

ENDOTEL HASARI SONRASI OLUşAN İNTİMAL HİPERPLAZİ ÜZERİNE NEBİVOLOLÜN ETKİSİ: DENEYSEL ÇALIşMA

THE EFFECTS OF NEBİVOLOL ON INTİMAL HYPERPLASIA FOLLOWING ENDOTHELIAL INJURY: AN EXPERIMENTAL STUDY)

İlker AKAR*, Ali RAHMAN*, Oktay BURMA*, Bilal ÜSTÜNDAĞ **, Ayhan UYSAL*, İbrahim Hanifi ÖZERCAN***, Mehmet BALIK****, Erdoğan LKAY*****

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi *Kalp ve Damar Cerrahi AD, **Biyokimya AD, ***Patoloji AD, ****Kardiyoloji AD, Elazığ

Özet

Amaç: İntimal hiperplazi vasküler remodeling süreci olup vasküler duvarda düz kas hücre migrasyonu ve proliferasyonu ile ekstrasellüler matris birikimi sonucu oluşan klinik bir problemdir. Bu çalışmada; nebivololün hasarlanmış endotel dokusunda intimal hiperplazi gelişimine etkilerini araştırıldı.

Yöntem: Çalışma eşit 3 gruba ayrılan toplam 21 tavşanda gerçekleştirildi: Kontrol, solvent ve nebivolol grupları. Kontrol grubundaki tavşanların abdominal aortalarına sadece balon ile endotel hasarı uygulandı. Solvent ve nebivolol grubundaki tavşanlara ise balon hasarı uygulanmasının dışında işlem öncesi 2 gün ve sonrası 28 gün süresince intraperitoneal olarak solvent ve nebivolol verildi. Tüm gruplarda 28. günde alınan abdominal aort kesitlerinde intimal-medial alanlar ölçülerek her bir kesitteki intima/media oranları elde edildi. Ayrıca biyokimyasal olarak doku NO düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Kontrol ve solvent grupları arasında intimal, medial alanlar ile intima/media oranları ve doku NO düzeyleri yönünden anlamlı fark bulunmadı. İntimal alan artışı nebivolol grubunda kontrol ve solvent gruplarına göre anlamlı derecede azıken ($p<0.001$), intima/media oranı da anlamlı olarak azaldı ($p<0.001$). Doku NO düzeylerinde ise nebivolol grubunda kontrol ve solvent gruplarına göre belirgin artış gözlemlendi ($p<0.01$).

Sonuç: Nebivolol kullanımı vasküler girişimlerden sonra erken restenoz gelişiminin engellenmesinde yararlı bir ajan olabileceği düşünülmektedir. (Damar Cer Der 2006;15(2):23-31).

Anahtar Kelimeler: İntimal hiperplazi, nitrik oksit, nebivolol

Abstract

Purpose: Intimal hyperplasia is a vascular remodelling process. It is a clinical problem which forms in vascular wall as a result of smooth muscle cell migration, proliferation and extracellular matrix accumulation. In this study we examined the effects of nebivolol on intimal hyperplasia at denatured endothelial tissue.

Methods: The study was made on 21 rabbits which were equally divided into 3 groups. Control, solvent and nebivolol. The rabbits in control group only underwent balloon injury on abdominal aorta. The rabbits in solvent group and nebivolol group underwent balloon injury and were treated with solvent and nebivolol intraperitoneally during the study. At the end of the study, abdominal aortas were harvested. Intimal, medial areas were measured and intima/media ratios were calculated. Tissue nitric oxide levels were detected.

Results: Statistically there were no differences between control and solvent groups at intimal, medial areas, intima/media ratios and tissue NO levels. The neointimal thickening was significantly less in nebivolol group than in control and solvent group ($p<0.001$). Intima/media ratio was decreased in nebivolol group ($p<0.001$). Tissue nitric oxide levels were greater in nebivolol group than in control and solvent group ($p<0.01$).

Conclusion: Nebivolol may be a useful agent at early restenosis after vascular reconstructive procedures. (Turkish J Vasc Surg 2006;15(2):23-31).

Keywords: Intimal hyperplasia, nitric oxide, nebivolol.

Dr. Ali RAHMAN

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, Elazığ
e-posta: alirahman33@hotmail.com
Tel: 0 424 2333555 / 2148

GİRİŞ

İntimal hiperplazi, ateroskleroz fizyopatolojisinde yer alır ve vasküler rekonstrüktif girişimlerin sonrasında travmaya yanıt olarak gelişir. Vasküler girişimler sonrasında iki yıl içinde intimal hiperplazi gelişme insidansı otolog safen venlerde %30, sentetik greftlerde %45-50, periferik arter transluminal anjioplasti sonrasında ise %20-50'dir⁽¹⁾. Birçok cerrahi girişim normal vasküler yapıyı bozucu etki gösterir. Örneğin fıtırlımış durumda bir embolektomi kateterinin damar boyunca çekilmesi; endotel yüzeyde soyulmaya, damar duvarında gerilmeye ve media tabakasındaki bazı düz kas hücrelerinin hasarına yol açar⁽²⁾. Bu girişimin uygulandığı hayvan modellerinde soyulmuş yüzeyde ilk önce trombositler birikmekte, daha sonra bunlar sırasıyla rejenere olmuş endotel ve proliferatif intimal düz kas hücreleri ile yer değiştirilerek düz kas hücre proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks birikimine bağlı intima kalınlaşmaktadır^(3,4).

