

Perfüzyon Tekniği İle Vasküler Doku Kültürü

Gökay BOZKURT¹, Hasan SUNAR³, Ömer YALÇIN⁴, Çetin ALGÜNEŞ²

ÖZET

Giriş: Ateroskleroz günümüzün önemli bir sağlık sorunudur. Aterosklerozun önlenmesi ve tedavi edilebilir olması ile özellikle atreosklerozun daha sık olarak rastlandığı diabet hastalarında yaşam kalitesini artacağı öngörülmektedir. Diabetik aterosklerozda ilk lezyonların oluşumundan hiperglisemi ve hiperinsülineminin vasküler düz kas hücreleri üzerinde proliferatif etkisinin rol oynadığı muhtelif yayınlarda bildirilmektedir. Bu konuyla ilgili elde edilen veriler, sadece media tabakası düz kas hücrelerinden oluşan tek tabakalı veya endotel hücrelerini de içeren çift tabakalı hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmalardan sağlanmıştır. Bu çalışmada ise daha öncekilerden farklı olarak adventisya, media ve intima tabakalarının tümünü içeren bir damar dokusu üzerinde çalışılmıştır. Hiperglisemi ve hiperinsülineminin vasküler doku hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak için bir perfüzyon tekniği kullanılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Diabetik bir hastadan koroner by-pass ameliyatı esnasında alınan safen veninden artan parça deney materyali olarak kullanıldı. Hiperinsülinemi ve hipergliseminin etkisini araştırmak için safenlerden birisi 500 ml %5 Dextroz solusyonu 12 U kristalize insülin ile nötralize edilerek, diğeri ise kontrol amaçlı, sadece %5 Dextroz solusyonu ile perfüze edildi. Perfüzyon 6 gün sürdürüldü. Bir termostatlı ısıtıcı ile ortam ısısının 37°C'de sabit tutuldu. Perfüzyon sıvılarını oksijenize eden birer oksijenatör kullanıldı. Uygulama sonunda her iki safen veni hematoksilin-eozin ve immünohistokimyasal boyalarla boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Bulgular: Kontrol olarak kullanılan safen veninde nekroz, diğeri ise kısmen nekroz ve endotel proliferasyonu, adventisya tabakasında ise hücre bütünlüğünün bozulduğu görüldü.

Tartışma: Örneğimizdeki endotel hücre proliferasyonunun transfer esnasında oluşan hipoksik ortama ve mekanik travmaya bağlı intimal hiperplazi olduğu düşünüldü. Aterosklerozla intimal hiperplaziyi ilişkilendirebilmek için ancak daha uzun süreli bir uygulamanın yapılması gerektiği ve deney düzenine optimize edilmesi ile daha sağlıklı sonuçların alınacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Aterosklerosis, Diabetes Mellitus, Aterogenezis, Hücre kültürü

SUMMARY:

VASCULAR TISSUE CULTURE THROUGH PERFUSION TECHNIQUE

Purpose: Atherosclerosis is an important problem today. If we could prevent and cure atherosclerosis especially in diabetic patients that atherosclerosis is mostly seen, the life quality of these patients will be higher. In diabetic atherosclerosis, it is reported that hyperglisemi and hyperinsulinemi has a proliferative effect in vascular smooth muscle cells during the appearance of first lesions. The data about this subject is obtained from the studies of double layered cell cultures which also contains single layered or endotelial cells that is formed from media layer smooth muscle cells. In this study, different from other studies, we studied with a vein tissue which contains all the adventesia, media and intima layers. We use a perfusion technique to investigate the effects of hyperglisemi and hyperinsulinemi on vascular tissue cells.

Material and Method: We used a section from safen vena that is taken from a diabetic patient during by-pass operation as an experiment material. In order to investigate the effects of hyperglisemi and hyperinsulinemi, one of the safens is notralized with 500 ml %5 Dextrose solution of 12 U crystalised insulin, the other one is perfused by only %5 Dextrose solution as a control. Perfusion is carried out 6 days. The surrounding temperature is taken constant by a thermostable heater at 37°C. We used oxijenators to oxijenize the perfusion solutions. At the end of the application, the two of the safen veins are painted with hemotoxilen eosin and immunohistochemical dyes and evaluated in the light microscope.

Findings: We have seen necrosis in safen vena which was used as a control and in the other partial necrosis and endotelial proliferation was seen. We have also seen that in adventesia layer the complexity of the cell was spoiled.

