

Safen Ven Greft Aterosklerozunun Önlenmesinde Glutaraldehit'in Rolü: Deneysel Modelde Koroner Bypass Çalışması ile Değerlendirme

The Role of Glutaraldehyde to Preventing Saphenous Vein Graft Atherosclerosis: An Experimental Research in Coronary Bypass Study

Dr. Mehmet Beşir AKPINAR,^a
Dr. İlker ALAT,^b
Dr. İclal GÜRSES,^c
Dr. Mehmet ÖZGEL,^d
Dr. Erdoğan ÖZTÜRK,^e
Dr. Aytaç YÜCEL,^f
Dr. Kadir BUT^g

^aKalp ve Damar Cerrahisi Kliniği,
TÜTAV Şifa Hastanesi, İzmir
^bKalp ve Damar Cerrahisi Kliniği,
Afiyon Devlet Hastanesi, Afiyonkarahisar
^cPatoloji AD,
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mersin
^dGöğüs Cerrahisi Kliniği,
Malatya Devlet Hastanesi, Malatya
^eAnesteziyoloji ve Reanimasyon AD,
Bezmîâlem Vakıf Üniversitesi
Tıp Fakültesi, İstanbul
^fAnesteziyoloji ve Reanimasyon AD,
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Malatya
^gAnesteziyoloji ve Reanimasyon AD,
Ankara Eğitim Araştırma Hastanesi,
Ankara

Geliş Tarihi/Received: 09.03.2011
Kabul Tarihi/Accepted: 11.05.2011

Bu çalışma Türk Kalp Damar Cerrahisi
Derneği IX. Ulusal Kongresi (01-05 Kasım
2006, Antalya)'nde 'Ödüle Aday Bildiriler'
bölümünde sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Mehmet Beşir AKPINAR
TÜTAV Şifa Hastanesi,
Kalp Damar Cerrahisi Kliniği, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
mbakpinar@hotmail.com

Copyright © 2011 by
Ulusal Vasküler Cerrahi Derneği

ÖZET Amaç: Aortokoroner bypass sonrasında safen ven greftlerinin başlıca tıkanma nedeni neointimal hiperplazidir. Aldehitlerin antimitotik etki ile intimal hiperplaziyi önlediğine dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmanın amacı bypass öncesinde safen venin glutaraldehit ile muamele edilmesi ile neointimal hiperplazi ve düz kas hücre proliferasyonunun önlenip önlenemeyeceğini araştırmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Glutaraldehit solüsyonunun safen ven greft hastalığı üzerine etkileri köpekler üzerinde yapılan deneysel çalışmada incelendi. Kontrol ve çalışma grubu olarak iki grup oluşturuldu ve her iki grupta da çalışan kalpte bypass tekniği ile bypass operasyonları uygulandı. Kontrol grubunda sefen venler sadece Ringer Laktat solüsyonu ile muamele edilirken (Kontrol grubu, n=5), çalışma grubunda safen venler %1,8 lik glutaraldehit solüsyonu ile muamele edildi (Glutaraldehit grubu, n=5). Ameliyattan otuz gün sonra implante edilmiş olan safen ven greftleri çıkarıldı ve histopatolojik olarak hematoxylin-eosin (HE), Masson's trichrom (MT), elastic von Gieson (EVG), alfa smooth muscle actin (ASMA) ve Factor 8 histokimyasal ve immünohistokimyasal boyaları ile değerlendirildi. **Bulgular:** Glutaraldehit grubunda bir denek ilk 24 saatte miyokard enfarktüsü nedeniyle kaybedildi, bir denek de operasyonun 14. Gününde kaybedildi. Glutaraldehit grubunda kaybedilen ilk olgu dışında çalışmaya devam edilen dört olguda neointimal hiperplazi bulgularına rastlanmazken kontrol grubunda tüm kesitlerde neointimal hiperplazi gelişmiş olduğu gözlemlendi. Gruplar kollajen ve elastik lif artışı yönünden karşılaştırıldığında anlamlı farklar tespit edildi. Kontrol grubunda üç denekte greft duvarına tutunmuş organize trombüse rastlanırken glutaraldehit grubunda böyle bir bulgu saptanmadı. Glutaraldehit grubunda muhtemelen kimyasal iritasyona bağlı olduğunu düşündüğümüz inflamatuvar yanıt bulguları ve bir olguda da intimal diseksiyon saptandı. **Sonuç:** Glutaraldehitin arteriyelize safen ven greftlerinde ateroskleroz sürecinin bir parçası olan düz kas hücre hiperplazisi ve neointimal hiperplaziyi engellemiş olduğu görüldü. Glutaraldehite bağlı kimyasal iritasyon sonucu oluşmuş olduğunu düşündüğümüz diseksiyon ve inflamatuvar yanıtın doz titrasyonları ile kabul edilebilir düzeye çekilebileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışma bu konuda yapılacak diğer çalışmalar için temel teşkil edecektir.

Anahtar Kelimeler: Venler; glutaraldehit; koroner arter bypass greft; restenoz; intimal hiperplazi

ABSTRACT Objective: Most of the saphenous vein grafts occlude after aortocoronary bypass surgery due to the neointimal hyperplasia. There are some studies suggest that the aldehydes have anti-mitotic effects preventing intimal hyperplasia. The purpose of this study is to search whether tanning of the saphenous grafts with glutaraldehyde solution before their implantation can prevent both neointimal hyperplasia and smooth muscle proliferation. **Material and Methods:** The effects of glutaraldehyde on saphenous vein graft disease was evaluated in an experimental study on dogs. Coronary artery bypass grafting operations were performed in each subject by using beating heart technique. The subjects were categorized into two different groups. In the first group saphenous veins were treated with only ringer lactate solution (Control group, n=5). In the second group saphenous veins were fixed with %1.8 glutaraldehyde solution (Glutaraldehyde group n=5). After thirty days we extracted the implanted vein grafts and evaluated histopathologically with hematoxylin-eosin (HE), Masson's trichrom (MT) type 1 collagen, elastic van Gieson (EVG), alfa smooth muscle actin (ASMA) and factor 8 immunohistochemical stains. **Results:** In the glutaraldehyde group one subject died in first 24 hour and the other one died 14th day of the operation. In the glutaraldehyde group neointimal hyperplasia was not observed; nevertheless in the control group advanced neointimal hyperplasia was seen in all slices. When compared the increase in both collagen and elastic fibers in the groups to each other, there was significant difference between the groups. In the grafts of the glutaraldehyde group, thrombus incorporated to the graft wall was not observed however it was encountered in the three subjects of the control group. Inflammatory response which was thought to be due to chemical irritation of the glutaraldehyde developed in glutaraldehyde group. **Conclusion:** It was showed that glutaraldehyde suppressed the neointimal hyperplasia and smooth muscle cell proliferation which are processors of the atherosclerosis of the arterIALIZED saphenous vein grafts. We believe that the side effects of glutaraldehyde like dissections or inflammatory responses can be surmounted by means of optimal dose titrations of the drug. This study will set the baseline for further studies.