Birçok araştırmacı intimal hiperplazinin gelişiminde "injüriye yanıt" hipotezi üzerinde odaklanmıştır. Bu hipotezde endotelial hasar, trombosit aderansı ve aktivasyonu, "platelet derived growth factor" (PDGF) ve "transforming growth factor" (TGF) gibi mitojenik faktörler, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu rol oynamaktadır^(5,6).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla yararlı esansiyel bir aminoasit olan L-argininden terminal guanidin grubunun NO'ye çevrilmesiyle sentezlenen aktif bir bileşiktir. Bir hücre içi habercisi olup vasküler tonusun fizyolojik düzenlenmesi, sinir iletimi, bağışıklık ve hücreler arası bağların düzenlenmesi gibi birçok biyolojik aktiviteye sahiptir. Nitrik oksit, L-argininden üç izoformu bulunan olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimiyle sentezlenmektedir. Nitrik oksitin sitoprotektif, regülatör ve sitotoksik pekçok etkileri bulunmaktadır⁽⁷⁾. Nitrik oksit çözünabilir guanilat siklaz ve cGMP'yi stimüle ederek vazodilatasyon oluşturmaktadır⁽⁸⁾. Trombosit adezyon ve agregasyonunda inhibisyon, doku plasminojen aktivatörü (tPA) ve fibrinolizis artırıcı etkileriyle antitrombotik etki gösterir. Ayrıca; lökosit adezyonunda inhibisyon, endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkileri vardır⁽⁹⁾. Nitrik

oksitin güçlü bir vazodilatör etkiye sahip olmasının yanı sıra, ateroskleroz oluşumunda koruyucu etkilerinin de olduğu bilinmektedir^(10,11).

Nebivolol, d-nebivolol (SRRR) ile l-nebivolol (RSSS) enantiyomerlerinin eşit oranlı rasemik bir karışımıdır. Bu nedenle bu karışıma dl nebivolol denir⁽¹²⁾. Her ikisi de NO salınımını ve vazodilatasyon gerçekleştirir. Deneysel ve klinik çalışmalarda nebivololün damar tonusunu regüle etmede kilit rol oynayan endotel türevi nitrik oksitin aktivasyonu yoluyla doğrudan vazodilatör etki gösterdiği saptanmıştır^(13,14).

Bu çalışmada; vasküler nitrik oksit salınımının artırılan ve üçüncü kuşak β-bloker olan nebivololün intimal hiperplazi üzerindeki etkinlikleri araştırıldı.

HASTALAR VE YÖNTEM

Çalışma; sağlıklı, erişkin, sağlıklı 2400 ile 2850 gr arasında ağırlık ve ortalama yaşı 10 ay olan 21 adet Yeni Zellanda cinsi erkek beyaz tavşan üzerinde yapıldı. Çalışma protokolünde Helsinki Deklarasyonu göz önünde bulunduruldu ve bu çalışma Fakülte Etik Kurulu tarafından onaylandı. Hayvanlar standart koşullarda (oda sıcaklığı, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) barındırıldı. Standart rat yemi ile beslendi ve her gün içme suları tazelendi. Yaşı faktörü ve hayvanlar arasındaki damar çap farklarının minimal düzeyde tutulması açısından yaklaşık olarak aynı yaşı ve kiloda tavşanların kullanılmasına özen gösterildi. Bununla birlikte balon hasarından sonra oluşan neointimal formasyonun cinsiyete göre farklılıkları göstermesi⁽¹⁵⁾ ve östrojenin neointimal yanıtı azaltması nedeniyle⁽¹⁶⁾ çalışmamızda erkek tavşanlar kullanıldı.

GRUPLAR: Denekler rastgele seçilerek, her grupta 7 denek olacak şekilde 3 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol): Yedi tavşandan oluşturuldu ve sadece vasküler balon kateter hasar işlemi uygulandı.

Grup 2 (Solvent): Yedi tavşandan oluşturuldu ve işlemden 2 gün önce etken maddeyi çözmekte kullanılan solvent, nebivolol grubunda kullanılan solvente eşdeğer hacimde intraperitoneal (i.p) olarak verildi. İşlemden sonra 28 gün devam edildi.

Grup 3 (Nebivolol): İntraperitoneal yolla 2.5mg/kg/gün nebivolol (Vasoxen®, 5 mg tb c.E. Ulagay, Türkiye) verilen 7 tavşandan oluşturuldu. Nebivolol verilmesine

iflemden 2 gün önce baflanıp iflemden sonraki 28. güne kadar devam edildi.

Solüsyonun Hazırlanması: Lipofilik bir ajan olan nebivolol tablet formunda temin edildi. Hacim olarak %80 distile su, %20 polietilen glikol (Merck-Schuchardt) olacak şekilde solvent (çözücü karflım) hazırlandı. Tablet formundaki nebivolol steril flarlarda toz formu haline getirildi. Ardından hazırlanan solüsyona eklenerek santrifüj yardımı ile çözülmesi sağlandı. Mililitresinde 2.5 mg nebivolol olan karflım elde edildi⁽¹⁷⁾.

Anestezi: Tüm deneklerde anestezi, Ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) 50 mg/kg intramuskuler (i.m.) ve Xylazine hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) 5 mg/kg i.m. ile sağlandı. Bu dozun 1/3'ü gerektiğinde i.m. olarak tekrarlandı.

