



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

FARKLI İÇ YÜZEYE SAHİP PTFE GREFTLERDE ENDOTELİZASYON, BAKTERİYEL KONTAMİNASYON VE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. MUHAMMET HÜSEYİN ERKAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet BOĞA

AYDIN-2020

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**FARKLI İÇ YÜZEYE SAHİP PTFE
GREFTLERDE ENDOTELİZASYON,
BAKTERİYEL KONTAMİNASYON VE
BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. MUHAMMET HÜSEYİN ERKAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet BOĞA

AYDIN-2020

Bu araştırma, TPF-19013 proje kod ile Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında en derin bilgi ve tecrübeleri ile hiçbir zaman desteğini esirgemeyen tez danışmanı kıymetli hocam Prof. Dr. Mehmet BOĞA'ya,

Kalp ve Damar Cerrahisi uzmanı olmanın ciddiyetini ve sorumluluğunu mesleki yaşantıları ile bizlere hissettiren ve öğreten, asistanlığım süresince üzerimde büyük emeği geçen, her konuyu danışabildiğim, bilgileri ve tecrübeleri ile bizlere destek olan sayın hocalarım Prof. Dr. Berent DİŞCİGİL, Prof. Dr. Muharrem İsmail BADAĞ, Prof. Dr. Uğur Gücün, Prof. Dr. Erdem Ali ÖZKISACIK, Doç. Dr. Tünay KURTOĞLU ve Dr. Selim DURMAZ'a,

Çalışmamın başından sonuna kadar her aşamasında destek olan, deneyler sürecinde Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Laboratuvarı'nın desteğini sağlayan, bilimsel kimliği ile hekimlik hayatımda bana yeni kapılar açtığına inandığım, etik çalışma anlayışı ve disiplini ile bana örnek olan değerli hocam Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Serhan SAKARYA'ya,

Uzun ve zorlu asistanlık sürecinde birlikte çalışmaktan keyif aldığım yol arkadaşlarım Dr. Emin BARBARUS ve Dr. Ömer RAHMAN'a,

Asistanlık sürecinde gece gündüz beraber çalıştığım tüm hemşire, perfüzyonist ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Yaşamım boyunca sevgi ve destekleri ile her zaman yanımda olan, büyük özveri ile beni yetiştiren, haklarını ödeyemeyeceğim annem Sümeyye ERKAN ve babam Ali ERKAN'a ve her zaman varlığını yanımda hissettiğim kardeşim Süleyman Burak ERKAN'a,

Sevgi ve saygılarımı sunar; teşekkür ederim.

Bu zorlu yolda sabrı, ilgisi ve sevgisi ile bana güç veren sevgili eşim Elif ERKAN'a ve tüm sıkıntıları unutturarak hayatımın neşesi biricik kızım Sıla ERKAN'a ithaf edilmiştir.

Dr. Muhammet Hüseyin ERKAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. PERİFERİK ARTER HASTALIĞI	2
2.1.1. ETİYOLOJİ.....	2
2.1.2. EPİDEMİYOLOJİ.....	3
2.1.3. RİSK FAKTÖRLERİ	4
2.1.4. BELİRTİLER VE KLİNİK EVRELEME.....	6
2.1.5. TEDAVİ.....	9
2.1.5.1. KONSERVATİF TEDAVİ	9
2.1.5.2. MEDİKAL TEDAVİ.....	11
2.1.5.3. ENDOVASKÜLER TEDAVİ.....	12
2.1.5.4. CERRAHİ TEDAVİ	13
2.2. CERRAHİ TEDAVİDE GREFT SEÇİMİ	15
2.2.1. OTOJEN GREFTLER.....	15
2.2.1. ALLOGREFTLER VE HETEROGREFTLER.....	16
2.2.1. PROSTETİK GREFTLER	17
2.2.3.1. DAKRON GREFTLER.....	18
2.2.3.2. POLİÜRETAN GREFTLER.....	18
2.2.3.3. PTFE (POLİTETRAFLOROETİLEN) GREFTLER.....	19
2.3. CERRAHİ TEDAVİDE KOMPLİKASYONLAR	22
2.3.1. GREFT TROMBOZU	22
2.3.1.1. İNTİMAL HİPERPLAZİ	24
2.3.2. GREFT ENFEKSİYONU	25
2.3.2.1. BİYOFİLM NEDİR?.....	27
2.3.2.2. QUORUM SENSİNG	28
2.3.2.3. ANTİBİYOTİK DİRENCİ.....	29

3.MATERYAL ve METOD	30
3.1. BAKTERİYEL KONTAMİNASYON VE BİYOFİLM OLUŞUMU	30
3.1.1. GREFTLERİN HAZIRLANMASI	30
3.1.2.BAKTERİ SUSPANSİYONU HAZIRLANMASI	30
3.1.3. GREFTLER ÜZERİNE MİKROORGANİZMALARIN EKİMİ	31
3.1.4. BİYOFİLM OLUŞUMU	32
3.1.5. SEM (SCANNİNG ELECTRON MICROSCOPE) GÖRÜNTÜLEMESİ	33
3.2. ENDOTELİZASYON	35
3.2.1. GREFTLERİN HAZIRLANMASI	35
3.2.2. ENDOTEL BESİ YERİNİN HAZIRLANMASI	35
3.2.3. ENDOTEL HÜCRELERİNİN HAZIRLANMASI	35
3.2.4. ENDOTEL HÜCRELERİNİN EKİMİ	35
3.2.5. ENDOTEL HÜCRELERİNİN FİKSASYONU VE GÖRÜNTÜLENMESİ	37
3.3.İSTATİSTİKSEL ANALİZ	37
4. BULGULAR	38
4.1. BİYOFİLM OLUŞUMUNUN KARŞILAŞTIRILMASI	38
4.2. BİYOFİLM OLUŞUMUNUN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU İLE GÖRÜNTÜLENMESİ	40
4.3. ENDOTELİZASYONUN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU İLE GÖRÜNTÜLENMESİ	41
5.TARTIŞMA	49
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	55
7.ÖZET	56
8.SUMMARY	57
9. KAYNAKLAR	58

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1.Periferik arter hastalığında Fontaine Evrelemesi ve Rutheford Sınıflaması

Tablo 2.2.Szilagyi Sınıflandırması: Postoperatif Yara Enfeksiyonuna göre Sınıflandırma

Tablo 2.3. Etken ve enfeksiyon bölgesine göre greft enfeksiyonu insidansı

Tablo 4.1. Ortalama absorbans değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

Tablo 4.2.Spektrofotometrikabsorbans değerleri

Tablo 4.3.İstatistiksel analiz



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 3.1. Greftlerin deney öncesi görünümü

Şekil 3.2. Plaka haline getirilen greftler

Şekil 3.3. Greftlerin ekim planı

Şekil 3.4. Ekim yapılan greftler

Şekil 3.5. Vorteks cihazı

Şekil 3.6. Santrifüj cihazı

Şekil 3.7. Spektrofotometre cihazı

Şekil 3.8. Kristal viyole ile boyama yapılan greftler

Şekil 3.9. SEM görüntülemesi için hazırlanan greftler

Şekil 3.10. SEM öncesi materyal kaplama cihazı

Şekil 3.11. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Şekil 3.12. HUVEC ekim planı

Şekil 3.13. Kabin

Şekil 3.14. İnkübatör

Şekil 4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu ile alınan görüntülerin karşılaştırılması(x10000).

Şekil 4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu ile alınan görüntülerin karşılaştırılması(x20000).

Şekil 4.3. Kontrol grubu greftlerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi.

Şekil 4.4. 3. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi.

Şekil 4.5. 5. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi.

Şekil 4.6. 10. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi.

Şekil 4.7. 15. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi.

Şekil 4.8. 20. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi.

Şekil 4.9. 25. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi.

KISALTMALAR

ABI	Ankle-Brakial Index
ACC/AHA	The American College of Cardiology/American Heart Association
ACE-inh	Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors
BCA	Bovine Carotid Artery
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMV	Bovine Mesenteric Vein
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
ePTFE	Expanded Polytetrafluoroethylene
EPS	Extracellular Polymeric Substances
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
HDL	High Density Lipoprotein
HUV	Human Umbilical Vein
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
KBY	Kronik Böbrek Yetmezliği
LDL	High Density Lipoprotein
MMP	Matrix Metalloproteinase
OR	Odds Ratio
PAH	Periferik Arter Hastalığı
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PET	Polietilenteraftalat
PTA	Perkütan Transluminal Anjioplasti
PTFE	Politetrafluoroetilen
SEM	Scanning Electron Microscope
SIA	Subintimal Anjioplasti
TBI	Toe-Brakial Pressure Index
TP	Toe Pressure
TSB	Triptik Soy Buyyon
VGEF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik arter hastalığında; medikal tedavi, endovasküler tedavi ve cerrahi tedavi seçenekleri mevcuttur. Cerrahi tedavide otojen greft ve prostetik greft seçenekleri karşımıza çıkmaktadır. İlk olarak 1973 yılında tanımlanan ve 1976 da klinik uygulamaya giren ePTFE (genişletilmiş politetrafloroetilen) greftler zamanla periferik vasküler cerrahide sıkça kullanılan prostetik greftler olmuştur.

Greft trombozu ve greft enfeksiyonu prostetik greftlerde görülen yüksek morbidite ve mortaliteye neden olan iki ana komplikasyondur. Prostetik greftin endotelizasyonunu ve antitrombojen özelliğini artırarak greft trombozu riskini azaltma fikri ePTFE greftlerde yapısal değişikliklere gidilmesine neden olmuştur. Bu nedenle ePTFE greftler duvar kalınlığı, porositisi ve iç yüzey kaplamaları ile çeşitlik göstermektedir.

ePTFE greftlere antitrombojen özellik katmak ve greft açıklığını artırmak amacıyla greftlerin iç yüzeyine heparin kaplama veya karbon kaplama uygulamaları mevcuttur. Biz de çalışmamızda farklı iç yüzey yapısına sahip ePTFE greftlerin; endotelizasyon, bakteriyel kontaminasyon ve biyofilm oluşumuna etkisini araştırmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.PERİFERİK ARTER HASTALIĞI

Periferik arter hastalığı ekstremitelerinin darlığı veya tıkanıklığı ile ortaya çıkan ciddi mortaliteye sebep olan bir hastalıktır. Altta yatan en sık neden ateroskleroz olmakla birlikte vaskülitler gibi inflamatuvar hastalıklar veya fibromusküler displazi gibi noninflamatuvar arteriyopatiler de periferik arter hastalığı nedenidir.

Periferikarteryel hastalık klinik olarak alt ekstremitelerinde daha sık karşımıza çıkmaktadır. Alt ekstremiteler periferik arter hastalığı proksimal ve distal hastalık olarak iki alt tipe ayrılabilir. Proksimal hastalık aortiliak ve femoropopliteal lezyonları içerirken, distal hastalık infrapopliteal lezyonları içermektedir(1). Distal hastalığa medial tabakanın kalsifikasyonu eşlik eder ve bu durum yüksek mortalite ile ilişkilidir(2).

2.1.1. ETİYOLOJİ

Periferik arter hastalığı etyolojisinde inflamatuvar veya inflamatuvar olmayan arteriyopatileri barındırmakla birlikte etyolojideki esas etken aterosklerozdur. Ateroskleroz orta ve büyük damarları tutan intimal lipid ve fibroz materyallerin birikimi ile seyreden bir hastalıktır(3). Ateroskleroz, risk faktörleri ile birlikte çok erken yaşta başlayan yavaş ve sessiz gelişen bir süreçtir. Öyleki kalp donörlerinin intravasküler ultrason ile değerlendirildiği bir çalışmada, 20 yaşından küçük bireylerin %17'sinde ateroskleroz kanıtlarına rastlanmıştır(4).

Ateroskleroz, sert (σκληρός, sklerosis) ve yulaf lapası (αθήρα, athere) anlamındaki iki Yunan kelimesinden türetilmiştir. 1975'te Von Haller sarı renkli plak içeriğini aterom olarak tanımlamıştır(5). 1904'te ise Marchand arteryel sertleşme ve yağlı dejenerasyonu ateroskleroz olarak tanımlamıştır(6). Endotel hasarı sonrası trombositlerin ve monositlerin hasarlı intima bölgesine adezyon sonrası inflamatuvar bir yanıt oluşur. Bu yanıt intimal hücrelere zarar vermekte ve nitrik oksit üretimini azalmaktadır. Sonuç olarak inflamatuvar mediatörler, trombosit agregasyonu, lipid depolanması gibi etkenlerle plak oluşumu ortaya çıkmaktadır(7).

Ateroskleroz sürecinin ilk basamağı endotel disfonksiyonudur. Endotel fonksiyon bozukluğu için risk faktörleri majör ve minor risk faktörleri olarak ikiye ayrılabilir. Major risk faktörler: ileri yaş, diyabet, hiperlipidemi, hipertansiyon, sigara kullanımı, c-reaktif protein yüksekliği, hiperhomosisteinemi'dir. Minör risk faktörleri: erkek cinsiyet, beyaz ırk harici ırklar, yüksek yağlı diyet, hiperkoagülabilite ve alkol tüketimidir(8).

2.1.2. EPİDEMİYOLOJİ

Periferik arter hastalığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sık görülen ve sıklığı giderek artan önemli bir sağlık sorunudur. Bozulmuş bacak-kol basınç indeksi (ABI) olan hastalarda yapılan kohort çalışmasında Amerika Birleşik Devletleri'nde en az 8,5 milyon kişinin periferik arter hastalığından etkilendiği sonucuna ulaşılmıştır(9). Benzer bir kohort çalışmasında ise dünya genelinde 200 milyon insanın periferik arter hastalığından etkilendiği düşünülmektedir(10).

Epidemiyolojik çalışmalarda tüm dünyada alt ekstremiteler periferik arter hastalığı insidansı %3-12 arasındadır(11,12). Alt ekstremiteler periferik arter hastalığının ülkemizdeki prevalansı bacak-kol basınç indeksi (ABI) 0.9 ve daha küçük olan hasta grubunda %8.27 olup; $ABI \geq 1,30$ olan hasta grubunda %11,49 olarak bildirilmiştir(13).

Periferik arter hastalığının asemptomatik evreleri de göz önüne alındığında toplumdaki görülme sıklığı çok daha fazladır. 45-74 yaş aralığında insanların %6,9'unda bacak-kol basınç indeksi 0.95'in altında ölçülmüş olup bu hasta grubunun sadece %22'si semptomatiktir(14). 55 yaşın üzerindeki bireylerde hastalığın prevalansı %10-25 olup yaşla birlikte bu oran artmasına rağmen etkilenmiş bireylerin %70-80'i asemptomatiktir(15,16).

Periferik arter hastalığı toplum içerisinde homojen bir dağılım göstermez. Tüm bu oranlar yaşa, cinsiyete hatta gelir düzeyine göre dahi farklılık göstermektedir(17). Sigara, ileri yaş ve erkek cinsiyet periferik arter hastalığı açısından majör risk faktörlerindendir(18).

Alt ekstremiteler periferik arter hastalığı 55 yaş üzerinde %15 oranında rastlanırken kladikasyoşikayeti 55 yaş üzerinde sadece %5 görülmektedir. Ancak yaş arttıkça kladikasyoşikayeti artmakta olup 85 yaş üzerinde bireylerde %24 oranında görülmektedir(19). İnvaziv olmayan kriterlere göre yapılan araştırmada hastalığın prevalansı 60 yaş altında %3-7 iken 70 yaş üstünde bu oran %20'ye çıkmaktadır. Ve 65 yaş üzerinde kadınlarda %17, erkeklerde ise %20 olarak bildirilmiştir(20). Kladikasyo görülme sıklığı ileri yaş ile ilişkili olup; görülme sıklığı 45-54 yaş arasında %0,6 iken 55-64 yaş arasında %2,5 ve 65-74 yaş arasında bu oran %8,8'dir(21). Toplam 7715 hastanın değerlendirildiği Rotterdam çalışmasında kladikasyo 55-60 yaş arası %1 iken 80-85 yaş aralığında %4,6 olduğu görülmüştür(22).

Ek olarak bu hastalarda sistemik aterosklerozun neden olduğu hipertansiyon, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık gibi ciddi sağlık problemleri de eşlik

edebilmektedir(23). Asemptomatikperiferik arter hastalığına klinik olarak daha az önem verilse de miyokardinfarktüsü gibi ciddi kardiyovasküler olaylar açısından önemli bir belirteçtir(24).

2.1.3. RİSK FAKTÖRLERİ

Periferik arter hastalığı risk faktörleri diğer aterosklerotik hastalıklarla benzer olup sigara kullanımı ve diyabetes mellitus en güçlü etkenler olarak öne çıkmaktadır(10). Yüksek inflamasyon ve tromboz belirteçleri, homosistein ve lipoprotein(a) yüksekliği, kronik böbrek hastalığı da risk faktörleri arasındadır(25). Yaş, cinsiyet, obezite ve hipertansiyon diğer risk faktörlerini oluşturmaktadır. Periferik arter hastalığı erkeklerde ve ileri yaşta daha sık görülmektedir(26).

Sigara kullanımı ile periferik arter hastalığı arasında ki ilişki ilk olarak Erb tarafından 1911 de tanımlanmış olup kladikasyo oranı sigara içmeyenlere göre üç kat fazla olduğu bildirilmiştir(27). İnhalasyon ile alınan nikotinin HDL miktarını azalttığı, trombosit agregasyonunu artırdığı, prostosiklin seviyesini düşürdüğü, tromboksan seviyesini artırdığı ve vazokonstruksiyonu desteklediği gösterilmiştir(28). Tüm bu etkileri ile sigara, aterosklerotik hastalıkların gelişimine ve ilerlemesine neden olmaktadır.

Framingham çalışmasında sigara kullananlarda periferik arter hastalığı görülme riski iki katı olduğu görülmüştür(29). Ayrıca sigara kullanım miktarı ile periferik arter hastalığı riski arasında korelasyon mevcuttur(30). Bununla birlikte sigara kullanımı bırakıldığında kladikasyo riskinde hızlı bir düşüş gözlenmiştir(31).

Diyabet, periferik arter hastalığı için ciddi bir risk faktörüdür. Glikolize hemoglobinin her %1 artışında periferik arter hastalığı riski %28 artmaktadır(32). Diyabetik hastalarda endotel hücrelerindeki nitrik oksit kullanılabilirliğinin değişkenliği ve vasküler düz kas hücrelerindeki fosfotidilinositol-3 aracılığı ile proaterojenik aktivitelerde artış ateroskleroza neden olmaktadır. Ayrıca diyabet kan viskozitesinde artış, trombosit agregasyonu ve fibrinojen seviyesinde artışa neden olmaktadır(33).

Hipertansiyon, periferik arter hastalığı riskini artıran bir diğer komorbid faktördür. Framingham Offspring çalışmasına göre hipertansiyon nedeniyle periferik arter hastalığı riski iki kat artmıştır(34). Periferik arter hastalığı tanısı olanlarda hedef kan basıncı 140/90 mmHg altında tutulması önerilirken; ek olarak diyabet veya kronik böbrek yetmezliği de eşlik ediyorsa hedef kan basıncı 130/80 mmHg altında olmasıdır(35,36). Bir anjiyotensin

dönüştürücü enzim inhibitörü olan ramipril ile yapılan çalışmada miyokard infarktusu, inme ve vasküler olay ilişkili mortalite oranı düşürdüğü görülmüştür. Aynı çalışmanın subgrup analizinde periferik arter hastalığı tanısı olan 4051 hastada plesebo grubuna göre ramipril kullananlarda %22 azalmış risk tesbit edilmiştir(37).

Hiperlipidemi alt ekstremitte periferik arter hastalığı açısından artmış risk göstergesidir. Periferik arter hastalığında etkin hiperlipidemi tedavisinin sağkalıma katkı sağladığı kanıtlanmıştır(38). The American College of Cardiology/AmericanHeart Association (ACC/AHA) klavuzu, periferik arter hastalarında hedef LDL değerini 100mg/dl altında tutmayı önermektedir.

Homosistein düzeyi ile prematür ateroskleroz arasındaki ilişki 1900'lü yıllarda başka risk faktörü tesbit edilmeyen aterosklerotik genç hastalarda tespit edilmiştir. Prematur periferik arter hastalığı olan hastalarda %30 oranında hiperhomosisteinemi görülmüştür(39). Homosistein seviyesindeki artış trombosit aktivasyonunda artış ve trombüs oluşumu ile endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Ayrıca hiperhomosisteinemi hidrojen peroksit üretiminde artış, faktör V ve VII de artış, protein C de azalma, trombomodulin ve heparin sulfata inhibisyona neden olmaktadır. Plazmadaki homosistein seviyesini Vitamin B ve folik asit düşürmektedir(40). Bu nedenle düşük Vitamin B6 ve düşük folat seviyeleri periferik arter hastalığı ile ilişkilendirilmiştir(41).

Aile öyküsü olan bireylerde periferik arter hastalığı riski iki kat fazla bulunmuştur(42). Ayrıca ikiz olan bireyleri içeren çalışmalarda periferik arter hastalığı sıklığı daha fazla bulunması herediter yönünü olduğunu göstermektedir(43).

Periferik arter hastalığında ateroskleroz nedeniyle koroner arter hastalığı ve serebrovasküler hastalık sık görülen komorbid durumlardır. Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events (CAPRIE) çalışmasında aterosklerozu olan koroner arter, periferik arter, serebrovasküler arteriyel hastalığı olan 20000 hastanın 3 te 1'inde kladikasyo şikayeti mevcuttur(44). Bu nedenle koroner arter hastalığı veya serebrovasküler arteriyel hastalığı olan hasta gruplarında periferik arter hastalığı birlikteliği ve riski unutulmamalıdır.

2.1.4. BELİRTİLER VE KLİNİK EVRELEME

Periferik arter hastalığı asemptomatik olabildiği gibi tipik semptomu olan efor ile ortaya çıkan ağrı (kladikasyo intermittant) veya istirahat ağrısı ve doku kaybı (ülser/gangren) ile görülen kritik bacak iskemisi olarak da karşımıza çıkmaktadır. Damardaki lezyon ilerledikçe damarda daralma (stenoz) veya tam tıkanıklık (oklüzyon) durumlarında doku kanlanmasında bozulma ile birlikte semptomlar ortaya çıkmaktadır.

Asemptomatik hastalarda noninvaziv tarama amaçlı ve semptomatik hastalarda hastalığın objektif değerlendirilebilmesi için sistolik kan basıncı ayak bileği-kol indeksi (ABI) kullanılmaktadır. ABI'nin gerçek duyarlılığı %79, özgüllüğü %96'dır(45). Ayak bileği-kol indeksi normalde 1 ile 1.3 arasındadır. ABI<0.9 ise alt ekstremité periferik arter hastalığı için tanı koydurucudur(46). ABI<0.5 ise istirahat ağrısı ve doku kaybı görülebilmektedir(47,48).

Kronik böbrek yetmezliği olan veya diyabetik hastalarda alt ekstremité arterlerinin ileri derece kalsifikasyonu sonucu komprese edilemeyebilir ve bu durumda ABI>1.4 olup yanlış bilgi vermektedir. Distal arterlerin ileri kalsifikasyonu nedeniyle artmış ABI(>1.4) artmış mortalite ile ilişkilidir(49). Bu gibi hastalarda ayak baş parmak basıncı (Toe Pressure-TP) veya ayak baş parmak-kol basınç indeksi (Toe-Brakial Pressure Index-TBI) ölçülebilir(50). Transkutanöz oksijen saturasyonu ölçümü de periferik arter hastalığı tanısı ve ciddiyeti hakkında bilgi verir(51).

Asemptomatik alt ekstremité periferik arter hastalığı toplumda tahmin edilenden daha fazladır. PERTNERS programında ABI ölçümü ile veya özgeçmiş ile %29 oranında PAH tespit edilmiştir. Yeni PAH tanısı alan bu hastaların %45'inde ağrı öyküsü yok iken sadece %5.5'luk bir kesimde klasik kladikasyo intermittant saptanmıştır(52). Başka bir çalışmada herhangi bir bacak semptomu olmayan hastaların %14'ünde ABI<0.9 bulunmuştur. Asemptomatik PAH tanısı diğer sistemlerdeki aterosklerotik hastalıklar açısından risk faktörü olması nedeniyle önemlidir. Örneğin, PAH tanısı olan hastaların yaklaşık %50'sinde bir renal arterde en az %50 darlık tespit edilmiştir(53).

Asemptomatik PAH olan hastalarda kladikasyo olmamasına rağmen fonksiyonel kapasite azalabilmektedir. Fonksiyonel kapasitedeki bu azalma semptomları maskeleyerek hastalığın şiddetinin hafife alınmasına neden olabilir. Asemptomatik hastaların kladikasyosu olan hastalara göre 6 dakikalık yürüme testi sonuçlarında yıllık düşüş daha fazla

bulunmuştur(54,55). Bu bulgular göz önüne alındığında PAH açısından risk faktörü taşıyan hastalarda fonksiyonel kapasite mutlaka sorgulanmalıdır.

Ağrı, kladikasyo intermittant veya istirahat ağrısı kliniği ile görülebilir. Alt ekstremitte periferik arter hastalığının tipik semptomu kladikasyo intermittanttır. Aterosklerotik lezyon ciddiyeti arttıkça damar lümeni daralarak doku perfüzyonu bozulmaya başlar. Egzersiz sırasında kan akımı ihtiyacı artar ve bu ihtiyaca yetersiz cevap nedeniyle dokuda geçici iskemik belirtiler ortaya çıkar. Ağrı hissi küçük miyelinsiz A delta ve C duyusal lifleri içeren iskemik nöropatiden ve anaerobik metabolizma sonucu açığa çıkan Substance P maddesi ile lokal intramusküler asidozdan kaynaklanır(56). Yaklaşık 2-5 dakika dinlenmekle ağrı geçer. Kladikasyo intermittantın bir diğer özelliği de sabit bir egzersiz temposunda hep aynı mesafede ağrının gelmesidir. Yokuş yukarı yürümek, merdiven çıkmak, koşmak gibi egzersiz dozunun arttığı durumlarda ağrı daha kısa mesafede ortaya çıkmaktadır.

Ağrı şikayeti kalçada, uyluk bölgesinde, baldır bölgesinde ve ayakta görülebilir. Genellikle hemodinamik olarak anlamlı arteriyel lezyonun altındaki kas gruplarında ağrı ortaya çıkar. Arteriyel lezyonlar; suprainguinal, infrainguinal ve ikisinin birlikte olduğu durumlar olarak üç ana gruba ayrılabilir. Suprainguinal lezyonlar distal abdominal aorta ve iliak arterleri içerir. Ve bu tip lezyonlarda ağrı genellikle kalça ve uyluk bölgesindedir. Erkek hastalarda iliak lezyonlar internal iliak arterin proksimalde ve bilateral ise erektile disfonksiyon gösterebilir. Suprainguinal periferik arter hastalığı olan bireylerde her ne kadar ağrı ilk kalça ve uyluk bölgesinde başlasa da yürüme sırasında tüm bacakta azalmış perfüzyon nedeniyle klasik baldır kladikasyosu da eşlik eder.

Infrainguinal lezyonlar, ana femoral arterden başlayarak pedal arterlere kadar tüm bacağın arteriyel sistemini kapsamaktadır. Ana femoral arter lezyonlarında uyluk bölgesinde ağrıya daha sık rastlanırken, yüzeysel femoral arter darlığı veya tıkanıklığı en sık görülen lezyon olup baldır kladikasyosunun en sık sebebidir. Popliteal arter ve tibial arterlerin lezyonları, kollateral dolaşımın yetersiz olması nedeniyle daha çok ekstremitayı tehdit eden iskemi ile ilişkilidir.

