



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

**PERİFERİK VASKÜLER HASTALIKLARDA
OTOLOG KEMİK İLİĞİNDEN ELDE
EDİLEN MONONÜKLEER KÖK HÜCRE
DENEYİMLERİMİZ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali İhsan TEKİN

Antalya, 2012



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KALP VE DAMAR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI

**PERİFERİK VASKÜLER HASTALIKLARDA
OTOLOG KEMİK İLİĞİNDEN ELDE
EDİLEN MONONÜKLEER KÖK HÜCRE
DENEYİMLERİMİZ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali İhsan TEKİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cengiz TÜRKAY

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2012

TEŐEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum hocalarım sayın Prof.Dr. Ömer BAYEZİD, sayın Prof.Dr. Atalay METE, tez danışmanım sayın Prof.Dr. Cengiz TÜRKAY, sayın Prof.Dr. İlhan GÖLBAŐI'na ve asistanlık eğitimim süresince bana ağabeylik yapan sayın Yrd.Doç.Dr. Ozan ERBASAN'a;

Yine asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini her fırsatta benimle paylaşmış olan Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyelerinden başta sayın Prof.Dr. Tülin AYDOĞDU TİTİZ olmak üzere, sayın Prof.Dr. Nursel ŐAHİN ve sayın Doç.Dr. Hanife KARAKAYA KABUKÇU'ya,

Bu dönem boyunca birlikte çalıştığım bütün asistan arkadaşlarıma ve Kalp Damar Cerrahisi Kliniğinde görevli bütün diğer yardımcı sağlık personeli arkadaşlarıma;

Ve son olarak hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olduğunu bildiğim biricik anneme, babama, kardeşlerime ve sevgili eşim Dr. Burcu TEKİN'e

Sonsuz Őükran ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Tablolar Dizini	vi
Grafikler Dizini	vii
Şekiller Dizini	viii
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. Buerger Hastalığının Tanımı	1
1.2. Buerger Hastalığında Demografi ve Epidemiyoloji	2
1.3. Tromboanjitis Obliterans Patofizyolojisi	4
1.4. Klinik Özellikler ve Tanı Kriterleri	8
1.5. Periferik Arter Hastalıklarında Sınıflandırma Yöntemleri	14
1.5.1. Fontaine Sınıflandırması	14
1.5.2. Rutherford Sınıflandırması	15
1.6. Buerger Hastalığında Tedavi Seçenekleri	15
1.6.1. Rekonstrüksiyon	16
1.6.2. Sempatektomi	16
1.6.3. Antikoagülan tedavi	19
1.6.4. Antiagregan tedavi	19
1.6.5. Kalsiyum kanal blokörleri	19
1.6.6. Pentoksifilin tedavisi	20
1.6.7. Trombolitik (Fibrinolitik tedavi)	20
1.6.8. İloprost	20
1.6.9. Vasküler endotelial büyüme faktörü geni kullanımı	22
1.6.10. Epidural anestezi tedavisi	22
1.6.11. Epidural spinal elektriksel stimülasyon tedavisi	22
1.6.12. Kimyasal ajanlar ile sempatik sinir blokajı	22
2. GELİŞME	24
2.1. Anjiogenezde Hematopoetik Kök Hücrelerin Rolü	24
2.1.1. HSC'lerde Ang-1 ekspresyonu	26
2.1.2. HSC'ler ve vasküler ağ oluşumunun regülasyonu	28
2.1.3. HSC'ler ve damar filizlenmesi	28
3. HASTALAR, MATERYAL VE METOD	32
3.1. Çalışmanın Amacı	32
3.2. İstatistiksel Veriler ve Analizler	32
3.3. Çalışma Grubu	33
3.4. Çalışmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri	33
3.5. Takipte Kullanılan Parametrelerle İlgili Genel Bilgiler	34

3.5.1. Visual Analog Skala	34
3.5.2. Ankle-brakial basınç indeksi	35
3.5.3. Maksimum yürüyüş mesafesi (Treadmill) testi	36
3.5.4. Anjiografide kollateralizasyon	37
3.6. İlk Değerlendirme	37
3.7. Kök Hücrelerin Toplanması ve Hazırlanması	38
3.8. Kemik İliği Materyalinin Hazırlanması	38
3.9. ABMMNC İmplantasyonu	39
3.10. Postoperatif Takip	41
4. BULGULAR	42
4.1. Demografik Özellikler	42
4.2. Sonuçlar	42
4.2.1. İmplantasyon öncesi ölçümler	42
4.2.2. İmplantasyon sonrası 1. ay takip gözlemleri	43
4.2.3. İmplantasyon sonrası 3. ay takip gözlemleri	44
4.2.4. İmplantasyon sonrası 6. ay takip gözlemleri	45
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	67
5.1. Otolog Hücre Tedavisinin Klinik Sonuçları	68
6. ÖZET	77
7. ABSTRACT	79
8. KAYNAKLAR	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5HT	5-HidroksiTryptamin
ABMMNC	Kemik İliğinden Elde Edilmiş Otolog Mononükleer Hücre
ABPI	Ankle-Brakial Basınç İndeksi
ACTH	Adenokortikotropin
ADP	Adenozin Di Fosfat
ADSC	Adipose Tissue-Derived Cells
BMC	Bone Marrow Cells
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CAM	Koryoallantoik Membran
CD	Cluster of differantiation
CFA	Common Femoral Arter
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptid
CLI	Kritik Bacak İskemisi
DM	Diabetes Mellitus
DSA	Dijital Substraction Anjiografi
EC	Endotel Hücresi
EPC	Endothelial Progenitor Cells
ESR	Eritrosit Sedimantasyon Hızı
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
G-CSF	Granulocyte- Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Stimule Edici
HADSC	Human adipose tissue-derived cells
hEPC	Human Endothelial Progenitor Cells
HGF	Hepatosi Büyüme Faktörü
HLA	Human Lökosit Antijeni
HPA Aks	Hipotalamo-Hipofizer-Adrenal Aks
I-CAM	Intercellular Adhesion Molecule
IDO	Indolamin 2,3-dioksijenaz
IFN	İnterferon
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin

IMG	İntussusseptif Mikrovasküler Büyüme
ITS	İntervasküler Doku Elemanları
LPS	Lipopolisakkarit
MCP	Monositik Kemotaktik Protein
MNC	Mononuclear Cells
MSC	Mesenchymal Stem-Cell Like Cells
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
OEC	Outgrowth Endothelial Cell
PAH	Periferik Arer Hastalığı
PAI	Plazminojen Aktivatör İnhibitörleri
PBMNC	Periferik Kandan Elde Edilen Mononükleer Hücreler
PDGF	Platellet Derivated Growing Factor
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PMN	Polimorfonükleer Lökositler
SMC	Düz Kas Hücresi
TACT	Therapeutic Angiogenesis with Cell Trasnplantation
TAO	Tromboangiitis Obliterans
TcPO ₂	Transkutanöz Parsiyel Oksijen Basıncı
TGF- β	Transforming Growing Factor- β
TLR	Toll Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
TNF- β	Tümör Nekrosis Faktör β
tPA	Doku Plazminojen Aktivatörü
TXA ₂	Tromboksan A ₂
u-PA	Urokinaz type Plazminojen Aktivatörü
VAS	Visual Analog Skala
V-CAM	Vascular Cellular Adhesion Molecule
VEGF	Vazoendotelyal Büyüme Faktörü
vWF	Von Willebrand Faktör

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
1.1.	Nielsen ve Lassen tarafından yapılmış, Buerger hastalığının tanısında puanlama tablosu	11
1.2.	Periferik arter hastalıklarında Fontaine sınıflaması	14
1.3.	Periferik arter hastalıklarında Rutherford sınıflandırması	15
5.1.	Alt ekstremitte iskemisinde hücre tedavisi uygulanması konusunda yapılmış olan hayvan modelleri ile yapılan çalışmalara genel bir bakış	75
5.2.	Kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücreler ile yapılan çalışmalar	76

GRAFİKLER DİZİNİ

<u>Grafik</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Hastaların yaş, boy ve kilo ortalamaları grafiği	48
4.2. Hastaların 1. ay, 3. ay ve 6. ayda yapılan gözlemlerde ağrısız yürüyüş mesafelerindeki artış değerleri	48
4.3. Hastaların 1. ay, 3. ay ve 6. ayda yapılan gözlemlerde ağrısız yürüyüş mesafelerindeki artış değerleri	49
4.4. İmplantasyon öncesi ve implantasyon sonrası 1. ay, 3. ay, 6. ay kontrollerinde ağrısız yürüme zamanı testi sonuçları	49
4.5. Ağrısız yürüme zamanı testi sonuçlarına göre 1-3-6. aylarda ağrısız yürüme zamanındaki artış miktarları	50
4.6. İmplantasyondan önce, implantasyondan 1 ay sonra, implantasyondan 3 ay sonra, implantasyondan 6 ay sonra yapılan visual analog skala testi sonuçları	50
4.7. Visual analog skalatetinde implantasyon işlemi sonrası 1. ayda, 3. ayda ve 6. ayda yapılan takiplerde görülen azalma miktarları	51
4.8. Visual analog skala testine ait implantasyon öncesi, implantasyondan 1 ay sonra, implantasyondan 3 ay sonra ve implantasyondan 6 ay sonra yapılan takiplerde elde edilen değerler	51
4.9. Visual analog skala testine ait implantasyon öncesi, implantasyon sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. ayda elde edilen sonuçlar	52
4.10. İmplantasyondan sonra 1. ay, 3. ay ve 6. ayda visual analog skala testinde gözlemlenen değişimler	52
4.11. ABPI değerlerinin implantasyondan önce ve implantasyondan sonra 3. ve 6. aylarda değişimleri	53
4.12. ABPI değerlerinin implantasyondan önce, 3. ay ve 6. ay kontrollerindeki değişimleri	53
4.13. ABPI değerlerinde implantasyondan sonra 3 ve 6. aylarda yapılan kontrollerde görülen değişim aralıkları	54
4.14. ABPI değerlerinde implantasyon sonrası 3 ve 6. aylarda implantasyon öncesi döneme göre artış miktarları	54
4.15. İmplantasyon öncesi dönem ve implantasyon sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. ay takiplerinde elde edilen ağrısız yürüme mesafesi değerleri ortalaması	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Arteriogenez prosesinde meydana gelen olaylar	29
2.2. Arteriogenez prosesinde meydana gelen olaylar	31
3.1. İmplantasyon prosedürünün şematik gösterimi	40
4.1. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	56
4.2. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	57
4.3. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	58
4.4. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	59
4.5. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	60
4.6. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	61
4.7. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	62
4.8. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	63
4.9. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	64
4.10. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	65
4.11. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri	66

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1. Buerger Hastalığının Tanımı

Tromboanjitis obliterans veya Buerger hastalığı sebebi tam olarak bilinmeyen ve genelde gangren ve doku kaybı ile sonuçlanan, non-aterosklerotik, episodik, keskin segmentasyonlar gösteren, inflamatuvar, tıkaçıcı-trombotik, non-destrüktif bir hastalıktır. Buerger hastalığı genelde alt ekstremitelerde, daha az yoğun olarak üst ekstremitelerde ve çok nadir olmak üzere de serebrovasküler bölgedeki distal segmentte nörovasküler demet içerisindeki damarları ve sinirleri etkilemektedir. Çoğunlukla düşük sosyoekonomik sınıfta bulunan sigara içicisi erkeklerde görülen bu hastalığın temel karakteristiklerinden bir tanesi olan vasküler inflamasyon periyodik bir şekilde ve örneğin haftalık, aylık veya yıllık aralıklar ile ortaya çıkabilmektedir. Hastalık ortaya çıktığı ekstremitenin distalinde görülmeye başlar ve proksimale doğru ilerleme gösterir ancak hastalığın her iki ekstremitelerde simetrik olarak bir dağılımı da yoktur. Çoğu zaman etkilediği iki alt ekstremitelerde sağ ve sol ayağın ikisi de farklı derecelerde etkilenirler.

Günümüzde 2. ile 4. dekat arasındaki genç erkeklerde en sık görülen damar hastalığı olan Buerger hastalığı inflamatuvar karakterde vasküler bir hastalık olup tarihçesi 1879 yılına kadar gitmektedir.

Von Winiwarter 1879 yılında 57 yaşındaki 12 yıldır ayak ağrısı şikayeti olan ve ilerleyen süreçte gangren oluşup ampute edilen bir erkek hastanın üzerinde yaptığı çalışmalardan elde ettiği bulguları yayınlamış ve bu hastada görülen rahatsızlığın aterosklerozdan farklı karakteristiğe sahip olan bir tıkaçıcı arter hastalığı türevi olduğunu görmüştür. Von Winiwarter bu şekilde tanımladığı hastalığa endarteritis obliterans adını vermiştir ve yaptığı patolojik incelemelerde intimal proliferasyon, trombus ve fibrosis görmüştür. Tarihte ilk kez Felix Von Winiwarter ampute edilen bacakta endoterit ve endoflebitin aterosklerozdan farklı olduğunu bildirmiştir (5).

Bu dönemden yaklaşık olarak 30 yıl sonra 1908 yılında Leo Buerger Tromboanjitis obliterans olarak adlandırdığı hastalığın klinik ve patolojik özelliklerinin tanımlamasını 11 hasta üzerinde uyguladığı gözlemler ve çalışmalar ile ayrıntılı ve doğru bir biçimde göstermiştir (6). Hastalığın Tromboanjitis obliterans olarak isimlendirilmesinin sebebi akut safhadaki histolojik tabloda hem arter, hem de

venlerde gelişen inflamatuvar bir reaksiyon ve trombozun ön planda bulunmasıdır. Patolojik olarak kan damarı duvarlarının göreceli olarak korunduğu yüksek oranda hücreli inflamatuvar bir trombus vardır.

Leo Buerger daha sonra 500 hasta üzerinde yaptığı muayene ve gözlemlerini Ekstremitelerde Sirkülatuvar Bozukluklar (The Circulatory Disturbances of the Extremities) kitabında yayınlamıştır (7).

Leo Buerger'in 1908 yılında yapmış olduğu kapsamlı yayınından sonra Allen ve Brown 1922-1926 yılları arasında Mayo Klinikte inceledikleri çoğu Yahudi ve erkek olan tromboanjitis obliteranslı olgulara ait bulguları bildirmişlerdir. Bu olgularda ayaklarında kladikasyo, parmaklarda gangrenöz ülserler, parmağın veya ayağın tamamını kaplayan gangrenler geliştiğini rapor etmişlerdir. Allen ve Brown'ın yaptıkları incelemeler sonucunda hastalığa dair ortaya koyduğu tanım ise 1908 yılında Leo Buergerin yaptığı tanım ile aynı özellikte idi (8) .

Leo Buerger'in hastalığın tanımlanmasında yapmış olduğu çalışmalardan dolayı, hastalığın Tromboanjitis obliterans olan adı eponim isimlendirme ile Buerger hastalığı olarak da kullanılmaktadır.

1.2. Buerger Hastalığında Demografi ve Epidemiyoloji

Buerger hastalığı hemen hemen tüm coğrafi bölgelerde görülmesine rağmen Orta ve Uzak Doğu ülkelerinde, Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülmesine göre yaygın olarak ortaya çıkmaktadır (9,10). Buerger hastalığının görülme oranları Amerika Birleşik Devletleri'nde %1'in altında, Avrupa'da %0.5-%5 arasında değişen oranlarda, Uzak Doğu'da %32 ve ülkemizde de %10 civarında tespit edilmiştir (11). Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde tromboanjitis obliterans insidansının azalmış olması bu ülkelerde daha ciddi tanı kriterleri kullanılmasına bağlanılmıştır (8).

Mayo Klinikte tromboanjitis obliterans tanısı alan hastaların sayısı 1947 yılında 104/100.000 iken, 1987 yılında bu oran 12.6/100.000'e gerilemiştir (12). Buerger hastalığının prevalans oranlarının Avrupa ve diğer ülkelerde çok değişkenlikler gösterdiği pek çok çalışmalar ile gösterilmiştir. Buna göre Buerger hastalığı, Batı Avrupa ülkelerinde %0.5 - %5.6 aralığında, Hindistan'da %45-%63 aralığında, Kore ve Japonya'da %16-66 aralığında, İsrail'de Aşkenazi ırkına mensup olan Yahudilerde %80 civarında bir oran ile karşımıza çıkmaktadır (13,14).

Wessler, uzun süren çalışmaları sonucunda, literatürdeki çeşitli çalışma ve görüşleri karşılaştırmış ve Tromboanjitis Obliterans'ın Aterosklerosis Obliterans'ın sık rastlanmayan bir formu olduğunu öne sürmüştür. Wessler'in bu savına karşılık Mc. Kusick, Goodman, Shaltz, Brown gibi araştırmacılar bu görüşe karşı çıkarak Tromboanjitis Obliterans'ın, aterosklerosisden farklı bir antite olduğunu ve klasik görüşün doğruluğunu savunmuşlardır (15,16).

Hill ve ekibinin Buerger hastaları üzerinde yaptığı analiz çalışmasının sonuçlarına göre hastalığa yakalanan kişilerin neredeyse tamamında sigara kullanımının olduğu gösterildi. Buna bağlı olarak sigara ve tütün ürünleri kullanımının, soğuk hasarı, mikotik enfeksiyon gibi etkenlerin Tromboanjitis Obliterans gelişiminde etkili olduğunu da açıklamışlardır.

Buerger hastalığı daha çok erkek cinsiyetinde ve 20-40 yaşları arasında görülür (%98). 1970 yılından önce yapılan yayınlarda Buerger hastalığının kadın cinsiyetindeki insidansının %1-2 arasında olduğu bildirilmiş olmasına karşın son yıllarda yapılan çalışmalarda hastalığın kadın cinsiyetindeki insidansının %5-%30 arasında değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (17,20). İnsidanstaki bu kadar belirgin artışın nedeni bilinmemektedir ancak en önemli nedenin kadın cinsiyetinde son yıllarda artan sigara kullanımının olduğu düşünülmektedir. Sigara içen kadın sayısı ile Buerger hastalığı insidansı arasındaki ilişki çok uyumlu gibi görünse de Japon kadınlarında Buerger hastalığı prevalansının, sigara içen kadın sayısı ile karşılaştırıldığında göreceli olarak oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (21,22). Buradan da Tromboanjitis Obliterans gelişmesinde sigaradan başka faktörlerin de sorumlu olabileceği düşünülmelidir.

Hastalığın zenci ırkında nadiren görülmesine karşın Yahudilerde sıklıkla görüldüğüne dair bir tez öne sürülmüşse de daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar bu kanıyı destekler nitelikte sonuçlar vermemiştir (8). Hastalığın ırklar arasında görülen insidans farklılığında tanı kriterlerinin farklı olmasının da etkisi olabileceği düşünülmektedir.

1.3. Tromboanjitis Obliterans Patofizyolojisi

Buerger hastalığı ekstremitelerdeki küçük ve orta boy arterlerde gelişen segmental trombotik oklüzyonlar ile karakterize klinik bir sendromdur. Hastalık nekrotize arterit ve aterosklerozdan patolojik bulgular ve klinik sunum bakımından farklılıklar taşımaktadır. Hasta grubunu çoğunlukla sigara kullanan genç erkekler oluşturmaktadır. Etkilenen ekstremitede distalde iskemiye bağlı ülserasyonlar, ayağın tamamında veya sadece ayak parmaklarında gangrenler görülebilir. Buerger hastalığında atipik olarak koroner arterler, serebral arterler ve visceral arterler de tutulabilmektedir ancak alt ekstremitede çok sık bir şekilde ortaya çıkan bu tutulum üst ekstremitede alt ekstremitedeki kadar sık görülmemektedir. Hastalığın mortalite oranları çok yüksek olmamakla birlikte bu hastalarda ağır iskemi, iskemiye bağlı doku kaybı ve major/minor amputasyonlar görülebilmektedir. Aynı zamanda hastalığın tanısının konulmasında önemli olan noktalar olarak, sigara kullanımı olması (sigara kullanım öyküsünün aktif olması ile beraber önceden kullanmış ve güncel olarak sigaranın bırakılmış olması da tanı kriteri olarak göz önüne alınmalıdır), hastanın 45-55 yaş arasında bulunması, proksimal vaskülarizasyondan ayrı olarak infrapopliteal arterial segmentte oklüzyonlar, ekstremitede distal kesimlerinde arteriyal yapıların azalmış olmasına bağlı olarak parmaklarda ülserler görülmesi ve Raynaud sendromu belirtileri, gezici tromboflebitler, ateroskleroz, diyabet, arterit, proksimal emboli ve hiperkoagülabilite durumlarının ekarte edilmesine dikkat edilmelidir (1).

Çoğunlukla düşük sosyoekonomik sınıfta bulunan sigara içicisi erkeklerde görülen bu hastalığın temel karakteristiklerinden bir tanesi olan vasküler inflamasyon periyodik bir şekilde ve örneğin haftalık, aylık veya yıllık aralıklar ile ortaya çıkabilmektedir (2). Hastalık ortaya çıktığı ekstremitenin distalinde görülmeye başlar ve proksimale doğru ilerleme gösterir ancak hastalığın her iki ekstremitede simetrik olarak bir dağılımı da yoktur. Çoğu zaman etkilediği iki alt ekstremitede sağ ve sol ayağın ikisi de farklı derecelerde etkilenirler (3,4).

Buerger hastalığı, sigara içicisi, genç erkeklerde sıklıkla görülen bir hastalıktır. Bununla beraber günümüzde kadınların sigara içme oranının artması ile birlikte, kadınlarda da Buerger hastalığının görülme oranı artış göstermektedir. Hastalığın patofizyolojik temellerine bakarken neden erkek hasta grubunda daha yoğun olduğuna baktığımızda bunun cevabının 1995 yılında Ajayi ve ekibi tarafından araştırıldığı ve

sonuç olarak da testosteronun, platelletler üzerindeki TXA₂(Trombaksan A₂) reseptör yoğunluğunu artırarak; trombositlerin aktivasyonunu ve agregasyon özelliklerini artırdığı ortaya konulmuştur (23). Ayrıca sigara kullanımı lökosit sayısını ve damar endotelinden salınan Von Willebrand Faktör (vWF) miktarını erkeklerde kadınlara göre daha fazla artırmaktadır (24). Burada erkekler ve kadınlar arasındaki bir diğer ayırım ise erkeklerin daha çok platellet kaynaklı arteriel tromboembolizm, kadınların ise pıhtılaşma faktörlerinden kaynaklanan venöz tromboz yaşamalarıdır (25).

Buerger hastalığı ile ilgili olarak yapılan pek çok çalışmadan belirli bir bölümü de bu hastalığın genetik temellerini ortaya koymaya yöneliktir ve bu çalışmalarda Buerger hastalığında ortaya çıkan durumların genetik kontrol etmenlerine dayandığı ortaya konulmuştur. Burada genetik temelden kastedilen genom üzerinde belirli lokuslardan kodlanan HLA yüzey proteinleridir. Bu proteinlerin dominant gen lokuslarının tromboanjitis obliterans bölgesel dağılımı ise; İngiltere’de HLA-B5 ve HLA-A9, Japonya’da HLA-DRB1 ve HLA-B54, Hindistan’da HLA-B40 ve İsrail’de HLA-DR4 olarak gösterilmiştir. Japon toplumunda HLA-DRB1 ve CD14 TT genotiplerinin prezentasyonu Buerger hastalığının etiyopatogenezinde önemli roller oynamaktadır (26-30). Tüm bu bilgilerin ışığında tromboanjitis obliterans yada diğer ismi ile Buerger hastalığının sadece dış etmenler ile değil genetik faktörler ile de kontrol edilen multifaktöriyel bir hastalık olduğunu söyleyebiliriz. Platellet reseptör polimorfizmleri de bu hastalığın ortaya çıkışında temel olgulardan bir tanesi olan arteriel tromboembolizm için önemlidir. Hastalığın ortaya çıkmasında etkili olan genetik faktörler ortaya konuyor olsalar dahi bunlardan hiçbirisi başlı başına hastalığın nasıl ortaya çıktığını açıklayamamaktadır. Bunun için Tromboanjitis obliterans patogenezi ile ilgili daha fazla çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Ortaya çıkışındaki net sebep halen açıklanamamış olmasına karşın sigara kullanımının Buerger hastalığının temel tetikleyicisi olduğu düşünülmektedir (31-34). Hastalıktan etkilenen kişilerin çok büyük bir bölümünde solunum yolu ile tütün kullanımı veya tütün çiğnenmesi bildirilmesine karşın Buerger hastalığından tanı almış ve sigara kullanmayan hastalar da bildirilmiştir. Ayrıca kokain kullanımının da Buerger hastalığında tetikleyici sebepler arasında olduğu bildirilmiştir (35). Hastalığın ortaya çıkışında, progresyonunda ve tekrarlayan ataklarında sigara kullanımının çok büyük bir rolü olduğu su götürmez bir gerçektir. Buerger hastalarında sigara kullanımının bırakılması ile birlikte uygun disipline uygulanan medikasyonun

iskemik ülserlerin ve iskemik lezyonların ilerlemesinde duraklama ve bir miktar düzelme görüldüğü bildirilmiştir. Nitekim bu da sigaranın rolünün görülebilmesi için iyi bir örnek teşkil etmektedir.

Matsushita ve ekibi Buerger hastalığında, nikotinin vücuttaki primer yıkım ürünü olan cotininin seviyesini ölçmüşler ve bu seviyeler ile Buerger hastalığının progresyonu arasında güçlü bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir (36). Cotinin, nikotinin vücuttaki primer yıkım ürünüdür ve yarılanma ömrü 20-30 saat arasındadır. Vücuttan primer atılım yolu idrar iledir. Buerger hastalığında idrarda görülen cotinin seviyelerinin düşmesi ile iskemik semptomların düzelmesi arasında korelasyon görülmektedir.

Hastalığın olası prognozunda segmental arterial ve venöz trombüsler olmasına rağmen hiperkoagülabilité durumu ile Buerger hastalığı arasındaki ilişki net olarak saptanamamıştır. Endovasküler tromboz üzerinde yapılan pek çok çalışma immün mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Adar ve ekibinin İsrail’de yaptığı bir çalışmada tip 1 ve tip 3 kollajene karşı otoimmün yanıtın gelişebildiği görülmüş ve bu durumun Buerger hastalığının ortaya çıkmasında etkili olabileceği düşünülmüştür (37). Tip 1 ve tip 3 kollajenin normo-fizyolojik şartlarda damar duvarında bulunması bu çalışmada temel dayanak noktalarından bir tanesini oluşturmaktadır. Buna istinaden Eichorn ve ekibi de bu durum ile ilişkili bazı antikorların Buerger hastalarında yükselme eğilimi gösterdiğini tespit etmiştir. Bu hastalarda kontrol gruplarına göre antikor seviyelerinde anlamlı yükselmeler görülmüştür (38).

Japonya - Nagoya’da Kobayashi ve ekibi tarafından Buerger hastalarından alınmış ve parafine gömülerek kesitlenmiş preparatlarda yapılmış immunohistokimyasal çalışmalarda intima tabakasındaki damar duvarında bulunan bileşenlerde ve trombüs içerisinde belirgin immün sistem elemanı infiltrasyonu olduğu gösterilmiştir (39). İntimada olan akut lezyonlarda CD3+ T hücreleri ve CD68+ makrofajların ve S-100+ dentritik hücrelerin rol aldıkları da bu çalışmada görülen sonuçlardan bir tanesidir. Tüm vakalarda makrofajlar ve dentritik hücrelerin HLA-DR antijeni ile ilişkili intimal infiltrasyon gösteriyor olması da elde edilen ilginç sonuçlardandır. Damar internal elastik laminasında da çeşitli immunoglobulinler ve kompleman sistem elemanları (C3d, C4c) birikimi de izlenmiştir. Bu denli yapılan çalışmalar ve bu çalışmaların sonuçlarına rağmen Buerger hastalığının oluşumundan sorumlu olan antijen halen net olarak bilinmemektedir.

Buerger hastalığının fizyopatolojisinde inflamasyon ve trombozun çok güçlü bir ilişkisi vardır. İnflamasyonun hücrel ve moleküler komponentleri olan lökositler, trombositler, mast hücreleri, endotelial hücreler ve nöropeptidler bu olayda birbirleri ile çok yakın ilişkiler içerisindedirler (40,41,42). Buerger hastalığında patolojik durum trombusun paternine ve inflamatuvar hücrelere göre; akut, subakut ve kronik olmak üzere kategorize edilebilmektedir (43,44). Diğer vaskülitlerden farklı olarak Tromboanjitis obliteransın her üç fazında da damar yapısını oluşturan komponentler ve internal elastik lamina yapısı intakt olarak görülebilmektedir (45,46).

Akut faz tromboanjitis obliteransın en karakteristik özelliği etkilenen damarın duvarında oluşmaya başlayan hiperselüler ve minimal inflamatuvar trombus yapısıdır. Bu fazda inflamasyon alanının baskın hücreleri olan polimorfonükleer lökositler trombus içerisinde mikroabseler meydana getirirler. (45,46). Her ne kadar subakut fazda bu PMN (polimorfonükleer) lökositler ve mikroabseler alanlar trombusun rekanalizasyonunu sağlasa da son dönem kronik fazda vasküler fibrosis ile birlikte olgun bir trombus formasyonunun içerisinde görülürler.

Akut fazda gerçekleşen ilk olay tartışmalıdır. Bazı kaynaklarda ilk olarak gerçekleşen olayın trombus şekillenmesi olduğu ve daha sonra inflamatuvar cevabın şekillenen trombus üzerinden geliştiği söylenmektedir (47). Bunun tam tersi olarak da vaskülit indükleyicisi olarak damarın intima katmanına karşı gelişen bir antijen cevabın tüm bu olayların tetikleyicisi olduğu savunulmaktadır (48). İkinci hipoteze göre akut intimal inflamasyon mikroabselerin ve trombus şekillenmesinin sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. İntima katmanında trombusun oluştuğu yerde CD68+ makrofajlar, S100+ dentritik hücrelerin görülmesi bize burada bu hücreleri çağıran ve tam olarak ne olduğu bilinmeyen bir antijenin varlığını göstermektedir (49). Hastalığın akut fazı geçtikten sonra daha fazla TCD4+ ve bir miktar TCD8+ lenfositleri vasküler duvara ve trombus içerisine penetre olmaktadır (50). TCD4+ hücreleri daha çok T_{HELPER}-1 formunda TCD8+ ve Ig-G ile birlikte granüloma alanının oluşumunda rol oynayan immun cevabın ortaya çıkışını ve tromboanjitis obliterans morfolojisinin oluşmasını sağlar. Ayrıca TCD4+ hücreleri hücre aracılıklı immun yanıtın oluşumunda bir orkestra şefi gibi hareket ederek hem TCD8+ hücrelerini hem de B hücrelerini harekete geçirmektedir. İlginç olarak hem kompleman sistem elemanları hem de antijenler vasküler endotelde işe dahil olmakta ve İnterferon γ (IFN- γ) ve mRNA

yapıları da damarın oklüde olan segmentindeki vasa-vasorumların etrafında görülebilmektedirler(50).

1.4. Klinik Özellikler ve Tanı Kriterleri

Buerger hastalığında tanının konulabilmesi için çok çeşitli tanı kriterleri bulunmaktadır. Tüm tanı kriterlerinde ortak bulunan noktalar, distal ekstremitelerde iskemisine bağlı istirahat ağrısı, ülserasyon ve gangrendir (52,53). Ayrıca hasta hikayesinde bulunan spesifik durumlar da tanının konulabilmesi için oldukça büyük bir önem teşkil etmektedir (54). Ekstremitelerde distalde görülen iskemik istirahat ağrısı ve ülserasyonlar daha çok Buerger hastalığına özgü olup aterosklerozda görülme sıklığı daha düşüktür. Buerger hastalığı ile ilgili yayınlanan pek çok raporda, hastaların %50'sinde izole alt ekstremitelerde tutulumu, %30-40'ında her iki ekstremitenin tutulumu ve iskemisi, yaklaşık %10'unda da sadece üst ekstremitelerde tutulum gözlenmiştir. Buerger hastalığında üst ekstremitelerde görülen semptomlar olan Raynaud sendromu ve parmaklarda olan iskemi ile aterosklerozdan ayrılmaktadır. Bunlara ek olarak Buerger hastalığında %40-50 oranında yüzeysel tromboflebitler görülmektedir (52,55). Özetle Buerger hastalığı aterosklerozun bir varyantı değil başlı başına kendi semptomları ve klinik sunumu olan farklı bir hastalıktır. Buerger hastalığında takip gözlemleri, cinsiyet farkı gözetmeksizin benzer prezentasyon göstermektedir.

