

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

ALT EKSTREMİTE PRİMER VARİSLERİNDE
APOPİTOZİSİN ROLÜ

UZMANLIK TEZİ
Dr. KADİR KAAN ÖZSİN

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. ALİ RAHMAN

ELAZIĞ, 2006

TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalıştığım 2001-2006 dönemi boyunca bilgi ve tecrübesi ile teorik ve pratik olarak yetişmemde her türlü destek ve yardımı gösteren Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışmanım Doç. Dr. Ali Rahman'a ve Yrd. Doç. Dr. Oktay Burma'ya teşekkür ederim.

İhtisas süresince bilgilerini benden esirgemeyen Uzm. Dr. Ayhan Uysal'a da teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamda bana yardımcı olan Doç. Dr. İbrahim H. Özercan'a ve M. Kemal Bayar'a teşekkür ederim.

Asistanlık hayatının her türlü zorluklarını benimle birlikte paylaşan ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşime teşekkür ederim.

Dr. K. Kaan Özsin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1.ÖZET	9
2.ABSTRACT	10
3.GİRİŞ	11
3.1. Normal Venöz Morfoloji	13
3.1.1. Venüller	13
3.1.2. Küçük Venler	13
3.1.3. Orta Çaplı Venler	13
3.1.4. Büyük Venler	14
3.1.5. Venöz Kapakçıklar	14
3.2. Alt Ekstremitte Venöz Sistem	15
3.2.1. Yüzeysel Venler	16
3.2.2. Perforan Venler	16
3.2.3. Venöz Sinüsler	17
3.2.4. Derin Venler	18
3.2.5. Kapakçıklar	18
3.3. Venöz Sistem Fonksiyonları	19
3.3.1. Müskülo-Venöz Pompa	19
3.3.2. Venöz Basınç Hemodinamisi	20
3.4. Alt Ekstremitte Varisleri	22
3.4.1. Etyopatogenez	22
3.4.2. Ven Duvarının Yapısal Zayıflığı	25
3.4.3. CEAP Klasifikasyonu	27
3.5. Apoptozis	29
3.5.1. Apoptozisin Morfolojisi	30
3.5.2. Apoptotik Süreç	33
3.5.2.1. Apoptozisde Sinyal İletim Sistemleri	33
3.5.2.2. Apoptotik Hücre Ölümünün Fazları	34
3.5.2.3. Ölüm Reseptör Yolu	35
3.5.2.4. Mitokondriyal yol	36
3.5.2.5. Kaspazlar	38

3.5.2.6. Bcl-2 ailesi	39
3.5.2.7. Apoptozisin İAP İle Düzenlenmesi	41
3.5.3. Damar Duvarında Apoptozis	42
3.5.3.1. Damar Duvarı Yeniden Yapılanmasında Apoptozis	43
3.5.3.2. Vasküler Düz Kas Hücresindeki Apoptozisin Etkisi	43
3.5.3.3. Vasküler Düz Kas Hücresindeki Apoptozisin Regülasyonu	44
4. GEREÇ VE YÖNTEM	46
4.1. Gruplar	46
4.2. Damar Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması	46
4.3. Histomorfolojik İnceleme	46
4.4. İmmunohistokimyasal İnceleme	47
4.3. İstatistiksel Analiz	47
5. BULGULAR	48
5.1. Histomorfolojik Veriler	48
5.2. İmmunohistokimyasal Veriler	51
6. TARTIŞMA	58
7. KAYNAKLAR	67
8. ÖZGEÇMİŞ	79

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1 Ölüm Reseptörleri ve Ligandları	34
Tablo 2 Bcl-2 Ailesi	40
Tablo 3 Bax Pozitif Boyanan Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri	51
Tablo 4 Bcl-2 Pozitif Boyanan Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri	53
Tablo 5 Kaspaz-9 Pozitif Boyanan Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri	55



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1 Tipik bir damar duvar yapısı	14
Şekil 2 Alt Ekstremitte Venöz Sistem	15
Şekil 3 Kapakçık Fizyolojisi	18
Şekil 4 Müskülo – Venöz Pompa	20
Şekil 5 Egzersizde Ayak Basınç Değişiklikleri	21
Şekil 6 Mitokondriyal Yol	37
Şekil 7A Variköz Ven Grubunda Kollajen Fibriller (Mason Trichrome Boyası X 200)	49
Şekil 7B Kontrol Grubunda Kollajen Fibriller (Mason Trichrome Boyası X 200)	49
Şekil 8A Variköz Ven Grubunda Elastin Fibriller (Verhoeff' un Elastik Boyası X 200)	50
Şekil 8B Kontrol Grubunda Elastin Fibriller (Verhoeff' un Elastik Boyası X 200)	50
Şekil 9 Bax (+) Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri	52
Şekil 10A Variköz Ven Grubunun Medya Tabakası. Sitoplazmik Bax (+) İmmün Boyanan Hücreler X 200	52
Şekil 10B Kontrol Grubunun Medya Tabakası. Sitoplazmik Bax (+) İmmün Boyanan Hücreler X 200	53
Şekil 11A Variköz Ven Grubunun Medya Tabakası. Sitoplazmik Bcl-2 (+) İmmün Boyanan Hücreler X 200	54
Şekil 11B Kontrol Grubunun Medya Tabakası. Sitoplazmik Bcl-2 (+) İmmün Boyanan Hücreler X 400	54
Şekil 12 Bcl-2 (+) Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri	55
Şekil 13A Variköz Ven Grubunun Medya Tabakası. Sitoplazmik Kaspaz-9 (+) İmmün Boyanan Hücreler X 400	56
Şekil 13B Kontrol Grubunun Medya Tabakası. Sitoplazmik Kaspaz-9 (+) İmmün Boyanan Hücreler X 200	56
Şekil 14 Kaspaz-9 (+) Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri	57

KISALTMALAR

AIF:	Apoptosis inducing factor. "Apoptozisi indükleyen faktör".
AIDS:	Akut İmmün Yetmezlik Sendromu
Apaf-1:	Apoptozis proteazı aktive eden faktör-1
ATP:	Adenozin trifosfat
BH:	Bcl-2 Homolog bölgesi
CED:	Cell Death (Hücre Ölüm) Genleri
CD:	Cluster of Differentiation
DAG:	Diaçil Gliserol
DD:	Death Domain. "Ölüm bölgesi".
DED:	Death Effector Domain. "Ölüm etkili bölge".
DISC:	Death İnducing Signalling Complex. "Ölüm İndükleyen Sinyal Kompleksi".
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
DNase:	Deoksiribo Nükleaz
DR:	Death Receptor. "Ölüm reseptörü".
EDRF:	Endotelin Kaynaklı Gevşetici Faktör
Egl:	Egg laying defective
FADD:	Fas-Associated Death Domain Protein
FasL:	Fas Ligand
IAP:	İnhibitor Apoptotik Protein
c-IAP:	Cellular İnhibitor Apoptotik Protein
ICE:	İnterleukin 1 β -Converting Enzyme
IL:	İnterleukin
IP3:	İnozitol 1,4,5-trifosfat
kD:	Kilo-Dalton
MMP:	Matriks Metalloproteinaz
NIAP:	Neuronal İnhibitor Apoptotik Protein
NF-κB:	Nükleer Faktör κ B
NO:	Nitrik Oksit
PARP:	Poly(ADP-riboz) Polimeraz
PIP2:	Fosfotidil İnozitol 4,5-bifosfat

- QACRG:** Gln-Ala-Cys-Arg-Gly
- TCR:** T-Hücre Reseptörü
- TIMP-1:** Doku İnhibitör Metalloproteinaz – 1
- TNF:** Tümör Nekrotizan Faktör
- TNFR:** Tümör Nekrotizan Faktör Reseptörü
- TRAIL:** TNF-Related Apoptosis-İnducing Ligand
- TRAMP:** TNF-Related Apoptosis Matrix Protein
- TRADD:** TNFR-Associated Death Domain Protein
- TUNEL:** Terminal deoksinükleotid transferaz-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling
- XIAP:** X-linked İnhibitor Apoptotik Protein
- VDAC:** Voltage-Dependent Anion Channel. "Voltaj bağımlı anyon kanalı"
- VSM:** Vena Safena Magna
- VSP :** Vena Safena Parva

1. ÖZET

Değişik teoriler geliştirilmesine rağmen alt ekstremitte variköz venlerin patogenezi halen tartışılmaya devam etmektedir. Variköz ven fizyopatolojisi için son zamanlarda ileri sürülen teoriler intrinsik venöz duvar anormallikleri nedeniyle oluşan dilatasyon ve bunun sonrasında ortaya çıkan yetersizliktir. Yapılan çalışmalarda kan damarı duvarının hücresel kompozisyonunun ve morfolojisinin kontrolünde vasküler hücre apoptozisinin rolü olabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmamızda normal ve variköz venlerin proapoptotik (bax ve kaspaz-9) ve antiapoptotik (bcl-2) durumlarını belirleyerek varis gelişiminde apoptotik aktivitenin rolünü araştırmayı amaçladık.

Çalışma, koroner arter bypass greft operasyonu geçirecek sağlıklı vena saphena magna (VSM)'ya sahip 15 hasta (Kontrol grubu, Grup 1) ve alt ekstremitte primer varis tanısı nedeniyle opere edilecek 15 hasta (Variköz ven grubu, Grup 2) olmak üzere 30 hasta üzerinde gerçekleştirildi. Grup 2'de yer alan hastaların VSM trasesi boyunca primer varisleri mevcut olup tümünde venöz duplex USG'de VSM'de reflü gösterildi (CEAP sınıflamasına göre C₂(s) Ep As₂₋₃ Pr). Her iki grubun dizaltı baldır bölgesi VSM' sından doku örnekleri alındı. Doku kesitlerinde immünohistokimyasal boyama ile proapoptotik bax ve kaspaz-9 ve antiapoptotik bcl-2 araştırıldı.

Variköz venlerin medya tabakasında kollajen fibril seviyesinde artış ile birlikte düz kas hücre azalması gözlemlendi. Elastin ağ örgüsündeki bozulma variköz venlerde daha fazlaydı. Variköz ven grubun medya tabakasında kontrol grubun medyasına oranla daha fazla bax (+) ve kaspaz-9 (+) hücreler saptandı (p<0.05 ve p<0.01). Tüm damar duvarı katmanında ise total bax (+) ve kaspaz-9 (+) hücreler kontrol grubunda anlamlı olarak fazlaydı (p<0.05 ve p<0.01). Variköz ven grubunun medya tabakasındaki fazla bax ve kaspaz-9 pozitifliği, aşırı düz kas hücre azalması nedeniyle olan rölatif yüksekliğe bağlı olabilir. Buna karşın bcl-2 boyamasında ise variköz venler ile sağlıklı venler arasında belirgin bir farklılık bulunmadı (p>0.05).

Sonuç olarak variköz venler bütün olarak değerlendirildiğinde apoptotik aktivitenin azaldığını saptadık. Fibrotik dejenerasyon ve artmış düz kas hücresi azalması daha az apoptotik mekanizmanın sebebi olabilir. Ancak fibrozis ve düz kas hücre azalmasının da sebebi medyadaki yüksek apoptotik aktivite olabilir.

Anahtar kelimeler: Variköz venler, Apoptozis, Vasküler duvar

2. ABSTRACT

The Role of Apoptosis in Lower Extremity Primary Varicose Veins

Even though different theories were developed for lower extremity varicose veins, pathogenesis of lower extremity varicose veins still continuous for debating. Most recent proposed mechanism for development of varicose vein pathophysiology is venous wall failure due to intrinsic venous wall abnormalities. The research studies were shown importance of apoptotic role on vessel wall cell composition and morphology control. In this study, we aim to investigate pro-apoptotic (bax and caspase-9) and anti-apoptotic (bcl-2) changes in varicose vein and normal vein to determine impotence of apoptotic activity for development of varices.

Fifteen patients with normal vena saphena magna (VSM) underwent coronary bypass surgery (Control group, Group 1) and fifteen patients with primary varicose dilatation on lower extremity underwent surgery (Varicose vein group, Group 2) were enrolled in this study. Appearance of varicose dilatation and venous reflux on VSM were depicted by Doppler Ultrasonography in Group 2 (According CEAP classification C2(s) Ep As₂₋₃ Pr). VSM tissue specimens were obtained from calf region. Pro-apoptotic bax and caspase-9 and anti-apoptotic bcl-2 were analyzed in tissue slices by immuno-histochemical staining methods.

Increased amount of collagen fibrils in tunica media and decreased smooth muscle cells were observed in varicose veins slices. Degeneration of elastin layer was prominent in varicose vein group. Bax and caspase-9 expression in tunica media layer were significant higher in the varicose vein groups of samples than normal vein groups of samples ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Increased bax and caspase-9 expression in entire vessel layers were significant in normal veins ($p < 0.05$, $p < 0.01$). Excess positivity of bax and caspase-9 in the media layer of the varicose vein group may be due to relative increase as a consequence of extreme loss of smooth muscle cells. Instead of there were no statically difference for bcl-2 expression by immunostaining between group 1 and group 2 ($p > 0.05$).

As a result, the whole layer of varicose veins evaluated together we observed that apoptotic activity were decreased in varicose veins. Fibrotic degeneration and excessed smooth muscle cell decrement may cause less apoptotic activity in varicose veins. However high apoptotic activity in the layer of media in the early period of illness may cause fibrosis and decrease in the smooth muscle cells.

Key words: Varicose veins, Apoptosis, Vascular wall

3.GİRİŞ

Başka bir sebebe bağlı olmaksızın alt ekstremitedeki yüzeysel venlerin uzayıp, kıvrıntılı genişlemiş bir görünüm alarak belirginleşmesine primer varis denir.

Çeşitli teoriler geliştirilmiş olmasına rağmen alt ekstremitte primer varis patogenezi halen tartışılmaktadır (1,2). Ven duvar anormallikleri, hormonal faktörler, yaş, konnektif doku metabolizmasındaki değişiklikler, valvüler yetmezlik ve artmış enzimatik aktivite etyolojide yer alan en önemli faktörlerdir. Variköz venlere sahip pek çok hastada aile öyküsünün bulunması varis gelişiminde genetik faktörlerin de rol oynayabileceği olasılığını göstermektedir (1).

Normal vasküler duvar gelişimi ve yeniden yapılanmasını etkileyen süreçlerden biri de doku kitle ve yapısını düzenleyen programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan "Apopitozis"dir. Moleküler seviyede hücre canlılığı bir seri gen ailesi tarafından kontrol edilen proapopitotik ve antiapopitotik sinyaller arasındaki denge ile sürdürülür.

Çeşitli çalışmalar postnatal dönemde damarlarda programlanmış hücre ölümü varlığını göstermektedir. Bu aynı zamanda aterosklerozda, inflamatuvar damar hastalıklarında veya anevrizma oluşumunda gelişen damar duvarı yeniden yapılanmasının bir özelliği olarak kabul edilmektedir. Venlerde apopitotik ölüm gerçek ven yapısının ve tonusunun ayarlanmasında büyük önemi olan vasküler düz kas hücreleri ile ilişkilidir. Düzensiz apopitozisin hatalı DNA onarım mekanizmaları ve hücre siklusu değişiklikleri ile ilişkili olduğu gösterilmektedir .

Ven duvarındaki hücre siklus disfonksiyonu ve düzensiz hücre döngüsü variköz venlerde gözlenen yeniden yapılanmaya katkıda bulunmaktadır. Düzensiz programlanmış hücre ölümünün variköz venlerin patogenezi için olası bir sebep olabileceği gösterilmiş; sağlıklı ve variköz venler arasında apopitoz seviyelerinde belirgin farklılıklar bulunmuştur.

Toksinler, iyonize radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, çeşitli kimyasallar, yaşlanma veya iskemi sonucu gelişen subletal hasarlar hücredeki apopitotik süreci aktive edebilir. Hücre çekirdeğinde, hücre membranında, mitokondriyumda veya hücre içi herhangi bir bölgeden gelebilecek bir uyarı apopitozu başlatabilir. Özellikle DNA'da oluşan bir hasar önemli bir uyarım olarak bilinir. Duyarlı hücrede p53'ün aktivasyonu veya başka mekanizmalar da apopitozu başlatabilir. Apopitozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında bazı iyonlar, moleküller , genler , proteinler ve hatta organeller bulunmaktadır.

Bu mediyatörlerden bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apopitozisi indüklediği (bax, bad, bid, bcl-Xs), bir kısmının ise inhibe ettiği (bcl-2, bcl-XL) geniş bir gruptur. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bcl-2/Bax oranının artması ya da azalması apopitozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır.

Apopitozu başlatabilen tüm bu uyarılar, sistein proteazlardan olan kaspazların aktivasyonuna neden olmakta, bunların aktivasyonu ile de kromatin kondansasyonu, DNA fragmantasyonu gibi apopitoza ait karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler gelişmektedir. Kaspazlar apopitozun efektör kolunu oluşturmaktadır ve apopitoza giden bütün hücrelerde aynı şekilde gelişmektedir .

Alt ekstremite varislerinin etyopatogenezinde apopitozisin regülasyonu son dönemlerde araştırılmaya başlanmış olup biz de bu çalışmamızda sağlıklı ve variköz venlerde proapoptotik (bax), antiapoptotik (bcl-2) ve apopitoz efektörü (kaspaz-9) seviyelerine bakarak variköz venlerde apopitotik aktivitenin azalıp azalmadığını göstermeyi amaçladık. Çalışmamızın sonuçlarının tedavi seçeneklerini geliştirecek sonraki basamaklar için yarar sağlayacağı kanaatindeyiz.

3.1. NORMAL VENÖZ MORFOLOJİ

Kan, kapiller ağdan başlayan venüller aracılığı ile önce küçük çaplı venlere dökülür. Bu venler ise daha büyük çaplı venleri oluşturduktan sonra vena cava inferior ve vena cava superioru oluşturarak kalbin sağ atriumuna boşalırlar. Venler, duvarları ince olduğu için kolayca gerilir ve fazla miktarda kan tutarlar. Bu yüzden de kapasitans damarlar (kan yüklenim damarları, ven yatağı) olarak bilinirler. Bu özellikleri intravasküler basıncı artırmasını engeller. Kapasitans damarlardan kalbe dönen kan miktarı, kalbin ön yükünü belirleyen önemli bir faktördür (3).

3.1.1. VENÜLLER

Postkapiller Venüller

Kapillerler, 10-50 mikron çapındaki en küçük venüllere açılırlar (3). Bazal lamina ve perisitlerle kaplı endotele sahiptirler. Tunika medya ve tunika adventisyaya sahip değildir. Postkapiller venül endoteli histamin ve serotonin gibi vazoaaktif ajanların başlıca etki yeridir. Bu venüllerde kapillerlerdeki gibi madde alış veriş olur (4). Lenf nodlarının postkapiller venülleri aynı zamanda lenfositlerin vasküler lümeninden lenfatik dokuya transmural migrasyonuna yardım eder. Lenf nodlarındaki postkapiller venüller, ovoid nükleusları ve endotelial hücrelerinin küboidal görünümü nedeniyle "*high endothelial venule*" olarak da adlandırılır (4). Bu "*high endothelial venule*"ler lenfosit resirkülasyon ve lenfositlerin histolojik ve ultrastrüktürel özelliklerinde önemli rol oynarlar (5).

Müsküler Venüller

Müsküler venüllere gelindikçe perisitler düz kas hücreleri ile yer değiştirir. Bunların çapları 50-100 mikron arasında değişir. Bir iki sıralı düz kas hücre tabakası oluşur ve en dış tarafta kollajen fibrillerin yoğun olduğu bir adventisya görülmeye başlar (4)

3.1.2. KÜÇÜK VENLER

Müsküler venüllerin devamıdır. Benzer duvar yapısına sahip olmasına rağmen çapları 1 mm'ye kadar ulaşır. Kas hücreleri daha belirgindir ve dışında adventisya tabakası görülür (3)

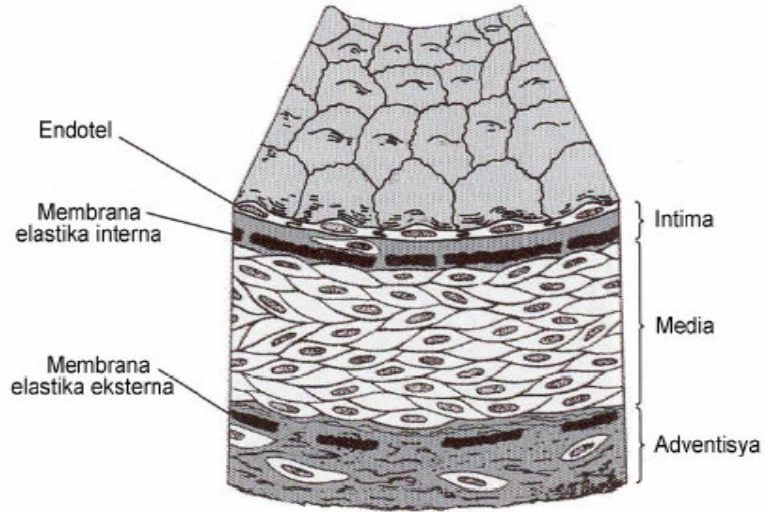
3.1.3. ORTA ÇAPLI VENLER

Bu kategorinin en önemli venleridir. Çapları 10 mm'ye kadar ulaşır. Orta çaplı venlerin karakteristik özellikleri kapakçık içermeleridir. Kapakçıklar vücudun alt bölümlerinde bilhassa bacaklarda çok sayıda bulunurlar ve kanın yerçekimi ile olan geriye akımını önlerler. Orta çaplı venlerin duvarı üç tabakadan oluşur. Tunika

intimasında iç tarafta endotel hücre dizisi, altında ince bir bağ dokusu ve üzerine serpilmiş düz kas hücreleri , dışta da belirgin olmayan bir membrana elastika interna bulunur. Tunika medyası arter tunika mediasına göre daha incedir. Aralarında elastik ve retiküler lifler bulunan iki ya da üç tabaka düz kas hücresi içerir. Tunika adventisya bu venlerde damar duvarının en kalın tabakasıdır. Uzunlamasına düzenlenmiş kalın kollajen demetlerden oluşur (4).

3.1.4. BÜYÜK VENLER

Çapı 10 mm'den daha büyük venlerdir. Tunika intiması endotel hücre dizisi ve altında orta tip venlere göre daha çok elastik ve kollajen lifler içerir. Membrana elastika interna dış tarafta bulunur. Tunika medyasında çok miktarda bağ dokusu ve birkaç sıra düz kas hücresi yer alır. Tunika adventisyası geniş bir tabaka olup kalın bir kollajen fibril demeti, uzunlamasına düzenlenmiş düz kas hücrelerinden ve elastik fibrillerden oluşur. Çok sayıda vaza vazorum içerir (4).