Distal arteriyel lezyonlar kladikasyo ile değil daha çok doku kaybı ile karşımıza çıkmaktadır. Distal arterlerin yaygın kalsifikasyonu diyabetik ve kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda sık görülür. Ayrıca uzun süreli kortikosteroid tedavisi de distal arteriyel yapılarda kalsifiye aterosklerotik hastalığa neden olabilmektedir(57). PAH tanısı alan 400

hastada yapılan ilk arteriogram da suprainguinal hastalığı olan grupta erkek cinsiyet ve sigara kullanımı ön planda iken, distal hastalığı olan grupta ileri yaş, diyabet, hipertansiyon ve kronik böbrek yetmezliği daha sık olduğu görülmüştür(58).

Kritik bacak iskemisi, periferik arter hastalığının en ağır şekli olup PAH tanısı alan hastaların %1'lik kısmında görülür(59). Kritik bacak iskemisinde kronik vazorelaksan maddelere maruziyet sonucu arteriollerde azami vazodilatasyon ve vazodilatatörlere duyarsızlaşma mevcuttur. Arteriolar vazodilatasyon sonucu duvar geçirgenliği artar ve o bölgede ödeme neden olur. ayrıca kronik iskemide endotel hücrelerinin yapı ve fonksiyonu bozulur; trombosit aktivasyonu ve lökosit adezyonu ile birlikte kapiller düzeyde mikrotrombüs formasyonları oluşur. Tüm bu değişiklikler kapiller düzeyde doku oksijenizasyonunun bozulması ile sonuçlanır(60,61).

Kritik bacak iskemisinin ana belirtileri; istirahat ağrısı, parmaklar veya ayağın distalinde iskemik ülser ve gangrendir. İstirahat ağrısı, yanma hissi veya rahatsız edici soğukluk hissi şeklinde ortaya çıkabilir. Ayrıca iskemik nöropati ayakta uyuşukluk veya hissizliğe neden olabilir. Bir çok hastanın aynı zamanda diyabetik olması nedeniyle nöropatik değişikliklerin sebebinin iske mi olarak belirlenmesi zorlaşmaktadır(62).

İskemik istirahat ağrısı yer çekiminin etkisi ile yavaşlayan kan akımı sonucunda bacak yukarı kaldırılınca artar ve bacak aşağı indirilince azalır. Klinik tanı bazı objektif hemodinamik ölçümlerle doğrulanmalıdır. Bu hemodinamik ölçümler $ABI < 0.4$, ayak bileği basıncı $< 50 \text{ mm Hg}$ ve ayak baş parmak basıncı $< 30 \text{ mmHg}$ olmasıdır.

İskemik ülserler genellikle hafif şiddetli bir travma sonrası dokudaki yetersiz kanlanma sonucu yaranın iyileşmeden giderek açılması ile oluşur. Diyabetik olmayan arteryel ülserler ayağın distalinde sığ, soluk ve cilt erezyonu görünümündedir. Ülser bölgesinde bazen yüksek doz oral narkotiklere dahi yanıt vermeyen ağrılar görülebilir. Bu ağrılar sadece iskemik nöropatiye bağlı olmayıp aynı zamanda derideki erezyona bağlı açığa çıkan duyu lifleri nedeniyle de oluşabilir. Diyabetik ayak ülserleri ise iskemik, nöroiskemik veya nöropatik olabilir. Son yapılan çalışmalarda diyabetik ayak ülserlerinin %50'den fazlasının iskemik veya nöroiskemik olduğu görülmüştür(63,64).

Gangren ise dokuların canlılığını korumaya yetecek kadar dahi kan akımının olmaması durumunda ortaya çıkar. İskemik nekroz geliştikçe sinir kaybı nedeniyle başlangıçta görülen

ağrı ortadan kalkar. Kritik bacak iskemisi olan diyabetik hastalarda gangren gelişimi %40 iken, diyabetik olmayan grupta %9 olarak raporlanmıştır(65).

Tüm bu belirtilerin ciddiyetine göre alt ekstremitte periferik arter hastalığı için Fontaine Evrelemesi ve Rutherford Sınıflaması olarak iki klinik sınıflandırma mevcuttur(Tablo2.1).

FONTAİNE		RUTHERFORD		
EVRE	KLİNİK	SINIF	KATEGORİ	KLİNİK
I	Asemptomatik	0	0	Asemptomatik
IIa	Hafif kladikasyo >200mt	I	1	Hafif kladikasyo
IIb	Orta veya Ciddi kladikasyo <200mt	I	2	Orta kladikasyo
		I	3	Ciddi kladikasyo
III	İstirahat ağrısı	II	4	İstirahat ağrısı
IV	Ülser veya gangren	III	5	Minör doku kaybı
		III	6	Major doku kaybı

Tablo 2.1. Periferik arter hastalığında Fontaine Evrelemesi ve Rutheford Sınıflaması

2.1.5. TEDAVİ

Alt ekstremitte PAH tedavisi kardiyovasküler riskleri azalmak, fonksiyonel kapasiteyi artırmak ve ekstremitte canlılığını korumayı hedefler. Tedavi yöntemlerinde ateroskleroza neden olan risk faktörlerinin yönetimi veyürüme egzersizleri gibi konservatif yaklaşımlar, uygun farmakolojik tedavi ve gereklilik halinde endovasküler veya cerrahi revaskülerizasyon seçenekleri karşımıza çıkmaktadır. Bu tedavi yöntemleri semptomlara yönelik uygulanırken öte yandan sistemik aterosklerozun neden olduğu komorbid hastalıklar unutulmamalıdır.

2.1.5.1. KONSERVATİF TEDAVİ

Konservatif tedavi risk faktörlerinin kontrol altına alınması ve egzersiz terapisi ile semptomların azaltılmasını amaçlar. Sigara kullanımının bırakılması, diyabet ve hipertansiyonun kontrol altına alınması, hiperlipidemi tedavisi risk faktörlerinin kontrolü açısından büyük öneme sahiptir.

Sigara kullanımının bırakılması ateroskleroz için en önemli risk faktörünün kontrolü ve tedavi yönetiminin ilk basamağını oluşturmaktadır. Sigara kullanımı kladikasyo şikayeti olan hastalarda ekstremitte kaybını etkileyen ispatlanmış en önemli faktörlerden biridir(66). Sigara kullanımının devam etmesi aterosklerozda progresyona, koroner arter hastalığı nedeni ölüm riskinde artmaya ve alt ekstremitte revaskülarizasyonunda kullanılan greftlerde erken greft kaybına neden olmaktadır(67,68). Sigaranın bırakılması hem erkeklerde hem de kadınlarda koroner arter hastalığından ölüm riskini ve amputasyon riskini azaltmaktadır(69).

Diyabetin kontrol altında tutulması periferik arter hastalığı progresyonu ve olumsuz kardiyovasküler olayların azaltılması açısından önemlidir. Kritik bacak iskemisine geçişte diyabet bir risk faktörüdür. Diyabetik hastalarda etkin kan glukoz kontrolünün mikrovasküler komplikasyonları azalttığı ve özellikle kilolu hastalarda metformin tedavisinin makrovasküler komplikasyonları azalttığı gösterilmiştir(70,71).

Periferik arter hastalarında, statin kullanılarak düşük dansiteli lipoprotein seviyesinin düşürülmesi (LDL<100) kardiyovasküler mortalite ve morbiditeyi dörtte bir oranında azalttığı gösterilmiştir(72). Statin kullanan periferik arter hastaları kullanmayan hastalara göre %18 daha az olumsuz ekstremitte sonuçlarına (semptomlarda kötüleşme, revaskülarizasyon ihtiyacı, amputasyon) sahip olduğu bulunmuştur(73).

Hipertansif hastalarda, sistolik kan basıncının 140mmHg'dan küçük ve diyastolik kan basıncının 90mmHg'dan düşük (KBY'li veya diyabetik hastalarda 130/80mmHg'dan düşük) tutulması önerilmektedir. Klinik uygulamalarda antihipertansif kullanımı ile kan basıncının düşürülmesinin bacakta iskemi semptomlarının artıracakı düşünülebilir. Fakat altı büyük çalışma ile yapılan bir meta analiz sonucuna göre, beta-blokör kullanımının kladikasyo ağrısını ve yürüme mesafesini etkilemediği gösterilmiştir(74). Diyabetik veya vasküler hastalığı olan 9297 hasta (4051 hastada PAH mevcut) ile yapılan çalışmada ramipril kullanımının 5 yıllık takipte kardiyovasküler olay riskini plesebo grubuna göre azalttığı gösterilmiştir(75). Periferik arter hastalığında, kardiyovasküler riski azaltmak için hipertansiyon tedavisinde anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri(ACE-inh) ön planda tercih edilebilir.

Egzersiz terapisi yürüme mesafesinde artma ve ağrı semptomunda azalma üzerinde belirgin etkiye sahiptir. Bir meta-analizde 20 randomize çalışmanın sonuçlarına göre, egzersiz tedavisinin kladikasyosu olan hastalarda en iyi başlangıç tedavisi olduğu doğrulanmıştır(76).

Kladikasyo şikayeti başlamasını takiben yürüme mesafesi yıllık 8.4 metre azaldığı tespit edilmiştir(77). Bu durum egzersiz tedavisi ile durdurabilir hatta aksine çevrilebilir. 1200 hastayı içeren bir meta-analizde egzersiz tedavisi ile rutin tedavi veya plesoba ile karşılaştırılmış ve egzersiz tedavisinin %50-200 oranında yürüme mesafesini artırdığı gösterilmiştir. İki yıla kadar iyileşme devam etmiştir. Fizyoterapist gözetiminde yapılan egzersizin normal egzersize göre yürüme mesafesini istatistiksel anlamlı (ortalama 150mt) artırmıştır(78).

Klavuzlar, egzersiz terapisinin en az 12 hafta boyunca, haftada üç veya dört seans ve her seans en az 30-45 dakika olacak şekilde yapılmasını önermektedir. Egzersiz sırasında ağır başladıktan sonra egzersize devam edilmeli ve ağrı tolere edilemeyecek noktaya geldiğinde durup dinlenilmelidir. Ağrı geçmesi ile birlikte tekrar egzersize başlanmalı ve bu döngüye 30-45 dakika devam edilmelidir. Egzersizin etkinliği kanıtlanmış olmakla birlikte, hastaların %34'ü komorbid faktörler nedeniyle egzersiz yapamamış ve %30'uda egzersizi reddetmiştir(79). Bu nedenle PAH olan hastalarda etkili olmakla birlikte ancak hastaların üçte birlik kısmına egzersiz tedavisi uygulanabilmektedir.

2.1.5.2. MEDİKAL TEDAVİ

Farmakolojik tedavi semptomları iyileştirmeyi ve hastalığın doğal progresyonunu yavaşlatmayı amaçlar. Medikal tedavi iki grupta incelenebilir. Bunlar antiplatelet ajanlar (asetilsalisilik asit,klopidogrel) ve reolojik/vazodilatör (pentoksifilin, silostazol, naftidurofril) ajanlardır.

Aspirin, tek başına kullanımında asemptomatik hastalarda dahil olmak üzere PAH popülasyonunda istatistiksel anlamlı yararı görülmemiştir(80). Bir çalışmada 325mg aspirin kullanımının cerrahi revaskülerizasyon ihtiyacını azalttığı ancak kladikasyo konusunda plesebo grubuyla anlamlı fark olmadığı raporlanmıştır(81). Klopidogrel, semptomatik PAH olan bireylerde risk azaltılması açısından aspirine alternatif olabilir. Ateroskleroz açısından yüksek riskli olup kanama riski düşük olan hastalarda aspirin ve klopidogrel'in birlikte kullanımı yararlı olabilir. Semptomatik PAH olan bireyler plesebo, aspirin ve aspirin+klopidogrel kullanımı karşılaştırıldığında, kombine antiplatelet kullanımı myokard infarktüsü, inme ve ölüm oranlarında belirgin fayda sağlamıştır(82).

Pentoksilin, metil ksantin türevi olup alyuvarların hücre duvarındaki esnekliğe ve deformasyonuna reolitik etkisi ile kan viskozitesini azalttığı ve bu sayede sokulara oksijen

sunumunu artırdığı düşünülmektedir. Ayrıca trombosit aktivasyonunu ve fibrinojen konsantrasyonunu azalttığı düşünülmektedir(83). Kladikasyonu olan 129 hastada yapılan çok merkezli çift kör çalışmada, plasebo grubuna göre yürüme mesafesinde anlamlı artış saptanmıştır(84). Pentoksifilin yürüme mesafesine etkisi istatistiksel olarak anlamlı olsada klinik olarak hastalar yeterli fayda görmeyebilir. Klinik etkisi tatmin edici olmasa da pentoksifilin en erken başarılı kladikasyon tedavisidir ve en iyi tolere edilen güvenli tedavi seçeneğidir.

Silastozol, fosfodiesteraz-3 inhibisyonu ile hücre içi siklik adenosin monofosfatı (cAMP) artırarak damar düz kasları kasılmasını ve trombosit agregasyonunu azaltır. Ayrıca serum lipid konsantrasyonlarına etki ederek trigliserit seviyesinde azalma ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyesinde artmaya neden olur. Ayrıca kronik alt ekstremitte iskemisinde anjiogenezi uyaran vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sentezini değiştirebileceğine dair kanıtlar mevcuttur(85). Silastozol ile pentoksifilin karşılaştırıldığı randomize kontrollü çalışmada; silastozol yürüme mesafesini %54 (107 metre) artırırken, pentoksifilin yürüme mesafesini %30 (64 metre) artırdığı bulunmuştur. Ayrıca pentoksifilin ile plasebo grubunda anlamlı fark saptanmamıştır(86). Silastozolun kalp yetmezliği varlığında kullanımı kontraendikedir.

Naftidrofuril, 5-hiroksitriptamil tip 2 antagonisti olup eritrosit ve trombosit agregasyonunu azaltarak etki gösterir. Bir meta-analizde naftidrofuril, plasebo grubuna göre yürüme mesafesini %26 artırmıştır(87). Cochrane analizinde kladikasyon tedavisinde olumlu etkisi netleşmiştir(88).

2.1.5.3. ENDOVASKÜLER TEDAVİ

Alt ekstremitte periferik arter hastalığı tedavisinde bir alternatif olan perkütan kateter girişimleri ilk kez 1964 yılında Dotter ve Judkins tarafından tanımlanmıştır(89). Endovasküler girişimler minimal invaziv olması nedeniyle zamanla daha ön plana çıkmıştır. 2116 hastanın dahil edildiği aortoiliak balon anjioplasti veya stent yerleştirme uygulanan bir meta-analiz sonucuna göre 30 günlük mortalite %1'den daha azdır(90).

Aortoiliak lezyonlarda endovasküler tedavi ilk tercih haline gelmiştir. Bir çalışmada 1996'dan 2000 yılına kadar aortoiliak oklüziv hastalıklarda balon anjioplasti ve stentleme %850 artış gösterirken eş zamanlı olarak cerrahi tedavide %16 azalma gözlenmiştir(91).

Aortoiliak endovasküler girişimler yaklaşık %96'lık yüksek başarı oranları ve %82'ye varan 3 yıllık açıklık oranlarına sahiptir(92).

Endovasküler tedavi yöntemleri infrainguinal periferik arter hastalığı için de ilk tercih haline gelmiştir. Perkütan transluminal anjioplasti(PTA) ve stent yerleştirme yaygın kabul gören yöntem olmakla birlikte subintimal anjioplasti (SIA) de total oklüziv lezyonlar için uygulanmaktadır. Çoklu komorbiditeleri olan veya otojen greft problemi olan hastalar cerrahi sınırlılıklar nedeniyle endovasküler yaklaşımdan en çok yarar saylayacak hasta grubu olabilirler(93). Endovasküler yöntemlerin başarısını belirleyen en önemli faktör ise distal damar yatağının durumudur(94).

Endovasküler işlemlerde sonrası major komplikasyon oranı %5, minor komplikasyon oranı %5'dir. Endovasküler işlemler sonrası 30 günlük mortalite kladikasyonu olan hastalarda %0,5 iken, ekstremitayı tehdit eden hasta grubunda mortalite %10'a kadar çıkmaktadır(95).

2017 yılında yayınlanan periferik arter hastalığı kılavuzuna göre infrainguinal periferik arter hastalıkları için girişim endikasyonları(96):

- 1) Lezyon uzunluğu<25cm ve daha önce endovasküler girişim yapılmamış ise ilk tercih endovasküler girişimdir.
- 2) Lezyon uzunluğu> 25cm olan ameliyat riski yüksek ve uygun ven grefti olmayan hastalarda endovasküler girişim, ameliyat riski düşük ve uygun ven grefti olan hastalarda cerrahi tedavi düşününülmelidir.

2.1.5.4. CERRAHİ TEDAVİ

Periferik arter hastalığı cerrahi tedavisi lezyonun bulunduğu bölgeye, proksimal ve distal anastomoz alanlarına göre birçok seçeneğin olduğu geniş bir konudur. Bu seçenekler aortafemoral bypass, iliofemoral bypass gibi anatomik bypassları içerdiği gibi aksillofemoral bypass, femorofemoral bypass gibi ekstra-anatomik bypassları da içermektedir. Ancak alt ekstremita periferik arter hastalığının cerrahi tedavisi dendiğinde infrainguinal bypass akla gelmektedir. Otojen veya prostetik greftler kullanılarak uygulanan diz altı veya diz sütü femoropopliteal bypasslar ve distal arterlere yapılan bypasslar infrainguinal bypass terimi içerisinde.

İnfrainguinal bypassın iki ana endikasyonu kladikasyon ve kritik bacak iskemisidir. Kladikasyon nedeniyle mesleki aktiviteleri ve günlük aktiviteleri kısıtlanan hastalar

infrainguinal bypass için potansiyel adaydırlar. Bu grup hastalara cerrahi tedaviden önce yaşam tarzı değişiklikleri, sigarayı bırakma ve uygun medikal tedavi denenmelidir. Kladikasyo şikayeti olan hastalarda 3-5 yıllık klinik kötüleşme oranı %20 ve amputasyon oranı %5'in altında olması nedeniyle ilk tercih yaşam tarzı değişikliği ve medikal tedavi olmalıdır(97-98). Çoğu merkezde infrainguinal bypass uygulanan hastaların %15-30'u kladikasyo şikayeti ile uygulanmaktadır(99). Kritik bacak iskemisi olan Fontaine Evre3-4 ve Rutherford Evre4-6 hastalara sıklıkla müdahale gerektirir(100-101).

2017 yılında yayınlanan periferik arter hastalığı kılavuzuna göre infrainguinal periferik arter hastalıkları için cerrahi tedavi endikasyonları(96):

- 1) Cerrahi için yüksek risk taşımayan, yaşam beklentisi>2yıl olan, lezyon uzunluğu>25cm olan, uygun otojen ven grefti olan hastalarda cerrahi tedavi endikedir.
- 2) Otojen safen ven femoro-popliteal bypass için tercih edilen grefttir.
- 3) Diz üstü bypass uygulanacaksa, herhangi bir otojen safen ven yokluğunda protez bir greft kullanılması düşünülmelidir.

Intrainguinal bypass prosedürleri en iyi sonucu otojen ven greftleri vermektedir, ancak greft diz eklemine geçmezse protez bypassların sonuçları kabul edilebilir(102). Bypass prosedürlerinin sonuçları hastalığın seviyesi ile ilişkilidir; aortofemoral rekonstrüksiyonlar infrainguinal prosedürlerden daha yüksek açıklık oranları ile ilişkilidir. Bununla birlikte, yeterli kalibrasyona sahip bir safen ven ile, infrapopliteal (krural) damarlarda bile uzun süreli açık kalma oranı 5 yılda yaklaşık% 70-80'dir(103-104). Farklı çalışmalarda diz üstü femoropoplitealbypass sonrası 5 yıllık açıklık oranı otojen greft için %66, prostetik greft için %50, diz altı femoropopliteal bypass için ise sırasıyla %66 ve %33 bildirilmiştir(105-106). Bu oranlar femorotibial bypass söz konusu olduğunda otojen greft için 5 yılda %74-80 olup prostetik greft için 3 yıllık açık kalma oranı %25 bildirilmiştir(107-108). Prostetik greft ve otojen greft kullanılarak oluşturulan kompozit greftler için 5 yıllık açık kalma oranı%28-50'dir(109).

Operasyondan sonra greftlerin açık kalma oranlarını etkileyen başlıca faktörler otojen greft kullanımı, diyabet olmaması ve distaldeki arterlerin açıklığının iyi olmasıdır. Ayrıca postoperatif uygun medikasyonda greft açıklığı için önemlidir. Antiagregan ajanlar Periferik cerrahi girişimler için incelenmiş ve aspirinin prostetik greft açıklığı, inme riski ve myokard

infarktüsü riskini azaltmak için etkili olduğunu göstermiştir(110). Greft tormbozu açısından yüksek riskli olduğu düşünülen hastalarda varfarinde tercih edilebilir(111). 2690 hastanın dahil edildiği çok merkezli randomize kontrollü bir çalışmada, infrainguinal revaskülerizasyonda oral antikoagulanların ven greft açıklığını artırdığı ve aspirinin prostetik greft açıklığını artırdığı gösterilmiştir(112).

Alt ekstremitte Periferik arter hastalığı cerrahi tedavisinde ilk tercih otojen ven grefti olmakla birlikte heterojen greftler ve prostetik greftlerde mevcuttur.

2.2. CERRAHİ TEDAVİDE GREFT SEÇİMİ

Teknolojideki gelişmelere rağmen halen doğala yakın greft materyali mevcut değildir. Enfeksiyona yatkınlık, esneklik, tromboza yatkınlık, fleksibilite açısından daha iyi greft materyalleri çalışılmaktadır(113-114). Var olan seçenekler arasında en ideal greft otojen ven greftleridir(115).

2.2.1. OTOJEN GREFTLER

Otojen ven greftlerinin kullanımı ilk olarak 20. Yüzyıl başlangıcında popliteal arter anevrizmalarında uygulanmıştır. Aterosklerotik periferik arter hastalığında ise 1944 te Dos Santos tarafından yüzeyel femoral arter endarterektomi sonrası yama olarak kullanıldığı raporlanmıştır(116). Birkaç yıl sonra Kunlin yüzeyel femoral arterdeki kısa lezyonlar için safen ven greftini kullanmıştır(117). Ancak zamanın cerrahi teknikleri nedeniyle oluşan anastomoz problemleri safen ven grefti açıklık sonuçlarını olumsuz etkilemesi nedeniyle 1940-1950 arasında cerrahlar arteryel homogreftlere ve yeni gelişen prostetik greftlere yönelmiştir.

1960 'lı yıllarda diz altı bypassta prostetik greftlerin yetersiz kalması safen ven greftlerine tekrar ilgiyi artırmıştır(118). 1963 yılında Dale tarafından femorotibial bypass için otojen safen ven kullanımı çalışması yayınlanmıştır(119). Cerrahi tekniklerde gelişmeler ile birlikte 1980'lerde alternatif otojen greft (küçük safen ven, yüzeyel femoral ven, kol venleri vb.) arayışları başlamıştır(120).

İnfrainguinal bypass için kullanılabilecek otojen greft seçenekleri arasında kontralateral veya ipsilateral büyük safen ven(121), küçük safen ven(122), yüzeyel femoral ven(123), basilik veya sefalik kol venleri(124), ve radial arter (125) mevcuttur.

Otolog ven greftleri arasında ilk seçenek büyük safen vendir. İpsilateral tarafta büyük safen ven uygun değilse veya yok ise kontralateral safen ven grefti tercih edilmektedir. İlerleyen zamanlarda tekrar safen ven ihtiyacı bu hasta grubunun %20-25'inden az bir bölümünde mevcuttur. Bu nedenle kontralateral safen ven grefti kullanılabilir ve bu az miktardaki hasta grubu için ihtiyaç halinde farklı otolog greft seçenekleri düşünülebilir. İpsilateral safen venin olmadığı durumda kontralateral safen ven korunmaya çalışan farklı yaklaşımlar kol venlerini kullanmayı tercih etmektedir(124-126).

Otojen ven greftleri rejeksiyon görülmemesi, difüzyon ile beslenerek canlılığını koruması ve açıklığını etkileyen en önemli etkenin endotel hasarı olduğu bilinmektedir(127). Variköz yapıda olması ve fibrotik kapaklar içermesi de açıklığı etkilediği unutulmamalıdır(128).

2.2.1. ALLOGREFTLER VE HETEROGREFTLER

Otojen ve prostetik greftlerdeki sınırlamalar farklı seçeneklerin araştırılmasına neden olmuş ve biyolojik greftlerin değerlendirilmesine yol açmıştır. Biyolojik greftler, klinik uygulamada kullanılmak üzere modifiye edilmiş otojen olmayan biyolojik damarlardan yapılmış bypass kanallarıdır. Allogreft veya homogreft terimi, aynı tür içinde bir kişiden diğerine nakledilen damarlar iken; ksenogreftler veya heterogreftler, bir türden farklı bir türe nakledilen greftler için kullanılmaktadır.

Carrel, 20. yüzyılın ilk on yılında köpeklerde allogreftler ve ksenogreftlerle deney yapmıştır(129). Birinci Dünya Savaşı sırasında yaralılarından elde edilen ilk kaydedilmiş allogreft kullanımıdır(130). 1948'de Gross ve arkadaşları, arteriyel allogreftlerin ilk klinik serisini tanımladı(131) ve on yıldan daha kısa bir süre sonra, Linton venöz allograft serisini yayınlamıştır(132). 1950'lerde çeşitli allogreft kriyoprezervasyon yöntemleri geliştirilmiş(132), ve son olarak 1980'lerin sonunda standardize edilmiştir(133). Enzimatik olarak işlenmiş sığır karotis arteri (BCA) ksenogreftleri ilk olarak 1966'da klinik bir ortamdakullanılmıştır(134). İnsan damarlarına benzer tekniklerin uygulanması, 1976 da insan umbilikal ven (HUV) greftinin Dardik tarafından geliştirilmesine yol açmıştır(135). Teorik olarak, kullanılabilirlik, çok çeşitli boyutlar, mükemmel kullanım özellikleri ve otojen damarlarınkine benzer açıklık oranları ile biyogreftler en uygun vasküler greft gibi görülmelerde pratikte bu denli yer edinmemiştir.

Bir köpek modelinde, taze venöz allogreftlerin açıklık oranı 20. Ayda% 69 olarak saptanmıştır(136). Başka bir köpek venöz allogreft deneyinde, azatiyoprin ile immünsüprese edilen köpekler, immünsüprese olmayanlara göre biraz daha iyi greft açıklığı göstermiştir(137). İnsanlarda, infrainguinal bypass için kullanılan taze venöz allogreftlerin bir seride başarısızlık oranı% 55 olup; başarısız greftler tıkanmış veya anevrizmatik hale gelmiştir. Allogreftlerin açıklık oranları, greftleri kan grubu ABO uyumlu donörlerden toplanan hastalarda daha yüksek görünmektedir(138). Başka bir çalışmada, aortik pozisyonda arteriyel allogreftlerin, hem humoral hem de hücrese düzeyde yüksek derecede immünojenik olduğu gösterilmiştir(139).

Kriyoprezervasyon tekniklerinin geliştirilmesi ile birlikte donörden alınan biyolojik greft, kolayca üretilen ve depolanabilen dayanıklı ve immünojenik olmayan greft haline dönüştürülmesi amaçlanmıştır. İlk başlarda, modifiye sığır karotis arter(BCA) greftleri önce köpeklere ve daha sonra semptomatik alt ekstremité oklüzyon hastalığı olan hastalara heterogreft olarak kullanılmıştır. Üç yıllık takipte greft rüptürü görülmemesine rağmen erken neointimal hiperplazi ve azalmış açıklık gözlenmiştir(134). Sığır mezenterik venleri(BMV) de glutaraldehit işlemi ile modifiye edilmiş ve γ radyasyon ile sterilize edilmiştir(140). Hem BCA'lar hem de BMV'ler, bir dizi klinik uygulamada heterogreft olarak kullanılmıştır. Modifiye sığır üreterleri, küçük bir çalışmada femoropopliteal bypassta kabul edilebilir açıklık oranları ile klinik olarak kullanılmıştır(141). Buna ek olarak, küçük bir randomize çalışma, ven seçenekleri olmayan hastalarda hemodiyaliz erişimi için kullanılan sığır üreterleri ve PTFE arasında klinik fark saptanmamıştır(142).