Tromboanjitis obliteransın ayırıcı tanısını koyabilmek için öncelikle hasta öyküsüne bakılmalı; eğer hasta kladikasyon benzeri bir kronik iskemik istirahat ağrısı ve iyileşmeyen ülserler tariflemiş ise aterosklerotik periferik tıkaçıcı arter hastalıkları ve diyabetik ayak durumu devre dışı bırakılmalıdır. Eğer hasta gezici tromboflebit tanımlamış ise sigara kullanımı ve Behçet hastalığına bağlı akciğer kanseri de devre dışı bırakılmalıdır. Burada Behçet hastalığı ile ilgili belirtilmesi gereken önemli bir nokta pek çok Behçet hastasının vasküler semptomları tromboanjitis obliterans ile karıştırılmakta ve bu hastalar aslında almaları gereken kortikosteroid tedavisini alamamaktadırlar.

Buerger hastalığında tanı konulması genellikle çok zor değildir. Tanı için gereken kriterler Japonya'da Shionoya tarafından tanımlanmıştır (56).

1. Sigara kullanma geçmişi
2. Hastanın 50 yaşından genç olması;

3. İnfra-popliteal arterial oklüzyonlar;
4. Etkilenen alt ekstremitede görülen gezici flebitler;
5. Sigara dışında hiçbir aterosklerotik faktörün bulunmaması;

durumları ile birlikte eğer beş kriterden en az dört tanesi sağlanmış ise hastada Buerger hastalığı tanısı konulabilmektedir.

Bununla birlikte tanı kriterlerinde bir diğer yaklaşım da Olin ve arkadaşlarından gelmiştir (57). Olin Kriterlerine göre:

1. 45 yaşından daha genç olması;
2. Geçmişte veya güncel olarak tütün veya tütün ürünleri kullanım hikayesi;
3. Klodikasyo tanımı, istirahat ağrısı, iskemi ülserler veya gangrenlerin sebebinin distal ekstremitte iskemisi olduğunun non-invazif vasküler testler ile ortaya konması;
4. Proksimal embolizasyonun olası kaynakları arteriyografi ve ekokardiyografi tetkikleri ile ekarte edilmelidir.
5. Hastalıktan etkilenen ve etkilenmeyen ekstremiteler için arteriografik bulgular karşılaştırılmalı ve değerlendirilmelidir.

Ekstremitte distalinde nabız alınamamasının nedenleri arasındaki arteriyel embolinin Buerger hastalığı tanısında ekarte edilmesi gerekmektedir. Proksimal embolinin muhtemel sebeplerinden, anevrizma, aterosklerotik lezyonlar, popliteal entrapment, adventisyal kistik hastalık, ergotizm veya ilaç kaynaklı arterit, otoimmün vaskülit veya hiperkoagülabilité gibi durumlar Buerger hastalığı tanısı konulmadan önce dışlanmış olmalıdır. Hastalığın tanısının konulmasında belirli kriterler aşağıda iki tabloda verilmiştir. Birinci tabloda (OREGON) hastalığın tanısında geçerli olan kriterler majör ve minör kriterler olarak verilmiştir, bu yöntemde major kriterlerin bulunması kesinlikle gerekli iken minor kriterlerin de bulunması tanıyı desteklemekte kullanılmalıdır (58,59).

Oregon;

MİLLS VE PORTER TARAFINDAN TANIMLANAN BU TASLAĞA GÖRE MAJÖR VE MİNÖR KRİTERLER:

MAJOR KRİTERLER:

- **Ekstremitte distalinde görülen semptomların 45 yaşından önce ortaya çıkmış olması;**
- **Sigara kullanımı**

Dışlanması gereken durumlar:

1. Proksimalde emboliye sebep olacak muhtemel kaynaklar;
2. Travma ve lokal lezyonlar;
3. Otoimmün hastalıklar;
4. Hiperkoagülabilité durumu;
5. Ateroskleroz (*Neden olabilecek sebepler aşağıda verilmiştir.*)
 - a. Diyabet
 - b. Hiperlipidemi
 - c. Hipertansiyon
 - d. Böbrek yetmezliği
6. Popliteal arter proksimalinde veya distal brakial arter seviyesinde hasar görmemiş arteriel yapılar;
7. Distal oklüsif hastalıklarda;
 - a. Segmental arteriyel doppler ve dört uzuva pletismografi
 - b. Arteriografi
 - c. Histopatolojik tetkiklerde
Buerger hastalığı ile uyumlu sonuçlar görülmesi.

MİNOR KRİTERLER;

- **Gezici yüzeyel flebitler**
 - **Raynaud sendromu;**
 - **Kladikasyo tarifi**
-

Tablo 1.1. Nielsen (59) ve Lassen (60) tarafından yapılmış, Buerger hastalığının tanısında puanlama tablosu (61).

Pozitif Bulgular				
Başlangıç Yaşı:	<30 yaş	+2	30-40 yaş	+1
Ayak Klodikasyo Tarifi:	Güncel	+2	Geçmişte	+1
Üst Ekstremiteler:	Semptomatik	+2	Aseptomatik	+1
Gezici Flebitler:	Güncel	+2	Geçmişte	+1
Raynaud Sendromu:	Güncel	+2	Geçmişte	+1
Anjiyografi; Biyopsi:	Her ikisi de	+2	Sadece birisi	+1
Negatif Bulgular				
Başlangıç Yaşı:	40-50	-1	>50	-2
Cinsiyet / Sigara Kullanımı:	Bayan	-1	Sigara Kullanmıyor	-2
Yerleşim:	Tek Uzun	-1	Bacak Tutulumu Yok	-2
Nabız Yokluğu:	Brakial	-1	Femoral	-2
Ateroskleroz; Diyabet; Hipertansiyon; Hiperlipidemi;	Tanıdan 5-10 yıl sonra	-1	Tanıdan 1-2 yıl sonra	-2
Puanlama Derecesine Göre				
0-1	Buerger Hastalığı Tanısı Dışlanabilir	0-1	Buerger Hastalığı Tanısı Dışlanabilir	0-1
2-3	Düşük İhtimal Buerger Hastası	2-3	Düşük İhtimal Buerger Hastası	2-3
4-5	Muhtemel / Büyük İhtimalle Buerger Hastası	4-5	Muhtemel / Büyük İhtimalle Buerger Hastası	4-5
>6	Çok Yüksek İhtimal Buerger Hastası	>6	Çok Yüksek İhtimal Buerger Hastası	>6

Buerger hastalığında tanının konulabilmesi için çok çeşitli tanı kriterleri bulunmaktadır. Tüm tanı kriterlerinde ortak bulunan noktalar, distal ekstremitelerde iskemisine bağlı istirahat ağrısı, ülserasyon ve gangrenlerdir. Ayrıca hasta hikayesinde bulunan spesifik durumlar da tanının konulabilmesi için oldukça büyük bir önem teşkil etmektedir. Ekstremitelerde distalinde görülen iskemik istirahat ağrısı ve ülserasyonlar daha çok Buerger hastalığına özgü olup aterosklerozda görülme sıklığı daha düşüktür. Buerger hastalığı ile ilgili yayınlanan pek çok raporda, hastaların %50'sinde izole alt ekstremitelerde tutulumu, %30-40'ında her iki ekstremitenin tutulumu ve iskemisi, yaklaşık %10'unda da sadece üst ekstremitelerde tutulum gözlenmiştir. Buerger hastalığında üst ekstremitelerde görülen semptomlar olan Raynaud sendromu ve parmaklarda olan iskemi ile aterosklerozdan ayrılmaktadır. Bunlara ek olarak Buerger hastalığında %40-50 oranında yüzeysel tromboflebitler görülmektedir. Özetle Buerger hastalığı

aterosklerozun bir varyantı değil başlı başına kendi semptomları ve klinik sunumu olan başlı başına farklı bir hastalıktır. Buerger hastalığında takip gözlemleri, cinsiyet farkı gözetmeksizin benzer prezentasyon göstermektedir.

Bu kriterler göz önüne alındığında distal oklüzif hastalıkların küçük ve orta boyutlu distal ekstremitte arterleri ile sınırlandırılmış olduğunu görmekteyiz. Dört uzuvda yapılan digital pletismografi ve ayırıcı histopatolojik bulgular bu kanıyı desteklemektedirler. Buerger hastalığı ile ilgili ayırıcı arteriografik bulgular Kumamoto (62), Rivera (63) ve McKusick (64) tarafından belirlenmiştir. Buna göre üst ekstremitte bilek hizasının üstünde radial ve ulnar arterlerden bir tanesinde veya her ikisinde birden oklüzyonlar görülmesi, bir veya her iki palmar arkın kaybolması ve parmaklara giden digital arterlerde budanma benzeri görünüm izlenmesi üst ekstremitte için Buerger hastalığı ile uyumlu bulgular olarak belirlenmiştir. Alt ekstremitte arteriografisinde ise infra-popliteal seviyede incelmış arteriyel yapılar görülmesi, tibial ve pedal arterlerde segmental diffüz görünüm ile beraber suprapopliteal seviyede normal olarak seyreden arter yapısının ani oklüzyonu da alt ekstremitte için Buerger hastalığı ile uyumlu olarak tanımlanmıştır. Buerger hastalığında tibialis anterior ve posterior arterde ve daha nadir olmak üzere peroneal arterde tutulumlar görülür. Kronik devrede Buerger hastalarında kollateral gelişimi görülebilmekle birlikte bu kollateraller anjiografik görünüm olarak tırbüyon, örümcek bacağı veya ağaç kökü görünümü olarak tanımlanmıştır.

Pek çok tür nekrotize immün kökenli arterit ile Buerger hastalığı arasında görülen en önemli farklılık, nekrotize immünolojik arteritte daha çok üst ekstremitte tutulumunun olmasına karşılık, Buerger hastalığında daha sıklıkla alt ekstremitte tutulumu olmasıdır. Bu nedenle Buerger hastalığı tanısı alan kişilerde dört ekstremitte segmental arteriyel basınçların ölçümü ile birlikte digital platismografi uygulanmalıdır. Buerger hastalığının tanısı konulmadan önce şüpheli durum kalmaması için hastaya ek olarak arteriografi tetkiki yapılmalıdır ancak diğer tetkikler ile desteklendiğinde duruma göre arteriografi olmazsa olmaz derecesinde gerekli bir tetkik değildir. Eğer distalde nabız alınamamasının sebebi olarak proksimalde yerleşmiş bir emboli veya aterosklerotik plak olabileceğine dair bir şüphemiz var ise arteriografi tetkiki yapılması gereği doğar. Eğer Buerger hastalığı tanısı biyopsi olmadan konulmuş ve hasta bu tanının üzerine aldığı medikasyona ve sigarayı

bırakmasına rağmen hastalığın prognozunda her hangi bir düzelme görülmemiş ise histopatolojik tetkik amaçlı olarak biyopsi yapılmalıdır.

Buerger hastalığı dışarıdan bakıldığında sadece distal ekstremitte arterlerini vuruyor gibi görünse dahi histopatolojik tetkikler ile de doğrulanmış olmak üzere çok az vakada aort, iliak, serebral ve koroner arter yapılarına da zarar verebilmektedir. Aynı zamanda Leo Buerger'in bizzat kendisi tarafından rapor edildiği üzere spermatik arteri ve spermatik kordu da vurduğu vakalar görülmüştür.

Buerger hastalığı ile ilgili daha önce bahsedilen ana tanı yöntemlerine ilaveten tanıyı destekleyebilecek ek tetkikler de bulunmaktadır. Bu tetkikler de aşağıda gösterildiği gibi özetlenebilir.

- Rutin kan tetkikleri;
- Tam kan sayımı;
- Karaciğer-Böbrek fonksiyon testleri;
- İdrar tahlili;
- Açlık kan glukoz seviyesi tetkiki;
- Lipid profili;
- Venerapl Disease Research Laboratory (VDRL);
- Otoimmün panel;
- ESR;
- Romatid Faktör;
- Antinükleer Antikor (ANA);
- Antisentromer Antikor;
- SCL-70 (CREST ve skleroderma için) (52)
- Hiperkoagülabilité paneli;
- Protein-C, Protein-S ve Antitrombin III seviyeleri;
- Antifosfolipid Antikorları;
- Faktör V Leiden;
- Üst ekstremitte tutulumu için el radyografisi;
- Segmental arteriyel doppler dalga formları ve basınçları;
- Digital pletismografi
- Nielsen Digital Hypotermic Challenge Test ;(60)
- Arteriografi
- Biyopsi (*Daha az sıklıkla*);

Buerger hastalığı, bazı tür nekrotize arteritler ve aterosklerozun prognozu kötüdür ve çoğunlukla bu hastalar major veya minor amputasyonlar ile sonuçlanır (65,66).

Hastalıkla ilgili yapılan literatür taramalarında ayak ve bacak beraber amputasyon oranları %19, major alt ekstremite amputasyon oranı %19, parmak amputasyonu %6,3 olarak görülmüştür (65). Hastalığın sebep olduğu amputasyon oranları ile sigara kullanımı arasında güçlü bir ilişki vardır. Olin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre sigara kullanımına devam eden hastalarda en az bir veya daha fazla amputasyon ile karşılaşma riski %43 olarak görülmüştür. Buna karşılık sigarayı bırakan hastaların ise %94 gibi bir oranı ise herhangi bir amputasyon ile karşılaşmadan yaşamlarına devam edebilmektedir (52,67).

1.5. Periferik Arter Hastalıklarında Sınıflandırma Yöntemleri

Hastalığın teşhisi konulduktan derecelendirilmesine gidilmelidir. Buerger hastalığında derecelendirme için Fontaine ve Rutherford yöntemi olmak üzere iki metod vardır. Bunların her birisinin kendi içerisinde kriterleri farklıdır.

1.5.1. Fontaine Sınıflandırması

Tablo 1.2. Periferik arter hastalıklarında Fontaine sınıflaması.

Sınıflama	Sınıfın Özellikleri ve Açıklaması	
Fontaine I	Ciltte hafif iskemi mevcuttur. Distal arter nabızı zayıflamış olabileceği gibi alınamayabilir de. Bu sınıfta bulunan hastalar, etkilenen ekstremitelerde üşüme soğukluk, çabuk yorulma ve karıncalanmadan şikayet ederler. Genellikle asemptomatik evre olarak da tanımlanabilmektedir.	
Fontaine II	<i>Fontaine II_A</i>	Bu sınıfta bulunan hastalar, egzersiz ile ekstremitelerde kladikasyo tarif ederler. Kladikasyonun ortaya çıkış zamanı ve şiddeti, hastalığın ilerleme derecesine göre değişim göstermektedir. Buna göre Fontaine II _A sınıfında kladikasyo mesafesi 200 metrenin üzerinde, Fontaine II _B sınıfında ise kladikasyo mesafesi 200 metrenin altında görülmektedir.
	<i>Fontaine II_B</i>	
Fontaine III	İstirahat ağrısı mevcuttur. Hastalık ilerledikçe ağrılar, gece uykudan uyandırabilecek kadar şiddetli bir hal alır.	
Fontaine IV	Etkilenen ekstremitelerde ülser, gangren ve nekroz mevcuttur.	

1.5.2. Rutherford Sınıflandırması

Tablo 1.3. Periferik arter hastalıklarında Rutherford sınıflandırması.

Evre	Kategori	Klinik
0	0	Aseptomatik
I	1	Hafif kladikasyo
I	2	Orta dereceli kladikasyo
I	3	Ciddi kladikasyo
II	4	İskemik istirahat ağrısı
III	5	Minor doku kaybı
IV	6	Ülserasyon veya gangren

1.6. Buerger Hastalığında Tedavi Seçenekleri

Tromboanjiitis obliterans'ın spesifik bir tedavisi yoktur. Bugüne kadar genel olarak etkili olduğu kabul edilen herhangi bir tedavi yöntemi tarif edilememiştir. Birçok tartışmalı tedavi seçenekleri denenmiş olup, hastalarda mevcut hastalığın şiddetine ve tedavi sonrası sigara kullanımının devam etmesine bağlı olarak uygulanan tedavi yöntemlerinin başarı oranları değişkenlikler göstermektedir. Hastalığın ilerlemesini ve sonucunda amputasyonu önlemek için kanıtlanmış en önemli nokta sigaranın bırakılması, hiçbir şekilde tütün ürünlerinin kullanılmaması, sigara içilen yerlerden (aktif, ortak veya pasif içicilikten) kaçınılması gerekir (68,69,70). Ekstremiteler en küçük travmalardan, sıcak ve soğuktan korunmalı, hastalara kan akımını arttıracak, vasküler kollateralleri geliştirecek egzersizler önerilmelidir. Egzersizlerde hastalara ağrı mesafesinin 2/3'ü kadar yürümesi ve sanki ağrı gelmiş gibi bir süre dinlenmesi tavsiye edilir. Fakat hiçbir zaman egzersiz mesafesi sınırlandırılmamalıdır (68,71,72,73).

Tromboanjiitis obliterans için önerilen tedavinin prensipleri şu şekilde sıralanabilir.

1. Hastanın sigara veya başka bir formdaki herhangi bir tütün mamülünü kullanımının engellenmesi
2. Hastanın pasif içicilikten uzak tutulması ve korunmasının sağlanması
3. Tutulan ekstremitenin enfeksiyonlardan korunması ve dikkatli temizliği, travmalardan korunması (tırnakların derin kesilmemesi, dar ayakkabı giyilmemesi, mantar tedavisi gibi önlemler alınması)

4. Lokal iskemik ülserasyonlar ve ağrının tedavi edilmesi
5. Kalsiyum kanal blokerleri, antiplatelet ajanlar, pentoksifilin
6. İloprost ile tedavi (PGI₂=Prostasiklin analogu)
7. Analjezikler
8. Sempatektomi
9. Rekonstrüksiyona uygun ise cerrahi girişim
10. İmplant edilebilir spinal kord uyarıcısı
11. Selülit var ise antibiyoterapi
12. Yüzeysel flebitler varsa nonsteroid antiinflatuar (NSAİ) ajanlar ile tedavi
13. Tüm tedavi yöntemleri başarısız olursa son çare olarak amputasyon

Buerger hastalığında tedavi yöntemlerini cerrahi tedavi, antikoagulan tedavi, antiagregan tedavi, kalsiyum kanal blokörleri, pentoksifilin tedavisi, trombolitik (fibrinolitik) tedavi, PGI₂ analogları verilmesi (İloprost), vasküler endotelial büyüme faktörü geni kullanımı, epidural anestezi tedavisi, epidural spinal elektriksel stimülasyon tedavisi, kimyasal ajanlar ile sempatik sinir blokajı olarak gruplandırabiliriz.

1.6.1. Rekonstrüksiyon

TAO da cerrahi vaskularizasyon genellikle hastalığın yaygın segmental oluşu ve büyük oranda distal tutulum nedeni ile uygun bir tedavi olarak fayda sağlamamaktadır. Fakat arteriografide tıkanıklık olan bölgenin proksimal ve distalinde açık ve sağlam arter tespit edilirse öncelikle otojen ven grefti daha sonraki durumda göz önüne alınmak üzere sentetik greftler ile rekonstrüksiyon için cerrahi tedavi uygulanabilir (74,75).

1.6.2. Sempatektomi

Direkt arterial rekonstrüksiyona dair bir cerrahi girişim, imkan dahilinde değil ise, hastanın semptomlarını azaltmaya yönelik indirekt cerrahi yöntem olarak sempatektomi denenebilir (76,77). Sempatektominin etkileri; kan akımının artması, kollateral perfüzyona etkileri, artan kan akımının besleyici değeri, ağrı ileti transmisyonunun değiştirilmesi olarak incelenebilir.

Ekstremitelerde sempatik stimulasýona cevap vazokonstriksiyon, derinin soluklaşması, soğuması ve terlemede artma şeklindedir. Sempatik stimulasyonun ortadan kaldırılması ile derideki arterler ve arteriyo-venöz anastomozlardaki bazal ve refleks vazokonstriksiyonun ortadan kalkması yoluyla total kan akımının artmasına bağılı olarak deri kanlanması artar. Böylece deri ısısının artması, derinin pembe renginin ve terlemenin durması, deri kuruluğunun artmasına neden olur. Sempatektomi sonrasında görülen akım değişiminin çok büyük bir bölümü derideki arteriyo-venöz anastomozlar yoluyla şant olur ve doku perfüzyonunda ciddi bir artma olmaz. Kaslardaki kan akımında sempatik kontrol önemsizdir. Kas, deri ve prekapiler sfinkterlerin adrenerjik uyarıya verdikleri cevaplar farklıdır. Deride adrenerjik uyarılar ile kan akımında ciddi değişimler olabilirken kaslarda kan akımında değişimlere yol açabilecek en önemli bileşen, egzersiz ve istirahat esnasında ortaya çıkan metabolitlerdir.

Bazı hastalarda sempatektominin kaslardaki kan akımını arttırmadığı aksine steal (çalma) fenomeni ile azalttığı tespit edilmiştir.

Lomber bilateral sempatektomi sırasında empotans gelişmesi riskine karşın L₁ sempatik gangliyon çıkarılmamalıdır. Rutin olarak L₂-L₄ gangliyonlar çıkarılmalıdır. Sempatektominin amputasyonun önlenmesinde ve ağrının giderilmesindeki rolü halen bilinmemekle beraber yüzeysel iskemik ülserlerin iyileşmesinde ve istirahat ağrısının giderilmesinde etkili olduğu (78,79) ve sempatektominin kaslara giden kan akımından daha ziyade deri ve kemiklere giden kan akımını arttırdığı bilinmektedir.

Sempatektomiden sonra ilk 3-4 günde görülen hiperemik evreyi takiben **“Beşinci Gün Fenomeni”** olarak da bilinen ve kan akımının nispeten daha azaldığı bir evre gelir. Bu durum daha çok torakal sempatektomilerde, daha nadiren de lomber sempatektomilerde görülür. Beşinci Gün Fenomeni devresini takiben kan akımı yeniden artmaya başlar ve sonra yavaş yavaş azalarak 10-12 hafta sonra stabilize olur(80). Sempatektomiden 2 hafta ile 6 ay arasında bir süre sonra vazomotor tonus normal seviyeye geriler. Buradan da Tromboanjitis obliterans'ta sempatektominin kalıcı çözüm sunabilecek bir operasyon olmadığını ve diğer tedavilere yardımcı olacak şekilde birlikte uygulanması gerektiği sonucu çıkarılabilir (77,81).

Sempatektominin olası komplikasyonları:

1. Post-sempatektomi nevraljisi
2. Horner Sendromu (Serviko-Torasik Sempatektomide)
3. Travmatik Şilotoraks (Serviko-Torasik Sempatektomide)
4. Sempatik İnnervasyonun Rejenerasyonu;
 - *Sempatik zincirin yetersiz eksizyonu*
 - *Intermediate ganglion varlığı*
 - *Diğer tarafla çaprazlaşan fibrillerin varlığı*
 - *Ganglion sayısında ve gallarının dağılımındaki kişisel farklılıklar*
 - *Sempatik sinir sisteminin rejenasyonu*
5. Lomber Arter ve Venlerde Kanama
6. Paradoks Gangren
7. Seksüel Fonksiyon Bozuklukları
8. Sudomotor Fonksiyonlarda değişimler
9. Steal (Çalma) Fenomeni

Alt ekstremitelerde (Lomber) yapılan sempatektomi, üst ekstremitelerde (Torakal) yapılabildiğine göre daha uzun süre etkilidir (80). Sinir rejenerasyonu denilen sempatik etkinin geri dönmesi ve bunun sonucu olarak vazokonstrüktör aktivitenin ortaya çıkması, üst ekstremitelere yönelik yapılmış olan torakal sempatektomilerde %95 iken, lomber sempatektomilerde bu oran %10 civarlarındadır (81,82). Buna göre Tromboanjitis obliteransta sempatektominin en son ve kesin bir çözüm değil, diğer tedavi seçeneklerine yardımcı olarak uygulanması gereken bir seçenek olduğu görülmektedir.

Cerrahi sempatektomiye alternatif olarak hastalara farmakolojik ajanlar ile yapılan sempatektomi yöntemi de uygulanabilmektedir. Farmakolojik sempatektomide sempatik gangliyonlara radyolojik görüntüleme yardımı ile kimyasal blokaj yapan ilaçlar uygulanmaktadır. Daha az invazif olması ve maliyetinin daha düşük olması, yöntem için en büyük tercih nedenidir.

1.6.3. Antikoagülan tedavi

Antikoagülan ilaçlar, pıhtılaşma faktörlerinin etkinliğini veya sentezini bozarak pıhtılaşma olayını inhibe eden ve böylece kanın koagülasyon yeteneğini azaltan ilaçlardır.

Heparin, kanda bazı pıhtılaşma faktörlerini (Trombin, Faktör XII, XI, X, IX, VII ve kallikrein) antitrombin aracılığı ile inaktive ederek dolaysız etki yapar.

Oral antikoagülanlar, karaciğerde K vitaminine bağımlı olarak yapılan faktörlerin (protrombin, faktör VII, faktör IX ve faktör X) sentezinin son basamağını bozarak dolaysız etki yaparlar.

Tromboanjitis obliterans'ta antikoagülan tedavinin etkinliğini net olarak bildiren bir sonuç elde edilememiştir. Antikoagülanlar sadece kronik fazdaki şiddetli iskemik ekstremitedeki kollateral kan akımını iyileştirebilmek amacı ile kullanılabilirler (8).

Antikoagülan tedavi hastalığın kronik döneminde yararsızdır.

1.6.4. Antiagregan tedavi

Bu tedavi seçeneğinde aspirin ve tiklodipin kullanılmaktadır. Tiklodipinin yan etkileri arasında lökopeni de bulunduğu için uzun dönem tiklodipin tedavisi alan hastalar lökopeni açısından takip edilmelidir.

1.6.5. Kalsiyum kanal blokörleri

Nifedipin, nikardipin, amlodipin gibi kalsiyum kanal blokerleri arterler üzerindeki vazospazmı azaltmaya yönelik etkileri nedeni ile tromboanjitis obliterans tedavisinde kullanılmaktadırlar. İndirekt bir tedavi seçeneğidir.

Periferik vazodilatörler, vazospastik hastalıkların tedavisinde spazmı çözerek etkili olmalarına rağmen, tromboanjitis obliterans'ta tedavi edici özellikleri düşüktür. Bu durumun sebebi, tromboanjitis obliteranslı hastaların damarlarının düz kas gevşetici etkiye yanıt vermemesi, sağlam damarların vazodilatasyonu sonucu göreceli olarak stenotik damara gelen kan miktarının azalmasıdır (Çalma fenomeni). Bu sebeple vazodilatör tedavi Buerger hastalığında yararlı bulunmamaktadır.

Tromboanjitis obliterans'lı hastalarda periferik damarlarda endotel bağımlı vazorelaksasyonda bozukluk vardır (83).

1.6.6. Pentoksifilin tedavisi

Pentoksifilin, ksantin türevi fosfodiesteraz inhibitörü bir ilaçtır.

Periferik dilatör ilaçların çoğundan farklı olarak kanda reolojik etkiler de gösterir ve kanın viskozitesini azaltır. Pentoksifilin reolojik etkisinden yani eritrositlerin hücre membran esnekliklerini arttırarak (eritrositlerin fleksibilitesini yada deformabilitesini) ve küçük damarlardaki alana sızmalarını sağlayarak iskemik alana ulaşmalarını sağlar. Başka bir söylem ile kanın yükselmiş olan viskozitesini düşürür, akışkanlığını arttırır ve iskemik alanın beslenmesini sağlamış olur (84). Klodikasyolu hastalarda bacak kaslarının oksijenlenmesini arttırır. Kronik oklüsif arter hastalığı olan kişilerde klodikasyo oluşana kadar yürünebilen mesafeyi belirgin bir şekilde arttırır.

Pentoksifilin, trombositlerin artmış olan agregasyon yeteneğini de azaltır.

Pentoksifilin, karaciğerde metabolize edilerek inaktive olur. Başlıca yan etkileri; bulantı, yüzde kızarma (Flushing), baş dönmesi baş ağrısı ve gastrointestinal bozukluklardır.

1.6.7. Trombolitik (Fibrinolitik tedavi)

İntraarteriyel trombotik tedavinin Buerger hastalığındaki etkinliği ile ilgili çelişkili çalışmalar mevcuttur. Çünkü Buerger hastalığında görülen trombüs inflamatuvar özelliktedir. İntraarteriyel streptokinaz uygulanarak yapılan bir çalışmada genel başarı oranı (amputasyonun önlenmesi veya düzeyinin değişmesi gibi) %53 olarak bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ürokinaz uygulanmış ve başarılı olduğu rapor edilmiştir (85,86).

Fakat patolojik olarak Tromboanjitis Obliterans'ta distal damarlarda yoğun bağ dokusu ve fibröz materyaller içeren inflamatuvar vasıflı trombüs mevcut olduğu için trombolitik tedavinin yüksek oranda etkili olmayabileceği kanısı yaygındır. Hastanın eğer amputasyondan başka çaresi kalmadıysa o taktirde trombolitik ajan verilebilir.

1.6.8. İloprost

PGI₂ (Prostasiklin), trombositler, lökositler ve endotelial hücreler üzerinde etkileri olan bir molekül olarak tanımlanmış ve damar duvarını etkileyen hastalıklar üzerinde tedavi edici olabileceği düşünülmüştür. Bu süreçte yapılan çalışmalarda prostasiklinin, mikrovasküler kan akışının düzenlenmesinde, trombosit

agregasyonunun ve vazodilatasyonun inhibe edilmesinde önemli rolü olduğu görülmüştür.

Periferik arter hastalıklarında prostaglandin kullanımı ilk olarak 1973 yılında bildirilmiştir (87). O zamandan beri hem kontrolsüz hemde randomize klinik çalışmalarda PGE₁ ve PGI₂ preparatlarının şiddetli ekstremite iskemisi tedavisinde yararlı etkileri olduğuna dair çeşitli çalışma raporları bildirilmiştir (88,89).

İloprost'un etkileri; trombosit, lökosit aktivitesinin inhibisyonu, vazodilatasyon ve endotel korunması olarak özetlenebilir. Bu etkileri yönüyle özellikle vazodilatasyon etkisinin güçlü olması çoğu yan etkiden sorumlu olabilir (90,91).

İloprost'un önemli farmakolojik özellikleri şunlardır:

- 1- Vasküler endotelde besleyici kan akımını geliştirir.
- 2- Lökosit aktivasyonunu ve adezyonunu inhibe eder.
- 3- ATP nedenli trombosit agregasyonu ve aktivasyonunu ve ayrıca aktive olan trombositlerden 5-HT ve tromboksan salınımını inhibe eder.
- 4- Endotelyal hücre geçirgenliğini azaltır.
- 5- Vasküler sistemin farklı kesimlerindeki vazokonstrüksiyonu inhibe eder.
- 6- Tümör nekrozis faktör artışını inhibe eder.

İloprost'un klinik yararları, farmakolojik özelliklerini de yansıtır. Bunlar;

1. Şiddetli iskemide, inflamatuvar doku lezyonlarında, vazospastik ataklarda ve soğuk stres intoleransında mikrosirkülasyon bozukluklarını iyileştirmek, amputasyon oranının ve mortalitenin azaltılmasını sağlamak (92).
2. Periferik arteriyel hastalıklarda, koroner kalp hastalığında, miyokard infarktüsünde vasküler direnci düşürmek.
3. Dijital kan akımını arttırmak
4. Venöz çapı azaltma ve venöz drenajı artırma etkisi ile venöz ülserlerin iyileştirilmesi (94)
5. Pulmoner hipertansiyonun tedavisinde inhalasyon yolu ile uygulama sonrası pulmoner hipertansiyonun düşürülmesi ve oksijenizasyonun düzeltilmesi (95).

1.6.9. Vasküler endotelial büyüme faktörü geni kullanımı

Yapılan çalışmalarda iskemik ülserlerin iyileşmesinde ve istirahat ağrılarının giderilmesinde vasküler endotelial büyüme faktörü kullanımının çok etkili olduğu belirtilmektedir.

Isner ve ekibi, Buerger hastalığı olan hastalarda vasküler endotelial büyüme faktörü geninin kullanımı sonucunda iskemik ülserlerde küçülme, iyileşme görüldüğü ve istirahat ağrısının azaldığını bildirmişlerdir (96).

1.6.10. Epidural anestezi tedavisi

Epidural anestezi ile Buerger hastalarının ekstremitte ağrıları azaltılır ve/veya ortadan kaldırılır. Böylece sempatik aktivasyonda azalma olur ve sonuçta bozuk olan perfüzyonda düzelmeler gözlenir. Sempatektomiye benzer bir etki ile doku perfüzyonu düzeltilmesi sonucu yara iyileşmesine katkıda bulunmakta ve iskemik ekstremitenin gangrene gidişini durdurmaktadır(97-98-99).

1.6.11. Epidural spinal elektriksel stimülasyon tedavisi

Sinir trasesi boyunca elektriksel akım uygulanarak sinirin, ağrı eşiğinin yükseltilip sempatik aktivasyonun azaltılması ile iskemik bölgedeki doku kanlanmasının artırılması amaçlanmaktadır. Cerrahi revaskülarizasyonun bir seçenek olarak düşünülmediği hastalarda omurilik uyarıcısı, ağrıyı azalttığı ve amputasyonu önlediği için diğer tedavi yöntemleri etkili olmadığında kullanılabilir bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.6.12. Kimyasal ajanlar ile sempatik sinir blokaj

Simpatik sinir blokajları geçtiğimiz yüzyılın başından beri, tanı, prognoz tayini ve tedavide kullanılmaktadır. Simpatik sinir blokajları, vasküler yetersizlik nedeni ile olan ağrı, visceral ağrı ve sempatik komponenti olduğu düşünülen ağrı için uygulanmıştır.

