

Ratlarda Venöz Trombozis Süresi ile Yeni Vasküler Gelişmeler ve Trombolizisin İlişkisi

Kaan Kırallı*, Hasan Ekim**, Hanefi Özbek***, Süleyman Özen****

* Koşuyolu Kalp Eğitim ve Araştırma Hastanesi-İSTANBUL

** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp-Damar Cerrahisi ABD-VAN

*** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD-VAN

**** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD-VAN

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, ratlarda oluşturulan derin ven trombozu sonrası meydana gelen neovaskülarizasyon ile trombozis süresi ve trombolizis arasındaki ilişkileri araştırmaktır.

20 Sprague-Dawley ratın bilateral femoral venleri disseke edildikten sonra, kontrol grubunu oluşturmak amacıyla ratların sağ femoral venlerine oklüzyon uygulanmadı. Akut derin ven trombozu oluşturmak amacıyla sol femoral ven 10 ratta proksimalden 4/0 ipek ile bağlanırken (Grup 1) diğer 10 ratta ise kliplendi. Klip, 5 ratta 24 saat sonra (Grup 2A), diğer 5 ratta ise 72 saat sonra kaldırıldı (Grup 2B).

Kronik venöz obstrüksiyon oluşturulan ratlarda (Grup 1 ve Grup 2B) erken dönemde trombüsün yayılması ve 7-15. günlerde pik yapan hücresel proliferasyon dikkati çekmekteydi. 15-18 gün içerisinde trombolizis sonucu gelişen rekanalizasyon sonrasında neointimal proliferasyonun gerilediği, ancak medial hücresel büyümenin devam ettiği gözlemlendi. Geçici venöz obstrüksiyon oluşturulan ratlarda (Grup 2A) ise, erken dönemde trombüs yayılması gözlenmez iken, 6-8 gün içinde trombolizis ve rekanalizasyon olduğu, 15 gün içinde de tüm sürecin normale döndüğü gözlemlendi. Yeni vasküler oluşuma ise rastlanmadı.

Ratlarda kronik venöz obstrüksiyona bağlı gelişen trombozis, obstrüksiyon süresine paralel olarak trombozun erken yayılmasına, trombolizisin ve dolayısı ile rekanalizasyonun gecikmesine ve yeni vasküler yapıların gelişmesine yol açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Venöz trombozis, trombin, rekanalizasyon, neovaskülarizasyon

SUMMARY

THE RELATIONS AMONG DURATION OF VENOUS THROMBOSIS, NEOVASCULAR GROWTHS AND THROMBOLYSIS IN THE RATS

Acute deep venous thrombosis was developed in rats to assess the relations among the duration of deep vein thrombosis, neovascular growths and thrombolysis.

Both femoral veins of 20 male Sprague-Dawley rats were dissected. Right femoral veins served as control group. The left femoral veins were proximally obstructed to cause thrombosis. Obstruction was achieved either by means of proximal suture ligation in the 10 rats (Group 1) or by means of clip ligation. Clip was removed in 5 rats after 24 hours (Group 2A) and in the remaining 5 rats after 72 hours (Group 2B).

Group 1 and Group 2B veins had marked vein wall thickening consisting of smooth muscle type, neointimal and cellular proliferation peaking between 7 and 15 days. Within 15-18 days, neovascular growths were observed, and resumption of normal venous flow was seen to bypass the obstructed segment. Subsequently, neointimal proliferation regressed, but medial cellular growth persisted. In contrast, group 2A veins had no neovascular changes and early thrombosis extension was seen (within 8 days). Within 15 days, Group 2A veins regained normal appearance and resumed normal flow.

Thrombosis with chronic venous obstruction results in early extension of thrombus, delayed re-canalization, development of neovascular channels and permanent proliferative changes.

Key Words: Venous thrombosis, trombin, recanalisation, neovaskularisation

Venöz tromboz ile venöz kapak disfonksiyonu arasındaki ilişki pek iyi anlaşılmamıştır. Derin ven trombozu gelişen hastaların hepsi kapak yetmezliği göstermektedir, ki bu da etkenin multifaktöriyel olduğunu gösterir. Zamanla derin ven trombozu reorganize olur ve çoğu kez rekanalizasyon gelişir, ancak venöz yetmezlik genellikle kaçınılmazdır. Trombüsler, hücrel ve yapısal değişiklikleri stimule ederek posttrombotik venöz bozuklukların gelişimine sebep olacak biyolojik aktif faktörlere sahiptirler (1). Trombüsün ven duvarıyla temas süresinin uzunluğu ile patolojik olayların şiddeti arasında doğru bir orantı vardır. Venöz outflow tıkanıklığının uzun sürmesi, trombüsün damar duvarı ile temas halinde olmasına ve içerisinde barındırdığı biyolojik aktif faktörlerle de temas ettiği ven duvarında patolojik değişikliklerin gelişimine sebep olmakta, sonuçta da rekanalizasyon işlevinin bozulmasına yol açmaktadır.