2.2.1. PROSTETİK GREFTLER

Sentetik greftler, modern arteriyel rekonstrüktif cerrahide 1952'de Voorhees ve arkadaşları tarafından Vinyon-N liflerinden dokunan bir vasküler greft geliştirilmesi ile yer almıştır(143). Başarılı erken klinik sonuçlara rağmen, birinci kuşak vasküler protezlerde uzun süreli dayanıklılık sağlanamamıştır. 5 yıl içinde greft dilatasyonu ve anevrizmal dejenerasyongösterilmiştir(144-145). Sentetik arteriyel kanallar için 1950'ler boyunca katı sert metaller, cam ve ipek dahil olmak üzere çeşitli aday materyaller incelenmiştir.

Polimer bilimi ve mühendisliğindeki yenilikler, 1938'de politetrafloroetilenin (PTFE; örn. Teflon) ve 1941'de polietilen tereftalatın (PET; örneğin Dacron) bulunmasını sağlamıştır. Prospektif randomize klinik çalışmalar, PET ve PTFE'nin infrainguinal

pozisyonda kullanıldığında uzun süreli performans özelliklerinde çok az farklılık gösterdiğini doğrulamıştır. Bununla birlikte, her ikisi de daha yüksek tromboz ve anastomotik neointimal hiperplazi riski nedeniyle otojen ven greftlerinden belirgin şekilde daha düşük açıklık göstermektedir. Bu komplikasyonlar prostetik greftlerde trombojeniteyi azaltmak amacıyla yeni yüzey yapıları geliştirmek için çalışmalar yapılmasına neden olmuştur.

2.2.3.1. DAKRON GREFTLER

Dakron, oldukça dayanıklı polyester polimeri olan polietilen tereftalatın DuPont tarafından tanımlanan bir örneğidir. DeBakey ilk örme Dacron protezini 1957'de bildirmiş olup torasik ve abdominal aortun yanı sıra proksimal periferik damarların arteriyel rekonstrüksiyonu için de yaygın olarak kullanılmıştır(146). Dakron liflerinin tubuler bir greft haline dönülmesi dokuma ve örme olmak üzere iki teknikle yapılmıştır. Örgü tekniği, yumuşak ve gerilebilir bir kumaş gibi liflerin birbirine geçen zincirde şeklindeilmek yapmasıdır. Buna karşılık, dokuma tekniği liflerin uzunlamasına ve çevresel doğrultularda üstten ve alttan birleşmesi ile oluşturulur(147-148). Dokuma greftler, örme greftlerden daha güçlü ve daha az gözeneklidir, ancak daha az uyumludur ve kesildiğinde yıpranabilirler.

Dacron greftlerinin çeşitli modifikasyonları mevcuttur. Yüzey trombojenisitesini azaltmak için biyoaktif heparin ile kaplı veya floropolimerler ile pasifleştirilmiş greftler geliştirilmiştir(149). Greft enfeksiyonu oluşumunu azaltmak için gümüş kaplı bir Dacron grefti de eklenmiştir. Bu değişikliklerin sonuçları iyileştirip iyileştirmediğini belirlemek için uzun süreli takip çalışmaları gerekmektedir. Örme greftler, implantasyondan hemen sonra greft boyutunda %10-20 artış, ardından yavaş yavaş genişleme ile zamanla dilatasyona eğilimi göstermiştir(150). Bununla birlikte, greft dilatasyonu ve yapısal başarısızlık korelasyonu belirlenmemiştir(151).1997'de FDA, implantasyondan ortalama 7.4 yıl sonra meydana gelen toplam 68 yapısal başarısızlık vakası bildirmiştir(152). Başka bir çalışmada, ortalama 12 yıllık takipte% 0.2'lik bir yapısal başarısızlık oranı bildirilmiştir(153).

2.2.3.2. POLİÜRETAN GREFTLER

Poliüretan, Dacron veya ePTFE'den daha elastomeriktir ve polimerik bir kaplama olarak kullanılmıştır. Poliüretan, üç farklı monomer tipinden (sert katman,zincir genişletici,yumuşak katman) oluşan bir kopolimerdir. Fizyolojik sıcaklıklarda, yumuşak alanlar esneklik sağlarken sert alanlar kuvvet kazandırır. Medikal amaçlı kullanılanpoliüretanlar; polyester, polieter veya polikarbonattan yapılmış yumuşak alanlara

sahiptir. Poliüretan vasküler greftlerin ilk jenerasyonunda polyester bazlı yumuşak alanlar kullanılmıştır.

İn vivo çalışmalarda biyouyumluluğun yüksek olduğu gözlenmiştir, ancak ester bağlantısının hidrolitik duyarlılığı kimyasal dejenerasyona yol açmıştır(154-155). Bir klinik çalışmada diz altı bypass greftlerinin 1 yıl içinde yarısından fazlası tıkanmıştır(156). Biyodejenerasyon da olası kanserojen etkiler nedeniyle önemli bir problemdir. FDA, hayvanlarda karaciğer kanserine neden olan 2,4-tolüen diamin salınımı nedeniyle 1991 yılında meme implantlarında poliüretan köpük kullanımını sonlandırmıştır(157). Ancakgünümüzde kullanılan çoğu poliüretan, farklı bir monomerik diamin alt birimi içermektedir.

Vectra (Bard Periferik Vasküler, Inc., Tempe, Ariz) polieter üretan bazlı temin edilebilen tek grefttir ve sadece hemodiyaliz erişimi için kullanılmaktadır(158). Kendiliğinden sızdırmazlık özellikleri nedeniyle implantasyondan sonraki 24 saat içinde hemodiyaliz amacıyla kullanılabilirler. Poliüretanın ana avantajı yüksek elastikiyeti olmakla birlikte implantasyonundan sonra zayıf biyo-kararlılık ve uyum kaybı göstermesi nedeniyle klinik kullanımını sınırlanmıştır(159).

2.2.3.3. PTFE (POLİTETRAFLOROETİLEN) GREFTLER

PTFE, DuPont tarafından 1930'ların sonlarında Teflon olarak tescillenen dayanıklı, hidrofobik bir floropolimerdir. PTFE başlangıçta tekstil bazlı greftlerde fibril olarak kullanıldı, ancak günümüzde ağırlıklı olarak genişletilmiş PTFE (ePTFE) greftleri kullanılmaktadır. ePTFE (expanded politetrafloroetilen), Matsumoto tarafından 1973 yılında tanımlanmıştır(160). Genişletilmiş PTFE greftleri ilk olarak 1972'de hayvanlara implante edilmiş(161) olup Campbell ve arkadaşları 1976'da ilk klinik kullanımlarını bildirmiştir(162).

Makroskopik olarak, ePTFE'nin yüzeyi Dacron'dan daha pürüzsüz, yumuşak ve esnektir. Mikroskobik ölçekte, genişletme işlemi, fibrillerle bağlanan katı adalardan veya düğümlerden oluşan gözenekli bir yapıyı ortaya çıkarmaktadır. Bu ada-fibril yapısı, genleşmiş polimerin toplam hacminin yaklaşık %20'sini kaplar ve Dacron greftlerinden daha yüksek gözenek oranı ile sonuçlanır. Bununla birlikte, ePTFE greftlerindeki gözenekler, dokuma veya örme dakron greftlere göre oldukça küçüktür. Ayrıca, floropolimerin doğal hidrofobik doğası, kanın nüfuz etmesini önleyen doğal bir bariyer oluşturur. ePTFE'nin kimyasal uygunluğunarağmen, plazma proteinleri ve trombositler yüzeye yapışır ve konakçı yanıtı Dacron'a benzerdir(163).

ePTFE greftlerince duvarlı, cuff'lı, ringli olmak üzere çeşitli konfigürasyonlarda mevcuttur. İnce duvarlı ePTFE, 400 ila 600 µm standart duvar kalınlığına kıyasla 200 ila 300 µm duvar kalınlığına sahiptir. Bu, greftin uyumunu arttırmakla beraber sütür tutma gücü kaybı ve protezin tekrarlanan diyaliz erişimi için elverişli olmaması nedeniyle kullanımı kısıtlıdır. İnce ve standart duvarlı ePTFE greftlerinin klinik performansları da benzer bulunmuştur(164). ePTFE greftlerinin bükülme direnci, harici plastik ring uygulanmasıyla artırılmıştır. Cuff yapısı ise, greft hemodinamisini optimize etmek amacıyla geliştirilmekle birlikte kesin olarak kanıtlanmamıştır(165). Ek olarak, ePTFE kendiliğinden sızdırmazlık özellikleri göstermediği için, , ponksiyon bölgesinde kanama riski nedeniyle hemodiyalize erken erişim engellenir.

ePTFE greftlerde, Dacron greftlere göre trombosit birikiminin(166) ve kompleman aktivasyonunun(167) daha düşük olduğunu gösteren bazı kanıtlara rağmen, Dacron ve ePTFE greftlerinin açıklık oranları benzerdir(168). ePTFE greftlerde açıklık oranını artırmak için bazı iç yüzey kaplamaları uygulanmaktadır. Heparin ve karbon kaplı ePTFE protezleri kullanılabilir hale gelmiştir, ancak açıklık oranlarını artırdığına dair veriler halen sınırlıdır.

- **Heparin Kaplı ePTFE**

Heparinize bir yüzeyin ilk raporu 1963 yılında Gott tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmalarda grafit kaplı yüzeylerde iyonik olarak bağlanmış heparinin in vitro ve in vivo pıhtılaşma sürelerini önemli ölçüde uzattığı gösterilmiştir(169). Daha sonra heparin kaplama teknolojileri farklı cihazlar için geliştirilmiş ve özellikle kardiyopulmoner bypass devrelerinde yaygın şekilde kullanılmıştır(170).

Prospektif randomize çok merkezli bir çalışma, femoropopliteal bypass için standart ePTFE ile heparin bağlı Dacron greftlerini (MAQUET Holding GmbH & Co. KG., Rastatt, Almanya) karşılaştırmıştır. Heparin bağlı Dacron greftlerinin açıklığı 3 yılda ePTFE'den daha üstün bulunmuş, ancak 5 yılda anlamlı bir fark gözlenmemiştir(171). Başka bir randomize çok merkezli prospektif bir çalışma da, femoropopliteal pozisyonunda heparin bağlı Dacron greftlerinin standart ePTFE ile karşılaştırılabilir 5 yıllık açıklık oranı sergilediğini bildirmiştir(172).

Heparinin greftin lümenal yüzeyine kovalent bağlanması ile, heparin molekülünün biyoaktivitesini kaybetmediği gösterilmiştir(173). Köpek ve primat modellerinde trombosit aderansını, akut trombozu ve anastomotik intimal hiperplaziyi azalttığı tespit edilmiştir(174). Trombosit aderansının azalması, trombüs oluşumu ve miyointimal hiperplazinin inhibisyonu ile, hem erken hem de geç greft yetmezliğini

azaltması hedeflenmiştir. Walluschek, diz altı baypaslar için 1 yıllık açıklık oranını %80 bildirmiştir(175). Ayrıca, Bosiers, popliteal ve tibial bypasslar için yüksek (sırasıyla %82 ve %97) 1 yıllık açıklık oranları bildirmiştir(176). Propaten (WL Gore ve Associates) olarak pazarlanan heparinle kaplı bir ePTFE greft, 2006 yılında FDA onayı almıştır. Kaplamasız ePTFE'ye kıyasla heparin bağlı ePTFE (Propaten) için 1 yıllık açıklık oranının (%81'e karşı %69, $P = .03$) üstün olduğu bildirilmiştir(177).

İç yüzeyi heparin kaplı greftlerin iki büyük problem mevcuttur. Bunlardan ilki, iç yüzeydeki heparin kaplamasının bir süre sonra etkisini kaybetmesidir. İki çalışmada Dacron greftleri üzerindeki heparin aktivitesi ve bir koyun modelinde Propaten greftlerinin implantasyonundan sonraki 3 veya 6 ay içinde heparin etkisi kaybedilmiştir(178-179). Diğer bir sorun ise heparin kaplı greft kullanımı ile ortaya çıkabilecek heparine bağlı trombositopenidir. Heparine bağlı trombositopeni, dünya çapında alt ekstremitte bypass greftleri geçiren hastaların içinde birkaç vaka raporunda tanımlanmıştır(180-181). Bununla birlikte, heparinin kovalent olarak bağlandığı greftlerde, implantasyondan 6 hafta sonrasına kadar in vivo hemostazın sistemik belirteçlerinde herhangi bir artış olmadığı ve heparine karşı antikor tespit edilmediği bildirilmiştir(182).

- **Karbon Kaplı ePTFE**

İmplant edilebilir materyallerin pirolitik veya grafitik karbon kaplaması, vasküler greftler, kalp kapakçıkları ve stentler dahil olmak üzere çeşitli kanla temas eden cihazlar için uygulama alanı bulmuştur(183). Pirolitik karbon filmler, metan gibi bir hidrokarbonun ayrışma sıcaklığına kadar ısıtıldığı ve grafitik tabakanın yüksek derecede düzenli bir karbon atomu katmanı olarak kristalleştirildiği kimyasal bir işlem ile üretilir.

Karbon kaplı vasküler protezlerin erken hayvan çalışmaları, kaplanmamış kontrollere kıyasla gelişmiş açıklık oranları göstermiştir(184). Bununla birlikte, karbon kaplı ePTFE greftlerindeki yüzey düzensizlikleri diğer araştırmalarda düşük performansa katkıda bulunmuştur(185). Koyunlarda yapılan 15 aylık implant çalışmaları, karbon kaplı polyester greftlerde trombosit yapışmasının azaldığını belgiledi, ancak bu genel histolojik sonuçları veya açıklık oranlarını etkilemedi(186).

Ayrıca, prospektif, randomize çok merkezli bir çalışmada, 283 hastaya femoral-anterior tibial arter bypass için 6 mm karbon kaplı (Carboflo, Bard Periferik Vasküler, Inc) veya kaplanmamış ePTFE greftleri (Bard Periferik Vasküler, Inc) greft karşılaştırılmıştır. Üç yıllık takipte açıklık veya uzuv kurtarması açısından iki grup arasında anlamlı fark gözlenmemiştir(187).

2.3. CERRAHİ TEDAVİDE KOMPLİKASYONLAR

Periferik arter hastalığının cerrahi tedavisinde sistemik (kardiyak, renal, respiratuvar) veya lokal (nörolojik hasar, aortoenterik fistüller, anastomoz bölgesinde anevrizma vb.) komplikasyonlar görülebilmektedir. Bu komplikasyonların yanı sıra greft trombozu ve greft enfeksiyonu, greft başarısızlığı ile başlayıp ekstremitte kaybına kadar ilerleyen önemli sonuçlar doğurabilecek ciddi morbidite ve mortalite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3.1. GREFT TROMBOZU

Postoperatif greft trombozu vasküler cerrahi pratiğinde önemli bir klinik sorun olmaya devam etmektedir. Erken veya geç dönem greft trombozu nedeniyle vasküler girişim gerektiren hastalarda uzuv kaybı, ciddi morbidite ve mortalite riski mevcuttur. İnfringuinal bypass operasyonu geçiren hastalarda greft yetmezliğinden 1 yıl sonra, hastaların% 50'sinden fazlası majör amputasyongeçirmektedir(188). Kalan hastalar arasında %25 oranında istirahat ağrısı veya ülserasyon, % 15 oranında ölüm riski mevcuttur(189-190).

Greft trombozunun nedenleri çok faktörlü olup hasta demografisi, risk faktörleri, komorbid koşulları ve arteriyel rekonstrüksiyon ile ilgili teknik konuları içerir. Bu risk faktörleri ve rekonstrüksiyon tekniği, ilk ameliyattan tüm takip dönemine kadar greft açıklığı üzerinde etkilidir. Bunu göz önünde bulundurarak, en uygun sonucu elde etmek için ilk rekonstrüksiyonda teknik hassasiyet şarttır çünkü teknik hatalar revaskülarizasyondan sonra erken başarısızlığın %4-25'ini oluşturur(191). Ameliyat öncesi planlamaya ve operasyon tekniğine özen gösterilmesine rağmen, revaskülarizasyon başarısızlığı görülebilmektedir.

Bir çalışmada, greft yetmezliğini öngören risk faktörlerini açıklamak amacıyla infringuinal arteriyel bypass uygulanan hastaların 8 yıllık takibi sonucu, genç yaş (<60 yaş), Afro-Amerikan ırk ve krural hedef damarların greft yetmezliği ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir(192). Ayrıca hemodiyaliz bağımlılığının, bilinen bir hiperkoagulabilite varlığının ve aktif sigara içiminin bağımsız olarak otojen ven greft oklüzyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(193). Bununla birlikte küçük ven greft çapının (<3 mm) bağımsız olarak greft yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir(194). Daha önce endovasküler girişim uygulanan

uzuvlarda yapılan bypass greftlerinin(% 28 oklüzyon oranı), hiç endovasküler müdahale geçirmeyen uzuvlarda uygulanan greftlerden(% 18 oklüzyon oranı) anlamlı derecede yüksek başarısızlık oranına sahip olduğunu gösterilmiştir(195).

Greft trombozunun operasyondan sonraki ilk 30 gün içerisinde gelişmesi erken greft trombozu olarak tanımlanmaktadır. Infrainguinal ven greft revaskülarizasyon tekniklerinde iyileşmelere rağmen, greftlerin % 5-10'u yerleştirmeden sonraki 30 gün içinde başarısız olmaktadır(196). Cerrahi teknikteki hataların erken greft başarısızlıklarının yaklaşık% 25'ini oluşturduğu bulunmuştur(197). Erken dönemde greft trombozu tanısı konduktan sonra, ilk olarak bypass greftinin kurtarılması için seçenekler arasında cerrahi trombektomi veya trombolitik tedavi yer almaktadır. Erken dönemde uygulanan trombolitik tedavi kanama riskini de beraberinde getirmektedir. Akut ekstremité iskemisi için trombolitik tedavi üzerine yapılan bir meta-analize göre, trombolitik ile ilişkili majör kanama riski, yaklaşık üç kat(OR 2.85) daha fazla bulunmuştur(198). Protez greft trombozunda trombolitik tedavi ile kıyasla daha iyi sonuçlar elde edilmiştir(199). Greft trombozu görülen hastalarda 1 yılda kümülatif sekonder açıklık oranı %47 olarak bildirmiştir. Bununla birlikte hastaların %26'sına greft trombektomisinden sonraki 1 ay içinde amputasyon, % 41'ine ise 1 yıl içinde amputasyon gerektiği bildirilmiştir(200).

Greft trombozunun ilk 30 günden sonra gelişmesi geç greft trombozu olarak adlandırılmaktadır. Erken greft trombozlarında kanama riski nedeniyle trombolitik tedaviden kaçınılmakla beraber tromboze olan greftin hastada bulunduğu süre arttıkça (1 yıl ve daha fazla) trombolitik tedaviye vereceği yanıt daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte geç dönemde greft trombozu görülen olgularda ek cerrahi girişim oranı çok yüksektir.

Trombolitik tedavinin komplikasyonları, tekrar cerrahi girişim getirdiği riskler, tüm müdahalelere rağmen ekstremitenin kurtarılamaması gibi durumlar göz önünde bulundurulduğunda greft trombozu ciddi morbidite ve mortalite sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3.1.1. İNTİMAL HİPERPLAZİ

İntimal hiperplazi, damarların ve greftlerin yaralanmaya karşı evrensel tepkisidir. Otojen veya protez bypass greftlerinde meydana gelen kronik bir yapısal değişikliği tanımlar. Gelişimi kronolojik olarak hiperakut, akut ve kronik olarak üç aşamaya ayrılmaktadır. Bu aşamalar içerisinde koagülasyon, inflamasyon, hücre migrasyonu, hücre proliferation ve remodeling gibi mekanizmalar yer almaktadır.

Politetrafloretilen (PTFE) greftler üzerinde yapılan çalışmalar, implantasyondan 5 ila 24 gün sonra, kırmızı kan hücrelerinin ve fibrinin anastomoz çizgilerini ve bazı lüminal yüzeyini kapladığını göstermiştir. Makrofajlar bu trombüs boyunca dağılmış olarak bulunabilir. 11 ila 48 ay arasında, ya tek bir endotel hücre tabakası ya da greftin anastomotik segmentlerini kaplayan ince bir fibrin tabakası bulunur ve burada gözlenen düz kas hücreleri ve kollajen gelişmekte olan bir anastomotik intimal hiperplazi olarak tanımlanır. İmplantasyondan 94 ila 149 ay sonra, anastomoz bölgesindeki intimal hiperplazi değiştirilemez, bu süreçte ölçülen intima tabakası 11 ila 36 ay arasında alınan greftlerde görülen kalınlık ve uzunlukla aynıdır. Makrofajlar, lenfositler, monositleri ve dev hücreler gibi kronik enflamatuar hücreler de ePTFE greftlerinde tanımlanabilir(201).

94 ve 149 ay arasında eksplante edilen greftin lümen yüzeyleri, üst üste binmiş dağınık trombüs ile birlikte bir bağ dokusu matrisi ile kaplı olduğu görülmüştür(202). Deneysel modellerin çoğunluğunun aksine, insan dolaşımına sokulan protez greftlerin iç yüzeyi tamamen endotelize bir intima geliştirebileceğine dair mevcut kanıt yoktur(203). Aksine, endotel hücreleri luminal yüzeyi anastomozların yakınında sadece birkaç santimetre doldurduğu gözlenmiştir. Greftin geri kalanı genellikle maruz kalan PTFE alanlarıyla serpiştirilmiş trombosit ve lökosit içeren ince düzensiz bir organize fibrin tabakası ile kaplanır(204).

Lipid ve kolesterol birikimi insidansı yüksektir olup PTFE greftlerinde ateromatöz değişiklikler de tespit edilmiştir. Kollajen tip III baskın olmakla birlikte kollajen alt tipleri I, IV ve V de tanımlanabilir. Tip II kollajen saptanmamıştır. Elastin fibrilleri de anastomotik neointimal hiperplazi içinde görülebilir(205).

Bir PTFE greftin endotelizasyonu, kapiller göç sonucu transmural endotelizasyon ve anastomozlardan göç yoluyla endotelizasyon olmak üzere iki yolla meydana gelebilir. Greft duvarından kapiller göç greftin gözenekli özelliklerine bağlıdır. PTFE'nin gözenekliliğinin bu fenomen üzerinde önemli bir etkisi vardır. Babun aortoiliak pozisyonuna yerleştirilmiş düşük gözenekli greftlerde (10-30 µm), lüminal endotel kapsama alanı anastomozların yakınındaki

küçük alanlarla sınırlıdır(206). Yüksek gözenekli greftlerde (60-90 µm), luminal endotel tamamlandığı görülmüştür(207).

PTFE greftlerinin endotelizasyonunun meydana geldiği ikinci bir süreç anastomoz bölgesinden göç ile büyümedir. Greftin gözenekliliği önemlidir, çünkü gözeneksiz greftlerin düzensiz ve kırılgan bir endotelial ilerleme bölgesi vardır. Köpek modelindeki yeni kanıtlar, greft endotelizasyonunun üçüncü bir olası şekli olarak kan akışından serpmeye endotelizasyonunu destekler(208).

2.3.2. GREFT ENFEKSİYONU

Vasküler protez enfeksiyonu insidansı, rutin antibiyotik profilaksisi, cihazların sterilizasyonundaki iyileştirmeler, aseptik prosedür ve cerrahi tekniğe dikkatle uyulması nedeniyle nispeten düşüktür. Vasküler protezde enfeksiyon meydana geldiğinde, saptanması ve tedavisinde gecikme kötü prognoz ve yüksek mortalite ile sonuçlanır. Erken dönemde tanı konamaz veya tedavi edilmezse, sepsis, kanama, tromboz veya implant yetmezliği sonucu end-organ iskemisi meydana gelecektir. Genel olarak, protezin eksizyonu ile birlikte cerrahi tedavi her zaman gereklidir, çünkü antibiyotikler yerleşik bir enfeksiyöz süreci ortadan kaldırmak için yetersizdir. Uygun bir tedavi planı klinik bulgular, anatomik yerleşim, ilk implantasyondan bu yana geçen süre, greft materyali tipi, enfeksiyon derecesi, enfekte organizmanın virülansı ve hastanın altta yatan komorbid durumlarından etkilenir.

Vasküler protezlerin rapor edilen enfeksiyon insidansı, gerçekleştirilen açık operasyonların% 0,2-5'i arasında değişir ve implant bölgesinden, müdahale endikasyonundan, altta yatan hastalık ve konakçı savunma mekanizmalarından etkilenir(204). Erken greft enfeksiyonu(<30 günlük) insidansı, prosedürlerin% 1 ila % 2'si arasındadır. Acil bir prosedür sırasında veya protez-femoral arter anastomoz varlığında protez enfeksiyonu olasılığı daha yüksektir.

Protez greft enfeksiyonlarında, implantasyon sonrası ortaya çıkma zamanına, ameliyat sonrası yara enfeksiyonuna (Tablo2.2) ve greft tutulumunun derecesine göre farklı sınıflandırmalar mevcuttur. Operasyondan sonraki ilk 4 haftada görülen greft enfeksiyonları erken, 4 haftadan daha sonra görülen greft enfeksiyonları geç greft enfeksiyonu olarak adlandırılmaktadır.

Szilagyi Sınıflandırılması	
Grade I	Yara bölgesinde selülit
Grade II	Cilt altı dokuyu içeren enfeksiyon
Grade III	Vasküler protezi içeren enfeksiyon

Tablo 2.2. Szilagyi Sınıflandırması: Postoperatif Yara Enfeksiyonuna göre Sınıflandırma

Biyomateryal ile ilişkili enfeksiyonun patogenezi dört temel adımı içerir: (1) bakterilerin greft yüzeylerine yapışması, (2) bakteriyel biyofilm içinde mikrokolonilerin oluşumu, (3) konakçı savunmaların aktivasyonu (nötrofil kemotaksisi, kompleman aktivasyonu) ve (4) perigraft dokuları ve greft-arter anastomozlarını içeren enflamatuvar yanıt. Bakterilerin biyomalzeme yüzeyine yapışmasından sonra, hem greft hem de bakteriyel özellikler kolonizasyon olasılığını etkiler. Polyester greftlere bakteriyel yapışma politetrafloroetilen (PTFE) greftlere göre 10 ila 100 kat daha fazladır. Stafilokoklar gibi gram pozitif bakteriler, gram negatif bakterilerde görülenden daha fazla sayıda biyomalzemeye yapışmayı destekleyen hücre dışı bir glikokaliks veya müsin üretir.

İmplantasyondan sonra ortaya çıkan lokal enflamatuvar yanıt, greft materyalinin dış yüzeyinde bağ dokusu büyümesini/yapışmasını sağlar. Bu iyileşme süreci, bakteriyel adherans ve kolonizasyon riskini artıran erken perigraft seroma veya hematoma oluşumu ile bozulabilir. Enflamatuvar yanıt ayrıca lokal iskemi ve bakteriyel kolonizasyona potansiyel olarak elverişli olan asidik bir pH ile karakterize olumsuz bir iyileşme ortamı yaratır.

Enflamatuvar dengenin bozulması, tümör nekroz faktörü ile uyarılan makrofajlar tarafından matris metaloproteinazların (MMP) üretiminin aşırı şekilde azalmasına neden olabilir(210). Salgılanan hücre dışı matrisin ve anjiyojenik büyüme faktörlerinin bozulması kılcal iç göçü, doku katılımını ve potansiyel lümenal endotelizasyonu kısıtlayarak greftlerin optimal iyileşmesini engelleyebilir.

Nötrofil fonksiyonu ayrıca biyomalzemelerin varlığında doğrudan bozulabilir. Kobaylara deri altına implante edilen PTFE materyallerde, Staphylococcus aureus'a karşı nötrofillerin opsonik, fagositik ve bakterisidal aktivitesi azalmıştır(211).