Nörolitik lomber sempatik blokajlar kladikasyon için çok az bir yarar sağlasa da sonrasında ağrıdan kurtarmak ve cilt ülserinin iyileşmesini hızlandırmak için kullanılmıştır. Sempatektominin cilt kan akımını arttırdığı, fakat kaslara giden besleyici kan akımını arttırmadığı ileri sürülmüştür. Bazı araştırmacılar bu görüşü kabul etmemektedirler ve nörolitik sempatik sinir blokajı sonrası ağrısız uzun mesafe yürüyüşte kısa ve uzun dönemde önemli gelişmeler rapor etmişlerdir. Kimyasal ajanlar

ile sempatik bloklar; intratekal, epidural aralıkta, paravertebral ve prevertebral alanda periferik sinirler ve postgangliyonik aksonlarda uygulanabilir. Paravertebral ve prevertebral blok ile tüm afferent ve efferent liflerin iletisi önlenir. Bununla beraber guanitidin veya diğer adrenolitik ajanlar ile yapılan intravenöz rejyonel sempatik blokla sadece efferent liflerin iletisi bloke edilebilir. Kimyasal sempatektomide, lidokain %0.5, bupivakain %0.25, mepivakain %0.5, fenil alkol %7-10, alkol %50-100, klorokresol ve %5-7.5'lük sudaki fenol çözeltisi gibi kimyasal özellikteki maddeler kullanılabilir (97,98,100).

2. GELİŞME

2.1. Anjiogeneizde Hematopoetik Kök Hücrelerin Rolü

Vasküler gelişim vaskülogenez ve anjiogeneiz olmak üzere 2 farklı olayı içerir. Bu iki olayda da endotelial hücreler (ECler) ve etrafını çeviren mezenkimal hücreler arasındaki iki yönlü sinyal şarttır (101). Vaskülo-anjiogeneiz sürecini düzenleyen birçok molekül izole edilmiş ve birçok molekülün, periendotelial tabakayı oluşturarak veya arter ve venler arasındaki etkileşime aracılık ederek damarların bütünlüğünün korunmasını sağlamak için gerekli olduğu ortaya çıkartılmıştır. Bunların arasında iki tirozin kinaz subfamilyası endotele özgü bol miktarda ekspresyonları ile karakterizedir. Bir aile Flt-1/VEFR1, Flk-1/KDR/VEGFR2 ve Flt-4/VEGFR3 üyelerini içerir. Bunların tümü vasküloendotelial growth faktör (VEGF) reseptör ailesinin üyeleridir. Flk-1, Flt-4'ün ve VEGF'nin önemli rolleri genetik yapılanma ile elde edilen fare mutantlarında yapılan analizlerle gösterilmiştir (104-107). Diğer aile ise TIE1/TIE ve TIE2/TEK'i içerir. TIE1 veya TIE2'nin hedeflenmiş mutasyonu bu reseptörlerin, VEGF'lerde olduğu gibi, embriyonik vasküler oluşumda kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (107,108). TIE2 veya TIE1 eksik olan embriyolarda, sırayla E9.5 ve E13.5'te hemoraji ile sonuçlanan vasküler sistemin yapısal bütünlüğünü oluşturmada başarısızlık görülmüştür. VEGF ya da VEGFR mutant embriyolarda görülen vaskülogenezdeki erken defekte kıyasla TIE1 veya TIE2 eksik fareler vasküler bütünlüğün yanında anjiogeneiz ve yeniden yapılanmada daha geç defektler göstermişlerdir. Bir yetişkin damarındaki anjiogeneizde ilk adım periendotelial hücrelerin (perisitlerin) ayrılması ve EClere sıkıca bağlanmasıdır. ECler ve perisitlerin adezyonu ve ayrılması arasındaki sıkı denge TIE2'nin ligandları olan anjiopoyetinlere bağlıdır. Anjiopoyetin-1 (Ang1) eksik embriyolar, TIE2 eksik embriyolarda gözlemlendiği gibi ağır vasküler anomaliler göstermiştir. Bu anomaliler perikardiumdaki ana ven veya kapillerdeki yetersiz dallanma, vitellus kesesindeki damarların yeniden yapılanmasındaki eksiklik ve yetersiz kalp gelişimidir (110). Dahası, ultrastrüktürel analiz, ECler ve perisitlerin sıkı adezyonununun TIE2 veya Ang1 yokluğunu baskıladığını ortaya koymuştur. Ang1'in doğal olarak bulunan antagonisti olan Ang2 ise, Ang1'in TIE2'yi aktive etme özelliğini bloklar (111). Ang2'yi aşırı eksprese eden transgenik farelerde, TIE2 veya Ang1 eksik embriyolarda gözlenene

benzer fenotip göstermiştir (111). Bu nedenle, Ang1 embriyoda geniş damarları çevreleyen mezenkimde ve yetişkinlerde de bol miktarda eksprese edilirken Ang2 sadece vasküler yeniden yapılanma alanlarında eksprese edilir (111). Bu gözleme göre Ang2, başka bir yolla Ang1'in oluşum dengeleyici sinyalini bloklamakta ve lokalize damarların destabilizasyonunu arttırmaktadır.

Ang2 tarafından damarların destabilize edilmesi, perisitler veya yeni oluşan damarlarca üretilen EClerin devamı için gerekli olan bloklayıcı faktörlerince damarların gerilemesi ile bağlantılı olabilir. Ang2 ve VEGF birlikte eksprese edildiğinde damarların filizlenmesini gerçekleştirmesine rağmen, Ang2'nin VEGF olmadan uzamış fazla ekspresyonu damar gerilemesine neden olmaktadır (112,113). Yakın bir zamanda, Ang1'in fibronektin ve kollajene TIE2 eksprese eden hücrelerin integrin bağımlı adezyonunu stimüle ettiğini bulunmuştur (114). Bu rol, EC'ler ve perisitlerin Ang1 ile indüklenen sıkı adezyonu için uygundur. Ayrıca Ang1'in kemoatraktan olarak damar filizlenmesini arttırdığı bildirilmiştir (115). Damar filizlenmesi Ang1 sinyalinin inaktivasyonuna dayanan bir olay olup perisitlerin EC'lerden ayrılması ile başlar. Daha sonra, EC'ler, Ang1 üreten dokulara doğru yönelirler. Perisitlerin işlevini, EClerin göçü takip eder. Ang1 üreten hücreler damar filizlenmesini belli bir uzaklığa kadar arttırabilirler. TIE2-Anjiopietin sisteminin kontrol ettiği anjiogenezi anlamak için, anjiogenezi ve hematopoezi uyaran para aortik splanknopleural (P-Sp) bölgede (pre AGM bölgesi, aort-gonad-mezonefroz bölgesi); hemanjioblastlara HSC'lerin bağlı olduğu yeni bir kültür sistemi kurulmuştur (116,117). Burada HSC'den kaynaklanan Ang1'in avasküler sahalara damar filizlenmesini arttırdığını ve bu stimülasyonun Ang1 üreten mezenkimal hücrelerin bulunmadığı dokularda kritik oluşunu gösterilmiştir. Dahası, HSC'leri olmayan *AML 1* eksik farede yapılan kapiller oluşumunun detaylı histolojik analizini göstererek HSC'lerin anjiogenezi için gerekli olduğunu gösteren raporlar yayınlanmıştır.

Anjiogenezi embriyogenik organogenezi yanında yetişkinde doku onarımı için de önemli bir olaydır. Hematopoetik kök hücrelerin (HSCler) embriyogenezi boyunca anjiogenezi de önemli rolleri vardır.

EC'ler ve hematopoetik hücreler arasındaki etkileşimi karakterize edebilmek için yapılan bir çalışmada, vaskülo-anjiogenezi ve hematopoezi için in vitro bir kültür sistemi geliştirilerek, E9.5 embriyolardan alınan P-Sp eksplantlar OP9 stromal hücrelerde kültüre edilip, bu kültürde PECAM-1⁺ EC'ler çarşafı bir şekil aldığı

gözlenmiş (vasküler bed, vb) ve daha sonra endotelial yatağın periferinde bir ağ (vasküler network, vb) şeklini aldığı izlenmiştir. PECAM-1, Flk-1 ve TIE2 markerları kullanılarak EC büyümesi gözlemlendiğine kültürün ilk dönemlerinde P-Sp eksplanttan PECAM-1 ve Flk-1 pozitif EC'ler ürettiği, bu hücrelerin göç ettiği ve OP9 hücrelerindeki eksplantın etrafında bir çember oluşturduğu gözlemlenmiştir. Çemberin etrafında filizlenen EC'lerin TIE2'yi kuvvetle eksprese etmelerine rağmen göç eden hücrelerde TIE2 ekspresyonu zayıf olarak izlenmiş, daha sonra eksplantı çevreleyen PECAM-1, Flk-1 pozitif EC'ler çoğaldığı, vasküler yatak şeklini aldığı ve EC'lerin büyük bir kısmının vasküler yataktan filizlendiği ağ şeklinde bir yapı oluşturulmuştur. Bu kültür sisteminde PECAM-1⁺Flk-1⁺TIE2^{low} immatür EC'lerin eksplanttan göç ettiğini ve vasküler yatak şeklini aldığı bu süreçte vaskülogenezi tanımlanmış, anjiogenez ise PECAM-1⁺Flk-1⁺TIE2⁺ ve EC'lerin bir yataktan filizlendiği ve ağ şeklini aldığı bir süreç olarak tanımlanmıştır. P-Sp kültür sisteminin sonuçlarına dayanarak HC'lerden gelen ekstrinsik sinyalin anjiogenezi uyardığını görülmüş ve bu olayı kontrol eden faktörleri araştırılmıştır. Ang1 ve VEGF kemik iliğinde HSC'ce zenginleştirilmiş populasyonda (Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺) eksprese edilir fakat matür HC'lerde (CD45⁺Lin⁺) edilememektedir. Embriyogenez boyunca, CD45⁺c-Kit⁺CD34⁺ hücreler HSC'ler olarak tanımlanmıştır (118). Kemik iliğinde gözlemlendiği gibi, CD45⁺c-Kit⁺CD34⁺ hücreler Ang1'i yüksek miktarda eksprese etmelerine rağmen VEGF'yi etmemektedir. Matur ya da immatür HClerde anjiogenezle ilişkili diğer genler olan Ang2 ve ephrin B2'nin eksprese olmadığı görülmektedir.

2.1.1. HSC'lerde Ang-1 ekspresyonu

Ang1'in HSC zenginleştirilmiş populasyonlarda bir protein olarak üretimini açıklamak için β-galaktozidaz (LacZ) ekspresyonunun Ang1 promotörü kontrolünde E12.5 fetal karaciğer ve Ang1 alleli için heterozigot farenin kemik iliğini kullanılmış (110) ve Ang1 ve LacZ'nin ekspresyonunu incelenmiştir. Anti-Ang1 antikoru ile HSC zenginleştirilmiş popülasyonda Ang1 proteini saptanmış fakat matür HClerde gözlenmemiştir. Ang1⁺ hücrelerin sıklığı fetal karaciğerindeki CD45⁺c-Kit⁺CD34⁺ hücrelerde %90, yetişkin kemik iliğinin Lin⁻c-Kit⁺Sca-1⁺ hücrelerinde %50 olarak bulunmuştur. Dahası, HSC zenginleştirilmiş populasyonlarda LacZ pozitif hücrelerin sıklığının Ang1 ekspresyonu ile aynı sıklıkta görüldüğünü doğrulanmıştır. Sonuçta, RT-PCR analizi ile mRNA seviyesinde, LacZ geni HSC zenginleştirilmiş

populasyonlarda bol miktarda eksprese edildiği gözlenmiştir. HSC'lerin anjiogenezdeki rolünü tanımlamak için *AML 1* mutantlarında gözlenen baş bölgesindeki ağır anjiogenez defektlerinde HSC'nin rolünü araştırılmış ve E10.5'te, primer hematopoez sahaları vitellus kesesi ve AGM alanı olarak rapor edilmiştir (117,118). HSC'lerin E10.5'teki lokalizasyonunu değerlendirmek için embriyolar vitellus kesesi, AGM sahası ve baş olarak üç parçaya diseke edilmiş; ayrılan hücrelerin dış fenotipik görünüşü FACS ile analiz edilmiştir CD45⁺ HC'ler CD34⁺c-Kit⁺ hücreler ve CD34^{dull/-}cKit⁺ hücreler olmak üzere hücre tipleri gözlenmiştir. CD34⁺c-Kit⁺ hücrelerin sıklığı vitellus kesesi ve AGM bölgesine kıyasla başta daha düşük olarak gözlenmiştir. OP9 hücreleri, dilüsyonu sınırlandırılmış CD34⁺c-Kit⁺ hücrelerle veya CD34⁻c-Kit⁻ hücreler birlikte kültüre edildiğinde multipotansiyel hematopoetik progenitörlerin CD34⁺c-Kit⁺ kısma eklendiğini fakat CD34⁻c-Kit⁻ kısma eklenmediği görülmüştür.

Bu bulgular özellikle HSC zenginleştirilmiş populasyonlarda HClerden eksprese edilen Ang1 'in anjiogenezi tetiklediğini göstermektedir. Bu hipotezi test etmek için E10.5 Ang1 mutantları ve yabancı tip embriyolardan alınan CD45⁺c-Kit⁺CD34⁺ hücreleri, *AML 1* mutant embriyoların P-Sp kültürlerine eklenmiş ve kemik iliğindeki HSClerde gözlendiği gibi yabancı tip embriyoların CD45⁺c-Kit⁺CD34⁺ hücreleri EClere defektif vasküler oluşumunu gerçekleştirdiği görülmüştür. Bunlara ek olarak, TIE2'de olduğu gibi P-Sp kültürlerinde Ang1 sinyalinin aktive etmek için HSC zenginleştirilmiş yabancı tip embriyoya soluble TIE2 reseptörleri veya Ang2 eklendiğinde *AML 1* mutantlarında HSC kontrolünde defektif anjiogenezin kurtarılması tamamen durmuştur

Perisitler ve düz kas hücreleri gibi periendotelyal hücrelerde Ang-1 Sekresyonu olduğu rapor edilmiştir(103). P-Sp kültür sisteminde ve in vivo olarak Ang1 ekspresyonunu analiz edildiğinde önce P-Sp kültürlerinde perisitlerin varlığını anlamak için, α düz kas aktin (α SMA) pozitif hücelere bakılmış, α SMA hücrelerin varlığı ve yokluğuna göre iki tip vasküler yatak gözlenmiş ve kafes şeklinde olan vasküler yatak α SMA⁺, düz, EC'lerden oluşan bir tabaka şeklinde olan da α SMA⁻ olarak adlandırıldı. PECAM-1⁺ hücrelerin dağılımına göre, EC'lerin filizlenmesinin α SMA hücelere bağlı gerçekleşmediği görüldü. İn situ hibridizasyon analizinde gözlendiği gibi (110), E10.5 embriyoların miyokardial hücelerde, geniş damarları çevreleyen periendotelyal hücelerde ve intersomiter alandaki mezenkimal hücelerde Ang1 ekspresyonu saptanmıştır. Ang1 eksprese eden HClere bulunduğu alana uyumlu

olarak PECAM-1⁺ EC'ler vasküler yataktan göç etmiş ve bir ağ şeklini almıştır. α SMA⁺ periendotelyal hücrelerin eksikliği ile uyumlu olarak bu aşamada küçük damarları çevreleyen mezenkimal hücrelerde Ang1 ekspresyonu gözlenmemiştir; halbuki damarlara adhere olmayan bazı mezenkimal hücrelerde Ang1 eksprese edilmektedir.

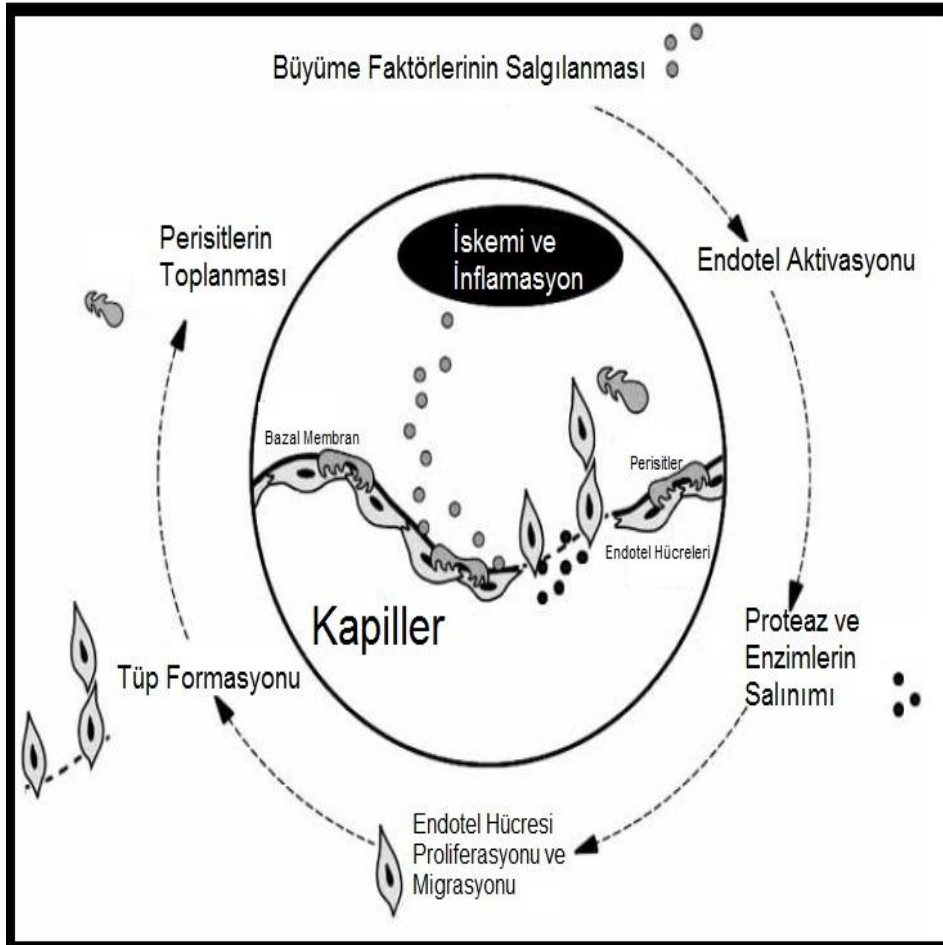
2.1.2. HSC'ler ve vasküler ağ oluşumunun regülasyonu

HSC'lerin anjiogenezdeki rolünü anlamak için yabancı tip ve *AML 1* mutant embriyoların E10.5 beyin ektoderminde kapiller oluşumları karşılaştırılmış ve yabancı tip embriyolarda öncelikle ECler CD45⁺ hücrelere doğru nöral katmanda göç etmişlerdir. Bu CD45⁺ hücreler c-Kit veya CD34 de eksprese eden EClerin önünde göç etmektedir ve bu da CD45⁺ hücrelerin HSC popülasyonunda bulunduğunu göstermektedir. P-Sp kültürlerinde gözleendiği gibi ECler bir ağ şeklini aldıktan sonra HSC'ler, EC'lerin yanında kalmıştır.

2.1.3. HSC'ler ve damar filizlenmesi

Vaskülo-anjiogenezde özellikle damar filizlenmesinde önemli bir soru, EClerin besin ve oksijen gereksinimi olan dokulara nasıl göç ettiği'dir. Burada gösterilen bulgular, EClerin HSClerden üretilen Ang 1 yönünde göç ettiği söylenmesine rağmen, HSClerin intralaminer boşluktan bir damarın dar kısmındaki parankimal hücrelere nasıl göç ettiğinin temel mekanizması açık değildir. Periferal CD34⁺ hematopoetik progenitörlerin yüksek miktarda matriks metallo-proteinaz (MMP)-2 ve 9'u (119) eksprese ettiği rapor edilmiştir, bu bulgu mekanizmaya ışık tutabilir. Önceki verilerimiz de embriyonik HSC'lerin (CD45⁺c-Kit⁺CD34⁺ hücreler) MMP-9'u yüksek miktarda eksprese ettiğini göstermektedir. Dahası HSC'lerin TIE2 ekspresyonu ve fibronektine (FN) bağlanmaları, Ang1 stimülasyonunu takiben olmaktadır (120). Bunlar göz önüne alındığında HSCler iskemik alanın yakınındaki EC'lerdeki fibronektine adhere olur, matriksi sindirir; kapillerlerin ECleri ise bazal membrandan parankimal hücrelere doğru transmigrasyon yapar. Bu yüzden, EClerin luminal alanında FN üretimi, HSC'lerin ve EC'lerin göçünde ilk adımı oluşturur. Ang 1 ve VEGF kornea uygulamaları ve transgenik farelerde gözlenen güçlü anjiogenik etkilerinden dolayı iskeminin tedavisindeki klinik uygulamalarda önemli bir rol oynayabilir (110,112). *AML 1* mutant ratta soluble Ang 1 ağ oluşumunu iyileştirdi;

fakat embriyolardan ve yetişkin ratlardan alınan HSC'ler vasküler ağ oluşumunu iyileştirmede daha etkilidir. K14 keratinosit spesifik promotörün kontrolü altında cildinde Ang 1 sentezleyen transgenik ratlarda, yalnızca dermiste olmak üzere hipervaskülarite gözlemlendi (110). HSC'ler lokal anjiogenezi artırırken Ang 1 tatbiki TIE2⁺ EC'lerin geniş çaplı stimülasyonu ile sonuçlanır. Bu yüzden, burada gösterilen bulgular klinik uygulamalar için önemli olabilir.



Şekil 2.1. Arterienez prosesinde meydana gelen olaylar.

Özetle Anjienez Mekanizması

Bacakta periferik arter hastalığı gelişimi, arterlerde bir daralma veya tıkanma ile karakterize, genellikle distal perfüzyonu bozan bir durumdur. Vücut bu durumu kompanse edebilmek için kollateral arterial damarlar oluşturma yoluna gider (5-6). Tüm bu kollateral arterler ve kapillerlerin büyümesi, anjienez olarak adlandırılan bir

sürecin parçalarıdır ve terapötik anjiogenez içerisinde kullanılmaktadırlar. Anjiogenez birbirinden bağımsız iki proses ile gelişmektedir. Bunlardan birincisi olan kapiller büyüme; lokal hipoksiye cevap olarak zaten var olan damar yapılarından yeni endotelial tüpler yapısında damar filizlenmeleri gelişmesine verilen isimdir. Bu süreç hipoksi ve buna bağlı sitokinler-kimokinler ile (Örneğin: VEGF ve bununla ilişkili büyüme faktörleri) yönetilir. Sonuç itibarı ile yeni oluşan damarlar 10-20 µm çapında ve oklüde olan büyük arterin boşluğunu kompanse etmek için yetersiz durumdadırlar.

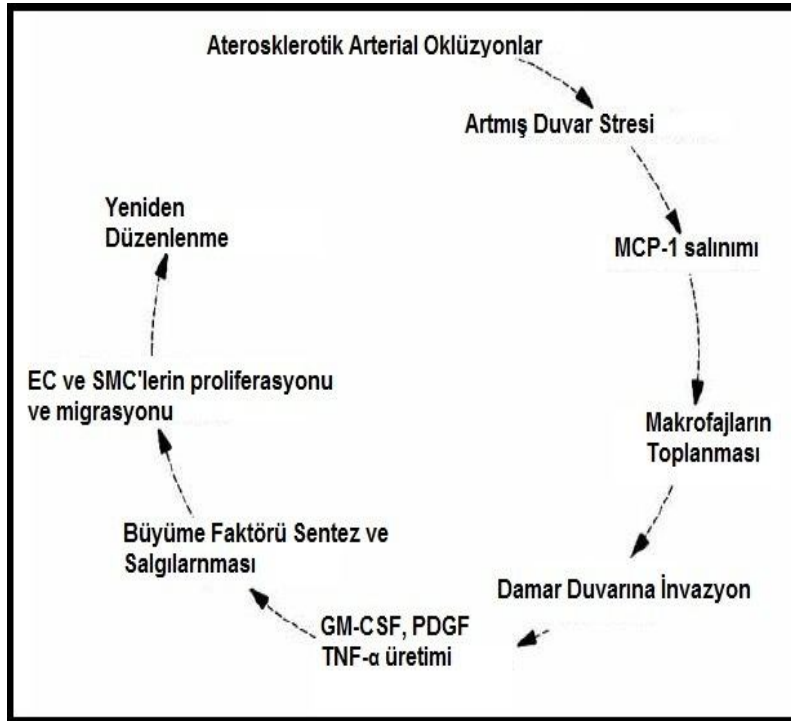
Anjiogenezde daha önceden var olan kollateral arteriollerin tıkanan damarlar ile paralel oryantasyon göstermesi şeklinde teşekkül eder. Arteriogenez sürecinde daha önceden var olan arteriol 20-30 kat arasında bir büyüme gösterir (8,9). Kollateralizasyonlar sayesinde bazen periferik arter hastalıkları semptom vermeyebilir. Bu durumun sebebi oluşan kollaterallerin distal damar dolumunu sağlayabilecek seviyede olmasıdır.

Anjiogenez damar duvar stresi ile meydana gelebileceği gibi arterial tıkanmalar ve daralmalar ile de ortaya çıkabilir. Bu durumda kan akımı küçük kollateral damar dallarına yönlendirilir. Sıvıların yarattığı duvar stresi anjiogenezin primer stimulatörüdür. Damar duvardındaki gerilim stresinin elemanları, damardan dallanan oldukça küçük yapıdaki kollaterallerden kemotaktik faktörlerin salınımını ve üretimini uyarır. İlk olarak anjiogenezin inflamasyon benzeri evresinde dolaşımdaki bulunan monositik prekürsör hücreler için salgılanan kemoatraktanlar ile bir kemotaktik gradient oluşturulur. Dolaşımdaki monositik hücrelerin adezyonu ve invazyonu ile birlikte, adezyon molekülleri up-regülasyona tabi tutulurlar. Perivasküler alana migrate olan monositler, kollateral damar duvarının oluşmasını sağlar. Bu esnada doku proteinazları ile büyüyen damarın etrafındaki dokular yıkılır ve kollateral damarın büyüebilmesi için gerekli bir yer açılmış olur. Bu durum bizlere monositlerin kollateralizasyon için oldukça önemi olduklarını göstermektedir.

Ana damarın tıkanmasının ardından yaklaşık 6 hafta içerisinde yeni kollateraller tıkanan kan akımını restore edebilecek seviyeye gelebilirler ve ayrıca bu gelişen kollaterallerin genişlik ve çaplarının artması da arterio-arterial kollateral bağlantılarının uyarımı ile olur.

Kemik iliğinden köken alan monositler fizyolojik anjiogenezde oldukça önemli roller oynamaktadırlar, bu görevlerin en önemlilerinden bir tanesi de dolaşımda bulunan endotelial progenitör hücrelerinin aktivitelerini güçlendirmektedir.

Arteriogenesis ile ilgili olarak iki önemli nokta akılda tutulmalıdır. Bunlardan birincisi, arteriogenesis esas olarak hipoksi ile değil, endotel duvar stresi ile indüklenmektedir ve ayrıca arteriogenesis oluşumu damarın tıkanan kısmının proksimalinden başlayıp oklüde damar segmentine paralel seyreden bir şekilde ilerler. Bir diğeri de kemik iliğinden köken alan monositik hücrelerin toplanması arteriogenesisin temel olgularından bir tanesidir. Bir diğere önemli nokta da bu adaptasyon mekanizmaları, bu hastaların büyük bir bölümünde kaybedilmiş ve ardından gelişen periferik iske mi ve ekstremitte kaybı gibi durumlara ortam hazırlanmıştır. İnsanlarda yaşlanma ile birlikte damar rejenerasyonu, arteriogenesis gibi fonksiyonlar da azalmaktadır. Kollateralizasyonun gelişmesine sebep olan proksimalde yer alan arter oklüzyonu veya daralması altında yatan ana sebep kollateralizasyonun da yetersiz şekilde gelişmesine veya hiç gelişmemesine sebep olabilmektedir. Bu sebeplerden bazıları diyabet, hiperlipidemi, ilerlemiş yaş olarak gösterilebilirler.



Şekil 2.2. Arteriogenesis prosesinde meydana gelen olaylar.

EC: Endotel Hücresi, SMC: Düz Kas Hücresi, MCP-1: Monosit Kimiatriktan Protein-1, GM-CSF: Granülosit-Makrofaj Koloni Stimule Edici Faktör, PDGF: Plaklet Derivated Growth Factor, TNF- α : Tumor Necrosis Factor - α

3. HASTALAR - MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmanın Amacı

Çalışmanın amacı kritik bacak iskemisi olan Tromboanjitis Obliteranslı hastalarda otolog kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücre implantasyonunun etkinlik ve güvenilirliğini incelemektir.

Çalışmanın primer sonlanma noktası olarak major veya minor amputasyon olmadan hastanın istirahat ağrısının 6 ay boyunca analjezik ihtiyacı olmadan rahatlaması belirlendi

Sekonder sonlanma noktaları olarak ise Ankle-Brachial Basınç İndeksi (ABPI) ölçümünde artış, maksimum yürüme mesafesindeki değişiklikler ve anjiyografik olarak yeni kollateral damar oluşumu, vasküler remodelling ve yaşam kalitesinde artış olarak belirlendi.

Bu amaca yönelik parametreler hastalara kemik iliğinden elde edilmiş otolog mononükleer kök hücre implantasyonu yapılmasından bir, üç ve altı ay sonra gerçekleştirilen takipler sonucunda toplandı. Hastalara yapılan ilk takip implantasyon işleminden 4 hafta sonra gerçekleştirildi.

3.2. İstatistiksel Veriler ve Analizler

Elde edilen verilerin bilgisayara girilmesi Microsoft Office Excel versiyon 2007 ile yapıldı. Verilerin bilgisayara girilmesi esnasında herhangi bir hata olmamasına dikkat edildi. Microsoft Office Excel versiyon 2007 ile hali hazırda bilgisayara girişi tamamlanmış olan verilerin artma azalma miktarı, ortalama, standart sapma, ortanca değer, birinci ve üçüncü dörtebirlik değerleri hesaplanması ve bu değerler ile uygun bir şekilde grafiklerin çizilmesi de aynı şekilde Microsoft Office Excel versiyon 2007 programı ile gerçekleştirildi. .

Bilgisayara girilmiş durumdaki veriler SPSS yazılım paketi versiyon 18 ile istatistiksel analizlere tabi tutuldu. Elde edilen veriler, Friedman testine göre anlamlı olarak görüldükten sonra ikili karşılaştırmalar için post hoc çoklu karşılaştırma yöntemi olarak, yanılma düzeyini aşağı çekerek, Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testi uygulandı. Ağrısız yürüme zamanı testi için yaptığımız istatistiksel analizin ikili karşılaştırma bölümünde elde edilen α değeri 0,008 olarak elde edildi ve

Wilcoxon işaretli sıra testinden elde edilen p değeri 0,008 değerinden düşük olan analizler anlamlı olarak kabul edildi. Visual Analog Skala testi için yaptığımız istatistiksel analizin ikili karşılaştırma bölümünde elde edilen α değeri 0,008 olarak elde edildi ve Wilcoxon işaretli sıra testinden elde edilen p değeri 0,008 değerinden düşük olan analizler anlamlı olarak kabul edildi. ABPI testi için yaptığımız istatistiksel analizin ikili karşılaştırma bölümünde elde edilen α değeri 0,016 olarak elde edildi ve Wilcoxon işaretli sıra testinden elde edilen p değeri 0,016 değerinden düşük olan analizler anlamlı olarak kabul edildi.

3.3. Çalışma Grubu

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalına Mayıs 2006 ile Haziran 2011 tarihleri arasında başvuran ve Rutherford Sınıflandırmasına göre Class II ve III grubunda yer alan 11 hasta çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hiçbir hastanın cerrahi veya cerrahi olmayan yollar ile revaskülarizasyonu sağlanamamaktaydı.

Hastaların preoperatif dönemde ayrıntılı anamnezleri alındı ve fizik muayeneleri yapıldı. Hastalara anamnezlerinde çalışmaya dahil edilme ve çalışmadan dışlanma kriterleri sorgulandı. Ayrıca önemli noktalardan bir tanesi olarak tüm hastalardan son 5 yılda kanser öyküleri sorgulandı. Hastaların tamamı 4. Hafta, 3. Ay, 6. Ay kontrolleri için polikliniğimize geldiler.

