

Ameliyat sırasında perikardda oluşan değişiklikler: Bir elektronmikroskopi çalışması

Intraoperative changes in the pericardium: a study via electron microscope

Ali Yener,¹ Yeşim Bardakçı,² Erkan İriz,¹ Candan Özoğul,² Nuran Yener,³
Hüseyin Bayram,¹ Adem Grbolar⁴

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, ²Histoloji Anabilim Dalı, Ankara;

³Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Ankara;

⁴Özel Ankara Ulus Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Bölümü, Ankara

Amaç: Bu çalışmada ilk kez kalp ameliyatı geçiren hastalarla daha önce en az bir kez kalp ameliyatı geçirmiş olan hastalar arasında perikard yapısı ve ameliyat sırasında perikarddaki değişimler karşılaştırıldı.

Çalışma planı: Çalışmaya Ocak 2005 - Nisan 2006 tarihleri arasında kliniğimizde ameliyat edilen 36 hasta (19 erkek, 17 kadın; ort. yaş 61.2±16.1 yıl; dağılım 47-85 yıl) dahil edildi. Hastalar iki gruba ayrıldı. Grup 1'de ilk kez kalp ameliyatı geçiren 20 hasta, grup 2'de ise daha önce en az bir kez kalp ameliyatı geçirmiş 16 hasta bulunmakta idi. Her iki grupta da perikard ilk açıldığında ve ilk biyopsiden 60 dakika sonra olmak üzere iki biyopsi alındı. Alınan biyopsilerin bir bölümü uPAR (ürokinaz plazminojen aktivatörü reseptörü) ve FGF-2 (fibroblast büyüme faktörü 2) immün boyama ve DNA fragmentasyonu olan hücrelerin belirlenmesi için TUNEL yöntemi ile nötral formalinde tespit edildi. Diğer doku örnekleri transient elektromanyetik (TEM) yöntemi ile incelendi ve toluidin mavi ile boyandı.

Bulgular: Her iki grup arasında gerek ameliyat öncesi risk faktörleri gerekse de hastaların demografik verileri açısından istatistiksel herhangi bir fark bulunmadı. Ancak grup 1'de birinci ve ikinci biyopsiler arasında uPAR ve FGF-2 düzeyleri açısından dokularda belirgin farklılıklar tespit edildi. Ayrıca bu grupta birinci biyopsilerde ultrastrüktürel olarak yüzeysel mikrovilluslar ve hücrelerin bazalinde derin interdigitasyonlar gözlenirken, ikinci biyopsilerde ve grup 2'deki her iki biyopside bu bulguların mikrovillus kaybı ve bazal membranda düzleşme şeklinde değiştiği tespit edildi. Grup 2'de ise birinci ve ikinci biyopsiler arasında önemli bir fark tespit edilmedi. Apoptosis açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Sonuç: Sonuç olarak, ilk kez kalp ameliyatı geçiren hastalarda perikardda görülen reaksiyonların ikinci kez kalp ameliyatı geçiren hastalarda görülmemesi perikardın yapısının bir bütün olarak bozulduğuna işaret etmektedir.

Anahtar sözcükler: İmmünohistokimyasal; açık kalp cerrahisi; perikard; TUNEL.

Background: In this study, we compared the pericardial structure and intraoperative pericardial changes between patients undergoing cardiac surgery for the first time and patients who had previously undergone at least one cardiac surgery.

Methods: Thirty-six patients (19 males, 17 females; mean age 61.2±16.1 years; range 47 to 85 years) who underwent surgery in our clinic between January 2005 and April 2006 were enrolled in this study. The patients were divided into two groups. Group 1 consisted of 20 patients who underwent surgery for the first time whereas group 2 consisted of 16 patients who had previously undergone at least one cardiac surgery. Two biopsies were obtained in both groups one immediately after opening the pericardium and the other 60 minutes after the first biopsy. A portion of the biopsies that were obtained was fixed in neutral formalin by the TUNEL method for uPAR (urokinase plasminogen activator receptor) and FGF-2 (fibroblast growth factor-2) immunostaining, and it was also used to detect cells with DNA fragmentation. The other tissue samples were examined by the transient electromagnetic (TEM) method and stained with toluidine blue.

Results: No statistically significant differences were found between the groups either in the preoperative risk factors or the demographic characteristics of the patients. However, there were marked differences in the tissues between the first and second biopsies in group 1 regarding the uPAR and FGF-2 levels. Moreover, at the ultrastructural level, superficial microvilli and deep basal interdigitations of cells were identified in the first biopsy, while microvilli disappeared and basal interdigitations smoothed out in the second biopsy, and in both biopsies of group 2. No important differences were found between the first and second biopsies in group 2. There was no statistically significant difference between the groups with respect to apoptosis.

Conclusion: In conclusion, the fact that the reactions seen in the pericardium of patients undergoing cardiac surgery for the first time are absent in patients undergoing cardiac surgery for the second time suggests that the structure of the pericardium deteriorates as a whole.

Key words: Immunohistochemical; open heart surgery; pericard; TUNEL.

Geliş tarihi: 22 Ekim 2010 Kabul tarihi: 15 Şubat 2011

Yazışma adresi: Dr. Erkan İriz, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 06500 Beşevler, Ankara.
Tel: 0312 - 202 56 19 e-posta: erkaniriz@hotmail.com

Son yıllarda gerçekleşen teknolojik ilerlemelere rağmen, daha önce kalp cerrahisi geçirmiş olan hastaların ikinci veya daha fazla sayıdaki kalp ameliyatlarına bağlı komplikasyonları kalp cerrahisinde halen önemli bir sorundur. Ameliyat sonrası dönemde gelişen perikardiyal adezyonlar tekrar ameliyatlar sırasında kalp, büyük damarlar ve bypass greftlerinin hasarlanma riskini artırmaktadır.^[1,2]

Gabbay ve ark.,^[3] cerrahi kliniklerinde redo kalp ameliyatlarının giderek artan sıklıklarda (%10-20) yapılmaya başladığını belirtmişlerdir. Son yıllarda bu olgu sıklığının arttığı ve daha da artacağı tahmin edilmektedir. Resternotomilerde kalp ve diğer vasküler dokularda ciddi hasarlanma sıklığının %2-6 arasında olduğu öne sürülmektedir.^[4]