Balon kateter hasarı: Hamon ve arkadaşları⁽¹⁸⁾ ile Ohkawa ve arkadaşları⁽¹⁹⁾ kullandığı model modifiye edilerek kullanıldı. flim floroskopik teknik altında yürütüldü. Anestezi verildikten sonra deneklerin dorsal kulak veni kullanılarak damar yolu açıldı ve bu yolla cerrahi girişimden 5 dk. önce amoksisilin (Ampisina, Mustafa Nevzat, Türkiye) 50 mg/kg intravenöz (i.v.) ve heparin sülfat (Liquemine®, Roche, Türkiye) 300 IU/kg i.v. verildi. Daha sonra steril flarlarda, sağ kasık bölgesine longitudinal bir kesi uygulanarak sağ superficial femoral arter mobilize edildi. Vertikal femoral arteriotomi yapılarak 2.5 mm çapında 20 mm uzunluğunda balon anjioplasti kateteri (Cordis-Europa, Hollanda), femoral arter içinden retrograt olarak abdominal aortaya ilerletildi. Hasar fliddetinin sabit tutulması açısından aynı tip ve ebatla balon kullanıldı. İnfrarenal abdominal aortada anjioplasti kateterinin balonu, içi serum fizyolojik ile doldurulmuş balon inflation device (Sedat SA, Fransa) ile 8 atmosfer basınçta flifirilerek femoral artere doğru çekildi⁽²⁰⁾. Bu iflem kateter 120°'lik açılarla döndürülerek 3 kez tekrarlandı. Bu sayede tüm damarda intimal hasar oluşumu sağlandı. Kateter çekildikten sonra femoral arter, arteriotominin distal ve proksimalinden bağlandı. Cilt kesisi eriyebilen sütür materyali ile kapatıldı.

Hemodinamik ölçümler: Tüm deneklerde sistolik, diastolik ve ortalama arteriyel basınçlar ile kalp hızları iflem başlangıcında ve 28. günde ölçüldü. Bu değerlerin ölçümü deneklerin sağ orta kulak arteri 24 G branül

(Mediflon™, Hindistan) ile kanüle edildi. Daha sonra bu arteriyel yol bir transduserle (Abbot Critical Care System, rlanda) konnekte edilerek Siemens SC-600 (Siemens Medical Systems Industry-USA) invazif basınç monitörü kullanılarak kaydedildi.

Damar örneklerinin alınması ve hazırlanması: Deney süresinin sonunda tüm deneklerde aynı anestezi tekniği ile Göncü ve arkadaşları⁽²¹⁾ uyguladığı şekilde abdominal aort serbestleştirilerek ksifoid altından 22 G branül (Mediflon TM) ile kanüle edildi. Aynı seviyeden vena kava inferior kesilerek venöz kan drene edildi. Arterlerin in vivo boyutlarının korunması için aortadaki kanül yolu ile 80 mmHg basınçta serum fizyolojik verildi ve vena kava inferiordan berrak mayii gelinceye kadar bu ifleme devam edildi. Daha sonra yine aynı yoldan 80 mmHg basınçta 20 dakika süre ile %10 formaldehid solüsyonu infüze edilerek damarların fikse edilmesi sağlandı.

Abdominal aort, iliyak bifurkasyona kadar zedelenmeden çıkarıldı. Renal arter hizasından 3 cm'lik distal aort segmenti %10'luk formaldehid solüsyonu içinde histomorfolojik incelemeler için patoloji laboratuvarına, iliyak bifurkasyona kadar olan aort segmenti ise serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra alüminyum folyolara sarılarak biyokimya laboratuvarına ulaştırıldı.

Histomorfolojik inceleme: Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom ile 4µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinize edilip cam slaytlara monte edilerek hematoksilin – eosin, Verhoeff'un elastik boyası ve Masson Trichrome boyası ile boyandı. Preparatlar BH-2 Olympus fotomikroskop ile incelenerek fotoğraflandırıldı. Bu fotoğraflar üzerinde bilgisayar ortamında her bir kesitteki intimal alan ve medial alan hesaplanarak intima/media oranları saptandı.

Biyokimyasal inceleme: Aort dokuları homojenize edilerek hazırlanan homojenatlarda nitrik oksit düzeyleri Griess reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak tayin edildi⁽²²⁾.

İstatistiksel değerlendirme: İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 11.0 paket program ile yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak verildi. Gruplar arasındaki farkların karflılaştırılmasında Kruskal Wallis varyans analiz testi, ikili karflılaştırmalarda ise

Mann Whitney U testi kullanıldı. Gruplarda uygulama öncesi ve sonrası verilerin değerlendirilmesinde Wilcoxon testi kullanıldı. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bu çalışma 1029 proje numarası ile Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Tarafından desteklenmiştir.

BULGULAR

Hemodinamik veriler: Her 3 grubun çalışma öncesi ortalama arteriyel basınç değerleri (MAP) arasında fark bulunmadı. Nebivolol verilen grupta MAP değerlerinin; kontrol ve solvent gruplarına göre çalışma sonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p < 0.01$). Nebivolol verilen deneklerde tedavi öncesine göre tedavi sonrasında MAP değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görüldü. ($p < 0.01$). Kontrol ve solvent gruplarında ise çalışma öncesi ve sonrası MAP değerlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Aynı zamanda her iki grup arasında da

çalışma sonrasında anlamlı bir fark yoktu (Tablo 1). Ortalama kalp hızı değerleri yönünden çalışma başlangıcında kontrol, solvent ve nebivolol grupları arasında anlamlı fark bulunmazken; çalışma sonunda ortalama kalp hızı değerleri nebivolol grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldı ($p < 0.01$). Ayrıca nebivolol verilen gruptaki deneklerin ortalama kalp hızı değerleri çalışma sonunda başlangıç değerlerine göre anlamlı olarak düştü ($p < 0.05$). Kontrol ve solvent grupları arasında çalışma öncesi ve sonrasında kalp hızı değerlerinde değişiklik saptanmadı (Tablo 2).

Histomorfolojik veriler: Kontrol ve solvent grupları arasında intimal alan, medial alan ile intima/media oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Şekil 1,2,3). Kontrol ve solvent gruplarından birer tavfana ait aort histolojik kesitleri resim 1,2,3 ve 4'de görülmektedir.