Discussion: We thought that the endotelial cell proliferation is an intimal hiperplasi due to the facts of hypocsic surrounding and mechanical trauma that is formed during the transfer. In order to find a correlation between atherosclerosis and intimal hiperplasi long studies must be done and we thought that if the experimental mechanism would be optimised more powerfull results will be obtained.

Key words: Atherosclerosis, Diabetes mellitus, Atherogenesis, Cell culture.

¹ Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

² Prof. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

³ Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp - Damar Cerrahisi A.D.

⁴ Yrd. Doç. Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.

GİRİŞ

Ateroskleroz gelişmiş ülkelerde görülen ölümlerin yaklaşık olarak yarısının nedeni olarak gösterilen miyokard infarktüsü, kardiyojenik şok ve bazı periferik damar hastalıklarının en temel nedenidir. Aterosklerozun etyopatogenezi ile ilgili bugün için ileri sürülen pek çok hipotez söz konusudur. Ancak günümüze kadar bu konuyla ilgili yapılan bilimsel çalışmalara göre; bu hipotezlerden özellikle bir tanesi aterosklerozla birliktelik gösteren veya aterosklerozda görülen olayları tam olarak olmasada diğerlerine göre daha fazla açıklar gözükmektedir(1, 2). Bu hipotez "Zedelenmeye yanıt" olarak isimlendirilmektedir. Zedelenmeye yanıt hipotezine göre gelişen olayları kısaca aşağıdaki maddelerde toplamak mümkündür;

1-Endotel permeabilite artışına yada endotelde fonksiyon bozukluğuna yol açan çok hafif ve lokal zedelenme odaklarının oluşması.

2-Zedelenme odaklarında adezyon moleküllerinin oluşmasını takiben monosit ve trombosit adezyonu olması ve lipid insüstasyonu. Özellikle çok düşük yoğunluklu lipoproteinler ile birlikte düşük yoğunluklu lipoproteinlerin bir kısmının endositozla endotel hücrelerine alınırken, bir kısmının da subendotelyal bölgeye göç etmesi.

3-Endotel hücrelerinde, adezyon molekülleri sentezinin uyarılması sonucu monositlerin ve lenfositlerin zedelenme bölgesine göç etmeleri. Adezyon gösteren monosit ve endotel hücreleri tarafından üretilerek kendi mikroçevrelerine bırakılan serbest radikallerin düşük yoğunluklu lipoproteinleri okside etmeleri.

4-Okside olmuş düşük yoğunluklu lipoproteinlerin zedelenmeyi arttırması;

5-Bu bölgede zedelenmenin artmasının monositler için kemotaktik, makrofajlar için ise immobilizasyon etkisi sağlaması ve bu hücrelerin düşük yoğunluklu lipoproteinleri fagosite ederek köpüksü hücrelere dönüşmeleri.

6-Medya tabakası düz kas hücrelerinin intimada toplanarak proliferasyon olmaları ve bir kısmının da tıpkı makrofajlar gibi köpüksü hücrelere dönüşmeleri. Köpüksü hücrelerin sayısının artmasına bağlı olarak köpüksü hücre agregatlarının oluşması.

7-Köpüksü hücre odakları çevresinde düz kas hücrelerinin proliferasyonu ile karakterize yağlı çizgilenme şeklindeki görünümün ortaya çıkması.

8-Arter duvarındaki fibroblastların köpüksü hücre odaklarını çevrelemesi. Ekstrasellüler aralıkta biriken lipid ve hücre artıkları nedeniyle, zemini bağ dokusundan oluşan, makrofaj kökenli köpüksü hücreler ve ölmüş düz kas hücrelerinden oluşan yağlı-fibröz görünümüne sahip ateromların oluşması

9-Ekstrasellüler aralıkta; kollajen, elastin ve glikoproteinlerin birikimi ile ateromun intimal bir plağa dönüşmesi ve intimada belirginleşerek fibröz kep denen yapıyı oluşturması.

10- Hücresel proliferasyon ve bağ dokusu gelişiminin daha ön plana çıkması nedeniyle bazı ateromların fibröz plaklara dönüşmesi.