Kalp cerrahisi sonrası kalbin ödemli olması,^[5] bypass greftlerinin sıkışmaması gerekliliği, ameliyat sonrası perkardiyal tamponadı önlemek^[6] ve bazı ameliyatlarda otolog perikard kullanımı gibi faktörler nedeni ile perikardın açıldığı şekilde kapatılması çoğu zaman mümkün değildir. Perikardda meydana gelen bu adezyonlar ile ilgili yapılmış olan daha önceki çalışmalar da perikard duvarındaki mezotelial hücrelerin gösterdiği fibrinolitik aktivitede ve plazminojen aktive edicideki (plasminogen aktivating)^[5] değişimlerin perikard adezyonlarının gelişmesini artırdığını gösterdi. Bu adezyonları azaltmak için geçmişte perikardın modifiye kapatılması,^[7,8] perkardiyal sentetik ve biyolojik yamalar,^[1,9,10] perikardın dekstran ile yıkanması^[11] gibi birçok yöntem kullanılmış olmakla birlikte sorun halen tam olarak çözümlenememiştir. Son yıllarda özellikle hayvanlar üzerinde emilebilir jelatin (bioabsorbabl gelatin) shettler ile yapılmış olan çalışmalarda,^[11,10] bu materyallerin perkardiyal yapışıklığı azaltmada çok faydalı olduğu görülmektedir. Bu çalışmalarda tam bir kardiopulmoner bypass (KPB) şartları sağlanmasa da, perikard minimal bir kan ile temas etmiş olsa da adezyon gelişiminin az olması değerlidir.

Kalp cerrahisi sonrası adezyonlarda perikardın reaksiyonunun ilk kez kalp ameliyatı olacak hastalar (İlk) ile daha önce kalp ameliyatı geçirmiş ve ikinci kez ameliyat olacak hastalar (Redo) arasında perikard mezotel hücre reaksiyonları arasında fark olup olmadığının araştırılması amacı bu çalışmayı planladık. Bu çalışmada, mezotel hücre aktivitesi için plazminojen aktive edici reseptörler gösterilerek, fibroblast gelişimi açısından da bir fark olup olmadığı fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor; FGF) düzeyleri ile araştırıldı. Bu çalışmada ayrıca, ameliyat sonrası farklı zamanlarda perikardda oluşan değişimlerin neler olduğu ve perikardda oluşan histopatolojik değişimlerin elektron mikroskobu ile karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlandı.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Çalışmaya Ocak 2005 - Nisan 2006 tarihleri arasında kliniğimizde ameliyata alınan toplam 36 hasta dahil (19 erkek, 17 kadın; ort. yaş 61.2±16.1 yıl; dağılım 47-85 yıl) edildi. Bu çalışmanın yapılması için Üniversitemizin etik kurulundan gerekli izinler alındı. Tüm hastalar çalışma hakkında bilgilendirildi ve çalışma için bilgilendirilmiş onam formları alındı. Çalışmamızda yer alan hastalar iki gruba ayrıldı. İlk kez kalp ameliyatı geçiren 20 hasta (İlk) grup 1'de, daha önce en az bir kez kalp ameliyatı geçirmiş olan 16 hasta (Redo) ise grup 2'de yer aldı. Grup 1 ve grup 2'de hastaların yaş ortalamaları sırasıyla 60.7±16.1 ve 62.1±16.5 idi. Tüm hastaların demografik verileri tablo 1'de verilmiştir. Miyokardiyal korunma tüm hastalarda soğuk kan kardioplejisi ile sağlandı. Ameliyatlar moderate ve topikal hipotermi altında yapıldı.

Grup 1'deki hastaların 15'inde koroner arter hastalığı, beşinde ise kapak hastalığı vardı. Grup 2'deki hastaların ise 11'inde koroner arter hastalığı, beşinde ise kapak hastalığı vardı. Hastaların cinsiyeti, hipertansiyon, sigara içimi, diabetes mellitus ve akut miyokard infarktüsü geçirme oranları gibi ameliyat öncesi risk faktörleri açısından da grup 1 ve grup 2 arasında istatistiksel bir fark yoktu.

Perikardiyal biyopsi tekniği

Grup 1'de tüm hastalarda perikard longitudinal olarak açıldıktan sonra kesilme çizgisinin yaklaşık 3 cm kadar uzağından ve perikardın nondiyafragmatik yüzünden biyopsiler alındı. Biopsiler 5 mm çapında bir biyopsi punch'ı ile alındı. Biyopsiler perikard açılır açılmaz [1. biyopsi (grup 1-1)] ve perikard açıldıktan 60 dakika sonra [2. biyopsi; (grup 1-2)] alındı. Grup 2'deki hastalarda ise sternum oscillating sternum testeresi ile açıldıktan sonra perikardı künt diseksiyonlar ile serbestleştirilebilen hastaların perikardının nondiyafragmatik yüzünden grup 1'deki hastalara benzer şekilde biyopsiler alındı (grup 2-1 ve grup 2-2). Grup 2'deki hastalar arasında perikardı kolayca bulunup diseke edilenler de vardı. Perikardında ciddi konstriksiyon bulunan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Tablo 1. Hastaların demografik sonuçları

	Grup 1	Grup 2	p*
	Ort.±SS	Ort.±SS	
Yaş (yıl)	60.7±16.1	62.1±16.5	0.9
C-reaktif protein	15.8±16.3	9.7±13.9	0.5
Sedimentasyon	26.2±16.5	25.5±20.3	0.7
Lökosit	8039±1940	7247±2126	0.2
Vücut kütle indeksi	27.8±4.5	25.4±3.8	0.1

*: İstatistiksel değerlendirme ki-kare testi ile yapılmıştır; Ort.±SS: Ortalama ± standart sapma.

Histopatolojik ve immünohistokimyasal işlemler

Her gruba ait alınan doku örneklerinin bir bölümü %10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildi. Daha sonra bu örnekler alışılmış ışık mikroskop takibinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4 micron (μ) kalınlığında kesitlerin bir grubu normal camlara alınarak hematoksilen eozin ile boyandı ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Diğer grup kesitler polilizinli camlar üzerine alınarak immün boyama uygulama yapıldı. Sınıflandırma sistemi olarak Nkere ve ark.nın^[12] tanımladığı perikarddaki lokal inflamasyonun şiddeti ve mesotel hücre hasarının derecesi ile ilgili sınıflama kullanıldı. Mesotel hücreleri şu şekilde sınıflandırıldı; sınıf 1, normal mesotelium, sınıf 2, mesotelial hücrelerin küboidal şekil alması; sınıf 3, mesoteliumun total olarak yokluğu. Lokal inflamasyon için sınıflama şöyle idi; sınıf 1; inflamasyonun yokluğu, sınıf 2; vasküler konjesyon, sınıf 3; nötrofillerin marginal infiltrasyonu, sınıf 4; konnektif dokuda belirgin nötrofil infiltrasyonu.

uPAR ve FGF-2 işlemleri

Kesitler ksilol ve alkol ile deparafinize edildi. Daha sonra dehidrate %3'lük hidrojen peroksit (Lab Vision, USA) ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında kesitler PBS (phosphate buffer saline) (LabVision, USA) (pH 7.4) ile yıkandı. Devam eden işlemlerde FGF için Zymed Universal Kit (Histostain plus, Ref/Cat: 85-9043), uPAR için Dako Kit (DakoCytomation Ref: K0690, Lot: 02913) kullanıldı.