Vasküler protezler; cerrahi yara yoluyla perioperatif kontaminasyon, bakteriyemik tohumlama, bağırsak/genitoüriner sistem veya deriye mekanik erozyon gibi yollarla mikroorganizmalara (bakteri veya mantarlara) maruz kalmaktadır. Konakçı savunmasının altında yatan bozulma enfeksiyon riskini daha da artırabilir.

Herhangi bir mikroorganizma vasküler protezi enfekte edebilse de, *S.aureus* en yaygın patojendir ve implant yerine bağlı olarak enfeksiyonların % 25-50'sini oluşturur (Tablo2.3). *S.epidermidis* veya gram negatif bakterilerle greft enfeksiyonları sıklığı da artmıştır. Graft enfeksiyonu mikrobiyolojisindeki bu değişiklik, enterik fistüller ile ilişkili aort greft enfeksiyonları dahil olmak üzere hem erken hem de geç ortaya çıkan greft enfeksiyonlarının bildirilmesinin sonucudur. Koagülaz negatif stafilokoklar normal cilt florasında bulunur, ancak protezin yüzeyinde bir biyofilm içinde büyümenin meydana geldiği biyomalzemelere yapışma ve kolonileşme yeteneğine sahiptir. Negatif kültür sonuçlarıyla ilişkili greft enfeksiyonlarına *S. epidermidis* veya diğer koagülaz negatif stafilokoklar ve *Candida* türleri neden olur. *Escherichia coli* ve *Pseudomonas*, *Klebsiella* gibi gram negatif bakterilerle enfeksiyon daha virülan olabilir. Organizmaların damar duvarının yapısal bütünlüğünü bozan endotoksin (elastaz ve alkalın proteaz) üretme kabiliyeti nedeniyle anastomotik ayrılma ve arteriyel rüptür insidansı yüksektir. Mantar (*Candida* ve *Aspergillus* türleri) ve mikobakteriyel (tüberküloz) greft enfeksiyonları nadirdir ve bu tür enfeksiyonları olan hastaların çoğu ya ciddi şekilde bağışıklığı baskılanır ya da başka bir yerde yerleşik bir mantar ya da fırsatçı enfeksiyona sahiptir.

GREFT ENFEKSİYONU İNSİDANSI %			
MİKROORGANİZMA	AORTAFEMORAL	FEMORAL- POPLİTEAL-TİBİAL	ENTERİK FİSTÜL
<i>Stafilokokus aureus</i>	27	28	4
<i>Stafilokokus epidermidis</i>	26	11	2
<i>Streptokokus spp.</i>	10	11	9
<i>Pseudomonas spp.</i>	6	16	3
Gram Negatif Patojenler	28	29	49
Diğer/ <i>Candida</i>	1	3	15

Tablo 2.3. Etken ve enfeksiyon bölgesine göre greft enfeksiyonu insidansı

2.3.2.1. BİYOFİLM NEDİR?

Biyofilm, mikroorganizmaların canlı veya cansız yüzeylere tutunarak çok hücreli bir canlıyı taklit eder nitelikte iş bölümü ve besin paylaşımı yatığı topluluktur. Claude Zo Bell 1943'te cam şişe içerisindeki bulunan deniz suyundaki planktonik mikroorganizmaların

sayısının zamanla azaldığı ve şişeye yapışan mikroorganizmaların sayısının giderek arttığını tespit etmiştir. Antony von Leeuwenhoek dış plaklarında bakterilerin varlığını göstermiştir. Bu bulgular biyofilmin ilk tanımlaması olarak literatüre geçmiştir.

Canlı veya cansız yüzeye geri dönüşümsüz tutunan mikroorganizma ekstraselüler polimerik madde sentezleyerek kendisini koruma altına alır(212). Mikroorganizmalar %65-80 oranında biyofilm içerisinde yaşamaktadır. Biyofilm oluşumu; yüzeyin durumu, yüzeyin düzgün veya pürüzlü olması, teflon, plastik veya cam, metal yüzeyler, çevre sinyalleri, yüzeyde organik ve inorganik besinlerin varlığı (müsin, aktin, DNA vb), ortamın oksijeni, pH, ısı, osmolite, demir iyonları vb gibi çeşitli faktörlere bağlıdır(213).

Planktonik formdaki mikroorganizma stres altında bir yüzeye tutunarak biyofilm oluşum sürecini başlatır. Biyofilm oluşumunun 1. basamağında mikroorganizma reversible olarak yüzeye tutunur ve logaritmik çoğalma gösterir. Bu basamak saniyeler sürer. Biyofilm oluşumunun ikinci basamağında mikroorganizma tutunması artık irreversibledir. İkinci basamakta Quorum Sensing gen aktivasyonu olur. Quorum Sensing (çoğunluğu algılama) ile hücreler arası iletişim başlar ve bu sinyal yoğunluğu belirli bir düzeye ulaştıkça ekstraselüler polimerik madde(slime) salınımı başlar. EPS hidrate bir yapı olup kalınlığı giderek artar.

Biyofilm kalınlığı 10 µm'ye ulaştığında biyofilm oluşumunun üçüncü basamağı başlar. Bu evreye I. Maturasyon evresi de denilmektedir. Biyofilm kalınlığı 100 µm'ye ulaştığında dördüncü basamak başlar. Ve bu evreye II. Maturasyon evresi de denilebilir. Biyofilm oluşumunun beşinci basamağı ise birkaç gün sonra olmaktadır ve bu dönemde bazı mikroorganizmalar planktonik forma dönerek yeni yüzeylere doğru ilerler.

Biyofilm içerisinde mikroorganizmalar iş bölümü ve gıda paylaşımı yapması ile, besin ve suyun dolaştığı atık kanalları ile çok hücreli organizmayı taklit eder. Biyofilm, mikroorganizmaları antibiyotik, antikor ve toksik madde gibi dış etkilere korur.

2.3.2.2. QUORUM SENSİNG

İlk olarak 1905'te Erwin Frink Smith tarafından Quorum Sensing tanımı yapılmıştır. Quorum Sensing (çoğunluğu algılama) sistemi mikroorganizmaların iletişim sistemidir. Bakterilerin biyofilm oluşumunun, antibiyotik direnci kazanmalarının, kronik enfeksiyona neden olmalarının altında yatan neden Quorum Sensing sistemidir.

Quorum Sensing kavramı ilk kez, mürekkep balığına yerleşerek yaşayan bir biyoluminesan (biyolojik olarak ışık veren) deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri* (V.fischeri)' de tanımlanmıştır. Yüksek bakteri yoğunluğunda, Quorum Sensing sinyal moleküllerinin eşik

yoğunlukta üretilmesi sayesinde biyoluminesans (biyolojik ışık) gerçekleşebilmektedir(214).

Quorum Sensing; *Pseudomonas aeruginosa* da las/rhl/pqs sistemleri, gram negatif mikroorganizmalarda açılanmış homoserin lakton, gram pozitif bakterilerde kendi kendini uyarıcı peptitler gibi moleküller aracılığı ile mikroorganizmaların aralarındaki iletişimdir. Ve bu sistem mikroorganizmaların dış etkilerden korunmasında büyük önem taşır.

2.3.2.3. ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Bakteriyel biyofilm ile antibiyotik direnci artar ve bu durum kronik enfeksiyona neden olur. Biyofilm içindeki mikroorganizmaların metabolizmaları ve üreme oranlarındaki farklılık, kapsül veya glikokaliks yapısı, enzim aracılı direnç, genetik adaptasyon, Quorum Sensing sinyal iletim sistemleri, dış membran yapıları ve “efflux” pompası gibi mekanizmalar çoklu antibiyotik direncine neden olmaktadır(215).

3.MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 16.05.2019 tarihinde TPF-19013 proje numarası ile onaylanmış ve Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri fonunca desteklenmiştir.

Deneyler Adnan Menderes Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmış olup hücre kültür ekimleri ve mikroskopik hesaplamalar konusunda gerekli teknik destek buradan sağlanmıştır.

İç lümeni heparin kaplı (Gore Propaten Graft, W.L.Gore&Associates,Inc.), iç lümeni karbon kaplı (İmpraCarboflo, C. R. Bard, Inc) ve normal(çıplak) PTFE (FlowlineBipore, Jotec, Germany) olmak üzere 8mm çapında ringli üç farklı PTFE greft seçilmiştir(Şekil 3.1). Endotelizasyon ve bakteriyel kontaminasyon /biyofilm oluşumu deneyleri olmak üzere iki farklı deney gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık açısından her iki grupta da deneyler üçer kez tekrar edilmiştir.

3.1. BAKTERİYEL KONTAMİNASYON VE BİYOFİLM OLUŞUMU

3.1.1. GREFTLERİN HAZIRLANMASI

İç lümeni heparin kaplı, iç lümeni karbon kaplı ve normal(çıplak) PTFE olmak üzere 8mm çapında ringli PTFE greftlerin steril koşullarda ringleri çıkarıldı. Greftlere longitudinal kesi yapılarak plaka haline getirildi(Şekil3.2). Bu plakalardan 1cm² 'lik eşit parçalar hazırlanarak her bir çalışma için kullanılacak miktarda steril edildi.



Şekil 3.1. Greftlerin deney öncesi görünümü



Şekil 3.2. Plaka haline getirilen greftler

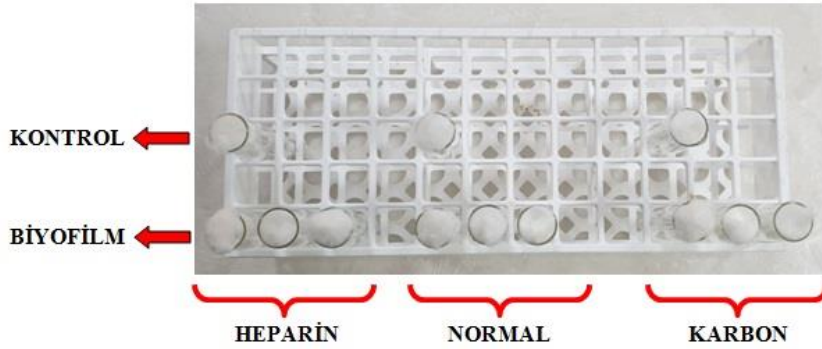
3.1.2.BAKTERİ SUSPANSİYONU HAZIRLANMASI

Bakteriyel kontaminasyon ve biyofilm oluşumunun araştırmak için biyofilm oluşturma özelliği olan *Staphylococcus Aureus*(ATCC 35556) suşu kullanıldı. Müller Hinton Agar'a ekim yapıldıktan sonra 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Buradan alınan koloniler 2ml triptik soy buyyon (TSB) içeren steril tüpe ekilerek 37°C'de 24 saat tekrar inkübasyona bırakıldı. Bir

gece inkübasyon sonrasında mikroorganizmalar biyofilm oluşumunu sağlamak üzere %0.25 glukoz içeren triptik soy buyyon (TSB)'a 1/40 oranında transfer edilerek bakteri süspansiyonu hazırlığı tamamlandı.

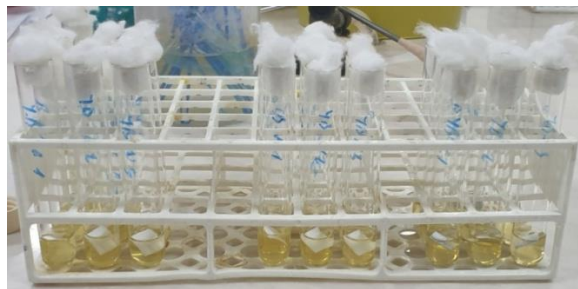
3.1.3. GREFTLER ÜZERİNE MİKROORGANİZMALARIN EKİMİ

Deneylerde heparin kaplı greft, karbon kaplı greft ve normal(çıplak) greft olmak üzere üç grup planlandı. Her greft tipi için birer adet kontrol grubu eklendi. İstatistiksel anlamlılık açısından biyofilm oluşum deneyleri her greft tipi için üçer adet ekim planlandı. Bu planlama sonucunda üç adet biyofilm ekimi ve bir adet kontrol grubu olmak üzere toplamda her greft tipi için dört parça hazırlandı(Şekil3.3).



Şekil 3.3. Graftlerin ekim planı

Steril cam tüpler numaralandırıldı. Her steril tüpe 1cm² olarak hazırlanan steril greft parçaları yerleştirildi. Biyofilm deney grubu greftlere 1/40 oranında hazırlanan %0.25 glukoz içeren triptik soy buyyon (TSB) içeren bakteri süspansiyonu 2'şer ml eklendi(Şekil3.4). Graftlerin yapısal olarak boya tutma oranları ve kontaminasyon açısından belirlenen kontrol gruplarına ise 2ml %0.25 glukoz içeren triptik soy buyyon (TSB) eklendi. Tüpün 30 saniye vortekslenmesiyle (IKA YellowLine TTS2) sonra 48 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.4. Ekim yapılan graftler.

3.1.4. BİYOFİLM OLUŞUMU

Biyofilm oluşumunu kantitatif olarak belirlemek amacıyla her tip greftten 3'er adet ekim yapılan biyofilm grubu ve kontrol grubuna Christensen ve ark. 'nın kullanmış olduğu yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Steril tüpte greftler ve 2ml bakteri süspansiyonu ile 48 saat inkübasyon sonrası bakteri süspansiyonu boşaltıldı.

Yıkama için tüpler içerisine 2ml serum fizyolojik (%0.9NaCl) eklendi. Tüpler 30 saniye vortekslendikten(Şekil 3.5) sonra 1500rpm de üç dakika santrifüj (HettichEba 20 S) edildi(Şekil 3.6). İçerisindeki kirli serum fizyolojik tekrar döküldü. Bu yıkama işlemi her tüp için üçer kez tekrarlandı. Üçüncü yıkama sonrası tüpler içerisindeki serum fizyolojik ortamdan uzaklaştırıldı ve sonrasında boyama yapıldı(Şekil3.8).



Şekil 3.5. Vorteks cihazı



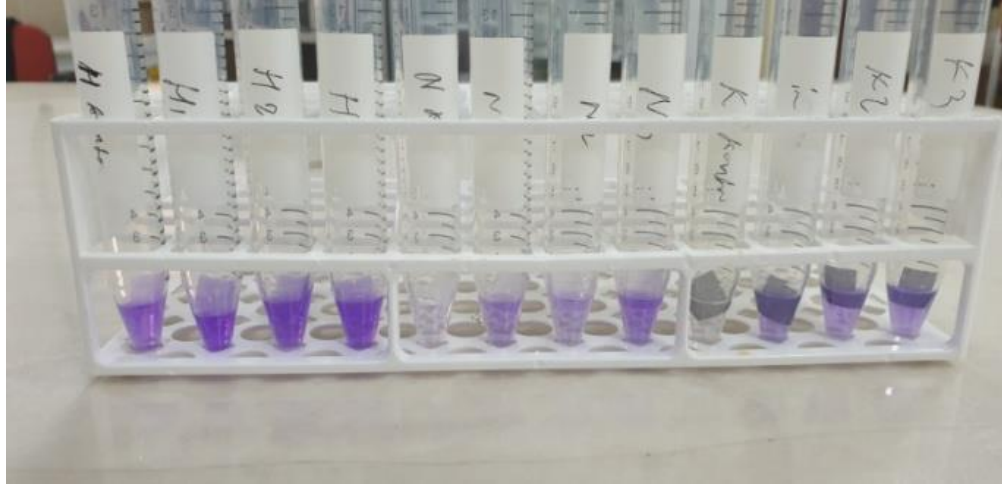
Şekil 3.6. Santrifüj cihazı



Şekil 3.7. Spektrofotometre cihazı

Her tüp içerisine 1ml %1'lik kristal viyole eklendi. Tüpler 30 saniye vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüpler içerisindeki kristal viyole döküldü ve 2 ml serum fizyolojik ve 30 sn vortekslenerek 4'er kez yıkama yapıldı. Boya tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra tüp içerisindeki greftler kuruması için 37°C etüve kaldırıldı.

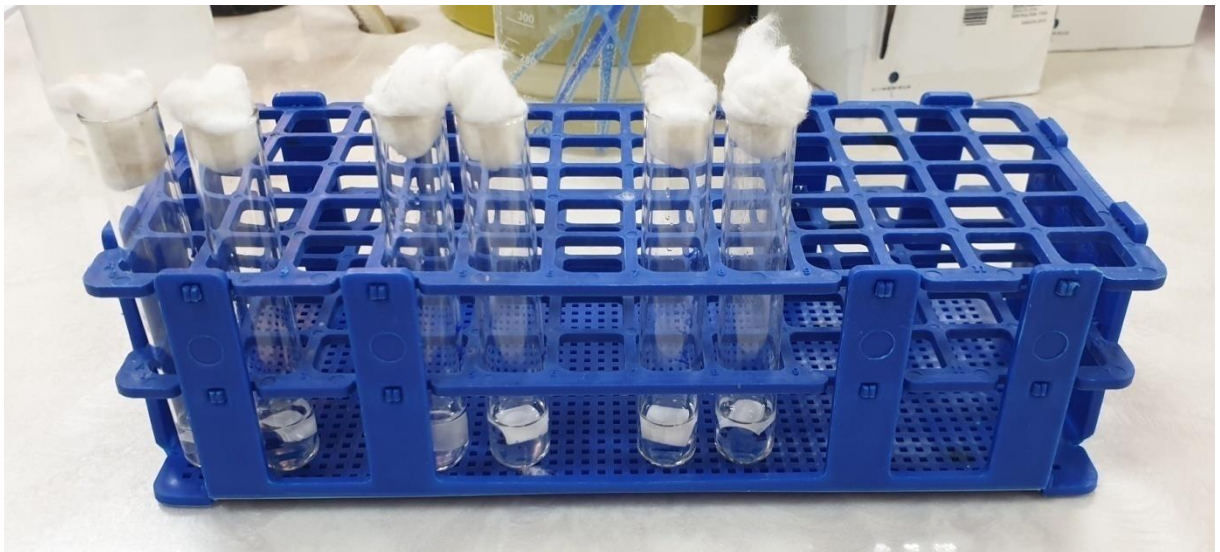
Kuruma tamamlandıktan sonra 80/20 oranında hazırlanan etanol aseton karışımından her tüpe 1ml eklenerek biyofilm tarafından tutulan kristal viyole çözdürüldü. Tüpler içerisinde çözülmüş boyadan pipet ile 200µl alınarak 96 kuyucuklu mikropalak içerisine aktarıldı. 595 nm dalga boyunda spektrofotometre (ThermoScientific™ Multiskan™ FC Microplate Photometer) ile okuma yapılarak sonuçlar elde edildi(Şekil3.7).



Şekil 3.8. Kristal viyole ile boyama yapılan greftler

3.1.5. SEM (SCANNING ELECTRON MICROSCOPE) GÖRÜNTÜLEMESİ

SEM görüntülenmesi amacıyla her üç tip greftten ikişer adet 1cm²greft parçaları hazırlandı. Graftler steril cam tüplere alındı. %0.25 glukoz içeren triptik soy buyyon (TSB) besi yerinde 1/40 oranında bakteri ile bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril tüpte greftler ve 2ml bakteri süspansiyonu ile 48 saat inkübasyon sonrası bakteri süspansiyonu boşaltıldı. Yıkama için tüpler içerisine 2ml serum fizyolojik (%0.9NaCl) eklendi. Tüpler 30 saniye vortekslelendikten sonra 1500rpm de üç dakika santrifüj (HettichEba 20 S) edildi. Graft parçaları yeni steril tüplere transfer edildi. Bu yıkama işlemi her greft için üçer kez tekrarlandı. Üçüncü yıkama sonrası greftler steril cam tüplere alındı(Şekil 3.9).



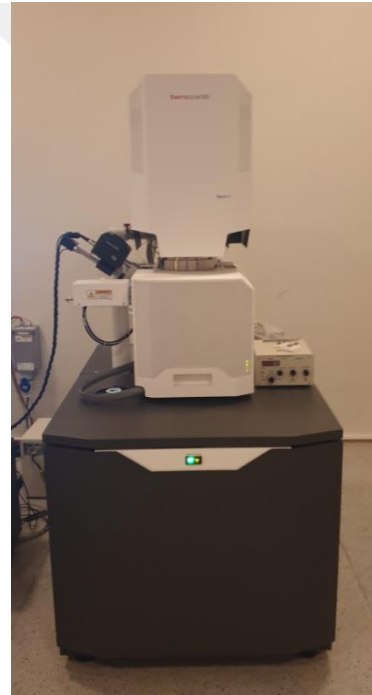
Şekil 3.9. SEM görüntülenmesi için hazırlanan greftler

Biyofilm fiksasyonu amacıyla %2 formaldehit, %2.5guluteraldehit ve 1M sodyumbikarbonat içeren solüsyon hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyonun pH7.4 olacak şekilde ayarlandı. Fiksasyon amacıyla bu solüsyondan yıkaması tamamlanan steril tüplerde bulunan greftler üzerine 2ml eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra greftler yeni tüplere alınarak 2ml %50 etanol eklenip -20°C de 1 saat bekletildi. Aşamalı olarak %70 etanolde -20°C de 1 saat bekletildi. Son olarak %95 etanolde 4°C de 2 saat bekletildi. Ardından greftler etüve alınarak kurumaya bırakıldı.

Kuruyan greftler elektron mikroskobunda tarama amacıyla Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (EGE_MATAL) 'ne götürüldü. Elektron mikroskobunda yüksek vakumda daha iyi görüntü almak amacıyla kaplama cihazı vasıtasıyla (Leica EM ACE600) greftler argon gazı ile 10^{-4} milibarda %80 altın %20 paladyum ile kaplandı(Şekil 3.10). Kaplama işlemi sonrası elektron mikroskobuna (ThermoScientificApreo S) alınan greft parçaları yüksek vakumda 5.00 kilovolt enerji ile görüntüler elde edildi(Şekil 3.11).



Şekil 3.10. SEM öncesi materyal kaplama cihazı



Şekil 3.11. Taramalı Elektron Mikroskobu

3.2. ENDOTELİZASYON

3.2.1. GREFTLERİN HAZIRLANMASI

İç lümeni heparin kaplı, iç lümeni karbon kaplı ve normal(çıplak) PTFE olmak üzere 8mm çapında ringli PTFE greftler biyofilm çalışmasında olduğu gibi 1cm²'lik plaklar halinde hazırlandı. Endotelizasyonun değerlendirilmesi için greftlerin üzerine endotel hücresi ekiminden sonraki 3.gün, 5.gün, 10.gün, 15.gün, 20.gün ve 25. gün taramalı elektron mikroskobu ile görüntülerin alınması planlandı. Bu plana uygun şekilde kontrol grubu da dahil olmak üzere her greft çeşidinden 7'şer adet ekim yapıldı.

3.2.2. ENDOTEL BESİ YERİNİN HAZIRLANMASI

Endotelizasyon deneyi için HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücreleri kullanıldı. Endotel hücreleri için besi yeri olarak EndoGRO-VEGF (SCME002; Merck; Millipore)kullanıldı. Besiyeri 475ml Endo GRO Basal Medium içerisine 0,5ml VEGF(Vascular endothelial growth factor), 0,5 ml EGF(Epidermal growth factor), 0,5 ml FGF(Fibroblast growth factor), 0,5 ml IGF-1(Insulin-like growth factor), 0,5 ml askorbik asit, 0,5 ml hidrokortizon hemisüksinat, 0,5 ml heparin sülfat, 25 ml L-Glutamin ve 10 ml FBS(Fetal bovine serum) eklenerek hazırlandı.

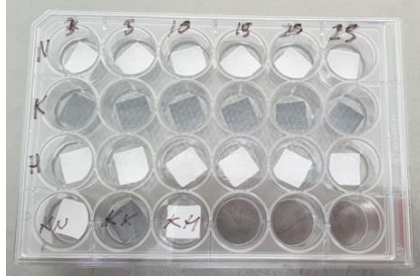
3.2.3. ENDOTEL HÜCRELERİNİN HAZIRLANMASI

Doku kültür petirisine alınan insan umbilikal ven endotel hücrelerine (HUVEC), FBS(Fetal bovine serum) ile zenginleştirilmiş besiyeri (ENDO GRO-VEGF Supplement Kit) eklenerek 37° C de %5 CO₂'li ortamda çoğaltıldı. Büyütülen endotel hücreleri tripsin ile parçalandı ve tripsin etkisi FBS ile ortadan kaldırıldı. Santrifüj sonrası alınan endotel hücrelerine %10 FBS ile zenginleştirilmiş besi yeri eklendi ve tripan mavisi ile boyandıktan sonra toma lamında sayıldı. Süspansiyon halinde hazırlanan hücreler 10⁴hücre/ml konsantrasyonunda ekim planlandı.

3.2.4. ENDOTEL HÜCRELERİNİN EKİMİ

Deneyler HEPA filtreli laminar kabin (Nüve LN120) içerisinde gerçekleştirildi(Şekil 3.13). 24 kuyucuklu hücre kültür plağına her greft tipinden steril şekilde 7'şer adet yerleştirildi(Şekil 3.12). Her kuyucuğa 10⁴hücre/ml konsantrasyonunda 500µl süspansiyon eklendi. Hücre kültür plağı 37° C de %5 CO₂' li ortama sahip inkübatöre(Thermo Forma Steri-Cycle Co2 Incubator Model:371, ThermoScientific) kaldırıldı(Şekil 3.14). 24 kuyucuklu hücre kültür plağındaki besi yeri üç günde bir yenilendi. 3.gün, 5.gün, 10.gün, 15.gün, 20.gün ve 25.gün planlandığı şekilde greft parçaları çıkarılarak yıkama ve fiksasyon işlemleri yapıldı.

Kontrol grubu greft parçaları da 25.gün grubu ile birlikte çıkarılarak yıkama ve fiksasyon yapıldı. Belirlenen günlerde 24 lü kuyucuk tabanında hücrelerin proliferasyonu takip edildi.



Şekil 3.12.HUVEC ekim planı

Yıkama için 15ml’lik steril polipropilen tüp içerisine alınan greft parçaları üzerine 2ml PBS (phosphate buffered saline) eklendi. Daha sonra tüpler eş zamanlı olarak 1125rpm hız ile 5dakika vortekslendi. Vorteksleme sonrası tüpler santrifüj cihazına(Hettich ROTINA 38/38R) yerleştirilerek 5°C ‘ de 400rpm hız ile 5 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlandı ve her yıkamada yeni steril polipropilen tüp kullanıldı. Üçünü yıkama sonrası greft parçaları yeni steril polipropilen tüpe alınarak fiksasyona geçildi.



Şekil 3.13. Kabin



Şekil 3.14.İnkübatör

3.2.5. ENDOTEL HÜCRELERİNİN FİKSASYONU VE GÖRÜNTÜLENMESİ

Besi yerinden çıkarılması için günü gelen greft parçaları 24 kuyucuklu hücre kültür plağından çıkarılmadan önce inverted mikroskop(Euromax,Hollanda) ile görüntülendi. Greftlerin bulunduğu her kuyucuğun tabanındaki endotel hücreleri inverted mikroskop görüntülenerek dijital kamera ile görüntüler kaydedildi.

Fiksasyon için her greft üzerine 2ml %2,5 gluteraldehit eklenerek 1 saat bekletildi. Ardından sırası ile %70 ve %90 etanol içerisinde 15'er dakika bekletildi. Son olarak saf etanol içerisinde 24 saat bekletildi. Saf etanol ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra greft parçaları steril tüpler içerisinde kurumaya bırakıldı.

Kuruyan greftler elektron mikroskopunda tarama amacıyla Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (EGE_MATAL) 'ne götürüldü. Elektron mikroskopunda yüksek vakumda daha iyi görüntü almak amacıyla kaplama cihazı vasıtasıyla(Leica EM ACE600) greftler argon gazı ile 10^{-4} milibarda %80 altın %20 paladyum ile kaplandı. Kaplama işlemi sonrası elektron mikroskopuna (ThermoScientificApreo S) alınan greft parçaları yüksek vakumda 5.00 kilovolt enerji ile görüntüler elde edildi.

