

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI

SODIUM LAURATE İLE OLUŞTURULMUŞ
TROMBOANJİTİS OBLİTERANS (TAO) MODELİNDE
LEVOSİMENDAN UYGULAMASININ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Melike ERTAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilgün BOZBUĞA

İSTANBUL, Haziran 2021

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI

SODIUM LAURATE İLE OLUŞTURULMUŞ
TROMBOANJİTİS OBLİTERANS (TAO) MODELİNDE
LEVOSİMENDAN UYGULAMASININ ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Melike ERTAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nilgün BOZBUĞA

İSTANBUL, Haziran 2021

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. BAP Proje ID: 37603

I. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmem ve kendimi geliştirmem için bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. İbrahim Ufuk Alpagut, Prof. Dr. Türkan Tansel, Prof. Dr. Emin Tireli, Prof. Dr. İhsan Bakır, Prof. Dr. Onur Selçuk Göksel, Prof. Dr. Murat Başaran, Doç. Dr. Ömer Ali Sayın'a,

Tez çalışmamın tüm sürecinde büyük desteği ve emeği olan, bilimsel çalışmalarda beni hep destekleyen, cerrahi ve klinik tecrübelerini benden esirgemeyen tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Nilgün Bozbuğa'ya

Tez çalışmamın her aşamasında desteklerini esirgemeyen Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndan Doç. Dr. Canan Küçkgergin'e

Tezimin patoloji çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Patoloji Ana Bilim Dalı'ndan Prof. Dr. Vakur Olgaç'a

Kliniğimizde yıllardır beraber çalıştığımız tüm asistan arkadaşlarıma, hemşire arkadaşlarıma, kliniğimiz ve hastanemiz personeline teşekkür ederim.

Sonsuz sevgisi ve yaşam enerjisi ile bana her zaman ilham olan canım annem Zühal Ertan'a, desteğini hep yanımda hissettiğim canım babam Cemal Ertan'a, sevgili kardeşlerim Pelin Ertan ve Mert Ertan'a bu günlere gelmemdeki tüm emek, sabır ve anlayışları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Melike Ertan-2021

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	I
II. İÇİNDEKİLER.....	II
III. TABLOLAR LİSTESİ.....	III
IV. RESİMLER LİSTESİ.....	IV
V. SEMBOLLER / KISALTMALAR.....	V
VI. ÖZET.....	1
VII. ABSTRACT.....	5
1- GİRİŞ.....	7
2- GENEL BİLGİLER.....	10
3- GEREÇ ve YÖNTEM.....	47
4- BULGULAR.....	59
5- TARTIŞMA ve SONUÇ.....	65
6- KAYNAKLAR.....	71
7- EKLER.....	81
8- ÖZGEÇMİŞ.....	83

III. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Vasküler Hastalıkların Sınıflandırılması. * Enflamatuvar, arteriyel displaziler, konjenital, travmatik, infeksiyon

Tablo 2: Papa ve Ader tanı kriterleri

Tablo 3: : TAO oluşturulan sıçanlarda Levosimendan uygulamasının serumda RAGE (receptor for advanced glycationend prouducts), Endotelin-1, Tromboksan B2, 6K-PGF1-alfa, HMGB1 (high mobility group box protein 1) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)



IV. RESİMLER LİSTESİ

Şekil 1: Vasküler Endotel Fonksiyonları

Şekil 2: Tromboksan ve Prostaglandin Sentezi

Şekil 3: Eikozanoid Metabolizması

Şekil 4: Anestezi verilen sıçanlar

Şekil 5: Sıçanların sağ femoral arterlerinin bulunması

Şekil 6: Sıçanların femoral arterlerinin kanülasyonu ve Sodium Laurate enjeksiyonu

Şekil 7: TAO grubu; Postop 30. dakika, 1.gün ve 3. Gün

Şekil 8: Otoamputasyon görülen ekstremiteler

Şekil 9: Sıçanların femoral arterlerinin çıkarılması

Şekil 10: TAO oluşturulan sıçanlarda Levosimendan uygulamasının serumda RAGE (receptor for advanced glycation end products), Endotelin-1, Tromboksan B2, 6K-PGF1-alfa, HMGB1 (high mobility group box protein 1) düzeyleri üzerine etkisi

V. SEMBOLLER / KISALTMALAR

TAO: Tromboanjitis Obliterans

MMP-3: Matriks Metalloproteinaz-3 (*Matrix Metalloproteinase-3*)

MMP-9: Matriks Metalloproteinaz-9 (*Matrix Metalloproteinase-3*)

ICAM-1: İntrasellüler Adezyon Molekülü (*Intracellular Adhesion Molecule-1*)

VCAM-1: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)

HGMB-1: Yüksek mobilite grup kutusu 1

TXA2: Tromboksan A2 (*Tromboxane A2*)

TXB2: Tromboksan B2 (*Tromboxane B2*)

ET1: Endotelin 1

6K-PGF1-alfa: 6-ketoprostoglandin F1-alfa

RAGE: İleri glikasyon son ürün reseptörü (*Receptor for Advanced Glycationend Proudacts*)

HMGB1: Yüksek Hareketli Grup *Box* 1 Proteini (*High Mobility Group Box Protein 1*)

AECA: Antiendotelial Hücre Antikorları (*Antiendothelial Cell Antibodies*)

SFI: Shenfu İnjesiyonu

İl-6: İnterlökin-6

PGI2: Prostatiklin

ACE: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (*Angiotensin Converting Enzyme*)

ARB: Anjiyotensin Reseptör Blokeri (*Angiotensin Receptor Blockers*)

NO: Nitrik Oksit

eNOS: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz

EDHF: Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*)

EDRF: Endotel Kaynaklı Relaksan Faktör (*Endothelium-Derived Relaxing Factors*)

TFPI: Doku Faktörü Yolu İnhibitörü (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*)

WPB: Weibel-Palade Cisimcikleri (*Weibel-Palade Bodies*)

VWF: von Willebrand Faktörü

NOS 3: Nitrik Oksit Sentaz 3

PIP2: Fosfatidil İnozitol 4,5 Bifosfat

PLC: Fosfolipaz C

IP3: İnozitol 1,4,5 Trifosfat

DAG: 1,2 –Diaçilgliserol

CGMP: Siklik Guanozin Monofosfat

PKC: Protein Kinaz C

ADP: Adenozin Difosfat

NF-KB: Nükleer Faktör Kappa B

MCP-1: Monosit Kemoatraktan Protein-1

5-HT: Serotonin

LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein (*Low Density Lipoprotein*)

PGE1: Prostaglandin E1

COX: Siklooksijenaz (*Cyclooxygenase*)

NSAID: Nonsteroidal Antienflamatuvar İlaç (*Non-Steroid Antiinflatuar Drugs*)

CD40: Farklılaşma Kümesi 40 (*Differentiation Cluster 40*)

aCL: Antikardiyolipin (*Anticardiolipin*)

tPA: Doku Plazminojen Aktivatörü (*Tissue Plasminogen Activator*)

PAI: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü (*Plasminogen Activator Inhibitör 1*)

TOS: Torasik Çıkım Sendromu (*Thoracic Outlet Syndrome*)

TOS: Total Oksidatif Durum (*Total Oxidative Status*)

TAC: Total Antioksidan Kapasite (*Total Antioxidant Capacity*)

CoQ10: Koenzim Q10 (*Coenzyme Q10*)

MDA: Malondialdehit

TIMP 1: Doku Metalloproteinaz İnhibitörü 1 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1*)

APLA: Antifosfolipid Antikor (*Antiphospholipid Antibodies*)

VI. ÖZET

Ertan M. Sodium Laurate ile oluşturulmuş Tromboanjitis Obliterans (TAO) modelinde Levosimendan etkinliğinin araştırılması. İstanbul, 2021

Giriş: Winiwarter-Buerger Sendromu ya da Buerger Hastalığı olarak da bilinen Tromboanjitis Obliterans; orta ve küçük boyuttaki arter, ven ve yandaş sinirlerin segmenter, enflamatuvar tutulumu ile seyreden oluşum mekanizması halen net şekilde ortaya konulabilmiş olamayan, nonaterosklerotik bir hastalıktır. Patofizyolojisinde bütün kullanımı ile tetiklenebileceği öne sürülen immün süreç ile başlayan, arter ve venlerde akut inflamasyon ve trombus formasyonu patolojik bulgu olarak yer alır. Tedavisinde antienflamatuvar, antikoagülan ve bazı vazodilatörler kullanılmaktadır. Çalışmamızın amacı oluşturacağımız TAO modelinde enflamatuvar ve trombotik yolaklar üzerinden hastalığın şiddetine, aynı zamanda periferik bir vazodilatatör olan kalsiyum kanal duyarlaştırıcı Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan) etkisini biyokimyasal ve immünohistokimyasal veriler ile gözlemek olarak öngörülmüştür. Literatürde Levosimendan periferik vazodilatasyon mekanizması üzerinden TAO etkilerinin gözlemlendiği bir çalışma olmadığından, çalışmamızdan anlamlı sonuçlar elde ettiğimiz takdirde kardiyak olarak geniş kullanım alanlarına ulaşmış olan Levosimendan, Buerger hastaları için alternatif ve yeni bir tedavi olarak düşünülebilecektir.

Materyal Metot: Proje için ortalama ağırlıkları 280-320 g olan 24 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan rastgele 4 gruba ayrılmıştır. 1. grup kontrol grubu (cerrahi girişim yapılmış ancak işlem yapılmamış), 2. grup TAO grubu, 3. grup TAO+düşük doz Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan), 4. grup TAO+yüksek doz Levosimendan grubudur. Tüm sıçanların femoral arterleri cerrahi insizyon kullanılarak eksplore edilmiştir. Femoral arter proksimaline yerleştirilen arteriyel klemple femoral arterin kan akımı engellenmiştir. Ardından 1. gruba 0,1 cc salin enjeksiyonunda edilip kapatılmıştır. 2. , 3. ve 4. gruptaki tüm hayvanlara 10mg/cc de olacak şekilde dozu ayarlanmış olan Sodium Laurate-Salin solüsyonundan her birine 0,1 cc olacak şekilde enjeksiyon edilmiştir. Arteriyel klempler 15 dk bekletildikten sonra kaldırılmıştır. 3. gruptaki sıçanlara Sodium Laurate enjeksiyonunu takiben 2. saatte Levosimendan düşük doz (12 mcg/kg %0,5 dekstroz 10cc ile) ve 4. gruptaki sıçanlara Levosimendan yüksek doz (24 mcg/kg %0,5 dekstroz 10cc ile) intraperitoneal enjeksiyonunda edilmiştir. Sonraki 7 gün boyunca Levosimendan uygulaması (düşük doz Levosimendan grubu ve yüksek doz

Levosimandan grubu için) aynı doz ve uygulama şekli ile devam edilmiştir. 1 hafta boyunca yapılan günlük gözlemler ile TAO oluşumu tüm sıçanlar için sınıflandırılmıştır. 1 hafta sonra tüm hayvanlar sakrifiye edilmek üzere tekrar anestezi altına alınmıştır. Sıçanların femoral arter dokularından biyopsi ile yapılan immünohistokimyasal incelemelerle MMP-3 (*matrix metalloproteinase-3*), MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*), ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) bakılmıştır. Biyokimyasal olarak sıçanların plazmalarında RAGE (*receptor for advanced glycationend prouducts*), ET1 (endothelin 1), TXB2 (*tromboksan B2*), 6K-PGF1-alfa (6-ketoprostoglandin F1-alfa), HMGB1 (*high mobility group box protein 1*) düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçülmüştür.

Bulgular: TAO oluşturulan sıçanların serum örneğinde kontrol sıçanlara göre, RAGE %51; Endotelin-1 %58; Tromboksan B2 %57 oranında artış, buna karşılık 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı.

TAO+DD tedavi grubu serum örnekleri, kontrol grubundaki sıçanlar ile karşılaştırıldığında RAGE, Endotelin-1, Tromboksan B2, 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı. Oysa; TAO oluşturulan sıçanlara göre; RAGE %43; Endotelin-1 %80; Tromboksan B2 %57 oranında azalış, buna karşılık 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı.

TAO+YD tedavi grubunda, kontrol grubundaki sıçanlar ile karşılaştırıldığında Endotelin-1 düzeylerinde anlamlı bir artış görülürken, RAGE, Tromboksan B2, 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı. TAO oluşturulan sıçanlara göre; RAGE %57; Tromboksan B2 %67 oranında azalma, buna karşılık Endotelin 1, 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı.

Düşük doz tedavi grubunun biyokimyasal ve morfolojik olarak tedaviye yanıtının yüksek doz grubuna kıyasla daha iyi olduğunu, bununla beraber her iki tedavi grubunda da tedaviye yanıtın iyi olduğunu gözlemledik.

TAO oluşturulan grupta, gözlemlenen immünohistokimyasal incelemelerde femoral arter çeperinde enflamatuvar (yangılı) belirteçler olan MMP3, MMP9, ICAM ve VCAM tutulumunu gözlemledik.

Sonuç: Sonuç olarak; elde ettiğimiz biyokimyasal, immünohistokimyasal veriler ve gözlemlediğimiz morfolojik bulgular ile Levosimendanın TAO tedavisinde etkinliğinin olumlu olduğunu gözlemledik. Çalışmamızın; TAO'nun tedavisinde Levosimendan etkinliğinin araştırılması ve doz çalışmalarının yapılması için düzenlenecek olan farklı ve yeni çalışmalara olumlu veriler sağladığını düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: Buerger Hastalığı, Tromboanjitis Obliterans, Levosimendan, Periferik Vazodilatasyon, Tromboz, Periferik Damar Hastalığı



VII. ABSTRACT

Ertan M. Investigation of the effectiveness of Levosimendan in the Thromboangiitis Obliterans (TAO) model formed with Sodium Laurate. İstanbul 2021

Objective: Thromboangitis Obliterans, also known as Winiwarter-Buerger Syndrome or Buerger's Disease; It is a non-atherosclerotic disease with segmental, inflammatory involvement of medium and small sized arteries, veins and companion nerves, the formation mechanism of which has not been clearly revealed yet. In its pathophysiology, acute inflammation and thrombus formation in arteries and veins, which start with the immune process that is suggested to be triggered by tobacco use, are pathological findings. Anti-inflammatory, anticoagulants and some vasodilators are used in TAO treatment. Our study aims to observe the effect of calcium channel sensitizer Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan), which is a peripheral vasodilator, on the severity of the disease through the inflammatory and thrombotic pathways in the TAO model we will create, with biochemical and immunohistochemical data. There is no study in the literature in which the effects of Levosimendan on TAO through peripheral vasodilation mechanism are observed. If we obtain meaningful results from our study, Levosimendan, which has reached wide areas of cardiac use, can be considered as an alternative and new treatment for Buerger patients.

Material and Methods: For the project, 24 male Wistar Albino rats with an average weight of 280-320 g were randomly divided into 4 groups. 1st group was sham-operated, 2nd group was the TAO group, 3rd group was the TAO+low dose Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan), 4th group was the TAO+high dose Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan). The femoral arteries of all rats were exposed using a surgical incision. The blood flow of the femoral artery was prevented by an arterial clamp placed proximal to the femoral artery. Then, 0.1 cc saline was injected into the 1st group and closed. All animals in groups 2, 3 and 4 were injected with 0.1 cc of Sodium Laurate-Saline solution adjusted at 10mg/cc to each animal. Arterial clamps were removed after 15 min. Rats in groups 3 and 4 were injected intraperitoneally with a low dose of Levosimendan(12 mcg/kg with 0.5% dextrose 10cc) and a high dose of

Levosimendan(24 mcg/kg with 0.5% dextrose 10cc) at the 2nd hour following Sodium Laurate injection. For the next 7 days, Levosimendan administration (for the low-dose Levosimendan group and high-dose Levosimendan group) was continued with the same dose and administration method. The TAO formation was classified for all rats by daily observations for 1 week. After 1 week, all animals were again anesthetized to be sacrificed. MMP-3 (Matrix metalloproteinase-3), MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9), Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were examined by immunohistochemical examinations on femoral artery tissues. RAGE (receptor for advanced glycation end products), ET1 (endothelin 1), TXB2 (thromboxane B2), 6K-PGF1-alpha (6-ketoprostoglandin F1-alpha), HMGB1 (high mobility group box protein 1) levels in plasma were measured by ELISA method biochemically.

Results: In the serum sample of TAO induced rats, compared to control rats, RAGE was 51%; Endothelin-1 58%; Thromboxane B2 increased by 57%, whereas 6K-PGF1-alpha and HMGB1 levels did not change.

When the serum samples of TAO+LD treatment group were compared with the rats in the control group, no change was detected in the levels of RAGE, Endothelin-1, Thromboxan B2, 6K-PGF1-alpha and HMGB1. Whereas; Compared to the TAO group; RAGE 43%; Endothelin-1 80%; There was a 57% decrease in thromboxane B2, but no change in 6K-PGF1-alpha and HMGB1 levels.

While a significant increase was observed in Endothelin-1 levels in the TAO+HD treatment group compared to the rats in the control group, no change was found in the levels of RAGE, Thromboxan B2, 6K-PGF1-alpha and HMGB1. RAGE 57%; Thromboxane B2 decreased by 67%, whereas Endothelin 1, 6K-PGF1-alpha and HMGB1 levels did not change.

We observed that the biochemical and morphological response of the low-dose treatment group to the treatment was better than the high-dose group, however, the response to the treatment was good in both treatment groups.

In the observed immunohistochemical examinations in the TAO group, we observed the uptake of inflammatory markers MMP3, MMP9, ICAM and VCAM in the vessel wall.

Conclusion: As a result; With the biochemical and immunohistochemical data we obtained and the morphological findings we observed, we showed that the efficacy of Levosimendan in the treatment of TAO is positive. Our work; We think that it provides positive data for the investigation of the efficacy of Levosimendan in the treatment of TAO and new studies to be organized for dose studies.

Key Words: Buerger's Disease, Thoromboangitis Obliterans, Levosimendan, Peripheral Vasodilation, Thrombosis, Peripheral Vascular Disease



1 - GİRİŞ

Tromboanjitis Obliterans (TAO) sıklıkla distal ekstremitelerin küçük ve orta büyüklükteki damarlarını etkileyen nonaterosklerotik, segmental, enflamatuvar bir hastalıktır. Tütün kullanımının bırakılması dışında standradize edilmiş bir tedavisi yoktur.(1) Ekstremitelerde iskemi ve yüzeysel tromboflebit, hastalığın temel klinik tablosunu oluşturmaktadır. Hastalığa spesifik olarak ortaya koyulabilmiş klinik, radyolojik, laboratuvar ve histopatolojik bulgular yoktur. Bu sebeple teşhis tüm verilerin biraraya getirilmesiyle oluşturulan klinik bir olasılık olarak belirlenir.(2) Hastalığın oluşum mekanizması ve prognozu net olarak ortaya koyulamamıştır.(3) Son yıllarda, hastalığın patofizyolojisi ile ilgili rapor edilmiş olan önemli gözlemler vardır. Bunlardan biri hasta serumunda artmış olan antiendotelial hücre antikorları seviyeleri bir diğeri ise endotel bağımlı disfonksiyon sebebi ile görülen vasküler dilatasyonun bozulması.(4) Antiendotelial hücre antikorlarının (AECA, *antiendothelial cell antibodies*) tromboanjitis obliterans patolojisinde rol oynayabileceği gösterilmiştir.(5) Ancak bu antikorların plazmadaki yüksekliğini gösteren TAO sıçan (*rat*) modelimizle ilgili çalışma literatürde bulunmamaktadır. Geleneksel Çin Tıbbi yöntemi shenfu enjeksiyonunun değerlendirildiği bir TAO sıçan modeli çalışmasında da enjeksiyon sonrası plazmada TXB2 ve 6K-PGF1-alfa düzeyleri, trombüsün patolojik derecelendirilmesi ve hematolojik değişiklikler gözlenmiş. Tedavi gruplarına kıyasla kontrol gruplarında TAO lezyonlarının patolojik bulguları, patolojik trombus oluşumunun, trombosit düzeylerinin ve TXB2/ 6K-PGF1-alfa oranının arttığı 6K-PGF1-alfa düzeylerinin ise azaldığı gözlenmiştir. SFI (*shenfu injection*) tedavisi Sodium Laurate enjeksiyonunun sebep olduğu patolojik belirtileri önemli ölçüde azaltmıştır. Eritrosit düzeyleri lökosit ve nötrofil düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.(6) Yakın zamanlarda aynı model ile çalışılmış olan başka serilerde HMGB1 in plazma düzeylerinin artışı, uygulamayı planladığımız TAO modelinde proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyen, enflamasyon (yangı) geç mediyatorü olarak TAO için yeni bir hasar belirteci olarak bulunmuştur.(7) Bu çalışmada HMGB1 ve reseptörü RAGE nin Sodium Laurate ile oluşturulmuş TAO modelinde hastalık sürecinde yol aldığı gösterilmiştir.

TAO, enflamasyonun uyardığı yüksek derecede hücreyel yangılı trombus (*highly cellular inflammatory thrombus*) ile karakterizedir. HMGB1 ve indüklediği enflamatuvar faktörler aracılığıyla; sodyum laurate ile başlatılmış mekanik hasar sebebiyle endotelial disfonksiyon gelişen endotel hücrelerinde fizyolojik antikoagülasyon ve vazodilatasyon yeteneğinin kaybedilmiş olduğu gösterilmiştir.(7) Aynı çalışmada plazmada TXB2, fibrinojen ve platelet artışı gözlenmiştir. Arter dokusunda Western Blot ile HMGB1, RAGE, IL-6 (interlökin-6), ICAM-1, VCAM, beta-aktin artışı gözlenmiştir. İnsanlarla ilgili retrospektif olarak yapılmış araştırma ile elde edilen veriler ile HMGB1, ICAM-1, MMP-9 un plazma seviyesindeki artışı ile HMGB1in belirteç olarak TAO'daki rolü gösterilmiştir. HMGB1 bu nadir görülen hastalıkla ilgili lezyonlarda önemli bir rol oynamakta hatta tedavide potansiyel bir hedef olarak ortaya çıkmaktadır.(8,9) Tromboksan A2 (TXA2) ve Prostaglandin (PGI2) tromboz ile ilişkili olayların seyrinde yer almaktadırlar. TXA2 güçlü trombosit indükleyicisi olarak görev yaparak mikrovasküler düzeyde vazospazm ve trombus formasyonuna sebep olarak gösterilmiştir.(10) Prostaglandin (PGI2) TXA2nin fizyolojik bir antagonisti olarak dolaşım sisteminde trombosit agregasyonunu inhibe edici ve vasodilatatör etkisiyle yer almaktadır.(10) TXA2/ PGI2 patolojik dengesizliği vazospazmı tetikleyip trombus oluşumuna sebep olabilir.(9) TXB2 ve 6K-PGF1-alfa, TXA2 ve PGI2nin stabil metabolitleridir. PGI2 ve 6K-PGF1-alfa gibi metabolitleri TAO tedavisinde farmakolojik ajanlar olarak önerilmiştir.(11) Bir PGI2 analogu olan iloprost üzerinde en iyi çalışılmış olup etkinliği kanıtlanmış tek vazodilatatördür.(12)

Çalışmamızda araştırmayı planladığımız Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan) kardiyak yetmezlikte klinik kullanımı olan kalbin kalsiyuma duyarlılığını artırıp kasılmasını arttıran bir kalsiyum kanal duyarlaştırıcısıdır. Levosimendan aynı zamanda vasküler düz kaslarda ATP duyarlı potasyum kanallarını açarak vazodilatatör etki sağlamaktadır. Çalışmamızdaki amaç Levosimendanın periferik vasküler yataktaki vazodilatatör etkisinden yararlanıp TAOda bozulmuş olan endotel kaynaklı disfonksiyon sebebiyle azalmış vazodilatasyon yeteneğini düz kas hücreleri üzerinden artışını yukarıda anlattığımız yollardaki biyokimyasal markerler üzerinden gözlemlemektir. Çalışmamızda kullanacağımız TAO modeli ilk olarak 1980 yılında uygulanmış olup, literatürdeki tüm TAO modelleri aynı şekilde düzenlenmiştir.(13) Literatürdeki başka makalelerde çalışmayı planladığımız biyokimyasal yollar gösterilmiş, Levosimendan

(Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan) ilaç etkinliğini göstermek amacıyla biyokimyasal markerları seçimimizde bu makaleler yol gösterici olmuştur.(14,15,16)

Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan) TAO modellerinde daha önce kullanılmamış olup etkin dozu daha önce yapılmış olan ‘ ‘*Analysis of the Influence of Short-Term Levosimendan Exposure on Oxidant/ Antioksidant Status and Trace-Element Levels in the Pyhysiological Status of the Thoracic Aorta of Rats*’ ’ makalesinden yararlanarak belirlenmiştir.(17) Sodium Laurate (Sodium Laurate, Sigma Aldrich®) birçok temizlik ve kişisel bakım ürününde bulunan, sabuna benzer şekilde davranan yüzey aktif bir maddedir. TAO oluşumunu sağlayan mekanizma endotelde fiziksel tahribat yolu ile enflamatuvar sürecin başlaması, trombüs oluşumu ve neticesinde lokal dolaşım bozukluğuna sebep olmasıdır. TAO’ya benzer görünüm makroskopik olarak, belirlenen sınıflandırma ile değerlendirilmiştir. Sodium Laurate ile oluşturduğumuz model yöntem bölümünde detaylı anlatılacak olup yöntemimiz femoral bölgeden cerrahi olarak erişeceğimiz femoral artere, intraarteriyel olarak sodium laurate (Sodium Laurate, Sigma Aldrich®) verilmesi, değişikliklerin makroskopik olarak gözlenmesi ve yukarıda anlattığımız biyokimyasal markerlar üzerinden ilaç etkinliğini araştırmaktır.