Blocking serum ile non-spesifik bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra camlar yıkanmadan iki gruba ayrıldı;

1. gruba FGF-2 primer antikor (poliklonal anti-rabbit Ig sc-79, Lot: A2805, SantaCrus),
2. gruba uPAR primer antikor (poliklonal anti-goat Ig sc-9793, Lot: K081, SantaCruz), uygulanarak +4 °C'de bir gece bekletildi.

Süre sonunda PBS ile yıkanan camlara biyotinli sekonder antikor eklenerek primer antikora bağlanması sağlandı. Phosphate buffer saline ile yıkanan camlar enzim kompleksine etkin bırakıldı, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak ortama AEC (ref/cat: 00-2007, Lot: 504811594) kromojeni eklenerek gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı.

Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksileni kullanıldı. Negatif boyama primer antikor aşamasında yapıldı. Bu şekilde boyanan camlar ultramount yardımı ile kapatıldı ve bilgisayar donanımlı fotoşık mikroskopta (DCM 4000, Leica, Weetlar, Germany) değerlendirildi.

TUNEL işlemi

TUNEL boyaması In Situ Cell Death Detection Kit® (Roche, Mannheim, Germany) firmasının üretim protokolüne uygun olarak yapıldı. Kesitler, 30 dakika 37 °C'de proteinase K (20 μ g/ml) deproteinize edildi. Distile suda fosfat-buffered-saline uygulanmasını takiben başarılı olarak deparafinize edildi. Daha sonra karışık TUNEL reaksiyonunda inkübe edilerek yıkandı. Daha sonra kesitler 0.02% 3,3'-diaminobenzidine (DAB)'li converter-POD kullanılarak yıkandı ve görüldü. Kesitler Harris hematoxylin ile boyanarak sayıldı.

Electronmikroskopik işlem

Alınan doku örnekleri 1 mm³'lük parçalara ayrıldı ve %2.5'lik gluteraldehitte 48 saat tespit edildi. Fosfat tamponları ile yıkandı. Örnekler bir saat süreyle OsO4 ile ikinci kez tespit edildi ve boyandı. Fosfat tamponları ile yıkandı. Dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Propilen oksitten geçirilerek şeffaflaştırıldı. Araldit +DDSA (dodesenyl succinic anhidrit) ön gömme materyaline gömülerek bir gece (overnight) bekletildi. Daha sonra araldit+DDSA+BDMA (benzil dimethyl amin) karışımı olan gömme materyaline gömüldü. Ultramikrotom ile alınan yarı ince kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskopik olarak incelendi ve işaretlendi. İşaretlenen yerlerden alınan ince kesitler uranylacetate-lead citrate boyaları ile boyanarak Libra 120 Carl Zeiss (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen , Germany) elektron mikroskopunda incelenerek resimlendirildi.

BULGULAR

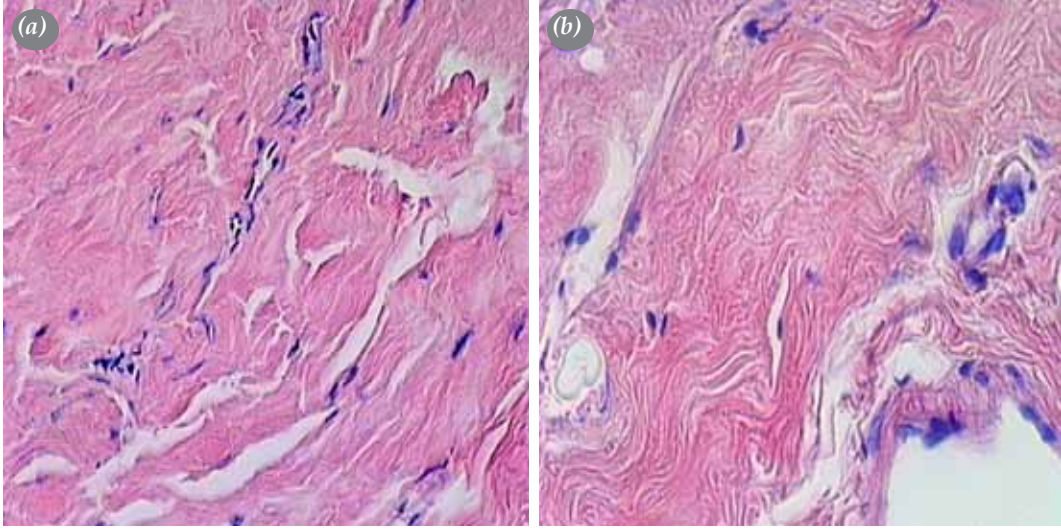
Histopatolojik bulgular

Tüm gruplarda kollajen lif dağılımı ve düzeni, vaskülarizasyon, diğer bağ doku hücrelerinin organizasyonu ve dağılımı damar duvar yapıları birbirlerine benzer ve normal görünümdeydi (Şekil 1).

Elektron mikroskopik bulgular

Grup 1 (grup 1-1) ve grup 2 (grup 2-1)'de ilk biyopsilerde fibroblastlar normal histolojik görünümde iken grup 1'nin ikinci biyopsi grubunda (grup 1-2) ve grup 2'nin ikinci biyopsi grubunda (grup 2-2) fibroblastların sitoplazmalarındaki granüllü endoplazmik retikulum sistenalarında sayıca artış ve bazı sistenlerde prokollajen aktivitesi gözlemlendi (Şekil 2).

Ayrıca grup 1-1'de perikard hücrelerinde yüzeyel mikrovilluslar ve hücrelerin bazalinde derin interdijitasyonlar gözlenirken bu bulguların grup 1-2'de kaybolduğu mikrovillusların silikleştiği bazal interdijitasyonların kaybolduğu ve mezotel hücrelerinde mitokondriyal kristalosis varlığı dikkati çekti (Şekil 3).



Şekil 1. (a) Grup 1 ve (b) grup 2 bulguları normal histolojik görünümde (H-E x 400).