3.3.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Her çalışma üç kez üçerli gruplar halinde yapılmıştır. Biyofilm oluşumunun spektrofotometrik değerlendirme sonuçları GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc.) yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Deney ve kontrol gruplarının ortalama sonuçlarını karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılmıştır. Graft tipleri arasında ikili karşılaştırmada Tukey testi kullanılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

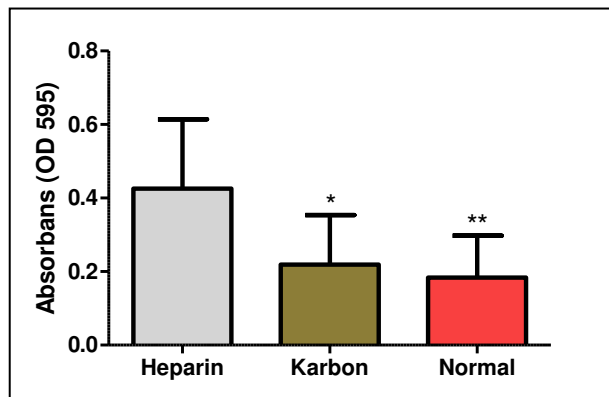
4. BULGULAR

4.1. BİYOFİLM OLUŞUMUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

Biyofilm oluşumunun karşılaştırılması için Christensen ve ark. 'nın kullanmış olduğu yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu yöntem ile biyofilm tabakasının absorbe ettiği boya miktarı spektrofotometrik olarak ölçülerek indirekt yolla biyofilm miktarı hesaplanmıştır. Her greft tipi için bir kontrol ve üç biyofilm grubu mevcut olup deney üç kez tekrar edilmiştir. Bu nedenle her greft grubu için üç adet kontrol grubu sonucu ve dokuz adet biyofilm grubu sonucu elde edilmiştir.

Greftlerin kendine ait boya tutma özellikleri mevcut olduğu için kontrol gruplarının spektrofotometrik absorbans değerleri biyofilm gruplarının değerlerinden çıkarılarak mutlak absorbans değerleri bulunmuştur. Üç greft türü için kontrol gruplarının ortalama absorbans değerleri, biyofilm gruplarının ortalama absorbans değerleri, standart deviasyon ve standart error değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2 de yer almaktadır.

Elde edilen ortalama absorbans değerleri: iç yüzeyi heparin kaplı greft için 0,4254 , iç yüzeyi karbon kaplı greft için 0,2193 ve normal(çıplak) greft için 0,1839 olarak bulunmuştur. İç yüzeyi karbon kaplı greftin ortalama absorbans değeri normal(çıplak) grefte göre ılımlı yüksek olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır(Tablo 4.1). İç yüzeyi heparin kaplı greft grubu, iç yüzeyi karbon kaplı greft grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha yüksek absorbans değerine sahiptir($p<0,05$). Ayrıca iç yüzeyi heparin kaplı greft, normal(çıplak) grefte göre istatistiksel açıdan anlamlı derece de daha yüksek absorbans değerlerine sahip olduğu saptanmıştır($p<0,01$). (Tablo 4.3)



Tablo 4.1. Ortalama absorbans değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

		Absorbans	Ortalama	STD	ERR
Heparin	Kontrol	0,6770	0,5423		
		0,5120			
		0,4380			
	1,1130	0,5707	0,4254	0,1781	0,0630
	1,0320	0,4897			
	0,9040	0,3617			
	1,0880	0,5457			
	1,0320	0,4897			
	0,5600	0,0177			
	0,9570	0,4147			
	1,0560	0,5137			
Karbon	Kontrol	0,0960	0,0937		
		0,0900			
		0,0950			
	0,1830	0,0893	0,2193	0,1296	0,0458
	0,2680	0,1743			
	0,4180	0,3243			
	0,4190	0,3253			
	0,4550	0,3613			
	0,15	0,0563			
	0,427	0,3333			
	0,184	0,0903			
Normal(cıplak)	Kontrol	0,139	0,1210		
		0,109			
		0,115			
	0,1540	0,0330	0,1839	0,1136	0,0379
	0,4840	0,3630			
	0,3010	0,1800			
	0,2660	0,1450			
	0,4920	0,3710			
	0,3120	0,1910			
	0,2230	0,1020			
	0,2430	0,1220			
	0,2690	0,1480			

Tablo 4.2.Spektrofotometrik absorbans değerleri

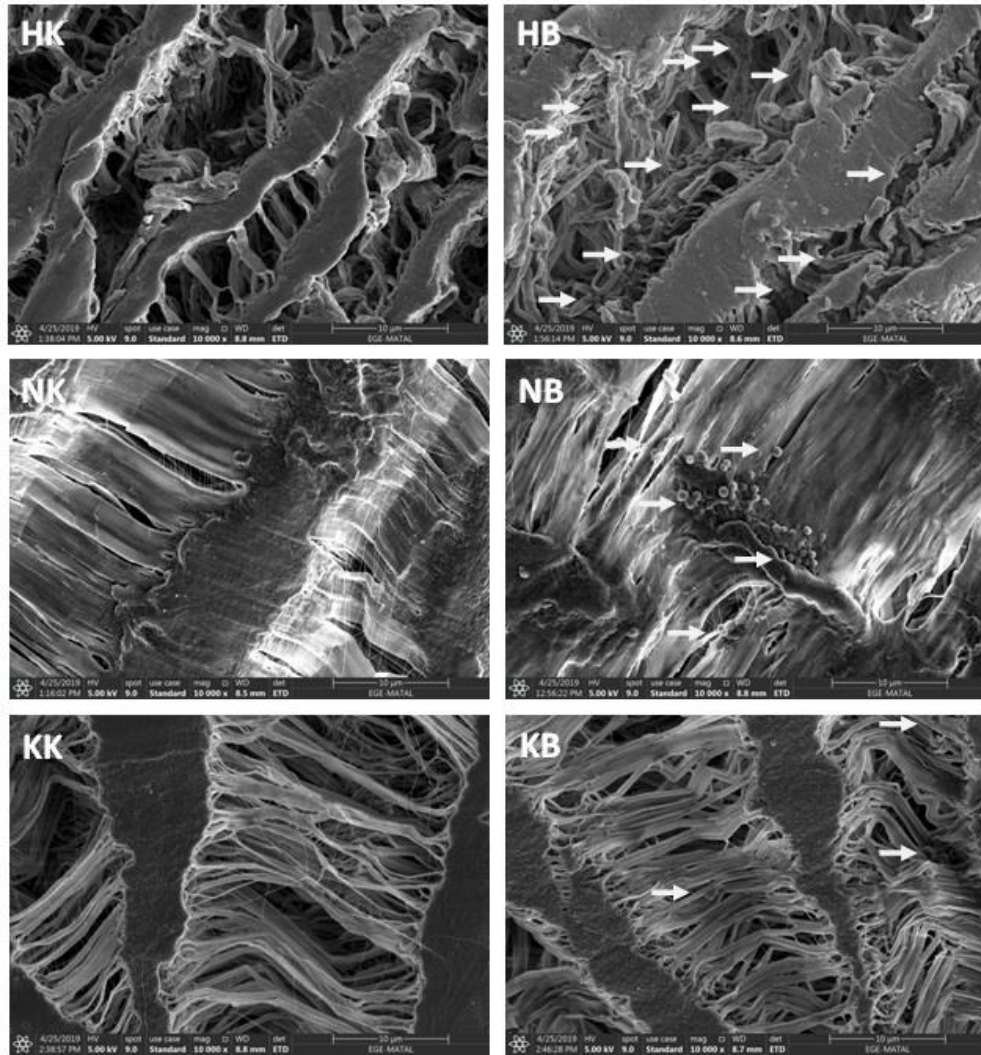
Table Analyzed	Data 1				
One-way analysis of variance					
P value	0.0044				
P value summary	**				
Are means signif. different? (P <	Yes				
Number of groups	3				
F	6.863				
R square	0.3638				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	2.065				
P value	0.3561				
P value summary	ns				
Do the variances differ signif. (P <	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0.3063	2	0.1531		
Residual (within columns)	0.5355	24	0.02231		
Total	0.8418	26			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean	α	Significant?	Summary	95% CI of diff
Heparin vs karbon	0.2064	4.145	Yes	*	0.03053 to
Heparin vs normal	0.2414	4.848	Yes	**	0.06553 to
Karbon vs normal	0.035	0.7029	No	ns	-0.1409 to

Tablo 4.3.İstatistiksel analiz

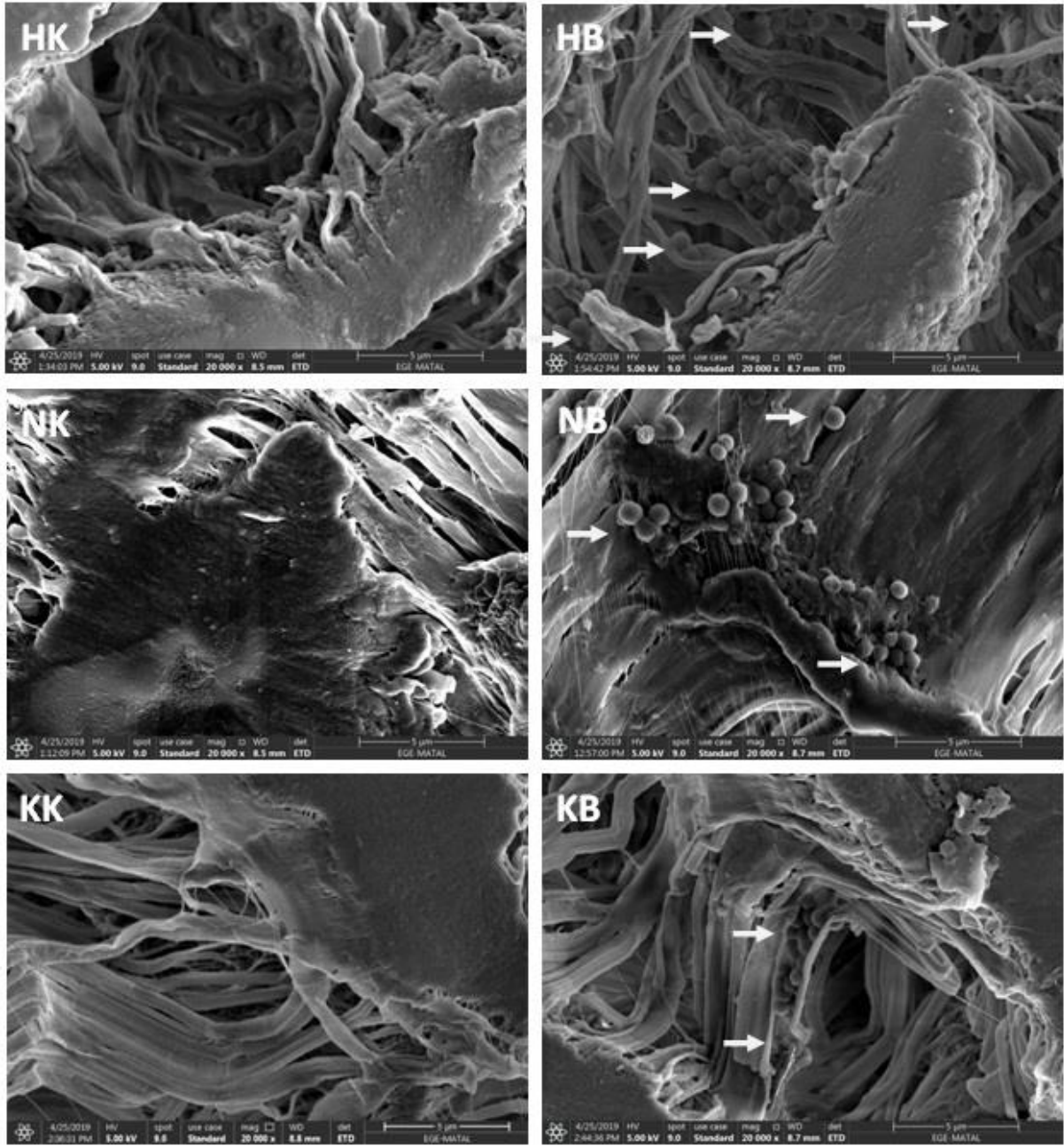
4.2. BİYOFİLM OLUŞUMUNUN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU İLE GÖRÜNTÜLENMESİ

Her üç greft tipi için taramalı elektron mikroskopunda değerlendirilmek üzere bir kontrol ve bir biyofilm grubu oluşturulmuş ve bu greft parçaları ThermoScientificApreo S mikroskobu ile görüntülenmiştir(Şekil 4.1). Tüm greft alanları ayrıntılı olarak taranmıştır. İç yüzeyi karbon kaplı greft ve normal(çıplak) greftte daha az sayıda mikroorganizma yüzeyel tutulum şeklinde gözlenirken, iç yüzeyi heparin kaplı greftin biyofilm grubunda daha fazla sayıda mikroorganizma ePTFE greftin porlarının derinliklerinde ve fibriller üzerine tutunmuş halde izlenmiştir(Şekil 4.2).

Bu sonuçlar kantitatif biyofilm sonuçları ile uyumlu olup heparin kaplı greftlerin hem bakteri tutulumunu hem de biyofilm oluşumunu artırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Taramalı Elektron Mikroskobu ile alınan görüntülerin karşılaştırılması(x10000).HK: heparin kontrol, HB: heparin biyofilm, NK: normal(çıplak) kontrol, NB: normal(çıplak) biyofilm, KK: karbon kontrol, KB: karbon biyofilm.

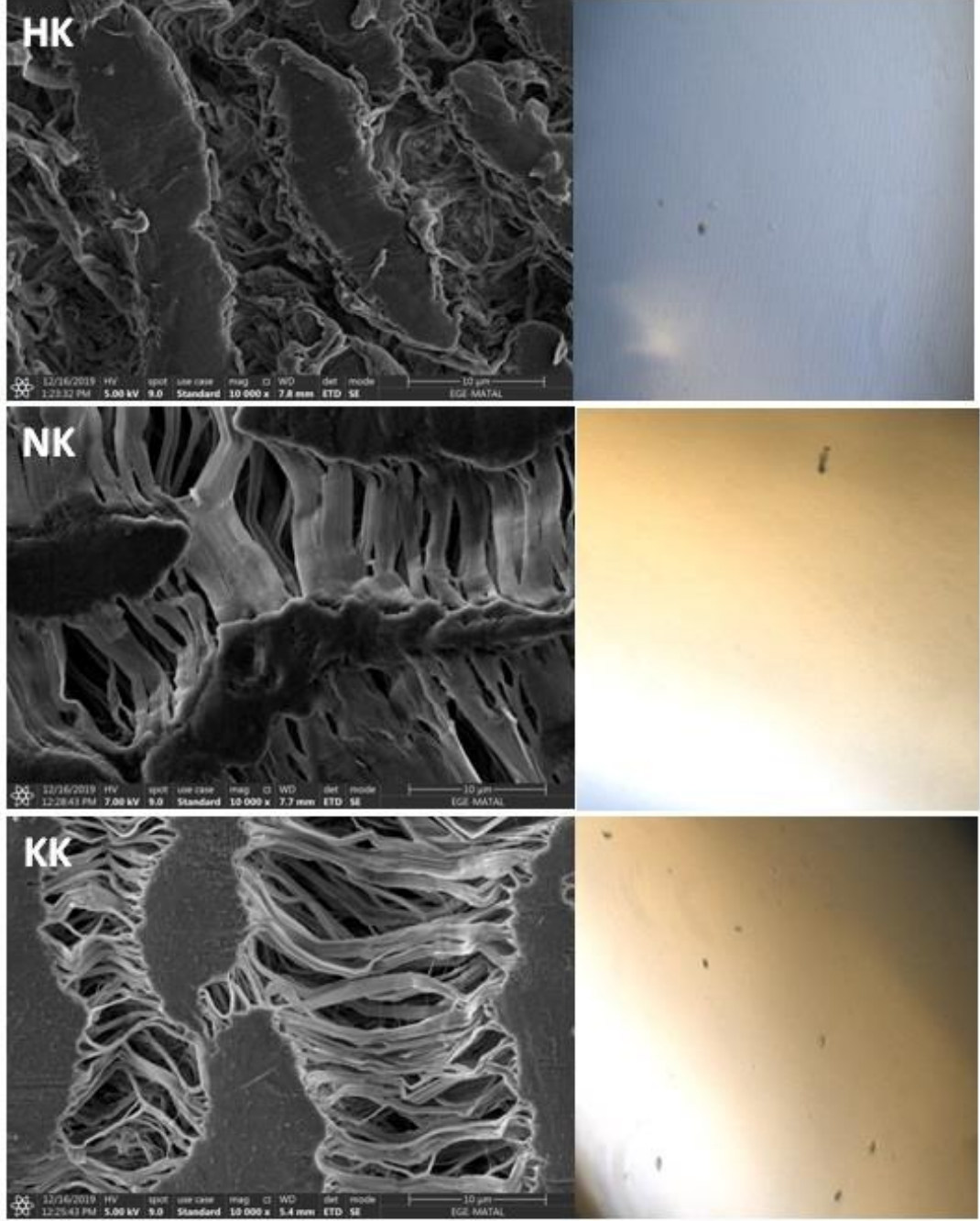


Şekil 4.2.Taramalı Elektron Mikroskopu ile alınan görüntülerin karşılaştırılması(x20000). HK: heparin kontrol, HB: heparin biyofilm, NK: normal(çıplak) kontrol, NB: normal(çıplak) biyofilm, KK: karbon kontrol, KB: karbon biyofilm.

4.3. ENDOTELİZASYONUN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU İLE GÖRÜNTÜLENMESİ

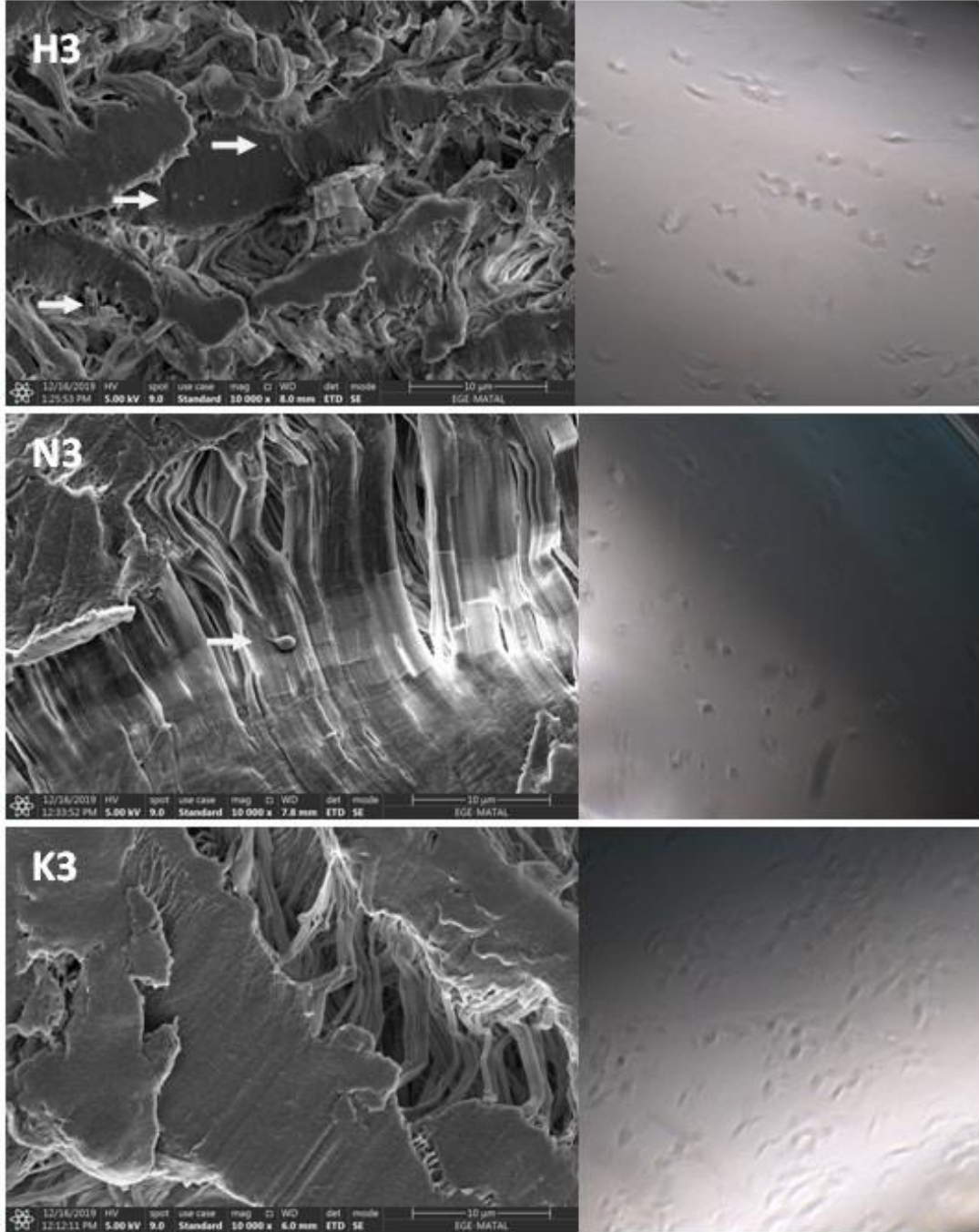
Her üç greft tipi için taramalı elektron mikroskopunda değerlendirilmek üzere bir kontrol ve 3.gün, 5.gün, 10.gün, 15.gün,20.gün, 25.gün grupları oluşturulmuş ve bu greft parçaları taramalı elektron mikroskopu (ThermoScientificApreo S) ile görüntülenmiştir. Her greft parçası fiksasyon için besi yerinden çıkarılmadan hemen önce inverted mikroskop (Euromax, Hollanda) ile görüntülenmiştir. Ve her greft parçasının bulunduğu kuyucuğun tabanında bulunan endotel hücrelerinin görüntüsü dijital kamera ile kaydedilmiştir. Greftlerin

bulunduğın kuyucuk tabanındaki endotel hücrelerinin görüntüleri ile elektron mikroskobundan elde edilen greft görüntüleri eşlenerek resimlerde gösterilmiştir. Kontrol grubu greftlerde de aynı görüntüler alınarak kaydedilmiştir(Şekil 4.3).



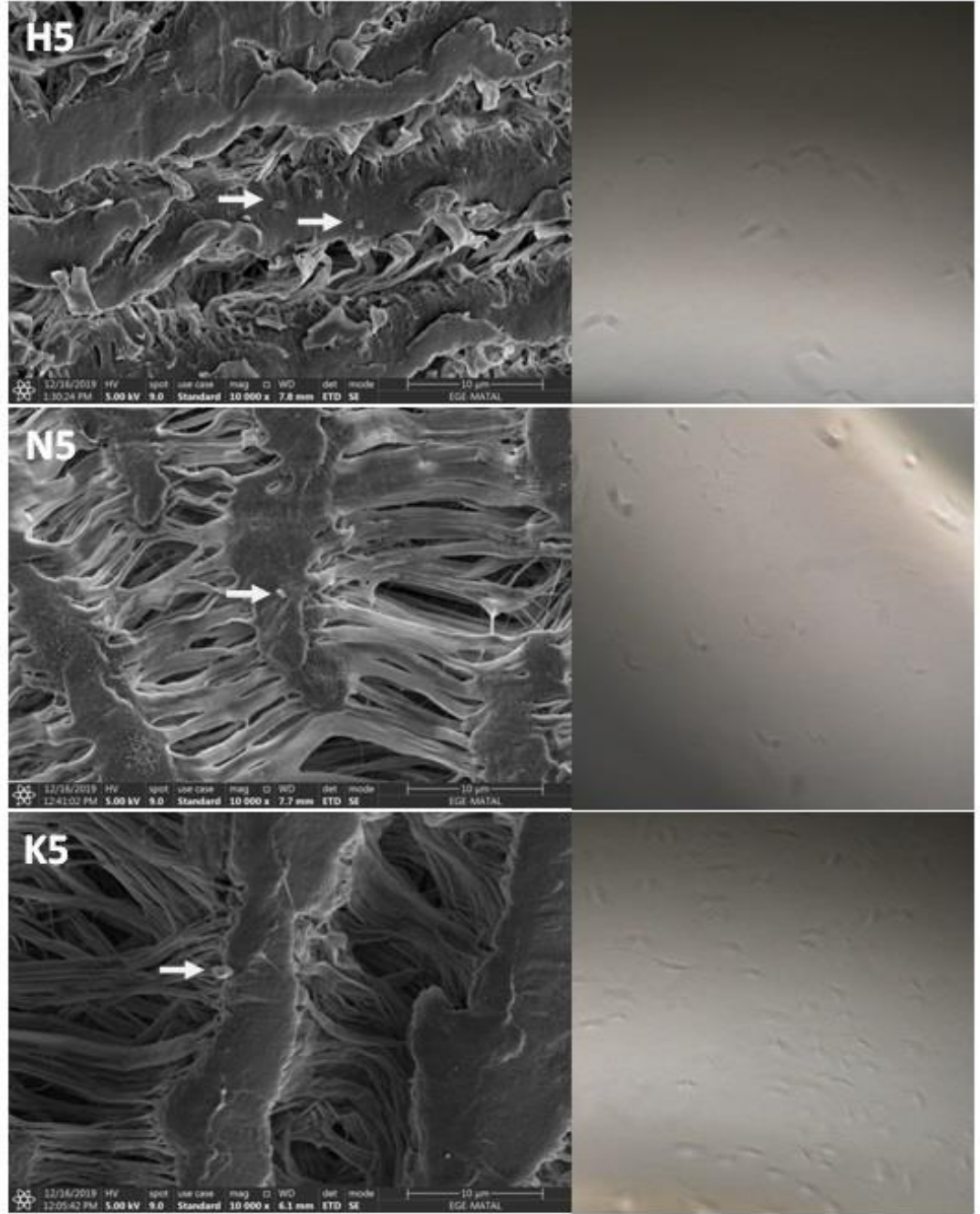
Şekil 4.3. Kontrol grubu greftlerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi(solda), ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi(sağda).

Endotel hücrelerinin ekiminin üçüncü gününde, greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanı inverted mikroskop ile incelendiğinde karbon kaplı greftin bulunduğu kuyucukta göreceli olarak daha fazla endotel hücresi görüntülenmiştir. Normal(çıplak) greft ve heparin kaplı greftin bulunduğu kuyucuğun tabanlarında yaklaşık eşit miktarda hücre görülmüştür. Elektron mikroskobu ile incelendiğin ise karbon kaplı greft üzerinde endotel hücresi gözlenmezken heparin kaplı greft ve normal(çıplak) greft üzerinde hücreler olduğu görülmüştür(Şekil 4.4).