Nebivolol verilen grupta intimal alandaki artış kontrol ve solvent gruplarına göre anlamlı derecede azıken ($p < 0.001$), medial alanda anlamlı bir değişiklik

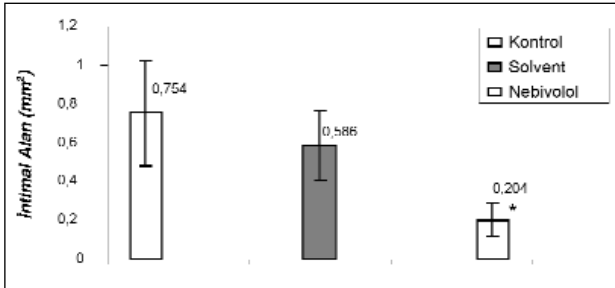
Tablo 1: Gruplardaki ortalama arteriyel basınç değerleri.

GRUPLAR	Ortalama Arteriyel Basınç (mmHg)		
	ÇALIŞMA BAŞLANGICI	ÇALIŞMA SONU	p (Başlangıç-Sonuç)
KONTROL (n=7)	82,71±3,48	81,57±3,15	AD
SOLVENT (n=7)	83,14±3,97	82,71±2,93	AD
NEBİVOLOL (n=7)	82,57±4,35	62,57±3,86* ^a	^a $p < 0.01$
p (Gruplar arası)	AD AD: Anlamlı Değil	* $p < 0.01$ (Nebivolol- Kontrol) (Nebivolol- Solvent)	

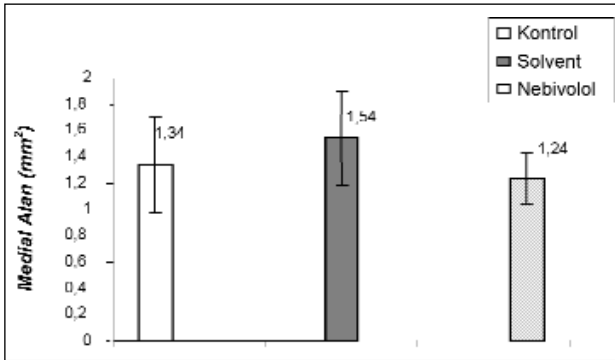
Tablo 2: Gruplardaki ortalama kalp hızı değerleri.

GRUPLAR	Ortalama Kalp Hızı (Atım/Dakika)		
	ÇALIŞMA BAŞLANGICI	ÇALIŞMA SONU	p (Başlangıç-Sonuç)
KONTROL (n=7)	209,57 ± 15,37	214,71 ± 13,87	AD
SOLVENT (n=7)	211,57 ± 13,57	215,42 ± 11,87	AD
NEBİVOLOL (n=7)	211,01 ± 14,12	182,85 ± 14,25* ^a	^a $p < 0.05$
p (Gruplar arası)	AD AD: Anlamlı Değil	* $p < 0.01$ (Nebivolol- Kontrol) (Nebivolol- Solvent)	

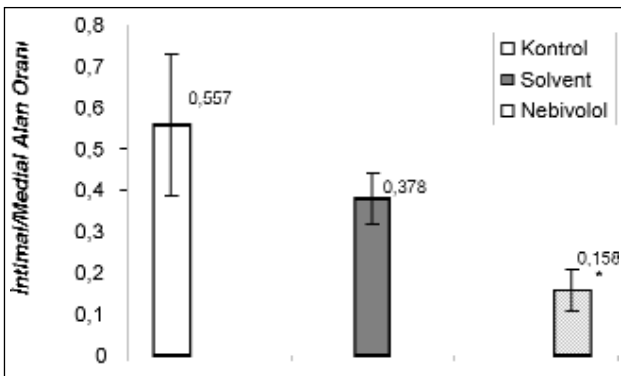
saptanmadı. «ntima/media oran» ise anlamlı olarak azaldı ($p<0.001$) (fişkil 1,2,3). Nebivolol grubundan bir tavflana ait aort histolojik kesiti resim 5 ve 6'da gör÷lmektedir.



Şekil 1: Ortalama intimal alan oranları, * $p<0.001$ (Nebivolol-Kontrol) (Nebivolol-Solvent).

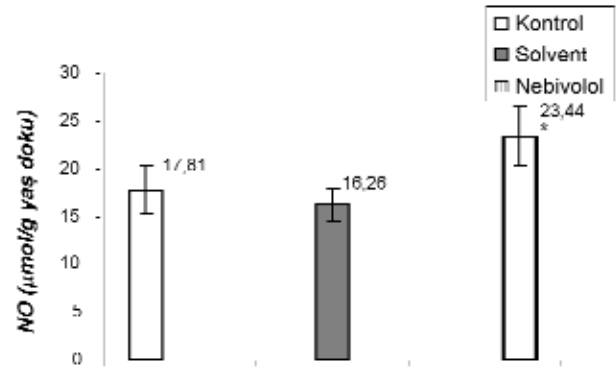


Şekil 2: Ortalama medial alan oranları.

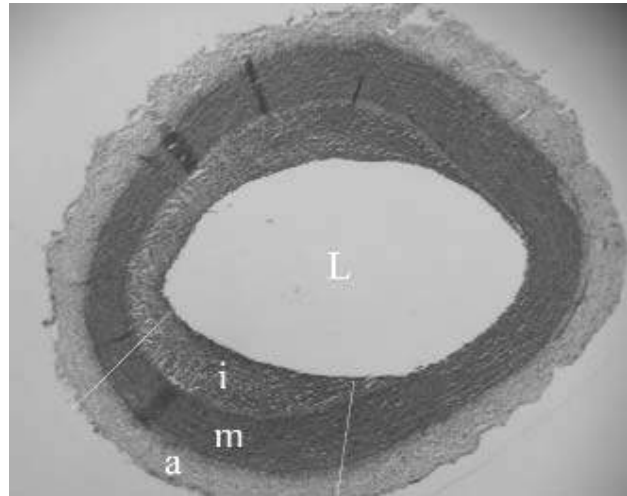


Şekil 3: «ntimal / medial alan oranları», * $p<0.001$ (Nebivolol-Kontrol) (Nebivolol- Solvent).

