

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIĞAN MODELİNDE BOTULİNÜM-A TOKSİNİNİN
DAMAR GREFTİ ANASTOMOZUNDA VAZOSPAZM VE
TROMBÜS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. İLKNUR AKBULUT

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MEHMET SÜHAN AYHAN

ANKARA
ARALIK 2024

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIĞAN MODELİNDE BOTULİNÜM-A TOKSİNİNİN
DAMAR GREFTİ ANASTOMOZUNDA VAZOSPAZM VE
TROMBÜS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. İLKNUR AKBULUT

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MEHMET SÜHAN AYHAN

ANKARA
ARALIK 2024

TEZ ONAYI



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tez Sınav Tutanağı

Adı ve Soyadı	İlknur AKBULUT
Baba Adı	
Doğum Yeri / Tarihi	
Diploma Tarihi / Diploma No	
Mezun Olduğu Fakülte	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
İhtisas Yaptığı Anabilim Dalı / Bilim Dalı	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
İhtisas Süresi	Yıl: 5 Ay:1
Sınav Yapılmasını İsteyen Makam	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı

UZMANLIK TEZİNİN ADI: Sıçan Modelinde Botulinum-A Toksininin Damar Grefti Anastomozunda Vazospazm ve Trombus Oluşumu Üzerine Etkisi

JÜRİ KARARI: Tez savunması 25.12.2024 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından onaylanmıştır. Uzmanlık sınavına girmeye hak kazanmıştır.

JÜRİ ÜYELERİ

ÜYE

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Plastik,Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitim serüvenim boyunca çok kıymetli tecrübelerini sunan ve öğrenme sürecimde desteklerini esirgemeyen, beni daima öğrenmeye ve gelişmeye teşvik eden çok değerli hocalarım *Prof. Dr. Seyhan Çenetoğlu, Prof. Dr. Osman Latifoğlu, Prof. Dr. Serhan Tuncer, Prof. Dr. Kemal Fındıkçioğlu, Prof. Dr. Ayşe Gülşen, Doç. Dr. Serhat Şibar ve Doç. Dr. Ayhan Işık Erdal'a*

Tüm asistanlık dönemim boyunca çok değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, tezi yazma sürecimde katkı ve fikirleriyle yol gösteren çok değerli tez hocam *Prof. Dr. M.Sühan Ayhan'a*

Çalışmamın histolojik değerlendirmelerini yapan Histoloji ve Embriyoloji A.D. öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Çiğdem Elmas ve Sayın Araş. Gör. Sinem Kırım Acar'a

Asistanlığım boyunca omuz omuza çalıştığım tüm çalışma arkadaşlarıma

Bu günlere gelmemde çok emeği olan ve beni her daim destekleyen değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY

TEZ ONAYI

TEŞEKKÜR

BEYAN

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ

TABLOLAR DİZİNİ

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Arter ve Ven Duvarı Histolojisi ve Anatomisi	4
2.2. Damar Spazmı ve Trombüs Oluşumu	6
2.2.1. Damar Spazmı ve Trombüs Oluşumu Moleküler Mekanizması	7
2.2.2. Damar Grefti Spazmı.....	9
2.2.3. Vasküler Spazma Yönelik Kullanılan Ajanlar	11
2.3. Botulinum Toksin.....	23
2.3.1. Tarihçe.....	23
2.3.2. Moleküler Yapısı ve Etki Mekanizması	28

2.3.3. Sıçanlarda Uygulanacak BoNT-A Dozları ve BoNT-A'nın Vasküler Etkilerinin Başlangıç Süresi	34
2.3.4. Vasküler Spazm, Trombüs ve Botulinum Toksin	35
2.4. Mikrocerrahi	39
2.4.1. Mikrocerrahi Tarihçesi	39
2.4.2. Mikrovasküler Anastomoz Teknikleri.....	41
2.4.3. Sütürlerin Yerleştirilmesi	42
2.4.4. Mikrocerrahi Uygulamalar Sonrasında Damar Duvarı İyileşme Süreci.....	43
2.4.5. Mikrovasküler Greft Uygulamaları	45
2.5. Lazer Doppler Akımölçer ile Anastomoz Akımın Ölçülmesi	47
2.6. İndosiyanin Yeşili (ICG) anjiyografi ile Vasküler Akımın ve Kas Perfüzyonunun Görüntülenmesi	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	52
3.1. Çalışma Gruplarının Tasarlanması	53
3.2. Cerrahi Teknik.....	54
3.3. Histolojik Analiz ve Doku Örneklemesi	70
3.3.1. Hematoksilen- Eozin Boyama Yöntemi	71
3.3.2. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	72
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	73

4. BULGULAR.....	74
4.1. Makroskopik Bulgular	74
4.2. Vasküler Çap Ölçümleri	78
4.3. ICG Floresan Anjiyografi ile Vasküler Akımın ve Kas Perfüzyonunun Görüntülenmesi	89
4.4. Lazer Doppler Akımölçer ile Anastomoz Akımı Değerlendirme	95
4.5. Histolojik Bulgular	99
4.5.1. Işık Mikroskobi Bulguları	99
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	112
6. KAYNAKÇA.....	126
7. ÖZET	144
8. SUMMARY	146
9. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Topikal vazodilatörlerin vasküler düz kas hücreleri üzerindeki etki mekanizması.....	8
Şekil 2: Vasküler spazma neden olan kemotraktanlar ve vasküler endotelin vasküler spazmı önleme mekanizması	11
Şekil 3: Topikal vazodilatasyon mekanizmaları	17
Şekil 4: (A) Botulinum nörotoksininin 3 boyutlu yapısı. Bağlayıcı alan ağır zincir N-terminali (AZN) ve ağır zincir C-terminali (AZC), translokasyon alanı (HN) ve katalitik veya endopeptidaz alanı (LC) gösterilmiştir. Alfa-heliks ve β tabakaları sırasıyla mavi ve sarı renkle gösterilmiştir. BoNT-E hariç tüm BoNT serotipleri dört alanının benzer yapısal organizasyonunu paylaşır. (B) Toksik olmayan nonhemaglutinin A'nın (NTNHA; PDB Kimliği: 3VUO) yapısı. Kristal yapıda, NTNHA'nın alan organizasyonu BoNT-A'ya benzerdir	29
Şekil 5: Botulinum nörotoksininin (BoNT) etki mekanizması.	33
Şekil 6: A: Tromboze anastomoz ve iskemik ekstremitte ICG floresan anjiyografi görüntüsü. B: Soldaki görüntünün ICG tutulum yoğunluğuna göre renklendirilmiş hâli	50
Şekil 7: Çalışmada kullanılan mikroskop ve cerrahi aletler	53
Şekil 8: Cerrahi öncesi işaretlemeler A: Arter grefti ile anastomoz oluşturulacak gruplarda kullanılan insizyonlar B: Ven grefti ile anastomoz oluşturulacak gruplarda kullanılan insizyonlar	54
Şekil 9: Stres testi ratın sağ arka bacağı buzlu su içerisinde 5 dakika bekletilerek ve anastomoz üzerine epinefrin uygulanarak gerçekleştirildi.	58

Şekil 10: Tükürük bezleri ekarte edildikten sonra boyun kaslarının görünümü... 59	59
Şekil 11: Boyunda sağ taraf ortak karotis arterin ve vagal sinirin görünümü 60	60
Şekil 12: 1 cm’lik vasküler greftle oluşturulmuş anastomoz..... 61	61
Şekil 13: Perivasküler alana salin enjeksiyonu 62	62
Şekil 14: İlk operasyonda yapılan anastomozda akımın olmadığı bir ratın ikinci operasyonundan alınmış ICG görüntüleri. Tromboze damar ve sol arka bacağına göre daha az ICG tutulumu olan iskemik sağ arka bacak görünümü 66	66
Şekil 15: Damar grefti olarak kullanılacak olan ortak karotis arter ve femoral damarların görünümü. Femoral arter ve ortak karotis arter arasındaki çap uyumsuzluğu dikkati çekmektedir..... 70	70
Şekil 16: A: Ven greftiyle oluşturulmuş stres testiyle tromboze anastomozun görüntüsü. B: Ven greftiyle oluşturulmuş primer tromboze anastomozun görüntüsü 74	74
Şekil 17: Makroskopik olarak belirgin iskemik görünümlü tibialis anterior kas örnekleri..... 76	76
Şekil 18: Makroskopik olarak iskemik görünümde olmayan tibialis anterior kas örnekleri..... 77	77
Şekil 19: A: Kontrol grubu olan 2. gruptan bir ratın ikinci cerrahide gözlenen arka bacak ön grup kasları B: BoNT grubu olan 4. Gruptan bir ratın ikinci cerrahide gözlenen arka bacak ön grup kasları. Deney grubundaki BoNT uygulanan tarafta iskemik görünümün eşlik etmediği artmış ödem dikkat çekmektedir..... 77	77
Şekil 20: Rat femoral arter dalları (Zepp ve ark. çalışmasından [196])..... 78	78

Şekil 21: Trombotik olmayan damar gruplarındaki femoral arter, femoral ven ve greft çapındaki değişikliklerin kutu grafikleri	85
Şekil 22: Trombotik olmayan damar gruplarındaki kontrol ve BoNT gruplarında femoral arter, femoral ven ve greft çapındaki değişikliklerin kutu grafikleri	86
Şekil 23: Botulinum toksin uygulanan anastomozda A: Femoral arter ve venin ilk görünümü. B: Anastomoz ve femoral damarların ikinci operasyonundaki görünümü.....	86
Şekil 24: Botulinum toksin uygulanan anastomozda A: Anastomoz ve femoral damarların ilk görünümü. B: Anastomoz ve femoral damarların ikinci operasyonundaki görünümü	87
Şekil 25: Deney ve kontrol gruplarındaki damarların ICG görüntüleri. BoNT-A grupları olan 3. ve 4. gruplarda damarların büyümüş görünümü dikkati çekmektedir	87
Şekil 26: Arter grefti ve ven grefti gruplarında klempler açılmadan önce ölçülen ortalama çaplar	88
Şekil 27: Tromboze damarlar dahil edilmeden botulinum toksin uygulanan ve uygulanmayan gruplarda 1. ve 2. operasyonlarda ölçülen ortalama damar çaplarındaki değişim.....	89
Şekil 28: Stres testi sonrası sağ bacağın kan akımındaki azalmayı tespit edebilmek için ICG tutulum yüzdeleri birbirlerine oranlanan sağ tibialis anterior kasının orta noktası ve sol taraf tibialis anterior kasının orta noktası.	90
Şekil 29: Stres testi sonrasında sağ tibialis anterior kasının ortalama ICG tutulumunda azalma yüzdelerinin gruplar arasındaki karşılaştırması	92

Şekil 30: Tüm ratlarda grupların sağ kas/ sol kas tutulum oranlarının kutu grafiği	94
Şekil 31: Stres testi yapılan ratlarda grupların sağ kas/ sol kas ICG tutulum oranlarının kutu grafiği.....	94
Şekil 32: Stres testi sonrası anastomozların ICG tutulumları	95
Şekil 33: Ven grefti +salin grubunda stres testi sonrası tromboze olan bir anastomozun LDF akım grafiği.....	96
Şekil 35: Grupların kas fiberleri ayrılma skorlarının kutu grafikleri.....	102
Şekil 36: Ven grefti +salin grubunda gastrokinemius kas kesitinde kas liflerinin ayrılması sarı ok ile gösterilmiştir	103
Şekil 37: Grupların kas interfasiküler ödem skorlarının kutu grafikleri.....	103
Şekil 38: Arter grefti + BoNT-A grubunda tibialis anterior kas kesitinde interfasiküler ödem ve kas liflerinde çizgilenme kaybı sarı ok ile gösterilmiştir	104
Şekil 39: Grupların artmış inflamatuvar hücre skorlarının kutu grafikleri	104
Şekil 40: Arter grefti + BoNT-A grubunda tibialis anterior kasında inflamatuvar hücre sayısı artışı gösterilmiştir.....	105
Şekil 41: Ven grefti + salin grubunda, gastrokinemius kasından elde edilen kesitte; Kas lifleri arasında bağ doku artışı sarı ok, enine çizgilenmede kayıp beyaz ok, inflamatuvar hücre artışı siyah ok ve hücre çekirdeğinin santrale göçü mavi ok ile gösterilmiştir.....	105
Şekil 42: Arter grefti+ salin grubundan elde edilen kas dokusunda, segmental nekrozis siyah ok ile, kas liflerinin ayrılması sarı ok ile ve inflamatuvar hücre sayısındaki artış mavi ok ile gösterilmiştir.....	106

Şekil 43: Ven grefti + BoNT-A grubundan elde edilen kas dokusunda; interfasiküler ödem ve çizgilenme kaybı siyah oklar ile, segmental nekroz mavi ok ile ve kas liflerinin ayrılması sarı ok ile belirtilmiştir 106

Şekil 44: Arter grefti + BoNT-A grubunda elde edilen kas kesitinde; nekroze olup parçalanarak dağılan siyah ok ile yaygın segmental nekroz yeşil ok ile gösterilmiştir. Bu grupta yapılan skorlamada segmental nekroz yaygın olarak bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı 107

Şekil 45: A: Ven grefti + Salin grubu, lümeni tam tıkayan trombüs gösterilmiştir. B: Ven grefti + BoNT-A grubu, lümeni tam tıkayan trombüs gösterilmiştir..... 108

Şekil 46: Sarı ok: subendotel tabakanın ayrılması, siyah ok: epitel tabakasının destrüksiyonu, beyaz yıldız: lümeni tam tıkayan, organize, hemorajik trombüsü göstermektedir 109

Şekil 47: C: arter grefti + salin grubunda lümeni tıkamayan trombüs varlığı, D: arter grefti + BoNT-A grubunda trombüs yokluğu, tam açık lümen gösterilmiştir..... 110

Şekil 48: Trombüs içeren damar lümeni gösterilmiştir. Sarı çizgi: trombüs, siyah ok: trombüs içerisinde organize olmuş bağ doku alanı 111

Şekil 49: Trombüs içermeyen arter grefti dokusu gösterilmiştir. Endotel ve subendotel tabakası intakt, paralel sıralanmış kas lifleri tunika media tabakasını oluşturmakta ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmemektedir. 111

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Grup 1'deki sıçanların 1. ve 2. operasyonları sırasında ölçülen femoral arter, femoral ven anastomoz öncesi, sonrası ve 2. operasyonda alıcı damar grefti çapları	79
Tablo 2: Grup 2'deki anastomozlarda 1. ve 2. operasyonları sırasında ölçülen femoral arter, femoral ven, anastomoz öncesi, sonrası ve 2. operasyonda alıcı damar grefti çapları	79
Tablo 3: Grup 3'deki anastomozlarda 1. ve 2. operasyonlar sırasında ölçülen femoral arter, femoral ven, anastomoz öncesi, sonrası ve 2. operasyonda alıcı damar grefti çapları	79
Tablo 4: Grup 4'deki sıçanların 1. ve 2. operasyonları sırasında ölçülen femoral arter, femoral ven, anastomoz öncesi, sonrası ve 2. operasyonda alıcı damar grefti çapları	80
Tablo 5: Deneklerin ilk cerrahide ölçülen femoral arter, ven ve greft çapları	81
Tablo 6: Primer trombüs görülmeeyen örneklerde grupların femoral arter, femoral ven ve greft çapındaki değışikliklerinin karşılaştırılması.....	83
Tablo 7: Kontrol ve BoNT gruplarının femoral arter, femoral ven ve greft çaplarının karşılaştırılması (primer tromboze damarlar hariç).....	84
Tablo 8: Grup 1'deki sıçanların kas ve damar ICG tutulum oranları.....	90
Tablo 9: Grup 2'deki sıçanların kas ve damar ICG tutulum oranları.....	91
Tablo 10: Grup 3'deki sıçanların kas ve damar ICG tutulum oranları.....	91
Tablo 11: Grup 4'deki sıçanların kas ve damar ICG tutulum oranları.....	91

Tablo 12: Stres testi yapılan sıçanlarda sağ/sol kas ICG tutulum oranları.....	93
Tablo 13: Stres testi yapılan sıçanların anastomozların ilk ve ikinci cerrahide ölçülen akım değerleri	97
Tablo 14: Ven grefti + salin iki kas grubunda kas dejenerasyon skorları	100
Tablo 15: Arter grefti + salin iki kas grubunda kas dejenerasyon skorları	100
Tablo 16: Ven grefti + BoNT-A grubunda kas dejenerasyon skorları	100
Tablo 17: Arter grefti + BoNT-A grubunda kas dejenerasyon skorları	101
Tablo 18: Grupların ortalama histolojik skorları.....	101
Tablo 19: Tüm gruplarda gastrokinemius ve tibialis anterior kaslarının histopatolojik skorlaması.....	102
Tablo 20: Gruplar arasında trombüs görülen deneklerin dağılımı	107
Tablo 21: Ven Grefti + Salin grubundaki trombüs boyutları ve trombüs görülen deneklerin damar lümeni boyutları.....	108
Tablo 22: Ven Grefti + BoNT-A grubundaki trombüs boyutları ve trombüs görülen deneklerin damar lümeni boyutları	108
Tablo 23: Arter grefti + Salin grubundaki trombüs boyutları ve trombüs görülen deneklerin damar lümeni boyutları.....	110
Tablo 24: Arter Grefti + BoNT-A grubundaki trombüs boyutları ve trombüs görülen deneklerin damar lümeni boyutları	110

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BoNT	: Botulinum Nörotoksini
BoNT-A	: Botulinum Nörotoksini Tip-A
cAM	: Kalmodulin
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
CMBC	: Hareketli Kan Hücreleri Konsantrasyonu
EDHF	: Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör
ET	: Endotelin
ICG	: Indocyanine Green (İndosiyanin yeşili)
FDA	: Food and Drug Administration
LDA	: Lazer Doppler Akımölçer
MLC	: Miyozin Hafif Zinciri
MLCK	: Miyozin Hafif Zincir Kinaz
MLCP	: Miyozin Hafif Zincir Fosfataz.
NBP	: Nörotoksin Bağlayıcı Protein
NE	: Norepinefrin
NİP	: Nörotoksin İlişkili Protein
NHB	: Nonhemaglutinin Bileşeni
NO	: Nitrik Oksit
PET	: Polietilenterefitalat
PGI₂	: Prostaglandin I ₂
PTFE	: Politetrafloroetilen
PU	: Perfüzyon Ünitesi
NIR Floresan	: Near InfraRed Floresan
ST	: Stres testi

TB : Total Backscatter

TXA₂ : Tromboksan A₂

V : Hız



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Botulinum toksini, uygulandığı lokalizasyona (perivasküler, nöronal, intramüsküler) ve etkileşime girdiği nörotransmitter veya reseptöre bağlı olarak çok sayıda farklı etkiler gösterebilir. Botulinum toksininin genel klinik kullanımı, sinaptik aralığa asetilkolin salınımını bloke ederek iskelet kasının kasılmasının inhibisyonu etkisine dayanır. Bu etkisine ek olarak, sinaptik aralığa norepinefrin, P maddesi gibi önemli vazokonstriktörlerin salınımını da bloke eder. Rho/Rho kinaz yolağında Rho kinazı inaktive eder ve vasküler düz kas hücrelerinin Ca^{2+} duyarlılığını ve nitrik oksit (NO) sistemini stimüle ederek düz kas hücre kasılmasını doğrudan inhibe eder, aynı zamanda da önemli bir vazodilatatör olan kalsitonin geni ile ilişkili peptidin (CGRP) salınımını artırır.

Tüm bu farmakolojik özellikler botulinum toksinini vasküler cerrahide karşılaşılabilecek bazı sorunların çözümü için araştırma konusu haline getirmiştir ve bu konu ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Ancak vazospazmı tedavi etmek için botulinum toksin uygulamasının Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı bir endikasyonun bulunmaması, etki mekanizması ve vasküler etkileri konusunda farkındalık eksikliği sebebiyle klinik kullanımı yaygın değildir.

Vasküler tromboz ve vazospazm serbest flep cerrahisi başarısızlığının en yaygın nedenleridir ve genellikle vasküler spazm oluşumu trombüs oluşumunu tetikler. Tüm bu istenmeyen olayların gelişme olasılığı genellikle anastomoz yapıldıktan sonra ilk 72 saatte en fazladır. Bazı özel klinik durumlarda bazı cerrahi girişimler vasküler spazm ve tromboz gelişim riskini arttırabilir ve damar greftlemesi bu duruma örnek olarak gösterilebilir.

İnterpozisyonel damar greftleri, travmatik defektlerde damarların uç uca dikilemediği durumlarda, defektin yakın çevresinde alıcı damarların yetersiz olduğu serbest flep pediküllerinin uzatılması gerektiğinde kullanılırlar. Venler, kolay bir şekilde erişilip alınabildiklerinden daha yaygın olarak kullanılırlar. Uygun klinik durumlarda arter greftlerinin kullanımı da söz konusu olabilir. Özellikle koroner bypass cerrahisi bunun önemli bir örneğidir.

Çoklu anastomoz varlığı, özellikle ven grefti kullanılan vakalarda kompresyona ve bükülmeye yatkınlık, türbülanslı veya değişen akış dinamikleri, intimal hasar gibi nedenler bu segmentin artmış intrinsik trombojenitesi ve vazospazma yatkınlığı ile sonuçlanır. Aynı zamanda greft ile alıcı damar arasındaki boyut farklılığı genellikle mevcuttur [1]. Trombozdan koruyucu olarak greft endoteli, damar genişlemesini indükleyen ve trombosit ve granülosit aktivasyonunu inhibe eden nitrik oksit ve prostasiklin (PGI₂) gibi maddeler üretir [2]. Bu koruyucu mediyatörler, damar duvarının kan bileşenleri ile etkileşimini baskılayarak tromboz eğilimini azaltmaya çalışır. Ancak, damar duvarına uygulanan hemodinamik kuvvetler yine de bu koruyucu önlemleri atlayabilir ve intimal hiperplazi, trombüs, vazospazm gibi durumlara neden olabilirler [3,4].

Arteriyel ve venöz greftlerin vazospazma yatkınlık oluşturabilmesi önemli bir klinik sorundur. Graft spazmını önlemek için vazodilatör özelliklere sahip çeşitli ilaçlar araştırılmıştır[5-8]. Ancak hâlen etkili, uzun süreli ve güvenli bir ilaç ve bir uygulama yöntemi arayışı devam etmektedir. Bu amaçla Duman ve ark. botulinum toksininin damar greft spazmını engelleme üzerindeki etkisini in-vitro olarak araştırmışlardır ve BonT-A'nın damar greftleri üzerindeki gevşetici etkisinin papaverinden daha uzun olduğunu gözlemlemişlerdir [9].

Birçok hayvan damar anastomoz modelinde intraoperatif olarak veya ameliyattan birkaç gün önce yapılan perivasküler botulinum toksin uygulamasının, perfüzyonu iyileştirdiği, arteriyel ve venöz dilatasyonu artırdığı, trombozu azalttığı ve hem random patern hem de pediküllü flep sağkalımını iyileştirdiği gösterilmiştir. Hayvan modellerinde toksinin prosedürle eş zamanlı olarak veya ön tedavi olarak uygulandığında, vasküler faydalarının kısa bir sürede ortaya çıkıp birkaç hafta boyunca devam ettirilebildiği gösterilmiştir. Birkaç hafta sürebilen etkileri, etkisi yalnızca birkaç saat süren papaverin veya lidokain gibi diğer yaygın vazoaaktif maddelerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha uzundur ve vasküler greftler kullanılarak yapılan anastomozların trombüs ve spazma yatkınlığına olumlu etkileri daha önce in-vivo bir çalışmada birlikte araştırılmamıştır. Bu çalışmada vasküler greftlerle yapılacak arter anastomozunda intraoperatif olarak alıcı arterin etrafına botulinum toksin enjeksiyonu yapılmasının etkilerini göstermeyi hedeflemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Arter ve Ven Duvarı Histolojisi ve Anatomisi

Kan damarları içten dışa intima, media ve adventisya olarak isimlendirilen üç tabakadan oluşmaktadır. Anastomoz hatlarında sorunsuz iyileşme, bu üç tabakanın anatomik bütünlüğünün sağlanmasına bağlıdır [10]. İntimal tabaka lümen tarafında endotel tabakası ve bu tabakanın altındaki bazal membran ve subintimadan oluşur. Arterlerde, bazal membran komşuluğunda yer alan miyointimal hücreler ve elastik mikrofibrillerden oluşan internal elastik lamina venlere göre daha kalındır ve bu durum arterlerin yüksek basınca karşı damar direncini artırır. Media tabakası düz kas hücreleri, elastik lifler ve kollajen içerir. Adventisya en dışta yer alır ve bağ doku ile beraber damar duvarını besleyen damarlar olan vasa vasorumlar adventisyada bulunur.

-Tunika intima: Endotel, subendotelyal doku ve internal elastik laminadan oluşur.

a-Endotel: Tek katlı yassı epitelden oluşur. Endotel hücreleri, nitrik oksit, tip II,IV,V laminin, kollojen, endotelin, prostaglandin I₂(prostasiklin), von Willebrand faktör ve EDHF (endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör) sentezler [11] ve vasküler remodelling üzerinde etkileri olan, anjiotensin II'yi sentezleyen anjiyotensin-converting enzim [12]; bradikinin, serotonin, prostaglandinler, trombin ve norepinefrin gibi mediyatörleri metabolize eden enzimleri ve lipoprotein lipaz enzimini içerir [13].

b-Subendotelyal Tabaka: Sıra halinde dizilmiş düz kas hücreleri ve gevşek bağ dokudan oluşur.

c-İnternal elastik membran: Elastik lifler yoğun olarak bulur. Mediada yer alan hücrelerin beslenebilmesi için diffüzyona izin veren fenestralar içerir.

-Tunika media: Proteoglikanlar ve özellikle tip III kollajenden oluşan ekstrasellüler matrikste yer alan konsantrik düz kas hücreleri ve elastik lifleri içerir. Ekstrasellüler matriks düz kas hücreleri tarafından sentezlenir.

-Tunika adventisya: Fibroblastlar, tip I kollajen ve elastik lifleri içerir. Çevre yapıların bağ dokuları ile devamlılık gösterir. Vaso vasorumlar, nervi vasorumlar bu tabakada yerleşim gösterir. Musküler arterler, elastik arterler ve büyük venlerde, media ve adventisya tabakası arasında eksternal elastik membran bulunur.

Kan Damarlarının Beslenmesi: İntima ve endotel damar içindeki kandan difüzyon ile beslenir. Büyük damarların, kalın media ve subintima tabakaları nedeniyle derinlerdeki hücrelerin difüzyonla beslenemez; bu yüzden büyük damarlar adventisyada seyreden ve yer yer media tabakasına da giren vasa vasorumlar tarafından beslenir. Vasa vazorumlar venlerde daha fazladır ve subintimal bölgeye kadar uzanır. Lenfatik kapillerler venlerde media tabakasına penetre olabilmelerine karşın arterlerde sadece adventisyada bulunur.

Kan Damarlarının İnnervasyonu: Damarlar vazomotor tonustan sorumlu olan, miyelinsiz sempatik sinirlerce innerve edilir. Bu postganglionik sempatik sinirler uyarıldığında vasokonstrüksiyona neden olur. Sinirler genellikle mediaya girmez ve direkt olarak düz kas hücreleri ile sinaplaşmaz. Sinir uçlarından mediaya salgılanan norepinefrin, komşu düz kas hücrelerinin kasılmasını sağlar ve uyarı gap junctionlar yoluyla tüm media tabakasına yayılır ve vazokonstrüksiyon gerçekleşir [14].

2.2. Damar Spazmı ve Trombüs Oluşumu

Mikrocerrahi tabanlı serbest flep ve replantasyon prosedürleri artık %94,3 ile %99,2 arasında değişen yüksek başarı oranlarına sahip yaygın tekniklerdir [15-18]. Serbest doku transferinin tanıtılmasından bu yana, mikrocerrahi tekniklerindeki ilerlemeler flep sağkalım oranlarını artırmıştır [19]. Ancak, tekniklerin ilerlemesine rağmen, serbest flep trombozu hala bir endişe konusu olmaya devam etmektedir çünkü daha yüksek morbidite, artan maliyetler ve daha uzun hastanede kalış süresi ile ilişkilidir [20]. Mikrocerrahi prosedürlerde revizyon cerrahilerinin bilinen en yaygın nedeni vasküler komplikasyonlardır ve anastomoz edilen damarlardaki herhangi bir anormallik flebin veya replantın yaşayabilirliğini önemli ölçüde etkileyebilir.

İntraoperatif gelişebilecek vazospazm iyi bilinen bir durum olmasına rağmen, genellikle öngörülemez bir şekilde meydana gelir ve devam ederse flepte ve replantta kan akışının azalmasına ve tromboza yol açabilir [21]. Sonuç olarak, bu durum flebin veya replantın tamamen kaybolmasına veya kısmi hasar görmesine neden olabilir ve mikrocerrahların çoğu uygulamalarının bir noktasında bu sorunla karşılaşmaktadır [22]. Postoperatif arteriyel vazospazm olgularına kalp damar cerrahisi ve beyin cerrahisi de aşınadır. Kalp cerrahisinde, arteriyel baypas greftinin refrakter spazmının koroner arter baypas prosedürlerinin %0,4 ila %1,3'ünde meydana geldiği bildirilmiştir [23,24]. Bu durum hem internal mammarian hem de radyal arter greftlerinde bildirilmiştir ve zaman dilimi ameliyat sonrası 3 ila 8 saat ile 2 gün arasında değişmektedir [23,25,26]. Özellikle distal radyal arterlerin yüksek konsantrasyonda endotelin-1 ve α -adrenerjik reseptörlere sahip olduğu ve bunların dolaşımdaki düşük norepinefrin seviyelerine bile duyarlı hale geldiği bulunmuştur [27]. Nöroşirürjide, subaraknoid kanamanın bir sonucu olarak serebral vazospazm 50 yıldan uzun bir süre önce tanımlanmıştır ve subaraknoid kanaması

olan hastalarının %70'inde radyografik olarak görülebilir [28]. Mekanizma tam olarak açıklanmamıştır ancak endotel disfonksiyonu veya vasküler düz kasın artmış kontraktilitesinin sürekli bir kontraktıl yanıtı neden olduğu düşünülmektedir [29]. Vazospazmı önlemek ve hafifletmek için prosedür sırasında antispazmodik ajanların lokal uygulaması yapılır ancak ilaç türleri ve optimum konsantrasyonları hala tartışma konusudur.

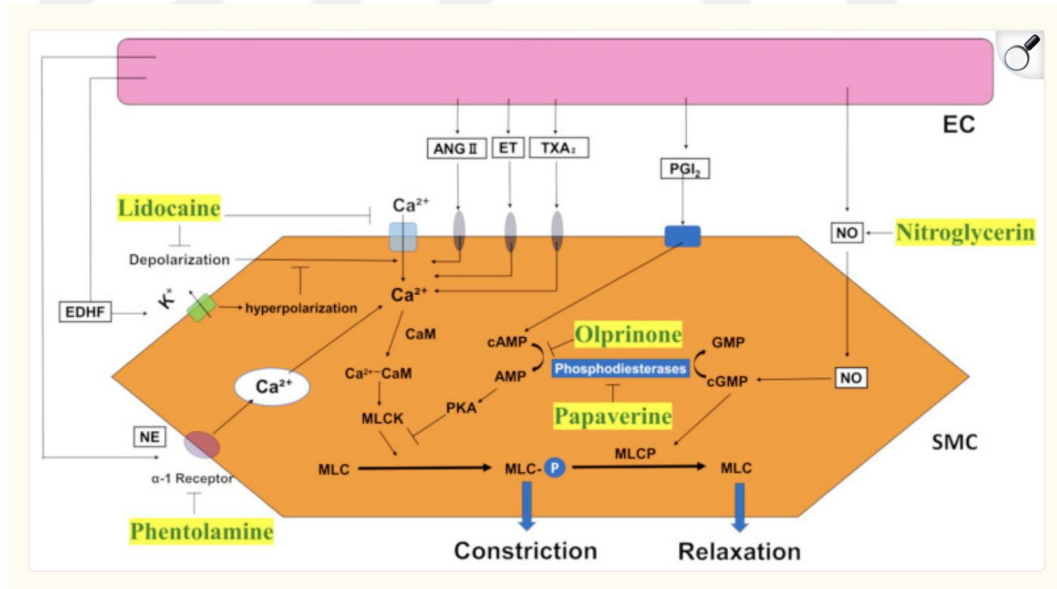
2.2.1. Damar Spazmı ve Trombüs Oluşumu Moleküler Mekanizması

Vazospazmın altında yatan mekanizmaları karmaşıktır. Soğuk, damarın kontrolsüz manipölasyonu, kanama, spazma intrensek eğilim, endotel hasarı, inflamatuvar mediatörler, artmış sempatik tonus ve dolaşımdaki vazokonstriktörler dahil olmak üzere çeşitli faktörlere ve yanıt olarak ortaya çıkabilir [23]. Kan damarlarının mekanik olarak gerilmesi, kas reaksiyonlarını indükleyebilir ve membran potansiyelini değiştirebilir. Membran potansiyelindeki hızlı değişiklikler, düz kas hücresi kasılmasını ve vazokonstriksiyonu indükleyebilir. Bu reaksiyonlar genellikle pediküllerin hazırlanması sırasında ortaya çıkar. Vasküler diseksiyonun uygun şekilde yönetilmesi ve gerginliğin en aza indirilmesi çok önemlidir [30].

Kan damarlarının hücresel bileşenleri de vazospazm yanıtında önemli bir rol oynar. Damar duvarı intima, medya ve adventisya olarak adlandırılan 3 anatomik katmandan oluşmuştur [31]. İntimanın önemli bileşenleri olan endotel hücreleri damar tonusunu düzenleyen çok sayıda biyoaktif madde salgılar. Nitrik oksit (NO), prostaglandin I₂ (PGI₂) ve endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak da bilinen endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör (EDHF) gibi maddelerin salınımı, lokal düz kas gevşemesine ve ardından vazodilatasyona neden olur. Buna karşılık, endotelin-1 ve tromboksan A₂ gibi parakrin faktörler vazokonstriksiyona neden olur. Endotel hücreleri ayrıca intimanın pürüzsüzlüğünü korur, trombosit ve

lökosit yapışmasını ve zararlı moleküllerin arter damar duvarına girmesini önler [32].

Kan damarı duvarlarının medyası, çok sayıda düz kas hücresi katmanından oluşur [33]. Düz kas hücreleri kan damarının düzgün çalışması için gereklidir [34]. Düz kas hücrelerinin kasılması ve gevşemesi, damar lümeninin çapında değişikliklere neden olarak kan damarının uygun kan basıncını korumasını sağlar. Lokal faktörlere ek olarak, anjiyotensin II ve vazopressin gibi sistemik hormonlar ve norepinefrin gibi sempatik nörotransmitterler, spesifik reseptörler aracılığıyla zarla çevrili kalsiyum kanallarını aktive ederek düz kas hücrelerindeki hücre içi kalsiyum iyon konsantrasyonunu artırır ve vazokonstriksiyona yol açar [35] (Şekil 1). Düz kas hücrelerinin işlevleri, mikrocerrahi sırasında kan damarlarının durumunu önemli ölçüde etkiler.



Şekil 1: Topikal vazodilatörlerin vasküler düz kas hücreleri üzerindeki etki mekanizması (Vargas ve ark. çalışmasından [21]) (EC, endotel hücresi; SMC, düz hücre kası; EDHF, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör; ANG, anjiyotensin; ET, endotelin; TXA₂, tromboksan A₂; PGI₂, Prostaglandin I₂; NO, nitrik oksit; NE,

norepinefrin; Ca^{2+} , kalsiyum; cGMP, siklik guanozin monofosfat; cAMP, siklik adenozin monofosfat; GMP, guanozin monofosfat; AMP, adenozin monofosfat; CaM, Kalmodulin; MLCK, miyozin hafif zincir kinazı; MLC, miyozin hafif zinciri; MLCP, miyozin hafif zincir fosfataz)

Vazodilatörler (Şekil 1 sarı arka planlı yeşil metin) hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarını azaltarak veya nitrik oksit, siklik adenozin monofosfat veya siklik guanozin monofosfatı artırarak etki eder.

Düz kas hücrelerinin disfonksiyonu vasküler doku dejenerasyonuna, vasküler tonus regülasyonunun bozulmasına ve potansiyel trombüs oluşumuna neden olabilir. Spazmın tedavisi için mikrocerrahi sırasında lokal olarak antispazmodik ajanlar uygulanabilir; ancak, vasküler spazmı etkili bir şekilde tedavi etmek için bu ilaçların optimum konsantrasyonları belirlenmemiştir. Ek olarak bu ajanların kan damarları üzerindeki etkileri hala belirsizdir. Dahası, bu ajanların fizyolojik işlevler üzerindeki etkisi ve toksisitesi ile kullanım için optimum konsantrasyonlar henüz açıklığa kavuşturulmamıştır [36].

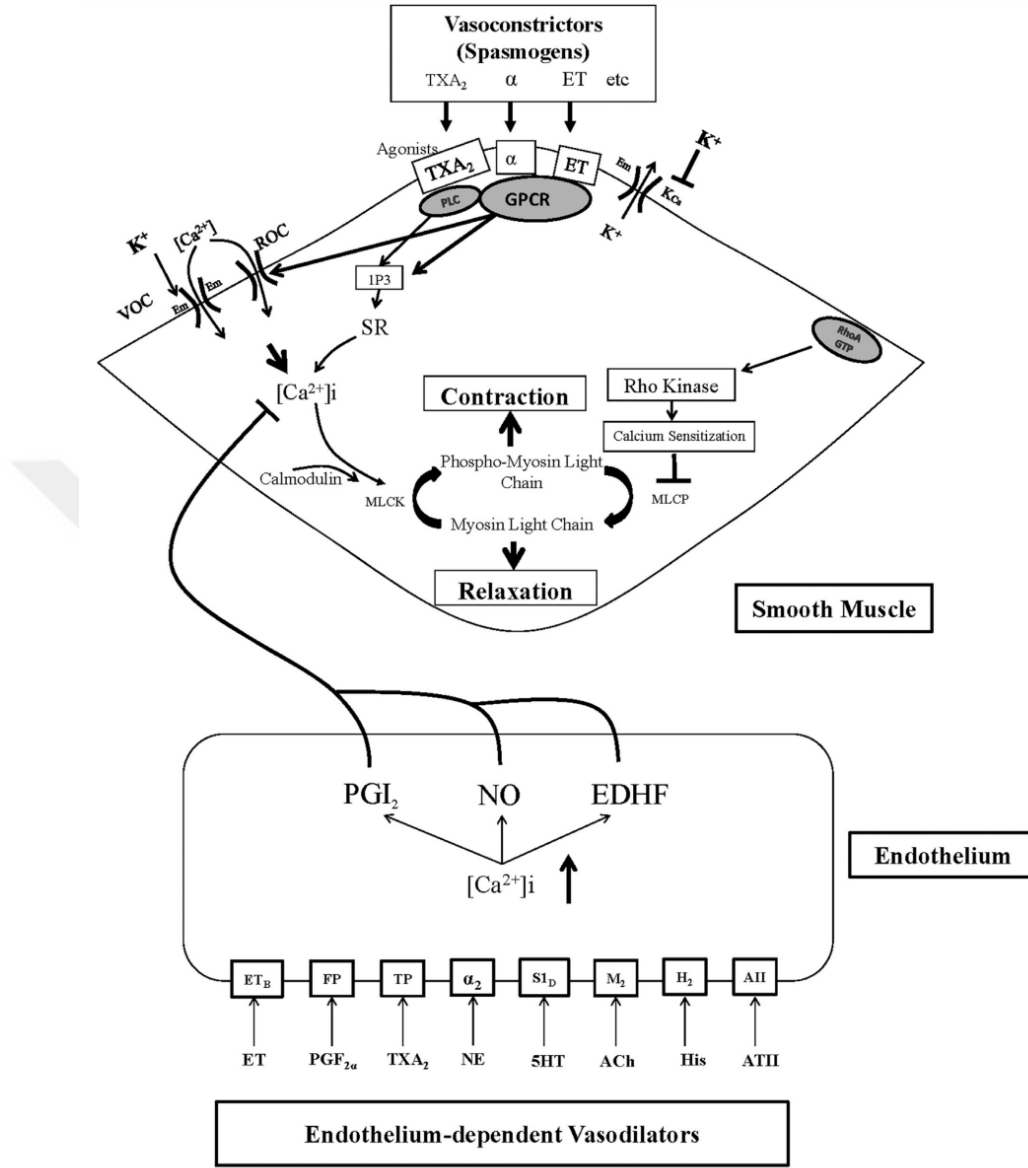
2.2.2.Damar Grefti Spazmı

Arteriyel ve venöz greftlerin vazospazmı önemli bir klinik sorundur ve damar greftleri üzerinde spazmojen etkileri olan etkenler birçok araştırmanın konusu olmuştur. Endotelden türetilen kasılma faktörleri (örneğin, endotelin-1), prostaglandinler (örneğin, tromboksan A2 veya PGF2a), a-adrenoseptör agonistleri (örneğin, norepinefrin, epinefrin, metoksamin ve fenilefrin), trombositlerden türetilen maddeler (örneğin, 5-hidroksitriptamin) ve hücrel membran depolarize edici ajan olan potasyum ve ayrıca mast hücreleri ve histamin bilinen önemli spazmojen maddeler olarak bilinirler [37, 38]. Ayrıca, insan ve hayvan damarları arasında bu spazmojenlere yanıt olarak belirgin farklılıklar olduğu da belirtilmelidir [37].