Grup 2-1'de perikard hücreleri çok az sayıda mikrovillus içermekteydi. Grup 1-1'de gözlenen derin invazyon gelişimi yoktu. Hücreler arası bağlantı birimlerinde açılmalar belirgin olarak gözlemlendi. Grup 1-1 ve grup 2-1'in biyopsileri arasında mikrovillus sayıları açısından önemli bir fark vardı.

Grup 2'de perikard hücreleri elektron açık hücreler olarak dikkati çekti. Az sayıda mikrovillus ve yok denecek kadar az bazal interdijitasyonlar ile grup 2-1'e benzer özellikler göstermekteydi. Ancak bu grupta komşu hücreler arasındaki bağlantı birimlerinde belirgin dejeneratif açılmalar perikardiyal kavite ile bağ doku arasındaki bariyerin kısmen bozulmuş olduğunun göstergesi olarak değerlendirildi (Şekil 4).

İmmünohistokimyasal bulgular

uPAR immünoaktivitesi

uPAR için yapılan immünohistokimyasal işaretlemede, ilk ameliyat grubunda, ameliyat başlangıcında alınan doku örneklerinde az sayıda endotel, damar düz kas hücresi ve kan hücrelerinde zayıf tutulum belirlerken fibroblastik tutulum saptanmadı. Grup 1-2'de ise endotel, damar düz kas hücreleri, fibroblast ve kan hücrelerinde belirgin olarak kuvvetli tutulum gözlemlendi. Bu durum grup 1-1 ve grup 1-2'nin biyopsileri arasında uPAR aktivitesi açısından fark yaratmadı (Şekil 5).

Grup 2-1'in biyopsilerinde, fibroblastlarda orta tutulum izlenirken, endotel, damar düz kası ve kan hücrelerinde immün tutulum gözlemlenmedi.

Grup 2-2'deki biyopsilerde ise az sayıda damar düz kas hücresinde zayıf tutulum saptandı. Bu durum önemli bir farklılık yaratmadı. Diğer hücrelerde immün yanıt gözlemlenmedi (Şekil 6; Tablo 2).

Fibroblast büyüme faktörü-2 immünoaktivitesi

Fibroblast büyüme faktörü-2 için yapılan immünohistokimyasal işaretlemede, grup 1'de, ameliyat başlangıcında alınan doku örneklerinde damar düz kas hücrelerinde zayıf, kan hücrelerinde orta derecede tutulum saptanırken, endotel ve fibroblastik tutulum gözlemlenmedi.

Grup 1-2'nin biyopsisinde ise fibroblast, damar düz kası ve kan hücrelerinde kuvvetli, endotel hücrelerinde orta derecede tutulum izlendi. Bu farklar da grup 1-1 ve grup 1-2'nin biyopsileri arasında FGF-2 immünoaktivitesi açısından önemli bir farklılık yarattı.

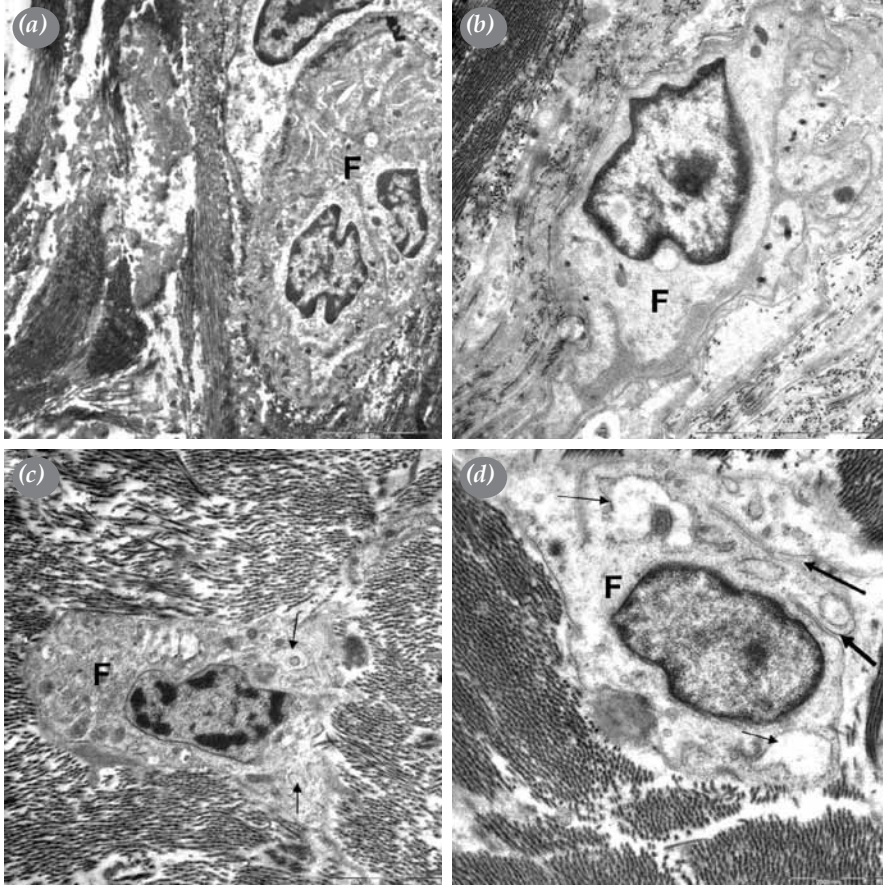
Grup 2'de ameliyat başlangıcında alınan doku örneklerindeki FGF-2 tutulumu kan hücrelerinde kuvvetli, fibroblast ve damar düz kas hücrelerinde ise orta derecede gözlemlendi, endotel hücrelerinde ise immün yanıt gözlemlenmedi.

Grup 2-2'nin biyopsisinde ise kan hücrelerinde kuvvetli, damar düz kas hücrelerinde orta derecede tutulum izlenirken, fibroblastik ve endotelial tutulum izlenmedi. Grup 2-1 ve grup 2-2'nin biyopsilerinde ise FGF-2 immünoaktivitesi açısından önemli bir fark bulunmadı (Şekil 7; Tablo 2).

TUNEL işaretleme

Grup 1'de ameliyat başlangıcında alınan doku örneklerinde immün yanıt gözlenmezken grup 1-2'de birkaç endotel hücresinde ve damar düz kas hücrelerinde TUNEL + hücreler gözlemlendi.

Aynı bulgular redo olgu alt gruplarında da gözlemlendi (Şekil 8). Grup 1 ve 2'de birinci ve ikinci biyopsiler açısından apoptozis pozitifliği açısından fark önemli bulunmadı.