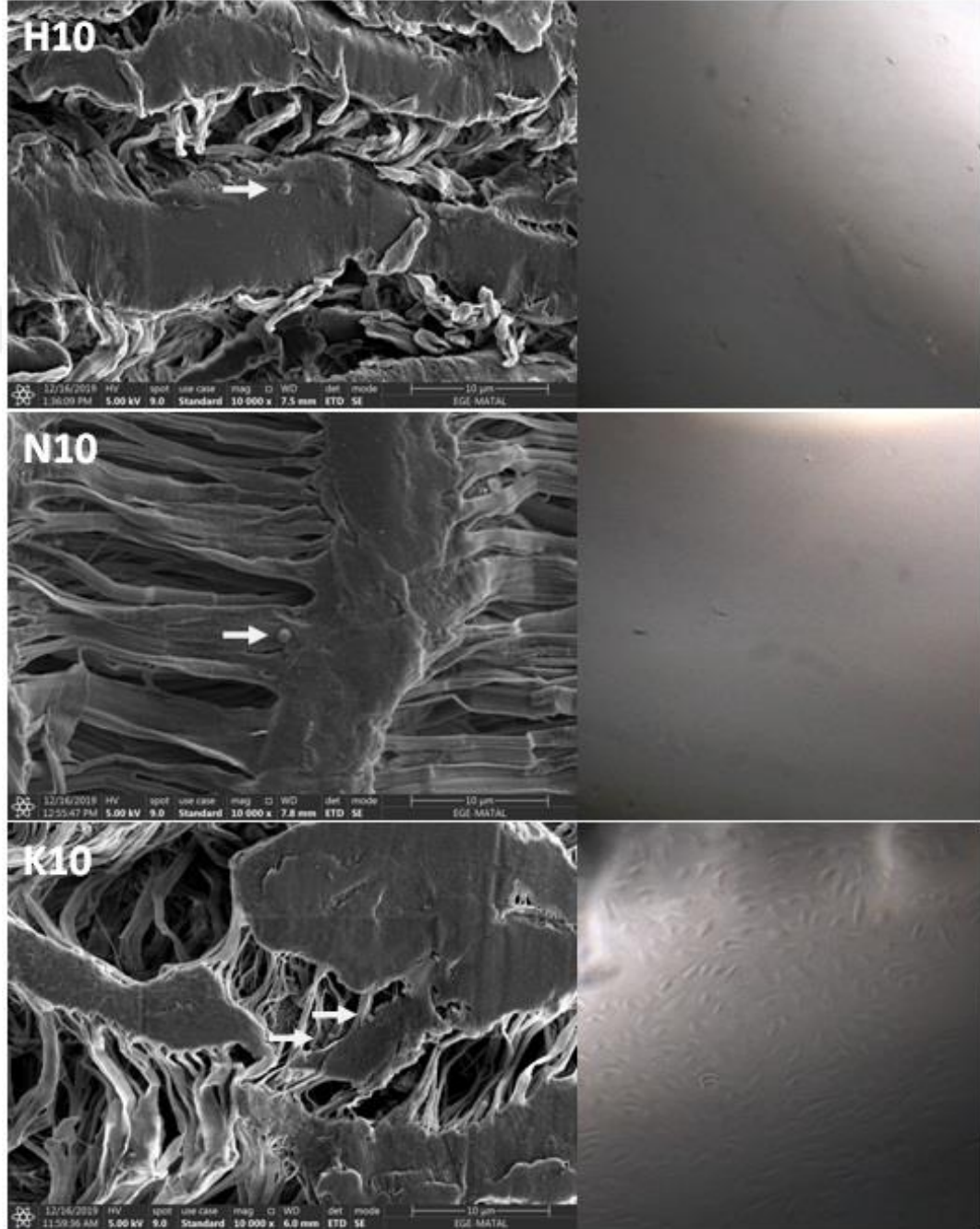
Şekil 4.4. Üçüncü gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi(solda), ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi(sağda).

Endotelizasyon deneyinin beşinci gününde, greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanındaki endotel hücrelerinin miktarında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde ise her üç tip greft üzerinde az miktarda ve tekli endotel hücreleri olduğu görülmüştür(Şekil 4.5).



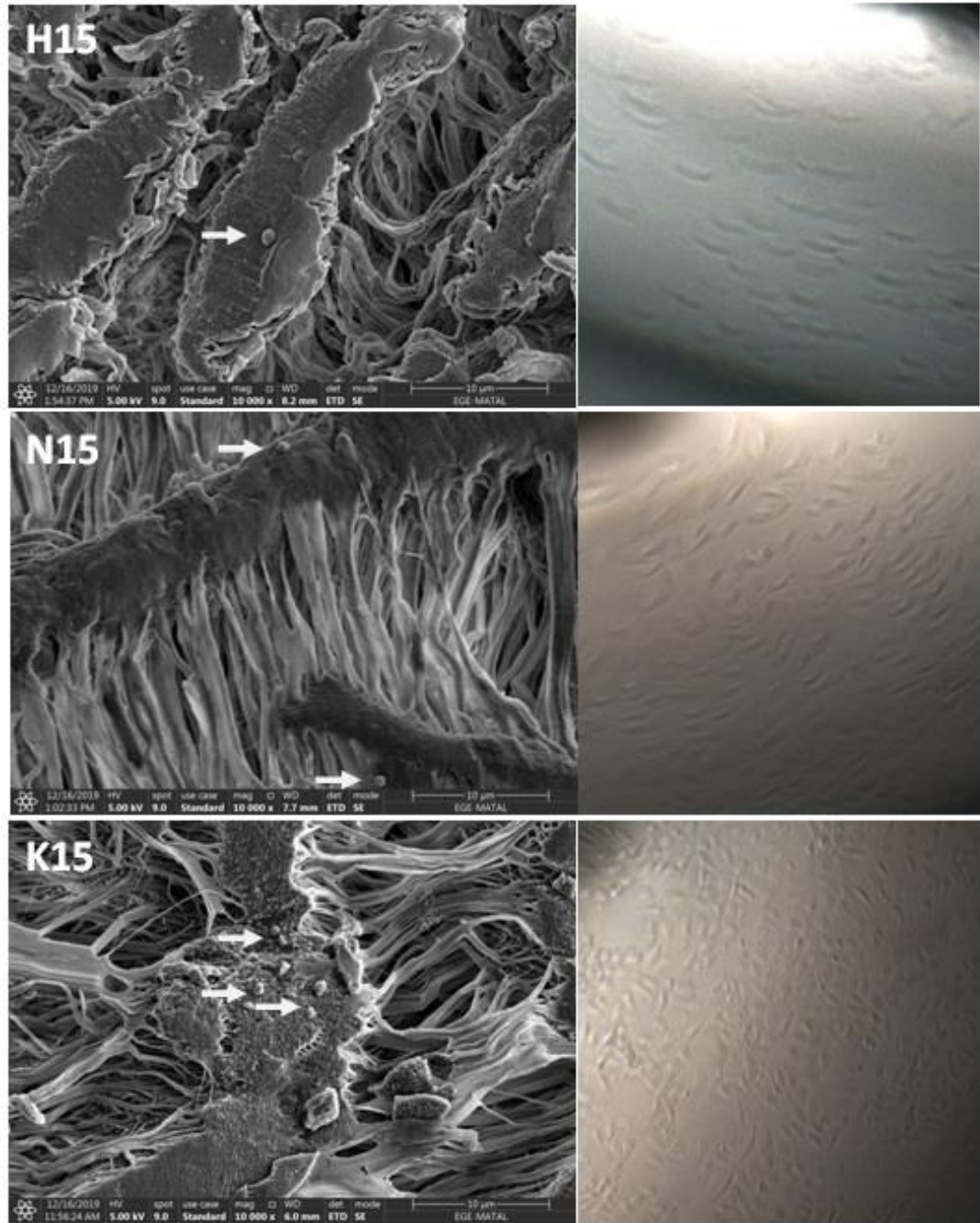
Şekil 4.5. Beşinci gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi(solda), ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi(sağda).

Deneyin 10. gününde normal(çıplak) ve heparin grubu greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanındaki endotel hücrelerinin miktarında değişiklik görülmemiştir. Buna karşılık karbon grubunda kuyucuk tabanındaki endotel hücrelerinde onuncu günde ciddi artış olduğu görülmüştür. Ve bu greftler elektron mikroskobu ile incelendiğinde 5. Güne benzer şekilde her üç greft tipinde az miktarda endotel tutulumu olduğu görülmüştür(Şekil 4.6).



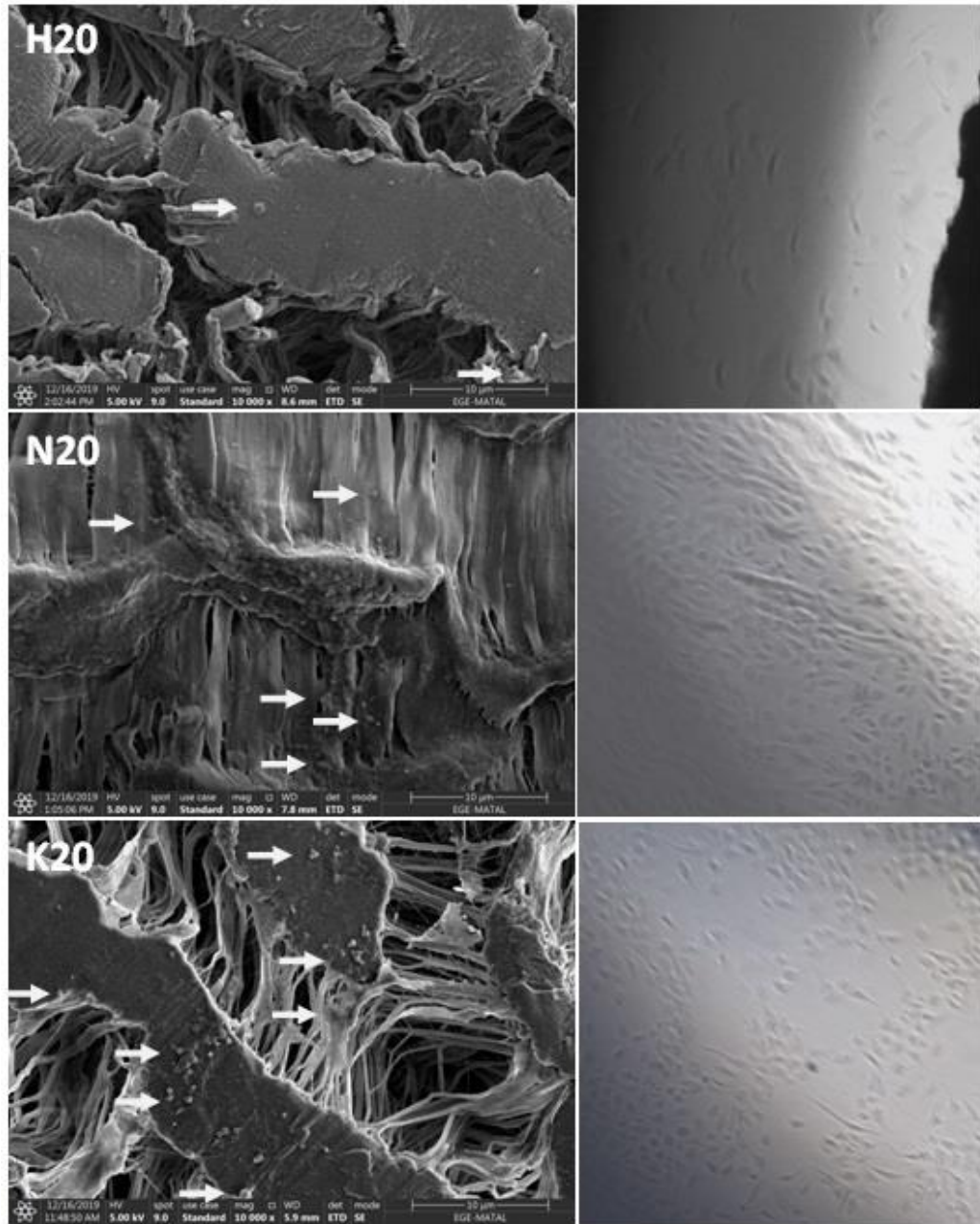
Şekil 4.6. Onuncu gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi(solıda), ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi(sağda).

15. gün grubu greftler çıkarılmadan önce kuyucuk tabanından alınan görüntülerde normal(çıplak) ve heparin alt gruplarında endotel hücre sayıları artış göstermekle birlikte karbon grubunda endotel hücre sayısının daha fazla olduğu görülmüştür. Elektron mikroskobu ile greftler incelendiğinde normal(çıplak) ve heparin kaplı greftte tekli endotel tutulumları görülürken karbon kaplı grefte tutunan endotel hücrelerinin sayısında artış olduğu görülmüştür(Şekil 4.7).



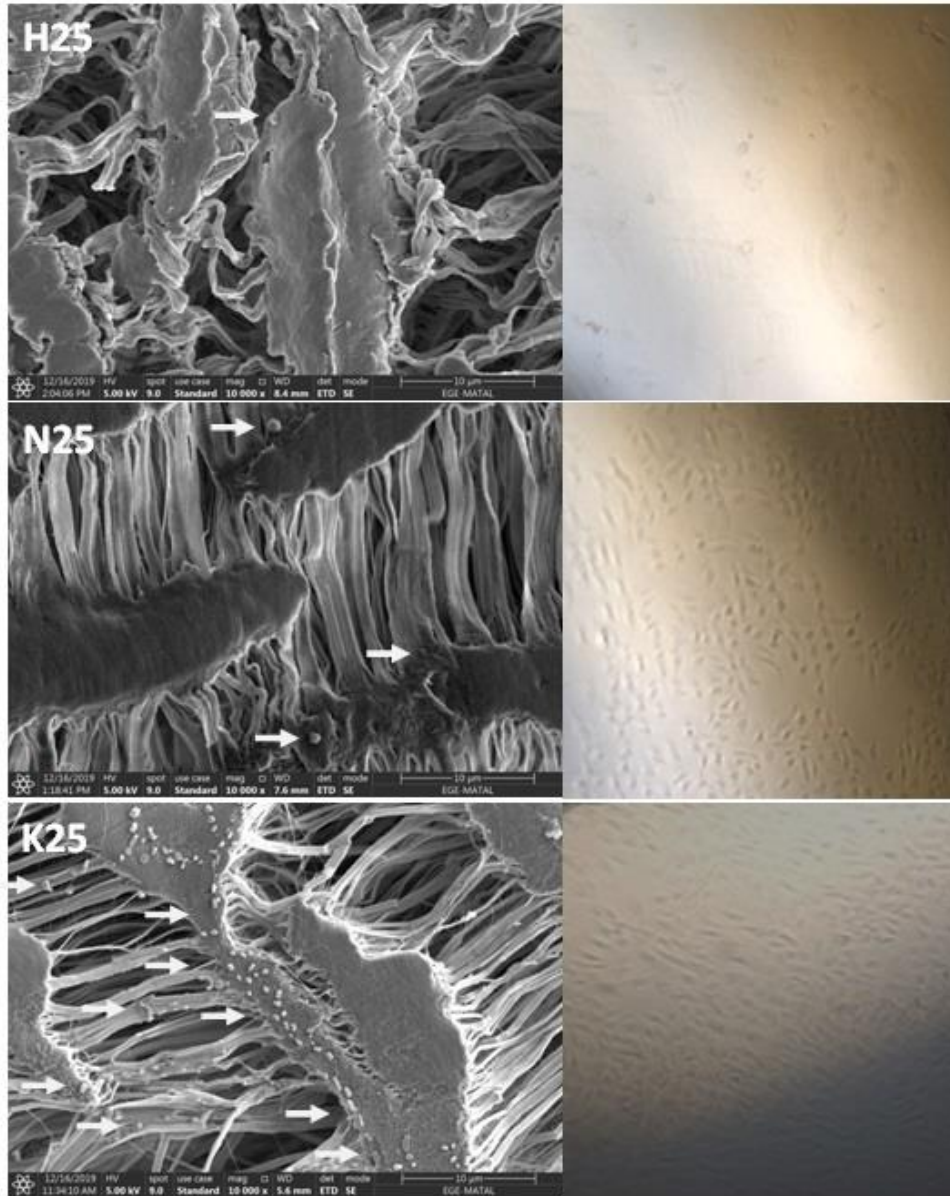
Şekil 4.7. 15. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi(solda), ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi(sağda).

Deneyin 20. gününde inverted mikroskop incelemesinde normal(çıplak) greftin bulunduğu kuyucuk tabanındaki hücre sayısının giderek arttığı ve karbon kaplı greft ile benzer şekilde yoğun endotel hücresi olduğu gözlenmiştir. Heparin kaplı greftin bulunduğu kuyucuk tabanında ise endotel hücre sayısının diğer iki gruptan daha az olduğu görülmüştür. Elektron mikroskobu ile greftler görüntülediğinde ise karbon kaplı greft ve normal(çıplak) greft üzerine tutunan endotel hücrelerinin benzer fakat, heparin kaplı greftte ise diğerlerine göre az miktarda ve tekli endotel hücrelerinin tutunduğu görülmüştür(Şekil 4.8).



Şekil 4.8. 20. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi(solıda),ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi(sağda).

25. günde greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanları inverted mikroskop ile incelendiğinde normal(çıplak) ve karbon kaplı greftin bulunduğu kuyucuklarda yoğun endotel hücre gözlenirken, heparin kaplı greftin bulunduğu kuyucuğun tabanında az miktarda endotel hücresi olduğu görülmüştür. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde heparin kaplı greftte önceki incelemelere benzer şekilde tekli az sayıda endotel hücresinin tutunduğu görülmüştür. Normal(çıplak) greftte heparin kaplı grefte göre daha fazla endotel hücresi tutunmuş olmakla birlikte halen sayıca karbon kaplı greftten daha az olduğu gözlenmiştir. Karbon kaplı greftte ise her geçen gün tutunan endotel hücrelerinin sayısının giderek arttığı ve 25. günde yoğun endotel tutulumunun olduğu görülmüştür(Şekil 4.9).



Şekil 4.9. 25. gün greftler üzerine tutunan hücrelerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi(solda),ve eş zamanlı greftlerin bulunduğu kuyucuk tabanın inverted mikroskop ile görüntülenmesi(sağda).

5.TARTIŞMA

Genişletilmiş politetrafloroetilen (ePTFE) greftler, periferik arter hastalığının cerrahi tedavisinde sıklıkla kullanılan prostetik materyallerdir. Teknolojik gelişmeler ile birlikte ePTFE greftlerin duvar yapısı, porositesi ve iç yüzey (lümen) kaplamaları farklılık göstermeye başlamıştır. Yapılan bu değişikliklerde esas amaç erken greft trombozunu önleyerek greft açıklığını artırmaktır. Bu nedenle ePTFE greftlerin iç yüzeylerine heparin kaplaması, karbon kaplaması gibi yöntemler denenerek iç yüzeyi birbirinden farklı ePTFE greftler piyasaya sürölmüştür.

Anastomoz bölgesinde intimal hiperplazi açısından prostetik greftin endotelizasyonu önemli bir süreçtir. Ayrıca greft enfeksiyonu açısından greftlerin bakteriyel kontaminasyon ve biyofilm oluşumuna yatkınlığı ciddi rol oynamaktadır. Bu çalışmada iç yüzeyi heparin kaplı ePTFE greft, iç yüzeyi karbon kaplı ePTFE greft ve iç yüzeyinde herhangi bir kaplama olmayan normal(ıplak) ePTFE grefti bakteriyel kontaminasyon, biyofilm oluşumu ve endotelizasyon açısından *in-vitro* ortamda karşılaştırılmıştır.

Bakteriyel kontaminasyon ve biyofilm deneyleri sonucunda, iç yüzeyi karbon kaplı greftin normal(ıplak) grefte göre biyofilm oluşumu bir miktar fazla olsa da (ortalama absorbans değerleri sırasıyla: 0,2193 ve 0,1839) iki greft arasında biyofilm oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır($p>0,05$). Öte yandan iç yüzeyi heparin kaplı greftte diğer iki greft tipine göre anlamlı derecede fazla biyofilm oluşumu gözlenmiştir (ortalama absorbans değeri: 0,4254). İç yüzeyi heparin kaplı greft, karbon kaplı grefte göre biyofilm oluşumuna daha yatkın olduğu bulunmuştur($p<0,05$). Ve yine heparin kaplı greftin, normal(ıplak) grefte göre biyofilm oluşumuna daha yatkın olduğu görölmüştür($p<0,01$).

Alt ekstremitte periferik arter hastalığı tedavisinde kullanılan sentetik greftlerin enfeksiyonunda karşımıza çıkan en sık patojen *S.aureus*'tur. Bu çalışmada da patojen olarak *S.aureus* suşu kullanılmıştır. Karbon kaplı greft ile normal(ıplak) greft arasında biyofilm oluşumu açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durum karbon moleköllerinin *S.aureus* açısından bir adherans etkeni olmadığını düşündürmektedir. Öte yandan karbon nanopartiköllerinin biyofilm içerisindeki veya planktonik formdaki *S.aureus* üzerine antimikrobiyal etkinliği olduğu(216), *Bacillus anthracis* biyofilmi(217) ve *E.coli* biyofilmi(218) üzerine inhibitör etkinliği olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Ayrıca çalışmamız sonucunda iç yüzeyi heparin kaplı greftte *S.aureus*'un daha fazla biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntülere göre ise iç yüzeyi heparin kaplı greftte daha fazla *S.aureus* tutunduğu (tüm porların derinlerine kadar ilerleyen tutulumlar) gözlenmiştir.

S.aureus canlı dokuda ekstraselüler matriks proteinleri (fibronektin, vitronektin, kollojen, trombospondin, laminin, plazminojen) aracılığı ile spesifik adherans sağlamaktadır(219). Bununla birlikte cansız yüzeylerde hidrofobik ilişki, elektrostatik çekim kuvveti gibi atomik ve moleküler yasalar ile nonspesifik adherans göstermektedir. ePTFE greftler de mikroorganizmaların adheransını kolaylaştırıcı hidrofobik yapıya sahiptir. Hidrofobik yapıları nedeniyle adherans kolay olmakla beraber üç farklı greft tipi arasında iç yüzeyi heparin kaplı greftte bakteriyel tutulumun ve biyofilm üretiminin fazla olması heparinin adezyonu etkilediğinin düşündürmüştür.

Liang ve ark. *S.aureus*'un, heparan sülfata bağlanmasını sağlayan 66kDa molekül ağırlığında yüzey proteini ve heparine bağlanmasını sağlayan 60kDa molekül ağırlığında yüzey proteini olduğunu tespit etmiştir(220). *S.aureus*'un heparine bağlanmasını sağlayan yüzey proteinine sahip olması, bizim çalışmamızda heparin kaplı grefte daha fazla mikroorganizma tutunmasını desteklemektedir. Ayrıca stafilokokların, implante edilmiş biyomalzemelerin doku entegrasyonunu etkileyebilecek heparine bağımlı büyüme faktörleri olan bFGF ve PDGF ile etkileşime girebileceği gösterilmiştir(221). Başka bir çalışmada ise stafilokokların hücre yüzeyinde 17kDa molekül ağırlığına sahip heparin-binding protein olduğu tespit edilmiştir(222).

Shanks ve ark. çalışmalarında ortamda heparin varlığının *S.aureus*'un biyofilm oluşumunu uyardığını ve elektron mikroskobunda incelendiğinde heparin varlığında biyofilm tabakasının üç boyutlu yapısının daha gelişmiş olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada heparin varlığının *S.aureus*'un büyüme hızını artırdığı, hücre-hücre etkileşimini artırdığı ve heparin varlığında 4 kat fazla bakteri kümesi görüldüğü bildirilmiştir(223). Bizim çalışmamızda da heparin kaplanmış greftte mikroorganizma sayısının taramalı elektron mikroskobunda daha fazla olduğu ve spektrofotometrik değerlendirmede daha fazla biyofilm oluştuğu tespit edilmiştir.

Abiyotik ortamlarda heparinin, *S.aureus*'un biyofilm oluşumu üzerine stimule edici etkilerinin yanında organizma içerisinde prostetik materyal varlığında mikroorganizmanın adhezyonunu nasıl etkileyeceği de önemlidir. Canlı doku da *S.aureus* fibrinojen ve fibronektine tutunduğu bilinmektedir. Fibrinojene ClfA ve ClfB yüzey molekülleri ile aracılığı ile bağlanmaktadır(224-225). Fibronektine ise FnbA ve FnbB molekülleri ile bağlanmaktadır(226-227). ClfA, ClfB, FnbA ve FnbB moleküllerinin heparin varlığında uyarıldığı bulunmuştur(223). Bu nedenle canlı dokuda da heparin varlığında *S.aureus*'un adezyonunun artacağı düşünülebilir. Bunu desteklemek için çalışmamızı *in-vivo* koşullarda da gerçekleştirmek gerekmektedir.

En sık greft enfeksiyonu patojeni olan *S.aureus*'un heparin-binding proteine sahip olduğu, heparin varlığında çoğalma hızının arttığı ve biyofilm oluşumunun uyarıldığı kanıtlanmıştır. Bunlara ek olarak, bizim çalışmamızda da ePTFE greftin iç yüzeyinde heparin kaplaması varlığında, iç yüzeyi farklı olan diğer greft seçeneklerine göre, greft yüzeyindeki *S.aureus* sayısının arttığı ve biyofilm oluşumunun daha fazla olduğu görülmüştür.

Endotelizasyon ve anti-trombojenite prostetik greftlerin geliştirilmesinde iki önemli konudur(228). Greft yetmezliğinin ana nedeni prostetik greft yüzeyinin trombojenitesi ve intimal hiperplazinin şiddetidir(229). Greftin hızlı endotelizasyonu uzun dönem trombojeniteyi azaltacak ve hemouyumlu bir arayüz oluşmasını sağlayacaktır. Ayrıca normofonksiyone endotelyum, aktif anti-tromboz etkisinin yanında, vasküler düz kas hücre proliferasyonunun inhibisyonuna katkıda bulunarak intimal hiperplaziyi azaltan bir role sahiptir(230,231). Endotelyum eksikliğinin hem greft trombozu hem de intimal hiperplazi açısından kritik öneme sahip olduğu düşünülmektedir(232).

Sentetik greftlerin tamamen endotelize olmadığı anastomoz bölgelerinden göç ile veya kapiller iç büyüme ile anastomoz bölgelerine yakın alanlarda endotelizasyon sağlandığı düşünülmektedir(233,234). Bu nedenle düşük çaplı prostetik greftler ile yapılan endotelizasyon çalışmaları mevcuttur. Doku mühendisliğinin gelişmesi ile greftin *in-vitro* tam endotelizasyonu sağlandığında yüksek anti-trombojen yüzey elde edilmiştir(235,236). Bu sayede yüksek açıklık oranları bildirilmiştir. *İn-vitro* endotelizasyonun greft açıklığını artırdığı hayvan deneylerinde kanıtlanmıştır(237). Zilla ve ark. *İn-vitro* endotelize greftleri femoropopliteal bypass operasyonlarında uygulamış ve 32 aylık takipte daha yüksek açıklık oranları ve daha düşük trombosit agregasyonu bildirmiştir(238). Bizde çalışmamızda periferik

arter hastalığında kullanılan ePTFE greftlerin iç yüzey yapılarının endotelizasyona etkisini endotel hücre kültürü ile *in-vitro* koşullarda araştırdık.

İç yüzeyi heparin kaplı, iç yüzeyi karbon kaplı ve iç yüzey kaplaması olmayan normal(çıplak) ePTFE greftler eşit (1cm^2)parçalar halinde hazırlanarak HUVEC hücre kültürü ile endotelizasyon çalışması yapılmıştır. Graft materyalleri 3.gün, 5.gün, 10.gün,15.gün, 20.gün ve 25. günlerde hem bulundukları kuyucuk tabanı inverted mikroskop ile görüntülenmiş hem de aynı günlerde taramalı elektron mikroskobisi için greftler fiske edilmiştir.

İç yüzeyi heparin kaplı ePTFE greft için, 3.gün kuyucuk tabanında endotel hücre sayısının fazla olduğu ancak ilerleyen günlerde kuyucuk tabanındaki endotel hücrelerinin giderek sayıca azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca heparin kaplı greftin bulunduğu kuyucuklardaki endotel hücrelerinin tipik içi morfolojik yapılarını zamanla kaybederek daha yuvarlak bir hal aldığı ve kuyucuk tabanındaki endotel hücrelerine has kaldırım taşı görüntüsünü kaybettiği gözlenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu görüntülerinde ise heparin kaplı greft üzerinde 3. günde endotel tutulumu gözlenmekle birlikte 25.güne kadar endotel sayısının azalma gösterdiği ve endotel hücrelerinin seyrek ve sayıca diğer gruplara göre az olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular heparin varlığında endotel hücre proliferasyonunun baskılandığını düşündürmektedir.

