

Balon Hasarı Oluşturulan Sıçan Karotisinde İntimal Hiperplazinin Baskılanması: Asetilsalisilikasit ve Tiklopidin Karşılaştırılması

Aşkın Ali Korkmaz*, Caner Arslan*, Kazım Beşirli*, Arzu Turan**, Hasan Tüzün*

*İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı/ İstanbul

**İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı/ İstanbul

ÖZET

Asetilsalisilik asit ve tiklopidinin ayrı ayrı veya kombine olarak kullanımında intimal hiperplazinin baskılanmasına olan etkilerini araştırmak amacıyla ana karotis arterlerine balon hasarı uygulanan 24 adet sıçan 4 gruba ayrıldı. Birinci gruptaki sıçanlara asetilsalisilik asit 2. gruptakilere tiklopidin HCL, 3. gruptakilere her iki ilaç birlikte verildi, 4. gruptakilere herhangi bir ilaç verilmedi. 10 gün sonra sakrifiye edilen sıçanların karotis arterleri çıkartılarak patolojik incelemeye alındı. İntimal indeks (intima/media kalınlık oranı) hesaplandı. İntimal hiperplazinin baskılanmasında asetilsalisilik asit ve asetilsalisilik asit ile tiklopidin birlikte kullanıldığı gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmazken, bu gruplar ile tiklopidin ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Asetilsalisilik asit, tiklopidin, intimal hiperplazi.

SUMMARY

SUPPRESSION OF INTIMAL HYPERPLASIA IN BALLON INJURED CAROTIDARTERIES IN RATS: COMPARISON OF ACETYLSALICYLIC ACID AND TICLOPIDINE

To investigate the effects of acetylsalicylate and ticlopidine and combination of these drugs in suppression of intimal hyperplasia, balloon injury was applied to the common carotid arteries of 24 rats. They were divided in 4 groups; acetylsalicylate, ticlopidine, both drugs together and no drug groups. Ten days later, rats were sacrificed and common carotid arteries were pathologically examined. Intimal index (intimal thickness / medial thickness) was calculated. In suppression of intimal hyperplasia, Although no statistically significant difference was revealed between acetylsalicylate group and ticlopidin and acetylsalicylate combination groups, there was statistically significant difference between these groups and ticlopidin and control groups.

Key Words: Acetylsalicylate, ticlopidin, intimal hyperplasia.

Son yıllarda tıkalı arter hastalıklarına yönelik her türlü girişim sayısında belirgin artış kaydedilmiştir. Ancak bu girişimlerin bir kısmı teknik hatalardan dolayı başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Teknik hataların en aza indirildiği, embolektomi, perkutan transluminal anjioplasti, endarterektomi ve vasküler anastomozlarda uzun dönemde meydana gelen lümen daralmasında intimal hiperplazinin önemli olduğu gösterilmiştir (1, 2). İnsan ve deneysel hayvan çalışmalarında luminal daralmanın düz kas hücre proliferasyonu ve intimada bağ dokusu birikimine bağlı olduğunun belir-

lenmesi, vasküler düz kas hücre proliferasyonu kontrolüne yönelik çalışmalara hız vermiştir. İntimal hiperplazinin önlenmesinde antitrombotikler, antikoagulanlar, östrojen, progesteron, anjiotensin konverting enzim inhibitörleri, antiinflamatuvarlar ve geliştirme aşamasında olan bir çok ilaç kullanılmıştır. Bu çalışmada sıçan karotisinde balon hasarı oluşturularak, koroner, periferik ve karotis arter hastalıklarında antitrombotik amaçla yaygın olarak kullanılan asetilsalisilik asit ve tiklopidini ayrı ayrı ve birlikte kullanarak intimal hiperplazinin baskılanmasında etkilerini ortaya ortaya koymayı amaçladık.