Zedelenmeye yanıt hipotezini destekleyen bir çok çalışma bulunmaktadır. Örneğin erken aterosklerotik lezyonlarda birikerek prognozu kötüleştirdiği bilinen maddelerden birisi de oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoproteinlerdir. Bu moleküllerin erken aterosklerotik lezyonlarda vasküler media tabakası düz kas hücreleri(VMDKH) içerisinde birikerek, kompleman sistemini ve makrofajları aktive eden aterojenik bir molekül olduğu zaten bilinmekte idi. Ancak aterojenik etkiyi nasıl oluşturduğu tam olarak bilinmemekteydi. Bugün için okside edilen düşük yoğunluklu lipoproteinlerin aterosklerozun ilk lezyonlarının oluşumu esnasında ne tip mekanizmayla olaya katıldığını açıklayan daha detaylı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birisinde okside edilen düşük yoğunluklu lipoprotein moleküllerinin VMDKH üzerinde iki farklı mekanizma ile mitojenik bir etkiye neden olduğu bildirilmektedir(3). Bu mekanizmalardan birisi PDGF(platelet derived growth factor) ve FGF- β 'in(Fibroblast Growth Factor- β) aktif rol oynadığı otokrin mitojenik siklusun indüklenmesi diğeri ise sIL6-R'nın (signal transducing chain of the IL-6 Receptor) hücre içi sinyal ileti molekülü olan gp130'un ekspresyonunun stimüle edilmesiyle, IL-6(Interlökin-6) salınımının arttırılmasıdır. IL-6 salınımının artması ise VMDKH'lerini proliferasyona duyarlı kılmaktadır.

Aterosklerozun gelişimini inhibe eden veya stimüle eden faktörlerin belirlenmesi ile tedavisinin veya oluşumunun önlenmesinin mümkün olacağı düşünülmektedir.

Nitekim yükselmiş serum homosisteinin seviyelerinin DNA sentezini arttırmak suretiyle, VMDKH'lerinde direkt olarak proliferasyona neden olduğu anlaşıldığında ARIC(Atherosclerosis Risk in Communities) popülasyonu bireylerinde profilaksi amaçlı, folik asit kullanımı önerilmiştir(4). Fakat muhtelif yayınlarda vasküler media tabakası düz kas hücrelerindeki proliferasyonu indükleyen veya inhibe eden birçok madde bildirilmektedir. Örneğin HMG-CoA redüktaz enzim inhibitörlerinin ve kallikrein'in VMDKH'lerindeki proliferasyonu inhibe ettikleri, Hiperinsülinemi, nikotin, azalmış plazma nitrik oksid seviyeleri ve hipergliseminin ise stimüle ettikleri bildirilmektedir(5-7) Dolayısı ile tüm bu maddelerin bir denge halinde tutulması zorunluluğu aterosklerozun tedavisini güçleştirmektedir. Üstelik bazen, ateroskleroza katkısı olduğu düşünülen maddelerin birden daha fazla sayıda etki mekanizmasının bulunması da söz konusu olabilmektedir. Örneğin Interleukin-1 β (IL-1 β) düz kas hücrelerini proliferasyon için uyarma yeteneğinde olan bir sitokindir ve Oncostatin M (OSM) isimli bir madde düz kas hücrelerini proliferasyon için uyarma yeteneğinde olan sitokin IL-6 üretimi yanında sinerjistik bir etkiyle aynı zamanda IL-1beta üretiminide indüklemektedir(8). Durum böyle bir hal alınca aterosklerozun tedavisi iyice güçleşmektedir.

Ateroskleroz oluşumu için bildirilen birçok risk faktörü vardır. Diabetes mellitus'da ateroskleroz için bilinen bir risk faktörlerinden birisidir. Ve yaşam kalitesi zaten bozuk olan diabet hastaları için ateroskleroz çok büyük bir sorun yaratmaktadır. Bu nedenle bazı bilim adamları çalışmalarını özellikle diabetik hastalarda aterosklerozun nasıl geliştiği sorusuna cevap bulmak üzere yoğunlaştırmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda; aterosklerozun ilk lezyonları arasında yer alan VMDKH'lerinin proliferasyonu ile diabet arasında bir ilişki kurulmuştur. Hipergliseminin ve hiperinsülineminin VMDKH'lerini proliferate ettiği gösterilmiştir. Hücre kültürü ortamında, infragenikular arterin media tabakasındaki düz kas hücrelerinin hiperinsülinemi ve hiperglisemiye bağlı olarak proliferate olduklarını gösteren çalışmalar bildirilmektedir. Hatta bir çalışmada insülinin, VMDKH'lerini insülin reseptörlerinin yokluğunda bile proliferate ettiği gösterilmiştir. Bu durum hem glukozun hemde insülinin IGF-1'in(insülin hormonu benzeri

büyüme faktörü-1) reseptörleri aracılığı ile oluşturduğu mitojenik etki ile açıklanmıştır(9).

Diabetik hastalarda aterosklerozun gelişiminde rol oynadığı iddia edilen hipergliseminin ve hiperinsülineminin sadece media tabakası üzerinde yaptığı değişiklikler değil aynı zamanda endotel ve adventisya tabakaları üzerinde de etkilerinin olması muhtemeldir. Bu çalışmada da; hipergliseminin ve hiperinsülineminin her üç hücre tabakasını da içeren bir damar dokusu üzerinde oluşturacağı etkilerin bir arada değerlendirilmesi amaçlandı.

Hiperglisemi ve hiperinsülineminin vasküler media tabakası üzerinde yaptığı değişiklikler ile ilgili elimizdeki bilgiler sadece tek tabakalı media tabakası düz kas hücreleri veya endotel hücre tabakasını da içeren çift tabakalı hücre kültürleri ile yapılan çalışmalardan elde edilmiş bulunmaktadır(10-13). Hiperglisemi ve hiperinsülineminin VMDKH'leri üzerindeki proliferatif etkisi gösterilmiştir. Komşuluk ilişkisinde bulunan ve her biri farklı histolojik karakterde olan; adventisya, media ve intima hücre tabakalarının tümünü içeren bir damar dokusunda, bu hücrelerin birbirleri üzerine muhtelif etkileri söz konusudur. Yağlı-fibröz ateroma bitişik adventisya tabakasındaki lenfositik infiltrasyon, plak çevresinde görülen vaskülarizasyon ve plak üzerinde oluşan mural trombüsün organizasyonu aterosklerotik lezyonlar arasında önemli bir komponenti oluşturmaktadır. Tek veya çift tabakalı hücre kültürü ortamlarında her üç tabakadaki değişiklikleri bir arada görmek mümkün değildir. Oysa aterosklerozun ilk lezyonlarında her üç hücre tabakasının birbirleriyle etkileşimleri söz konusudur. Örneğin endotel fonksiyon bozukluğu ile gelişen olaylar neticesinde VMDKH'lerinde proliferasyon başlamaktadır.

Hiperinsülinemi, hipergliseminin ve ortama salınan sitokinlerin aynı zamanda adventisya tabakası hücreleri üzerine de etkisi söz konusudur. Birbiriyle komşuluk ilişkisinde bulunan hücrelerin birbirleriyle etkileşimlerinin yanı sıra aynı zamanda lümen içersindeki hücreler ile de bir etkileşimin olduğu gösterilmiştir. Aterosklerozun ilk lezyonlarında biriken hücreler arasında bulunan monositlerin daha önceleri prolife olmadıkları için progresyona bir katkılarının olmadığı düşünülmekte,idi.

Ancak son yapılan çalışmalarda aterosklerozun başladığı bölgede gelişen proliferasyonun indüksiyonundan monositlerin de etkilendiğini göstermektedir. Özellikle ateroskleroz lezyonunda biriken monositlerden endotel hücreleri ile temasda bulunanlarda bu artışın dikkat çekici boyutlarda olduğundan bahsedilmektedir(14).

Bu nedenle her üç hücre tabakasını da içeren bir damar dokusu ile çalışılması son derece önemlidir. Hücre kültürü ortamında oksijenin, insülinin ve glukozun arterin media tabakasındaki düz kas hücrelerinin bulunduğu medyuma direkt olarak verilmesi ile diabetik bir hastada olduğu gibi glukozun endotel hücreleri arasındaki hücreler arası boşluğu kullanarak verilmesi arasında bir fark söz konusudur. Bu fark endotel hücreleri arasındaki boşluğun, media tabakası düz kas hücreleri arasındaki boşluktan içeriğindeki serbest radikal, elektrolit ve pH yönünden farklılık göstermesi nedeniyledir. Nitekim subendotelyal bölgede biriken serbest radikaller düşük yoğunluklu lipoproteinlerin okside olmalarına neden olarak aterosklerozu hızlandırdığına dair makaleler bulunmaktadır. Ayrıca aterosklerozun geliştiği bölgede sürekli bir sıvı akımının olması da hücre proliferasyonunu etkileyebilir. Nitekim soyucu zorlama(shear stress) ve türbülant akımın endotel permeabilitesi, rejenerasyonu ve reseptör aracılığı ile düşük yoğunluklu lipoproteinlerin endositozunu arttırdığı deneysel olarak gösterilmiştir.

Tüm bu nedenler göz önüne alındığında elde edilen deney sonuçlarının sağlıklı olabilmesi için aterosklerozun gelişiminden sorumlu olduğu öne sürülen ve in-vivo ortama göre in-vitro ortamda farklılık gösterebilen tüm parametrelerin optimize edilmesi ve kontrol edilebilir olması zorunluluğu vardır.

Bu noktadan hareketle in-vivo ortam şartlarını olabildiğince simüle eden bir deney düzeneği tasarlandı ve bu deney düzeneği ile diabetik hastalarda görülen aterosklerozun oluşumundan sorumlu tutulan hiperinsülinemi ve hipergliseminin damar düz kas hücreleri üzerine olan proliferatif etkisi araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney ortamı uygulama öncesi 260-280 nm Ultraviyole ışını ile 48 saat süreyle sterilize edildi ve ayrıca deney düzeneğinin sabitleştirileceği ortama %10'luk povidone-iodine poly iyot kompleks uygulaması yapıldı.

Çalışmada disposable steril malzemeler kullanıldı. Deney materyali olarak diabetik bir hastadan koroner by-pass ameliyatı esnasında alınan safen veninden artan parça kullanıldı. Safen ven parçası fetal kalf serumu içerisinde ve soğuk zincir korunarak laboratuvar ortamına transfer edildi. Ven 3 cm uzunlukta iki eşit parçaya bölündü. In-vivo ortamı simüle edebilmek için her iki safen veni lümeni içerisinden sürekli bir sıvı akımın sağlanabileceği bir perfüzyon düzeneğine monte edildi. Ven izotonik NaCl içeren bir sıvı kabına yerleştirildi. İki infüzyon cihazı ile her iki venin lümenleri içerisinde 100 ml / h debide sürekli ve sabit akım hızının olması sağlandı. Safenlerden birisi 500 ml %5 Dextroz solusyonu 12 U kristalize insülin ile nötralize edilerek, diğeri sadece %5 Dextroz solusyonu ile perfüze edildi. Perfüzyon 6 gün sürdürüldü. Bir termostatlı ısıtıcı ile ortam ısısının 37°C'de sabit tutuldu. Her iki perfüzyon sıvısını oksijenize eden birer oksijenatör kullanıldı. Oksijenizatörün debisi 7 dm³ / dakika olarak ayarlandı. Enfeksiyon profilaksisi için perfüzyon sıvısına %1'lik penicillin-streptomycine eklendi.

Tüm bu uygulamalar, hücre kültüründe proliferasyonun görüldüğü süre baz alınarak 6 gün sürdürüldü. 6.günün sonunda her iki safen veni, doku takip aşamalarından geçirilerek parafin bloklara gömüldü. 4µ(mikron) kalınlıklarda kesitler H.E(hematoksilen-eozin) ile boyandı, ışık mikroskopunda incelendi. Daha sonra bloklardan alınan 4'er µ kalınlığındaki kesitler FVIII, aktin ve myozine spesifik immünohistokimyasal boyalarıyla boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi.

BULGULAR

Işık mikroskopik düzeyde H.E'le boyalı kesitler incelendi. Kontrol grubunun kesitlerinde hiç nükleus görülmedi. Bu kesitlerde dokular tamamen otolitik görünümdeydi.

Diğer gruptaki dokular ise yer yer korunmuştu. Ancak ajutajların bağlandığı bölge olduğu sanılan, bazı fokal alanlarda yine otoliz hakimdi. Diğer bölgelerde nükleuslar korunmuş halde idi. Ancak adventisyada yer yer yoğun ödem mevcuttu. Bazı endotel tabakasındaki hücrelerde hidropik dejenerasyon, bazı alanlarda damar duvarından ayrılmalar ve yine bazı endotel alanlarında hücre proliferasyonları dikkati çekmekteydi (ResimI-II).