Key Words: Veins; glutaraldehyde; coronary artery bypass grafting; restenosis; intimal hyperplasia

Damar Cer Derg 2011;20(1):12-21

Koroner bypass cerrahisinde arteriyel greftler popülerlik kazanmış olmasına rağmen safen ven greftleri birçok klinikte kullanılmakta, arteriyel greftlerin yanında ve reoperasyonlarda ilk seçenek olarak konumunu korumaktadır. Koroner bypass cerrahisini takip eden ilk 1 ay içerisinde en sık safen ven tıkanıklık nedeni trombotik oklüzyon iken; daha sonraki tıkanmaların ana nedeni neointimal hiperplazi sonucu gelişen greft ateroskleroza, başka bir deyişle intimal hiperplazi ve accelerated atherosclerosis olarak adlandırılan hızlanmış aterosklerozdur.^{1,2} Ne yazık ki safen ven greftlerinde yıllık tıkanıklık oranı 1-6 yıllar için %1-2, 6-10 yıllar için %4-5'tir. 10 yıl sonra greftlerin %60'ı açık kalmakta ve sadece %50'sinde hiçbir stenoz belirtisi görülmemektedir.^{3,4}

Safen ven greft hastalığının önlenmesi için gen terapileri veya farklı cerrahi teknikler geliştirilmeye çalışılmaktadır.^{5,6} Bu çalışmada antimitotik etkisi nedeniyle intimal hiperplaziyi inhibe etme özelliği olan aldehitlerden 'glutaraldehit'in koroner pozisyonda safen ven greft hastalığı üzerine olan etkileri incelenmiştir.⁷ Nitekim daha önce benzer olarak alt ekstremitte revaskülarizasyon ameliyatlarında alternatif greft olarak glutaraldehit ile muamele edilmiş safen ven greftleri kullanılmış ve önerilmiştir.⁸ Bununla birlikte araştırmalarımıza göre bu çalışma glutaraldehit ile muamele edilmiş safen ven greft çalışmaları arasında koroner pozisyonda bypass olarak yapılan ilk çalışmadır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma 2003-2004 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alındıktan sonra Malatya Belediyesi Hayvan Toplama ve Barındırma Merkezi tarafından sağlanan karışık cinsteki erkek köpekler kullanılarak yapıldı.

On günlük gözlem süreci sonucunda iki ayrı veteriner hekimin gözetiminden geçerek 'sağlıklıdır' onayı alınmış olan ortalama aynı yaş (2 ila 4 yaş), aynı kilo ve boydaki 10 erkek köpek çalışmaya dahil edildi. Deneklerden 5 tanesi kontrol grubu, 5 tanesi de glutaraldehit grubu olacak şekilde iki grup oluşturuldu. Bir'den on'a kadar K1, K2,

TABLO 1: Deneklerin boy*, bacak boyu ve ağırlıklarını gösterir tablo.

	Kod	Boy* (cm)	Bacak Boyu (cm)	Ağırlık (kg)
Kontrol Grubu				
	K1	71	61	25
	K2	70	68	23
	K3	68	68	25
	K4	70	66	22
	K5	70	69	30
Ortalama		69.8	66.4	25
Çalışma Grubu				
	K6	62	64	24
	K7	50	52	20
	K8	63	63	20
	K9	56	54	22
	K10	70	68	26
Ortalama		60.2	60.2	22.4

* Boyun toraks bileşkesi ile kuyruk sokumu arası mesafe kastedilmiştir.

K3,.....K10 şeklinde kodlanan deneklerin ilk beş tanesi kontrol grubu, son beş tanesi de glutaraldehit grubu olarak düzenlendi (Tablo 1).

Deneklerin tamamı aynı kalori ve içeriğe sahip diyetle beslendi.

CERRAHİ TEKNİK

Deneklere 5 mg/kg ksylasin hidroklorid (Rompun®, Bayer, İstanbul, Türkiye) ve 7.5 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, Bandırma, Türkiye) intramuskuler (İM) enjeksiyonu ile premedikasyon yapıldıktan sonra İnönü Üniversitesi Hayvan Laboratuvarı'na getirildi ve entübe edilerek respiratöre bağlandı, 3 MAK (Minimal Alveolar Konsantrasyon) isofluran ve 3 Lt/dk oksijen ile gaz anestezisi altında uyutulduktan sonra EKG ve oksijen saturasyonu monitörize edildi.

Enfeksiyon profilaksisi için 1 g. sefazolin sodyum (Cefamezin®, Eczacıbaşı, Lüleburgaz, Türkiye) ve 500 mg amikasin (Mikasin®, Fako, İstanbul, Türkiye) İM olarak yapıldı.

Sağ lateral dekübit pozisyonunda yatırılan denekler tüyleri traş edildikten ve operasyon sahaları antiseptik solüsyonla (Polyvidon İodin, Glividon®, Bikar, İstanbul, Türkiye) boyandıktan sonra steril örtülerle örtüldü ve steril cerrahi mal-

zemeler ve önlükler kullanılarak operasyona başlandı.

Sol 5. interkostal aralıktan yapılan insizyonla toraksa girildi ve kalbe ulaşıldı. İV olarak 1000 ünite heparin sodyum (Nevparin® , Mustafa Nevzat İlaç Sanayii, İstanbul, Türkiye) yapıldıktan sonra perikard açıldı ve koroner damarlar tanımlandı.

GREFT HAZIRLIĞI

Aynı anda sağ arka ekstremiteden safen ven çıkarıldı. 250 cc ringer laktat (Laktatlı Ringer®, Eczacıbaşı-Baxter, İstanbul, Türkiye) içine 1000 ünite heparin sodyum konuldu ve hazırlanan solüsyon kullanılarak, ortalama bir basınçla şişirilen venin dalları 4/0 serbest ipek ile bağlandı.