Damar greftlerindeki vazospazm, vasküler kontraktilite veya endotel disfonksiyonunun diğer yollarıyla da ilişkili olabilir. Örneğin, otolog nötrofiller endotel disfonksiyonuna neden olan stabil bir protein olmayan küçük molekül salgılar [39]. Ek olarak, RhoA/Rho kinaz yolağının damar greftlerini spazma duyarlı hale getirebilen başka bir mekanizma olması muhtemeldir [40].

Düz kas hücresinin kasılması temelde kalsiyum sinyal kaskadları ve RhoA/Rho-kinaz sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşir ve Rho-kinaz her iki mekanizmada da önemli ölçüde yer alır. Daha yakın zamanda, yağ hücrelerinin veya yağ hücrelerinin hem endokrin hem de parakrin etkilere sahip çok sayıda metabolik olarak aktif madde ürettiği fark edilmiştir; bu, perivasküler yağ dokusunun da vasküler spazmda rol oynayabileceği anlamına gelir [2]. Spazmojenlerin yanı sıra, hipotermi gibi diğer uyarıcılar da greft spazmında rol oynamıştır [41]. Ek olarak, yaygın endotel disfonksiyonuna neden olan diabetes mellitus gibi metabolik hastalıkların da vasküler greft spazmı riskini artırdığı gösterilmiştir [42].

Sağlam endotel, nitrik oksit, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör ve PGI₂ gibi bir dizi endotel kaynaklı gevşetici faktörü serbest bırakarak damar spazmını önleyebilir; bu faktörler arteriyel greftlerde vazokonstriksiyon ve gevşemeyi dengelemeye yardımcı olur [2,3,43]. Şekil 2, damarlardaki kasılmanın (veya spazmın) olası mekanizmalarını ve spazmı önlemede vasküler endotelin rolünü de göstermektedir.



Şekil 2: Vasküler spazma neden olan kemotraktanlar ve vasküler endotelin vasküler spazmı önleme mekanizması (Guo Wei He ve ark. “Spasm in Arterial Grafts in Coronary Artery Bypass Grafting Surgery” çalışmasından[11])

2.2.3. Vasküler Spazma Yönelik Kullanılan Ajanlar

İntraoperatif gelişebilecek vazospazm, doğrudan vasküler manipülasyon, metabolik homeostaz ve intrinsek eğilim de dahil olmak üzere çok sayıda uyarana

yanıt olarak ortaya çıkabilir. Vazospazm, kan akışının azalmasına ve anastomozun tromboze olmasına yol açabilir. Mikrocerrahi sırasında vazospazmın tetikleyici mekanizması belirsiz olsa da, prosedürlerin yüzde 5 ila 10'unu önemli ölçüde etkilediği tahmin edilmektedir [21]. Vazospazmı önlemek veya azaltmak için birçok farmakolojik ajan hayvan ve in- vitro modellerde değerlendirilmiştir

Birleşik Krallık'taki plastik cerrahlar arasında yakın zamanda yapılan bir anket, %94'ünün rutin olarak intraoperatif vazodilatör kullanmasına rağmen, bunların kullanımının gerekçesinin, tercih edilen ajan(lar)ın ve uygulama tekniğinin büyük ölçüde değiştiğini ortaya koymuştur [44]. Papaverin, verapamil ve/veya lidokain çoğunlukla tercih edilen ajanlardır; cerrahların büyük bir çoğunluğu bu ajanları topikal olarak kullanmaktadır, küçük bir grup ise bu ajanları topikal kullanmanın yanısıra damar lümenini bu ajanlarla yıkamaktadır [44].

Vasküler spazma yönelik kullanılan ajanlar etki mekanizmalarına göre beş farmakolojik kategoriye ayrılır: fosfodiesteraz inhibitörleri (papaverin, pentoksifilin ve amrinon), lokal anestezikler (lidokain), kalsiyum kanal blokerleri (nikardipin, verapamil, nifedipin ve magnezyum sülfat), direkt etkili vazodilatörler (sodyum nitroprusid, prostaglandin E1, nitrogliserin ve hidralazin) ve alfa antagonistleri (fentolamin ve klorpromazin) [21].

Fosfodiesteraz İnhibitörleri

Fosfodiesteraz inhibitörleri, siklik guanozin monofosfatı inaktive etme işlevi gören fosfodiesterazı antagonize eder. Vasküler düz kas hücreleri içindeki bu ikinci habercinin artan konsantrasyonu, miyozin hafif zincir kinazının etkisini inhibe eder ve sonuçta gevşeme ve vazodilatasyona neden olur [21].

Papaverin

Papaverin, siklik nükleotid fosfodiesterazları inhibe ederek, hücre içi siklik guanozin monofosfat birikimine neden olur ve vasküler düz kas hücrelerinin kasılma aktivitesini azaltır [45,46]. Papaverinin spazmolitik etkisine ek olarak, kolajen kaynaklı trombosit agregasyonunu ve serotonin salınımını da inhibe eder. Kalsiyum kanal antagonizması, vazodilatasyonun ek bir mekanizması olabilir [47]. Dikkat çekici olarak, mevcut papaverin solüsyonları genellikle oldukça asidiktir (pH, 3 ila 4,5) ve vasküler endotele karşı aşındırıcı olabilir [48]. Hayvan araştırmalarında vasküler endotel ve düz kas hücrelerinin apoptozunu indükler [49]. Bu nedenle, sistemik uygulama kontrendikedir ve papaverinin intraluminal irrigasyon olarak kullanımı sorgulanmıştır. Etkililik açısından, papaverinin, tuzlu suya kıyasla arteriyel mikroanastomoz açıklığını iyileştirdiği ve etkili rahatlama sağladığı (kan akışı kontrolün %116'sı) ve vazospazmı bir dereceye kadar önlediği gösterilmiştir. Evans ve arkadaşları, topikal papaverin uygulamasından sonra yeniden anastomoze edilen bir tavşan karotis arterindeki kan akışında önemli ve tutarlı bir artış bulmuştur [50]. Benzer bulgular Gherardini ve arkadaşları tarafından da doğrulanmıştır [50]. Papaverin, açığa çıkarılmış bir sıçan femoral arter modelinde damar çapında ani ve önemli bir artışa (yüzde 66 artış) neden olmuştur [47]. Hou ve arkadaşları ayrıca papaverinin sıçan femoral arterinin kan kaynaklı vazospazmını önlemede ve çözmede etkili olduğunu göstermiştir [51]. Ek olarak, papaverin spastik olmayan damarlar üzerinde vazodilatör bir etki göstermiştir ve bu da akımda mutlak bir artışa neden olmuştur. Birkaç çalışmada topikal uygulamadan sonra etki süresinin 5 dakikadan az, bir diğerinde ise 1 dakikadan az olduğu bildirilmiştir [47]. Genel olarak, papaverin hızlı başlayan ve makul bir etki süresine sahip etkili bir spazmolitik ve antispazmodik topikal ajandır.

Pentoksifilin

Pentoksifilin, vasküler kladikasyonun tedavisinde klinik olarak kullanımıyla bilinen, fosfodiesterazın bir diğer kompetitif inhibitörüdür [52]. Eritrosit deformabilitesini artırarak daha düşük kan viskozitesi gibi antikoagülan bir etkiye neden olur [53]. Topikal vazodilatör olarak kullanıldığında, pentoksifilin çeşitli hayvan modellerinde in vivo vazospazm süresini azaltır [54] ve diğerlerinde deri flebi sağkalımını iyileştirir [55,56]; ancak topikal uygulama ile etki başlangıcı veya süresi hakkında herhangi bir bilgi bulunamamıştır.

Amrinon

Fosfodiesteraz III'ün seçici bir inhibitörü olan amrinon, vasküler düz kas hücrelerinde siklik adenosin monofosfat ve siklik guanozin monofosfatı artırarak vazodilatasyona neden olur [57]. Amerika Birleşik Devletleri'nde inotropik amrinon konjestif kalp yetmezliğinin tedavisinde kullanılır. Sistemik uygulama hipotansiyona ve artmış miyokardiyal talebe neden olur, bu nedenle amrinon kullanımı hipertrofik kardiyomiyopati ve aort stenozu olan hastalarda kontrendikedir [58]. Ancak topikal amrinonun, bir sıçan femoral arter modelinde vazospazmı giderebildiği gösterilmiştir [59]. Ichioka ve arkadaşları, topikal vazodilatörlerle ilgili nadir bir insan flep çalışmasında, amrinonun vazospazmı giderdiğini ve topikal uygulamadan 10 dakika sonra flebe giden kan akışını önemli ölçüde artırdığını bulmuşlardır[59]. Amrinon etkili bir topikal spazmolitik olmasına rağmen, istenmeyen sistemik etki riski yaygın klinik kullanımını sınırlayabilir.

Lokal Anestezikler

Depolarizasyonu ve kalsiyum kanal aktivasyonunu önlemek için membran stabilizasyonuna ek olarak, topikal olarak kullanılan lokal anestezikler düz kas hücreleri üzerinde doğrudan spazmolitik etki oluşturur [21].

Lidokain

Başlıca lokal anestezik ve antiaritmik etkileri için kullanılan lidokainin lokal vazoaaktif özelliklerini nasıl gösterdiğine dair kesin mekanizma belirsizdir. Vazodilatasyon, voltaj kapılı sodyum kanallarının inhibisyonundan kaynaklanabilir ve vasküler düz kas hücreleri içindeki hücre içi sodyum ve kalsiyum konsantrasyonunda azalmaya neden olabilir [46]. Hücre zarının stabilizasyonunu, depolarizasyonu ve kalsiyum girişini önleme gibi etkilerinin de vazodilatasyonun birincil mekanizması olduğunu öne sürülmüştür [45]. Yine etkilerinin başlıca yakındaki otonom sinir hücreleri üzerindeki endotel bağımlı etkiler aracılığıyla gerçekleştiği öne sürülmüştür [60]. Hayvan çalışmalarında, Geter ve ark. %2 lidokain uygulamasıyla sıçan kuyruğu arterinin epinefrin kaynaklı vazospazmında bir iyileşme bulmamış ancak %20 lidokain ile 15 ila 30 dakika içinde tamamen çözüldüğünü görmüşlerdir [61]. Gherardini ve ark. tavşan karotis arterinde deneysel olarak oluşturulan vazospazmı %2 lidokain ve %20 lidokainin topikal uygulamasını incelemişler ve yalnızca daha yüksek dozda anlamlı iyileşme bulmuşlardır [50]. Ichioka ve arkadaşları %10 lidokain uygulandıktan sonra sıçan femoral arterinde epinefrin kaynaklı vazospazmı anlamlı iyileşme bulmuşlardır [59]. Mikrovasküler vazokonstriksiyonu çözmek için ideal lidokain konsantrasyonunun %12 olduğu bildirilmiştir çünkü bu dozun, ergotamin kaynaklı vazospazmı değerlendiren bir sıçan kuyruk arteri çalışmasında %20 lidokain kadar etkili ancak daha az toksik olduğu gösterilmiştir [60]. Benzer bir takip çalışmasında, aynı grup %12 lidokainin daha düşük konsantrasyonlardan daha fazla etkiye sahip olduğunu ve minimum lokal doku toksisitesi olduğunu bulmuşlardır [62]. Ohta ve arkadaşları yabancı kanın vazospazmı indüklemek için kullanıldığı bir sıçan femoral arter modeli kullandı ve %2 ila %40 konsantrasyonlarında topikal olarak lidokain uyguladı. Spazmolitik etki değişmemiş olsa da, etkinin süresi artan

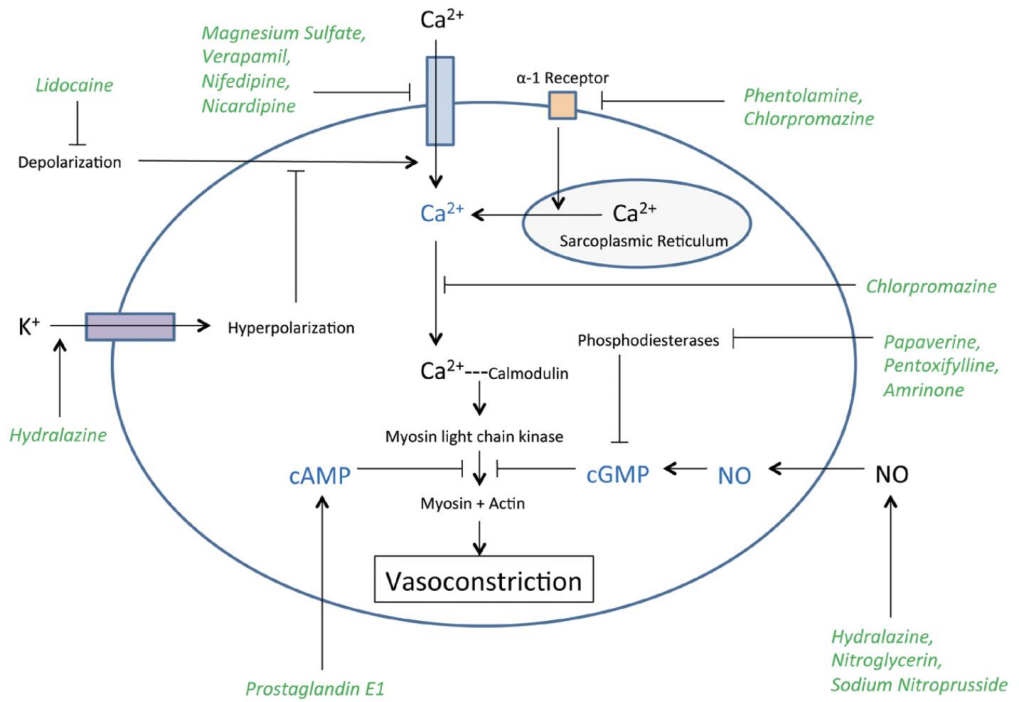
konsantrasyonlarla birlikte arttı. Bu yazarlar, %20 lidokainin mikrocerrahi sırasında topikal bir ajan olarak kullanıldığında en etkili olduğunu öne sürdüler [63]. Aynı bulgu, %2 ve %20 lidokaini karşılaştıran başka bir sıçan modelinde de öne sürülmüştü [61]. İnsanlar için, %2'nin üzerindeki dozların güvenliği kesin olarak belirlenmemiştir; ancak Johnstone ve ark. periferik lidokain konsantrasyonlarının 1,5 µg/ml'de zirve yaptığı mikrovasküler rekonstrüksiyon vakaları sırasında %4 lidokainin topikal uygulanmasından sonra dört hasta serisinde sistemik toksisiteye dair bir kanıt bildirmedi; bu, 5 ila 10 µg/ml'lik belirlenmiş toksisite seviyesinin çok altındaydı [64].

Düşük konsantrasyonlarda, lidokainin damar spazmını kötüleştirdiği bildirilmiştir [50,51]. Chen ve arkadaşları, %1 lidokainin aslında bir sıçan cremaster kas modelinde damar spazmını kötüleştirdiğini ve 5. ve 10. dakikalarda damar çapında ek bir önemli azalmaya neden olduğunu bildirmiştir [51]. Hyza ve arkadaşları, %2 lidokain uygulamasının bir sıçan arka bacak flep modelinde vazospazm süresini önemli ölçüde uzattığını bulmuştur [54]. Bu endişelerin bir sonucu olarak, bir dizi çalışma bu konsantrasyonun topikal bir ajan olarak klinik kullanımının yararlılığını sorgulamıştır [50, 51]. Diğer çalışmalar, daha düşük lidokain konsantrasyonlarının etkili olduğunu bulmuştur. Vazospazmın kimyasal olarak oluşturulmadığı sıçan femoral arterleri üzerinde %1 lidokainin etkisine ilişkin bir in vivo çalışmada, Kerschner ve Futran kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmış bir damar çapı bulmuştur [47]. Yokoyama ve arkadaşları sıçan femoral arterlerinin epinefrin kaynaklı vazospazmının tedavisinde %2 topikal lidokain kullanmış ve akışta hemen, önemli bir artış bulmuştur [65]. Genel olarak, lidokain muhtemelen doza bağımlı etki gösteren bir ajandır ve vazospazmı gidermek için pratik kullanımı konusunda tartışmalar vardır. Daha yüksek

konsantrasyonlar deneysel olarak etkili olsa da, lokal ve sistemik komplikasyonların potansiyeli klinik uygulamasını sınırlar.

Kalsiyum Kanal Blokerleri

Yüksek konsantrasyonlarda hücre içi kalsiyum, miyozin hafif zincir kinazı yoluyla vazokonstriksiyona neden olur, miyozin-aktin etkileşimine izin verir ve düz kas kasılmasına neden olur [66]. Transmembran voltaj kapılı kalsiyum kanallarının antagonizması, vasküler düz kas hücrelerindeki hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarını azaltarak vazodilatasyona neden olur (Figür 3). Membran kalsiyum kanal inhibitörleri, bazıları kardiyak anjina ve serebral vazospazmları tedavi etmek için kullanılmasına rağmen, en yaygın olarak hipertansiyon tedavisinde kullanılır. Dihidropiridin türevi ilaçlar (nikardipin ve nifedipin), ticari olarak temin edilebilen kalsiyum kanal blokerlerinin büyük kısmını oluşturur.



Şekil 3: Topikal vazodilatasyon mekanizmaları (Vargas ve ark. çalışmasından [21])

Topikal vazodilatörlerin vasküler düz kas hücreleri üzerindeki etki mekanizmasının basitleştirilmiş diyagramı. Vazodilatörler (yeşil metin) öncelikli olarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonlarını azaltarak veya nitrik oksit, siklik adenosin monofosfat veya siklik guanozin monofosfatı (mavi metin) artırarak etki eder. Ca^{2+} , kalsiyum; cGMP: siklik guanozin monofosfat; cAMP: siklik adenosin monofosfat; NO: nitrik oksit.

Verapamil

Verapamil, L tipi kalsiyum kanallarının antagonistidir ve hipertansiyon ve kardiyak aritmi tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Son zamanlarda serebral vazospazmların doğrudan intra-arteriyel tedavisinde kullanımı gündeme gelmiştir [67]. Mikrovasküler çalışmalarda, Hyza ve arkadaşları, bir sıçan arka bacak flebinin gerilim kaynaklı vazospazmından sonra, topikal verapamilin spazm süresini etkili bir şekilde azalttığını bulmuşlardır [54]. Weinzwieg ve arkadaşları da, verapamilin sıçan femoral arterinin mekanik ve buz kaynaklı vazospazmının önlenmesinde ve tedavisinde etkili olduğunu bildirmişlerdir [68]. Verapamil, topikal bir ajan olarak bir dereceye kadar etkili görünmektedir, ancak etkisi diğer ilaç sınıflarındaki ajanlara göre daha az güçlü görünmektedir.

Magnezyum Sülfat

Genellikle eklampsi ve torsades de pointes tedavisinde kullanılan magnezyum sülfat, muhtemelen kalsiyum kanal inhibisyonuyla ilişkili bronkodilatör ve vazodilatör özelliklere de sahiptir. Hyza ve arkadaşları, sıçan arka bacak modelinde çekiş kaynaklı vazospazm üzerine yakın zamanda yapılan bir çalışmada, %10 magnezyum sülfatın topikal uygulamasının hem vazospazmı azaltmada hem de hiperperfüzyona kadar geçen sürede en güvenilir ajan olduğunu buldular ancak topikal uygulama ile etki hızı ve süresiyle ilgili sonuçlar eksikti [54].

Direkt Etkili Vazodilatörler

Bu kategorideki ajanlar, vasküler düz kasların gevşemesini sağlamak için ikinci haberci sistemleri (siklik adenosin monofosfat ve siklik guanozin monofosfat) aracılığıyla etki ederler [66].

Sodyum Nitroprussid

Sodyum nitroprussid, nitrik oksit üretmek için oksihemoglobin ile etkileşime girer ve bunun sonucunda hücre içi siklik guanozin monofosfat artar, miyozin hafif zincir kinazının inhibisyonu ve vazodilatasyon meydana gelir. Hem arteriyel hem de venöz sistemler üzerindeki etkisi nedeniyle, sodyum nitroprussid hem kardiyak ön yükü hem de son yükü azaltır ve bu nedenle antihipertansif bir ajan olarak ve konjestif kalp yetmezliğinin tedavisinde etkilidir. Sistemik uygulamadan sonra rebound vazokonstriksiyon bildirilmiştir, ancak bu etki henüz mikrocerrahi literatüründe bildirilmemiştir [69]. Gurlek ve ark. tavşan karotis arter modelinde anastomoz kaynaklı vazospazmdan sonra sodyum nitroprussidin topikal uygulamasının damar akışında önemli ölçüde artışa neden olduğu bildirilmiştir [50]. Ancak, sıçan modelinde gerilim kaynaklı vazospazm kullanılarak yapılan yakın tarihli bir değerlendirme, sodyum nitroprussidin vazospazm süresini veya hiperperfüzyon süresini kontrole kıyasla önemli ölçüde kısaltmada etkili olmadığını bulmuştur [54]. Sodyum nitroprussidin metabolizması, detoksifikasyon için endojen kükürt ile daha fazla reaksiyon gerektiren methemoglobin ve siyanür üretir. Siyanür toksisitesi, methemoglobinemi ve artmış tiyosiyanat zararlı potansiyel yan etkilerdir. Sodyum nitroprussidin ışığa duyarlı olması ve uygulamadan önce opak bir ambalaj malzemesiyle korunması gerekir. Bu nedenle cerrahi ortamda sodyum nitroprussidin kullanımı zorluk gösterebilmektedir.

Prostaglandin E1

Prostaglandin E1, miyozin hafif zincir kinazının etkisini bozmak için hücre içi siklik adenosin monofosfatı artırarak doğrudan damar düz kası üzerinde etki eden güçlü bir vazodilatördür [70]. Prostaglandin E1'in ayrıca trombosit agregasyonu üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [51]. Kullanıldığı tıbbi uygulamalar arasında patent duktus arteriosus, erektil disfonksiyon ve kritik uzuv iskemisinin yönetimi yer alır [71,72]. Chen ve arkadaşları, epinefrin kaynaklı vazospazmdan sonra bir sıçan kremaster kasında prostaglandin E1'in topikal uygulamasını değerlendirdiler ve uygulamadan 5 dakika sonra başlayıp 20 dakikalık deneme süresinin sonuna kadar devam eden damar çapında önemli bir artış buldular [51]. Buna karşılık, Hyza ve arkadaşlarının çalışmasında topikal uygulamadan sonra hiperperfüzyon süresinde veya vazospazm süresinde anlamlı bir fark gözlemlenmedi [73].

Nitrogliserin

Organik bir nitrat olan nitrogliserin, nitrik oksit salgılayarak hücre içi siklik guanozin monofosfatta artışa neden olur ve vasküler düz kas gevşemesine yol açar [69]. Sistemik olarak uygulandığında, düşük dozlarda venöz vazodilatasyon, daha yüksek dozlarda ise arteriyel vazodilatasyon meydana gelir. Nitrogliserin preparatlarının transdermal uygulaması, çelişkili sonuçlarla birlikte, cilt flebi sağkalımını iyileştirmenin olası bir yöntemi olarak incelenmiştir [74-77]. Mikrocerrahi sırasında intraoperatif kullanım için topikal bir preparat olarak, 1 mg/ml'lik bir solüsyonun bir sıçan modelinde vazospazm süresini azaltmada etkili olduğu gösterilmemiştir [73]. Bununla birlikte, insan kas-kutanöz damarlarını kullanan bir in vitro modelde, Zhang ve arkadaşları topikal nitrogliserinin endotelin-1 kaynaklı vazospazmdan sonra konsantrasyona bağlı gevşeme üretmede

çok etkili olduğunu bulmuşlardır [78], ancak etki başlangıç süresi ve süresi incelenmemiştir.

Hidralazin

Hidralazin, potasyum kanallarının aktivasyonu, hücre içi kalsiyum salınımının inhibisyonu ve vasküler endotelden nitrik oksit salınımının uyarılması yoluyla düz kas hiperpolarizasyonuna neden olur [66]. Hidralazinin nitrik oksit salınımını uyarma yeteneği fonksiyonel endotele bağlıdır [79]. Klinik olarak antihipertansif bir ajan olarak kullanılmasına rağmen, hidralazinin birincil tedavi olarak kullanımı ilişkili sempatik uyarım ve refleks taşikardi nedeniyle sınırlıdır [66]. Gurlek ve ark. bir in vitro çalışmada hidralazin uygulamasından sonra tavşan karotis arterinin norepinefrinle kasılmış halkalarının iki fazlı yanıtını göstermiştir: düşük konsantrasyonlar damar kasılmasını daha da artırırken, daha yüksek konsantrasyonlar bunu rahatlatmıştır. Ancak bunu takip eden in vivo çalışmada, anastomoz kaynaklı sağlam tavşan karotis arteri spazmına hidralazinin topikal uygulanması akışta önemli bir artışa neden olmamıştır [50]. Topikal vazodilatör bir ajan olarak etkililiğe dair ek kanıt olmadan, mikrocerrahi sırasında hidralazinin klinik kullanımı önerilmemektedir.

Alfa Antagonistler

Alfa-adrenerjik reseptör antagonistleri, α_1 reseptörlerini, α_2 reseptörlerini veya her ikisini inhibe ederek etki eder. Düz kas hücrelerindeki α reseptörlerinin uyarılması, sarkoplazmik retikulumdan hücre içi kalsiyum salınımı yoluyla vazokonstriksiyona neden olur; alfa reseptörlerinin inhibisyonu ise vazodilatasyona neden olur.

Fentolamin

Fentolamin, vazodilatasyon etkisini hücre içi kalsiyum salınımını inhibe ederek gösteren seçici olmayan bir alfa blokerdir. Feokromositoma kaynaklı hipertansiyonun tedavisindeki uygulamasıyla klinik olarak bilinmektedir; ayrıca yakın zamanda kompleks bölgesel ağrı sendromunun yönetiminde de araştırılmıştır [80]. Huang ve Li, sıçan cremaster damarlarının epinefrin kaynaklı vazokonstriksiyonundan sonra topikal fentolaminin etkisini incelemiş ve uygulamadan hemen sonra spazmın hızlı ve önemli ölçüde tersine döndüğünü bulmuşlardır. Ancak, çözelti epinefrin ile daraltılmamış damarlara uygulandığında hiçbir etki görülmemiştir. Etki, uygulamadan 2 dakika sonra başlamış ve 20 dakikalık deneme süresi boyunca sürmüştür. Bu çalışmada fentolaminin spazmolitik etkisinin papaverin veya magnezyum sülfattan daha güçlü olduğu belirtilmiştir.

Klorpromazin

Klorpromazin, dopamin, serotonin, histamin ve muskarinik asetilkolin reseptörlerini antagonize etmesinin yanı sıra, seçici olmayan alfa-adrenerjik antagonizma yoluyla vazodilatasyona neden olur. Ayrıca vazokonstriksiyonu önlemek için kalsiyum-kalmodulin kompleksinin oluşumunu bloke ettiği bildirilmiştir [81]. Geter ve arkadaşları, sıçan kuyruk arterlerinde epinefrin kaynaklı vazokonstriksiyondan sonra topikal klorpromazin uygulamasının etkisini incelediler ve vazospazmda hızlı, önemli, konsantrasyona bağlı rahatlatma ve damar açıklığında %20 lidokainin etkisinden daha üstün bir iyileşme buldular [61]. Notodihardjo ve arkadaşları, anastomoze edilmiş sıçan femoral arterlerine klorpromazin uyguladılar ve uygulamadan sonraki 5 dakika içinde damarlardaki akışta 60 dakikalık deneme süresi boyunca süren önemli bir etki buldular [81].

2.3. Botulinum Toksin

2.3.1. Tarihçe

Clostridium Botulinum'un İlk Tanımları ve Keşfi

Gıda kaynaklı botulizmin kaydedilen en eski salgınlarından biri, 1793 yılında günümüzde Almanya'nın Baden-Württemberg eyaletinde bulunan Wildbad köyünde meydana geldi. Yerel bir lezzet olan kan sosisiyle dolu domuz midesini yedikten sonra on üç kişi hastalandı ve altı kişi öldü. Württemberg'de meydana gelen ölümcül gıda zehirlenmesi vakaları, yetkilileri 1802 yılında tutsülenmiş kan sosislerinin tüketilmesine karşı kamuoyunu uyarmaya ve "sosis zehirlenmesi" vaka raporlarını toplamaya yöneltti. 1817 ile 1822 yılları arasında Alman hekim Justinus Kerner, kapsamlı klinik gözlemlere ve hayvan deneylerine dayanarak botulizmin semptomlarının ilk eksiksiz tanımını yayınladı. Toksinin anaerobik koşullar altında bozuk sosislerde geliştiği, biyolojik bir madde olduğu, sinir sistemine etki ettiği ve az miktarda bile ölümcül olduğu sonucuna vardı [82]. Kerner, bu "sosis toksininin" aşırı aktif bir sinir sisteminin neden olduğu çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılabileceği hipotezini ortaya attı ve bu, bunun terapötik olarak kullanılabileceğini öne süren ilk kişi oldu. 1870'te Alman hekim Müller, sosis zehirlenmesinin neden olduğu hastalığı tanımlamak için, Latince "sosis" anlamına gelen botulus kelimesinden türetilen botulizm terimini türetti [83].

1895 yılında Belçikalı bir mikrobiyolog olan Émile van Ermengem, günümüzde Clostridium botulinum olarak adlandırılan bakteriyi keşfetti ve bakterinin ürettiği bir toksinin botulizme neden olduğunu doğruladı [84]. 14 Aralık 1895'te, Belçika'nın Ellezelles köyünde, insanların turşu ve tutsülenmiş jambon yediği bir cenaze töreninde büyük bir botulizm salgını yaşandı; üç kişi öldü. Kirilenmiş jambonu inceleyen ve jambonu yedikten sonra ölen insanlar üzerinde

otopsi yapan van Ermengem, *Bacillus botulinus* adını verdiği anaerobik bir mikroorganizmayı izole etti [82]. Ayrıca hayvanlar üzerinde jambon özleri, izole edilmiş bakteri kültürleri ve bakterilerden elde edilen toksin özleri ile deneyler yaptı. Bunlardan, bakterilerin kendilerinin gıda kaynaklı botulizme neden olmadığı, bunun yerine yutulduktan sonra hastalığa neden olan bir toksin ürettiği sonucuna vardı [85]. Kerner ve van Ermengem'in araştırmaları sonucunda, yalnızca kirlenmiş et veya balığın botulizme neden olabileceği düşünülüyordu. Bu fikir, 1904 yılında Almanya'nın Darmstadt kentinde beyaz fasulye konservesi nedeniyle bir botulizm salgını meydana geldiğinde çürütüldü. 1910 yılında Alman mikrobiyolog J. Leuchs, Ellezelles ve Darmstadt'taki salgınların farklı *Bacillus botulinus* suşlarından kaynaklandığını ve toksinlerin serolojik olarak farklı olduğunu gösteren bir makale yayınladı [82]. 1917 yılında *Bacillus botulinus*, *Bacillus* teriminin yalnızca aerobik mikroorganizmalar grubunu ifade etmesine, *Clostridium* teriminin ise yalnızca anaerobik mikroorganizmalar grubunu tanımlamak için kullanılmasına karar verildiği için *Clostridium botulinum* olarak yeniden adlandırıldı. 1919'da Georgina Burke, toksin-antitoksin reaksiyonlarını kullanarak A ve B olarak adlandırdığı iki *Clostridium botulinum* suşunu tanımladı [84].

Sonraki üç on yıl boyunca, 1895-1925 yılları arasında, gıda konserveciliği yılda bir milyar dolarlık bir endüstriye yaklaşırken, botulizm halk sağlığı açısından tehlikeli hale geldi. İsviçreli-Amerikalı bir veteriner bilimci olan Karl Friedrich Meyer, San Francisco'daki Hooper Vakfı'nda bir merkez kurdu ve burada organizmayı yetiştirmek ve toksini çıkarmak için teknikler geliştirdi ve bunun tersine, organizmanın büyümesini ve toksin üretimini önlemek ve ısıtma yoluyla toksini etkisiz hale getirmek için teknikler geliştirdi. Böylece Kaliforniya konserve endüstrisi korunmuş oldu [85].

II. Dünya Savaşı'nın patlak vermesiyle birlikte, botulinum toksininin silah haline getirilmesi Maryland'deki Fort Detrick'te araştırıldı. Carl Lamanna ve James Duff, Edward J. Schantz'ın ilk klinik ürünü yaratmak için kullandığı konsantrasyon ve kristalleştirme tekniklerini geliştirdiler [86]. Botulinum toksininin temel etki mekanizmasının sinir uçlarından nörotransmitter asetilkolinin salınımını engellemek olduğu ise 20. yüzyılın ortalarında açıklanmıştır [87].

Şaşılık konusunda uzmanlaşmış oftalmologlar, oküler kasların göz hareketine katkısını değerlendirmek için bir tanı tekniği olarak lokal anesteziğin EMG rehberliğinde enjeksiyon yöntemini (enjeksiyonu yönlendirmek için aktif bir kastan gelen elektrik sinyali olan elektromiyogramı kullanan) geliştirdiler [88]. Şaşılık cerrahisi sıklıkla tekrarlanması gerektiğinden, çeşitli anesteziğler, alkoller, enzimler, enzim blokerleri ve yılan nörotoksinleri kullanılarak cerrahi olmayan enjeksiyon tedavileri için bir araştırma yapıldı. Son olarak, Daniel B. Drachman'ın Johns Hopkins'te civcivlerle yaptığı çalışmalardan ilham alan [89] Alan B. Scott ve meslektaşları maymunların ekstraoküler kaslarına botulinum toksini enjekte ettiler. Sonuç dikkat çekiciydi çünkü hedef kasla sınırlı, uzun süreli ve yan etkisi olmayan bir kas felci gözlemlendiler [90]. Dondurarak kurutma, albüminle tamponlama ve sterilite, güç ve güvenlik sağlama tekniklerini geliştirdikten sonra Scott, FDA'ya araştırma amaçlı ilaç kullanımı için başvurdu ve San Francisco laboratuvarında botulinum tip A nörotoksini üretmeye başladı. 1977'de ilk şaşılık hastalarına enjeksiyon yaptı, 1980'de klinik faydasını bildirdi ve kısa süre sonra yüzlerce göz doktoruna Oculinum ("göz hizalayıcı") adını verdiği ilacın EMG rehberliğinde enjeksiyonu konusunda eğitim verdi [91]. ABD ve Kanada'daki oftalmologlar, botulinum toksininin terapötik bir ajan olarak kullanımını daha da geliştirdiler. 1985'e gelindiğinde, blefarospazm ve şaşılık tedavisi için enjeksiyon yerleri ve dozajların bilimsel protokolü ampirik olarak

belirlenmişti [92]. Bu durumun tedavisindeki yan etkilerin nadir, hafif ve tedavi edilebilir olduğu düşünülüyordu[93]. Enjeksiyonun faydalı etkileri yalnızca dört ila altı ay sürdü. Bu nedenle, blefarospazm hastalarının yılda iki veya üç kez yeniden enjeksiyona ihtiyacı vardı [94]. 1986'da, Scott'un botulinum toksininin mikro üreticisi ve dağıtıcısı olan Oculinum Inc, ürün sorumluluk sigortası yaptıramadı ve artık ilacı tedarik edemedi. Stoklar tükendikçe, periyodik enjeksiyonlara güvenen insanlar çaresiz kaldı. Sorumluluk sorunları çözülene kadar dört ay boyunca, Amerikalı blefarospazm hastaları enjeksiyonları için Kanada göz merkezlerine gittiler [95]. Aralık 1989'da Botoks,12 yaş üstü kişilerde şaşılık, blefarospazm ve hemifasiyal spazm tedavisi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylandı.

Botulinum toksin tip-A'nın alın kırıxıklıklarını azaltma ve ortadan kaldırma etkisi ilk olarak Sacramento, Kaliforniya'dan plastik cerrah Dr. Richard Clark tarafından tanımlanmış ve yayınlanmıştır. 1987'de Clark, yüz germe prosedürü nedeniyle alınının sol tarafı felç olduktan sonra sadece sağ taraftaki alın kaslarının işlev gören bir hastada şekil bozukluğunu ortadan kaldırmak için botulinum toksini kullandı. Clark, şaşılık olan bebekleri tedavi etmek için botulinum toksinin güvenli bir şekilde kullanıldığının farkındaydı ve hareket eden ve kırışan normal işlevli sağ alın kaslarını felç ederek alının her iki tarafının aynı görünmesini sağlamak için botulinum toksini ile deneyler yapmak üzere FDA'dan onay istedi ve bu onay alındı. Bu çalışma ve Botulinum toksininin kozmetik bir cerrahinin kozmetik komplikasyonunu tedavi etmek için kozmetik kullanımına ilişkin vaka raporu, kırışıklıkların spesifik tedavisine ilişkin ilk raporu ve 1989'da Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi dergisinde yayınlandı[96]. Amerikan Plastik Cerrahlar Derneği dergisinin editörleri, "toksinin estetik koşullarda ilk açıklanan kullanımının 1989'da Clark ve Berris tarafından yapıldığını" açıkça belirtmişlerdir [97]. 1987'de,

ikisi de Vancouver, British Columbia'da doktor olan Jean ve Alastair Carruthers, göz çevresine ve üst yüze enjeksiyon yapılan blefarospazm hastalarının ayrıca yüzdeki kaş arası çizgilerinin ("kaşlar arasındaki "kaş çatma çizgileri") azaldığını gözlemlediler. Alastair Carruthers, o dönemde başkalarının da bu etkileri fark ettiğini ve botulinum toksininin kozmetik potansiyelini tartıştıklarını bildirdi [98]. Diğer araştırmacıların aksine, Carruthers botulinum toksininin kozmetik amaçlı kullanılma olasılığından bahsetmekten fazlasını yaptı. Tek endişesi kaş çizgileri olan, aksi takdirde normal bireyler üzerinde klinik bir çalışma yürüttüler. Çalışmalarını 1987 ile 1989 yılları arasında gerçekleştirdiler ve sonuçlarını Amerikan Dermatolojik Cerrahi Derneği'nin 1990 yıllık toplantısında sundular. Bulguları daha sonra 1992'de yayınlandı [99]. Bu sonuç daha sonra diğer gruplar tarafından doğrulandı (Brin ve Monte Keen yönetimindeki Columbia Üniversitesi grubu [100]. FDA, kapsamlı klinik çalışmalardan sonra 2002'de kaşlar arasındaki orta ila şiddetli kaş çatma çizgilerinin (kaş arası çizgiler) görünümünü geçici olarak iyileştirmek için botulinum toksin tip A'nın (Botox Cosmetic) onayını duyurdu. Bundan çok önce, botulinum toksin tip A'nın kozmetik kullanımı yaygınlaştığı ve Botulinum toksin tip A'nın, diş eti gülümsemelerinin tedavisinde de kullanıldığı bilinmekteydi [48].