2 - GENEL BİLGİLER

2.1. Vasküler Sistem Embriyoloji ve Histolojisi

2.2. Endotelyal Hücre Fonksiyonları ve Trombotik Mekanizmalar

2.3. Periferik Vasküler Hastalıklar

2.3.1. Ateroskleotik Periferik Vasküler Hastalıklar

2.3.2. Anevrizmalar

2.3.3. Nonaterosklerotik Periferik Vasküler Hastalıklar

2.4. Winiwarter-Buerger Hastalığı (Tromboanjitis Obliterans)

2.4.1. Tromboanjitis Obliteransın Kısa Tarihçesi

2.4.2. Tromboanjitis Obliteransın Demografik Özellikleri

2.4.3. Risk Faktörleri

2.4.4. Klinik Tablo

2.4.5. Tanı Kriterleri

2.4.6. Laboratuar Testleri

2.4.7. Patogenez

2.4.8. Tanı Yöntemleri

2.4.9. Ayırıcı Tanı

2.4.10. Tedavi

2.5. Levosimendan

2.5.1. Levosimendan Farmakolojik Özellikleri

2.5.2. Levosimendan Farmakokinetik Özellikleri

2.5.3. Levosimendan Endikasyonları

2.5.4. Levosimendan Kontraendikasyonları

2.5.5. Levosimendan Yan Etkileri

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Araştırma Planı

3.2. Kullanılan Gereç ve Maddeler

3.3. Anestezi ve Cerrahi Prosedür

3.4. Deney Modeli

3.5. Morfolojik Skorlama

3.6. Biyokimyasal İncelemeler

3.7. Histopatolojik İncelemeler

3.8. İstatistik

4. Bulgular

4.1. Serumda Elde Edilen Bulgular

4.2. Damar Duvarında Elde Edilen Bulgular

4.3. Morfolojik Bulgular

5 - Tartışma ve Sonuç

6 - Kaynaklar

7 - Ekler

2.1. Vasküler Sistem Embriyolojisi ve Histolojisi

Embriyonik gelişim sürecinin 3. haftasına gelindiğinde insan embriyosunun damar sistemi belirmeye başlar. Vitellüs kesesi duvarındaki visseral mezoderm içinde yer alan hemanjiyoblastlar olarak bilinen öncül hücreler üçüncü haftanın başlarında kan damarlarına farklılanır. Anjiyoblast olarak adlandırılan bu hücreler kan damarları ve pluripotent kök hücrelere farklılaşırlar. Embriyonik disk boyunca dağılan kan adacıkları olarak bilinen hücre kitlelerini oluştururlar. Kan adacıklarında beliren boşluklar damar lümenine dönüşür. Damarların endotelial tabakası bu adacıklardaki anjiyoblastlardan farklılaşır. Çevreleyen mezenkim hücrelerinden damarların düz kas ve bağ dokusu oluşur. Damarların gelişme süreci devam ederken pluripotent kök hücreler de kanı oluşturmaya başlar. Kan adacıklarında vasküler tüpler gelişmeye devam eder; birbirleri ile ve tubuler kalp ile bağlantı kurarlar. Bu gelişim modeli tek bir merkezi damarın oluşup dışarıya yayılmasından ziyade eş zamanlı birçok tubuler yapının oluşup birbiri ile bağlantı kurması ile meydana gelir. Bu anjiyogenez ihtiyaç olduğu müddetçe yaşam boyu devam eder. Kan damarları gelişimi sinir sistemi gelişimi ile aynı modeli izler, aynı hedef doku ve organlara gider. Sebebi sinir büyümesini yönlendiren birçok faktörün aynı zamanda kan damarlarını da benzer bir modelle oluşması için uyarmasıdır. Belirli bir damarın arteriyel ya da venöz karakterde olması lokal sinyal proteinlerinin konsantrasyonuna bağlıdır.(18)

Vücuttaki aktif metabolitlerin kullanım yerlerine transferi, metabolizmadan uzaklaştırılacak metabolitlerin ise sistem dışına alınması kardiyovasküler ve lenfatik sistem olarak ikiye ayrılan dolaşım sistemi aracılığı ile gerçekleşir.(19)

Vücudun transport işlevinde görevli, kardiyovasküler sistemin bir bileşeni olan kan damarları; arteriyel ve venöz sistem olarak ikiye ayrılır. Arteriyel sistem; arter, arteriol ve kapillerlerden venöz sistem ise ven ve venüllerden oluşmaktadır. Kapiller sistem dışındaki tüm damarlar tunika intima, tunika media ve tunika adventisya olarak adlandırılan 3 konsantrik tabakadan oluşur. Bu üç katman buldukları bölgenin işlevlerine uyum sağlayabilmek amacıyla segmentel farklılaşma diye adlandırılan yapı ve işlev değişiklikleri gösterirler.(20)

Tunika intima :

- Bazal membran üzerinde yer alan tek katlı endotelial olarak özelleşmiş basit squamöz epitel tabaka ve subendotelial bağ dokusundan oluşan en ince katmandır.
- İç elastik lamina adı verilen elastik bir katman ile mediadan ayrılır.
- Endotel hücre hasarında subendotelial bağ dokusu aktivasyonu ile trombosit agregasyonu indüklenir.
- Endotel hücreleri tarafından vazodilatasyonda görevli NO (Nitrik Oksit), vazokonstruksiyonda görevli endotelin, vazodilatasyon ve aynı zamanda trombosit adhezyonunun inhibe edilmesinde görevli PGI₂ (prostasiklin) salgılanır.
- Koagülasyonda görevli doku faktörü ve von Willebrand faktör subendotelial bağ dokuda bulunur. Von Willebrand faktör endotel hücreleri içindeki Weibel-Palade cisimciklerinde depo edilir.(20)

Tunika media :

- İntima ve adventisya arasında yer alan, damarın yapısal desteğini sağlayan elastik, vazoreaktif bölümdür.
- Bağ dokusu, sistol ve diyastol arası gerim farkı ile kan iletimini sağlayan elastik lifler ve otonom sinir sistemi ile aktivasyonu düzenlenen düz kas hücrelerinden oluşur.

Tunika adventisya :

- Perivasküler yumuşak dokuya komşu bağ dokusundan oluşan; büyük çaplı damarlarda vasa vasorum ve nervi vasorumları da içeren damarın en dış tabakasıdır.

Büyük çaplı damarlarda tunika intima ve ve tunika medianın iç kısmı lümen içerisindeki kandan oksijen ve besinlerin difüzyonu ile beslenir. Tunika adventisya ve medianın dış kısmı vasa vasorumlar ile beslenir.

Küçük ve orta çaplı damarların tüm katmanları direkt lümeden difüzyon ile beslenir.

Arteriyel sistem :

Kanı kalpten perifere iletirler. Arter, arteriol ve kapillerler olarak ayrılırlar.

1. Büyük (elastik) arterler :

- Çapı 10 mm ve üzerinde olan arterlerdir.
- Duvar kalınlığı lümen çapının 1/10'u kadardır.
- Kalpten çıkan kanın yönlendirilip ilettilmesinde görev aldıklarından kondüktör arterler olarak da adlandırılırlar.
- Aort ve büyük dalları (innominate, subklaviyen, iliyak, common carotis arter...)
- İnternal ve eksternal lamina tunika mediaya oranla çok daha az elastik lif içerdiğinden belirgin değildir.
- Tunika mediada sistolde genişleyen ve diastolde gevşeyen, yüksek basınca dayanıklı elastik lifler daha fazla, düz kas hücreleri ise daha az bulunur. Bu sayede kanın distale iletimi ve diastolik basınç sağlanmış olur. (19,20)

2. Orta çaplı (musküler) arterler :

- Çapı 0,5-10 mm arası olan arterlerdir.
- Duvar kalınlığı lümen çapının $\frac{1}{4}$ ü kadardır.
- Büyük arterlerden gelen kanı organ ve çeşitli dokulara arteriol ve kapillerler vasıtasıyla dağıtımından sorumlu oldukları için distrübitör arterler olarak da adlandırılırlar.
- Eksternal carotis arter dalları, radial ve ulnar arterler, femoral ve popliteal arterler...
- İnternal ve eksternal lamina belirgindir.

- Tunika mediada damar çapını ve bölgesel kan akımının ve basıncının düzenlenmesini sağlayan düz kas hücreleri daha fazla, elastik lifler ise daha az bulunur.(20,21)

3. Arterioller :

- Çapı 100 mikrometre ve daha küçük olan arterlerdir.
- 50 mikrometreden küçük çapta olanlar terminal arterioller olarak adlandırılır. Kapillerlere dal verecek olan en küçük boyuttaki arteriollere ise metaarteriol adı verilir. Kapillerlere dal verdikleri bölgede, çevresel düz kas dokusundan oluşan pre-kapiller sfinkter bulunur.
- 1-2 tabaka düz kas hücrelerinden oluşan tunica mediaya sahiptirler.
- Boyutlarının küçüklüğü nedeniyle iletilen kana direnç gösterdikleri için direnç damarları olarak da adlandırılırlar.
- Kan basıncının düzenlenmesinde majör sorumludurlar.
- Bu boyuttaki damrlarda düz kas vasıtasıyla olan kasılma dramatik değişikliklere sebep olur, sistemik kan nasıncı ve bölgesel kan akışının kontrolünde önemli rol oynarlar.(20,21)

4. Kapillerler :

- Ortalama çapları 8 mikrometredir
- Sadece tunica intima ve basla laminadan oluşurlar. Basal laminanın dışında kontraktıl hücreler olan perisitler bulunur.
- Gaz, besin ve metabolik atıkların değişim bölgesidir.
- Sürekli, fenestre ve sinusoidal olmak üzere 3 tiptedirler. (21)

Venöz sistem :

Kanı periferden kalbe iletirler. Büyük, orta, küçük boy venler ve venüller olarak ayrılırlar. Arteriyel sistemdekine benzer şekilde 3 katmanlı yapıda oluşmuşlardır. Aynı çaptaki arter duvarına göre duvarları çok daha ince, tunika mediaları ise daha az gelişmiştir. Tunika media daha fazla kollajen daha az elastik lif içermektedir. Tunika adventisya mediaya oranla daha gelişmiş ve daha kalındır. Reflüyü önlemek amacıyla

genellikle kapakçıkları bulunur. Kraniyal kavite vertebral kanal vena cava inferior vena cava superior ve çok küçük venlerde kapakçık bulunmaz.

Venüller post kapiller ve büyük musküler venüller olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Post kapiller venüler 10-40 mikrometre çapında, drene oldukları büyük musküler venüller 40-100 mikrometre çapındadır.(21)

2.2. Endotelial Hücre Fonksiyonları ve Trombotik Mekanizmalar

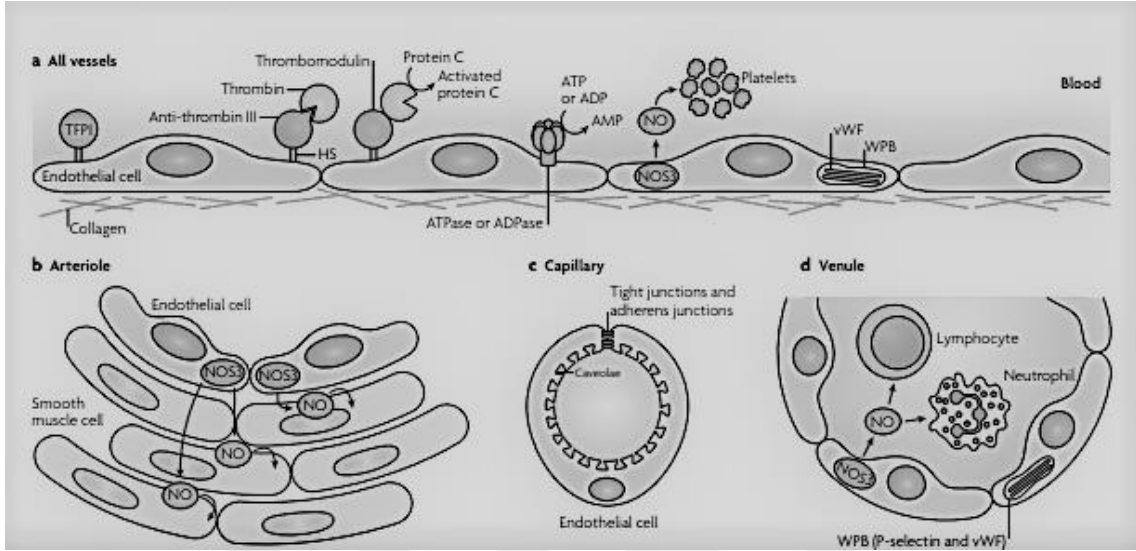
Endotel hücreleri, kan ile direk teması olan arter, ven, kapiller, kalp kapakları ve endokardiyal tüm yüzeleri örten tabakadır. Endotel hücreleri su ve suda çözünen maddelerin transportu, plazma lipid ve immünolojik reaksiyonlarının regülasyonu, hemodinamik değişikliklere cevaptan sorumludur. Endotelyum kardiyovasküler hastalıkların oluşum ve gelişim sürecinde yer alan dinamik bir yapıdır. (22) Endotel hücreleri, salgıladıkları trombosit agregasyonu inhibitörleri, bazı vazodilatör ve bazı vazokonstriktörler ile vasküler tonusun ve lümen çapının ayarlanmasını sağlayan antitrombotik yüzeyin oluşturulmasını sağlarlar. Ayrıca salgıladıkları NO ile düz kas hücre proliferasyonu ve kontraksiyonunu düzenleyip, lökosit ve trombositlerin enflamatuvar yanıtı göre adhezyonunu düzenlerler. NO; yapısal bir nitrik oksit sentazın, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), aktivitesi yoluyla üretilir. Endotele bağlı vazodilatör yanıtın olmayışı endotel disfonksiyonu olarak tanımlanmış, hipertansiyon, yaşlanma, aterosklerozda endotel bağımlı vazodilatasyon yanıtının azaldığı gösterilmiştir. eNOSun başlangıçta yapısal olarak salgılandığı düşünülse de son yıllarda salınımını uyaran hipoksi, kronik egzersiz, sitokinler aracılığıyla düzenlenme mekanizmalarının da olduğu gösterilmiştir.(22)

Endotel hücreleri endotelin, NO ve diğer nörohümorale mediyatörler aracılığı ile damar kontraktilesini sağlayacak faktörlerin salınımından sorumludur. Endotel kaynaklı vazoaktif maddelerin üretimi ve salınımı mekanik gerim kuvvetleri ve nöromediyatörler tarafından sağlanır. Asetilkolin, bradikinin gibi endotel bağımlı agonistler ve yüzey gerilimi (*shear stress*), endoteli NO, PGI₂, EDHF (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*) gibi vazodilatörlerin salımı için simüle eder. NO ve PGI₂ yanıtları özellikle kondüit damarlarda yaygın iken EDHF daha çok direnç arterlerinde baskındır.

Endotel hücreleri kanın normal vizkozitesinin sürdürülmesini travma olmadığı müddetce pıhtılaşmaya engel olarak sağlarlar. Hücreler, Faktör VIIa-doku faktörü kompleksi ile koagülasyonun başlamasını, salgıladıkları doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*) ile önlerler. Sahip oldukları antikoagülan özellikleri ile antitrombin IIIü bağlayıp pıhtılaşma kaskadı boyunca üretilen herhangi bir trombin molekülünün inhibe edilmesini sağlayan heparan sülfat moleküllerini, sentezleyip hücre yüzeyinde bulundurlar. Endotel hücreleri ayrıca, trombini bağlayıp substrat spesifitesini kan pıhtı sürecinin ana faktörü olan fibrinojen salınımından protein C aktiflenmesi ve salınımına dönüştüreren trombomodulini sentezler.(23) Aktive protein C pıhtılaşma faktörleri ve koagülasyon sürecini inhibe eden bir enzimdir. Trombosit aktivasyonunu önlemek için temel süreç trombin inaktivasyonu ve ATPase, ADPase aktivasyonu ile ATP'nin inert AMP'ye dönüştürülmesi ile trombositler ve kollajen arasındaki trombositleri aktifleyebilecek fiziksel etkileşimi başlatılmasıdır. Endotel hücreleri depolama granülleri olarak bilinen Weibel-Palade cisimciklerinde (Weibel Palade Bodies, WPB) depoladıkları von Willebrand Faktör (von Willebrand Factor, vWF) adı verilen protein ile trombositler ve bazal membran arasındaki etkileşimi güçlendirirler.(23) Nitrik oksit sentaz 3 (NOS3) tarafından üretilen nitrik oksit (NO) trombosit aktivasyonunu inhibe eder. Arteriyel endotel hücreleri, media tabakasındaki düz kas hücrelerinin tonusunu düzenleyerek kan akışının regülasyonunda majör rol oynarlar. Farklı mediyataörler bulunsa da esas düzenleyici faktör NOS3 tarafından sentezlenen NO'dur.

Kapiller endotel hücreler, plazma proteinlerinin transendotelial ekstrasvazyonunun esas düzenleyicileridir. Her ne kadar bu bariyer fonksiyonun kapsamı kapiller endotel hücrelerinin bulunduğu dokulara göre farklılık gösterir ise de genellikle sürekli kapillerlerde hücrelerarası sıkı bağlantılar ile protein kaçağı önlenir. Caveolae, plazma proteinlerinin veziküler taşıma yoluyla kapiller tabaka boyunca transportunun başlatıp kontrolünü sağlar. Venüler endotel hücreleri kandan dokulara aktarılan lökositlerin ana bölgesini şekillendirirler. Lökositlerin verimli bir şekilde toplanması endotel hücrelerince aktive olması ile sağlanır. Dinlenme halindeki endotellerde löksit bağlanmasına aracılık edecek adezyon moleküllerinin sentezi engellendiğinden bu aktivasyon mevcut değildir. Bazal olarak insan endotel hücrelerinde eksprese edilen ve vWF ile beraber WPBlerde bulunan P-Selektin, E-selektin, VCAM1,

ICAM1 minimal olarak sentezlenir ve NO bu moleküllerin sentezinin baskılanmasına sebep olur. Aynı zamanda lökositler üzerindeki doğrudan etkiler ile dokulara penetre olabilen aktive formalar dönüşmelerini engeller.



Şekil 1: Vasküler Endotel Fonksiyonları (23)

Memelilerde ikinci haberci mekanizması üç ana aşamada düzenlenmiştir. İlk aşama agonistin spesifik reseptöre bağlanması, ikinci aşama karşılık gelen G proteinin hormon reseptör kompleksi ile aktivasyonu ve son aşama ise adenilat siklaz aktivasyonu ile fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat (PIP₂) spesifik fosfolipaz C (PLC) aktivasyonu ile hücre içi Ca kanallarının açılmasıdır.

Vasküler endotel hücrelerinin fonksiyonlarını iki sınıf agonist düzenler. Birinci sınıf, adenilat siklazı aktive ederek sitozolik siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyelerini artırarak aktivasyon gösteren Prostaglandin I₂ (Prostasiklin, PGI₂) ve epinefrinden oluşur. İkinci sınıf agonistler ise fosfoinozid metabolizmasını uyararak inozitol 1,4,5-trifosfat (IP₃), 1,2-diasilgliserol (DAG), aracılığıyla serbest intrasellüler Ca seviyelerini arttırmaları. Agonistler, siklik guanozin monofosfat (cGMP), fosfoinozid metabolitleri ve Ca gibi intrasellüler sekonder haberciler ile işlev gösterirler.

Bu sekonder haberciler protein kinaz C (PKC)yi simüle edecek şekilde birçok aşamada sinerjik olarak çalışırlar. PKC aktivasyonu ve Ca'un hem hücre içi depolar hem de hücre dışı depolardan serbestlenmesi ile damarda vazokonstriksiyon gerçekleşir. PIP₂

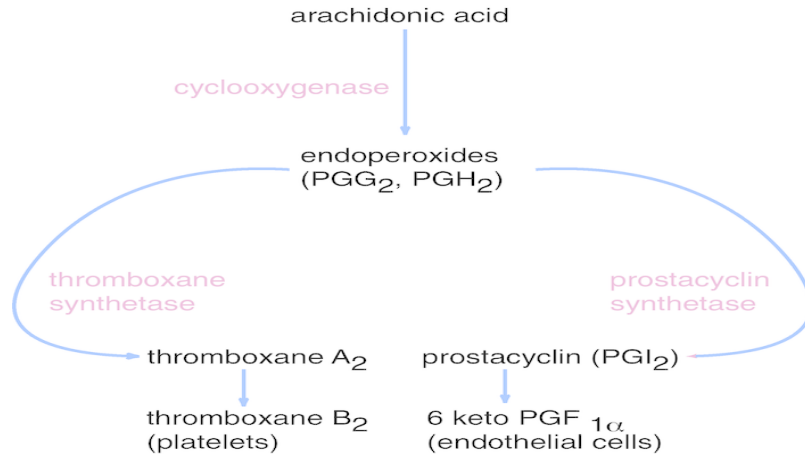
(fosfatidil inozitol 4,5 bifosfat)'nin fosfolipaz C (PLC) adlı enzimle hidrolizi DAG ve IP3 adlı iki adet ikincil habercinin oluşumuyla sonuçlanır. Bu iki haberci, iki farklı sinyal yolağı zincirini harekete geçirir: PKC ve kalsiyum (Ca^{++}) serbestleştirilmesi. Artan PKC sonrasında, PLC yi baskılar.

Endotel hücreleri, kan vizkositesini belli sınırlar arasında tutabilmek için damar duvar bütünlüğünü bozan bir durumla karşılaştığı zaman kotrollü pıhtı oluşumu ve pıhtının çözülmesini sağlayan faktörleri salgırlar. Endotel hücreleri tarafından üretilen antikoagülanlar; doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*), heparan, trombomodulin, endoteliyal protein C reseptör, NO, PGI₂, doku plazminojen aktivatörü (t-PA, *tissue plasminogen activator*), ekto-adenozindifosfataz (ADPase)dır. Prokoagülan faktörler ise plazminojen aktivatör inhibitör, von Willebrand faktör ve protez ile aktive olan reseptörlerdir. Endotelin antitrombotik karakteri kısmen heparan sülfat ve kondroitin sülfatın neden olduğu anyonik yüzey yükü sebebiyledir. Trombosit aktivasyonu ve agregasyonu sentezlenen prostaglandinler ve salgılanan NO ve hücrelerin yüzey ADPase aktivitesi ile engellenir. EDRF (*endothelium-derived relaxing factors*) olarak da bilinen NO trombosit sitoplazmasında cGMP üretimi ile trombosit agregasyonunu inhibe eder. CGMP trombositlerin agregasyon için ihtiyaç duydukları ikinci habercileri üretmesini engeller. NO, trombosit adezyonunu inhibe eder, disagregasyonu destekler. Trombosit agregasyonu, trombositlerin de dahil olduğu bir negatif feedback mekanizması ile düzenlenir. NO ayrıca NF-KB (*nuclear factor KB*) nin aktivasyonunu bozma yeteneğı ile antienflamatuvar rol oynar. NF-KBnin inhibisyonu VCAM, ICAM, MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) gibi adhezyon proteinlerinin ekspresyonunu baskılar.(24) NO hemostazın kontrolü, fibrinoliz, trombosit ve lökositlerin damar duvarı ile etkileşimi, vasküler tonus düzenlenmesi, vasküler düz kas hücre proliferasyonu ve kan basıncı regülasyonu gibi işlevlere sahiptir. NO biyoyararlanımında azalma NO bağımlı sinyal yolları vasküler hastalıkların merkezinde görülmektedir. Fakat bu mekanizmanın sonuç mu yoksa sebep mi olduğu açık değildir. NO biyoyararlanımındaki bozukluklar endoteliyal fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirilmiş ve aterosklerotik lezyonların ilerleyişi, hipertansiyon, hiperkolestrolemi, diabetes mellitusa sebep olabileceğı düşünölmüştür.(25)

Normal fonksiyonun sürdürölmesinde protrombotik ve antitrombotik/ fibrinolitik mekanizmlar arasında bir denge mevcuttur. Arteriyel sistemde trombüs oluşumunun

temelini trombositlerin aktivasyonu oluşturur iken, venöz sistemdeki trombüslerin oluşumundan esas sorumlu faktör fibrindir. Adenozindifosfat (ADP) plazmin ile indüklenen trombosit agregasyonunda önemli bir kofaktördür. Endotelial yüzeyden ADPase sunumu ADPyi adenozinmonofosfat, adenozin ve inozine dönüştürerek trombosit agregasyonunu engeller. İntakt endotelde konstrüksiyon ve agregasyon sağlayan serotonin (5-HT), trombosit aktive edici faktör, ADP, ATP gibi faktörler agregate olan trombositlerden salınarak endotel hücrelerinden endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF, *endothelium derived relaxing factor*) ve PGI₂ salınımını başlatırlar. EDRF ve PGI₂ damar düz kas hücrelerini gevşeterek mikroagregatları damar dışına almak için damar lümenini genişletirler. EDRF ayrıca damar lümenine de salınarak trombositlerin damar endoteline bağlanmasını engeller. Ayrıca endotel, trombositlerden salgılanan vazokonstriktör bileşenler tromboksan A₂ (TXA₂), 5-HT ve damar düz kası arasında bariyer fonksiyonu görür. Endotel hücre hasarı durumunda düz kas ve lümen arası iletişim açık olacağından, 5-HT ve TXA₂ nin sürekli salınımı ve damar düz kasına aralıksız erişimleri ile agregasyon sürekli devam edecektir. Endotel giderek düşük dansiteli lipoproteine (LDL, low density lipoprotein) daha da geçirgen hale gelir ve nötrofil, monosit ve trombositlerin adezyon ve integrasyonunu indükleyen yüzey glikoproteinleri eksprese etmeye başlar.