Kontrol grubunda safen venler, çıkarıldıktan sonra 250 cc ringer laktat içine 1000 ünite heparin katılmış solüsyonla muamele edilirken; çalışma grubunda safen ven çıkarıldıktan sonra ringer laktat ile hazırlanan 100 cc %1.8'lik glutaraldehit (Cidex, Johnson&Johnson Medical, UK) içine 1 ampül (%8.4 10 ml) sodyum bikarbonat (Molar sodyum bikarbonat®, Biosel, İstanbul, Türkiye) ve 1000 ünite heparin katılmış solüsyon içinde 10 dakika boyunca bekletildi ve bu sırada her 1 dakikada bir aynı solüsyondan 10 cc alınarak venin içinden geçirildi. 10 dakikanın sonunda ven grefti 10 kez de içerden olarak %1.8'lik glutaraldehitli solüsyona maruz kalmış oldu. Bu işlemin ardından ringer laktat içine daldırılan venler içinden bir kez de 10 cc RL geçirilerek yıkandı ve greft olarak kullanıldı.

ANASTOMOZ

Kalpde Ön inen Dal (Left Anterior Descending: LAD) mümkün olan en proksimal bölgeden olacak şekilde; 5/0 prolent ile dönülerek teflon plejit (pledget) ile desteklendi ve bu suture (askıya) siner takıldı. İlk askının yaklaşık 1,5 cm distalinden ve bu aradan (varsa) çıkan diagonal arter dalının arkasından aynı yöntemle birer askı daha geçildi ve plejitle desteklenerek siner takıldı.

En proksimaldeki siner 1 saniye sıkılıp gevşetildi. Sonra 1 dakika sıkılıp 1 dakika gevşetilerek iskemik önkoşullama (preconditioning) işlemine geçilmiş oldu. 1 dakika reperfüzyon sonrası 5 dakika iskemi ve 5 dakika reperfüzyon uygulandı.^{9,10}

Daha sonra tüm sinerler sıkıldı ve tesbit edildi. LAD'ye arteriotomi yapılarak çalışan kalpte bypass (Beating heart) yöntemi ile bypass aşamasına geçildi.

Oksijen püskürtme yöntemi ile sahadaki kan temizlenirken 7/0 prolent kullanılarak safen ven-LAD anastomozu yapıldı. Anastomoz bittikten sonra safen ven greftine plastik buldok klemp konarak tüm sinerler gevşetildi. Ortalama anastomoz süresi 8-10 dakika olarak ölçüldü. Proksimal anastomozlar 5/0 prolent dikiş kullanılarak desenden aortaya yapıldı. LAD, safen ven grefti - nativ koroner kompetisyonu olmaması için anastomoz proksimalinden bağlandı. Tüm deneklerde anastomoz sonrası greftte akım ve nabız vardı.

Heparini nötralize etmek amacıyla 1mg. protamin İV olarak yapıldı. Kanama kontrolü sonrasında 7. interkostal aralıktan 36 numara toraks dreni yerleştirilerek su altı drenaj sistemine bağlandı. 2 numara vikril (Vicryl) kullanılarak kostalar yaklaştırıldı ve torakotomi insizyonu kapatıldı. Bacak insizyonu ve torakotomi insizyonlarını kapatmak için cilt altı 2/0, cilt de 4/0 vikril ile devamlı olarak dikildi.

AMELİYAT SONRASI ERKEN VE GEÇ DÖNEM TAKİP

Toraks su altı drenaj sisteminden hava ve/veya sıvı (kan, lenf vs) drenajı olup olmadığını kontrol etmek için iki saat süreyle entübe olarak gaz anestezisi altında gözlenen deneklerin bu süre sonunda anestezisine son verilerek 3 lt/dk olmak üzere oksijen inhalasyonu ile tam olarak uyanması beklenildi. Hiçbir denekte böyle bir komplikasyon görülmedi ve hiçbir denek kanama ya da hava kaçağı sebebiyle revizyona alınmadı. Denekler uyanıp bir-iki kez öksürdükten sonra toraks drenleri çekildi ve ekstübe edilerek post operatif analjezi için 5 mg/kg ketamin intramuskuler olarak yapıldı. Tekrar belediyeye ait hayvan barınağındaki kafeslerine alınan denekler her kafeste bir denek olacak şekilde yerleştirilmek suretiyle ayrı kafeslerde iki ayrı veteriner gözetiminde takibe alındı.

Ameliyat sonrası dönemde ilk 5 gün sefazolin sodyum 2x1 g ve amikasin 2x500 mg intramuskuler yapılan deneklerin yara bakımları için polyvidon

iodin solüsyonu kullanıldı. Hiçbir denekte yara enfeksiyonu gelişmedi. Deneklere post operatif ilk günden itibaren 30 gün boyunca 150 mg asetil salisilik asit (Ecopirin®, Bayer, İstanbul, Türkiye) yemeklerine katılmak suretiyle oral olarak yedirildi. Her bir dozun her bir denek tarafından alınmış olduğuna özellikle dikkat edildi.

ÖRNEKLEME

1. Hem çalışma hem de kontrol grubunda; greftin dalları 4/0 serbest ipekle bağlandıktan hemen sonra 0.5 cm'lik safen ven segmentleri inceleme için alındı ve 'Evvel' kelimesinin baş harfine istinaden 'E' olarak kodlandı.

2. Glutaraldehit grubunda safen ven glutaraldehit ile fikse edildikten sonra 0.5 cm'lik bir segment daha alındı ve 'Evvel Glutaraldehit' anlamında 'EG' olarak kodlandı.

3. 30 günün sonunda çıkarılan greft segmentleri de 'Sonra' anlamında 'S' olarak kodlandı.

Tüm parçalar distile su ile tamponlanmış %10'luk formaldehit solüsyonunda histopatolojik inceleme amacıyla fikse edildi.

ÖTONAZİ VE SON ÖRNEKLEME

Shintani'nin çalışmasında da belirtildiği gibi 30 günlük süreç köpeklerde safen veninin arteriyalizasyonu için yeterli bir süre olarak kabul edildiği için, otuz gün sonra 5 mg/kg ksylasin hidroklorür ve 5 mg/kg ketamin hidroklorür İM ile sedatize edilen denekler hayvan laboratuvarına alındı ve entübe edildi.¹¹

Barınaklarından alınan denekler İnönü Üniversitesi Hayvan Laboratuvarı'na getirildi. İlk operasyonda olduğu gibi gaz anestezisi ile uyutulan deneklere eski insizyon yerinden sol torakotomi yapıldı. Koroner bypass grefti tanımlandı, greft travmatize edilmeden sağ atriotomi ile aspiratör kullanılarak eksanguinasyon yapıldı ve denekler bu şekilde sakrifiye edildi. Safen ven greftleri aort ve kalp tarafındaki uçlardan bir kısım aort ve bir kısım myokard dokusu içerecek şekilde eksize edilerek çıkarıldı ve köpük strafor üzerine uzatılarak fazla travmatize etmeden %10'luk formaldehit solüsyonunda 48 saat fikse edildi.

HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Histopatolojik değerlendirme İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda uzman bir patolog tarafından ve materyallerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin yapıldı.

Fiksasyonu takiben koroner ve aort anastomoz bölgelerinden birer adet, ve greftten birbirine eşit uzaklıkta (biri tam greftin ortasından) üç adet kesit alındı. Kesitler aort tarafından başlamak üzere SA, S1, S2, S3 ve SK olarak kodlandı (Şekil 1).

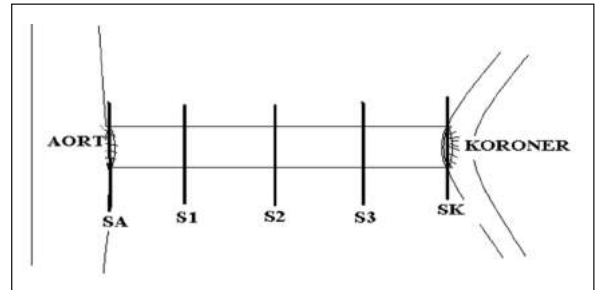
Bu kodlamaların sonunda kontrol grubundan E kodlu 5 ve S kodlu 25 olmak üzere toplam 30, çalışma grubundan da E kodlu 5, EG kodlu 5 ve S kodlu 25 kesit olmak üzere 35 kesit incelenmeye alınmış oldu.

Doku takip işlemi sonrasında tüm kesitlere Hematoksilen eosin (HE), Masson trikrom, Elastik von Gieson (EVG) konvansiyonel histokimya boyaları ile; Alfa smooth muscle actin (α SMA) ve Faktör 8 immünohistokimyasal boyaları uygulandı. Tüm kesitlerde lümen, endotel, intima, media, adventisya ve perigreft doku patolojik yönlerden incelendi.

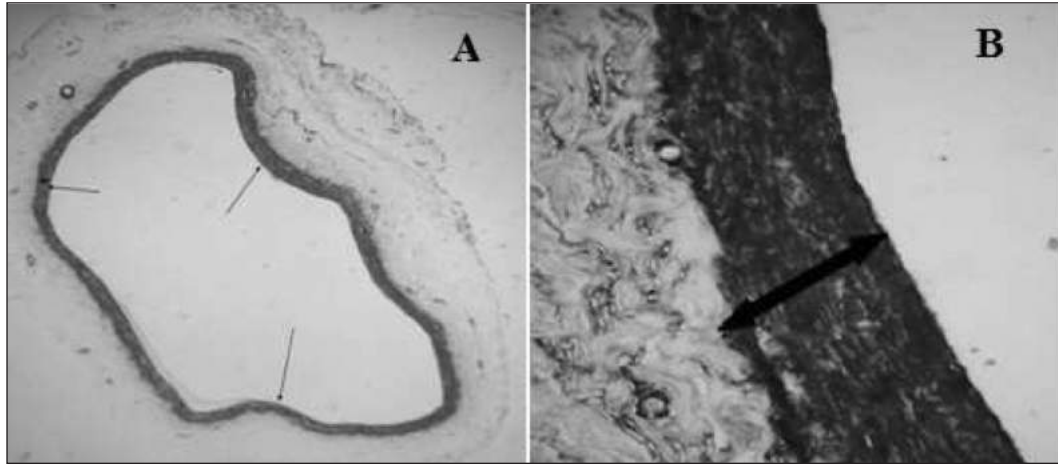
Lümen açıklığı, trombus veya diseksiyon varlığı, endotel, kollajen ve elastin yapısı ve devamlılığı, kalsifikasyon varlığı, makrofaj yoğunluğu, inflamatuvar yanıt ve düz kas hücre hiperplazisi yönünden yapılan değerlendirmeler not edildi.

Damar duvar kalınlıkları hematoksilen eosin, Masson trikrom ve alfa smooth muscle actin boyaları ile değerlendirildi.

Endotel hücre bütünlüğü Faktör 8 ile değerlendirildi.



ŞEKİL 1: Safen ven greftinden kesit alma planı.



ŞEKİL 2: S2 kesitinde ölçüm yapılacak bölgelerin tesbit edildiği noktaları (A) ve ölçüm görüntüsünü gösteren (B) şekil (Alfa smooth muscle actin immünohistokimya boyası X40 ve X300).

Faktör 8 ve alfa smooth muscle actin boyaları çalışmadan önce insan dokuları eksternal kontrol olarak kullanılarak köpek dokusunda aynı seansta çalışıldı. Bu boyaların köpek endotel ve düz kas hücrelerinde de boyandığı görüldüğü çalışmada kullanılmaya karar verildi.

Değerlendirme Olympus BX50® (Olympus Optical CO., Ltd. Model V-MDOB, Japan) mikroskopu ile yapıldı.

Damar duvar kalınlıkları S2 kesitlerde (greftin tam ortasına ait kesit) X40 büyütme ile çekilen fotoğraflarda Corel Draw® 9.0 bilgisayar tasarım programı kullanılarak, ölçülecek olan üç kadran belirlendikten sonra %300 büyütme altında 'mm.' uzunluk birimi ayarlanarak yapıldı (Şekil 2) (Tablo 2).

BULGULAR

Deneklerin boy ortalamaları glutaraldehit grubunda 69.8 cm, kontrol grubunda 60.2 cm, ağırlık ortalamaları glutaraldehit grubunda 25 kg, kontrol grubunda 22.4 kg olarak ölçüldü (Tablo 1).

Glutaraldehit grubunda bir olgu post operatif ilk 24 saat içerisinde (K6), bir olgu da post operatif 14. gün (K10) kaybedildi. Her iki deneye de üç vücut boşluğu (kraniyum, toraks ve abdomen) açılarak otopsi yapıldı. Otopsi esnasında şüpheli görülen organlardan biyopsiler alınarak histopatolojik değerlendirme yapıldı. Sonuçta her iki denenin de

TABLO 2: Deneklerin S2 greft kesitlerinde Masson trikrom ve alfa smooth muscle actin boyalarıyla boyanmış kesitlerden karşılaştırmalı kontrollerle üç kadrandan ölçülen intima + media kalınlığı ve ortalaması.