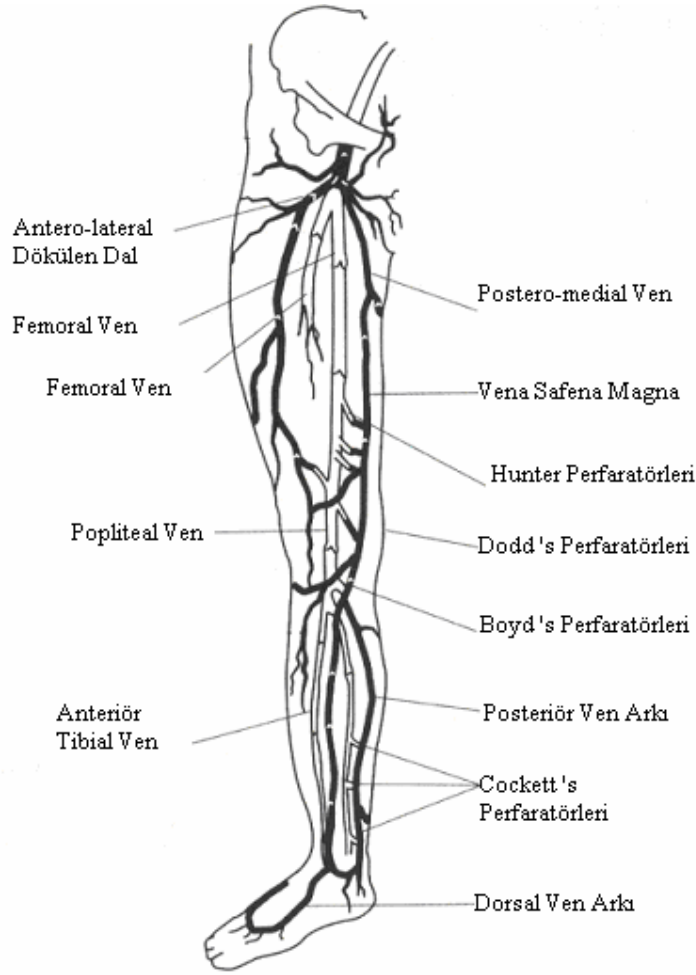
Şekil 1. Tipik bir damar duvar yapısı

3.1.5. VENÖZ KAPAKÇIKLAR

Kapakçıklar iki endotelial kıvrım konkavitesinden meydana gelmişlerdir. Fibroelastik tabaka içerirler ve onların sıkılığını sağlarlar. Bundan dolayı ven duvarı kapakçık bölgesinden daha incedir (6).

3.2. ALT EKSTREMİTE VENÖZ SİSTEM

Alt ekstremitte venleri üst ekstremitte venlerine göre klinik olarak daha önemlidir. Alt ekstremitelerde venöz dolaşım: derin, yüzeysel ve bunları birbirine bağlayan perforan venler olmak üzere 3 ayrı sistemden oluşur (7).



Şekil 2. Alt Ekstremitte Venöz Sistem

3.2.1. YÜZEYEL VENLER

Yüzeysel venler, büyük safen ven (vena safena magna) ve küçük safen ven (vena safena parva) olarak bilinir. Yüzeysel venler membranöz fasyanın üstünde seyrederek ve derin venler gibi kas kompartmanında yer almadıkları için destek dokusundan yoksundurlar. Vena safena magna (VSM) ayak dorsalinde v.marginalis medialis'in devamı olarak dorsal venöz arkdan başlar, iç malleol önünden geçip, baldır iç yüzünde ilerleyerek popliteal boşluğun posteromedial kenarından uyluk iç yüzüne gelir. Buradan yukarı çıkarak yüzeysel inguinal bölgede fossa ovalisten femoral vene dökülür (7). VSM v.communicans' lar aracılığı ile vena safena parva ile , v.perforans' lar yardımıyla derin venöz sistemle bağlantı kurar (8).

VSM'ya dökülen variköz küme oluşumunda önem arzeden dallar şunlardır:

1-) Posterior ark veni: Leonardo Veni de denilen bu ven, üç Cockett's perforan ven grubunu direne eder.

2-) Safen ven sisteminin anterior dalı: Patella altında uzanır ve bacağın anterior ve lateral yüzlerinin kanını toplar.

3-) Posterior dal: Baldırın antero-medial yüzeyinde bulunur (7).

Postero-medial uyluk veni ve antero-medial uyluk veni gibi diğer dallar kasığın yakınlarında safen sistemde sonlanır. Bu venlerden her biri buldukları bölgelerde variköz kümelere dönüşebilir (7).

Vena safena parva (VSP) ise ayak lateralindeki dorsal venöz arkta başlayarak baldır orta kesiminden yukarı çıkar ve VSM' dan farklı olarak derin fasyayı penetre ederek popliteal vene dökülür. Variköz venlerin oluşumunda VSP'dan daha çok VSM sorumludur (7).

Yüzeysel venlerde distalde kapakçık sayısı proksimalden fazladır. Bileşke bölgelerindeki kapakçıklar daha kuvvetli olup, kapakçık içeren kısımlardaki ven duvarında belirgin sinüzoid genişlemeler vardır. VSM' da en az 6 kapakçık vardır. Bunlardan biri, olguların %85'inde safeno-femoral bileşkenin 2-3 cm distalindedir. Küçük safende ise kapakçıklar birbirine yakın olup sayıları 4-13 arasında değişir (7).

3.2.2. PERFORAN VENLER

Perforan venler fasyayı uygun alanlardan penetre ederek yüzeysel venöz sistemle derin venöz sistemi birbirine bağlar. Günümüzde kominikan ven terimi aynı sistemin parçalarını birbirine bağlayan venler için kullanılmaktadır. Yüzeysel venlerle derin venleri birbirine bağlayanlar direkt perforan, dolaylı olarak kas bağlantıları ya

da soleal venöz sinüslere bağlayanlar ise indirekt perforan olarak anılır. Perforan venlerde akım yönü yüzeysel venlerden derine doğrudur (7).

Perforatörlerdeki kapakçık yetersizliği sonucu oluşan reflü, distal varikositlerin nedenlerinden biridir (7).

Alt ekstremitede 150' ye yakın perforan ven vardır. Ayakta ortalama 9 direkt perforan varken, bacakta kalf düzeyinde sadece medial konumda 7-8 direkt perforan bulunmaktadır (7). Malleolus medialis' den tuberositas tibiae' ye doğru sırasıyla Cockett 1, Cockett 2, Cockett 3, distal paratibial perforanlar, proksimal paratibial perforanlar, Boyd's perforanı şeklinde adlandırılırlar. Dize en yakın olan Boyd's perforatörü VSM' yı popliteal vene bağlar (8). Boyd's perforatöründen proksimale doğru ilerlendiğinde ise uyluğun 1/3 distalinde adını Harold Dodd' dan alan Dodd Perforanı bulunur. Bunun biraz proksimalinde ise Hunter Perforanı vardır (7). Bu perforanlar VSM' yı doğrudan v. poplitea' nın proksimaline veya v.femoralis' e bağlar (8).

Çapı 1 mm' den küçük olan perforatörler kapakçiksızdır. Ayaktaki perforan venlerin akım yönü yüzeysel venlere doğrudur. Akımı yüzeyelden derin sisteme doğru yönlendiren subfasyal yerleşimli, uyluk ve baldırdaki perforatörlerdir. Bunların 1/3' ünde kapakçıklar bileafletlidir (7).

3.2.3. VENÖZ SİNÜSLER

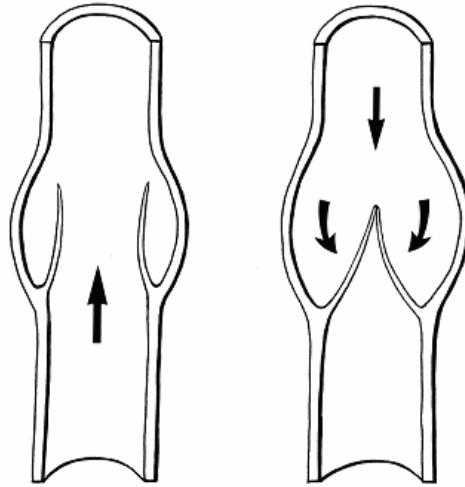
Yüksek volümde venöz kan kapasitesi olan ince duvarlı, baldırda lokalize büyük venlerdir. Venöz sinüsler, küçük kas venleri, postkapiller venüller, kas perforatörleri ve en son yüzeysel venler tarafından doldurulurlar. Soleus kası bu açıdan zengin olup 1-18 adet venöz sinüs bulundurabilir ve bu venler soleus veni aracılığı ile posterior tibial ya da peroneal vene direne olurlar. Gastroknemius kası ise venöz sinüs açısından fakirdir. Venöz sinüsler kapakçık içermez ancak ilişkili olduğu venlerde kapakçık vardır. Venöz sinüsler, venöz (kas) pompasının işlevi bakımından önemli anatomik oluşumlardır (7).

3.2.4. DERİN VENLER

Alt ekstremitte derin venleri arterlerle birlikte seyrederek ve aynı isimle anılırlar. Çok sayıda kapakçık içerirler. Anterior ve posterior tibial venler m.popliteus'un alt kenarında birleşerek popliteal veni oluştururlar. V. Poplitea'da genellikle 4 adet kapakçık bulunur (8). Adduktor kanal içine girdikten sonra yüzeysel femoral ven adını alır. Kanaldan çıktıktan sonra, inguinal ligamentin altında derin femoral ven ile birleşerek ana femoral vene dönüşür. VSM, fossa ovaliste safeno-femoral bileşkede ana femoral vene direne olur. Femoral vendede 3 adet kapakçık bulunur. Ana femoral ven, inguinal ligamentin proksimalinde eksternal iliyak ven olarak devam eder. Bu ven de internal iliyak venle birleşerek ana iliyak ven adıyla vena cava inferior'e direne olur. Ana femoral ven ve eksternal iliyak vendede en fazla bir kapakçık vardır. Ana iliyak ven ve vena cava inferior kapakçık içermez (7).

3.2.5. KAPAKÇIKLAR

Venöz dolaşımın en önemli unsurlarından biri de venlerin içerdiği kapakçıklar olup, görevleri kanın akım yönünde akışını sağlamak ve reflüyü önlemektir (Şekil 3). Normalde akım yönü derin ve yüzeysel sistemde kalbe, perforatörlerde yüzeylenden derine doğrudur. Çoğunlukla biliflet olan venöz kapakçıklar, bileşke bölgelerinde daha kalın ve güçlü iken diğer lokalizasyonlarda incedir (7).



Şekil 3. Kapakçık Fizyolojisi

3.3. VENÖZ SİSTEM FONKSİYONLARI

Venöz sistem fonksiyonlarını 4 bölüm halinde incelemek mümkündür.

- Taşıma (venöz dönüş)
- Isı regülasyonu
- Kan depolama
- Müskulo-venöz pompa (periferik kalp) (9).

Venöz dönüşü sağlayan faktörler plantar venöz baskı, bacak eklem pompası, baldır kas pompası, venöz kapakçıklar, venöz tonus, postural vazokonstriksiyon, komşu arteriyel pulsasyon, diyafram hareketleri, kardiyak çekim, venin müsküler kontraksiyonu olarak sayabiliriz (10).

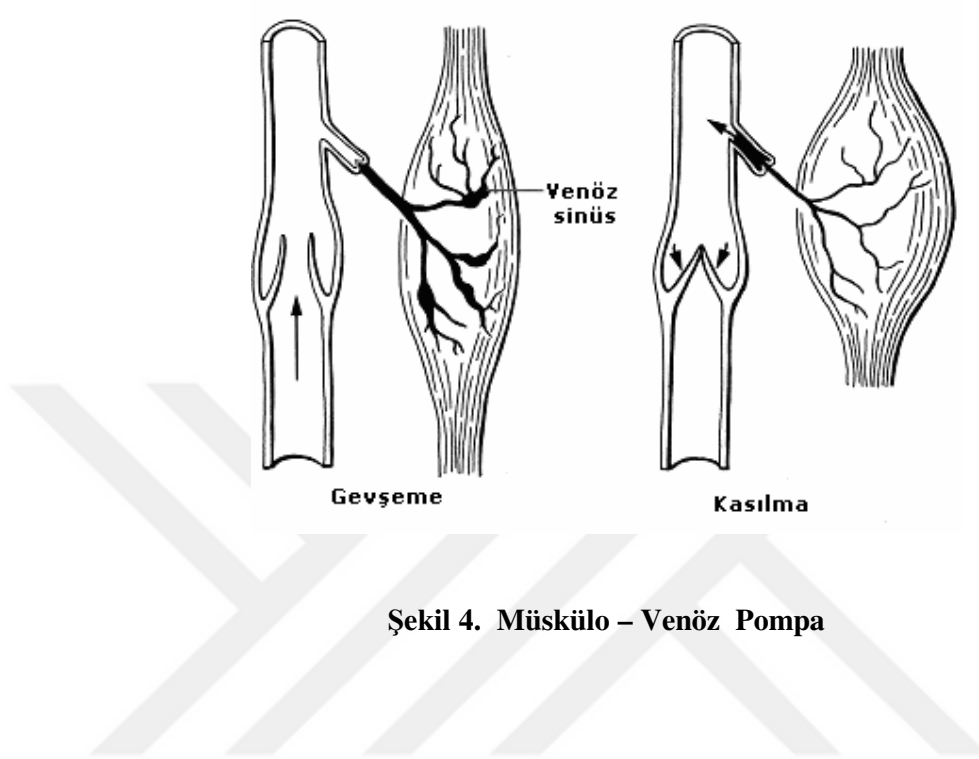
Venöz sistemin total kesit alanı 338 cm² iken arteriyel sistem sadece 62.6 cm² dir. Venöz segment volümü ise arterden üç kez daha fazladır. Venöz sistem total kan volümünün % 64' ünü oluşturur (10).

3.3.1. Müskulo-Venöz Pompa

Ekstremitelerin kapakçıklı derin venleri ve bunların içinden geçtiği kaslar, egzersizle ritmik olarak çalışan bir pompa görevi yaparlar. Bunun en güzel örnekleri, uylukta kasların bir faysa kılıfı ile sarıldığı ve baldırda venöz sinüsleri kapsayan baldır kaslarıdır. Bu özellik insanlara özgüdür ve onun iki ayak üzerinde durmasının ve hareketliliğinin bir karakteristiğidir (9).

Alt ekstremitte kas ve eklemlerin venleri sıkıştırması venöz kanın kalbe doğru yayılmasına imkan verir. Bu pompa venöz dönüşün fizyolojisinde ve patofizyolojisinde ilk rolü oynar (10). Uyluk ve ayak pompasının yanında en önemlisi baldır kası pompasıdır. Bunun sebeplerinden biri, ekstremitelerdeki en büyük venöz kan deposunun soleal sinüsler olmasıdır (7).

Kas kontraksiyonuyla oluşan kuvvet, kompartmanlar arasındaki venlere basınç uygulayarak, kapakçıkların ileri doğru açılmasını ve venöz kanın proksimale yani sistemik venlere doğru ilerlemesini sağlar. Kaslar gevşekken kapakçıklar kapanarak geri akımı ve kaçağı önler (Şekil 4). Kasların gevşek döneminde basınç azaldığı için derin venler genişler ve perforanlar aracılığıyla yüzeysel sistemdeki kanı emme şeklinde alırlar. Böylece artan yüzeysel ven basıncını da düşürürler. Bu yapı, iyi desteklenmemiş yüzeysel venleri egzersiz sırasında aşırı artan kompartman basıncından korumaya yöneliktir. Kapakçıkların açılımı akım yönüne doğrudur ve görevleri reflüyü önlemektir (7).



Şekil 4. Müskülo – Venöz Pompa

3.3.2. Venöz Basınç Hemodinamisi

Ambulatuvar venöz basınç ölçümü ile ekstremitelerde venöz basınç kayıtları yapılabildiği gibi, istirahatle egzersiz dönemindeki değişiklikler de izlenebilir.

Yatar pozisyon

Sırtüstü yatıldığı zaman venüler hidrostatik basınç 20 mmHg' dir. Buna karşı duran doku basıncı (-3) mmHg ve ozmotik kolloid basınç (-22) mmHg olup filtrasyon basınç (-5) mmHg olarak değerlendirilir. Bundan dolayı supin pozisyonda venöz dönüş, zayıf basınç gradyenti ve düşük periferik basınçla karakterizedir. Sağlıklı yatar pozisyondaki bir bireyde bacak venöz basınç 12-18 mmHg olup sağ atriyal basınç (-2) ile 10 mmHg arasında değişir (10).

Oturur pozisyon

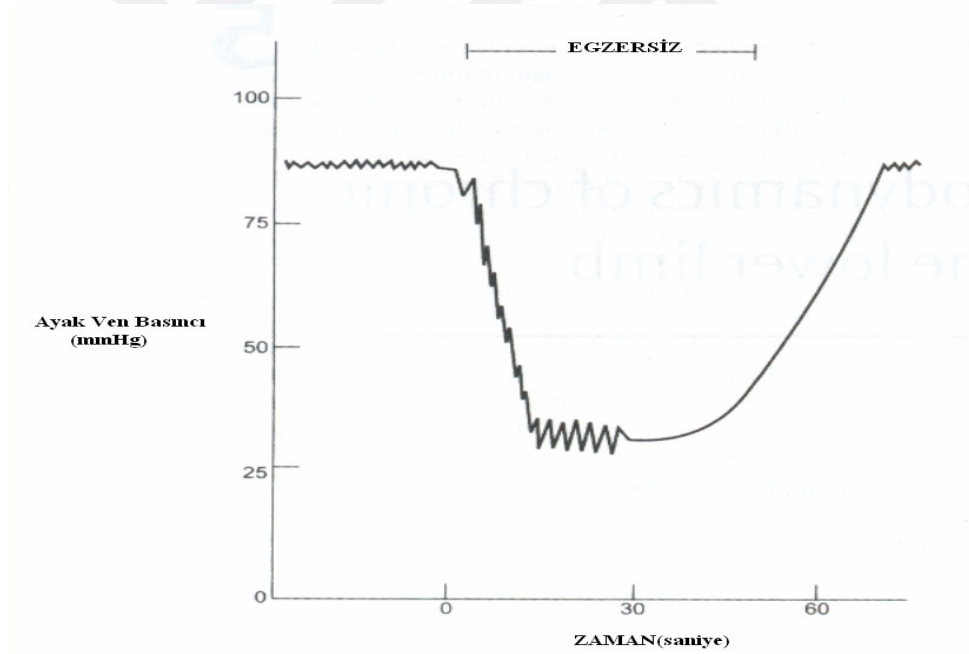
Bacaktaki venöz basınç 56 mmHg' dir (10).

Ayakta istirahatte ve egzersiz halinde

Ayakta istirahat halindeyken ayak ven basıncı yaklaşık 85-90 mmHg civarında olup damar içindeki hidrostatik basınçtan kaynaklanır (Şekil 5). Ayağa kalkış anında alt ekstremitte kan volümünde en az 300 ml artış olur, bu da kardiyopulmoner kan ve

strok volümde geçici düşme yaşanır. Bu durumda postural vazokonstriktör refleks artmış kapiller basıncı düşürür (10).

Egzersizle bu basınç % 80 azalma ile yüzeysel venlerde 20 mmHg'ya, derin venlerde 40 mmHg' ya geriler (7,9). Egzersiz bitiminden yaklaşık 13-25 sn veya 11-37 sn sonra istirahat değerlerine geri döner (Şekil 5). Bu süre derin venlerin tekrar dolması için gerekli zamandır (7,10). Kasların kontraksiyonu 250 mmHg değerinde basınç yapabilmektedir (9). Sağlıklı bir bireyde 3 ile 12 adım sonrasında hidrostatik basınçta azalma meydana gelerek bacak venöz basıncında düşme sağlanır. Bu düşüş nispeten yürüme hızından bağımsızdır (10).



Şekil 5. Egzersizde Ayak Basınç Değişiklikleri

3.4. ALT EKSTREMİTE PRİMER VARİSLERİ

Derin ven trombozu gibi herhangi bir başka sebep olmaksızın alt ekstremitedeki yüzeysel venlerin uzayıp, kıvrıntılı genişlemiş bir görünüm alarak belirginleşmesine primer varis denir.

Variköz venler kayıtlı tarihin başlangıcından beri bilinmektedir. Atina' da Ulusal Müze'de taşa kazınmış olarak uzun variköz ven açıkça görülmektedir. Yapılan araştırmalarda varis tedavisinin bir çok metodları bulunmakla beraber Arap kaynaklarında milattan sonra 400. yılda cildin kesilip varisin ortaya konulup altından arasına cerrahi bir mil yerleştirilerek varisin çekilerek koparılması bulunmaktadır. Gerçi yirmibirinci yüzyıla girilinceye kadar bu tedavi metodu fazla geliştirilememiştir. Homans 1916'da variköz venlerin etyoloji, patofizyoloji ve tedavisini etkili bir şekilde tanımlamıştır. Modern günümüzde tanımladıkları geçerliliğini korumaktadır (11).

Varisler çoğunlukla alt ekstremitelerde yüzeysel venlerde görülmekle beraber spermatik kordon, özofagus, anorektum venaları ve venalarda da görülürler. Varisler insanlarda sık görülen vasküler hastalıklardan biri olup dünya nüfusunun % 10-20' inde varis olduğu düşünülmektedir. Bu sıklık yaşa paralel olarak artmaktadır (12).

3.4.1. ETYOPATOGENEZ

Bir çok teorilere rağmen alt ekstremitte variköz venlerin patogenezi hala tartışmalıdır. Primer variköz venlerin nasıl niye geliştiği hakkında çok az şey bilinmektedir. Çok genç yaşlarda dahi bu hastalığın görülmesi doku ve organ oluşumunun rolünü göstermektedir (1,13).

Primer varislerin oluşumundaki nedenler halen kesin olarak bilinmemekle beraber bu hipotezleri üç ana başlıkta toplayabiliriz :

1. Ven kapakçıklarının yetmezliği
2. Ven duvarında defekt
3. Hem kapakçıklarda hem de ven duvarında yetmezlik ve defekt (9,12).

Variköz venlerin oluşumunda primer neden olarak kapakçık yetmezliği ve venöz hipertansiyon üzerinde durulmuştur. Son zamanlarda öne sürülen yeni teorilerde, venöz duvardaki primer intrinsik anormallikler ve bunun sonucu olarak gelişen kapakçık yetmezliği etyopatogenezde sorumlu tutulmaktadır (14).