Tromboksan A₂ , trombositlerde bulunan bir enzim olan tromboxan-A sentaz ile bir araşidonik asit türevi olan prostoglandin H₂den üretilen, eikazanoid ailesinin iki majör tromboksanından (TXA₂ ve TXB₂) biridir. TXA₂; çok düşük bir hızda üretilen dolaşımdan hızla temizlenen güçlü bir proagregan ve vazokonstriktör eikazanoiddir. Kimyasal olarak stabil hidrasyon ürünü TXB₂ C-11de hemiasetal alkol grubunun dehidrojenasyonu ve betaoksidasyonu yolu ile büyük ölçüde metabolize edilir.(26) Tromboksan potent bir hipertansif ve trombosit agregasyonunu kolaylaştıran bir vazokonstriktördür. Dolaşım sisteminde PGI₂ ile hemostatik denge halinde bulunur. Aktive edilen trombositlerden üretilen tromboksan A₂ yeni trombositlerin aktivasyonunu uyaran ve trombosit agregasyonu arttıran protrombotik özelliklere sahiptir. Trombosit agregasyonu trombositlerin hücre zarında glikoprotein kompleks GPIIb/ IIIa nın ekspresyonuna aracılık edilerek elde edilir. Dolaşımdaki fibrinojen, bu reseptörleri bitişik trombositlere bağlayarak pıhtıyı güçlendirir.



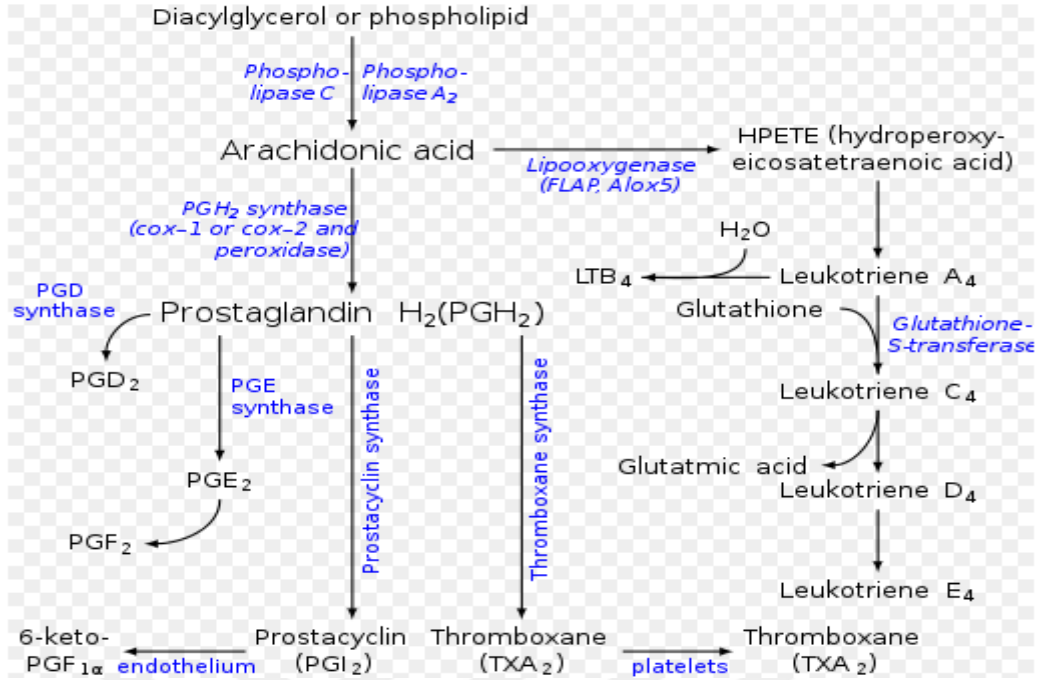
Şekil 2: Tromboksan ve Prostatiklin Sentezi

PGI₂, vasküler yatağın tüm arter ve venlerinde potent hipotansif ve vazodilatatör ajan olarak görev alan ve aynı zamanda trombosit agregasyonu inhibisyonu yapan bir arasıdonik asit ana ürünüdür. PGI₂ endotel hücreleri tarafından yüzey gerilimi (*shear stress*) ya da bazı antagonistler maruziyeti sonrası sıklıkla NO ile birlikte salınır. PGI₂ üretimi damarın initleme katmanında maksimal olarak yapılmakta olup adventisyaya doğru sentezi azalır. PGI₂nin esas ve aktif sentezleyicileri endotel hücreleridir. PGI₂ler trombositlerdeki adenilat siklaz ilişkili spesifik reseptörlere bağlanırlar. Reseptör aktivasyonu trombosit sitoplazmasında intrasellüler cAMP birikimine sebep olur. cAMP artışı dolaşımın sürdürülmesi amacı ile gereksiz trombosit aktivasyonunu engeller ve tromboxan A₂ (TXA₂) bağlanması ile sonuçlanabilecek sitozolik kalsiyum seviyelerindeki artışı önler. PGI₂ ayrıca endotelial prostatiklin reseptörlerine bağlanarak aynı şekilde sitoplazmadaki cAMP seviyelerini yükseltir. Artan cAMP protein kinaz A (PKA)yı aktive eder. PKA miyozin hafif zincir kinazın fosforilasyonunu uyararak düz kas gevşemesine ve vazodilatasyona sebep olur. PGI₂ ve TXA₂ fizyolojik antagonist olarak çalışır. PGI₂ prostaglandin E₁'den (PGE₁) 30-40 kat daha güçlü bir trombosit inhibitörüdür, PGE₁ 30 saniyelik bir süreç için cAMP düzeylerini yükseltiyor iken PGI₂ 30 dakikalık bir süre boyunca cAMP düzeylerinin yüksek kalmasını sağlar. PGI₂ potent ancak kısa ömürlü bir trombosit agregasyon inhibitörüdür. PGI₂nin trombosit üzerindeki

adenilat siklaz ilişkili spesifik reseptörlerine bağlanması ile hücre içi cAMP birikimi artar ve trombosit agregasyonu inhibe olur. Yarı ömrü 42 saniye olan PGI₂, çok daha zayıf bir vazodilatör olan 6K-PGF₁-alfaya parçalanır.(27)

PGI₂ üretimi, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların (NSAID, *non-steroid antiinflamatuvar drugs*) siklooksijenaz enzimleri COX1 ve COX2 üzerindeki etkisi ile engellenir. Bunlar araşidonik asidi, prostasiklinin hemen öncüsü olan prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüştürürler. Tromboksanda COX enzimlerinin inhibisyonu ile kontrolsüz olacağından NSAID'lerin dengeli bir etkisi olacağı düşünülebilir. Ancak PGI₂ konsantrasyonları tromboksan konsantrasyonlarına nazaran çok daha hızlı iyileşir. Bu herbir molekül (TXA₂ ve PGI₂) üreten hücrelerin anlaşılması ile açıklanabilir. PGI₂ esas olarak çekirdekli endotelial hücrelerde üretildiğinden COX inhibisyonu sonrası zamanla artan COX gen ekspresyonları ile, PGI₂ üretiminin artışı sağlayacak COX enzimleri üretilmesi sağlanır. Aksine TXA₂ esas olarak hücre çekirdeği olmayan trombositlerden salgılandığından COX inhibisyonuna, COX gen transkripsiyonu ile yanıt veremezler. Çünkü bunu sağlayabilecek genetik materyalden yoksundurlar. Bu sistem NSAIDlerin dolaşımını sürdürülmesini destekleyen ve trombozu geciktiren PGI₂ dominansı ile sonuçlanır.

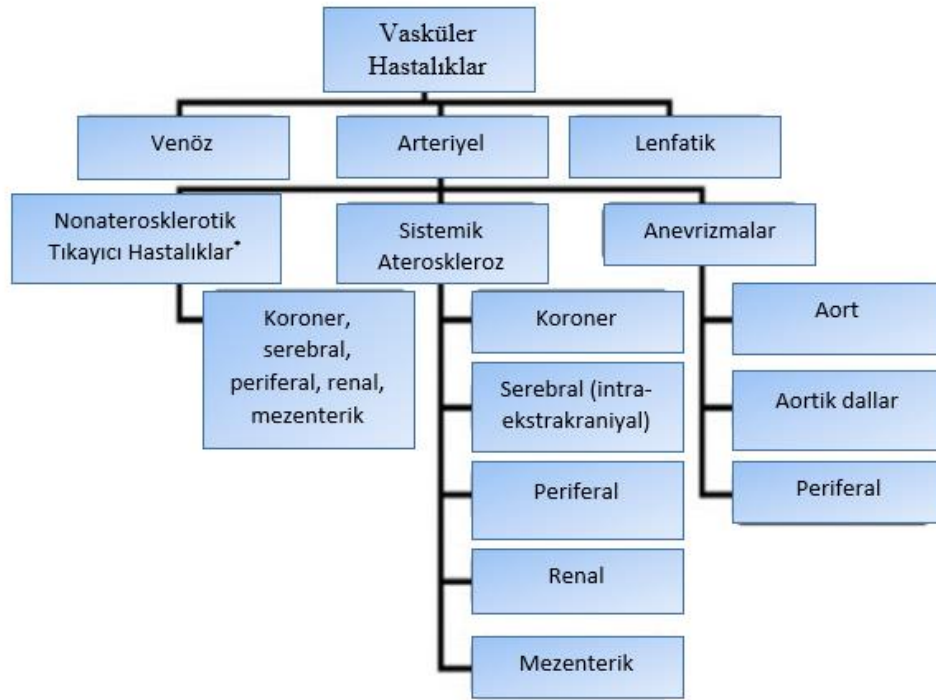
Endotelin (ET) insanda 3 izoformu olan 21 aminoasitli bir peptid ailesindedir.(28) Endotelin-1 yavaş fakat uzun süreli bir tepkiye sebep olan güçlü bir vazokonstriktördür. Yalnızca endotel hücreleri tarafından üretilir ve NO, PGI₂, heparin, natriüretik peptid ve yüksek düzeylerde yüzey gerilimi (*shear stress*) ile inhibe olur. ET-1 mRNA ekspresyonu ve peptid salınımı trombin, insülin, siklosporin tranformin büyüme faktörü-beta1, interlökin-1, epinefrin, anjiyotensin II, arjinin, vazopressin, kortizol, inflamatuvar mediyatörler, hipoksi ve yüzey gerilimi tarafından stimüle edilir. Düşük konsantrasyonlarda ET-1; NO, PGI₂, EDHF ilişkili ETB reseptörleri aracılığıyla vazodilatasyonu indükler. Fizyolojik koşullarda ET-1 seviyeleri düşük endojen üretim, potent inhibitör mekanizmaların varlığı ya da lümen dışı salınım nedeniyle düşük seyreder.



Şekil 3: Eikozanoid Metabolizması

2.3. Periferik Vasküler Hastalıklar

Periferik damar hastalıkları kardiyovasküler tıbbın yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahip önemli bir bileşenidir. Çeşitli kaynaklar ve literatür incelemesi yapıldığında bu hastalıkların sınıflandırılması ve terminolojisinde bazı ayrımlar bulunmaktadır. Farklı birçok sınıflama olmasıyla beraber bu tez çalışmasında nonaterosklerotik periferik vasküler hastalıklar alt grubunda ele alınmakta olan Tromboanjitis Obliteransın bulunduğu “*Atherosclerotic Peripheral Disease Symposium II*” kapsamında önerilmiş olan sınıflama, anlatım kolaylığı sağlayacağı düşüncesiyle kullanılmıştır.



Tablo 1: Vasküler Hastalıkların Sınıflandırılması. * Enflamatuvar, arteriyel displaziler, konjenital, travmatik, infeksiyon (18)

2.3.1. Ateroskleotik Periferik Vasküler Hastalıklar

Ateroskleroz, erişkinlerde en önemli ölüm sebebini oluşturan enflamatuvar hücre ve faktörlerin patogeneğinde rol oynadığı kronik enflamatuvar bir süreçtir. Ana lezyon damar duvarında lipid depozitlerinin birikimine düz kas hücre ve fibröz matriks proliferasyonunun eşlik ettiği, aterosklerotik plak oluşumudur. İnflamasyon aterosklerozun oluşumu ve gelişimi boyunca oluşan fizyolojik ve patolojik değişikliklerin sebebidir.(29) Aterosklerotik plak gelişim süreci köpük hücrelerinin oluşumu, yağlı çizginin belirmesi, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu ve fibröz kap oluşum aşamalarını içerir. Fibröz kaptaki enflamatuvar değişiklikler erozyon, ülserasyon ve rüptür ile sonuçlanabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda aterosklerozun patofizyolojisinde doğuştan ve kazanılmış immün yanıtın rolü olduğu düşünülmektedir.(30)

Tedavide sigaranın bırakılması, egzersiz terapilerini içeren yaşam tarzı değişiklikleri, antiplatelet tedavi, statinlerin dahil olduğu ikincil koruma önirleri mevcuttur. Son zamanlarda yapılmış çalışmalarda ACE inhibitörleri (*angiotensin converting enzyme*) ve ARB (*angiotensin receptor blockers*) ikincil korumda önerilmektedir. Yaşam tarzı değişiklikleri ve ikincil koruma yöntemlerine rağmen akut ya da kronik olarak ekstremitte tehdit edici durumlarda cerrahi girişim ya da endovasküler girişim planlanmalıdır.(31)

2.3.2. Anevrizmalar

Anevrizma, arter çapının etkilenmemiş komşu arter segmentlerinin 150 oranında ya da daha fazlası olacak şekilde fokal ve kalıcı genişlemesi olarak tanımlanır. Farklı konum ve durumlara göre kesin tanımlamalar değişebilir. Etiyolojisi etkilenen bölgeye göre çeşitlilik ve farklılıklar gösterir. Son yıllarda tedavisindeki gelişmeler ve ilerlemelere rağmen vasküler morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden olmaya devam etmektedirler. Gerçek anevrizmalar arterin her 3 katının da tutulumu ile gelişirken, psödoanevrizmalar (yalancı anevrizmalar) damar duvarında yaralanma sonucu gelişen hasarın enflamatuvar hücreler ve çevre dokularla çevrilmesi ile oluşurlar.

Venöz anevrizmaların etiyolojisi tam olarak anlaşılammış nadir görülen vasküler malformasyonlardan olup literatürde kısıtlı sayıda araştırma mevcuttur. Çoğunlukla tanı diğer endikasyonlar için yapılmış olan rutin görüntüleme tekniklerinde venöz tromboemboli bulgusu ile görülür.(32) Altta yatan sebebi açıklayabilecek bağ doku hastalıkları, genetik bozukluklar ya da enzim anomalilikleri gibi antitelerle ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Lokalizasyon bölgesine göre tedavi seçenekleri değişmekte olup endovasküler tedaviler ile iyi sonuçlar sağlanmaktadır. Ancak endikasyonun doğruluğundan emin olunduğu takdirde açık cerrahi onarım standart tedavi yöntemi olarak görünmektedir.(32)

2.3.3. Nonaterosklerotik Periferik Vasküler Hastalıklar

Aterosklerotik vasküler hastalıklar ve aneverizmalar dışında kalan; enflamatuvar, enfeksiyöz, konjenital, displastik, romatolojik ve travmatik lezyonlar bu alt grupta sınıflandırılmaktadır. Tromboanjitis Obliterans bu grubun içinde yer almaktadır.

2. 4. Winiwarter-Buerger Sendromu Tromboanjitis Obliterans (TAO)

Winiwarter-Buerger Sendromu ya da Buerger Hastalığı olarak da bilinen Tromboanjitis Obliterans; ağırlıklı olarak genç erkek sigara içicilerinde görülen orta ve küçük boyuttaki arter, ven ve yandaş sinirlerin segmenter, enflamatuvar tutulumu ile seyreden oluşum mekanizması halen net şekilde ortaya konulabilmiş olamayan, nonaterosklerotik bir hastalıktır. Sıklıkla komşu ve superficial venlerin ve sinirlerin tutulumu görülür. Sigara ile tetiklenen, amputasyona ilerleyebilen akut alevlenme periyodları ile seyir gösterir. Hastalığın aynı zamanda visseral organlarda da tutulum yaptığını gösteren yakın zamanlı çok sayıda çalışma literatürde yer almaktadır.(33)

Patofizyolojisinde tütün kullanımı ile tetiklenebileceği öne sürülen immün süreç ile başlayan, arter ve venlerde akut enflamasyon ve trombüs formasyonu patolojik bulgu olarak yer alır.

2.4.1. Tromboanjitis Obliteransın Kısa Tarihçesi

Hastalığın tanımı ilk olarak 1879 yılında von Winiwarter tarafından 57 yaşındaki bir erkek otopsi materyalinden çalışarak aterosklerozdan farklı histopatolojik özelliklerin ortaya konulmasıyla "Endarteritis Obliterans" olarak yapılmıştır. 1908 yılında genç Polonyalı ve Rus göçmen Yahudilerden ampute edilmiş olan uzuvlar üzerindeki çalışması ile ayrıntılı olarak patolojik bulgularını tanımlayan Leo Buerger (1879-1943) hastalığı aterosklerozis obliteransdan ayırt etmek amacıyla "Tromboanjitis Obliterans" olarak tanımlamıştır. Bulgularına dayandırdığı detaylı ve kesin bir tanımlama yaptığı, 1908 yılında yayınlanan çalışmasından sonra hastalık Buerger Hastalığı olarak anılmaya başlamıştır.(34) Leo Buerger'in 628 sayfa ve 32 bölümden oluşan "*The Circulatory Disturbances of the Extremities*" başlıklı monografisi 1924 yılında yayınlanmıştır.

Tromboanjitis obliterans (TAO) günümüzde tipik klinik ve histopatolojik bulguları ile kesin bir vaskülopati olarak kabul görülmektedir.

Tromboanjitis obliterans için 1998 yılında tanımlanan Shionoya'nın tanı kriterleri ve 2000 yılında tanımlanan Olin'in tanı kriterleri kullanılmaktadır.

2.4.2. Tromboanjitis Obliteransın Demografik Özellikleri

Hastalık tüm dünya çapında görülmekle beraber, Batı Avrupa'da tüm periferik vasküler hastalıkların %0.5-5.6 sı kadar düşük bir oranını oluşturmakta iken Hindistan'da bu oran %45-63'lerde Kore ve Japonya'da %16-66 gibi yüksek oranlarla görülmektedir. Aşkenazi Yahudilerinde ise bu oran %80'lere ulaşmaktadır.(35) TAO'nun gerçek prevalansı yaygınlığındaki bu coğrafi farklılıkların yanısıra TAO ve ateroskleroz gibi diğer tıkaçıcı damar hastalıkları ayırıcı tansında yeterli noninvaziv tanı yöntemlerinin bulunmayışı sebebiyle tam olarak belirlenememektedir. Yeni tanı yöntemlerinin uygulamaya girmesi, özellikle de anjiyografinin kullanımının artması ile başlangıçta Buerger hastalığı olarak sınıflandırılan tipik aterosklerotik lezyonlar ayırt edilebilmiştir.

Her iki cinsiyet ve tüm ırkları etkilemekle beraber erkek cinsiyette görülme oranları çok daha yüksektir. Günümüzde kadınlarda sigara kullanımının artması ile görülme sıklığı artmaya başlamıştır.

2.4.3. Risk Faktörleri

Tütün maruziyeti hastalığın başlangıcı ve progresyonunda esas faktör olarak öngörülmektedir. Tromboanjitis Obliterans hastalarının yaklaşık üçte ikisinde hastalığı gelişimini kolaylaştıran periodontal kronik anaerobik enfeksiyona kolaylaştırıcı faktör olarak rastlanmıştır. PCR ile anaerob bakteri DNA'larının hem arteriyel lezyonlar hem de oral kaviteden alınan örneklerde olduğu gösterilmiştir.(36)

Yapılan bir çalışmada *Rickettsia* enfeksiyonu ile tromboanjitis obliterans arasındaki ilişki gösterilmiş. Hastalığı tetikleyen ana faktör olduğu ileri sürülmüştür. *Rickettsianın* COX (siklooksijenaz) enflamatuvar yolağını aktive edip PGE2 salgılanmasına sebep olması vasküler geçirgenliği artırıp ödeme sebebiyet vermektedir. PGE2 vasküler spazmı artırıp EP3 reseptörleri üzerinden arteriyel trombüs oluşumuna sebebiyet vermektedir.

PGE2 nin antagonisti olan PGI2 hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Eğer Rickettsia esas sebep olarak kabul edilir ise bu hastaların neden immünosupresif tedaviye yanıt vermedikleri de açıklanmış olacağını düşünmüşlerdir.(37)

TAO'nun çok faktörlü etyolojisi kalıtsal eğilim, tütün kullanımı immün ve prokoagülan yanıt gibi bileşenlerden oluşur.(38)

2.4.4. Klinik Tablo

Tromboanjitis Obliterans hastaları genellikle distal ekstremitte arter ve venlerin stenoz ve oklüzyonu sonucu gelişen iskemik ve infeksiyöz akral lezyonlar (ülser, gangren, subungual enfeksiyonlar, flegmon, tromboflebitik nodüller) ve Raynaud sendromu bulgusu gibi cilt renk değişimi bulguları ile başvururlar. Noneroziv artirit iskemik bulgularından aylar veya yıllar önce görülebilir.(39) Hastalık ilerledikçe daha proksimal damarların tutulumu görülür. Her ne kadar tek ekstremitte ile başlangıç gösterebilir ise de hem üst ekstremitte hem de alt ekstremitte damralarının tutulmuş olması ile aterosklerozun klinik bulgularından farklılık gösterir. Klodikasyon, istirahat ağrısı ve el ve ayak parmaklarında iskemik ülserasyonlar görülebilir. Klinik olarak semptom görülmeyen ekstremitede, tüm ekstremiteleri görüntüleyecek şekilde arteriyografi yapıldığı takdirde tutulumu radyolojik olarak görüntüleme oranı düşük değildir.(40)

Bacak ülseri olan ve tromboanjitis obliteransdan şüphelenilen tüm hastalarda dolaşımı değerlendirmek için Allen testi uygulanmalıdır. Pozitifliği skleroderma, CREST sendromu (*calcinosis cutis*, *Raynaud's phenomenon*, *esophageal dysfunction*, *sclerodactyly*, *telangiectasia*) (kalsinosis kutis, Raynaud fenomeni, özefagus disfonksiyonu, sklerodaktili, telenjektazi) gibi küçük damar hastalıklarını da düşündürse bile sigara içicisi genç hastalarda Allen testi pozitifliği tromboanjitis obliterans için yüksek olasılıklı öngörücüdür.

Yüzeyel tromboflebit tromboanjitis obliteransı ateroskleroz ve diğer vaskülitlerden ayırır ve yaklaşık olarak hastaların %40ında görülür. Yüzeyel tromboflebit migratuvar karakterde ve hastalığın başlangıcından önce olabilmekle beraber hastalığın aktivitesi ile paralellik gösterecek şekilde bulunur. Yüzeyel migratuvar tromboflebit ile başvuran hastalarda tromboanjitis obliterans yüksek şüphe ile düşünülmelidir.(34,40) Derin venöz

tromboz ise nadir olarak görülür. Hastalığın alevlenme ve remisyon periyotları ile seyri karakteristiktir.

Lezyonların ampütasyona ilerleme süreci ve sigara içiciliğinin devamı çok güçlü ilişkidirler. Hastalık süreci; sigaradan kaçınılan tüm vakalarda oldukça iyi huylu, progresyon göstermeden seyretmektedir. Hastaların yaşam beklentisi sigara bırakıldığı takdirde normal popülasyona oranla 5 yıllık sağkalımlar %97, 10 yıllık sağkalımlar %94 gibi yüksek oranlarda görülmektedir. (40,41)

TAO beklenen lokalizasyonlar dışında da belirti verebilir, böyle bir klinik tablodan şüphelenildiğinde tanı yalnızca akut lezyonlardan alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesi ile yapılabilir.(42) TAO'nun GİS (gastrointestinal sistem) tutulumu nadir görülür ancak şiddetli periferik arter semptomlarından çok önce kolon perforasyonu ya da kolon striktürü gibi klinik tablolar meydana gelebilir. (43)

Subkutanöz nodüllerden yapılacak olan biyopsiler ile akut faza benzer okluziv trombotik lezyonların görüldüğü, tüm ven duvarını tutan inflamasyon varlığının gösterilebileceği bulgular ile superficial tromboflebit doğrulanabilir.(44)

2.4.5. Tanı Kriterleri

Hastalığın tanısı, semptomlar, muayene bulguları görüntüleme yöntemleri ve yaygın kullanılan bazı tanı kriterlerinin bulunması ile mümkün olabilmektedir. Hiçbiri tek başına tanı koydurmakta yeterli değildir.