Şekil 2. (a) Grup 1-1'de normal görünümde bir fibroblast, (F). (b) Grup 1-2'de, genişlemiş granüllü endoplazmik retikulum sisternaları (ince oklar) ile aktif kollajen sentezi evresinde bir fibroblast (F). (c) Grup 2-1 normal görünümde fibroblast (F). (d) Grup 2-2, oldukça geniş endoplazmik retikulum sisternaları (ince oklar) ve derin plazma zarı invajinasyonlarına sahip bir fibroblast (F; kalın oklar). *Uranyl asetat-kurşun sitrat*.

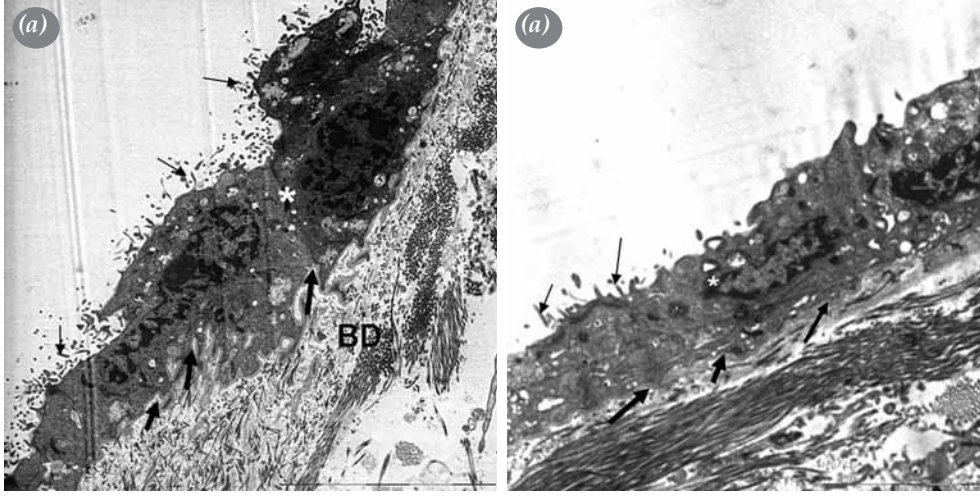
TARTIŞMA

Perikardiyal adezyon gelişimi günümüzde halen kalp cerrahisinin en önemli sorunudur ve bu konuda yapılan araştırmalar devam etmektedir. Araştırmaların devam etmesinden de anlaşılacağı üzere birçok nokta halen açık olarak bilinmemektedir. Acaba perikard yapışıklığı sadece perikardda meydana gelen bazı patolojik olayların^[5] neticesinde mi gelişmektedir? Yoksa bu patolojinin gelişimini tetikleyen kişisel, çevresel, cerrahi ortama, kalp akciğer pompasına bağlı bazı faktörlerin ortak etkisi mi rol oynamaktadır.

Perikardda ameliyat sırası histopatolojik değişimleri ilk kez Nkere ve ark.^[12] elektronmikroskopik çalışmalarında göstermişlerdir, ancak bugüne kadar redo hastalarda da perikardda benzer değişimlerin ameliyat sırasında olup olmadığına yönelik herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında^[1,10] ise daha çok perikardın defektif böl-

gelerine konulacak olan ve yapışıklığı azalttığı gösterilen gözlemler ön plana çıkmıştır.

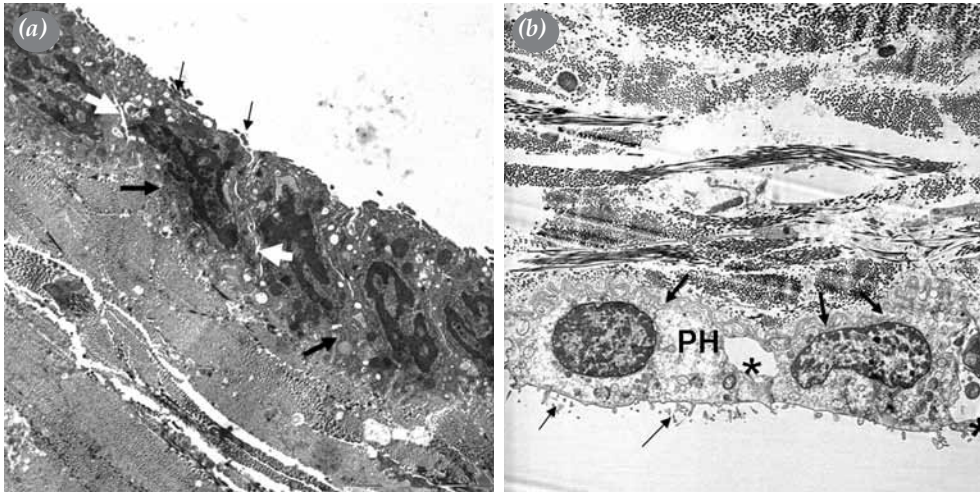
Bizim çalışmamızda da Nkere ve ark.nın^[5,12] bulgularına paralel olarak perikardı ilk kez açılan hastalarda plazminojen aktive edici reseptör ile fibroblast büyüme faktörlerinin ikinci alınan biyopsilerde, birinci alınanlara kıyasla önemli oranda yüksek bulunması ve anlamlı fark yaratması önemlidir. Ancak biz çalışmamızda, redo olgulardan alınan biyopsilerde bu çalışmalara paralel anlamlı bir fark tespit edemedik. Bu sonuç bizim düşüncemize göre oldukça önemlidir. Kalp cerrahisi ile ilgilenenlerin hemen hepsi bilirler ki üçüncü kez kalp ameliyatına giden bir hastada ameliyat riski, ikinci kez ameliyat olanlara göre daha fazladır.^[2] Bunun pratikteki en önemli nedeni ise perikard adezyonlarının daha sert ve sıkı gelişmiş olmasıdır. Ancak bu yapışıklığı etkileyen eğer sadece perikard reaksiyon derecesi olsaydı, redo olguların ameliyat olduğu grup 2'deki hastalarda en az grup 1'deki hastalara benzer