William J. Binder 2000 yılında yüz çevresine kozmetik enjeksiyon yaptıran kişilerin kronik baş ağrılarından kurtulduklarını bildirdi [101]. Bunun başlangıçta kas gerginliğinin azalmasının dolaylı bir etkisi olduğu düşünüldü ancak daha sonraları toksinin artık periferik nosiseptif nörotransmitterlerin salınımını inhibe ederek migren baş ağrısından sorumlu merkezi ağrı işleme sistemlerini baskıladığı gösterildi [102,103]. Botulinum toksin tip B, Aralık 2000'de servikal distoni tedavisi için FDA onayı aldı [104]. Ocak 2014'te Botulinum toksini, yetişkinlerde felçle ilişkili alt ekstremitte spastisitesi nedeniyle oluşan ayak bileği sakatlığının

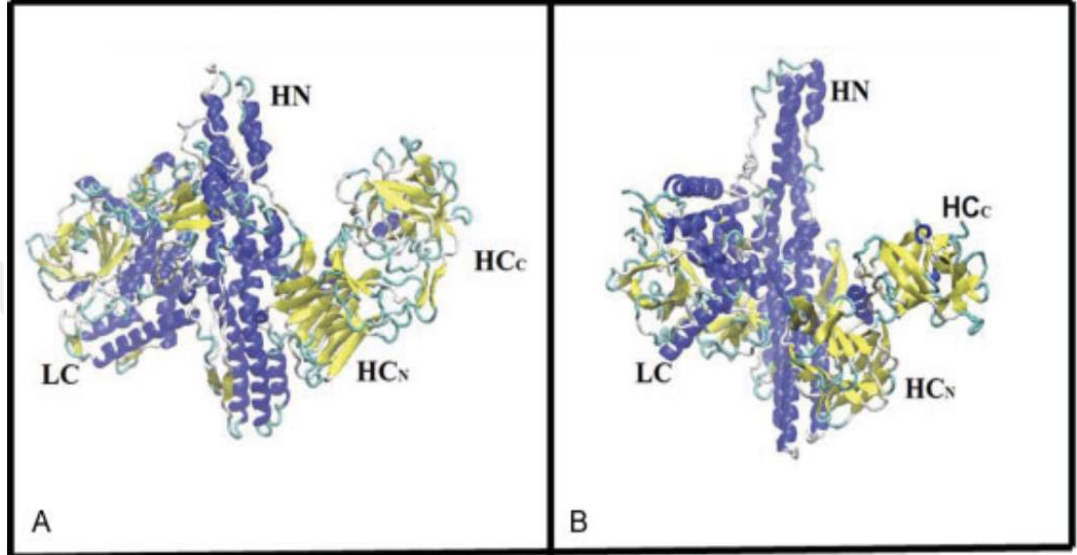
tedavisi için İngiltere İlaç ve Sağlık Ürünleri Düzenleme Ajansı tarafından onaylandı.

2.3.2. Moleküler Yapısı ve Etki Mekanizması

Botulinum nörotoksinleri (BoNT'ler), ölümcül felçli hastalık botulizmine neden olan son derece zehirli protein toksinleridir. Bakterilerde doğal olarak birkaç toksik olmayan nörotoksin ilişkili protein (NAP) ile üretilirler ve birlikte bilinen en büyük bakteriyel toksin kompleksi olan bir progenitor toksin kompleksi (PTC) oluştururlar. Botulinum nörotoksinleri (BoNT'ler), Clostridium botulinum bakterisi ve daha az sıklıkla Clostridium butyricum ve Clostridium baratii tarafından salgılanır. En az 40 farklı alt tip içeren A'dan G'ye kadar (BoNT/A–G) tanımlanan yedi BoNT serotipi vardır [105]. Sekizinci bir serotip olan BoNT/H son zamanlarda bildirilmiştir ancak daha fazla doğrulama beklemektedir [106,107]. BoNT/A, B, E ve F'nin hem insanlarda hem de diğer hayvanlarda botulizme neden olduğu bilinirken, BoNT/C ve D esas olarak sığırları, kümes hayvanlarını ve yabani kuşları etkiler [108]. Tüm BoNT'ler, periferik kolinerjik sinir terminallerinde nörotransmisyonu bloke ederek etkilerini gösterirler [109].

Botulinum nörotoksini, yaklaşık 150 kDa moleküler kütleye sahip tek bir polipeptit zinciri olarak üretilir. Bu öncü protein daha sonra, 100 kDa ağır zincir (AZ) ve 50 kDa hafif zincirden (HZ) oluşan tamamen aktif bir nörotoksin üreten, açığa çıkmış bir protein duyarlı halkada bakteriyel proteazlar tarafından kesilir (Şekil 4). HZ ve AZ, kovalent olmayan protein-protein etkileşimleri, korunmuş bir zincirler arası disülfür köprüsü ve AZ'den uzanan ve HZ'in etrafını saran bir kuşakla bağlı kalır [110]. Toksinin hücre içi etkisini gösterebilmesi için bahsedilen zincirler arası bağların zayıflaması gerekli bir ön koşuldur [111]. BoNT'lerin üç boyutlu yapıları, hücre toksikasyon mekanizmalarıyla işlevsel olarak ilişkili olan üç ayrı

alana katlandıklarını ortaya koymaktadır. N-terminal alanı, Zn^{2+} bağımlı bir endoproteaz olan 50 kDa LC'dir. 100 kDa HC, bir N-terminal translokasyon alanı ve bir C-terminal reseptör bağlama alanı içerir [48].



Şekil 4: (A) Botulinum nörotoksininin 3 boyutlu yapısı. Bağlayıcı alan ağır zincir N-terminali (AZN) ve ağır zincir C-terminali (AZC), translokasyon alanı (HN) ve katalitik veya endopeptidaz alanı (LC) gösterilmiştir. Alfa-heliks ve β tabakaları sırasıyla mavi ve sarı renkle gösterilmiştir. BoNT-E hariç tüm BoNT serotipleri dört alanının benzer yapısal organizasyonunu paylaşır. (B) Toksik olmayan nonhemaglutinin A'nın (NTNHA; PDB Kimliği: 3VUO) yapısı. Kristal yapıda, NTNHA'nın alan organizasyonu BoNT-A'ya benzerdir. (Raj Kumar ve ark. çalışmasından [112])

Botulinum nörotoksinleri, *Clostridium botulinum* bakterisinden multimerik kompleksler şeklinde salgılanır ve nörotoksin genine bitişik genler tarafından kodlanan bir dizi toksik olmayan protein içerir [113]. Bu protein komplekslerinin boyutları 300 kDa ile 900 kDa arasında değişir ve üç progenitör toksin formunda bulunur: orta, büyük ve ekstra büyük formları. M formu nörotoksin (150 kDa) ve nörotoksin bağlayıcı protein (NBP)18 veya 12S moleküler boyuta sahip toksik

olmayan nonhemaglütinin bileşeni (NHB)19 olarak adlandırılan toksik olmayan bir protein bileşeninden (120 kDa) oluşur (kompleks formların moleküler boyutu sedimantasyon denge değerleri olarak ifade edilir). Büyük formunun moleküler ağırlığı yaklaşık 500 kDa ve moleküler boyutu 16S'dir. Ekstra büyük formu yaklaşık 900 kDa ve 19S'dir. Büyük ve ekstra büyük kompleksler 150 kDa nörotoksin kısmından ve bir NHB/NBP ve birkaç hemaglutinin proteininden (HA) oluşan bir kompleks protein setinden oluşur. Bunlar nörotoksin ilişkili proteinler (NİP'ler) ve ayrıca kompleks veya aksesuar proteinler olarak adlandırılır. Kovalent olmayan etkileşimler yoluyla stabilize edilen NİP'ler, BoNT kompleksinin toplam kütesinin %70'ine kadarını oluşturur [114].

Günümüzde, başlıca BoNT terapötik ürünleri arasında BoNT-A kompleksi (BOTOX ve Dysport, Galderma Laboratories, L.P. olarak pazarlanmaktadır), BoNT-B kompleksi (ABD'de MYOBLOC, Solstice Neurosciences, LLC ve Avrupa'da NeuroBloc, Eisai Manufacturing Inc. olarak pazarlanmaktadır) ve NAP içermeyen izole edilmiş BoNT-A (XEOMIN, Merz North America, Inc. olarak pazarlanmaktadır) yer almaktadır. NİP'lerin herhangi bir terapötik rolü olmamasına rağmen, bunlar BoNT formülasyonunun stabilitesinde ve terapötik amaçlar için enjekte edilen BoNT'nin difüzyonunda rol oynayabilir[115, 116]. Genel olarak, kompleks formdaki BoNT, pH, sıcaklık ve proteazlar gibi çevresel strese dayanıklıdır. Ancak, ticari ürünler ürünün stabilitesini etkileyebilecek ek formülasyonlar içerir. BoNT-A kompleks preparatlarında, sodyum klorür (BOTOX) veya laktoz (Dysport) eklenmesi BoNT'nin sterik konformasyonunu korur [117]. Yüzey adsorpsiyonundan kaynaklanan kaybı önlemek için insan serum albümini de eklenir. Toksin daha sonra dondurularak (Dysport) veya dondurulmadan (BOTOX) kurutulur. Bunlar ve saf BoNT-A ürünü olan XEOMIN,

fizyolojik pH'a yakın tutulan tuzlu çözeltiyle yeniden oluşturulan liyofilize ürünlerdir.

Terapötik BoNT preparatı hedef dokuya enjekte edildiğinde, periferik kolinerjik sinir terminallerine giren ve nöroekzositoz aparatının önemli bileşenleri olan proteinleri parçalayan bir metaloproteinaz gibi davranarak nörotransmitter salınımının kalıcı ancak geri dönüşümlü bir inhibisyonuna neden olur. BoNT etkisinin kesin moleküler mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır, ancak mevcut deneysel kanıtlara dayanarak, BoNT zehirlenmesinin toksinin işlevsel alanlarının her birini içeren çok adımlı bir süreçle gerçekleştiğine inanılmaktadır [115]. Bu adımlar, nörotoksinin presinaptik sinir terminalindeki belirli reseptörlere bağlanmasını, toksinin sinir hücresine içselleştirilmesini ve endozomal membran boyunca taşınmasını ve nörotransmitter salınımı için önemli proteinlere karşı hücre içi endopeptidaz aktivitesini içerir.

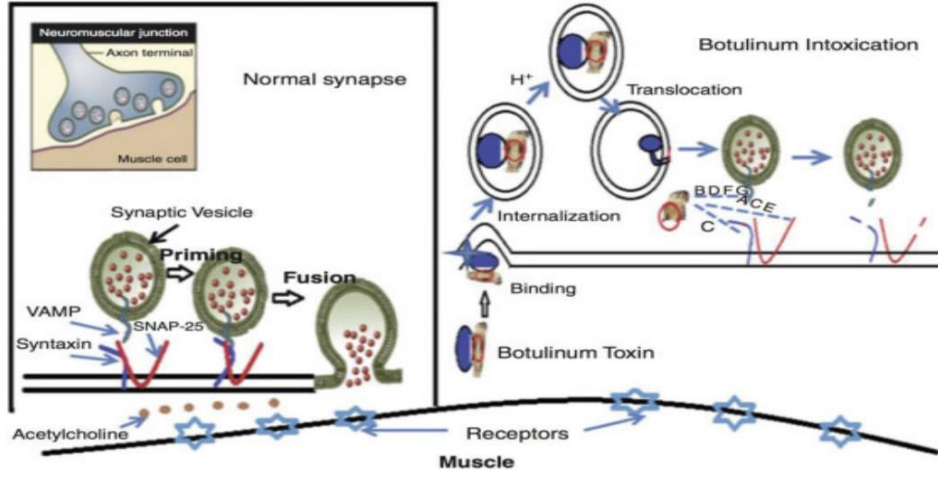
Botulinum nörotoksinleri hedef hücreleri için yüksek afiniteye ve özgüllüğe sahiptir ve nöronal hücre yüzeyinde bağlanmak için iki farklı koreseptör kullanır. BoNT'lerin nöromusküler kavşağa bağlanması, reseptör bağlayıcı ağır zincir alanı ile özellikle nöronlarda zenginleştirildiği bilinen GT1b, GD1b, GQ1b olmak üzere karmaşık polisialogangliosidler arasında sıkı bir ilişki içerir [118,119]. BoNT-A, -B, -E, -F ve -G, gangliosidler için korunmuş bir bağlanma cebine sahipken, BoNT-C ve BoNT-D, gangliosidler için iki bağlanma yeri gösterir.

Gangliosidlere bağlandıktan sonra, zarla çevrili gangliosid-toksin kompleksi toksin spesifik protein reseptörüne ulaşmak üzere hareket eder. Farklı BoNT serotipleri farklı protein reseptörlerine bağlanır. Sinaptik vezikül glikoproteini 2 (SV2; izoformlar A-C), bir sinaptik vezikül glikoproteini, BoNT-A, -D, -E, -F ve -G için bir reseptör olarak tanımlanmıştır [120]. Sinaptik vezikül

proteini olan sinaptotagmin, botulinum nörotoksini (BoNT) tipleri B ve G için reseptör olarak tanımlanmıştır [118]. Botulinum nörotoksini G, sinaptotagminin intraluminal alanına bağlanırken, BoNT-A, -D, -E ve -F, SV2'nin 4. halkasına bağlanır. Botulinum nörotoksini C, nöronal hücrelerde tanımlanmış bir protein reseptörü olmayan tek serotiptir. Yukarıda belirtildiği gibi, BoNT-C'nin iki ganglioside bağlanmasının yanı sıra fosfoinozitid içeren lipozomlara bağlandığı da bildirilmiştir [121].

Nöronal hücre yüzey reseptörlerine bağlandıktan sonra, BoNT reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınır [46,110]. BoNT'lerin erken endozomlara dahil edilmesinden sonra, endositotik veziküllerin asidik ortamının nörotoksin yapısında konformasyonel bir değişikliğe neden olduğuna inanılmaktadır. Ağır zincir sinaptik vezikül membranına sokulur ve HZ'i sitozole taşıyan bir transmembran protein iletim kanalı oluşturur [109].

Nöronal sitozole internalizasyondan sonra, BoNT'ler toksik etkilerini, veziküler trafiğe ve nörotransmitter salınımına temel olan üç SNARE proteininden birini spesifik olarak kesen LC'nin metalloproteaz aktivitesi sayesinde gösterirler. Spesifik SNARE protein hedefleri ve hidrolitik kesme yeri yedi BoNT serotipi arasında değişir. 14 BoNT serotipleri A ve E, SNAP-25'i benzersiz bir peptit bağında spesifik olarak keser. BoNT serotipleri B,D,F ve G, VAMP/sinaptobrevin'i farklı tek peptit bağlarında hidrolize eder ve BoNT-C hem sintaksini hem de SNAP-25'i keser (Şekil 2) [110].



Şekil 5: Botulinum nörotoksininin (BoNT) etki mekanizması.

(Sol) Normal sinaptaki presinaptik ve postsinaptik olaylar. (Sağ) BoNT'inin neden olduğu sinaptik olaylar. Adımlar bağlanma, hücre içine alınma, translokasyon ve endopeptidaz aktivitesidir (Singh ve ark., 2014'ten.[110]).

Yukarıda belirtildiği gibi, reseptör aracılı endositoz için ikili reseptör modeli önerilmiştir. Sinaptik vezikül glikoproteini 2C (SV2C) ve gangliosidler (GT1b/GD1b), BoNT'ler için reseptörler olarak tanımlanmıştır. SV2C, CaCo-2 veya m-ICel2 hücreleri gibi bağırsak hücrelerinde de eksprese edilir. Bu nedenle, nöronal ve bağırsak hücrelerindeki BoNT reseptörlerinin aynı olması mümkündür. Ancak, BoNT-A AZ'in bağırsak hücrelerine bağlanması, nöronal hücrelere kıyasla çok daha düşüktür. Bunun nedeni, BoNT-A'nın bağırsak reseptörlerine düşük afinitesi veya bağırsak hücrelerinde BoNT-A için daha az sayıda reseptör olması olabilir. Nöronal ve bağırsak hücre zarlarında BoNT reseptörlerinin herhangi bir özel mikrotopografik dağılımı açısından doğru lokalizasyonu henüz belirlenmemiştir. Ancak, BoNT-A reseptörleri doğrudan kolesterolle zenginleştirilmiş mikrodomanlerde lokalize görünmüyorken, SNARE'ler submikrometre boyutlarında yoğunlaşmaktadır [122-124].

BoNT'nin istemsiz kas aktivitesinde inhibitör potansiyeli onu yararlı bir terapötik molekül yapar. Sinir terminalinin BoNT'ler tarafından etkilenmesi tamamen geri dönüşümlüdür ve nörodejenerasyona yol açmaz [125]. BoNT etkileşimi sırasında, denervasyonun aksine, sinir terminali ile kas lifi arasındaki temas motor nöronların kaybı olmadan sürdürülür. BoNT etkileşim süreci birkaç haftadan aya kadar sürse de geçicidir. Histolojik çalışmalar iyileşme sürecinin iki aşamada gerçekleştiğini göstermiştir [126]. Başlangıçta sinir filizlenmesi meydana gelir ve yeni sinapslar gelişir, ayrıca vezikül geri dönüşüm oranı artar. İkinci aşamada, sinir girintisinin dalları filizlenir ve işlevsellik normale döner. İyileşme süresi, serotiplere ve intoksikasyonun yerine göre değişir [127].

2.3.3. Sıçanlarda Uygulanacak BoNT-A Dozları ve BoNT-A'nın Vasküler

Etkilerinin Başlangıç Süresi

Aoki 2002 yılında farelerde yaptığı çalışmada BoNT-A için maksimum kas paralizisi oluşturan dozu 29 ünite/kg, hayvanların %50 sine öldürücü olan dozu 81,4 ünite/kg, etki süresini 36 gün olarak tanımlamıştır [128]. Billante ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BoNT-A dozları 350-400 gr ağırlığındaki sıçanlarda gastrokinemius kasına uygulanmış ve şu şekilde sınıflandırılmıştır [129]:

- ☐ Minimal doz; 0,625 ünite
- ☐ Düşük doz; 1,25 ünite
- ☐ Orta doz; 2,5 ünite
- ☐ Yüksek doz; 5 ünite
- ☐ Çok yüksek doz; 10 ünite

Arnold ve arkadaşları 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında perivasküler olarak 5 ünite BoNT-A uygulaması sonrası 1, 14. ve 28. günlerde

damar çaplarını mler; BoNT-A'nın uygulama sonrası 1.gününde bile hem arter, hem de ven çaplarında anlamlı artıa yol açtığını, bu artışın 14.gün ölçümünde en yüksek seviyeye çıktığını ve 28. günde halen yüksek olduğunu belirtmişlerdir [130]. Duman ve ark.larının 2021 yılında yaptıkları in-vitro çalışmada BoNT-A ile n tedavinin, hem arteryel hem de ven greftlerinin spazmında papaverin ile n tedaviye yanıtı karılatırılmı; BoNT'nin vazospazma etkilerinin hemen balayabildiği, inhibisyon etkisinin çözeltinin konsantrasyonuna, damarı daraltacak maddeye ve greftin yapısına bağlı olarak devam ettiği ve 2. saatte arttığı gösterilmiştir [9].

Sketelji ve arkadaşlarının 1983 yılında sıçan arka bacağında BoNT ile yaptıkları çalışmada 5U BoNT ile sıçanın tüm ekstensör ve fleksr kaslarında paralizisi oluştuğu bildirilmiştir [131]. Kemirgenlerde BoNT-A enjeksiyon sonrası etkisinin 24. saatte baladığı ve 4-6 hafta sürdüğü belirtilmektedir [132].

2.3.4. Vasküler Spazm, Trombüs ve Botulinum Toksin

Botulinum toksini (BoNT), uygulandığı doku türüne (nöronal, perivasküler, intramusküler) ve etkileşime girdiği nörotransmitter veya reseptöre bağlı olarak birden fazla farklı etkiye sahip olabilir [133]. Çoğu klinisyen, BoNT'nin asetilkolin salınımının blokajı ilişkili etkilerine aınadır. Ancak, BoNT'in norepinefrin içeren veziküllerin sinaptik salınımını da bloke ettiği daha az bilinmektedir [134,135]. Norepinefrin aracılı vasküler etkilerin etkisinin başlangıcı, asetilkolin aracılı iskelet kası etkilerine göre daha hızlıdır. Norepinefrin salınımının engellenmesi etkisi, kompleks bölgesel ağrı sendromu tip 2'de toksinin sempatik blokaj etkisiyle ağrıyı azaltmasında etkilidir [136]. Aynı zamanda BoNT vasküler medyatörlerin ekspresyonunu değiştirir ve anjiyogenezi teşvik eder [71,137].

BoNT'in 7 serotipi vardır ve sadece A ve B serotipleri insanlarda klinik kullanım için ticari olarak mevcuttur. Her serotip, benzersiz nöronal protein etkileşimleri ve farmakolojik ve biyolojik etkileri olan bir proteazdır. Her serotipin farklı bir etki başlangıcı zamanlaması, etki süresi ve etkilenen belirli nörotransmitterleri vardır. Botulinum toksini tip A, tuzlu suda yeniden oluşturulması gereken liyofilize bir toz olarak vakumla kurutulur ve 3 mevcut formu vardır: Botox (onabotulinumtoxinA) (Allergan, Madison, New Jersey); Xeomin (incobotulinumtoxinA): (Merz Pharma, Raleigh, North Carolina); ve Dysport (abobotulinumtoxinA): (Ipsen, Cambridge, Massachusetts). Botulinum toksini tip B, pH'ı düşürülmüş bir sıvı olarak hazırlanır ve Myobloc (rimabotulinumtoxinB) olarak bilinen 1 formu vardır: (Supernus Pharmaceuticals, Rockville, Maryland). Botulinum toksini tip A'nın insanlarda otoimmün hastalıklardan kaynaklanan şiddetli periferik arter vazospazmında (Raynaud) iskemik ağrı ve ülserasyonu tedavi etmek için kullanıldığı bilinmektedir [138,139]. Ancak, kronik vazospazmı tedavi etmek için BoNT-A'nın deri altı perivasküler enjeksiyonunun kullanımı, erken veya potansiyel olarak hastalığı değiştiren bir müdahale olarak düşünülmekten ziyade genellikle son çare kurtarma tekniğidir. Bunun nedeni 2 ana faktör olabilir: (1) vazospazmı tedavi etmek için BoNT uygulamasına yönelik FDA tarafından onaylanmış bir endikasyonun olmaması ve (2) etki mekanizması ve vasküler etkileri konusunda farkındalık eksikliği.

Daha önce yapılan hayvan çalışmalarının dahil edildiği bir meta-analiz çalışmasında, perivasküler BoNT-A ve/veya BoNT-B uygulamasının perfüzyonu iyileştirdiği, arteriyel ve venöz dilatasyonu artırdığı, trombozu azalttığı ve kritik iskemik modellerde hem random patern hem de pediküllü flep sağkalımını iyileştirdiği, kan akışını 1 hayvan çalışması hariç tümünde kontrollere göre artırdığı

sonuçları elde edilmiştir [140]. Vasküler kan akışının artması, BoNT uygulamasından sonra lazer doppler perfüzyon taramalarında ve transkutanöz oksijen satürasyonu ölçümlerinde iyileşme yoluyla klinik olarak insan çalışmalarında da gözlemlenmiştir [141].

Hayvan modellerinde, BoNT prosedürle eş zamanlı olarak veya ön tedavi olarak uygulandığında, vasküler faydalar birkaç dakika gibi kısa bir sürede hızla ortaya çıkar [135] ve birkaç hafta boyunca sürebilir[130]. Bu, sadece birkaç saat süren papaverin veya lokal anestezikler gibi diğer yaygın vazodilatasyon maddelerden önemli ölçüde daha uzundur [142].

Hayvan çalışmaları BoNT'nin vazodilatasyon etkisi hem arter hem de ven üzerinde gösterilmiş, arteriyel ve venöz dilatasyon sırasıyla ortalama %39,5 ve %46,3 arttığı gözlemlenmiştir[140]. Başka bir çalışma ile, BoNT ile tedavi edilen damarların vazodilatasyon nedeniyle onarılmasının daha kolay olduğunu gösterilmiştir. Hem arter hem de ven için onarım sürelerinin kantitatif olarak daha hızlı olmasıyla ve cerrahın BoNT ile tedavi edilen damarların %60 oranında onarımının daha kolay olduğuna karar vermesiyle kalitatif olarak kanıtlanmıştır [143]. BoNT uygulamasından sonra vazodilatasyonun hızlı başlaması ve vazospazmın önlenmesi, lokal anestezik veya papaverin kaynaklı vazodilatasyona benzer, ancak toksinin etkisi bu medikal ajanlara göre daha uzun sürelidir [144]. Eksternal olarak damarın BoNT ile irrigasyonu, vazospazm ve tromboz riskini arttıracak vasküler klemple ilişkili endotel hasarını önleyebildiği sıçan femoral arterindeki ezilme yaralanması çalışmasında da gösterilmiştir [145].

Goldberg ve ark.larının meta-analiz çalışmasında trombozun başlıca nedenlerinden birinin vazospazm olduğu ve BoNT uygulamasından sonra, salin kontrolüyle karşılaştırıldığında, hem arter hem de venlerde %62 oranında mutlak

tromboz riski azalması olduğu görülmüştür [140]. BoNT'in vasküler açıdan faydalı etkilerine dair bir diğer kanıt, anastomoz sonrası buzla muamele ve eş zamanlı sistemik fenilefrin uygulamasıyla aşırı vazospastik zorluğa maruz bırakıldığı bir hayvan çalışmasında vasküler anastomozdan sonra BoNT ile muamele edilmiş anastomozlarınun tromboza karşı direnç göstermiş olmasıdır [61].

Tekrarlayan postoperatif vazospazm ve trombozla komplike olan ve iki kez kullanılan ven greftinin revizyonu yapılan çift ayak parmağı replantasyon vakasında BoNT kullanımıyla parmakların kurtarıldığı bir vaka ile BoNT'nin vazospazm ve trombozu önleme etkisi insanlarda da gündeme gelmiştir [146]. Bu vaka raporu, BoNT'nin insanlarda vasküler onarımla eş zamanlı uygulanmasının faydalı olabileceğini göstermiştir [147]. BoNT, postoperatif kontrol anjiyogramlarda greft vazospazmı göstermeyen küçük bir vaka serisinde klinik serebral vasküler baypas cerrahisi sırasında vazospazmı önlemiştir [67]. Botulinum toksininin, vasküler etiyojisi olan kronik migren baş ağrılarını önleme ve tedavi etmede kullanım için FDA onaylı bir endikasyonu vardır. Birçok çalışma, BoNT-A'nın iskemik ağrıyı azalttığını, ülser iyileşmesini iyileştirdiğini ve Raynaud atak sıklığını ve şiddetini azalttığını göstererek periferik arter vazospazmlarının tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir [138,139]. Bu, BoNT-A'nın hem endotelin-1- hem de 5-hidroksitriptamin kaynaklı kasılmaları engellediğini belirleyen bir insan radyal arter greft çalışmasında gösterilmiştir. Bu çalışmada, papaverinin aksine, BTX-A'nın spazmı önleme etkinliği zamanla azalmadığı görülmüştür [148]. Son olarak, 1 veya daha fazla iskemik parmağı olan 11 hastanın dahil edildiği bir klinik çalışmada, BoNT olmadan yönetilen 6 kişilik bir grupta görülen %83'lük bir amputasyon oranına karşın, BoNT ile yönetilen 5 hastada amputasyon oranının %0 olduğu gözlenmiştir [149].

2.4. Mikrocerrahi

2.4.1. Mikrocerrahi Tarihçesi

Mikrocerrahi; milimetrik vasküler ve nöral yapıların onarılmasına olanak sağlayacak cerrahi aletler ve loop, ameliyat mikroskobu gibi optik cihazlar kullanarak onarılmasını sağlayan cerrahi disiplindir. 1950'li yıllarda operasyon mikroskobunun kullanılmasıyla gelişen mikrocerrahi uygulamalar günümüzde 0,8 mm'nin altındaki damarların anastomoze edilmesini sağlayacak duruma gelmiştir.

Mikrocerrahi tarihçesi

Vasküler yapıların cerrahisi ile ilgili ilk operatif girişimler 16 ve 17. yüzyıllara dayanmaktadır. 1759'da Hallowell yaralanan damarların uçlarını onarma fikrini ilk kez başarıyla uygulamıştır ve parsiyel yaralanmış brakial arter onarımını gerçekleştirmiştir [150]. 1877 yılında Nikolay Vladimiroviç Eck, köpeklerde portal ven ile vena kava inferioru uç-yan anastomoz etmiştir. 1889'da Jassinowski separe dikişler ile uç uca arter onarımı işlemini ilk kez koyun karotis arterinde başarmıştır. 1897'de Murphey arter ve ven anastomozlarında kullanılabileceğini belirttiği invaginasyon tekniğini yayınlamıştır [151]. 1902 yılında Alexis Carrel, uç uca damar onarımlarında halen kullanılmakta olan triangülasyon yöntemini tanımlamıştır [152]. Hoepfner 1903 yılında köpeklerde ilk ekstremité replantasyonunu gerçekleştirmiştir. Goyanes ve Lexter 1906 ve 1907 yılında otolog ven grefti kullanarak vasküler onarımlar yapmışlardır. Carrel ve Gutrie birçok deneysel transplantasyon modelinde çalışmışlar [152] ve Carrel bu çalışmaları nedeniyle 1912 Nobel Tıp ve Fizyoloji Ödülü'ne layık görülmüştür. Carrel ve Gutrie öncesinde anastomoz uygulaması sırasında sutür materyalinin intimadan geçip geçmemesi gerektiği konusunda bir fikir birliği yokken ilgili çalışmalar sonrasında sutür materyalinin intimadan da geçmesinin tromboz oranlarını azalttığı

sonucuna varılmıştır. Hallowel ve Holt 1918 yılında heparini bulmuştur [153]. 1933 yılında Charles ve Scott heparini saflaştırarak klinik uygulamasını kolaylaştırmıştır [44]. Heparinin bulunmasıyla mikrovasküler cerrahi uygulamalarda tromboz sıklığı ciddi anlamda azalmıştır. 1921 yılında Nylen ve 1923 yılında Holmgren kulak burun boğaz operasyonlarında monooküler ve binoküler mikroskobu kullanmışlardır. 1950'de Perrit göz operasyonlarında binoküler mikroskop kullanmıştır. İlk ameliyat mikroskobu 1951 yılında Littmann tarafından geliştirmiş ve 1953 yılında ticari kullanıma sunulmuştur. Tubingen ve Barraquer operasyon mikroskobunu 1953 yılından itibaren oftalmoloji alanında kullanmaya başlamışlar ve birçok mikrolet geliştirmişlerdir. 1950'lerin sonlarında Jacobson ve Donaghy, ameliyat mikroskobunu intrakraniyel mikrovasküler cerrahide kullanmaya başlamışlardır. 1961 yılında Jacobson ve Suarez, sıçanlarda ortalama 1,6 mm çaptaki damarları operasyon mikroskobu kullanarak %100 başarıyla onardıklarını yayınlamışlardır. 1962 yılında Malt ve McKhann ilk başarılı kol replantasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yine 1962 yılında Kleinert ve Kasdan ilk parmak revaskülarizasyonu operasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 1965 yılında ilk başarılı başparmak replantasyonu Komatsu ve Tamai tarafından yapılmıştır. 1965'te Yaşargil ve Donaghy orta serebral arter tıkanıklığı olan hastalarında superfisyal temporal arter ve orta serebral arter arasında ekstrakraniyel-intrakraniyel şant girişimlerini ve bu girişimlerde vasküler greft kullanımlarını tariflemişlerdir [152]. Serbest doku aktarımları ise 1968 yılında McLean ve Buncke tarafından omentum flebi ile saçlı deri rekonstrüksiyonu yapılmasıyla başlamıştır. 1973 yılında Daniel ilk serbest inguinal flep operasyonunu, Taylor ise ilk serbest fibula flebi operasyonunu gerçekleştirmiştir [152]. Ülkemizde ilk mikrocerrahi girişimler, 1970'li yıllarda Prof Dr. Ayan Gülgönen ve ark. tarafından İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesinde gerçekleştirmiş olup bu operasyonlar ülkemizin ilk

parmak replantasyonu ve ilk serbest doku aktarımı operasyonlarıdır. Yine bu yıllarda, yurtdışından mikrocerrahi alet teminindeki problemler nedeniyle ilk yerli damar aproksimatörü Prof. Dr. Tahir Hayırlıoğlu tarafından saç tokasından yapılmış ve İstanbul Tıp Fakültesindeki mikrovasküler uygulamalarda kullanılmıştır.

2.4.2. Mikrovasküler Anastomoz Teknikleri

Mikrovasküler anastomozların uygulanmasında birçok teknik kullanılmaktadır. Her tekniğe özgü farklı avantaj ve dezavantajlar mevcuttur. Farklı klinik durumlarda farklı yöntemler kullanmak gerekebilmektedir. Anastomoz tipleri; uç-uca, uç-yan, uç-yan dal, uç içinde uç (sleeve) anastomoz olarak alt başlıklara ayrılabilir [154].

a. Anastomoz tipi

- 1) Uç-uca anastomoz
- 2) Uç-yan anastomoz
- 3) Uç-yan dal anastomozu
- 4) Uç içinde uç anastomoz
- 5) Manşet teknikleri

1)Uç- uca Anastomoz: Uç-uca anastomoz ilk kullanılan ve en sık kullanılan tekniktir. Damar uçları yaklaşırtıcı bir mikrovasküler klemp ya da ayrı ayrı iki tekli mikroklemp ile bir araya getirilir. Önce arka duvar dikilir, ardından mikroklempler döndürülerek ön duvarın dikilmesi sağlanır.

2) Uç-yan Anastomoz: Uç uca anastomozun tersine, donör arterin hedef organlara kan akımını etkilemeyen bir yöntemdir. Donör arter üzerinde, alıcı arter çapından daha büyük bir delik oluşturulur ve alıcı arter bu bölgeye separe ya da

kontinü olarak suture edilir. Alıcı arter ve donör arter aksının dik olması türbülant akıma yol açabileceği için 30-60 derecelik bir açı ile anastomoz yapılmalıdır. Özellikle geniş ezilme yaralanması olan alt ekstremitte rekonstrüksiyonlarında donör arter akımını koruduğu için tercih edilmektedir [152].

3) Uç-yan Dal Anastomozu: Uç-yan anastomoz tekniği modifikasyonudur. Anastomoz major bir damar yerinde major damardan ayrılan bir damara uç uca anastomoz tekniği ile yapılır. Major bir damarın feda edilmesini gerektirmediği için avantajlı bir yöntemdir.

4) İç – içe Anastomoz (Sleeve anastomoz): Kaynak arterin küçük, amputat ya da flep arterinin de büyük olduğu durumlarda uygulanabilir. Distal taraftaki damar proksimaldeki damarın üstüne geçirilir ve iki ya da 4 suture ile fiks edilir. Bu tekniğin avantajları, uç-uca anastomozdan daha hızlı olması, intima diseksiyonunun minimal olması, anastomoz hattında anevrizma bildirilmemesi ve radyasyona daha dirençli olmasıdır.

5) Manşet Teknikleri: Manşet teknikleri (Cuffing), anastomoz hattındaki küçük kaçaqları engellemek için kullanılmıştır. Bu uygulama terk edilmiştir. Bugünkü klinik bilgilerimiz küçük kaçaqların kontrollü kompresyon ile kendiliğinden duracağı, büyük kaçaqların ek sutureler gerektirdiği şeklindedir.

2.4.3. Suturelerin Yerleştirilmesi

Suture kullanılarak yapılan anastomozlarda hedef en az suture ile sızdırmaz bir anastomoz elde etmektir [155]. Sutureler damar duvarını tam kat geçmelidir. Damar duvarından parsiyel olarak geçen sutureler daha fazla media hasarına neden olur. Suture düğümlenirken damar uçları birbirlerine yaklaştırılmalı ancak sutureler arasında kalan dokular aşırı derecede sıkıştırılmamalıdır. Uygun gerimde ve uygun aralıklarla atılan sutureler yüksek patensi oranlarının sağlanmasında önemlidir. Aşırı

gergin ya da sık atılmış sütürler damar duvarında, özellikle media tabakasında nekroza yol açar ve bu bölgede oluşan skar, lümenin daralmasına, vasküler tromboz riskinin artmasına yol açar. Sütürler eşit aralıklarla, aşırı sık ya da seyrek olmadan yerleştirilmelidir. Son atılan iki sütür sırasında arka duvardan geçme riski yüksektir. Bunun nedeni sütürler atıldı a daralan aralıktan lümeni görmenin zorla masıdır. Harashina bu zorluğu açmak için, en son atılan iki ya da üç sütürün birlikte geçilmesini ve sırayla d   m atılmasını önermektedir [156]. Günümüzde, 0 ve 180 dereceye iki sütür yerleştirerek uygulanan biang lasyon tekniği en sık tercih edilen tekniktir ancak sütürlerin yerleştirilmesi için ilk triangülasyon metodu tarif edilmiştir. Sütürler 0,3 mm aralıklarla yerleştirilmelidir. Bu 0,9-1,0 mm çaplı bir damar için yaklaşık 8 sütür atılması gerektiği anlamına gelir. Sütürlerin d   mlenmesinde cerrahi d   m tekniği uygulanır. Kontin  diki ler kullanmak hızlı bir yöntemdir, ancak d   mlenirken aşırı gerginli e ba lı lümenin daralması, sütürün kopmasıyla anastomozun geniş bir segmentinin açıkta kalması gibi dezavantajları içerir.