Günümüzde en sık kullanılan tanı kriterleri Shinoya tanı kriterleri ve Olin tanı kriterleridir. 1996 yılında Papa ve Adar tarafından da Buerger hastalığı için bir skorlama sistemi belirlenmiştir.(45)

Papa ve Ader Tanı Kriterleri * (1996)

Pozitif Bulgular :

- | | | |
|---------------------|---------------------------------------|--------|
| • Başlangıç yaşı | <30yaş / 30-40 yaş | +2/ +1 |
| • Klodikasyo | Muayene esnasında mevcut/ Geçmiş öykü | +2/ +1 |
| • Üst ekstremiteler | Semptomatik/ Aseptomatik | +2/ +1 |

- Migratuvar SVT Muayene esnasında mevcut/ Geçmiş öykü +2/ +1
- Raynaud RD Muayene esnasında mevcut/ Geçmiş öykü +2/ +1
- Anjiyografi, Biyopsi Tipik bulgular, ikisinde de/ Sadece birinde +2/ +1

Negatif Bulgular :

- Başlangıç yaşı 45-50/ 50 yaş üstü -1/ -2
- Cinsiyet, Sigara Öyküsü Kadın/ sigara içicisi değil -1/ -2
- Lokalizasyon Tek ekstremita/ alt ekstremita tutulmu yok -1/ -2
- Nabız alınması Brakial/ Femoral -1/ -2
- ASO, DM, HT, HL Tanı sonrası 5.1-10 yıl/ 2.1-5 yıl -1/ -2

SVT: Superfisiyal Ven Trombozu, RD: Renk Değişlikleri, ASO: Aterosklerozis Obliterans, DM: Diabetes Mellitus; HT: Hipertansiyon, HL: Hiperlipidemi

Puan Aralığı

- 0-1 puan Tanı dışlanır
- 2-3 puan Şüphelenilir, düşük olasılık
- 4-5 puan Muhtemeldir, orta olasılık
- 6 puan ve üzeri Kati tanı, yüksek olasılık

Tablo 3: Papa ve Ader tanı kriterleri * Papa ve Adar'ın yayınından referans alınarak hazırlanmıştır.(45)

Shinoya (1998) Tanı Kriterleri :

- Sigara içme öyküsü
- 50 yaşından önce başlangıç gösteren iskemi bulguları
- İnfrapopliteal oklüzyon
- Üst ekstremita arterlerinin tutulumu ya da flebitis migrans (*phelebitis migrans*)
- Sigara içiciliği dışında diğer aterosklerotik risk faktörlerinin olmaması

Olin (2000) Tanı Kriterleri :

- 45 yaşın altında başlangıç
- Aktif veya yakın zamanlı tütün kullanım öyküsü
- Klodikasyo, istirahat ağrısı, iskemik ülserler veya gangren eşlik ettiği noninvaziv vasküler testlerle belgelenen distal ekstremitte iskemisinin varlığı
- Otoimmün hastalıklar, hiperkoagülabilitate durumları ve diabetes mellitusun dışlanması
- Proksimal emboli kaynaklarının ekokardiyografi veya arteriyografi ile dışlanması
- Etkilenmiş ve etkilenmemiş ekstremitelerde klinik olarak tutarlı arteriyografi bulgularının bulunması

Buerger hastalığı gözlenen Japon hastaların prevalans ve klinik özelliklerinin Japon Sağlık, Çalışma ve Refah Bakanlığı'na (*Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare-MHLW*) göre analiz edildiği bir başka çalışma ile de tanı kriterleri belirlenmiştir. Klinik kriterlerine göre 129 yeni hasta ve takipteki 3639 hasta değerlendirildiği 2009 yılında yayınlanan bu çalışmada hastalar; cinsiyet, yaş, hastalık başlangıç yaşı, klinik kriterler (yüksek olasılık veya muhtemel), sigara içme alışkanlığı, semptomların şiddeti, iskemik uzuvlar, anjiyografik bulgular, diğer periferik vasküler hastalıklardan ayırıcı tanımlar, tedaviler, mevcut sosyal aktivite, yaşam tarzı açısından değerlendirildi. Tüm tanı kriterlerini karşılayan hastalar kati tanı olarak tanımlandı. Tüm tanı kriterlerini karşılamayan ancak klinik ve radyolojik olarak TAO'dan şiddetle şüphelenilen hastalar olası tanı olarak sınıflandırıldı.(46)

MHLW (*Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare*) tanı kriterleri:

1. 50 yaş öncesi başlangıç
2. Sigara öyküsü
3. Popliteal arter ya da distalinde oklüzyon
4. Arteriyel oklüzyon ya da gezici tromboflebit
5. Hipertansiyon, dislipidemi ya da diyabet tanısı olmaması

Yukarıdaki tanı kriterlerinin hepsinin birarada bulunması ve kollajen doku hastalığını gösterecek bulguların olmaması Buerger tanısı koydurur. Kadın hastalar ve sigara içicisi olmayan hastalar için dikkatli ayırıcı tanı yapılması önerilir.

2.4.6. Laboratuvar Testleri

Tromboanjitis obliterans tanısında kullanılan hiçbir laboratuvar test tanı koydurucu ve hastalığa özgü değildir. Listede belirtilen testlerin istenme amacı ayırıcı tanıda düşünülmesi gereken hastalıkları dışlayabilmektir.(41)

Tromboanjitis Obliterans'ın Önerilen Tanısal Değerlendirmesi (41)

Rutin :

Tam kan sayımı, trombosit sayımı

Karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, idrar tahlili

Açlık kan şekeri

Lipit profili

Zührevi Hastalıklar Araştırma Laboratuvarı (VDRL, *Venerial Disease Research Laboratory*)

Otoimmün incelemeler :

Eritrosit sedimentasyon hızı (ESR, *erythrocyte sedimentation rate*, Westergren)

Romatoid faktör (RF, *romatoid factor*)

Antinükleer antikor (ANA, *antinuclear antibody*)

Antisentromer antikor ve Scl 70 (serolojik belirteçler CREST ve skleroderma için)

Hiperkoagülabilité durumu için incelemeler :

Protein C, S ve Antitrombin III seviyeleri

Antifosfolipid antikor

Faktör V Leiden

Üst ekstremitte lezyonları olan hastalarda el radyografileri (kalsinozu hariç tutmak için)

Segmental arteriyel Doppler dalga formları ve basınçları

ayak parmağı ve parmak pletismografisi

Seçilmiş durumlarda:

Nielsen dijital hipotermik zorlama testi (Raynaud sendromu ayırıcı tanı değerlendirme)

Arteriyografi

Biyopsi (nadiren pratik)

Akut vakalardaki histopatolojik bulgular genellikle tanı koydurucu olmasına rağmen hastada amputasyon zorunluluğu olmadığı takdirde biyopsinin tanıda kullanılması nadiren mümkün olmaktadır. Tarama sonuçlarında normalin dışında değerler ile karşılaşılır ya da hastalığın daha çok üst ekstremitteye sınırlı olduğu görülür ise daha detaylı romatolojik araştırma gerekli olabilir.(41)

2.4.7. Patogenez

TAO yirminci yüzyılın ilk yarısında yüksek oranda teşhis edildi. Her ne kadar spesifik etiyojisine ilişkin belirsizlik hastalığın varlığının bazı kesimler tarafından sorgulanmasına sebep olsa da yapılan biyopsilerdeki ayırt edici özellikler göz önünde bulundurulduğunda hastalığın özgünlüğü şaşırtıcı olarak gözlemlendi.(47) Histopatolojik bulguların diğer vaskülit ya da ateroskleroz vakalarıyla karıştırılmayacağı aşikardır.

Patogenezinde birçok faktör bulunmasına karşın esas olarak, ön planda düşünülen etken tütün maruziyeti olarak düşünülmektedir. TAO'da gözlenen trombotik eğilim, tütün kaynaklı başladığı öne sürülen endotelial hasar sonucu oluşmaktadır. Tütün kullanımı ile trombosit aktivasyonu da gelişir. P-selektin, tromboksan A2 ve serotonin salınımı da artar. Sigara ile uyarılan CD40-CD40L yolağı aracılığı ile plazma homosistein ve trombopoetin düzeyleri artıp lökositöz ile sonuçlanır. Aktiflenen nötrofillerden salınan serbest oksijen radikalleri damar duvar hasarını daha da arttırır. NO bağımlı vazodilatasyonun TAO hastalarında azalmış olduğu gözlenmiştir.(48) Kronik mental stres ve düşük sosyoekonomik düzeyinin de patogenezde rol oynadığı düşünülmektedir.

Leo Buerger hastalığı ilk tanımladıktan sonra yaptığı yeni araştırmalarda, her ne kadar mikroorganizmayı tanımlayamamış olsa da TAO'nun enfeksiyöz bir durum sebebi olabileceğini bildirdi. Yayınlandığı dönemde kabul görmeyen araştırmalar olsa da ilerleyen süreçlerde TAO ve enfeksiyon arasındaki ilişkiyi gösteren birçok makale yayınlandı. TAO'yu diğer damar hastalıkları olan bireylerden ayıran önemli bir fark olarak sigara kullanımı sebebi uygun olmayan ağız hijyeni gösterilmiştir. Ağız içinin lenfatik yapıdan zengin ve geniş fenestasyonlu endoteller ile kaplı oluşu sebebi ile mikroorganizmaların lenfatik damarlara göçü kolaylıkla olabilmektedir Periodontopatik bakterilerin TAO gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği ve terapötik bir hedef olarak göz önünde bulundurulması gerektiği belirtilmiştir. (49) TAO hastalarından alınan arter duvarı biyopsi örneklerinde sağlıklı bireylerde olmayan DNA'nın varlığı gösterilmiştir.

TAO ve koagülasyon sistemindeki bozukluk arasındaki bağlantı birçok çalışmada gösterilmiştir. TAO hastalarında, hastalık olmayan bireylere oranla antifosfolipit antikörlerinin (APLA, *antiphospholipid antibodies*) varlığı belirgin bir şekilde yüksek olarak bulunmuştur. Tıkaçıcı aterosklerotik damar hastalıkları grubu (%8) ve diğer kontrol gruplarına (%2) kıyasla TAO hastalarında, belirgin şekilde daha yüksek antikardiyolipin (aCL, *anticardiolipin*) antikör (%36) oranları görülmüştür. Bu çalışmalarda, görülen yüksek aCL titreleri majör ekstremitte amputasyonları ile ilişkili bulunmuştur. Ancak HBV, HCV, HIV, CMV gibi birçok enfeksiyöz hastalık ve SLE gibi otoimmün hastalıklarda da sekonder yükseklikleri görüldüğünden hastalık ile spesifik korelasyonu net olarak ortaya koyulamamıştır. TAO'nun şiddetli vakalarında, koagülasyon faktörlerindeki artışın daha anlamlı olabileceği ileri sürülmüştür. Koagülasyon ve fibrinoliz faktörlerinin beraber değerlendirildiği bir başka çalışmada D-dimer, tPA (*tissue plasminogen activator*), PAI (*plasminogen activator inhibitör 1*), fibrinopeptid A düzeyleri TAO hastalarında daha yüksek bulundu. Ayrıca incelenen trombus materyallerinde hızlı oluşum, parçalanmaya direnç ve azalmış geçirgenlik gibi istenmeyen sonuçlar görülmüştür. Artmış enflamatuvar cevap ile ilişkili olduğunu düşünülmüştür.(50) Patofizyolojide kinin sisteminin rolünü inceleyen bazı çalışmalar mevcuttur. Kininler vasküler dilatasyon, ödem oluşumu ve nosiseptörlerin uyarılmasını aktive eden akut faz mediyatörlerinin salınımına öncülük ederler. Ayrıca sitokinler, koagülasyon faktörleri, prostaglandinler ve nitrik oksit ilişkili enflamatuvar yanıtın organizasyonu ile ilişkilidirler. (50)

Vasküler endotel hasarının ve disfonksiyonunun TAO patofizyolojisinde belirgin yer tutmakta olduğu morfolojik ve biyokimyasal belirteçler ile gösterilmektedir. TAO hayvan modellerinden alınan örnekler elektron mikroskop altında incelendiğinde lezyon ciddiyeti ve büyüklüğü endotel hasarı ile orantılı olarak gösterilmiştir. TAO hastalarının akut manifestasyonlarından en önemlisi vasküler endotel hasarına cevap olarak gelişen vazospasmdır. Ancak TAOda gelişen endotelial hasarın mekanizması halen net olarak ortaya koyulamamıştır. İleri sürülen mekanizmalar arasında bulunan oksidatif stres, TAO hastalarında sağlıklı sigara içicileri ve sigara içmeyen gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek görülmüştür. Oksidatif stres endotelial NFkB-İnos-NO yolğını aktive edip artmış NO salınımına sebep olmakta, salınan NO süperoksit anyonu ile reaksiyona girip ciddi lipid peroksidasyonu ve endotel duvarında direkt hasra sebep olmaktadır. Aynı zamanda adhezyon molekülleri ve enflamatuvar faktörlerinin salınımına sebep olmaktadır.(51) TAO hastalarında endotel aktivasyonu ile artmış selectin E (endotele lökosit adezyonunu sağlar, enflamatuvar süreç dışında saptanmaz) ICAM-1, VCAM-1 integrinler (lökositlerin endotele yüksek adezyonu) saptanmıştır. Periferik kan örneklerinde artmış IL-6, IL-12 ve azalmış IL-10 ekspresyonu görülmüştür.(51,50) TAOda endotelial hasarı ile ilgili öne sürülen bir diğer mekanizma ise hemodinamik etkidir. Hemodinamik etkide değişiklikler, kan akışının endotel üzerindeki etkisini değiştirir. Hücre üzerindeki G proteinlerin fosforilasyon sürecini aktive edip vasküler endotel hücrelerin yapısal düzenlenmesi ve fonksiyonu üzerinde NFkB sinyal yoluyla aracılığıyla aktive edilmiş olur.(51)

TAO'da endotel hasarına sebep olan oksidatif stresin araştırılıp gözlemlendiği bir başka çalışmada antioksidan kapasiteyi aşacak ölçüde yüksek düzeylerde olan oksidatif stres belirlenmiştir. Dolaşımdaki TOS (*total oxidative status*), TAC (*total antioxidant capacity*) ve CoQ10 (*Coenzyme Q10*) seviyeleri kontrol grubu olan sağlıklı sigara içicilerine oranla anlamlı derecede yüksek olarak saptanmıştır. Yüksek düzeyler ciddi vazokonstrüksiyon ile sonuçlanan, patogenezi tam olarak anlaşılammış bu hastalıkta umut verici bir yolak olarak düşünülebilir. SOD (superoksit dismutaz) ve MDA (malondialdehit) serum düzeyleri sağlıklı sigara içicileriden oluşan kontrol grubuna göre düşük saptanmıştır. MDA seviyelerinin düşüklüğü lipid peroksidasyon ürünlerinin bozmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.(52)

İnfeksiyöz etkenler, koagülasyon sistemindeki bozukluklar, immün mekanizma ve endotel hasarı hipotezleri dışında TAO gelişimini ve mekanizmasını araştıran çok sayıda çalışma literatürde mevcuttur. Bu çalışmalardan biri, güçlü bir vazokonstrüktör olan geniş etki spektrumuna sahip endotelin-1 in hastalığa olan etkisidir. Bu çalışmada plazma endotelin-1 seviyesinin tromboanjitis obliterans semptomlarının alevlenmesinde rol oynayabileceği belirtilmiştir. (53) Yapılan başka bir çalışmada TAO hastalarında yüksek antiendotel hücre antikolarının (AECA) varlığı gösterildi. Bu çalışmalar TAO'nun alerjik, hipererjik immün yanıtı hipotezini destekler niteliktedir. (54) İmmunolojik faktörlerin tavşanlara verilen soluble elastin peptidler (kappa-1 elastin) ile immünizasyon sağlanarak değerlendirildiği bir başka çalışmada ise ilerleyen dönemlerde aort ve akciğer arteriolleinde elastin peptidlerinin fragmantasyonuna sebep olduğu görüldü. Dahası antielastin antikolar arttıkça nekrozun arttığı gözlemlendi. TAO'nun akut fazında yüksek antielastin antikolar olabileceği belirtildi.(55)

İmmun sistem TAO gelişim sürecinde kritik bir yol oynadığı görülmektedir. İmmunolojik veriler hastalığın oluşumu ve seyrini açıklamada elde edilen veriler halen sınırlı olsa da TAO otoimmün bir hastalık olabilir. İncelenen damar öreklerinde antinükleer antikor, antielastin antikor, antikollajen I-III ve immunglobulin IgG, IgC3, IgC4 depositlerinin bulunması bu teoriyi destekler niteliktedir. Bu etkenler göz önünde bulundurulduğunda hücre aracılı fagositozun uyarılması ile oluşan bağışıklık sistemi kpmpleksleri ve nikotin stimülasyonu ile salınan toksinler vasküler hasradan sorumlu esas etkenler olark görülmektedir. Ayrıca bu çalışmada TAO olmayan gruba kıyasla, otoimmün teoriyi güçlendirmek adına değerlendirilen MMP9 aktivitesinin arttığı, TIMP 1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 1*) aktivitesinin ise azaldığı görülmüştür. Bu veriler tütün dumanındaki bileşiklerin MMP-9 aktivasyonunu arttırıp TIMP-1 aktivasyonunu inhibe edebileceğini destekler niteliktedir.(56)

TAO hastalarında faktör V Leiden, protrombin 20210 G /A mutasyonları, hiperhomosisteinemi ve trombosit agregasyon yanıtlarını içeren trombotik risk faktörlerinin etkisi tartışmalıdır.(57,58)

TAO hastalarında yapılan bir başka çalışmada doğal bağışıklık ile ilgili anormal gen ekspresyonun görülmesi bağışıklığı zayıflatıp enfeksiyon yatkınlık oluşturmakta ve TAO oluşumuna sebep olan süreçte rol oynamaktadır.

TAO'da hipersellüler trombus oluşumu ve damar duvar yapısının korunmuş olması iyi bilinmektedir. Hücresel ve humoral immün cevap sonucu oluşan trombotik okluzyon, bir endarterit olarak adlandırılan TAO'da damarın intiması ile sınırlıdır. Intimal inflamasyon sonucu T hücre aktivasyonu ve infiltrasyonu TAO'da erken arter tıkanıklığına yol açan bulgu ile sonuçlanır. TAO'nun tüm patolojik evrelerinde internal elastik lamina ve vasküler duvar anatomisi ateroskleroz ve diğer damar vaskülitlerinin aksine iyi korunmuştur. İnflamatuar hücre infiltrasyonu büyük çoğunlukla intimal tabaka ile sınırlı ve trombus formasyonu içinde bulunur. Buerger tarafından panvaskülit olarak tanımlanan duvar hasarına yol açmayan, tüm katmanlara yayılan hücre infiltrasyonu nadir olarak gözlemlenir.(59)

Endoteli ve diğer damar duvar komponentlerini hedefleyen dolaşımdaki çeşitli otoreaktif antikorlar aktif hastalık ile ilişkiindedir. Yakın tarihli bir yayında immünoadsorpsiyon yöntemi ile dolaşımdan uzaklaştırılan antikorlar sonrasında hastalığın şiddetinde azalma olduğu belirtilmiştir. Her ne kadar genetik test tanı amacıyla rutinde kullanılmıyor ise de MHC class 1 ve MHC class 2 genlerinin etkisi gösterilmiştir.

Histopatolojik bulgular hastalığın bulunduğu evreye göre değişiklik gösterir. TAO arter örneklerinin ,incelendiği bir çalışmada internal elastik laminada ondülasyon, multiplikasyon ve dejenerasyon olduğu gösterildi. Bu gözlemlerden yola çıkıldığında patogenezin erken evrelerinde öncelikli olarak damarın iç katmanları tutulur. (59) En sık olarak hastalığın akut fazında yüzeysel tromboflebit görülen damar biyopsisinde gözlemlenen bulgular tanısaldır. TAO'nun patolojik gelişimi 3 aşama şeklinde kategorize edilmiştir.(60) Akut fazda küçük ve orta boyutlu arter ve venlerde inflamasyon başlar. Akut fazda internal elastik laminanın çoğunlukla CD3+ T hücreler tarafından infiltrasyonu ile giden süreç başlar. Daha az oranda ise CD20+ lenfosit infiltrasyonu görülür. Diğer infiltre eden hücreler gibi dendritik hücreler de tüm katmanlarda görülse de esas olarak intimaya lokalizedir. Akut fazın esas komponentleri tıkaçıcı, yüksek sellüler arteriyel trombus, polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, dev hücre formasyonlar ve mikroabse oluşumu sürecidir. Her ne kadar damarın tüm katmanlarında değişiklik görülebilirse de infiltrasyonun çoğu intima tabakasında görülür. Akut evrede görülen infiltrasyon ve hücresel proliferasyon özellikle venler de tutulduğu takdirde çok belirgindir.(60) Multinükleer dev hücreler görülebilse de majör arteritlerin aksine fibrinoid nekroz ve granuloma gözlenmez. İntermediate ya da subakut fazda okluziv

trombüsün parsiyel rekanalizasyon ile progresif organizasyonu ve mikroabse formasyonlarının kaybolmuş olması gözlenir. Etkilenen damarların iç elastik membranında CD3+ , pan-T hücreleri ve CD4+ T *helper-inducer* hücreler CD20+ pan-B hücreleri içeren enflamatuvar yanıt gösterilmiştir.

Kronik faz ya da *end-stage* lezyonlarda ise rekanalizasyon ile sonuçlanan trombüs organizasyonu, medianın belirgin vaskülarizasyonu ve perivasküler fibrozis gözlemlenir.

2.4.8. Tanı Yöntemleri

Hastalığın patognomik bulguları olmasa da tanısında en yararlı bilgileri sağlayan metod DSA (dijital substraksiyon anjiyografisi) dır. Hastalık daha çok distal dolaşımla sınırlı neredeyse her zaman infrapopliteal ve brakial arter distalinde görülür. Proksimal arterlerin görünümü genellikle normal olmalıdır. Anjiyografi hastalıklı bölge ve tutulum olmayan bölge şeklinde segmental dağılım gösteren tutulumu gözleyebilmeyi sağlamaktadır. Tutulum gösteren damarların çevresinde tirbuşon (*corksrew*), ağaç kökü (*tree root*), örümcek bacağı (*spider's leg*) ya da Martonell'in işareti (*Martonell's sign*) olarak adlandırılan kollateraller görülmektedir.(61)

Bu kollaterallerin genişlemiş vasa vasorumlar olduğu düşünülse de yakın zamanlı yapılmış çalışmalarda bu damarların vasa vasorumlar değil de nervi vasorumlar olabileceği öne sürülmüştür.(62)

Buerger tipi tikanıklıkların and kollaterallerin daha önceden Buerger tanısı olan herhangi bir genç hastada görülebildiği kadar APLA (*antiphospholipid antibodies*) ya sekonder arteriyel oklüzyolar veya popliteal arterin nonaterosklerotik oklüziv hastalıkları gibi hastalıklarda da görülebilmekte olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur.(29)

BT (bilgisayarlı tomografi) ve MRA (manyetik rezonans anjiyografi) tromboanjitis obliterans tanısında doğrudan rol oynamamaktadır. Ancak kullanıldıkları takdirde segmentel stenozları ve kollateral damarları göstermeleri açısından proksimal kaynaklı embolileri ve diğer vaskülitleri dışlamaları açısından yararlı oldukları düşünülmektedir.(64)

2.4.9. Ayırıcı Tanı

Torasik Ootlet Sendromu (TOS): TOS üst ekstremitede semptom ve bulgular ile seyreden nörovasküler demetin torasik çıkım yolunda sıkışması sebebiyle belirti veren bir sendromdur. Nörovasküler demet 3 bileşenden oluşmakta olup sıkışan bileşenin türüne göre nörojenik (NTOS), venöz (VTOS), ve arteriyel (ATOS) türlerinden birinde bulgu verebilir. Vakaların çoğu (%90- %95) nörolojik semptomlar ile kendini gösterir. Vakaların (%5-%10) vasküler tutulum gözlenir. TAO hastalarına benzer şekilde ekstremitte elevasyonu ile kollarda uyuşma ve ağrı görülür.(50)

Periferik Emboli: Bilinen atrial fibrilasyonu olan ileri yaş hastalar ve yakın dönemde MI geçirmiş hastalar sıklık ile doğru tanı alabilir. Aortik ark ve üst ekstremitte anevrizmaları kaynaklı emboliler de nadir değildir. Kol ve parmakları etkileyen ateroemboli aortik arktaki aterosklerotik plak ya da subklaviyen anevrizmadan gelişen trombus sebebiyle olabilir. Sigara içen genç erişkin hastalarda ayırıcı tanı yapılır iken, tanı almamış foramen ovale sebebiyle paradoks emboli kliniği akılda tutulmalıdır.