Şekil 3. (a) Grup 1-1 perikard hücreleri apikalde iyi gelişmiş mikrovillus (ince oklar) bazalde yaygın interdijitasyonlara sahip (kalın oklar). (b) Grup 1-2'de perikard hücreleri apikalde mikrovillusların sikiştiği (ince oklar) bazal membranın düzenli yapısı (kalın oklar) ve mitokondriyal kristalizis (*) belirlendi. *Uranil asetat-kurşun sitrat.*

perikardda reaksiyon dereceleri görülmesi gerekirdi. Bizim çalışmamızdan çıkarabileceğimiz bir sonuç, redo olgulardan sonra perikardın elektronmikroskopik görüntülerde de görüldüğü gibi normal zar yapısında bulunması, gereken mikrovillusların kaybı ve hücreler arası bağlantı birimlerinde açılmalar ile olması gereken yapısını kaybettiğidir. Elektron mikroskopik olarak mezotel hücrelerinde gözlenen mikrovillus kaybı ve interdijitasyonlarda düzleşme mezotel hücrelerinin aktif emilim ve transport görevlerini yerine getiremediğinin göstergesi olarak düşünüldü. Hücrelerin apikal morfolojilerinde gözlenen bu değişiklik beraberinde

membran yapısında ve hücre yeni yüzey moleküllerinin şekillenmesine (adezyon molekülleri vb.) neden olabilir kanısındayız. Üstüne üstlük ilk ameliyat sonrası dönemlerde de grup 2'deki hastaların kendi perikardını hiçbir şekilde rejenerere edemediği ve perikardın eski yapı ve fonksiyonunu asla kazanamadığına da histopatolojik bulgular işaret etmektedir. Perikard dokusu yerinde artık perikard ile hiç ilgisi olmayan fibröz bir doku bulunmaktadır. Yani bu çalışmada elde edilen bulgular, perikard yapışıklığını önlemeye yönelik yapılacak girişimlerin kalbi çepeçevre sadece yapışıklığı önleyecek moleküller ile saracak girişimler şeklinde



Şekil 4. (a) Grup 2-1'de; bu grupta perikard hücreleri çok az sayıda mikrovillus (ince oklar) düzenli bazal membran (kalın oklar), hücreler arası bağlantı birimlerinde açılmalar (beyaz oklar). (b) Grup 2-2'de elektron açık perikard hücreleri (PH), az sayıda mikrovillus (ince oklar) ve yok denecek kadar az bazal interdijitasyonlar (kalın oklar), komşu hücreler arasındaki bağlantı birimlerinde belirgin dejeneratif açılmalar (*). *Uranil asetat-kurşun sitrat.*

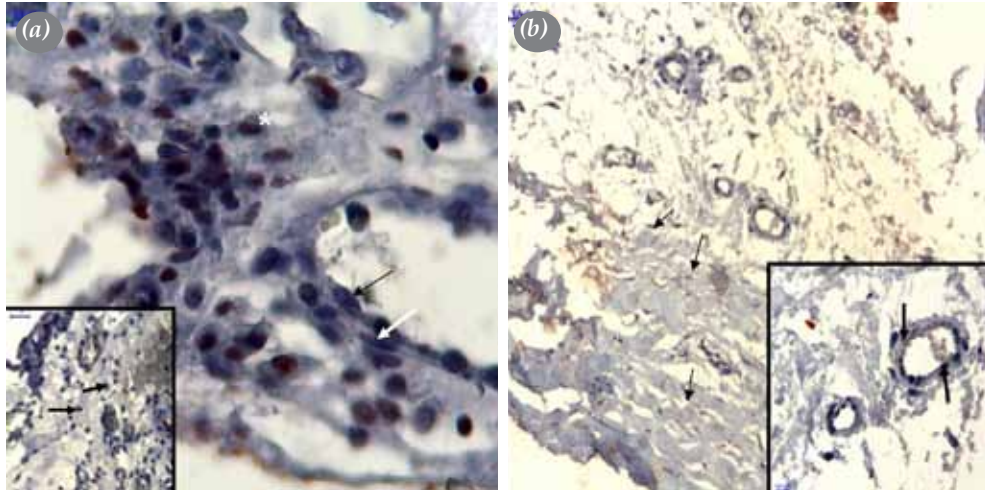


Şekil 5. (a) uPAR grup 1-1, kan hücreleri (beyaz oklar), damar düz kas hücreleri (siyah oklar; uPAR immün boyama x 400). (b) Grup 1-2'de uPAR damar düz kas hücreleri (siyah uzun oklar), endotel hücreleri (beyaz oklar), küçük resim: fibroblastlar (kısa siyah oklar; uPAR immün boyama x 100). (c) uPAR grup 2-2'de büyük resim: fibroblastlar (oklar), küçük resim: Damar düz kas hücreleri (siyah oklar), endotel (beyaz oklar; uPAR immün boyama x 400).

olması ve hastanın kendi perikardının bulunduğu bölgelere de yapışıklığı giderici tedavilerin uygulanması gerekliliğini düşündürmektedir. Yapılmış olan deneysel çalışmalarda,^[1,10,13,14] perikardda oluşturulan defektin yerine bu yapışıklığı azaltıcı moleküllerden üretilen ürünler yerleştirilmiştir. Bu tarz ürünlerde sonuçta perikarddaki genel reaksiyonu azaltmada etkili olmadığı için pek faydalı olamayacağı düşünülebilir. Hastalarda perikardın bir kez açılması bu zarda geri dönüşü olmayacak bir dizi fizyolojik olayları tetiklemektedir. Bu reaksiyonlar neticesinde, perikard zarı normal reaksiyon yeteneğini, uPAR aktivitesini, FGF-2 aktivitesini kaybetmektedir. Grup 2'deki hastalarda grup 1'deki hastalara göre reaksiyon farklarının gözlenmesinin buna işaret ettiğini düşünmekteyiz.

Grup 2'deki hastalarda elektron mikroskopik olarak mezotel hücrelerinde gözlenen mikrovillus kaybı ve interdijitasyonlarda azalma mezotel hücrelerinin aktif emilim ve transport görevlerini yerine getiremediğinin göstergesi olarak düşünüldü. Normal sekresyon ve emilim özelliklerini kaybeden perikardın zaten normal bir zar fonksiyonu yapabilmesi olası değildir.

Bu çalışmada, grup 1 ve grup 2'de histolojik değerlendirmede anjiyogenez ve bağ dokusu artışı gözlenmedi. Ancak grup 1-2'nin biyopsilerinde endotel hücrelerinde, damar düz kas hücrelerinde, fibroblastlarda ve kan hücrelerinde anjiyogenez aktivatörü olan uPAR tutulumunun belirgin olarak gözlenmesi ve diğer bir anjiyogenez aktivatörü olan FGF-2



Şekil 6. (a) uPAR grup 2-1'de endotel hücreleri (siyah oklar), damar düz kas hücresi (beyaz oklar), fibroblast (*), küçük resim: Fibroblastlar (ince oklar), (uPAR immün boyama x 400). (b) uPAR grup 2-2'de fibroblastlar (oklar), küçük resim: Damar düz kas hücreleri (siyah ok), (uPAR immün boyama x 200).