2.4.4. Mikrocerrahi Uygulamalar Sonrasında Damar Duvarı İyileşme Süreci

Anastomoz sonrası iyileşme ve yeniden şekillenme aşamaları üzerine birçok çalışma mevcuttur ancak bu süreç henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Tarayıcı elektron mikroskop kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ışığında, patent bir anastomoz hattındaki değişiklikler şöyle sıralanabilir:

a. Cerrahi travma sonucu subintimal dokular kan ile temas eder. Buna ilk yanıt trombosit adhezyonu ve agregasyonudur. Trombositler GpIb reseptörleri ile kollajen liflere yapı ır. Anastomoz sonrası lümende ekspoze olan sütür materyali trombositler, pıhtılaşma elemanları ve fibrinle kaplanır.

b. 24 saat sonra trombosit aktivasyonu ve fibrin oluşumu maksimum seviyeye ulaşır. Lümende ekspozite olan suture materyali kalın bir trombosit-fibrin tabakasıyla kaplanır [157].

c. İkinci gün sonunda ise trombosit, fibrin ve kan ürünlerinden oluşan tabaka sınırlanır. Klemp ayakları arasında kalan endotel tamamıyla dökülür. Sutureler arasında kalan media tabakasında nekroz ortaya çıkmaya başlar [158]. 3. günde re-endotelizasyon başlar ve yaklaşık olarak 5-7. günlerde suture hattı endotelize olur. Endotel rejenerasyonu için 4 hipotez vardır. Bunlar; (1) Damar uçlarındaki intakt endotelden anastomoz hattı yönünde ilerleme, (2) Mediadaki düz kas hücrelerinin endotel hücrelerine dönüşümü, (3) Adventisyadaki fibroblastların endotel hücrelerine dönüşümü, (4) Dolaşımda bulunan kök hücrelerin hasarlanma bölgesine gelerek endotele dönüşümü hipotezleridir [10].

d. 7. günde endotelizasyon anastomoz hattının dışına yayılır. Endotelizasyon, 3. gün başlar ve 7-10. günler arasında tamamlanır.

e. 2-3. günlerde subintimal bölgeye göç etmeye başlayan media düz kas hücreleri 10. günde belirgin bir subintimal hiperplaziye neden olur. Bu aşamada intima media kalınlığının 2/3'üne kadar ulaşabilir. Bu kalınlaşmaya mediadan göç eden düz kas hücreleri yanında, miyofibroblastlar ve makrofajlar sebep olur. Travma sonrası endotelial kayba bağlı olarak trombosit aktivasyonu sonucu salgılanan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), düz kas hücre göçü ve proliferasyonunu tetikler [159].

f. İkinci haftanın sonunda re-endotelizasyonun geç bulguları görülür. Ekspozite suture materyalleri lümene uzanmış düzensizlikler olarak görülebilir. Suture hatları arasında kalan medianın beslenmesi bozulur ve düz kas nekrozu gelişir (Bu durum gergin düğüm atılarak yapılan anastomozlarda daha belirgindir). Bu durum

anastomoz hattı düzeyinde damar duvarında düzensizlik gelişimine yol açar. Damar duvarı düzensizlikleri laminer kan akımını bozarak tromboz için riskli bir durum oluşturabilir. Bu görünüm re-modelling sonucu uzun sürede (3-6 ay) düzelir. Medial düz kas nekrozu, endotel nekrozu gibi klemp ayakları arasında kalan alanlarda yaygın biçimde görülmez. Düz kas nekrozunun esas sebebi sütür hatlarındaki aşırı gerginliktir. Bunun nedeni Morrison tarafından düz kasların hipoksi toleransının yaklaşık 2 saat olmasına ancak endotelin hipoksiye toleransının 10 dakika olmasına bağlanmıştır [160]. Ancak 30gr/mm² üzerindeki basınçlar süreden bağımsız olarak media düz kas nekrozuna neden olabilmektedir [161]. İnflamasyon en yoğun olarak adventisyada izlenir. Bu nedenle geniş adventisyektomi inflamasyon ve skar oluşumunu arttırmakta ve anastomoz hatlarında stenoza yol açabilmektedir [162]. Başlangıçta yoğun lenfositik infiltrasyon ikinci hafta sonunda azalır. Sütür materyallerinin tetiklediği yabancı cisim granulomları görülür.

2.4.5. Mikrovasküler Greft Uygulamaları

Mikrocerrahi uygulamalarında, anastomoze edilmek istenen damar uçları, travma nedeniyle oluşan uzun segment vasküler yaralanma ya da alıcı damarın uzak olması gibi nedenlerle her zaman doğrudan, uç uca getirilerek onarılamamaktadır. Bu durumlarda vasküler greftlerin kullanılması gündeme gelmektedir. Vasküler otogreftler olarak ven greftleri 1900'lü yılların başında Goyannes, Lexter ve Alexis Carrel tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Mikrovasküler otojen greftler ise ilk kez 1960'lı yıllarda Gazi Yaşargil tarafından kullanılmıştır [151]. Vasküler greftler otojen, allojen ya da sentetik olabilir. Kriyoprezerve edilmiş allojenik greftler ve polytetrafloroetilen (PTFE), polietilentereftalat (PET), poliüretan ya da silikon sentetik greftler literatürde yayınlanan çelişkili patensi oranları nedeniyle mikrovasküler cerrahi klinik uygulamalarında yaygın kullanım alanına sahip

değildir [163-165]. 60-90 µm fibriler uzunluğa ve 0,16-0,18 mm duvar kalınlığına sahip PTFE yapıdaki sentetik greftlerin mikrovasküler cerrahi uygulamalarda kullanıldığı deneysel ve klinik çalışmalar mevcuttur [166-168]. Bakteriyel kaynaklı selüloz kullanılarak üretilen sentetik greftlerin mikrovasküler cerrahi uygulamalarında kullanılabildiğini gösterir deneysel çalışmalar mevcut olsa da henüz klinik kullanım için yeterli veri yoktur. Mikrocerrahi uygulamalarda kolay ulaşılabilir olması, yeterli uzunlukta alınabilmesi ve donör saha morbiditesinin daha az olması gibi nedenlerle sıklıkla ven greftleri daha sık tercih edilmektedir [20,169,170]. Arter greftleri sınırlı uzunluğa sahip olmaları, donör saha morbiditeleri nedeniyle daha sınırlı uygulama alanına sahiptir [171]. Vasküler greft uygulamalarında, greftin her iki ucu, anastomoz yapılacak damar uçları arasında uç uca anastomoze edilebileceği gibi, vasküler greft alıcı damara uç yan, flep pedikülü ya da replantasyonu yapılan amputatın damarlarına da uç uca anastomoz edilebilir. Yine vasküler greft bifurkasyon bölgesi ile birlikte alınarak bir kaynaktan birden fazla alıcı damara kan akımı sağlanabilir. Bu yöntem kimerik flep uygulamalarında gündeme gelmektedir. Otolog vasküler greftler kullanılarak yapılan onarımlarda iyileşme, damar uçlarının doğrudan anastomozu ile yapılan onarımların iyileşmesi ile benzer özellikler gösterir ancak bazı farklılıklar da barındırır. Greftler donör sahadan alınıp anastomozlar tamamlanana dek avasküler kalmaktadır. Bu durum greft endotel hücrelerinin iskemi süresi ile orantılı olarak kaybı ile sonuçlanır [172]. Ayrıca özellikle ven greftleri ile yapılan arteriyel defekt onarımlarında, ven greftlerinin duvar yapısının zayıf olması ve greftin dilatasyonu nedeniyle duvar gerimi ve laminar akımın bozulması daha sık görülmektedir [172]. Bu durum intimal hiperplastik yanıtı arttırdığı gibi re-endotelizasyonu da uzatır. Re-endotelizasyonun uzaması neden olduğu pro-trombotik ve pro-inflamatuar tablo nedeniyle mikrotromboembolilere ve intimal hiperplastik yanıtın daha da

alevlenmesine yol açabilir [172,173]. Arter greftleri, duvar yapısı gereği arteriyel defektlere daha hızlı uyum sağlamaktadır. Bu nedenle daha az endotelial hasara maruz kaldıkları, re-endotelizasyonlarının daha hızlı sağlandığı düşünülmektedir. Bu NO ve CGRP gibi vazodilatör ve antiproliferatif mediyatörler daha erken ortaya çıktığı ve bu nedenle uzun dönem patensilerinin daha yüksek olduğu olarak yorumlanmaktadır [171].

2.5. Lazer Doppler Akımölçer ile Anastomoz Akımın Ölçülmesi

Lazer doppler akımölçer (LDA) ilk olarak 1964 yılında Riva tarafından tavşan retinasının kan akımını ölçmek için kullanılmıştır [174,175]. Daha çok farmakolojik deneyler, yara iyileşmesi, fizyolojik çalışmalar gibi deneysel tıp alanında kullanılırken [125,175]; son zamanlarda çürük, travma, osteotomiler, ortodontik hareketler ve materyallerin çevre ve diş üzerine etkisinin ölçülmesi gibi diş hekimliği uygulamaları [174], farmakoloji [176], iç hastalıkları [177], anesteziyoloji ve reanimasyon [178], kardiyovasküler cerrahi [179], dermatoloji [180], ilaç sanayi sektörü [181], nöroloji [182], ortopedi [183] gibi pek çok tıbbi branş alanında yapılan araştırmalarda kullanımı gündeme gelmiştir. Plastik ve rekonstruktif cerrahide ise flep kanlanması takibinde kullanılabilmektedir [183].

LDA cihazında ölçülen değer bir nesneden yansıyan radyasyonun frekansında oluşan doppler kaymasının nicel bir değerini yansıtmaktadır. Bu teknik güçlü bir monokromatik lazer ışını taşıyan bir optik prob vasıtasıyla doku kan akımının non invaziv ve sürekli ölçümüne imkan tanır [174]. Ölçüm için kullanılan ışığın dalga boyu genellikle 633-780 nm arasındadır [184]. Bu ışınlar düşük enerjili lazer olup ısı veya nekroza sebep olmaz ve dokular için tehlikeli değildir. Işının bir kısmı dokuda absorbe olurken büyük bir kısmı dokudan yansımaktadır. Işığı yansıtan statik nesneler dalga boyunu değiştirmezken ışığı yansıtan hareketli kan

hücreleri doppler kaymasına neden olmaktadır [174]. Ölçüm probunda ışını dokuya taşıyan verici fiber ve dokudan geri saçılan ışınları foto dedektöre taşıyan toplayıcı fiber bulunmaktadır. LDA’de ölçülen değer direkt olarak kan hücrelerinin sayısı ve hızıyla orantılıdır. Doppler kayması ayrıca nesnenin hareketlerine, gelen ışının yönüne ve dağılan ışının yönüne bağlıyken ve Doppler ultrasonografinin aksine kan akımının yönüne bağlı değildir [174]. LDA cihazlarından elde edilen veriler; hareketli kan hücrelerin konsantrasyonu (CMBC), hız (V), perfüzyon ünitesi (PU) ve total backscatter(TB)dır. Total backscatter fotodedektöre geri dönen ışın miktarıdır. TB değeri lazerin gücüne, doğrultusuna ve odaklamasına, ayrıca prob fiberler arası mesafe ve probdaki fiberlerin toplam alıcı alanına bağlıdır [185]. Bir formül içinde kullanılacak olursa bu 4 veri; $PU=CMBC \times V \times TB$ olarak kullanılabilir [174]. Bu ölçümler LDA cihazı üzerinde veya bilgisayar ekranında traseler ve rakamlar şeklinde not edilebilir [186]. Bu parametreler dışında LDA’de ölçülen değerler kan akımının miktarı kadar dokunun optik özelliklerine de bağlıdır [184]. Probun ucu tüm hareketleri kaydettiği için probun ölçüm yapıldığı sırada hareketsiz kalması gereklidir, aksi takdirde kan hücrelerinden başka yapılar da doppler kayması oluştururlar [174]. Araştırmamızda bu artefakt oluşumunu ölçüm yapacağımız damarı etrafındaki nörovasküler yapılardan bir fon aracılığıyla izole ederek önledik.

LDA avantajları; noninvaziv olması, kullanım kolaylığı, devamlı veya belli aralıklarla kayıt alabilmesidir. Dezavantajları arasında pahalı olması, elde edilen değerlerinin mutlak olmaması, her zaman kan akımı ile doğru ilişkide olmamasıdır ki bu noktada lazer stabilitesinde bozukluk ve çevreden gelen ışınlar büyük rol oynamaktadır[187, 188]. Cihaza bağlı parametreler; cihazın tipi, lazer ışığının dalga boyu, probun tipi, probun fiber seperasyonu, süre, sıcaklık, cihazın band genişliği ve yazıcı ayarlarıdır. Hastaya bağlı parametreler ise hastanın vücut sıcaklığı, kanın

pO₂, pCO₂, pH değeri, sistemik kan basıncı, kardiyak output, ilaç kullanımı, sigara içiciliği, diyet gibi durumlar ile hastanın fizik durumu önemlidir [174].

2.6. İndosiyanin Yeşili (ICG) anjiyografi ile Vasküler Akımın ve Kas

Perfüzyonunun Görüntülemesi

50 yılı aşkın süredir kardiyovasküler fonksiyon, hepatik klirens ve retinal anjiyografinin klinik değerlendirmesinde kullanılan suda çözünür bir bileşiktir. Kandaki veya dokudaki proteine bağlandığında, indosiyanin yeşili yaklaşık 750-810 nm arasındaki kızılötesi bölgede enerji yayar. Kısa plazma yarı ömrüne sahiptir ve bu da özellikle tekrarlanan değerlendirmeler gerektiğinde güvenlidir [189].

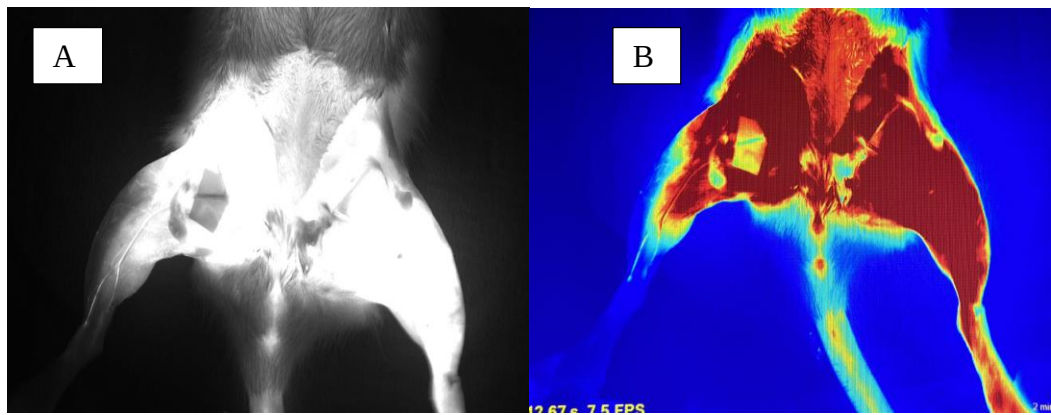
Near-InfraRed (NIR) floresan, iyi standardize edilmiş, tekrarlanabilir, yüksek tanısal kesinliğe ve teşhis doğruluğuna sahiptir. NIR floresan, dokulardaki ICG perfüzyonunu değerlendirmede başarılı bir araçtır. ICG'nin damarlanmayı değerlendirmeye yönelik özellikleri, başta plastik cerrahi olmak üzere çeşitli diğer cerrahi prosedürlerde başka uygulamaların geliştirilmesine olanak sağlamıştır [189].

İntraoperatif anjiyografi, klasik pediküllü flepler ve pediküllü perforatör flepler için deri perfüzyonunu değerlendirmek için kullanılır. İyileşme defektlerinin intraoperatif ICG boya dolum defektleri ile sistematik olarak korele olduğu gösterilmiştir [190].

ICG ile deri canlılığının değerlendirilmesine ilişkin makalelerin çoğu mastektomi flep nekrozunun öngörülmesiyle ilgilidir. Phillips ve arkadaşlarına göre, intraoperatif lazer destekli ICG anjiyografi, meme rekonstrüksiyonunda mastektomi deri flebi nekrozunu doğru bir şekilde öngörebilir. Doku genişletici-implant meme rekonstrüksiyonu uygulanan 51 hastada klinik sonuçları intraoperatif

anjiyografi ile prospektif olarak karşılaştırmışlardır. Nekroz tanısı için tekniklerinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %90 ve %100 olmuştur [191].

Serbest flep takibi için ICG kullanımını bildiren ilk makale 2002 yılında Holm ve ark. Tarafından yayınlanmıştır. Holm ve arkadaşları, 20 serbest flebi içeren prospektif bir çalışmada, klinik değerlendirme ile ICG anjiyografiyi karşılaştırmış ve intraoperatif bulgular ile klinik sonuçlar arasında güçlü bir korelasyon bulmuşlardır. ICG görüntüleme kullanmanın arteriyel spazmı, venöz konjesyonu ve bölgesel hipoperfüzyonu tespit etmede cerraha yardımcı olabileceğini göstermişlerdir [192]. Tekniğin kullanımında hastaya ICG enjeksiyonu yapılır ve ICG daha sonra harici bir lazer aracılığıyla uyarılır ve bir kamera çeşitli filtreler aracılığıyla aktiviteyi okurken yakın kızılötesi dalga boylarında floresan verir [193]. Kamera tarafından toplanan görüntüler, boyanın floresanını ölçerek dokudaki gerçek zamanlı perfüzyonu ortaya çıkarır, ardından hangi bölgelerin en iyi kan akımına sahip olduğu ve yara komplikasyonları için düşük risk altında olduğu konusunda objektif bilgi sağlar [194].



Şekil 6: A: Tromboze anastomoz ve iskemik ekstremite ICG floresan anjiyografi görüntüsü. B: Soldaki görüntünün ICG tutulum yoğunluğuna göre renklendirilmiş hâli

Görüntüler gerçek zamanlı olarak izlenir, böylece cerrah ek çalışma veya harici yorumlama beklemeden hemen karar alabilir [113]. Tüm yara komplikasyonlarını öngörmese de SPY Elite Sistemi hipoperfüzyon bölgelerini gösterir ve cerrahı deri flebini gözden geçirmeye, dokuyu debride etmeye veya gerginliği ihtiyaca göre serbestlemeye yönlendirebilir [190].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Botulinum toksinin aynı damara ait kesik uçlarının birleştirildiği anastomozlarda trombüs oluşumu ve vazospazma etkisi daha önce araştırılmış olup, artmış trombojeniteyle ilişkilendiren damar greftleriyle yapılan anastomozlarda bu toksinin trombüs oluşumu ve vazospazma etkisini birlikte değerlendiren in-vivo bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda **“Damar greftleri ile oluşturulacak anastomoz modelinde anastomozun etrafına salın enjeksiyonu yapılan gruba göre, anastomozun etrafına botulinum toksin enjeksiyonu yapılan grupta vasküler trombüs ve spazm daha az görülür ve toksinin olumlu etkileri daha fazla düz kas içeren arter greftlerinde daha belirgindir.”** hipotezinden yola çıkılmıştır ve toksinin spazma zorlanan greftli anastomozlardaki olumlu etkilerini göstermek hedeflenmiştir.

Çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 24.068 karar numarasıyla etik yönden uygun bulunmuştur ve onaylandı. Çalışmada kullanılan hayvanlar, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM)’dan elde edildi. Çalışma kapsamında uygulanan cerrahi girişimler yine Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM) bünyesinde bulunan ameliyathanede gerçekleştirildi. Sıçanlara standart besleme ve laboratuvar şartlarında, gereği kadar yem ve su verilerek, gece gündüz siklusuna uygun ışıklandırma, uygun havalandırma ve ısıtmaya dikkat edilerek bakıldı.



Şekil 7: Çalışmada kullanılan mikroskop ve cerrahi aletler

3.1. Çalışma Gruplarının Tasarlanması

Araştırmada ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen, 28 adet dişi Sprague-Dawley rat kullanıldı.

-Araştırmada 4 adet grup oluşturuldu.

1.Grup: Femoral arter segmentlerinin arasına **ven grefti** anastomoz edilen ve perivasküler **salin** enjekte edilen grup (7 rat)

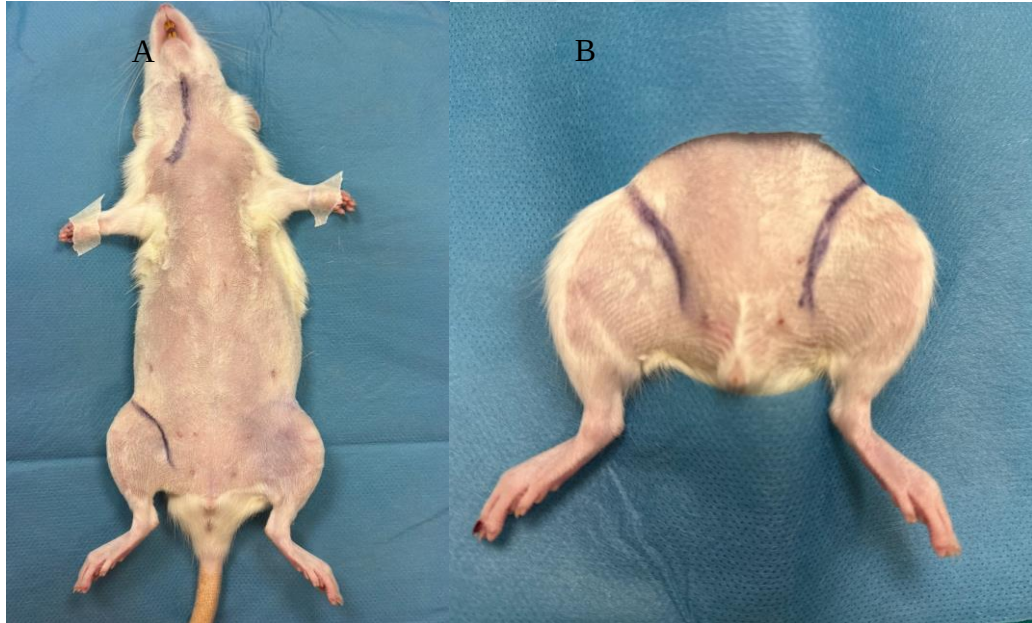
2.Grup: Femoral arter segmentlerinin arasına **arter grefti** anastomoz edilen ve perivasküler **salin** enjekte edilen grup (7 rat)

3.Grup: Femoral arter segmentlerinin arasına **ven grefti** anastomoz edilen ve perivasküler **botulinum toksin** enjekte edilen grup (7 rat)

4.Grup: Femoral arter segmentlerinin arasına **arter grefti** anastomoz edilen ve perivasküler **botulinum toksin** enjekte edilen grup (7 rat) olarak belirlendi.

3.2. Cerrahi Teknik

Yapılan çalışmada ratlara 2 aşamalı cerrahi uygulandı. Cerrahi aşamaların tamamında anestezikler intramuskuler olarak uygulanacak 45 mg/ kg ketamin + 5 mg/kg ksilazin olarak belirlendi. İlk uygulanacak cerrahide anestezi sonrası ratlar operasyon masasına supin pozisyonda yatırılıp her iki üst ve alt ekstremitesi ve kuyruğu uygun şekilde sabitlendi. Ardından ven grefti alınacak gruplarda ratların her iki inguinal bölgesi; arter grefti alınacak gruplarda ise ratların boyun sağ yarımı ve sağ inguinal bölge tıraş makinesi ile tıraş edildi. Tıraş edilen bölgeler povidon iodin ile silindi ve operasyon sahası açıkta kalacak şekilde örtme işlemi yapıldı.



Şekil 8: Cerrahi öncesi işaretlemeler A: Arter grefti ile anastomoz oluşturulacak gruplarda kullanılan insizyonlar B: Ven grefti ile anastomoz oluşturulacak gruplarda kullanılan insizyonlar

Grup 1'de uygulanan cerrahi işlem

Grup 1'de anastomozlar interpozisyonel ven greftleri kullanılarak gerçekleştirildi ve ven grefti donörü olarak sol taraf femoral ven kullanıldı. Femoral vene sol taraf inguinal bölgeye yapılan cilt insizyonları ve inguinal yağ yastığı diseksiyonu yoluyla ulaşıp venin derin dalları 8/0 poliamid suture kullanılarak bağlandı ve 10 mm uzunluğunda femoral ven greftleri alındı. Anastomoz komşuluğunda kalacak her iki uca yaklaşık 1'er mm segmentte adventisya ven greftlerinden sıyrıldı. Ven greftinin proksimal kısmındaki adventisya üzerine yön belirtmesi için 1 adet emilmeyen poliamid suture yerleştirildi. Toplanan ven greftleri %0,9 serum fizyolojikle sulandırılmış 1,000 IU/100 mL heparin çözeltisiyle yıkandıktan sonra içinde benzer derişimde heparin bulunan steril bir çözelti içerisinde steril bir kapta anastomoz gerçekleştirilene kadar bekletildi. Operasyon sahası %0.9'luk NaCl ile ıslatılmış gazlı bez ile geçici olarak kapatılarak sağ tarafa geçildi.

Sağ taraf femoral arterlere inguinal bölgeye yapılacak cilt insizyonları ve inguinal yağ yastığı diseksiyonu yoluyla ulaştıktan sonra arter ve venin içerisinde bulunduğu nörovasküler kılıf açılarak vasküler yapılar serbestlendi ve arter derin dallarından ayrıldı. Femoral arterin profunda femoris dalının proksimali ve descending genicular dalının distali arasından keskin bir makas yardımıyla damar segmenti eksize edildi ve 1 cm'lik arter defektleri oluşturuldu. Anastomoz komşuluğunda kalacak her iki uçlarında yaklaşık 1'er mm segmentte adventisya femoral arterden sıyrıldı. Sonrasında femoral arterin kesik uçları heparin solüsyonuyla (%0,9 serum fizyolojikle sulandırılmış 1,000 IU/100 mL) yıkandı ve sol taraftan alınan ven grefti mikrocerrahi prensiplere uygun şekilde venlerin kapak yönleri göz önünde bulundurularak ters çevirilip (proksimal ucu distal tarafa gelecek şekilde) 10/0 poliamid mikrosuture materyali ile 8 separe suture atılarak her

iki uca uç-uca anastomoze edildi. Anastomozlarda 8 sutür tekniği kullanıldı. Anastomoz yapıldıktan sonra anastomoz proksimalindeki arter segmentinin ve arter komşuluğundaki venin proksimaldeki Murphy dalının seviyesinden; vasküler greftin ise anastomoz öncesi ve sonrasında orta noktasından çapları hassas dijital mikrokumpas kullanılarak ölçüldü ve kaydedildi. Yapılan anastomozun akımı lazer doppler akım ölçer (PeriFlux 5000, Perimed AB,İsviçre) ile de anastomoz distalindeki femoral arterden değerlendirildi ve ardışık 60 ölçüm değeri kaydedildi. Boyut ve akım değerlendirmesinden sonra perivasküler alana 0,5 cc salin enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası insizyonlar cilt altı 4/0 emilebilir poliglekapron dikişlerle ve son olarak cilt 5/0 polipropilen dikiş ile tek tek dikildi. Cerrahi kapatmadan sonra hayvanın pansumanı povidon iyod kullanılarak yapıldı ve pansuman günlük olarak tekrarlandı.

İkinci cerrahi ilk cerrahiden 3 gün sonra gerçekleştirildi. Süre anastomoz sonrası mikrovasküler komplikasyonların büyük kısmının ilk 72 saat içerisinde gelişmesi sebebiyle 3 gün olarak belirlendi. Anestezi sonrası hayvanlar operasyon masasına supin pozisyonunda yatırılıp her iki üst ve alt ekstremitesi ve kuyruğu uygun şekilde sabitlendi. Ardından her iki inguinal bölge, tıraş makinesi ile tıraş edilip povidon iodin ile silindikten sonra operasyon sahası açıkta kalacak şekilde örtme işlemi yapıldı. Daha önce damar greftleri kullanılarak yapılan anastomozlara sağ taraf inguinal bölgeye yapılan önceki cilt insizyonundan girip ulaşıldı. İlk cerrahide damar çaplarının ölçüldüğü yerden damar çapları tekrar ölçüldü ve kaydedildi. Anastomoz açıklıkları anastomoz distalindeki femoral arterde lazer doppler akım ölçer kullanarak ve anastomozların distalindeki damarda yapılacak sağma testi ile doğrulandı. Akım ölçerde sinyal saptanmayan ve sağma testinde geçiş göstermeyen ratların anastomozlarında geçiş olmadığının doğrulanması ve ilgili ekstremitenin (sağ arka bacak) perfüzyonunun değerlendirilmesi plazma proteinlerine bağlanan

intravasküler enjekte edilebilir bir boya olan indosiyanin yeşili (ICG) aracılı videoanjiyografi kullanılarak gerçekleştirildi ve bu ratlarda sonraki aşama olan vazopressör stres testi uygulanmadı. Ritschl ve ark. da benzer endikasyonda çalışmalarında kullandıkları şekilde indosiyanin yeşili boya (ICG-PULSION; Pulsion Medical System AG; Münih, Almanya), kızılötesi videoanjiyografi kullanılarak floresans davranışını değerlendirmek için 0,03 mg/kg dozunda intravenöz olarak kuyruk veninden enjekte edildi [195]. İndosiyanin yeşilini algılama sistemi olarak Near-InfraRed (NIR) floresan anjiyografi (Novadaq Technologies Inc., Winnipeg, Kanada) kullanıldı. Anastomoz açıkları korunan ratlar için anastomozları spazm oluşumuna zorlamak için sonraki aşamada vazopressör stres testi uygulanadı. Yokoyama ve ark. çalışmasında olduğu gibi vazospazm modelini oluşturmak için sıçan damarlarına topikal olarak 0,03 mL %0,001 epinefrin uygulandı ve 5 dakika boyunca ratın sağ arka bacağına bir buz banyosunda (16°C) soğuk uygulamasına tâbi tutarak gerçekleştirildi [65].



Şekil 9: Stres testi ratın sağ arka bacağı buzlu su içerisinde 5 dakika bekletilerek ve anastomoz üzerine epinefrin uygulanarak gerçekleştirildi.

Damar açıklığı vazopressör stres testinden sonra lazer doppler akım ölçer ve anastomozların distalindeki damarda yapılacak sağma testi ile değerlendirildi ve akım değerleri kaydedildi. Sonrasında her bi ratın sağ arka bacak perfüzyonunu değerlendirmek için indosiyanin yeşili boya (ICG-PULSION 25mg; Pulsion Medical System AG; Münih, Almanya) 0,03 mg/kg dozunda intravenöz olarak kuyruk veninden enjekte edildi. İndosiyanin yeşilini algılama sistemi olarak Near-InfraRed (NIR) floresan anjiyografi (Novadaq Technologies Inc., Winnipeg, Kanada) kullanıldı. Daha sonra tüm denekler yüksek doz anestezi uygulanarak feda edildi.

Grup 2’de Uygulanan Cerrahi İşlem

Grup 2’de anastomozlar arter greftleri kullanılarak gerçekleştirildi ve arter grefti donörü olarak sağ taraf ortak karotis arter kullanıldı. Sağ taraf ortak karotis artere ulaşmak için cilt insizyonu boyun orta hatta mandibular bölgeden omuz eklemine kadar yapıldı. Cilt altı fasya açıldığında üst servikal bölgede, nispeten büyük submaksiller ve sublingual bezler görüldü ve tükürük bezleri inferior sınırında etrafındaki dokulardan ayrıldı ve yukarı doğru ekarte edildi. Mikroskop altında ortak karotid arterin sternomastoid ve omohyoid kasların altında, skalen kasların üzerinde ve trakeanın yan tarafı boyunca uzandığı görüldü ve bu kaslar ekarte edildikten sonra karotis arter vagal sinirden disseke edilerek ayrıldı.



Şekil 10: Tükürük bezleri ekarte edildikten sonra boyun kaslarının görünümü

Arterin yan dalları 8/0 poliamid suture kullanılarak bağlandı ve 10 mm uzunluğunda karotis arter greftleri alındı. Anastomoz komşuluğunda kalacak her

iki uçta yaklaşık 1'er mm segmentte adventisya arter greftlerinden sıyrıldı. Toplanan arter greftleri %0,9 serum fizyolojikle sulandırılmış 1,000 IU/100 mL heparin çözeltisiyle yıkandıktan sonra içinde benzer derişimde heparin bulunan steril bir çözelti içerisinde steril bir kapta anastomoz gerçekleştirilene kadar bekletildi. Boyundaki insizyon cilt altı 4/0 emilebilir poliglekapron dikişlerle ve son olarak cilt 5/0 polipropilen dikiş ile kapatıldı.



Şekil 11: Boyunda sağ taraf ortak karotis arterin ve vagal sinirin görünümü

Ardından sağ taraf femoral arterlere inguinal bölgeye yapılacak cilt insizyonları ve inguinal yağ yastığı diseksiyonu yoluyla ulaştıktan sonra arter ve venin içerisinde bulunduğu nörovasküler kılıf açılarak vasküler yapılar serbestlendi ve arter derin dallarından ayrıldı. Femoral arterin profunda femoris dalının proksimali ve descending genicular dalının distali arasından keskin bir makas

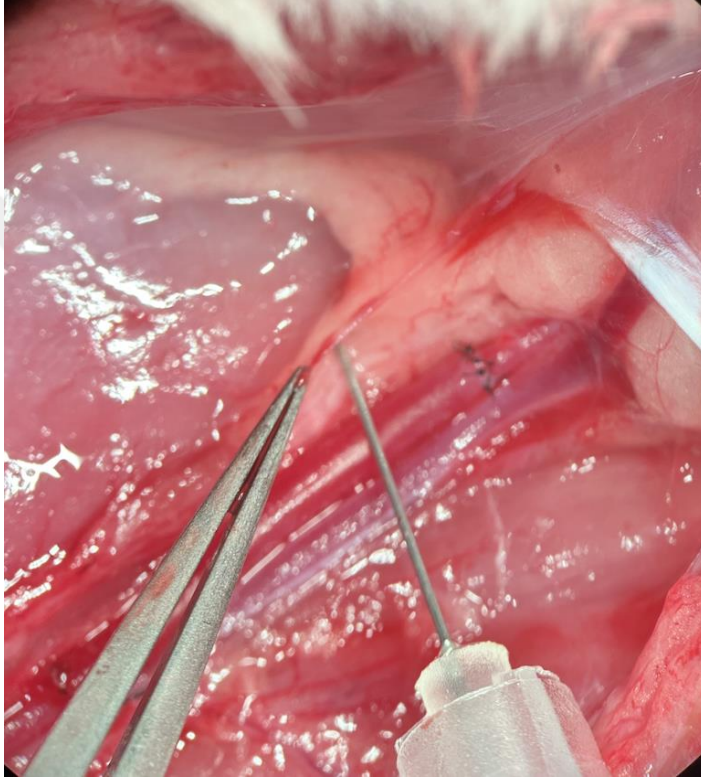
yardımıyla damar segmenti eksize edildi ve 1 cm'lik arter defektleri oluşturuldu. Anastomoz komşuluğunda kalacak her iki uçlarında yaklaşık 1'er mm segmentte adventisya femoral arterden sıyrıldı. Sonrasında femoral arterin kesik uçları heparin solüsyonuyla (%0,9 serum fizyolojikle sulandırılmış 1,000 IU/100 mL) yıkandı ve kesik arter segmentleri arasına boyundan alınan arter grefti 10/0 poliamid mikrosütür materyali ile 8 separe suture atılarak her iki uca uç-uca anastomoz edildi. Anastomozlarda 8 suture tekniği kullanıldı.



Şekil 12: 1 cm'lik vasküler greftle oluşturulmuş anastomoz

Anastomoz yapıldıktan sonra anastomozun hemen proksimalinde arter segmentinden ve arter komşuluğundaki venin proksimaldeki Murphy dalının seviyesinden; vasküler greftin anastomoz öncesi ve sonrasında orta noktasından çapları ölçüldü ve kaydedildi. Yapılan anastomozun akımı lazer doppler akım ölçer (PeriFlux 5000, Perimed AB, İsviçre) ile de anastomoz distalindeki femoral arterden

değerlendirildi ve ardışık 60 ölçüm değeri kaydedildi. Boyut ve akım değerlendirmesinden sonra perivasküler alana 0,5 cc salin enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası insizyonlar cilt altı 4/0 emilebilir poliglekapron dikişlerle ve son olarak cilt 5/0 polipropilen dikiş ile tek tek dikildi.



Şekil 13: Perivasküler alana salin enjeksiyonu

İkinci cerrahi ilk cerrahiden 3 gün sonra gerçekleştirildi. Anestezi sonrası hayvanlar operasyon masasına supin pozisyonda yatırılıp her iki üst ve alt ekstremitesi ve kuyruğu uygun şekilde sabitlendi. Ardından her iki inguinal bölge, tıraş makinesi ile tıraş edilip povidon iodin ile silindikten sonra operasyon sahası açıkta kalacak şekilde örtme işlemi yapıldı. Daha önce damar greftleri kullanılarak yapılan anastomozlara sağ taraf inguinal bölgeye yapılan önceki cilt insizyonundan girip ulaşıldı. İlk cerrahide damar çaplarının ölçüldüğü yerden damar çapları tekrar ölçüldü ve kaydedildi. Anastomoz açıklıkları anastomoz distalindeki femoral

arterde lazer doppler akım ölçer kullanarak ve anastomozların distalindeki damarda yapılacak sağma testi ile doğrulandı. Akım ölçerde sinyal saptanmayan ve sağma testinde geçiş göstermeyen ratların anastomozlarında geçiş olmadığının doğrulanması ve ilgili ekstremitenin (sağ arka bacak) perfüzyonunun değerlendirilmesi indosiyanin yeşili (ICG) aracılı videoanjiyografi kullanılarak gerçekleştirildi ve bu ratlarda sonraki aşama olan vazopressör stres testi uygulanmadı. Anastomoz açıkları korunan ratlar için anastomozları spazm oluşumuna zorlamak için sonraki aşamada vazopressör stres testi yapıldı. Stres testi anastomoz yapılan damarların üzerine topikal olarak 0,03 mL %0,001 epinefrin uygulaması ve 5 dakika boyunca ratın sağ arka bacağına bir buz banyosunda (16°C) soğuk uygulamasına tâbi tutarak gerçekleştirildi. Damar açıklıkları vazopressör stres testinden sonra lazer doppler akım ölçer ve anastomozların distalindeki damarda yapılacak sağma testi ile değerlendirildi ve akım değerleri kaydedildi. Sonrasında her bir ratın sağ arka bacak perfüzyonunu değerlendirmek için indosiyanin yeşili boya intravenöz olarak kuyruk veninden enjekte edildi ve indosiyanin yeşilini algılama sistemi olarak Near-InfraRed (NIR) floresan anjiyografi kullanıldı. Daha sonra tüm denekler yüksek doz anestezi uygulanarak feda edildi.

Grup 3'de Uygulanan Cerrahi İşlem

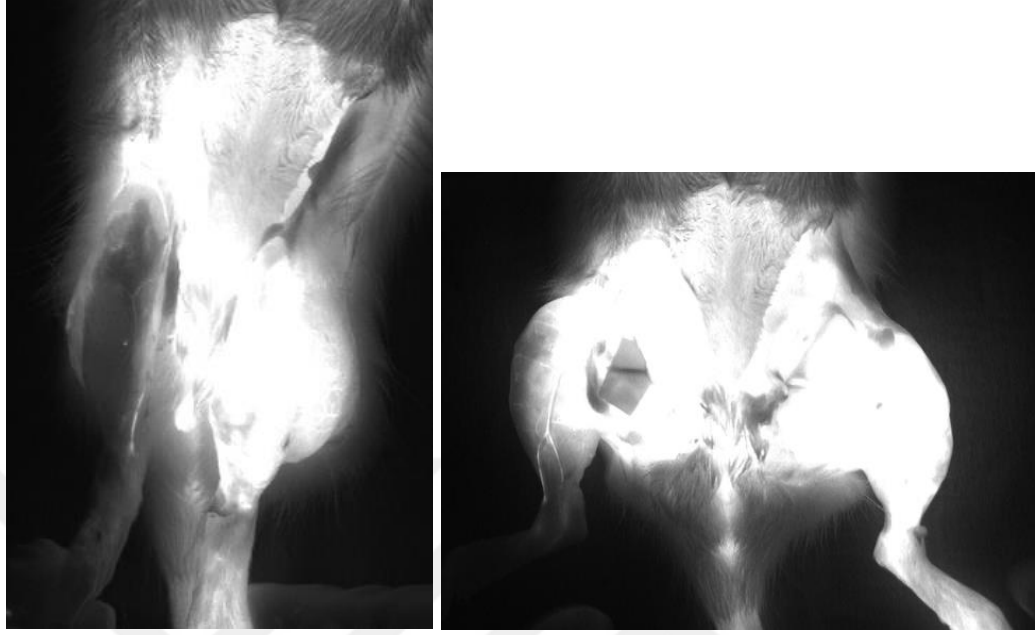
Grup 1'de anastomozlar interpozisyonel ven greftleri kullanılarak gerçekleştirildi ve ven grefti donörü olarak sol taraf femoral ven kullanıldı. Femoral vene sol taraf inguinal bölgeye yapılan cilt insizyonları ve inguinal yağ yastığı diseksiyonu yoluyla ulaşıp venin derin dalları 8/0 poliamid suture kullanılarak bağlandı ve 10 mm uzunluğunda femoral ven greftleri alındı. Anastomoz komşuluğunda kalacak her iki uca yaklaşık 1'er mm segmentte adventisya ven greftlerinden sıyrıldı. Ven greftinin proksimal kısmındaki adventisya üzerine yön

belirtmesi için 1 adet emilmeyen poliamid suture yerleştirildi. Toplanan ven greftleri heparin çözeltisiyle yıkandıktan sonra içinde benzer derişimde heparin bulunan steril bir çözelti içerisinde steril bir kapta anastomoz gerçekleştirilene kadar bekletildi. Operasyon sahası serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bez ile geçici olarak kapatılarak sağ tarafa geçildi.