Resim I



Resim II

FVIII, aktin ve desmin ile yapılan immunohistokimyasal boyamalarda endotel bölgesindeki hücrelerin FVIII'le pozitif boyandığı saptandı. Media tabakasındaki hücrelerin aktin ile pozitif boyandığı, hatta bazı endotel tabakadaki hücrelerin de pozitif boyandığı görüldü. Desmin ile boyanan hücre yoktu.

Endotel hücre tabakasındaki bazı hücrelerin aktin ile pozitif boyanması nedeniyle düz kas hücre proliferasyonu şüphesiyle bu hücrelerin elektron mikroskopik düzeyde de incelenmesi sonucuna varıldı.

Bu bulgular eşliğinde bazı alanlarda endotel hücre proliferasyonu geliştiğine karar verildi. Ancak bazı endotel alanlarındaki aktin ile olan boyanma düz kas hücre proliferasyonunu da düşündürdü.

TARTIŞMA

Bazı çalışmalarda aterosklerozun ilk lezyonlarının damarın media tabakası düz kas hücrelerinin intima tabakasına göç etmeleri ile başladığı ve sonrasında da bu göç eden düz kas

hücrelerinin proliferere olduğu ve en sonrasında da apoptozise gittikleri şeklindedir.

Damarın media tabakası düz kas hücrelerinin proliferasyonundan ise endotel disfonksiyonu sorumlu tutulmaktadır. Atherogenetik endotel fonksiyon bozukluğunda, endotel hücre aktivasyonu(ECA) olarak isimlendirilen ve birbirini takip eden 5 temel değişiklikten bahsedilmektedir(15). Bu değişiklikler sırası ile damarın yapısal bütünlüğünün deformasyona uğraması, lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu, antitrombotik fenotipten protrombotik fenotipe değişiklik, sitokin üretimi ve HLA(Human Lokocyte Antigen) antijenlerinin üst düzenlenmesidir. Aterosklerozun ilk lezyonları arasında genellikle endotel proliferasyonundan ziyade media tabakasındaki düz kas hücrelerinin proliferasyonundan bahsedilmektedir. Oysa bizim örneğimizde aynı zamanda endotel hücre proliferasyonu da gözükmemektedir. Ancak endotel hücrelerinin bazal membrandan ayrılması, damardaki yapısal bütünlüğün kaybolmaya

başladığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Damardaki yapısal bütünlüğün kaybolması ise endotel hücre aktivasyonunda görülen temel değişikliklerden birisini teşkil etmektedir. Eldeki bu bulgular nedeniyle; Atherosklerozun ilk lezyonlarının oluşumunun bilinmesi açısından öncelikle endotel hücrelerinin mi proliferere olduğu yoksa media tabakasındaki düz kas hücrelerinin mi proliferere olduğuna dair bir soruya cevap bulma ihtiyacı doğmaktadır. Bu sorunun cevabına adres olabilecek bir çalışmada, endotel hücreleri ile damar orta tabakası düz kas hücrelerinin bir arada bulunduğu, iki tabakalı bir hücre kültürü çalışması yapılmıştır. Vasküler bir lezyon gelişiminde kültür ortamında endotel hücrelerinden mitojenik aktivitesi olan ET-1(Endotelin-1) isimli bir maddenin salgılandığı bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada endotel hücrelerinden salgılanan ET-1'in ET-1B reseptörü aracılığı ile media tabakasındaki düz kas hücrelerini proliferere ettiği gösterilmiş bulunmaktadır(16). Makrofaj ve lenfosit etkileşimleri sonucu lenfosit, makrofaj, endotel, media tabakası düz kas hücreleri ve trombositlerden salgılanan PDGF(Trombosit derivesi büyüme faktörü), IL-1(İnterlökin-1), TNF (tümör nektotizan faktör) ve interferon- γ gibi sitokinler de düz kas hücre proliferasyonunu stimüle etmektedirler. Bu çalışmalar, aterosklerotik lezyon oluşumunda önce düz kas hücrelerinin proliferere olduğu yönünde kuvvetli bir kanaatin uyanmasına sebep olmaktadır. Örneğimizdeki endotel proliferasyonun ise transfer esnasında oluşan hipoksik ortama ve

mekanik travmaya bağlı intimal hiperplazi olduğu düşünüldü.