3.4. Çalışmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri

Çalışmaya dahil olan hastalarda;

(1) Tek taraflı bacak iskemisi ve buna bağlı olarak ortaya çıkan iskemik bacak ağrısının olması gerekmektedir. Ancak hastalarda oluşan iskemiye bağlı şekilde ortaya çıkan iskemik ülserlerin görülmesi olmazsa olmaz şart olarak aranmamaktadır. Hastanın ABPI değeri aralıklı olarak düzenli en az üç kere ölçümün ortalamasında 0.6 değerinden düşük görülmesi, (2) ABMMNC implantasyonundan en az 6 ay önce sigaranın bırakılmasına cevaben klinik tabloda bir gelişme görülmemesi veya daha kötüye gidiş gözlenmesi, (3) İntavenöz İloprost infüzyonu verilmesine karşın hastanın klinik durumunda bir gelişme görülememesi, (4) Hastanın cerrahi veya cerrahi olmayan yöntemler ile revaskülarizasyon sağlanmaya elverişsiz damar lezyonları

bulunması, (5) En az 6 aylık dikkatli ve düzenli bir şekilde yapılan yara bakımının ardından halen deride iyileşmeyen deri ülserasyonları görülmesi, (6) Rutherford sınıflamasına göre Class II veya Class III olması (7) Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formunu onaylayıp imzalamaları şartları aranmaktadır.

Çalışmaya dahil olan veya olmaya aday olan hastalarda aşağıdaki problemlerden bir veya birkaçı var ise hastalar çalışmadan dışlanacak veya çalışmaya dahil edilmeyecektir.

(1) Aterosklerozu olması, Diabetes Mellitusu veya Konnektif Doku Hastalığı bulunması, (2) Atrial Fibrilasyon gibi emboli kaynağı olabilecek hastalıklara sahip olan hastalar, (3) Neoplazi veya diğer ko-morbit hastalığı olabilecek hastalar; (4) Primer hematolojik hastalığı bulunan hastalar; (5) Proliferatif Retinopatisi bulunan hastalar; (6) Entrapment (Tuzak) sendromu olan hastalar, (7) Kokain, amfetamin, esrar gibi madde bağımlılığı olan ve halen tütün kullanımına devam eden hastalar; (8) Osteomyeliti olan hastalar çalışmaya dahil edilmeyecek veya dahil edilmişlerse çalışmadan dışlanacaklardır.

3.5. Takipte Kullanılan Parametrelerle İlgili Genel Bilgiler

3.5.1. Visual Analog Skala

Visual analog skala pek çok çalışmanın sonuç çıktıları amacı ile ilgili olarak kullandığı bir yöntemdir. Visual Analog Skala testi hastanın ağrı durumunu ölçmekte kullanılan anket formunda bir testtir. Test psikometrik bir yaklaşım ile yapıldığı için direkt olarak ölçüm yapılamamaktadır. Temel olarak oldukça basit bir mantığa dayanan bu test esnasında hastaya verilen test kağıdının üzerindeki 100 mm uzunluğundaki çizgi üzerinde kendi ağrısının konumunu değerlendirmesi istenilir. Bu çizginin bir ucunda hiç ağrı yok ifadesi yer alırken diğer ucunda çok şiddetli ifadesi yer almaktadır. Bu test ağrının şiddetini ve yoğunluğunu belirtmeye yarayan basit, kullanışlı ve güvenilir bir test yöntemidir. Visual Analog Skalanın diğer ağrı skalalarından farkı ölçüm yönteminin analog bir bakış açısına sahip olmasıdır. Bu sayede visual analog skala ile diğer ağrı ölçüm skalalarına göre çok daha hassas ve daha metrik bir ölçüm alınabilir. Bununla beraber visual analog skala ile diğer ağrı skalalarının büyük sonuç farklılıkları olmamasına karşın Visual Analog Skala kullanım oranı daha yüksek olduğundan dolayı çoğu çalışma için daha kullanışlıdır.

3.5.2. Ankle-Brakial basınç indeksi

ABPI ölçümü periferik arter hastalıklarının tanısında kullanılabilen basit ve non-invazif bir tekniktir. ABPI ölçümü, bir poliklinikte bulunabilen kan basıncı ölçüm manşonu ve vasküler proba sahip bir doppler ile rahatlıkla yapılabilmektedir. ABPI hesaplaması için her bir koldan ve bacadan sistolik kan basıncı değeri ölçümü yapılmalıdır. İşlem çoğunlukla 10 dakikadan daha kısa sürmekte ve aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır.

ABPI ölçümünün ilk aşamasında hastaların her iki kolundan da sistolik kan basıncı ölçümü gerçekleştirilir. Bu işlem yapılmadan önce hastalar supine pozisyonda 5-10 dakika kadar dinlendirilir ve ölçüm o şekilde yapılır. Ölçüm için kan basıncı ölçüm manşonu hastanın antekübital fossanın yaklaşık 3 cm yukarısına yerleştirilir ve manşon şişirilmeden, brakial arter nabızı palpe edilir. Doppler vasküler probu palpe edilen brakial arterin üzerine konulup arterial akımın sesi net ve temiz bir şekilde alınmaya dek küçük miktarlarda hareket ettirilir. Alınan arterial pulsasyon sesinin kesildiği basınç değerinin yaklaşık 20 mmHg üzerine kadar kan basıncı manşonu şişirilir ve ardından her bir saniyede 2 mmHg olacak şekilde manşonun basıncı indirilir. Arterial kan akımına dair ses alabildiğimiz ilk basınç değeri o kola ait sistolik basınç değeri olarak kaydedilir ve aynı işlemler diğer kol için tekrarlanır.

Testin ikinci aşamasında her iki alt ekstremitede tibialis posterior ve dorsalis pedis arterine ait sistolik basınç değerleri ölçülür. Bunun için kan basıncı manşonu ayak bileğinde medial malleus hizasından ortalama olarak 6-7 cm yukarıya yerleştirilir. Burada doppler ve vasküler prob ile tibialis posterior artere ait net ve temiz akım sesi alındıktan sonra brakial arterde sistolik basınç ölçümü ile aynı prosedürler izlenir. Daha sonra aynı bacak için dorsalis pedis arteri nabzına ait doppler ile nabız sesleri alınarak brakial ve tibialis posterior arterleri için uygulanan protokoller uygulanır.

Testin üçüncü aşamasında tibialis posterior ve dorsalis pedis arterlerine ait sistolik nabızlardan büyük olanı değerlendirmeye alınır. Aynı tarafın alt ve üst ekstremitelerinden alınan sistolik basınç değerlerinden alt ekstremitelik sistolik basınç değeri, üst ekstremitelik sistolik basınç değerine bölünür ve ABPI değeri hesaplanır.

ABPI, aterosklerozun önemli belirteçlerinden bir tanesidir. ABPI değerlerinin normal ve fizyolojik değerleri konusundaki ortak görüş 0.9 değerinin üzerinde ölçülen

ABPI değerlerinin genel bağlamda doğru olduğudur. ABPI ölçümlerinde 0.9 değerinden küçük olarak bulunan ölçümler ise alt ekstremitelerde bir veya daha fazla arterde oluşan problemi işaret etmektedir. ABPI değerinin klinik kullanımdaki öneminin incelenebilmesi için çeşitli klinik tabloları gösteren hastalardan ölçülen ABPI değerlerine bakmak gerekmektedir. Kladiyasyon tanımlayan hastalarda ABPI değeri 0.3 ila 0.9 arasında değişmekte iken, iskemik istirahat ağrısı görülen hastalarda ABPI değeri 0.5 değerinin altında görülmektedir. 0.2 değerinin altında ölçülen ABPI değerlerinde ise ekstremitelerde iskemiden dolayı meydana gelen gangrenöz bir klinik sunum ortaya çıkmaktadır. ABPI ölçümü ile %95 gibi yüksek bir oranda doğru sonuçlar elde ederiz ancak diyabet gibi bazı durumlarda ABPI değeri >1 şeklinde yalancı bir yükselme sağlayabilir. Bu durum fizyolojik şekilde perfüzyon artışı sağlanması ile karşılaştırılmamalıdır.

ABPI değerinde düşme olmaksızın bazı hastalarda periferik arter hastalıklarına dair bulgular görülebilmektedir. Bu durumun aksi de mümkündür. Bazı durumlarda da periferik arter hastalığı olmaksızın ABPI değerlerinde düşme olmaktadır. Bu yüzden periferik arter hastalıklarının tanısında en önemli koşullardan bir tanesi anjiyografik tetkiktir. Bu tetkiklerin sonucunda periferik arter hastalığı tanısı kesin olarak konulabilmektedir.

3.5.3. Maksimum yürüyüş mesafesi (Treadmill) testi

Periferik arter hastalığında görülen en karakteristik bulgulardan bir tanesi de egzersiz ile ortaya çıkan ve istirahat ile düzelen iskemik ağrıdır. Periferik arter hastalığı üzerinde yapılan çalışmaların pek çoğunun primer sonlanma noktası olarak yürüme mesafesi, treadmill testi ile değerlendirilir. Treadmill testine ait sonuçlardan bir tanesi ICD (kladiyasyonun başladığı mesafe değeri), bir diğeri ACD'dir (testin kladiyasyondan dolayı bırakılmak zorunda kalındığı kladiyasyon zamanı). Treadmill testi günlük yaşamda hareket kapasitesine büyük kısıtlamalar getiren egzersiz ağrısını tespit etmeye yönelik yapılan bir testtir. Arterlerde bulunan aterosklerotik lezyonların veya başka bir takım sebeplerden dolayı oluşan tıkanıklık veya darlıkların seviyesi ile treadmill testinde ortaya çıkan azalmış yürüme mesafesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktadır. Buna göre darlık ve tıkanıklık miktarı arttıkça arterial kan akımı ve kladiyasyon zamanı da azalma göstermektedir. Ayrıca treadmill testi ile hastaların cerrahi veya medikal tedaviden gördükleri faydalar da karşılaştırılabilir.

Treadmill testinin içerisinde çeşitli hızlar ve eğimler ile pek çok prosedür tanımlanmıştır. Bizler çalışmamızda hastaları %12 eğim açısı ile 2 km/saat hızında yürüterek ölçümlerimizi yaptık.

3.5.4. Anjiografide kollateralizasyon

Vasküler yapıların filizlenerek veya IMG yolu ile yeni damar yapıları oluşturması iskemik kalan bölgenin kanlanabilmesi mümkün olmaktadır. Bu duruma göre kollateral vaskülarizasyon gelişimi hastalarda postoperatif 6. ayda (24. haftada) gerçekleştirilen DSA (Dijital Substraction Anjiografi) veya BT Anjiografi tetkikleri ile değerlendirildi ve sonuçlar aşağıdaki şekilde derecelendirildi.

- +0 → Yeni kollateral oluşmaması
- +1 → Hafif Kollateral Oluşması
- +2 → Orta Derecede Kollateral Oluşması
- +3 → Zengin Kollateral Oluşması

3.6. İlk Değerlendirme

Polikliniğimize başvuran her hastada başvuru sırasında rutin laboratuvar testleri ve serolojik tetkikler çalışıldı. Ayrıca hastalara Tam kan sayımı, karaciğer fonksiyon testleri, böbrek fonksiyon testleri, açlık kan şekeri, üre analizi, sedimentasyon hızı, CRP, Romatoid Faktör, Antinükleer Antikor, Antifosfolipid Antikor, Scl-70, kompleman ölçümü, fibrinojen ölçümü, serum homosistein düzeyi ölçümü ve hiperkoagulabilite testleri (Protein-C, Protein-S, Antitrombin-III, Faktor-V Leiden, Protrombin gen mutasyon analizi), PA akciğer grafisi, Elektrokardiografi (EKG) ve Ekokardiografi testleri yaptırıldı. İmplantasyon işleminden önce bütün hastalar tecrübeli bir hematolojist tarafından detaylı şekilde değerlendirildi. Asetil Salisilik Asit (ASA) ve klopidogrel implantasyon işleminden 5-7 gün önce kesildi.

Tüm hastalara standart vasküler muayene uygulandı. Bu muayene içerisinde perfüzyon durumunun değerlendirilebilmesi için ABPI ölçümü, ağrı durumlarının değerlendirilebilmesi adına Visual Analog Skala(VAS) testi ve iskemik ağrılardan dolayı test bırakılana kadar Treadmill testi uygulandı. Bununla birlikte iskemik deri ülseri olan hastalara sistemik antibiyotik reçete edildi. ABMMNC implantasyonu yapılmadan önce tüm hastaların yara bakımları ve debritlemeleri yapıldı.

Hastalara preoperatif dönemde DSA (Dijital Substraction Anjiografi) veya BT anjiografi tetkikleri uygulanarak tedavi sonrasında oluşan kollateral damar gelişimi değerlendirilebilmesi için preoperatif veriler toplandı.

3.7. Kök Hücrelerin Toplanması ve Hazırlanması

Kemik iliği aspirasyonu, ABMMNC implantasyonundan ortalama 2 saat kadar önce hastalardan genel anestezi altında her iki spina iliaka posterior süperiordan toplamda 500 ml kemik iliği materyali olacak şekilde yapıldı. Kemik iliği aspirasyonu için önceden heparinize edilmiş şırıngalar ve 16 gaugelik iğneler kullanıldı. Kemik iliği materyalinin aspirasyonu esnasında farklı derinlik seviyelerine inilmeye özen gösterildi. Bunun sebebi de olabilecek en verimli preparatı elde etmek idi. Kemik iliği aspirasyonu işlemi elde ettiğimiz hücreler için mikrobial kontaminasyon riskinin en yüksek olduğu dönemdir. Bu sebepten dolayı aspirasyon işlemi steril şartlar altında yapılmaktadır. Tüm hastalar aspirasyon işlemi esnasında vital parametrelerin takibi açısından monitörize edildiler.

3.8. Kemik İliği Materyalinin Hazırlanması

Aspire edilen kemik iliği materyali Baxter marka kemik iliği toplama setinde toplanarak aferez ünitesine gönderilir. Afereze gelen ürün Fresenius P1y marka set kullanılarak Fresenius com-tech (Fresenius SE & Co. KGaA- Homburg-GERMANY) marka aferez aracı ile saflaştırılıp CD-34⁺ hücre sayımı ve mononükleer hücre ayrıştırılması yapılır. Bu program sayesinde %99 oranda saflaştırılmış kök hücre volümü elde edilir. toplam harvest volümü olan 500 ml seviyesinden, final volümü olan 100 ml yoğun mononükleer kök hücre preparatı elde edilir. Elde edilen 100 ml mononükleer kök hücre preparatının 1 ml'lik kısmında $1.6 \pm 0.9 \times 10^9$ mononükleer hücre bulunmaktadır. Elde edilen mononükleer hücre preparatında toplam CD34⁺ kök hücre sayısı $53 \pm 36 \times 10^6$ dır. Bununla beraber sitoflorometrik analiz sonuçlarına göre ise elde ettiğimiz kemik iliği kaynaklı otolog kök hücre preparatının %99 oranında saf ve %97.5 \pm 2.2 oranında CD45⁺ hücre içermekteydi ve elde ettiğimiz kök hücreler üzerinde implantasyon öncesinde ve sonrasında G-CSF kullanılmamıştır.

İşlemin her aşamasında hücrelerin kullanılabilirliği ve herhangi bir kontaminasyon ihtimaline karşı sterilitesi test edildi.

Son aşamada elde edilen 100 ml saflaştırılmış ve işlemde geçirilmiş ABMMNC preparatı kullanılması için operasyon odasına gönderildi.

3.9. ABMMNC İmplantasyonu

Aferez ünitesinde kök hücrelerin saflaştırma süreci boyunca bekleyen hastalar, kemik iliği materyali aspirasyonundan yaklaşık iki saat sonra kök hücrelerin işlenmelerinin bitimini takiben tekrar operasyon odasına alındılar.

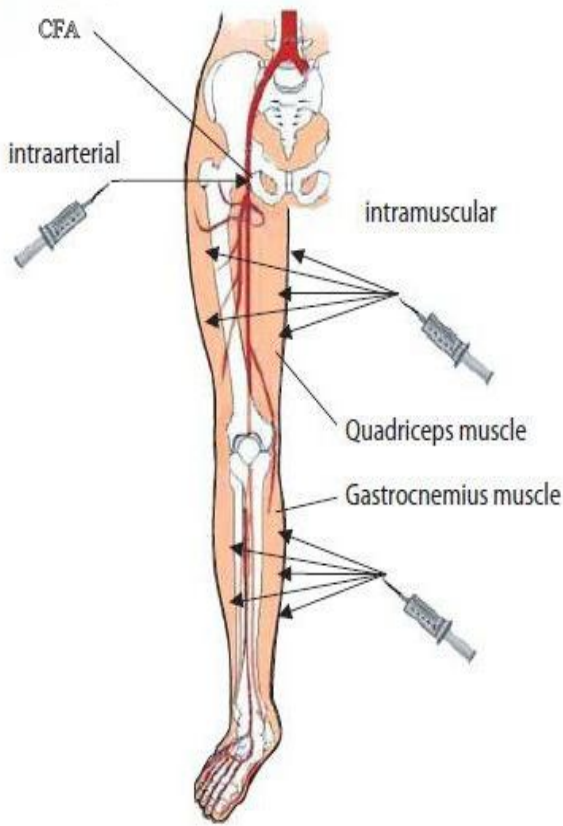
Eğer hastalara kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre implantasyonu ile aynı seansta yara debrütmanı da yapılacaksa operasyon genel anestezi altında, sadece kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre implantasyonu yapılacak ise hafif sedasyon altında işlem gerçekleştirildi.

Ayrıca tüm hastalarda işlem aynı kişilerden oluşan cerrahi ekip tarafından gerçekleştirildi.

Aferez işlemi ile elde edilen otolog kemik iliği orjinli mononükleer hücreler (ABMMNC) hastaya dört ayrı aşamada enjekte edildi. Enjeksiyonun yapıldığı her bir aşama iskemik stimulus ile paralel bir şekilde işletildi.

İmplantasyonun birinci aşamasında hastalara alt ekstremitede iskemik ağrı meydana gelinceye kadar ergometrik stres testi yapıldı. Bu aşamayı takiben ikinci aşamaya geçildi ve hasta yatar-istirahat pozisyonunda iken kan basıncı manşonunun sistolik kan akımı basıncının 20-30 mmHg üstündeki bir seviyeye kadar şişirilmesi aracılığı ile kan akımı durdurularak hastaya ikinci iskemik stimulus verildi. İkinci iskemik uyarı birkaç dakika devam ettirildikten sonra kan basıncı manşonu indirilerek bacağına kan akımının yeniden gelmesi sağlanır ve ardından inguinal ligament altından common femoral arter (CFA) palpe edilerek ponksiyonu gerçekleştirildi ardından CFA içerisine bir enjeksiyonda 10 ml aferez edilip işlemde geçirilmiş kök hücre preparatı enjekte edildi. Çalışmanın bu aşamasından sonra zaman kaybetmeden üçüncü çalışmaya geçildi. İmplantasyon işleminin intraarterial safhasından sonra gelen üçüncü safhasında bacak bir kan basıncı manşonu ile tekrar sarıldı ve manşon sistolik kan basıncı değerinin 20-30 mmHg üzerindeki bir değere kadar şişirilip, birkaç dakika bekletildi. Bacakta meydana gelen iskemi durumunu takiben şişirilen kan basıncı manşonunun havası indirilerek intramusküler enjeksiyona geçildi. İnamusküler enjeksiyonda quadriceps femoris kası ve gastroknemius kası içerisine elimizdeki 90 ml

kemik iliği orjinli otolog mononükleer hücre preparatı implante edildi. İmplantasyon oklüzyona uğrayan arter segmentinin 4-5 cm proksimalinden başlayarak distale doğru ilerletildi. Bu enjeksiyonlar quadriceps femoris kası ve gastrocnemius kaslarına her birisi için 10 ayrı bölgeye gerçekleştirildi. Her bir enjeksiyon alanına enjeksiyon yapılacak olan kas içine 3-4 cm girilerek ortalama 4-5 ml kemik iliğinden elde edilmiş otolog mononükleer hücre preparatı enjekte edildi. Enjeksiyon için 22 gagugelik iğneler kullanıldı.



Şekil 3.1. İmplantasyon prosedürünün şematik gösterimi.

İskemik stimulyasyondan sonra inguinal ligamentin hemen altından common femoral artere (CFA) girilerek 10 ml ABMMNC enjeksiyonu yapılır. Bunu takiben oluşturulan iskemik stimulusun ardından quadriceps femoris ve gastrocnemius kaslarına da intra-musküler enjeksiyonlar gerçekleştirilir²⁸².

3.10. Postoperatif Takip

Hastalar ortalama olarak implantasyon işleminden bir gün sonra hemoglobin, hematokrit düzeylerinin kontrolünün ardından poliklinik kontrolü tavsiyesi ve mevcut medikasyonlarının devamı ile taburcu edildiler. Hastalar 9 ila 64 ay arasında ortalama olarak $30\pm 22,12$ ay takip edildiler. Takipler 4. hafta, 12. hafta ve 24. haftada gerçekleştirildi. Yapılan takiplerde hastalardan DSA veya BT anjiyografi tetkiki ile birlikte treadmill maksimum yürüyüş mesafesi testi, ABPI ölçümü ve Visual Analog Skala değerlendirmesi yapıldı.

Bu takip süreci zarfında hiçbir hastada işleme dair istenmeyen bir etki görülmedi.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Özellikler

Çalışmaya toplam 11 hasta dahil edildi. Çalışmaya katılan hastaların tamamı erkek idi. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş ortalaması $48,27\pm 11,55$ olarak hesaplandı. Hastaların boy ortalaması $165\pm 8,43$ cm, kilo ortalaması ise $66,72\pm 8,68$ olarak hesaplandı (Grafik 4.1).

4.2. Sonuçlar

Hastalar 9 ila 64 ay arasında takip edildi. Kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre implantasyonu yapılmadan önce ağrısız yürüme mesafeleri, vasküler yapıları, perfüzyon durumları ve ağrı durumları değerlendirilen hastaların implantasyon sonrasında 1, 3, 6. aylarda yapılan poliklinik kontrollerinde, implantasyon öncesinde bakılan tüm değerleri tekrar incelendi. Bu tetkiklerden Treadmill ve Visual Analog Skala testleri implantasyon sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. ayda, ABPI ölçümü 3. ve 6. ayda tekrarlanırken anjiyografi işlemi sadece implantasyon öncesinde ve anjiyografi ile kollateral gelişiminin takibi amacı ile implantasyondan sonraki 6. ayda gerçekleştirildi.

4.2.1. İmplantasyon öncesi ölçümler

İmplantasyon işlemi öncesi yapılan değerlendirme ve ölçümlerde hastalara ağrısız yürüme mesafesi için Treadmill testi, ağrı değerlendirmesi için Visual Analog Skala testi, vasküler yapıların değerlendirilmesi için DSA veya BT anjiyografi ve perfüzyonun değerlendirilmesi için ABPI ölçümü yapıldı. Hastalara uygulanan Treadmill testi sonucunda ortalama ağrısız yürüme mesafeleri $62,72\pm 20,60$ metre olarak, Visual Analog Skala testi ortalama sonuçları $8,23\pm 1,31$ olarak, ABPI ölçümü sonuçları ortalaması da $0,50\pm 0,06$ olarak hesaplandı.

İmplantasyon öncesinde yapılan ağrısız yürüme mesafesi ölçümlerinde 40-50 metre arasında olan 4 hasta (%36,36), 50-60 metre arasında olan 2 hasta (%18,18), 60-70 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 70-80 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 80-90 metre arasında olan 2 hasta (%18,18) ve 90-100 metre arasında olan 1 hasta (%9,9) bulunmakta idi.

İmplantasyon öncesinde yapılan Visual Analog Skala testi sonucunda Visual Analog Skala puanı 5-6 puan arasında olan 1 hasta (%9,9), 6-7 puan arasında olan 0 hasta (%0), 7-8 puan arasında olan 3 hasta (%27,27), 8-9 puan arasında olan 3 hasta (%27,27) ve 9-10 puan arasında bulunan 4 hasta (%36,36) bulundu.

İmplantasyon öncesinde yapılan ABPI ölçümlerinin sonuçlarına göre ise ABPI değeri 0,4-0,5 arasında bulunan 4 hasta (%36,36) ve 0,5-0,6 arasında bulunan 7 hasta (%63,63) bulundu.

İmplantasyon işlemi öncesinde yaptırılan DSA anjiyografi işlemlerinden elde edilen görüntülerde tüm hastalarda Buerger hastalığı ile uyumlu görünüm izlendi.

4.2.2. İmplantasyon sonrası 1. ay takip gözlemleri

Hastalara kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre implantasyonu gerçekleştirildikten 1 ay sonra yapılan takip gözlemlerinde Treadmill testi ile ağrısız yürüme zamanı, Visual Analog Skala ile ağrı durumu tekrar değerlendirildi. Bu ölçümler sonrasında elde edilen verilere göre hastaların Treadmill testinde ağrısız yürüme mesafesi ortalama $56,90 \pm 35,40$ metre artış göstermiş ve ortalama $62,72 \pm 20,60$ metreden $119,63 \pm 39,57$ metreye yükselmiştir ($p=0,003^*$, $p<0,008$). Ayrıca implantasyondan bir ay sonra gerçekleştirilen Treadmill testi ile ağrısız yürüme mesafesi değerlendirilmesinde ağrısız yürüme mesafesi değeri 0-70 metre arasında olan 0 hasta (%0), 70-80 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 80-90 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 90-100 metre arasında olan 2 hasta (%18,18), 100-110 metre arasında olan 2 hasta (%18,18), 110-120 metre arasında olan 0 hasta (%0), 120-130 metre arasında olan 3 hasta (%27,27), 130-170 metre arasında olan 0 hasta (%0), 170-180 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 180-200 metre arasında olan 0 hasta (%0), 200-210 metre arasında olan 1 hasta (%9,9) bulundu (Grafik 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve Grafik 4.6).

İmplantasyondan 1 ay sonra ağrı durumunun gözlenmesi amacı ile tekrarlanan Visual Analog Skala testinden elde edilen sonuçlara göre ise hastaların ortalama Visual Analog Skala puanı $8,23 \pm 1,31$ değerinden $7,73 \pm 1,32$ ($p=0,003^*$, $p<0,008$) değerine düşmüştür. İmplantasyon öncesi ile implantasyon sonrası 1. ay kontrollerinde elde edilen Visual Analog Skala testine ait sonuçlar arasında ortalama $0,5 \pm 0,29$ puan fark görüldü. İmplantasyon sonrası 1. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuçlarına göre Visual Analog Skala değeri 0-4 puan arasında olan 0 hasta (%0), 4-5 arasında olan 1 hasta (%9,9), 5-6 puan arasında olan 0 hasta (%0), 6-7 puan arasında

olan 1 hasta (%9,9), 7-8 puan arasında olan 4 hasta (%36,36), 8-9 puan arasında olan 3 hasta (%27,27), 9-10 puan arasında olan 2 hasta (%18,18) bulundu (Grafik 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 ve Grafik 4.11).

4.2.3. İmplantasyon sonrası 3. ay takip gözlemleri

İmplantasyondan sonra gerçekleştirilen 3. ay takiplerinde Treadmill testi ile ağrısız yürüyüş mesafesi ölçümü sonuçlarının ortalaması $210,09 \pm 101,05$ olarak hesaplandı. 3. ay tetkiklerinde elde edilen ağrısız yürüme mesafesi ortalaması ile implantasyon öncesi için hesaplanan ağrısız yürüme mesafesinin arasında oluşan ortalama $147,36 \pm 96,08$ metre fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görülmüştür ($p=0,003^*$, $p<0,008$). Buna karşılık olarak Treadmill testi ile ağrısız yürüyüş mesafesi ölçümü için 1.ay tetkiklerinde elde edilen ölçüm sonuçları ile 3. ay tetkiklerinde elde edilen ölçüm sonuçları arasındaki oluşan ortalama $90,45 \pm 85,78$ metre farklılık Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testine göre anlamlı olarak görülememiştir ($p=0,021$, $p>0,008$). Hastalara kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre implantasyonu yapıldıktan 3 ay sonra yapılan kontrollere göre kontrolü yapılan 11 hastanın içerisinde, ağrısız yürüme mesafesi 0-100 metre arasında olan 0 hasta (%0), 100-110 metre arasında olan 2 hasta (%18,18), 110-120 metre arasında olan 2 hasta (%18,18), 120-170 metre arasında olan 0 hasta (%0), 170-180 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 180-190 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 190-200 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 200-290 metre arasında olan 0 hasta (%0), 290-300 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 300-310 metre arasında olan 1 hasta (%9,9), 310-350 metre arasında yer alan 0 hasta (%0) ve 350-360 metre arasında yer alan 2 hasta (%18,18) görüldü (Grafik 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve Grafik 4.6).

İmplantasyon işleminden sonra 3. Ayda tekrarlanan Visual Analog Skala testi sonuçları ortalaması $7,08 \pm 1,47$ puan olarak hesaplanmıştır. İmplantasyon işleminden 3 ay sonra elde edilen bu sonuçlar ile 1. ay sonuçları arasındaki $0,65 \pm 0,57$ puanlık fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görülmüştür ($p=0,003^*$, $p<0,008$). Bununla beraber Visual Analog Skala testine ait implantasyon öncesi sonuçlar ile implantasyon sonrası 3. ayda yapılan testin sonuçları arasındaki $1,15 \pm 0,58$ puanlık fark da Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görülmüştür ($p=0,003$, $p<0,008$). Buna göre Visual Analog Skala testine ait 3. ayda yapılan test sonuçlarına göre 11 hastadan; 0-4 puan arasında 0 hasta (%0),

4-5 puan arasında 1 hasta (%9,9), 5-6 puan arasında 2 hasta (%18,18), 6-7 puan arasında 2 hasta (%18,18), 7-8 puan arasında 2 hasta (%18,18), 8-9 puan arasında 4 hasta (%36,36) görülmüştür (Grafik 4.7, 4.8, 4.9, 4.10. ve Grafik 4.11).

İmplantasyondan 3 ay sonra yapılan gözlemlerde ölçülen ABPI değeri ortalaması $0,58\pm 0,09$ olarak ölçüldü ve implantasyondan önce yapılan ABPI ölçümü ortalaması ile arasında $0,08\pm 0,05$ olarak bulunmuş ve bu fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,016$). İmplantasyondan 3 ay sonra ABPI değerleri ölçülen 11 hastanın, 2 hastada (%18,18) 0,15 puandan daha fazla, 8 hastada (%72,72) 0,05 puandan fazla artış görüldü (Grafik 4.12, 4.13, 4.14 ve Grafik 4.15).

4.2.4. İmplantasyon sonrası 6. ay takip gözlemleri

İmplantasyondan sonra 6. ayda gerçekleştirilen Treadmill ile ağrısız yürüme zamanı testinin sonuçlarına göre ortalama ağrısız yürüme mesafesi $310\pm 172,54$ metre olarak belirlendi ve implantasyon öncesi yapılan ölçümlerin ortalaması ile arasında $272,27\pm 164,96$ metre fark görüldü ve bu fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$).

İmplantasyon sonrası 1. ayda yapılan Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi ölçümü sonucu ile implantasyon sonrası 6. ayda yapılan Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi ölçümü sonuçları arasında $190,36\pm 152,86$ metre fark görüldü. İmplantasyon sonrası 1. ayda yapılan Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi testi sonuçları ortalaması ile implantasyon sonrası 6. ayda yapılan Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi testi sonuçları ortalaması arasında görülen bu farklılık Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$).

İmplantasyon sonrasında 3. ayda yapılan Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi testi sonuçları ortalaması ile implantasyon sonrası 6. ayda yapılan Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi testi sonuçları ortalaması arasında $99,91\pm 91,61$ metre fark görüldü. İmplantasyon sonrası 3. ayda yapılan Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi testi sonuçları ortalaması ile implantasyon sonrası 6. ayda yapılan Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi testi sonuçları ortalaması arasındaki farklılık Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$) (Grafik 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve Grafik 4.6).

İmplantasyon sonrası 6. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuçları ortalaması $6,25 \pm 1,50$ olarak hesaplandı. İmplantasyon sonrası 6. ayda takip gözlemleri gerçekleştirilen 11 hastadan Visual Analog Skala puanı 0-3 arasında bulunan 0 hasta (%0), 3-4 puan arasında bulunan 1 hasta (%9,9), 4-5 puan arasında bulunan 1 hasta (%9,9), 5-6 puan arasında bulunan 3 hasta (%27,27), 6-7 puan arasında bulunan 1 hasta (%9,9), 7-8 puan arasında bulunan 3 hasta (%27,27), 8-9 arasında bulunan 2 hasta (%18,18) görüldü.

İmplantasyon sonrasında 6. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuç puanları ortalaması ile implantasyon öncesinde gerçekleştirilen Visual Analog Skala testi sonuçları ortalamasının arasında $1,97 \pm 0,86$ puanlık bir fark görüldü. Bu azalma Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$).

İmplantasyon sonrası 6. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuç puanları ortalaması ile implantasyon sonrası 1. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuç ortalaması arasında $1,47 \pm 0,83$ puan fark görüldü. İmplantasyon sonrası 1. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuçları ortalaması ile implantasyon sonrası 6. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuçları ortalaması arasındaki farklılık Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$).

İmplantasyon sonrası 6. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuç puanları ortalaması ile implantasyon sonrası 3. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuç ortalaması arasında $0,83 \pm 0,59$ puan fark görüldü. İmplantasyon sonrası 3. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuçları ortalaması ile implantasyon sonrası 6. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuçları ortalaması arasındaki farklılık Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$) ($p=0,003^*$, $p<0,008$) (Grafik 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 ve Grafik 4.11).