Sağ taraf femoral arterlere inguinal bölgeye yapılacak cilt insizyonları ve inguinal yağ yastığı diseksiyonu yoluyla ulaştıktan sonra arter ve venin içerisinde bulunduğu nörovasküler kılıf açılarak vasküler yapılar serbestlendi ve arter derin dallarından ayrıldı. Femoral arterin profunda femoris dalının proksimali ve descending genicular dalının distali arasından keskin bir makas yardımıyla damar segmenti eksize edildi ve 1 cm'lik arter defektleri oluşturuldu. Anastomoz komşuluğunda kalacak her iki uçlarında yaklaşık 1'er mm segmentte adventisya femoral arterden sıyrıldı. Sonrasında femoral arterin kesik uçları heparin solüsyonuyla yıkandı ve kesik arter segmentleri arasına sol taraftan alınan ven grefti mikrocerrahi prensiplere uygun şekilde venlerin kapak yönleri göz önünde bulundurularak ters çevirilip 10/0 poliamid mikrosuture materyali ile 8 separe suture atılarak her iki uca uç-uca anastomoz edildi. Anastomozlarda 8 suture tekniğı kullanıldı. Anastomoz yapıldıktan sonra anastomozun hemen proksimalinde arter segmentinden ve arter komşuluğundaki venin proksimaldeki Murphy dalının seviyesinden; anastomoz öncesi ve sonrasında vasküler greftlerin orta noktasından çapları ölçüldü ve kaydedildi. Yapılan anastomozun akımı lazer doppler akım ölçer ile de anastomoz distalindeki femoral arterden değerlendirildi ve ardışık 60 ölçüm değeri kaydedildi. Boyut ve akım değerlendirmesinden sonra perivasküler alana 0,9% serum fizyolojik ile seyreltilmiş, 0,5 cc 10 ünite onabotulinum toksin tip A (Botox; Allergan, Inc., Irvine, Kaliforniya) enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası insizyonlar cilt altı 4/0 emilebilir poliglekapron dikişlerle ve son olarak cilt 5/0

polipropilen dikiş materyali ile kapatıldı. Cerrahi kapatmadan sonra hayvanın pansumanı povidon iyod kullanılarak yapıldı ve pansuman günlük olarak tekrarlandı.

İkinci cerrahi ilk cerrahiden 3 gün sonra gerçekleştirildi. Anestezi sonrası hayvanlar operasyon masasına supin pozisyonda yatırılıp her iki üst ve alt ekstremitesi ve kuyruğu uygun şekilde sabitlendi. Ardından her iki inguinal bölge, tıraş makinesi ile tıraş edilip povidon iodin ile silindikten sonra operasyon sahası açıkta kalacak şekilde örtme işlemi yapıldı. Daha önce damar greftleri kullanılarak yapılan anastomozlara sağ taraf inguinal bölgeye yapılan önceki cilt insizyonundan girip ulaşıldı. İlk cerrahide damar çaplarının ölçüldüğü yerden damar çapları tekrar ölçüldü ve kaydedildi. Anastomoz açıklıkları anastomoz distalindeki femoral arterde lazer Doppler akım ölçer kullanarak ve anastomozların distalindeki damarda yapılacak sağma testi ile doğrulandı. Akım ölçerde sinyal saptanmayan ve sağma testinde geçiş göstermeyen ratların anastomozlarında geçiş olmadığının doğrulanması ve ilgili ekstremitenin (sağ arka bacak) perfüzyonunun değerlendirilmesi indosiyanin yeşili (ICG) aracılı videoanjiyografi kullanılarak gerçekleştirildi ve bu ratlarda sonraki aşama olan vazopressör stres testi uygulanmadı. İndosiyanin yeşili boya (ICG-PULSION; Pulsion Medical System AG; Münih, Almanya), kızılötesi videoanjiyografi kullanılarak floresans davranışını değerlendirmek için 0,03 mg/kg dozunda intravenöz olarak kuyruk veninden enjekte edildi [195]. İndosiyanin yeşilini algılama sistemi olarak Near-InfraRed (NIR) floresan anjiyografi kullanıldı.



Şekil 14: İlk operasyonda yapılan anastomozda akımın olmadığı bir ratın ikinci operasyonundan alınmış ICG görüntüleri. Tromboze damar ve sol arka bacağı göre daha az ICG tutulumu olan iskemik sağ arka bacak görünümü

Anastomoz açıkları korunan ratlar için anastomozları spazm oluşumuna zorlamak için sonraki aşamada vazopressör stres testi uygulandı. Stres testi anastomoz hattındaki damarlara topikal olarak 0,03 mL %0,001 epinefrin uygulaması ve 5 dakika boyunca ratın sağ arka bacağına bir buz banyosunda (16°C) soğuk uygulamasına tâbi tutarak gerçekleştirildi [65]. Damar açıklığı vazopressör stres testinden sonra lazer doppler akım ölçer ve anastomozların distalindeki damarda yapılacak sağma testi ile değerlendirildi ve akım değerleri kaydedildi. Sonrasında her bi ratın sağ arka bacak perfüzyonunu değerlendirmek için indosiyanin yeşili boya intravenöz olarak kuyruk veninden enjekte edildi ve indosiyanin yeşilini algılama sistemi olarak Near-InfraRed (NIR) floresan anjiyografi kullanıldı. Daha sonra tüm denekler yüksek doz anestezi uygulanarak feda edildi.

Grup 4’de Uygulanan Cerrahi İşlem

Grup 4’de anastomozlar arter greftleri kullanılarak gerçekleştirildi ve arter grefti donörü olarak sağ taraf ortak karotis arter kullanıldı. Sağ taraf ortak karotis artere ulaşmak için cilt insizyonu boyun orta hatta mandibular bölgeden omuz eklemine kadar yapıldı. Cilt altı fasya açıldığında üst servikal bölgede, nispeten büyük submaksiller ve sublingual bezler görüldü ve tükürük bezleri inferior sınırında etrafındaki dokulardan ayrıldı ve yukarı doğru ekarte edildi. Mikroskop altında ortak karotid arterin sternomastoid ve omohyoid kasların altında, skalen kasların üzerinde ve trakeanın yan tarafı boyunca uzandığı görüldü ve bu kaslar ekarte edildikten sonra karotis arter vagal sinirden disseke edilerek ayrıldı. Arterin yan dalları 8/0 poliamid sütur kullanılarak bağlandı ve 10 mm uzunluğunda karotis arter greftleri alındı. Anastomoz komşuluğunda kalacak her iki uçta yaklaşık 1’er mm segmentte adventisya arter greftlerinden sıyrıldı. Toplanan arter greftleri heparin çözeltisiyle yıkandıktan sonra içinde benzer derişimde heparin bulunan steril bir çözelti içerisinde steril bir kapta anastomoz gerçekleştirilene kadar bekletildi. Boyundaki insizyon cilt altı 4/0 emilebilir poliglekapron dikişlerle ve son olarak cilt 5/0 polipropilen dikiş ile kapatıldı. Ardından sağ taraf femoral arterlere inguinal bölgeye yapılacak cilt insizyonları ve inguinal yağ yastığı diseksiyonu yoluyla ulaşıldıktan sonra arter ve venin içerisinde bulunduğu nörovasküler kılıf açılarak vasküler yapılar serbestlendi ve arter derin dallarından ayrıldı. Femoral arterin profunda femoris dalının proksimali ve descending genicular dalının distali arasından keskin bir makas yardımıyla damar segmenti eksize edildi ve 1 cm’lik arter defektleri oluşturuldu. Anastomoz komşuluğunda kalacak her iki uçlarında yaklaşık 1’er mm segmentte adventisya femoral arterden sıyrıldı. Sonrasında femoral arterin kesik uçları heparin solüsyonuyla yıkandı ve kesik arter segmentleri arasına boyundan alınan arter grefti 10/0 poliamid mikrosütur materyali ile 8 separe

sutür atılarak her iki uca uç-uca anastomoz edildi. Anastomozlarda 8 sutür tekniği kullanıldı. Anastomoz yapıldıktan sonra anastomozun hemen proksimalinde arter segmentinden ve arter komşuluğundaki venin proksimaldeki Murphy dalının seviyesinden; anastomoz öncesi ve sonrasında vasküler greftin ortasından çapları ölçüldü ve kaydedildi. Yapılan anastomozun akımı lazer doppler akım ölçer ile de anastomoz distalindeki femoral arterden değerlendirildi ve ardışık 60 ölçüm değeri kaydedildi. Boyut ve akım değerlendirmesinden sonra perivasküler alana, 9% serum fizyolojik ile seyreltilmiş, 0,5 cc 10 ünite onabotulinum toksin tip A (Botox; Allergan, Inc., Irvine, Kaliforniya) enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası insizyonlar cilt altı 4/0 emilebilir poliglekapron dikişlerle ve son olarak cilt 5/0 polipropilen dikiş materyali ile tek tek dikiş atılarak kapatıldı.

İkinci cerrahi ilk cerrahiden 3 gün sonra gerçekleştirildi. Anestezi sonrası hayvanlar operasyon masasına supin pozisyonda yatırılıp her iki üst ve alt ekstremitesi ve kuyruğu uygun şekilde sabitlendi. Ardından her iki inguinal bölge, tıraş makinesi ile tıraş edilip povidon iodin ile silindikten sonra operasyon sahası açıkta kalacak şekilde örtme işlemi yapıldı. Daha önce damar greftleri kullanılarak yapılan anastomozlara sağ taraf inguinal bölgeye yapılan önceki cilt insizyonundan girip ulaşıldı. İlk cerrahide damar çaplarının ölçüldüğü yerden damar çapları tekrar ölçüldü ve kaydedildi. Anastomoz açıklıkları anastomoz distalindeki femoral arterde lazer doppler akım ölçer kullanarak ve anastomozların distalindeki damarda yapılacak sağma testi ile doğrulandı. Akım ölçerde sinyal saptanmayan ve sağma testinde geçiş göstermeyen ratların anastomozlarında geçiş olmadığının doğrulanması ve ilgili ekstremitenin (sağ arka bacak) perfüzyonunun değerlendirilmesi indosiyanin yeşili (ICG) aracılı videoanjyografi kullanılarak gerçekleştirildi ve bu ratlarda sonraki aşama olan vazopressör stres testi uygulanmadı. Anastomoz açıkları korunan ratlar için anastomozları spazm

oluşumuna zorlamak için sonraki aşamada vazopressör stres testi yapıldı. Anastomoz yapılan damarların üzerine topikal olarak 0,03 mL %0,001 epinefrin uygulandı ve 5 dakika boyunca ratın sağ arka bacağına bir buz banyosunda (16°C) soğuk uygulamasına tâbi tutarak gerçekleştirildi. Damar açıklıkları vazopressör stres testinden sonra lazer doppler akım ölçer ve anastomozların distalindeki damarda yapılacak sağma testi ile değerlendirildi ve akım değerleri kaydedildi. Sonrasında her bir ratın sağ arka bacak perfüzyonunu değerlendirmek için indosiyanin yeşili boya intravenöz olarak kuyruk veninden enjekte edildi ve indosiyanin yeşilini algılama sistemi olarak Near-InfraRed (NIR) floresan anjiyografi kullanıldı. Daha sonra tüm denekler yüksek doz anestezi uygulanarak feda edildi.



Şekil 15: Damar grefti olarak kullanılacak olan ortak karotis arter ve femoral damarların görünümü. Femoral arter ve ortak karotis arter arasındaki çap uyumsuzluğu dikkati çekmektedir.

3.3. Histolojik Analiz ve Doku Örneklemesi

Tüm deneklerin yüksek doz anestezik kullanarak feda edilmesinin ardından sağ gastrocnemius ve sağ tibialis anterior kasları tamamen eksize edildi. Damar greftleriyle oluşturulan anastomozlar proksimaldeki ve distaldeki femoral arter segmentlerinin 5'er mm'sini içerecek şekilde histolojik inceleme için alındı.

Alınan doku örnekleri, oda ısısında, %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 72 saat tespit edildiler. Tespit edilen dokular standart ışık mikroskobu takip yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan bloklardan mikrotomla (Leica SM 2000, Germany) 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Her denekten alınan kas dokusundan 10 adet seri kesit histolojik değerlendirmenin yapılabilmesi amacıyla hematoksilin-eozin ile boyandı. Her denekten alınan damar kesitleri ise masson trikrom ile boyandı. Kesitler bilgisayar donanımlı, kamera ataçmanlı foto-ışık mikroskopta (DM 4000 B, Leica, Weetlar, Germany, DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) fotoğraflanarak değerlendirildi. Her kesitten alınan görüntüler, dejenerasyon yönünden incelendi ve verilen puanlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.3.1. Hematoksilin- Eozin Boyama Yöntemi

Deney gruplarından alınan kesitler 57°C etüvde deparafinizasyon olana kadar bekletildikten sonra, 2x15 Dk ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80, %70, %50) havada kurutuldu. 10 Dk akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilin' de 10-15 Dk boyandı ve 10 Dk akar suda yıkandı. % 70 alkol + 2 – 3 damla glasiyel asedik asit karışımına batırılıp tekrar 10 Dk akar suda yıkandı. Lamalar 5-10 dakika Eozin de bekletilip 10 Dk daha akar suda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, %100), 2x15 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

Hemotoksilen-Eosin kesitlerinde; segmental nekroz, enine çizgilenme kayıpları, çekirdeğin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ doku artışı, interfasiküler ödem, enflamatuvar hücrelerin sayısı kriterlerine göre dejeneratif bulgular tarandı. Değerlendirmede dejenerasyon kriterleri yüzdesel olarak

değerlendirildi. 0: hiç yok, 1: <%10, 2: %10-30, 3: %30-50, 4: >%50 puanlama sisteminde göre sayısal veri tablosu oluşturuldu. Her dejeneratif bulgu için verilen skorlar ayrı ayrı toplanıp 10'a bölünerek her hayvandaki dejeneratif bulgu için bir skor belirlendi. Daha sonra bu bulgular toplanıp dejeneratif bulgu sayısına bölünerek her hayvanın iki kas grubu için de oluşturulan skorların ortalaması alındı. Daha sonra bu ortalama skorlar istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirildi.

3.3.2. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Kesitler 60°C etüvde deparafizasyon olana kadar bekletildikten sonra, 15 dk ksilole alındı. Tekrar farklı ksilolde 15 dk daha bekletildi. Azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80, %70, %60) 10'ar dakika bekletilerek geçirildiler. Suda yıkandıktan sonra kesitler kesitlere Bio-optika Masson Trikrom (cat: 04-010802, Lot: 24068, Bio-Optica 20134 Milano, ITALY via S. Faustino 58) kiti uygulandı. 6 damla demirli hematoksilen (regent A) ve 6 damla demirli hematoksilen (regent B) karıştırıldı, kesitlere damlatıldı. 10 dk bekletildi. Ardından yıkama yapılmadan 10 damla pikrik asit alkol solüsyonu (regent C) damlatıldı ve 4 dk bekletildi. Daha sonra, dokular hızlıca (3-4 saniye) distile suda çalkalanarak her bir kesite 10 damla asit fuksin (regent D) damlatılarak yine 4 dk bekletildi. Lamlar distile suyla yıkanarak üzerlerine 10 damla fosfomoliptik asit solüsyonu (regent E) damlatılarak 10 dk tutuldular. Yıkama yapılmadan camlar silkelendi ve 10 damla anilin mavisi (regent F) damlatılarak 5 dk bekletildi. Son olarak, camlar distile suda yıkanarak artan alkol serilerinden geçirildi ve ksilolde tutularak entellanla kapatıldı.

Kesitler bilgisayar donanımlı, kamera ataçmanlı foto-ışık mikroskopta (DM 4000 B, Leica, Weetlar, Germany, DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) incelendi. Dokular epitel devamlılığı, inflamatuvar hücre yoğunluğu, trombüs varlığı ve var ise trombüsün boyutu açısından değerlendirildi.

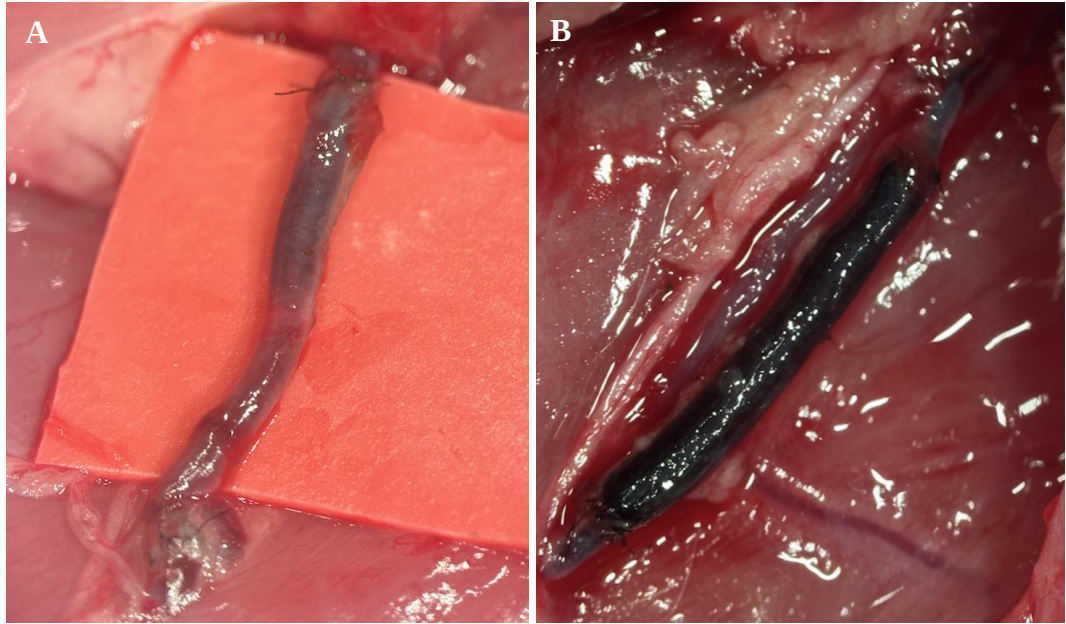
3.4. İstatiksel Değerlendirme

Kaydedilen veriler sürüm 27.0 SPSS programı (Inc., Armonk, NY, ABD) kullanılarak analiz edildi. Sayısal veri dağılımının normalliği Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk normallik testleri kullanılarak incelendi. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenler ortalama ve standart sapma olarak; normal dağılım göstermeyenler medyan ve minimum-maksimum değerlerle gösterildi ve nitel veriler frekans ve yüzde olarak ifade edildi. Trombüs sayılarının gruplar arasındaki değerlendirmesinde sayısal değişkenler, örneklem sayısı veya parametrik olmayan dağılım nedeniyle iki grup arasında Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Damar çapları, ICG tutulum oranları ve Doppler değerlendirmelerinde sayısal değişkenleri gruplar arasında karşılaştırmak için çoklu testler için Posthoc Bonferroni düzeltmeli Kruskal-Wallis kullanıldı. Kategorik değişkenleri karşılaştırmak için Fisher's Exact testi kullanıldı. Güven aralığı %95 olarak alındı ve kabul edilen hata payı %5 olarak belirlendi. Bu nedenle, p değeri $p < 0,05$ olduğunda anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Tüm gruplarda toplam 28 adet sıçanın yarısında her iki taraf inguinal bölgede; yarısında ise inguinal bölge ve boyunda çalışıldı ve toplam 28 adet femoral arter defekti, 14 ortak karotis arter ve 14 femoral ven grefti ile uç uca anastomoz yapılarak rekonstrükte edildi. Deney boyunca denek kaybı olmadı, deneklerde komplikasyon gerçekleşmedi. İlk cerrahide yapılan anastomozların tromboze olduğu ikinci cerrahideki incelemede belirlendiyse bu durum “primer tromboze” olarak adlandırıldı. İkinci cerrahide stres testi sonrası anastomozun tromboze olduğunun gözlenmesi durumu ise “ST (stres testi) sonrası tromboze” olarak isimlendirildi.



Şekil 16: A: Ven greftiyle oluşturulmuş stres testiyle tromboze anastomozun görüntüsü. B: Ven greftiyle oluşturulmuş primer tromboze anastomozun görüntüsü

Ven grefti ile onarım yapılan kontrol grubu olan 1. gruptaki anastomozların 72. saatte yapılan değerlendirmelerinde 2 anastomozun tromboze olduğu görüldü ve bu ratlarda anastomozun tıkalı olduğu Doppler akım ölçer ve anastomoz distalinde yapılan sağma testi ile doğrulandı. Tromboze olmayan anastamozlara yapılan stres testi geriye kalan 5 anastomozun 3'ünün tromboze olmasıyla sonuçlandı.

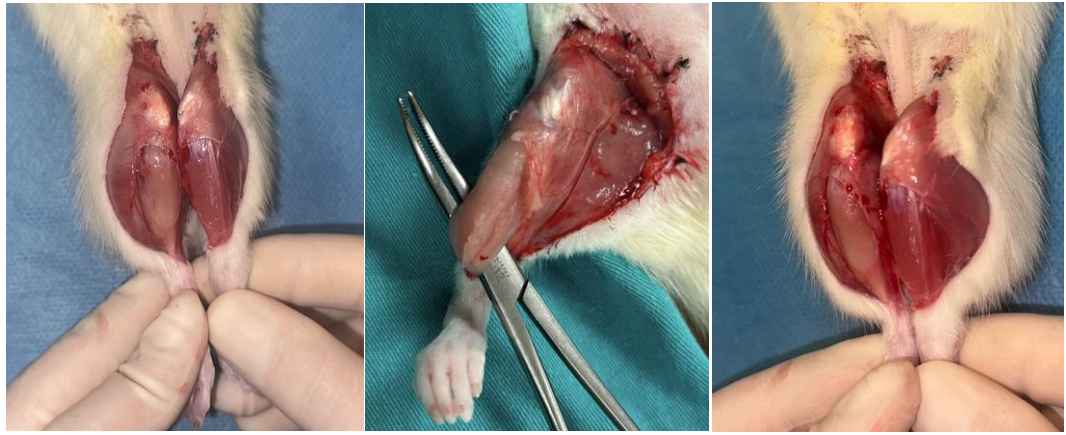
Arter grefti ile onarım yapılan kontrol grubu olan 2. gruptaki anastomozların 72. saatte yapılan değerlendirmelerinde 1 anastomozun tromboze olduğu görüldü ve bu ratlarda anastomozun tıkalı olduğu Doppler akımölçer ve anastomoz distalinde yapılan sağma testi ile doğrulandı. Tromboze olmayan anastamozlara yapılan stres testi geriye kalan 6 anastomozun 2'sinin tromboze olmasıyla sonuçlandı.

Ven grefti ile onarım yapılan BoNT grubu olan 3. gruptaki anastomozların 72. saatte yapılan değerlendirmelerinde 1 anastomozun tromboze olduğu görüldü ve bu anastomozların tıkalı olduğu Doppler akım ölçer ve anastomoz distalinde yapılan sağma testi ile doğrulandı. Tromboze olmayan anastamozlara yapılan stres testi geriye kalan 6 anastomozun 2'sinin tromboze olmasıyla sonuçlandı.

Arter grefti ile onarım yapılan BoNT grubu olan 4. gruptaki anastomozların 72. saatte yapılan değerlendirmelerinde hiçbir anastomozda trombüs görülmedi. Tromboze olmayan anastamozlara yapılan stres testi 7 anastomozun 1'inin tromboze olmasıyla sonuçlandı.

GRUP	PRİMER TROMBOZE	ST İLE TROMBOZE
1 (Ven Grefti + Salin)	2	3
2 (Arter Grefti + Salin)	1	2
3 (Ven Grefti + BTX)	1	2
4 (Arter Grefti + BTX)	-	1

İkincil değerlendirmede tromboze anastomozu olduğu gözlenen 3 ratta karşı taraf tibialis anterior kasıyla karşılaştırıldığında iskemik görünümde olan tibialis anterior kası mevcuttu. Kontrol grubundaki açık anastomozlu bacak ön grubu kaslarıyla karşılaştırıldığında BoNT gruplarında açık anastomoz görülen ratların bacak ön grubu kasları daha ödemli görünümdeydi.



Şekil 17: Makroskopik olarak belirgin iskemik görünümlü tibialis anterior kas örnekleri



Şekil 18: Makroskopik olarak iskemik görünümde olmayan tibialis anterior kas örnekleri

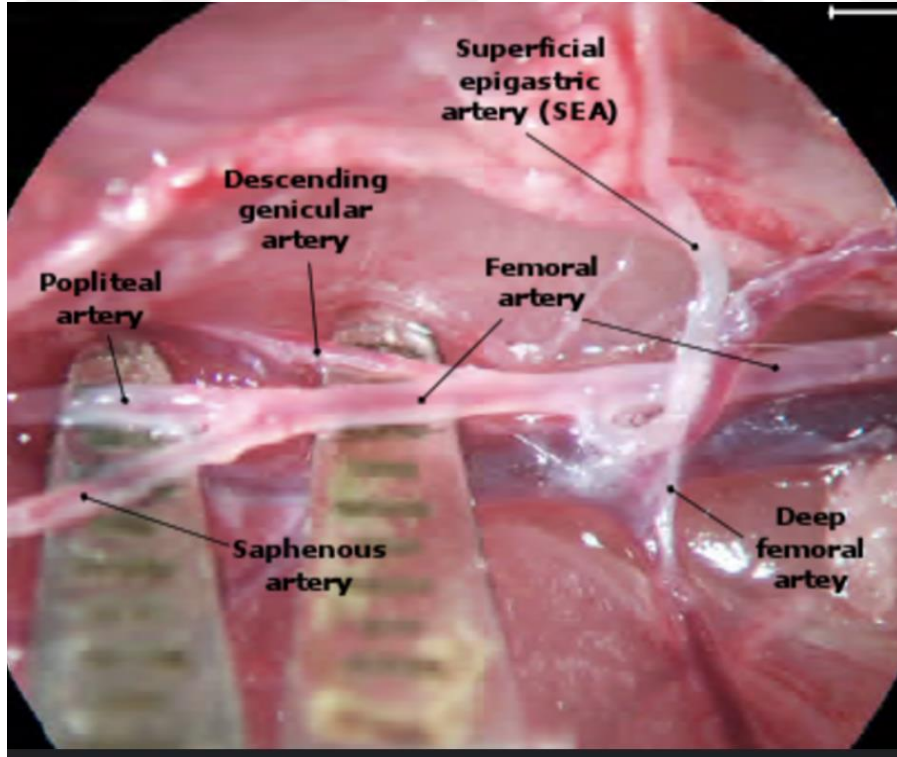


Şekil 19: A: Kontrol grubu olan 2. gruptan bir ratın ikinci cerrahide gözlenen arka bacak ön grup kasları B: BoNT grubu olan 4. Gruptan bir ratın ikinci cerrahide gözlenen arka bacak ön grup kasları. Deney grubundaki BoNT uygulanan tarafta iskemik görünümün eşlik etmediği artmış ödem dikkat çekmektedir.

4.2. Vasküler Çap Ölçümleri

Tüm gruplardaki sıçanların ilk operasyonlarında anastomozun proksimalinden femoral arter çapı, Murphey dalı seviyesinden femoral ven çapı, donör sahadan ayrıldıktan sonra ortak karotis arter ve femoral ven greft çapı ve alıcı sahada onarım sonrası ortasından greft çapı ölçüldü. Tüm gruplardaki sıçanların 2. operasyonlarında ilk operasyonda yapılan ölçümler aynı lokalizasyonlardan tekrarlandı. Kaydedilen vasküler çap ölçüm değerleri Tablo 1-4’de gösterilmiştir.

Primer trombüsün görüldüğü anastomozlarda anastomoza oturan trombüsün anastomoza ait damarları ve anastomoz komşuluğundaki femoral venin akım ve çapını etkileyeceği düşünülerek ilk ve ikinci cerrahide ölçülen vasküler çap karşılaştırmaları primer tromboze damarlar dahil edilmeden karşılaştırıldı.



Şekil 20: Rat femoral arter dalları (Zepp ve ark. çalışmasından [196])

Tablo 1: Grup 1'deki sıçanların 1. ve 2. operasyonları sırasında ölçülen femoral arter, femoral ven anastomoz öncesi, sonrası ve 2. operasyonda alıcı damar grefti çapları

GRUP1 SIÇAN NO	FA ÇAPI (1.Op.)(mm)	FA ÇAPI (2.Op.)(mm)	FV ÇAPI (1.Op.)(mm)	FV ÇAPI (2.Op.)(mm)	DG ÇAPI ANST. ÖNCESİ(mm)	DG ÇAPI ANST. SONRASI (mm)	DG ÇAPI (2.Op.)(mm)
1	0,76	0,7	0,75	0,77	1,13	1,3	1,30
2	0,74	0,72	0,83	0,8	0,99	1,11	1,09
3	0,63	0,65	0,78	0,75	1,11	1,25	1,26
4	0,69	0,74	0,77	0,58	1,08	1,21	1,15
5	0,78	0,82	0,7	0,53	1,1	1,24	1,28
6	0,65	0,66	0,82	0,8	1,27	1,38	1,33
7	0,77	0,77	0,78	0,78	1,21	1,36	1,21

Tablo 2: Grup 2'deki anastomozlarda 1. ve 2. operasyonları sırasında ölçülen femoral arter, femoral ven, anastomoz öncesi, sonrası ve 2. operasyonda alıcı damar grefti çapları

GRUP 2 SIÇAN NO	FA ÇAPI (1.Op.)(mm)	FA ÇAPI (2.Op.)(mm)	FV ÇAPI (1.Op.)(mm)	FV ÇAPI (2.Op.)(mm)	DG ÇAPI ANST. ÖNCESİ(mm)	DG ÇAPI ANST. SONRASI (mm)	DG ÇAPI (2.Op.)(mm)
1	0,82	0,83	0,75	0,75	1,14	1,16	1,16
2	0,7	0,71	0,83	0,83	1,26	1,28	1,24
3	0,69	0,65	0,76	0,73	0,99	1	1,01
4	0,69	0,71	0,79	0,77	1,17	1,19	1,18
5	0,63	0,67	1	1,1	1,02	1,03	1,03
6	0,8	0,82	0,87	0,87	1,09	1,1	1,12
7	0,76	0,5	0,79	0,48	1,13	1,14	0,82

Tablo 3: Grup 3'deki anastomozlarda 1. ve 2. operasyonlar sırasında ölçülen femoral arter, femoral ven, anastomoz öncesi, sonrası ve 2. operasyonda alıcı damar grefti çapları

GRUP 3 SIÇAN NO	FA ÇAPI (1.Op.)(mm)	FA ÇAPI (2.Op.)(mm)	FV ÇAPI (1.Op.)(mm)	FV ÇAPI (2.Op.)(mm)	DG ÇAPI ANST. ÖNCESİ (mm)	DG ÇAPI ANST. SONRASI(mm)	DG ÇAPI (2.Op.)(mm)
1	0,72	0,89	0,81	1	1,19	1,31	1,37
2	0,72	0,94	0,79	1,14	1,38	1,57	1,49
3	0,7	0,85	1	1,24	1,12	1,28	1,45
4	0,8	0,98	0,89	1,09	1,25	1,25	1,39
5	0,81	0,52	0,63	0,59	0,85	0,91	1,04
6	0,61	0,75	0,6	0,73	1,03	1,11	1,36
7	0,76	0,86	0,63	0,74	1,08	1,23	1,41

Tablo 4: Grup 4'deki sıçanların 1. ve 2. operasyonları sırasında ölçülen femoral arter, femoral ven, anastomoz öncesi, sonrası ve 2. operasyonda alıcı damar grefti çapları

GRUP 4 SIÇAN NO	FA ÇAPI (1.Op.)(mm)	FA ÇAPI (2.Op.)(mm)	FV ÇAPI (1.Op.)(mm)	FV ÇAPI (2.Op.)(mm)	DG ÇAPI ANST. ÖNCESİ (mm)	DG ÇAPI ANST. SONRASI (mm)	DG ÇAPI (2.OP.)(mm)
1	0,74	0,9	0,78	1,02	1,31	1,36	1,44
2	0,7	0,93	0,83	1,06	1,02	1,02	1,06
3	0,78	0,95	0,79	0,97	1,16	1,16	1,22
4	0,65	0,89	0,68	0,96	0,99	0,99	1,12
5	0,76	0,96	0,76	1,02	1,09	1,09	1,13
6	0,77	0,96	0,82	1,03	1,23	1,27	1,33
7	0,73	0,84	0,82	1,07	1,24	1,24	1,29

Tüm anastomozlar incelendiğinde kontrol grupları grup 1 ve 2'de birinci operasyonda ölçülen ortalama femoral arter çapları sırasıyla $0,72\pm0,06$ mm ve $0,73\pm0,07$ mm olarak hesaplandı. 2.operasyonda aynı grupların ortalama femoral arter çapları sırasıyla $0,72\pm0,06$ ve $0,70\pm0,11$ mm olarak hesaplandı. BoNT grupları olan grup 3 ve 4'de birinci operasyonda ölçülen femoral arter çapları ilk operasyonda sırasıyla $0,72\pm0,07$ mm ve $0,73\pm0,05$ olarak ölçülürken 2. operasyonda aynı grupların ortalama femoral arter çapları sırasıyla $0,83\pm0,15$ ve $0,92\pm0,04$ mm olarak ölçüldü.

Kontrol grupları olan 1 ve 2. grupta birinci operasyonda ölçülen ortalama femoral ven çapları sırasıyla $0,78\pm0,04$ mm ve $0,83\pm0,09$ mm olarak hesaplandı. 2.operasyonda aynı grupların ortalama femoral ven çapları sırasıyla $0,72\pm0,11$ ve $0,79\pm0,19$ mm olarak hesaplandı. BoNT grupları olan grup 3 ve 4'de birinci operasyonda ölçülen femoral ven çapları ilk operasyonda sırasıyla $0,76\pm0,15$ mm ve $0,78\pm0,05$ olarak ölçülürken 2. operasyonda aynı grupların ortalama femoral ven çapları sırasıyla $0,93\pm0,25$ ve $1,01\pm0,04$ mm olarak ölçüldü.

Kontrol grupları olan grup 1 ve 2'de birinci operasyonda klempler açıldıktan sonra ölçülen ortalama damar grefti çapları sırasıyla $1,26\pm0,09$ mm ve $1,13\pm0,1$ mm olarak hesaplandı. 2.operasyonda aynı grupların ortalama damar grefti çapları sırasıyla $1,23\pm0,09$ ve $1,08\pm0,08$ mm olarak hesaplandı. Botulinum toksin uygulanan gruplar olan grup 3 ve 4'de birinci operasyonda ölçülen damar grefti çapları ilk operasyonda sırasıyla $1,24\pm0,2$ mm ve $1,16\pm0,14$ mm olarak ölçülürken 2. Operasyonda aynı grupların ortalama damar grefti çapları sırasıyla $1,36\pm0,15$ mm ve $1,23\pm0,13$ mm olarak ölçüldü.

İlk cerrahide ölçülen femoral arter ($p=0,957$); femoral ven ($p=0,713$) ve greft çapları ($p=0,166$) arasında anlamlı bir fark görülmedi.

İkinci cerrahide tromboze olan anastomozların trombüs etkisiyle olan çap değişiklikleri damar çapı değişiklikleriyle ilgili değerlendirmeyi bozacağı için ilk ve ikinci cerrahide ölçülen damar çapları grupların tromboze olmayan örnekleri arasında değerlendirildi.

Tablo 5: Deneklerin ilk cerrahide ölçülen femoral arter, ven ve greft çapları

	Group 1 (Salin + Ven Grefiti) (n=7)	Group 2 (Salin + arter grefiti) (n=7)	Group 3 (BoNT + ven grefiti) (n=7)	Group 4 (BoNT + arter grefiti) (n=7)	P- value*
İlk cerrahi femoral arter çapı	0.72 ± 0.06	0.73 ± 0.07	0.72 ± 0.07	0.73 ± 0.05	0.957
İlk cerrahi femoral ven çapı	0.78 ± 0.04	0.83 ± 0.09	0.76 ± 0.15	0.78 ± 0.05	0.713
İlk cerrahi greft çapı	1.26 ± 0.09	1.13 ± 0.10	1.24 ± 0.20	1.16 ± 0.014	0.166

*p değerleri Kruskal-Wallis analiziyle grup içi karşılaştırmaları göstermektedir

Primer trombüsün görüldüğü denekler çıkarıldığında kontrol grupları grup 1 ve 2'de birinci operasyonda ölçülen ortalama femoral arter çapları sırasıyla $0,71\pm0,07$ mm ve $0,72\pm0,07$ mm olarak hesaplandı. 2.operasyonda aynı grupların

ortalama femoral arter çapları sırasıyla $0,70\pm0,05$ ve $0,73\pm0,08$ mm olarak hesaplandı. BoNT grupları olan grup 3 ve 4'de birinci operasyonda ölçülen femoral arter çapları ilk operasyonda sırasıyla $0,72\pm0,06$ mm ve $0,73\pm0,05$ olarak lölürken 2. operasyonda aynı grupların ortalama femoral arter çapları sırasıyla $0,88\pm0,08$ ve $0,92\pm0,04$ mm olarak lölüdü.

Kontrol grupları olan 1 ve 2. grupta birinci operasyonda ölçülen ortalama femoral ven çapları sırasıyla $0,79\pm0,03$ mm ve $0,83\pm0,09$ mm olarak hesaplandı. 2.operasyonda aynı grupların ortalama femoral ven çapları sırasıyla $0,78\pm0,02$ ve $0,84\pm0,14$ mm olarak hesaplandı. BoNT grupları olan grup 3 ve 4'de birinci operasyonda ölçülen femoral ven çapları ilk operasyonda sırasıyla $0,79\pm0,15$ mm ve $0,78\pm0,05$ olarak lölürken 2. operasyonda aynı grupların ortalama femoral ven çapları sırasıyla $0,99\pm0,21$ ve $1,01\pm0,04$ mm olarak lölüdü.

Kontrol grupları olan grup 1 ve 2'de birinci operasyonda klempler açıldıktan sonra ölçülen ortalama damar grefti çapları sırasıyla $1,28\pm0,11$ mm ve $1,13\pm0,1$ mm olarak hesaplandı. 2.operasyonda aynı grupların ortalama damar grefti çapları sırasıyla $1,24\pm0,09$ ve $1,12\pm0,09$ mm olarak hesaplandı. Botulinum toksin uygulanan gruplar olan grup 3 ve 4'de birinci operasyonda ölçülen damar grefti çapları ilk operasyonda sırasıyla $1,29\pm0,15$ mm ve $1,16\pm0,14$ mm olarak lölürken 2. Operasyonda aynı grupların ortalama damar grefti çapları sırasıyla $1,41\pm0,05$ mm ve $1,23\pm0,13$ mm olarak lölüdü.