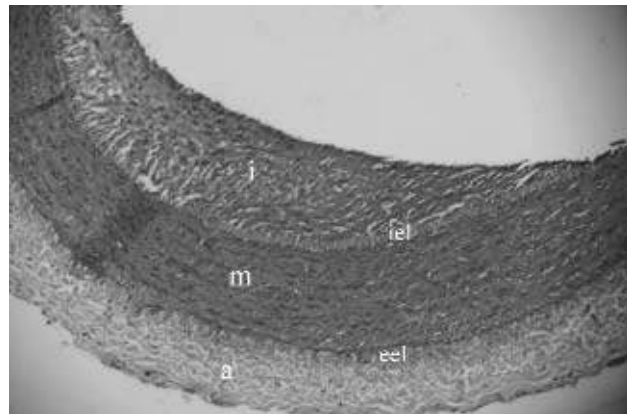
Biyokimyasal veriler: Kontrol ve solvent grupları arasında doku nitrik oksit düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmazken, nebivolol grubunda diğer iki gruba göre anlamlı derecede artış tespit edildi ($p<0.01$) (fişkil 4).



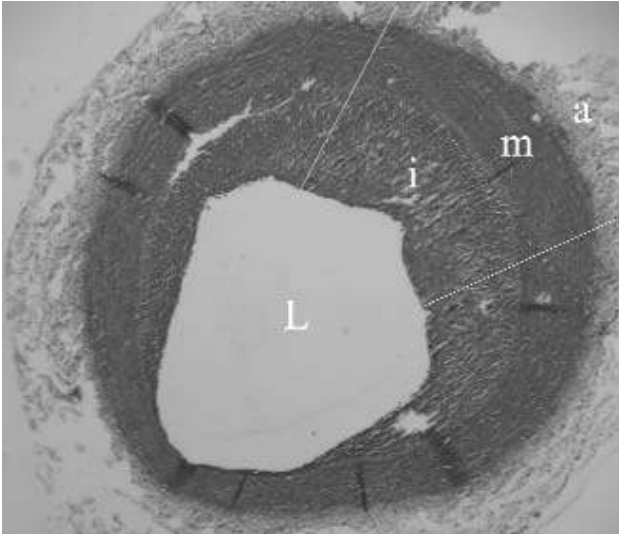
Şekil 4: Doku nitrik oksit düzeyleri, * $p<0.01$ (Nebivolol-Kontrol) (Nebivolol-Solvent).



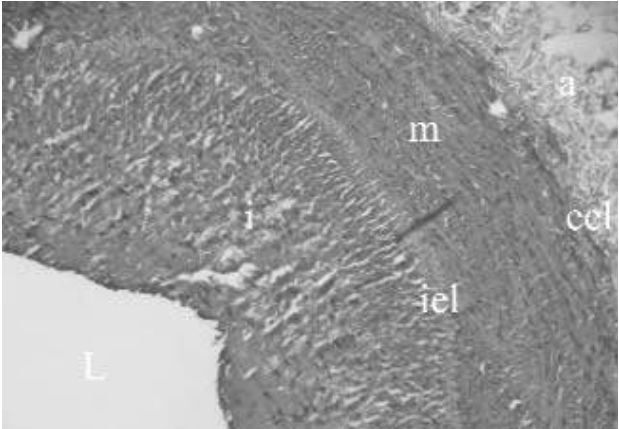
Resim 1: Kontrol grubundan bir tavflanın aort histolojik kesiti (İflık mikroskobu H&E X40)
L: lümen i: intima m:media a: adventisya



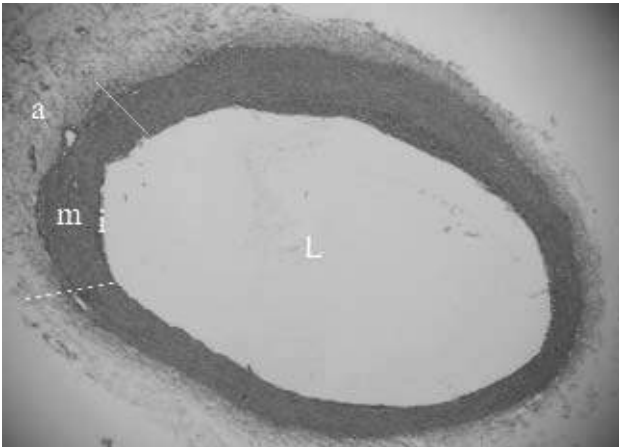
Resim 2: Kontrol grubundan bir tavflanın aort histolojik kesiti (İflık mikroskobu H&E X 200)
i: intima m:media a: adventisya
iel: internal elastik lamina
eel: eksternal elastik lamina



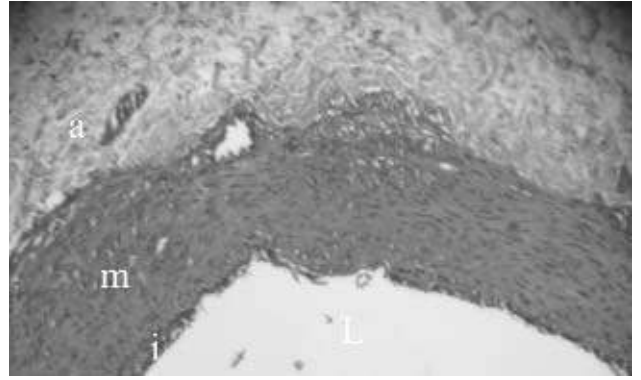
Resim 3: Solvent grubundan bir tavfan›n aort histolojik kesiti (İfl›k mikroskobu H&E X40)
L: lümen i: intima m:media a: adventisya



Resim 4: Solvent grubundan bir tavfan›n aort histolojik kesiti (İfl›k mikroskobu H&E X 200)
L: lümen i: intima m:media a: adventisya
iel: internal elastik lamina,
eel: eksternal elastik lamina



Resim 5: Nebivolol grubundan bir tavfana ait aort histolojik kesiti (İfl›k mikroskobu H&E X40)
L: lümen i: intima m:media a: adventisya



Resim 6: Nebivolol grubundan bir tavfana ait aort histolojik kesiti

(İfl›k mikroskobu H&E X 200)

L: lümen i: intima m:media a: adventisya
iel: internal elastik lamina,
eel: eksternal elastik lamina

TARTIřMA

T›kay›c› arter hastal›klar›n›n tedavisinde rekonstr›ktif girifimler s›k kullan›lmaktadır. Arteryel rekonstrüksiyonlarda baf›lar› flans›n› engelleyen en önemli sorun erken ve geç dönemde ortaya çıkan tromboz, intimal kal›nlaşma ve luminal daralmadır. Yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre intimal hiperplazi gelişiminde endotelial hücreler önemli bir rol oynamaktadır. İntimal kal›nlaşma arter veya greftin hasara karşı verdiği normal onar›c› yan›t›n bir paras›dır^(2,5) ve büyük oranda düz kas hücre proliferasyonuna ve intimada konnektif doku birikimine bağlı olarak olmaktadır^(2,3,4). Yara iyileşmesindeki ađ›r› yan›t sonuçta luminal daralmaya ve vasküler girifimin yetersiz hale gelmesine neden olmaktadır. Arteryel rekonstrüksiyon girifimlerinin baf›s›zlağ›nda bu kadar önemli yeri olan intimal hiperplazinin önlenmesinde bu sürecin basamaklar›na etkili olabilecek çeşitli farmakolojik ajanlar denenmiş olmas›na rağmen etkili bir tedavi yöntemi bulunamam›tır.

Nitrik oksit damar endotelinden sentezlenen sitoprotektif, regülatör ve sitotoksik etkileri olan aktif bir bileşiktir^(7,9). Etkileri aras›nda; intimal hiperplazide rol alan endotel hasar› s›ras›nda gelişen hücre aktivasyonunu inhibe ederek monosit ve lökositlerin endotele yap›lmas›n› önlemek, damar düz kas hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu engellemek yer almaktadır^(10,11).

Nebivololün intimal hiperplazi üzerine etkisi ile ilgili in vivo yapılmış bir çalışmada bulunmaması nedeniyle doz belirlemek amacıyla geniş bir literatür taraması yapıldı. Nebivolol ile değişik amaçlı yapılan deneysel çalışmalarda 1.25 mg/kg ile 2.5 mg/kg/gün dozlarında ve intravenöz veya intraperitoneal olarak kullanıldı^{23,24,25}. Biz çalışmamızda nebivololü 2.5mg/kg/gün dozunda i.p. olarak kullandık. İntimal hiperplastik yanı²⁶ zamanla göre gelişimi ratlarda ve tavşanlarda iyi bir şekilde karakterize edilmektedir^(2,5,26). More ve arkadaşları⁽²⁶⁾ yaptıkları bir çalışmada tavşanlarda balon hasarından 3 gün sonra reendotelizasyonun bafıladı²⁶ ve bunun 14. günde tamamlandı²⁶, bu kalınlımanın daha ziyade ekzantrik tarzda olduğunu rapor etmişler, yine aynı çalışmada ekstrasellüler matriks birikimine bağlı olarak 1. ayda intimal kalınlımanın maksimum seviyeye ulaftı²⁶ tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da deney süresi balon hasarı işlemi sonrası 28 gün olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kontrol ve solvent grubu tavşanlarda balon kateter hasarından 4 hafta sonra intimal alanda artış oldu²⁶ fakat bu artışta her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadı²⁶ görüldü. Bu sonuç kullanılan solventin intimal hiperplaziyi önlemede etkili olmadı²⁶ göstermektedir. İntimal alandaki bu artış More ve arkadaşları⁽²⁶⁾ ile Ohkawa ve arkadaşları⁽¹⁹⁾ tarafından yapılan çalışmalardakine göre daha fazla idi. Bizim kontrol grubumuzdaki intimal kalınlımanın bu çalışmalara göre daha fazla bulunması, bu çalışmalarda balon anjioplasti kateteri yerine Fogarty kateterinin kullanılması ve balon fiirme basıncıların²⁶ elle ayarlanması nedeniyle damar duvarındaki hasarın daha az seviyede olmasıyla açıklanabilir. Bu bulgu bazı hayvan çalışmaları²⁷ vasküler yüksek balon fiirme basıncıların²⁷ restenozu arttırdı²⁷ görüşünü desteklemektedir⁽²⁷⁾. Ayrıca bu çalışmalarda süre 14 gün ile sınırlı iken bizim çalışmamızda intimal hiperplazinin maksimum olduğu 28. güne kadar beklenilmektedir. Bu da bizim çalışmamızdaki intimal kalınlımanın daha fazla olması²⁶ izah etmektedir. Deneysel ve klinik çalışmalarda nebivololün damar tonusunu regüle etmekte kilit rol oynayan endotel türevi nitrik oksitin aktivasyonu yoluyla doğrudan vazodilatör etki gösterdiği saptanmıştır^(13,14). Nebivolol ile vasküler düz kas gevşemesinin, bir nitrik oksit sentaz

inhibitörü olan L-nitromonometilarginin (L-NNMA) ile birlikte verilmesiyle bozulduğunun gözlemlenmesi⁽¹³⁾ nebivololün vazodilatasyonu endotelial metabolik sistem L-arginin/nitrik oksitin aktivasyonu yoluyla harekete geçirdiği varsayımını desteklemektedir. Bununla birlikte nebivololün fenilefrin ile önceden daraltılmış dorsal el venlerine lokal uygulanmasından sonra vazodilatasyona yol açması ve venöz kan akımındaki artışın L-NNMA ile anlamlı düzeyde azalmış olması yine nebivololün NO²⁸ yoluyla etki ettiğini doğrulamaktadır⁽¹⁴⁾.

Broeders ve arkadaşları⁽²⁸⁾ fare torasik aorta hücre kültürleri düzeyinde yapmış oldukları in vivo bir çalışmada nebivololün endotelial kalsiyumu β_2 adrenerjik reseptör aracılığıyla olarak arttırdı²⁸ ve bunun da NO²⁸ üretiminde artışa yol açtığını gösterilmektedir.

Brehm ve arkadaşları⁽²⁹⁾ yapmış oldukları hücre kültürü düzeyindeki bir başka çalışmada ise nebivololün insan endotel hücrelerinde nitrik oksiti arttırdı²⁹ ve bunun L-NNMA ile inhibe edildiği gösterilmektedir. Yine Kakoki ve arkadaşları nebivololün potant bir nitrik oksit sentaz stimülatörü olduğunu ileri sürmüşlerdir⁽³⁰⁾.

Çalışmamızda abdominal aortlarına balon hasarı uygulanan kontrol ve solvent grupları arasında doku nitrik oksit düzeyleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmezken, nebivolol grubunda doku nitrik oksit düzeylerinde bu iki gruba göre anlamlı artış oldu²⁶ görüldü.

Nitrik oksitin arteriyel hasar sonrası damar duvarında trombosit adezyon ve agregasyonunun inhibisyonu, düz kas hücre proliferasyonunun önlenmesi, ekstrasellüler matriks sentezinin inhibisyonunun gerçekleştirilmesi ile^(8,11) intimal hiperplazi gelişimini engellemesi, onu tedavi seçeneği olarak ön plana çıkarmıştır. Bu amaçla yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Provost ve arkadaşları⁽¹⁰⁾ nitrik oksit donörü olan 3-morpholino-sydnonimine (SIN-1)'in domuz balon anjioplasti modelinde antiadesif ve antitrombotik etkilerini araştırmışlar ve SIN-1'in hasarlı olan intimal bölgeye mural trombosit ve nötrofil adezyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Hamon ve arkadaşları⁽¹⁸⁾ tavşan iliak arterlerinde, Chen ve arkadaşları⁽³¹⁾ rat karotis arterlerinde oluşturdıkları intimal hiperplazi çalışmaları²⁶nda oral olarak verilen Nitrik oksit prekürsörü L-argininin intimal

kalınlaşmay› belirgin bir şekilde azalt›ld› bulunmuştur. Ayrıca Lee ve arkadaşları'nın⁽³²⁾ yapt›r›ld› oldukları bir diğer çalışmada da kronik nitrik oksit inhalasyonunun arteriyel balon hasar› sonrasında oluşan intimal kalınlaşmay› azalt›ld› gösterilmiştir.

Doku nitrik oksit seviyelerini arttıran nebivololün insan ve kemirgen düz kas hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri bulunmaktadır^(33,34). Ignarro ve arkadaşları⁽³⁴⁾ nebivololün antiproliferatif etkisinin cGMP'den bağımsız olarak düz kas hücrelerinde poliamin yap›m›nın inhibisyonu ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Andre ve arkadaşları⁽³³⁾ ise hücre siklusü düzenleyici proteini olan Cdk2'nin inhibisyonuna bağlı olarak hücre siklusünün G1 faz›ndan S faz›na geçişin engellenmesi sonucu düz kas hücre proliferasyonunun inhibisyonunun gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmam›zda nebivolol verilen grupta doku NO düzeylerinin diğer iki gruba göre anlamlı derecede arttırd› tespit edildi. Yine nebivolol verilen grupta intimal alandaki artışın kontrol ve solvent gruplarına göre anlamlı olarak daha az olduğu, medial alanda anlamlı bir değişiklik olmad›ğı görüldü. İntimal/medial alan oranları ise nebivolol grubunda, kontrol ve solvent gruplarına göre anlamlı derecede azald›.

Sonuç olarak balon kateter hasar› arterlerin intimas›nda belirgin kalınlaşmaya yol açmaktadır. Nebivolol; vasküler dokuda nitrik oksit miktar›n› arttırmaktadır. Hem doku nitrik oksit düzeyinin artması hem de ilacın kendisinin düz kas hücre proliferasyonunu inhibe etmesi intimal alan artışında azalmaya neden olmuştur. Bu özellikleri nedeniyle nebivolol kullan›m›nın vasküler girişimlerden sonra erken restenoz gelişiminin engellenmesinde yararlı bir ajan olabileceği düşünülmektedir. Ancak bilindiği gibi balon anjioplasti girişimleri endotelial disfonksiyonu bulunan aterosklerotik damarlara uygulanmaktadır. Bu damar bölgelerinde azalmış L-arginin sentezine bağlı NO yap›m›nın azalması yanında superoksit radikallere bağlı NO inaktivasyonunda artış da söz konusudur. Ayrıca bu damarlarda düşük dansiteli lipoproteinlerin uyar›m› sonucu endotelin yap›m› da artmaktadır⁽³⁵⁾. Bu nedenle Nebivolol'ün gerçek etkinlik düzeyinin belirlenmesi ve rutin klinik kullan›ma girebilmesi için bu çalışmaların endotelial disfonksiyonu bulunan hiperkolesterolemik ve hipertansif deneklerde de yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Zubilewicz T, Wronski J, Bourriez A, et al. Injury in vascular surgery- the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit.* 2001; 7:316-324.
2. Clowes AW. Pathologic intimal hyperplasia as a response to vascular injury and reconstruction. In: *Vascular Surgery*. Rutherford RB (ed). Philadelphia USA W.B. Saunders Co., 1995: 285-293.
3. De Meyer GR, Bult H. Mechanisms of neointima formation - lessons from experimental models. *Vasc Med.* 1997;2:179-189
4. Mach F. Toward new therapeutic strategies against neointimal formation in restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1699-1700
5. Zarinsk CK, Bassiony HS, Glagov S. Intimal Hyperplasia. In: *Haimovici's Vascular Surgery Principles and Techniques*. Haimovici H, Ascer E, Hollier LH, Strandness DE, Towne JB (eds). Cambridge Massachusetts, USA Blackwell Science Inc., 1996: 678-687
6. Schachter M. The pathogenesis of atherosclerosis. *Int J Card.* 1997; 62:3-7.
7. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:434-456.
8. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ J.* 2002;66:529-533.
9. Prof. Dr.Sezen Köfay. Nitrik oksitin patolojik olaylardaki rolü. *Ay›n Kitab›* 1996;83;1-89.
10. Provost P, Tremblay J, Merhi Y. The antiadhesive and antithrombotic effects of the nitric oxide donor SIN-1 are combined with a decreased vasoconstriction in a porcine model of balloon angioplasty. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 1997;17:1806-1812.
11. Tourneau T, Belle EV, Corseaux D, et al. Role of nitric oxide in restenosis after experimental balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit: effects on neointimal hyperplasia and vascular remodelling. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:876-882.
12. Rosendorff C. Beta blocking agents with vasodilator activity. *J Hypertens Suppl.* 1993;11:37-40.
13. Cockcroft JR, Chowienzyk PJ, Brett SE, et al. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO dependent mechanism. *J Pharmacol Experiment Therapeutics.* 1995;274:1067-1071.
14. Gao Y, Nagao T, Bond RA, et al. Nebivolol induces endothelium-dependent relations of canine arteries. *Drug Invest.* 1991;3:118-119.
15. Ignarro LJ, Bryns RE, Trinh K, et al. Nebivolol: a selective b1 adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide and cyclic Gmp-dependent mechanisms. *Nitric Oxide.* 2002;7:75-82
16. Watanabe T, Miyahara Y, Akishita A, et al. Inhibitory effect of low-dose estrogen on neointimal formation after balloon injury of rat carotid artery. *European Journal of Pharmacology.* 2004;502:265-270.

17. Güleflı c. Tavflanlarda oluşturulan subaraknoid kanama sonrası gelişen vazospazmda nitik oksit donörü ve beta 1 reseptör antagonisti olan nebivololün etkisi. Uzmanlık Tezi, İstanbul:İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroflurji Anabilim Dalı, 2000.
18. Hamon M, Vallet B, Bauters C, et al. Long term oral administration of L-arginin reduces intimal thickening and enhances neoendothelium-dependent acetylcholine-induced relaxation after arterial injury. *Circulation* 1994;90:1357-1362.
19. Ohkawa H, Ito M, Shigeno K, et al. Suppression by tranilast of fetal myosin heavy chains and intimal hyperplasia in rabbits. *Current Therapeutic Research* 1997;58:764-770
20. Kipshidze N, Facc PD, Sahota H, et al. Photoremodelling of arterial wall reduces restenosis after balloon angioplasty in an atherosclerotic rabbit model. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1152-1157.
21. Göncü T, Yavuz fı, Çekirdekçi A, et al. Vasküler injüri sonrası oluşan intimal hiperplazi üzerine perindoprilin etkisi. *TKDC Dergisi*. 2001;91:109-114.
22. Cortas NK, Wakid N. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*. 1990;36:1440-1443.
23. Mangrella M, Rossi F, Fıcc F. Pharmacology of nebivolol. *Pharmacological Research*. 1998;38:419-431.
24. Lu HR, Remeysen P, De Clerck F. Antifibrillary action of class I-IV antiarrhythmic agents in the model of ventricular fibrillation threshold of anesthetized guinea pigs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26:132-136.
25. D'Agostino B, Gallelli L, Falciani M, et al. Nebivolol and airway responsiveness in the rabbit. *Life Sciences*. 2001;6:2159-2168.
26. More RS, Underwood MJ, Brack MJ, et al. A time sequence of vessel wall changes in an experimental model of angioplasty. *J Pathol*. 1994; 172:281-292.
27. Sarembock IJ, La Veau PJ, Sigal SL, et al. Influence of inflation pressure and balloon size on development of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Circulation*. 1989;80:1029-1035.
28. Broeders MAW, Doevendans PA, Bekkers BC, et al. Nebivolol: A third-generation b blocker that augment vascular nitric oxide release. *Circulation*. 2000;102:677-682.
29. Brehm BR, Wolf SC, Bertsch D, et al. Effects of nebivolol on proliferation and apoptosis of human coronary artery smooth muscle and endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2001;49:430-439.
30. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, et al. Effects of vasodilatory beta-adrenoreceptor antagonists on endothelium-derived nitric oxide release in rat kidney. *Hypertension*. 1999;33:467-471.
31. Chen C, Mattar SG, Lumsden AB. Oral administration of L-arginine reduces intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. *Journal of Surgical Research*. 1999;82:17-23.
32. Lee JS, Adrie C, Jacob HJ, et al. Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointimal formation after balloon-induced arterial injury. *Circulation Research*. 1996;78:337-342.
33. Andre DE, Arnet U, Yang Z, et al. Nebivolol inhibits human aortic smooth muscle cell growth: effects on cell cycle regulatory proteins. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35:845-848.
34. Ignarro LJ, Sisodia M, Trinh K, et al. Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by mechanisms involving nitric oxide but not cyclic GMP. *Nitric Oxide*. 2002;7:83-90.
35. Önder MR, Barutcuolu B. Endotel. İstanbul, 2005.