Popliteal Entrapment Sendromu: Popliteal arterin medialde gastroknemius kasının medial başına doğru yer değiştirmesi sebebiyle görülen bir durumdur. Bu anomali popliteal arter gelişim sürecindeki gecikme sebebiyle ya da gastroknemius kasının medial başının erken migrasyonu sebebiyle görülür. Daha çok genç erkeklerde, intermittan klodikasyon semptomu ile belirti verir. Manyetik rezonans görüntüleme ve arteriyografi kombinasyonu ayırıcı tanıda en uygun yöntem olarak bildirilmiştir.(65)

Takayasu Hastalığı: Hastalarda üst ekstremitte tutulumu yaygındır. Hastaların %53-%98 oranında azalmış ekstremitte nabızları ya da palpe edilemeyen nabızlar mevcuttur. Alt ekstremitelerde görülen klodikasyon, üst ekstremitteye nazaran daha nadirdir.(66) Yaygın olarak aort ve dallarının proksimal bölümleri, subklaviyen arterler daha nadiren de aorta iliyak segmentler ve alt ekstremitte arterleri tutulur. Takayasu hastalığına özgü, inflamasyona sekonder vasküler değişikliklerin görüntüleme çalışmaları ile saptanması ile TAO'dan ayırt edilebilir.

Primer Sistemik Küçük-Orta Damar Vaskülitleri: Lökostoklastik vaskülit olarak da bilinen izole kutanöz damar vaskülitleri TAO'dan farklı klinik prezantasyonu ile ayırt edilir. Deride görülen en yaygın vaskülit şekli olup damar duvarında immün

komplekslerin birikimi ile karakterizedir.(67) Ayak bileği kol indeksi normal olup, ekstremite iskemisi bulguları yoktur. Ekstremitelerde distallerinde görülen nekrotik lezyonlar TAO ayırıcı tanısında akılda bulundurulması açısından önemlidir. Kutanöz poliarteritis nodoza (PAN), TAOdan farklı olarak dizaltı damarlarda okluzyon görülmemekle birlikte livedo reticularis, dizaltına lokalize nekrotik lezyonlar ve eşlik eden artralji, ateş yüksekliği gibi sistemik semptomlar ile ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Tromboflebit bulgusu ile başvuru yapabilen Behçet Hataları eşlik eden oral ve genital ülserler ve artralji bulgularıyla ayırt edilebilir ve ayırıcı tanıda mutlaka akılda tutulmalıdır.

Sekonder Sistemik Vaskülitler: Bu durum, sistemik bağ dokusu hastalıkları, romatoid artrit, SLE (sistemik lupus eritematozus), malign neoplazmlar, enfeksiyonlar (HBV, HCV, HIV), ilaç alerjileri gibi tablolarda advers reaksiyon olarak görülebilir.

Hipotenar *Hammer* Sendromu: Gelişiminde avuç içinin itme, vurma, bükme gibi hareketlerle tekrarlayan kullanım öyüksü mevcuttur. Ulnar aretrin hipotenar bölgedeki yerleşimi sebebi ile tekrarlayan darbelere karşı savunmasızdır. Bu bölgenin tekrarlayan travmatizasyonu ile ulnar veya dijital arterlerde spazm, anevrizma veya okluzyonlar görülebilir. Genellikle başparmak tutulumunun olmadığı, 4. ve 5. parmakların sıklıkla tutulduğu soğukluk, ağrı, parestezi ve atrofik ülserler ile bulgu verir. İlerleyen vakalarda cilt ve parmak nekrozları görülebilir. Allen testi çoğunlukla pozitifdir. Teşhis genellikle ulnar arterde anevrizma ya da tromboz varlığını doğrulayan anjiyografi ile koyulur.

Antifosfolipid Antikor Sendromu: Kazanılmış hiperkoagülabilite durumlarının en yaygın sebeplerinden biridir. Hem arteriyel hem de venöz trombozlar ile seyreder. Sendrom, Lupus Antikoagülan (LA), antikardiyolipin ve beta2glikoproteine bağlanarak in vitro koagülasyonu inhibe eden otoantikorların varlığıyla seyreder. Livedo retikularis en tipikal bulgusudur. Periferik arter trombozları akut veya kronik kritik ekstremite iskemisi bulguları ile semptom verebilir. Beklenmedik bölgelerde tekrarlayan trombozlarda, tekrarlayan düşük öykülerinde ayırıcı tanıda düşünülmelidir.

Persistan Siyatik Arter: İliyofemoral arterlerin embriyogenik gelişimi sırasında başarısızlık olur ise siyatik arter uyluğun esas kanlanması sağlayan arter persistan kalabilir, %0.05 oranında nadir görülen bir durumdur. İnternal iliyak arterden popliteal artere uzanan komplete form ile, küçük kolletareller ile bağlantının kurulduğu inkomplete form arasında değişik varyasyonlarda görülür. Fizik muayenede femoral nabız nonpalpe

ancak poplital nabzılar palpe olarak alınır. Kalça seviyesinde yüzeysel seyrettiğinden oturur pozisyonda travmaya maruz kalabilir. Travma sebebiyle damarda erken aterosklerotik değişiklikler ve anevrizma oluşumu görülebilir. Hastalar genellikle distal emboli veya tromboz ile komplike hale gelir. Tedavisi genellikle femoropopliteal baypas operasyonu ile sağlanır. Özellikle bilateral iliofemoral arter hipoplazisi olan hastalarda brakialarter yaklaşımı ile endovasküler tedavi yapılabilir.(68)

Kalsinozis Kutis: Ciltte kalsiyum tuzlarının birikmesi olarak tanımlanır. Kalsifikasyon, distrofik, metastatik, idiyopatik, iyatrojenik olarak beşe ayrılır. Distrofik form otoimmün hastalıklarla birliktelik gösteren ve en yaygın olan formdur. Dermis ve ciltaltı dokunun küçük ve orta boyutlu arterlerinin tunica mediasının kalsifikasyonudur.(69) Deri lezyonları papül, plak ya da nodul şeklinde görülebilir. Parmakları da içecek şekilde olabilecek cilt nekrozları daha şiddetli vakalarda görülebilir. Teşhis radyografik ve histopatolojik bulgular ile subkutanöz dokuda kalsiyum birikimini gösterilmesi ile koyulabilir.

Frosbites (Donma): Düşük sıcaklıklara uzun süre maruziyet ile meydana gelen, genellikle total vücut hipotermisi sonucu gelişen vücudun distal bölümlerinde ciddi gangrenöz lezyonların oluşumuna sebebiyet verebilen cilt hasarlanmalarındır. Ciddi morbidite sonuçlarıyla seyreden bu termal yaralanmalar tarihsel olarak askeri personelle ilişkilendirilmiş olsa da günümüzde sivil popülasyonda da sıklıkla karşılaşılmaktadır. İntravenöz ilioprost ve intraarteriyel trombolitikler doku kurtarılmasında umut verici sonuçlar ortaya çıkarmıştır.(70)

Kistik Adventisiyal Hastalık: Popliteal arter tutulumunun sıklıkla ve unilateral olduğu, venöz tutulumların da gözlenebileceği vasküler sistemin kistik izole bir hastalığıdır. Eksternal iliak arter ve femoral arterler popliteal arterden sonra lezyonların en sık gözlemlendiği bölgelerdir. Daha çok genç erkek, aterosklerotik risk faktörlerinin olmadığı, ani başlangıçlı klodikasyon ile gelen hastalarda ayırıcı tanı olarak hatırlanmalıdır. Zamanla genişleyen kistler arteriyel lümenine bası yapıp, tromboz olmaksızın fonksiyonle bir tıkanmaya sebebiyet verirler. Uzun süreli bası sonrası trombus oluşumu da meydana gelebilir. Popliteal ve safen ven tutulumu derin venöz sistem trombusu şeklinde klinik bulgu verebilir. Doppler USG sonrası yapılacak olan BT ya da MR görüntüleme tanıda en iyi yöntem olarak görülmektedir.

Psödoksantoma Elastikum: Erken ve diffüz arteropati ile bulgu veren, cilt ve kardiyovasküler sistem tutulumu ile seyreden (arteriyel stenoz ve intermittant klodikasyon) geleneksel risk faktörleri yokluğunda düşünülmesi gereken bir hastalıktır. Orta ve küçük boyutlu damarlar aorttan sıklıkla tutulur.

İlaç İlişkili Arteriyopatiler: İlaçlar; direkt toksisite, yüzey gerilimi (*shear stress*), immün aracılı vaskülit gibi çeşitli mekanizmalar ile vasküler sistem hasarına sebebiyet verebilirler. Klinik semptom ve bulgular kendini sınırlayan cilt lezyonlarından multiorgan yetmezliğine kadar geniş bir aralıkta olduğundan ayırıcı tanıda akılda tutmak zor olabilir. En yaygın cilt lezyonu alt ekstremitelerde palpabl purpura olarak başlayan, düzgün sınırlı ağrılı ülser lezyonlardır. Lezyonların lokalizasyonu multisentrik ve arteriyel ya da venöz yerleşimler için atipiktir. Ciddi vazospazma yol açabileceği bilinen ilaçlar en yaygın olarak epinefrin, norepinefrin, sempatomimetik aminler ve yüksek doz dpamin uygulamalarıdır. Metamfetamin ve kokain kullanımı şiddetli vazospazm ve miyokard enfarktüsü ile ilişkilendirilmiştir. Kokain kullanımının venöz ve arteriyel tromboz ile ilişkisi bilinmektedir. Beta blokörler daha ılımlı bir vazospazma sebep olmakla beraber Reynaud fenomenini şiddetlendirebilirler. Orta dereceli vazospazm ilaç tedavisinin kesilmesi ile tedavi edilebilir. Şiddetli ekstremitte vazospazmında nifedipin ve nitroprussid gibi vazodilatörler kullanılabilir.

Radyasyon Arteriti: Maligniteler için uygulanan radyasyon sebepli komşu büyük arterlerde klinik olarak anlamlı olabilecek düzeyde inflamasyon ve fibrozis ile başlayan oklüzyonlar, nadiren anevrizmalar görülebilir. Erken dönemde görülen endotel hasası, intimal kalınlaşma, damar düz kas hücrelerinde görülen fibrozis gibi histopatolojik değişiklikler zamanla ateroskleroz oluşum sürecinin hızlanmasına ve ciddi darlığa sebebiyet verecek bulgular gelişimine yol açar. Arter duvarının tüm katmanları tutulur. Adventisyanın fibrozisi ile vasa vasorumlarda oklüzyon gelişir. Hastalar ateroskleroz bulgularına benzer semptomlar ile başvururlar. Akut vasküler embolizasyon ile gelişen ekstremitte iskemileri görülebilir. Anjiyografide fragil, atheromatous lezyonlar ile tanı koyulabilir. Radyasyon arteriti invaziv meme kanseri olgularında PMRT'yi (postmastektomi radyasyon terapi) takiben üst ekstremitte iskemi bulguları ile başvuran hastalarda düşünülmalıdır. Radyasyon maruziyetinden hemen sonra görülebileceği gibi yıllar sonra da görülebilir. Subklaviyen ya da aksiller arterlerinde radyasyon arteriti

bulguları ile başvuran hastaların müdahale endikasyonları ateroskleoz olgularıyla benzer şekilde anatomik lokalizasyon, semptom şiddeti ve prognoza bağlı olarak belirlenir.(71)

2.4.10. Tedavi

TAO'nun tedavisinde esas; tütün kullanımının bırakılmasıdır. Tütün kullanımını bırakan hastalarda hastalığın remisyon sürecine geçilmesi ve ampütasyondan uzak kalınabilmesi etkileyicidir. Cerrahi müdahalenin yapılabileceği uygun hedef damar olmadığından tedavide cerrahinin yeri sınırlı, sıklıkla eşlik eden migratuvar tromboflebit sebebiyle otojen ven kaynakları uygun değildir.(72) Özellikle eşlik eden Raynaud fenomeni mevcut ise kalsiyum kanal blokerleri ve diğer vazodilatörler tedavide kullanılabilir. Ağrı ve iskemik komplikasyonların tedavisinde intravenöz ilioprost kullanılabilir.

Deneysel olarak intramusküler VEGF (*vascular endothelial growth factor*, vasküler endotelial büyüme faktörü) tedavide kullanılmıştır.(72) Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada intravenöz ilioprostun Buerger hastalığında istirahat ağrısını önlemek ve iskemik ülserleri iyileştirmek için aspirinden daha etkili olduğunu ancak oral ilioprostun aynı etkinlikte olmadığını göstermiştir. Aynı çalışmada düşük kanıt düzeyi ile ülserleri iyileştirmek ve ağrıyı gidermek açısından prostasiklin ve prostaglandin analogu alprostadil arasında fark gösterilmemiştir.(73)

Çok düşük kaliteli kanıtlar ile desteklenen bulgular ile Buerger Hastalığında ülserlerin iyileşmesi ve ağrısız yürüme mesafesinin artırılmasında kemik iliğ kaynaklı kök hücrelerin kullanımının etkisi olabileceğini düşündürmektedir.(74)

2.5. Levosimendan

Levosimendan; kalsiyum duyarlaştırıcı olarak görev yapan inotropik bir ajandır. Troponin C'nin kalsiyuma duyarlılığını hücre içi kalsiyum düzeyini arttırmadan, iskemiye şiddetlendirmeden sağlayıp, kardiyak ön yük ve art yük düşürücü inodilatör olarak çalışır.(75)

2.5.1. Levosimendan Farmakolojik Özellikleri

Levosimendan; farmakolojik etkinliğini 3 yolak üzerinden gösteren esasen dekompanze kalp yetersizliği tedavisinde endike olan bir inodilatördür. Etki mekanizmalarından ilki myokardiyal hücrelerde troponin C nin kalsiyuma duyarlılığını arttırmak ve cAMP bağımsız bir inotrop etki yaratmak, ikincisi damar düz kas hücrelerinde adenozin trifosfat sensitif potasyum kanallarının (KATP kanalları) açılmasını sağlamak ve sonucusu ise kardiyak mitokondride KATP kanallarının aktivasyonu ile hücreleri iskemi/ reperfüzyon hasarına karşı korumak.(75) Teorik olarak bu ajan hücre içi kalsiyum ve cAMP seviyelerini arttırmaksızın kardiyak performansı iyileştirdiklerinden, cAMP bağımlı ajanların olumsuz etkilerini taşımadıkları düşünülmektedir.(76)

Klasik inotropik ajanların tümü, serbest sitozolik kalsiyumda artış ile kasılma gücünü artırır iken myokardiyal oksijen tüketiminde artışa sebep olur. Bu durum oksijen sunumu oldukça sınırlı olan son dönem kalp yetersizliği hastalarında istenmeyen bir etkidir.(77) Levosimendan diyastolik fonksiyonu etkilemediği ve myokard oksijen tüketiminde artışa sebep olmadığından hemodinamik instabil hastalarda kullanımı milrinon ve dobutamine göre daha güvenlidir.(78)

Levosimendan vazodilatasyon etkisini, fosfodiesteraz III (PDEII) inhibisyonu, intrasellüler serbest Ca azaltılması, KATP kanallarının açılması ve damar düz kasında kasılma proteinlerinin duyarsızlaştırılmasıyla gösterir. Levosimendanın insan internal mammarian arterlerinde (IMA) vazodilatasyon yaptığı gösterilmiştir.(79) Ca aracılı vazodilatör yanıtın metabolizması orantılı bir intrasellüler Ca azalması olmadan da gerçekleşebilir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda levosimendanın antiagregan etkisinin olabileceğine dair yayınlarda, levosimendan konsantrasyonun trombosit agregasyon inhibisyonu ile ilişkili olduğu gösterildi. (80) Yapılan başka bir çalışmada ise levosimendanın trombosit agregasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gösterildi.(81) Levosimendanın trombositler üzerindeki etkisi ile ilgili çelişkili yayınlar olması üzerine yapılan randomize klinik çalışmaların sonuçlarının yer aldığı bir raporda mevcut veriler ile levosimendanın trombositler üzerindeki etkinliğine net olarak ulaşılamayacağı, bu etkinin değerlendirilebilmesi için antiplatelet tedavi ve

levosimendanın birlikte kullanıldığı hastaların değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç duyulduğu belirtildi.(82)

2.5.2. Levosimendan Farmakinetik Özellikleri

Levosimendan orta derecede lipofilik ve zayıf asidik özellik gösterir, %98 oranda plazma proteinlerine bağlanır ve atılım öncesi tamamen metabolize olur. Dozun yaklaşık %5'i bağırsaklarda 75-80 saatlik yarıömre sahip, oldukça aktif bir metabolitine çevrilir. Levosimendanın kendisinin eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 1 saattir. Bu aktif metabolit infüzyonun sona ermesinden 2 gün sonra pik plazma konsantrasyonuna ulaşır ve levosimendanın kendisine benzer hemodinamik etkileri sergiler. Uzun yarılanma ömrü nedeniyle bu hemodinamik etkiler 7 ila 9 gün arası devam eder.(83) Levosimendanın esas etkisi yarılanma ömrü 75-80 saat olan aktif metaboliti OR-1896 ile olur. İntravenöz yolla uygulanmasına rağmen, ince barsakta ekskrete edillir ve barsak bakterileri tarafından OR-1855'e indirgenir. Bu metabolit asetilasyon yolu ile OR-1896'ya metabolize edilir. Dolaşımdaki metabolitler OR-1855 ve OR-1896 yavaşça oluşur ve maksimum konsantrasyonlarına 24 saatlik infüzyonu doldurduktan sonra ulaşırlar.(84)

2.5.3. Levosimendan Endikasyonları

Levosimendan ilk olarak 2000 yılında akut dekompanze kronik kalp yetersizliği tedavisi için kullanım onayı aldı. Sonraki 20 yıl içinde kalsiyum duyarlaştırıcı yönüyle kardiyak kontraktileteyi arttıran, ATP bağımlı potasyum kanallarının açılması yolu ile vazodilatasyonu sağlayan bu inodilatör çoğu Avrupa Birliği ve Latin Amerika ülkeleri otoriteleri tarafından onaylanmıştır. Kullanım alanı kardiyojenik şok, takotsubo kardiyomiopatisi, ileri kardiyak yetersizlik, sağ ventrikül yetersizliği, pulmoner hipertansiyon, kardiyak cerrahi olarak genişletilmiştir. Levosimendan ABD'de (Amerika Birleşik Devletleri) halen aktif klinik değerlendirme aşamasındadır.(85)

Levosimendan kullanımındaki klinik deneyimlerin artması, levosimendanın perioperatif hemodinamik destek sağlanması amacıyla ve akut dekompanze kalp yetersizliği ile sonuçlanabilecek sağ ventrikül yetersizliği, kardiyojenik şok, multiorgan yetersizliği ve kardiyorenal sendrom gibi bir dizi klinik durumda destek olarak kullanılmasını sağlamıştır. Çalışmalardan elde edilen kanıtlar neticesinde kalp cerrahisi sonrası kardiyojenik şok veya ECMO'dan (*extracorporeal membrane oxygenation*)

ayrılan hastalarda kısa süreli sağkalım açısından dobutamine üstün olabileceğini düşündürmektedir.(86)

2.5.4. Levosimendan Kontraendikasyonları

Ventrikül doluşu ya da çıkış yolunu etkileyen belirgin mekanik obstrüksiyon, ciddi böbrek yetmezliği, ciddi karaciğer yetmezliği, ciddi hipotansiyon, taşikardi ve Torsade de Pointes geçmişı olanlarda kullanılmamalıdır.(87)

2.5.5. Levosimendan Yan Etkileri

En sık görülen yan etkileri baş ağrısı, hipotansiyon, bulantı sersemlik hissi, taşikardi olduğu tesbit edilmiştir. Kalp hızı üzerine etkisi doza bağlıdır ve yüksektir. Bu durum koroner arter hastalarında kullanımda önem kazanır.(88)

3 - GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araştırma Planı:

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal incelemeler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda ve histopatolojik incelemeler İstanbul Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda yapılmıştır. Çalışma öncesinde, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun (B. V. Ü. HADYEK), 22.02.2021 tarihli oturumunda onay alındı.(Ek-1) Çalışma için İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi kapsamında destek sağlanmıştır. (BAP Proje ID: 37603)(Ek-2)

Proje için ortalama ağırlıkları 280-320 gr olan 24 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan rastgele 4 guba ayrılarak deney planlanmıştır. Tüm sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol grubu (cerrahi girişim yapılmış ancak işlem yapılmamış), 2. Grup TAO grubu, 3.grup TAO + düşük doz Levosimendan, 4. Grup TAO + yüksek doz Levosimendan grubu.

3.2. Kullanılan Gereç ve Maddeler

- 1- MMP-3 Antibody
- 2- MMP-9 Antibody
- 3- Rat High Mobility Group Protein B1 (HMGB1) ELISA kit
- 4- Rat Thoromboxane B2 (TXB2) ELISA kit
- 5- Rat 6-ketoprostoglandin F1-alfa (6K-PGF1-alfa) ELISA kit
- 6- Rat RAGE ELISA kit
- 7- Rat Endothelin-1 (ET-1) ELISA kit
- 8- ICAM-1 Antibody

- 9- VCAM-1 Antibody
- 10- Pipet takımı (Eppendorf)
- 11- 1.5 ml Microcentrifuge Tube, Clear, Dnase-Rnase Free
- 12- Lam Pozitif Yüklü
- 13- THOMA LAMI
- 14- Doku takip kasedi
- 15- Phosphate buffered saline (PBS)
- 15- Mayer's Hematoxylin
- 16- Citrate Buffer Ph 6.0
- 17- Aqueous Mounting Medium (Low Viscosity)
- 18- Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan 2,5 mg/ml, 5ml)
- 19- Sodium Laurate (Sodium dodecanoate, Sigma Aldrich®)
- 20- Ketamin Hidroklorür (Ketalar®, Pfizer, İstanbul, Türkiye)
- 21- Ksilazin Hidroklorür (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya)
- 22- Işık Mikroskobu
- 23- Dijital Fotoğraf Makinesi
- 24- Spektrofotometre (Ultrospec 2000 / Pharmacia Biotech)
- 25- Mikrosantrifüj (Biofuge / Heraeus Instruments)
- 26- Masaüstü soğutmalı santrifüj (Megafuge 1.0 R / Heraeus Instruments)
- 27- Thermo Electron Corporation Fluoroskan Ascent FL
- 28- pH metre (HI 9321 microprocessor pH meter)
- 29- Su banyosu (Electromag)
- 30- Vorteks (Ika MS2 Minishaker)

- 31- Manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı (Ika Labortechnik)
- 32- Hassas terazi (AND HR-120)
- 33- ELISA mikroparka okuyucusu (Bio-tek Elx-800 ve μ Quant)
- 34- Windows işletim sistemi ile çalışan ve içinde IBM SPSS Statistics 22 (*Statistical Package for Social Sciences*) program paketi (SPSS for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL) yüklü kişisel bilgisayar

3.3. Anestezi ve Cerrahi Prosedür

Tüm sıçanlar deney öncesi hassas terazide tartılıp, ağırlıkları kayıt altına alınmıştır. İntraperitoneal 50-60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 5mg/kg Ksilazin Hidroklorür (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) uygulanması sonrası anestezi derinliği her 15 dakikada bir, kuyruktan ağrı verilerek değerlendirilmiştir. Bu dozun 1/3ü gerektiğinde intramusküler olarak tekrarlanmıştır. Cerrahi girişim, enjeksiyonlar ve kan alınması anestezi altında yapılmıştır. Anestezi süresince denekler solunum desteğine ihtiyaç duyulmadan, oda havasında izlenip deney sırasında gelişebilecek hipotermiyi önlemek amacıyla, cerrahi girişim ısıtıcı lamba altında yapılmıştır. Vücut sıcaklığı rektal termometre ile ölçülerek 37° C civarında tutulmuştur.

3.4. Deney Modeli

Tüm sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol grubu (cerrahi girişim yapılmış ancak işlem yapılmamış), 2. Grup TAO grubu, 3.grup TAO + düşük doz Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan), 4. Grup TAO + yüksek doz Levosimendan. Tüm sıçanlar deney öncesi hassas terazide tartılıp, ağırlıkları kayıt altına alındı. İntraperitoneal 50-60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Parke-Dawis, Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 5mg/kg Ksilazin Hidroklorür (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya) uygulanması sonrası anestezi derinliği her 15 dakikada bir, kuyruktan ağrı verilerek değerlendirildi. Bu dozun 1/3ü gerektiğinde intramusküler olarak tekrarlandı.

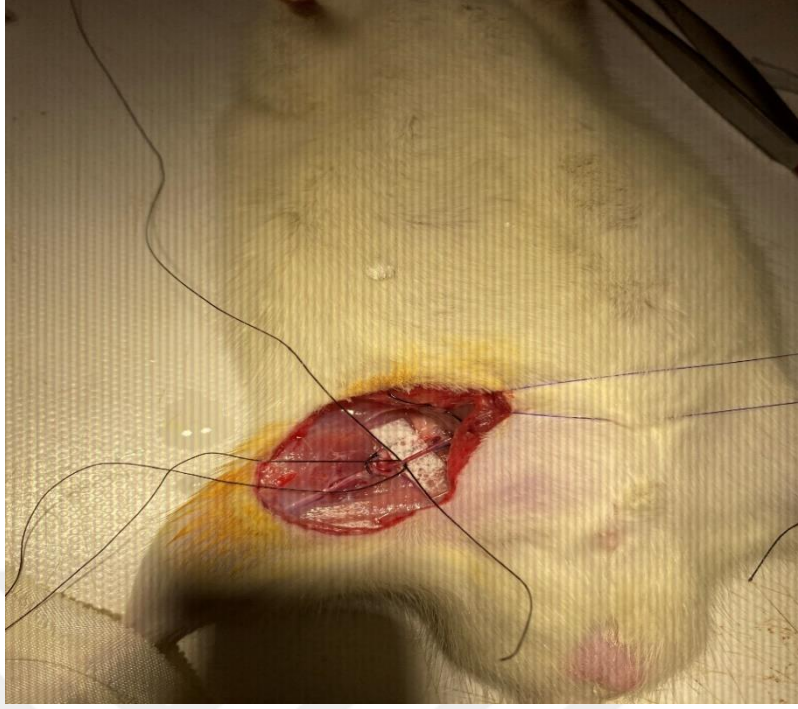
Sıçanlar supin pozisyonda ameliyat masasına alındı. Tüm sıçanların sağ arka bacakları tıraş edildi. Femoral arter cerrahi insizyon kullanılarak açığa çıkarıldı. Femoral

arter proksimaline koyulan arteriyel atravmatik bulldog bir klemp ile femoral arterin kan akımı engellendi. Ardından 1. Gruba 0,1 cc salin enjekte edilip kapatıldı. 2., 3. ve 4. Gruptaki tüm hayvanlara 10mg/cc de olacak şekilde ayarlanmış olan Sodium Laurate-salin solüsyonundan her hayvana 0,1 cc olacak şekilde enjekte edildi. Arteriyel klemler 15 dk bekletildikten sonra kaldırıldı.



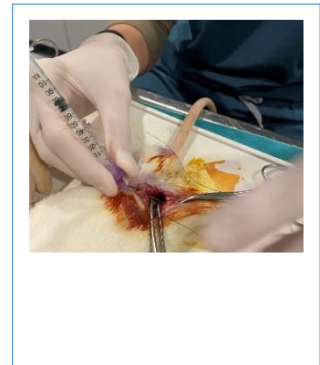
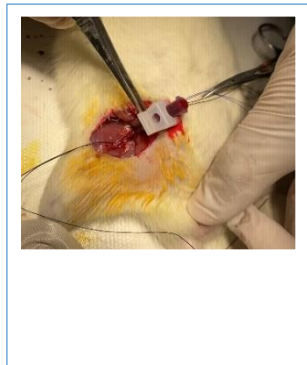
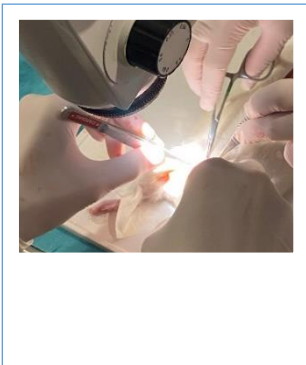
Şekil 4: Anestezi verilen sıçanlar

Cerrahi alan enfeksiyonunu önlemek için tüm gruplara işlem öncesi 15-25mg/kg Sefazolin intramusküler olarak verildi. 3. ve 4. Gruptaki sıçanlara Sodium Laurate injeksiyonunu takiben 2. Saatte Levosimendan düşük doz (12 mcg/kg %0,5 dekstroz 10cc ile) ve Levosimendan yüksek doz (24 mcg/kg %0,5 dekstroz 10cc ile) intraperitoneal enjekte edildi. Sonraki 7 gün boyunca Levosimendan uygulaması (düşük doz Levosimendan grubu ve yüksek doz Levosimendan grubu için) aynı doz ve uygulama şekli ile devam edildi.



Şekil 5: Sıçanların sağ femoral arterlerinin bulunması

1 hafta boyunca yapılacak günlük gözlemler ile TAO oluşumu tüm sıçanslar için sınıflandırıldı.



Şekil 6: Sıçanların femoral arterlerinin kanülasyonu ve sodium laurate enjeksiyonu

3.5. Morfolojik Skorlama

TAO oluşumunda kullanılacak morfolojik sınıflama literatür bölümünde belirtilmiş makalelerden örnek alınarak hazırlanmıştır.(17)

0: Normal görünüm

I: Tırnak renginde değişiklik

II: Parmak renginde değişiklik

III: Ekstremitenin gangreni

IV: Ekstremitte kaybı ya da mumyalaşması.(17)

Doz belirlenmesi ile ilgili yararlandığımız makalede makroskopik olarak lezyonların boyutu kabaca doz bağımlı olarak belirlenmişti. Ekstremitte başına 0,5 mg Sodium Laurate uygulandığı takdirde lezyonlar genellikle parmakların tırnak kısımları ile sınırlı ve otoamputasyon görülmemiştir. Ekstremitteye 10 mg kadar yüksek bir doz uygulandığında ise lezyonlar tüm bacakta hızla gelişip 2-5 gün arasında ekstremitede otoamputasyon görüldü.(13) Ekstremitede TAO oluşumunu sağlamak için uygulayacağımız Sodium Laurate dozunu 0,1 cc (1mg) olarak belirledik.(13)



Şekil 7: TAO grubu; Postop 30. dakika, 1.gün ve 3. Gün

TAO grubunda otoamputasyon oranı düşük doz ve yüksek doz grubuna kıyasla daha yüksek olarak gözlemlendi. Kontrol grubunda ise herhangi bir iskemi bulgusuna ve otoamputasyona rastlanmadı.

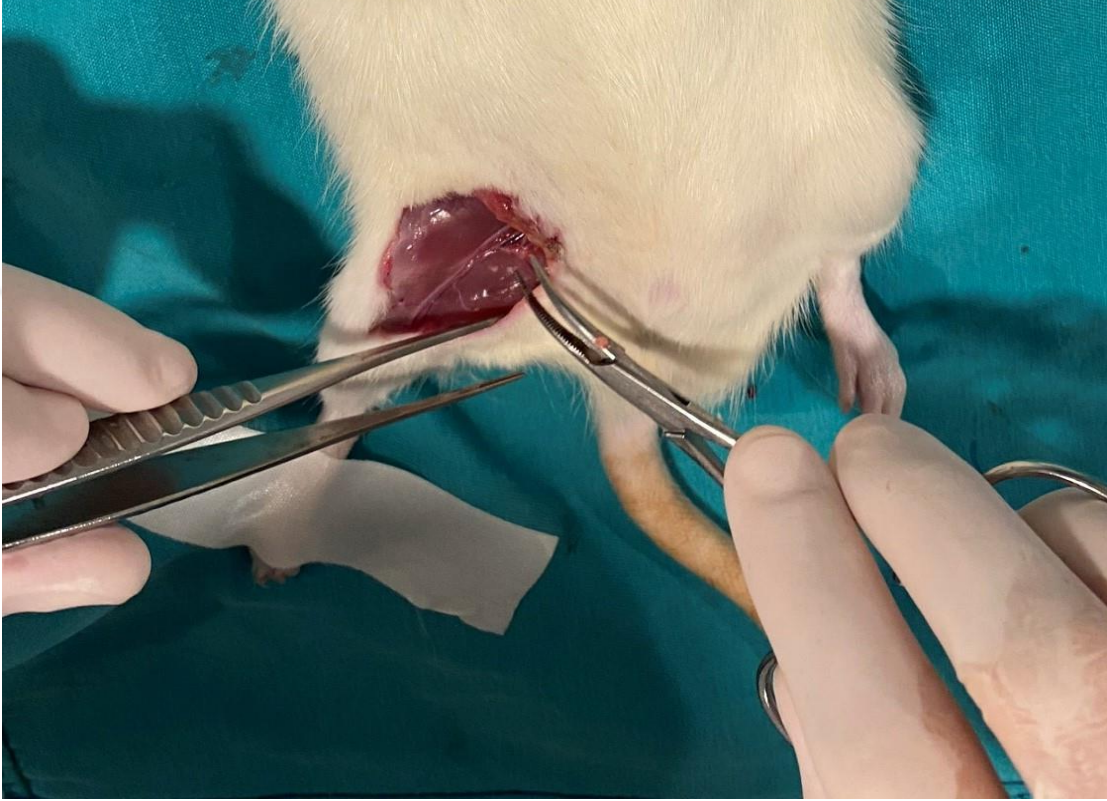
TAO grubunda genel olarak morfolojik skorlama III ve IV olarak görülür iken, tedavi gruplarında ekstremitelerde gangreni görülmedi. Yapılan günlük gözlemlerde tedavi grubunda renk değişikliği 5-7. günler arasında koyu mordan açık mor pembeye dönüş olarak gözlemlendi. Düşük dozda morfolojik değişiklikleri daha belirgin olduğu gözlemlendi.



Şekil 8: Otoamputasyon görülen ekstremitede

1 hafta sonra tüm hayvanlar sakrifiye edilmek üzere tekrar anestezi altına alındı. Hayvanların femoral arterleri diseke edilip, immünohistokimyasal çalışmalar için formalin ile oda sıcaklığında saklanıp sonrasında dokular parafine gömüldü. Mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alınıp ve Hematoksilen&Eozin boyası ile boyamaları

yapıldı. İmmunohistokimyasal olarak MMP-3, MMP-9 intracelluler adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) bakıldı.



Şekil 9: Sıçanların femoral arterlerinin çıkarılması

Hayvanlardan alınan kan örnekleri biyokimyasal inceleme için santifrüjlenip (300 rpm 15dk) -80 C⁰ derecede biyokimyasal incelemeler için saklandı. Biyokimyasal analiz ile plazmada RAGE (*receptor for advanced glycationend prouducts*), Endotelin 1 (ET1), TXB2 (tromboksan B2), 6-ketoprostoglandin F1-alfa (6K-PGF1-alfa), HMGB1 (*high mobility group box protein 1*) düzeyleri ELISA yöntemi ile bakıldı.

3.6. Biyokimyasal İncelemeler

Serum Örneklerinin Elde Edilmesi

Sıçanlar uygulamaların bitiminde bir gece aç bırakıldıktan sonra sodyumtiyopental (50 mg/kg; intraperitoneal) anestezisi altında kalplerinden kuru tüplere kan alınarak sakrifiye edildi.

Pıhtılaşmasını tamamlayan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi. Elde edilen serumlar porsiyonlara ayrılarak çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

Elde edilen örneklerde RAGE (*receptor for advanced glycationend prouducts*), Endotelin 1 (ET1), TXB2 (tromboksan B2), 6-ketoprostoglandin F1-alfa (6K-PGF1-alfa), HMGB1 (*high mobility group box protein 1*) düzeyleri ELISA yöntemi ile bakıldı.

Serum Örneklerinde Belirleyici Düzeylerinin Ölçümü

A- Serum RAGE (*Receptor for Advanced Glycationend Prouducts*) Düzeyinin Ölçülmesi

Serum örneklerinin RAGE düzeyleri İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sandviç ELISA prensibine dayanan My Biosource marka (San Diego, USA, katalog no: MBS-177329) ticari kitler ile Eon-Biotek marka (Winooski/USA) mikroplaka spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar pg/ml olarak verilmiştir.

B- Serum Tromboksan B2 Düzeyinin Ölçülmesi

Serum örneklerinin Tromboksan B2 düzeyleri İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sandviç ELISA prensibine dayanan My Biosource marka (San Diego, USA, katalog no: MBS-2601763) ticari kitler ile Eon-Biotek marka (Winooski/USA) mikroplaka spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar pg/mL olarak verilmiştir.

C- Serum Endotelin-1 Düzeyinin Ölçülmesi

Serum örneklerinde Endotelin-1 düzeyi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sandviç ELISA prensibine dayanan My Biosource marka (San Diego, USA,

katalog no: MBS-2880211) ticari kitler ile Eon-Biotek marka (Winooski/USA) mikropilaka spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar pg/mL olarak verilmiştir

D- Serum 6-ketoprostoglandin F1-alfa Düzeyinin Ölçülmesi

Serum örneklerinde 6-ketoprostoglandin F1-alfa düzeyi, İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sandviç ELISA prensibine dayanan My Biosource marka (San Diego, USA, katalog no: MBS-9304572) ticari kitler ile Eon-Biotek marka (Winooski/USA) mikropilaka spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar pg/ml olarak verilmiştir.

E- Serum Örneklerde HMGB1 (*High Mobility Group Box Protein 1*) Düzeyinin Ölçülmesi

Serum örneklerinde IL-1 β düzeyi, İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında sandviç ELISA prensibine dayanan My Biosource marka (San Diego, USA, katalog no: MBS-765190) ticari kitler ile Eon-Biotek marka (Winooski/USA) mikropilaka spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Sonuçlar pg/ml olarak verilmiştir.

Yöntemin prensibi

Yöntem, ELISA prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde ilgili parametrelere özgü spesifik antikorla kaplanmış kuyucuklar kullanılmaktadır. Hasta örneklerinde bulunan analit, kuyucuklardaki spesifik antikora bağlanır. Daha sonra biotinle işaretlenmiş antikor eklenir ve analite bağlanır. Böylece antikor-antijen-antikor sandviç kompleksi oluşur. Streptavidin-HRP işaretli antikorlar ortama eklenir ve biotinle işaretlenmiş olan antikora bağlanır. Kuluçka süresinden sonra yıkama yapılarak ortamdaki bağlanmamış Streptavidin-HRP uzaklaştırılır. Ortama HRP substratı eklenir. Gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu oluşan renkli ürün miktarı örnekteki analit yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Asidik durdurma çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulur. 450nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Testlerin Performans Özellikleri

RAGE (*receptor for advanced glycationend prouducts*), Endotelin 1 (ET1), TXB2 (Tromboksan B2), 6-ketoprostoglandin F1-alfa (6K-PGF1-alfa), HMGB1 (*high mobility group box protein 1*) test kitlerinin üretici firmalar tarafından verilen performans özellikleri aşağıda listelenmiştir:

- **RAGE:**

- Hassasiyet: Ölçülebilen minimum serum konsantrasyonu 10 pg/mL'dir.
- Intra-assay CV: %5.5
- Inter-assay CV: %6.5
- Ölçüm aralığı: 78 – 5000 pg/mL

- **Endotelin-1**

- Hassasiyet: Ölçülebilen minimum konsantrasyon 2.351 pg/mL'dir.
- Intra-assay CV: %5.2
- Inter-assay CV: %9.6
- Ölçüm aralığı: 4.69-300 pg/MI

- **Tromboksan B2**

- Hassasiyet: Ölçülebilen minimum serum konsantrasyonu 5 pg/mL'dir.
- Intra-assay CV: %8
- Inter-assay CV: %12
- Ölçüm aralığı: 15.6-1000 pg/MI

- **6K-PGF1 alfa**

- Hassasiyet: Ölçülebilen minimum serum konsantrasyonu 2 pg/mL'dir.
- Intra-assay CV: %15
- Inter-assay CV: %15
- Ölçüm aralığı: 15.6-500 pg/mL

- **HMGB1**

- Hassasiyet: Ölçülebilen minimum konsantrasyon 18.75 pg/mL'dir.
- Intra-assay CV: %8
- Inter-assay CV: %10
- Ölçüm aralığı: 31.25-2000 pg/mL

3.7. Histopatolojik İncelemeler

Elde edilen materyal 3 gün süre ile %10 oranında tamponlanmış formalinde fikse edildi. Daha sonra tüm femoral arterlerden 2mm kalınlığında enine kesitler alınarak rutin doku takibinden geçirilip parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan elde edilen 3 µm kalınlığındaki kesitler Hematoksilen Eozin ile boyanıp (Olympus BX60, Tokyo, Japonya) ışık mikroskobu ile incelendi.

İmmunhistokimyasal olarak ICAM-1 SC-8439 Lot #G2420, VCAM-1 SC-18864 Lot #B0520, MMP3 SC-21732 Lot#B0121, MMP9 SC39385 Lot#C2421 primer antikorları ile boyamalar yapıldı.

3.8. İstatiksel Analiz: İstatistiksel değerlendirmede SPSS paket programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama±SD olarak verildi. Grup dağılımları Kolmogorov-Simirnov testi ile belirlendi. ANOVA (post-hoc Tukey) veya Kruskal-Wallis (post-hoc Mann-WHITNEY U) testi kullanıldı.

4 - BULGULAR

Çalışmamızda Sodium Laurate ile Tromboanjitis Obliterans modeli oluşturulan sıçanlara uygulanan Levosimendan tedavisinin serum ve damar dokusunda biyokimyasal ve immünohistokimyasal yollar üzerinden etkinliği araştırıldı. Bu amaçla alınan serum örneklerinde RAGE, Endotelin-1 ,TXB2, 6K-PGF1-alfa, ve HMGB1 düzeyleri ELISA yöntemi ile damar duvarında immünohistokimyasal olarak da MMP3, MMP9, ICAM, VCAM düzeyleri bakıldı.

4.1. Serumda Elde Edilen Bulgular

a) TAO oluşturulan sıçanların serum örneğinde kontrol sıçanlara göre, RAGE % 51; Endotelin-1 %58; Tromboksan B2 %57 oranında artış, buna karşılık 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı.

b) TAO+DD tedavi grubu serum örnekleri, kontrol grubundaki sıçanlar ile karşılaştırıldığında RAGE, Endotelin-1,Tromboksan B2, 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı. Oysa; TAO oluşturulan sıçanlara göre; RAGE %43; Endotelin-1 %80; Tromboksan B2 %57 oranında azalış, buna karşılık 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı.

c) TAO+YD tedavi grubunda, kontrol grubundaki sıçanlar ile karşılaştırıldığında Endotelin-1 düzeylerinde anlamlı bir artış görülürken, RAGE, Tromboksan B2, 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı.

TAO oluşturulan sıçanlara göre; RAGE %57; Tromboksan B2 %67 oranında azalma, buna karşılık Endotelin 1, 6K-PGF1-alfa ve HMGB1 düzeylerinde bir değişiklik saptanmadı (Tablo 1 ve Şekil10).

Tablo 1: TAO oluşturulan sıçanlarda Levosimendan uygulamasının serumda RAGE (receptor for advanced glycationend proudocts), Endotelin-1, Tromboksan B2, 6K-PGF1-alfa, HMGB1 (high mobility group box protein 1) düzeyleri üzerine etkisi (Ortalama±SD)

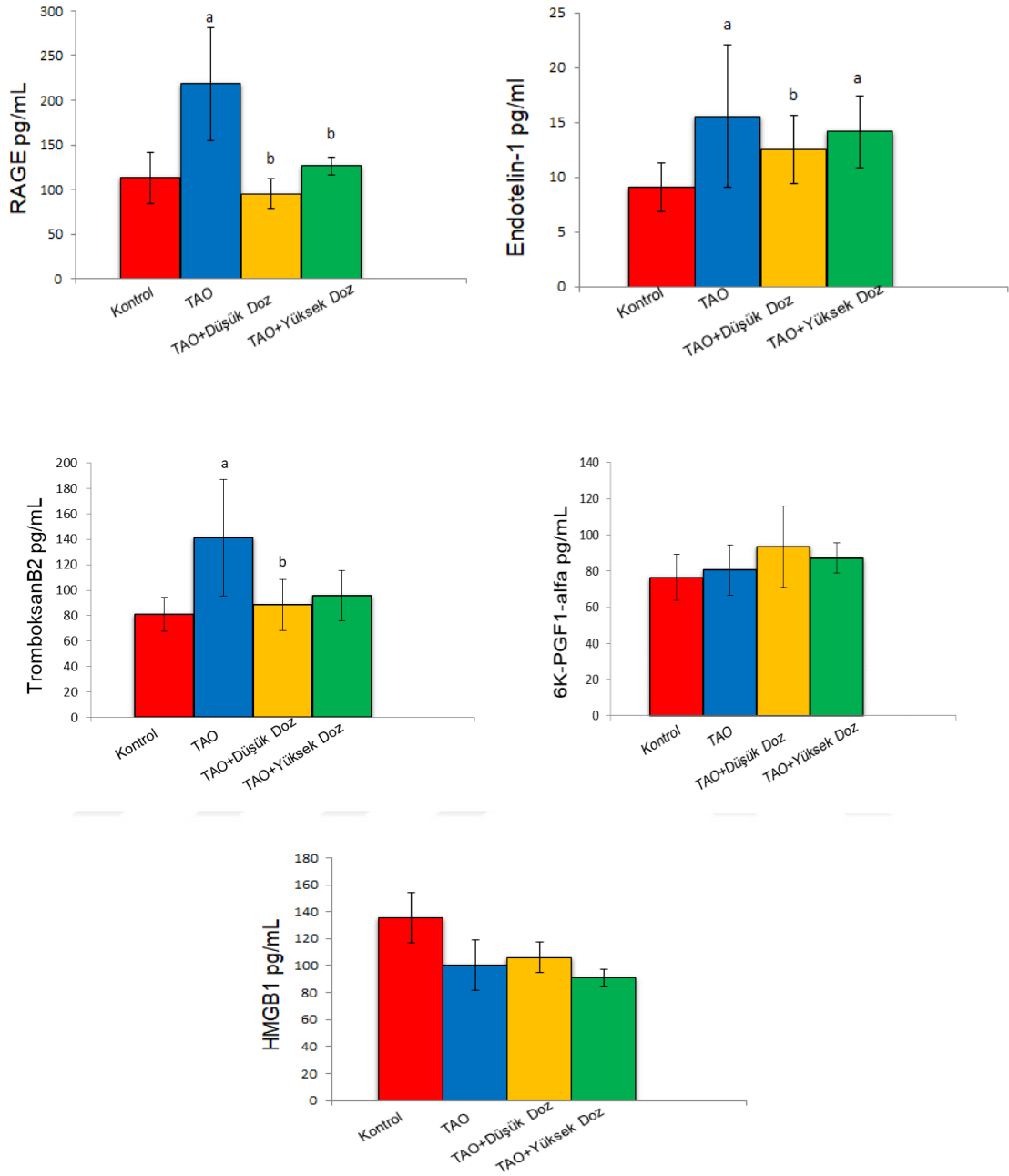
	n	RAGE (pg/mL)	Endotelin-1 (pg/mL)	TromboksanB2 (pg/mL)	6K-PGF1-alfa (pg/mL)	HMGB1 (pg/mL)
Kontrol	6	112,80±28,05	9,08±2,25	81,18±13,28	76,51±12,80	135,63±18,86
TAO	6	218,3±63,35 ^a	15,57±6,50 ^a	141,27±45,67 ^a	80,67±13,91	100,60±18,68
TAO+DD tedavi	6	95,4±16,86 ^b	12,57±3,11 ^b	88,43±19,98 ^b	93,41±22,39	106,08±11,33
TAO+YD tedavi	6	126,0±9,83 ^b	14,36±3,25 ^a	95,82±19,93 ^b	87,23±8,27	91,07±6,13

DD: düşük doz

YD: yüksek doz

P^a<0,05 : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

P^b<0,05 : TAO grubu ile karşılaştırıldığında



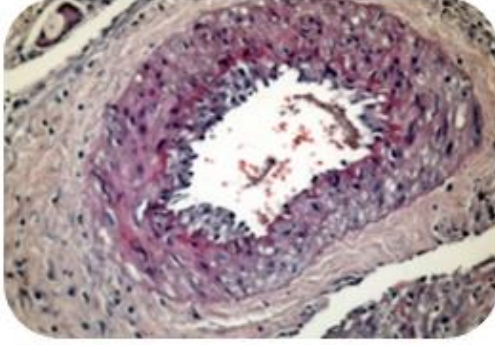
P^a<0,05 : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

P^b<0,05 : TAO grubu ile karşılaştırıldığında

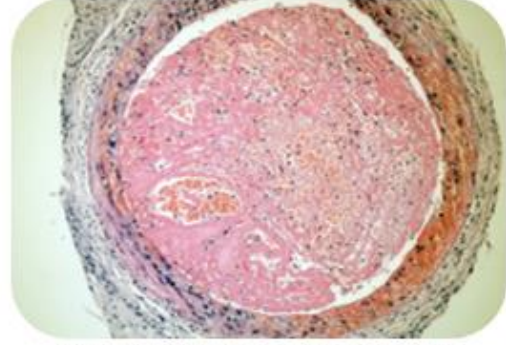
Şekil 10: TAO oluşturulan sıçanlarda Levosimendan uygulamasının serumda RAGE (receptor for advanced glycation end products), Endotelin-1, Tromboksan B2, 6K-PGF1-alfa, HMGB1 (high mobility group box protein 1) düzeyleri üzerine etkisi

4.2. Damar Duvarında Elde Edilen Bulgular:

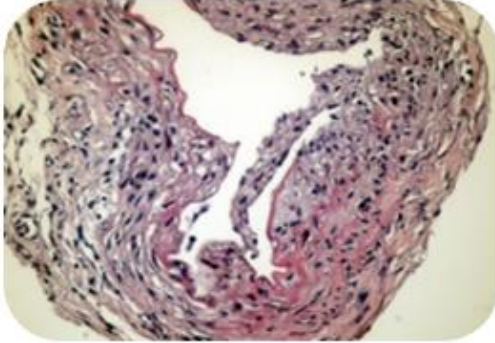
TAO oluşturulan grupların mikroskopisinde lümeni büyük ölçüde tıkayan enflamatuvar trombüs materyali ve enflamatuvar hücreler görüldü. Tedavi gruplarında ise TAO'nun patolojik özellikleri görülmesine karşın okluziv trombüs gözlenme oranı düşük olarak görüldü.