Primer trombüs görölmeyen örneklerin ilk ve ikinci cerrahi arasındaki femoral arter, femoral ven ve greft çap değişimleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6: Primer trombüs görülmeyen örneklerde grupların femoral arter, femoral ven ve greft çapındaki değişikliklerinin karşılaştırılması

	Group 1 (Salin + ven grefti) (n=7)	Group 2 (Salin + arter grefti) (n=7)	Group 3 (BoNT-A + vein grefti) (n=7)	Group 4 (BoNT-A + arter grefti) (n=7)	p- value*
Çap değişimi(mm) (median:min-max)					
Femoral arter	0.010 (-.006-0.050)	0.010 (-0.260-0.040)	0.150 (-0.290-0.320)	0.190 (0.110-0.240)	<0.001*
Femoral ven	0.770 (0.530-800)	0.770 (0.480-1.100)	1.000 (0.590-1.240)	1.020 (0.960-1.070)	<0.001*
Greft	-0.020 (-0.150-0.040)	0.000 (-0.320-0.080)	0.140 (-0.080-0.250)	0.060 (0.040-0.130)	<0.01*
Change in diameter (increased/decreased/no change) (%)					
Femoral artery					NA
Increased	4 (57.1)	5 (71.4)	6 (85.7)	7 (100.0)	
Decreased	2 (28.6)	2 (28.6)	1 (14.3)	-	
No change	1 (14.3)	-	-	-	
Femoral vein					NA
Increased	1 (14.3)	2 (28.6)	6 (85.7)	7 (100.0)	
Decreased	5 (71.4)	3 (42.9)	1 (14.3)	-	
No change	1 (14.3)	2 (28.6)	-	-	
Graft					NA
Increased	2 (28.6)	2 (28.6)	6 (85.7)	7 (100.0)	
Decreased	4 (57.1)	3 (42.9)	1 (14.3)	-	
No change	1 (14.3)	2 (28.6)	-	-	

NA: Not analyzed (Vaka sayısının az olması nedeniyle analiz edilmemiştir;) * p değerleri, Kruskal-Wallis analizi ve Bonferroni testi kullanılarak gruplar arasındaki karşılaştırmaları göstermektedir

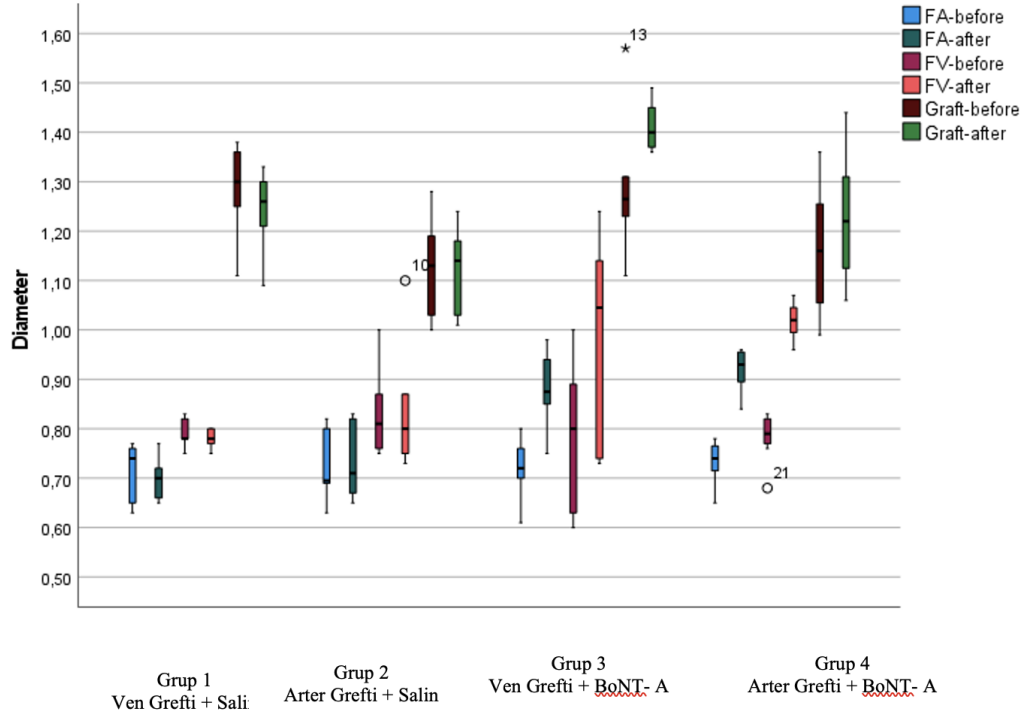
BoNT-A + ven grefti grubunda (p=0,030) ve BoNT-A + arter grefti grubunda (p<0,01) femoral arter çapı değişimi, salin + ven grefti grubuna (p=0,030) göre anlamlı derecede yüksekti. Ayrıca, BoNT-A + arter grefti grubunda femoral arter çapı değişimi, salin + arter grefti grubuna göre (p=0,013) daha yüksekti. Femoral ven çapı değişimi, BoNT-A + ven grefti grubunda (p=0,046) ve BoNT-A + arter grefti grubunda (p<0,01) salin + ven grefti grubuna göre anlamlı derecede

yüksekti. Greft çapındaki değişim, BoNT + ven grefti grubunda salin + ven grefti grubuna göre ($p=0,018$) daha yüksekti. Diğer çiftler halinde grup karşılaştırmalarında başka anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Trombotik olmayan damarlardan oluşan gruplarda femoral arter, femoral ven ve greft çapındaki değişikliklerin kutu grafikleri Şekil 21’de gösterilmektedir.

Tablo 7: Kontrol ve BoNT gruplarının femoral arter, femoral ven ve greft çaplarının karşılaştırılması (primer tromboze damarlar hariç)

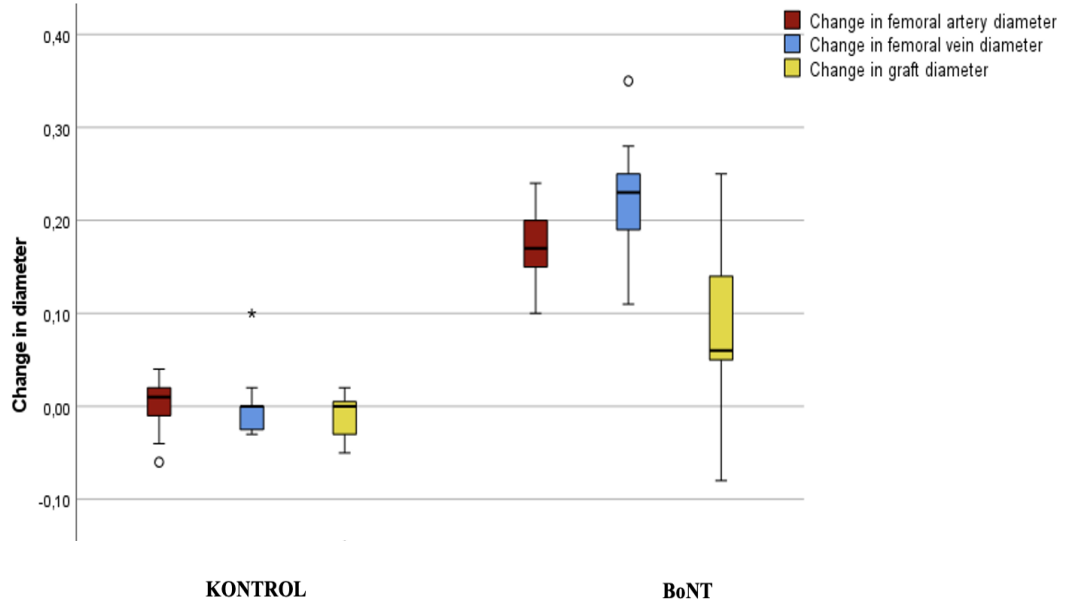
	Kontrol Gruplarını (n=11)	BoNT Grupları (n=13)	p-value*
İlk cerrahi femoral arter çapı	0,71±0,06	0,72±0,05	0.649
İkinci cerrahi femoral arter çapı	0,71±0,06	0.90±0,06	<0.001
İlk cerrahi femoral ven çapı	0,81±0,07	0,78±0,1	0.733
İkinci cerrahi femoral ven çapı	0,81±0,1	1.00±0,14	0.013
İlk cerrahi vasküler greft çapı	1,19±0,12	1,22±0,15	0.910
İkinci cerrahi vasküler greft çapı	1,18±0,15	1,31±0,13	0.015

* Mann-Whitney U test

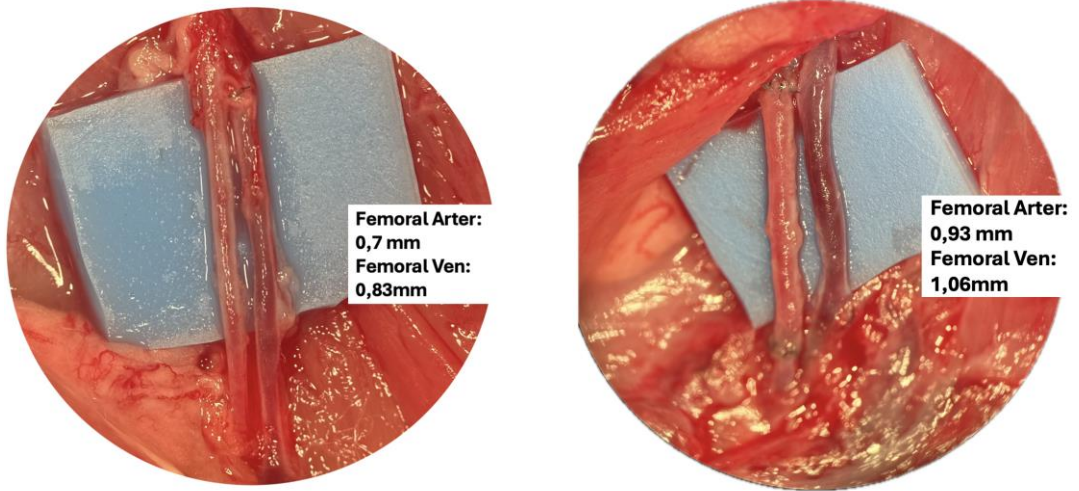


Şekil 21: Trombotik olmayan damar gruplarındaki femoral arter, femoral ven ve greft çapındaki değişikliklerin kutu grafikleri

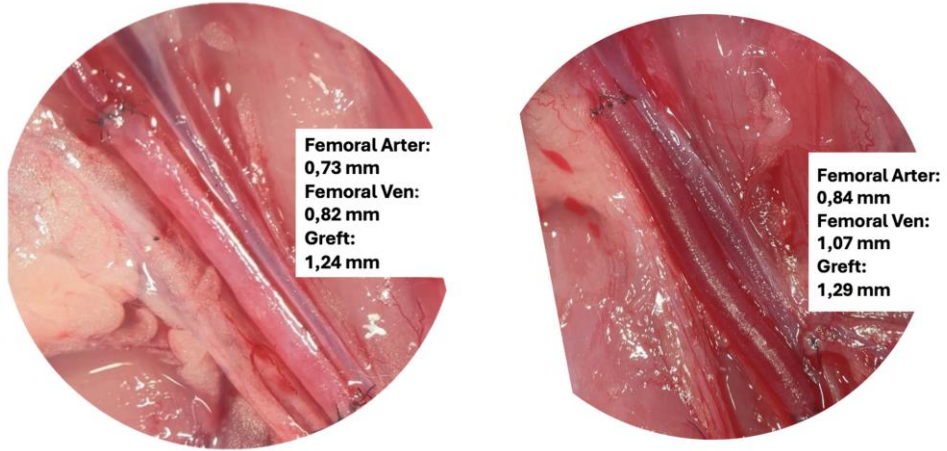
BoNT ve kontrol grubu karşılatırmalarında BoNT grubunda femoral arter çapındaki değişim kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$). Ayrıca kontrol grubunda femoral ven ve greft çapının medyan değerinde bir değişim olmazken, BoNT grubunda pozitif bir değişim gözlemlendi ve anlamlı bir fark görüldü ($p<0,001$). (Şekil 22). Trombotik olmayan örnekler için kontrol ve BoNT grupları arasındaki femoral arter, ven ve greft çaplarındaki değişimin kutu grafiği Şekil 22’de gösterilmiştir.



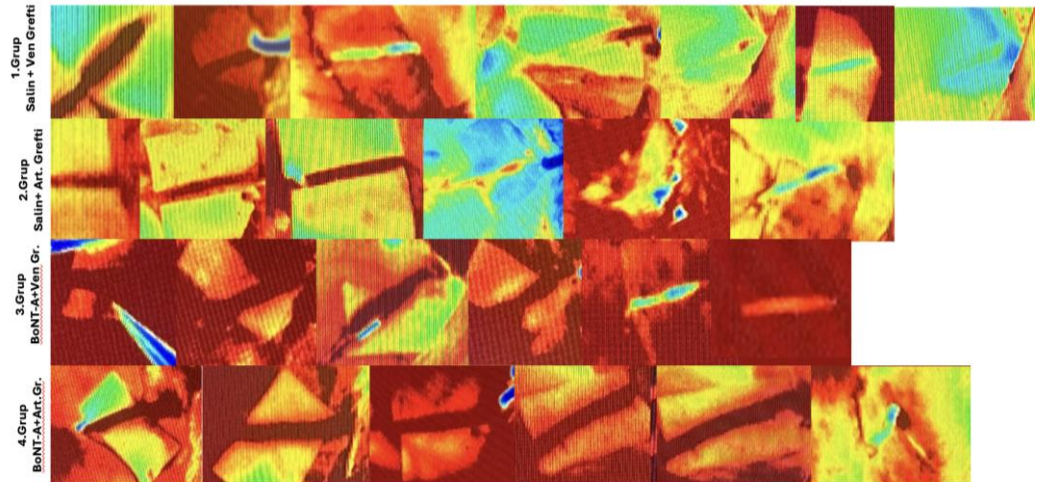
Şekil 22: Trombotik olmayan damar gruplarındaki kontrol ve BoNT gruplarında femoral arter, femoral ven ve greft çapındaki değişikliklerin kutu grafikleri



Şekil 23: Botulinum toksin uygulanan anastomozda A: Femoral arter ve venin ilk görünümü. B: Anastomoz ve femoral damarların ikinci operasyonundaki görünümü



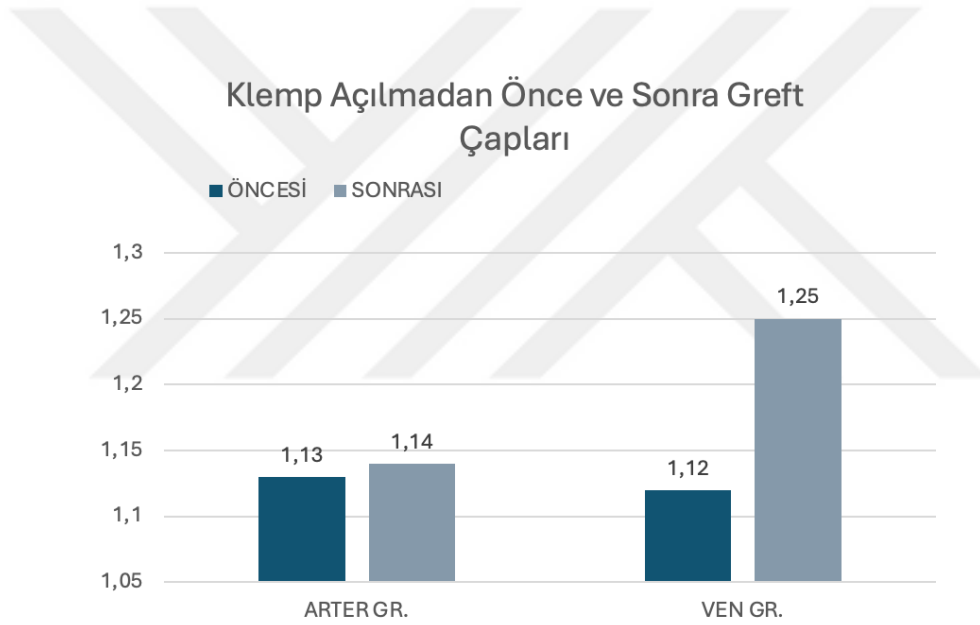
Şekil 24: Botulinum toksin uygulanan anastomozda A: Anastomoz ve femoral damarların ilk görünümü. B: Anastomoz ve femoral damarların ikinci operasyonundaki görünümü



Şekil 25: Deney ve kontrol gruplarındaki damarların ICG görüntüleri. BoNT-A grupları olan 3. ve 4. gruplarda damarların büyümüş görünümü dikkati çekmektedir

Ek olarak ilk cerrahide greftlerin anastomoz akımı sağlanmadan öncesi ve sonrasında çapları ölçüldü ve değerler kaydedildi. Ven grefti kontrol grubunda anastomoz öncesi ve damar klempleri açıldıktan sonra ölçülen damar grefti çapları

sırasıyla $1,12\pm0,09$ ve $1,21\pm0,1$ olarak belirlendi. Arter grefti kontrol grubunda anastomoz öncesi ve damar klempleri açıldıktan sonra ölçülen damar grefti çapları sırasıyla $1,11\pm0,09$ ve $1,21\pm0,09$ olarak belirlendi. Ven grefti BoNT-A grubunda anastomoz öncesi ve damar klempleri açıldıktan sonra ölçülen damar grefti çapları sırasıyla $1,12\pm0,16$ ve $1,26\pm0,16$ olarak belirlendi. Arter grefti BoNT-A grubunda anastomoz öncesi ve damar klempleri açıldıktan sonra ölçülen damar grefti çapları sırasıyla $1,14\pm0,11$ ve $1,16\pm0,13$ olarak belirlendi.

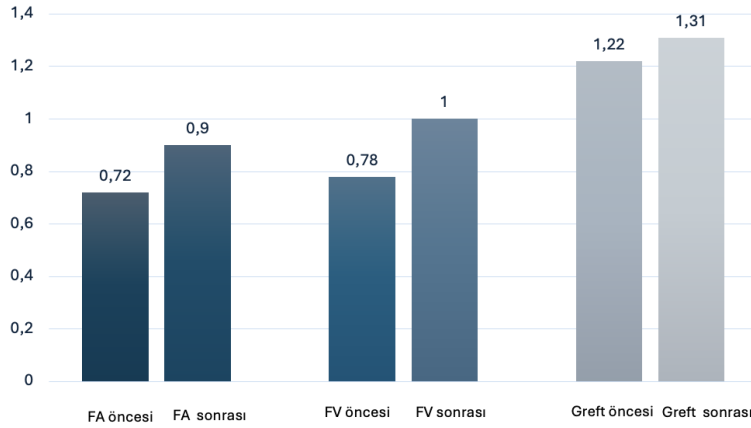


Şekil 26: Arter grefti ve ven grefti gruplarında klempler açılmadan önce ölçülen ortalama çaplar

1.operasyonda klempler açılmadan önce ve açıldıktan sonra ölçülen çaplar arter grefti gruplarında ortalama olarak sırasıyla $1,13\pm0,11$ ve $1,14\pm0,11$ olarak belirlendi. Ven grefti gruplarında ise bu ortalama değerleri sırasıyla $1,14\pm0,11$ ve $1,25\pm0,15$ olarak belirlendi. Ven grefti gruplarındaki greft çap değişiminin arter greftlerine göre daha yüksek olduğu görüldü.

Botulinum grupları kendi içinde karşılaştırıldığında damar çapındaki artış en fazla anastomoz komşuluğundaki femoral venlerde görüldü (öncesi $0,78\pm0,1$; sonrası $1\pm0,14$). Ven boyutlarındaki değişimi femoral arter boyutlarındaki değişim takip etti (öncesi $0,72\pm0,05$; sonrası $0,9\pm0,06$). En az boyut değişimi ise vasküler greftlerde görüldü (öncesi $1,22\pm0,15$; sonrası $1,31\pm0,13$).

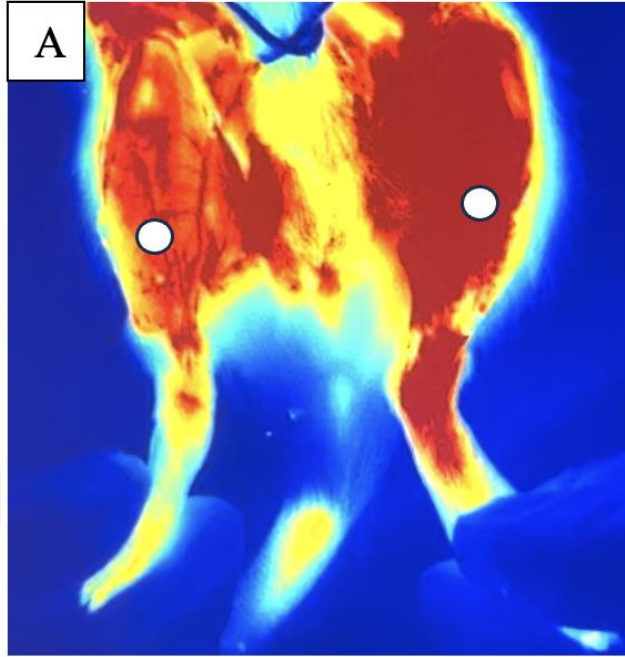
BoNT-A Gruplarında Çap Değişimleri



Şekil 27: Tromboze damarlar dahil edilmeden botulinum toksin uygulanan ve uygulanmayan gruplarda 1. ve 2. operasyonlarda ölçülen ortalama damar çaplarındaki değişim

4.3. ICG Floresan Anjiyografi ile Vasküler Akımın ve Kas Perfüzyonunun Görüntülenmesi

Tüm gruplardaki sıçanların ikinci operasyonlarında arka bacak ön grup kaslarının ve vasküler greft ile oluşturulan anastomozun akımı, indosiyanin yeşili (ICG) aracılı floresan anjiyografi ile değerlendirildi. Stres testi sonrası kas perfüzyonundaki azalmayı değerlendirmek için sol taraf tibialis anterior kasının ortasından ve sağ taraf tibialis anterior kasının orta noktasından ölçülen ICG tutulum yüzdeleri sağ/sol kas olacak şekilde oranlandı.



Şekil 28: Stres testi sonrası sağ bacağın kan akımındaki azalmayı tespit edebilmek için ICG tutulum yüzdeleri birbirlerine oranlanan sağ tibialis anterior kasının orta noktası ve sol taraf tibialis anterior kasının orta noktası.

Sağ/sol kasların ICG tutulum oranları tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8: Grup 1’deki sıçanların sağ/ sol kas ICG tutulum oranları

GRUP 1 SIÇAN NO	SAĞ /SOL TA KAS ORANI
1	0,71
2	0,64
3	0,42
4	0,2
5	0,34
6	0,65
7	0,73

Tablo 9: Grup 2’deki sıçanların kas ve damar ICG tutulum oranları

GRUP 2 SIÇAN NO	SAĞ /SOL TA KAS ORANI
1	0,71
2	0,72
3	0,31
4	0,66
5	0,25
6	0,67
7	0,2

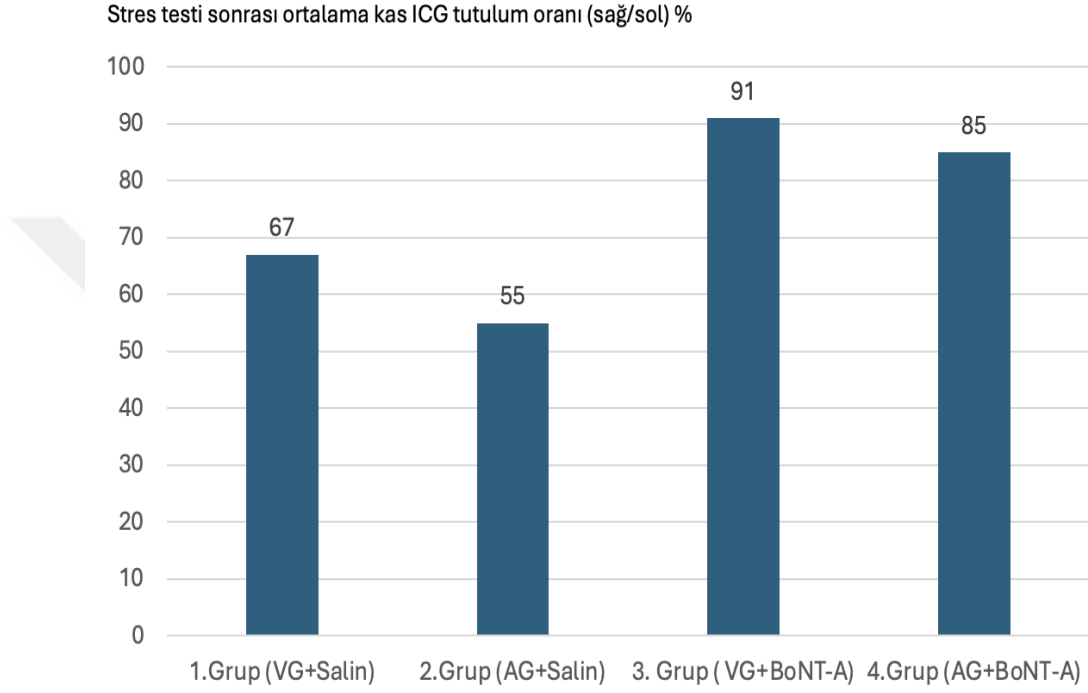
Tablo 10: Grup 3’deki sıçanların kas ve damar ICG tutulum oranları

GRUP 3 SIÇAN NO	SAĞ /SOL TA KAS ORANI
1	1
2	0,87
3	0,9
4	0,7
5	0,33
6	1,31
7	0,7

Tablo 11: Grup 4’deki sıçanların kas ve damar ICG tutulum oranları

GRUP 4 SIÇAN NO	SAĞ /SOL TA KAS ORANI
1	0,76
2	0,87
3	0,85
4	0,92
5	1
6	0,75
7	0,85

Tüm ratlar birlikte değerlendirildiğinde sağ/sol ICG tutulum oranının BoNT-A+ arter grubunda salin + arter ve salin+ ven grefti gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,023$).



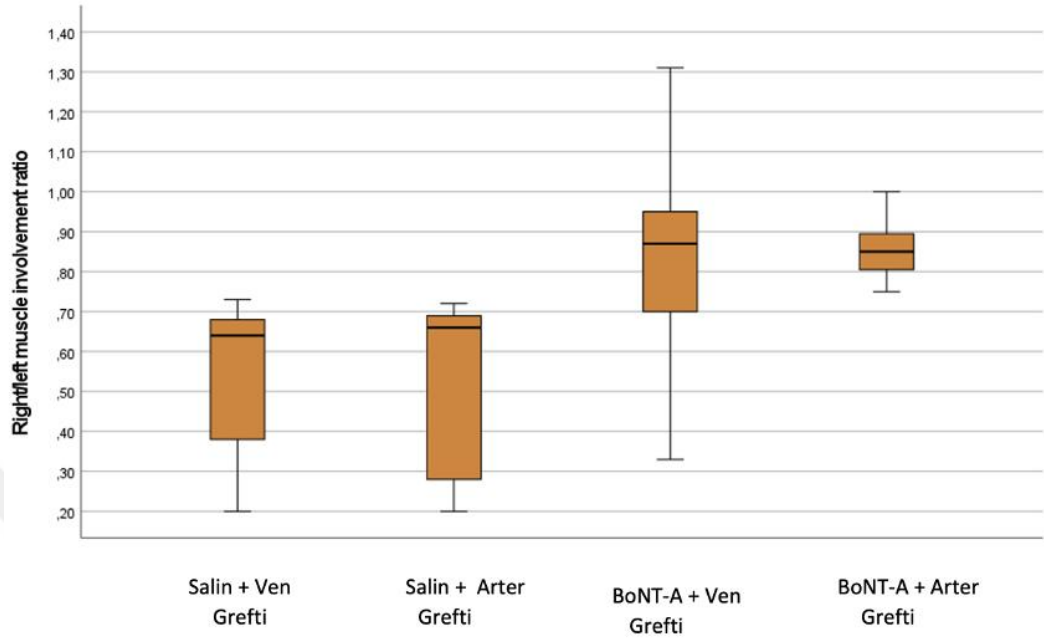
Şekil 29: Stres testi sonrasında sağ tibialis anterior kasının ortalama ICG tutulumunda azalma yüzdelerinin gruplar arasındaki karşılaştırması

Stres testi uygulanan ratlarda ise stres testi sonrası grup 1’de sağ tibialis anterior kas ICG tutulumunun sol kas ICG tutulumuna oranı ortalama $0,63\pm0,12$ iken grup 2’de $0,5\pm0,09$; grup 3’de $0,91\pm0,23$ ve grup 4’de $0,86\pm0,09$ olarak belirlendi. Sağ/sol kas ICG tutulum oranı, BoNT-A + ven ve BoNT-A + arter grefti gruplarında salin + arter grefti grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; $p=0,030$, $p=0,011$). Gruplar arası karşılaştırmalarda başka bir fark bulunmamıştır.

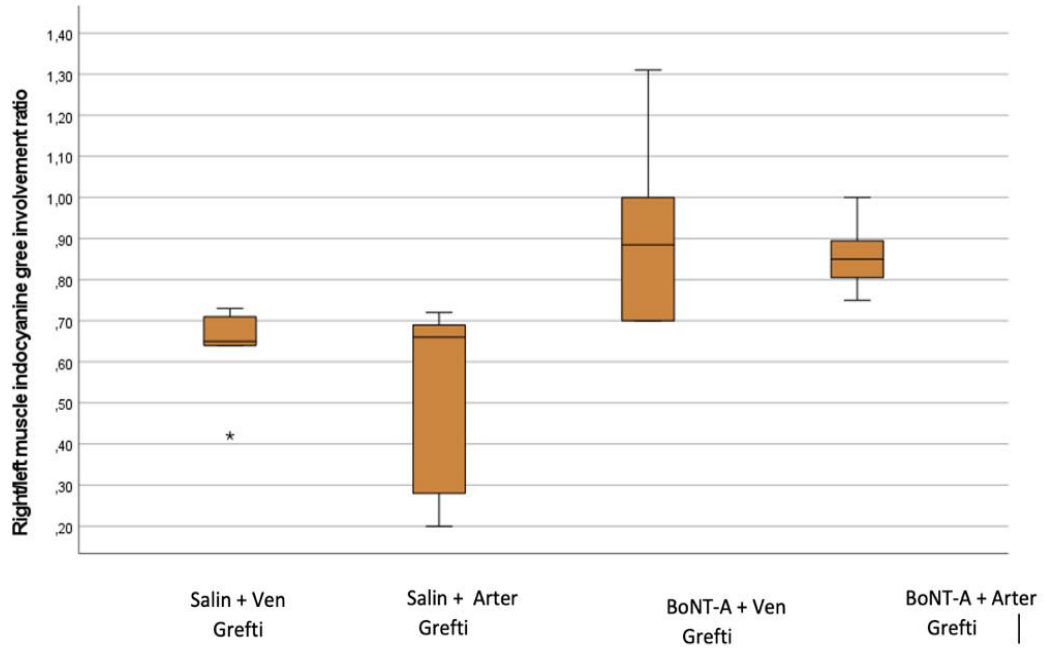
Tüm ratların sağ/sol kas ICG tutulum oranlarının kutu grafiği sırasıyla Şekil 30’da, stres testi yapılan ratlarda grupların sağ/sol kas ICG tutulum oranlarının kutu grafiği Şekil 31’de gösterilmiştir.

Tablo 12: Stres testi yapılan sıçanlarda sağ/sol kas ICG tutulum oranları

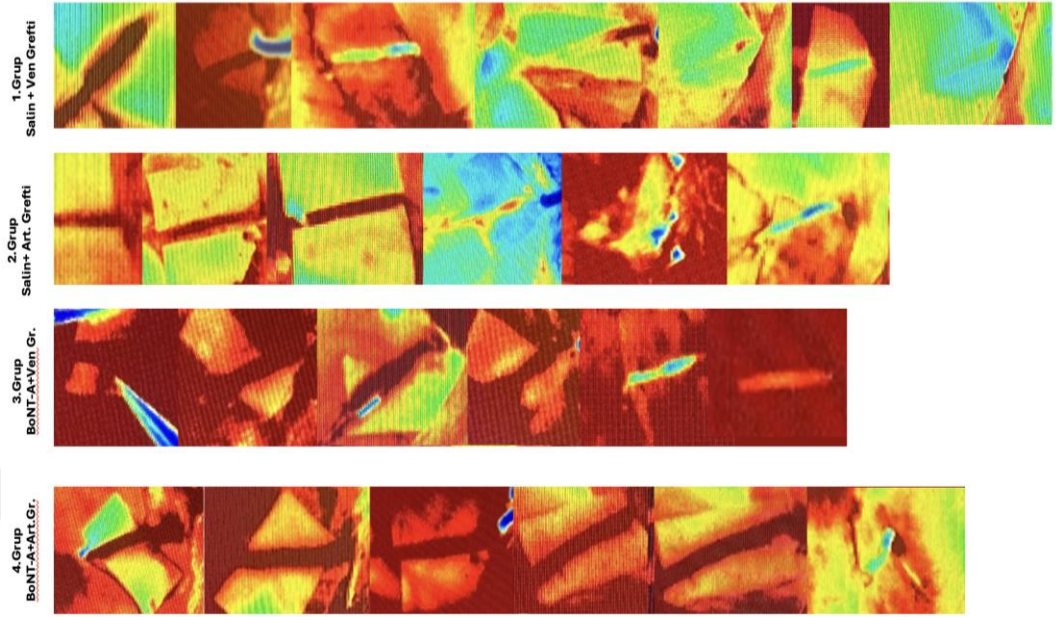
	Group 1 (Control venous graft) (n=5)	Group 2 (Control arterial graft) (n=7)	Group 3 (BoNT-A + vein graft) (n=6)	Group 4 (BoNT-A + artery graft) (n=7)	p- value*
Sağ / Sol kas ICG tutulum oranı (mean $\pm$ SD)	0.63 ± 0.12	0.50 ± 0.09	0.91 ± 0.23	0.86 ± 0.09	
Sağ/Sol kas ICG tutulum oranı (median:min-max)	0.65 (0.42-0.73)	0.66 (0.20-0.72)	0.89 (0.70-1.31)	0.85 (0.75-1.00)	<0.01



Şekil 30: Tüm ratlarda grupların sağ kas/ sol kas tutulum oranlarının kutu grafiği



Şekil 31: Stres testi yapılan ratlarda grupların sağ kas/ sol kas ICG tutulum oranlarının kutu grafiği



Şekil 32: Stres testi sonrası anastomozların ICG tutulumları (3.ve 4. gruptaki anastomozlarda görülen daha fazla ICG tutulumu ve nispeten büyük damar çapları dikkati çekmektedir)

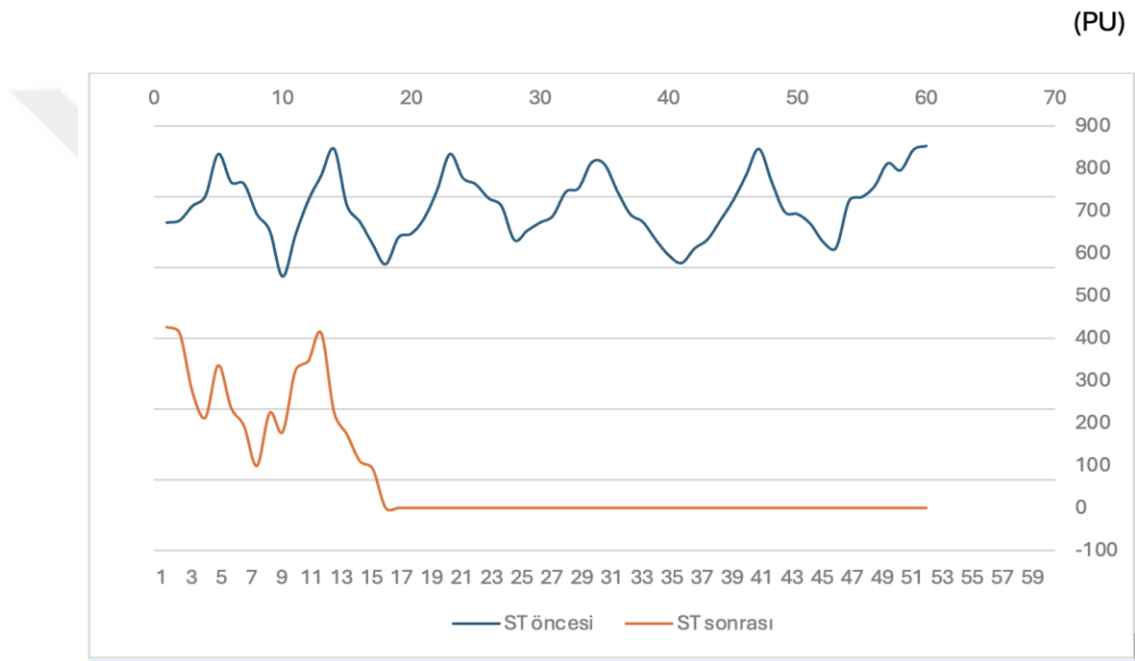
4.4. Lazer Doppler Akımölçer ile Anastomoz Akımı Değerlendirme

Lazer Doppler akım ölçer ile akım ölçümü her ratta ilk cerrahide anastomoz tamamlandıktan sonra; ikinci cerrahide yine aynı lokalizasyondan stres testi öncesi ve sonrasında anastomoz distalindeki femoral arter segmentinden yapıldı.

Tüm Doppler akımölçer değerlendirilmelerinde elde edilen ardışık 60 adet PU birimli veriler kaydedildi ve ortalamaları alınarak analizlere dahil edildi.

Stres testi yapılan ratların anastomoz öncesi ve sonrası anastomoz akımları ven grefti + salin grubunda sırasıyla ortalama $684,6 \pm 15,28$ PU ve $701,34 \pm 11,15$ PU; arter grefti + salin grubunda $712,61 \pm 19,3$ PU ve $702,72 \pm 21,97$ PU; ven grefti + BoNT-A grubunda $706,54 \pm 51,42$ PU ve $763,37 \pm 45,06$ PU; arter grefti + BoNT-A grubunda $691,38 \pm 47,84$ PU ve $739,47 \pm 47,85$ PU olarak belirlendi.

ST öncesi ve ST sonrası anastomoz akımları ven grefti + salin grubunda sırasıyla ortalama $701,34 \pm 11,15$ PU ve $248,48 \pm 191,86$; arter grefti + salin grubunda $702,72 \pm 21,97$ PU ve $210,25 \pm 166,38$ PU; ven grefti+ BoNT-A grubunda $763,375 \pm 45,06$ PU ve $375,96 \pm 292,7$ PU; arter grefti + BoNT-A grubunda $739,47 \pm 47,85$ PU ve $411,58 \pm 189,87$ PU olarak belirlendi.



Şekil 33: Ven grefti +salin grubunda stres testi sonrası tromboze olan bir anastomozun LDF akım grafiği

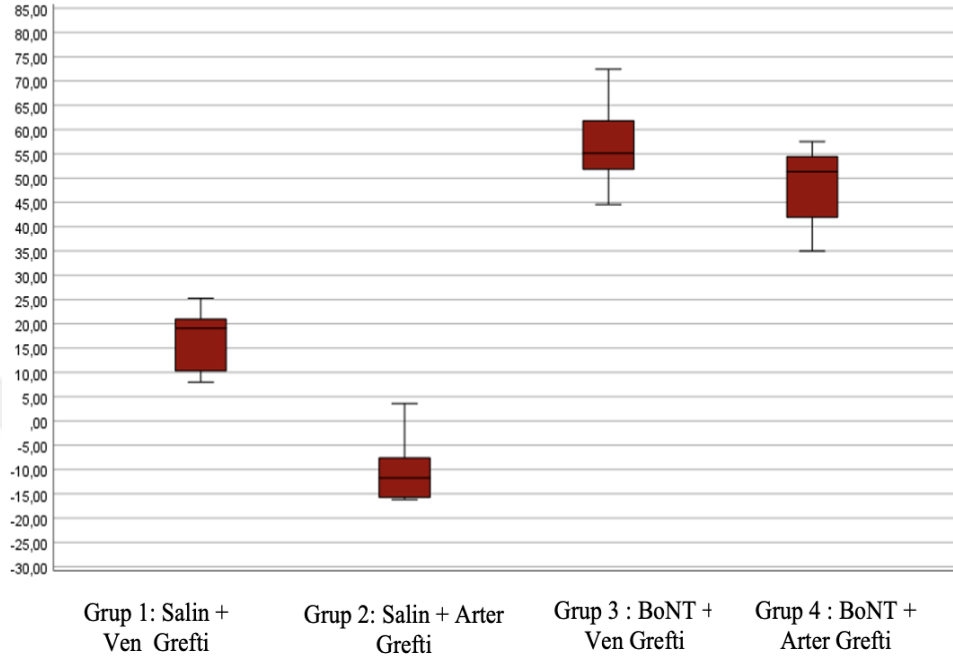
Stres testi yapılan sıçanların anastomozların ilk ve ikinci cerrahide stres testi öncesinde ölçülen akım değerleri Tablo 13’de gösterilmiştir.