İmplantasyondan önce doku perfüzyonunun gözlenmesi amacı ile yapılan takiplerde ölçülen ABPI ortalaması $0,507 \pm 0,06$ iken, implantasyondan 6 ay sonra yapılan takip gözlemlerinde gerçekleştirilen ölçümlerden elde edilen ABPI değerleri ortalaması $0,66 \pm 0,1$ olarak elde edilmiştir. İmplantasyon işlemi öncesindeki ABPI değerleri ile implantasyon işleminden 6 ay sonrasındaki ABPI değerleri arasındaki ortalama fark değeri $0,15 \pm 0,07$ olarak bulunmuş ve bu fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görülmüştür ($p=0,003^*$, $p<0,016$). İmplantasyon işleminden sonra 6. ayda gerçekleştirilen kontrollerde yapılan ABPI

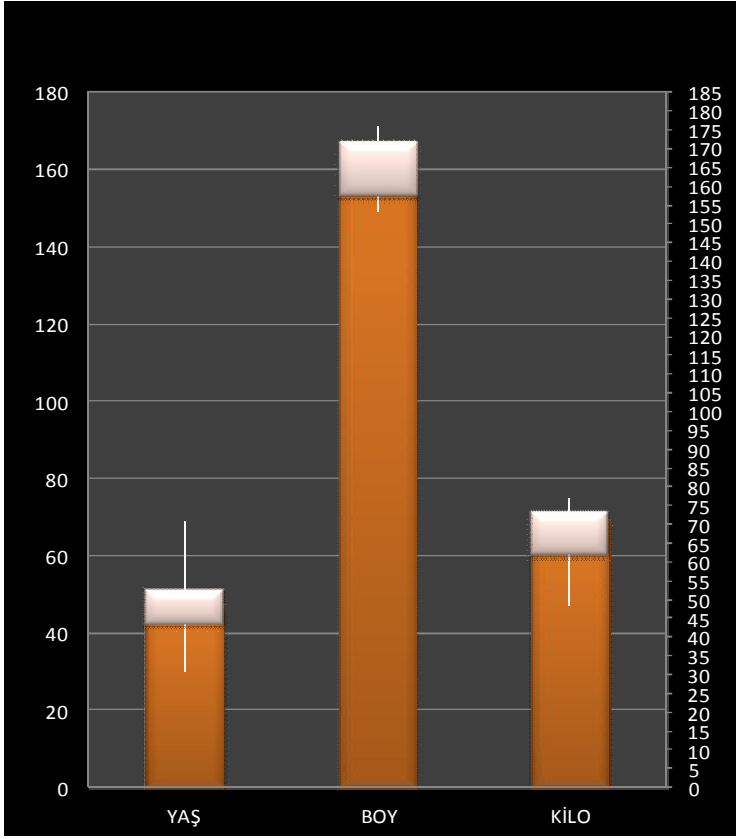
ölçümlerinde 6 hastada (%54,54) 0,15 değerinden, 9 hastada (%90,9) 0,1 değerinden daha yüksek bir artış sağlandığı görüldü (Grafik 4.12, 4.13, 4.14 ve Grafik 4.15).

İmplantasyondan 6 ay sonra yapılan gözlemlerde ölçülen ABPI değeri ortalaması $0,66\pm 0,1$ olarak ölçüldü ve implantasyondan önce yapılan ABPI ölçümü ortalaması ile arasında $0,15\pm 0,07$ olarak bulundu ve bu fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,016$).

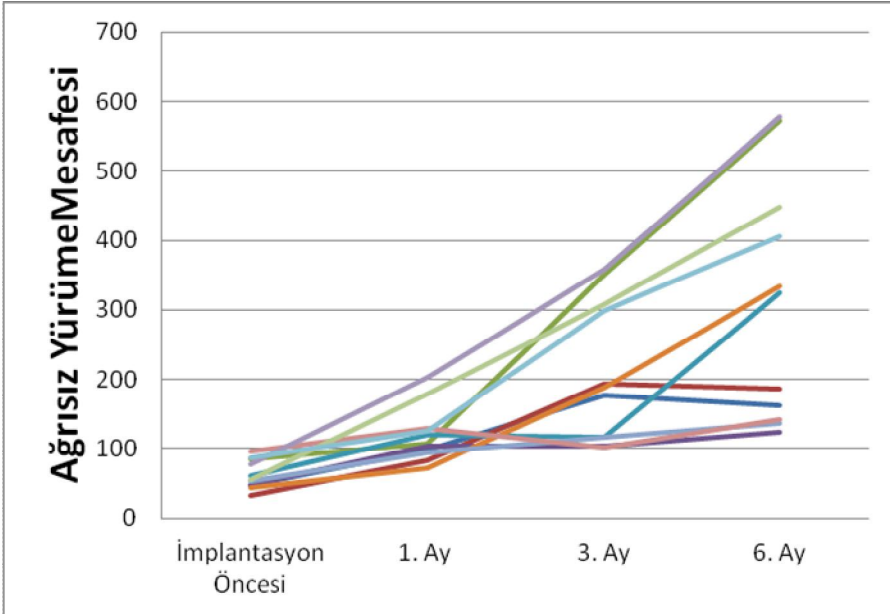
İmplantasyondan 6 ay sonra yapılan gözlemlerde ölçülen ABPI değeri ortalamaları ile implantasyondan 3 ay sonra yapılan gözlemlerde ölçülen ABPI değerleri arasında $0,07\pm 0,05$ puan fark görüldü ve bu fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$).

İmplantasyondan sonra 6. ayda takip gözlemleri yapılan 11 hastadan, 3 tanesinde (%27,27) 0,2 puandan daha fazla artış, 6 tanesinde (%54,54) 0,15 puandan daha fazla artış, 9 tanesinde (%81,81) 0,1 puandan daha fazla artış sağlandığı görüldü (Grafik 4.12, 4.13, 4.14 ve Grafik 4.15).

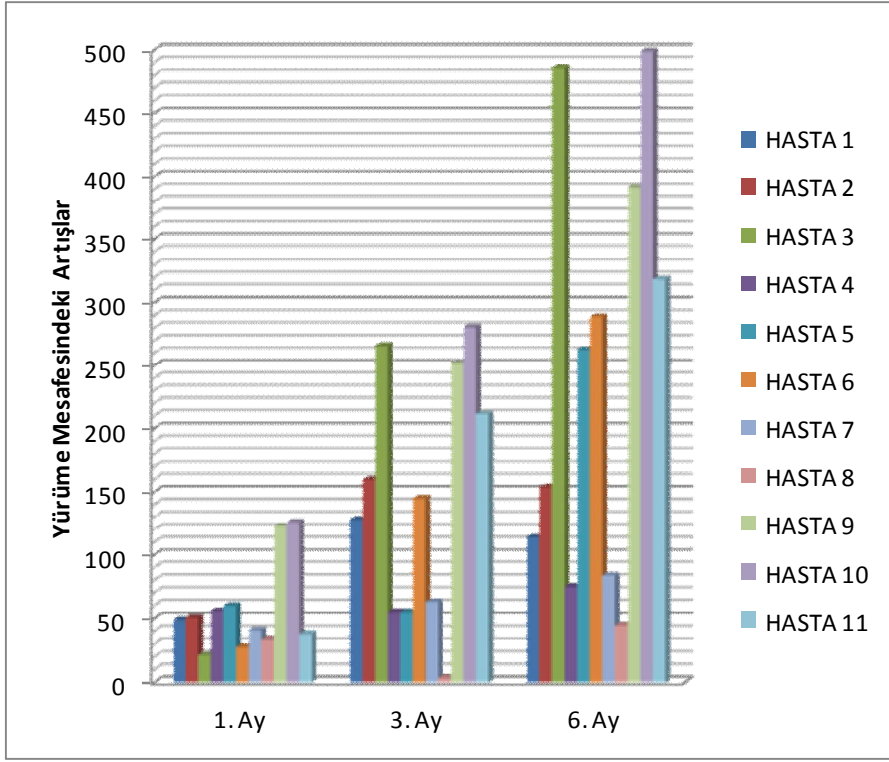
İmplantasyondan 6 ay sonra tüm hastalara yeni kollateralizasyon oluşumunu gözlemek üzere yapılan anjiyografi tetkikinde 4 hastada (%36,36) oluşan kollateralizasyon +3 puan, 2 hastada (%18,18) gelişen kollateralizasyon +2 puan, 4 hastada (%36,36) gelişen kollateralizasyon +1 puan ve 1 hastada (%9,9) gelişen kollateralizasyon ise +0 puan olarak değerlendirildi (Şekil 4.1.- Şekil 4.11).



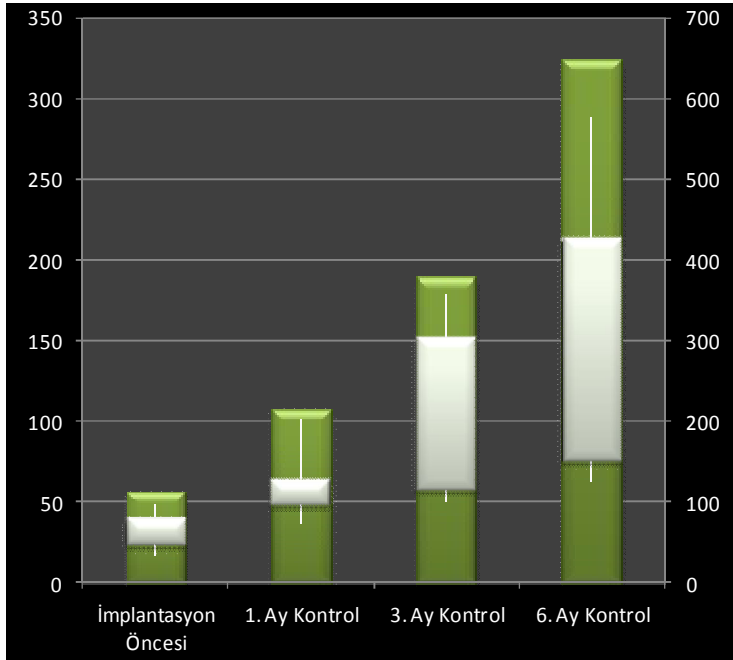
Grafik 4.1. Hastaların yaş, boy ve kilo ortalamaları grafiği.



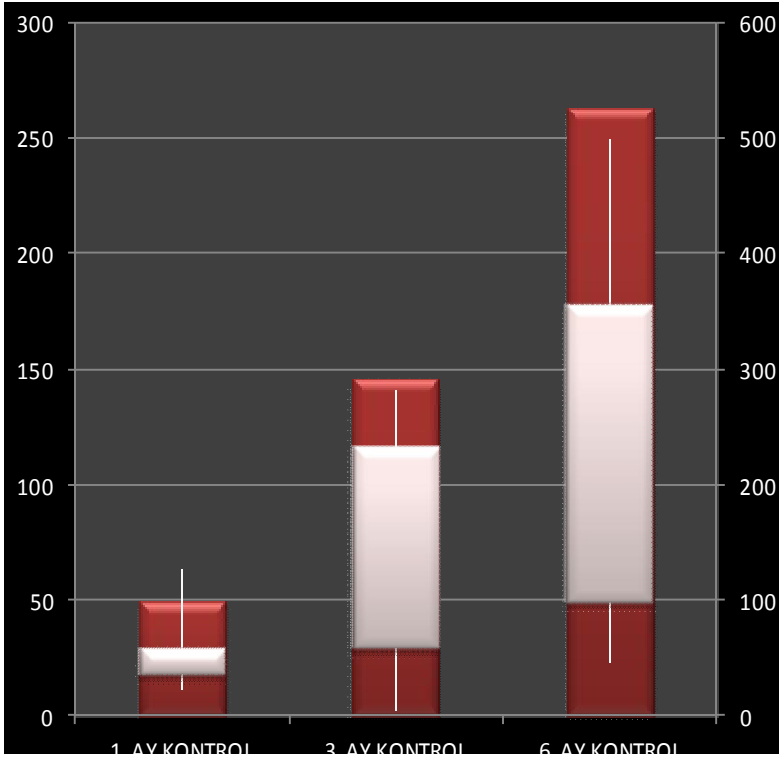
Grafik 4.2. Hastaların 1. ay, 3. ay ve 6. ayda yapılan gözlemlerde ağrısız yürüyüş mesafelerindeki artış değerleri.



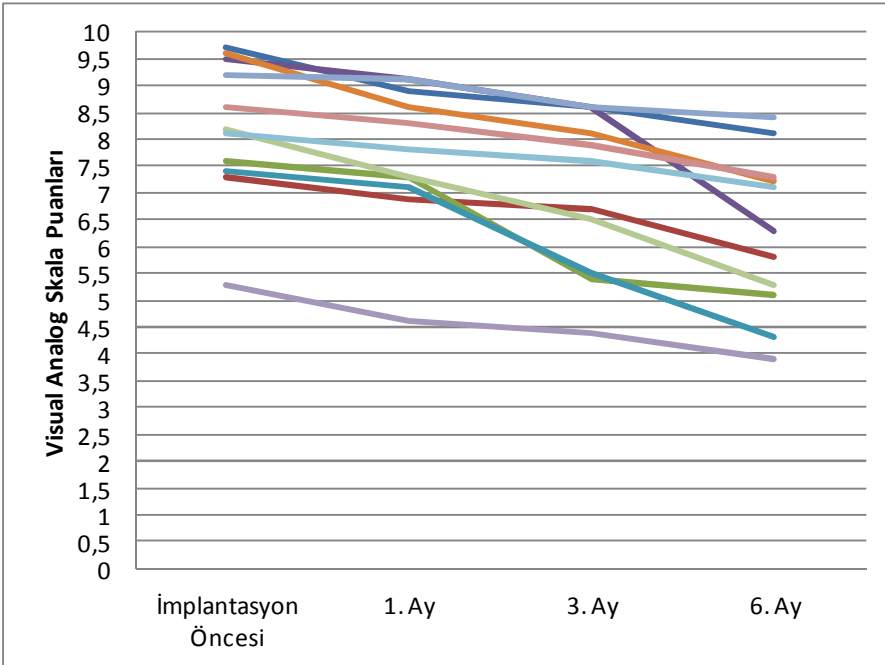
Grafik 4.3. Hastaların 1. ay, 3. ay ve 6. ayda yapılan gözlemlerde ağrısız yürüyüş mesafelerindeki artış değerleri.



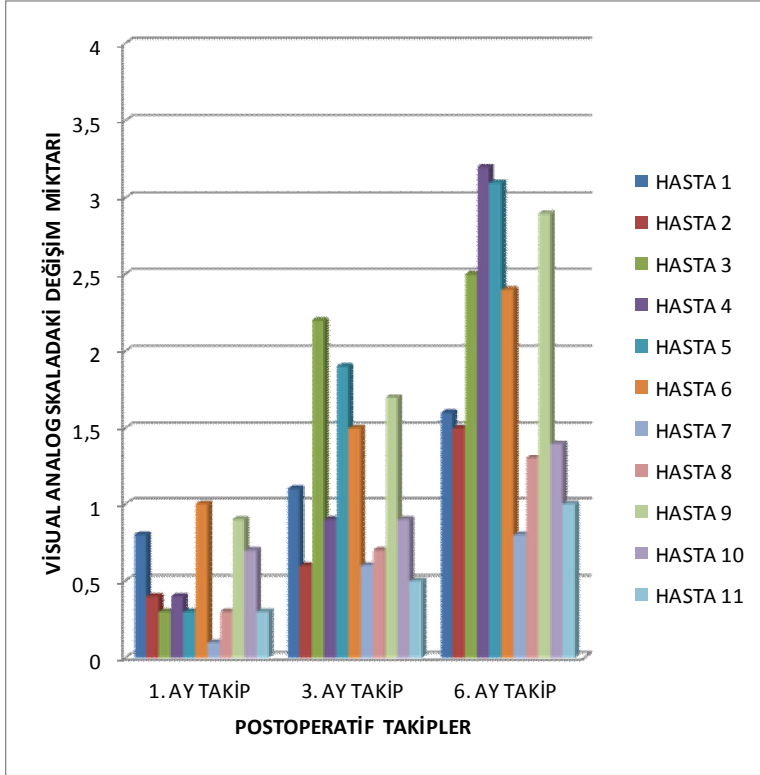
Grafik 4.4. İmplantasyon öncesi ve implantasyon sonrası 1. ay, 3. ay, 6. ay kontrollerinde ağrısız yürüme zamanı testi sonuçları.



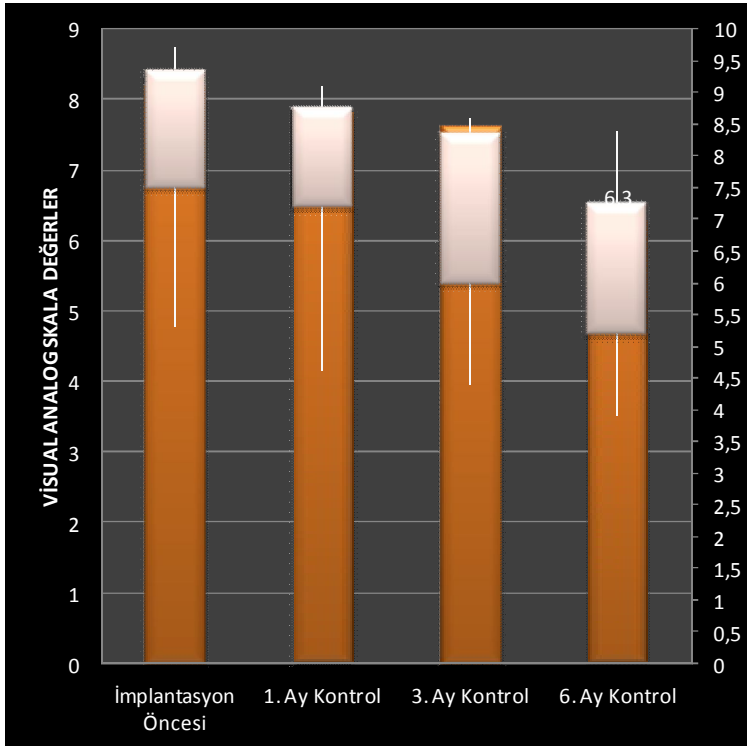
Grafik 4.5. Ağrısız yürüme zamanı testi sonuçlarına göre 1 - 3 - 6. aylarda ağrısız yürüme zamanındaki artış miktarları.



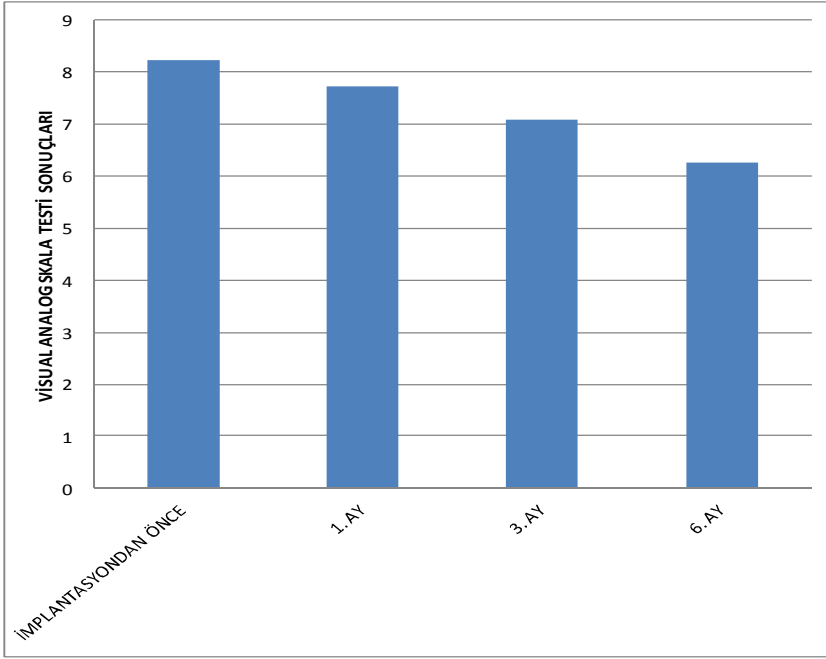
Grafik 4.6. İmplantasyondan önce, implantasyondan 1 ay sonra, implantasyondan 3 ay sonra, implantasyondan 6 ay sonra yapılan visual analog skala testi sonuçları.



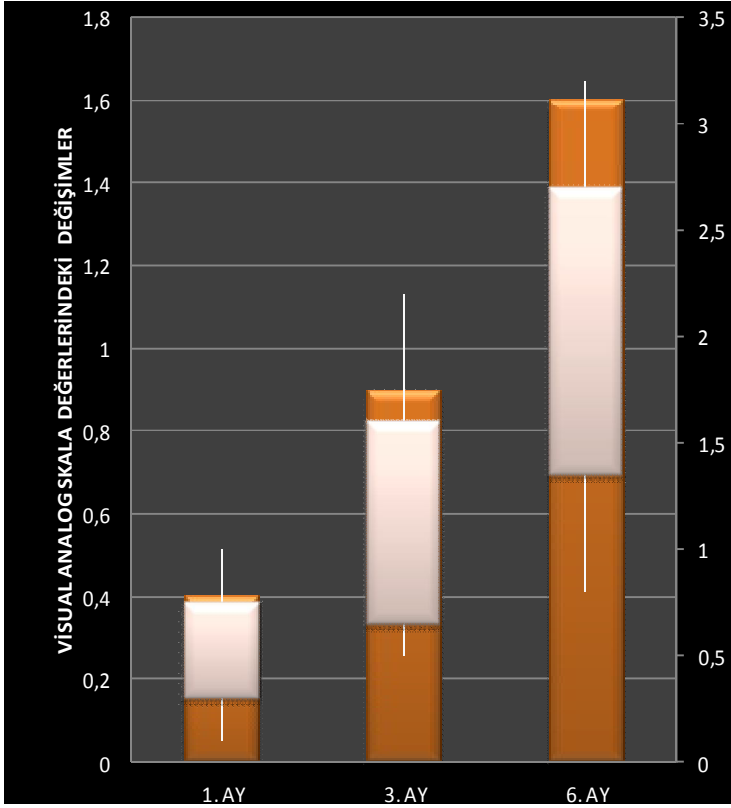
Grafik 4.7. Visual analog skala tetinde implantasyon işlemi sonrası 1. ayda, 3. ayda ve 6. ayda yapılan takiplerde görülen azalma miktarları.



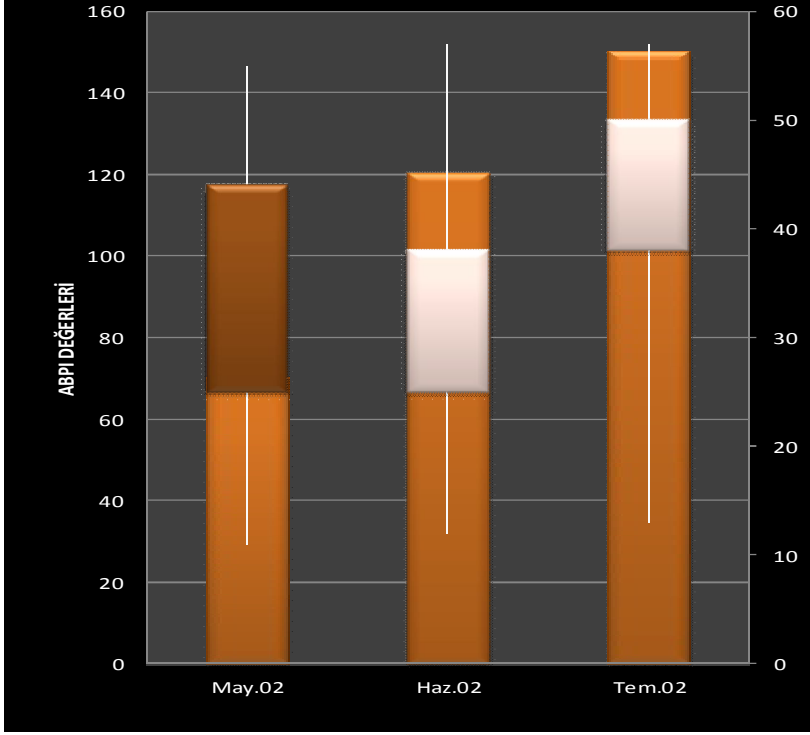
Grafik 4.8. Visual analog skala testine ait implantasyon öncesi, implantasyondan 1 ay sonra, implantasyondan 3 ay sonra ve implantasyondan 6 ay sonra yapılan takiplerde elde edilen değerler.



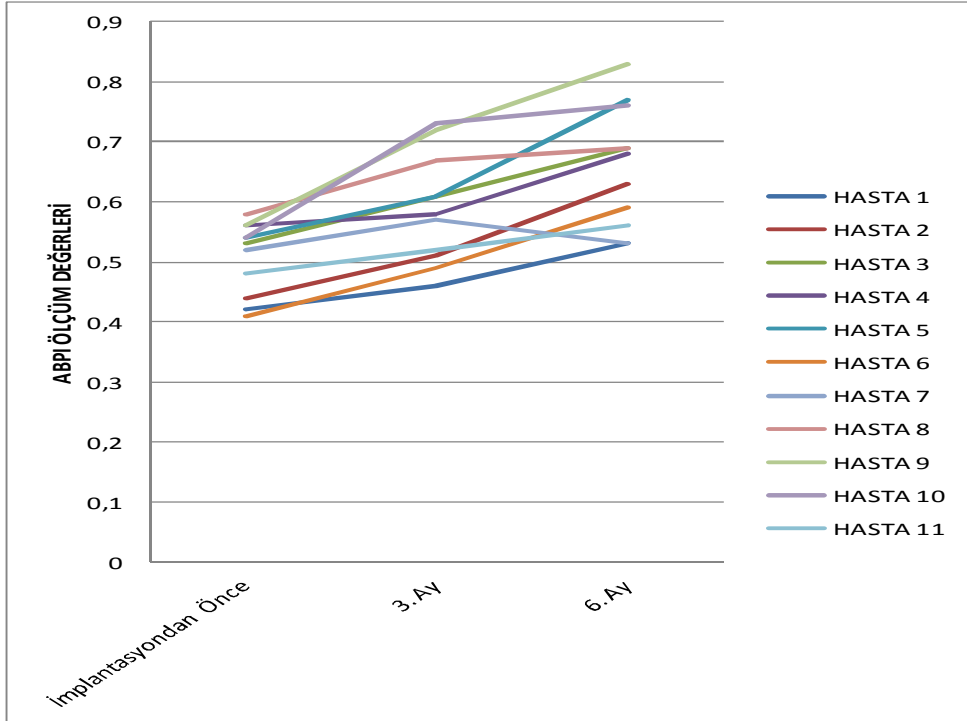
Grafik 4.9. Visual analog skala testine ait implantasyon öncesi, implantasyon sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. ayda elde edilen sonuçlar.



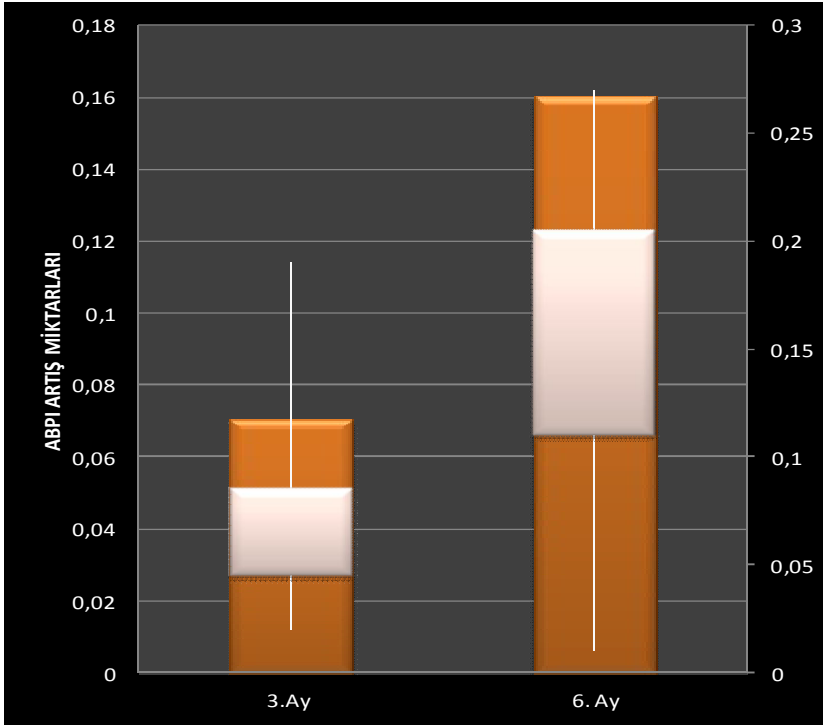
Grafik 4.10. İmplantasyondan sonra 1. ay, 3. ay ve 6. ayda visual analog skala testinde gözlemlenen değişimler.



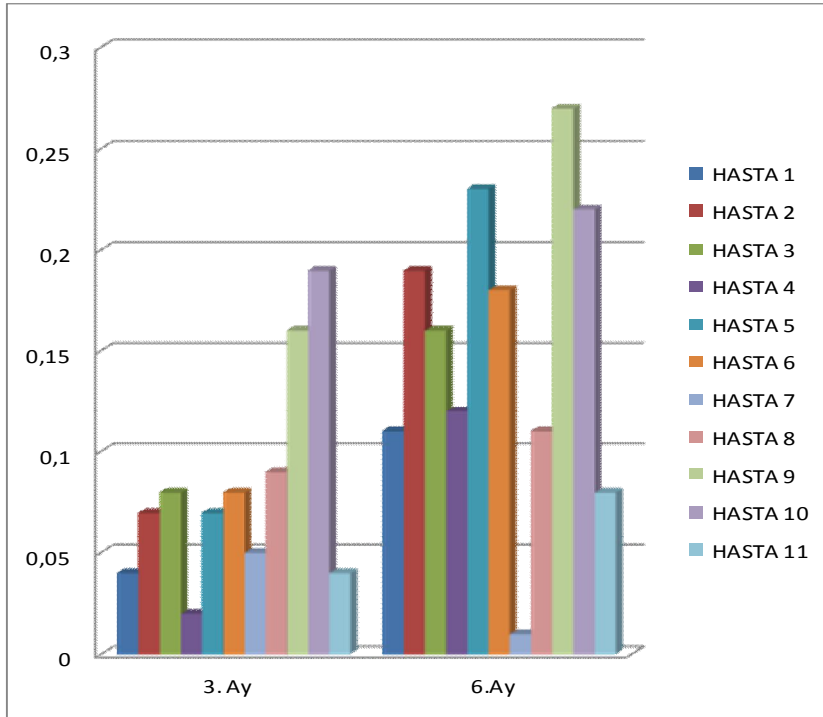
Grafik 4.11. ABPI değerlerinin implantasyondan önce ve implantasyondan sonra 3. ve 6. aylarda değişimleri.



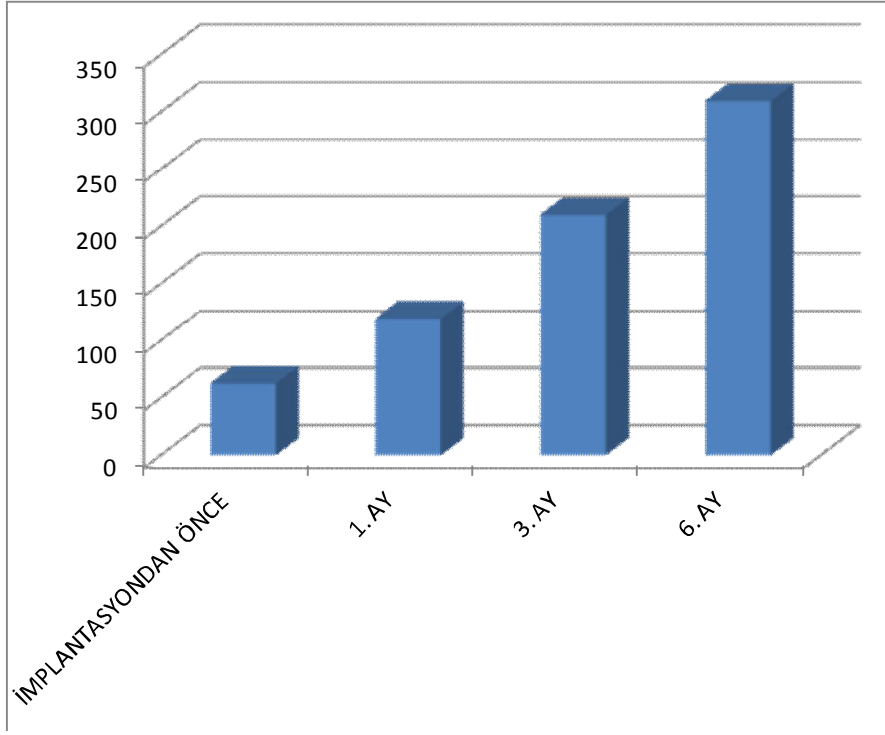
Grafik 4.12. ABPI değerlerinin implantasyondan önce, 3. ay ve 6. ay kontrollerindeki değişimleri.