Khorona ve ark. unfraksiyone heparinin endotel hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir(239). Başka bir çalışmada ise hem unfraksiyone heparinin hem de düşük molekül ağırlıklı heparinin endotel hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir(240). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde heparin kaplı greftte hem kuyucuk tabanında hem de greft üzerinde endotel hücre sayısı zamanla azalmıştır. Buna karşılık 3. günde heparin kaplı greft üzerinde diğer greftlere göre daha fazla endotel hücresi gözlenmiştir. Kolar ve ark. 'nın PET(polietilen tereftalat) üzerine kovalent bağ ile bağlanmış heparinin endotel hücrelerine olan etkisini araştırdıkları çalışmasında, ilk 3. saatte heparinin endotel hücreleri arası hücre-hücre bağlantısını artırdığı ve proliferasyonu olumlu etkilediği ancak 24. Saatten sonra bu olumlu etkinin giderek negatif yönde değiştiğini bildirmiştir(241). Rosenbaum ve ark. ise doz bağımlı olarak heparin maruziyetinden 6-9 saat sonra endotel inhibisyonunun irreversible olarak başladığını göstermiştir(242). Benzer şekilde çalışmamızda heparin kaplı greftte erken

dönemde endotel hücre sayısının daha fazla olduğu zamanla hücre sayısında azalma görüldüğü tespit edilmiştir.

Hücre morfolojisine bakıldığında ise heparin kaplı greftin bulunduğu kuyucuk tabanındaki endotel hücrelerinin zamanla içi yapıyı kaybettiği tipik kaldırım taşı görüntüsünün silindiği görülmüştür. Mandal ve ark. heparin varlığında endotel hücrelerinin aktin ve vimentin dengelerinin değiştiği ve bu nedenle endotel hücrelerinin sitoskelatal yapısında bozulma olduğu ve zamanla endotel hücrelerinin nükleusunda silinme olduğunu göstermiştir. Bu bulgular heparinin endotel hücresi üzerine antiproliferatif etkisinin göstergesidir. Ve aynı çalışmada heparin maruziyetinde doz ve süre arttıkça endotel hücrelerinin sitoskeletal reorganizasyonunun ve protein ekspresyonunun inhibe olduğu ve mikrovilluslarda daha fazla silinme olduğu gösterilmiştir(243).

Prostetik greftlerin endotelizasyonu, antitrombojenik bir yüzey sağlamakla birlikte intimal hiperplaziyi de inhibe ettiği bilinmektedir. Duktus arteriozusun kapanması sürecinde fizyolojik olarak görülen intimal hiperplazi(244), cerrahi revaskülerizasyonda greft yetmezliğine neden olabilen patolojik bir süreçtir. İntimal hiperplazi, intima sürekli bir vasküler düz kas hücresi göçünün sonucudur ve greft lümeninde daralma ile greft yetmezliğine neden olabilmektedir(245). Endotelyumun düz kas hücreleri proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ederek intimal hiperplaziyi baskıladığı bilinmektedir(246). Prostetik greftlere endotel tohumlama yöntemi ile endotelizasyon sağlanmasının düz kas hücre proliferasyonunu olumlu şekilde etkilediği bildirilmiştir(232). Bu nedenle heparin varlığında endotelize olamayan bir prostetik greft endotel hücrelerinin intimal hiperplaziye olumlu etkisinden mahrum kalacağı düşünülebilir.

Karbon bazlı malzemeler son 10 yılda en biyouyumlu bileşikler olarak kabul edilmektedir(247). Karbon filmlerin, kimyasal olarak olumsuz etkilerinin olmaması, sitotoksikite göstermemesi ve insan vücudunun doğasında var olan bir element olması nedeniyle medikal alanda sık kullanılan ürünlerdir(248). ePTFE greftler içinde iç yüzeyine karbon kaplama uygulaması mevcuttur. Karbon kaplı poliüretan malzemelerin trombosit aktivasyonunu ve adezyonunu azalttığı bildirilmiştir(249).

Bizim çalışmamızda karbon kaplı ePTFE greftin endotelizasyonu da değerlendirilmiştir. Karbon kaplı greftin bulunduğu kuyucuk tabanı inverted mikroskop ile

incelendiğinde 3. ve 5.günlerde kuyucuk tabanındaki endotel hücrelerinde değişiklik gözlenmezken 10. gün ve sonrasında kuyucuk tabanında endotel hücrelerinin sayısının hızla arttığı gözlenmiştir. Ve aynı zamanda hücreler morfolojik yapısını hiç kaybetmemiş hücre sayısı arttıkça kuyucuk tabanında tipik kaldırım taşı görüntüsü ortaya çıkmıştır. İç yüzey kaplaması olmayan normal(çıplak) greftte de 25. günde kuyucuk tabanında endotel hücre sayısı fazla görünmekle birlikte hücre sayısında artış 20. gün başlamıştır. Karbon kaplı greftte normal(çıplak) grefte göre endotel hücrelerinin daha erken çoğalmaya başlaması ve 25. günde kuyucuk tabanını neredeyse tamamen kaplamış olması karbonun endotel hücrelerine proliferatif etkisini düşündürmektedir.

Chen ve ark. amorf karbon filmlerinin endotel hücrelerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, karbon varlığında endotel hücre proliferasyonunun arttığını ve yüksek karbon seviyelerinde endotel hücreleri arası bağlantının olumlu etkilendiğini göstermiştir(250). Ek olarak aynı çalışmada, karbon varlığında endotel hücrelerinin canlılığının iyileştiği ve endotel hücrelerinin sitoskeletal yapısının korunarak morfolojik olarak tipik kaldırım taşı görüntüsü sergiledikleri gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da karbon kaplı greftin bulunduğu kuyucukta diğer greftlere göre endotel hücrelerinin daha erken ve daha hızlı çoğaldığı ve inverted mikroskop altında morfolojik yapılarını kaybetmedikleri görülmüştür.

Taramalı elektron mikroskobu ile değerlendirildiğinde ise karbon kaplı greftte 15. gün ve sonrasında greft üzerine tutunan endotel hücre sayısının diğer greft tiplerine göre çok daha fazla olduğu görülmüştür. Castellino ve ark. karbon kaplı stentlerin hızlı ve erken endotelize olduğunu, trombosit aktivasyonunun ve inflamatuvar hücre adezyonunun baskılandığı, düz kas hücre proliferasyonunun azalarak 180. Gün takibinde minimal neointimal kalınlaşma olduğunu bildirmiştir(251). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde karbon kaplı greftte diğer greftlere göre daha erken ve hızlı endotelizasyon geliştiği görülmüştür. Bu bulgular ile karbon kaplı greftlerin erken endotelizasyon ve bu sayede düz kas hücre poliferasyonunun baskılanarak neointimal hiperplazinin olumsuz etkileri ile daha az karşılaşılacağı düşünülebilir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Vasküler cerrahide sık kullanılan genişletilmiş politetrafloroetilen (ePTFE) greftler teknolojik gelişmeler ile birlikte çeşitlilik göstermektedir. Bu gelişmeler yaşanırken greft yetmezliği ön planda tutularak hemen her zaman greftin trombojenitesi üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Antitrombojenite üzerine yapılan bu çalışmalar sonucu ePTFE greftlerde farklı iç yüzey kaplamaları karşımıza çıkmaktadır.

ePTFE greftlerin iç yüzey yapılarının endotelizasyon, bakteriyel kontaminasyon ve biyofilm oluşumu üzerine etkisini incelediğimiz bu çalışmamızda, greft iç yüzeyine yapılan kaplamaların bakteriyel adezyonu ve endotel hücre proliferasyonunu etkilediğini tespit ettik.

ePTFE greft iç yüzeyine kaplanan heparinin hem *S.aureus* için bir adezyon faktörü gibi davranarak biyofilm oluşumunun daha fazla olduğu, hem de endotel hücrelerinin proliferasyonunu olumsuz etkileyerek greft endotelizasyonunu engellediği görülmüştür. Bu nedenle prostetik greft uygulanacak hastada tromboza yatkınlık nedeniyle antikoagülan gerekliliği düşünülüyor ise heparinin antitrombojen özelliğinden faydalanmak için grefte heparin kaplanması yerine sistemik antikoagülasyon yapılmasını öneriyoruz.

İç yüzeyi karbon kaplı greft bakteriyel kontaminasyon ve biyofilm oluşumu açısından normal(çıplak) greft ile benzer sonuçlar göstermiş olup endotelizasyon açısından normal(çıplak) grefte göre daha erken ve hızlı endotelize olmuştur. Karbon kaplı greftler ve normal(çıplak) greftlerin, iç yüzeyi heparin kaplı greftlere göre greft enfeksiyonu ve greft endotelizasyonu açısından daha güvenli olduğunu düşünüyoruz.

Bu çalışma farklı iç yüzey yapısına sahip olan üç greft tipinin endotelizasyon, enfekte olma ve biyofilm oluşturma özelliklerinin karşılaştırıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmamızda greftler *in-vitro* koşullarda karşılaştırılmış olup bu konuda ileri *in-vivo* ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7.ÖZET

FARKLI İÇ YÜZEYE SAHİP PTFE GREFTLERDE ENDOTELİZASYON, BAKTERİYEL KONTAMİNASYON VE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI

AMAC: Genişletilmiş politetrafloroetilen (ePTFE) greftleri, periferik vasküler cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır ve farklı iç yüzey kaplamalarına sahip olabilirler. Greft enfeksiyonu ve greft trombozu, protez greft bypass prosedürlerinin iki ana komplikasyonudur ve yüksek mortalite ve morbiditeye neden olabilir. Çalışmamızın amacı, farklı protez ePTFE greft kaplama yöntemlerinin endotelizasyon, bakteriyel kontaminasyon ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkisini araştırmaktır.

YÖNTEM: Biyofilm oluşumu ve endotelizasyon için üç farklı tipte greft incelendi. Herhangi bir kaplaması olmayan ePTFE greftleri ve heparin ya da karbondan oluşan lümenal yüzey kaplamaları olan greftler kullanıldı ve *Staphylococcus Aureus* suşu ile kontamine edildi. Biyofilm tespiti için Christiansen yöntemi kullanıldı. Ayrıca biyofilm oluşumu tamamlanmış greftler taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile değerlendirildi. Endotelizasyonun belirlenmesi için insan göbek veni endotel hücreleri (HUVEC) kullanıldı. Endotel hücre kültüründen sonra greftler SEM altında görüntülendi ve ekimden sonraki 3. ve 25. günler arasında altı farklı zamanda endotel hücrelerinin proliferasyonu için incelendi.

BULGULAR: Greftlerde biyofilm oluşumunu belirlemek için spektrofotometrik yöntem kullanıldı ve her greft tipinde biyofilm oluşumunun yoğunluğunu karşılaştırmak için kantitatif değerler kullanıldı. Heparin kaplı greftler için biyofilm oluşumunun diğer iki greft tipinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu ($p < 0.05$). SEM muayenesi ile heparin kaplı greftlerde mikroorganizma sayısının arttığını gözlemledik. Endotel hücrelerinin karbon kaplı greftlere yapışması, endotel ekiminden 15., 20. ve 25. gün sonra yapılan incelemelerde artmış bulunmuştur. Heparin kaplı greftlerin, yapılan her incelemede diğer greft tiplerine kıyasla daha az endotelial hücre içerdiği gözlemlendi.

SONUÇ: İn vitro çalışmamız, ePTFE greftin iç yüzeyi üzerindeki heparin kaplamasının, mikroorganizmalar için bir yapışma faktörü olarak biyofilm oluşumunu arttırdığını ve endotel hücre çoğalmasını ve greft içi endotelizasyonunu engellediğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: ePTFE, heparin kaplı, karbon kaplı, biyofilm, endotelizasyon, greft enfeksiyonu, greft endotelizasyonu, HUVEC

8.SUMMARY

INVESTIGATION OF ENDOTHELIZATION, BACTERIAL CONTAMINATION AND BIOFILM CREATION IN PTFE GRAFTS WITH DIFFERENT INTERNAL SURFACES

BACKGROUND: The expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) grafts are commonly employed in peripheral vascular surgery have and may have different internal surface coatings. Graft infection and graft thrombosis are two main complications of prosthetic graft bypass procedures and may cause high mortality and morbidity. The aim of our study is to investigate the effect of different prosthetic ePTFE graft coating methods on endothelialization, bacterial contamination, and biofilm formation.

METHODS: Three different types of grafts were examined for biofilm formation and endothelialization. ePTFE grafts without any coating and grafts with luminal surface coatings of either heparin or carbon were used and contaminated with *Staphylococcus Aureus* strain. Christiansen method was used for biofilm detection. In addition, grafts with completed biofilm formation were assessed by scanning electron microscopy (SEM). Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used for the determination of endothelialization. After endothelial cell cultivation grafts were visualized under SEM and examined at six different times between the 3rd and 25th days after cultivation for the proliferation of endothelial cells.

RESULTS: The spectrophotometric method was used to determine the biofilm formation on grafts and quantitative values were used to compare the intensity of biofilm formation on each graft type. The biofilm formation for heparin-coated grafts was found to be statistically significantly higher than the other two graft types ($p < 0.05$). We observed that the number of microorganisms was increased in heparin-coated grafts under the SEM examination. The adherence of endothelial cells on carbon-coated grafts was found to be increased, in examinations performed at 15th, 20th and 25th days after endothelial seeding. Heparin-coated grafts were observed to contain fewer endothelial cells in comparison with the other graft types on each examination performed.

CONCLUSION: Our *in-vitro* study has shown that heparin coating on the inner surface of the ePTFE graft increases the formation of biofilm as an adhesion factor for microorganisms and hinders endothelial cell proliferation and inner graft endothelialization.

Keywords: ePTFE, heparin coated, carbon coated, biofilm, endothelialization, graft infection, graft endothelialization, HUVEC

9. KAYNAKLAR

1. Chen Q, Smith CY, Bailey KR, Wennberg PW, Kullo IJ. Disease location is associated with survival in patients with peripheral arterial disease. *J Am Heart Assoc* 2013; 2(5): e000304.
2. Arain FA, Ye Z, Bailey KR, et al. Survival in patients with poorly compressible leg arteries. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59:400-7.
3. Liapis C, Kakisis J: Atherosclerotic Risk Factors: General Considerations. Rutherford RB, editors: *Vascular Surgery*, ed 8, 2014, p400
4. Tuzcu EM, et al: High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 103:2705–2710, 2001.
5. Haimovici H, et al: Atherosclerosis. Biologic and surgical considerations. In Haimovici H, et al, editors: *Vascular surgery principles and techniques*, ed 4, Cambridge, Mass, 1996, Blackwell Science, p 127.
6. McMillan GC: Nature and definitions of atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 454:1, 1985.
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6423):801-9.
8. Fuster V, Gotto AM. Risk reduction. *Circulation* 2000;102:94-102.
9. Allison MA, HO E, Denenberg JO, et al. Ethnic-specific prevalence of peripheral arterial disease in the United States. *Am J Prev Med* 2007; 32: 328-33.
10. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 2013; 382: 1329-40.
11. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG; TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007;45 Suppl S:S5-67.

- 12.** Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; Trans Atlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. *Circulation* 2006;113(11):e463-654.
- 13.** Karabay Ö, Karaçelik M, Yılık L, Tekin N, İriz AB, Kumdereli S, ve ark. İskemik periferik arter hastalığı: Bir tarama çalışması. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* 2012;20(3):450-7.
- 14.** Stoffers HE, Rinkens PE, Kester AD, Kaiser V, Knottnerus JA. The prevalence of asymptomatic and unrecognized peripheral arterial occlusive disease. *Int J Epidemiol* 1996; 25:282–90.
- 15.** Norman PE, Eikelboom JW, Hankey GJ. Peripheral arterial disease: prognostic significance and prevention of atherothrombotic complications. *MJA* 2004;181(3):150–4.
- 16.** Mohler ER. Peripheral arterial disease. *Arch Intern Med* 2003;163(19):2306-14.
- 17.** Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 2013;382(9901):1329-40.
- 18.** Meru AV, Mitra S, Thyagarajan B, Chugh A. Intermittent claudication: an overview. *Atherosclerosis* 2006;187(2):221-37.
- 19.** Hiatt WR. Atherogenesis and the medical management of atherosclerosis. Rutherford (ed): *Vascular Surgery*. Philadelphia: Elsevier Saunders Company; 2005. p.582-601.

20. Welten GM, Schouten O, Chonchol M, Hoeks SE, BaxJJ, Van Domburg RT, et al. Prognosis of patients with peripheral arterial disease. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2009;50:109-21.
21. Stoffers HE, Kaiser V, Knottnerus JA. Prevalence in general practice. In: Fowkes FGR, ed. *Epidemiology of peripheral Vascular disease*. London: Springer-Verlag, 1991: 109–15.
22. Meijer WT, Hoes AW, Rutgers D, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Peripheral arterial disease in the elderly: the Rotterdam Study. *ArteriosclerThrombVascBiol* 1998; 18: 185–92.
23. Gibson JME, Kenrick M. Pain and powerlessness. The experience of living with peripheral Vascular disease. *J AdvNurs* 1998; 27(4):737-45.
24. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, et al. Mortality over a period of ten years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 1992; 326: 381–86.
25. Khawaja FJ, Kullo IJ. Novel markers of peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2009; 14: 381-92.
26. Shammas NW. Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3:229-34.
27. Erb W. Klinische Beiträge zur Pathologie des Intermittierenden Hinkens. *Munch Med Wochenschr* 1911; 2: 2487.
28. Couch NP: On the arterial consequences of smoking. *J Vasc Surg* 3:807–812, 1986.
29. Kannel WB, McGee DL. Update on some epidemiological features of intermittent claudication. *J Am Geriatr Soc* 1985; 33: 13–18.
30. Bainton DF, Sweetman P, Baker I, Elwood P. Peripheral arterial disease: consequences for survival and association with risk factors in the Speedwell prospective heart disease study. *Br Heart J* 1994;72: 128–32.
31. Ingolfsson IO, Sigurdson G, Sigvaldason H, Thorgeirsson G, Sigdusson N. A marked decline in the prevalence and incidence of intermittent claudication in Icelandic men 1968–

1986: a strong relationship to smoking and serum cholesterol—the Reykjavik Study. *J Clin Epidemiol* 1994; 47: 1237–43.

32. Hawkey GJ, et al: Medical treatment of peripheral arterial disease. *JAMA* 295:547–553, 2006.

33. American Diabetes Association: Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care* 26:3333–3341, 2003.

34. Murabito JM, et al: Prevalence and clinical correlates of peripheral arterial disease in the Framingham Offspring Study. *Am Heart J* 143:961–965, 2002.

35. ESH/ESC European Society of Hypertension, European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* 21:1000–1053, 2003.

36. Mehler PS, et al: Intensive blood pressure control reduces the risk of cardiovascular events in patients with peripheral arterial disease and type 2 diabetes. *Circulation* 107:753–756, 2003.

37. Yusuf S, et al: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 342:145–153, 2000.

38. Feringa HH, et al: The effect of intensified lipid-lowering therapy on long-term prognosis in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 45:936–943, 2007.

39. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocystinaemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1149–55.

40. Wald DS, et al: Randomized trial of folic acid supplementation and serum homocysteine levels. *Arch Intern Med* 161:695–700, 2001.

41. Robinson K, et al: Low circulating folate and vitamin B6 concentrations: risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease. European COMAC Group. *Circulation* 97:437–443, 1998.

42. Wahlgren CM, Magnusson PK. Genetic influences on peripheral arterial disease in a twin population. *ArteriosclerThromb Vasc Biol* 2011; 31: 678-82.
43. Khaleghi M, Isseh IN, Bailey KR, Kullo IJ. Family history as a risk factor for peripheral arterial disease. *Am J Cardiol* 2014; 114: 928-32.
44. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329–39.
45. Lijmer JG, Hunink MG, van den Dungen JJ, Loonstra J, Smit AJ. ROC analysis of noninvasive tests for peripheral arterial disease. *Ultrasound Med Biol* 1996;22: 391–398.
46. Rooke TW, et al: American College of Cardiology Foundation/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society of Interventional Radiology; Society for Vascular Medicine; Society for Vascular Surgery: 2011 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with peripheral artery disease (updating the 2005 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Society for Vascular Medicine, and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg* 54:e32–e58, 2011.
47. Ouriel K, Zarins CK. Doppler ankle pressure: an evaluation of three methods of expression. *Arch Surg* 1982; 117: 1297–300.
48. Ouriel K, Veith FJ, Sasahara AA. A comparison of recombinant turokinase with vascular surgery as initial treatment for acute arterial occlusion of the legs. *N Engl J Med* 1998; 338:1105–11.
49. Criqui MH, McClelland RL, McDermott MM, Allison MA, Blumenthal RS, Aboyans V, Ix JH, Burke GL, Liu K, Shea S. The ankle–brachial index and incident cardiovascular events in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol* 2010;56:1506–1512.

- 50.** Ubbink DT, Tulevski II, den Hartog D, Koelemay MJ, Legemate DA, Jacobs MJ. The value of non-invasive techniques for the assessment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13: 296–300.
- 51.** Wyss CR, Robertson C, Love SJ, Harrington RM, Matsen FA III. Relationship between transcutaneous oxygen tension, ankle blood pressure, and clinical outcome of vascular surgery in diabetic and nondiabetic patients. *Surgery* 1987; 101: 56–62.
- 52.** Hirsch AT, Criqui MH, Treat-Jacobson D, *et al.* Peripheral arterial disease detection awareness, and treatment in primary care. *JAMA* 2001;286:1317-1324.
- 53.** Rimmer JM, Gennari FJ. Atherosclerosis renovascular disease and progressive renal failure. *Ann Intern Med* 1993;118:712-719.
- 54.** McDermott MM, Kerwin DR, Liu K, *et al.* Prevalence and significance of unrecognized lower extremity peripheral arterial disease in general medicine practice. *J Gen Intern Med* 2001;16:384- 390.
- 55.** McDermott MM, Liu K, Greenland P, *et al.* Functional decline in peripheral arterial disease: associations with the ankle brachial index and leg symptoms. *JAMA* 2004;292:453-461.
- 56.** Sluka KA: Pain mechanisms involved in musculoskeletal disorders. *J Orthop Sports Phys Ther* 24:240–254, 1996.
- 57.** Willenberg T, *et al.*: Impact of long-term corticosteroid therapy on the distribution pattern of lower limb atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 39:441, 2010.
- 58.** Aboyans V, *et al.*: The general prognosis of patients with peripheral arterial disease differs according to the disease localization. *J Am Coll Cardiol* 55:898–903, 2010.
- 59.** Dormandy JA, *et al.*: The TransAtlantic Inter-Society Consensus on the management of peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 31:S1–S296, 2000.
- 60.** Coats P, *et al.*: Marriage of resistance and conduit arteries breeds critical limb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1044–H1050, 2005.

- 61.** Tang GL, et al: The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 41:312–320, 2005.
- 62.** Weinberg DH, et al: Chronic ischemic monomelic neuropathy from critical limb ischemia. *Neurology* 57:1008–1012, 2001.
- 63.** Prompers L, et al: High prevalence of ischaemia, infection and serious comorbidity in patients with diabetic foot disease in Europe. Baseline results from the Eurodiale study. *Diabetologia* 50:18–25, 2007.
- 64.** Jeffcoate WJ, et al: Assessing the outcome of the management of diabetic foot ulcers using ulcer-related and person related measures. *Diabetes Care* 29:1784–1787, 2006.
- 65.** Kannel WB: Risk factors for atherosclerotic cardiovascular outcomes in different arterial territories. *J Cardiovasc Risk* 1:333–339, 1994.
- 66.** Jonason T, Bergström R. Cessation of smoking in patients with intermittent claudication. Effects on the risk of peripheral vascular complications, myocardial infarction and mortality. *Acta Med Scand* 1987;221:253–60.
- 67.** Kabir Z, et al: Coronary heart disease deaths and decreased smoking prevalence in Massachusetts, 1993–2003. *Am J Public Health* 98:1468–1469, 2008.
- 68.** Willigendael EM, et al: Smoking and the patency of lower extremity bypass grafts: a meta-analysis. *J Vasc Surg* 42:67–74, 2005.
- 69.** Kenfield SA, et al: Smoking and smoking cessation in relation to mortality in women. *JAMA* 299:2037–2047, 2008.
- 70.** UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837–53.
- 71.** UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS

34). *Lancet* 1998;352:854-65.

72. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart protection study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: A randomized placebo controlled trial. *Lancet* 2002;360:7-22.

73. Kumbhani DJ, Steg PG, Cannon CP, et al. Statin therapy and long-term adverse limb outcomes in patients with peripheral artery disease: insights from the REACH registry. *Eur Heart J* 2014; 35: 2864-72.

74. Radack K, et al: Beta-adrenergic blocker therapy does not worsen intermittent claudication in subjects with peripheral arterial disease. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 151: 1705–1707, 1991.

75. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 2000; 342: 145-53.

76. Gardner AW, et al: Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain. A meta-analysis. *JAMA* 274:975–980, 1995.

77. Aquino R, et al: Natural history of claudication: long term follow-up study of 1244 claudicants. *J Vasc Surg* 34:962–970, 2001.

78. Bendermacher BL, Willigendael EM, Teijink JA, Prins MH. Supervised exercise therapy versus non-supervised exercise therapy for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;2:CD005263.

79. Norgren L, et al; TASC II Working Group: Inter-Society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J Vasc Surg* 45(Suppl S):S5–S67, 2007.

80. Belch J, MacCuish A, Campbell I, et al. The prevention of progression of arterial disease and diabetes (PROPADAD) trial: factorial randomised placebo controlled trial of aspirin and antioxidants in patients with diabetes and asymptomatic peripheral arterial disease. *BMJ* 2008;337:a1840.

- 81.** Goldhaber SZ, Manson JE, Stampfer MJ, *et al.* Low-dose aspirin and subsequent peripheral arterial surgery in the Physicians Health Study. *Lancet* 1992;340:143-145.
- 82.** Bhatt DL, *et al.* Patients with prior myocardial infarction, stroke, or symptomatic peripheral arterial disease in the CARISMA trial. *J Am Coll Cardiol* 49:1982–1988, 2007.
- 83.** Samlaska CP, *et al.* Pentoxifylline. *J Am Acad Dermatol* 30:604–621, 1994.
- 84.** Porter JM, Cutler BS, Lee BY, *et al.* Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J* 1982;104:66-72.
- 85.** Lee TM, *et al.* Differential effects of cilostazol and pentoxifylline on vascular endothelial growth factor in patients with intermittent claudication. *Clin Sci (Lond)* 101:305–311, 2001.
- 86.** Dawson DL, *et al.* A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med* 109:523–530, 2000.
- 87.** Leher P, Comte S, Gamand S, Brown TM. Naftidrofuryl in intermittent claudication: a retrospective analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;23Suppl 3:S48–S52.
- 88.** De Backer T, Vander Stichele R, Leher P, Van Bortel L. Naftidrofuryl for intermittent claudication: meta-analysis based on individual patient data. *BMJ* 2009; 338:b603.
- 89.** Dotter CT, Judkins MP. Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction: description of a new technique and a preliminary report of its application. *Circulation* 1964; 30: 654–70.
- 90.** Bosch JL, Hunink MG. Meta-analysis of the results of percutaneous transluminal angioplasty and stent placement for aortoiliac occlusive disease. *Radiology* 1997; 204: 87–96.
- 91.** Upchurch GR, *et al.* Diffusion of new technology in health care: the case of aorto-iliac occlusive disease. *Surgery* 136:812, 2004.
- 92.** Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, *et al.* Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33: Suppl 1: S1-S75.