Işık ve elektron mikroskop incelemelerinde normal ven yapısından farklı olarak variköz ven segmentlerinde hücresel düzenlemenin bozulduğu gösterilmiştir. Bu yapısal anormallikler, şişmiş ve helikal ayrılmış kollajen fibrilleri, incelmış ve düzensizleşmiş düz kas tabakasını, fibröz dejenerasyona uğramış medya tabakasını ve piknotik çekirdeklerle beraber vakuollü endotelyumu kapsar. Dolayısı ile venöz tonus azalmış, hormonal ve temperatur değişikliklere cevabı azalmıştır. Bu değişiklikler üniform değildir. Bazı segmentler kalınlaşmış ve fibrotik olmuş, bazı segmentler de incelmış ve anevrizmatik olmuştur. Ven duvarında düz kas, kollajen ve elastin liflerinin miktar ve yapısı değişmiştir. Venöz tonüsün; histamin, serotonin, adrenalin ve pasif gerginliğe cevabı değişmiştir. EDRF bağımlı olmayan relaksasyon cevap (NO ile oluşan) %86 oranında azalmıştır. Sonuç olarak; variköz venlerde endotelyal ve düz kas fonksiyonları bozulmuştur. Bu primer duvar anormallikleri venöz dilatasyona predispozan rol oynar. Bu fonksiyonel, biyokimyasal ve yapısal değişiklikler yalnız dilate bölgelerde değil, tüm safen ven boyunca vardır (14).

Variköz venlerin %70'inde primer veya sekonder olarak kapak yetersizliği vardır. Primer varislerde derin ve yüzeysel sistemler arasında perforan ven kapakçıklarının yetmezliği en önemli rolü oynamaktadır ve bu durumun ilerlemesi ana yüzeysel sistemdeki kapakçıkları da etkileyerek varisleri oluşturur (12).

Primer varis oluşum nedenlerine paralel olarak bir çok etyolojik faktörler sıralanmaktadır:

Yaş:

İleri yaşlarda hem kadında hem de erkeklerde variköz ven veya telenjektazilerin görülme sıklığı artar. Özellikle trunkal bölgede varis veya retiküler varis ve telenjektazinin kombinasyonları yaşla birlikte artış gösterir (15).

Heredite:

Varisli hastaların çoğunda ailevi hikaye vardır. Hastalığın otozomal dominant, otozomal resesif ve cinse bağlı resesif olarak geçişli olduğu söylenmiştir (16). Yapılan çalışmalarda hem annesinde hem de babasında varis olanların çocuklarında varis gelişme riski % 89 iken, bu risk, ebeveynlerin sadece birinde varis olanların çocuklarında %47, varisi olmayan ebeveynlerin çocuklarında ise % 20 olarak saptanmıştır (15).

Tamamen ispatlanamamakla birlikte doğuştan bulunan defektin v.iliyaka eksterna kapakçığının hipoplazisi veya yokluğu olduğu sanılmaktadır. Böyle bir düşünceyi ortaya çıkaran deliller, primer varislerin çoğunda bu kapakçığın yetersiz

olması ve ailevi varis hikayesi olmakla birlikte kendilerinde henüz varis gelişmeyen genç kimselerde bu kapakçığın yetersiz bulunmasıdır (16). Gelişme döneminde oluşan ven duvar defekti ve kapakçık yetersizliği ile ilgili bir kanıt olmasa da varisli hastaların % 50' de aile hikayesi vardır (12).

Cinsiyet:

Kadınlarda erkeklere göre rastlanma olasılığı 2-4 kat fazladır. Bu oran doğurganlık özelliği nedeniyle kadınlarda fazladır. Ancak doğurmamış kadınlarda bile kadınların aleyhine olması hormonal faktörlerin etkisini akla getirmektedir (16).

Hormonal Etkenler:

Gebeliğin ilk aylarında henüz uterusun pelvis venalarına bası yapmadığı durumda varisler ortaya çıkmaktadır. Aynı şekilde oral kontraseptiflerin kullanımında, uzun süreli östrojen tedavisinde varislerin geliştiği bir gerçektir. Burada östrojen ve progesteronun etkili olduğu, östrojenin ven duvarında ödem meydana getirdiği ve ödemli ven duvarında progesteron etkisiyle dilatasyona neden olduğu ileri sürülmektedir. Menstruasyon döneminde varis şikayetlerinin daha sık görülmesi de bu savı desteklemektedir (12).

Enzim Anormallikleri:

Bazı varisli hastalarda yüksek kan β -glukuronidaz, β -N-asetilglukozaminidaz ve arilsülfataz seviyeleri tespit edilmiş olup cerrahi veya medikal tedavi sonrası bu seviyelerin azaldığı gözlenmiştir (10).

Karın İçi Basıncının Arttığı Durumlar:

Gebelik mekanik yolla da karında büyük venlere baskı yaparak venöz dönüşü zorlaştırdığından varis oluşumunda etkili olur. Venler üzerine dışarıdan bası yapan durumlar, tümör, lenf nodu ve alt ekstremitelerde tekrarlayan travmalar varis olasılığını artırmaktadır (12).

Fizik gücüyle çalışan ve selülozlu gıdalarla beslenen kişilerde konstipasyonun az olması nedeniyle varislere az rastlanmaktadır. Buna karşın yüksek kalorili karbonhidratlı posasız dıdalarla beslenen gelişmiş ülkelerde yaşayan insanlarda varisler ve hemoroidler sık görülmektedir. Buna örnek olarak; Afrika' da yaşayan ve genelde selülozlu gıdalarla beslenen zenci ırkında varisler hemen hiç görülmezken, Amerika' da yaşayan zenci ırkında sık görülmektedir (12).

İleri derecede şişmanlarda iliofemoral venlerdeki eksternal basınç artışı varis oluşumunu kolaylaştırır.

Artmış Venöz Hidrostatik Basınç:

Cerrah, diş hekimi, berber ve kasap gibi ayakta sabit durarak iş gören meslek sahiplerinde müskülovenöz pompanın çalışmamasına bağlı olarak yüksek venöz hidrostatik basınç nedeniyle kapakçık çalışması yetersiz kalıp varis oluşumunu tetikleyebilir (12). Perforan venaların derin fasyayı geçtikleri yarıklardaki, daha çok travmatik nedenle olan genişlemeler sonucu rekürren mikrotravmaya bağlı perforan ven kapakçıklarındaki yetmezlik varis gelişimine neden olabilir (12).

Seyrek olarak öksürme ve defekasyon sırasında safenofemoral birleşme noktasında geçici basınç artışı olduğu ve terminal VSM kapakçıklarını bozarak yetersizliğe sebep olduğu ileri sürülmüştür (16).

Kollateral ven veya arteriyovenöz fistül sonucu yüzeysel venlerdeki kan akımının anormal derecede artmasına bağlı olarak ve perforan ven kapakçıklarının yetersizliği nedeniyle derin ven kanının yüzeysel sisteme aktarıldığı durumlarda venöz hipertansiyonun sonucu olarak varis oluşumu gerçekleşebilir (16).

Tüm bunlarla beraber sigara içimi, inguinal herni, hipertansiyon ve sedanter yaşam da varis oluşumunu artırır (15).

3.4.2. VEN DUVARININ YAPISAL ZAYIFLIĞI

Variköz ven fizyopatolojisi için son zamanlarda yaygın kabul gören teori intrinsik venöz duvar anormallikleri nedeniyle oluşan dilatasyon ve bunun sonrasında gelişen yetersizliktir (14). Variköz venlerde hücre düzenindeki dejenerasyonunun normal venlerden açıkca farklı olduğu ışık ve elektron mikroskopik çalışmalarda gösterilmiştir. Bu yapısal anormallikler, ışık ve elektron mikroskopisinde vakuolize olmuş endotelium, piknotik çekirdek, incelmış ve düzensizleşmiş düz kas tabakası, fibröz dejenerasyona uğramış medya tabakasını ve şişmiş ve helikal kırılmış kollajen fibrilleri olarak tanımlanmıştır. Kas hücrelerinin aralarındaki bağlantı kollajen infiltrasyonu nedeniyle kesintiye uğramıştır. Duvar dejenerasyonunun bu dağılımı homojen değildir bazı segmentler kalınlaşıp fibrotikleşirken bazıları anevrizmalaşmıştır. Morfolojik ve histokimyasal çalışmalarda primer variköz venli hastalardan elde edilen yüzeysel bacak venlerinde elastin, kollajen ve düz kas hücre içeriğinde değişiklikler gösterilmiştir. Bu teori son zamanlarda kabul görmeye başlamıştır (14).

Thulesius ve arkadaşları (17) primer ve sekonder variköz venli hastalardan elde ettikleri izole ven segmentlerinde norepinefrin, serotonin, histamininin ve pasif

germeye cevaplarının azaldığını göstermişlerdir. Lowel ve arkadaşları (18) primer variköz venlerdeki endotel bağımlı relaksasyon ürünü olan nitrik oksit seviyesinin kontrol gruba kıyasla % 86 azaldığını saptamışlardır. Bu endotelial ve düz kas fonksiyonunun primer varikozitli hastalardan alınan ven segmentlerinde zayıfladığını göstermektedir. Normal venler incelendiğinde yüksek intralüminal basınçta hipertrofi gelişmektedir. Bu nedenle arteriyal bypasda kullanılan venlerde arteriyalizasyon gelişir ve duvarları kalınlaşır ve hipertrofidan çok dilate bir görünüm alır (1).

İntima proliferasyonu, medyanın konnektif doku hipertrofisi ve elastik fibrillerin parçalanması variköz hastalığıdaki flebosklerozda da görülür. Bu değişiklikler aterosklerozdakilere benzerdir. Kalınlaşan damar duvarında kalsiyum depositleri ve amorf maddeler ortaya çıkar. Venöz duvardaki interstisyel konnektif dokudaki düzensizlikler, parçalanmalar ve medyada ayrılmış kas fibrilleri elektron mikroskopisinde açıkça görülmüştür. Major düz kas hücre tipi kontraktıl tipten sekretuar tipe dönmüştür (6).

Damar duvar gerilimi elastin, kollajen ve düz kas hücreleri ile kontrol edilir. Bu güç, otonomik sinirler ve dolaşım faktörlerinin etkisiyle oluşur (2,21). Elastik ve mekanik özellik değişikliklerinden ve mekanik kontraktilite yetersizliğinden dolayı oluşan venöz tonusdaki azalmanın sebebi olarak, düz kas hücrelerinin ekstraselüler matriks ile yer değiştirmesi rapor edilmiştir (13,19,22,23). Bu bilgi dilatasyona yol açan primer ven duvar fonksiyonunun önemini izah etmektedir. Variköz ven olgularının % 10-33 ünde femoral bileşkedeki yetersizlik bulunmamaktadır. Ayrıca arteriyal sisteme implante edilmiş venlerde dilatasyon gelişmeyip hipertrofiye uğramışlardır (1,21,24-26).

Ven duvarındaki primer zayıflık, reflü nedeniyle ve valv küspis ayrılmasıyla ortaya çıkan ven dilatasyonu sonucunda olabilir (27). Bir çok yazar ise bu zayıflığın ven duvarındaki yapısal problemler sonucunda olabileceğini öne sürmüşlerdir (28-32). Venin yapısal proteinlerindeki değişiklikler anormal kollajen ve elastin içerik ile intimal hiperplazi ve matriks kontrol enzimlerindeki değişiklikleri içermektedir (28-32). Andreotti ve arkadaşları (28) makroskopik olarak variköz venlerde normal venlere oranla kollajen ve elastin miktarının azaldığını göstermişlerdir. Buna zıt olarak bir çok araştırmacı variköz segmentlerde normal venlere kıyasla kollajen miktarında artış saptamışlardır (30,31).

Örneğin Gandhi ve arkadaşları (30) variköz ven duvarında proteolitik enzim aktivitesinde değişiklik olmaksızın kollajen miktarındaki artışı ve elastin miktarındaki azalmayı göstermişlerdir. Sansilvestri – Morel ve arkadaşları (31) variköz venlerden alınan düz kas hücreleriyle kollajen subtipleri sentezinde dengesizlik bulmuşlar ve bu dengesizliği kollajen tip-1' in artarken kollajen tip-3' ün azalmasına bağlamışlardır. Badier–Commander ve arkadaşları (32) son zamanlarda yaptıkları çalışmalarda variköz venli hastaların örneklerinde, ekstraselüler matriks düzenleyici enzim konsantrasyonlarına bakmışlar. Araştırma sonucunda, oldukça yüksek konsantrasyonlarda doku inhibitör metalloproteinaz – 1 (TIMP-1) ve oldukça düşük konsantrasyonlarda proteolitik enzim metalloproteinaz – 2 bulmuşlar. Matriks kontrol enzimlerindeki bu değişim variköz venlerin duvarındaki matriks birikimini desteklemektedir. İlginç bir şekilde proteolitik enzim çevresiyle ilişkili inflamasyonu normal olarak bulunmuş (33).

Yapılan değişik çalışmalarda gösterilen variköz ven duvarındaki matriks değişiklikleri farklılıklar göstermektedir. Bunun nedeni olarak patolojik bulguların bir çoğunun, variköz ven gelişiminden ziyade sonucuyla ilgili olduğu söylenebilir (27).

3.4.2. CEAP SINIFLAMASI

Venöz yetmezlikli olguların gereksinimleri düşünülerek, 1994 yılında bir araya gelen uzmanlar grubunun Amerikan Venöz Forumu altında toplanmasıyla CEAP sınıflaması ortaya çıkmıştır (34). Bu sınıflandırmada, klinik sınıf (C), etyoloji (E), ekstremitedeki venlerin anatomik dağılımı (A), patolojik mekanizması (P) ile tanımlanır.

Klinik Sınıflama : (C)

Class 0 : Görünen veya palpe edilebilen venöz hastalık yok

Class 1 : **Telanjiyektazi** veya **retiküler venlerin** olması

Class 2:Variköz venler : Çoğunlukla primer venöz hastalıklar olarak sınıflandırılırlar. Sekonder varikositler ise post-trombotik lezyonlar, arteriyovenöz fistüller ya da non-trombotik proksimal venöz oklüzyonlar sebebiyle oluşur.

Class 3 : **Ödem**

Class 4 : **Deri değişiklikleri ve lipodermatoskleroz**

Class 5 : **İyileşmiş ülser**

Class 6: Aktif venöz ülser : İyileşmiş ya da aktif ülserler buldukları bölgelerde yetmezlikli perfaratörlerin işareti olabilirler.

Klinik sınıflamada asemptomatik (a), semptomatik (s) ile gösterilir.

Etyolojik Sınıflama : (E)

Ec : Konjenital

Ep : Primer

Es : Sekonder

Anatomik sınıflama : (A)

As : Süperfisiyal ven : 1- VSM' da telenjiyektazi / retiküler ven

2- VSM' da dizüstünde (uylukta)

3- VSM' da dizaltında (baldırda)

4- VSP' da

5- Aksesuar sistemde

Ad : Derin ven : 6- Vena kava inferior

7- Ana İliyak

8- İnternal İliyak

9- Ekternal İliyak

10- Pelvik / Gonodal

11- Ana Femoral

12- Derin Femoral

13- Yüzeyel Femoral

14- Popliteal

15- Krural (anterior tibial, posterior tibial, peroneal)

16- Müsküler (gastroknemus, soleus ve diğerleri)

Ap : Perforan : 17- Uyluk perforanları

18- Baldır perforanları

Patofizyolojik sınıflama : (P)

Pr : Reflü

Po : Oklüzyon

Pr,o : Reflü ve oklüzyon

Örneğin, iç malleolde ödem ve deri değişiklikleriyle birlikte aktif ülseri bulunan ve beraberinde VSM trasesinde varisleri olan bir olgunun venografisinde de dizaltı ve dizüstü yüzeyel, derin ve perforan venlerde reflü gösterilmiş olsun. Bu hastanın klinik durumu **C_{2,3,4,6} -EP - A_{s,p,d} - Pr_{2,3,13,14,15,17,18}** şeklinde yazılabilir.

3.5. APOPTOZİS

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır (35). Son otuz yılda histopatoloji genetik ve moleküler biyolojide yoğun araştırmalar bütün hayvansal hücrelerin kendilerini öldürecek bir genetik düzeneğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Multisellüler organizmalarda hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin devamı ile sağlanır (36). Normal koşullar altında zedelenmiş veya yaşlanmış hücreler organizmanın hücresel homeostazının sağlanması için apoptozis olarak adlandırılan iltihabi olmayan ve enerji gerektiren bir tür hücre ölümü ile kendilerini feda ederler (37). Apoptozis programlı ve fizyolojik bir ölüm şekli olması nedeniyle bu dengenin sürdürülmesinde önemli rol oynar. Bu ölüm şekli ilk kez, 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı hücre ölümü gösterilmiş ve buna Latince sonbaharda ağaçlardan veya çiçekten kuruyan yaprakların düşmesini anlatan ‘**apoptosis**’ sözcüğü ile adlandırılmıştır (38). Apoptozis programlanmış hücre ölümüdür ve embriyogenesis, immün repertuarın gelişimi ve iltihabi olayların rezolusyonu gibi birbirinden farklı birçok süreçte istenmeyen hücrelerin eliminasyonu için gerekli bir olaydır. Yine, apoptozis ve hücrelerin ortadan kaldırılması arasındaki denge organizmanın iltihabi olaylardan veya othereaktiviteden korunması için önemlidir (39).

Apoptozis embriyonun gelişmesi, metamorfozis olaylarında ve sağlıklı erişkin dokularda süregelen fizyolojik bir hücre ölümüdür. Bunun dışında endokrin dokularda kantrofik hormon konsantrasyonunun düşmesi ile oluşan atrofi, neoplazmlarda kendiliğinden veya kemoterapi, iyonize radyasyon ve hipertermi tedavileri sonrası görülen ölüm, allerjilerde T lenfositlerin hedef hücreye olan etkisi apoptozis yoluyla gerçekleşir (40).

Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşarlar. Deri, gastrointestinal sistem ve immün sistem gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlıdır (41).

Apoptozis fetusta normal doku gelişiminin temel özelliğidir (42). Normal erişkin dokularında ise hücre büyümesi ve apoptozis bir denge içindedir. Bu dengenin biri lehine bozulması çeşitli patolojilere yol açmaktadır. Genetik hücre ölüm programının hatalı ekspresyonu veya apoptotik hücre ölüm programının eksik

uygulanması çeşitli karsinom, AIDS, viral infeksiyonlar ile otoimmün, nörodejeneratif ve iskemik hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (42-45).

Bir Nematodun Öyküsü :

Caenorhabditis elegans isimli nematod üzerinde, 1990'ın ilk yıllarında yapılan ayrıntılı çalışmalar, apoptozisin genetik ve moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında oldukça yardımcı olmuştur. Bu organizmada bulunan 1090 hücreden tam olarak 131 tanesi apoptozis ile ölür ve geriye kalan 959 hücre erişkin nematodu oluşturur (46). *Caenorhabditis elegans* ile ilgili çalışmalar apoptozisin birbirini izleyen dört evresi olduğunu göstermiştir:

- 1- Hücreyi intihara götüren hücre içi veya hücre dışı uyarılma
- 2- Hücre içi proteazların aktivasyonu ile hücrelerin öldürülmesi
- 3- Apoptotik hücrelerin diğer hücreler tarafından ortadan kaldırılması
- 4- Apoptotik hücre parçacıklarının lizozomlar içinde yıkılması (46).

Bu aşamalar *C.elegans*'da CED (Cell Death) genleri ile kontrol edilir ve bu genler nematodlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede hayvansal evrimleşme boyunca oldukça korunmuştur. Ced-3 ve ced-4 genlerinin ürünleri apoptozis için gerekli iken ced-9 , ced-3 ve ced-4 genlerini inhibe ederek apoptozise engel olur. ced-3 sistein içeren aspartil proteaz olup bir kaspaz benzeridir. Bu enzim DNA tamir enzimleri, çekirdek zarı komponentleri ve apoptotik hücredeki DNA'nın yıkımından sorumlu endonükleazlar gibi birçok hücrenel proteini aktive eder. Ced-3 memeli hücrelerinde kaspazlar ile, ced-4 apoptozis proteazı aktive eden faktör-1 (Apaf-1) ile, ced-9 ise apoptozisi önleyen bcl-2 ailesi ile homologdur (46,47).

3.5.1 APOPTOZİSİN MORFOLOJİSİ

Hücre ölümü nekroz ve apoptoz olmak üzere başlıca iki şekilde meydana gelir. Nekroz ve apoptoz arasında biyolojik ve morfolojik belirgin değişiklikler vardır. Nekroz kimyasal ve fiziksel zararlanmaları takiben ortaya çıkan patolojik bir ölüm şeklidir. Başta mitokondrium olmak üzere sitoplazmik organeller hasarlanır, hücre membranı selektif permeabilitesini kaybeder ve şişerek rüptüre olur. Hücre içeriği çevre dokuya yayılarak, inflamatuvar bir cevaba neden olur (48). Apoptotik hücrede, nekrozun aksine en çarpıcı değişiklik çekirdekte meydana gelir.

Apoptozisde hücreler tek tek etkilenir, hacimce küçülür, komşu hücrelerle temasını kaybeder (mikrovillus gibi özel yüzey farklılıkları ve diğer hücrelerle olan bağlantı yapıları bozulur). Bu olay hızla gerçekleşirken aynı anda hücrede değişik

yüzey çıkıntıları ve kıvrıntılar oluşur. Bunların membranla çevrili olarak hücreden ayrılmasıyla "apoptotik cisimler" meydana gelir (40).

Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup daha diffüz görünümündedir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp (base pair - baz çifti) büyüklüğünde veya bunun katları boyutunda parçalara ayrılmasıdır. Bu durum immün agaroz jel elektroforezde "ladder patern" olarak isimlendirilen karakteristik "merdiven" şeklinde bir görünüm oluşturur. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase-I ve II de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılabılırken, apoptoziste yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (49).

Ormerod ve arkadaşları (50) insan over kanseri hücrelerine cisplatin vererek yaptığı çalışmada hücrelerin apoptozis yoluyla öldüğünü gözlemiştir. Bu hücrelerin önce 30 kbp (kilo bp)' lik daha büyük kromatin parçalara bölündüğünü bu sırada kromatin yapısında morfolojik değişikliklerin saptandığını 180-200 bp' lik oligonükleozomlara ayıran internükleozomal parçalanmanın daha geç bir olay olduğunu göstermiştir. Bu nedenle jel elektroforezdeki merdiven manzarasının iyi bir kriter olmadığı, erken tanıda mikroskopla apoptozis belirtilerine bakılması gerektiğini söylenmektedir.

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Hücre yüzeyinde sitoplazmik çıkıntılar "bleb" meydana gelir. Tüm bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir halo ile görülmektedir. Büzülen ve küçük parçalara ayrılan yapılar protein çapraz bağlanmalar ile stabilize edilirler (35,36). Transglutaminaz sitoplazmik proteinlerde çapraz bağların oluşmasına neden olur. Nitekim apoptotik

hücrelerde deterjanlardan etkilenmeyen protein bir kabuk vardır. Scanning elektron mikroskopunda epidermisin kornifiye hücreleri gibi kıvrıntılı görülürler (51).

Bu hücrelerde endoplazmik retikulum genişler, genişlemiş sarnıçların hücre yüzeyi ile birleşmesi sonucu hücre yüzeyinde krater gibi oyuklar gözlenir. Hücre iskeleti filamanları hücre yüzeyine paralel kenarlarda toplanır. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korurlar. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görülür. Mitokondriyumlar, nekrozla ölen hücrelerin aksine başlangıçta itibaren normal yapıdadır. Nekrozdan farklı olarak apoptozisde hücre zarı sağlamdır, bu nedenle de inflamasyona neden olmaz (40).