In vitro olarak derin ven trombozunun rezolusyonuna ait bilgiler ancak Duplex ultrasound çalışmalarından elde edilebilmektedir (2,3). Bu tetkikler ile rekanalize olmuş ven segmentlerinde bulunan fibrinöz trombus artıkları ve ven duvarındaki kalınlaşmalar gösterilebilmektedir. Proliferatif ven duvarı değişikliklerinin, akut yangı hücresi infiltrasyonu ile başlayan trombüsün organize olmasından tetiklendiği sanılmaktadır (4). Ancak, süreç kronikleştikçe düz kas tipi fibroblastlar proliferasyon tabloya hakim olmaya başlar (5). Trombüs organizasyonunun intimal hiperplazi gelişimine benzediği gösterilmiştir (6). Kompliyans kaybıyla sonuçlanan bu proliferatif ven duvarı kalınlaşması, venöz kapakçıkların kapanmasını bozacak kadar şiddetli olabilir ve sonuçta venöz kapak yetmezliği, reflü ve ilerleyici fibrozis gelişir.

Derin ven trombozu bulunan hastalar çeşitli ilaçlar kullandığından hastalığın doğal gidişini insanlarda izlemek oldukça zordur. Koagülasyon olayının önemli komponentlerinin ve proteinlerinin insan ve ratlarda oldukça benzer olması (7,8), kronik venöz tromboz gelişiminin evrelerinin değerlendirilmesinde, neovaskülarizasyon gelişiminin izlenmesinde ve trombolizis sürecinin aydınlatılmasında bu denek hayvanlarından yararlanmamıza olanak sağlamaktadır.

Denek hayvanları üzerinde gerçekleştirdiğimiz bu prospektif deneysel çalışmada akut ve

nöz obstrüksiyon sonucu gelişecek tromboz, trombolizis ve neovaskülarizasyon aşamaları incelenmiş ve oklüzyon süresinin bu aşamalara olan etkisi araştırılmıştır.

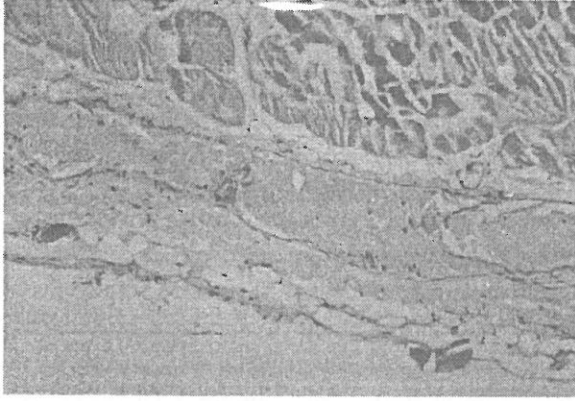
MATERYAL VE METOD

Van Yüzüncü Yıl Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarında yetiştirilen ve ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 20 adet "Sprague-Dawley" cinsi erkek rat bu çalışmada kullanılmıştır. Deneysel çalışma, uluslararası kurallara da paralellik gösteren, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunun yönergesine göre (tarih: 17/2/2000 ; protokol no: 2000/ 01-2) gerçekleştirilmiştir.