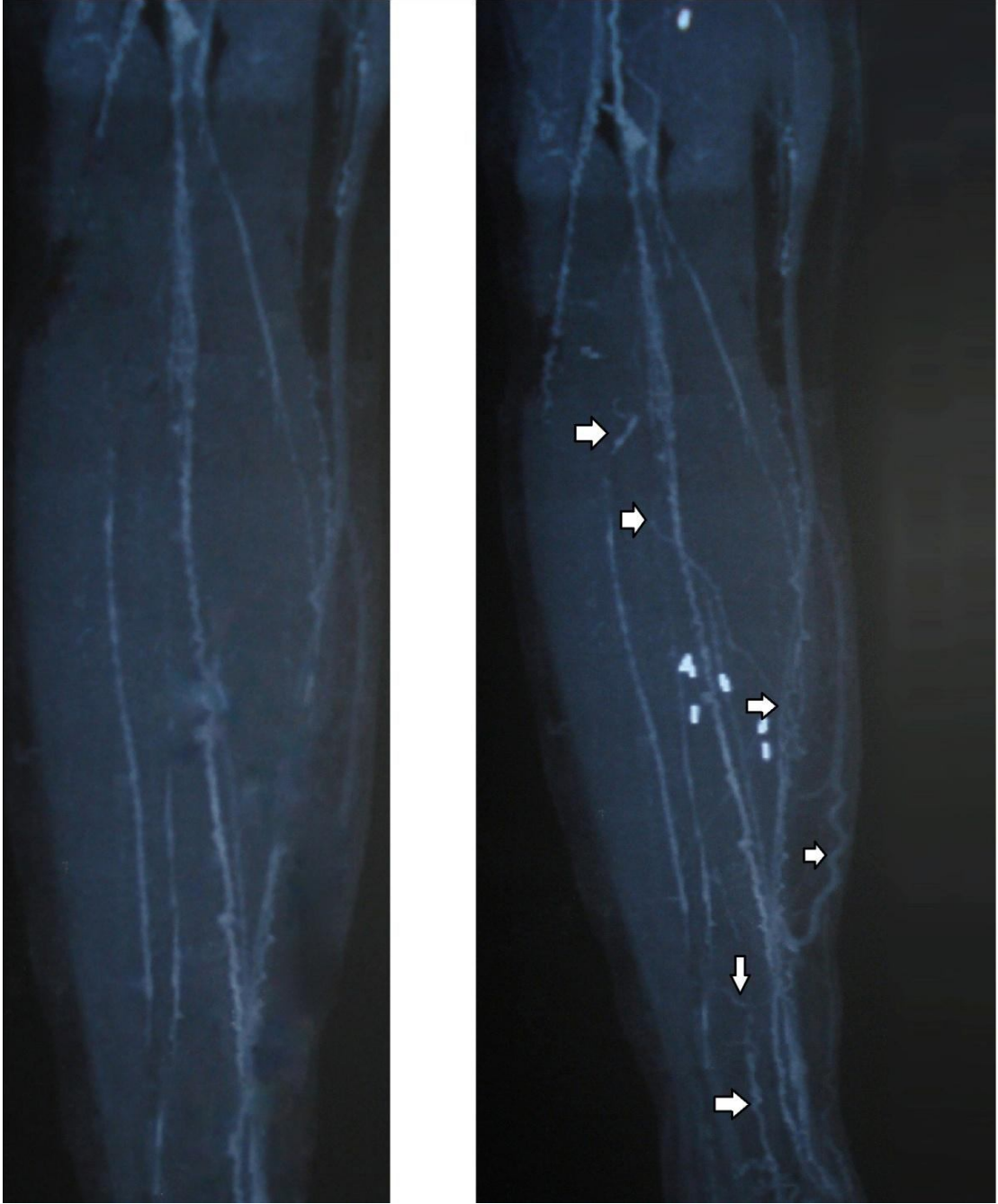
Grafik 4.13. ABPI değerlerinde implantasyondan sonra 3 ve 6. aylarda yapılan kontrollerde görülen değişim aralıkları.



Grafik 4.14. ABPI değerlerinde implantasyon sonrası 3 ve 6. aylarda implantasyon öncesi döneme göre artış miktarları.



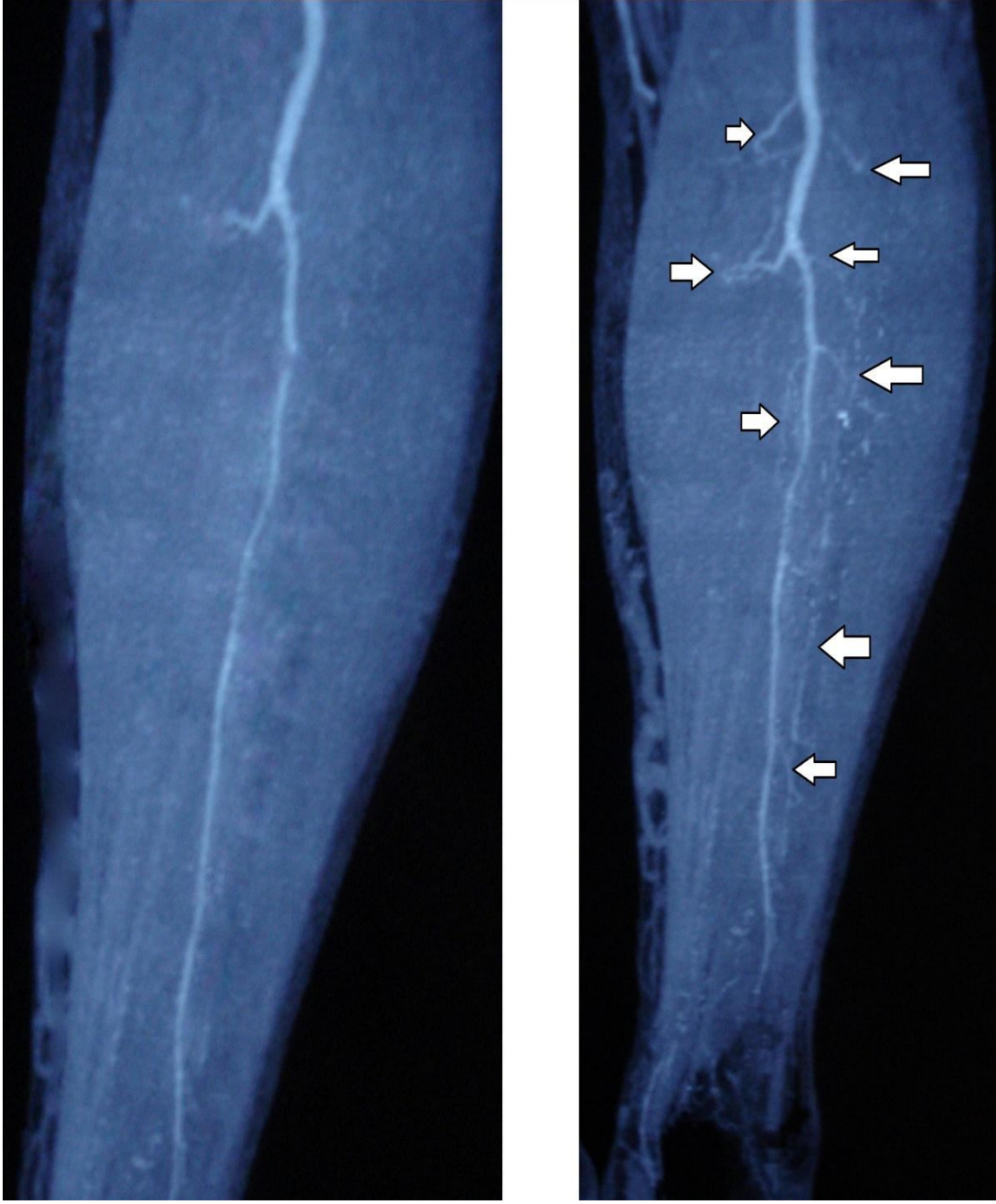
Grafik 4.15. İmplantasyon öncesi dönem ve implantasyon sonrası 1. ay, 3. ay ve 6. ay takiplerinde elde edilen ağrısız yürüme mesafesi değerleri ortalaması.



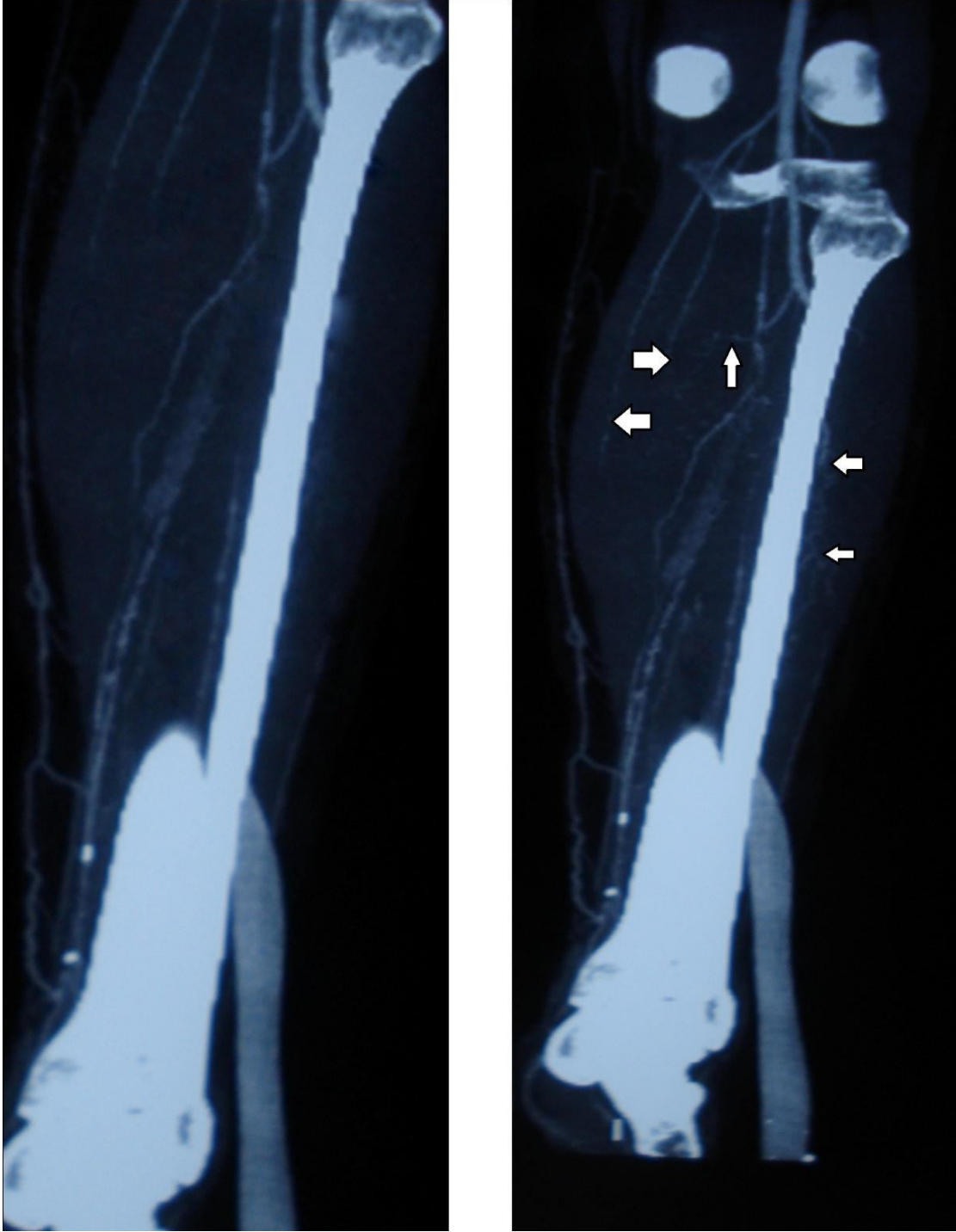
Şekil 4.1. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.



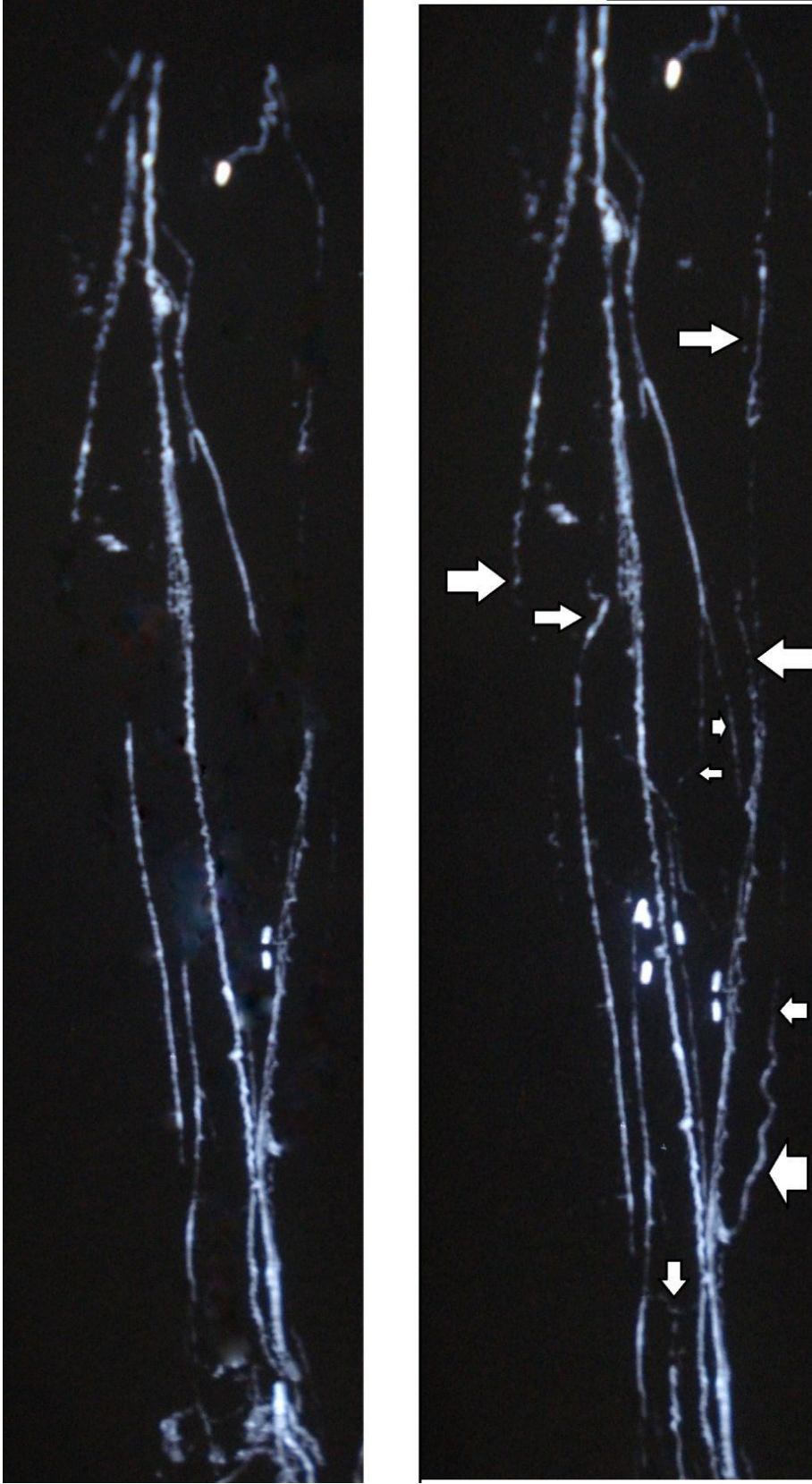
Şekil 4.2. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.



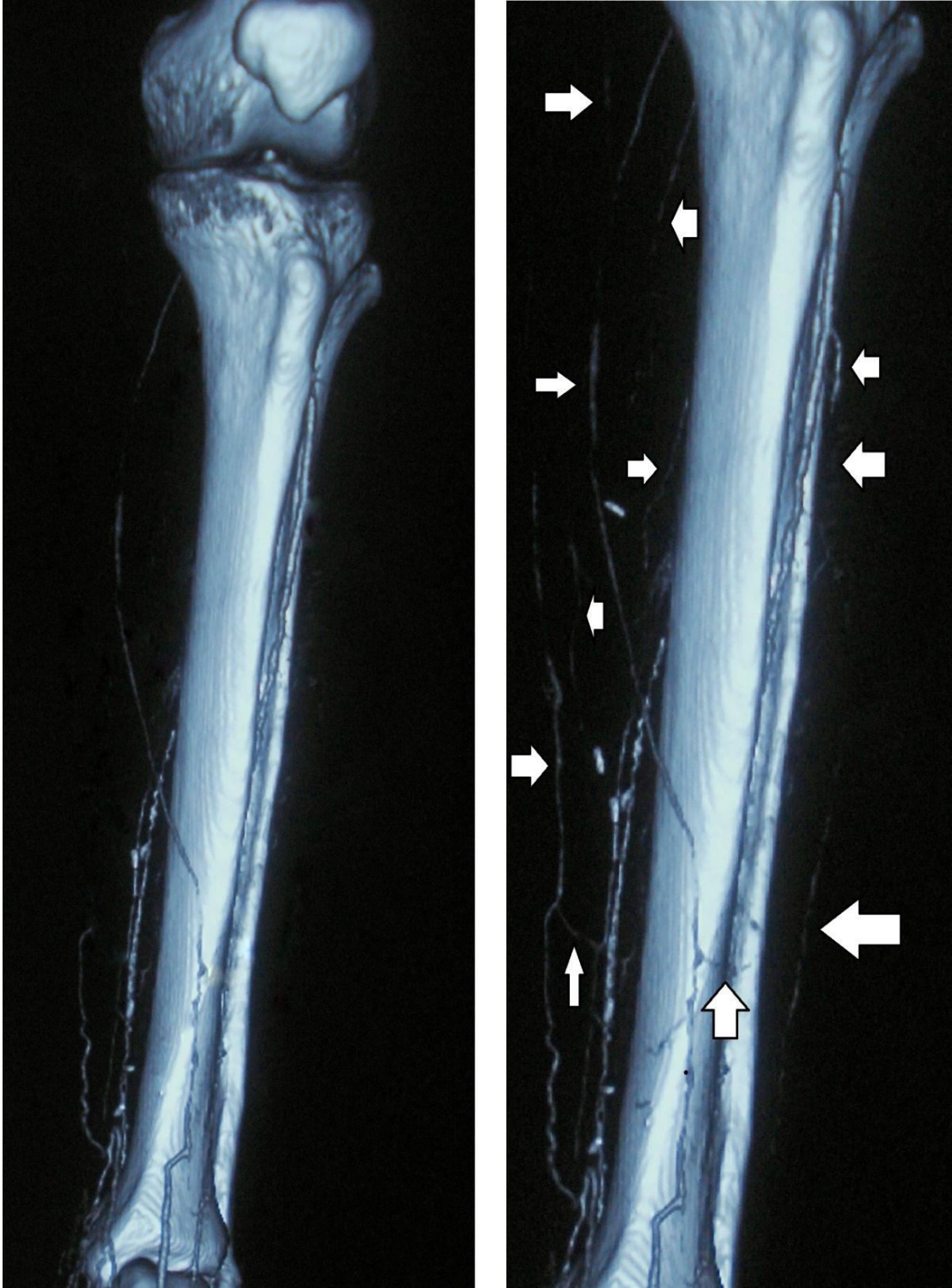
Şekil 4.3. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.



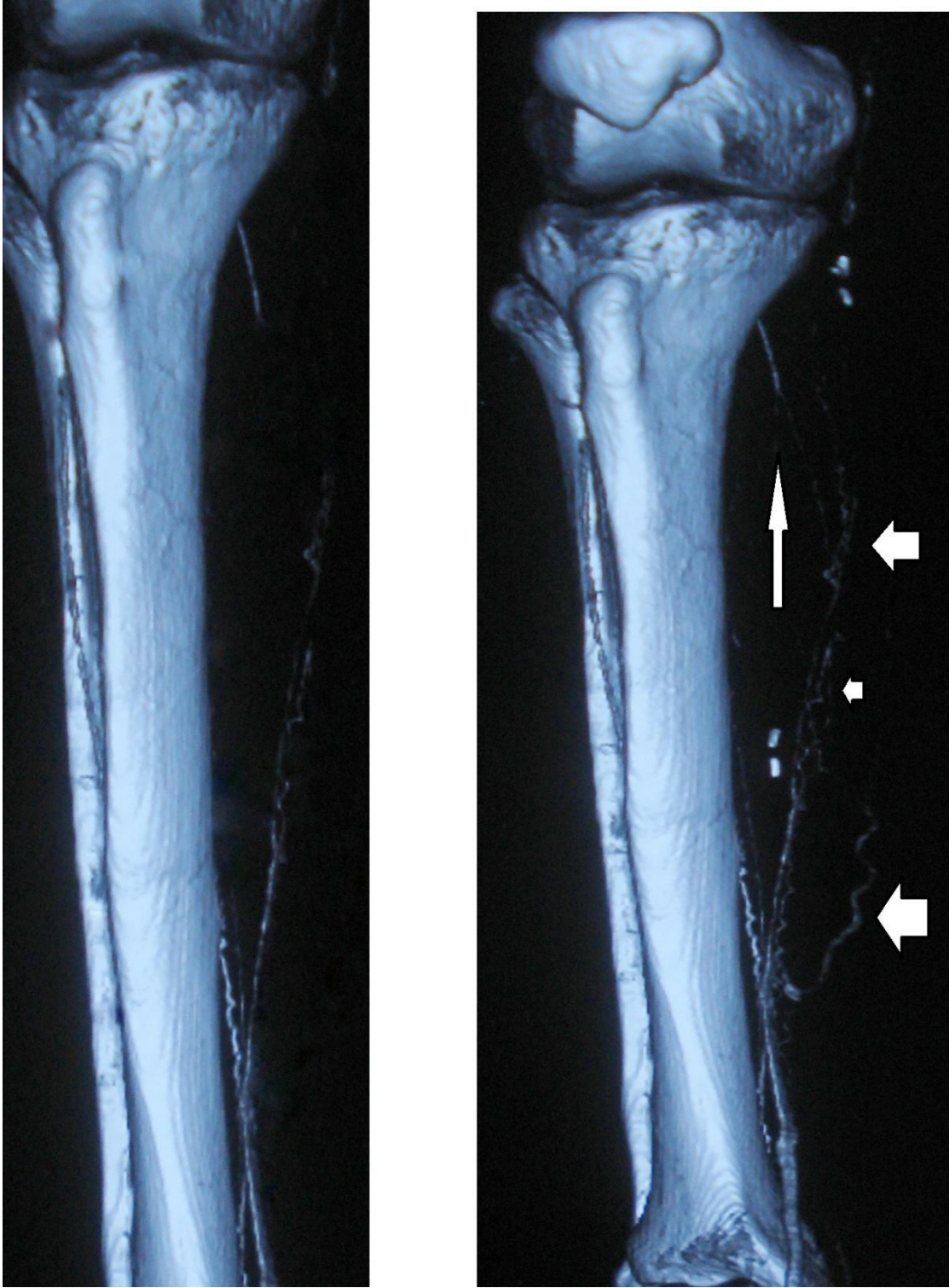
Şekil 4.4. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.



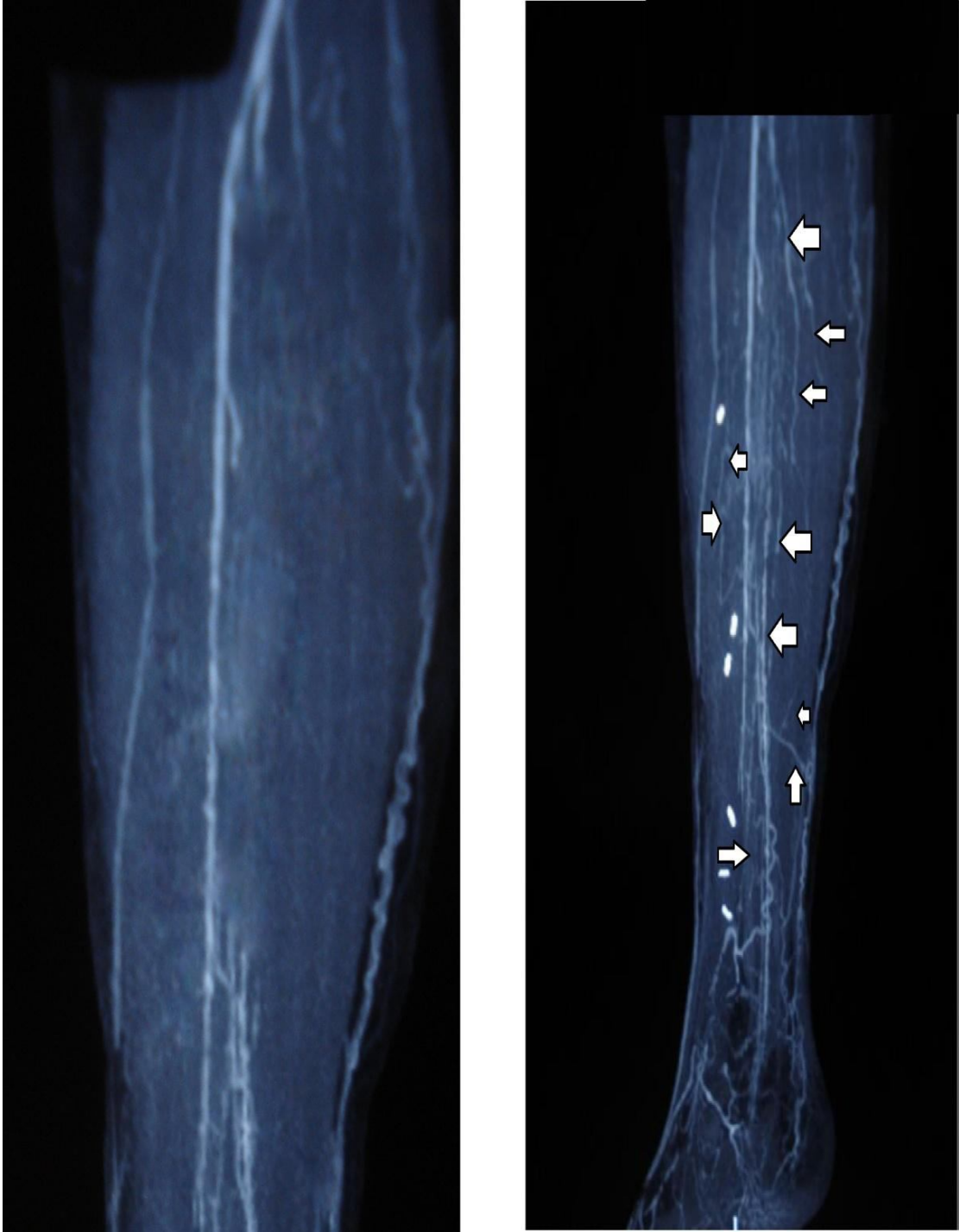
Şekil 4.5. Hastalara ait anjiografi görüntüleri



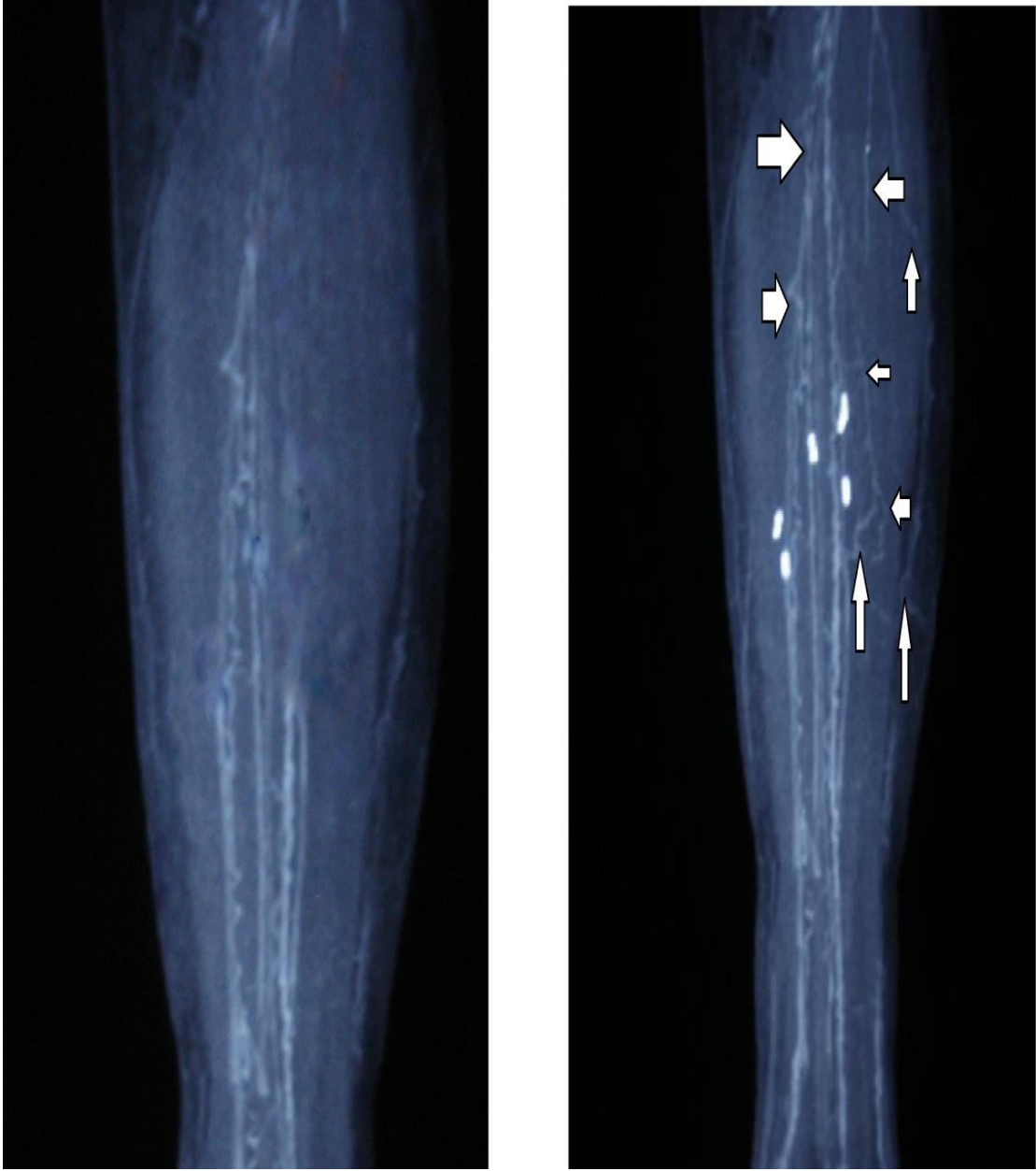
Şekil 4.6. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.



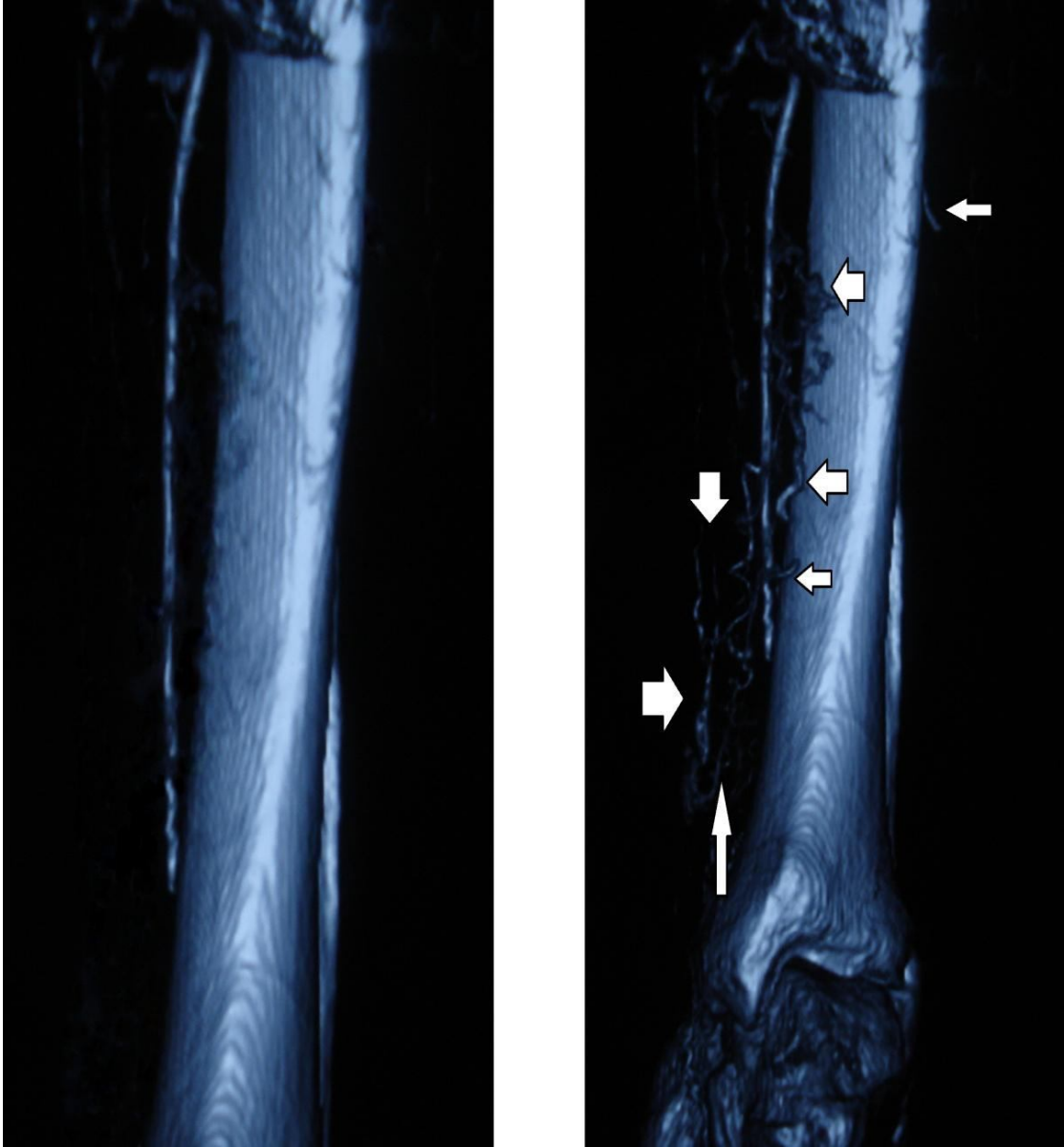
Şekil 4.7. Hastalara ait anjiyografi görüntüleri.