Tablo 13: Stres testi yapılan sıçanların anastomozların ilk ve ikinci cerrahide ölçülen akım değerleri

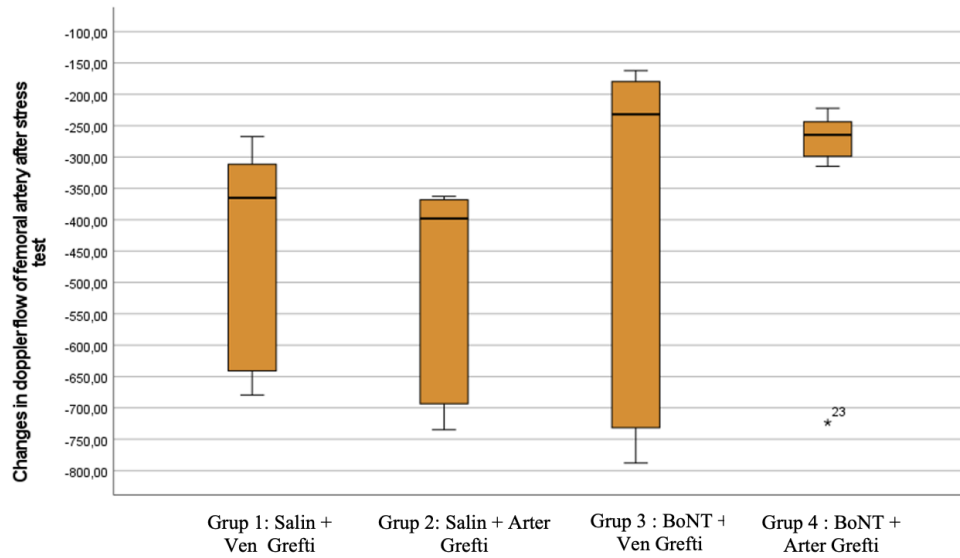
	Group 1 (Salin + ven grefti) (n=5)	Group 2 (Salin + arter grefti) (n=6)	Group 3 (BoNT + ven grefti) (n=6)	Group 4 (BoNT + arter grefti) (n=7)	p- değeri*
	Mean±SD				
İlk cerrahi anastomoz akımı	684.60±15.28	712,61±19.30	706.55±51.42	691.38±47.85	0.446
İkinci cerrahi anastomoz akımı	701.34±11.15	702.72±21.98	763.38±45.06	739.48±47.86	0.050
Anastomoz akım değişimi	16.74±7.33	-9.90±7.38	56.83±9.59	48.10±8.62	<0.001
Stres testi öncesi akım	701.34±11.15	702.72±21.98	763.38±45.06	739.48±47.85	0.050
Stres testi sonrası akım	248.48±191.87	210.26±166.38	375.97±292.71	411.59±189.88	0.126
Stres testiyle akım değişimi	-452.86±192.94	-492.40±173.31	-387.46±290.63	-327.89±177.10	0.153

* p değerleri Kruskal-Wallis analizi ile grup içi karşılaştırmaları gösterir.

Anastomoz akım değışimi
(PU)



Stres Testi Akım Değişimi
(PU)



Şekil 34: Stres testi yapılan ratlarda anastomozların ilk ve ikinci cerrahide ST öncesinde ve ST sonrasında ölçülen Doppler akışlarının kutu grafikleri

Stres testi yapılan ratlarda gruplar arasında ilk cerrahide ölçülen anastomoz akımları, ikinci cerrahi anastomoz akımları ve ST'den sonra ölçülen akımlar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (sırasıyla $p=0,446$, $p=0,050$, $p=0,126$). Lazer Doppler akımölçer değerlendirmelerinde stres testi yapılan ratlarda gruplar arasında ikinci cerrahi sırasında ölçülen anastomoz akımları, ortalama akım azalması görülen kontrol arter grefti grubuna kıyasla BoNT + arter grefti ve BoNT + ven grefti gruplarında anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (her iki karşılaştırma için de $p<0,01$).

Stres testi nedeniyle oluşan anastomoz akımındaki azalmalar grupların ayrı ayrı karşılaştırmasında benzer görülmüşken; BoNT ve kontrol gruplarının ikili karşılaştırmasında stres testi ile Doppler akışındaki azalma kontrol grubunu oluşturan anastomozlara kıyasla BoNT grubunu oluşturan anastomozlarda daha düşük ($p=0,030$) bulunmuştur. İlk ve ikinci cerrahide ölçülen anastomoz akım değişimleri kontrol grubunu oluşturan anastomozlarda ikinci cerrahide belirgin değişiklik göstermezken; BoNT grubunu oluşturan anastomozlarda önemli ölçüde artış göstermiştir ($p<0,001$).

4.5. Histolojik Bulgular

4.5.1. Işık Mikroskopi Bulguları

A. HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA BULGULARI

Deney hayvanlarından elde edilen kas dokularına uygulanan hematoksilin eozin boyama protokolü sonrasında incelenen preperatlarda hem botulinum toksin uygulanan arter ve ven grefti gruplarında hem de kontrol arter ve ven grefti gruplarında gastrokinemius ve tibialis anterior kaslarında yaygın dejeneratif bulgular saptanmıştır. Saptanan bulgular segmental nekroz, enine çizgilenme kaybı, nükleusun santrale göçü, bağ doku artışı, interfaziküler ödem ve inflamatuvar hücre

sayısında artış parametrelerine göre skorlandı. (0: hiç yok, 1: <%10, 2:%10-30, 3: %30-50, 4: >%50)

Tüm gruplarda kaydedilen dejenerasyon skorlama sonuçları tablo 14-17’de gösterilmiştir.

Tablo 14: Ven grefti + salin iki kas grubunda kas dejenerasyon skorları

	segmental nekroz	enine çizgilenme kaybı	nükleusun santrale göçü	kas liflerinin ayrılması	bağ doku artışı	interfasküler ödem	inflatuar hücre sayısında artış
1.1. m. Gastrocnemius	2	2	3	3	1	1	2
1.1. m. tibialis	3	4	3	4	1	1	2
1.2. m. Gastrocnemius	2	4	3	2	2	2	1
1.2. m. tibialis	1	4	4	4	2	3	3
1.3. m. Gastrocnemius	3	4	4	3	1	2	3
1.3. m. tibialis	1	4	4	4	1	1	2
1.4. m. Gastrocnemius	1	4	4	3	1	3	2
1.4. m. tibialis	1	4	4	4	3	2	3
1.5. m. Gastrocnemius	3	4	4	3	1	3	3
1.5. m. tibialis	1	4	4	4	1	2	3
1.6. m. Gastrocnemius	1	4	3	4	1	2	2
1.6. m. tibialis	2	4	4	3	1	2	4
1.7. m. Gastrocnemius	1	2	3	3	1	3	4
1.7. m. tibialis	1	4	3	3	1	1	3

Tablo 15: Arter grefti + salin iki kas grubunda kas dejenerasyon skorları

	segmental nekroz	enine çizgilenme kaybı	nükleusun santrale göçü	kas liflerinin ayrılması	bağ doku artışı	interfasküler ödem	increased inflammatory cell
2.1. m. Gastrocnemius	2	4	4	4	1	1	2
2.1. m. tibialis	1	4	4	4	1	1	1
2.2. m. Gastrocnemius	1	3	3	3	1	2	1
2.2. m. tibialis	1	3	3	3	1	1	1
2.3. m. Gastrocnemius	2	4	3	4	1	1	1
2.3. m. tibialis	1	4	3	4	1	3	3
2.4. m. Gastrocnemius	2	4	4	2	1	3	1
2.4. m. tibialis	2	4	4	3	1	2	2
2.5. m. Gastrocnemius	3	4	4	3	1	1	1
2.5. m. tibialis	2	3	3	3	2	3	3
2.6. m. Gastrocnemius	1	3	3	2	1	1	1
2.6. m. tibialis	1	4	4	4	1	1	1
2.7. m. Gastrocnemius	1	3	3	3	1	2	2
2.7. m. tibialis	2	4	4	4	1	3	4

Tablo 16: Ven grefti + BoNT-A grubunda kas dejenerasyon skorları

	segmental nekroz	enine çizgilenmede kayıp	nükleusun santrale göçü	kas liflerinin ayrılması	bağ doku artışı	interfasküler ödem	inflatuar hücre sayısında artış
3.1. m. Gastrocnemius	3	3	4	2	1	2	2
3.1. m. tibialis	3	4	3	2	1	3	1
3.2. m. Gastrocnemius	1	4	3	1	1	4	2
3.2. m. tibialis	2	3	3	3	2	4	4
3.3. m. Gastrocnemius	1	3	3	3	1	3	1
3.3. m. tibialis	3	4	3	2	2	2	4
3.4. m. Gastrocnemius	1	3	3	2	1	2	1
3.4. m. tibialis	3	4	4	3	1	3	4
3.5. m. Gastrocnemius	2	3	3	3	1	2	2
3.5. m. tibialis	3	4	3	3	1	4	2
3.6. m. Gastrocnemius	2	4	3	2	1	2	2
3.6. m. tibialis	1	4	3	3	1	2	2
3.7. m. Gastrocnemius	4	4	4	2	3	3	3
3.7. m. tibialis	2	3	3	3	1	3	3

Tablo 17: Arter grefti + BoNT-A grubunda kas dejenerasyon skorları

	segmental nekroz	enine çizgilenmede kayıp nükleusun santrale göçü	kas liflerinin ayrılması	bağ doku artışı	interfasiküler ödem	inflatuar hücre sayısında artış
4.1. m. Gastrocnemius	3	3	3	3	1	3
4.1. m. tibialis	2	4	4	3	2	2
4.2. m. Gastrocnemius	3	4	4	3	2	3
4.2. m. tibialis	3	4	4	3	1	3
4.3. m. Gastrocnemius	2	3	4	3	1	3
4.3. m. tibialis	1	4	4	4	1	2
4.4. m. Gastrocnemius	3	4	4	4	3	4
4.4. m. tibialis	1	3	3	3	1	2
4.5. m. Gastrocnemius	3	3	4	3	1	2
4.5. m. tibialis	3	3	4	3	1	2
4.6. m. Gastrocnemius	4	3	4	3	1	3
4.6. m. tibialis	1	3	3	4	1	3
4.7. m. Gastrocnemius	1	3	4	3	1	2
4.7. m. tibialis	1	3	3	3	1	2

Grupların ortalama histolojik skorlarının birbirinden anlamlı derecede farklı olmadığı görüldü ($p=0,217$).

Tablo 18: Grupların ortalama histolojik skorları

	Group 1 (Salin +ven grefti) (n=7)	Group 2 (Salin + arter grefti) (n=7)	Group 3 (BoNT +vengrefti) (n=7)	Group 4 (BoNT + arter grefti) (n=7)	p-value*
Ortalama Histolojik Skor	0.26 (0.05)	0.25 (0.05)	0.25 (0.05)	0.26 (0.02)	0.217

*Kruskal-Wallis test

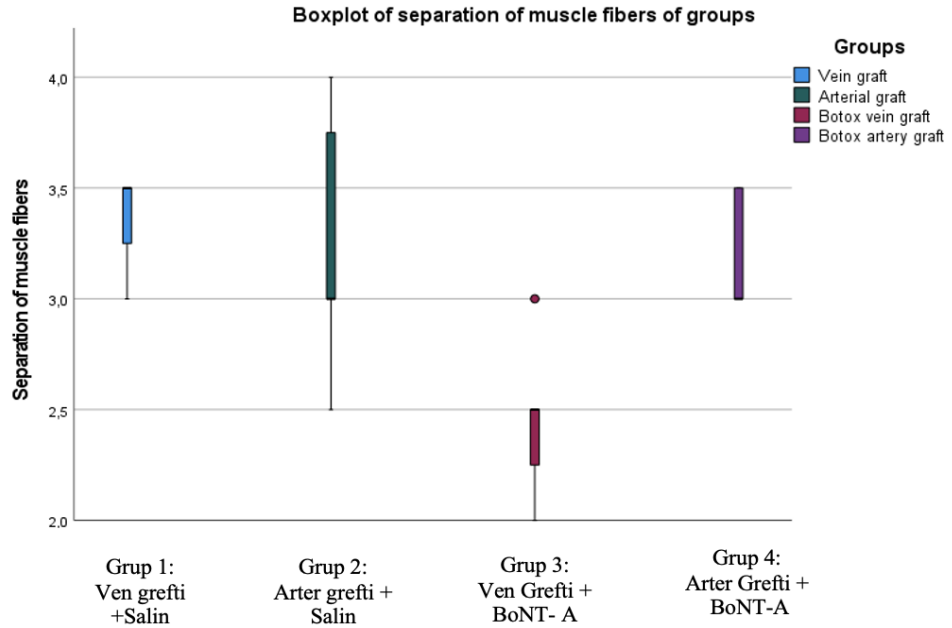
Gastrokinemius ve tibialis anterior kas gruplarının ortalama histolojik skorlarının karşılaştırılması Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 19: Tüm gruplarda gastrokinemius ve tibialis anterior kaslarının histopatolojik skorlaması

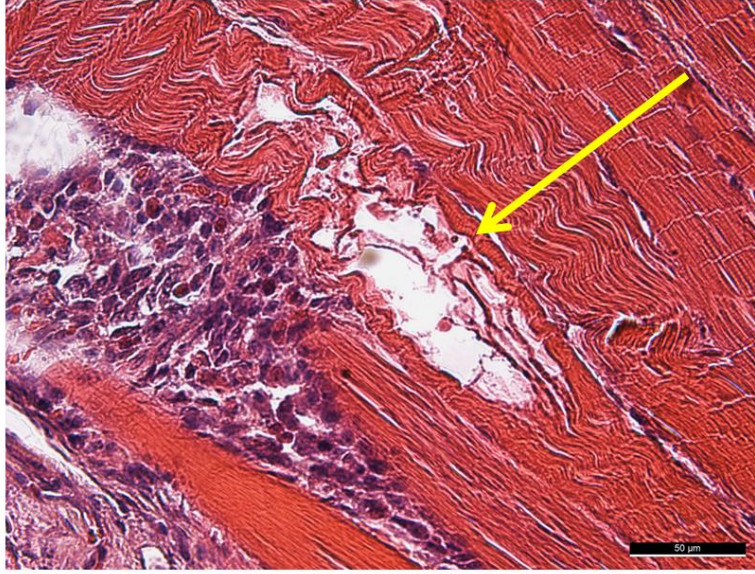
	Grup 1 (ven grefti +salin) (n=7)	Grup 2 (arter grefti +salin) (n=7)	Grup 3 (ven grefti + BoNT-A) (n=7)	Grup 4 (arter grefti + BoNT-A) (n=7)	P- değeri*
Mean values of gastrocnemius and tibialis anterior muscle					
Segmental nekroz	1.5 (1.0-2.0)	1.5 (1.0-2.5)	2.0 (1.5-3.0)	2.5 (1.0-3.0)	0.071
Horizontal lif kaybı	4.0 (3.0-4.0)	3.5 (3.0-4.0)	3.5 (3.5-4.0)	3.5 (3.0-4.0)	0.290
Nükleusun santrale göçü	3.5 (3.0-4.0)	3.5 (3.0-4.0)	3.0 (3.0-3.5)	3.5 (3.5-4.0)	0.099
Kas liflerinin ayrılması	3.5 (3.0-3.5)	3.0 (2.5-4.0)	2.5 (2.0-3.0)	3.0 (3.0-3.5)	<0.01
Bağ doku artışı	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-1.5)	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	0.639
İnterfasiküler ödem	2.0 (1.0-2.5)	2.0 (1.0-2.5)	2.5 (2.0-4.0)	2.5 (2.0-3.0)	0.020
İnflamatuar hücre sayısında artış	2.5 (2.0-3.5)	1.5 (1.0-3.0)	2.5 (1.5-3.0)	2.0 (1.0-2.0)	0.013

*Kruskal-Wallis test with Posthoc Bonferroni test

Kas liflerinin ayrılması ven grefti + BoNT-A grubunda, arter grefti + BoNT-A grubuna ($p<0.001$), arter grefti + salin grubuna ($p<0.01$) ve ven grefti +salin grubuna göre ($p<0.001$) belirgin olarak daha az görülmüştür

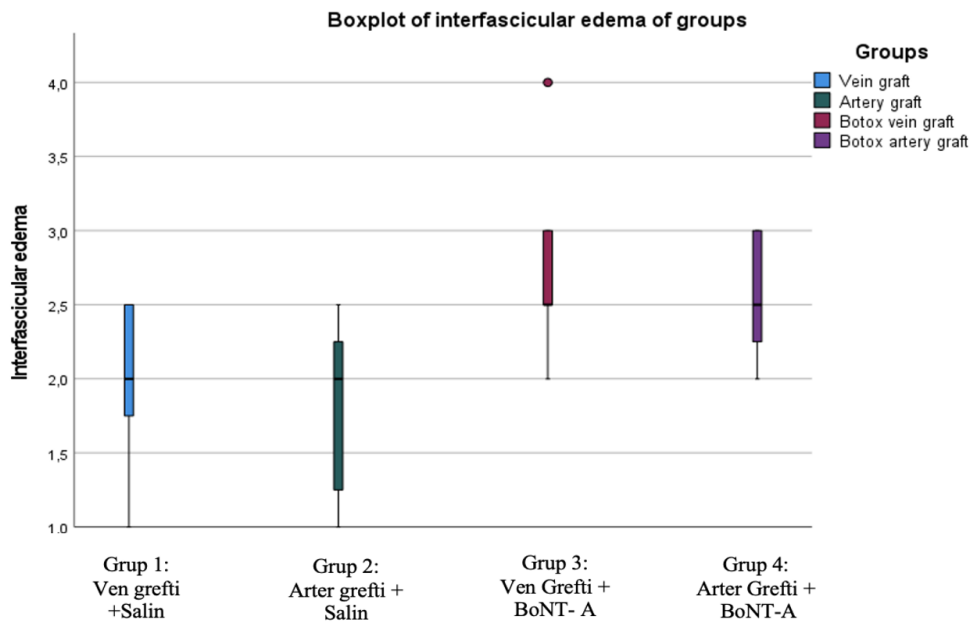


Şekil 34: Grupların kas fiberleri ayrılma skorlarının kutu grafikleri

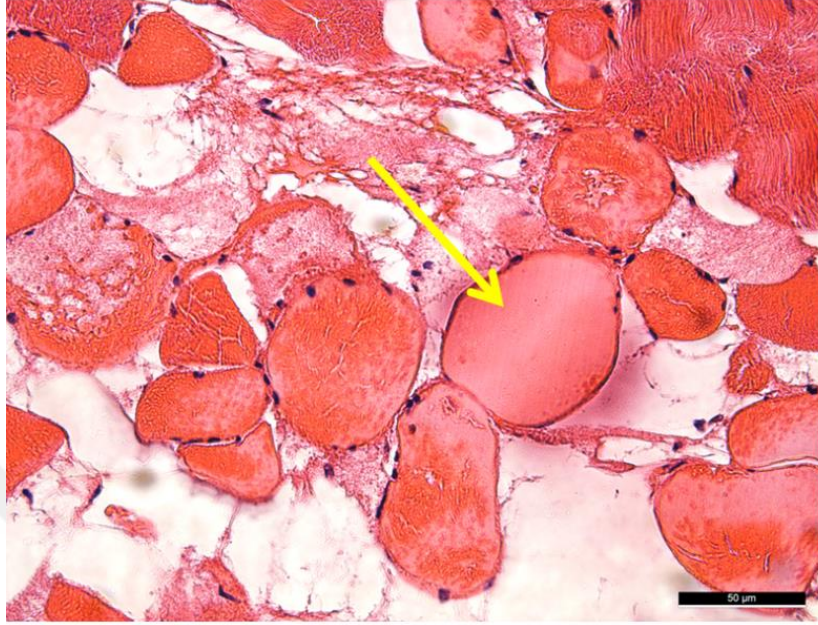


Şekil 35: Ven grefti +salin grubunda gastrokinemius kas kesitinde kas liflerinin ayrılması sarı ok ile gösterilmiştir (Görüntü 40x büyütmede elde edilmiştir)

Ven grefti + salin grubunda interfasküler ödem; ven grefti + BoNT-A grubuna ($p=0.035$), arter grefti + salin grubuna ($p=0.025$) ve ven grefti + BoNT-A grubuna göre ($p<0.01$) daha az görülmüştür.

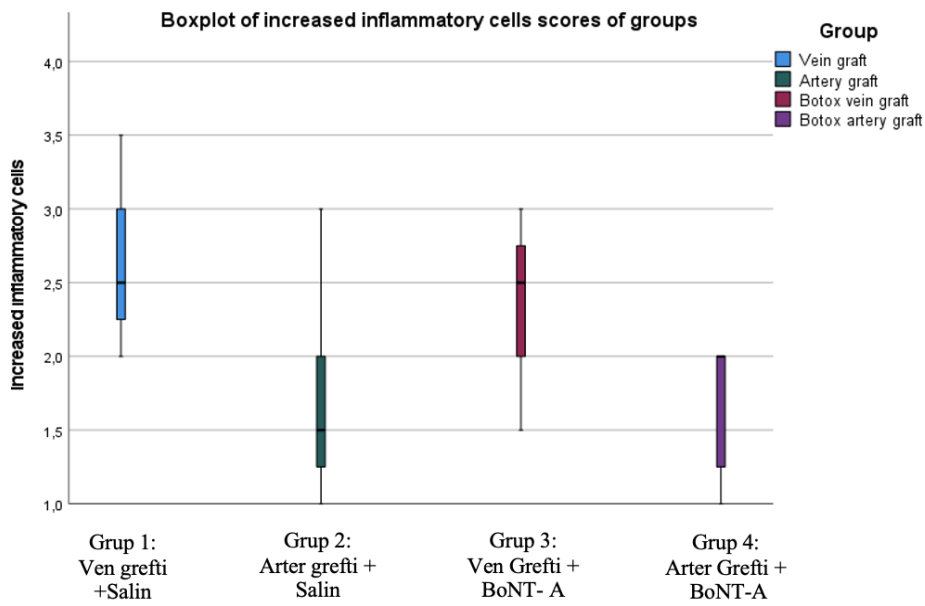


Şekil 36: Grupların kas interfasküler ödem skorlarının kutu grafikleri

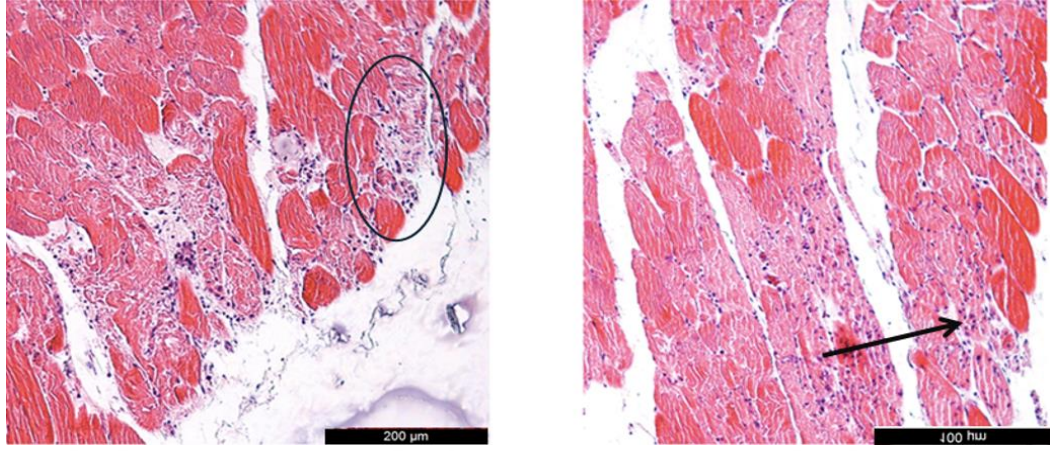


Şekil 37: Arter grefti + BoNT-A grubunda tibialis anterior kas kesitinde interfasiküler ödem ve kas liflerinde çizgilenme kaybı sarı ok ile gösterilmiştir. (Görüntü 40x bütümede elde edilmiştir)

Tüm ven grefti gruplarına göre inflamatuvar hücre sayısında artış skoru arter grefti + salin grubunda ($p=0.011$) ve arter grefti + BoNT-A grubunda ($p<0.01$) daha düşük bulunmuştur.

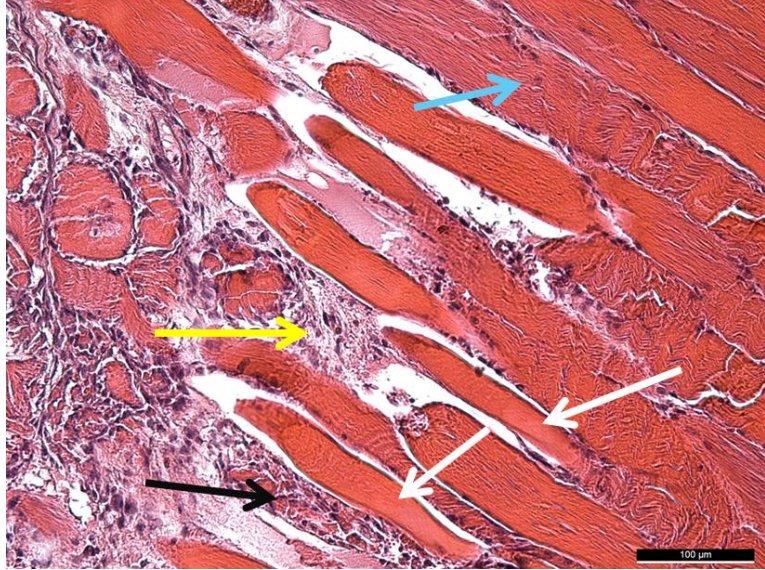


Şekil 38: Grupların artmış inflamatuvar hücre skorlarının kutu grafikleri



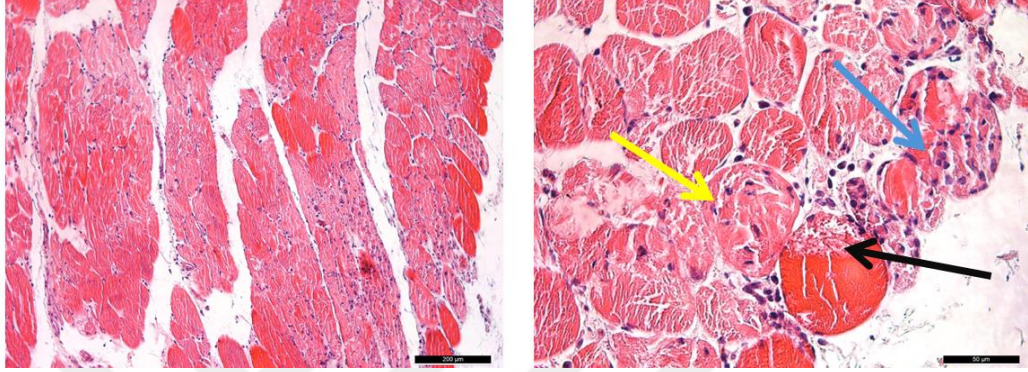
Şekil 39: Arter grefti + BoNT-A grubunda tibialis anterior kasında inflamatuvar hücre sayısı artışı gösterilmiştir (görüntüler sırasıyla 10x ve 20x büyütmede elde edilmiştir)

Diğer skorlamalarda ise gruplar arası veya gruplar içerisinde belirgin farklılıklar görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 40: Ven grefti + salin grubunda, gastrokinemius kasından elde edilen kesitte; Kas lifleri arasında bağ doku artışı sarı ok, enine çizgilenmede kayıp beyaz ok, inflamatuvar hücre artışı siyah ok ve hücre çekirdeğinin santrale göçü mavi ok ile gösterilmiştir.

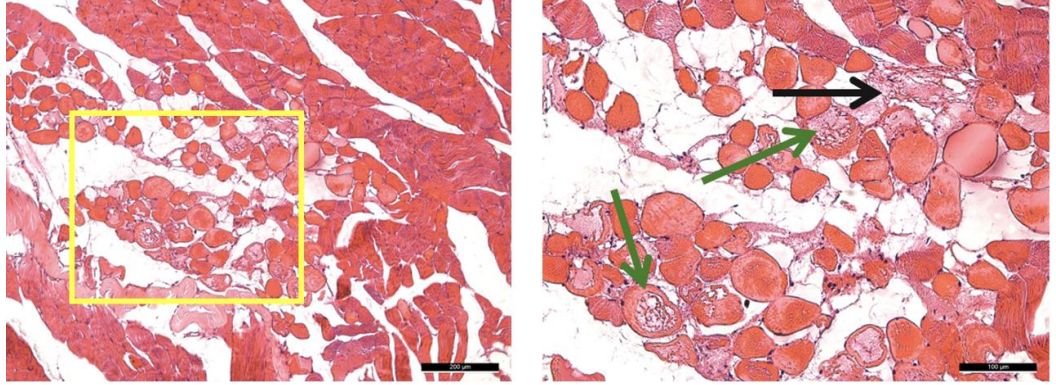
Bu grupta yapılan incelemelerde enine çizgilenmede kayıp ve nükleusun santrale göçünde artış saptanmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (Görüntü 20x büyütmede elde edilmiştir)



Şekil 41: Arter grefti+ salin grubundan elde edilen kas dokusunda, segmental nekrozis siyah ok ile, kas liflerinin ayrılması sarı ok ile ve inflamatuvar hücre sayısındaki artış mavi ok ile gösterilmiştir. (Görüntüler sırası ile 10x ve 40 x büyütme ile elde edilmiştir)



Şekil 42: Ven grefti + BoNT-A grubundan elde edilen kas dokusunda; interfaziküler ödem ve çizgilenme kaybı siyah oklar ile, segmental nekroz mavi ok ile ve kas liflerinin ayrılması sarı ok ile belirtilmiştir. (Görüntü 20x büyütmede elde edilmiştir)



Şekil 43: Arter grefti + BoNT-A grubunda elde edilen kas kesitinde; nekroze olup parçalanarak dağılan siyah ok ile yaygın segmental nekroz yeşil ok ile gösterilmiştir. Bu grupta yapılan skorlamada segmental nekroz yaygın olarak bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (Görüntüler sırasıyla 10x ve 20 x büyütmede elde edilmiştir)

B. MASSON TRİKROM BOYAMA BULGULARI

Botulinum toksin verilen ve kontrol grubundaki hayvanlardan elde edilen arter ve ven grefti dokularına masson trikrom boyama protokolü uygulandıktan sonra elde edilen kesitler trombüs varlığı yönünden incelendi.

Tablo 20: Gruplar arasında trombüs görülen deneklerin dağılımı

GRUP	TOPLAM DENEK SAYISI	TROMBÜS GÖRÜLEN DENEK SAYISI
Ven grefti+salin	7	4
Arter grefti+salin	7	3
Ven grefti+BoNT-A	7	3
Arter grefti+BoNT-A	7	2

Ven grefti+ salin grubunda 7 denek hayvanından alınan ven grefti örneklerinin 4 tanesinde trombüs saptanmışken; ven grefti + BoNT-A grubunda 7 denek hayvanından alınan ven grefti örneklerinden 3 tanesinde trombüs olduğu

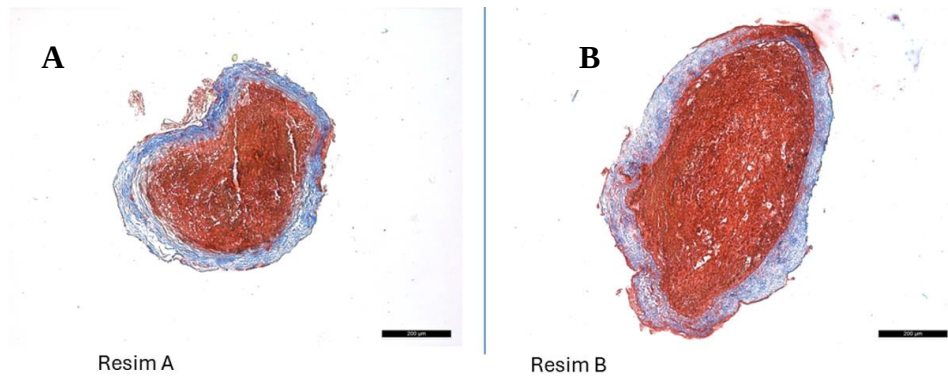
görülmüştür. Her iki grup için doku takibi sonrası elde edilen görüntülerde lümen çapı ve trombüsün lümende kapladığı alan x ve y ekseninde ölçülmüştür. Sonuçlar aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 21: Ven Grefti + Salin grubundaki trombüs boyutları ve trombüs görülen deneklerin damar lümeni boyutları

Ven grefti+salin Grubu	Damar Lümeni Boyutu (µm)	Trombüs Boyutu (µm)
1	1299x431 µm	828x419 µm
2	1025x587 µm	308x210 µm
3	844x951 µm	820x948 µm
4	653x227 µm	478x98 µm

Tablo 22: Ven Grefti + BoNT-A grubundaki trombüs boyutları ve trombüs görülen deneklerin damar lümeni boyutları

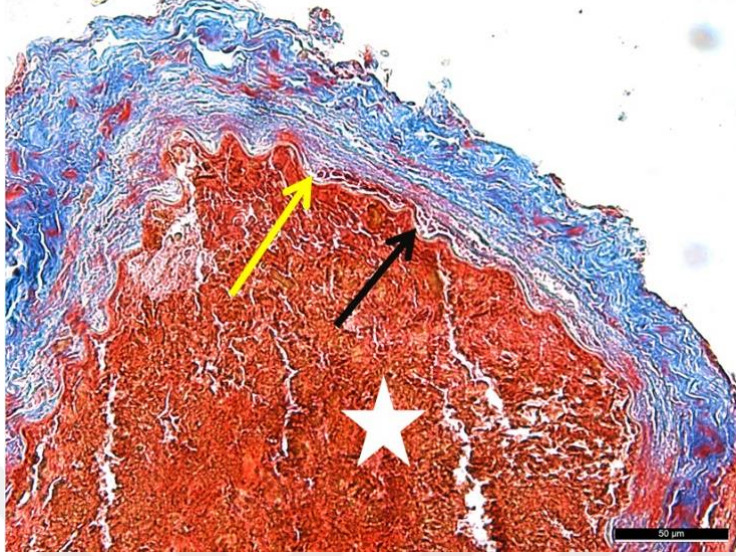
Ven grefti+BoNT-A Grubu	Damar Lümeni Boyutu (µm)	Trombüs Boyutu (µm)
1	864x564 µm	774x562 µm
2	1091x846 µm	392x357 µm
3	771x426 µm	591x414 µm



Şekil 44: A: Ven grefti + Salin grubu, lümeni tam tıkayan trombüs gösterilmiştir.

B: Ven grefti + BoNT-A grubu, lümeni tam tıkayan trombüs gösterilmiştir

(Görüntüler 10x büyütmede elde edilmiştir)



Şekil 45: Sarı ok: subendotel tabakanın ayrılması, siyah ok: epitel tabakasının destrüksiyonu, beyaz yıldız: lümeni tam tıkayan, organize, hemorajik trombüsü göstermektedir (görüntü 40x büyütmede elde edilmiştir).

Arter grefti+salin grubundan alınan 7 greft dokusu örneğinden 3 tanesinde trombüs görüldü. Bunlardan birinde lümeni tama yakın tıkayan, ortasında minimal lümen oluşmuş trombüs bulunurken; diğer iki denekte organize trombüs lümeni tıkayıcı vasıfta değildi.

Arter grefti + BoNT-A grubundan alınan 7 damar grefti dokusu örneğinden ikisinde trombüs görüldü. 2 trombüsten biri lümeni tam dolduran vasıfta iken diğeri lümende minimal yer kaplar vaziyetteydi.

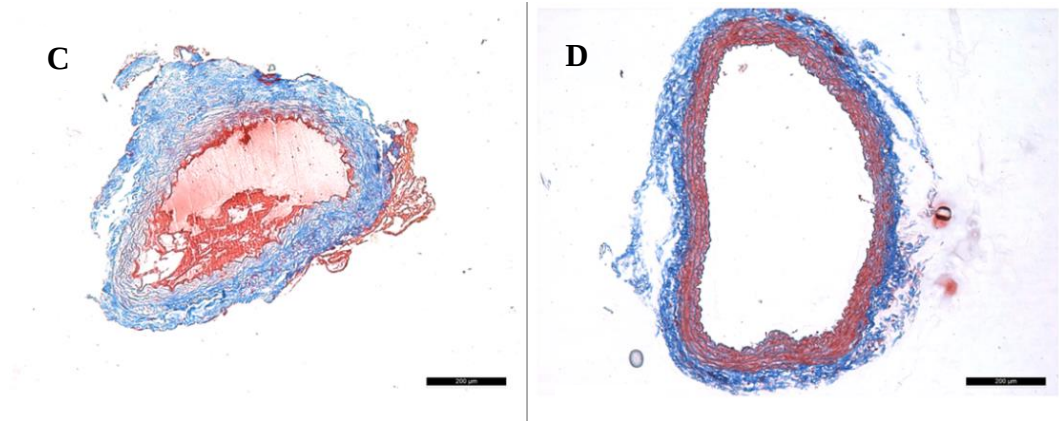
Kontrol ve BoNT-A grubunda doku takibi sonrasında alınan görüntülerde ölçüm yapıldı, damar lümeninin ve trombüsün boyutları x ve y ekseninde ölçüm sonuçları aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 23: Arter grefti + Salin grubundaki trombüs boyutları ve trombüs görülen deneklerin damar lümeni boyutları

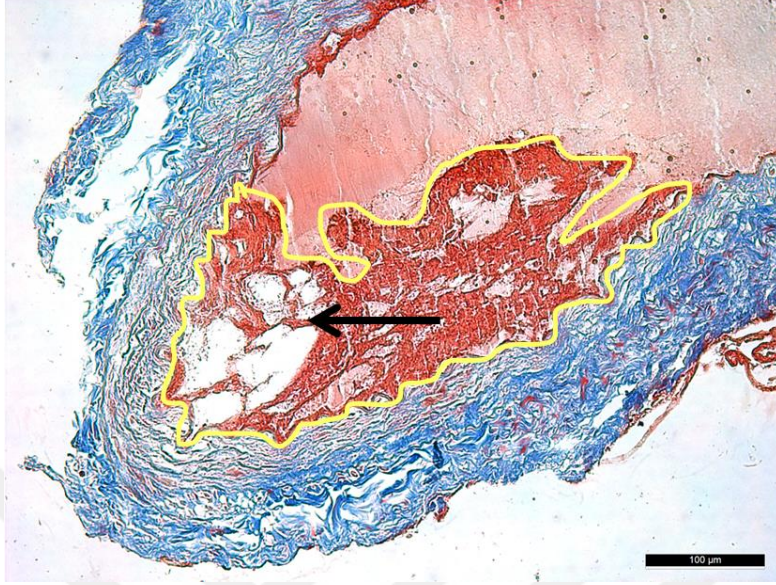
Arter grefti+salin Grubu	Damar Lümeni Boyutu (µm)	Trombüs Boyutu (µm)
1	1200x793 µm	1192x783 µm
2	644x1181 µm	316x830 µm
3	302x1892 µm	261x374 µm

Tablo 24: Arter Grefti + BoNT-A grubundaki trombüs boyutları ve trombüs görülen deneklerin damar lümeni boyutları

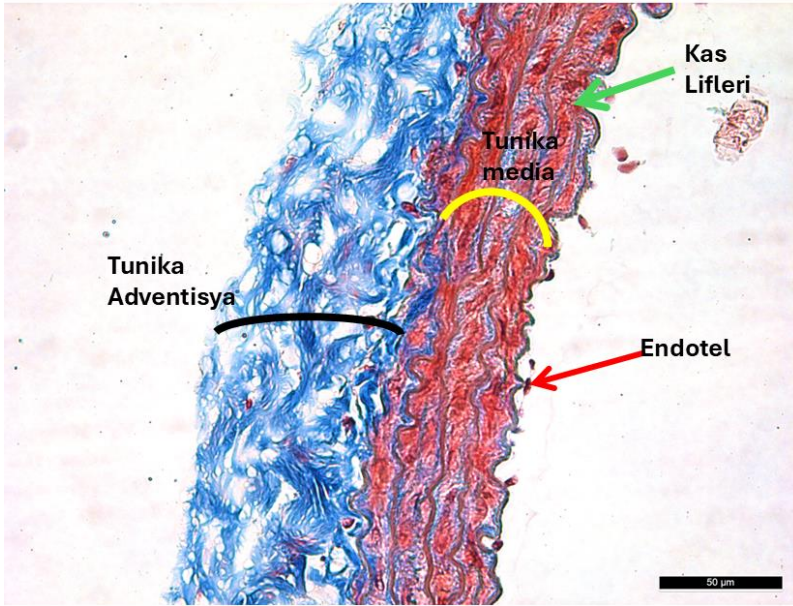
Arter grefti+BoNT-A Grubu	Damar Lümeni Boyutu (µm)	Trombüs Boyutu (µm)
1	661x878 µm	648x878 µm
2	1525x749 µm	602x664 µm



Şekil 46: C: Arter grefti + salin grubunda lümeni tam tıkanmayan trombüs varlığı, D: Arter grefti + BoNT-A grubunda trombüs yokluğu, tam açık lümen gösterilmiştir (resimler 10x büyütmede elde edilmiştir).