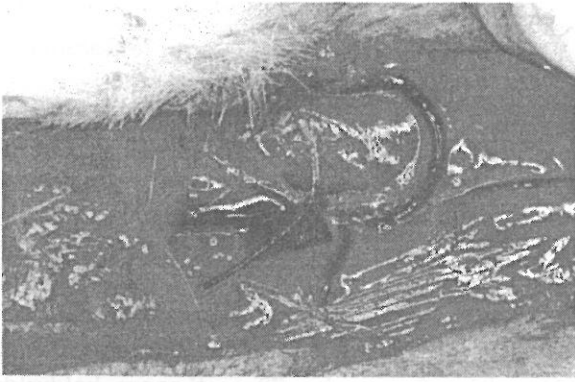
Hayvan laboratuvarında, ratların femoral venleri pentobarbital anestezisi altında bilateral olarak disseke edildi. Kontrol grubu oluşturmak amacıyla tüm deneklerde sağ femoral venlere herhangi bir oklüzyon uygulanmadı. Akut derin ven trombozu oluşturmak amacıyla deneklerin sol femoral venleri 10 ratta proksimalden 4/0 ipekle bağlanırken (Grup 1), geri kalan 10 ratın sol femoral venleri proksimalden kliplenerek oklüde edildi. Klip, 5 ratta 24 saat sonra (Grup 2A), diğer 5 ratta ise 72 saat sonra kaldırıldı (Grup 2B). Grup 1'deki deneklerin bağlanan venleri tekrardan açılmayarak devamlı obstrüksiyon uygulandı. Venöz trombozisin başlamasını, trombüsün oluşarak yayılmasını, trombolizis ve rekanalizasyon sonucu gelişen yeni vasküler oluşumları araştırmak ve histolojik incelemeler yapmak için denek hayvanları 6 haftalık bir süre içerisinde birkaç kere ameliyat edildikten sonra çalışma sonunda kurban edildi. Çıkarılan damar örnekleri %10 formol içinde tespit edilerek rutin takip işlemleri uygulandı. Hazırlanan örneklerden 5mm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eosin ve Weckoff elastik boyaları uygulandı.

SONUÇLAR

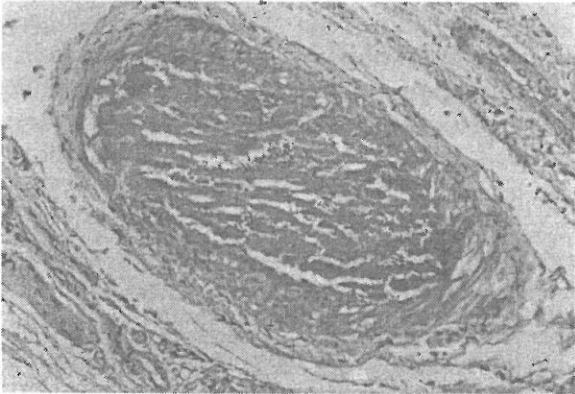
Kontrol için disseke edilen, ancak oklüzyon uygulanmayan sağ femoral venlerde herhangi bir tromboz gelişimine rastlanmadı ve hiçbir hücrel veya yapısal değişiklik görülmedi (Resim 1). Akut oklüzyon uygulanan ve kronik venöz obstrüksiyon gelişimine yol açılan ratlarda (Grup 1 ve Grup 2B), erken dönemde tromboz gelişiminin ortaya çıktığı ve yayılım gösterdiği belirlendi (Resim 2 ve 3). 4. gün başlayan ve 7-



Resim 1. Normal rat veni. (Hematoksilen-eosin x 50).

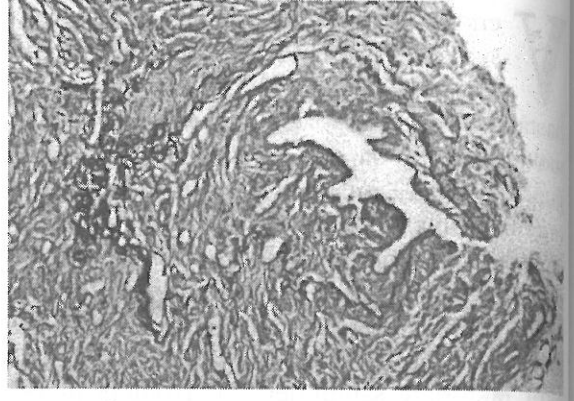


Resim 2. Ligatüre edildikten sonra tromboze olan femoral venin görünümü.



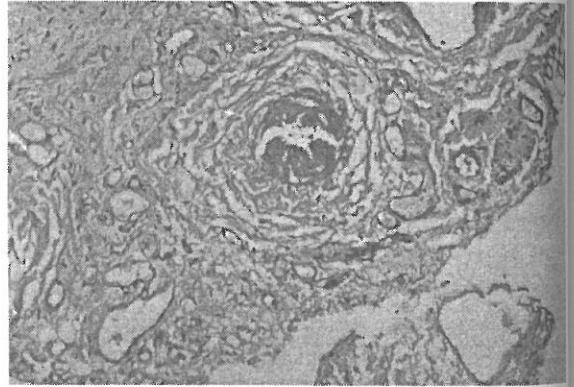
Resim 3. Erken dönemde trombus oluşumu. (Hematoksilen-eosin x 50).