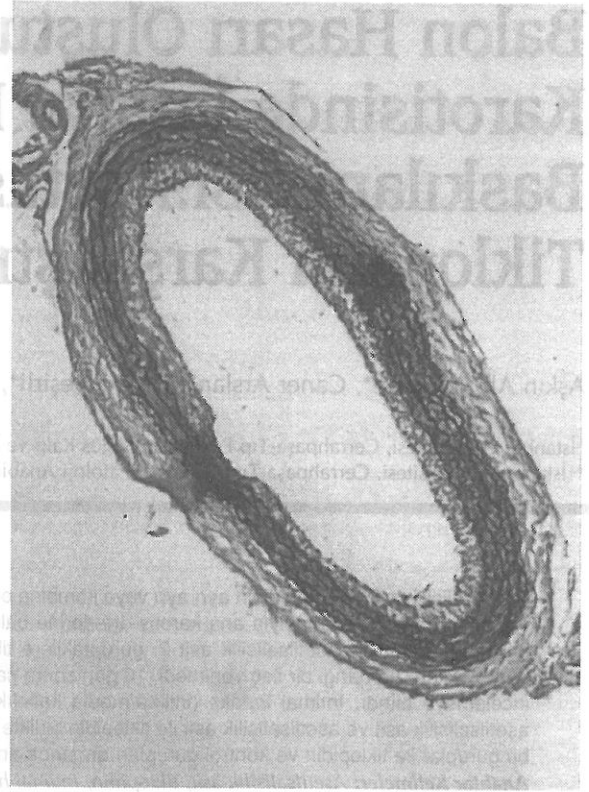
MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda 24 adet 300-350 gr. ağırlığında Sprague-Dawley sıçanı kullanıldı. Eter anestezisi altında sağ vertikal boyun insizyonu ile internal jugular ven korunarak ana karotis arter ve dalları hazırlandı. Distal, proksimal kontrolü takiben eksternal karotis arter ayırma en yakın yerden transvers arteriotomi yapılarak 2 French Cirrus volüm ayarlı anjioplasti balon kateteri ana karotis arterden innominat artere doğru ilerletildi. Kateter balonu 0.5 cc serum fizyolojik ile 3 kez değişik açılarda döndürülerek şişirildi. Kateter çıkartıldıktan sonra olası pıhtı ve debrislerin atılmasını sağlamak amacıyla ana karotis arter kanatıldı. Arteriotominin distal ve proksimali 5/0 prolene bağlandı. Postop ana karotis arter nabızı gözle görüldü. Cilt 4/0 prolene konitü kapatıldı.

Her grupta 6 sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu. 1. gruba 100mg/kg/gün asetilsalisilik asit, 2. gruba 200 mg/kg/gün tiklopidin HCL, 3. gruba her iki ilaç birlikte bahsedilen dozlar da verildi. Dördüncü kontrol grubuna herhangi bir ilaç verilmedi. İlaçlara operasyondan 30 dak sonra başlandı ve sakrifikasyonun yapılacağı 10. güne kadar her gün devam edildi. Postop 10. gün eter anestezisi altında sıçanlar hazırlanarak ana karotis arterleri çıkartıldı ve % 10 tamponlu formalin ile tespit edilerek patolojik incelemeye alındı. Burada damarlar parafin bloklar içerisine gömülerek 3 _ kalınlıkta seri kesitler hazırlandı. Bunlar hematoksilin-eosin ve elastik tabakayı boyayan Elastika Van Giesson boyaları ile boyanarak hazırlandı (Resim 1). Daha sonra elde edilen kesitlerden istatistiksel değerlendirme için morfometrik ölçümler yapıldı. Tüm morfometrik analizler bir gözlemci tarafından değerlendirildi. Her damar kesitinde toplam damar çapı, lümen, intima ve media kalınlıkları 90 derecelik açılarla 4 ayrı bölgede ölçülerek değerlendirildi. İntima ve medianın 4 ayrı bölgeden ölçülen kalınlıklarının ortalaması alınarak her bir denek için intimal indeks (intima kalınlığı/ media kalınlığı) hesaplandı.

Uygulama olarak 2 den fazla gruptaki ortalamaların karşılaştırılması gerektiği için tek yönlü varyans analizi uygulandı (One-way analysis of variance: one way ANOVA) (Tablo 1).