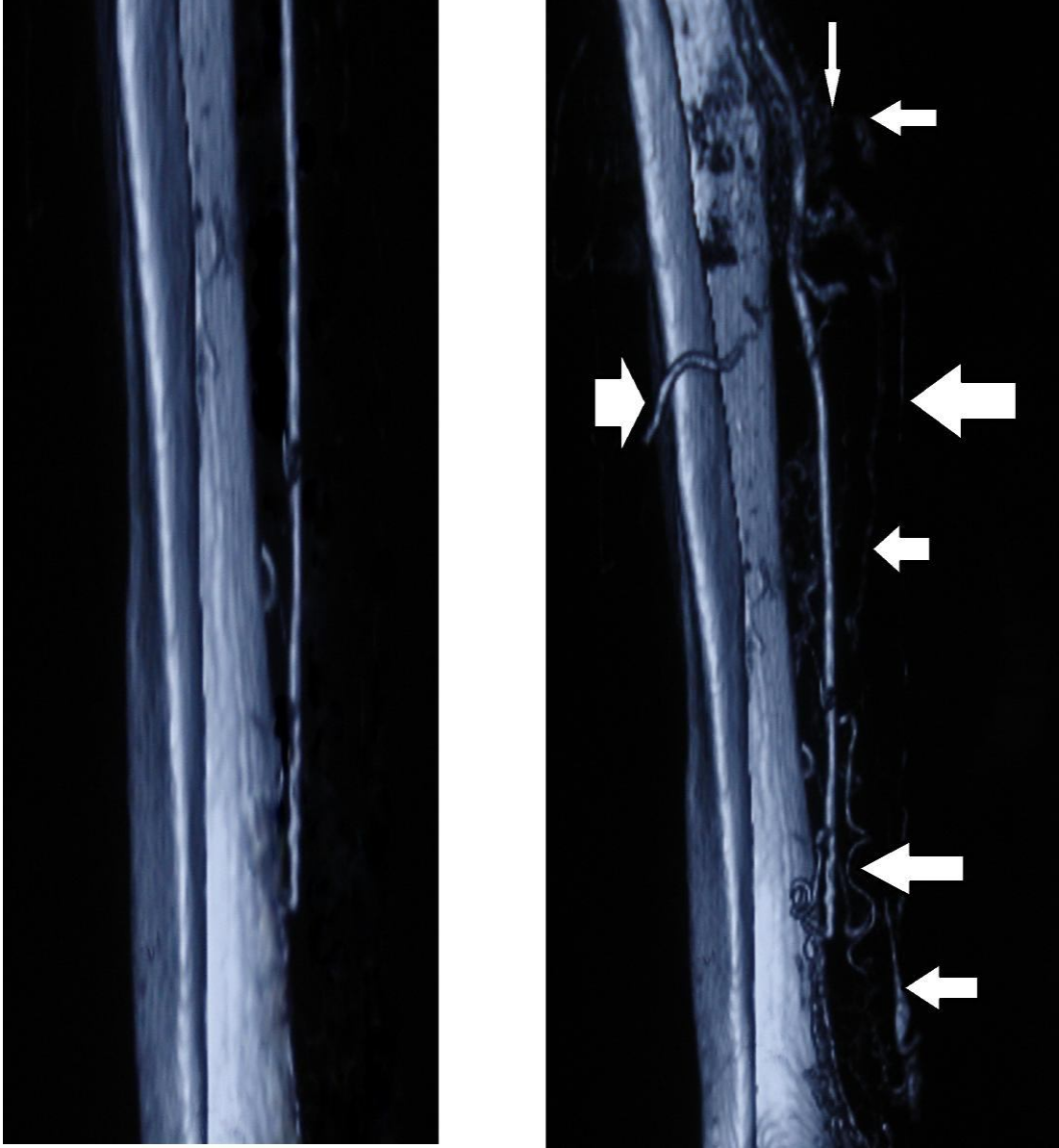
Şekil 4.8. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.



Şekil 4.9. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.



Şekil 4.10. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.



Şekil 4.11. Hastalara ait anjiografi görüntüleri.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

ABMMNC implantasyonu, güvenilirlik ve başarı durumunu insanlar üzerinde yapılan deneylerden daha önce hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda ispatlamıştır. Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmaların çok büyük bir bölümünde tavşanlar ve ratlar kullanılmıştır. Bu çalışmalarda söz konusu yöntemin bozulmuş kan akımını yeniden sağlayarak iskemik durumdaki ekstremitayı tekrar kanlandırabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmaların oldukça büyük bir bölümünde dolaşımdaki endotelial progenitör hücrelerinin iskemiye karşı verdiği yanıt sayesinde neovaskülarizasyon ortaya çıkmıştır (123,124). Dolaşımdaki bu hücreler kapillerlerin içerisinde ve iskemik doku içerisindeki arterlerde bulunmaktadır (124,125). Bu hücreleri parakrin etkileşim ve haberleşme yolunu kullanarak anjiyogenik büyüme faktörleri ve sitokinleri de salgılayabilmektedir (126). Bu terapötik yaklaşım üzerine yapılan ex-vivo çalışmalarda, alt ekstremita iskemisi olan atimik farelere insan endotelial progenitör hücreleri transplante edilmiş ve bunun sonucunda kan akımında düzelme ile beraber, kollateral yoğunluğunda artma ve yaklaşık olarak %60 oranında ekstremita korunumu sağlanmıştır. Bu ekstremita korunum oranı endotelial progenitör hücre transplantasyonu yapılmayan farelerde ise sadece %7 oranında kalmıştır. Tablo 5.1'de dünyanın çeşitli yerlerinde kök hücreler kullanılarak anjiyogenez sağlamaya yönelik yapılan çalışmalar ve sonuçları gösterilmiştir.

Bazı çalışmalarda heterojen hücre kaynakları ve preparatları kullanılmış olmasına karşın bu çalışmaların büyük bir bölümünde kemik iliğinden elde edilen hücreler ve saflaştırılmış fraksiyonel preparatları kullanılmıştır. Preklinik çalışmalardan elde edilen yüz güldürücü ve cesaretlendirici sonuçlar küçük klinik denemelerin büyük bir hızla başlamasına ve tıkaçıcı periferik arter hastalıklarında kemik iliğinden elde edilen mononükleer kök hücreleri ekstremita iskemisine neden olan tıkaçıcı periferik arter hastalıklarının tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılabilmesini sağlamıştır.

5.1. Otolog Hücre Tedavisinin Klinik Sonuçları

TACT (Therapeutic Angiogenesis using Cell Transplantation) çalışması ekstremite iskemisinde kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücrelerin tedavi etme amacı ile kullanımını yayınlayan ilk çalışmadır (127). TACT çalışması iki bölümden oluşmaktadır, çalışmanın birinci bölümü açık pilot çalışma, ikinci bölümü de randomize kontrollü çalışma fazlarını içermektedir.

Pilot çalışmada kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre transplantasyonu yapılacak olan hastalar kritik bacak iskemisi ve buna bağlı olarak istirahat ağrısı bulunan, periferik arter hastalığından kaynaklanan iyileşmeyen cilt ülserleri olan ve cerrahi veya cerrahi olmayan yollar ile revaskülarizasyon şansı olmayan hastalar olarak tanımlanmış ve çalışmaya dahil edilecek olan grup buna göre seçilmiştir. Pilot çalışma safhasında unilateral bacak iskemisi olan 25 hastalık bir grup oluşturularak ve kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücreler hastaların iskemik olan bacağına (ABPI<0.6) gastrokinemius kasının 40 ayrı noktasına ve her bir enjeksiyon alanına $1.6 \pm 0.6 \times 10^9$ hücre gidecek şekilde enjekte edilmiştir. Kontrol grubu olarak iskemik olmayan karşı bacakta da aynı prosedüre uygun bir şekilde tuz solüsyonu enjeksiyonu yapılmıştır. İşlem uygulandıktan 24 hafta sonra yapılan gözlemlerde hastaların ABPI değerinin, transkutanöz parsiyel oksijen basıncının (TcPO₂) ve ağrısız yürüme mesafesinin arttığı ve bununla beraber Visual Analog Skala ile değerlendirilen ağrı düzeyinin ise azaldığı kaydedilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümü olan randomize kontrollü deneylerde ise bilateral bacak iskemisi olan 22 hasta üzerinde otolog kemik iliğinden elde edilmiş mononükleer kök hücreler (ABMMNC) ile periferik kandan elde edilmiş mononükleer hücrelerin (PBMNC) karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu amaçla hastaların iskemik olan iki alt ekstremitesinden bir tanesine ABMMNC (Aktif Tedavi) uygulanırken diğerine PBMNC uygulaması yapılmıştır. Tedaviden 4 hafta sonra yapılan gözlemlerde ABMMNC implantasyonu yapılan 20 ekstremiteden 13 tanesinde ABPI ve TcPO₂ değerlerinde artış izlenmiş, ayrıca ABMMNC implantasyonu yapılan 20 ekstremiteden 16 tanesinde iskemik istirahat ağrısında azalma ve ağrısız yürüme mesafesinde de artma görülmüştür.

Bu sonuçlara göre PBMNC enjeksiyonu yapılan ekstremitelerdeki sonuç parametreleri ABMMNC enjeksiyonu yapılanlara göre daha başarısız olarak izlenmiş

ve bu durum PBMNC'lerin anjiogenez ve kollateralizasyonu sağlamada yetersiz olduğu kanısına ulaşılmamasına neden olmuştur. TACT çalışmasının yayıncıları, kemik iliğinden elde edilen hücre preparatlarının, periferik kandan elde edilen hücre preparatlarına göre yaklaşık 500 kat daha fazla CD34⁺ hematopoetik hücre içerdiği belirtilmiştir. Ayrıca kemik iliğinden elde edilen hücre preparatlarının, periferik kandan elde edilen hücre preparatlarına göre daha fazla immatür hücre içermesi de önemli bir diğer farklılıktır.

TACT çalışmasının ardından farklı ülkelerde tıkaçıcı periferik arter hastalıklarının sebep olduğu iskemik durumlarda kemik iliğinden elde edilmiş kök hücre preparatları kullanılarak yapılan çalışmalara ait sonuçlar yayınlanmıştır.. Mononükleer kök hücrelerin kullanılması üzerine oldukça fazla sayıda klinik çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların özetleri Tablo 5.2'de sunulmuştur. İnsanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalar devam ederken eş zamanlı olarak hayvan modelleri üzerinde de farklı hücre tiplerinin kullanılması ve farklı izolasyon yöntemleri denenmiştir. Ayrıca dünyanın farklı yerlerinde hastalığın Rutherford, Fontaine gibi farklı sınıflandırma yöntemlerine göre farklı evreleri üzerine bu tedavi yönteminin denenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Kemik iliğinden elde edilen hücre preparatları ile yapılan çalışmalarda perfüzyon parametreleri olarak ABPI ve TcPO₂ ölçümü sonuçları, klinik çıktı verileri olarak da yara iyileşmesi ve yürüme mesafesi gibi sonuç verileri dikkate alınmaktadır. Kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre implantasyonu ile ilgili çalışmalarda bu sonuç parametreleri farklı şekillerde ele alınarak işleme tabi tutulmuştur ancak bu çalışmaların arasında en büyük ortak nokta neredeyse tüm çalışmalarda bu parametlerin tamamına yakınının olumlu yani pozitif gelişmeler göstermesidir. Otolog hücre tedavisi ile ilgili olarak yayınlanan raporların sonuçlarından oluşan bilgi havuzuna göz atıldığında bu değerlerdeki pozitif yada başka bir söylem ile olumlu değişmelerin değerleri görülebilir. Buna göre kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre implantasyonu sonrasında ABPI değerlerinde 0.1 ila 0.2 puan, TcPO₂ değerlerinde de 10-20 mmHg arasında artış görülmektedir. Ayrıca yürüme mesafesi ölçümü başlangıç değerleri yani hastaya kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre implantasyonu uygulanmadan önceki ölçümlerde elde edilen sonuçlar baz alındığında ortalama 100-200 metre arasında artış göstermektedir.

İskemik durumlarda kemik iliğinden veya periferik kandan elde edilen mononükleer kök hücrelerin tedavi edici amaçla kullanılmasına dair elde edilen sonuçlar oldukça güzel olmasına karşın tedavinin metodolojisi ile ilgili halen tartışmalı olan noktalar bulunmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklarda hücre tedavisinin etki mekanizmasında, teorik olarak dolaşımdaki endotelial progenitör hücrelerin hasarlanan damar endoteli ile etkileşimi olduğu düşünülmektedir. Buna alternatif olarak hemanjioblastlar ve endotelial progenitör hücreler arasındaki etkileşiminde de novo damar formasyonunda etkin rol oynadığı hipotezi mekanizmalar arasındadır.

Endotelial progenitör hücrelerin ilk olarak ortaya çıkartılması 1997 yılında Asahara(140) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu dönemin ardından endotelial progenitör hücreleri ile ilgili yaklaşık olarak yaklaşık 800 adet bilimsel makale yayınlanmış olmasına karşın halen bulunması çok zor olan bu hücreleri net olarak açıklayacak bir tanım yapılamamıştır. Buna bağlı olarak yetişkin bir insanda doğru damar formasyonunu sağlayacak olan anjiogenezin ne şekilde ortaya çıktığına dair de ikna edici bir açıklama bulunmamaktadır. Tüm tanımlar varsayımlar ve hipotezler üzerinden yürütülmektedir ve tartışmalı bir şekilde endotelial progenitör hücrelerin periferik vasküler tıkanıklıklarda anjiogenez ne şekilde sağladığı sorusuna verilen cevaplar da şüphelidir. Bunlara karşın endotelial progenitör hücreler kullanılarak yapılan endotel tamiri ve anjiogenez temelli tedavilerin üzerinde yapılacak klinik ve preklinik çalışmalar ile daha da geliştirilerek rutin tedavi yöntemleri arasında kullanılabilmesi mümkündür.

Arteriogenez olayında tamamı monositik fenotipte olan oldukça fazla kemik iliği orijinli hücre rol oynamaktadır. Bu hücreler henüz olgunlaşmamış kollaterallerden perivasküler aralığa migrate olup salgıladıkları sitokinler ve anjiogenik büyüme faktörleri ile kollateral arter gelişimi üzerinde indükleyici etki yaparlar. Bu şartlar altında periferik arter hastalıklarında kemik iliğinden elde edilen monositik hücrelerin ve periferik kandan elde edilen mononükleer hücrelerin kombine kullanımı, subfraksiyonel hücre preparatlarının kullanımlarına göre çok daha yararlı olacaktır. Kemik iliğinden elde edilen monositik hücreler sayesinde aktive olan, periferik kanda bulunan mononükleer kök hücreler, anjiogenez (arteriogenez) sağlamakta sadece PBMNC kullanımına göre daha başarılı olmaktadır.

Periferik arter hastalıklarında kullanılan uygulama yöntemlerinin çok büyük bir bölümü kemik iliğinden elde edilen olog mononükleer hücreler veya periferik

kandan elde edilen monositik hücreler kullanılarak yapılmaktadır. Hayvan modelleri üzerinde olası donör havuzundaki başka bir bireyden alınan plasental hücre konsantrasyonları ile faz I çalışması olarak yapılan terapötik yaklaşımların insan denekler üzerinde kullanımına dair yayınlanmış bir rapor bulunmamaktadır. Otolog veya otojen olarak adlandırılan ve kullanıma müsait şekilde bulunan alternatif hücre kaynakları arasında dental pulpa, adipöz doku, endometrial ve plasental hücreler ve umbilikal kord hücreleri bulunmaktadır. Burada belirtilen hücrelerin de kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer kök hücreler veya periferik kandan elde edilen mononükleer kök hücreler gibi klinik çalışmalarda kullanımlarına dair sonuçları içeren raporlar beklenmektedir.

Hücre sel tedavinin doğru ve efektif sonuçlar verebilmesi için doğru bir şekilde uygulanması gerekmektedir. Aspirasyon sonrası elde edilen kemik iliği materyalinin işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. İşlemden geçirilmemiş ham kemik iliği materyalinin anjiogenezi promote etmek üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Bazı durumlarda hücre sel izolasyon işleminin ayrı bir uzmanlık gerektirmesi ve izolasyon işlemi için kullanılan sistemlerin büyük ve kompleks olması yapılması planlanan çalışmalara engel olabilmektedir.

Kemik iliğinden elde edilen kök hücreler ile yapılan çalışmaların çok büyük bir bölümünde hastalardan 100 ila 800 ml arasında kemik iliği materyali aspire edilmekte ve bu kemik iliği materyali içerisindeki mononükleer kök hücreler saflaştırma işlemi ile ayrıştırılmaktadır. Kemik iliği işlenmesi sonucu elde edilen mononükleer kök hücre miktarının yaklaşık olarak 1.5×10^9 ila 10×10^9 arasında olması amaçlanmaktadır.

Periferik arter hastalıklarında terapötik olarak uygulanan mononükleer hücre enjeksiyonu üzerine yapılan bazı çalışmalarda enjekte edilen kök hücre miktarı 0.1×10^9 düzeyinin altında bazılarında ise 50×10^9 düzeyinin üzerinde olmasına karşın bu konsantrasyonlarda bile enjekte edilen mononükleer hücrelerin perfüzyon üzerinde pozitif etkileri olduğu görülmüştür.

Enjekte edilen kök hücre miktarlarına bakıldığında TACT²⁸⁷ çalışmasında ve bunun ardından Higashi'nin yapmış olduğu çalışmalarda³¹⁰ hastalara enjekte edilen otolog mononükleer hücre miktarı yaklaşık 1.6×10^9 olarak bildirilmiş fakat Durdu ve ekibinin(153) yapmış olduğu çalışmalarda bu miktarın yaklaşık olarak 50 katı hücre kullanılmıştır. Bu alanda çalışma yürüten pek çok grup enjekte edecekleri hücre miktarını TACT çalışması ile uygun seviyede yani 1.6×10^9 değerinde tutmaktadır.

Bununla birlikte enjekte edilen hücre miktarı ile ortaya çıkan klinik cevabın arasındaki net ilişkiyi gösteren bir çalışma sonucu henüz rapor edilmemiştir.

Enjekte edilen hücre sayılarının arasında bu kadar büyük farklılıklar olmasının bir diğer sebebi de hücre sayımlarında farklı metodlar kullanılmasıdır. Otomatize hücre sayaçları; sayım sırasında granülositler gibi non-monositik hücreleri de sayımda monosit olarak değerlendirebilmektedir.

Aspire edilen 100 ml kemik iliği materyalinde yaşla birlikte azalmakla beraber yaklaşık olarak 0.5×10^9 ila 3×10^9 mononükleer hücre bulunmaktadır. İzolasyon işlemi esnasında implantasyona elverişli mononükleer hücrelerin bir miktarı atılır ve son miktar olarak elimizde 100 ml izole edilmiş kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre preparatı içerisinde 0.3×10^9 ila 2×10^9 arasında mononükleer hücre yer alır. Her ne kadar direkt bir kanıt bulunmasa da indirekt kayıtlar enjekte edilen mononükleer hücre miktarının klinik sunumda etkili olduğunu göstermektedir. Enteresan bir şekilde hücre tedavisi uygulanan Tromboanjitiis Obliteransın hastalarından oluşturulan iki gruptan bir tanesine diğer gruba uygulanan hücre miktarının yarısı kadar miktarda ABMMNC uygulanmış ve birinci gruptaki (tam miktarda ABMMNC implantasyonu yapılan gruptaki) hastalarda, yara iyileşmesi, istirahat ağrısında azalma ve yürüme mesafesindeki artışın tam miktarda ABMMNC uygulanan hastalarda daha fazla olduğu görülmüştür. Bu duruma dair net bir açıklama olmamakla birlikte konu üzerinde daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Hastaya enjekte etmek üzere hazırlanan ve işleminden geçirilen kemik iliği materyali içerisinde yaklaşık olarak %0.6 ila %2.4 arasında değişen miktarlarda $CD34^+$ hücre bulunmaktadır. Ancak $CD34^-$ hücre preparasyonlarının da $CD34^+$ hücreler kadar anjiogenez üzerinde etkili olmasından dolayı bu konuda $CD34^+$ sayısı ile ortaya çıkan cevap arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Sonuç itibarı ile anjiogenezin sağlanabilmesi için $CD34^+$ hücrelerin ortamda bulunması olmazsa olmaz bir kriter değildir ancak $CD34^+$ hücreler konstantrasyon işleminin ardından elde ettiğimiz hücre preparatının kalitesinin değerlendirilebilmesi için kullanılabilen materyallerdir.

Anjiogenez için gerekli olan hücre sayısına ulaşılabilmesi için göreceli olarak oldukça fazla miktarda kemik iliğine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durumu sağlayabilmek adına büyüme faktörleri kullanılarak kemik iliğinde lokalize olan hücrelerin mobilize olarak periferel dolaşıma geçmelerini sağlayabilmek için G-CSF veya GM-CSF preparatları birkaç gün sürece hastaya kullanılabilir. Bu sürecin sonunda

prekürsörler ve kök hücreler kemik iliğinden periferik dolaşıma salınırlar daha sonra salınan bu hücreler lökoferez işlemi ile toplanıp ayrıştırılır. Ayrıca bu teknik hematolojik hastalıkların tedavisinde uzun zamandan beri kullanılmaktadır.

İn vitro olarak yapılan çalışmalarda G-CSF kullanımı, periferik kanda bulunan otolog mononükleer hücreleri mobilize ederek anjiogenik aktivite kazandırıldığı gösterilmiştir ancak bu aktivitenin kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücrelerin aktivitesi ile kıyaslandığında oldukça düşük seviyede kalmaktadır. Ayrıca anjiogenik süreç içerisinde salgılanması zorunlu olan bir diğer madde olan GM-CSF'nin de apoptotik aktiviteyi bloke etme özelliği oldukça önemlidir (175). Tüm bu durumlara ilave olarak GM-CSF'lerin anjiogenez sürecinde tek başına etkisi halen tartışmalıdır. Günümüz şartlarında GM-CSF primer olarak; kemik iliğinden progenitör hücrelerin ve monositik hücrelerin mobilizasyonunu sağlamak için kullanılmaktadır. Tüm bu bilgileri sağlamak amacı ile yapılan pek çok çalışmanın sonucunda dayanak olarak alınabilecek en önemli nokta PBMMNC'lerin anjiogenik aktivitesinin ABMMNC'lerin anjiogenik aktivitesinden kayda değer bir şekilde daha düşük olduğudur.

Her ne kadar aterosklerotik periferik arter hastalığı olan kişilerde, arteriogenezin endojen olarak indüklenmesine ve yeniden sağlanmasına metabolik olarak yüksek bir şekilde ihtiyaç duyulsa da, bu hastalarda kan akımının yeniden düzenlenmesi ve sağlanması yeteri kadar iyi bir şekilde gerçekleşmemektedir. Bu hastalarda kan akımının yanı sıra dolaşımdaki kemik iliği kaynaklı monositik hücreler ve bu hücrelerin fonksiyonları da bozulmuştur (166,167,168).

Statinler, anjiotensin reseptör blokörleri, vardenafil, puerarin, peroksizom proliferatör aktive edici reseptör- γ agonistleri (PPAR- γ agonistleri), östrojen, iloprost ve eritropoietin gibi pek çok ilaç veya endojen madde de endotelial progenitör hücrelerin proliferasyonunu indüklemektedir (169-172). Ayrıca hastalara tedavi öncesinde Nitrik Oksit sentez stimulatorleri verilmesi veya hastaların implantasyondan önce iskemik koşulda bırakılmaları da otolog hücre tedavisinin başarısını arttıran etmenlerden birkaç tanesidir (173,174). Mekanizma ve kontrolü tam olarak anlaşılamamakla birlikte ABMMNC (kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre) implantasyonu neovaskularizasyon ve arteriogenezin yanı sıra, yan tedavi olarak aterosklerotik rahatsızlıklar, diyabet, kronik iskemik kalp rahatsızlıkları gibi

durumlarda bozulmuş endotelial fonksiyonun regülasyonu yeniden düzenlenmesi ve tamirini de sağlayabilmektedir.

Periferik arter hastalıkları ile ilgili olarak keşfedilen ve tanımlanan yeni tedavi stratejilerinden bir tanesi olan otolog mononükleer hücre implantasyonu tedavisi, özellikle major ekstremite amputasyonu riski taşıyan, cerrahi veya endovasküler revaskülarizasyon sağlanamayan veya bu girişimlerin yapılma şansı olmayan hastalarda oldukça büyük bir önem arz etmektedir. Yapılan pek çok çalışmada hücresele tedavi ile ABPI ve TcPO₂ artması ve Visual Analog Skala puanlarında azalma görülmüş ayrıca kemik iliği orjinli mononükleer hücrelerin veya periferik kandan elde edilen monositik hücrelerin kullanılabildiği yeni bir tedavi şeklinin ortaya çıkmakta olduğunu göstermiştir. Bununla beraber bu tedavi seçeneği üzerinde büyük randomize, plasebo kontrollü çalışmalar yapılmalı ve bu çalışmaların sonuçlarına göre tedavinin başarısını arttıracak gelişmeler ortaya çıkartılmalıdır.

Bu konu ile ilgili olarak yapılan deneylerin sayılarının artması ABMMNC (kemik iliğinden elde edilen otolog mononükleer hücre) ve yakın zamanda PBMNC (Periferik kandan elde edilen mononükleer hücre) preparatlarının rutin klinik kullanımda da görülebileceğini işaret etmektedir.

Hücre tedavisi ile ilgili olarak şu anda çözümsüz bir şekilde kalan, optimal hücre tipi, izolasyon metodu, hücre miktarı, koloni stimule edici faktörlerin kullanımı ve rolü gibi konuların çözümü için çalışmalar devam etmekte ve otolog mononükleer hücre tedavisinin daha iyi yerlere gelmesi sağlanmaya çalışılmaktadır.

Bizler yapmış olduğumuz çalışmada sayımız oldukça az olsada hastaların ağrısız yürüme mesafesi ve ABPI değerlerini arttırarak, Visual Analog Skala skorunu azaltarak ve anjiografi sonuçlarında kollateralizasyon artışı sağlayarak hastaların yaşam kalitesinde artış olduğunu gözlemledik. Yapmış olduğumuz hücre implantasyonu sonrasında hastaların hiçbirinde herhangi bir komplikasyon gözlenmedi. Sonuç olarak çalışmamızın amacı olan kritik bacak iskemili Tromboanjitis Obliteranslı hastalarda otolog kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücre implantasyonunun etkin ve güvenilir bir tedavi yöntemi olmaya aday gösterilebileceğini gözlemledik.

Yukarıda verilen bilgiler ışığında Buerger hastalığında otolog kök hücre tedavisi modern tedavi yöntemlerinden bir tanesi olmaya aday gösterilmekle birlikte bu yöntem ve üzerinde pek çok çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar ile beraber

Buerger hastalığında otolog mononükleer hücrelerin kullanımının yararını arttırabilmek için halen pek çok çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Tablo 5.1. Alt ekstremitte iskemisinde hücre tedavisi uygulanması konusunda yapılmış olan hayvan modelleri ile yapılan çalışmalara genel bir bakış. Alt ekstremitte iskemisi oluşturabilmek için deney hayvanlarında common femoral artere tek taraflı olarak ligasyon veya koagülasyon işlemleri uygulanmaktadır.

1997 Asahara (128)	hEPC	Fare	Kan Akımında Düzeltme Kapiller yoğunlukta artma
2002 Iba (129)	PBMNC, PMN	Rat	Kollateral damar oluşumunda artış
2004 Ziegelhoeffer(130)	BMC	Fare	Kollateral büyüme, Perivasküler alanda hücre toplanması
2004 Kinnaird (131)	MSC	Fare	Kollateral akımda artış, bacak fonksiyonlarında düzeltme, kas atrofisi oranında azalma
2004 Kinnaird (132)	MSC	Fare	Perivasküler alanda hücre toplanması, b-FGF ve VEGF seviyelerinde artış
2004 Niagara (133)	İskelet kası myoblastları	Tavşan	Neovaskülarizasyonda artış
2005 Napoli (134)	BMC	Fare	Kan akımında ve kapiller yoğunlukta artış
2005 Takagi (135)	BMC	Rat	Neovaskülarizasyonda artış
2005 Iwase (136)	MSC, MNC	Rat	Kan perfüzyonunda artış
2005 Nakagami (137)	ADSC	Fare	Anjiogenik skorda artış
2005 Yoon (138)	EPC, OEC	Fare	Neovaskülarizasyonda artış
2006 Aicher (139)	EPC	Rat	EPCLerin yerleşmesi ve toplanması
2006 Awad (140)	EPC	Fare	İyileşme ve vasküler büyüme
2006 Kobayashi (141)	BMC	Tavşan	Anjiografik skorda, kapiller yoğunlukta, TcPO ₂ düzeyinde artış ve cilt ülserlerinde azalma
2006 Li (142)	PBMNC	Fare	Kapiller yoğunluk artışı, ekstremitte kaybında azalma ve perivasküler alanda hücre toplanması
2006 Kim (143)	MSC	Fare	Alt ekstremitelerde (arka bacaklarda) güçlenme
2006 Moon (144)	hADSC	Fare	Kas hasarında ve vasküler yoğunlukta artış
2006 Sica (145)	BMC	Fare	Kan akımı, kapiller yoğunluk ve intersitisyel fibrosiste artış
2007 Jeon(146)	BMC	Fare	Mikrovasküler yoğunlukta, b-FGF ve VEGF seviyelerinde artış
2008 Zhang (147)	BMC	Fare	Kan akımında kapiller yoğunlukta ve laser doppler akımında artış

hEPCs, human endothelial progenitor cells; PBMNC, mobilised peripheral blood mononuclear cells; PMNs, polymorphonuclear leukocytes; BMCs, bone marrow cells; EPCs, endothelial progenitor cells; MSCs, mesenchymal stem-cell like cells; MNCs, mononuclear cells; ADSCs, adipose tissue-derived cells; hADSCs, human adipose tissue-derived cells; OECs, outgrowth endothelial cells;281

Tablo 5.2. Kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücreler ile yapılan çalışmalar.

