

Koroner Arter Baypas Grefti İçin Farklı Yöntemler Kullanılarak Alınan Safen Veninin Apoptotik İndekslerinin Karşılaştırılması*

Ünal USLU ¹, Süheyla GONCA ², Alev CUMBUL ³, Onur ŞEN ⁴

ÖZ

Amaç: Koroner arter grefti olarak kullanılan safen venin hazırlanmasında farklı cerrahi toplama teknikleri kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı koroner arter baypas greftlemesi (KABG) için kullanılan safen ven hazırlama işlemlerinden geleneksel yöntem ile “no-touch” tekniği arasında apoptotik indeks açısından farklılığı araştırmaktır.

Gereç ve Yöntemler: KABG uygulanan 40 hastada geleneksel ve “no-touch” cerrahi yöntemleri kullanılarak toplanan safen venlerde apoptoz bakılarak prospektif, randomize bir klinik çalışma yapıldı. Toplanan safen ven parçaları paraformaldehitte bekletilerek tespit edildi. Kriyo cihazı ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Örnekler modifiye TUNEL yöntemi ile işaretlenerek apoptotik hücre ölümleri gösterildi. Doku kesitlerindeki TUNEL (+) ve (-) hücreler Stereo Investigator version 7.5 görüntü işleme yazılımı kullanılarak tarafsız ve eşit 100 çerçeveye optik olarak bölünmüş alanlarda sayıldı. Apoptotik indeks; Hücre / Toplam Hücre oranı kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar bağımsız gruplarda t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Geleneksel yöntem ile “no-touch” tekniği apoptotik indeksleri karşılaştırıldı. Geleneksel tekniğin uygulandığı grubunun apoptotik indeksi “no-touch” tekniği uygulanan diğer gruba göre anlamlı oranda yüksek bulundu. Mekanik ve yapısal koruma venin etrafını kuşatan yastıkçıklar tarafından sağlanmaktadır. Bu yastıkçıklarda apoptotik hücre ölümünün daha az görülmesi safen vendeki doku hasarının daha az olduğunu gösterir.

Sonuç: Safen ven grefti hazırlanmasında geleneksel yöntem yerine ‘no-touch’ cerrahi tekniğinin tercih edilmesi ile doku hasarı ve vazospazm oluşumunun azalabileceği ve baypas sonrası greftin açık kalma olasılığının artabileceği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Safen ven; koroner damar baypas; apoptoz.

Apoptotic Index of the Saphenous Vein Using Different Harvesting Methods for a Coronary Artery Bypass Graft

ABSTRACT

Aim: Different surgical harvesting techniques are applied to prepare the saphenous vein which is used as a coronary artery graft. The aim of this study is to investigate two different surgical techniques, the conventional and no-touch, which are used in coronary artery bypass grafting (CABG), in the preparation for saphenous vein by comparing the apoptotic index results.

Material and Methods: A prospective, randomized clinical study comparing 2 different saphenous vein harvesting techniques, the conventional and no-touch methods, was performed with 40 patients who underwent CABG. Small pieces of the SV tissues were fixed for paraformaldehyde. Up to 5 - µm - thick cryosections were obtained with a cryostat. Samples have labeled with modified TUNEL method and apoptotic cell deaths were shown. TUNEL (+) and (-) cells were determined in tissue sections and counted in unbiased and equal 100 frames optically divided areas by using the Stereo Investigator version 7.5 image analysis software. The apoptotic index was calculated as the ratio of apoptotic cells/total cells. Findings were statistically analyzed by using the independent sample t test.