Sonuçta yüzey çıkıntıları plazmalemma ile beraber hücre yüzeyinden ayrılır ve membranla çevrili yuvarlak veya oval apoptotik cisimler meydana gelir. Bunların sayısı, büyüklüğü ve içeriği hücrenin tipine göre değişir. Bazıları, yoğunlaşmış sitoplazmayla beraber bir veya daha fazla nükleer parça içeriyorken bazıları sadece sitoplazma elemanlarını içerir. Nükleer içerik bulunması cismin büyüklüğüne bağlı değildir (40).

Oluşan bu apoptotik cisimler hücreler arası doku aralıklarına dağılırlar veya lümeneye dökülürler. Mononükleer fagositik sistem veya komşu epitel hücreleri tarafından fagositik edilirler (40). Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Apoptotik hücrede plazma membranı fosfolipid asimetrisinin kaybolduğu gözlenmektedir. Normalde fosfatidil kolin ve sfingomyelin fosfolipid baş gruplarının sık paketlenmesini sağlar ve hücre dışında yer alır. Buna karşın fosfatidilserin ve fosfatidil etanolamin iç yüzeyde bulunur ve bu kenarın daha gevşek paketlenmesini sağlar (52). Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, ATP bağımlı aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fosfolipid asimetrisi kaybolunca makrofajların apoptotik hücreyi tanıyamaması sonucu fagositoz gerçekleşir (52). Fagositik hücrelerin vitronektin ve lektin özelliğindeki reseptörleri, fosfatidil serin ile bağlanarak fagositozu uyarır (53-55).

Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalırlar. Apoptotik cisimlerin sindiriminde fagositik hücrenin lizozomal enzimleri rol oynar. Kendisine ait lizozomlar diğer organeller gibi bozulmamıştır. Her ne kadar apoptotik cisimler hızla fagositik edilse de bazıları özellikle de süspansiyon kültürleri, tümör asitleri gibi sıvılarda dağılmış olanlar fagositozdan kaçabilir.

Bunlar kendiliğinden şişme ve membran rüptürüyle dejenerasyona giderler. Buna "Sekonder Nekroz." denir. Morfolojik olarak nekrozla aynıdır (56).

Apoptotik cismin ayırıcı özellikleri şöyledir; dejenere hücre parçaları küçüktür, oval veya yuvarlaktır, tipik olarak görülen nüklear parçalar bulunabilir.

3.5.2 APOPTOTİK SÜREÇ

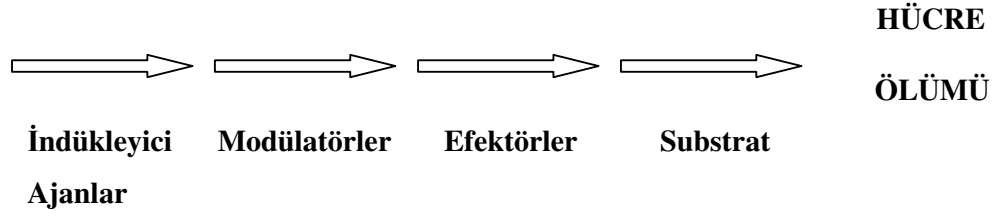
Programlı hücre ölümünde birbirini izleyen basamakların neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır. Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir (35).

3.5.2.1 Apoptozisde Sinyal İletim Sistemleri

Hücre ölümü veya yaşamının sürdürülmesindeki stimülasyon ile ilgili olaylar, protein kinaz C, büyüme faktör reseptörleri ve G proteinler tarafından geçirilen sinyal yollarını içerirler (57). Bazı hücre içi olaylarda olduğu gibi apoptozisde gelişen olaylar, benzer sinyal yollarını kullanmaktadırlar. Bu olaylar serisi, hücrel proliferatif homeostazide denge oluşturulması için gereklidir. Hatta küçük bir dengesizlik tek bir hücre için letal etkiye veya andiferansiye hücrelerde atipik proliferasyona neden olur. Plazma membranının sitoplazmik yüzeyinde lokalize olan G proteinleri transmembran sinyal sistemlerinde önemli rol oynarlar, adenilat siklazın stimülasyonu veya inhibisyonu ile hormonal sinyal iletimini sağlarlar (40).

Apoptozisin homeostatik mekanizmalarda oynadığı önemli rollere verilen en iyi örnek T-hücreleridir. Bir çok timosite ait T-hücre reseptörü (TCR) konakçı organizmada bulunan antijenleri tanıyabilir ve bu hücrelerin zararlı otoimmün cevabı başlatma potansiyelleri vardır. Bu risk, timusdaki negatif seleksiyon sırasında hücrelerin apoptozise uğramaları sağlanarak en aza indirgenir (58). Uyarı reseptöre bağlandığında G protein veya TCR aracılığı ile fosfolipaz C aktive olur. Bu enzim ile PIP₂ (Fosfotidil İnozitol 4,5-bifosfat)' den IP₃ (İnozitol 1,4,5-trifosfat) ve DAG (Diacil Gliserol) oluşumu gerçekleşir. IP₃ endoplazmik retikulumundan Ca²⁺ kanallarının açılmasına neden olur ve böylece hücre içi Ca²⁺ konsantrasyonu yaklaşık 100 kat artar. DAG ile membranda yer alan Ca²⁺ bağımlı protein kinaz C aktive edilir. Bu enzimin, fosforilleştiği proteinin tipine göre hücre ya apoptozise veya proliferasyona sevk edilir (58-60).

3.5.2.2 Apoptotik Hücre Ölümünün Fazları



İndükleyici Ajanlar : Apoptozis çok çeşitli iç ve dış uyarı ile tetiklenebilmektedir. Toksinler, iyonize radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, çeşitli kimyasallar, kemoterapik ajanlar, ısı şoku, yaşlanma veya iskemi sonucu gelişen subletal hasarlar ve DNA hasarlanmaları hücredeki apoptotik süreci aktive edebilir. Ölüm reseptörlerinin uyarılması apoptozisi indükleyen en önemli yollardan birisidir. Büyüme faktörleri azlığında, hormon ve sitokinlerin sinyalleri olmadığında hücreler apoptozise giderler. Sonuç olarak çekirdekte, hücre membranında, mitokondriyumda veya hücre içi herhangi bir bölgeden gelebilecek bir uyarı apoptozu başlatabilir (61).

DNA hasarı, hücre siklusu kontrolü ve apoptozis arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır (62). Hücrede bir şekilde irradyasyon ve kemoterapik ilaçlar nedeniyle DNA hasarı oluştuğunda p53 proteini fonksiyonel duruma geçer (63,64). Eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu durdurur ve hücreye DNA' sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Hasar tamir edilemeyecek düzeyde ise bu durumda apoptozisi indükler (61).

Apoptozisi başlatan önemli yollardan birisi de ekstraselüler ölüm sinyal proteinleri ve onların hücre yüzey reseptörleridir (65-68). Beş ölüm reseptörünün DNA sıralamışları bilinmektedir (Tablo 1) (69-74).

Tablo 1: Ölüm Reseptörleri ve Ligandları

Reseptör	Ligand
Fas (Apo-1 CD95)	FasL
TNFR-1	TNF- α
DR-3 (TRAMP, Apo-3, Wsl-1)	Apo-3L
DR-4 (TRAIL-R1)	TRAIL
DR-5 (TRAIL-R2)	TRAIL

Fas ve TNF- α reseptör-1 (TNFR-1) reseptörleri kendi ligandları ile bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein-protein interaksyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ölüm bölgeleri "death domain (DD)" ile interaksiyona girerler (62). Bu ölüm bölgeleri proteazları aktifleştirerek apoptozisi başlatırlar.

İndüleyici ajanlar intrinsik apoptotik yolu veya ekstrinsik apoptotik yolu tetiklerler. Ölüm reseptörleri ile tetiklenen süreç ekstrinsik apoptotik yol olup diğer indükleyici ajanların neden olduğu yol ise intrinsik apoptotik yol (mitokondriyal yol) olmaktadır.

3.5.2.3. Ölüm Reseptör Yolu (Ekstrinsik Yol)

Ekstrinsik apoptozis, sinyalleri hücre membranında bulunan hücre ölüm reseptörlerinin spesifik ligandlarıyla bağlanmaları vasıtasıyla aktif hale gelir. Ölüm reseptörleri tümör nekrotizan faktör reseptör (TNFR) gen ailesine aittir ve TNRF-1, Fas (Apo-1 CD95), "death receptor 3" (DR-3), ve de TRAIL reseptörleri DR-4, DR-5' i kapsar (Tablo 1) (75).

TNFR ailesinin tüm üyeleri sisteinden zengin ekstraselüler alt bölgeler içerir. Bu bölgeler kendi ölüm reseptörlerinin trimerizasyonu ve aktivasyonu sonucunda kendilerine özgü ligandların tanınmasına izin verirler (76). Ölüm reseptörleri, yaklaşık 80 aminoasit kalıntısını ihtiva eden farklı sitoplazmik bölge içerir (77,78). Bu bölgeler, reseptörlerin proapoptotik fonksiyonları için kritik öneme sahiptirler ve "death domain" (DD) ölüm bölgeleri olarak adlandırılırlar (62). Benzer ligandların bağlanması sonrasında ölüm reseptörleri homotrimerik kompleks şeklini alırlar ve ölüm bölgelerinin aracılığı ile protein-protein etkileşimleri neticesinde intraselüler adaptör proteinler hücre membranına dahil olurlar Bu durumda TNFR-1 ve DR-3, "TNFR-associated death domain protein" (TRADD) TNFR bağlantılı ölüm bölge proteini ile etkileşime girerken Fas ve DR-4, "Fas-associated death domain protein" (FADD) Fas bağlantılı ölüm bölge proteini ile aktivasyona girer (71-73,79-81). DR-5 ' in FADD ve TRADD ile etkileşime girdiği görülmez, bilinmeyen ekstra proteinleri içerdiği akla gelmektedir (74). FADD veya TRADD benzeri adaptör moleküllerin kendileri de kendi ölüm bölgelerine sahiptirler. Kendi ölüm bölgelerine sahip FADD veya TRADD gibi uygulayıcı moleküller sinyali aktive olmuş ölüm reseptörünün ölüm bölgesine aktarır ve ölüm indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Buna

ek olarak uygulayıcı FADD ayrıca DED (death effector domain-ölüm etkili bölge) içerir ve homopitik DED- DED ilişkisi prokaspaz 8' den DISC' in ayrılmasını sağlar.

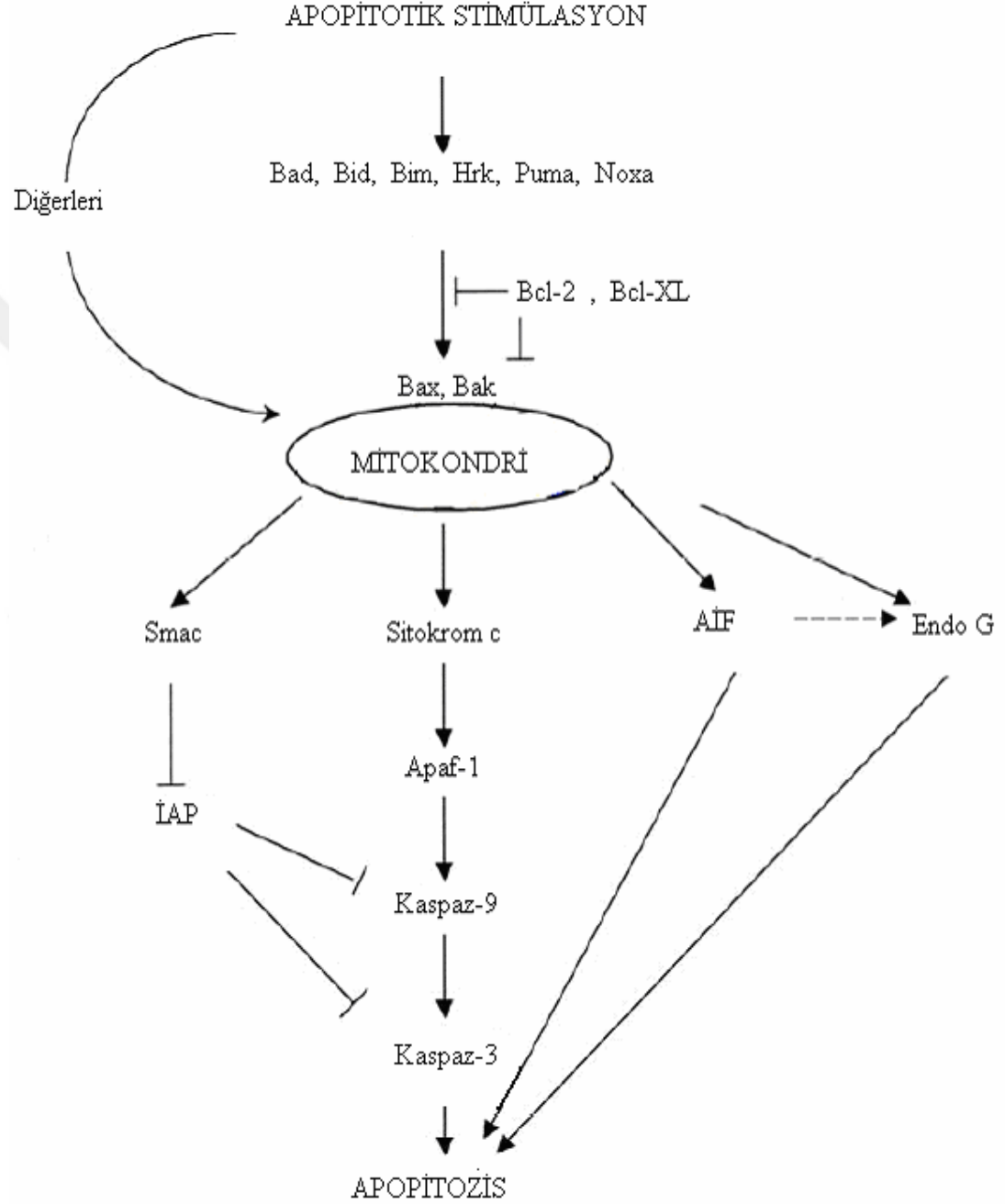
Yukarda tanımlandığı gibi DISC'te bir çok prokaspaz 8 molekülünün toplanması onların otokatalitik aktivasyonuna ve aktif kaspaz 8 salınımına neden olur. Aktif kaspaz 8 daha sonra ölü hücrede spesifik substratların ortaya çıkması ile diğer kaspazları aktive eder. Direkt ve esas olarak kaspaz bağımlı apopitozis yollarında indüklenen hücrelerin kapasitesi tip 1 hücrelerine sahip olmaları ile sınıflandırılır (82).

3.5.2.4. Mitokondriyal Yol

Tip 2 hücrelerde aktive edilmiş reseptörden gelen sinyal, hücrenin yok olması için yeterli güçte kaspaz sinyal kaskadını meydana getiremez. Bu durumda sinyal mitokondri bağımlı apopitotik yolla etkisinin artırılmasına ihtiyaç duyar. Kaspaz sinyal kaskadı ve mitokondri arasındaki bağlantı bcl-2 ailesi üyesi olan *bid* ile sağlanır. Bid kaspaz 8'in bölünmesiyle ortaya çıkar ve mitokondride sitozolden sitokrom c ve diğer mitokondriyal proapopitotik faktörlerin salınmasını indüklemek için proapopitotik bcl-2 aile üyelerinden *bax* ve *bak* ile uyumlu rol oynar (83). Sitozolik sitokrom c, dATP bağımlı şekil değişikliğinin olduğu monometrik Apaf-1 ile bağlanıyor ve apopitozoma benzeyen oligomerlerine ayrılır. Bu da başlatıcı prokaspaz 9'u aktive eder. Kaspaz 9'un aktive olması kesin hücre ölümüyle sonuçlanan kaspaz 3, 6 ve 7 gibi efektör kaspazların katılımıyla kaspaz kaskadının başlamasına neden olur (84).

Ekstrinsik apopitotik yol için aracılık ve büyütme etkisinin yanında mitokondri ayrıca kemotöreatik ilaçlar tarafından indüklenen DNA hasarı, oksidatif stres, açlık gibi hücre içinden orjin alan ölüm sinyallerinin çoğaltılması ve tamamlanmasında rol oynar (85,86). Çoğu apopitotik indüklenmiş durumlar permaibilite geçişi adlandırılan iç mitokondri transmembran potansiyelinin bozulması ile ilişkilidir. Bu da ani iç mitokondri membran permeabilitesinde artış ortalama 1.5 kD altındaki eriyen moleküllerin geçişine neden olur. Suyun matriks içine geçişi ile gelişen osmotik mitokondriyal şişme ile eş zamanlı olarak dış mitokondriyal membranın parçalanması sonucunda mitokondriyal membran arasından proapopitotik proteinlerin sitoplama salınmasına neden olur (87,88). Sitokrom c yi içeren salınan proteinler ve apopitozisi indükleyen faktör (AIF) (92), endonükleaz endo G (90),

Smac/Diablo (91) ve Htr/Omi (92) gibi proteinler apoptozisi ve kaspaz kaskadını aktive ederler.



Şekil 6. Mitokondriyal Yol

3.5.2.5. Kaspazlar

Kaspazlar C elegans ced-3 ile homolog olan sistein proteazlarıdır. Apoptotik hücre eğilimi olan vakaların çoğunda aktive olan apoptotik sinyal ağı için esas önem taşırlar (93). Hücre ölümü kaspaz aktivitesine bağımlı hücre ölümünün gerçekleşmesi ve klasik apoptotik yolun izlenmesi olarak sınıflandırılabilir (48).

Kaspaz terimi sistein bağımlı aspartat spesifik proteazlardan (cystein-dependent aspartate-proteases) türetilmiştir. Onların katalitik aktivitesi yüksek derecede korunmuş aktif bölüm pentapeptit QACRG içindeki sistein miktarına bağlıdır. Şimdiye değin Drosophilalarda 7, memelilerde 14 üyeli kaspaz ailesi bulunurken bunlardan kaspaz 11 ve 12 farelerde tanımlanmıştır (94,95). Terminolojiye göre kaspazlar yayınlanma sıralarına göre, kaspaz 1, ICE (interleukin 1 β -converting enzyme) ilk memeli kaspazı ced-3 ün homoloğu olarak adlandırılır. Kaspaz 1 olduğu kadar kaspaz 4,5,11 ve 12, pro-IL-1 β ve pro-IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin proteolitik maturasyonunu etkilemektedirler (94). Kaspaz 1 veya 11 için defektli sıçanlardan elde edilen hücrelerin hala ölüm sinyaline duyarlı oldukları saptanmış (96,97). Ayrıca kaspaz 3 ve 9 geninin çıkarıldığı deneklerde beyin gelişiminde ağır defekt sonucu perinatal mortalite gelişmiştir (98,99).Yine kaspaz 8 yetmezlikli emriyonun 12 gün sonra öldüğü bildirilmiştir (100). Bu gen defektleri olan hücre dizileri, proapoptotik olan kaspazların önemi yanında farklı apoptotik uyarıların olduğunun altını çizmektedir. Gerçekten kaspaz 3, 9 ve 8'e ek olarak 2, 6, 7 ve 10'un apoptotik sinyal için önemli rol oynadıkları bilinmektedir (100).

Hücrede kaspazlar inaktif zimojenler gibi sentez edilir ve prokaspazlar olarak adlandırılır. N terminalleri, bir prodomain bölgesi ve büyük-küçük subunitlerini bağlayan bağlayıcı peptitten oluşur. Olgunlaşma sırasında prokaspazlar proteolitik olarak büyük ve küçük subunitlerine ayrılır. Aktivasyon sırasında prodomain sıklıkla ortamdan uzaklaşırken her iki küçük-büyük subunitten oluşan heterotetramer oluşur ve aktif kaspaz şekillenir (101).

Proapoptotik kaspazlar başlatıcı kaspazlar 2, 8, 9, ve 10 ile uygulayıcı kaspazlar 3, 6, 7 olarak 2 gruba ayrılır. Ugulayıcı kaspazlar sadece kısa prodomaine sahipken, başlatıcı kaspazlar prokaspaz 8 ve 10 için DED olan uzun prodomain bölgesine veya prokaspaz-9 ve prokaspaz-2 için güçlendirilmiş domainlere sahiptir. Başlatıcı kaspazlar ya hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin bağlanmasına (ekstrinsik apoptotik yol) ya da hücre içinden orjin alan sinyallere (intrinsik

apoptotik yol) cevap olarak ölüm indükleyen sinyal kompleksler tarafından aktive olur (101).

Ekstrinsik apoptotik yolda, örneğin prokaspaz 8 için, TNF reseptör ailesinin bir üyesinin kendi ligandına bağlanmasını takiben oluşan membran- reseptör kompleksi, DISC' ten onun DED bölgelerine doğru sinyaller prokaspaz 8'in toplanmasına neden olur. DISC'e bağlandığında bir çok prokaspaz 8 molekülleri kendi aralarında yakın yerleştiklerinden otoproteolizis ile bir diğerini aktive ederler (94).

İntrinsik apoptozis yoluna katılan prokaspaz 9, mitokondriden sitokrom c nin salınımıyla şekillenen sitozolik ölüm sinyal proteini olan apoptozom adlı proteinlerin mitokondriyal proapoptotik olayları ileletmesiyle aktive olur (102). Bu durumda kaspaz 9 aktivasyonundan sorumlu Apaf-1 kaskadında prokaspaz 9 dimerlerine ayrılır (94). Başlatıcı kaspazlar aktive olduklarında proteolitik olarak, morfolojik ve biyokimyasal uyarılarla hücre ölümünün gerçekleşmesi durumunda ölüm sinyallerini artırır ve sonunda protein substratların spesifik gruplarına ayrılan efektör prokaspaz 3, 6, ve 7'i aktive ederler. (100).

3.5.2.6. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2, foliküller lenfomaya neden olan bir onkojendir. Sıklıkla immünglobulinin kromozom translokasyon [t(14:18)] bölgesiyle bağlantılıdır ve hücre proliferasyonundan çok hücre ölümünü inhibe eden onkojenlerin ilk örneğidir. Bcl-2 ile infekte olmuş B hücreleri, IL-3 azalmasıyla indüklenen apoptozise karşı direnç gösterme eğilimindedir. Tümör oluşumu yolunda sadece büyüme kontrolunda kaçış kabiliyeti değil ayrıca apoptozisten korunma yeteneği de önemli rol oynar (103). Bcl-2'nin homologları identifiye edildiğinde bcl-2 homolog bölgeleri (BH1'den BH4'e kadar) denen korunmuş sıralı motiflerin varlığı ile bcl-2 ailesinin proteinleri ortaya çıktı. Memelilerde bir kısmı antiapoptotik üyelere diğer kısmı da proapoptotik üyelerine ait 30 kadar benzerleri tanımlanmıştır (Tablo 2) (104).

Tablo 2: Bcl-2 Ailesi

Antiapoptotik	Proapoptotik	
Bcl-2	Bax	Bmf
Bcl-X _L	Bak	Hrk
Bcl-w	Bok	Noxa
Bcl-B	Bid	Puma
Boo	Bim	Spike
A1	Bik	BNIP3
Mcl-1	Bad	Bcl-Xs
	Blk	

Bcl-2'ye ek olarak *bcl-X_L*, *bcl-w*, *bcl-B*, *boo*, *A1* ve *Mcl-1* gibi BH1, BH2, BH3 ve BH4 bölgelerine sahip diğer antiapoptotik proteinleri mevcuttur. Proapoptotik bcl-2 grup üyeleri 2 gruba ayrılır; Bax alt ailesi *bax*, *bak* ve *bok* olarak oluşur ki bunlar BH1, BH2, BH3 domainlerine sahiptir. Buna karşın *bid* alt ailesine ait *Bid*, *Bim*, *Bik*, *Bad*, *Bmf*, *Hrk*, *Noxa*, *Puma*, *Blk*, *BNIP3* ve *Spike* gibi proteinler sadece kısa BH3 motifine sahiptir. Bcl-Xs ise BH4 domainini içerir.. Öldürme aktivasyonunun başarısı için iki domainin birbirleri arasında etkileşimleri gerekir (105).

Bcl-2 ailesinin apoptozisi nasıl kontrol ettiği hakkında tartışmalar vardır. Bir model, bcl-2 üyelerinin direkt olarak kaspaz aktivitesini kontrol edebileceğini, diğer model mitokondri bütünlüğünün korunması ile etkili olabileceklerini savunmaktadır (86). Birinci modelde bcl-2, ortolog ced-9 adaptor protein gibi ced-4'e benzeyen Apaf-1'e bağlanır. BH3 spesifik protein *Egl-1*'in ced-4 ile yer değiştirmesi durumunda kaspaz ced 3 aktivasyonunu önler (106). Bunun aksine memeli ced-4 benzeri Apaf-1 kesinlikle bcl-2 benzeri proteinler ile bağlanmaz. Bcl-2 tarafından kontrol edilebilen mitokondriden sitokrom c nin salınımı ile aktive olur (107). Bu yüzden memeli bcl-2 aile üyelerinin esas fonksiyonu, mitokondri bütünlüğünü korumak ve sitoplazmaya mitokondriyal proteinlerin salınımını kontrol etmektir (108). Proapoptotik bcl-2 üyelerinin mitokondri bütünlüğünü koruması bax ve bak genleriyle ilişkilidir. Sadece bax geninin inaktivasyonu apoptozisi sadece biraz etkilerken, yalnız bak geninin bozulması hiç bir etki göstermemiştir. Buna karşın bax

ve bak genlerinin birlikte salınması hemopoetik sistem ve beyinde biriken superflous hücrelere sahip bir çok dokuda apoptozis gelişimi sırasında dramatik bozulmaya neden olur. Bax-/-, bak-/- sıçanlardan elde edilen hücreler etoposid veya irradyasyon gibi maruziyetlere duyarlı bulunmamıştır (109). Bax apoptozis sırasında değişikliklere uğrayan canlı hücrelerdeki sitozolik monomerdır ve dış mitokondriyal membrana integre olarak oligomerlerine ayrılır (110). Mekanizma tartışmalarına rağmen bax ve bak oligomerlerinin dış mitokondriyal membranda geçirgenliği uyardığı ve katkıda bulduklarına inanılır. Bu ya kendileri tarafından kanalların oluşturulması ya da voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC) gibi dış mitokondriyal membran porlarının etkilenmesi ile olur (111). Antiapoptotik bcl-2 üyeleri kendi BH3 bölgelerine bağlanarak Bax ve Bak aktivasyonu ve oligomerizasyonunu önleyerek mitokondriyal proapoptotik olayları inhibe eder. Bu olaylar bcl-2 ve bcl-X_L fazla salınımı birçok sitotoksik etkilere cevap olarak apoptozisi inhibe eder (112).

Özet olarak mevcut model Bcl-2 aile üyelerinin apoptozisi nasıl regüle ettiklerini tanımlamaktadır. Spesifik apoptotik stres sinyalleri, özellikle BH3 proteinlerinin aktivasyonunu tetikleyerek dış mitokondriyal membranda olan antiapoptotik üyeler ile etkileşim sonucu bax benzeri proapoptotik faktörlerin salınımına yol açarlar. Bax benzeri faktörler uyarılmış geçirgenlik bağlantısı ve apoptojenik faktörlerin salındığı yerde değişime uğrayarak dış mitokondriyal membran içine girerler (104).

3.5.2.7. Apoptozisin IAP İle Düzenlenmesi

Bcl-2 ve bcl-X_L gibi antiapoptotik proteinlerin salınım seviyelerinin sıklıkla antiapoptotik transkripsiyon faktörü olarak tanımlanan doğal ve kazanılmış immun yanıtın ana düzenleyicisi transkripsiyon faktör NF-κB (Nükleer faktör κB) tarafından regüle edildikleri bildirilmektedir.(113). NF-κB ayrıca apoptozis indüksiyonunu pozitif olarak sağlar (114). Prosurvival bcl-2 üyelerinin indüklenmesinin yanında NF-κB' e ek olarak İAP (İnhibitor Apoptotik Protein) gibi diğer antiapoptotik genlerin artışı aktive eder. İAP antiapoptotik proteinlerin bir ailesidir ve orjinal prototipi baculovirüslerde tanımlanmıştır. Şimdiye değin insan İAP homologları olarak NIAP (Natural), c-IAP1 (cellular), c-IAP2, XIAP (X-linked) saptanmıştır. Bütün IAP ler ve baculovirüs IAP, yetmiş aminoasitten oluşan tekrar bölgeleri içerir (89). Bu tekrar bölgeleri kaspazlar arasındaki etkileşimi sağlar ve bu etkileşim IAP

lerin antiapoptotik aktivitelerini en fazla etkileyendir. Gerçekten XIAP, c-IAP1, c-IAP2' nin kaspaz 3 ,7 ve 9' u direk olarak inhibe ettiği düşünülmektedir (115).

Tekrar bölgesine ek olarak XIAP, c-IAP1, c-IAP2, E3 ubiquitin ligaz aktivitesine sahip C terminalinde sonlanan yüksek korunmuş RING bölgesi içerir. RING bölgesi ile IAP' ler kendilerini katalize etme yeteneğine sahiptirler. Böylece proteozomlar tarafından yıkım için kendilerine hedef seçerler ayrıca yıkım ve ubiquinasyon için kaspaz 3 ve 7 gibi proteinleri hedefleyebilirler (116). Cellular-IAP tarafından kaspaz aktivasyonunun inhibisyonu regulasyonu çok önemli kısımdır. Kaspazlar gibi proteolitik enzimler tarafından kaskadın aktive edilmesi geri dönüşümsüzdür bu yüzden geçici ve lokal hücre ölümünü önlemek için tam olarak düzenlemesi gerekir.

Önemli olarak, Smac/Diablo mitokondrial apoptotik olaylarda mitokondrial intermembran boşlugundan salındığında İAP lerin kaspazlar üzerinde inhibe edici etkilerini geriye dönderebilir ve kaspazlarla yer değiştirip onların etkilerini yapabilen XIAP ile bağlanabilir. Böylece Smac/Diablo İAP' lerin negatif düzenleyicileridir ve bu yol apoptozis güçlendiricilerini artırır (117). Mitokondrial proapoptotik faktör olan HtrA2/Omi'de gösterilen korunmuş tetra peptit motif kaspazların salınması Smac/Diablo' nun XIAP' ye bağlanması için gereklidir (61).

3.5.3. DAMAR DUVARINDA APOPTOZİS

Damar duvarının normal gelişimi ve fibroproliferatif hastalıkları esnasında meydana gelen kan damarlarının yeniden yapılanmasında, vasküler hücrelerin apoptozisi göze çarpar. Yapılan çalışmalarda kan damarı duvarının hücresel kompozisyonunun ve morfolojisinin kontrolünde vasküler hücre apoptozisinin fonksiyonu ileri sürülmüştür (118). Hücre proliferasyonu, migrasyonu ve matris turnoveri ile birlikte apoptotik hücre ölümü normal damar ve hastalık gelişimindeki yapısal değişikliklere katkıda bulunabilir. Bunun yanında damar duvarındaki hücre ölümü, spesifik sitokinler ve gen ürünlerinin her ikisiyle de ayarlanmış olabilir (119).

Damarların yeniden yapılanması sırasında fizyolojik ve patolojik durumların her ikisinde de apoptozis ile hücre proliferasyonu ayrılmaz ikilidirler. Bununla beraber anevrizma formasyonundaki vasküler atrofi aşırı apoptozis ile birlikte bulunur. Damar duvarındaki vasküler düz kas hücreleri yaşamın başından sonuna kadar

bölünebilirler ve apopitozise maruz kalabilirler (120).Bu nedenle damar duvarı içindeki çok az veya çok fazla olan apopitozis zararlı olabilir (121).

3.5.3.1. Damar Duvarı Yeniden Yapılanmasında Apopitozis

Doku kitlesi veya toplam hücre sayısında büyük değişikliğe ihtiyaç duymadan damar boyutundaki değişim, baştan sona bu yöntemle meydana gelebilmektedir. Bu durum damar duvar yeniden yapılanması olarak tanımlanır. Örneğin proliferasyon / apopitozis sonucu ile olan fizyolojik yeniden yapılanmada; doğum sonrası umbilikal kordun arter ve veninin lümen boyutunda azalma ve duktus arteriozusda kapanma meydana gelir (122). Neonatal vasküler yeniden yapılanma sırasında vasküler hücre apopitozisi, plasentadan akciğerlere oksijen değiş tokuşu sonucunda dallanma noktalarındaki akımın karışıklılığı veya akımın azalması ile tetiklenerek ortaya çıkar (118).

İmmatür tavşanların karotis arterlerinin akımlarındaki değişiklikler nedeniyle damar duvarı yeniden yapılanması direkt olarak gösterilmiştir. Bu deneysel çalışmada sol eksternal karotisin bağlanması sonucunda common karotis arterdeki kan akımındaki azalma ve bu azalmayla korele olan endotelial hücre ve vasküler düz kas hücre apopitozisinde artış dikkati çekmiştir (123).

Ayrıca yeniden yapılanma primer aterosklerozda, anjiyoplasti sonrasında ve restenozda da meydana gelir. Her ne kadar bu durumların tümünde şüphesiz apopitozis meydana gelse de sonuç olarak yeniden yapılanmada vasküler düz kas hücre apopitozisinin rolü zor anlaşılır olmaktan çıkmamıştır (121).

3.5.3.2. Vasküler Düz Kas Hücresindeki Apopitozisin Etkisi

Vasküler düz kas hücresindeki apopitozisinin etkisi ortamın şartlarına bağlıdır. Bu nedenle ilerlemiş aterosklerotik plaktaki intimal vasküler düz kas hücre apopitozisi plak rüptürünün gelişmesine ve mediyal apopitozis de anevrizma formasyonunun gelişmesine yardımcı olabilir. Hasar sonrası neointima oluşumu intima ve medyanın her ikisindeki vasküler düz kas hücre apopitozisi ile sınırlandırılabilir (124).

İnsandaki anevrizmanın en yaygın şekli damar medyasından vasküler düz kas hücre kaybı ile elastin parçalanması ve matriks bozulmasıyla karakterize, ilerleyici dilatasyon gösteren ve bunun sonunda rüptüre olan anevrizmalardır. Vasküler düz kas hücresindeki apopitozis aortik anevrizmalarda normal aortalara kıyasla artmıştır.

Bu artışla ilişkili olarak proapoptotik moleküllerin sayısında da artış mevcuttur (125).

3.5.3.3. Vasküler Düz Kas Hücresindeki Apoptozisin Regülasyonu

Hücresinin yaşama yeteneği moleküler düzeyde proapoptotik ve antiapoptotik sinyaller arasındaki denge ile yönetilir. Bu olay bir takım gen familyaları aracılığı ile olur ki bunlardan en önemlisi bcl-2 familyasıdır. Bcl-2 familyası üyelerinden bcl-2, A1 ve bcl-x' in uzun formu olan bcl-X_L hücrelerin hayatta kalmalarını sağlarken bax, bad, ve bid fonksiyonu apoptozisi iletir. Yapılan bir çok çalışmada vasküler hücre yaşama yeteneğinin kontrolü üzerinde bcl-2 familyası proteinlerinin rolü incelenmiştir (118). İnsan aterosklerotik plakların vasküler düz kas hücrelerinde Bax ekspresyonunun artışıyla aterosklerotik plaklarda apoptozisin yüksek frekansa olduğu gösterilmiştir (126). Ayrıca yenidoğandaki vasküler yeniden yapılanma ve vasküler regresyon da vasküler düz kas hücrelerindeki bax ekspresyonunun artışıyla ilişkilidir (127). Koruyucu protein bcl-X_L, normal vasküler düz kas hücreleri medyasında bolca bulunurken, balon hasarı sonrası apoptotik hücre ölümünün başlarındaki dalgalanma ile korele olarak ekspresyonu azalır (128). Tavşanlarda yapılan anjiyoplasti aracılıklı apoptozisde, bcl-X_L ekspresyonu, vasküler düz kas hücrelerinin intimasında medyasından daha fazla artmış olarak bulunur (124).

Vasküler düz kas hücresinin hayatta kalma mücadelesinde bcl-2 familyası proteinlerinin fonksiyonel farklılıkları yapılan deneylerde gösterilmiştir. Stenotik damarlarda karşıt strateji kullanılarak bcl-X_L' in ablasyonunun neointimal vasküler düz kas hücre apoptozisine neden olabileceği ve bunun da intimal kalınlıkta azalmaya yol açacağı gösterilmiştir (124). Bcl-X_L ekspresyonu neointimal vasküler düz kas hücrelerinde tercih edilen proteindir.

Tüm bu çalışmalar, vasküler düz kas hücrelerinin hayatta kalma mücadelesinde endojen bcl-2 ve bcl-X_L seviyelerinin gerekli olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda vasküler düz kas hücrelerindeki apoptozisin regülasyonunda başlı başına kaspazlar ve İAP proteinleri de rol oynar.

Bcl-2 familyası proteinlerine ek olarak vasküler hücre apoptozisinin regülasyonunda faktör p53 transkripsiyonu öne sürülmüştür. Aterosklerotik lezyonlarda p53 birikimi rapor edilmiştir (129). Bu faktör çok az bir bölümdeki etkisiyle apoptozisi iletir. Faktör p53, ilginç olarak hücre yüzeyindeki ölüm reseptörü Fas' ın ekspresyonunu artırarak vasküler düz kas hücre apoptozisini iletir

(130). Zorunlu p53 ekspresyonu in vitro olarak vasküler düz kas hücre apoptozisini indüklerken in vivo olarak neointima formasyonunu inhibe eder (131).

Sonuç olarak (118);

-Vasküler düz kas hücreleri ve endoteliyal hücrelerin apoptozisi insan damarlarının gelişimi sırasında belgelendirilmiştir.

-Vasküler düz kas hücreleri , endoteliyal hücreleri ve inflamatuvar hücrelerinin apoptozisi, insan ve hayvan modellerinin kronik vasküler lezyonlarında bulunmuştur.

- Akut hasar sonrası intimal lezyonlardaki vasküler düz kas hücrelerinin turnover'ından apoptozisin sorumlu olabileceği ve medyada meydana gelen hücre azalmaya apoptotik vasküler düz kas hücre ölümünün katkıda bulunabileceği gösterilmiştir.

4.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi A.D. ve Patoloji A.D. tarafından gerçekleştirildi.

Çalışmaya her iki cinsten, alt ekstremitede primer varis tanısı almış 15 hasta ve koroner arter bypass greft operasyonu geçirecek sağlıklı VSM 'ya sahip 15 hasta dahil edildi. Yapılacak çalışma tüm hastalara anlatılarak onay belgesi alındı. Çalışmaya dahil edilen hastalarda yaş ve cinsiyet ayrımı yapılmadı.

4.1. GRUPLAR

Grup 1 (Kontrol Grubu): Venöz hastalık hikayesi ve şikayeti olmayan venöz duplex ultrasonda reflü, venöz dilatasyon saptanmayan derin venleri açık koroner arter bypass greft operasyonu geçirecek ve VSM'nın da kullanılacağı 15 hasta kontrol grubuna alındı.

Grup 2 (Variköz Ven Grubu): Alt ekstremitede VSM trasesi boyunca primer varisleri olan ve klinik yakınmaları nedeniyle operasyon endikasyonu almış hastalardan (CEAP sınıflamasına göre C₂ (s) Ep As₂₋₃ Pr kriterlerine uyan) 15 hasta seçildi. Seçilen hastaların tümünde venöz duplex USG'de VSM'de reflü gösterildi.

4.2. DAMAR ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE HAZIRLANMASI

Kontrol grubunda koroner bypass için VSM çıkarılırken ve variköz ven grubunda pake eksizyonu yapılırken dizaltı baldır bölgesi vena safena magnasından yaklaşık 2 cm örnek alındı. Alınan doku örnekleri %10'luk formolde tespit edildikten sonra parafin bloklara gömüldü.

4.3. HİSTOMORFOLOJİK İNCELEME:

Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom ile 4µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler deparafinize edilerek cam slaytlara monte edilip hematoksilin-eozin, Verhoeff'un Elastik boyası ve Masson Trichrome kollajen boyası ile boyandı. Işık mikroskopisinde ven duvar katmanlarının yapısal düzeni ve hücre dizilimleriyle birlikte kollajen ve elastin içerikteki patolojik değişiklikler değerlendirildi.

4.4. İMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME:

Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4µm kalınlığındaki kesitlere avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimyasal olarak bax, bcl-2 ve kaspaz-9 uygulandı. Elde edilen 4 mikron kalınlığındaki kesitler bax, bcl-2 için deparafinize ve rehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini ölçmek için 5 dk. %3 hidrojen peroksitte tutuldu. Daha sonra distile su ile yıkanıp pH 6'da 650 mw (mikrodalga)'da Sitrat buffer'da 5 dakika bekletildi. Kesitlere 10 dk Ultra V blok uygulandı. Kaspaz-9 için deparafinize ve rehidrate edildikten sonra 10 dakika pepsin enzimi uygulandı ve distile su ile yıkanıp 5 dk. %3 hidrojen peroksitte tutuldu. Daha sonra benmaride 37°C nemli ortamda 30 dk süreyle mouse monoclonal antibody Bax (Neomakers, Fremont,CA,USA), mouse monoclonal antibody Bcl-2 (Neomakers, Fremont,CA,USA), rabbit polyclonal antibody Kaspaz-9 (Neomakers, Fremont,CA,USA) antikoları uygulandı. Ardından 0.001 M, pH 7.4 olan PBS ile yıkanarak avidin- biotin peroksidaz ile inkübe edildi. AEC kromojen ile boyandı. Bütün kesitlere Mayer Hematoksileni ile zıt boyama yapıldı ve özel kapatma maddesi (Ultra Mount Medium) ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal inceleme Enrico Ascher ve arkadaşlarının (132) yöntemine göre yapıldı. Işık mikroskopisinde (Olympus model U-MDOB, Japan) × 400 büyütmede her kesitten rastgele 10 saha incelendi. Her sahadaki 100 hücreden intima , medya ve adventisyada sitoplazmik olarak bax (+), bcl-2 (+) ve kaspaz-9 (+) boyanan hücreler sayıldı. Toplam boyanan hücrelerin ortalama yüzdeleri alındı.

4.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

İstatistiksel değerlendirmeler için Statistical Programme Software System (SPSS) 12.0 programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama ± standart deviasyon olarak gösterildi.

Gruplar arası farkın değerlendirilmesinde, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi parametrik Student's t test kullanıldı. Sonuçların tümünde p<0.05 değerler anlamlı olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

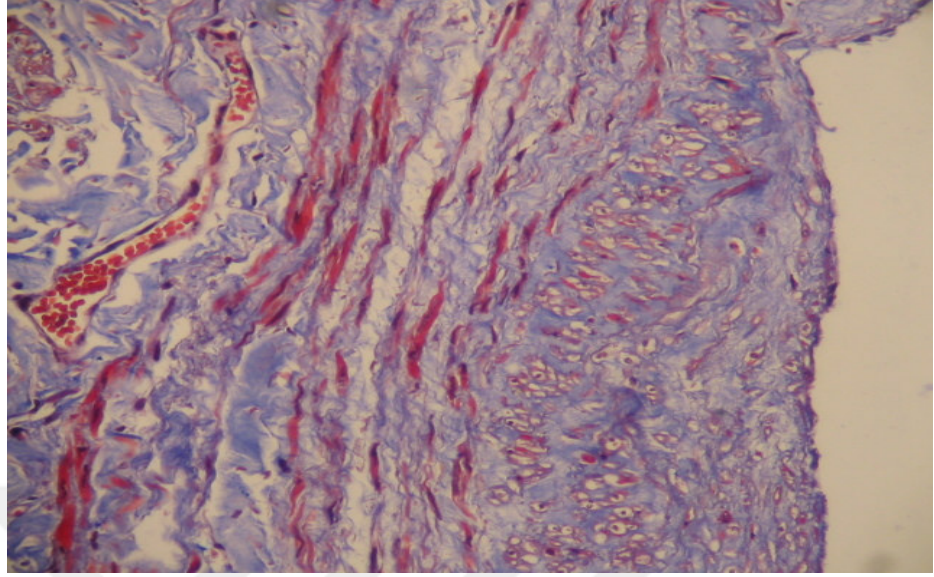
5.1. HİSTOMORFOLOJİK VERİLER:

Işık mikroskop incelemelerinde variköz ven örneklerinde, kontrol grubundaki sağlıklı venlere göre daha fazla yapısal düzensizlikler tespit edildi. Variköz ven grubunda intima ve medya tabakası sağlıklı venlere göre daha kalın, adventisya tabakası ise daha inceydi. Variköz ven grubundaki düz kas hücrelerinin kontrol grubuna göre morfolojik olarak boylarının uzadığı görüldü.

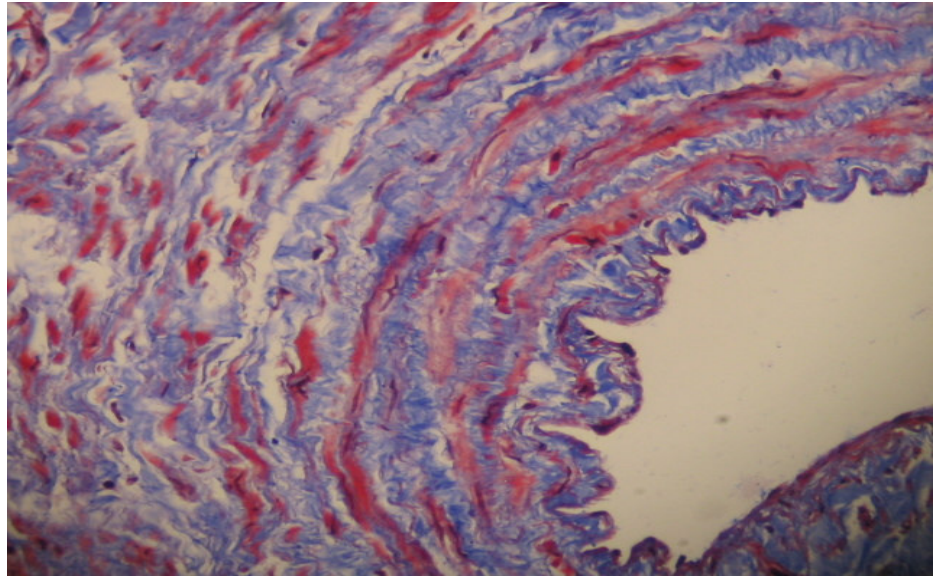
Masson Trichrome boyası ile variköz venlerin medya tabakasında kollajen fibril seviyesinde artış ile birlikte düz kas hücre azalması gözlemlendi. Artmış fibröz doku ile birlikte ayrılmış kollajen fibrilleri medya tabakasında homojen olmayan kalınlaşma meydana getirmiştir. Yine variköz ven grubunda kontrol gruba göre intimada daha fazla kollajen, adventisyada ise daha az kollajen fibril tespit edildi (Şekil 7A, 7B).

Verhoeff'un elastik boyamasında variköz ven grubunda elastin ağ örgüsündeki bozulma daha fazlaydı (Şekil 8A, 8B).

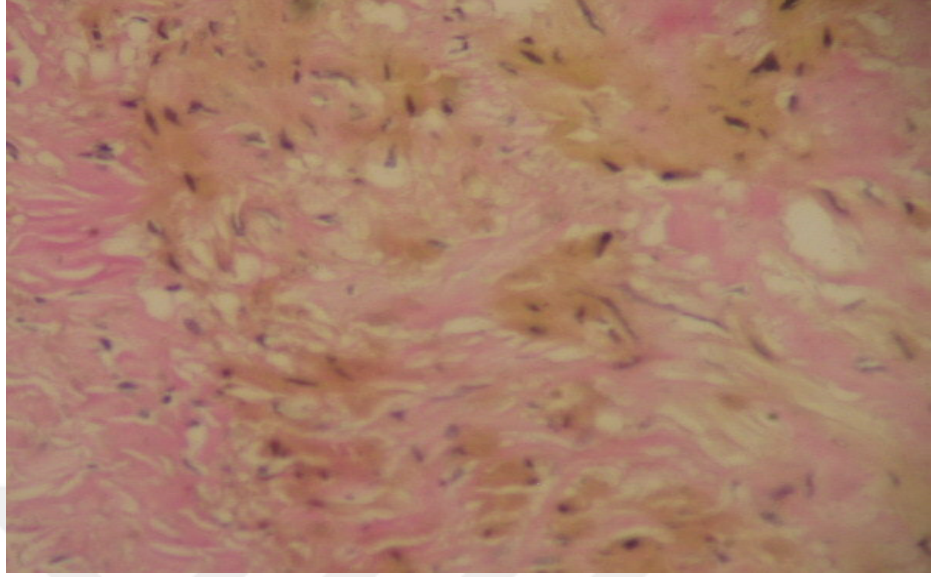
Sonuç olarak variköz ven duvarının tüm katmanlarında düz kas hücre sayısında azalma, kollajen ve elastin liflerinin miktar ve yapısında değişiklik gözlemlendi.



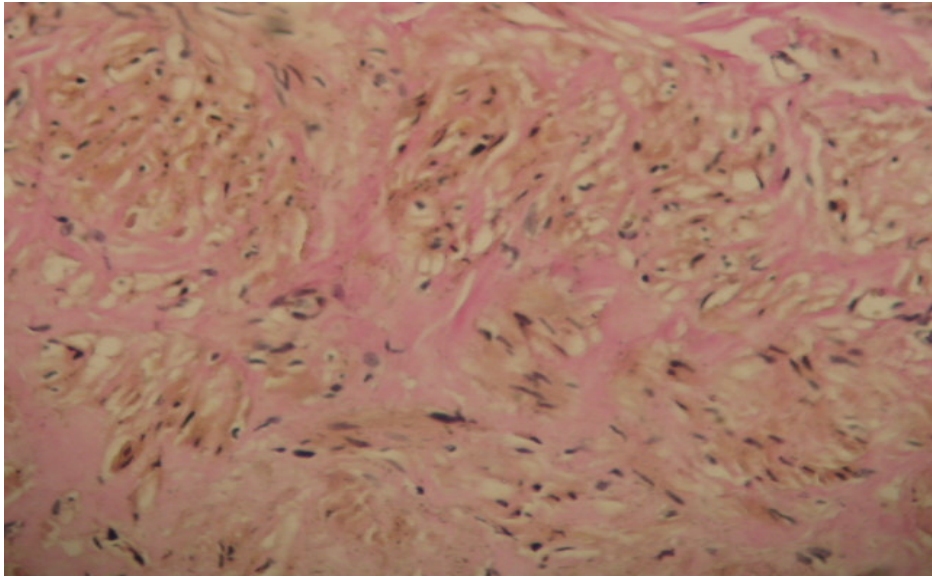
Şekil 7A.
Variköz Ven Grubunda
Kollajen Fibriller (Masson Trichrome Boyası X 200)



Şekil 7B.
Kontrol Ven Grubunda
Kollajen Fibriller (Masson Trichrome Boyası X 200)



Şekil 8A.
Variköz Ven Grubunda
Elastin Fibriller (Verhoeff'un Elastik Boyası X 200)



Şekil 8B.
Kontrol Grubunda
Elastin Fibriller (Verhoeff'un Elastik Boyası X 200)

5.2. İMMUNOHİSTOKİMYASAL VERİLER:

Alınan kesitler bax, bcl-2 ve kaspaz-9 içerikleri yönünden immunohistokimyasal olarak boyandılar ve değerlendirildiler.

5.2.1 Bax Boyanması :

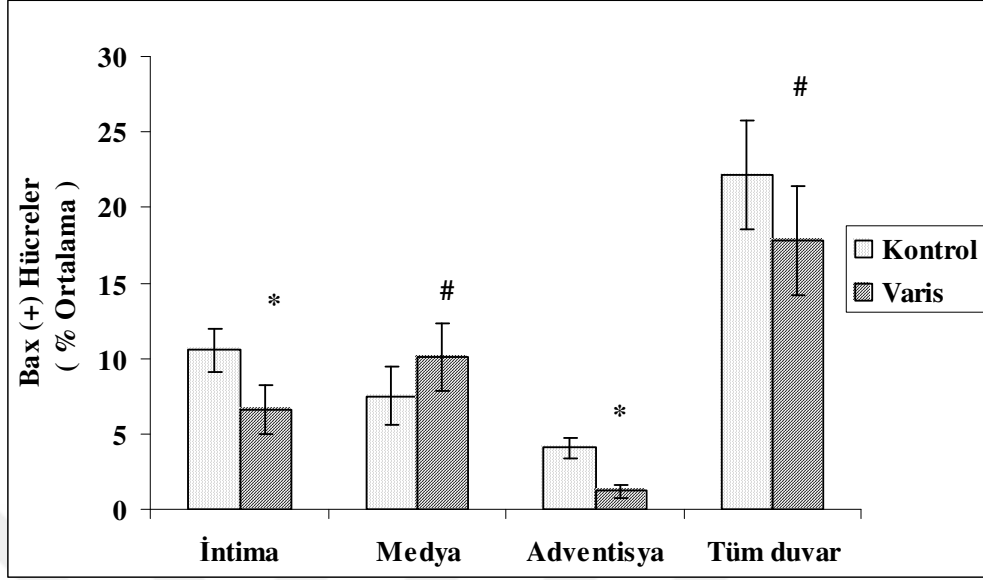
Gruplardan elde edilen örneklerin intima, medya ve adventisyalarda bax ile boyanan hücrelerin ortalamaları Tablo 3 ve Şekil 9' da gösterilmiştir.

İntima ve adventisyada bax boyanan ortalama hücre sayısı kontrol grubunda anlamlı olarak ($p<0.01$) fazla bulunurken, medya tabakasında variköz gruba göre daha az bulundu (Şekil 10A, 10B) ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Damarın tüm katları birlikte değerlendirildiğinde de kontrol grupta bax (+) hücreler daha fazlaydı ($p<0.05$).

Çalışmamızda sadece variköz ven grubunun medyasında, istatistiksel olarak anlamlı bulunan bax pozitif hücre fazlalığı görüldü. Sonuç olarak kontrol ven grubunda variköz venlere kıyasla daha fazla bax pozitif boyanan hücre tespit ettik.

Tablo 3. Bax Pozitif Boyanan Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri

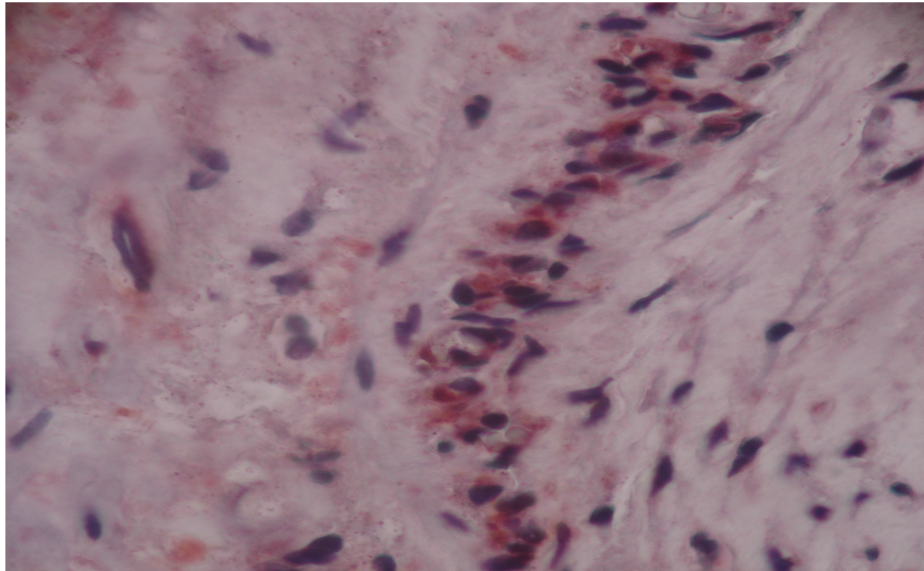
Gruplar	İntima	Medya	Adventisya	Tüm Duvar
Kontrol(n=15)	10,53 ± 1,45	7,53 ± 1,92	4,06 ± 0,70	22,13 ± 3,58
Varis (n=15)	6,60 ± 1,59	10,06 ± 2,21	1,20 ± 0,41	17,80 ± 3,64
p	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.05



Şekil 9. Bax (+) Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri

* $p < 0.01$ (Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

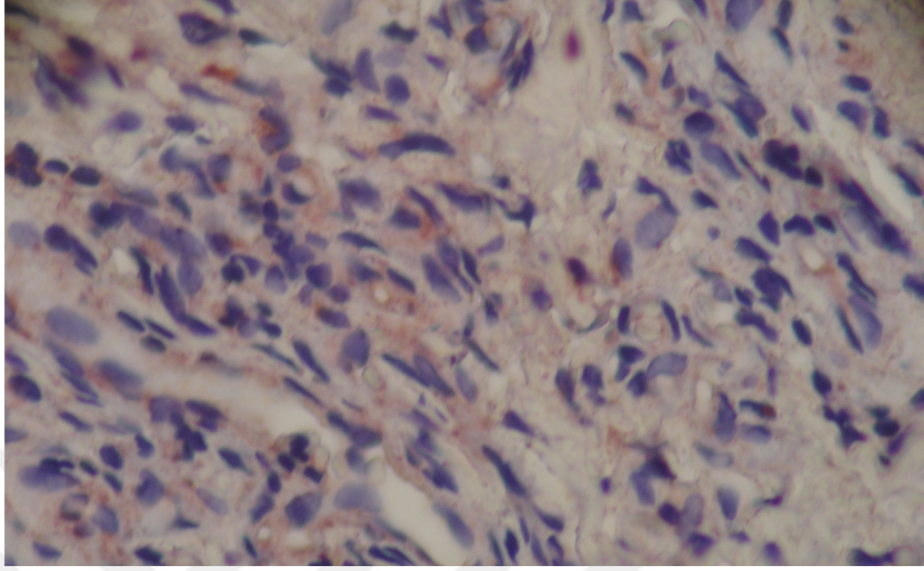
$p < 0.05$ (Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)



Şekil 10A.

Variköz Ven Grubunun Medya Tabakası

Sitoplazmik Bax (+) İmmün Boyanan Hücreler (X 200)



Şekil 10B.
Kontrol Grubunun Medya Tabakası
Sitoplazmik Bax (+) İmmün Boyanan Hücreler (X 200)

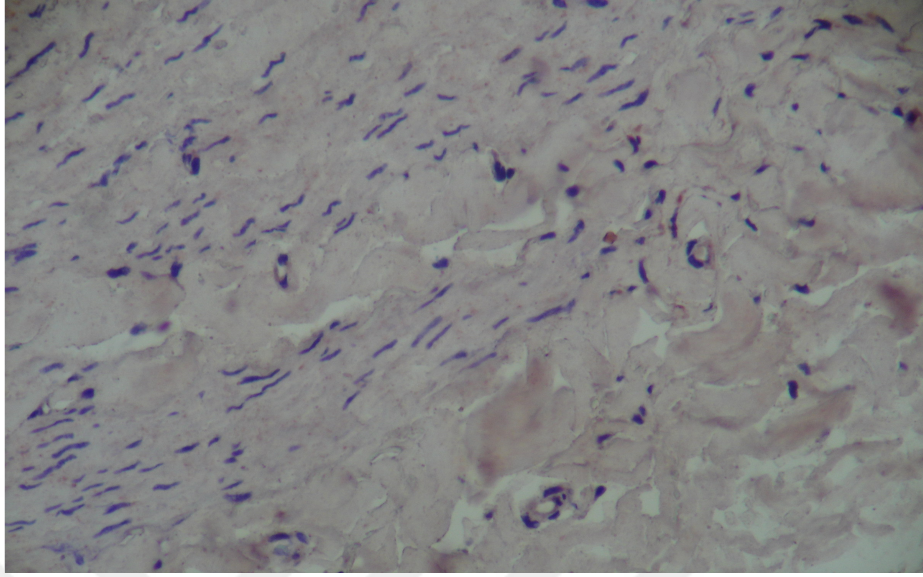
5.2.2. Bcl - 2 Boyanması :

Her iki gruptaki ven örneklerinde bcl-2 ile boyanan hücrelerin ortamları intima ve adventisya ile damarın bütününde variköz grupta daha fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4, $p>0.05$). Her iki grubun medyasında bcl-2 (+) hücre sayısı hemen hemen birbirine eşit ($1,60 \pm 0,73$ - $1,60 \pm 0,63$) bulundu (Şekil 11A, 11B).

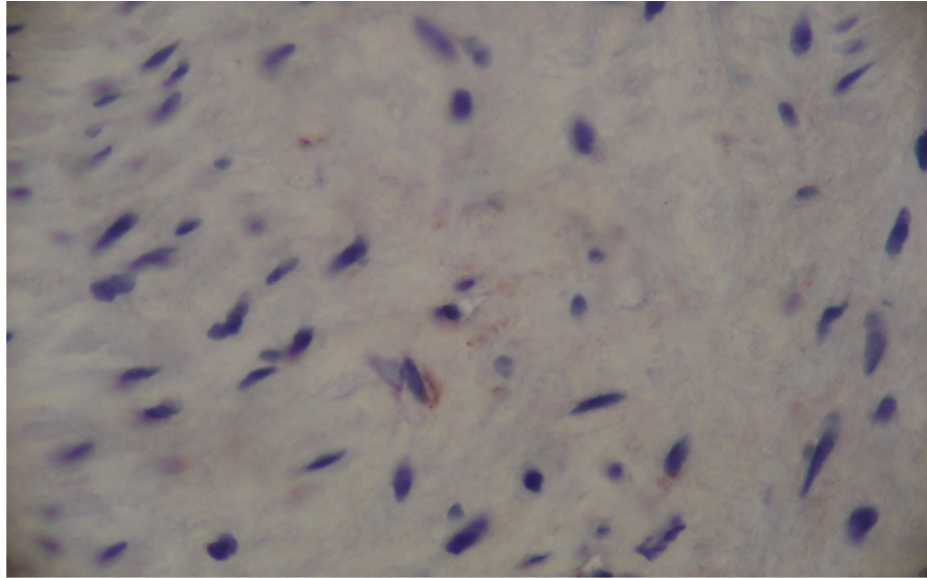
Sonuç olarak bcl-2 ile yaptığımız çalışmada variköz ven grubunda kontrol grubuna göre sayısal değer olarak çok az bir fazlalık bulsak da iki grup arasında bcl-2 immünreaktivitesi açısından önemli farklılık gösterilemedi (Şekil 12).

Tablo 4. Bcl-2 Pozitif Boyanan Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri

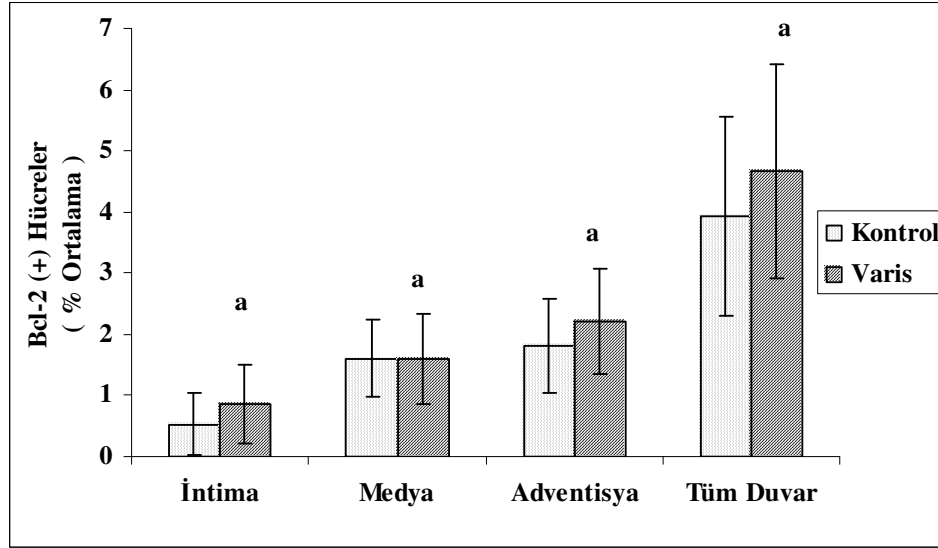
Gruplar	İntima	Medya	Adventisya	Tüm Duvar
Kontrol(n=15)	$0,53 \pm 0,51$	$1,60 \pm 0,63$	$1,80 \pm 0,77$	$3,93 \pm 1,62$
Varis (n=15)	$0,86 \pm 0,63$	$1,60 \pm 0,73$	$2,20 \pm 0,86$	$4,66 \pm 1,75$
p	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$



Şekil 11A.
Variköz Ven Grubunun Medya Tabakası
Sitoplazmik Bcl-2 (+) İmmün Boyanan Hücreler (X 200)



Şekil 11B.
Kontrol Grubunun Medya Tabakası
Sitoplazmik Bcl-2 (+) İmmün Boyanan Hücreler (X 400)



Şekil 12. Bcl-2 (+) Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri

^a p > 0.05 (Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

5.2.3. Kaspaz - 9 Boyanması :

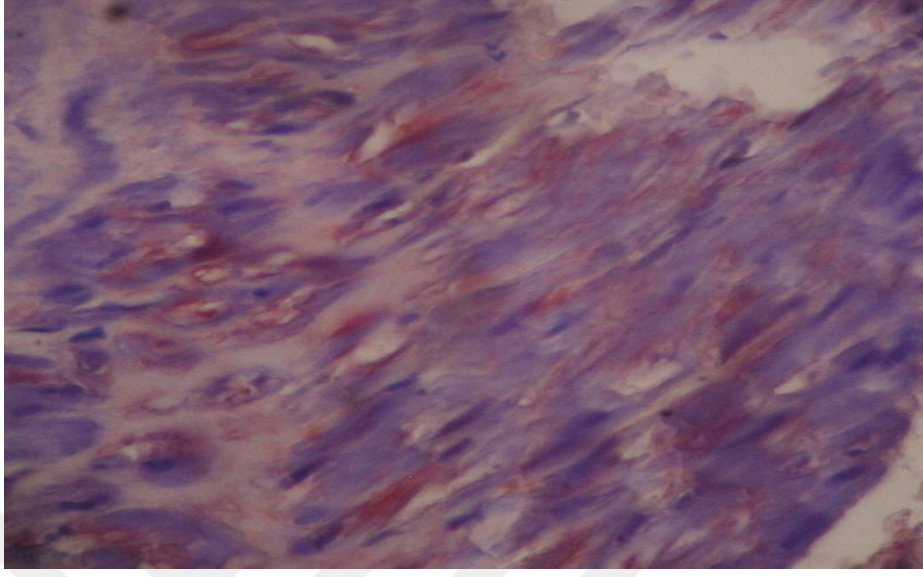
Her iki grubun ven örneklerinin intima, medya, adventisya ve bütününe ait kaspaz-9 (+) hücre ortalamaları Tablo 5' de verilmiştir. Kontrol grup medyasında varis grubun örneklerine göre daha az kaspaz-9 ile boyanan hücelere rastlanmıştır (p<0.01) (Şekil 13A, 13B). Kontrol grubunun intima ve adventisya tabakasında ise varis grubuna göre daha fazla sayıda kaspaz-9 (+) hücre bulundu ve ancak bu fark sadece intima tabakası için anlamlıydı (p<0.01) (Şekil 14).

Tüm damar duvar katmanı göz önüne alındığında, total kaspaz-9 pozitif boyanan hücre değerleri kontrol grubunda $16,60 \pm 1,99$, variköz ven grubunda $13,40 \pm 1,84$ olarak bulundu ve aralarındaki farklılığın istatistiksel değeri mevcuttu (p<0.05).

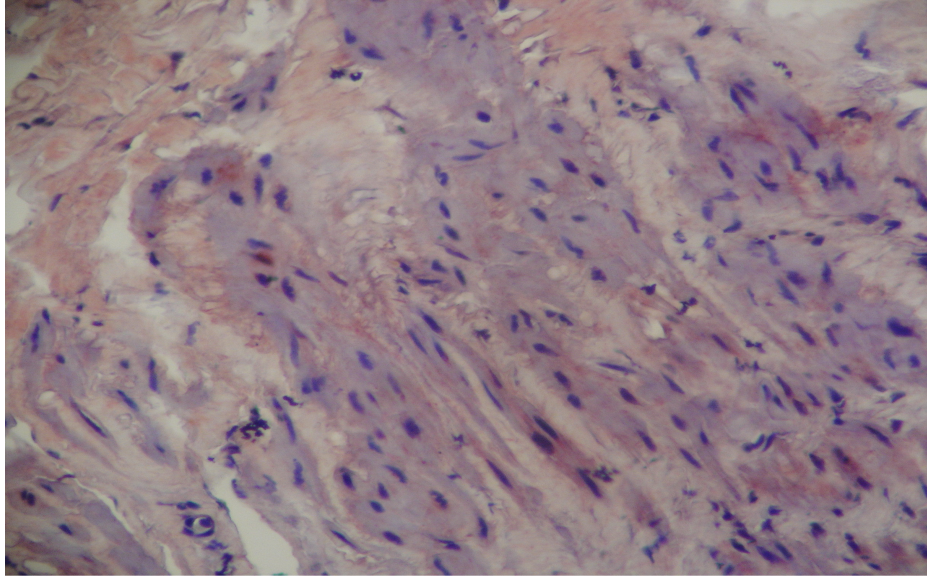
Yaptığımız çalışmada sadece variköz ven grubunun medyasında, istatistiksel olarak anlamlı kaspaz-9 pozitif hücre fazlalığı görüldü. Sonuç olarak kontrol ven grubunda variköz ven grubuna kıyasla daha fazla kaspaz-9 pozitif boyanan hücre tespit ettik.

Tablo 5. Kaspaz-9 Pozitif Boyanan Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri

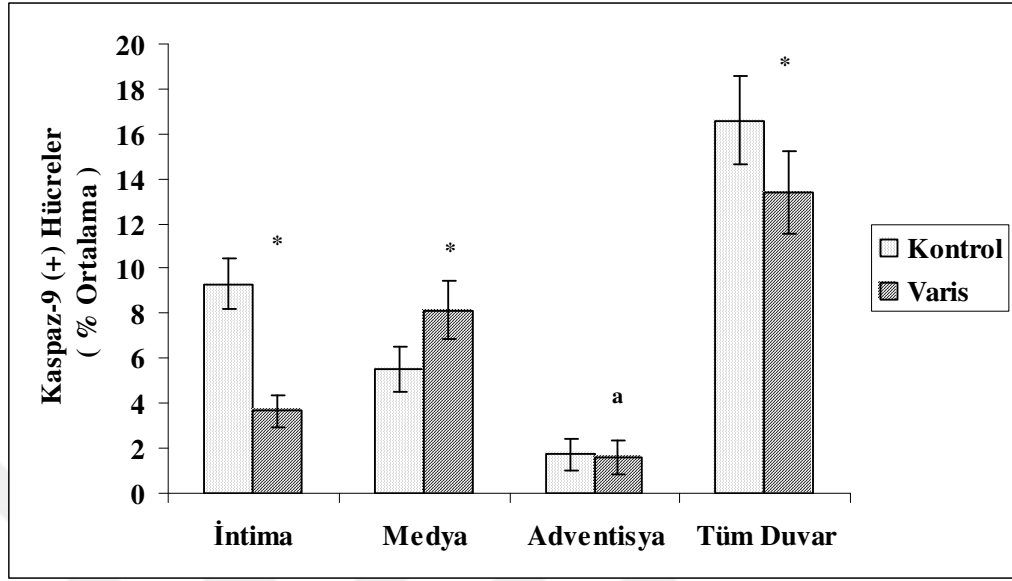
Gruplar	İntima	Medya	Adventisya	Tüm Duvar
Kontrol(n=15)	9,33 ± 1,17	5,53 ± 0,99	1,73 ± 0,70	16,60 ± 1,99
Varis (n=15)	3,66 ± 0,72	8,13 ± 1,30	1,60 ± 0,73	13,40 ± 1,84
p	p<0.01	p<0.01	p>0.05	p<0.01



Şekil 13A.
Variköz Ven Grubunun Medyasında
Sitoplazmik Kaspaz-9 (+) İmmün Boyanan Hücreler (X 400)



Şekil 13B.
Kontrol Grubunun Medyasında
Sitoplazmik Kaspaz-9 (+) İmmün Boyanan Hücreler (X 200)



Şekil 14. Kaspaz-9 (+) Hücrelerin Ortalama Yüzdeleri

* $p < 0.01$ (Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

a $p > 0.05$ (Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında)

6. TARTIŞMA

Variköz ven fizyopatolojisi için son zamanlarda ileri sürülen teoriler intrinsik venöz duvar anormallikleri temeline oturmaktadır. Bu yapısal anormallikler; incelmış ve düzensizleşmiş düz kas tabakası, fibröz dejenerasyona uğramış medya tabakası, şişmiş ve helikal kırılmış kollajen fibriller olarak tanımlanmıştır (14). Duvar dejenerasyonunun bu dağılımı homojen değildir, bazı segmentler kalınlaşmış ve fibrotikleşmişken bazıları anevrizmalaşmıştır. Primer variköz venli hastalardan elde edilen yüzeyel bacak venlerinin morfolojik ve histokimyasal çalışmalarında elastin, kollajen ve düz kas hücre içeriğinde değişiklikler saptanmıştır (14).

Venin yapısal proteinlerindeki değişiklikler anormal kollajen ve elastin içerik, intimal hiperplazi ve matriks kontrol enzimlerindeki değişiklikleri içermektedir (28-32). Damarların tunika medyasındaki ekstraselüler matriks, elastik lameller ve kollajen fibriller variköz ven histopatolojisinde önemli role sahiptir (133). Bir çok araştırmacı variköz segmentlerde normal venlere kıyasla kollajen miktarında artış saptamışlardır (30,31).

Gandhi ve arkadaşları (30) variköz ven duvarında proteolitik enzim aktivitesinde değişiklik olmaksızın kollajen miktarında artış ve elastin miktarında azalma tespit etmişlerdir. Sansilvestri–Morel ve arkadaşları (31), variköz venlerde düz kas hücreleriyle kollajen subtipleri sentezinde bir dengesizlik bulmuşlardır. Bu dengesizliği kollajen tip-1' in artarken kollajen tip-3' ün azalması şeklinde tespit etmişler

Badier–Commander ve arkadaşları (32) son zamanlarda yaptıkları çalışmalarda variköz venlerde, ekstraselüler matriks düzenleyici enzim konsantrasyonlarına bakmışlar. Araştırma sonucunda, oldukça yüksek konsantrasyonlarda doku inhibitör metalloproteinaz–1 (TIMP-1) ve oldukça düşük konsantrasyonlarda proteolitik enzim metalloproteinaz–2 bulmuşlar. Damar duvar zayıflığı kollajen ve elastik içerik ile ekstraselüler matriks duvarının metalloproteinaz ve bunların inhibitörlerinin arasındaki var olan dengenin bozulmasından kaynaklanabilir (32). Matriks kontrol enzimlerindeki bu denge değişimi variköz venlerin duvarındaki matriks birikimini desteklemektedir. MMP'lar aortik anevrizmaların tunika medyasındaki makrofajlarca üretilmektedirler (134).

Arteriyel rekonstrüksiyonda kullanılan venlerin bir çok histopatolojik değişikliklere maruz kaldığı tanımlanmıştır (135). Bu histopatolojik değişiklikler kontraktıl fenotipte azalmayla beraber düz kas hücre proliferasyonunu kapsar (136).

Bu değişiklikler vaso vasorum kaybından dolayı gelişen mural iskemi, sirkumferansiyal damar duvar gerilimi ve basıncındaki değişikliklerle ilişkilidir (137). Variköz venlerin yeniden yapılanmasının da benzer mekanizmalarla geliştiği düşünölmüştür. Variköz venlerde damar duvarının kalınlaştığı ve dilate olduğu ve yaygın fibrozis geliştiği gösterilmiştir. Medya tabakasının konnektif doku kısmının progresif artışı hücresel kısımdan daha önemlidir (138).

Şimdiye kadar variköz ven hücre kültürlerinde venöz duvarının ana komponenti olarak, özellikle medya tabakasına lokalize olan düz kas hücreleri gösterildi. Variköz venlerde hücre siklus değişiklikleri aracılığıyla düz kas hücreleri kontraktil tipten sekretuar tipe dönüşür (139). Bu düz kas hücreleri normal kontraktil tipten sekretuar hücre tipe dönüştüğü için variköz ven duvarında fibrotik dejenerasyon gelişir (139).

Maurel ve arkadaşları (140) primer variköz venli hastalardan elde edilen ven örneklerinde elastin, kollajen ve düz kas hücre içeriğindeki değişikliklerin önemini belirtmişlerdir.

Ducasse ve arkadaşları (141) variköz venlerde elastin ve kollajen fibrillerin dağılımının ve yapılarının diffüz olarak bozulduğunu görmüşlerdir. Bu hücresel düzensizlik, medya ve adventisyal tabakada kollajen fibril seviyesinde artış ile birlikte düz kas hücre sayısında azalma ve elastin fibrillerinde parçalanmayı kapsamaktadır. Ayrıca medya tabakasında homojen olmayan kalınlaşma tespit etmişlerdir.

Urbanek ve arkadaşlarının (142) yapmış oldukları geniş çalışmada variköz venli hastaların hem proksimal hem de distal segmentlerinde intimal alanı daha fazla ölçölmüşler ve intimal tabaka içinde düzensiz kollojen fibril birikimi ve bununla birlikte internal elastik lamina ve mürküler bantlarda yarılmının olduğunu tespit etmişlerdir. Medya tabakasında artmış fibröz doku ile birlikte kollajen fibril birikimi ve düzgün kırılmış kas yığını gösterilmiş ve medyadaki ekstraselöler matriks birikimi distal segmentlerde proksimal segmentlerden daha fazla bulunmuştur. Sonuç olarak variköz venli hastaların distal safenlerinin medyasında düz kas hücre içeriğinin azaldığı ve kollajen miktarının arttığı gösterilmiştir. Adventisyal tabakada ise kontrol venlere kıyasla proksimal segmentlerde miyozit ve elastin miktarlarında farklılık saptanmamış ve istatikselsel olarak kollajen miktarında anlamlı azalma gösterilmiş. Ayrıca distal segmentlerde düz kas hücre azalması ile birlikte, proksimal segmentlerinde azalmış mürküler ve elastin içerik adventisyal tabakada gözlenmiş.

Ascher ve arkadaşları ise (132,143) yaptıkları iki ayrı çalışmada variköz venlerde sağlıklı venlere kıyasla kollajen miktarında azalma tespit etmişler, elastin ağ örgüsündeki bozulmanın da variköz venlerde daha fazla olduğunu görmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda da Ducasse ve arkadaşları(141) ile Urbanek ve arkadaşları (142) tarafından yapılan çalışmalarda olduğu gibi variköz venlerde daha fazla yapısal düzensizlikler tespit edildi. Variköz ven grubunda intima ve medya tabakası daha kalın, adventisya tabakası daha inceydi. Variköz venlerin medya tabakasında kollajen fibril seviyesinde artış ile birlikte düz kas hücre azalması ve homojen olmayan kalınlaşma gözlemlendi. İntimada kontrol ven grubunda daha fazla kollajen içerik bulunurken adventisyal tabakada variköz ven grubunda sağlıklı venlere göre daha az kollajen fibril tespit edildi. Ayrıca variköz ven grubunda elastin ağ örtüsündeki bozulma da daha fazlaydı.

Sonuç olarak variköz ven duvarındaki histopatolojik değişiklikler bizim bulgularımızla da desteklenmektedir. Bu patolojik ve histolojik özellikler tamamen paryetal duvardaki fibrotik yıkım ve variköz venlerin mekanik özelliklerinin kaybıyla uyumludur.

Önceki yapılan çalışmalarda variköz ven duvarının yeniden yapılanmasının düz kas hücre hipertrofiyle ilişkili olduğunu ve bu hipertrofinin tüm tabakalardaki düz kas hücre sayısındaki azalmanın sonucu olduğunu rapor edilmiştir (144). Aynı zamanda safen vendeki hipertrofik alanların apoptozisin ilerlemesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (145)

Venlerde apoptotik ölüm gerçek ven yapısının ve tonusunun ayarlanmasında büyük önemi olan vasküler düz kas hücreleri ile ilişkilidir. Apoptozis endotelial hücreler ve inflamatuvar yanıt hücreleri gibi diğer hücre popülasyonunda gösterilmiş olmasına rağmen variköz ven duvar hasarında bu programlanmış hücre ölümüne ilişkin hala çok az veri bulunmaktadır (132,143,145).

İnsanda hatalı DNA tamir mekanizmaları ve hücre siklus değişikliklerini içeren çeşitli hastalıkların temel mekanizması olarak apoptozis suçlanmıştır (146).Ven duvarı hücrelerinin disfonksiyone olmasının hücre siklusunun ve apoptozisin deregülasyonundan dolayı olması muhtemeldir. Çünkü apoptozis doku homeostazında ve hücre sayısının korunmasında majör bir rol oynar, bu da ven duvarındaki hücre turnoverine etki eder. Deregüle apoptozis anormal bir fenotipe transforme olabilecek, işe yaramayan hücrelerin sayısında artmaya yol açar.

Apoptozis multifaktöriyel bir fenomendir. Farklı uyaranlarla indüklenebilen ve büyüyen bcl-2 aile üyeleri tarafından pozitif veya negatif regülasyonu altında olabilir. Bununla birlikte bcl-2 hücreleri programlanmış hücre ölümüne uğramaktan kurtaran negatif modülatördür. Bax ise apoptozis indükleyicisidirler. İn vivo ortamda bax ve bcl-2 sırasıyla hücre ölümü ve sağkalımı ile ilişkili olan homodimerler (bax/bax) ve heterodimerler (bax/bcl-2) oluşturabilirler (147).

Ducasse ve arkadaşlarının (141) sadece ven duvarının medya tabakasındaki yaptıkları çalışmada, immün reaktiviteyle apoptozis tespitinde variköz venlerde sağlıklı venlerden daha az apoptotik hücre bulunmuştur. İmmünohistokimyasal boyamada variköz venlerde, sağlıklı venlere göre daha az intrinsik apoptotik yol mediyatörleri olan bax ve kaspaz-9 (+) hücre tespit etmişler. Aynı çalışmada variköz venlerde azalmış bax ve kaspaz-9 birlikteliğinin önemini vurgulamışlardır.

Urbanek ve arkadaşlarının (142) variköz venli hastaları genç-yaşlı ve ven segmentlerini de proksimal-distal olarak ayırdıkları çalışmada TUNEL yöntemiyle variköz venlerde apoptotik aktiviteyi araştırmışlardır. Variköz venli genç hastaların distal bölümündeki varisli damarların medyasında istatistiksel olarak anlamlı apoptotik indeks artışı bulmuşlar. Yine aynı çalışmada variköz venli hastaların distal safen ven segmentlerinde bcl-2 ve bax seviyeleri artmış bulunmuş. Buna ek olarak 50 yaşından genç varisli hasta grubunda p53 seviyesi kontrol grubundan fazlaydı. Genç hastaların distal segmentlerinin ven medyasında p53 ve apoptotik indeks arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuş. Bu bulgular yaşlı hastaların distal segmentlerinden elde edilememiş. Tüm örneklerde bax, bcl-2 den daha fazla bulunurken bu oran genç varisli grubun distal segmentlerinde anlamlı olarak yüksek bulunmuş. Ayrıca immünohistokimyasal boyamalarda Bcl-2 (+) hücreler kontrol ve variköz venlerin medyasında ve adventisyasında yoğun olmakla beraber az miktarda intimada da gösterilmiştir. Güçlü bax immünreaktivitesi kontrol ve varisli venlerin tüm tabakalarında özellikle intima ve medyada (+++) olarak değerlendirilmiştir. Adventisyada kontrol grup (++) boyanırken variköz venli hastaların distal bölümündeki safenlerde sadece (+) boyanma tespit edilmiş. Bu genç varisli grupta, kontrol grupla kıyaslandığında medya tabakasında düz kas hücre azalması da gözlenmiş. Diğer taraftan yaşlı grupta distal safen ven segmentlerinde düz kas hücre yüzdesi anlamlı olarak genç hastalarinkinden yüksek bulunmuş.

Ascher ve arkadaşları (132) normal venlerle karşılaştırıldığında variköz venlerde bax (+) boyanan hücrelerin yüzde oranlarını daha fazla bulmuşlar.

Dokulardaki immünreaktivite sitoplazmik ve nükleer olarak gösterilmiş. Özellikle variköz venlerin medya tabakasında belirgin bax pozitifliği saptamışlar. Bu proapoptotik proteinini kontrol ven duvarında transmural olarak gösterilmesine rağmen variköz ven adventisyasında anlamlı olarak bulamamışlar. Her bir damar duvarı katmanında "high-powerfield (hpf)" (yüksek etkilenmiş saha) ölçümüne göre bax (+) boyanan hücrelerin sayısı bax (+) boyanan hücrelerin yüzde oranlarıyla korele olmadığını ve variköz venlilerde daha az bulunduğunu tespit etmişler. Çünkü kontrol ven dokusuna kıyasla variköz ven dokusunda hpf' ye göre saptanan total hücre sayısında farklılıklar vardır. Bu, damar duvarı yapısı ve hücre boyutundaki önceki değişikliklerin sonucu olabilir. Variköz ven vaso vasorumundaki hiçbir hücrede bax için immünpozitiflik bulunamamış. Bununla beraber kontrol venlerde hpf' ye göre bax (+) hücreler gösterilmiş. Poly(ADP-riboz) polimeraz (PARP) ile yapılan boyama variköz venlerde PARP' in azalışını işaret etmektedir. Ancak buna zıt olarak özellikle variköz venlerin medya tabakasında PARP pozitifliği belirgin olarak mevcutmuş. Variköz venlerin adventisyasında bu ölüm substratı bulunamamış. Buna rağmen sağlıklı venlerin adventisyasında vaso vasorum dahil olmak üzere pozitif sinyaller anlamlı olarak yüksek görülmüş. Bu önemli bir bulgu çünkü PARP bölünmesi venlerdeki programlanmış hücre ölümünden sorumlu kaspaz aktivitesini işaret eder. Bax ve PARP' in varis dokularında az olması varis patogenezinde anlamlı rol oynayabilir. Verileri sonucunda programlanmış hücre ölümü sürecinin variköz venlerde inhibe olduğunu işaret etmişlerdir.

Ascher ve arkadaşlarının (143) yaptıkları başka bir çalışmada variköz venlerde apoptozisin inhibe olduğu gösterilmiştir. Apoptozis azalması variköz ven medya ve intimasında normal venin adventisyasından daha fazla olmaktadır. Varis dokusunda cyclin D1' in nükleer ekspresyonu artarken sitoplazmik ekspresyonunu azalmış olarak gözlemlemişlerdir. Bunun sonucu olarak düzensiz apoptozis önderliğinde hücre siklusunda oluşan düzensizliklerin variköz ven bütünlüğünün kaybında rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir.

Bizim yaptığımız immünohistokimyasal çalışmada da proapoptotik aktiviteye sahip bax ve kaspaz-9 ile antiapoptotik aktiviteye sahip bcl-2 değerlendirildi. Hücreler sitoplazmik boyanmalarına göre değerlendirildi. Variköz ven grubunun sadece medya tabakasında bax pozitifliği kontrol grubundan fazlaydı ve istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu veri Ascher ve arkadaşlarının (132) variköz venli grupta buldukları bax pozitifliği ile uyumaktadır. Ancak bu durum, muhtemelen varisli

damarların medyasında azalan düz kas hücre nedeniyle, medya tabakasındaki bax (+) boyanan hücrelerin daha az olan total hücre sayısına oranının, kontrol grubuna göre yüksek bulunmasından kaynaklanabilir. Aynı şekilde Ascher ve arkadaşları (132). bu yüksek bax (+)' liğini yüksek etkilenmiş saha formülüyle açıklamışlardır. Urbanek ve arkadaşları (142) genç variköz venli hastaların distal safen segmentlerin medyasında istatistiksel olarak anlamlı apoptotik indeks artışı bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da alınan variköz ven örnekleri distal safen bölgesindendi ve sonuçlarımız paralellik göstermektedir.

Ascher ve arkadaşları (132) variköz venlerin adventisyasında bax (+) boyanan hücre saptayamazken bir diğer çalışmalarında (143) apoptotik indeksi adventisyada diğer katmanlara göre yüksek bulmuşlar. Urbanek ve arkadaşları (142) variköz venlerin distal bölümündeki adventisyalarda düşük seviyede bax (+)' lik tespit etmişlerdir. Bizim incelememizde de variköz venlerin adventisyasında kontrol gruba göre istatistiksel olarak anlamlı daha az immün pozitif bax hücreleri tespit edildi.

Venin tüm damar duvarı katmanları göz önüne alındığında bax pozitifliğinin sağlıklı ven grubunda anlamlı olarak daha fazla olduğunu gözlemledik. Önceki yapılan çalışmalarda da (132,141,142) apoptozisin indükleyicisi olan bax pozitifliği sağlıklı venlerde daha fazla bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada bcl-2 immünreaktivitesinde kontrol grubuyla variköz venli grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptayamadık. Urbanek ve arkadaşları (141) immünohistokimyasal olarak bcl-2 (+) hücreleri kontrol ve variköz venlerin medyasında ve adventisyasında olmakla beraber az miktarda intimada göstermişler. Gen ekspresyonuyla da varisli hastaların proksimal ve distal safen segmentlerinde bcl-2 seviyelerinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır. Bizim çalışmamızla aynı şekilde Ascher ve arkadaşları (143) da örnekleri arasında bcl-2' de önemli bir farklılık tespit edememişler ve bunun nedeni olarak kullandıkları antikorların ven dokusundaki hücrelere spesifikliğin az olması olabileceğini öne sürmüşlerdir. Isner ve arkadaşları (148) restenotik gibi primer aterosklerotik lezyonlarda bcl-2 nin pozitifliğinin yetersizliğini rapor etmişlerdir. Ascher ve arkadaşları (132) yaptıkları başka bir çalışmada kan damarlarında bcl-x ve bcl-2 ekspresyonunun tespitinin zor olduğu belirtmişlerdir. Ducasse ve arkadaşları (141) önceki araştırmalarda bcl-2 seviyesinde anlamlı artma veya azalma tespit edilemediği için çalışmalarına bcl-2' yi dahil etmemişlerdir.

Bcl-2 başlıca mitokondriyal dış membranında lokalize bir proteindir. Bcl-2 nin regülasyonu mitokondriyal intraselüler kalsiyum seviyeleri ve birçok sistemlerde proapoptotik stimülasyonlar ile meydana gelen membran potansiyellerinin kaybına göre düzenlenir (149). Bu nedenle bcl-2 apoptozis inhibisyonu ile alakalıdır. Bcl-2 nin overekspresyonu bir çok hücre tipinde apoptozise karşı koruyucudur. Roman ve Fisher bu koruyucu etkinin gen regülasyonu aracılığıyla olmadığını öne sürmüşlerdir (149).

Çalışmamızda kaspaz-9 immün boyanmasını variköz venli grubun sadece medya tabakasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulduk. Bu bulgu variköz ven grubunun medyasında tespit ettiğimiz yüksek bax pozitifliği ile paralellik göstermektedir. Ancak aynı şekilde variköz ven grubunun medyasında düz kas hücre azalması nedeniyle medya tabakasında kaspaz-9 (+) boyanan hücrelerin daha az olan total hücre sayısına oranının kontrol grubuna göre rölatif olarak yüksek bulunması, aslında variköz venli grupta daha az kaspaz-9 (+) liğini göstermektedir. Beraberinde tüm damar duvarı katmanlarına baktığımızda kaspaz-9 pozitifliğinin sağlıklı ven grubunda daha fazla olmasının istatistiksel olarak anlamlı bulunması bizi doğrulamaktadır. Ducasse ve arkadaşları da (141) sağlıklı ven grubunda daha fazla kaspaz-9 immün boyanmasını tespit etmişlerdir. Ascher ve arkadaşları (132) hücrelerin morfolojik olarak ölümünün başlatıldığı son aşamadaki kaspazların ölüm substratı olan PARP seviyelerine de bakmışlar. PARP ekspresyonu apoptozisin öncüsü olan kaspaz aktivasyonunu işaret etmektedir. Variköz venlerin sadece medyasında sitoplazmik olarak PARP ekspresyonunu daha yüksek bulmuşlar. Bütün dokularda ise PARP ekspresyonunu sağlıklı venlerde daha fazla tespit etmişler. Bu tespit de bizim bulgularımızla örtüşmektedir.

Yaptığımız çalışmada variköz venlerde apoptotik aktivitenin azalmış olduğunu gördük. Bununla beraber proapoptotik aktiviteye sahip bax ve kaspaz-9' u variköz ven medyasında daha fazla bulduk. Aynı şekilde Ascher ve arkadaşları da (132) variköz ven medyasında bax ve kaspaz substratı olan PARP' ı fazla ölçmüşlerdir. Urbanek ve arkadaşları da (142) variköz venli genç hastaların distal segmentlerin medya tabakasında proapoptotik mediyatörleri kontrol grubundan daha yüksek bulmuşlardı. Buna ek olarak tüm araştırmacılar özellikle medya tabakasında düz kas hücre azalmasını belirtmişlerdi. Bu düz kas hücre miktarına etki eden moleküler mekanizmalardan biri de programlanmış hücre ölümü olabilir.

Daha önceki alt ekstremite variköz ven patoloji incelemelerinde düz kas hücrelerinin fenotip olarak kontraktıl tipten sekretuar tipe dönüştüğü görülmektedir (139). Pappas ve arkadaşları (138) variköz venlerdeki artmış pRb (Retinoblastoma proteini) fosforilasyonunun düz kas hücrelerindeki farklılaşmada rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ven duvarı hücrelerinin disfonksiyone olmasının hücre siklusunun ve apoptozisin deregölasyonundan dolayı olması muhtemeldir (132). Ven duvarı içinde salgısal düz kas hücre birikiminin varlığına ilaveten kontraktıl düz kas eliminasyonunun izahı apoptotik aktivite ile ilişkili olabilir (142).

Normal venlere kıyasla variköz venlerde apoptozis ve hücre siklus düzeni bozulur. Hücrel hemostazis, doku içindeki hücre proliferasyonu ve apoptozis arasındaki dengeye bağlıdır. Anevrizma formasyonu gibi ekstraselüler değışiklikleri de içine alan diğler hastalık süreçlerinde, apoptotik olaylar değışikliğe uğramış olarak bulunmuştur (150). Aynı şekilde apoptozis muhtemelen varikozitlerin patofizyolojisine de katkıda bulunabilir.

İnsan vasküler düz kas hücrelerinin p53 aracılıklı apoptozise olan artmış duyarlılığı atrosklerotik plak veya endovasküler tedavi sonrası restenoz gibi diğler vasküler patolojilerde ayrıca belgelendirilmiştir (151).

P53 aracılıklı apoptozis ven duvar hemostazında düzenleyici mekanizmalardan biridir. Variköz ven gelişimi esnasında aktive olması hastalığın erken evrelerinde meydana gelir. Daha sonra hastalık oluşumunda ven medyasındaki yapısal değışikliklerin artışı düz kas hücre apoptozisinin regölasyonu ile ilgilidir (142).

İnsan çalışmalarında karotis, koroner ve renal arter segmentlerindeki aterosklerotik lezyonlardaki apoptotik aktiviteler son zamanlarda incelenmeye alınmış ve baxın ve apoptozisin arttığı gözlenmiştir (152).

Görölüyor ki tüm bu yapılan çalışmalarda ven duvarının katmanlarında proapoptotik ve antiapoptotik mediyatörlerin seviyelerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Bunun nedenini apoptotik süreç içerisinde rol alan tüm maddelerin kendi aralarındaki çalışma düzeninde bilinmeyen bir etkinin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca çalışmalarda farklı klinik evrelerdeki hastaların bulunması apoptozisin variköz venlerdeki patolojik aşamalarda etkisinin değışebileceğini akla getirmektedir. Bununla ilgili somut bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle homojen oluşturulmuş farklı klinik evrelere ait ileri klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Buna göre erken evrelerde apoptozisin daha fazla olduğu ve hastalık ilerledikçe fibrotik dejenerasyon ve azalmış düz kas hücresi nedeniyle daha az apoptotik mekanizmanın meydana geldiği akla gelebilir. Yani sebep sonuç ilişkisinde apoptozisin yeri belli değildir.

Sonuç olarak variköz venlerin etyopatogenezinde programlanmış hücre ölümünün damar duvarı yeniden yapılanmasıyla ilişkisi ve doku matriks metalloproteinazların rolü önemlidir. Tüm bunların yanında hormonal ve genetik faktörlerin ven duvarı üzerindeki etkilerini gözardı etmemek gerekir.



7. KAYNAKLAR

1. Rose SS, Ahmed A. Some thoughts on the aetiology of varicose veins. *Cardiovasc Surg.* 1986;27:535-543.
2. Travers JP, Brookes CE, Evans J, Baker DM, Kent C, Makin GS, Mayhew TM. Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen elastin and smooth muscle content. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996;11:230-237.
3. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology.* 9. Baskı, Appleton & Lange. 1998: 202-217
4. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W (editors). *Histology : a text and atlas with cell and molecular biology.* 4. Baskı, Lippincott Williams & Wilkins. 2003: 341-342.
5. Sternberg SS (editor). *Histology for Pathologist.* Newyork, Raven Press Ltd. 1992: 199-201.
6. Perroulaz G. Morphology and structure of the venous wall. Ramelet AA, Monti M, Bounameaux H, Buchheim G, Capasso P (editors). *Phlebology The Guide.* 4.baskı, Paris, France Elsevier SAS. 1999: 51-58.
7. Sngn M. Variköz venler ve kronik venöz yetmezlik. Duran E (editor). *Kalp ve Damar Cerrahisi.* 1. Baskı, İstanbul, Çapa Tıp Kitapevi. 2004: 879-896.
8. Tađıl M. Üst ve alt ekstremite venlerinin anatomisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery.* 2003;8(2):73-80.
9. Yaycıoğlu A, Arıbal D, Tatlıcıoğlu E (editörler). *Cerrahi Damar Hastalıkları.* 2. Baskı, Ankara Türkiye Klinikleri Yayınevi. 1987: 318-334.
10. Venous physiology and pathophysiology of the lower limbs. Ramelet AA, Monti M, Bounameaux H, Buchheim G, Capasso P (editors). *Phlebology The Guide.* 4th Edition, Paris, France Elsevier SAS. 1999: 59-75.
11. Illing KA, Dewese JA. Venous and lymphatic disease. Gloviczki P, Yao JST (editors). *Handbook of Venous Disorders.* 2th Edition, London, Great Britain Hodder Headline Group. 2001: 3-10.
12. Tzner A, Tzner A. Varis. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery.* 2003;8(2): 117-121.
13. Leu HJ, Vogt M, Prefunder H. Morphological alterations of non varicose and varicose veins. *Basic Res Cardiol.* 1979;74:435-444.

14. O'Donnell TF, Iafrati MD. Varicose veins. Haimovici H, Ascer E, Hollier LH, Strandness DE, Towne JB (editors). Haimovici's Vascular Surgery Principles and Techniques. 4th Edition, Cambridge Massachusetts, USA Blackwell Science Inc. 1996: 1187-1198.
15. Epidemiology, cost and quality of life. Ramelet AA, Monti M, Bounameaux H, Buchheim G, Capasso P (editors). Phlebology The Guide. 4th Edition, Paris, France Elsevier SAS. 1999: 77-84.
16. Yayıncıoğlu A, Arıbal D, Tatlıcıoğlu E (editörler). Cerrahi Damar Hastalıkları. 2. Baskı, Ankara Türkiye Klinikleri Yayınevi. 1987: 336-353.
17. Thulesius O, Said S, Shuhaiber H, Neglen P, Gjores JE. Endothelial mediated enhancement of noradrenaline induced vasoconstriction in normal and varicose veins. Clin Physiol 1991;11:153-159.
18. Lowell L, Gloviczki P, Miller V. In vitro evaluation of endothelial and smooth muscle function of primary varicose veins. J Vasc Surg. 1992;16:679-686.
19. Psaila JV, Melhuish J. Viscoelastic properties and collagen content of the great saphenous vein in normal and varicose veins. Br J Surg. 1989;76:37-40.
20. Pacaud P, Loirand G. Pathways and receptors involved in the alteration of smooth muscle cell contractility in venous diseases. Phlebology 2003;39:113-118.
21. Golledge J, Quigley FQ. Pathogenesis of varicose veins. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2003;25:319-324.
22. Kirsch D, Diens HP, Kuchle R, Duschner H, Wahl W, Bottger T, Junginger T. Changes in the extracellular matrix of the vein wall the cause of primary varicose varicosity? Vasa. 2000;29:173-177.
23. Porto LC, Da Silveira PRM, De Carvalho JJ, Brandao Panico MD. Connective tissue accumulation in the muscular layer in normal and varicose saphenous vein. Angiology. 1995;3:243-249.
24. Abu-Own A, Scurr JH, Coleridge Smith PD. Saphenous reflux without incompetence of the saphenofemoral junction. Br J Surg. 1994;81:1452-1454.
25. Cooper DG, Hillman-Cooper CS, Barker SG, Hollingsworth SJ. Primary varicose veins; the saphenofemoral junction, distribution of varicosities and patterns of incompetence. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2003;25:53-59.

26. Jiang P, van Rij AM, Christie RA, Hill GB, Thomson IA. Nonsapheno-femoral venous reflux in the groin in patients with varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001;21:550-557.
27. Golledge J, Quigley FG. Pathogenesis of varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;25:319-324.
28. Andreotti L, Cammelli D. Connective tissue in varicose veins. *Angiology.* 1979;30:798-805.
29. Andreotti L, Cammelli D, Sampognaro S, Allori A, Baldoni D, Busotti A, et al. Biochemical analysis of dermal connective tissue in subjects affected by primary uncomplicated varicose veins. *Angiology.* 1985;36:265-270.
30. Gandhi RH, Irizarry E, Nackman GB, Halpern VJ, Mulcare RJ, Tilson MD. Analysis of the connective tissue matrix and proteolytic activity of primary varicose veins. *J Vasc Surg.* 1993;18:814-820.
31. Sansilvestri-Morel P, Rupin A, Badier-Commander C, Kern P, Fabiani JN, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Imbalance in the synthesis of collagen type I and collagen type III in smooth muscle cells derived from human varicose veins. *J Vasc Res* 2001;38:560-568.
32. Badier-Commander C, Verbeuren TJ, Lebard C, Michel JB, Jacob MP. Increased TIMP / MMP ratio in varicose veins: Possible explanation for extracellular matrix accumulation. *J Pathol* 2000;192:105-112.
33. Golledge J, Greenhalgh RM, Davies AH. The symptomatic carotid plaque. *Stroke* 2000;31:774-781.
34. Kistner RL, Masuda EM. A practical approach to the diagnosis and classification of chronic venous disease. Rutherford RB (editor). *Vascular Surgery.* 5th Edition, Philadelphia USA W.B. Saunders Co. 2000: 1990-1998.
35. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001;2(1):91-95.
36. Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. *T Klin J Med Sci* 2001;21:57-62.
37. Güçer Ş, Tınaztepe K. Böbrek hastalıklarında apoptozisin rolü. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2001;32(2):160-168.
38. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
39. Mene P, Amore A. Apoptosis: potential role in renal diseases. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13: 1936-43.

40. Sungurluoğlu A, Erdemli EA, Tekelioğlu M. Programlanmış hücre ölümü: Apoptozis. *T Klin Tıp Bilimleri* 1996;16:333-337.
41. Cohen JJ. Apoptosis: Mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(4):548-554
42. Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO et al. Apoptosis: a general comment. *FASEB J* 1991;5:2127-8.
43. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Ann* 1982; 17: 229-59.
44. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107: 489-506.
45. Fadeel B, Gleiss B, Hogstrand K, Chandra J, Wiedmer T, Sims PJ, Henter JJ, Orrenius S and Samali A. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266(2): 504-11.
46. Hengartner MO. Programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Recent Prog Horm Res* 1999; 54: 213-24.
47. Cecconi F. Apaf 1 and the apoptotic machinery. *Cell-Death Differ* 1999;6(11):1087-1098.
48. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(8): 589-98.
49. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 1992;119:493-501.
50. Ormerod MG, Oneill CF, Robertson D, Harrap KR. Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp Cell Resc* 1994;211:231-237.
51. Fesus L, Davies PJ, Piacentini M. Apoptosis: Molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 1991;56:170-177.
52. Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89:1121-1132.
53. Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin

- receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 1992;149:4029–4035.
54. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990;343:170–173.
 55. Hall SE, Savill JS, Henson PM, Haslett C. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J Immunol* 1994;153:3218–3227.
 56. Almeida CJ, Linden R. Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(14):1532-1546.
 57. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.
 58. Hussar P, Tokin I, Hussar U, Filimonova G, Suuroja T. Application of Photoshop-based image analysis and TUNEL for the distribution and quantification of dexamethasone-induced apoptotic cells in rat thymus. *Medicina (Kaunas)* 2006;42(6):504-512.
 59. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;1284:555-556.
 60. Altman A, Villalba M. Protein kinase C- θ (PKC- θ): it's all about location, location. *Immunological Reviews* 2003;192:53-63.
 61. Van Loo G, Saelens X, Van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenberghe P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 2002;9(10):1031-1042.
 62. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis : Basic Mechanisms and Implications for Cardiovascular Disease. *Circ Res* 1998;82;1111-1129.
 63. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993;362(6423):847–849.
 64. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362(6423):849–852.
 65. Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995;377(6547):348–351.

66. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169–1178.
67. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687–12690.
68. Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A, Ashkenazi A. Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Curr Biol* 1998;8:525–528.
69. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233–243.
70. Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1990;61:351–359.
71. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR et al. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 1996;274:990–992.
72. Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT et al. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 1996;384(6607):372–375.
73. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*. 1997;276:111–113.
74. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* 1997;16:5386–5397.
75. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 420-420.
76. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* 1998;23(2): 74-79.
77. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis: mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993;268:10932–10937.
78. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993;74:845–853.

79. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803– 815.
80. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505–512.
81. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995;81:495–504.
82. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998 17(6): 1675-1687.
83. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X . Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94(4): 481-490.
84. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144(2): 281-292.
85. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256(1): 42-49.
86. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;15(22): 2922-2933.
87. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F . Mitochondria and cell death.Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999;264(3): 687-701.
88. Loeffler M, Kroemer G . The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 2000;256(1): 19-26.
89. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC . A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 1998;273(14): 7787-7790.
90. Li LY, Luo X, Wang X . Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412(6842): 95-99.
91. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz, RL, Simpson, RJ and Vaux,DL. Identification of DIABLO, a mammalian

protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102(1): 43-53.

92. Verhagen AM, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 2002;277(1): 445-454.
93. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM . Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;256(1): 27-33.
94. Denault JB, Salvesen GS . Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev* 2002;102(12): 4489-500.
95. Richardson H, Kumar S . Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J Immunol Methods* 2002;265(1-2): 21-38.
96. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C et al. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 1995;80(3): 401-411.
97. Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E , Yuan J . Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 1998;92(4): 501-509.
98. Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H et al. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998; 94(3): 325-337
99. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996;384(6607): 368-372.
100. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH . Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68: 383-424.
101. Gewies A. Introduction to apoptosis. *ApoReview* 2003.
102. Salvesen GS, Renatus M. Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell* 2002;2(3): 256-7.
103. Vaux DL, Cory S, Adams JM . Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988;335(6189): 440-442.

104. Borner C . The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003;39(11): 615-647.
105. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899 -1911.
106. Conradt B, Horvitz HR. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998;93(4): 519-529.
107. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275(5303): 1132-1136.
108. Cory S, Adams JM . The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2(9): 647-656.
109. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292(5517): 727-730.
110. Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ . Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 2001;153(6): 1265-1276.
111. Tsujimoto Y, Shimizu S . VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 2000;7(12): 1174-1181.
112. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998;17(25):3225-3236.
113. Heckman CA, Mehew JW, Boxer LM . NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 2002;21(24): 3898-3908.
114. Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J Cell Biol* 1996;134(1): 13-23.
115. Salvesen GS, Duckett CS . IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(6): 401-410.
116. Huang H, Joazeiro CA, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T. The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." *J Biol Chem* 2000;275(35): 26661-26664.

117. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X . Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102(1): 33-42.
118. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular Cell Apoptosis in Remodeling Restenosis, and Plaque Rupture. *Circ. Res* 2000;87;184-188.
119. Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular Research* 1999;41:361–368.
120. Bennett MR. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart* 2002;87:480-487.
121. McCarthy NJ, Bennett MR. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovascular Research* 2000;45:747–755.
122. Cho A, Courtman D, Langille L. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res* 1995;76:168–175.
123. Cho A, Mitchell L, Koopmans D, Langille BL. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res* 1997;81:328–337.
124. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nature Med* 1998;4:222–227.
125. Thompson RW, Liao SX, Curci JA. Vascular smooth muscle cell relevant in vivo. Moreover, a closer examination of the apoptosis in abdominal aortic aneurysms. *Coron Artery Dis* 1997;8:623–631.
126. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998;97:2307–2315.
127. Kim HS, Hwang KK, Seo JW, Kim SY, Oh BH, Lee MM, Park YB. Apoptosis and regulation of Bax and Bcl-X proteins during human neonatal vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:957–963.
128. Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells following balloon injury. *Circulation* 1997;95:981–987.
129. Ihling C, Haendeler J, Menzel G, Hess RD, Fraedrich G, Schaefer HE, ZeiherAM. Co-expression of p53 and MDM2 in human atherosclerosis:

- implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. *J Pathol* 1998;185:303–312
- 130.** Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998;282:290–293.
- 131.** Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, Nakashima Y, Komori K, Sugimachi K, Sueishi K. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res* 1998;82:147–156.
- 132.** Ascher E, Jacob T, Hingorani A, Tsemekhin B, Gunduz Y. Expression of molecular mediators of apoptosis and their role in the pathogenesis of lower extremity varicose veins. *J Vasc Surg* 2001;33:1080–1086
- 133.** Kosugi I, Urayama H, Kasashima F, Ohtake H, Watanabe Y. Matrix metalloproteinase-9 and urokinase-type plasminogen activator in varicose veins. *Ann Vasc Surg* 2003;17:234-238.
- 134.** Tamarina NA, Mcmillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery* 1997;122:264-272.
- 135.** Charles AK, Gresham GA. Histopathological changes in venous grafts and in varicose and non-varicose veins. *J Clin Pathol* 1993;46:603-606.
- 136.** Kockx MM, Cambier BA, Bortier HE, De Meyer GRY, Van Cauwelart PA. The modulation of smooth muscle cell phenotype is an early event in human aorta-coronary saphenous vein grafts. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1992;420:155-162.
- 137.** Karayannacos PE, Rittgers E, Kakos GS, Williams TE, Meckstroth CV, Vasko JS. Potential role of velocity and wall tension in vein graft failure. *J Cardiovasc Surg* 1980;21:171-178.
- 138.** Pappas PJ, Gwertzman GA, De Fouw DO, Padberg Jr FT, Silva Jr MB, Duran WN et al. Retinoblastoma protein: a molecular regulator of chronic venous insufficiency. *J Surg Res* 1998;76:149–153.
- 139.** Jurukova Z, Milenkov C. Ultrastructural evidence for collagen degradation in the walls of varicose veins. *Exp Mol Pathol* 1982;37(1):37–47.
- 140.** Maurel E, Azema C, Deloly J, Bouissou H. Collagen of the normal and the varicose human saphenous vein: a biochemical study. *Clin Chim Acta* 1990;193:27-38.

141. Ducasse E, Giannakakis K, Chevalier J, Dasnoy D, Puppink P, Speziale F et al. Dysregulated Apoptosis in Primary Varicose Veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29:316–323.
142. Urbanek T, Skop B, Wiaderkiewicz R, Wilczok T, Ziaja K, Lebda-Wyborny T, Pawlicki K. Smooth Muscle Cell Apoptosis in Primary Varicose Veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2004;28:600–611.
143. Ascher E, Jacob T, Hingorani A, Gunduz Y, Mazzariol F, Kallakuri S. Programmed Cell Death (Apoptosis) and Its Role in the Pathogenesis of Lower Extremity Varicose Veins. *Ann Vasc Surg* 2000;14:24-30.
144. Kockx MM, Knaapen MWM, Bortier HE, Cromheeke KM, Bouterin-Falson O, Finet M. Vascular remodeling in varicose veins. *Angiology* 1998;49:871-877.
145. Bujan J, Jimenez-Cossio JA, Jurado F, Gimeno MJ, Pascual G, Garcia-Honduvilla N et al. Evaluation of the smooth muscle cell component and apoptosis in the varicose vein wall. *Histol Histopathol* 2000;15:745-752.
146. Wyllie AH. Death from inside out: an overview. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994;345(1313):237-241.
147. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-619.
148. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995;91:2703-2711.
149. Rowan S, Fisher DE. Mechanisms of apoptosis cell death. *Leukemia* 1997;11:459-46.
150. Henderson LE, Geng YJ, Sukhova GK, et al. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1999;99:96-104.
151. Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, Weisberg PL. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ Res* 1997;81:591–599.
152. Saxena A, McMeekin JD, Thomson DJ. Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens. *J Pathol* 2002;196:335–342.

8.ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Silifke'de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mersin'de tamamladım.1989 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdim ve 1995 yılında tıp eğitimimi tamamladım. Nevşehir SSK Hastanesi' nde 1996 ve 2000 yılları arasında pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2001 yılında Tıpta Uzmanlık Sınavı' nı kazanarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahi Anabilim Dalı' nda uzmanlık eğitimime başladım ve halen burada eğitimime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.