Herhangi bir grubun ortalamasının diğer gruplardan herhangi birininkinden farklı olduğu olduğu saptanarak, hangi grupta yada grupların



Resim 1. Balon basarı oluşturulan sıçan karotisinde intimal hiperplazinin baskılanması asetilsalisilik asit ve tiklopidinin karşılaştırılması. Elastika Va Giesson Giesson (EVG) X 100

ortalamalarının farklı olduğunu araştırmak için çoklu karşılaştırma yöntemlerinden, sonradan yapılan (Post Hoc) çoklu karşılaştırma yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemlerden Tukey'in gerçekten önemli farklar testi (Tukey's honestly significant difference test: Tukey HSD) seçildi (3) (Tablo2).

SONUÇLAR

Çalışılan sıçanlardan hiçbirinde nörolojik de-

Tablo 1. Tek Yönlü Varyans Analizi

	Kareler Toplamı	df*	Kareler Ortalaması	F	Sig.**
Gruplar arası	1.974	3	0.658	4.299	0.017
Gruplar içi	3.062	20	0.153		
Total	5.037	23			

Tablo 1. Bu tabloda gruplar arası ve gruplar içi, kareler toplamı, serbestlik derecesi*, kareler ortalaması, F değeri ve p değeri (Sig.**: significance=anlamlılık) verilmiştir. Görüldüğü gibi $p=0.017$ ($p<0.050$) olduğundan, tek yönlü varyans analizi göre gruplardan birinin ortalaması, diğerlerinden herhangi birinin ortalamasından farklıdır sonucu çıkmaktadır.

Tablo 2. Post Hoc Çoklu Karşılaştırma; Tukey HSD

Verilen ilaç (1)	(2)	Ortalama arası fark (1-2)	Std.Hata	Sig.	%95 Güven aralığı	
					Alt	Üst
Ticlid	Aspirin	0.21450	0.226	0.779	-0.41781	0.84681
	Aspirin + Ticlid	0.27950	0.226	0.611	-0.35281	0.91181
	Kontrol	-0.45317	0.226	0.219	-1.08548	0.17915
Aspirin	Ticlid	-0.21450	0.226	0.779	-0.84681	0.41781
	Aspirin + Ticlid	6.50E-02	0.226	0.911	-0.56731	0.69731
	Kontrol	-0.66767*	0.226	0.036	-1.36498	-3.5E-02
Aspirin + Ticlid	Ticlid	-0.27950	0.226	0.611	-0.91181	0.35281
	Aspirin	-6.50E-02	0.22	0.911	-0.69731	0.56731
	Kontrol	-0.73267*	0.226	0.020	-1.36498	-0.10035
Kontrol	Ticlid	0.45317	0.266	0.219	-0.17915	1.08548
	Aspirin	0.66767*	0.266	0.036	3.54E-02	1.29998
	Aspirin + Ticlid	0.73267*	0.226	0.020	0.10035	1.36498

Tablo 2. * Ortalamalar arası fark 0.05 seviyesinde Kontrol-Aspirin (p=0.036) ve Kontrol-Aspirin+Ticlid (p=0.020) grupları arasında anlamlıdır.

fisit gelişmedi. Verilen ilaçların başta kanama olmak üzere herhangi bir yan etkisine rastlanmadı ve başka bir komplikasyon gelişmedi. Tiklopidin ile asetilsalisilik asit (p= 0,779), tiklopidin ile asetilsalisilik asit + tiklopidin (p= 0,611), tiklopidin ile kontrol (p=0,219), asetilsalisilik asit ile asetilsalisilik asit + tiklopidin (p=0,991) grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı.

Asetilsalisilik asit ile kontrol (p=0,036), asetilsalisilik asit + tiklopidin ile kontrol (p=0,020) grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi.

Asetilsalisilik asit + tiklopidin grubu ile kontrol grubu arasında ve asetilsalisilik asit grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık olmasına rağmen asetilsalisilik asit ile asetilsalisilik asit + tiklopidin grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmaması asetilsalisilik asitin tiklopidin ile beraber verilmesinin intimal hiperplazinin baskılanmasında tek başına verilmesinden farklı olmadığını göstermektedir.