Bu kurulan yeni deney düzeneği ile daha önce ileri sürülen mekanizmalardan hangilerinin primer, hangilerinin ise sekonder olarak geliştiğini görmek mümkün olabilir. Deney düzeneğinin optimize edilmesi ile daha sağlıklı sonuçların alınacağı düşünülmektedir. Tasarlanan deney düzeneğinin in-vivo ortama olabildiğince benzemesi için planlanan değişikliklerin sisteme katkılarının kontrol edilebilmesi için kademe kademe hayata geçirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla daha sonra bu çalışmanın devamı olarak yapacağımız çalışmalarda planlanan ilaveler kabaca aşağıda belirtilmiştir.

Perfüzyon sıvısına kan, parenteral besleme solusyonu ilavesi planlanmaktadır. Ayrıca soyucu zorlamanın etkisini de kontrol edebilmek için sisteme intraluminal basıncı ölçebilebileceğimiz bir manometre eklenecektir. Deney düzeneğinin sağlıklı olarak çalışıp çalışmadığını hücre bazında kontrol edebilmek için ise perfüzyon sıvısından uygulama müddetince hergün 8 saat aralıklarla kan glukozu, pO_2 , pCO_2 , pH, hematokrit, Hb yüzdesi, elektrolitler ve BUN değerlerine bakılacaktır.

Bu çalışmanın klasik hücre kültürü ortamı dışında da basit bir deney düzeneği ile uygulanabilir olduğunu görmek açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Çünkü en azından endotel hücrelerinin ve media tabakası hücrelerinin tamamen nekroze olmamalarının bunun bir kanıtı olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. V. Kumar, R. S. Cotran, S. L. Robbins. Basic Pathology. Ed. U. Çevikbaş. 5th. W. B. Saunders Company. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul, 1995.
2. Ying AK, Hassanain HH, Roos CM, Smiraglia DJ, Issa JJ, Michler RE, Caligiuri M, Plass C, Goldschmidt-Clermont PJ. Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells. Cardiovasc Res 2000 1;46(1):172-179.
3. Klouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. Circulation 2000 18;101(15):1799-1805.
4. Carmody BJ, Arora S, Avena R, Cosby K, Sidawy AN. Folic acid inhibits homocysteine-induced proliferation of human arterial smooth muscle cells. J Vasc Surg 1999 30(6):1121-1128.
5. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Massy ZA, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF, Egido. Lipophilic statins induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells. J Kidney Int Suppl 1999 71:S88-91.
6. Cucina A, Sapienza P, Corvino V, Borrelli V, Mariani V, Randone B, SantoroD'Angelo L, Cavallaro A. Nicotine-induced smooth muscle cell proliferation is mediated through bFGF and TGF-beta 1. Surgery 2000 127(3):316-322.
7. Wilson SH, Caplice NM, Simari RD, Holmes DR Jr, Carlson PJ, Lerman A.

- Activated nuclear factor-kappaB is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2000 ;148(1):23-30.
8. Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, Bowen-Pope DF, Seifert RA, Coats S, Hawkins SM, Clowes AW. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res*. 1999;1179-1185.
 9. Avena R, Mitchell ME, Carmody B, Arora S, Neville RF, Sidaway AN. Insulin-like growth factor-1 receptors mediate infragenicular vascular smooth muscle cell proliferation in response to glucose and insulin not by insulin receptors. *Am J Surg* 1999 178(2):156-161.
 10. Massi-Benedetti M, Federici MO. Cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: the role of hyperglycaemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107 Suppl 4:S120-123
 11. Cosentino F, Luscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32 Suppl 3:S54-61
 12. Absher PM, Schneider DJ, Baldor LC, Russell JC, Sobel BE . Increased proliferation of explanted vascular smooth muscle cells: a marker presaging atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997 131(2):187-195.
 13. Ridray S. Hyperinsulinemia and smooth muscle cell proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995 May;19 Suppl 1:S39-51
 14. Pakala R, Benedict CR . Endothelial cells regulate the proliferation of monocytes in vitro. *Atherosclerosis* 1999 1;147(1):25-32.
 15. Hunt BJ. The endothelium in atherogenesis. *Lupus* 2000;9(3):189-193.
 16. Di Luozzo G, Bhargava J, Powell R. J. Vascular smooth muscle cell effect on endothelial cell endothelin -1 production. *J. Vasc. Surg.* 2000, 31 (4) : 781-789.