Results: The apoptotic index of the conventional method and the no-touch surgical technique were compared. The conventional technique apoptotic index results were significantly higher than that no-touch technique group. Mechanical and structural protection is provided by the cushions surrounding the vein. Less apoptotic cell death in

1 İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, İstanbul, Türkiye

2 Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, Kocaeli, Türkiye

3 Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD, İstanbul, Türkiye

4 Mehmet Akif Ersoy Göğüs ve Kalp Damar Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye

* Bu çalışma 25-30 Ağustos 2013 tarihleri arasında Regensburg’da düzenlenen Microscopy Congress 2013’te poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ünal USLU, e-mail: unal.uslu@medeniyet.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 21.12.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 06.01.2020

these cushions means less tissue damage in the saphenous vein. The fact that the cushions which provide venous, mechanical and structural support are more stable shows that apoptotic cell death in the 'no-touch' technique group is less than the other groups.

Conclusion: It was concluded that, in saphenous vein graft preparation, preferring the "no-touch" surgical technique instead of conventional method could decrease tissue injury and vasospasm and the possibility of the graft to remain open after bypass could increase.

Keywords: Saphenous vein; coronary artery bypass; apoptosis.

GİRİŞ

Aterosklerotik koroner arter hastalığı, gelişmiş ülkelerde en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Dünyada her yıl bir milyondan fazla insan koroner kalp hastalığına bağlı olarak ölmektedir (1). Heparinin bulunması, ekstrakorporal dolaşım sistemlerinin kullanımı, farmakoloji ve anesteziye ek olarak teknolojik gelişmelerin tıptaki etkileri sayesinde kalp cerrahisinde önemli ilerleme kaydedilmiştir. Favalora'nın 1967'de ilk kez koroner baypas yapmak için safen ven (SV) grefti kullanmasının ardından, bu yöntemle koroner arter ameliyatları geniş çapta yapılmaya başladı. Koroner baypas cerrahi prosedüründe elde edilen başarı greft açıklığı ile doğru orantılıdır. Koroner arter baypas ameliyatını takip eden beşinci yılda greftlerin %25'inde, onuncu yılda ise greftlerin %35'inde tıkanma görülmektedir (2). SV greftlerinde görülen bu tıkanma pek çok farklı sebepten kaynaklanabilir. Örneğin SV greftin hazırlık sürecinde uygulanan yüksek basınç veya postoperatif dönemde greftin iltihaplanması endotelin ve düz kas hücrelerinin zarar görmesi sonucunu doğurur (3). Trombüs oluşumu erken dönemde gerçekleştiğinde veya geç dönemde lipid birikimi oluştuğunda endotel tabakasında hasar tespit edilmiştir (4,5). Koroner baypas ameliyatından sonraki erken dönemde görülen komplikasyonlarda vazokonstriksiyon, vazospazm, hiperlipidemi, yanlış greft hazırlanması ve anastomoz teknikleri gibi predispozan faktörlerle cerrahi tekniklerin yakından ilişkili olduğu görülmüştür (6).

Apoptoz, SV greftinin patofizyolojisinde tanımlanmış bir mekanizmadır. Apoptoz hasarlı damarın intima ve kas tabakalarında görülen iskemi veya inflamasyona bağlı fibröz değişikliklerden kaynaklanır (7). Safenöz greftinin kullanımı sırasında basınca bağlı gerilmeler ve apoptozis endotel fonksiyonları üzerinde klinik sonuçlara yol açabilir (8).

Yapılan bu çalışmada, intimal ve medial tabakalarda mekanik bir travmadan kaynaklı oluşmuş olabilecek hücresel seviyede gerçekleşmiş apoptozisi analiz etmeyi amaçladık. İnceleme esnasında KABG için geleneksel cerrahi teknikle hazırlanmış olan SV greftler ile dokunmadan yapılan "no-touch" tekniği ile hazırlanan doku örnekleri karşılaştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmanın etik yönü

Bu çalışma için İstanbul 4. Klinik Araştırmalar etik kuruldan 70 protokol numarasıyla onay alınmıştır. Takip edilmiş olan tüm süreçler, insan deneyleri konusunda sorumlu komitenin etik standartlarına (kurumsal ve

ulusal) ve 1964 tarihli Helsinki Deklarasyonu ve sonraki uygulanan değişikliklerine uygun olacak şekilde gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan bilgilendirilmiş yazılı onam alınmıştır.

Cerrahi işlemler

Çalışmaya Kalp ve Damar Cerrahi kliniğinde Ocak 2010-Mayıs 2010 tarihleri arasında aorto-koroner baypas ameliyatı uygulanacak ve greft olarak safen ven kullanılması planlanan hastalar dahil edildi. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun %40'dan fazla olması, periferik damar hastalığının, kronik böbrek yetmezliğinin olmaması, yakın zamanda kortikosteroid ve venoprotektif ilaç kullanmamış olması araştırmaya dahil edilme kriterleri olarak belirlendi. Bu kriterlere uygun 40-70 yaş aralığında toplam 40 hasta (grup başına n = 20) seçildi. Greft olarak hazırlanmak üzere safen venlerin proksimal bölümlerinden alınan yaklaşık 4 cm uzunluğundaki örnekler toplandı.

Geleneksel yöntemle 20 hastanın safen venleri, damar izi boyunca ciltte bir kesi açılarak açığa çıkarılıp kanüle edildi. SV ve alt dalları travmatize edilmeden dikkatlice diseke edildi. Damar çevre dokulardan ayrıldıktan sonra, alt dallar kliplenerek, 100 mm Hg'lık bir maksimum gerilme basıncında şişirildi. Yaklaşık 4 cm uzunluğunda bir parça proksimal bölgeden travmatize edilmeden alındı.

Aynı cerrah tarafından 20 hastada no-touch tekniği kullanılarak safen venleri çıkarıldı. Damar yolu boyunca ciltte bir kesi yapılarak SV ortaya kondu. SV'nin etrafındaki dokularla birlikte, damara gerilme basıncı uygulanmadan alt dallar kliplendi. Yaklaşık 4 cm uzunluğundaki greft parçası proksimal bölgeden travmatize edilmeden alındı.

İmmünohistokimyasal işlem ve apoptozun miktarını belirleme

SV parçalarının kullanılmayan küçük kısımları 24 saat süreyle 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,4) içinde %4 paraformaldehit ile fikse edildi. Kriyostat aracılığı ile (THERMO Shandon Cryotome E Kriyostat, San Francisco, CA, ABD) 5 µm kalınlığında kesitler alındı. TUNEL kiti (Roche Applied Science; Basel, İsviçre) üreticinin talimatlarına uygun olarak (9,10) kesitlere uygulandı. Kesitler %0,1'lik (v/v) Triton X- 100 (Acros Organics; Geel, Belçika) ile %0,1 (w/v) sodyum sitrat (Merck; Darmstadt, Almanya) karışımı içinde permiabilizasyon işlemine tabi tutuldu. 2,45 GHz frekansta ve maksimum 900 W'lık bir güçte çalışan Bosch HMT 812 C marka mikrodalga fırın ile 700 watt güçte antijen kurtarma işlemi yapıldı. Örnekler 200 ml 0,01 M sitrat tamponu (pH 6) içeren plastik petri kaplarına yerleştirilerek 45 saniye boyunca mikrodalga radyasyonuna maruz bırakıldı. Oda sıcaklığından 86° C'ye yükseltilecek örnekleri hızla soğutmak amacıyla önce oda sıcaklığında 80 ml distile su petri kabına eklendi daha sonra lamlar oda sıcaklığında PBS ile yıkandı. Arka plan boyanmasını en aza indirmek amacıyla örnekler double distile su içinde hazırlanmış %2 BSA, %10 normal keçi serumu (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Almanya) ve %0,03 Triton X-100 karışımında oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletildi. TUNEL reaksiyon karışımı (Roche Diagnostics; Mannheim, Almanya), hazırlanarak 37° C'de 60 dakika nemlendirilmiş odada inkübe edildi. Renk reaksiyonu için %0,05 3-3'- diaminobenzidin

tetrahidroklorür kromojen konsantresi ve diaminobenzidin substrat tamponu (Scy Tek Laboratories, Inc.; West Logan, UT, ABD) karışımı kullanıldı. Mayer hematoksilen ile çekirdek boyaması yapıldı.

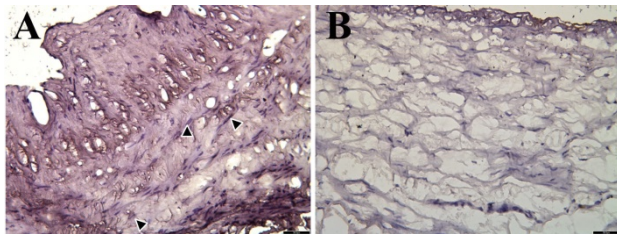
Kesitler Leica DM4000B (Wetzlar, Almanya) araştırma mikroskopunda değerlendirildi. Bu araştırma mikroskobu örnekleme yapabilmek için motorize örnek tablası (Ludl XYZ Bioprecision; Hawthorne, NY, ABD), ve CCD dijital kamera (Optronics Microfire 1600 x 1200 P; Goleta, CA, ABD) ile donatılmıştı. StereoInvestigator 7.5 görüntü analiz yazılımı (MicroBrightField; Williston, VT) entegre edilmiş bilgisayar yardımıyla sayım yapıldı. Her kesitte optik parçalama kullanılarak rastgele ve tarafsız 100 çerçeve sayıldı. TUNEL ile işaretlenmiş apoptotik hücreler ile tüm hücreler sayılarak oranlandı ve apoptotik indeks elde edildi.

İstatistiksel Analiz

Verilere ait tanımlayıcı değerler, Ortalama \pm Standart Sapma olarak hesaplandı. Apoptotik indeks ölçümlerinin normal dağılıma uyumu Kolmogorov-Smirnov testi ile iki grubun varyanslarının homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. İlgili test sonuçlarında apoptotik indeks ölçümlerinin normal dağılım gösterdiği ve karşılaştırılacak grupların varyanslarının homojen olduğu belirlendi. Bu sonuca göre geleneksel cerrahi teknik grubu ile no-touch grubunun apoptotik indeks ölçümleri, bağımsız iki örneklem t-testi kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistik anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ kabul edildi. İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS (ver. 16.0, SPSS, Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Safen venin intima ve media tabakalarında TUNEL pozitif boyanmış hücreler gözlemlendi (Şekil 1). Geleneksel cerrahi teknik grubundan alınan doku örneklerindeki apoptotik indeks değerleri, ortalaması ($0,367 \pm 0,12$), no-touch grubuna göre ($0,078 \pm 0,054$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu ($P < 0,001$) (Şekil 2).

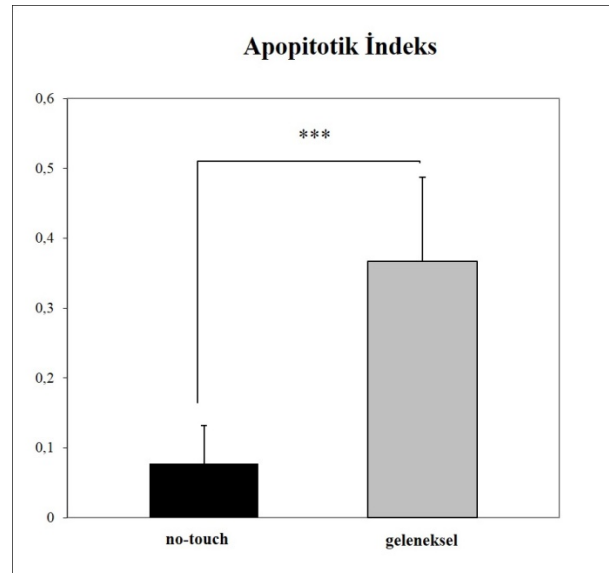


Şekil 1. TUNEL yöntemi ile işaretlenmiş apoptotik hücrelerin safen vende gösterimi. A. Geleneksel Yöntem; B. "No-touch" Yöntemi. Safen ven medya tabakasında ok başı ile apoptotik hücreler gösterildi. Bar: 50 μ m

TARTIŞMA

Safen ven dünyada koroner baypas ameliyatı esnasında en sık kullanılan grefttir. Araştırmalarda ven greftlerinin kasılma ve düz kas hücrelerinin çoğalması dahil olmak üzere histopatolojik değişikliklere maruz kaldığı bildirilmiştir (11). Ayrıca, damar duvarı iskemisi, vaza vazorumun kaybindan kaynaklanabilmektedir. Ek olarak, damar duvarının gerginliği ve basıncındaki değişiklikler bu süreçte önemli rol oynar (12). SV beslenmesi vaza

vazorum aracılığı ile sağlanır ve bunlar çevre bağ doku ile yakın ilişki halindedir. Bu nedenle SV etrafındaki bağ dokuları tamamen temizlemek damarın perfüzyonuna zarar verir. Sonuç olarak, SV greftini çevreleyen bağ dokunun mümkün olduğunca korunması tercih edilir (13). Üstelik vazospazmlar genellikle greftin hazırlanması sırasında veya nadiren postoperatif dönemde meydana gelmektedir (14). Çalışmalar, greftin hazırlanması sırasında dokunun farmakolojik çözeltilerde bekletilmesiyle ve bu çözeltilerle damarın belirli bir basınçta şişirilmesiyle çeşitli yapısal değişikliklerin ve sonucunda vasospazmların önüne geçilebileceğini göstermiştir (15). Spazmların ana nedenlerinden biri, SV greft çevresinin manipülasyonu olduğu için geliştirilen "no-touch" tekniğinin asıl amacı, hasat sırasında SV greftinin çevresine dokunmaktan kaçınmaktır. Koroner baypas cerrahisinde, SV greftinin hazırlanması sırasında spazmları önlemek için yapılan işlemlerde aşırı basınç uygulanabilmektedir. Bu da damar duvarında dejeneratif değişikliklere ve endotel hasarına neden olur.



Şekil 2. Safen ven apoptotik indeksi. Veriler Ortalama \pm Standart Sapma (n = 20) olarak gösterildi. No-touch yöntem (no-touch) safen vende apoptozu geleneksel yöntem (geleneksel) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede önledi (***) $P < 0,001$.

Apoptozis, hücrelerin, dokuların ve organizmaların doğal gelişiminde önemli bir mekanizmadır ve yaşamda homeostazın devam etmesi için gereklidir. Ayrıca, apoptoz patolojik süreçleri sınırlamada rol oynamaktadır (16). Gerçekten de apoptoz birçok vasküler hastalıkta önemli bir rol oynar. Ayrıca, apoptotik süreç, membran peroksidasyonunu tetikleyen serbest oksijen radikallerini üretir (17). Hücre dışı ara madde Bcl-2 ailesinin proteinlerini içeren bir anti-apoptotik yolağı düzenleyen hayatta kalma sinyalleri de üretebilir. Antiapoptotik protein Bcl-2 mitokondride bulunur ve apoptotik sinyalleri bloke eder (18). Bcl-2 ailesinin proteinleri, hem baskılayıcılarını (Bcl-2, Bcl-xL) hem de apoptozun indükleyicilerini (Bcl-xS, Bax, Bid, Bad, Bak) içerir. Apoptozu giden hücre de Bcl-2 aile üyelerinin

proapoptotik ve antiapoptotik yollar üzerinden dengeyi sağlayıcı önemli rolleri vardır (19, 20).

Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, iskemi / reperfüzyonun, in vivo olarak iskemik miyokardın apoptozisine neden olduğunu ortaya koymuştur (21). Yine de apoptozisin iskemi sırasında mı yoksa reperfüzyon sırasında mı tetiklendiği hala tartışmalıdır (22). Bir greftin hazırlanması sırasında endotel hücre hasarı ve apoptozis erken ve geç greft yetmezliğinin önemli nedenlerindendir. Endoteliumun kaybı, akut fakat geri dönüşlü geçici bir iltihabi hücre reaksiyonu ile birlikte intima ve medyada ödemlere neden olabilir. Fibrin ve trombüs intimal yüzeyde birikir. KABG cerrahi prosedürünü takip eden dört ila altı hafta arasında, düz kas hücrelerinin, fibroblastların ve endotel hücrelerinin proliferasyonu intima kalınlaşmasına neden olur. Endotel hasarı, trombosit ve fibrin birikimi olan bir trombüsü tetikler. Aynı zamanda, trombositlerden salınan büyüme faktörleri, düz kas hücre proliferasyonuna ve lümen çapı darlığına neden olur. Bu devam eden süreç, greft ven duvarında lipit birikmesine ve uzun vadede ateroskleroza sebebiyet verir (15,23). Bu patolojik değişiklikler, arteriyel basıncın artmasıyla ortaya çıkabilir. Souza ve ark. safen venin greft olarak kullanılmak üzere geliştirilen klasik, ara (çevre dokulardan kazıma ve şişirme olmadan kanüle etme) ve “no-touch yöntemlerini (damarın periferik destekleyici dokularla birlikte çıkarılması) karşılaştıran bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, safen venine dokunmadan, çevre destek dokularıyla birlikte çıkarılmasıyla gerçekleştirilen “no-touch” tekniğinin endotel bütünlüğünü sağlayarak greft endotelinin en iyi koruyan yöntem olduğunu öne sürdüler (24).

Sonuç olarak, diğer hücre tiplerinde de olduğu gibi, vasküler hücrelerin yerel ortamları ile etkileşimleri, bu hücrelerin hayatta kalması için gerekli olabilir. Bu çalışmanın amacı, geleneksel yöntem ve no-touch yöntem ile yapılan SV hasat tekniğinin etkilerini değerlendirmektir. Vasküler endotel ve düz kas hücrelerinin sağkalım / apoptozis oranını karşılaştırdık; iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde ettik. Endotel hücrelerinin ve SV'nin damar tabakalarının bütünlüğü; geleneksel metodun kullanılması yerine No-touch tekniğinin uygulanarak kendi doğal vasküler yatağından çıkarıldığında SV'nin daha iyi korunduğu gözlemlenmiştir.

Yazarların Katkıları: Fikir/Kavram: O.Ş., S.G., Ü.U.; Tasarım: S.G., Ü.U., O.Ş.; Veri Toplama ve/veya İşleme: A.C., Ü.U., S.G.; Analiz ve/veya Yorum: Ü.U., S.G., O.Ş.; Literatür Taraması: S.G., A.C., Ü.U.; Makale Yazımı: Ü.U., S.G., A.C.; Eleştirel İnceleme: Ü.U., S.G., O.Ş.

KAYNAKLAR

1. Raja SG, Haider Z, Ahmad M, Zaman H. Saphenous vein grafts: to use or not to use? *Heart Lung Circ.* 2004; 13(4): 403-9.
2. Fulton GJ, Davies MG, Hagen PO. Preservation of the endothelium in venous bypass grafts: relevance for graft patency. *Asia-Pacific Heart J.* 1997; 6(2): 98-106.

3. Cambria RP, Megerman J, Abbott WM. Endothelial preservation in reversed and in situ autogenous vein grafts. *Ann. Surg.* 1985; 202(1): 50-5.
4. Angelini GD, Bryan AJ, Williams HM, Morgan R, Newby AC. Distention promotes platelet and leukocyte adhesion and reduces short-term patency in pig arteriovenous bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999; 99(3): 433-9.
5. Boerboom LE, Bonchek LI, Kissebah AH, Werner PH, Pepper JR, Olinger GN, et al. Effect of surgical trauma on tissue lipids in primate vein grafts: relation to plasma lipids. *Circulation.* 1980; 62(2 Pt 2): I142-7.
6. Thatté HS, Khuri SF. The coronary artery bypass conduit: I. Intraoperative endothelial injury and its implication on graft patency. *Ann Thorac Surg.* 2001; 72(6): 2245-52.
7. Kockx MM, Cambier BA, Bortier HE, De Meyer GR, Declercq SC, van Cauwelaert PA, et al. Foam cell replication and smooth muscle cell apoptosis in human saphenous vein grafts. *Histopathology.* 1994; 25(4): 365-71.
8. Urbanek T, Skop B, Wiaderkiewicz R, Wilczok T, Ziaja K, Lebda-Wyborny T, et al. Smooth muscle cell apoptosis in primary varicose veins. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 28(6): 600-11.
9. Lucassen PJ, Chung WCJ, Vermeulen JP, van Lookeren Campagne M, van Dierendonck AJH, Swaab DF. Microwave-enhanced in situ end-labeling of fragmented DNA: parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain. *J Histochem Cytochem.* 1995; 43(11): 1163-71.
10. Yildirim A, Ersoy Y, Ercan F, Atukeren P, Gumustas K, Uslu U, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther.* 2010; 23(3): 215-21.
11. Kockx MM, Cambier BA, Bortier HE, De Meyer GR, Van Cauwelaert PA. The modulation of smooth muscle cell phenotype is an early event in human aorta-coronary saphenous vein grafts. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992; 420(2): 155-62.
12. Karayannacos PE, Rittgers E, Kakos GS, Williams TE Jr, Meckstroth CV, Vasko JS. Potential role of velocity and wall tension in vein graft failure. *J Cardiovasc Surg.* 1980; 21(2): 171-8.
13. Rueda F, Souza D, Lima Rde C, Menezes A, Johansson B, Dashwood B, et al. Novel no-touch technique of harvesting the saphenous vein for coronary artery bypass grafting. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 90(6): 356-62.
14. Ramos JR, Berger K, Mansfield PB, Sauvage LR. Histologic fate and endothelial changes of distended and nondistended vein grafts. *Ann Surg.* 1976; 183(3): 205-28.
15. He GW, Rosenfeldt FL, Angus JA. Pharmacological relaxation of the saphenous vein during harvesting for coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 1993; 55(5):1210-7.
16. Dündar S, Özcura F, Meteçoğlu İ, Kara ME. Effects of long-term passive smoking on the vascular endothelial growth factor and apoptosis marker expression in the retina and choroid: an experimental study. *Turk J Med Sci.* 2012; 42(3): 377-83.

17. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281(5381): 1305-8.
18. Polat A, Kayaselçuk F, Eğılmez R, Tuncer İ. Expression of Fas Antigen and Bcl-2 Protein in Liver Tissues of Patients with Chronic Hepatitis B. *Turk J Med Sci*. 2001; 31(6): 517-21.
19. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, et al. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*. 1998; 143(1): 207-15.
20. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*. 1999; 144(5): 903-14.
21. Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL. Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase and apoptosis. *J Clin Invest*. 1996; 97(10): 2391-8.
22. Kiliçkan L, Gonca S, Dalçık C, Dalçık H, Solak M, Bayindir O, et al. General anesthesia with thoracic epidural anesthesia in the cardiopulmonary bypass surgery reduces apoptosis by upregulating antiapoptotic protein Bcl-2. *J Cardiovasc Surg*. 2006; 47(3): 315-22.
23. Golledge J. Vein grafts: haemodynamic forces on the endothelium a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997; 14(4): 333-43.
24. Souza DS, Christofferson RH, Bomfim V, Filbey D. "No-touch" technique using saphenous vein harvested with its surrounding tissue for coronary artery bypass grafting maintains an intact endothelium. *Scand Cardiovasc J*. 1999; 33(6): 323-9.