TARTIŞMA

Araştırmalar başlıca iki temele dayanmaktadır. Birisi intimal hiperplazinin hasara yanıt hipotezidir (Reaction to injury); burada endotel hasarı, trombosit adherans ve aktivasyonu, mitojenik faktörlerin salınımı, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu rol oynamaktadır (4,5). Olayların inisiyal bir hasarla başladığı trombositlerin hasarlanan artere doğru göç ederek düz kas hücrelerini uyaran büyüme faktörlerini saldı ve sonuçta intimal kalınlaşma ge-

liştiği kabul edilmektedir. Mekanik, sitotoksik, immunohistokimyasal ve termal hasarlar oluşturularak deneysel hayvan modelleri geliştirilmiştir. Balon kateter hasarı endotel ve hemen altındaki mediada lezyon oluşturur ve çok sık kullanılan bir metodudur. Benzer hasarlar düz kas hücre (DKH) proliferasyonunu uyarır ancak bu, sıklıkla kendini sınırlayan ve oklüzyona yol açmayan bir süreçtir (6, 7).

İkinci temel konu ise arterin biomekanik ve metabolik faktörlere karşı adaptif reaktif yeniden şekillenme (Adaptive remodeling) cevabıdır (8, 9). Bu cevap, kan basıncı ve kan akımındaki lokal ve sistemik değişikliklere arter duvarının yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel değişiklikleri şeklindedir. Aterosklerotik plaklar, endarterektomi, anjioplasti, bypass greftleri yeni geometrik konfigürasyonlar oluşturarak kan akımında değişiklik oluşturur ve o damardaki duvar kopma stresi (DKS), duvar gerilme stresi (DGS), doku vibrasyonu ve arter duvarı kompliansında değişikliklere yol açarlar. Bu değişiklikler de intimal kalınlaşmayı, DKH proliferasyonu ve migrasyonunu stimüle ederler. Endotel hücreleri bu DKS'ndeki değişikliklere invitro olarak morfoloji ve hücre iskelet yapısında, prostasiklin ve mitojen sekresyonunda, doku plazminojen aktivatörü kopyalanmasında, potasyum kanal aktivasyonunda değişiklikler şeklinde yanıt verir (10). Damar duvarında sirküler gerilme gibi mekanik kuvvetler, kollajen yapısını arttırarak DKH'lerini stimüle ederler. Adaptif intimal kalınlaşma ve patolojik intimal hiperplaziyi regüle eden mekanizmaların farklı olduğu düşünülmektedir (11).

Trombositopeninin intimal kalınlaşmadaki etkisi sıçan karotisi balon hasarı modellerinde doğrulanmıştır. Bununla beraber bu etkinin DKH migrasyonunun inhibisyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir. Trombositopenik hayvanlar ve kontrol gurubunda DKH proliferasyonunda ilk yükselme aynı seviyededir (12). Bu sonuçlar desteklemesede trombositlerden salınan faktörlerin DKH ve fibroblastlar için kemoatraktan olduğu bilinmektedir. Platelet derived growth factor (PDGF) bu faktörlerden biridir, farmakolojik dozda infüze edildiğinde mediada DKH migrasyonunu stimüle eder (13). Endotelial soyulmanın olmadığı durumlarda da DKH proliferasyonu olabilmektedir. Bu hipertansiyona damar cevabında, arter içi kateter varlığında, vasküler greftlerin iyileşmesinde görülebilmektedir (14, 15). Böylece medial DKH ile üzerindeki endotel proliferasyonu arasında kesin bir korrelasyon olmadığı söylenebilir. Balon kateter hasarında endotelial soyulma dışında alttaki mediada hasar ve damarda gerilme de mevcuttur. Bugün artık trombositlerden salınan faktörlerin DKH büyümesinde gerekli olduğu bilinmektedir. Diğer bir büyüme faktörü ise basic fibroblast growth factor dır. Bu faktör endotel ve DKH'nde depolanır, bir hasar olduğunda salınır ve daha sonra matrikste depolanır (16). Endotel ve DKH için potent bir mitojendir. Hasar sürecinin kendisi ve ölü ya da hasarlı hücrelerden salınan faktörler, DKH proliferasyonunun ilk dalgalanmasını stimüle eder, trombositlerde DKH'sinin migrasyonunu uyarır. İntimada proliferasyonu regüle eden faktörler; Anjiotensin-P, insülin like growth factor-I,ve PDGF'dür (17, 18).