Gruplar	Kodlar		İntima+Media Kalınlığı			Ortalama
	Evvel	Sonra	M1	M2	M3	
Kontrol Grubu						
	1E		1.47	1.12	1.66	1.42
		1S	10.04	9.75	10.72	10.17
	2E		3.73	3.09	4.59	3.8
		2S	12.8	10.54	9.04	10.79
	3E		5.3	5.57	5.04	5.3
		3S	20.18	23.37	20.06	21.2
	4E		5.2	4.86	5.42	5.16
		4S	19.04	21.99	17.51	19.51
	5E		4.84	4.51	4.73	4.69
		5S	12.45	13.23	10.93	12.2
Glutaraldehit Grubu						
	6E		2.23	2.55	2.47	2.42
		6S	3.15	3.71	3.99	3.62
	7E		3.69	4.2	4.48	4.12
		7S	4.63	3.96	4.16	4.25
	8E		3	2.41	2.43	2.61
		8S	2.12	3.14	2.14	2.47
	9E		2.25	2.55	2.14	2.31
		9S	2.71	2.57	3.28	2.85
	10E		6.24	5.5	5.69	5.81
		10S	4.99	7.02	2.22	4.74

E: Evvel, S: Sonra, M1, M2, M3: 1, 2 ve 3. kadrandan ölçülen intima + media kalınlığı (X40 büyütme altında çekilen mikroskop fotoğraflarından Corel Draw bilgisayar programı ile 'mm' birimi kullanılarak yapılan ölçüm sonuçları).

(6 ve 10 numaralı denekler çalışmanın 1 ve 14. gününde kaybedilmiştir).

myokardda oluşan yaygın infarktüs sahalarına bağlı olarak kaybedildiği anlaşıldı.

İlk 24 saat içerisinde kaybedilen deneğin (K6) E kesitlerinde ven çevresinde kronik iltihabi hücre infiltrasyonu gelişmiş olduğu görüldü. Ayrıca bu denekte yapılan otopside safen ven greft çevresinde ve myokardda kronik myokardite benzer yaygın inflamatuvar yanıt elemanlarına rastlandı.

K7 kodlu denekte S2 ve S3 kesitlerinde intimal diseksiyon saptandı.

Tüm deneklerin S kesitlerinin intima + media kalınlıkları ortalaması Tablo 2'de sunulmuştur. Endotel ve lümen (Tablo 3), intima ve mediya (Tablo 4)

ve adventisya ve perigreft dokuya (Tablo 5) ait patolojik inceleme sonuçları tablolarda özetlenmiştir.

İntima + mediya kalınlıklarının ölçümleri sonucunda kontrol grubunda bir aylık bekleme süreci sonunda anlamlı artışlar saptanırken, glutaraldehit grubunda bu derece lümen daralması oluşmamış olduğu ve ateroskleroz gelişmediği gözlemlendi (ilk 24 saat içerisinde ölen denek çalışma süresini tamamlamadığından bu deneğe ait ölçümler dikkat dışı bırakıldı).

Glutaraldehit ve kontrol grubuna ait intima + mediya kalınlıklarındaki farklar Şekil 3 ve Şekil 4'te gösterilmiştir.

TABLO 3: Tüm S kesitlerinde endotel ve lümenin değerlendirilmesi (6 ve 10 numaralı denekler çalışmanın 1 ve 14. gününde kaybedilmiştir).

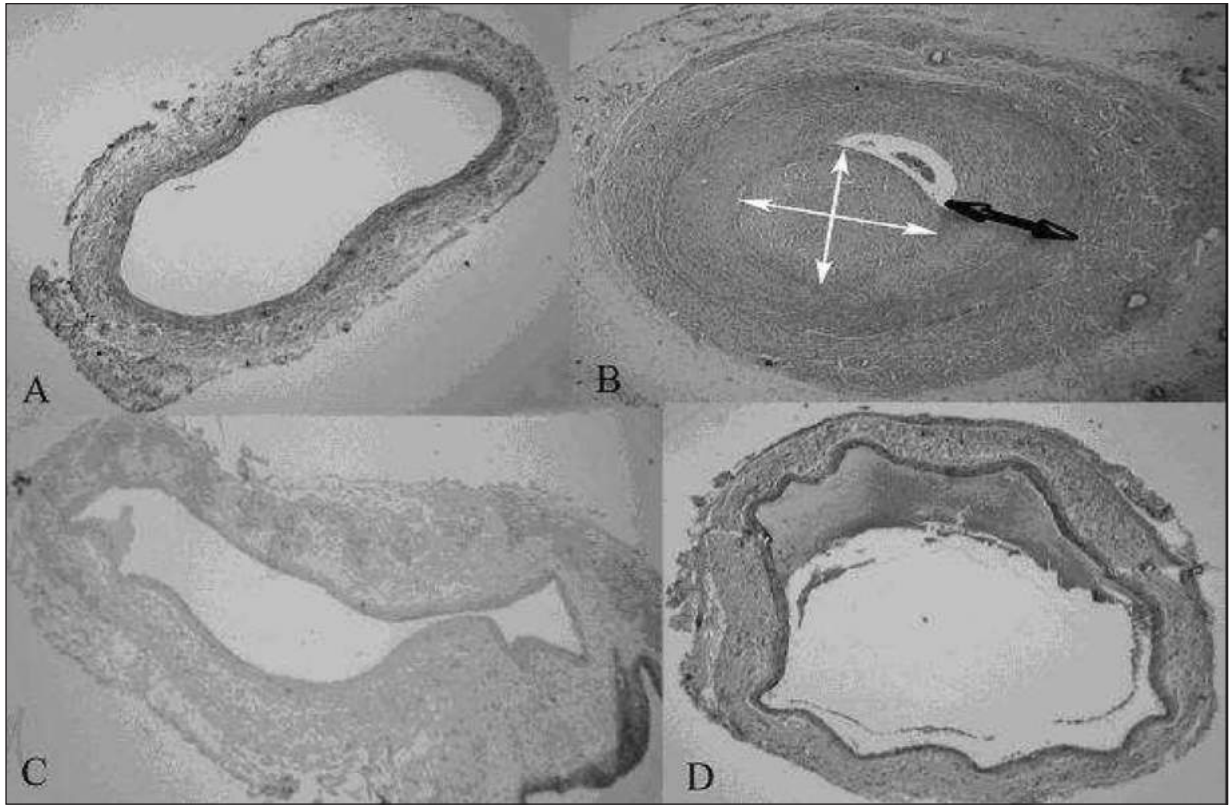
	Denek / Paramt.	Kontrol					Glutaraldehit				
		1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	10S
Endotel	Dejenerasyon	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
Lümen	Trombüs	Organize	-	Organize	Organize	-	Taze	-	-	-	Propagasyon
	Lümen Açıklığı	0%	60%	0%	0%	20%	100%	50%	100%	50%	80%
	Diseksiyon	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Kalsifikasyon	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

TABLO 4: Tüm S kesitlerinde intima ve medianın değerlendirilmesi (6 ve 10 numaralı denekler çalışmanın 1 ve 14. gününde kaybedilmiştir).

Denekler / Parametreler	Kontrol					Glutaraldehit				
	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	10S
İntima										
Kooljen lif artışı	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Elastik lif artışı	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Kalsifikasyon	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Köpük hücreleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kolesterol plakları	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnflamasyon	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Düz kas hücre proliferasyonu	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Media										
Kollojen lif artışı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elastik lif artışı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kalsifikasyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Köpük hücreleri	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kolesterol plakları	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnflamasyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Düz kas hücre proliferasyonu	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

TABLO 5: Tüm S kesitlerinde adventisya ve çevre dokunun değerlendirilmesi (6 ve 10 numaralı denekler çalışmanın 1 ve 14. gününde kaybedilmiştir).

Denekler / Parametreler	Kontrol					Glutaraldehit				
	1S	2S	3S	4S	5S	6S	7S	8S	9S	10S
Adventisya										
Kollojen lif artışı	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Elastik lif artışı	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Perigreft doku										
Granulasyon	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
İnflamasyon	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-



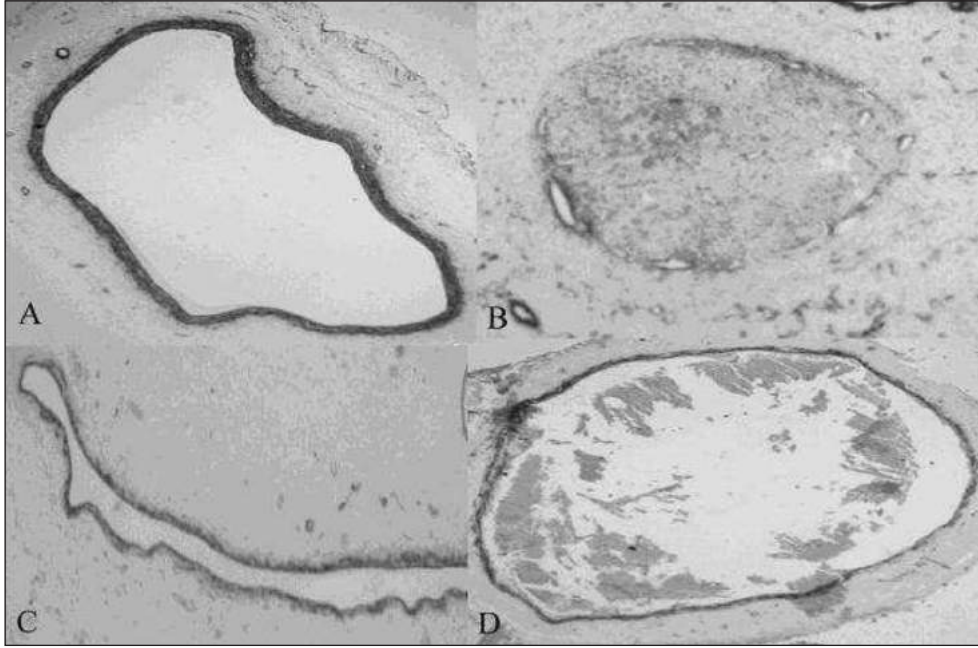
ŞEKİL 3: Evvel ve Sonra kesitlerine ait görüntüler. A fotoğrafında kontrol grubuna ait bir 'E' kesit görüntüsü ve aynı deneğe ait bir ay sonraki 'S' kesit görüntüsü. Çapraz oklar lumen içerisindeki organize trombüse ve siyah ok intima + media kalınlığındaki artışa dikkat çekmektedir. C fotoğrafında glutaraldehit grubundan bir deneğe ait 'E' görüntüsü ve D fotoğrafında aynı deneğe ait 'S' görüntüsü görülmektedir. Post operatif periyotta intima + media kalınlığında artış olmadığı izlenmektedir. (Masson's tricrom X40).

Kollajen ve elastik liflerde de benzer şekilde glutaraldehit grubunda kontrol grubu kadar artış oluşmamış olduğu gözlemlendi.

Kontrol grubunda iki olguda media tabakasında kalsifikasyona rastlarken glutaraldehit grubunda böyle bir bulgu saptanmadı.

TARTIŞMA

Bilindiği gibi koroner bypass cerrahisinde tüm ihtiyaçları karşılayacak düzeyde ideal bir greft henüz bulunmuş değildir ve bu konuda arayışlar devam etmektedir.



ŞEKİL 4: Evvel ve Sonra kesitlerine ait görüntüler. A fotoğrafında kontrol grubuna ait bir 'E' kesit görüntüsü ve aynı deneğe ait bir ay sonraki 'S' kesit görüntüsü. İntima + media kalınlığındaki artış ve lümeni tıkayan organize thrombus görülmektedir. C fotoğrafında glutaraldehit grubundan bir deneğe ait 'E' görüntüsü ve D fotoğrafında aynı deneğe ait 'S' görüntüsü görülmektedir. Post operatif periyotta intima + media kalınlığında artış olmadığı izlenmektedir. (Alfa smooth muscle actin X40).

Bu çalışmada; koroner bypass grefti olarak kullanılacak olan safen venini bir fiksatif olan glutaraldehit ile muamele ederek;

- intima ve media tabakasını fikse etmek, endotel hücre bariyerini korumak
- greft trombozunu engellemek
- safen ven greftlerinde görülen intimal hiperplaziyi
- medial düz kas hücrelerinin proliferasyonunu⁷ ve
- ateroskleroz gelişimini

yani; 'safen ven greft hastalığını' önlemeyi denedik.

Daha önceki çalışmalarda alt ekstremitte revaskularizasyonlarında glutaraldehit ile muamele edilmiş safen ven ve umbilikal kord veni çalışmaları yapılmış ve yayınlanmıştır.^{8,12} İnternet veri tabanlarından araştırdığımız kadarıyla bu çalışmamız koroner pozisyonda glutaraldehit ile muamele edilmiş safen ven çalışması olarak literatürdeki ilk çalışmadır.

Literatürde glutaraldehit solüsyonu ile farklı konsantrasyonlarda yapılmış çalışmalar mevcuttur. Wu ve ark. %3'lük glutaraldehit ile muamele ettikleri dokularda çalışırken, Uemura ve ark.%1.5, Harjula %0.2 ve Duncan %0.05'lik konsantrasyonlarda çalışmışlardır.¹³⁻¹⁵

Duncan ve grubu %0.05'lik glutaraldehit solüsyonunda 24 saat beklettikleri biyoprostetik kapaklarla yaptıkları çalışmayı yayınlamışlardır.¹⁵ Benzer şekilde Kaya ve ark.nın yaptıkları bir çalışmada köpeklerin femoral venleri çıkarılmış, heparinize ringer laktat (RL) ile yıkandıktan sonra 16 saat %0.2'lik GA solüsyonunda bekletilmiş ve anastomoz öncesi tekrar RL ile yıkanmış ve alıcı köpeğe implante edilmiştir.¹⁶

Bizim çalışmamızda intraoperatif olarak otoplastik safen ven grefti kullanılması planlandığı için daha kısa sürede fiksasyonun sağlanması amaçlandı. Bunun için de daha yüksek konsantrasyonda çalışmayı uygun bulduk.

Uemura ve ark.nın safen ven greftlerini %1.5 glutaraldehit solüsyonu ile muamele ettikleri ve %83 oranında açıklık oranı yakaladıkları çalışmaya

bakarak biz de buna yakın ancak daha konsantre bir oranda çalışırsak daha yüksek oranda greft açıklığı yakalayabilir miyiz düşüncesi ile %1.8 lik glutaraldehit konsantrasyonunda çalışmayı seçtik.

Doğal bir bariyer olan endotel tabakasının glutaraldehit ile fiksasyonu sayesinde -fonksiyonunu yitirmiş olsa bile bir damar katmanı olarak- kısmen korunduğu düşüncesindeyiz. Nitekim tüm EG kesitlerinde endotel tabakasının korunmuş olması bu hücreleri buraya fikse ettiğimizi gösterdi. Kontrol grubunun 3 tanesinde (K1, K3, K4) endotelde kayıp olduğu izlenirken, GA grubunda bir olguda fokal alanlarda endotel kaybı (K10), bir olgumuzda da diseksiyon geliştiği (K7) gözlemlendi.

Diseksiyon gelişen olgunun safen ven greftinin histopatolojik incelemesinde sadece S2-S3 kesitlerinde göze çarpan intima-media ayrışması vardı. Diğer kesitlerde diseksiyona ait herhangi bir bulguya rastlanmadı. Tüm deneklerde safen venler aynı cerrah tarafından ve travmatize edilmemeye özen gösterilerek 'no touch' tekniği ile çıkarılmaya çalışıldı. Tüm greftlerde dallar aynı yöntemle bağlandı ve ameliyat tekniği aynı idi. Bundan dolayı diseksiyonun anastomoz hatlarına uzak bir noktada olması, sadece S2 ve S3 kesitlerine lokalize olması, yan dal çıkış bölgelerinde olmaması, E kesitlerinde bulunmamış olması ve kontrol grubunda hiçbir olguda rastlanmaması nedeniyle cerrahi komplikasyondan çok; glutaraldehite bağlı olarak gelişmiş bir diseksiyon olduğu sonucuna varıldı. Nitekim daha önce yapılmış bir çalışmada da glutaraldehit ile ilişkili olabilecek bir diseksiyon geliştiği ancak bunun %0.4 oranında kaldığı belirtilmiştir.⁸

Angelini ve ark.nın hayvan (domuz) modelinde belirttiği gibi intima ve media tabakasında gözlenen kalınlaşmanın üç patolojik evresi vardır. İlk evre greft implantasyonundan bir hafta sonra mediada düz kas hücrelerinde gözlenen hızlı proliferasyon evresi, ikinci evre ilk ve dördüncü hafta arasında media ve neointimada gelişen düz kas hücre göçü, hipertrofi ve ekstrasellüler matriks sentezi, son evre de greft implantasyonunun dördüncü haftasında ve sonrasında neointimada düz kas hücre proliferasyonunun yavaş evresidir.¹⁷

Biz de bu evreleri göz önünde bulundurarak dört haftalık bir bekleme süresi sonrasında greftlerde gelişen patolojik değişimleri inceledik. Nitekim buna benzer bir şekilde Shintani ve ark.nın köpeklerde yaptığı bir çalışmada bu sürenin ateroskleroz modeli için yeterli olduğu bir kez daha vurgulanmıştır.¹¹

Mikroskopi sonrasında glutaraldehit grubunda düz kas hücrelerinin neredeyse hiç artış göstermediği; buna karşın kontrol grubunda ciddi bir düz kas hücre hiperplazisi olduğu ve tüm olgularda lümenin bu hiperplazi sonucu oluşan intima + media kalınlaşmasına bağlı olarak daralmış olduğu gözlemlendi.

Greft trombozu yönünden incelediğimiz kontrol grubunda 3 olguda lümenin organize trombüs nedeniyle tamamen tıkanmış olduğu gözlenirken (Tablo 3) glutaraldehit grubunda diseksiyon olan denekte kısmen organize trombüse, bir olguda (post operatif ilk 24 saat içinde kaybedilen olgu K6) taze trombüse, ve bir olguda da lümen içerisinde serbest olarak duran ve hiçbir yere tutunmayan (muhtemelen propagasyon göstermiş) trombüse rastlandı.

Glutaraldehit grubunda hiçbir greftte greft gövdesinde organize trombüse rastlanmadı ve 2 olguda %50 darlık olmasına karşın tüm lümenler açıktı (Tablo 3). Nitekim bu konuda Harjula'nın yaptığı çalışmada da GA ile muamele edilmiş safen venlerde trombüsün tutunamadığı düzgün bir greft yüzeyi elde edilirken kontrol grubunda dejeneratif bir yüzey ve trombüs formasyonu geliştiği belirtilmiştir.¹⁴

Tüm glutaraldehit grubu olgularda greft çevresi adventisya dokusunda belirgin bir şekilde göze çarpan inflamatuvar yanıt dikkat çekiciydi. Bu inflamatuvar yanıtın otolog doku olduğu için, dokunun kendi yapısına karşı değil, glutaraldehitin kimyasal yapısına karşı olduğu kanaatindeyiz. Nitekim kontrol grubunda böyle bir inflamatuvar yanıtı rastlanmadı.

İlk 24 saat içerisinde kaybedilen denekte daha operasyonun ilk aşamasında alınan safen kesitlerinin incelenmesinde (E kesiti) safen ven çevresinde inflamatuvar yanıt elemanlarına (makrofaj, poli-

morf nüveli lökosit, köpük hücreleri) rastlandı. Otopsi sonrasında yapılan histopatolojik inceleme ve otopside safen ven çevresinde yaygın inflamatuar yanıt ve myokarda kronik myokardit bulgularına rastlandı. Bu sonuçlara göre bu denekte daha preoperatif dönemde başlamış olan inflamatuar bir süreç varlığından bahsedilebilir. Myokard dokusundaki inflamasyonun GA'ye reaksiyoner olup olmadığı konusunda daha çok kanıtı ihtiyaç vardır.

SONUÇ

GA'in arteriyelize safen veninin atresokleroza gi-dişte rol alan patolojik yolları baskılamak suretiyle faydalı olduğunu düşündürecek sonuçlar elde edilmiştir.

Yukarıda da belirttiğimiz gibi, mikroembolik trombüsler, inflamatuvar yanıt ve lokalize diseksiyon gibi GA'ye bağlı gelişmiş komplikasyonların ilave uygulanacak tedavi rejimleriyle ve daha uygun

glutaraldehit doz titrasyonu ile tamamen ortadan kaldırılması ya da kabul edilebilir sınırlar içerisine çekilmesi mümkündür. Bu da bu çalışmanın ideal grefte henüz ulaşamadığımız yönündeki temel bil-gimizi kanıtlayan bir başka yönüdür ki, GA ile ilgili bu değerlendirmelerin de göz önünde tutulduğu ileriki çalışmalara yön vermesi anlamında büyük önem arz etmektedir.

Teşekkür

Teknik ekipman sağlama konusunda ve genel olarak çalışmanın başlatılması ve devamı aşamalarında gönüllü olarak gösterdikleri eşsiz fedakarlıklardan dolayı sayın Yunus Emre AKIN, Özgür ÖZTÜRK, Ayhan EDER, Hüseyin AYKIN, Yüksel SALİK ve Ümit TARAKÇI'ya, Malatya Belediyesi Hayvan Toplama Merkezi veteriner hekimleri sayın Sami ALTAŞ, Yasin BAZNA ve Sadık ÖZELÇİ'ye ve kurum çalışanlarına çalışmanın başından sonuna kadar gösterdikleri moral ve lojistik destekten dolayı şükranlarımı sunuyorum.

KAYNAKLAR

- Lardenoye JH, de Vries MR, Löwik CW, Xu Q, Dhore CR, Cleutjens JP, et al. Accelerated atherosclerosis and calcification in vein grafts: a study in APOE*3 Leiden transgenic mice. *Circ Res* 2002;91(7):577-84.
- Gallagher PJ. *Blood Vessels*. In: Stephan S. ed. *Histology For Pathologists*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1997. p.763-86.
- Shah PJ, Gordon I, Fuller J, Seevanayagam S, Rosalion A, Tatoulis J, et al. Factors affecting saphenous vein graft patency: clinical and angiographic study in 1402 symptomatic patients operated on between 1977 and 1999. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126(6):1972-7.
- Yavuz T, Kutsal A. The saphenous vein graft diseases. *Ana Kar Der* 2002;2(1):50-4.
- Jeremy JY, Bulbulia R, Johnson JL, Gadsdon P, Vijayan V, Shukla N, et al. A bioabsorbable (polyglactin), nonrestrictive, external sheath inhibits porcine saphenous vein graft thickening. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127(6):1766-72.
- Stoeker W, Niessen HW, Wildevuur WR, van Hinsbergh VW, Fritz J, Jansen EK, et al. Perivenous application of fibrin glue reduces early injury to the human saphenous vein graft wall in an ex vivo model. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;21(2):212-7.
- Sentein P. Glutaraldehyde and formaldehyde as fixative and antimetabolic agents. *Microsc Acta* 1975;77(2):142-7.
- Dardik H, Wengerter K, Qin F, Pangilinan A, Silvestri F, Wolodiger F, et al. Comparative decades of experience with glutaraldehyde-tanned human umbilical cord vein graft for lower limb revascularization: An analysis of 1275 cases. *Vasc Surg* 2002;35(1):64-71.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285(2):H579-88.
- Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: Part 1. *Circulation* 2001;104:2981-9.
- Shintani T, Sawa Y, Takahashi T, Matsumiya G, Matsuura N, Miyamoto Y, et al. Intraoperative transection of vein grafts with the NFkappaB decoy in a canine aortocoronary bypass model: a strategy to attenuate intimal hyperplasia. *Ann Thorac Surg* 2002;74(4):1132-8.
- Dardik H, Ibrahim IM, Dardik II. Femoral tibial-peroneal bypass: The lateral approach and use of glutaraldehyde-tanned umbilical vein. *Am J Surg* 1977;134(2):199-201.
- Uemura S. Experimental study of the modified human saphenous vein as a small caliber arterial substitute. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1983;84(5):452-64.
- Harjula A, Myllärniemi H, Nickels J, Mattila S. Morphological study of flow surface of glutaraldehyde pre-treated vascular substitutes. *Ann Chir Gynaecol* 1980;69(4):144-50.
- Duncan AC, Boughner D, Vesely I. Viscoelasticity of dynamically fixed bioprosthetic valves. II. Effect of glutaraldehyde concentration. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;113(2):302-10.
- Kaya M, Grogan JB, Lentz D, Tew W, Raju S. Glutaraldehyde-preserved venous valve transplantation in the dog. *J Surg Res* 1988;45(3):294-7.
- Angelini GD, Bryan AJ, Williams HM, Soyombo AA, Williams A, Tovey J, et al. Time-course of medial, and intimal thickening in pig venous arterial grafts: relationship to endothelial injury and cholesterol accumulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;103(6):1093-103.