2002 Tateishi-Yuyama (127)	1b	45, PAH, DM	↑	↑	↓	↓	+
2002 Esato (148)	4	8, PAH, TAO	↑	--	↓	↓	+
2004 Saigawa (149)	4	8, PAH, DM	↑	↑	↓	↓	+
2004 Higashi (150)	4	8, PAH	↑	↑	↓	↓	+
2004 Miyamoto (151)	4	12, PAH, CLI	↑	--	↓	--	+
2005 Nizankowski (152)	4	10, TAO, CLI	↑	↑	↓	↓	+
2006 Durdu (153)	1b	28, TAO	↑	↑	↓	↓	+
2006 Bartsch (122)	4	10, PAH, CLI	↑	↑	--	--	+
2006 Miyamoto (154)	4	8, TAO, CLI	--	--	↓	--	+
2007 Kajiiguchi (155)	4	7, CLI, TAO	→	↑	↓	?	+/-
2007 Huang (156)	2	74, PAH, DM	↑	↑	↓	--	+
2007 Herandez (157)	4	12, PAH, DM	↑	↑	↓	↓	+
2008 Gu (158)	4	16, PAH, CLI	↑	↑	↓	↓	+
2008 Chochola (159)	4	28, CLI, PAH	↑	↑	↓	↓	+
2008 Wester (160)	--	8, CLI	--	--	↓	↓	+
2008 Van Tongeren (161)	4	27, PAH	↑	↑	↓	?	+
2008 De Vriese (162)	4	16, PAD	→	↑	↓	?	+/-
2009 Amann (163)	4	51, CLI	↑	↑	↓	↓	+
2009 Prohazka (164)	4	37, CLI, DM	↑	↑	↓	--	+

6. ÖZET

PERİFERİK VASKÜLER HASTALIKLARDA OTOLOG KEMİK İLİĞİNDEN ELDE EDİLEN MONONÜKLEER KÖK HÜCRE DENEYİMLERİMİZ

Trombonjitis obliterans veya Buerger hastalığı sebebi tam olarak bilinmeyen ve genelde gangren ve doku kaybı ile sonuçlanan, non-aterosklerotik, episodik, keskin segmentasyonlar gösteren, inflamatuvar, tıkaçıcı-trombotik, non-destrüktif bir hastalıktır. Buerger hastalığı genelde alt ekstremitelerde, daha az yoğun olarak üst ekstremitelerde ve çok nadir olmak üzere de serebrovasküler bölgedeki distal segmentte nörovasküler demet içerisindeki damarları, sinirleri etkilemektedir. Hastalık ortaya çıktığı ekstremitenin distalinde görülmeye başlar ve proksimale doğru ilerleme gösterir.

Bizim çalışmamızın amacı kritik bacak iskemisi olan Tromboanjitis Obliteranslı hastalarda otolog kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücre implantasyonunun etkinlik ve güvenilirliğini incelemektir. Bu amaca yönelik parametreler hastalara kemik iliğinden elde edilmiş otolog mononükleer kök hücre implantasyonu yapılmasından bir, üç ve altı ay sonra gerçekleştirilen takipler sonucunda toplandı. Hastalara yapılan ilk takip implantasyon işleminden 4 hafta sonra gerçekleştirildi. Elde edilen ve bilgisayara girişi tamamlanan verilerin istatistiksel analizler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı tarafından SPSS programı versiyon 18.0 ile yapıldı.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalına Mayıs 2006 ile Haziran 2011 tarihleri arasında başvuran ve Rutherford Sınıflandırmasına göre Class II ve III grubunda yer alan 11 hasta çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastalara %12 eğim açısı ile 2 km/saat hızda Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi testi, Visual Analog Skala testi, ABPI ölçümü ve DSA veya BT anjiyografi tetkikleri yapıldı.

İmplantasyondan sonra 6. ayda gerçekleştirilen Treadmill ile ağrısız yürüme mesafesi testinin sonuçlarına göre ortalama ağrısız yürüme mesafesi $310 \pm 172,54$ metre olarak belirlendi ve implantasyon öncesi yapılan ölçümlerin ortalaması ile arasında $272,27 \pm 164,96$ metre fark görüldü ve bu fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$).

İmplantasyon sonrası 6. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuçları ortalaması $6,25\pm 1,50$ olarak hesaplandı. İmplantasyon sonrasında 6. ayda yapılan Visual Analog Skala testi sonuç puanları ortalaması ile implantasyon öncesinde gerçekleştirilen Visual Analog Skala testi sonuçları ortalamasının arasında $1,97\pm 0,86$ puanlık bir fark görüldü. Bu azalma Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görüldü ($p=0,003^*$, $p<0,008$).

İmplantasyondan önce doku perfüzyonunun gözlenmesi amacı ile yapılan takiplerde ölçülen ABPI ortalaması $0,507\pm 0,06$ iken, implantasyondan 6 ay sonra yapılan takip gözlemlerinde gerçekleştirilen ölçümlerden elde edilen ABPI değerleri ortalaması $0,66\pm 0,1$ olarak elde edilmiştir. İmplantasyon işlemi öncesindeki ABPI değerleri ile implantasyon işleminden 6 ay sonrasındaki ABPI değerleri arasındaki ortalama fark değeri $0,15\pm 0,07$ olarak bulunmuş ve bu fark Bonferroni düzeltmeli Wilcoxon işaretli sıra testinde anlamlı olarak görülmüştür ($p=0,003^*$, $p<0,016$).

İmplantasyondan 6 ay sonra tüm hastalara yeni kollateralizasyon oluşumunu gözlemek üzere yapılan anjiyografi tetkikinde 4 hastada oluşan kollateralizasyon +3 puan, 2 hastada gelişen kollateralizasyon +2 puan, 4 hastada gelişen kollateralizasyon +1 puan ve 1 hastada gelişen kollateralizasyon ise +0 puan olarak değerlendirildi.

Periferik arter hastalıklarında hücresel tedavi ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlara ilave olarak bizim yaptığımız çalışmada da hastalara uyguladığımız 6 aylık gözlemler sonucunda oldukça umut verici sonuçlar elde ettik. Bu duruma ilave olarak periferik arter hastalıklarında ABMMNC implantasyonunun etkinliğini değerlendirmek ve daha ileriye götürebilmek için daha fazla çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak kök hücre implantasyonunun gelecekte periferik vasküler rahatsızlıklarda önemli bir alternatif tedavi yöntemi olarak ele alınacağı görülebilmektedir.

Anahtar Sözcükler: Buerger Hastalığı, Tromboanjitis Obliterans, Kök Hücre, ABPI, Treadmill, Neovaskülarizasyon.

7. ABSTRACT

AUTOLOGOUS BONE MARROW DERIVATED MONONUCLEER STEM CELL İMPLANTATION EXPERIENCES IN PERIPHERAL VASCULAR DISEASE

Thromboangiitis obliterans (TAO), or Buerger's disease, is a non-atherosclerotic, episodic, sharply segmental, inflammatory, thrombotic-occlusive and non-destructive vascular disease of unknown origin that leads to gangrene and tissue loss. It initially involves the distal vessels and nerves within the neuro-vascular bundles of the legs (infrequently, the arms might be involved, and less commonly, the cerebral visceral vessels). The disease appears to start distally and then extends proximally.

The aim of our study investigated the efficacy and safety of autologous bone marrow-mononuclear cells (ABMMNC) implantation in patients with critical limb ischemia (CLI) due to thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). The parameters collected on 1, 3 and 6 months after implantation and used to evaluate the functional outcomes of the stem cell implantation. The first follow up was approximately 1 month after the implantation. The statistical analysis of the data was done by Biostatistics Division of Akdeniz University with SPSS software pack v.18.0.

11 patients with Rutherford Grade II-III thromboangiitis obliterans who were applied to the polyclinic of the Division of Cardiovascular Surgery of Akdeniz University were carried out stem cell implantation between May 2006 and June 2011. All patients underwent a standard vascular examination that included measurement of ankle-brachial pressure index (ABPI), measurement of the pain free walking distance with Treadmill protocol including the 12% gradient with 2 km/hour, Visual Analog Scale test and DSA or BT angiography tests.

The follow up performed after the 6 months the ABMMNC implantation, average pain free walking distance measured that $310 \pm 172,54$ meters and the difference between the result of average pain free walking distance on the Treadmill tests performed before the implantation was $272,27 \pm 164,96$ meters. This difference was seen significant on the Bonferroni correction Wilcoxon signed rank test ($p=0,003^*$, $p<0,08$).

The follow up performed after the 6 months the ABMMNC implantation, average Visual Analog Scala score measured that $6,25 \pm 1,50$ points and the difference between the result of average Visual Analog Scala score on the Visual Analog Scala tests performed to before the implantation was $1,97 \pm 0,86$ points. This difference was seen significant on the Bonferroni correction Wilcoxon signed rank test ($p=0,003^*$, $p<0,08$).

The Ankle-Brachial Blood Pressure measurement performed before the implantation of ABMMNC for observe the tissue perfusion and this measurement results averages was $0,507 \pm 0,06$. The follow up after the implantation ABPI measurement repeat up and result average was calculated $0,66 \pm 0,10$. The difference between before the implantation ABPI results and after the implantation APBI results was seen significant on the Bonferroni correction Wilcoxon signed rank test ($p=0,003^*$, $p<0,08$).

The follow up 6 months after the implantation, DSA angiography or BT angiography was performed all patient for observe the new vessel formation and collateralisation. According to angiographic results 4 to 11 (36,36%) patients shown +3 points collateralisation, 2 to 11 (18,18%) patients shown +2 points collateralisation, 4 to 11 (36,36%) patients shown +1 points collateralisation and 1 to 11 (36,36%) patients shown +0 points collateralisation.

In addition to the studies which about the cell therapy on the peripheral vascular disease, the 6 months result of our study is promising. Also more clinical studies are needed increase to safety and utility and evaluate the efficiency of the ABMMNC implantation.

It is seems that cell therapy will be a major therapeutic strategy in the threatment of the patients with peripheral vascular disease in the future.

Key Words: Buergers Disease, Thromboanjiitis Obliterans, Stem Cell, ABPI, Treadmill, Neovascularisation.

8. KAYNAKLAR

1. Joseph L Mills Sr. Buerger's Disease in the 21st century: diagnosis, clinical features and therapy. *Seminars in Vascular Surgery* 2003; 16(3): 179-89.
2. Fazeli B, Rezaee SA. A review on thromboangiitis obliterans pathophysiology: thrombosis and angiitis, which is to blame? *Vascular* 2011; 19: 141-153; doi:10.1258/vasc.2010.ra0045.
3. Olin JW, Shih A. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 18-24.
4. Puéchal X, Fiessinger JN. Thromboangiitis obliterans or Buerger's disease: challenges for the rheumatologist. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 192-9.
5. von Winiwarter F. Ueber eine eigenthümliche form von endarteritis und endophlebitis mit gangran des fusses. *Arch Klin Chir* 1879; 23: 202-26.
6. Buerger L. Thromboangiitis obliterans a study of the vascular lesions leading to presenil spontaneous gangrene. *Am J Med Sci* 1908; 136: 567-80.
7. Buerger L. *The circulatory disturbances of the extremities*. WB Saunders, Philadelphia 1924.
8. Olin JW. Thromboangiitis Obliterans. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6: 44-9.
9. Lie JT. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) revisited. *Pathol Annu* 1988; 23(Part): 257-91.
10. Lie JT. The Rise and fall and resurgence of thromboangiitis obliterans (Buerger's Disease). *Aotha Pathol Jpn* 1989; 39: 153-8.
11. Bozkurt AK, Besirli K, Köksal C, Şirin G, Yüceyar L, Tüzün H, Sayın AG. Surgical treatment of Buerger's disease. *Vascular* 2004; 12(3): 192-7.
12. Lie JT. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) in women. *Medicine (Baltimore)* 1987; 66: 65-72.
13. Cachovan M. Epidemiologie und geographisches Verteilungsmuster der Thromboangiitis obliterans. In: Heidrich H, ed. *Thromboangiitis Obliterans Morbus Winiwarter- Buerger*. Stuttgart, Germany: Grog Thieme 1988; 31-6.
14. Matsushita M, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y. Decrease in prevalence of Buerger's disease in Japan. *Surgery* 1998; 124: 498-502.
15. Wessler S. Thromboangiitis obliterans: fact or fancy. *Circulation* 1961; 23: 165-7.
16. Mc Kuisck. Buerger's Disease: A distinct clinical and pathologic entity. *JAMA* 1962; 18: 15.
17. Olin JW, Young JR, Graor RA. The changing clinical spectrum of thromboangiitis obliterans (Buerger's Disease). *Circulation* 1990; 82 (5Suppl): IV: 3-8.

18. Olin JW, Childs MB, Bartholomew JR. Anticardiolipin antibodies and homocysteine levels in patients with thromboangiitis obliterans. Presented at the American Collage of Rhomatology, Orlando, Fla, September 1997.
19. Pietraszek MH, Chaudhury NA, Koyano K. Enhanced platellet response to serotonin in Buerger's disease. *Thromb Res* 1990; 60: 241-6.
20. Leu HJ. Thromboangiitis obliterans Buerger: Patologisch-Anatomische Analyse von 53 fallen. *Schweiz Med Wschr* 1985; 115: 1080-6.
21. Shionoya S. Buerger Disease (Thromboangiitis Obliterans). In Rutherford RB (ed): vascular Surgery. Philadelphia, WB Saunders 1989; 207-17.
22. Shionoya S. Buerger's Disease: Pathology, Diagnosis and treatment. Nagoya, University of Press 1990; 261.
23. Ajayi AA, Mathur R, Halushka PV. Testosterone increases human platelet thromboxane A2 receptor density and aggregation responses. *Circulation* 1995; 91: 2742-7.
24. Al-Awadhi AM, AlFadhli SM, Mustafa NY, Sharma PN. Effects of cigarette smoking on hematological parameters and von Willebrand factor functional activity levels in asymptomatic male and female Arab smokers. *Med Princ Pract* 2008; 17: 149-53.
25. Cogo A, Bernardi E, Prandoni P. Acquired risk factors for deep-vein thrombosis in symptomatic outpatients. *Arch Intern Med* 1994; 154: 164-8.
26. Zervas J, Vayopoulos G, Konstantopoulos K. HLA antigens in Burger's disease. *Clin Rheumatol* 1991; 10: 434-6.
27. Aerbajinai W, Tsuchiya T, Kimura A, Yasukochi Y, Numano F. HLA class II DNA typing in Buerger's disease. *Int J Cardiol* 1996; 54(Suppl): 197-202.
28. Jaini R, Mandal S, Khazanchi RK, Mehra NK. Immunogenetic analysis of Buerger's disease in India. *Int J Cardiol* 1998; 66(Suppl 1): 283-5.
29. Papa M, Bass A, Adar R. Autoimmune mechanisms in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease): the role of tobacco antigen and the major histocompatibility complex. *Surgery* 1992; 111: 527-31.
30. Tiwari JL, Terasaki PI. HLA-DR and disease associations. *Prog Clin Biol Res* 1981; 58: 151-63
31. Mills JL, Taylor LT. Porter Buerger's disease in the modern era. *Am J Surg* 1987; 54: 123-9.
32. Corelli F. Buerger's disease: Cigarette smoker disease may always be cured by medical therapy alone: Uselessness of operative treatment *J Cardiovasc Surg* 1973; 14: 28-36.
33. Harkavy J. Tobacco sensitivities in thromboangiitis obliterans, migratory phlebitis and coronary artery disease *Bull NY Acad Med* 1933; 9: 318-22.
34. Westcott FN, Wright IS. Tobacco allergy and thromboangiitis obliterans. *J Allergy* 1938; 9: 555-64.
35. Marder VJ, Mellinghoff IK. Cocaine and Buerger's diseases there a pathogenetic association? *Arch Intern Med* 2000; 160: 2060-57.

36. Matsushita M, Shionoya S, Matsumoto T. Urinary cotinine measurement in patients with Buerger's disease effects of active and passive smoking on the disease process J Vasc Surg 1992; 14: 53–8.
37. Adar R, Papa MZ, Halpern Z. Cellular sensitivity to collagen in thromboangiitis obliterans. N Engl J Med 1938; 308: 1113–6
38. Eichhorn J, Sima D, Lindschau C, et al. Antiendothelial cell antibodies in thromboangiitis obliterans Am J Med Sci 1998; 315: 17–23.
39. Kobayashi M, Ito M, Nakagawa A et al. Immunohistochemical analysis of arterial wall cellular infiltration in Buerger's disease (endarteritis obliterans) J Vasc Surg 1999; 29: 451–8.
40. Olin JW, Shih A. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). Curr Opin Rheumatol 2006; 18: 18–24.
41. Puéchal X, Fiessinger JN. Thromboangiitis obliterans or Buerger's disease: challenges for the rheumatologist. Rheumatology (Oxford) 2007; 46: 192–9.
42. Li N. Platelet-lymphocyte cross-talk. J Leukoc Biol 2008; 83: 1069-78.
43. Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 1321–4.
44. Black PH. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. Brain Behav Immun 2002; 16: 622–53.
45. Tanaka K. Pathology and pathogenesis of Buerger's disease. Int J Cardiol 1998; 66(Suppl 1): 237–42.
46. Piazza G, Creager MA. Thromboangiitis obliterans. Circulation 2010; 121: 1858-61. Review.
47. Williams G. Recent views on Buerger's disease. J Clin Pathol 1969; 22: 573–8.
48. Sato T, Tsujino I, Ikeda D, Ieko M, Nishimura M. Trousseau's syndrome associated with tissue factor produced by pulmonary adenocarcinoma. Thorax 2006; 61: 1009–10.
49. Kobayashi M, Ito M, Nakagawa A, Nishikimi N, Nimura Y. Immunohistochemical analysis of arterial wall cellular infiltration in Buerger's disease (endarteritis obliterans). J Vasc Surg 1999; 29: 451–8.
50. Lee T, Seo JW, Sumpio BE, Kim SJ. Immunobiologic analysis of arterial tissue in Buerger's disease. Eur J Vasc Endovasc Surg 2003; 25: 451–7.
51. Elokda H, Abou-Gharbia M, Hennan JK. Tiplaxtinin, a novel, orally efficacious inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1: design, synthesis, and preclinical characterization. J Med Chem 2004; 47: 3491–4.
52. Nielubowicz J, Rosnowski A, Pruszynski B. Natural history of Buerger's disease. J Cardiovasc Surg 1980; 21: 529–40.
53. Mills JL. Buerger's Disease Current Status. Vasc Med Rev 1994; 5: 139–50.
54. Shionoya S. Diagnostic criteria of Buerger's disease. Int J Cardiol 1998; 66: 243–5.
55. Mills JL, Porter JM. Buerger's disease (thromboangiitis obliterans). Ann Vasc Surg 1991; 5: 570–2.
56. Shionoya S. Diagnostic criteria of Buerger's disease. Int J Cardiol 1998; 1; 66(1): 243-5.

57. Olin JW. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *N Engl J Med* 2000; 21; 343(12): 864-9.
58. Mills JL. Buerger's Disease Current Status. *Vasc Med Rev* 1994; 5: 139-50.
59. Mills JL, Taylor LT, Porter JM. Buerger's disease in the modern era. *Am J Surg* 1987; 54: 123-9.
60. Nielsen SL, Lassen NA. Measurement of digital pressure after local cooling.
61. Papa MZ, Rabi I, Adar R. A point scoring for the clinical diagnosis of Buerger's disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996; 11: 335-9.
62. Kumamoto M. Arteriography as a special diagnostic method of spontaneous gangrene Jitchii Katorinsho 1940; 17: 589-601.
63. Rivera R. Roentgenographic diagnosis of Buerger's disease *J Cardiovasc Surg* 1973; 14: 40-6.
64. McKusick VA, Haris WS, Ottesen OE. Buerger's disease. A distinct clinical and pathologic entity. *JAMA* 1962; 181: 93-100.
65. Mills JL, Porter JM. Buerger's disease (thromboangiitis obliterans). *Ann Vasc Surg* 1991; 5: 570-2.
66. Ohta T, Shionoya S. Fate of the ischemic limb Buerger's disease. *Br J Surg* 1988; 75: 259-62.
67. Olin JW, Young JR, Graor RA. The changing clinical spectrum of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease).
68. Mills JL, Taylor LM, Porter JM. Buerger's disease in the modern era. *Am J Surg* 1974; 61: 476-81
69. Corelli F. Buerger's disease: Cigarette smoker disease may always be cured by medical therapy alone -uselessness of operative treatment. *J Cardiovasc Surg* 1973; 14: 28-36.
70. Gifford RW, Hines EA. Complete clinical remission in thromboangiitis obliterans during abstinence from tobacco: Report of a case. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1951; 26: 241-5.
71. Müller-Bühl U, Wiesermann A, Oser B, Kirchberger I, Strecker EP. Correlation of hemodynamic and functional variables with the angiographic extent of peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med* 1999; 4: 247-51.
72. Gifford RW, Hines EA. Complete clinical remission in thromboangiitis obliterans during abstinence from tobacco: Report of a case. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1951; 26: 241-5.
73. Ouriel K, McDonnell AE, Mertz CE, Zarins CK. Critical evaluation of stress testing in the diagnosis of peripheral vascular disease. *Surgery* 1982; 91: 686-93.
74. Sasajima T, Kubo Y, Inaba M, Goh K, Azuma N. Role of infrainguinal bypass in Buerger's disease: an eighteen -year experience. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 13: 186-92.
75. Talwar S, Jain S, Porwal R, Laddha BL, Prasad P. Free versus pedicled omental grafts for limb salvage in Buerger's disease. *Aust N Z J Surg* 1998; 68: 38-40.
76. Shionoya S. Surgical treatment of Buerger disease. *J Cardiovasc Surg* 1980; 21: 77.
77. Imporata AM. Lumbar sympathectomy. Role in the treatment of occlusive arterial disease in lower extremities. *Surg Clin North Am* 1979; 59: 715.

78. Sayın A, Bozkurt AK, Tüzün H, Vural FS, Erdog G, and Özer M. Surgical treatment of Buerger's disease: experience with 216 patients. *Cardiovasc Surg* 1993; 4: 377– 80.
79. Swigris JJ, Olin JW, Mekhail NA. Implantable spinal cord stimulator to treat the ischemic manifestations of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *J Vasc Surg* 1999; 29(5): 928–35.
80. Yüksel Bozer A, İlhan Günay İ. Damar Hastalıkları Ve Cerrahisi. Hacettepe Üniversitesi Yayınları 1984; 169–81.
81. Olin JW, Young JR, Graor RA. The changing clinical spectrum of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Circulation* 1990; 82 (5 Suppl): IV 3–8.
82. Lau H, Cheng SWK. Buerger's disease in Hong Kong: a review of 89 cases. *Aust NZJ Surg* 1997; 67: 264–9.
83. Makita S, Nakamura M, Murakami H, Komoda K, Kawazoe K, Hiramori K. Impaired endothelium-dependent vasorelaxation in peripheral vasculature of patients with thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Circulation* 1996; 94: Suppl II: 211.
84. Olin JW, Lie JT. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). In Cooke JP, Frolich ED, (eds): *Current Management of Hypertension and Vascular Disease*. Philadelphia, BC Decker 1992; 265–71.
85. Kubota Y, Kichikawa K, Uchida H. Superselective urokinase infusion therapy for dorsalis pedis artery occlusion in Buerger' disease. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1997; 20; 380–2.
86. Hussein EA, El Dorri A. Intra-arterial streptokinase as adjuvant therapy for complicated Buerger's disease. Early trials. *Int Surg* 1993; 78: 54–8.
87. Carlsón LA, Eriksson I. Femoral -artery infusion of prostaglandin E1 in severe peripheral vascular disease. *Lancet* 1973; 1(795): 155–6.
88. Sethi GK, Bridgman AH, King L, Scott SM. Intravenous infusion of PGI1 in the management of limb ischaemia. *American J Surg* 1986; 52: 474–8.
89. Olsson AG, Nilsson E. The effect of i.v.prostacyclin on rest pain and healing of ischaemic ulcers in peripheral artery disease. *Prostaglandins in Medicine* 1981; 329–39.
90. Witt W, Baldus B, Müller B. Antithrombotic profile of iloprost in experimental models of arterial and venous thrombosis. In Gryglewski RJ, Stok G (eds). *Prostacyclin and its Stable Analogue Iloprost*. Springer Verlag, Berlin 1987; 81–90.
91. Müller B, Krast T, Stürzebecher S, Witt W, Schillinger E, Baldus B. Potential therapeutic mechanisms of stable prostacyclin (PGI2) - mimetics in severe peripheral vascular disease. *Acta Biomed Biochim* 1988; 47: 40–4.
92. Belch J. Raynaud's phenomenon. *Cardiovasc Res* 1997; 33(1): 25–30.
93. Dormandy J. Use of the prostacyclin analogue iloprost in the treatment of patients with critical limb ischaemia. *Therapie* 1991; 46(4): 319–22.
94. Lowell R, Gloviczki V. In vitro evaluation of endothelial and smooth muscle function of primary varicose veins. *J Vasc Surg* 1992; 16(5): 679–86.
95. Kelly LK, Porta NF, Goodman DM, Carroll CL, Steinborn RH. Inhaled prostacyclin for term infants with persistent pulmonary hypertension refractory to inhaled nitric oxide. *J Pediatr* 2002; 141: 830–2.

96. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Monor O, Razvi S, Symes JF. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998; 28(6): 964–73; discussion 73–5.
97. Erdine S. Ağrı Sendromları Ve Tedavisi, Gizben Yayınları 2003; 305–20.
98. Önal A. Algoloji, Nobel Tıp Kitabevleri 2004; 34–45.
99. Olin JW. Tromboanjitiis Obliterans (Buerger's Disease); *Vascular Surgery* (Rutherford) 2000; 350–64.
100. Mulroy MF. Regional anesthesia an illustrated procedural guide. Second edition 1996: 147–57.
101. Folkman, J and D'Amore, PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996; 87: 1153–5.
102. Hanahan, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48–50.
103. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996; 87: 1161–9.
104. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66–70.
105. Shalaby F, Rossant J, Tamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62–6.
106. Ferrara N, Carver Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439–42.
107. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gerstenstein M, Auerbach A et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 1994; 8: 1897–909.
108. Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, and Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* 1995; 14: 5884–91.
109. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70–4.
110. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN., et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171–80.
111. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55–61.

112. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, et al. Tie2 receptor ligands, Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2, modulate VEGF- induced postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1998; 83: 233–40.
113. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by Angiopoietins and VEGF. *Science* 1999; 284: 1994–8.
114. Sato A, Iwama A, and its ligands, Angiopoietins, in human hematopoietic progenitor Takakura, N., Nishio, H., Yancopoulos, G.D., and Suda, T. (1998). Characterization of TEK receptor tyrosine kinase and its ligands, Angiopoietins, in human hematopoietic progenitor cells. *Int Immunol* 1998; 10: 1217–27.
115. Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD and Isner JM. Chemotactic properties of Angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 1998; 273: 18514–21.
116. Cumano A, Dieterlen-Lie`vre F and Godin I. Lymphoid tranpotential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell* 1986; 86: 907–16.
117. Medvinsky A and Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 1996; 86: 897–906.
118. Yoder MC, Hiatt K, Dutt P, Mukherjee P, Bodine DM and Orlic D. Characterization of definitive lymphohematopoietic stem cells in the day 9 murine yolk sac. *Immunity* 1997; 7: 335–44.
119. Janowska-Wieczorek A, Marquez LA, Nabholz JM, Cabuhat ML, Montano J, Chang H, et al. Growth factors and cytokines upregulate late gelatinase expression in bone marrow CD341 cells and their transmigration through reconstituted basement membrane. *Blood* 1999; 93: 3379–90.
120. Takakura N, Kodama H, Nishikawa S, and Nishikawa SI. Preferential proliferation of murine colony-forming units in culture in a chemically defined condition with a macrophage colony-stimulating factor-negative stromal cell clone. *J Exp Med* 1996; 184: 2301–9.
121. Lawall H, Bramlage P, Aman B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease doi:10.1160/TH09-10-0688 *Thromb Haemost* 2010; 103: 696–709.
122. Bartsch T, Brehm M, Zeus T, Kögler G, Wernet P, Strauer BE. Transplantation of autologous mononuclear bone marrow stem cells in patients with peripheral arterial disease (The TAM-PAD study) *Clin Res Cardiol* DOI 10.1007/s00392-007-0569
123. Shintani S, Murohara T, Ikeda H. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776–9.
124. Takahashi T, Kalka C, Masuda H. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434–8.
125. Asahara T, Masuda H, Takahashi T. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Res* 1999; 85: 221–8.

126. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046–52.
127. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427–35.
128. Asahara T, Murohara T, Sullivan A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–7.
129. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation* 2002; 106: 2019–25.
130. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004; 94: 230–8.
131. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004; 109: 1543–9.
132. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS. Marrow-derived stromal cells Express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation Res* 2004; 94: 678–85.
133. Niagara MI, Haider HK, Ye L. Autologous skeletal myoblasts transduced with a new adenoviral bicistronic vector for treatment of hind limb ischemia. *J Vasc Surg* 2004; 40: 774–85.
134. Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F. Beneficial effects of concurrent autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the mouse hindlimb. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 17202–6.
135. Takagi Y, Omura T, Yoshiyama M. Granulocyte-colony stimulating factor augments neovascularization induced by bone marrow transplantation in rat hindlimb ischemia. *J Pharmacol Sci* 2005; 99: 45–51.
136. Iwase T, Nagaya N, Fujii T. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 543–51.
137. Nakagami H, Maeda K, Morishita R. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2542–7.
138. Yoon KH, Lee JH, Kim JW. Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet* 2006; 368: 1681–8.
139. Aicher A, Heeschen C, Sasaki K. Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: a new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia. *Circulation* 2006; 114: 2823–30.
140. Awad O, Dedkov EI, Jiao C. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 758–64.

141. Kobayashi K, Kondo T, Inoue N. Combination of in vivo angiopoietin-1 gene transfer and autologous bone marrow cell implantation for functional therapeutic angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1465–72.
142. Li S, Zhou B, Han ZC. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and. *Thromb Haemost* 2006; 95: 301–11.
143. Kim SW, Han H, Chae GT. Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells* 2006; 24: 1620–6.
144. Moon MH, Kim SY, Kim YJ. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2006; 17: 279–90.
145. Sica V, Williams-Ignarro S, de Nigris F. Autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the diabetic mouse hindlimb. *Cell Cycle* 2006; 5: 2903–8.
146. Jeon O, Song SJ, Bhang SH. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs. *J Biomed Sci* 2007; 14: 323–30.
147. Zhang H, Zhang N, Li M. Therapeutic angiogenesis of bone marrow mononuclear cells (MNCs) and peripheral blood MNCs: transplantation for ischemic hindlimb. *Ann Vasc Surg* 2008; 22: 238–47.
148. Esato K, Hamano K, Li TS. Neovascularization induced by autologous bone marrow cell implantation in peripheral arterial disease. *Cell Transplant* 2002; 11: 747–52.
149. Saigawa T, Kato K, Ozawa T. Clinical application of one marrow implantation in patients with arteriosclerosis obliterans, and the association between efficiency and the number of implanted bone marrow cells. *Circ J* 2004; 68: 1189–93.
150. Higashi Y, Kimura M, Hara K. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 2004; 109: 1215–8.
151. Miyamoto M, Yasutake M, Takano H. Therapeutic angiogenesis by autologous bone marrow cell implantation for refractory chronic peripheral arterial disease using assessment of neovascularization by ^{99m}Tc-tetrofosmin (TF) perfusion scintigraphy. *Cell Transplant* 2004; 13: 429–37.
152. Nizankowski R, Petriczek T, Skotnicki A. The treatment of advanced chronic lower limb ischaemia with marrow stem cell autotransplantation. *Kardiologia Pol* 2005; 63: 351–60.
153. Durdu S, Akar AR, Arat M. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III thromboangiitis obliterans. *J Vasc Surg* 2006; 44: 732–9.
154. Miyamoto K, Nishigami K, Nagaya N. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans. *Circulation* 2006; 114: 2679–84.

155. Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H. Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J* 2007; 71: 196–201.
156. Huang PP, Yang XF, Li SZ. Randomised comparison of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. *Thromb Haemost* 2007; 98: 1335–42.
157. Hernandez P, Cortina L, Artaza H. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: a comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis* 2007; 194: 52-6.
158. Gu YQ, Zhang J, Guo LR. Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells for patients with lower limb ischemia. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 963–967.
159. Chochola M, Pytlik R, Kobylka P. Autologous intra-arterial infusion of bonemarrow mononuclear cells in patients with critical leg ischemia. *Int Angiol* 2008; 27: 281–90.
160. Wester T, Jorgensen JJ, Stranden E. Treatment with autologous bone marrow mononuclear cells in patients with critical lower limb ischaemia. A pilot study. *Scand J Surg* 2008; 97: 56–62.
161. Van Tongeren RB, Hamming JF, Fibbe WE. Intramuscular or combined intramuscular/intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells: a clinical trial in patients with advanced limb ischemia. *J Cardiovasc Surg* 2008; 49: 51–8.
162. De Vriese AS, Billiet J, Van Droogenbroeck J. Autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells for limb ischemia in a caucasian population with atherosclerosis obliterans. *J Intern Med* 2008; 263: 395–403.
163. Amann B, Luedemann C, Ratei R. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduces amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplant* 2009; 18: 371–80.
164. Prochazka V, Gumulec J, Chmelova J. Autologous bone marrow stem cell transplantation in patients with end-stage chronic critical limb ischemia and diabetic foot. *Vnitr Lek* 2009; 55: 173–8.
165. Buschmann IR, Hoefler IE, van Royen N. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* 2001; 159: 343–56.
166. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulation Res* 2001; 89: 1-7.
167. Fadini GP, Sartore S, Albiero M. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2140–6.
168. Heeschen C, Lehmann R, Honold J. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004; 109: 1615–22.
169. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108: 391–7.

170. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 399–405.
171. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885–90.
172. Assmus B, Urbich C, Aicher A. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circulation Res* 2003; 92: 1049–55.
173. Akita T, Murohara T, Ikeda H. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab Invest* 2003; 83: 65–73.
174. Sasaki K, Heeschen C, Aicher A. Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with endothelial NO synthase enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy.