daha fazla miktarda FN birikimi saptandı.

Anahtar Kelimeler: Fibronektin, vasküler greftler, endotelizasyon

**COMPARISON OF FIBRONECTIN LEVELS BOTH
QUALITATIVELY AND QUANTITATIVELY ON THE INNER
SURFACES OF DACRON® AND PTFE VASCULAR GRAFTS:
AN EXPERIMENTAL STUDY**

▪ **Summary:**

Early postoperatively graft failure in small diameter vessels with poor blood flow conditions is still an important problem of the vascular surgery era. There are several reasons for this problem. Some of them are related to the graft material. Fibronectin is an extracellular matrix protein which has reported results about its influence on endothelial cell migration and proliferation. This study was planned to establish the effects on fibronectin deposition of two different and mostly preferred graft materials and to determine the significance of this effect on graft patency in an animal experiment. Dacron® vascular grafts on the right side and ePTFE vascular grafts on the left side were anastomosed onto the femoral arteries of 10 adult mongrel dogs. The grafts were extracted at the end of a 6-week period. Fibronectin content of the neointimal layer of the prosthetic grafts were measured with ELISA and immunocytochemical staining methods. FN levels of ePTFE grafts were significantly higher than of the Dacron® grafts.

Key Words: Fibronectin, vascular grafts, endothelialization

▪ GİRİŞ:

Özellikle yirminci yüzyılın ikinci yarısında hızla gelişen endüstrileşme ve şehirleşme ile birlikte, buna bağlı olarak değişen yaşam biçimleri, batı toplumlarından başlayarak tüm dünyayı sarmıştır. Artık günlük yaşam zamana karşı bir yarış biçiminde geçmekte, stres adı altında bir çok faktörün de etkisi ile, sigara başta olmak üzere *tütün* kullanımı gitgide artmaktadır. Benzer şekilde, beslenme alışkanlıkları da, yaşamın hızlı akışına ayak uydurmaktadır. Sanayileşmiş toplumlarda gününün yarısından fazlasını evinin dışında geçiren insanların beslenme için ayırdıkları zaman ve emek de belirgin olarak azalmış ve *fast food* yaşantımızın önemli bir parçası haline gelmiştir. Bu faktörler biraraya geldiğinde, kalp ve damar hastalıklarının da artış göstermesi beklenen ve kaçınılmaz bir sonuç olmalıdır. Bu etkenlerin yanısıra, kalıtım, çevresel faktörler ve bölgesel özellikler gibi daha pek çok faktör de sağlık üzerinde etkili olmaktadır. Bunlardaki değişimler gözönüne alındığında, hastalık çeşitlerinde de farklılıklar olması doğaldır. Batı toplumlarında ölümlerin çoğu, distal organlara sağlanan arteriyel kan akımının azalması ile karakterize olan hastalıklara bağlıdır(1).

Aterosklerotik arteriyel oklüziv hastalıklar, daha çok alt ekstremiteleri tutmaktadır. Genellikle sigara içen ve kolesterolden zengin

diyet alışkanlığı olan bireylerde görülen *arteriyosklerozis obliterans* ve daha çok genetik bir temel üzerinde gelişen *tromboanjitis obliterans*, ekstremité kaybına neden olabilmektedirler. Bu olguların tedavisinde, koruyucu hekimliğin çok önemli bir rolü olduğu açıktır. Tütün kullanımının kesilmesi ve kolesterolden yoksun diyet düzenine geçilmesi ilk aşama tedavi planı olmalıdır. Aterosklerotik prosesin, serum HDL düzeylerinin yükseltilip LDL düzeylerinin düşürülmesi ile gerilediği özellikle koroner ve karotis arter hastalıklarında gösterilmiştir.

Ancak periferik arter hastalarında, ekstremitenin oksijenizasyonunu sağlayabilmek için gerekli doku perfüzyonunun restorasyonu genellikle cerrahi olarak sağlanabilmektedir. Bu amaçla, ileri derecede hasar görmüş olan vasküler yapıların replasmanı için kullanılabilecek farklı alternatifler mevcuttur: Otogreftler, xenogreftler, sentetik ve biyosentetik vasküler protezler bunlara örnek olarak gösterilebilirler. Sayısı sınırlı olan otogreft kaynaklarının genellikle koroner revaskülarizasyon girişimleri gibi yaşamsal önemi olan prosedürler için saklanması tercih edilmektedir. Hayvanlardan elde edilen xenogreftlerin kullanımları da, farklı boyut seçenekleri sunulamaması, üretim maliyetlerinin yükseliği ve sentetik greftlere oranla belirgin üstünlüklerinin olmaması gibi nedenlerle yaygınlaşmamaktadır. Bu nedenle, her boyutta ve istendiği anda bulunabilme kolaylığı gösteren sentetik prostetik malzemeler, periferik arteriyel rekonstrüksiyon

amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak revaskülarizasyon yapılacak bölgenin özellikleri de bu konuda belirleyici olmaktadır. Bugün, bu konuda vasküler cerrahi alanında oluşmuş bir konsensüsten söz edilebilir. Genellikle küçük arter çapı ve yüksek akım direnci ile karşılaşılan bölgelerde, örneğin infrapopliteal ve üst ekstremité arteriyel sisteminde olduğu gibi, daha çok otojen venöz greftler tercih edilmektedir. Damar çaplarının daha geniş olduğu supragenual bölüm ve karotis arter greftleme işlemleri için ise prostetik sentetik vasküler greftler otojen greftlere alternatif oluşturabilmektedirler. Ancak asendan aortadan iliyak arterlere kadar olan bölümde, sentetik vasküler greftler, gerek uygun çap ve gerekse yüksek basınç ve akıma uyum yönünden, tek seçenek olmaktadır(2).

Bugün vasküler replasman ve by-pass amacıyla cerrahi kullanımda, iki sentetik greft türü ön plana çıkmaktadır: Dacron® ve PTFE (polytetrafluoroethylene). Markette en kolay bulunan bu iki materyalin farklı markalar tarafından üretilmiş varyasyonları mevcuttur. Diğer bazı materyallerden üretilmiş olan greftlerin bir çoğu ise kullanımdan kalkmıştır. İdeal prostetik vasküler greftlerin üretimi konusunda çalışmalar devam ettirilmektedir. Literatürde bu materyallerin karşılaştırıldığı *in vivo* çalışma sayısı kısıtlıdır(3). *In vitro* çalışmalarda ise genellikle biyolojik çevre koşulları taklit edilerek hazırlanmış olan

deney ortamlarında tek bir greft türü üzerinde araştırmalar yapılmıştır(4,5,6,7,8).

Sentetik greftlerin kullanımını sınırlayan en önemli faktörlerden birisi de, bu protezlerin küçük çaplı arterlerin rekonstrüksiyonunda kullanıldıklarında, kısa zamanda oklüde olmalarıdır. Özellikle distal kan akımının iyi olmadığı durumlarda kullanılan sentetik greftler kısa zamanda tıkanmakta, reoperasyon gerekliliği hasta ve hekim açısından medikal olduğu kadar, ekonomik açıdan da önemli yük getirmektedir.

Sentetik greftlerin bazı maddelerle kaplanarak trombojenitelerinin azaltılabileceği fikri 1970'lerin ortalarında popüler olmuş ve heparin ve fibronektin gibi maddelerle akım yüzeyleri kaplanan vasküler protezlerin akım yüzeylerinde *neointima* ya da *pseudointima* tabakasının daha hızlı ve düzenli oluştuğu belirlenmiştir (4,5,6,9,10,11,12,13,14,15,16,17). Literatürdeki bu bilgiler, bu çalışmanın başlangıcındaki fikirsel temellerden birini oluşturmaktadır.

Günümüzde modern vasküler cerrahi merkezleri tarafından en fazla kullanılan iki sentetik greft materyali olan Dacron® ve PTFE'nin, aynı biyolojik organizmada, aynı akım koşullarında ve aynı sürede yarattığı biyolojik reaksiyon incelenmiştir. Objektif kriter olarak, önemli bir adeziv glikoprotein olan ve endotel hücrelerinin adezyon, multiplikasyon ve migrasyonunu indükleyen *fibronektinin* (FN) akım yüzeylerinde birikimi, kalitatif ve kantitatif olarak karşılaştırılmıştır.

▪ TARİHÇE:

Vasküler replasman amacıyla sentetik materyallerin kullanılması fikri oldukça eskidir. İlk defa 1912 yılında *Alexis Carrel*'in abdominal aortayı rijit bir boru ile entübe etmesi ile birlikte farklı sentetik materyal arayışları başlamıştır(18). Sınırlı sayıda bulunabilen otojen greftlerin kullanımı, o yıllarda da gerçekleştirilmekte idi ve 1906'da arteriyel sisteme implante edilen otojen venöz greftlerde, zaman içinde gerçekleşen değişimler *Carrel* ve *Guthrie* tarafından "venöz greftlerin arteriyelizasyonu" adı ile tanımlanmıştı(19).

Vasküler cerrahide modern zamanlar, 1951 yılında, *Voorhees*, *Jaretzki* ve *Blakemoore* ile başlamıştır. Bu araştırmacılar *intraluminal* bir ipek iplikçiğinin üzerinde, makroskopik trombüs içermeyen, parlak bir film tabakasının oluştuğunu gözlemlemişlerdi(20). Buradan hareketle geliştirilen *Vinyon N* sentetik greftlerle aortoiliyak onarım, *Voorhees* tarafından, 1950'lerin başlarında gerçekleştirildi(21). Bunu, *nylon*, *teflon*, *orlon*, *ivalon* gibi diğer sentetik materyallerle yapılan denemeler izledi(21).

İlk *Dacron*® implantları, 1955 yılında uygulandı(20). *DeBakey*, 1967 yılında *Dacron*® *velour* greftleri kullanmaya başladı(21). Daha sonra *Dacron*®, un farklı işlenmiş ve dokunmuş biçimleri yaygın kullanım

alanı bulmaya başladı: *woven/knitted, crimped/non-crimped, hafif ve geçirgen/ağır ve geçirgen olmayan* gibi(3).

1970'lerin başları greft materyallerinin geliştirildiği önemli bir dönem oldu: *Dardik* ve *Dardik* tarafından insan umbilikal kord veni, vasküler protez olarak kullanıldı(3). Aynı yıllarda PTFE'den üretilen sentetik greftler de kullanılmaya başlandı. Ancak bu yıllarda greft materyallerinin çevre dokularla uyum sağlama gücü mevcuttu(1). 1973 yılında *Matsumoto*, küçük çaplı arterlere anastomoz yapılabilecek, biyolojik inert teflon polimerlerinden üretilen PTFE greftler ile ilk vasküler rekonstrüksiyonları bildirdi(22). Bu arada modifiye sıgır karotis arterlerinden üretilen xenogreft örnekleri de geliştirilmekteydi(3).

Vasküler sentetik protezlerde, açık kalma özelliğini arttırmak ve trombojeniteyi azaltmak için, *Herring* tarafından endotel hücrelerinin akım yüzeylerine ekilmesi fikri 1978 yılında ortaya atıldı(14). Bu ve benzeri çalışmalar ile greftlerin heparin ya da FN benzeri maddelerle kaplanması çalışmaları 1980'lerde de sürdü(3). 1981'den sonra, aortoiliyak gibi büyük damar rekonstrüksiyonlarında PTFE de Dacron®'a bir alternatif olarak kullanıma girmeye başladı(21).

▪ **AMAC:**

Bu çalışmada amaç, Dacron® ve ePTFE küçük çaplı sentetik vasküler protezlerin, aynı biyolojik ortamda ve akım şartlarında, objektif bir kriter ile karşılaştırmalarını yapmaktır.

Vasküler rekonstrüksiyon amacıyla kullanılan materyallerin, kullanım amaçlarına ve kullanıldıkları bölgelere bağlı olarak, birbirlerine üstün özellikleri vardır. Bugün, tüm amaçlar ve lokalizasyonlar için uygun, *ideal* bir greft materyali geliştirilememiştir. Orta genişlikteki arterler düzeyine kadar periferik arteriyel dolaşımın restorasyonu, genellikle, sentetik vasküler protezler kullanılarak, yüksek açık kalma oranları ile gerçekleştirilmektedir. Ancak aynı materyaller ile, daha küçük çaplı arterlerdeki rekonstrüksiyonların tıkanma oranları, kabul edilebilir olmaktan uzaktır(23). Altı milimetrenin altındaki damarlar için sentetik greftler kullanıldığında, yüksek tıkanma oranları ile karşılaşılmaktadır(18). Bu noktadan hareket edilerek, greftlerin yapısal özellikleri ve dokuma türlerinin modifikasyonları üzerinde altmışlı ve yetmişli yıllarda araştırmalar yapılmıştır(1,20,21).

Sentetik vasküler protezlerin akım yüzeylerinde nontrombojenik bir *neointima* ya da *pseudointima* oluşmaktadır. Bu tabakada endotelizasyon insanlarda sadece anastomoz hatlarında ve bu hatlardan greft lümeninine doğru, bir kaç milimetre uzunluğundaki bir segmentte olabilmektedir(1,10,11,23,24). Bunun dışında kalan bölümlerde *fibrin*

içeren bir intima tabakası göze çarparken, köpek ve baboonlarda neointimada tam bir endotelizasyon olduğu gösterilmiştir(1,13,15,25,26).

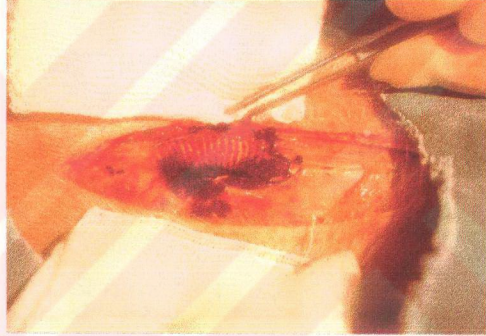
Fibronektin (FN), endotel hücrelerinin akım yüzeylerine migrasyonunu ve bu yüzeylerde adezyonunu indükleyen önemli bir adeziv glikoproteindir. Bu özelliğinden dolayı, implantasyon öncesi greftlerin FN ile kaplanması fikri tartışılmıştır(6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 27, 28, 29, 30, 31, 32). Ekzojen olarak çeşitli yöntemler ile sentetik greft yüzeyine bağlanan FN'in endotel hücrelerinin bu yüzeylere afinitesini arttırdığı belirlenmiştir((4, 6, 7, 9, 49). FN, organizmada hücre düzeyinde önemli fonksiyonları olan bir glikoproteindir. Endotel hücrelerinin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesindeki görevleri nedeniyle, sentetik vasküler prostetik greftlerin karşılaştırılması için, akım yüzeylerinde oluşan pseudointima tabakasının FN içeriğinin kalitatif ve kantitatif ölçümleri kriter olarak seçilmiştir.

▪ **MATERYAL VE METOD:**

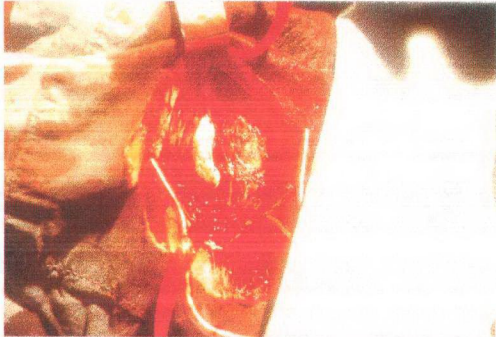
Bu çalışma *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Laboratuvarları*'nda gerçekleştirilmiştir. Uygun damar çaplarına sahip olmaları nedeniyle, ağırlıkları 10 kg'ın üzerinde olan 10 adet *mongrel* türü köpek kullanılmıştır (Resim 1). Çalışma, 6 haftalık süre sonunda sentetik vasküler greftlerin akım yüzeylerindeki FN birikiminin kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmesini



Resim 1: Çalışmada kullanılan deneklerden iki tanesi. Bütün denekler aynı veteriner hekim tarafından operasyona hazırlandı.



Resim 2: Deneklerin sağ femoral arterleri, Dacron®_greftler ile by-pass edildi.



Resim 3: Sol femoral arterler için ise ePTFE greftler kullanıldı.

gerektirmektedir. İnsanlardan greft biyopsileri alınması, etik ve medikal olarak uygun bulunmadığı için, deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Denekler, *İzmir Büyükşehir Belediyesi Veteriner Müdürlüğü* tarafından toplanan, sahipleri belli olmayan köpekler arasından seçilmiştir. İşleme alınmadan önce tüm denekler özel bir veteriner hekim tarafından kontrolden geçirilip, aşıları ve bakımları tamamlanmıştır. Denekler, *National Society for Medical Research* tarafından belirlenen “Principles of Laboratory Animal Care” ve *National Academy of Sciences* tarafından tanımlanmış olan “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” prensiplerine uygun olarak bakım almışlardır.

Tüm operasyonlar, Multidisipliner Laboratuvarları ameliyat salonunda gerçekleştirilmiştir. Bu boyuttaki deney hayvanlarının postoperatif bakımları için laboratuvarın fiziksel koşullarının yeterli olmaması nedeniyle, izlemleri *Türkiye Jokey Kulübü*’ne ait olan *Şirinyer Hipodromu*’nda sağlanan özel bakım odalarında veteriner hekim kontrolünde gerçekleştirilmiştir.

▪ **Operasyon:**

Operasyon odasına alınan deneklere, önce intravenöz olarak 150 mg/kg *sodyum tiyopental* verilerek anestezi indüksiyonu sağlandı. Operasyon masasına alındıktan sonra, her iki inguinal bölgeleri

temizlenip *povidon iodin* solüsyonu ile dezenfekte edildi. Ardından cerrahi tekniğe uygun olarak örtüldüler. Cerrahi malzemeler multidisipliner laboratuvarı ameliyathanesinden sağlandı.

Operasyon sırasında genel anestezi yine *sodyum tiyopental*'in 50 mg/kg'lık ek dozları ile sağlandı ve deneklerin spontan solunumları korundu.

Cilt ve cilt altı katları geçildikten sonra, bilateral ana femoral arterler ve dallarına ulaşıldı. Uygun kalınlıktaki teyplerle çevreleri dönülüp klemp konmak üzere hazırlandıktan sonra, 1 mg/kg *heparin* ve 1 gr *sulbactam – ampicillne* intravenöz olarak yapıldı ve *arteria femoralis communis*, *arteria femoralis profunda* ve *arteria femoralis superficialis* lere uygun vasküler klempler kondu. Ana femoral arterin iliak arter ile birleştiği nokta ile distalde yüzeysel femoral arter bileşkesi arasına 6 mm çapındaki sentetik vasküler protezler ile *by-pass* yapıldı. Bu amaçla sağ tarafta *Dacron*[®] (Hemashield[®], Meadox Medicals, Inc., Oakland, NJ), sol tarafta ise *ePTFE* (Gore Tex[®], W.L. Gore & Associates) greftler kullanıldı (Resim 2 ve 3). Her iki tarafta da ortalama 40 mm uzunluğunda greftler kullanıldı. Anastomozlar için ⁶/₀ kalınlıktaki polipropilen sütür materyali kullanıldı. Böylece 10 adet deney hayvanının sağ ana femoral arterleri *Dacron*[®], sol ana femoral arterleri de *ePTFE* greftler ile *by-pass* edilmiş oldu. Akımı greftlere yönlendirmek için, iki

Altı haftalık izlem boyunca yara yeri infeksiyonu saptanmadı. Deneklerin fiziksel aktiviteleri doğal olarak gözlemlendi. Günlük nabız muayeneleri yapıldı. Periferik nabızları intakt olarak izlendi.

▪ **Biyopsi:**

Sentetik greftlerin implantasyonu sonrasında, *neointima* ya da *pseudointima* tabakasının oluşması için gerekli süre üzerinde yapılmış çalışmalardan elde edilen bilgilere göre, bu proses implantasyon sonrası ilk saatlerde başlamakta, ancak köpeklerde 6 hafta içinde belirgin olarak düzenli bir tabaka oluşmaktadır (3, 9, 11, 12, 18, 25, 30, 31, 36, 44). Greft iyileşmesi prosesi, çevre bağ dokusunun, greft duvarı içine doğru gelişmesi ve az miktarda hücresel elemanla birlikte bir kapsül oluşturmasıdır(54). Bu nedenle denekler altıncı haftanın sonunda, postoperatif kırkikinci günde, yine Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Laboratuvarı ameliyat salonuna alındılar. Yukarıda belirtilmiş olan genel anestezi ve operasyon şartları tekrar sağlanarak, inguinal bölgeler yeniden insize edilip greftlere ulaşıldı.

Her iki tür greftin de çevre dokularla sıkı bir yapışıklık gösterdikleri ancak özellikle ePTFE greftlerin çevreden zor sıyrılabildiği, Dacron® greftlerin ise daha kolay ayrılabilirdikleri gözlemlendi. Deneklerden iki tanesinde Dacron®, bir tanesinde de ePTFE greft lümeni içinde trombüs olduğu, ancak akımı tam olarak oblitere etmediği görüldü.

Diğer deneklere implante edilmiş olan greftlerin ise açık oldukları gözlemlendi. Trombüs oluşmuş olan greftler de, akımın oblitere olmaması ve klinik olarak kladikasyon oluşturmamaları nedeniyle çalışmaya dahil edildiler.

Bütün greftler distal ve proksimal anastomoz hatlarından itibaren ikişer santimetre uzunluğunda nativ damar segmentleri ile birlikte eksize edildi (Resim 4). Saline solusyonu içine alınan örnek materyaller, kandan arındırıldıktan sonra, buz torbaları içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarına nakledildiler.

Denekler, anestezi derinleştirilerek yaşamlarına son verildikten sonra, gastrointestinal sistemleri üzerinde yapılacak parazitolojik bir incelemede kullanılmak üzere *İzmir Büyükşehir Belediyesi Veteriner Müdürlüğü* 'ne devredildiler.

▪ **Kalitatif ve Kantitatif İnceleme Yöntemleri:**

Greftlerin akım yüzeylerinde biriken FN'in kalitatif ve kantitatif analizleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Patoloji Anabilim dallarında gerçekleştirildi.

▪ **Kantitatif değerlendirme:**

Kantitatif analiz için biyokimya anabilim dalında değerlendirmeye alınan materyal örnekleri, steril olarak -70°C 'de % 0,89 NaCl , 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4, 0,5 mmol/l phenylmethanesulphonylfluoride içinde saklandı. İncelemeye alınacakları zaman, 24 saat boyunca oda sıcaklığında kloroform / etanol (3:1) ekstraksiyonundan sonra kurutularak, 10 mg kuru doku proteaz inhibitörleri içeren 3 ml TBS ile 6 saat oda sıcaklığında bekletildiler. Daha sonra 12 dakika 5000 G'de santrifüj edilen dokular, NaCl ekstraksiyonu yapıldıktan sonra, her pelletde 3 ml 2 mmol/l üre, 5 mg/ml heparin, proteaz inhibitörleri içeren bir tampon ile ikinci bir ekstraksiyona alındılar. Örnekler 16 saat oda sıcaklığında anti Fibronektin Fab 2 inkübe edilmiş olan mikro-ELISA platelere alındılar ve peroksidaz bağlı ikinci bir antikor inkübasyonu uygulandı. Son olarak o-phenylenediamine ile substrat reaksiyonu gerçekleştirilip 492 nm'de sandwich ELISA yöntemi ile değerlendirme yapıldı. Sonuçlar, birim yüzey başına ve birim yaş doku ağırlığına oranlanarak değerlendirildi. Tablo 1'de biyokimyasal analiz için kullanılan malzemeler sunulmuştur.

PBS Tween Sigma P 3563
Phenylmethanolsulphonylfluoride Sigma P 7626
Urea Sigma UO 631 500 g
Heparin Sigma H 5027
Fibronectin ELISA Kit Stago
Fibronectin Rabbit Antihuman Ab Dako A 245
1 LSAB Kit Universal 40 Test Dako K 0681
53 000 DAB Tablet (10x10 mg)
Tablo 1: ELISA kantitasyon için kullanılan malzemeler

▪ **Kalitatif değerlendirme:**

Kalitatif değerlendirme için -70 °C’de saklanan materyallerden alınan örnekler, patoloji anabilim dalında parafin bloklar içine gömüldükten sonra, mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler etüvde 56 – 62 °C’de bekletilip immunohistokimyasal yöntemle 1/50 dilusyonla boyandılar. Kontrol bloğu olarak villus içeren plasental dokular kullanıldı. Koyu renkli boyanma (+) olarak kabul edildi ve yoğunluk şiddetine göre (+), (++) ve (+++) olarak değerlendirildi. Tüm preparatların değerlendirmeleri aynı patoloji uzmanı (M.K.) tarafından gerçekleştirildi. Bu değerlendirmede her iki materyal anastomoz hatları ve greft akım yüzeylerindeki FN birikimi yönünden karşılaştırıldı.

▪ **SONUÇLAR:**

▪ **Kantitatif analiz sonuçları:**

Materyallerin içerdikleri FN miktarları iki şekilde hesaplandı.

Birinci değerlendirmede, birim yaş doku ağırlığı başına FN içeriği hesaplanırken, ikinci değerlendirmede birim akım yüzeyi alanı başına hesaplama yapıldı.

Kantitatif değerlendirme sonuçları tablo 2 ve 3'te belirtilmiştir.

Denek No	Birim doku ağırlığı başına ($\mu\text{g}/\text{mg}$ yaş doku)	Birim doku yüzeyi başına ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ doku yüzeyi)
1	15.0	40.76
2	0.9	4.39
3	0.7	4.05
4	2.65	13.80
5	3.7	24.08
6	1.1	12.27
7	8.3	27.44
8	11.0	63.65
9	7.75	35.87
10	10.5	78.12

Tablo 2: Dacron[®] greftlerin FN içerikleri

Denek No	Birim doku ağırlığı başına ($\mu\text{g}/\text{mg}$ yaş doku)	Birim doku yüzeyi başına ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$ doku yüzeyi)
1	4.25	16.60
2	9.8	102
3	1.90	10.60
4	1.4	8.10
5	10.2	107
6	4.7	32.63
7	34	53.66
8	17	28.79
9	28	57.19
10	12	17.73
Tablo 3: ePTFE greftlerin FN içerikleri		

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, Dacron® greftlerin birim doku ağırlığı başına ortalama 6,16 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SD=5,04; Standart hata=1,60), ePTFE greftlerin ise ortalama 12,33 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (SD=11,05; Standart hata=3,50) FN içerdikleri görülmüştür.

Değerlendirme, birim akım yüzeyi alanına göre yapıldığında ise, Dacron® greftlerin ortalama 30,44 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (SD=24,82; Standart hata=7,85), ePTFE greftlerin ise ortalama 43,43 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (SD=36,21; Standart hata=11,45) FN ile kaplı olduğu saptandı.

Sonuçlar *bağımlı örneklerde 2 ortalama arasındaki fark için nonparametrik Wilcoxon testi* ile değerlendirildiğinde birim yaş doku

ağırlığına göre FN içeriklerinin iki materyal arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varıldı ($p>0,05$). Değerlendirme birim akım yüzey alanına oranlandığında ise ePTFE greftlerin neointimalarının Dacron®'a oranla anlamlı şekilde daha *fazla* FN içerdiği görüldü ($p<0,05$).

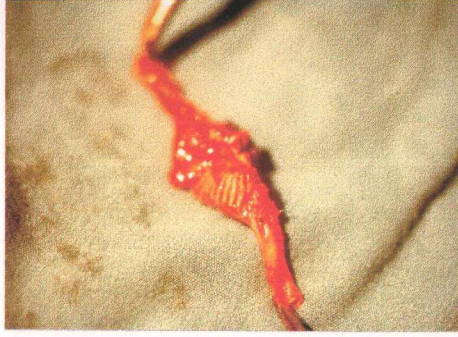
▪ **Kalitatif değerlendirme:**

İmmunohistokimyasal boyama ile yapılan karşılaştırmalı immunfloresan mikroskopik inceleme sonucunda, PTFE greftlerin neointimal akım yüzeylerinde ve anastomoz hatlarında, FN varlığını belirleyen koyu renkli boyanmanın, Dacron® greftlere oranla belirgin olarak daha fazla olduğu gözlemlendi. Ancak PTFE örneklerde akım yüzeyindeki FN tabakası greft duvarına yer yer gevşek bir bağlanma göstermekteydi. Ayrıca PTFE'nin çevre dokularla sıkı bir ilişki kurduğu, yaygın fibrotik bağlantılar meydana getirdiği de görüldü. Biyopsi alınması sırasında PTFE'nin etraf dokulardan zor ayrılması dikkat çekmişti. Mikroskopik incelemede de inflamasyonun daha belirgin olduğu saptandı. Mikroskopik bakının diğer bir ilginç sonucu ise ePTFE greft materyalinin çevresinde yabancı cisim reaksiyonunu düşündüren *dev hücrelerin* bulunmuş olmasıydı. Biyolojik olarak inert kabul edilen teflonun bu tür bir reaksiyon oluşturmuş olması da dikkat çekiciydi.

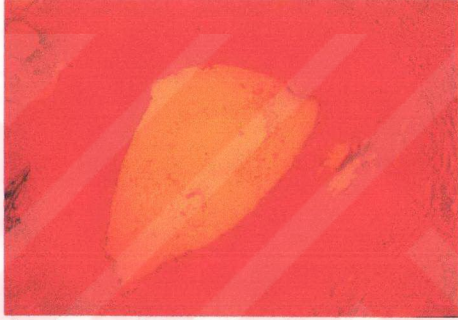
Dacron® örneklerde ise, az yoğunlukta FN içeren bir neointimal tabakanın, greft akım yüzeyini daha düzenli bir şekilde örtmekte olduğu görüldü.

Nativ damar duvarı ile karşılaştırıldığında her iki greft materyalinin de daha yüksek oranda FN içeren bir intimal tabaka ile kaplı olduğu görülmekteydi(Resimler 5,6,7,8,9).

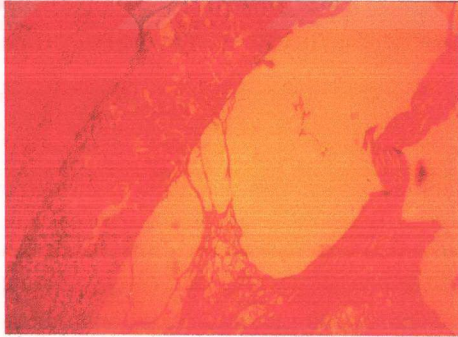




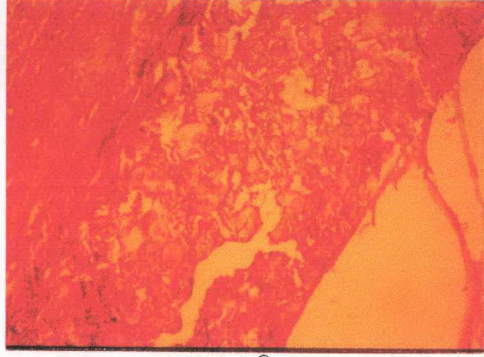
Resim 4: 6 hafta sonunda greftler ve nativ damar segmentleri çıkartıldı.



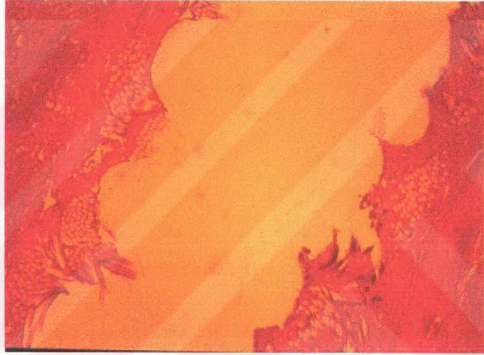
Resim 5: Nativ arter duvarında FN'e özgü homojen boyanma



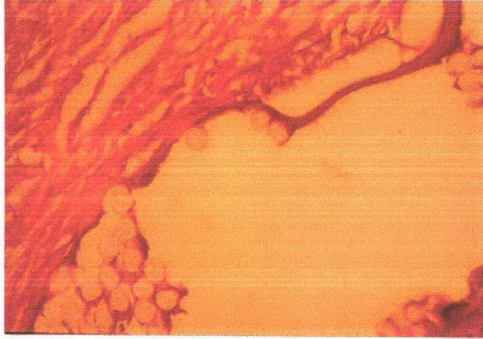
Resim 6: Dacron® greftin mikroskopik görünümü



Resim 7: Büyütülmüş görüntüde Dacron[®]’da az miktarda FN izlenmekte



Resim 8: PTFE greft: Daha yoğun FN birikimi ile beraber yabancı cisim dev hücreleri izleniyor.



Resim 9: PTFE greft üzerindeki gevşek bağlı FN tabakası ve dev hücreler

- **TARTIŞMA:**

Vasküler cerrahi, aterosklerotik damar hastalıklarının yaygın biçimde görülmeye başlaması ile birlikte, yeni teknikler ve malzemelerle önemli gelişmeler göstermiştir. Batı toplumlarında ölümlerin çoğu, distal organlara arteriyel kan akımının azalması ile karakterize olan hastalıklara bağlı gelişmektedir (1). By-pass greftleme yöntemi ile distal organlara kan sağlama metodu bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaya başlandığından bu yana, en iyi arteriyel sentetik grefti bulmak için çalışmalar yapılmıştır. Ancak otolog greftlerin alternatifi olarak düşük akım ve yüksek akım direnci özelliklerine sahip küçük çaplı arterlere anastomoze edilebilecek sentetik greftler henüz ortaya konamamıştır(1).

Önceleri otolog greftler kullanılarak yapılan distal revaskülarizasyon işlemlerinde, artık koroner by-pass operasyonu gibi yaşamsal girişimlerde otolog greft kullanımı yaygınlaştığı için, sentetik greft kullanımı gerekliliği ortaya çıkmıştır. Otolog venöz greftlerin kullanımı, daha önce bir başka operasyonda kullanılmış olması ya da bazı anomaliler nedeniyle %15 - %30 oranında mümkün olamamaktadır(3). Ayrıca, ven greftlerinin, *anevrizmal dejenerasyon*, *fibrozis* ve *intimal hiperplazi* gibi geç komplikasyonları da kullanımlarını sınırlandırmaktadır (3). Sentetik greftler yüksek akım hızı olan bölgelerde, örneğin abdominal aorta, aorto iliyak ya da aorto femoral by-pass gibi, iyi ve kabul edilebilir sonuçlar vermektedirler(1). Ancak,

özellikle küçük çaplı arter anastomozlarında erken tıkanma hala önemli bir sorundur(3,18,23,39).

Akım yüzeyinin, kan koagülasyonu yapan elemanları aktive etmemesi ya da kendi üzerinde kümelenmemesi, Mason tarafından “*kan uyumluluğu*” olarak tanımlanmıştır(3). Bugün için bilinen tek *kan uyumlu* yüzey *endotel*dir(3). Endotelin bu özelliğinin, içerdiği glikozaminoglikanlar, antitrombin III, heparin ve trombin bağlama özellikleri, plazminojen aktivatörleri ve PGI₂ (prostasiklin) üretebilme kapasitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir(3). PGI₂ trombosit agregasyonunun doğal inhibitörüdür ve endotel tarafından salgılanan vazodilatör bir maddedir(40). PGI₂ aynı zamanda olası bir *antiaterosklerotik faktör* olarak da değerlendirilmektedir(40). Greftin oklüde olmaması ve endotel bütünlüğünün korunması da yeterli miktarda PGI₂’in salgılanabilmesi ile yakın ilişki içindedir(41). Bugün kullanımda olan biyolojik ve sentetik vasküler protezlerin hiç birinde bu özellikler mevcut değildir(3).

Sentetik greftlerdeki bu *düşük akım hızı, yetersiz distal akım, küçük arter çapı* gibi şartlarda ortaya çıkan erken greft oklüzyonu sorunu vasküler cerrahlar için greft seçimi konusunda karar verirken şaşırtıcı ve zorlayıcı bir konu olmuştur(42). Bu konuyu açıklayabilmek için, çalışmaya konu olan sentetik greftlerin özelliklerini ve arteriyel sisteme

implantasyonlarından sonra gösterdikleri değişimleri gözden geçirmekte yarar vardır.

- **Sentetik vasküler protezlere genel bakış:**

İlk kez 1912 yılında yetersiz arteriyel doku için onarım ya da yerine kullanım amacıyla sentetik materyal kullanımı ile ilgili girişimler başlamış olsa da, otolog greftlerin kullanımı ile periferik arteriyel dolaşım restorasyonu, daha eskilerde bilinen ve sınırlı da olsa uygulanan bir yöntemdi(18,19). Voorhees tarafından sentetik materyalden üretilmiş olan protezlerin kullanılmaya başlanmasından sonra, bu konudaki çalışmalar artarak devam etti(1,3,20,21,22). Kunlin tarafından femoropopliteal by-pass'ın ilk defa uygulanmasından bu yana otojen safen ven en iyi kondüt olarak kabul görmektedir(43). Otojen safen venin *in situ* ya da *reverse* kullanım şekillerinde uzun dönem açık kalım oranları %75 - %85 arasında bildirilmektedir(43). Aynı şekilde sefalik ve bazilik venler de otojen greft materyalleri olarak seçilebilirler(44). Ancak koroner by-pass cerrahisinin yaygınlaşması ile birlikte bu otojen safen ven greft türlerine olan gereksinim de artmıştır(44). Bu nedenle infrainguinal vasküler rekonstrüksiyon işlemlerinde, safen ven kullanımı daha çok yaşlı hastalarda, poplitea distalindeki *bacak kurtarma* girişimleri için tercih edilir olmuştur(44). Çünkü altı aylık izlemlerle yapılmış olan klinik çalışmalar, sentetik vasküler protezlerin, tibioperoneal düzeyde

anastomoze edildiklerinde, trombektomilere rağmen başarısız sonuçlar verdiklerini göstermektedir(44). Dizüstü düzeydeki başarılı sonuçlara oranla bu sonuçların kabul edilemez düzeyde oldukları açıktır (39,44).

Sentetik vasküler protez üretiminde temel olarak iki tip polimer kullanılır: *Hidrofobik* ve *hidrofilik* polimerler (3). Kan bu iki tip polimer yüzeyinden biri ile karşılaştığında, plazma proteinlerinin adsorbsiyonu ve trombosit ve diğer kan elemanlarının adezyon ve agregasyonu olmaktadır(3). Hidrofobik yüzeylerde bu özelliğin hidrofilik yüzeylere oranla daha belirgin olduğu saptanmıştır (3). Bu yüzeyler, trombositleri hidrofilik olanlara oranla daha fazla çekmektedirler (3). *Fibrinojen*, *F XII*, *F XI*, *F V* ve *F VII* hızla adsorbe edilmekte ve *intrinsik koagülasyon zinciri* tetiklenmektedir (3).

Yüzeyin *elektriksel yük özelliği* de, trombosit agregasyonunda etkilidir. Sawyer ve Pate, endotel hücreleri ve trombositlerin *negatif* elektrik yüküne sahip olmalarının endotel hücrelerinin non-trombojen özelliğe sahip olmalarının sebeplerinden biri olduğu fikrini öne sürmüşlerdir(3). Ancak negatif yüklü sentetik yüzeylere de trombositlerin tutunabilmesi, elektrik yükü özelliğinin tek başına açıklayıcı olmadığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır(3).

Bugün infrainguinal by-pass girişimleri için safen ven yerine en çok kullanılan iki greft türü mevcuttur: Dokuma (tekstil) bir materyal olan Dacron® ve teflon liflerinin yüksek sıcaklık ve basınç altında

işlenmesi ile elde edilen *polytetrafluoroethylene* (PTFE). Bu iki materyalden Dacron® 1950'lerin sonlarından bu yana değişik dokuma şekilleriyle kullanılmaktadır. PTFE ise 1970'lerin başlarında klinik kullanıma girmiş ve son 10 yılda daha fazla yaygınlaşma imkanı bulmuştur. Her iki materyal de yüksek akım hızı ve düşük akım direnci özellikleri gösteren büyük kalibrasyonlu arteriyel rekonstrüksiyonda başarı ile kullanılmaktadır.

Weselowski ve arkadaşlarının, ideal sentetik vasküler protez için tanımladıkları özellikler şöyle sıralanabilir(38):

1. Materyalin kullanımı ve hazırlanması kolay olmalıdır. Cilt ya da fasiya altına yerleştirildiğinde, ezilmemeli, bükülmemeli, akımı engelleyecek derecede keskin açılanmalar (*kinking*) yapmamalıdır(42).
2. Dayanıklı olmalı, arteriyel kan akımı ve basıncı karşısında dilate olmamalıdır. Ancak implante edildiği bölgedeki lineer tansiyona uygunluk açısından gerçek bir elastisiteye de sahip olmalıdır(42).
3. Nontoksik malzemeden üretilmiş olmalıdır.
4. Çevre dokunun greft duvarı içinde gelişimi için maksimal geçirgenlik göstermelidir. Kanama – iyileşme dengesinin korunması açısından geçirgenliğin çok fazla olmaması da önerilmektedir(42).

5. Ancak implante edildiği andan başlayarak porozitesi minimal olmalı yani hemorajiye neden olmamalıdır.

Esas olarak kullanımda olan vasküler protezlerin hemen hemen tamamı ilk üç özelliğe zaten sahip olan greftlerdir. Ancak amaç, son iki özelliği de aynı anda bünyesinde barındıran bir greft üretmektir. Çünkü greft ve çevre doku ilişkisi, yani *greftin iyileşme süreci*, hem non-trombojen bir akım yüzeyi oluşması için hem de perigreft ve iç kapsülün sağlam bir şekilde oluşması için gerekli bir prosesdir.

Yüksek poroziteli greftler, interstisiyumlarından fibroblastların greft duvarı içine doğru ilerlemelerine olanak tanıdıkları için, uzun ama yararlı bir iyileşme süreci geçirirler(38). Bu şekilde iç kapsül ve perigreft yapılar, vasküler proteze sıkı bir şekilde bağlanırlar. Aksine düşük poroziteli greftlerde, transstisiyel fibroblastik ilerleme daha yavaş ve az olacağı için, iç ve dış kapsüllerin greft duvarına bağlantıları da daha zayıf olmaktadır(38).

Ancak porozite arttıkça ortaya çıkan önemli bir sorun vardır: *Greft duvarından kanama*. Bu nedenle, erken dönem hemoraji riskini azaltmak amacıyla özellikle tekstil türdeki sentetik vasküler protezlerin porozitelerini geçici olarak en aza indirme yöntemleri geliştirilmiştir(33,36,37,38,45).

Yüksek poroziteli greftlerde görülen iyileşme süreci üzerinde yapılmış olan araştırmalar, gerçekte bu prosesin hayvan deneylerinde 6

hafta gibi kısa sürelerde tamamlanmasına rağmen, insanlarda 6 ay ve daha uzun sürede bile tam iyileşme olmadığını göstermektedir (1,10,11,46). Bu süreç sonunda, greft iç yüzeyinde endotel hücreleri de içerebilen bir neointima tabakası oluşmaktadır(1).

Geçirgenliği yüksek olan greftlerin geçirdikleri bu *iyileşme* sürecinin ayrıntılarına değinmeden önce, bu tür bir süreç geçirmeyen düşük poroziteli greftlerin sahip olmaları gereken özelliklerden de söz etmek gerekir (1):

1. Greftin akım yüzeyi bir iyileşme süreci sonucunda non-trombojen özellik kazanmayacağı için, implantasyon anından başlayarak trombositlerin adezyon ve agregasyonuna karşı dirençli olmalıdır.

2. Çevre dokularla bağlantı kurabilmesi için gerekli olan *greft duvarı içine doğru fibroblastik ilerlemeye* olanak vermeyeceği için, doku ile uyumlu bir materyalden üretilmiş olmalıdır.

3. Anastomoz yapılmasına olanak verecek şekilde yumuşak ve dikiş geçirilebilecek bir materyalden yapılmalıdır.

4. Dış duvar, komşu dokular ile sıkı bağlantılar kurabilecek özellikte olmalıdır.

5. İç kapsül de greft duvarına sıkı bir şekilde bağlanmalı ve distal embolizasyona neden olmamalıdır.

Porozitesi fazla olan Dacron® tekstil sentetik protezlere alternatif olarak, düşük poroziteli ePTFE greftler kullanılmaktadır.

- **Dacron® Vasküler Protezler'in İyileşme ve Neointima tabakası oluşturma özellikleri ve Klinik Sonuçları:**

Yüksek poroziteli greftlerde, iyileşme süreci, greft duvarına trombositlerin yerleşmesi ile başlar(1). Bu şekilde, fibroblastik hücre ilerlemesi ve gelişmesine imkan veren bir *tekstil-trombüs* kompleksi oluşur. Eğer kan akım hızı , “*trombüs eşik hızı*”nın altında olursa, bu kompleks akım yüzeyinde yeni trombüslerin oluşumuna neden olur (1). Ayrıca greft duvarı içinde biriken trombositlerin sayısı arttıkça iyileşme süreci de aynı derecede uzun olmaktadır. Ancak trombüs oluşumu hücreler ilerlemeye olanak sağladığı için, bu tür greftlerin iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır. Erken dönemde iyileşme, akım yüzeyinin fibrin tabakası ile kaplanmasına bağlıdır. Bu dönem, Voorhees, Jaretzki ve Blakemoore'un 1951 yılında ilk kez gözledikleri intraluminal ipek iplikçiği üzerindeki non-trombojen film tabakası ile uyumludur(20). Ancak zamanla neointima tabakası üzerinde endotel hücreleri de görülmeye başlanmaktadır(1).

Yates ve arkadaşları, implantasyon anında greft yüzeyinde “*yüzey pıhtılaşma süresi*”ni (surface clotting time) 15 saniye olarak saptamışlardır(1). Ancak bir kaç gün ile bir kaç hafta arasında

organizmada bırakılmış olan greftlerde bu sürenin 1 –2 dakikaya kadar uzadığı görülmüş. Tam olarak iyileşme sürecini tamamlamış greftlerde ise bu süre 15 dakikaya kadar uzayabilmektedir(1). Süredeki bu uzamanın erken dönemdeki fibrin ağırlıklı neointimanın yerini endotel hücreleri de içeren bir tabakanın almasına bağlı olduğu düşünülmektedir(1). Ancak hayvan deneylerinde, özellikle köpekler, domuzlar ve baboonlar üzerinde yapılan çalışmalarda sentetik greftlerde tama yakın bir endotelizasyon gösterilebilmiş ise de, insanlarda sadece anastomoz bölgelerinde, *pannus* dokusu üzerinde ve greft iç yüzeyine doğru bir kaç milimetrelik bir alanda endotel hücrelerinin bulunduğu, bunun dışında insan endotel hücrelerinin sentetik protezlerin yüzeyine tutunma özelliklerinin olmadığı saptanmıştır(1,10,11,15,20,23,24,34,46,47). Oysa endotel hücreleri migrasyon ve multiplikasyon kapasiteleri olan hücrelerdir(15). Greftlerin tam olarak endotelize olamamaları, akım yüzeylerinde endotel hücrelerini tutamamaları ve bu hücrelerin prostetik yüzey üzerinde ilerlemelerini en çok bir kaç santimetre sürdürdükten sonra durmaları ile ilgili yeterli bilgi elde edilememiştir(13,15). Nativ arterlerde görülen düzgün tek sıralı endotel hücresi tabakası (*endothelial monolayer*), sentetik vasküler greftlerin akım yüzeylerinde oluşamamaktadır (13). Vasküler protezlerin spontan olarak endotelize olamamaları, erken dönem greft trombozunun önemli nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir(13).

İyileşmenin önemli bir komponenti de, perigraft dokuların, greft çevresinde oluşturduları sıkı kapsül yapısıdır(1). Bu kapsülden iç tabakalara doğru gelişen fibroblastik doku büyümesi ile birlikte trombositler organize olmakta ve iyileşme sonlanmaktadır(1). Akım yüzeyinde, akım hızı *trombüs eşik hızına* ulaşınca kadar yeni trombositler eklenerek lümeni daraltırlar; ancak akım hızı arttıkça trombüs oluşumu da yavaşlamakta ve durmaktadır(1). Distal kan akımının yetersiz (70 ml/dk'nın altında) ya da greft çapının 6 mm'nin altında olduğu durumlarda, bu trombüs tabakasının kalınlaşması greft trombozuna neden olmaktadır. Bu nedenle, trombüs tabakasının kalınlığının düşük tutulabildiği kısa zamanda iyileşebilen greftlerin üretimi amaçlanmıştır(1,3). Gereğinden büyük çaplı greftler de kullanıldığında, greft içindeki düşük akım hızı nedeniyle tromboza eğilim artmaktadır(1).

Harker, Slichter ve Johnson'un çalışmaları, greft trombozunda temel mekanizmanın *tam kan koagülasyonundan* çok, trombosit agregasyonuna bağlı olduğunu göstermektedir(1). Klinikte aortofemoral by-pass yapılan hastalar ve torakoabdominal greft konan baboonlar üzerinde yapılan çalışmalarda, *trombosit yaşam süresinin* %50 oranında kısaldığı gösterilmiştir(1,22). Bu süre baboonlarda 6 haftada normale dönerken, insanlarda 6 ayı bulmaktadır(1). Fakat bu sürenin normale yaklaşması, baboon ve köpeklerde tam ve devamlı bir endotelizasyon ile

ilişkili olarak açıklanabilirken, insanlarda ancak sınırlı ve adacıklar tarzında endotel hücre kümeleri gösterilebilmektedir(22). Greft duvarında, pseudointima tabakası oluştuktan sonra ışık mikroskopisi ile yapılan incelemelerde, lümeneye yakın bölgelerde hücresel zenginlik göze çarparken, duvara yakın kesimlerde de *fibrokollajenöz* bir yapı belirlenmiştir (7). Greft duvarının intersitisiyel bölümlerinde sellüler ve asellüler matriksin yanı sıra *vaso vasorum*lara da rastlanmaktadır(7). Pseudointimanın hücresel yapısı iç kısımda *sirküler*, dış kısımda ise *longitudinal* yerleşimli hücreler nedeniyle nativ arteriyel hücre yapısına benzer bir durum gösterir(7).

Oluşan neointima tabakası hem *prostasiklin* (PGI₂) üreterek trombosit reaksiyonunu önler ve yüzeyin non-trombojenik özellik kazanmasını sağlar, hem de bakteriyel enfeksiyonlara karşı olan direncini artırır(22). Deney hayvanlarında bu tabakanın, içerdiği glikoprotein yapısındaki adeziv makromoleküller yardımıyla endotel hücrelerinin tutunabilecekleri bir bazal membran görevi de üstlendiği gösterilmiştir(1).

Vasküler protezin çevre dokularla bütünleşmesini engelleyen teknik hatalar erken greft tıkanmasının diğer bir nedenidir. Perigreft hematoma oluşmasına neden olmayacak iyi bir cerrahi teknik bu açıdan önemlidir(1). Bu nedenle greft duvarından, erken dönemde hemorajik kaçak olmasını engelleyecek önlemler alınması düşünülmüştür. Dacron® vasküler protezlerin hayvan kollajeni, albumin, non-heparinize otolog kan

gibi allerjen ve toksik olmayan bazı maddelerle kaplanması öngörülmüştür(7,11,15,36). Bu maddeler, organizma tarafından kısa zamanda lizise uğratarak greftin iyileşme prosesini engellememeli, ancak erken dönemde duvardan hemoraji olmasını önleyerek, perigreft dokular ile vasküler protez duvarı arasında oluşabilecek hematoma nedeniyle meydana gelebilecek iyileşme gecikmesi riskini de ortadan kaldırmalıdır.

Dacron® greftlerin, femoropopliteal düzeyde açık kalma oranları 21 aylık klinik izlemlerde %87 gibi yüksek oranda gösterilmişken, infrapopliteal distal anastomoz yapılmış olan olgularda, bu oran %62'ye düşmekte, femorotibiyal pozisyonda ise ancak %12'ler düzeyinde olmaktadır(3). Özellikle ekstremité kurtarma amacıyla opere edilen olgularda sonuçlar, klavikasyon nedeniyle opere edilenlere oranla belirgin olarak kötü bulunmuştur(3). Dean ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, sentetik greftler içinde akım hızı 70 ml/dakika'nın altına düştüğünde greft içinde oklüde edici trombüs oluşma riski artmakta, greftler erken dönemde tıkanmaktadır(3).

Genç sığır derisinde elde edilen *tip I hayvan kollajeni* ile kaplı bir Dacron® tekstil greft türü olan Hemashield® (Meadox Medicals, Inc., Oakland, NJ), geçirgenliği tamamen ortadan kaldırılmış, kan uyumluluğu gösteren, trombosit agregasyonu ve intravasküler koagülasyona neden olmayan bir materyaldir(36). Kollajen absorbe edilebilen ve allerjen

olmayan bir maddedir. Greftin iyileşme sürecini etkilemez(36). Hemashield® kolay bükülebilen, yumuşak ve kollajen kaplaması fragmente olmayan bir malzemedir. Kolaylıkla dikiş geçilebilir ve örneğin aort kökündeki koroner arter implantasyonları, 6/0 kalınlıktaki polipropilen suture materyalleri ile devamlı teknikle yapılabilir(36). Kollajen kaplaması, heparinize kana karşı geçirgen olmamasını sağlar(36). Yumuşak ve kolay bükülebilir olması, kompliyansı yetersiz olan kalsifik arterlere anastomozunda kolaylık sağlar, anastomoz hattından kanama riski azalır(36).

Hemashield®, ambalajından çıkartıldığı anda kullanıma hazır bir protezdir. Porozitelerinin fazla olması nedeniyle erken postoperatif hemoraji riskine karşı çeşitli maddelerle *preclotting* gerektiren diğer tekstil greftlerden ayrılmaktadır(36). Dacron®'un yapısına eklenmiş olan %90 saf kollajen, elektron mikroskopik olarak greftin tüm yüzeyini kaplamakta ve tüm interstisiyel boşluklarını doldurmaktadır(36). Kollajen inflamatuvar reaksiyon oluşturmamakta, pirojenite ve sitotoksosite göstermemektedir(36). Ortalama 30 günde greft duvarındaki kollajenin %70'i lizise uğramakta, 180 günde duvarda hiç kollajene rastlanmamaktadır(36). Bugün, ePTFE ile birlikte en fazla kullanılan sentetik vasküler protez olan Hemashield®, bu çalışmada kullanılan iki greftten birisidir.

- **ePTFE Protezler'in İyileşme ve Neointima tabakası**

oluşturma özellikleri ve Klinik Sonuçları:

Yüksek poroziteli greftlerde görülen *iyileşme* sürecini kısaltmak, hatta ortadan kaldırmak yani implantasyon anında bile nontrombojen bir akım yüzeyine sahip greftler geliştirme fikri ortaya atılmıştır(1). Bu tür vasküler protezlerin sahip olmaları gereken özellikler şunlardır(1):

1. Trombüs oluşumuna dirençli akım yüzeyi,
2. Biyolojik organizmaya yüksek derecede uyumluluk,
3. Kolaylıkla dikiş geçilebilecek doku yapısı,
4. Çevre dokularla sıkı bağlanma sağlayabilecek dış yüzey özelliği,
5. İç kapsülün greft duvarına tutunmasını sağlayarak, distal emboliye engel olacak akım yüzeyi özelliği.

İnsanlarda, greft akım yüzeyinde endotelizasyonun tam ve düzenli olarak gerçekleştiği gösterilemediğine göre, bu yüzeyin nontrombojen özelliğinin devamlı olması gereklidir(1). ePTFE greftlerin duvarı, perigreft bağ dokusunun akım yüzeyine kadar ilerlemesini sağlayacak derecede olmasa da, çevre dokularla sıkı yapışıklıklar sağlayacak büyüklükte porlar içermektedir(1). Greft duvarında hücreler ilerlemeye izin veren ama akım yüzeyi non-trombojen olan bir vasküler

protez büyük avantajlar sağlayabilir(1). Non-trombojen yapay bir yüzey henüz geliştirilemediği için aslında amaçlanan akım yüzeyindeki trombüs tabakasının olabildiğince ince olmasını sağlamaktır(1). Farklı maddelerle *preclotting* gerektirmeyen ePTFE greftlerde, akan kan *teflon – hava* yüzeyi ile temas eder(45). Bu yüzeyin, Dacron® greftlere oranla, düşük akım hızlarında daha az trombojen olduğu düşünülmektedir(45).

Kolaylıkla ve kullanıma hazır biçimde bulunabilen, hazırlanması ve suture edilmesi de aynı şekilde zahmetsiz bir materyal olan ePTFE, özellikle diz üstü femoropopliteal by-pass greftleme operasyonlarında oldukça iyi sonuçlar vermektedir(44). Oldukça elektronegatif bir yüzeye sahiptir ve poröz, hidrofobik bir polimerdir(3). Anevrizmal dejenerasyonu önlemek için sağlam bir dış destek tabakası (*reinforcing mesh*) mevcuttur(3). Ancak yetersiz kompliyansı nedeniyle, anastomotik yırtılmalara neden olabilir(3). Matsumoto tarafından ilk defa klinik kullanıma sunulduğu yıllarda özellikle küçük çaplı arteriyel rekonstrüksiyonlarda umut verici olduğu düşünülmekteydi(22).

Temel yapısı olan biyolojik inert teflon polimerlerinin, elektronegatif yüzey yaratma özelliği nedeniyle, non-trombojen özelliğinin kuvvetli olduğu düşünülmekteydi(22). Başlangıçta, ePTFE'nin neointima oluşturma özelliğinin, Dacron®'a oranla daha iyi olduğu ve nativ arterlerdekine benzer bir neoendotel tabakası ile kaplanabileceği öne sürülmüştü(22).

ePTFE'nin iyileşme süreci incelendiğinde, çeşitli nedenlerle çıkartılan greftlerin ilk bir aylık sürede, *eritrosit – fibrin* karışımı bir iç tabaka ile kaplı oldukları ve bu tabakanın altında da, *eozinofilik bir transuda* biriktiği görüldü(22). Greftin intersitisiyel boşluklarında, az miktarda polimorfonükleer hücreler gözlenmekteydi(22). Greftin organizmada kalış süresi uzayınca, fibrin tabakasının homojenize olup kalınlaşmaya başladığı (10 – 50 µm) farkedildi(22). Akım yüzeyinde ya da fibrin tabakası içinde az miktarda mononükleer hücreler de ortaya çıkmaya başlamıştı(22). Altı aydan uzun süre ile biyolojik çevrede kalan ePTFE greftlerde, duvarın az miktarda kapillerler içeren bir kollajen doku tarafından invaze edildiği ortaya çıktı(22).

On sekizinci aydan sonra, dış duvarı kaplayan *reinforcing mesh*'in bütünlüğünün bozulduğu ve çevre dokular ile sıkı bir fibrotik bağlantı kurduğu görülmüştür(22). Elektron mikroskopik incelemede, neointimanın temel olarak, *fibrin dokusu* ve bu doku içine hapsedilmiş olan *trombositler*den oluştuğu saptanmıştır(22). Greft duvarında polimorfonükleer hücreler ve makrofajlar saptanırken endotel hücrelerine rastlanmamıştır(22). Oysa köpekler ve diğer bazı deney hayvanları ile yapılan çalışmalar, canlı bir neointimal tabakanın varlığını ortaya koymaktadır(22). Bu tabaka, nativ arteriyel endotel tabakasının fonksiyonlarının bazılarını da ortaya koyabilen, gerçek bir neoendotelizasyon oluşumudur: PGI₂ üreterek, trombosit adezyonunu

önleyebilmektedir(39). Ancak, adezyon, migrasyon ve multiplikasyon özelliğine sahip olan insan endotel hücrelerinin sentetik yüzeylerde proliferate olamamasının doyurucu bir açıklaması yapılamamıştır. Gerçek endotel hücreleri sadece anastomoz hatları üzerinde greft boyunca bir kaç milimetrelik alanda gösterilebilmiştir(22).

Perigreft dokularla sıkı bağlantılar kurabilme ve sağlam bir kapsül oluşturabilme özelliği, ePTFE'nin bakteriyel invazyona karşı daha dirençli olmasını sağlamaktadır(21). Ancak, greftin kompliyansını da azaltan bu durum, tromboz sebebi de olabilmektedir(22).

Femoropopliteal düzeyde yapılmış bir çok klinik araştırmada, distal kan akımının (*run off*) yeterli olduğu durumlarda üç yıllık açık kalma oranları %77'ye yaklaşarak otojen safen ven greftlerine iyi bir alternatif oluşturdukları belirlenmiştir(3). Ancak distal kan akımının yetersiz olduğu olgularda, %100 oranında greft tıkanması bildiren yayınlar da vardır(3). Distal düzeylere inildikçe, ePTFE'nin safen greftlere oranla belirgin olarak yetersiz kaldığı görülmektedir. Özellikle erken greft oklüzyonu açısından değerlendirildiğinde, otojen safen ven greftlerinin hem ePTFE hem de insan umbilikal ven greftine oranla dört kat daha iyi sonuçlar vermiş olması dikkat çekici bir sonuçtur(3).

- **Greft yetersizliği nedenleri nelerdir?**

Weisel tarafından greft tıkanmasına neden olan bir triad tanımlanmıştır: *Uygun olmayan akım yüzeyi, uygunsuz kan etkileşimi ve greft içinde yavaşlamış kan akımı.*

Uygun olmayan greft yüzeyi etkenini ortadan kaldırmak ancak, sentetik vasküler protezlere otojen damar yüzeyi özelliklerinin kazandırılması ile mümkün olabilir(3). Bu amaçla, sentetik yüzeylerin endotelizasyona uygun hale getirilmesi ya da fonksiyonel endotel hücreleri *ekilerek* nativ vasküler akım yüzeyine benzer özellikler kazandırılmasına çalışılmıştır(4,5,6,9,10,11,12,14,15,16,34,35,46,47).

Sentetik vasküler protezlerin akım yüzeylerine, endotel hücrelerinin yerleştirilmesi ile ilgili ilk yayın, 1978 yılında Herring tarafından yapılmıştır(14). Otolog endotel hücrelerinin sentetik yüzeylere ekilmesini etkileyen iki önemli faktör vardır: Endotel hücrelerinin elde edilme tekniği ve bu hücrelerin greft duvarına tutunma yetenekleri(14). Endotel hücrelerinin sentetik yüzeylere tutunma ve bu yüzeylerde proliferere olma özellikleri oldukça kısıtlıdır. *Indium-111 oxine* ile yapılan çalışmalar, *in vitro* koşullarda Dacron® ve ePTFE vasküler protezlerin yüzeyinde endotel hücrelerinin tutunabildiklerini göstermiş olmakla birlikte, *in vivo* çalışmalarda neointimanın endotel hücresi içeriğinin son derece sınırlı kaldığı belirlenmiştir (34). Endotel hücresinin, akım yüzeyine tutunmasını sağlamak ve bunu sağlamlaştırmak için

ekstrasellüler bir matriks yapısının oluşması, yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri bulunması ve bu yapıda hücrelerin tutunmasını sağlayacak moleküllerin varlığı gerekmektedir(3, 4, 6, 9, 11, 12, 14, 16, 17, 24, 27, 30, 35, 46, 47, 48, 49).

Genetik mühendisliğinin de gelişmesi ile birlikte, *antitrombojenik* ve *fibrinolitik* ajanlar üretilip salgılayabilme yeteneği kazandırılmış insan endotel hücrelerinin prostetik sentetik vasküler greftlerin akım yüzeylerine ekilmesi gerçekleştirilmiştir(5). Bu tekniklerin yardımı ile, neointimal hiperplazinin kontrol altına alınması olanağı sağlanmış ve nontrombojen ve fonksiyonel sentetik greftler üretilmiştir(5,10).

Bu çalışmalar sırasında endotel hücrelerinin adezyon, migrasyon ve proliferasyonunu arttıran önemli makromoleküllerden *fibronektin* (FN), sentetik vasküler protezlerin akım yüzeylerine farklı şekillerde bağlanarak, bu materyallerin endotel hücrelerine afinitelerini arttırma gayretleri gösterilmiştir(40,47).

- **Fibronektin (FN) molekülünün yapısal özellikleri ve biyolojik fonksiyonları:**

Fibronektin (FN), her biri yaklaşık 2500 aminoasitten oluşan iki polipeptid zincirinden oluşmaktadır(28). İlk kez 1970'lerde *hücre adezyon proteinlerinin prototipi* olarak tanımlanmıştır(28). Bu dimerik

glikoproteini oluşturan iki identik zincir, birbirlerine kovalen *sistin (disülfid)* köprüleri ile bağlanmışlardır(28,31). Molekül yaklaşık 440 000 Dalton ağırlığındadır ve kaynağına bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte yaklaşık %4-10 arasında karbonhidrat içermektedir(28,31). FN, kültürdeki bir çok hücrenin, ama özellikle de endotel hücrelerinin biyosentetik ürünüdür (31).Transforme ve embriyonel hücrelerde sentezlenen FN daha fazla karbonhidrat içerirken adult fibroblastlar ve plazma kaynaklı FN'in karbonhidrat içeriği daha azdır(28). Daha çok *siyalik asid, mannoz, galaktoz ve N-asetilglukozamin* şeklinde bulunan karbonhidrat, makromolekülü proteolitik aktiviteden korumaktadır. Ancak molekülün biyolojik fonksiyonları üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir(28,29). FN, elektroforetik incelemede, bir β - globulin olarak hareket eder(29).

FN, hem hücrelere hem de bazı diğer moleküllere bağlanma özelliği gösterir: Denatüre kollajen I (jelatin), nativ kollajen, heparin, fibrin, trombospondin, DNA ve aktin (28). Günümüzde tanımlanabildiği kadarı ile iki hücre bağlama bölgesi, bir jelatin bağlama bölgesi, üç heparin bağlama bölgesi ve DNA, proteoglikanlar, fibrin ve hylaüronik aside bağlanabilme özelliklerine sahip bölgeleri mevcuttur (28). Bu moleküllerin FN üzerindeki bağlanma yerleri aynı değildir ve FN molekülü aynı anda bu moleküllerin birden fazlası ile etkileşime girebilir(28). İki subgrubunu birbirine bağlayan disülfid köprülerinin

molekölün *karboksi-terminal* uçlarında yer alması, moleküler stabilitenin yanısıra farklı ligandlara da kolaylıkla bağlanabilme özelliğini kazandırmaktadır(29). Kollajene afinitesinin yüksek olması nedeniyle, *jelatin-sepharose kromatografi* tekniği ile plazmadan ayrıştırılabilmektedir(28). FN'in önemli özelliklerinden birisi de, *stafilokokların* bu moleküle gösterdikleri yüksek afinitedir(28). FN, stafilokoksik enfeksiyonlar sırasında hedef olan moleküllerin başında gelmektedir(28).

Hepatositler tarafından plazmaya çözülebilir formda FN salgılanır(28). Bir çok diğer hücreler, kondrositler, myoblastlar, epitel ve endotel hücreleri de perisellüler olarak FN taşırlar(28).

Ekstrasellüler matriks ve vücut sıvılarında bulunan FN'in plazma konsantrasyonu 300 µg/ml'dir(29,49). Serum değeri ise plazma değerinden %30 daha yüksektir(29). Plazmada dolaşan FN'in kaynağını saptamak için yapılan *ex vivo perfüzyon* çalışmalarında, izole karaciğerin dolaşımdaki miktarı sağlayabilecek kadar FN sentezleyebildiği görülmüştür(29). Ayrıca bir çok başka hücre de FN salgılayabilmektedir: Bunlar içinde en önemli kaynak olarak *endotel hücreleri* gösterilmektedir(29).

Endotel hücreleri, akım yönünde ve tek kat halinde devamlı bir dizilim gösterirler. Bu hücrelerin temas noktaları intersellüler madde transportunu sağlarken, *glikokaliks* adı verilen ince bir mukopolisakkarid

tabakası da luminal yüzeylerini kaplar(29). Yapısal özellikleri birbirine benzer olan FN ve *von Willebrand faktör*'ün, bu endotel hücrelerinin intrasellüler granüler substansları oldukları saptanmıştır(29).

FN ve benzer bir makro molekül olan *vitronectin*'in bulunması hücre kültürü tekniğinin gelişmesinde önemli bir aşama yaratmıştır(28). Çünkü bu makromoleküller, tüm embriyonel ve adult mezenkimal ve epitelial hücrelerin ve bağ dokusu hücrelerinin yanısıra lenfosit ve makrofajların adezyon yapabilmelerini sağlamaktadırlar(28). Serum içeren hücre kültürlerinde, hücrelerin yüzeylere tutunma ve proliferasyonunda mediyatör olarak rol alırken, *hücre hücreye* adezyonu arttırırlar(28,29). Normal hücrelerin morfolojilerinin düzenlenmesi ile beraber, bazı *izoformları* (B^+ .FN) neoplastik ve normal dokularda, anjiyogenetik proses içinde yer alır(30). Bu proses sırasında, endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunun modülasyonu gibi, bu hücrelerle bazı ekstrasellüler matriks komponentleri arasında etkileşimler olduğu da saptanmıştır(30). Matriksteki *mikrovaskülerizasyona* neden olan bu moleküller içinde en önemlisinin *Fibronektin* olduğu düşünülmektedir(30). Risau ve Lemmon, endotel hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonu için FN'den zengin bir bazal membran gerekliliğini ispatlamışlardır(30). Aynı araştırmacılara göre, bu hücreler kendileri de FN içeren bir matriks üretmektedirler(30). *Gliyoblastoma multiforme* tümör dokuları içindeki damarlanmanın hiperplastik endotel hücreleri içerdiği

ve bunun da bazal membranlarındaki B⁺.FN izoformu ile yakın ilgisi olduğu belirtilmektedir(30). Anjiyogenezisin FN ile ilişkisi benzer şekilde, diğer bazı tümör dokularında ve benign lezyonlarda da saptanmıştır (ependimoma, memenin intraduktal papillomu)(30).

FN'in önemli bir fizyolojik rolü, kemotaksiste ve opsonizasyonda görev alması ve *doku onarımı* ve *iyileşmesine* olan katkısıdır(29): Doku büyümesinin ve doku onarımının önemli bir modülatörüdür(31). Özellikle iyileşmenin erken fazlarında granülasyon dokusunun hızlı gelişiminin indüklenmesi ve vasküler hücrelerin hızlı gelişiminde FN'in görevleri kanıtlanmıştır(50). Spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak, hücre büyümesini hızlandırır(51). Hücrelerin FN ile bağlantı kurması ile birlikte, hücre içi *alkalinizasyon* indüklenmekte ve DNA sentezi hızlanmaktadır(51).

Trombosit granüllerinin de önemli bir komponenti olan FN, ekzojen olarak fazla miktarda verildiğinde, *trombosit-kollajen etkileşimini* azaltmaktadır(29). Bu mekanizmanın, doku transglutaminazları ve aktive F XIII (F XIII_a) ile fibrin, kollajen, α₂-makroglobulin ve α₂-plazmin inhibitörlerinin bağlanması ile gerçekleştiği düşünülmektedir(29).

Kutanöz yara iyileşmesinde de, FN ve fibrinojen'in epidermal keratonistlerin migrasyon özelliğini artırıcı etkileri önemlidir(49). Hemostazın primer basamaklarından birisi olan, hasarlı damarın

subendoteline trombosit adezyonu için FN başta olmak üzere bazı adeziv proteinlerin varlığı gereklidir(17). Trombosit membranında, adezyon için gerekli olan iki adet FN reseptörü tanımlanmıştır: VLA-5 (very late antigene) ve GP IIb/IIIa (17). Bu iki reseptör de akım ve statik şartlarda aynı derece etkilidir(17). Keratinositlerin migrasyonu için de spesifik *hücre- substrat adezyon moleküllerine* (integrinler) gereksinim vardır(17).

Endotel hücrelerinin adezyonunu sağlayan ve indükleyen FN'in büyük bölümünün, yine bu hücreler tarafından sentezlenip salgılandığı, karaciğer kaynaklı FN'in ise daha az etkili olduğu ileri sürülmektedir. Farklı hücre türleri tarafından sentezlenen FN moleküllerinin biyolojik fonksiyonlar açısından da farklılıklar gösterdikleri varsayılmaktadır. Kardiyak (koroner ve mitral ve aortik kapak) ve non-kardiyak (torasik aorta, pulmoner arter) endotel hücrelerinin de FN içerikleri birbirlerinden farklıdır(31). Bu farkın nedenlerinden birisi de, bu hücrelerin FN'in önemli bir reseptörü olan $\alpha 5 - \beta 1$ integrin yoğunluğu açısından farklılıklar göstermeleridir(31). ELISA sonuçları, torasik aorta endotel hücrelerinde bu reseptörlerin, aort kapağındakilere oranla daha yoğun olduklarını göstermiştir(31).

FN'e adeziv özelliğini hücre yüzeyinde bağlanma bölgesinde bulunan *arjinin – glisin – aspartik asid* sekansı ile vermektedir(17).

Ekzojen olarak verilen FN'in hücre yüzeyine hızla tutunması ve normal fibroblastik aktiviteyi restore etmesi, endotel hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonunu hızlandırması nedeniyle, bir çok araştırmacı, sentetik vasküler protezlerin akım yüzeyinin bu madde ile kaplanması fikrini ortaya atmışlardır(4,5,6,9,10,11,12,27,35,47).

▪ **SONUÇ:**

Bu çalışmada amaç, otojen vasküler greftlere alternatif olarak kullanılan iki ayrı türdeki sentetik vasküler protezin, objektif kriterlerle karşılaştırılması olmuştur. Fibronektin'in organizmadaki fonksiyonlarından hareketle, aynı süre ile aynı organizmada ve akım koşullarında bırakılan greftlerin akım yüzeyinde biriken FN miktarının neointima oluşumu ve endotelizasyonun bir göstergesi olabileceği düşünülmüştür. Sentetik vasküler protez akım yüzeyinde endotel hücrelerinin tutunup proliferere olabilmeleri için gerekli bir adeziv makromolekül olan FN, hem kantitatif olarak ELISA yöntemi ile saptanmış hem de kalitatif olarak immunohistokimyasal boyama tekniği ile gösterilmiştir.

Endotel hücrelerinin adezyon ve proliferasyonu için gerekli bazal membran içinde saptanan FN miktarı açısından yapılan değerlendirmede, ePTFE (Gore Tex®) greftlerin Dacron® greftlere oranla daha fazla FN ile kaplı oldukları belirlendi. Akım yüzey alanı ile FN

içeriği oranlandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Ancak yaş doku ağırlığına oranlanarak yapılan değerlendirmede fark anlamlı bulunmadı.

Çalışmadan elde edilen verilerle, bu farkın ePTFE'nin akım yüzey özelliklerinden kaynaklandığı ve *polytetrafluoroethylene*'in Dacron®'a oranla neoendotelizasyonu daha fazla indüklediği sonucuna varıldı. FN'in PTFE greft yüzeyinde daha fazla miktarda bulunması, endotel hücrelerinin de bu akım yüzeyine yüksek oranda afinite göstermeleri ve PTFE neointimasında endotelizasyona eğilimin daha fazla olması sonucunu yaratmaktadır.

Ancak ePTFE greft duvarında ve perigreft dokularda görülen yabancı cisim dev hücreleri de bu materyalin biyolojik olarak inert olarak kabul edilmesine rağmen organizmada reaksiyon yaratabilme özelliğine sahip olduğunu göstermektedir.

Kardiyovasküler sistem ile ilgili deneysel çalışmalarda, damar çaplarının uygun olması nedeniyle köpek, domuz ya da baboonlar tercih edilmektedir. Ancak köpeklerin aktif hemostatik ve fibrinolitik sistemleri nedeniyle bu tür çalışmalar için fazla uygun olmadıklarını belirten yazarlarda vardır(3). Sentetik yüzeylerde endotelizasyon, insanlarda pek az yayında gösterilebilirken, bu tür deneklerde kısa zaman içinde tam endotelizasyon oluşmaktadır. Bu nedenle, akım yüzeyinin endotel hücresi içeriğinin kantitasyonunun klinik uygulamalar için yeterince anlamlı

olmayacağı düşünölmüş ve endotel hücrelerinin neointimaya yerleşmesini sağlayan FN molekülünün bu iki vasküler proteze olan afinitesini karşılaştırılmıştır.

Primat modeller dışında, endotel hücreleri prostetik yüzeyleri morfolojik olarak tek ve düzenli bir tabaka halinde (endothelial monolayer) kaplamasalar da, adacıklar halinde ve düzensiz olarak yerleşmiş hücre gruplarının da fonksiyonel oldukları ve PGI₂ gibi antitrombojenik maddeler sentezleyebildikleri gösterilmiştir. Bu nedenle, PTFE greftlerin FN içeriklerinin daha yüksek olmasının önemli bir avantaj oduğı sonucuna varılmıştır.

▪ **LITERATÜR:**

1. Sauvage LR, Knute EB, Mansfield PB, Wood SJ, Smith JC, Overton JB: Future directions in the development of arterial prostheses for small and medium caliber arteries. *Surgical Clinics of North America* 1974; 54(1): 213-228
2. Sauvage LR. Biologic behavior of grafts in the arterial system. Haimovici H, Ascer E, Hollier LH, Strandness DE, Towne JB (eds): *Vascular Surgery*. Blackwell Science, Cambridge / Massachusetts 1996.
3. Esquivel CO, Blaisdell FW: Why small caliber vascular grafts fail: a review of clinical and experimental experience and the significance of the interaction of blood at the interface. *Journal of Surgical Research* 1986; 41: 1-15
4. Gosselin C, Vorp DA, Warty V, Severyn DA, Dick EK, Borovets HS, Gresler HP: ePTFE coating with fibrin glue, FGF-1, and heparin: effect on seeded endothelial cells. *Journal of Surgical Research*, 1996 Feb, 60:2, 327-32
5. Sugawara Y, Sakata Y, Minowada S, Hamada H, Yoshida Y, Sato O, Deguchi J, Kimura H, Namba T, Makuuchi M, Miyata T: Adenovirus-mediated transfer of tissue-type plasminogen activator gene to human endothelial cells. *Surgery*, 1997 Jul, 122:1, 91-100

6. Huber Ts, WellingTH, Sarkar R, Messina LM, Stanley JC: Effects of retroviral-mediated tissue plasminogen activator gene transfer and expression on adherence and proliferation of canine endothelial cells seeded onto expanded polytetrafluoroethylene. *Journal of Vascular Surgery*, 1995 Dec, 22:6, 795-803
7. Sottiurai VS, Sue SL, Rau DJ, Tran AB: Comparative analysis of pseudointima biogenesis in Gelseal coated Dacron knitted graft versus crimped and noncrimped graft. *Journal of Cardiovascular Surgery* 1989; 30: 902-909
8. Zammit M, Wu H-d, Sauvage LR: A comparison of external velour and double velour Dacron grafts in the canine thoracic aorta. *The American Surgeon* 1985; 51: 637-640
9. Patterson RB, Messier A, Valentini RF: Effects of radiofrequency glow discharge and oligopeptides on attachment of human endothelial cells to polyurethane. *ASAIO Journal*, 1995 Jul-Sep, 41:3, M625-9
10. Sackman JE, Freeman MB, Petersen MG, Allebban Z, Niemeyer GP, Lothrop CD Jr: Synthetic vascular grafts seeded with genetically modified endothelium in the dog: evaluation of the effect of seeding technique and retroviral vector on cell persistence in vivo. *Cell Transplant*, 1995 Mar-Apr, 4:2, 219-35

11. Carr HM, Vohra R, Sharma H, Smyth JV, Rooney OB, Dodd PD, Walker MG: Endothelial cell seeding kinetics under chronic flow in prosthetic grafts. *Annals of Vascular Surgery*, 1996 Sep, 10:5, 469-75
12. Zhang JC, Wojta J, Binder BR: Growth and fibrinolytic parameters of human umbilical vein endothelial cells seeded onto cardiovascular grafts. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1995 Jun, 109:6, 1059-65
13. Etchberger KJ, Sharefkin JB, Lalka SG, Taylor MW: Detection of Fibronectin on Vascular Flow Surfaces by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Annals of Vascular Surgery* 1989; 3(2): 118-122
14. Budd JS, Allen KE, Bell PRF, James RFL: The effect of varying fibronectin concentration on the attachment of endothelial cells to polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Journal of Vascular Surgery* 1990; 12(2): 126-130
15. Seeger JM, Klingman N: Improved in vivo endothelialization of prosthetic grafts by surface modification with fibronectin. *Journal of Vascular Surgery* 1988; 8(4): 476-482
16. Prendiville EJ, Coleman JE, Callow AD, Gould KE, Laliberte-Verdon S, Ramberg K, Connolly RJ: Increased in-vitro incubation time of endothelial cells on fibronectin-treated ePTFE increases cell retention in blood flow. *European Journal of Vascular Surgery* 1991; 5: 311-19

17. Beurner S, Ijsseldijk MJW, de Groot PG, Sixma JJ: Platelet adhesion to fibronectin in flow: Dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP I_b/III_a and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood* 1994; 84(11): 3724-33
18. Shack RB, Neblett WW, Richie RE, Dean RH: Expanded polytetrafluoroethylene as dialysis access grafts: Serial study of histology and fibrinolytic activity. *The American Surgeon* 1977; 43(42): 817-826
19. Henderson VJ, Mitchell RS, Kosek JC, Cohen G, Miller DC: Biochemical (functional) adaptation of "arterialized" vein grafts. *Annals of Surgery* 1985; 203: 339-345
20. Mathisen SR, Wu H-D, Sauvage LR, Robel SB, Wechezak AR, Walker M: The influence of denier and porosity on performance of a warp-knit Dacron arterial prosthesis. *Annals of Surgery* 1986; 202: 382-389
21. Polterauer P, Prager M, Hölzenbein Th, Karnr J, Kretschmer G, Schemper M: Dacron versus polytetrafluoroethylene for Y-aortic bifurcation grafts: a six year prospective, randomized trial. *Surgery* 1992; 111: 626-633
22. Camilleri J-P, Phat VN, Bruneval P, Tricottet V, Balaton A, Fiessinger J-N, Cormier J-M: Surface healing and histologic maturation of patent polytetrafluoroethylene grafts implanted in patients for up to 60

months. Archives in Pathological Laboratory Medicine 1985; 109: 833-837

23. Sipehia R, Marucci G, Lipscombe J: Transplantation of human endothelial cell monolayer on artificial vascular prosthesis: the effect of growth-support surface chemistry, cell seeding density, ECM protein coating, and growth factors. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 1996 Jan, 24:1, 51-63
24. Sackman JE, Wymore AM, Reddick TT, Freeman MB, Stevens SL, Goldman MH: Retroviral mediated gene transduction alters integrin expression on vascular endothelial cells. Journal of Surgical Research, 1997 Apr, 69:1, 45-50
25. Bellon JM, Bujan J, Hernando A, Honduvilla NG, Jurado F: Arterial autografts and PTFE vascular microprostheses: Similarities in the healing process. European Journal of Vascular Surgery 1994; 8: 694-702
26. Clagett GP, Robinowitz M, Maddox Y, Langloss JM, Ramwell PW: The antithrombotic nature of vascular prosthetic pseudointima. Surgery 1982; 91(1): 87-94
27. Huebsch JB, Fields GB, Triebes TG, Mooradian DL: Photoreactive analog of peptide FN-C/H-V from the carboxy-terminal heparin-binding domains of fibronectin supports endothelial cell adhesion and

- spreading on biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Material Research*, 1996 Aug, 31:4, 555-67
28. Von der Mark K, Goodman S: Adhesive Glycoproteins. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*, Wiley-Liss Inc. 1993; pp 211-236
29. Giddings FC: Fibronectin. *Haemostasis and Thrombosis*, Bloom AL, Thomas DP (ed). Churchill Livingstone 1987: 312-320
30. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L: The fibronectin isoform containig the ED-B oncofetal domain: A marker of angiogenesis. *International Journal of Cancer* 1994; 59: 612-8
31. Johnson CM, Helgeson CS: Fibronectin biosynthesis and cell-surface expression by cardiac and non-cardiac endothelial cells. *American Journal of Pathology* 1993; 142(5):1401-8
32. Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO: Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *The Journal of Cell Biology* 1989; 109: 903-14
33. Kenny DA, Berger K, Walker MW, Robel SB, Bogulavsky L, Ray LI, Lischko MM, Sauvage LR: Experimental comparison of the thrombogenicity of fibrin and PTFE flow surfaces. *Annals of Surgery* 1980; 191: 355-361

34. Carr HM, Smyth JV, Rooney OB, Dodd PD, Sharma H, Walker MG:
Limitations of in-vitro labeling of endothelial cells with indium -111
oxine. *Cell Transplant*, 1995 May-Jun, 4:3, 291-6
35. Poole-Warren LA, Schindhelm K, Graham AR, Slowiaczek PR, Noble
KR: Performance of small diameter synthetic vascular prostheses with
confluent autologous endothelial cell cell linings. *Journal of
Biomedical Material Research*, 1996 Feb, 30:2, 221-29
36. Westaby S, Parry A, Giannopoulos N, Pillai R: Replacement of the
thoracic aorta with collagen-impregnated woven Dacron grafts.
Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 1993; 106: 427-433
37. Van der Lei B, Wildewuor ChRH: Microvascular
polytetrafluoroethylene prostheses: The cellular events of healing and
prostacyclin production. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1988; 81:
735-41
38. Hirt SW, Aoki M, Demertzis S, Siclari F, Haverich A, Borst HG:
Comparative in vivo study on the healing qualities of four different
presealed vascular prostheses. *Journal of Vascular Surgery* 1993; 17:
538-45
39. Clagett GP, Graeber GM, Robinowitz M, Langloss JM, Ramwell PW:
Differentiation of vascular prostheses in dogs with serial tests of in
vivo platelet reactivity. *Surgery* 1984; 95:331-338

40. Subramanian VA, Hernandez Y, Tack-Goldman K, Grabowski EF, Weksler BB: Prostacyclin production by internal mammary artery as a factor in coronary artery bypass grafts. *Surgery* 1986; 100(2): 376-82
41. O'Neil GS, Chester AH, Allen SP, Luu TN, Tadjkarimi S, Ridley P, Khagani A, Musumeci F, Yacoub MH: Endothelial function of human gastroepiploic artery. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 1991; 102: 561-565
42. Wesolowski SA: Teflon, Dacron, glass and mysticism. *Surgery* 1962; 54: 287-288
43. Park TC, Harker CT, Edwards JM, Moneta GL, Taylor LM, Porter JM: Human saphenous vein grafts explanted from the arterial circulation demonstrate altered smooth-muscle and endothelial responses. *Journal of Vascular Surgery* 1993; 18: 61-9
44. Edwards WH, Mulherin JL Jr: The role of graft material in femorotibial bypass grafts. *Annals of Surgery* 1980; 191: 721-725
45. Bethea MC, Reemtsma K: Graft hemostasis: an alternative to preclotting. *Annals of Thoracic Surgery* 1979; 27: 374
46. Gouny P, Hocquet-Cheynel C, Martin-Mondiere C, Bensenane J, Bonneau M, Nussaume O: Incorporation of fibronectin-impregnated vascular prostheses in the pig. Microscope study. *Journal of Cardiovascular Surgery (Torino)*, 1995 Dec, 36:6, 473-80

47. Walluscheck KP, Steinhoff G, Kelm S, Haverich A: Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 1996 Oct, 12:3, 321-30
48. Shimada K, Ozawa T: Evidence that cell surface heparan sulfate is involved in the high affinity thrombin binding to cultured porcine aortic endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 1985; 75: 1308-1316
49. Juhasz I, Murphy GF, Yan H-C, Herlyn M, Albelda SM: Regulation of extracellular matrix proteins and integrin cell substratum adhesion receptors on epithelium during cutaneous human wound healing in vivo. *American Journal of Pathology* 1993; 143(5): 1458-69
50. Lamme EN, de Vries HJ, van Heen H, Gabbiani G, Westerhof W, Middelkoop E: Extracellular matrix characterization during healing of full-thickness wounds treated with a collagen/elastin dermal substitute shows improved skin regeneration in pigs. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1996 Nov, 44:11, 1311-22
51. Ingber DE, Prusty D, Frangioni JV, Cragoe EJ Jr, Lechene C, Schwartz MA: Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *The Journal of Cell Biology* 1990; 110:1803-11