15. günler arasında pik yapan başlıca düz kas hücre tipindeki neointimal ve medial hücre proliferasyonunun neden olduğu belirgin duvar kalınlaşması görüldü (Resim 4). Kronik gruba oluşturan bu iki gruptaki tüm ratlarda 15-18 gün içerisinde trombolizis sonucu rekanalizasyon gelişimine rastlanırken, bu süreç zarfında tıkalı ven bölümünü bypass ederek kan akımının devamlılığını sağlayacak yeni vasküler kanalların



Resim 4. İntimal proliferasyon ve rekanalizasyon gelişimi. (Verboff elastik boyası x 50).

geliştiği dikkati çekti (Resim 5 ve 6). Ligatür yeri veya klipin çıkarıldığı yerler tıkalı olduğu halde, rekanalizasyon ve yeni vasküler oluşumlar sayesinde venöz kan akımının proksimale doğru devam ettiği tespit edildi. Venöz kan akımının devamlılığının sağlanmasını takiben venöz dönüşteki bu düzelmenin neointimal proliferasyonu yatıştırdığı, ancak kronik posttrombotik venöz yetmezliğe götüren medial hücresel büyümenin sebat ettiği fark edildi.



Resim 5. Yeni vasküler gelişmeler. (Hematoksilen-eosin x 50).



Resim 6. 20 gün sonra ki yeni vasküler gelişmeler.

Akut venöz obstrüksiyonu oluşturulan ve geçici venöz outflow obstrüksiyon yaratılan ratlarda (Grup 2A) ise meydana gelen trombozun erken dönemde yayılma göstermediği gözlemlendi. Deneklerin hepsinde 6-8 gün içerisinde trombolizis gelişiminin rekanalizasyon oluşumuna yol açtığı ve ayrıca klipin çıkarıldığı yerlerde geçişe izin veren lümen açıklığını oluşturduğu fark edildi. Histolojik incelemede ven duvarında meydana gelen değişikliklerin kronik gruptakilere benzediği görülmüş ise de, proliferasyon derecesinin ve duvar kalınlaşmasının daha az olduğu belirlendi. Rekanalizasyonu takiben tüm değişiklikler normale dönerken hiçbir yeni vasküler oluşum gelişmemiştir.

TARTIŞMA

Alt ekstremitte derin ven trombozunun akut hecmelerinden sonra ki 6-9 aylık sürede, takip edilen hastaların %50-70'inde venöz kapak yetmezliğinin geliştiği görülmüştür (3). Aynı şekilde, derin ven trombozunun medikal tedaviyle 6 aydan önce düzelmiş olduğu hastalarda da %44 oranında damar duvarı kalınlaşması tespit edilmiştir. Posttrombotik kronik venöz yetmezlik gelişiminin başlıca sebepleri ven duvarındaki kalınlaşma, kapaklarda meydana gelen koaptasyon kusuru ve reflüdür. Ven duvarının kalınlaşmasından bahsedebilmek için, ven duvarı kalınlığının trombozis ve trombolizis süreçlerinden önceki normal değerinin en az iki katına çıkması gerekir. Derin ven trombozunun rekanalize olmasından sonra ki aşamalarda yapılan venöz duplex incelemelerde ekojeniteyi artıran bozukluklar rahatlıkla tespit edilebilir (2,3). Posttrombotik venöz yetmezliği olan hastalarda yapılan histolojik incelemelerde tromboze ven segmentinde fibrotik kalınlaşma geliştiği gösterilmiş; ancak duvar kalınlaşmasına bağlı kısmi obstrüksiyondan ziyade, kronik reflü varlığının kronik venöz yetmezliğine neden olduğu ileri sürülmüştür (9).

Derin ven trombozu sonrası gelişebilecek tam bir obstrüksiyon, ven duvarında daha ciddi morfolojik değişikliklere neden olacaktır. Tromboz oluşumunu takiben büyük miktarda trombin oluşur (10). Trombin, gelişmekte olan trombüsün içinde bulunan fibrin ve fibrinojene bağlanır. Bu fibrin-trombin kompleksi biyolojik ve fonksiyonel bakımdan aktif olarak trombüsün

içinde kalır. Bu esnada trombolizis oluşmaya başlar ve plazmin trombüsü eritir. Trombolizis ilerlerken trombüs içerisindeki lokal olarak aktif haldeki trombin serbest kalmaya başlar. Trombinin lokal etkisi, kronik venöz tıkanıklıktaki yeni fibrin oluşumunun ve trombüs yayılmasının neden olduğu lokal yangısal hücre infiltrasyonunda görev alan hücrelerin ve ven duvarının üzerinde tanımlanmış olan trombin reseptörlerinin uyarılmasıyla devam eder. Trombin reseptörünün koagülasyon esnasında birçok hücrel cevabı uyardığı uzun zamandan beri bilinmektedir (11). Monositler için kemotaktik etki gösteren trombin vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar ve mezankimal hücreler gibi bazı hücre tipleri için de mitojenik etkilidir (12). Trombin, vasküler endotel yokluğunda kontraksiyonu, endotelin sağlam olduğu hallerde ise relaksasyonu uyarır (13). Trombin reseptörü, bu hücrel cevapların çoğunluğunda aracılık ederken, trombin de proteolitik olarak aktive edilmiş trombin reseptörünün aracılığıyla damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyarır.

Geçici venöz tıkanıklarda aktif trombin dolaşımdan devamlı temizlenecek ve olay yerinin uzağında bulunan antitrombin III vasıtasıyla inaktive edilecektir (1). Bu çalışmada da gösterildiği gibi, subakut venöz oklüzyonun düzelmesini takiben patolojik değişikliklerin ven duvarına kronik etki etmesi ortadan kalkmaktadır. Yani, yeni trombüs ve fibrin oluşumu olmadığı için trombinin kendi reseptörüyle etkileşim olasılığı azalacak ve kronik etkisi ortadan kalkacaktır.

Derin venöz trombozun sabit bir hızda ilerleyen organizasyonu ve rekanalizasyonu gösterilmiştir (14). Trombüs organizasyonunun akut fazının başlangıcında, lokal sitokinlerin jenerasyonu vasıtasıyla dolaşımda bulunan yangı hücreleri bu bölgeye toplanır (4). Dolaşımdaki mononükleer ve polimorf nükleer lökositlerin infiltrasyonu, katepsin-G ve elastaz gibi enzimler vasıtasıyla plazmine bağlı olmayan bir fibrinolizisi başlatır (15). Trombüsün rezolüsyonunun devam etmesi, trombüs içerisindeki plazminin lokal jenerasyonunu kapsayan doku plazminojen aktivatörünün (tPA) ve ürokinaz tip plazminojen aktivatörünün (uPA) her ikisinin de aktif olarak olaya karışmasını gerektirir. Her iki plazminojen aktivatörü trombüs içerisindeki mono-

sitler tarafından trombüsün her tarafına dağıtılır. Ancak doku plazminojen aktivatörünün (tPA) lokal ve komşu epitele etkisinin trombüsün rezolüsyonunda gerekliliği gösterilememiştir. Nitekim kliplerin 24 saat içinde çıkarıldığı zaman tıkalı ven bölümünün tekrardan açıldığı, ama 72 saat sonra çıkarıldığında artık lümenin tamamen tıkalı olduğu gözlemlendi.

Anjiogenezin ilerlemesinde asidik fibroblastik büyüme faktörü, bazik fibroblastik büyüme faktörü, tümör nekrozis alfa faktör ve vasküler endotelial büyüme faktörleri gibi birkaç büyüme faktörünün anjiogenezinin önemli olduğu görülmüştür (16). Plazminojen aktivatörleri, esas olarak da hücresele bağlantılı bir reseptörle ilişkili olan uPA anjiogenezinin önemli mediyatörleridir (17). Trombinin anjiogenezi desteklemesi membrana bağlı trombin reseptörünün aktivasyonunu gerektirir. Grup 1 ve Grup 2B'deki ratlarda, lokal trombin salınımı ve lokal uPA aktivitesiyle ilgili membran bağlantılı reseptörün uyarılması, anjiogenezin başlamasını ve sonuçta da yeni vasküler oluşumların gelişimini açıklayabilir. Trombüs organizasyonunda neointimal proliferasyona benzeyen bir intimal hiperplazi tanımlanmış olup bu çalışmada da buna benzer bulgular elde edilmiştir (6). Geçici outflow tıkanıklığı oluşturulan deneklerde (Grup 2A) lokal aktif trombin ve uPA birikiminin hızla azalması, yeni vasküler yapıların gelişmemesinin nedeni olabilir.

Sonuç olarak, ratlarda kronik outflow obstruksiyonuna bağlı tromboz trombüsün erkenden yayılmasına, trombolizis ve rekanalizasyonun gecikmesine, yeni vasküler kanalların oluşmasına ve miyosellüler proliferasyona sebep olmaktadır. Bir pluripotent proteaz olan trombin, ilginç özelliklere sahip reseptörü sayesinde, bu gelişmelerin çoğunda aktif olarak rol almaktadır. Derin ven yetmezliğine götüren bu değişikliklerin önlenmesinde akut venöz oklüzyon yapan nedenlerin en kısa sürede ortadan kaldırılması ve trombin aktivitesinin en kısa sürede önlenmesi önemlidir.

KAYNAKLAR

1. See-Tho K, Harris J: Thrombosis with outflow obstruction delays thrombolysis and results in chronic wall thickening of rat veins. *J Vasc Surg* 24: 115-123, 1998.
2. Fowlkes JB, Strieter RM, Downing LJ, et al: Ultra-

- sound echogenicity in experimental venous thrombosis. *Ultrasound Med Biol* 24: 1175-1182, 1998.
3. Caprini JA, Arcelus JI, Hoffman KN, et al: Venous duplex imaging follow-up of acute symptomatic deep vein thrombosis of the leg. *J Vasc Surg* 21: 472-476, 1995.
4. Wakefield TW, Strieter RM, Prince MR, et al: Pathogenesis of venous thrombosis: a new insight. *Cardiovasc Surg* 5: 6-15, 1997.
5. Northeast ADR, Soo KS, Bohrow LG, et al: The tissue plasminogen activator and urokinase response in vivo during naturel resolution of venous thrombosis. *J Vasc Surg* 22: 537-539, 1995.
6. Sigel B, Swami V, Can A, et al: Intimal hyperplasia producing thrombus organisation in an experimental venous thrombosis model. *J Vasc Surg* 19: 350-360, 1994.
7. Solis MM, Vitti M, Cook J, et al: Recombinant soluble human thrombomodulin: A randomized, blinded assesment of prevention of venous thrombosis and effects on hemostatic parameters in a rat model. *Thromb Res* 73: 385-394, 1994.
8. Stanton C, Ross AP, Hutson S, Wallin R: Processing and expression of rat and human clotting factor-x-encoding cDNAs. *Gene* 169: 269-273, 1996.
9. Markel A, Manzo RA, Bergein RO, Strandness DE: Valvular reflux after deep vein thrombosis: Incidence and time of occurrence. *J Vasc Surg* 15: 377-384, 1992.
10. Kumar R, Beguin S, Hemker HC: The influence of fibrinogen and fibrin on thrombin generation: Evidence for feedback activation of the clotting system by clot bound thrombin. *Thromb Haemost* 72: 713-721, 1994.
11. Burnand KG, Gaffney PJ, McGuinness CL, Humphries J, Quarmby JW, Smith A. The role of the monocyte in the generation and dissolution of arterial and venous thrombi. *Cardiovasc Surg* 6: 119-125, 1998.
12. Hung DT, Vu TKH, Nelken NH, et al: Thrombin induced events in non platelet cells are mediated by the unique proteolytic mechanism established for the cloned platelet thrombin receptor. *J Cell Biol* 116: 827-832, 1992.
13. Walz DA, Anderson GF, Ciaglowksi RE, et al: Thrombin elicited contractile responses of aortic smooth muscle. *Proc Soc Exp Biol Med* 180: 518-526, 1985.
14. Wakefield TW, Linn MJ, Henke PK, et al: Neovascularization during venous thrombosis organization: A preliminary study. *J Vasc Surg* 30: 885-892, 1999.
15. Gramse M, Bingelheimer C, Haverman K: Degradation of human fibrinogen by chymotrypsin-like

- venous 5-1182.
- Venous tomatic Surg 21:
- al: Pat- insight.
- al: The use res- f veno- 1995.
- perpla- 1 expe- sc Surg
- iant so- omized, venous umeters 1994.
- Proces- clotting 69-273.
- ess DE: s: Inci- 15: 377-
- ence of eration: clotting nb Ha-
- ss CL, role of olution sc Surg
- rombin ediated blished : J Cell
- , et al: f aortic 30: 518-
- Neovas- anizati- 85-892.
- Degra- sin-like
- neutral protease from human granulocytes. Thromb Res 19: 201-209, 1980.
16. Yashida S, Ono M, Shono T, et al: Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. Mol Cell Biol 17: 4015-4023, 1997.
17. Van Hinsberg VMW, Koolwijk P, Hanemaaijer R: Role of fibrin and plasminogen activators in repair associated angiogenesis: In vitro studies with human endothelial cells. EXS 79: 391-441, 1997.