- 93.** Menard MT, et al: Infrapopliteal intervention for the treatment of the claudicant. *Semin Vasc Surg* 20:42–53, 2007.
- 94.** Whyman MR, Fowkes FG, Kerracher EM, et al. Randomised controlled trial of percutaneous transluminal angioplasty for intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;12:167-72.
- 95.** Matsi PJ, Manninen HI. Complications of lower-limb percutaneous transluminal angioplasty: a prospective analysis of 410 procedures on 295 consecutive patients. *Cardiovasc Int Radiol* 1998;21:361-6.
- 96.** Aboyans V, Ricco JB, Bartelink ME, Björck M, Brodmann M, Cohnert T, et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J* 2017.
- 97.** Norgren L, et al: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 45(Suppl S):S5– S67, 2007.
- 98.** Dormandy JA, et al: Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. Trans Atlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg* 31:S1–S296, 2000.
- 99.** *Dartmouth atlas of vascular health care*, Chicago, 2000, AHA Press.
- 100.** Fontaine R, et al: Surgical treatment of peripheral circulation disorders. *Helv Chir Acta* 21:499–533, 1954.
- 101.** Rutherford RB, et al: Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. *J Vasc Surg* 26:517–538, 1997.
- 102.** Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *J Vasc Surg* 1986; 3: 104–14.
- 103.** Taylor LM Jr, Edwards JM, Porter JM. Present status of reversed vein bypass grafting: five-year results of modern series. *J Vasc Surgery* 1990; 11: 193–206.

- 104.** Belkin M, Knox J, Donaldson MC, Mannick JA, Whittemore A. Infrainguinal arterial reconstruction with nonreversed greater saphenous vein. *J Vasc Surg* 1996; 24: 957–62.
- 105.** Nicoloff AD, Taylor LM Jr, McLafferty RB, et al. Patient recovery after infrainguinal bypass grafting for limb salvage. *J Vasc Surg* 1998;27:256-63.
- 106.** AbuRahma AF, Robinson PA, Holt SM. Prospective controlled study of polytetrafluoroethylene versus saphenous vein in claudicant patients with bilateral above knee femoropopliteal bypasses. *Surgery* 1999;126: 594-601.
- 107.** Allen BT, Reilly JM, Rubin BG, et al. Femoropopliteal bypass for claudication: vein vs. PTFE. *Ann Vasc Surg* 1996;10: 178-85.
- 108.** Schweiger H, Klein P, Lang W. Tibial bypass grafting for limb salvage with ringed polytetrafluoroethylene prostheses: results of primary and secondary procedures. *J Vasc Surg* 1993;18:867-74.
- 109.** McCarthy WJ, Pearce WH, Flinn WR, et al. Long-term evaluation of composite sequential bypass for limb-threatening ischemia. *J Vasc Surg* 1992;15:761-9.
- 110.** Jackson MR, Clagett GP. Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease. *Chest* 2001; 119 (suppl 1): 283–99.
- 111.** Sarac TP, Huber TS, Back MR, et al. Warfarin improves the outcome of infrainguinal vein bypass grafting at high risk for failure. *J Vasc Surg* 1998; 28: 446–57.
- 112.** Dutch Bypass Oral Anticoagulants or Aspirin (BOA) Study Group. Efficacy of oral anticoagulation compared with aspirin after infrainguinal bypass surgery (The Dutch Bypass Oral Anticoagulants or Aspirin Study): a randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 346–51.
- 113.** Haimovici H: Vascular Surgery, Principles and Technics. Montefiore Hospital and Medical Center Brox. New York, 1996; 605-31.
- 114.** Falco E, Celoria G, Nardini A: Femoro-popliteal bypass with reversed saphenous vein. *Minerva-Chir* 1999;50(8):883-8.

- 115.** Macamley E.M, Samy AK, Cooper GG: Infrageniculate vein bypass graft for critical limb ischaemia. *JR Coll Surg Edinb* 1996;41(1):391-4.
- 116.** Dos Santos JC: Sur la desobstruction des thromboses arterielle anciennes. *Memorandes Academie Chirurgie* 73:409–411, 1944.
- 117.** Kunlin JL: Le traitement de l'arterite obliterante par le greffe veineuse. *Arch Mal Coeur Vaiss* 42:371–374, 1949.
- 118.** Couch NP, et al: Factors influencing limb survival after femoropopliteal reconstruction. *Arch Surg* 95(2):163–169, 1967.
- 119.** Dale WA: Grafting small arteries. Experience with 19 shunts below the knee. *Arch Surg* 86:22–33, 1963.
- 120.** Campbell DR, et al: The use of arm veins in femoral-popliteal bypass grafts. *Ann Surg* 190(6):740–742, 1979.
- 121.** Chew DK, et al: Bypass in the absence of ipsilateral greater saphenous vein: safety and superiority of the contralateral greater saphenous vein. *J Vasc Surg* 35:1085–1092, 2002.
- 122.** Chang BB, et al: The lesser saphenous vein: an underappreciated source of autogenous vein. *J Vasc Surg* 15:152–156; discussion 156–157, 1992.
- 123.** Schulman ML, et al: Superficial femoral-popliteal veins and reversed saphenous veins as primary femoropopliteal bypass grafts: a randomized comparative study. *J Vasc Surg* 6:1–10, 1987.
- 124.** Faries PL, et al: The use of arm vein in lower-extremity revascularization: results of 520 procedures performed in eight years. *J Vasc Surg* 31:50–59, 2000.
- 125.** Leshnower BG, et al: Adjunctive uses of the radial artery for emergency infrapopliteal bypass in patients presenting with acute limb-threatening ischemia. *Vasc Endovasc Surg* 41:348–351, 2007.
- 126.** Faries PL, et al: Arm vein conduit is superior to composite prosthetic autogenous grafts in lower extremity revascularization. *J Vasc Surg* 31:1119–1127, 2000.

- 127.** Samuel E. Wilson, Frank J. Robert W. Hoson II, et al: Vascular surgery principles and practice New York 1999.
- 128.** Edwards WS. Progress in synthetic grafts development: An improved crimped graft of teflon surg. *Surgery* 1959;45(2):298-309.
- 129.** Carrel A: Ultimate results of aortic transplantations. *J Exp Med* 15: 389–392, 1912.
- 130.** Jeger E: Zur Technik der Blutgefassnaht. *Beitr Klin Chir* 97:553, 1915.
- 131.** Gross RE, et al: Preliminary observations of the use of human arterial grafts in the treatment of certain cardiovascular defects. *N Engl J Med* 239:578, 1948.
- 132.** Linton RB: Some practical considerations in the surgery of blood vessel grafts. *Surgery* 38:817, 1955.
- 133.** Faggioli GL, et al: The role of cryopreserved vein allografts in infrainguinal reconstructions. *Adv Vasc Surg* 3:173, 1995.
- 134.** Rosenberg N, et al: Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. *Ann Surg* 164:247–256, 1966.
- 135.** Dardik H, et al: Successful arterial substitution with modified human umbilical vein. *Ann Surg* 183:252–258, 1976.
- 136.** Barner HB, et al: Fresh and frozen homologous venous grafts for arterial repair. *Angiology* 17:389–401, 1966.
- 137.** Perloff LJ, et al: The venous homograft: an immunological question. *Surgery* 72:961–970, 1972.
- 138.** Ochsner JL, et al: Experience with fresh venous allografts as arterial substitute. *Ann Surg* 173:933–939, 1971.
- 139.** Mirelli M, et al: Fresh and cryopreserved arterial homografts: immunological and clinical results. *Transplant Proc* 37:2688–2691, 2005.

- 140.** Katzman HE, et al: Multicenter evaluation of the bovine mesenteric vein bioprosthesis for hemodialysis access in patients with an earlier failed prosthetic graft. *J Am Coll Surg* 201:223–230, 2005.
- 141.** Field PL: The chemically treated bovine ureter—clinical performance of a novel biological vascular prosthesis. *Cardiovasc Surg* 11:30–34, 2003.
- 142.** Chemla ES, et al: Randomized clinical trial comparing decellularized bovine ureter with expanded polytetrafluoroethylene for vascular access. *Br J Surg* 96:34–39, 2009.
- 143.** Voorhees A, et al: The use of tubes constructed from Vinyon “N” cloth in bridging arterial defects. *Ann Surg* 135:332, 1952.
- 144.** Edwards WS, et al: Chemically treated nylon tubes as arterial grafts. *Surgery* 38:61, 1955.
- 145.** Harrison JH: Synthetic materials as vascular prostheses. II: a comparative study of nylon, Dacron, Orlon, Ivalon sponge and Teflon in large blood vessels with tensile strength studies. *Am J Surg* 95:16, 1958.
- 146.** Noon G, et al: DeBakey Dacron prosthesis and filamentous velour graft. In Sawyer PN, Kaplitt MJ, editors: *Vascular grafts*, New York, NY, 1978, Appleton-Century-Crofts, p 177.
- 147.** Snyder R, et al: Woven, knitted, and externally supported Dacron vascular prostheses. In Stanley JC, editor: *Biologic and synthetic vascular prostheses*, New York, 1982, Grune & Stratton.
- 148.** Salzmann DL, et al: Inflammation and neovascularization associated with clinically used vascular prosthetic materials. *Cardiovasc Pathol* 8:63, 1999.
- 149.** Eiberg JP, et al: Fluoropolymer-coated Dacron versus PTFE grafts for femorofemoral crossover bypass: randomised trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 32:431, 2006.
- 150.** Nunn DB, et al: Postoperative alterations in size of Dacron aortic grafts: an ultrasonic evaluation. *Ann Surg* 189:741, 1979.
- 151.** Nunn DB: Structural failure of Dacron arterial grafts. *Semin Vasc Surg* 12:83, 1999.

- 152.** Wilson SE, et al: Late disruption of Dacron aortic grafts. *Ann Vasc Surg* 11:383, 1997.
- 153.** Van Damme H, et al: Intrinsic structural failure of polyester (Dacron) vascular grafts: a general review. *Acta Chir Belg* 105:249, 2005.
- 154.** Uchida N, et al: Compliance effects on small-diameter polyurethane graft patency. *J Biomed Mater Res* 27:1269, 1993.
- 155.** Santerre JP, et al: Biodegradation evaluation of polyether and polyester urethanes with oxidative and hydrolytic enzymes. *J Biomed Mater Res* 28:1187, 1994.
- 156.** Zhang Z, et al: Vascugraft polyurethane arterial prosthesis as femoropopliteal and femoro-peroneal bypasses in humans: pathological, structural and chemical analyses of four excised grafts. *Biomaterials* 18:113, 1997.
- 157.** Brinton LA, et al: Breast implants and cancer. *J Natl Cancer Inst* 89:1341, 1997.
- 158.** Glickman MH, et al: Multicenter evaluation of a polyurethane urea vascular access graft as compared with the expanded polytetrafluoroethylene vascular access graft in hemodialysis applications. *J Vasc Surg* 34:465, 2001.
- 159.** Kapadia MR, Popowich DA, Kibbe MR. Modified prosthetic vascular conduits. *Circulation*. 2008;117:1873–1882.
- 160.** Matsumoto H, Hasegawa T, Fuse K, et al. A new vascular prosthesis for a small caliber artery. *Surgery*. 1973;74:519–523.
- 161.** Soyer T, et al: A new venous prosthesis. *Surgery* 72:864, 1972.
- 162.** Campbell CD, et al: The use of expanded microporous polytetrafluoroethylene for limb salvage: a preliminary report. *Surgery* 79:485, 1976.
- 163.** Greisler HP: *New biologic and synthetic vascular prostheses*, Austin, Tex, 1991, RG Landes.
- 164.** Lenz BJ, et al: A three-year follow-up on standard versus thin wall ePTFE grafts for hemodialysis. *J Vasc Surg* 28:464, 1998.

- 165.** Neville RF, Elkins CJ, Alley MT, et al. Hemodynamic comparison of differing anastomotic geometries using magnetic resonance velocimetry. *J Surg Res.* 2011;169:311–318.
- 166.** Allen BT, et al: Platelet deposition on vascular grafts. The accuracy of in vivo quantitation and the significance of in vivo platelet reactivity. *Ann Surg* 203:318, 1986.
- 167.** Shepard AD, et al: Complement activation by synthetic vascular prostheses. *J Vasc Surg* 1:829, 1984.
- 168.** Abbott WM, et al: Prosthetic above-knee femoropopliteal bypass grafting: results of a multicenter randomized prospective trial. Above-Knee Femoropopliteal Study Group. *J Vasc Surg* 25:19, 1997.
- 169.** Gott VL: Heparin bonding on colloidal graphite surfaces. *Science* 142:1297, 1963.
- 170.** Hsu LC: Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits: current status. *Perfusion* 16:417, 2001.
- 171.** Devine C, et al: North West Femoro-Popliteal Trial Participants: Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass: five-year results of a prospective randomized multicenter clinical trial. *J Vasc Surg* 40:924, 2004.
- 172.** Scharn DM, et al: Human umbilical vein versus heparin-bonded polyester for femoro popliteal bypass: 5-year results of a prospective randomized multicentre trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 35:61, 2008.
- 173.** Heyligers JM, Verhagen HJ, Rotmans JI, et al. Heparin immobilization reduces thrombogenicity of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg.* 2006;43:587–591.
- 174.** Lin PH, Chen C, Bush RL, et al. Small-caliber heparin-coated ePTFE grafts reduce platelet deposition and neointimal hyperplasia in a baboon model. *J Vasc Surg.* 2004;39:1322– 1328.

- 175.** Walluscheck KP. Heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene vascular graft for occlusive vascular disease of the lower extremity. *Ital J Vasc & Endovasc Surg*. 2006;13:137-147.
- 176.** Peeters P, Verbist J, Deloose K, et al. Will heparin-bonded PTFE replace autologous venous conduits in infrapoplitealbypass? *Ital J Vasc & Endovasc Surg*. 2008;15:143–148.
- 177.** Lindholt JS, et al: The Scandinavian Propaten® trial—1-year patency of PTFE vascular prostheses with heparin-bonded luminal surfaces compared to ordinary pure PTFE vascular prostheses: a randomised clinical controlled multi-centre trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 41:668, 2011.
- 178.** Devine C, et al: Heparin-bonded Dacron or polytetrafluoroethylene for femoropopliteal bypass grafting: a multicenter trial. *J Vasc Surg* 33:533, 2001.
- 179.** Pedersen G, et al: Improved patency and reduced intimal hyperplasia in PTFE grafts with luminal immobilized heparin compared with Standard PTFE grafts at six months in a sheep model. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 51:443, 2010.
- 180.** Wheatcroft MD, Greco E, Tse L, et al. Heparin-induced thrombocytopenia in the presence of a heparin-bonded bypass graft. *Vascular*. 2011;19:338–341.
- 181.** Whiffen JD, Beeckler DC. The fate of the surface heparin of GBH-coated plastics after exposure to the blood stream. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1966;52:121–125.
- 182.** Heyligers JM, Lisman T, Verhagen HJ, et al. A heparinbonded vascular graft generates no systemic effect on markers of hemostasis activation or detectable heparininduced thrombocytopenia-associated antibodies in humans. *J Vasc Surg*. 2008;47:324–329 [discussion 9].
- 183.** Olcott EL: Pyrolytic biocarbon materials. *J Biomed Mater Res* 8:209, 1974.
- 184.** Debski R, et al: Polytetrafluoroethylene grafts coated with ULTI carbon. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 28:456, 1982.

- 185.** Tsuchida H, et al: Modified polytetrafluoroethylene—In-111 labeled platelet deposition on carbon-lined and high-porosity polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg* 16:643, 1992.
- 186.** Arabi H, et al: In vitro and in vivo hemocompatibility evaluation of graphite coated polyester vascular grafts. *Int J Artif Organs* 27:691, 2004.
- 187.** Kapfer X, et al: Comparison of carbon-impregnated and Standard ePTFE prostheses in extra-anatomical anterior tibial artery bypass: a prospective randomized multicenter study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 32:155, 2006.
- 188.** Watson HR, Schroeder TV, Simms MH, et al. Relationship of femorodistal bypass patency to clinical outcome. Iloprost Bypass International Study Group. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;17(1):77–83.
- 189.** Lancaster RT, Conrad MF, Patel VI, Cambria RP, LaMuraglia GM. Predictors of early graft failure after infrainguinal bypass surgery: a risk-adjusted analysis from the NSQIP. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012;43(5):549–555.
- 190.** Goodney PP, Likosky DL, Cronenwett JL. *Risk factors for graft failure and amputation after lower extremity bypass in patients with critical limb ischemia*. [Vascular Study Group of Northern New England. May 7] 2008 [Portland, ME2008].
- 191.** Stept LL, Flinn WR, McCarthy WJ 3rd, Bartlett ST, Bergan JJ, Yao JS. Technical defects as a cause of early graft failure after femorodistal bypass. *Arch Surg*. 1987;122(5):599–604.
- 192.** Singh N, Sidawy AN, DeZee KJ, Neville RF, Akbari C, Henderson W. Factors associated with early failure of infrainguinal lower extremity arterial bypass. *J Vasc Surg*. 2008;47(3):556–561.
- 193.** Gisswold ME, Landry GJ, Sexton GJ, et al. Modifiable patient factors are associated with reverse vein graft occlusion in the era of duplex scan surveillance. *J Vasc Surg*. 2003;37(1):47–53.

- 194.** Oresanya L, Makam AN, Belkin M, Moneta GL, Conte MS. Factors associated with primary vein graft occlusion in a multicenter trial with mandated ultrasound surveillance. *J Vasc Surg.* 2014;59(4):996–1002.
- 195.** Nolan BW, De Martino RR, Stone DH, et al. Prior failed ipsilateral percutaneous endovascular intervention in patients with critical limb ischemia predicts poor outcome after lower extremity bypass. *J Vasc Surg.* 2011;54(3):730–735 [discussion 5-6].
- 196.** Darling RC 3rd, Chang BB, Shah DM, Leather RP. Choice of peroneal or dorsalis pedis artery bypass for limb salvage. *Semin Vasc Surg.* 1997;10(1):17–22.
- 197.** Walsh DB, Zwolak RM, McDaniel MD, Schneider JR, Cronenwett JL. Intragraft drug infusion as an adjunct to balloon catheter thrombectomy for salvage of thrombosed infragenicular vein grafts: a preliminary report. *J Vasc Surg.* 1990;11(6):753–759 [discussion 60].
- 198.** Van den Berg JC. Thrombolysis for acute arterial occlusion. *J Vasc Surg.* 2010;52(2):512–515.
- 199.** Rickard MJ, Fisher CM, Soong CV, Hardman DT, Lane RJ, Appleberg M. Limitations of intra-arterial thrombolysis. *Cardiovasc Surg.* 1997;5(6):634–640.
- 200.** Robinson KD, Sato DT, Gregory RT, et al. Long-term outcome after early infrainguinal graft failure. *J Vasc Surg.* 1997;26(3):425–437 [discussion 37-8].
- 201.** Olofason P, Rabahie GN, Matsumoto K, et al. Histopathological characterization of explanted human prosthetic arterial grafts: implications for the prevention and management of graft infection. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1995;9:143–151.
- 203.** Guidoin R, Chakfe N, Maurel S, et al. ePTFE arterial prostheses in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. *Biomaterials.* 1993;14:678–693.
- 202.** Swedberg SH, Brown BC, Sigley R, Wight TN, Gordon D, Nicholls SC. Intimal fibromuscular hyperplasia at the venous anastomosis of PTFE grafts in hemodialysis patients

clinical immunocytochemical light and electron microscopic assessment. *Circulation*. 1989;80:1726–1736.

204. Cho JS, Ouriel K, DeWeese JA, Green RM, Chen GY, Stoughton J. Thrombus formation on PTFE surfaces: the importance of vWF. *Cardiovasc Surg*. 1995;3:645–691.

205. Urayama H, Kasashima F, Kawakami T, Kawakami K, Watanabe Y. An immunohistochemical analysis of implanted woven dacron and ePTFE grafts in humans. *ArtifOrgans*. 1996;20:24–29.

206. Golden MA, Hanson SR, Kirkman TR, Schneider PA, Clowes AW. Healing of polytetrafluoroethylene arterial grafts is influenced by graft porosity. *J Vasc Surg*. 1990;11:838–844.

207. Golden MA, Au YPT, Kenagy RD, Clowes AW. Growth factor gene expression by intimal cells in healing polytetrafluoroethylene grafts. *J Vasc Surg*. 1990;11:580–585.

208. Shi Q, Wu MH, Hayashida N, et al. Proof of fallout endothelialization of impervious Dacron grafts in the aorta and inferior vena cava of the dog. *J Vasc Surg*. 1994;20:546–556.

209. Bandyk DF. Vascular graft infections: epidemiology, microbiology, pathogenesis, and prevention. Bernhard VM, Towne JB. *Complications in Vascular Surgery*. Quality Medical: St Louis; 1991:223.

210. Back MR, et al. Arterial prosthetic grafts stimulate local production of tumor necrosis factor and matrix metalloproteases. *ACS Surg Forum*. 1997;158:395.

211. Zimmerl W, et al. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. *J Infect Dis*. 1982;146:487.

212. Wenzel RP. Health care-associated infections: Major issues in the early years of the 21st century. *Clin. Infect. Dis* 2007;45(Suppl 1):85-8.

213. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2004;2(2):95-108.

214. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21: 319-46.
215. Singh S, Singh SK, Chowdhury I, and Singh R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *Open Microbiol J* 2017;11:53-62.
216. Anju VT, Paramanantham P, Siddhardha B, Sruthil Lal SB, Sharan A, Alyousef AA, Arshad M, Syed A. Malachite green-conjugated multi-walled carbon nanotubes potentiate antimicrobial photodynamic inactivation of planktonic cells and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine*. 2019 May 27;14:3861-3874.
217. Dong X, Yang L. Inhibitory effects of single-walled carbon nanotubes on biofilm formation from *Bacillus anthracis* spores. *Biofouling*. 2014;30(10):1165-74.
218. Rodrigues DF, Elimelech M. Toxic effects of single-walled carbon nanotubes in the development of *E. coli* biofilm. *Environ Sci Technol*. 2010 Jun 15;44(12):4583-9.
219. Paulsson M, Ljungh A, Wadström T. Rapid identification of fibronectin, vitronectin, laminin, and collagen cell surface binding proteins on coagulase-negative staphylococci by particle agglutination assays. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2006–2012.
220. Liang OD, Ascencio F, Fransson L-A, Wadström T. Binding of heparan sulfate to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1992; 60: 899–906.
221. Pascu C, Ljungh A, Wadström T. Staphylococci bind heparin-binding host growth factors. *Curr Microbiol* 1998; 32: 201–207.
222. Fallgren C, Utt M, Ljungh A. Isolation and characterisation of a 17-kDa staphylococcal heparin-binding protein with broad specificity. *J Med Microbiol*. 2001 Jun;50(6):547-57.
223. Shanks RM, Donegan NP, Graber ML *et al*. Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Infect Immun* 2005; 73: 4596–4606

224. McDevitt, D., T. Nanavaty, K. House-Pompeo, E. Bell, N. Turner, L. McIntire, T. Foster, and M. Hook. 1997. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur. J. Biochem.* 247:416–424.
225. Ni Eidhin, D., S. Perkins, P. Francois, P. Vaudaux, M. Hook, and T. J. Foster. 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 30:245–257.
226. Flock, J. I., G. Froman, K. Jonsson, B. Guss, C. Signas, B. Nilsson, G. Raucchi, M. Hook, T. Wadstrom, and M. Lindberg. 1987. Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* 6:2351–2357.
227. Jonsson, K., C. Signas, H. P. Muller, and M. Lindberg. 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur. J. Biochem.* 202:1041–1048.
228. Li G, Ping Y, Wei Q, Maitz MF, Zhou S, Nan H (2011) The effect of coimmobilizing heparin and fibronectin on titanium on hemocompatibility and endothelialization. *Biomaterials* 32(21):4691–703
229. Callow, A.D., 1982. Current status of vascular grafts. *Surg. Clin. North Am.*, 62(3):501-513.
230. Rogers C, Parikh S, Seifert P, Edelman ER (1996) Endogenous cell seeding. Remnant endothelium after stenting enhances vascular repair. *Circulation* 94(11):2909–14
231. Kushwaha M, Anderson JM, Bosworth CA, Andukuri A, Minor WP, Lancaster JR et al (2009) A nitric oxide releasing, self assembled peptide amphiphile matrix that mimics native endothelium for coating implantable cardiovascular devices. *Biomaterials* 31(7):1502–8
232. Yu, H., Dai, W., Yang, Z., Kirkman, P., Weaver, F.A., Eton, D., Rowe, V.L., 2003. Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo. *J. Vasc. Surg.*, 38(3):557-563. [doi:10.1016/S0741- 5214(03)00334-3]
233. Wesolowski Sa, Fnes Cc, Karlson Ke, Debaeky M, Sawyer Pn. Porosity: primary determinant of synthetic vascular grafts. *Surgery* 1961; 50: 91-96.

234. Florey Hw T Greer Sj/ Poole Jcf S Werthessen Nt. The pseu- dointima lining fabric grafts of the aorta. *Br J Exp Pathol* 1961; 42: 236-246.
235. Lian X, Howard PG. Biomaterial in the development and future of vascular grafts. *J Vasc Surg* 2003;37:472–480.
236. Matsuda T. Recent progress of vascular graft engineering in Ja-pan. *Artif Organs* 2004;28:64–71.
237. Zilla P, Preiss P, Von Oppell U, Odell], Reichart B. In vitro endothelialization of vascular prostheses: rapid mass-culture technique for autologous endothelial cells and implantation of confluent lined 4mm PTFE grafts in non-human primates. In: Zilla P, Fasol R, Callow A, eds. *Applied Cardiovascular Biology* 1989. Basel: Karger, 1990:56-72.
238. Zilla P, Deutsch M, Meinhart J, Puschmann R, Eberl T, Minar E, Dudczak R, Lugmaier H, Schmidt P, Noszian I. Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years. *J Vasc Surg*. 1994 Mar;19(3):540-8.
239. Khorana AA, Sahni A, Altland OD, et al: Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2110- 2115, 2003
240. Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, van Hinsbergh VW. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res*. 2000;60: 6196–6200.
241. Kolar M, Mozetič M, Stana-Kleinschek K, Fröhlich M, Turk B, Vesel A. Covalent Binding of Heparin to Functionalized PET Materials for Improved Haemocompatibility. *Materials (Basel)*. 2015 Mar 31;8(4):1526-1544.
242. Rosenbaum J, Tobelem G, Molho P, Barzu R, Caen JP. Modulation of endothelial cells growth induced by heparin. *Cell Bid Inf Rep* 1986; 10:437-45.
243. Mandal AK, Lyden TW, Fazel A, Saklayen MG, Mehrotra B, Mehling B, et al. Heparin-induced endothelial-cell cytoskeletal reorganization - a potential mechanism for vascular relaxation. *Kidney Int* 1995;48: 1508–1516.
244. Slomp J, van Munsteren JC, Poelmann RE, de Reeder EG, Bogers AJ, Gittenberger-de Groot AC. Formation of intimal cushions in the ductus arteriosus as a model for

vascular intimal thickening: an immunohistochemical study of changes in extracellular matrix components. *Atherosclerosis* 1992;93:25–39.

245. Zubilewicz T, Wronski J, Bourriez A. Injury in vascular surgery—the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit* 2001;7:316–24

246. Steven OM, Jain HT, Marks AR. Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circulation: Cardiovasc Interv* 2011; 4: 104–111.

247. Roy RK, Lee KL (2007) Biomedical applications of diamond-like carbon coatings: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 83B:72–84

248. Brammer KS, Choi C, Frandsen CJ, Oh S, Johnston G, Jin S (2011) Comparative cell behavior on carbon-coated TiO₂ nanotube surfaces for osteoblasts vs. osteo-progenitor cells. *Acta Biomaterialia* 7(6):2697–703

249. Sun T, Tan H, Han D, Fu Q, Jiang L (2005) No platelet can adhere—largely improved blood compatibility on nanostructured superhydrophobic surfaces. *Small* 1(10):959–63

250. Chen H, Tang N, Chen M, Chen D. Endothelialization of TiO₂ Nanorods Coated with Ultrathin Amorphous Carbon Films. *Nanoscale Res Lett*. 2016 Dec;11(1):145.

251. Castellino M, Stolojan V, Virga A, Rovere M, Cabiale K, Galloni MR, Tagliaferro A. Chemico-physical characterisation and in vivo biocompatibility assessment of DLC-coated coronary stents. *Anal Bioanal Chem*. 2013 Jan;405(1):321-9.