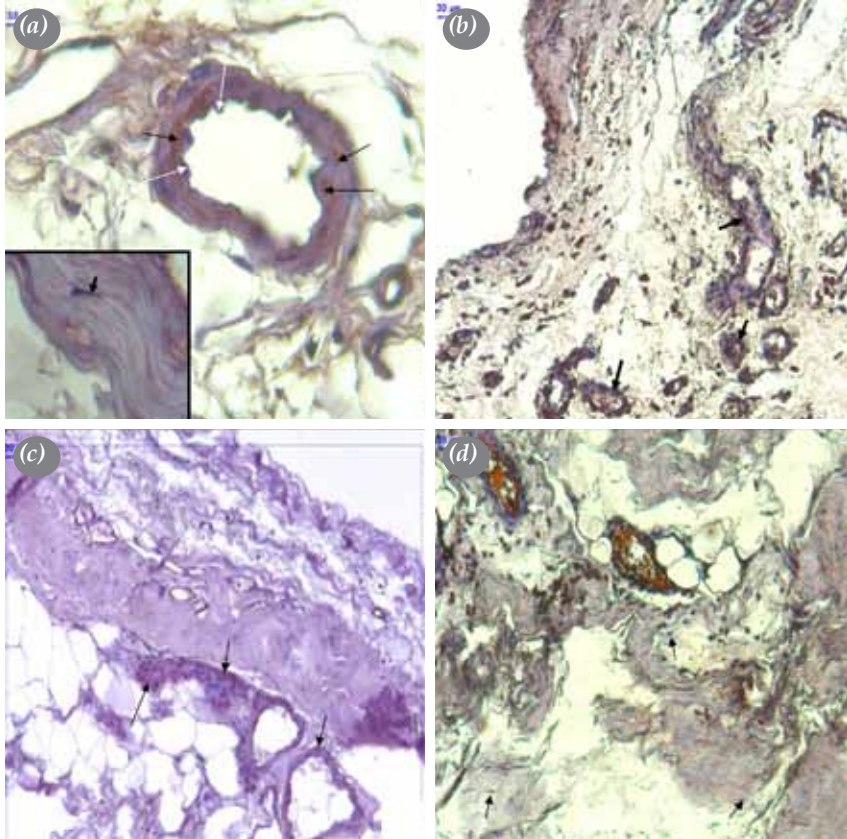
Tablo 2. uPAR ve FGF immün-reaksiyon sonuçları

	Endotel	Damar düz kas hücresi	Fibroblast	Kan hücreleri
uPAR grup 1-1	-	+	-	+
uPAR grup 1-2	+	++	+++	+++
uPAR grup 2-1	-	-	++	-
uPAR grup 2-2	-	+	-	-
FGF2 grup 1-1	-	+	-	++
FGF2 grup 1-2	++	+++	++	+++
FGF2 grup 2-1	-	++	++	+++
FGF2 grup 2-2	-	++	-	+++

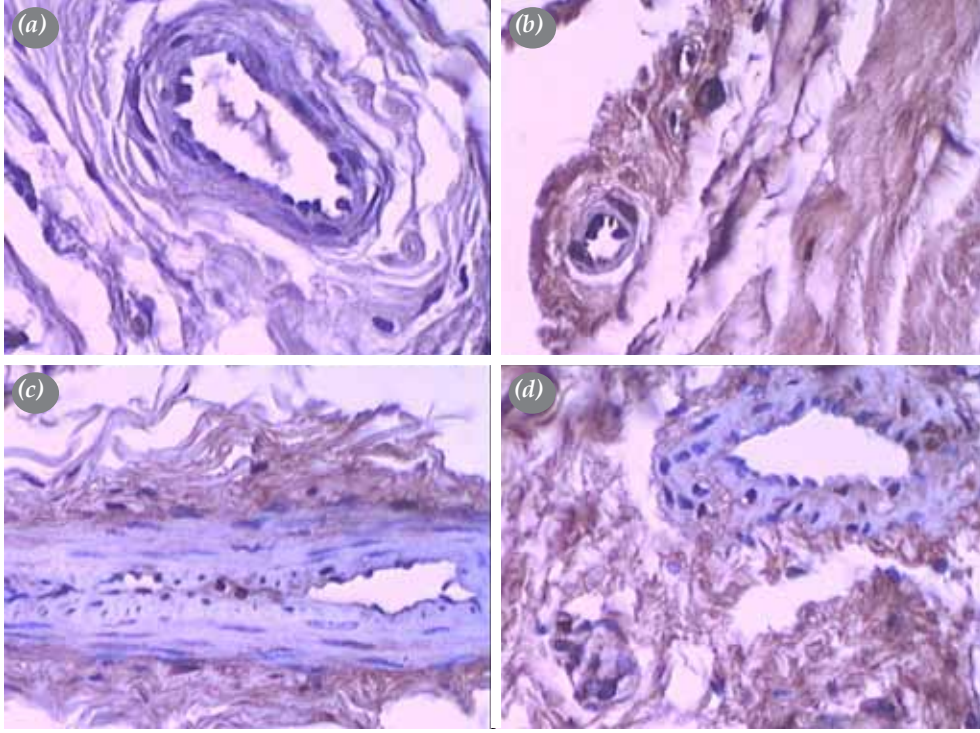
-: Negatif; +: Zayıf sitoplazmik tutulum; ++: Orta derecede sitoplazmik tutulum; +++: Kuvvetli derecede sitoplazmik tutulum; uPAR: Ürokinaz plazminojen aktivatörü reseptörü; FGF: Fibroblast büyüme faktörü.

tutulununun da uPAR bulgularına paralel seyretmesi anjiyogenezin tetiklendiği ancak morfolojik değişime henüz yansımadağı şeklinde yorumlandı. Son yıllarda yapılmış olan bazı çalışmalar ile perikardiyal mesotelial hücrelerin prostasiklin^[15] ve vasküler endotelial büyüme faktörü^[16] ürettiği ve bunların da kalp hücre-

lerinde mikrosirkülasyonun düzenlenmesinde potansiyel fizyolojik role sahip olduğu düşünölmektedir. Fibroblast büyüme faktörü ve plazminojen aktivatör reseptör düzeylerinin de çalışmamızın sonuçlarına göre kalp hücreleri üzerine benzer etkileri olduğunu düşünölmekteyiz. Henüz deneysel değerlendirmede,^[17]



Şekil 7. (a) Fibroblast büyüme faktörü grup 1-1'de, damar düz kas hücreleri (siyah oklar), endotel hücreleri (beyaz oklar), küçük resim: fibroblast (ok), (FGF immün boyama x 400). **(b)** Fibroblast büyüme faktörü grup 1-2'de, damar düz kas hücreleri (oklar), fibroblastlar (beyaz oklar), (FGF immün boyama x 200). **(c)** Fibroblast büyüme faktörü grup 2-1'de, damar düz kas hücreleri (siyah oklar), fibroblastlar (beyaz oklar), (FGF immün boyama x 200). **(d)** Fibroblast büyüme faktörü grup 2-2'de damar düz kas hücreleri (beyaz oklar), fibroblastlar (siyah oklar), (FGF immün boyama x 200).