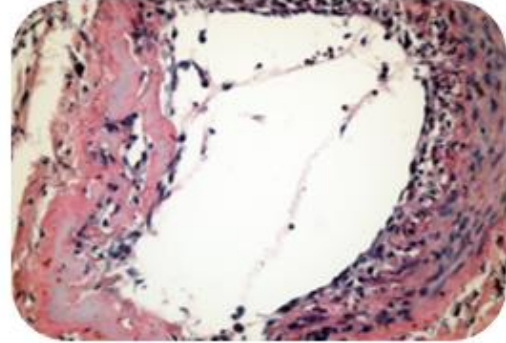
Şekil 11: Kontrol grubu, doğal görünümde damar kesiti



Şekil 12: TAO grubu, okluziv trombüs, damar duvarında hasar ve kanama (H&Ex200)

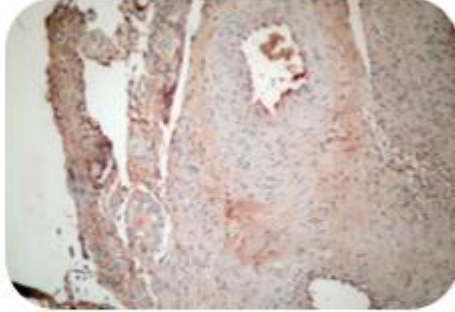


Şekil 13: Düşük doz tedavi grubu, damarda intima ve media düzensizliği, elastik lamina düzensizliği (H&Ex200)

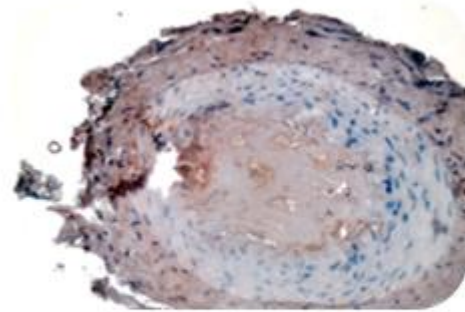


Şekil 14: Yüksek doz tedavi grubu, mediada hyalinizasyon+ intimal hiperplazi(H&Ex200)

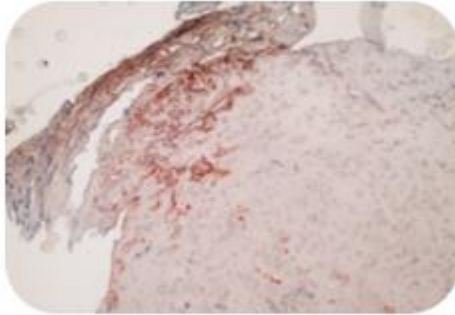
TAO oluşturulan grupta, gözlemlenen immünohistokimyasal incelemelerde damar çeperinde MMP3, MMP9, ICAM ve VCAM tutulumu gösterildi.



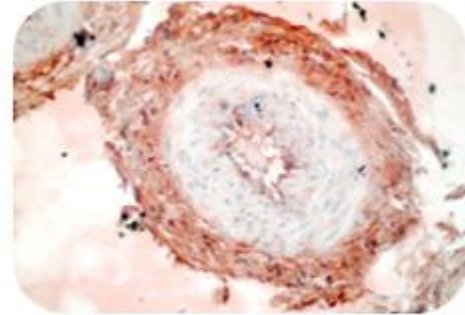
Şekil 15: TAO grubu, damar çeperinde MMP3 pozitifliği (H&E x 400)



Şekil 16: TAO grubu, tromboze damarda hafif diffuz MMP9 pozitifliği (H&E x 200)



Şekil 17: TAO grubu, damar çeperinde ICAM pozitifliği (H&E x 400)



Şekil 18: TAO grubu, damar çeperinde ve periarteriol dokuda VCAM pozitifliği

TAO grubunda 3 hayvanda damarda trombüs oluşumu

4.3. Morfolojik Bulgular

TAO grubunda otoamputasyon oranı düşük doz ve yüksek doz grubuna kıyasla daha yüksek olarak gözlemlendi. Kontrol grubunda ise herhangi bir iskemi bulgusuna ve otoamputasyona rastlanmadı.

TAO grubunda genel olarak morfolojik skorlama III ve IV olarak görülür iken, tedavi gruplarında ekstremitte gangreni görülmedi. Yapılan günlük gözlemlerde tedavi grubunda renk değişikliği 5-7. günler arasında koyu mordan açık mor, pembeye dönüş olarak gözlemlendi. Düşük dozda morfolojik değişikliklerin daha belirgin olduğu gözlemlendi.

5 - TARTIŞMA ve SONUÇ

Tromboanjitis Obliterans (TAO) sıklıkla distal ekstremitelerin küçük ve orta büyüklükteki damarlarını etkileyen nonaterosklerotik, segmental, enflamatuvar bir hastalıktır. Tütün kullanımının bırakılması dışında standardize edilmiş bir tedavisi yoktur.(1) Ekstremitelerde iskemi ve yüzeysel tromboflebit, hastalığın temel klinik tablosunu oluşturmaktadır. Hastalığa spesifik olarak ortaya koyulabilmiş klinik, radyolojik, laboratuvar ve histopatolojik bulgular yoktur. Bu sebeple teşhis tüm verilerin biraraya getirilmesiyle oluşturulan bir olasılık olarak belirlenir.(2) Hastalığın oluşum mekanizması ve prognozu net olarak ortaya konulamamıştır.(3)

Son yıllarda, hastalığın patofizyolojisi ile ilgili rapor edilmiş olan önemli gözlemler vardır. Bunlardan biri hasta serumunda artmış olan antiendotelial hücre antikorları seviyeleri bir diğeri ise endotel bağımlı disfonksiyon sebebi ile görülen vasküler dilatasyonun bozulması.(4) Antiendotelial hücre antikorlarının (AECA) tromboanjitis obliterans patolojisinde rol oynayabileceği gösterilmiştir.(5)

Geleneksel Çin Tıbbı yöntemi shenfu injeksiyonunun değerlendirildiği bir TAO rat (sıçan) modeli çalışmasında da enjeksiyon sonrası plazmada TXB2 ve 6K-PGF1-alfa düzeyleri, trombüsün patolojik derecelendirilmesi ve hematolojik değişiklikler gözlenmiştir. Tedavi gruplarına kıyasla kontrol gruplarında TAO lezyonlarının patolojik bulguları, patolojik trombus oluşumu, trombosit düzeylerinin ve TXB2/ 6K-PGF1-alfa oranının arttığı 6K-PGF1-alfa düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir. SFI (*shenfu injection*) tedavisi sodium laurate enjeksiyonunun sebep olduğu patolojik belirtileri önemli ölçüde azaltmıştır. Eritrosit düzeyleri lökosit ve nötrofil düzeylerinde anlamlı değişiklik gözlemlenmemiştir.(6)

TAO, enflamasyonun uyardığı yüksek derecede hücresel yangılı trombüs (*highly cellular inflammatory thrombus*) ile karakterizedir. HMGB1 ve indüklediği enflamatuvar faktörler aracılığıyla; sodium laurate ile başlatılmış mekanik hasar sebebiyle endotelial disfonksiyon gelişen endotel hücrelerinde fizyolojik antikoagülasyon ve vazodilatasyon yeteneğinin kaybedilmiş olduğu gösterilmiştir.(7) Aynı çalışmada arter dokusunda Western Blot ile HMGB1, RAGE, IL-6, ICAM-1, VCAM, B-actin artışı gözlenmiştir.(7) Plazmada HMGB1, TXB2 düzeyleri artmış, 6K-PGF1-alfa seviyeleri ise düşük

bulunmuştur. TXB2/ 6-keto-PGF1-alfa düzeyleri anlamlı yüksek bulunmuştur. HMGB1 birçok enflamatuvar ve otoimmün hastalığın patogenezinde reseptörü RAGE üzerinden aktivasyon göstermektedir. HMGB1in, A-box ve B-box olmak üzere 2 DNA bağlayıcı bölgesi mevcuttur. Yapı fonksiyon analizlerinde aktif DNA bağlayıcı bölgenin B-box a lokalize olduğu gösterilir iken A-box HMGB1 ile yarışarak biyolojik işlevini zayıflatır. Yüksek doz rekombinant A-box (rA-box) grubunda TAO grubuna kıyasla patolojik bulgularda ve trombus formasyonunda ciddi azalmalar gözlenmiştir.(6) İmmunohistokimyasal ve immünofloresan incelemelerde HMGB1 ve RAGE'nin damar duvarında, yüksek doz rA grubunda TAO grubuna oranla azalmış olduğu gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda rekombinant A-box'ın HMGB1'in spesifik bir antagonisti olarak prelinik enflamatuvar hastalıklarda koruyucu etkisi gösterilmiştir.(7) Ayrıca HMGB1 makrofaj ve endotel hücreleri aktifleyip IL-6, ICAM-1, VCAM-1 salınmasına sebep olur. TAO grubunda kontrol gruba oranla artmış düzeyler gözlenmiştir.(7)

Yakın zamanlarda aynı model ile çalışılmış olan başka serilerde HMGB1 (*high mobility group box protein 1*) in plazma düzeylerinin artışı, uyguladığımız TAO modelinde proinflamatuvar sitokinlerin üretimini indükleyen, inflamasyon geç mediyatorü olarak TAO için yeni bir hasar belirteci olarak bulunmuştur.(6,13) HMGB1in kendisi RAGE, TLR2 (*toll-like receptor 2*) ve TLR4 (*toll-like receptor 4*) ile sinyal verebilir. HMGB1 reseptörlerinin aktivasyonu ile lökosit adhezyon moleküllerinin upregülasyonu, endotel hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin ve anjiyojenik faktörlerin üretimini sağlayan NFkB aracılığıyla enflamatuvar süreci başlatır. Endotel hücreleri HMGB1 in yanısıra RAGE, TLR2 ve TLR4 eksprese ederler. Bu çalışmalarda HMGB1 ve reseptörü RAGE'nin Sodyum Laurate ile oluşturulmuş TAO modelinde hastalık sürecinde yol aldığı gösterilmiştir.(7,14)

İnsanlarla ilgili retrospektif olarak yapılmış araştırma ile elde edilen veriler ile HMGB1, ICAM-1, MMP9 un plazma seviyesindeki artışı ile HMGB1in belirteç olarak TAO'daki rolü gösterilmiştir. HMGB1 bu nadir görülen hastalıkla ilgili lezyonlarda önemli bir rol oynamakta hatta tedavide potansiyel bir hedef olarak ortaya çıkmakta olduğu düşünülmüştür.(8,9,14)

Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise plazma HMGB1, TXB2 seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla TAO grubunda daha yüksek olduğu görülmüştür.(14) RAGE ve

NF-KB esasen arterin intimasında eksprese edilir. HMGB1, RAGE ve NFkB düzeyleri Immünofluorescence, PCR ve Western Blot ile üç farklı şekilde gösterilmiştir. Üç yöntemde de kontrol grubuna kıyasla TAO grubunda, daha yüksek düzeyler tespit edilmiştir. HMGB1, RAGE ile ilişkili inflamasyonda NFkB yolağı ile TAO patogenezinde önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.(14)

Tromboksan A2 (TXA2) ve Prostaglandin (PGI2) tromboz ile ilişkili olayların seyrinde yer almaktadırlar. TXA2 güçlü trombosit indükleyicisi olarak görev yaparak mikrovasküler düzeyde vazospazm ve trombus formasyonuna sebep olarak gösterilmiştir. (10) Prostaglandin (PGI2) TXA2nin fizyolojik bir antagonisti olarak dolaşım sisteminde trombosit agregasyonunu inhibe edici ve vazodilatatör etkisiyle yer almaktadır.(10) TXA2/ PGI2 patolojik dengesizliği vasospazmı tetikleyip trombus oluşumuna sebep olabilir.(10) TXB2 ve 6-keto-prostaglandinF1-alfa (6K-PGF1-alfa), TXA2 ve PGI2nin stabil metabolitleridir. PGI2 ve 6K-PGF1-alfa gibi metabolitleri TAO tedavisinde farmakolojik ajanlar olarak önerilmiştir. (11) Yapılan bu çalışmada TAO gruplarına kıyasla tedavi gruplarında plazmada ELISA yöntemi ile bakılan TXB2, ET1 düzeyleri düşük, 6K-PGF1-alfa düzeyleri yüksek saptanmıştır, ET1in hastalığın alevlenmesinde rol oynadığı belirtilmiştir. SalBnin (salviyonolik asit B) femoral arter duvarında immünohistokimyasal olarak gözlenen TNF-alfa ve İnos ekspresyonunu azalttığı, TXB2 ve ET1 üretimini azalttığı gözlenmiştir.(11)

Geleneksel Çin Tıbbı yöntemlerinin değerlendirildiği Li ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, kendi çalışmamızda da kullanmış olduğumuz aynı morfolojik sınıflandırma ile değerlendirilmiş olan TAO grubundaki tüm sıçanlar morfolojik grade IV iken NP (*Notoginseng Powder*) ve MFS (*Maifusheng*) gruplarında morfolojik grade azalmış olarak belirlenmiştir. NDDM (*Nibble Debridement and Dressing Method*) ile kombine edilen NP ve NFS gruplarında ise gangren görünümünde ciddi azalma saptanmıştır.(15)

Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, lokal olarak eksprese edilen bir proinflamatuvar peptid olan urocortinin TAO'nun hiperkoagülabilité fazını CRF1 (*corticotropin releasing factor*) reseptörleri üzerinden şiddetlendirdiğini belirtmişlerdir.(16) COX-2 ve ICAM-1in de bu alevlenmeye katkıda bulunabileceği ifade edilmiştir. Sıçanların plazmaları hiperkoagülabilité fazında gözlemlenmiş, plazma

ürokortin, prostogalndin E2, ICAM-1 seviyeleri yüksek, femoral arterlerde ise ürokortin, CRF1 reseptörleri, COX-2 ve ICAM-1 ekspresyonları belirgin yüksek bulunmuştur.(16)

Oksidatif stres endotelial NFkB-İnos-NO yolağını aktive edip artmış NO salınımına sebep olmakta, salınan NO süperoksit anyonu ile reaksiyona girip ciddi lipid peroksidasyonu ve endotel duvarında direkt hasra sebep olmaktadır.Aynı zamanda adhezyon molekülleri ve enflamatuvar faktörlerinin salınımına sebep olmaktadırlar.(51) TAO hastalarında endotel aktivasyonu ile artmış selektin E (endotele lökosit adezyonunu sağlar, enflamatuvar süreç dışında saptanmaz) ICAM-1 VCAM-1 integrinler (lökositlerin endotele yüksek adezyonu) saptanmıştır. Periferal kan örneklerinde artmış IL-6, IL-12 ve azalmış IL-10 ekspresyonu görülmüştür.(51,50)

TAOda gözlenen trombotik eğilim tütün kaynaklı başladığı öner sürülen endotelial hasar sonucu oluşmaktadır. Tütün kullanımı ile trombosit aktivasyonu da gelişir. P-selektin, tromboksan A2 ve serotonin salınımı da artar. Sigara ile uyarılan CD40-CD40L yolağı aracılığı ile plazma homosisteinve trombopoetin düzeyleri artıp lökositoz ile sonuçlanır. Aktiflenen nötrofillerden salınan serbest oksijen radikalleri damar duvar hasarını daha da arttır. NO bağımlı vazodilatasyonun TAO hastalarında azalmış olduğu gözlenmiştir.(48)

NO biyoyararlanımındaki bozukluklar endotelial fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirilmiş ve aterosklerotik lezyonların ilerleyişi, hipertansiyon, hiperkolestrolemi, diabetes mellitusa sebep olabileceği düşünülmüştür.(25)

Endotel hücreleri su ve suda çözünen maddelerin transportu, plazma lipid ve immünojik reaksiyonlarının regülasyonu, hemodinamik değişikliklere cevaptan sorumludur. Endotelyum kardiyovasküler hastalıkların oluşum ve gelişim sürecinde yer alan dinamik bir yapıdır. (22)

PGI2 potent ancak kısa ömürlü bir trombosit agregasyonu inhibitörüdür. PGI2nin trombosit üzerindeki adenilat siklaz ilişkili spesifik reseptörlerine bağlanması ile hücre içi cAMP birikimi artar ve trombosit agregasyonu inhibe olur. Yarı ömrü 42 saniye olan PGI2, çok daha zayıf bir vazodilatör olan 6K-PGF1e parçalanır.(27)

Çalışmamızda kullandığımız TAO modeli ilk olarak 1980 yılında uygulanmış olup, literatürdeki tüm TAO modelleri aynı şekilde düzenlenmiştir.(13,14,15,16) Bu çalışmayı

rastgele 4 gruba ayrılmış 24 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan ile planladık Deney modelini oluşturmak amacıyla kullandığımız Sodium Laurate (Sodium Laurate, Sigma Aldrich®) birçok temizlik ve kişisel bakım ürününde bulunan, sabuna benzer şekilde davranan yüzey aktif bir maddedir. TAO oluşumunu sağlayan mekanizma endotelde fiziksel tahribat yolu ile enflamatuvar sürecin başlaması, trombüs oluşumu ve neticesinde lokal dolaşım bozukluğuna sebep olmasıdır.

Tüm sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. 1. Grup kontrol grubu (cerrahi girişim yapılmış ancak işlem yapılmamış), 2. Grup TAO grubu, 3. grup TAO+düşük doz Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan), 4. Grup TAO+yüksek doz Levosimendan grubu olarak belirlendi. 3. ve 4. Gruptaki ratlara Sodium Laurate enjeksiyonunu takiben 2. Saatte Levosimendan düşük doz (12 mcg/kg %0,5 dekstroz 10cc ile) ve Levosimendan yüksek doz (24 mcg/kg %0,5 dekstroz 10cc ile) intraperitoneal enjekte edildi. Sonraki 7 gün boyunca Levosimendan uygulaması (düşük doz Levosimendan grubu ve yüksek doz Levosimendan grubu için) aynı doz ve uygulama şekli ile devam edildi.

Çalışmamızda kullandığımız Levosimendan (Simdax®, Daiichi Sankyo, Japan) kardiyak yetmezlikte klinik kullanımı olan kalbin kalsiyuma duyarlılığını artırıp kasılmasını arttıran bir kalsiyum kanal duyarlaştırıcısıdır. Levosimendan etkisini 3 ayı yolak üzerinden gösterir. Etki mekanizmalarından ilki myokardiyal hücrelerde troponin C nin kalsiyuma duyarlılığını arttırmak ve cAMP bağımsız bir inotrop etki yaratmak, ikincisi damar düz kas hücrelerinde adenozin trifosfat sensitif potasyum kanallarının (KATP kanalları) açılmasını sağlamak ve sonuncusu ise kardiyak mitokondride KATP kanallarının aktivasyonu ile hücreleri iskemi/ reperfüzyon hasarına karşı korumak. (75)

Levosimendan vazodilatasyon etkisini, fosfodiesteraz III (PDEII) inhibisyonu, intrasellüler serbest Ca azaltılması, KATP kanallarının açılması ve damar düz kasında kasılma proteinlerinin duyarsızlaştırılmasıyla gösterir. Levosimendanın insan internal mammarian arterlerinde (IMA) vazodilatasyon yaptığı gösterilmiştir.(79)

Çalışmamızda; Levosimendanın periferik vasküler yataktaki vazodilatatör etkisinden yararlanıp TAO'da bozulmuş olan endotel kaynaklı disfonksiyon nedeni azalmış vazodilatasyon yeteneğinin düz kas hücreleri üzerinden artışını yukarıda anlattığımız yolaklardaki biyokimyasal markerler üzerinden gözlemledik.

Bulgularımız ile kontrol grubu dışındaki tüm gruplarda TAO gelişiminin morfolojik ve biyokimyasal ve mikroskopik olarak gözlemlendiğini, tedavi gruplarında kontrol grubuna kıyasla TAO'nun biyokimyasal ve morfolojik olarak şiddetinin azaldığını kaydettik.

Düşük doz tedavi grubunun biyokimyasal ve morfolojik olarak tedaviye yanıtının yüksek doz grubuna kıyasla daha iyi olduğunu, bununla beraber her iki tedavi grubunda da tedaviye yanıtın yüksek olduğunu gözlemledik.

Sonuç olarak; elde ettiğimiz biyokimyasal, immünohistokimyasal veriler ve gözlemlediğimiz morfolojik bulgular ile Levosimendan'ın TAO tedavisinde etkinliğinin olumlu olduğunu gösterdik. Çalışmamızın; TAO'nun tedavisinde Levosimendan etkinliğinin araştırılmasına ve doz çalışmaları yapılması için düzenlenecek olan yeni çalışmalara olumlu veriler sağladığını düşünmekteyiz.

6 - KAYNAKLAR

- 1- Abeles AM, Nicolescu M, Pinchover Z, Abeles M. Thromboangiitis obliterans successfully treated with phosphodiesterase type 5 inhibitors. *Vascular*. 2014 Aug;22(4):313-6. doi:10.1177/1708538113502648. Epub 2013 Sep 2. PMID: 24000082.
- 2- Fiessinger JN, Frank M. Maladie de Buerger [THROMBOANGIITIS OBLITERANS (BUERGER'S DISEASE)]. *Rev Prat*. 2015 Oct;65(8):1079-83. French. PMID: 26749712.
- 3- Puéchal X, Fiessinger JN. Thromboangiitis obliterans or Buerger's disease: challenges for the rheumatologist. *Rheumatology (Oxford)*. 2007 Feb;46(2):192-9. doi: 10.1093/rheumatology/ke1388. Epub 2006 Nov 20. PMID: 17116654.
- 4- Olin JW, Shih A. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Curr Opin Rheumatol*. 2006 Jan;18(1):18-24. doi: 10.1097/01.bor.0000198000.58073.aa. PMID: 16344615.
- 5- Eichhorn J, Sima D, Lindschau C. Antiendothelial Cell Antibodies Thromboangiitis Obliterans, *The American Journal of the Medical Sciences*, Volume 315, Issue 1, 1998, Pages 17-23, ISSN 0002-9629, [https://doi.org/10.1016/S0002-9629\(15\)40266-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9629(15)40266-6).
- 6- Hong F, He C, Liu X, Tu G, Guo F, Yang S. Protective effect of Shenfu injection on thromboangiitis obliterans model rats. *J Ethnopharmacol*. 2011 Nov 18;138(2):458-62. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.033. Epub 2011 Sep 29. PMID: 21982791.
- 7- Kong X, Yuan H, Wu X, Zhang J, Zhou H, Wang M, Liu Y, Jin X. High-mobility-group box protein 1A box reduces development of sodium laurate-induced thromboangiitis obliterans in rats. *J Vasc Surg*. 2013 Jan;57(1):194-204. doi: 10.1016/j.jvs.2012.06.083. Epub 2012 Oct 13. PMID: 23069071.
- 8- De Caridi G, Bitto A, Massara M, Pallio G, Pizzino G, Serra R, Altavilla D, Squadrito F, Spinelli F. Increased Serum HMGB-1, ICAM-1 and Metalloproteinase 9 Levels in Buerger's Patients. *Curr Vasc Pharmacol*. 2016;14(4):382-7. doi:10.2174/1570161114666160303111355. PMID: 26935815.

- 9- Joras M, Poredos P, Fras Z. Endothelial dysfunction in Buerger's disease and its relation to markers of inflammation. *Eur J Clin Invest*. 2006 Jun;36(6):376-82. doi: 10.1111/j.1365-2362.2006.01646.x. PMID: 16684120.
- 10- Zhou J, Song Z, Han M, Yu B, Lv G, Han N, Liu Z, Yin J. Evaluation of the antithrombotic activity of ZhiXiong Capsules, a Traditional Chinese Medicinal formula, via the pathway of anti-coagulation, antiplatelet activation and anti-fibrinolysis. *Biomed Pharmacother*. 2018 Jan;97:1622-1631. doi:10.1016/j.biopha.2017.11.135. PMID: 29793324.
- 11- Ziru Zhang, Jianbo Ji, Dawei Zhang, Maoqiang Ma, Longru Sun. Protective effects and potential mechanism of salvianolic acid B on sodium laurate-induced thromboangiitis obliterans in rats. *Phytomedicine*, Volume 66, 2020, 153110, ISSN 0944-7113, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153110>.
- 12- Oral iloprost in the treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease): a double-blind, randomised, placebo-controlled trial. The European TAO Study Group. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1998 Apr;15(4):300-7. doi: 10.1016/s1078-5884(98)80032-4. Erratum in: *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1998 Nov;16(5):456. PMID: 9610341.
- 13- Ashida S, Ishihara M, Ogawa H, Abiko Y. Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral arterial occlusive disease in rats. *Thromb Res*. 1980 Apr 1-15;18(1-2):55-67. doi: 10.1016/0049-3848(80)90170-x. PMID: 7404505.
- 14- Liu C, Kong X, Wu X, Wang X, Guan H, Wang H, Wang L, Jin X, Yuan H. Alleviation of A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) on thromboangiitis obliterans involves the HMGB1/RAGE/NF κ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Oct 20;505(1):282-289. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.002. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30245136.
- 15- Jianhua Li, Jingfeng Zhong, Chunfa Huang et al. Integration Traditional Chinese Medicine and Nibble Debridement and Dressing Method Reduce Thrombosis and Inflammatory Response in the Treatment of Thromboangiitis Obliterans, 18 November 2020, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-107305/v1>]

- 16- Xu Y, Zhang R, Chen J, Zhang Q, Wang J, Hu J, Guan X, Jin L, Fu H, Gui B, Guo Y, Li S. Urocortin promotes the development of vasculitis in a rat model of thromboangiitis obliterans via corticotrophin-releasing factor type 1 receptors. *Br J Pharmacol.* 2009 Aug;157(8):1368-79. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00210.x. Epub 2009 Jun 30. PMID: 19572944; PMCID: PMC2765315.
- 17- Murakami T, Sawada K, Taneda K, Hayashi M, Katsuura Y, Tanabe H, Kiyoki M, Araki H. Effect of isocarbacyclin methyl ester incorporated in lipid microspheres on experimental models of peripheral obstructive disease. *Arzneimittelforschung.* 1995 Sep;45(9):991-4. PMID: 7488320.
- 18- T.W. Sadler. *Langman's Medical Embryology* 6th ed. Çev. Başaklar C. Medikal Embriyoloji. Palme yayıncılık; 1993: 69–70
- 19- Kumar V, Abbas A, Aster J (çeviri: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U). *Robbins temel patoloji*. Dokuzuncu baskı. İstanbul Nobel Tıp Kitabevi 2013;17.
- 20- Taylor AM, Bordoni B. *Histology, Blood Vascular System*. [Updated 2021 Feb 7]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553217/>
- 21- Shinaoka A, Momota R, Shiratsuchi E, Kosaka M, Kumagishi K, Nakahara R, Naito I, Ohtsuka A. Architecture of the subendothelial elastic fibers of small blood vessels and variations in vascular type and size. *Microsc Microanal.* 2013 Apr;19(2):406-14. doi: 10.1017/S1431927612014341. Epub 2013 Mar 4. PMID: 23453051.
- 22- López-Farré A, Farré J, Sánchez de Miguel L, Romero J, González-Fernández F, Casado S. Disfunción endotelial: una respuesta global [Endothelial dysfunction: a global response]. *Rev Esp Cardiol.* 1998;51 Suppl 6:18-22. Spanish. PMID: 10050140.
- 23- Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007 Oct;7(10):803-15. doi: 10.1038/nri2171. PMID: 17893694.
- 24- Cronenwett J, Johnston Wayne. *Rutherford's Vascular Surgery*, 7th Edition 2010 Elsevier
- 25- Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2009 Aug;32(8):1103-8.

- 26- Patrono C. Biosynthesis and pharmacological modulation of thromboxane in humans. *Circulation*. 1990 Jan;81(1 Suppl):I12-5; discussion I22-3. PMID: 2136814. 10.1007/s12272-009-1801-1. Epub 2009 Aug 29. PMID: 19727602.
- 27- Cawello, W., Schweer, H., Müller, R. et al. Metabolism and pharmacokinetics of prostaglandin E1 administered by intravenous infusion in human subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 46, 275–277 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00192562>
- 28-Chabrier PE, Braquet P. Endothelin. *Horm Res*. 1990;34(3-4):169-74. doi: 10.1159/000181819. PMID: 1966566.
- 29- Zhu Y, Xian X, Wang Z, Bi Y, Chen Q, Han X, Tang D, Chen R. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*. 2018 Aug 23;8(3):80. doi: 10.3390/biom8030080. PMID: 30142970; PMCID: PMC6163673.
- 30-Shah PK. Inflammation, infection and atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2019 Nov;29(8):468-472. doi: 10.1016/j.tcm.2019.01.004. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30733074.
- 31-Firnhaber JM, Powell CS. Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 2019 Mar 15;99(6):362-369. Erratum in: *Am Fam Physician*. 2019 Jul 15;100(2):74. PMID: 30874413.
- 32-Teter KA, Maldonado TM, Adelman MA. A systematic review of venous aneurysms by anatomic location. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2018 May;6(3):408-413. doi: 10.1016/j.jvsv.2017.11.014. Erratum in: *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*. 2018 Jul;6(4):563. PMID: 29661366.
- 33-Fakour F, Fazeli B. Visceral bed involvement in thromboangiitis obliterans: a systematic review. *Vasc Health Risk Manag* 2019; 15: 317-53.
34. Piazza G, Creager M. Thromboangiitis Obliterans. *Circulation*. 2010 Apr 27; 121(16): 1858–1861. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.942383
- 35- Arkkila PE. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Apr 27;1:14. doi: 10.1186/1750-1172-1-14. PMID: 16722538; PMCID: PMC1523324.
- 36-Iwai T, Inoue Y, Umeda M, Huang Y, Kurihara N, Koike M, Ishikawa I. Oral bacteria in the occluded arteries of patients with Buerger disease. *J Vasc Surg*. 2005;42: 107–115

- 37- Fazeli B, Ravari H, Ghazvini K. Rickettsia infection could be the missing piece of the Buerger's disease puzzle. *Int Angiol.* 2017 Oct;36(5):410-416. doi: 10.23736/S0392-9590.17.03420-4. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26344511.
- 38- Małeckı R, Zdrojowy K, Adamiec R. Thromboangiitis obliterans in the 21st century--a new face of disease. *Atherosclerosis.* 2009 Oct;206(2):328-
- 39-Klein-Weigel PF, Richter JG. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Vasa.* 2014 Sep;43(5):337-46. doi: 10.1024/0301-1526/a000371. PMID: 25147010.
- 40-Olin JW, Shih A. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Curr Opin Rheumatol.* 2006 Jan;18(1):18-24. doi: 10.1097/01.bor.0000198000.58073.aa. PMID: 16344615.
- 41-Mills JL Sr. Buerger's disease in the 21st century: diagnosis, clinical features, and therapy. *Semin Vasc Surg.* 2003 Sep;16(3):179-89. doi: 10.1016/s0895-7967(03)00023-1. PMID: 12975757.
- 42-Olin JW, Young JR, Graor RA, Ruschhaupt WF, Bartholomew JR. The changing clinical spectrum of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Circulation.* 1990 Nov;82(5 Suppl):IV3-8. PMID: 2225420.
- 43-Arkkila PE, Kahri A, Färkkilä M. Intestinal type of thromboangiitis obliterans (Buerger disease) preceding symptoms of severe peripheral arterial disease. *Scand J Gastroenterol.* 2001 Jun;36(6):669-72. PMID: 11424329.
- 44-Puéchal X, Fiessinger JN. Thromboangiitis obliterans or Buerger's disease: challenges for the rheumatologist. *Rheumatology (Oxford).* 2007 Feb;46(2):192-9. doi: 10.1093/rheumatology/kel388. Epub 2006 Nov 20. PMID: 17116654.
- 45- Papa MZ, Rabi I, Adar R. A point scoring system for the clinical diagnosis of Buerger's disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996 Apr;11(3):335-9. doi: 10.1016/s1078-5884(96)80081-5. PMID: 8601245.
- 46- Hida N, Ohta T. Current status of patients with buerger disease in Japan. *Ann Vasc Dis.* 2013;6(3):617-23. doi: 10.3400/avd.oa.13-00012. Epub 2013 Aug 12. PMID: 24130618; PMCID: PMC3793184.

- 47- Lockwood SJ, Bresler SC, Granter SR. Politics, culture, and the legitimacy of disease: the case of Buerger's disease. *Clin Rheumatol*. 2016 Sep;35(9):2145-9. doi: 10.1007/s10067-016-3310-1. Epub 2016 May 18. PMID: 27188859.
- 48- Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management. *Curr Pharm Des*. 2012;18(11):1478-93. doi: 10.2174/138161212799504731. PMID: 22364132.
- 49- Pavlic, Verica et al. "Periodontitis and Buerger's Disease: Recent Advances." *Acta informatica medica : AIM : journal of the Society for Medical Informatics of Bosnia & Herzegovina : casopis Drustva za medicinsku informatiku BiH* vol. 21,4 (2013): 250-2. doi:10.5455/aim.2013.21.250-252
- 50- Małecki R, Kluz J, Przeździecka-Dołyk J, Adamiec R. The Pathogenesis and Diagnosis of Thromboangiitis obliterans: Is It Still a Mystery? *Adv Clin Exp Med*. 2015 Nov-Dec;24(6):1085-97. doi: 10.17219/acem/33322. PMID: 26771983.
- 51-Sun XL, Law BY, de Seabra Rodrigues Dias IR, Mok SWF, He YZ, Wong VK. Pathogenesis of thromboangiitis obliterans: Gene polymorphism and immunoregulation of human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2017 Oct;265:258-265. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.009. Epub 2017 Aug 18. PMID: 28864202.
- 52- Sharebiani H, Fazeli B, Maniscalco R, Ligi D, Mannello F. The Imbalance among Oxidative Biomarkers and Antioxidant Defense Systems in Thromboangiitis Obliterans (Winiwarter-Buerger Disease). *J Clin Med*. 2020 Apr 7;9(4):1036. doi: 10.3390/jcm9041036. PMID: 32272606; PMCID: PMC7231233.
- 53- Czarnacki M, Gacka M, Adamiec R. Rola endoteliny-1 w patogenezie choroby Buergera (doniesienie wstepne) [A role of endothelin 1 in the pathogenesis of thromboangiitis obliterans (initital news)]. *Przegl Lek*. 2004;61(12):1346-50. Polish. PMID: 15850327.
- 54- Eichhorn J, Sima D, Lindschau C, Turowski A, Schmidt H, Schneider W, Haller H, Luft FC. Antiendothelial cell antibodies in thromboangiitis obliterans. *Am J Med Sci*. 1998 Jan;315(1):17-23. doi: 10.1097/00000441-199801000-00004. PMID: 9427570.

- 55- Jacob MP, Hornebeck W, Lafuma C, Bernaudin JF, Robert L, Godeau G. Ultrastructural and biochemical modifications of rabbit arteries induced by immunization with soluble elastin peptides. *Exp Mol Pathol.* 1984 Oct;41(2):171-90. doi: 10.1016/0014-4800(84)90034-0. PMID: 6566612.
- 56- Dellalibera-Joviliano R, Joviliano EE, Silva JS, Evora PR. Activation of cytokines corroborate with development of inflammation and autoimmunity in thromboangiitis obliterans patients. *Clin Exp Immunol.* 2012 Oct;170(1):28-35. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04624.x. PMID: 22943198; PMCID: PMC3444714.
- 57- Brodmann M, Renner W, Stark G, Winkler M, Pabst E, Hofmann C, Pilger E. Prothrombotic risk factors in patients with thrombangitis obliterans. *Thromb Res.* 2000 Sep 1;99(5):483-6. doi: 10.1016/s0049-3848(00)00266-8. PMID: 10973678.
- 58- Hus I, Sokolowska B, Walter-Croneck A, Chrapko M, Nowaczynska A, Dmoszynska A. Assessment of plasma prothrombotic factors in patients with Buerger's disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2013 Mar;24(2):133-9. doi: 10.1097/MBC.0b013e32835b7272. PMID: 23358197.
- 59- Ketha SS, Cooper LT. The role of autoimmunity in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Ann N Y Acad Sci.* 2013 May;1285:15-25. doi: 10.1111/nyas.12048. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23510296.
- 60- Akar, A.R., İnan, M.B. & Baran, Ç. Thromboangiitis Obliterans. *Curr Treat Options in Rheum* 2, 178–195 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40674-016-0047-6>
- 61- Dimmick SJ, Goh AC, Cauzza E, Steinbach LS, Baumgartner I, Stauffer E, Voegelin E, Anderson SE. Imaging appearances of Buerger's disease complications in the upper and lower limbs. *Clin Radiol.* 2012 Dec;67(12):1207-11. doi: 10.1016/j.crad.2012.04.005. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22784658.
- 62- Kocak B, Ustun ED. Vasa Nervorum as the Source of Corkscrew Collaterals in Thromboangiitis Obliterans (Buerger's Disease). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016 Oct;52(4):508. doi: 10.1016/j.ejvs.2016.07.017. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27515062.
- 63 Adar R, Papa MZ. Buerger's disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997 Oct;14(4):322. doi: 10.1016/s1078-5884(97)80252-3. PMID: 9366803.

- 64- Stepansky F, Hecht EM, Rivera R, Hirsh LE, Taouli B, Kaur M, Lee VS. Dynamic MR angiography of upper extremity vascular disease: pictorial review. *Radiographics*. 2008 Jan-Feb;28(1):e28. doi: 10.1148/radiol.e28. Epub 2007 Oct 29. PMID: 17967936.
- 65-Carneiro Júnior FCF, Carrijo ENDA, Araújo ST, Nakano LCU, de Amorim JE, Cacione DG. Popliteal Artery Entrapment Syndrome: A Case Report and Review of the Literature. *Am J Case Rep*. 2018 Jan 9;19:29-34. doi: 10.12659/ajcr.905170. PMID: 29311538; PMCID: PMC5769514.
- 66- Hatri A, Guermaz R, Laroche JP, Zekri S, Brouri M. Artérite de Takayasu et athérosclérose [Takayasu's arteritis and atherosclerosis]. *J Med Vasc*. 2019 Sep;44(5):311-317. French. doi: 10.1016/j.jdmv.2019.07.002. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31474340.
- 67-Sunderkötter C, Bonsmann G, Sindrilaru A, Luger T. Management of leukocytoclastic vasculitis. *J Dermatolog Treat*. 2005;16(4):193-206. doi: 10.1080/09546630500277971. PMID: 16249140.
- 68- Luo H, Fu J, Tang B. Acute Ischemia of Lower Limbs Caused by Thrombosis of Persistent Sciatic Artery: Case Report. *Clin Med Insights Case Rep*. 2020 Aug 18;13:1179547620951198. doi: 10.1177/1179547620951198. PMID: 32884388; PMCID: PMC7440720.
- 69- Jiménez-Gallo D, Ossorio-García L, Linares-Barrios M. Calcinosis Cutis and Calciphylaxis. *Actas Dermosifiliogr*. 2015 Dec;106(10):785-94. English, Spanish. doi: 10.1016/j.ad.2015.09.001. Epub 2015 Sep 26. PMID: 26394755.
- 70- Handford C, Thomas O, Imray CHE. Frostbite. *Emerg Med Clin North Am*. 2017 May;35(2):281-299. doi: 10.1016/j.emc.2016.12.006. PMID: 28411928.
- 71- Schwitzer JA, Dekker P, Kanuri A, Tirrell A, Sher SR. Post-mastectomy radiation arteritis in a patient presenting with upper extremity claudication. *AME Case Rep*. 2019 Dec 31;3:49. doi: 10.21037/acr.2019.11.03. PMID: 32030367; PMCID: PMC6987322.
- 72-Qaja E, Muco E, Hashmi MF. Buerger Disease. 2021 Feb 11. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 28613608.
- 73-Cacione DG, Macedo CR, Baptista-Silva JC. Pharmacological treatment for Buerger's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Mar 11;3(3):CD011033. doi: 10.1002/14651858.CD011033.pub3. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 May 4;5:CD011033. PMID: 26967103; PMCID: PMC7104255.

- 74- Cacione DG, do Carmo Novaes F, Moreno DH. Stem cell therapy for treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Oct 31;10(10):CD012794. doi: 10.1002/14651858.CD012794.pub2. PMID: 30378681; PMCID: PMC6516882.
- 75-Bouchez S, Fedele F, Giannakoulas G, Gustafsson F, Harjola VP, Karason K, Kivikko M, von Lewinski D, Oliva F, Papp Z, Parissis J, Pollesello P, Pözl G, Tschöpe C. Levosimendan in Acute and Advanced Heart Failure: an Expert Perspective on Posology and Therapeutic Application. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2018 Dec;32(6):617-624. doi: 10.1007/s10557-018-6838-2. PMID: 30402660; PMCID: PMC6267661.
- 76-Abraham WT, Adams KF, Fonarow GC, Costanzo MR, Berkowitz RL, LeJemtel TH, Cheng ML, Wynne J; ADHERE Scientific Advisory Committee and Investigators; ADHERE Study Group. In-hospital mortality in patients with acute decompensated heart failure requiring intravenous vasoactive medications: an analysis from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE). *J Am Coll Cardiol*. 2005 Jul 5;46(1):57-64. doi: 10.1016/j.jacc.2005.03.051. PMID: 15992636.
- 77-Cholley B, Caruba T. Should we keep levosimendan in our pharmacies? Yes, undoubtedly! *Anaesth Crit Care Pain Med*. 2019 Jun;38(3):211-212. doi: 10.1016/j.accpm.2019.04.007. PMID: 31076141.
- 78-Zhou X, Hu C, Xu Z, Liu P, Zhang Y, Sun L, Wang Y, Gao X. Effect of levosimendan on clinical outcomes in adult patients undergoing cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2018 Jun 1;26(6):1016-1026. doi: 10.1093/icvts/ivy017. PMID: 29415177.
- 79-Yildiz O. Vasodilating mechanisms of levosimendan: involvement of K⁺ channels. *J Pharmacol Sci*. 2007 May;104(1):1-5. doi: 10.1254/jphs.cp0060010. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17452812.
- 80-Kaptan K, Erinç K, Ifran A, Yildirim V, Uzun M, Beyan C, Işık E. Levosimendan has an inhibitory effect on platelet function. *Am J Hematol*. 2008 Jan;83(1):46-9. doi: 10.1002/ajh.20999. PMID: 17654687.
- 81-Plaschke K, Bent F, Rosenhagen C, Wagner S, Hofer S, Kopitz J. The inhibitory in-vitro effect of high-dose levosimendan on platelet function may be mediated through its

action as a phosphodiesterase inhibitor. *Coron Artery Dis.* 2012 May;23(3):215-20. doi: 10.1097/MCA.0b013e32835167cc. PMID: 22343797.

82-Sikora J, Pstrągowski K, Skibińska N, Sobczak P, Sikora A, Marszałł MP, Fabiszak T, Grzešek G, Kubica J. Impact of levosimendan on platelet function. *Thromb Res.* 2017 Nov;159:76-81. doi: 10.1016/j.thromres.2017.10.001. Epub 2017 Oct 2. PMID: 28987709.

83-Kamath SR, Jaykumar I, Matha S. Levosimendan. *Indian Pediatr.* 2009 Jul;46(7):593-6. PMID: 19638658.

84-Antila S, Sundberg S, Lehtonen LA. Clinical pharmacology of levosimendan. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(7):535-52. doi: 10.2165/00003088-200746070-00001. PMID: 17596101.150-www

85- Papp Z, Agostoni P, Alvarez J, Bettex D, Bouchez S, Brito D, Černý V, Comin-Colet J, Crespo-Leiro MG, Delgado JF, Édes I, Eremenko AA, Farmakis D, Fedele F, Fonseca C, Fruhwald S, Girardis M, Guarracino F, Harjola VP, Heringlake M, Herpain A, Heunks LMA, Husebye T, Ivancan V, Karason K, Kaul S, Kivikko M, Kubica J, Masip J, Matskeplishvili S, Mebazaa A, Nieminen MS, Oliva F, Papp JG, Parissis J, Parkhomenko A, Pöder P, Pözl G, Reinecke A, Ricksten SE, Riha H, Rudiger A, Sarapohja T, Schwinger RHG, Toller W, Tritapepe L, Tschöpe C, Wikström G, Lewinski DV, Vrtovec B, Pollesello P. Levosimendan Efficacy and Safety: 20 Years of SIMDAX in Clinical Use. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2020 Jul;76(1):4-22. doi: 10.1097/FJC.0000000000000859. PMID: 32639325; PMCID: PMC7340234.

86- Heringlake M, Alvarez J, Bettex D, Bouchez S, Fruhwald S, Girardis M, Grossini E, Guarracino F, Herpain A, Toller W, Tritapepe L, Pollesello P. An update on levosimendan in acute cardiac care: applications and recommendations for optimal efficacy and safety. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2021 Apr;19(4):325-335. doi: 10.1080/14779072.2021.1905520. Epub 2021 Apr 2. PMID: 33739204.

87-Figgitt DP, Gillies PS, Goa KL. Levosimendan. *Drugs.* 2001;61(5):613-27; discussion 628-9. doi: 10.2165/00003495-200161050-00006. PMID: 11368286.

88-Kivikko M, Lehtonen L, Colucci WS. Sustained hemodynamic effects of intravenous levosimendan. *Circulation.* 2003 Jan 7;107(1):81-6. doi: 10.1161/01.cir.0000043245.00859.11. PMID: 12515747.

7 - EKLER

Ek-1

		
T.C. BEZMİÅLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR METNİ		
SAYI: 2021/2.2 KONU: Sn. P	22.02.2021	
<p>“Sodium Laurate ile Oluşturulmuş Tromboanjitis Obliterans (TAO) Modelinde Levosimenden Uygulamasının Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı projenize ait başvurunuz 22.02.2021 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.</p>		
Çalışılacak Hayvanın	Türü Sayısı	Sıçan 24

- Etik kurulamadan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygulamasını (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

Ek-2



TC
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
(Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi)

Konu:Yürürlüğe Giren Proje Öneriniz

Tarih
12.03.2021

Sayın : Prof.Dr. Nilgün BOZBUĞA

Aşağıda bilgileri özetlenen proje önerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır.

Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

Prof.Dr. Ayşe EROL
Koordinatör

Proje Başlığı: SODIUM LAURATE İLE OLUŞTURULMUŞ TROMBOANJİTİS OBLİTERANS (TAO) MODELİNDE LEVOSİMENDAN UYGULAMASININ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Proje No: TTU-2021-37603

Proje Türü: T.Uzmanlık

Süresi: 6 ay

Başlama Tarihi: 12.03.2021

Onaylanan Bütçesi: 49949,40 TL

Proje Yürütücüsü: Prof.Dr. Nilgün BOZBUĞA

Araştırmacı(lar): ARŞ.GÖR. MELİKE ERTAN

Yayımları/ /Sertifikaları/Ödülleri

Ertan M, Öztaş DM. Pelvik konjesyon sendromu: Tanı metotları. Alpagut İU, editör. Pelvik Venöz Konjesyon (Pelvik Konjesyon Sendromu). 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.27-31.

Ertan M, Pamuk S, Tansel T. COVID-19 salgınında konjenital kalp cerrahisi planlaması Akgül A, editör. COVID-19 Vaskülopati, PostCOVID-19 Fenomeni ve Kalp Damar Cerrahisi. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.28-32.

Oztas DM, Umutlu M, Ertan M, Beyaz MO, Badem S, Erdinc I, Ulukan MO, Unal O, Conkbayir C, Alpagut U, Ugurlucan M. Brief Review of Right Aortic Arch with Aberrant Left Subclavian Artery. Aorta (Stamford). 2019 Dec;7(6):179-180. doi: 10.1055/s-0039-3401999. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32066186; PMCID: PMC7145435.

Canbay Ç, Öztaş DM, Babur Güler G, Ertan M, Kahveci G, Uğurlucan M. Nadir Bir Olgu: Takotsubo Kardiyomiyopatisi (A Rare Case: Takotsubo Cardiomyopathy). Turkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci 2016;28(3):123-7

Travmatik ATA psödoanevrizmalarında iki farklı yaklaşım. Kaan Altunyuva, Ergin Arslanoğlu, İbrahim Demir, Melike Ertan, Ömer Ali Sayın. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Rivaroksaban kullanım öyküsü olan hastada spontan femoral psödoanevrizma. Kaan Altunyuva, Ömer Ali Sayın, Ergin Arslanoğlu, Melike Ertan, İbrahim Demir. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Kısa boyunlu izole common iliyak arter anevrizmalarında endovasküler tedavi-tek merkezde 10 yıllık deneyim Çağla Canbay , Emre Gök , Ergin Arslanoğlu , Melike Ertan,İbrahim Demir, Onur Selçuk Göksel Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Zor boyunlu abdominal aort anevrızmasında endovasküler yaklaşım Onur Selçuk Göksel, Çağla Canbay, Melike Ertan, İbrahim Demir, Mert Meriç, Emre Gök, İbrahim Ufuk Alpagut Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Üst ekstremitede dev venöz ülser Çağla Canbay, Ömer Ali Sayın, Cemile Seda Pamuk, Melike Ertan, İhsan Bakır Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 15. Kongresi, 2018, Antalya.

Sertifikalar:

Ulusal Vasküler Ve Endovasküler Cerrahi Kongresi, 2017, Kıbrıs
TKDC derneği 15. Kongresi Katılım Belgesi, 26-29 Ekim 2018, Antalya

Bezmialem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları
Kullanım Sertifikası, İstanbul 2019

Damar Cerrahisinde Gri Alanlar 16 Şubat 2019, İstanbul

Charing Cross International Symposium Nisan, 2019, Londra

9. Kalp ve Damar Cerrahisi Okulu 27-29 Eylül 2019

Klinik Anatomi Kursu Kasım 2019, Ankara

Ven Akademisi 11 Ocak 2020