Anjioplasti, endarterektomi, embolektomi, vasküler rekonstrüksiyonlar gibi girişimler sonrası, girişim ne kadar başarılı olursa olsun sonuçta intimal kalınlaşma gelişimi kaçınılmazdır. Bu nedenle intimal kalınlaşmanın kontrolünde girişimin başarısını devam ettirecek, intimal kalınlaşmayı önleyecek yada yavaşlatacak önlemler geliştirilmiştir.

Antitrombotikler ve antikoagulan tedavi, bugün için etkisi en iyi bilinen ve en yaygın yöntemdir. Antitrombotiklerden başlıca aspirin ve dipiridamol, antikoagulan olarakda heparin verilerek erken trombotik olayların ve intimal kalınlaşma gelişiminin kontrolü amaçlanmaktadır. Aspirin ve dipiridamolün çeşitli klinik serilerde koroner bypass greft yetersizliğini % 10 azalttığı

gösterilmiştir (19). Burada önemli olan bu ilaçların operasyondan kısa bir dönem içinde verilmesidir. Eğer 2 günden sonra verilirse faydalı olmadığı anjiografik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu gözlem bu ilaçların, hem akut greft oklüzyonunu hemde trombüsün toplanmasını önleyerek fibröz lezyon gelişimini engellediğini düşündürmektedir. Aynı çalışmalar periferik damarlarda da yapılmış negatif yada minimal derecede anlamlı sonuçlar bulunmuştur (19, 20).

Antitrombotikler intimal kalınlaşma sürecinde en önemli etkilerini DKH migrasyonunu etkileyerek göstermektedirler. Aspirin antitrombotik etkisini siklooksijenazı inhibe ederek gösterir. Tiklopidin bir tienopiridin derivativesidir ve antitrombotik etkisini kesin bilmemekle beraber ADP aktivitesini önleyerek gösterdiği düşünülmektedir. Çalışmamızda sıkça kullanılan bu iki ilacın kombine kullanımının intimal hiperplaziyi baskılamada sadece aspirin kullanımına kıyasla herhangi bir üstünlüğünün olmadığını göstermiş olduk.

KAYNAKLAR

1. Imparato AM, Bracco A: Intimal and neointimal fibrous proliferation causing failure of arterial reconstruction. *Surgery* 72: 1007-1017, 1972.
2. Garrat KN, Edwards WD: Differential histopathology of primary atherosclerotic and restenotic lesions in coronary arteries and saphenous vein bypass grafts: analysis of tissue obtain from 73 patients by directional atherectomy. *J Am Coll Cardiol* 17: 442-448, 1991.
3. Hayran M, Özdemir O: İkiden fazla ortalamanın karşılaştırılması: Bilgisayar İstatistik ve Tıp, Hekimler Yayın Birliği, 1996 sf: 301.
4. Ross R: Pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 362: 801-809, 1993.
5. Jackson CL, Reidy MA: Basic fibroblast growth factor: its role in the control of smooth muscle cell migration. *AM J Pathol* 143: 1024-1031, 1993.
6. Reidy MA, Fingerle J, Linder V: Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation* 86 (suppl III) : 43-46, 1992.
7. Clowes AW, Clowes MM, Reidy MA: Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessels. *Lab. Invest* 54: 295-303, 1986.
8. Glagov S, Zarins CK: Hemodynamics and atherosclerosis: insight and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 112: 1018-1031, 1988.
9. Glagov S, Weisenberg E: Compensatory enlarge-