Şekil 8. (a) TUNEL (a) Grup 1-1, (b) Grup 1-2, (c) Grup 2-1, (d) Grup 2-2. TUNEL x 400.

olan interferon-gama'nın mezotel hücrelerinde nitrik oksit, adezyon molekülleri ve kemokinler gibi moleküllerin üretimini düzenlediği bilinmektedir. Ayrıca bir diğer deneysel çalışmada^[18] bir analjezik ve anti-inflamatuvar ilaç olan piroksikamın ameliyat sonrası retrosternal ve perikardiyal yapışıklık oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir. İnterferon ve piroksikam gibi sistemik etkili bazı ilaçlar ile perikardın bu fizyolojik reaksiyonlarının düzenlenmesinin perikard yapışıklığı oluşumunu azaltmada uzun dönemde daha yararlı olacağına inanılmaktadır.

Ayrıca tunel işaretleme sonucu elde edilen bulgulara DNA kırıkları içeren tunel + fibroblast, damar düz kas hücresi ve endotel hücrelerinin az sayıda olması apoptotik hücre kaybının da oldukça az olduğunun göstergesi olarak düşünüldü. Bu durumda özellikle grup 1-2'nin biyopsilerinde belirgin olmak üzere fibroblastlarda, damar düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde mitotik aktivite başlatılmış olmaktadır. Elektronmikroskopik bulgularda ise bağ dokuda, grup 1-2 ve grup 2-2'nin biyopsilerinde fibroblastlarda endoplazmik retikulum sisternalarında belirgin kollajen sentezi aktivitesi gözlenmesi ekstraselüler matris ve kollajen sentezinin ve dolayısıyla bağ doku içeriğinin arttığını ultrastrüktürel olarak göstermektedir.

Sonuç olarak, endotel, damar düz kas hücreleri ve fibroblastlarda mitoz ve kollajen sentezi tetiklenirken,

önemli apoptotik artış olmadı. Bu bulgular kalp cerrahisi sırasında ilk kez kalp ameliyatı geçiren grupta diğer gruba göre belirgindi. Bu farkın perikardın cerrahiler sonrası normal fonksiyonunu kaybetmesine bağlı olduğu düşünüldü.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projelerince 2004/72 nolu proje olarak bilimsel araştırma desteği ile yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Yoshioka I, Saiki Y, Sakuma K, Iguchi A, Moriya T, Ikada Y, et al. Bioabsorbable gelatin sheets latticed with polyglycolic acid can eliminate pericardial adhesion. *Ann Thorac Surg* 2007;84:864-70.
2. Yau TM, Borger MA, Weisel RD, Ivanov J. The changing pattern of reoperative coronary surgery: trends in 1230 consecutive reoperations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 120:156-63.
3. Gabbay S. The need for intensive study of pericardial substitution after open heart surgery. *ASAIO Trans* 1990;36:789-91.
4. Loop FD. Catastrophic hemorrhage during sternal reentry. *Ann Thorac Surg* 1984;37:271-2.

5. Nkere UU, Whawell SA, Sarraf CE, Schofield JB, Thompson JN, Taylor KM. Perioperative histologic and ultrastructural changes in the pericardium and adhesions. *Ann Thorac Surg* 1994;58:437-44.
6. Angelini GD, Fraser AG, Koning MM, Smyllie JH, Hop WC, Sutherland GR, et al. Adverse hemodynamic effects and echocardiographic consequences of pericardial closure soon after sternotomy and pericardiectomy. *Circulation* 1990;82:IV397-406.
7. Zapolanski A, Fishman NH, Bronstein MN, Ellertson DG, O'Connell TJ, Siegel S. Modified pericardial closure to protect cardiovascular structures during sternal reentry. *Ann Thorac Surg* 1990;50:665-6.
8. Milgalter E, Uretzky G, Siberman S, Appelbaum Y, Shimon DV, Kopolovic J, et al. Pericardial meshing: an effective method for prevention of pericardial adhesions and epicardial reaction after cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985;90:281-6.
9. Gabbay S, Guindy AM, Andrews JF, Amato JJ, Seaver P, Khan MY. New outlook on pericardial substitution after open heart operations. *Ann Thorac Surg* 1989;48:803-12.
10. Sakuma K, Iguchi A, Ikada Y, Tabayashi K. Closure of the pericardium using synthetic bioabsorbable polymers. *Ann Thorac Surg* 2005;80:1835-40.
11. Reikerås O, Nordstrand K, Sørli D. Use of dextran to prevent pericardial adhesions caused by maize starch powder. *Eur Surg Res* 1987;19:62-4.
12. Nkere UU, Whawell SA, Thompson EM, Thompson JN, Taylor KM. Changes in pericardial morphology and fibrinolytic activity during cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:339-45.
13. Tsukahara H, Takamoto S, Kitahori K, Matsuda K, Murakami A, Novick RJ, et al. Prevention of postoperative pericardial adhesions with a novel regenerative collagen sheet. *Ann Thorac Surg* 2006;81:650-7.
14. Mitchell JD, Lee R, Hodakowski GT, Neya K, Harringer W, Valeri CR, et al. Prevention of postoperative pericardial adhesions with a hyaluronic acid coating solution. Experimental safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:1481-8.
15. Dusting GJ. The basis for developing an anti-anginal agent which has actions on prostanoid mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1983;4:81-4.
16. Hatakeyama M, Imaizumi T, Sakaki H, Yoshida H, Tanaka H, Kimura H, et al. Interleukin-1 induces the expression of vascular endothelial growth factor in human pericardial mesothelial cells. *Heart Vessels* 2007;22:123-7.
17. Hatakeyama M, Imaizumi T, Terasaki F, Mori F, Tanji K, Sato F, et al. Interferon-gamma upregulates retinoic acid-inducible gene-1 in human pericardial mesothelial cells. *Acta Cardiol* 2007;62:553-7.
18. Iskesen I, Aksoy O, Cerrahoglu M, Sirin H. The effect of piroxicam on the prevention of postoperative retrosternal and pericardial adhesions. *Acta Cardiol* 2007;62:559-64.