Şekil 47: Trombüs içeren damar lümeni gösterilmiştir. (Görüntü 20x büyütmede elde edilmiştir.) Sarı çizgi: trombüs, siyah ok: trombüs içerisinde organize olmuş bağ doku alanı



Şekil 48: Trombüs içermeyen arter grefti dokusu gösterilmiştir. (Görüntü 40x büyütmede elde edilmiştir.) Endotel ve subendotel tabakası intakt, paralel sıralanmış kas lifleri tunika media tabakasını oluşturmakta ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu görülmemektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrocerrahi gerektiren serbest flep ve replantasyon prosedürleri için %94,3 ile %99,2 arasında değişen yüksek başarı oranlarını bildirilmiştir [15-18]. Serbest doku transferlerinin bu başarısına rağmen, %6 ila %14'ü vasküler komplikasyonlar nedeniyle yeniden eksplore edilebilmektedir [197,198]. Vasküler tromboz ve vazospazm serbest flep cerrahisi ve replantasyon cerrahisi başarısızlığının hâlen bilinen en yaygın iki nedenidir ve vasküler spazm oluşumu kan akışının azalmasına ve anastomozun tromboze olmasına yol açabilir [21,199]. Postoperatif gelişecek bu vasküler komplikasyonların %95'i ameliyattan sonraki ilk 72 saat içinde ortaya çıkar [197,200].

Vazospazmın altında yatan mekanizmalar karmaşıktır ve soğuk, damarın kontrolsüz manipülasyonu, vasküler sızıntılar, spazma intrensek eğilim, endotel hasarı, inflamatuvar mediatörler, artmış sempatik tonus ve dolaşımdaki vazokonstriktörler de dahil olmak üzere çeşitli faktörlere yanıt olarak ortaya çıkabilir [23]. Yakın zamanda yağ hücrelerinin hem endokrin hem de parakrin etkilere sahip çok sayıda metabolik olarak aktif maddeler üretebildiği fark edilmiştir; bu, perivasküler yağ dokusunun da vasküler spazmı rol oynayabileceği anlamına gelir [2]. Ek olarak, yaygın endotel disfonksiyonuna neden olan diabetes mellitus gibi metabolik hastalıkların da vasküler spazm riskini artırdığı gösterilmiştir [42]. Vazospazmın tetikleyici mekanizması belirsiz olsa da, prosedürlerin %5-%10'unu önemli ölçüde etkilediği tahmin edilmektedir [21].

Vazospazmın tedavisi için mikrocerrahi sırasında lokal olarak antispazmodik ajanlar kullanılabilir; ancak, vasküler spazmı etkili bir şekilde tedavi etmek için bu ilaçların optimum konsantrasyonları belirlenmemiştir [21]. Ek olarak, kan damarları üzerindeki etkileri henüz belirsizliğini korumaktadır. Dahası, bu

ajanların fizyolojik işlevler üzerindeki etkisi ve toksisitesi ile kullanım için optimum konsantrasyonlar henüz açıklığa kavuşturulmamıştır [36].

Travmatik defektlerde damarların uç uca dikilemediği durumlarda, defektin yakın çevresinde alıcı damarların yetersiz olduğu serbest flep pediküllerinin uzatılması gerektiğinde kullanılan vasküler greftler çoklu anastomoz varlığı, özellikle ven grefti kullanılan vakalarda kompresyona ve bükülmeye yatkınlık, türbülanslı veya değişen akış dinamikleri, intimal hasar, boyut uyumsuzlukları gibi nedenlerle artmış intrinsik trombojenite ve vazospazma yatkınlık ile ilişkilendirilebilir [1]. Harris ve ark. boyut uyumsuzluğu olan ven greftleri üzerine yaptıkları iki aşamalı bir rat çalışmasında, boyut uyumsuzluğunun arteriyel defektlerin interpozisyonel ven greftlemesinin uzun vadeli açıklığını belirgin şekilde etkilemese de, ven greftleri yoluyla oluşturulan serbest flep pedikül anastomozlarının açıklığını önemli ölçüde engellediğini belirtmiştir [201]. Mevcut retrospektif klinik çalışmalar ise vasküler greft gerektiren fleplerin daha büyük tümörlere, daha şiddetli travmalara sahip olma veya daha önce cerrahi prosedürler veya radyasyon geçirmiş olma gibi nedenlerle daha yüksek bir başarısızlık riski ve trombüs yatkınlığına ilişkin çelişkili veriler içerse de ; deneysel literatürde ven grefti açıklık oranının %53 ile %100 arasında değiştiği bildirilir [202-206].

Greft olarak kullanılan arterler, önemli kas katmanları nedeniyle spazma karşı daha hassastır. Venöz greft spazmları daha az sıklıkla bildirilir ve genellikle ameliyattan sonraki ilk 48 saat içinde görülür [207]. Greft vazospazmının mekanizmasının vazodilatör ve vazokonstriktör etkilerin dengesi ile mekanik ve fiziksel uyarım ve oksidatif stresle ilişkili olduğuna inanılmaktadır[11,208]. Damar greftleri üzerinde spazmojen etkileri olan etkenler birçok araştırmanın konusu olmuştur. Endotelden türetilen kasılma faktörleri (örneğin, endotelin-1), prostaglandinler (örneğin, tromboksan A2 veya PGF2a), a-adrenoseptörler başlıca

suçlanan endojen kaynaklı faktörlerdir. Damar greftlerindeki vazospazm, vasküler kontraktilite veya endotel disfonksiyonunun diğer yollarıyla da ilişkili olabilir. Oksidatif stres sonrası otolog nötrofiller endotel disfonksiyonuna neden olan stabil bir protein olmayan küçük bir molekül salgırlar [39]. Ek olarak, RhoA/Rho kinaz yolağının damar greftlerini spazma duyarlı hale getirebilen başka bir mekanizma olması muhtemeldir [40]. Sağlam endotel ise, nitrik oksit, endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör ve PGI₂ gibi bir dizi endotel kaynaklı gevşetici faktörü serbest bırakarak damar spazmını önleyebilir [2,3,43].

Botulinum toksininin genel olarak bilinen etki mekanizması sinaptik aralığa asetilkolin salınımını bloke ederek iskelet kasının kasılmasının inhibisyonudur. Bununla birlikte bu toksinin uygulandığı lokalizasyona ve etkileşime girdiği nörotransmitter veya reseptöre bağlı olarak çok sayıda farklı etkileri gösterilmiştir. Sinaptik aralığa norepinefrin, P maddesi gibi önemli vazokonstriktörlerin salınımını da bloke eder ve Rho/Rho kinaz yolağında Rho kinazı inaktive ederek vasküler düz kas hücrelerinin Ca²⁺ duyarlılığını ve nitrik oksit (NO) sistemini stimüle edip düz kas hücre kasılmasını doğrudan inhibe eder, aynı zamanda da önemli bir vazodilatatör olan kalsitonin geni ile ilişkili peptidin (CGRP) salınımını artırır [135,143,209]. Düz kas hücresinin kasılması temelde kalsiyum sinyal kaskadları ve RhoA/Rho-kinaz sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşir ve Rho-kinaz her iki mekanizmada da önemli ölçüde yer aldığı [2] için RhoA/Rho-kinaz sinyal yolağının Botulinum toksininin damarlar üzerindeki olumlu etkilerini gerçekleştirebileceği bir yolak olduğu düşünülebilir.

Tüm bu farmakolojik özellikler Botulinum toksinini vasküler cerrahide karşılaşılabilecek bazı sorunların çözümü için araştırma konusu haline getirmiştir ve bu konu ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır. Birçok hayvan damar anastomoz modelinde intraoperatif olarak veya ameliyattan birkaç gün önce yapılan

perivasküler botulinum toksin uygulamasının, perfüzyonu iyileştirdiği, arteriyel ve venöz dilatasyonu artırdığı, trombozu azalttığı ve hem random patern hem de pediküllü flep sağkalımını iyileştirdiği gösterilmiştir. Hayvan modellerinde toksinin prosedürle eş zamanlı olarak veya ön tedavi olarak uygulandığında, vasküler faydalarının kısa bir sürede ortaya çıkıp birkaç hafta boyunca devam ettirilebildiği gösterilmiştir. Birkaç hafta sürebilen etkileri, etkisi yalnızca birkaç saat süren papaverin veya lidokain gibi diğer yaygın vazodilatör maddelerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha uzundur. Vasküler spazm üzerinde olumlu etkileri gösterilen ancak vazospazmı tedavi etmek için botulinum toksin uygulamasının Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylı bir endikasyonun bulunmaması, etki mekanizması ve vasküler etkileri konusunda farkındalık eksikliği sebebiyle klinik kullanımı yaygın değildir.

Çalışmamızda, küçük kalibreli arteriyel sistemde boyutları uyumsuz arteriyel ve venöz greftlerle yapılan anastomozların erken dönem vasküler trombüs ve spazma yatkınlık düzeylerine BoNT-A'nın etkisini araştırdık. Sonuçlar, histolojik, makroskopik ölçümler ve görüntüleme yöntemleriyle değerlendirildi. Trombüs oranlarında teknik veya beceriyle ilişkili oluşabilecek herhangi bir varyasyondan kaçınmak için, tüm müdahaleler aynı cerrah tarafından gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, histopatolojik analizlerin tarafsız olması için de değerlendirmeler iki histolog tarafından çift-kör bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Deneyisel modelimizde kullandığımız vasküler greftler Blain ve ark.'nın ratlarda kullanılabilecek vasküler greftlerin gösterildiği anatomik çalışma sonuçlarına göre [210] belirlenmiştir ve gruplar arasında femoral arter -vasküler greft arasında benzer çap uyumsuzlukları oluşturabilmek için arter grefti olarak ortak karotis arter, ven grefti olarak femoral ven kullanılmıştır. Anastomozda akım sağlanmadan önce ölçülen femoral arter ($p=0,957$) ve vasküler greft çapları

arasında gruplar arasında anlamlı bir fark gösterilememesi ($p=0,166$) tercih edilen vasküler greftlerin benzer boyutlarda olduğu şeklinde yorumlanabilir. Anastomoz öncesi ölçülen ortalama femoral arter çapı $0,73\pm0,05$ mm; ölçülen ortalama damar grefti çapı $1,12\pm0,11$ mm olarak ölçülmüştür; bu durum vasküler greft ile femoral arter anastomozların yaklaşık olarak 1:1,5 çap uyumsuzluğuyla yapıldığını göstermektedir.

Şimşek ve arkadaşları 2014 yılında çalışmamıza benzer şekilde ortak karotis arter ve femoral ven ile oluşturdukları anastomozları karşılaştırmış, 14 arter ve 14 ven grefti ile yaptıkları onarımların her iki grupta da 13 tanesinin patent olduğunu, ven grefti ile onarım yaptıkları tüm deneklerde anevrizmatik dilatasyon geliştiğini ve ven grefti bu grubundaki 13 denekten 5'inde rekanalize trombüs görüldüğünü rapor etmişlerdir [211]. Çalışmamızda Şimşek ve ark.larının çalışma benzer şekilde ikincil cerrahide yapılan ilk değerlendirmemizde arter grefti ile oluşturulan 14 anastomozdan 13 tanesinin, ven grefti ile oluşturulan 14 anastomozdan ise 11 tanesinin patent olduğunu gözlemledik. Şimşek ve ark.larının yaptığı çalışmada ven grefti gruplarında her ne kadar klinik olarak 13 anastomozun patent olduğu gösterilse de bu anastomozların 5 tanesinde histolojik olarak rekanalize trombüs varlığı gösterilmiştir. Çalışmamızda ven grefti gruplarında Şimşek ve ark.ların çalışmalarına göre daha fazla gördüğümüz primer trombüs sayısını bu grupta tromboze olan ve ilk cerrahi ile ikinci cerrahi arasında hangi dönemde tromboze olduğu belirsiz olan anastomozların çalışmamızdaki kısa takip süresi nedeniyle henüz rekanalize olamadan ikincil cerrahinin gerçekleştirilmiş olabilmesine bağlamaktayız. Şimşek ve ark. anjiyografi ile bu damarların açıklığını 21. günde değerlendirmiş olup; anastomoz açıklığını değerlendirdiğimiz süre ise çalışmamızda 3 gündür.

Klinik olarak primer trombüs gördüğümüz ratların tamamının histolojik incelemesinde lümeni tamamını/tamamına yakını tıkayan ve belirgin endotel destrüksiyonu ile birlikte olan trombüs görünümü varken; 1. grupta stres testiyle vasküler akımın durduğunu gözlemlediğimiz anastomozda histolojik olarak trombüs tespit edilememiştir. Stres testi sonrası gelişen erken dönem trombüsün damar duvarına organize trombüs kadar sıkı yapışık olmaması nedeniyle histolojik analizde görülmeyen trombüsün histolojik analiz öncesinde bekletilen formol çözeltisinin içinde çözünmüş olabileceği veya klinik olarak akımın kesildiğini gördüğümüz bu anastomozda vasküler spazma trombüsün eşlik etmemiş olabileceği muhtemeldir. Benzer şekilde 4. gruptaki 7 rattan klinik olarak sadece birinde stres testi sonrası akımın durduğu gözlenmişken histolojik olarak 2 anastomozda trombüs görülmüştür. Klinik olarak lazer Doppler akım ölçer ve ICG değerlendirmelerinde tespit edilemeyen trombüsün greft lümeninin yarısından daha azını (damar lümeni boyutu: 1525x749µ; trombüs boyutu: 602x664µ) tıkaması nedeniyle Doppler akım ölçerde ölçülen akım değerlerini ve ICG görüntülerini etkilememiş olması olasıdır.

Arteriyel ve venöz greft gruplarının kendi içerisindeki karşılaştırmasında arteriyel greft grubunda primer trombüs ve stres testi sonrası trombüs oranları sırasıyla %7,1 (1/14) ve %23,1 (3/13) ; ven greft grubunda ise primer trombüs ve stres testi sonrası trombüs oranları sırasıyla %21,4 (3/14) ve %45,4 (5/11) olarak belirlenmiştir. Şimşek ve ark. çalışmalarında, ven greftinin arteriyel kan basıncı kaynaklı genişlemesinin ven grefti grubunda endotel sürekliliğini önemli ölçüde bozduğunu ve ayrıca mural trombüs ve mural inflamasyon insidansının arttığını göstermişlerdir. Ven grefti gruplarında gördükleri artmış mural trombüs ve mural inflamasyon insidanslarını arteriyel ve venöz greftlerin yüksek basınçlı pulsatil arteriyel kan akışına karşı dirençleri arasındaki farka bağlamışlardır [210]. Aynı

zamanda femoral ven greftlerinin, türbülanslı kan akışına ve endotel hasarına neden olan anevrizmatik dilatasyonlara daha yatkın olduğunu görmüşler ve endotel sürekliliğinin bozulmasının trombüsleri yaydığı ve inflamatuvar yanıtı tetiklediği sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda kullandığımız karotis arter greftlerinde anastomoz akımı sağlandıktan sonra öncesine göre belirgin bir çap değişikliği saptanmazken (akım öncesi ortalama: $1,13 \pm 0,11$ mm, akım sonrası ortalama: $1,14 \pm 0,11$ mm); femoral ven greftlerinin çaplarının arteryel kan basıncına maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde arttığı görülmüştür (akım öncesi ortalama: $1,12 \pm 0,13$, akım sonrası ortalama $1,26 \pm 0,15$). Bizim çalışmamızda da Şimşek ve ark.larının çalışmalarına benzer şekilde ven grefti gruplarında görülen trombüs oranlarının (hem primer trombüs hem de stres testi sonrası görülen trombüs) arter grefti gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmesine rağmen istatistiksel olarak bu farklılık anlamlı bulunamamıştır (Fischer's exact test $p=0,124$). Hem primer trombüs oranlarının hem de stres testi sonrası trombüs oranlarının ven greftlerinde endotel hasarının daha fazla olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Goldberg ve ark.larının 2023 yılında yayınladıkları bir meta-analiz çalışmasında perivasküler BoNT-A ve BoNT-B uygulamasının perfüzyonu iyileştirdiği, arteriyel ve venöz dilatasyonu artırdığı, trombozu azalttığı ve kritik iskemik modellerde hem random patern hem de pediküllü flep sağkalımını iyileştirdiği, kan akışını 1 hayvan çalışması hariç tümünde kontrollere göre arttığı sonuçlarını elde etmişlerdir [140]. Aynı meta-analiz çalışmasında Goldberg ve ark.larının trombozun başlıca nedenlerinden birinin vazospazm olduğu ve BoNT uygulamasından sonra, salin kontrolüyle karşılaştırıldığında, hem arter hem de venlerde mutlak tromboz riskininin %62 oranında azaldığı sonucuna varılmıştır [140]. Benzer şekilde Hassanpour ve ark. 2018 yılında yaptıkları sıçan femoral arterindeki ezilme yaralanması çalışmasında eksternal olarak damarın BoNT ile

irrigasyonunun, vazospazm ve tromboz riskini artırabilecek vasküler klemple ilişkili endotel hasarını önleyebildiğini gösterilmişlerdir [145]. BoNT uygulamasının, kontrollerine kıyasla arterlerdeki trombozu %85, venlerdeki trombozu %79 azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda BoNT enjeksiyonu yapılan grupta trombüs oranlarının kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür (kontrol gruplarında primer trombüs oranı %21,4 (3/14) iken stres testi sonrası trombüs oranı %45,4 (5/11); BoNT-A grubunda ise organize trombüs oranı %7,1 (1/14) iken ve stres testi sonrası trombüs oranının %23,1(3/13)) ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Fischer's exact test $p=0,124$). Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı farklılık içermemesini çalışmamızın adı geçen çalışmalardaki örneklem büyüklükleriyle kıyaslandığında daha küçük bir örneklem grubuna sahip olmasına bağlamaktayız.

Vasküler çapların değerlendirmesi organize olmuş trombüsün görüldüğü anastomozlarda organize olmuş trombüsün femoral arter, vasküler greft ve anastomoz komşuluğundaki venin çapında önemli değişiklikler oluşturacağı varsayıldı ve damar çaplarındaki değişikliklerin karşılaştırması esas olarak primer trombüsün görülmediği anastomozlar arasında gerçekleştirildi. Trombotik olmayan örnekler analiz edildiğinde, kontrol ve BoNT grupları arasında femoral arter, femoral ven ve greftlerin ilk operasyonda ölçülen çaplarında çaplarda anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak ikinci operasyonda ölçülen ortalama femoral arter ($p<0,001$), femoral ven ($p<0,001$) ve greft ($p<0,001$) çapları, BoNT grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.

Goldberg ve ark.larının 2023 yılında yayınladıkları meta-analiz çalışmasında BoNT'nin vazodilatasyon etkisini hem arter hem de ven üzerinde gösterebilme etkisinin olduğu gösterilmiştir ve bu meta-analiz çalışmasında arteriyel ve venöz çaplarda sırasıyla ortalama %39,5 ve %46,3 artış oranları tespit edilmiştir[140]. Çalışmamızda tromboze anastomozlar hariç tutulduğunda BoNT

gruplarında femoral arterlerin ilk operasyondaki çap ortalaması $0,73\pm0,05$ mm iken ikinci cerrahide bu ortalama $0,87\pm0,11$; femoral venlerin ilk operasyonda çap ortalaması $0,77\pm0,11$ iken ikinci cerrahide bu ortalama $0,97\pm0,14$; vasküler greftlerde ilk operasyonda $1,14\pm0,14$ olan vasküler çap ortalaması $1,29\pm0,15$ 'e yükselmiştir. Çalışmamızda BoNT gruplarında femoral arter çaplarında ortalama $\%24,11\pm6,53$, femoral ven çaplarında ortalama $\%27\pm8,27$ ve vasküler greft çaplarında ortalama $\%8,89\pm5,99$ 'luk artış gözlenmiştir. Goldberg ve ark.larının meta-analiz sonuçlarıyla karşılaştırıldığında çalışmamızda daha düşük damar çapı artış oranları bulunmuştur. Bahsi geçen meta-analiz çalışmasına dahil edilen botulinum toksininin cerrahiden önce uygulandığı çalışmalarda botulinum toksininin uygulanmasından işleme kadar geçen gün sayısı ortalama olarak 6,73 gün; botulinum toksini uygulamasından analize kadar geçen gün sayısı ise ortalama 10 gün olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise botulinum toksini ilk cerrahiyle eş zamanlı olarak uygulanmış; uygulandıktan 3 gün sonra sonuçlar analiz edilmiştir. Arnold ve arkadaşları 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında perivasküler olarak 5 ünite BoNT-A uygulaması sonrası 1, 14. ve 28. günlerde damar çaplarını ölçmüşler; BoNT-A'nın uygulama sonrası 1.gününde bile hem arter, hem de ven çaplarında anlamlı artışa yol açtığını, bu artışın 14.gün ölçümünde en yüksek seviyeye çıktığını ve 28. günde halen yüksek olduğunu belirtmişlerdir[130, 212]. Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında çalışmamızda ilk cerrahi ile eş zamanlı olarak uygulanan BoNT-A'nın 3 gün içerisinde damarlar üzerindeki maksimum vazodilatatör etkisini gösteremediği düşünülmektedir. Aynı zamanda çalışmamızda gördüğümüz gibi venlerde gözlenen ince duvar yapısı sebebiyle damar çapı artış oranının arterlerden belirgin olması beklenen bir durumdur ve hem sempatik blokaj hem de alternatif mekanizmalarla BoNT'nin bu damarlarda etkisini gösterebildiği düşünülmektedir. Damar apı artışının en az damar greftlerinde görülmesi sempatik blokaj, sinaptik aralığa norepinefrin, P maddesi gibi önemli vazokonstriktörlerin salınımının blokajı gibi BoNT'nin sinir sistemi üzerinden gösterdiği etkilerin hâlihazırda denerve olan vasküler greftler üzerinde gösterememiş olabilir ve greft olarak taşınan doku sekonder kontraksiyonuna maruz kalmış olabilir.

Murakami ve ark.larının 2009 yılında yaptığı in vitro çalışmada botulinum toksininin arteriyel greft spazmını in vitro önlemedeki yararlılığını araştırmak için sıçanlarından alınan abdominal aort örneklerini 30 dakika boyunca çeşitli dozlarda botulinum toksini veya papaverin ile muamele ettikten sonra KCl ve noradrenalin ile in-vitro ortamda damarları spazma zorlayıp gerilim miyografi kullanılarak spazma yanıtlarını karşılaştırmışlardır. Botulinum toksininin neredeyse tüm konsantrasyonlarda kontrollerle karşılaştırıldığında arteriyel kasılmayı tamamen engellediğini gözlemlemişlerdir. Ayrıca spazmı önleme etkisi papaverinli grupta 60 dakika sonra kaybolurken; botulinum toksini gruplarında bu etkinin 120 dakika devam ettiği görülmüştür [144].

Tekrarlayan postoperatif vazospazm ve trombozla komplike olan ve iki kez kullanılan ven greftinin revizyonu yapılan çift ayak parmağı replantasyon vakasında BoNT kullanımıyla parmakların kurtarıldığı bir vaka ile BoNT'nin vazospazm ve trombozu önleme etkisi insanlarda da gündeme gelmiştir [146]. Bu vaka raporu, BoNT'nin insanlarda vasküler onarımla eş zamanlı uygulanmasının faydalı olabileceğini göstermiştir [147]. BoNT, postoperatif kontrol anjiyogramlarda greft vazospazmı göstermeyen küçük bir vaka serisinde klinik serebral vasküler baypas cerrahisi sırasında vazospazmı önlemiştir[67]. Birçok çalışma, BoNT-A'nın iskemik ağrıyı azalttığını, ülser iyileşmesini iyileştirdiğini ve Raynaud atak sıklığını ve şiddetini azalttığını göstererek periferik arter vazospazmlarının tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir [138, 139]. Bu durum BoNT-A'nın hem endotelin-1- hem de 5-hidroksitriptamin kaynaklı kasılmaları engellediğini belirleyen bir insan radyal arter greft çalışmasında da gösterilmiştir. Bu çalışmada, papaverinin aksine, BoNT-A'nın spazmı önleme etkinliğinin zamanla azalmadığı görülmüştür [148]. Son olarak, 1 veya daha fazla iskemik parmağı olan 11 hastanın dahil edildiği bir klinik çalışmada, BoNT

olmadan yönetilen 6 kişilik bir grupta görülen %83'lük bir amputasyon oranına karşın, BoNT ile yönetilen 5 hastada amputasyon oranının %0 olduğu gözlenmiştir[149]. Clemens ve ark.larının 2009 yılında yaptıkları çalışmada anastomoz sonrası buzla muamele ve eş zamanlı sistemik fenilefrin uygulamasıyla vazospazma zorlanan çalışmasında vasküler anastomozlardan önce BoNT ile muamele edilmiş olan anastomozlar trombüs oluşumuna karşı direnç göstermişlerdir [143]. Çalışmamız Clemens ve ark.larının çalışmasına benzer şekilde dizayn edilmiştir; ancak bu çalışmadan farklı olarak botulinum toksini ön tedavi şeklinde uygulanmayıp anastomoz bittikten hemen sonra uygulanmıştır. Bununla birlikte Clemens ve ark.larının çalışmasında arter ve venler kesilip uç uca dikilmiştir. Çalışmamızda ise trombüse yatkınlığı arttırmak için aralarında 1:1,5 oranında çap farkı bulunan damarların bulunduğu vasküler greftle oluşturulmuş bir anastomoz modeli tercih edilmiştir. Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla damar greftleriyle oluşturulmuş anastomozda BoNT'nin trombüs oranları ve spazma yatkınlığı azaltmadaki etkilerini birlikte değerlendiren ilk çalışmadır.

Çalışmamızda BoNT'nin vasküler spazma etkisi ICG ve lazer Doppler akımölçer aracılığıyla değerlendirdik ve uyguladığımız spazm modelinde Ichiooka ve ark. çalışmalarında [59] kullandıkları dozda topikal adrenalin uygulamasına ek olarak Clemens ve ark. çalışmalarındakine [143] benzer şekilde arka bacağı buz uygulaması gerçekleştirdik. Clemens ve ark. larının çalışmasından [143] farklı olarak anastomozlarımız tek taraflı olduğu için buz uygulamasını her iki arka bacak yerine sadece spazm oluşturmak istediğimiz anastomozun olduğu sağ arka bacağı uyguladık. Yokoyama ve ark. [65] aynı doz adrenalin uygulamasından sonra sıçan femoral arterlerinde %10'lara kadar düşebilen bazal akış hızını 4 dakikadan sonra görmeleri sebebiyle sırasıyla sağma testi, Doppler ve ICG değerlendirmelerini 5.dakikadan sonra gerçekleştirdik. İndüklenen spazm sonrası oluşan arka bacak kas

iskemisinin ana vasküler kaynaktaki kan akımıyla direkt ilişkili olması sebebiyle ilgili arka bacak kasının iskemi şiddeti karşı taraf arka bacakdaki dolaşımına karşılaştırılarak belirlendi. Bu karşılaştırma için sağ ve sol arka bacakta tibialis anterior kaslarının ICG tutulumları birbirlerine oranlandı ve sağ/sol kas ICG tutulum oranı, BoNT + ven grefti ve BoNT + arter grefti gruplarında salin + arter grefti gruplarına göre daha yüksek bulundu (sırasıyla; $p=0,030$, $p=0,011$). Her ne kadar stres testi sonrası hem BoNT+ ven grefti hem de BoNT + arter grefti gruplarındaki ortalama sağ/ sol kas ICG tutulum oranları salin + ven grefti grubuna göre yüksek olsa da (sırasıyla $0,91\pm0,23$; $0,86\pm0,09$ ve $0,63\pm0,12$) salin + ven grefti grubuyla BoNT grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ve ICG bulgularının tamamının çalışmamızın başlangıç hipotezini destekler şekilde olduğu görülmüştür. BoNT hem arter greftiyle hem de ven greftleriyle oluşturulmuş anastomozda vasküler spazmı engellemede etkili olmuştur; ancak etkisini daha çok düz kas içeren arter greftlerinde daha fazla göstermiştir. Damarların ICG değerlendirmesinde damar çapı ölçüm sonuçlarımızı destekler biçimde BoNT gruplarında kontrol gruplarına kıyasla kalibrasyonu daha yüksek anastomoz görüntüleriyle karşılaştırılmıştır.

Lazer Doppler akımölçer değerlendirmelerinde stres testi yapılan ratlarda gruplar arasında ikinci cerrahi sırasında ölçülen anastomoz akımları, ortalama akım azalması görülen kontrol arter grefti grubuna kıyasla BoNT + arter grefti ve BoNT + ven grefti gruplarında anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (her iki karşılaştırma için de $p<0,01$). Stres testi nedeniyle oluşan anastomoz akımındaki azalmalar grupların ayrı ayrı karşılaştırmasında benzer görülmüşken; BoNT ve kontrol gruplarının ikili karşılaştırmasında stres testi ile Doppler akışındaki azalma kontrol grubunu oluşturan anastomozlara kıyasla BoNT grubunu oluşturan anastomozlarda daha düşük ($p=0,030$) bulunmuştur. İlk ve ikinci cerrahide ölçülen

anastomoz akım değişimleri kontrol grubunu oluşturan anastomozlarda ikinci cerrahide belirgin değişiklik göstermezken; BoNT grubunu oluşturan anastomozlarda önemli ölçüde artış göstermiştir ($p<0,001$).

Kasların histopatolojik incelemesinde grupların ortalama histolojik skorlarının birbirinden anlamlı derecede farklı olmadığı görülmüştür ($p=0,217$). Tüm skorlar ayrı ayrı incelendiğinde “kas liflerinin ayrılması skoru” ven grefti + BoNT-A grubunda, arter grefti + BoNT-A grubuna ($p<0.001$), arter grefti + salin grubuna ($p<0.01$) ve ven grefti +salin grubuna göre ($p<0.001$) belirgin olarak daha az görülmüştür. “İnterfasiküler ödem skoru” ven grefti + salin grubunda; ven grefti + BoNT-A grubuna ($p=0.035$), arter grefti + salin grubuna ($p=0.025$) ve ven grefti + BoNT-A grubuna göre ($p<0.01$) daha az görülmüştür. “İnflamatuvar hücre sayısında artış skoru” tüm ven grefti gruplarına göre arter grefti + salin grubunda ($p=0.011$) ve arter grefti + BoNT-A grubunda ($p<0.01$) daha düşük bulunmuştur. Diğer skorlamalarda ise gruplar arası veya gruplar içerisinde belirgin farklılıklar görülmemiştir ($p>0.05$).

Histopatolojik sonuçların genel skorları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Elmas ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada BoNT-A'nın erken ve geç dönemde yol açtığı yapısal değişiklikler incelenmiş; BoNT-A uygulandıktan 5 gün sonra bile miyofibrillerin organizasyonun bozulduğu, bazı hücre çekirdeklerinin merkeze göç ettiği, kas liflerinin ayrışmaya başladığı ve bazı mitokondrilerin dejenere olduğunu belirtilmişlerdir [213]. Çalışmamızda Elmas ve ark. [213] yaptığı çalışmadan farklı olarak tavşan yerine rat kullanılmıştır ve Elmas ve ark. 2,5 U BoNT-A (Botox; Allergan, Inc., Irvine, Kaliforniya) uygulayarak gördükleri dejeneratif bulguları 10 U BoNT-A (Botox; Allergan, Inc., Irvine, Kaliforniya) uygulayarak yaptığımız çalışmamızda daha erken görmüş olmamız olasıdır. Her ne kadar BoNT-A gruplarına kıyasla kontrol gruplarında hem primer

trombüs hem de stres testiyle indüklenen trombüs oranlarının daha fazla olması sebebiyle kontrol gruplarındaki dejeneratif skorların daha yüksek olması beklense de Billante ve ark. çalışmasına [129] göre rat için çok yüksek doz olarak belirlenen 10U BoNT-A'nın BoNT gruplarında erken dönemde bile kastaki dejenerasyon bulgularını olumsuz olarak etkilemiş olabileceğini düşünmekteyiz. BoNT'nin neden olduğu dejenerasyona rağmen bölgedeki kan akımının kontrol gruplarına göre daha yüksek olması Matic ve ark.larının 2007 yılında yaptığı çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur[213]. Bu çalışmada tavşan masseter kasına 25 ünite botulinum toksin uygulaması sonrası 4. ve 8. haftalarda masseter kası içindeki kan akımını, kan hacmini, damar geçirgenliğini ve glikoz alım hızını değerlendirmişler ve tüm bu parametrelerde artış olduğunu belirtmişlerdir. BoNT-A uygulama ve değerlendirme arasında geçen süre her ne kadar çalışmamızdaki süreye göre uzun olsa da vasküler etkileri kısa süre içerisinde başlayan BoNT'nin 3. günde dolaşımı arttırmış olabileceği beklenen bir bulgudur. Aynı zamanda makroskopik incelemede sıçan arka bacak kaslarında BoNT-A gruplarına göre iskemik görüntünün eşlik etmediği ödem görünümünün bu gruplarda artmış kan akımıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Hem arterlerde hem de venlerde damar çaplarında artışa neden olduğu bilinen perivasküler BoNT-A uygulaması denerve dokular olan vasküler greftler üzerinde de olumlu etkilerini gösterebilir ve vasküler greftlerin çaplarında artışa; spazmojenlere yanıtlarında azalmaya sebep olabilir. Sonuç olarak damar greftleriyle oluşturulmuş anastomozda, anastomoz tamamlandıktan sonra perivasküler alana yapılacak BoNT-A enjeksiyonları postoperatif trombüs görülme ihtimalinin en yüksek olduğu ilk 3 günde etkilidir ve başta vasküler spazm olmak üzere vasküler komplikasyonların görülme sıklığını azaltarak mikrocerrahi operasyonların revizyon oranlarını düşürebilir.

6. KAYNAKÇA

1. Bozиков K, Arnez ZM. Factors predicting free flap complications in head and neck reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006;59(7):737-42. Epub 20060221. doi: 10.1016/j.bjps.2005.11.013. PubMed PMID: 16782570.
2. Aghamohammadzadeh R, Withers S, Lynch F, Greenstein A, Malik R, Heagerty A. Perivascular adipose tissue from human systemic and coronary vessels: the emergence of a new pharmacotherapeutic target. *Br J Pharmacol.* 2012;165(3):670-82. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01479.x. PubMed PMID: 21564083; PubMed Central PMCID: PMC3315039.
3. Liu ZG, Ge ZD, He GW. Difference in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization and nitric oxide release between human internal mammary artery and saphenous vein. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):Ii296-301. doi: 10.1161/01.cir.102.suppl_3.iii-296. PubMed PMID: 11082404.
4. He GW, Fan L, Grove KL, Furnary A, Yang Q. Expression and function of endothelial nitric oxide synthase messenger RNA and protein are higher in internal mammary than in radial arteries. *Ann Thorac Surg.* 2011;92(3):845-50. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.04.063. PubMed PMID: 21871268.
5. Girard DS, Sutton JP, 3rd, Williams TH, Crumbley AJ, 3rd, Zellner JL, Kratz JM, Crawford FA. Papaverine delivery to the internal mammary artery pedicle effectively treats spasm. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(4):1295-8. doi: 10.1016/j.athoracsur.2004.01.061. PubMed PMID: 15464488.
6. Kiessling AH, Romasku D, Beiras-Fernandez A, Ferreirós N, Labocha S, Moritz A, Rastan AJ. Pharmacokinetics of intraluminally administered serum papaverine for spasm prophylaxis of the internal mammary artery. *Heart Surg Forum.* 2013;16(5):E266-70. doi: 10.1532/hsf98.2013201. PubMed PMID: 24217241.
7. Mussa S, Guzik TJ, Black E, Dipp MA, Channon KM, Taggart DP. Comparative efficacies and durations of action of phenoxybenzamine, verapamil/nitroglycerin solution, and papaverine as topical antispasmodics for radial artery coronary bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(6):1798-805. doi: 10.1016/s0022-5223(03)00943-7. PubMed PMID: 14688690.
8. Ding R, Feng W, Li H, Wang L, Li D, Cheng Z, et al. A comparative study on in vitro and in vivo effects of topical vasodilators in human internal mammary, radial artery and great saphenous vein. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34(3):536-41. Epub 20080715. doi: 10.1016/j.ejcts.2008.05.050. PubMed PMID: 18632282.
9. Duman I, Tanyeli Ö, Dereli Y, Oltulu P, Toy H, Sahin AS. The effects of botulinum toxin A and papaverine on human saphenous vein and internal mammary artery grafts: an in vitro study. *Arch Med Sci.* 2022;18(6):1607-16. Epub 20210324. doi: 10.5114/aoms/110157. PubMed PMID: 36457963; PubMed Central PMCID: PMC9710267.
10. Lidman D, Daniel RK. The normal healing process of microvascular anastomoses. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1981;15(2):103-10. doi: 10.3109/02844318109103422. PubMed PMID: 7339871.

11. He GW, Taggart DP. Spasm in Arterial Grafts in Coronary Artery Bypass Grafting Surgery. *Ann Thorac Surg.* 2016;101(3):1222-9. Epub 20151114. doi: 10.1016/j.athoracsur.2015.09.071. PubMed PMID: 26588865.
12. Zubilewicz T, Wronski J, Bourriez A, Terlecki P, Guinault AM, Muscatelli-Groux B, et al. Injury in vascular surgery--the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit.* 2001;7(2):316-24. PubMed PMID: 11257743.
13. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34(12):1508-12. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00075-4. PubMed PMID: 12379270.
14. Bagher P, Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. *Acta Physiol (Oxf).* 2011;202(3):271-84. Epub 20110301. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02244.x. PubMed PMID: 21199397; PubMed Central PMCID: PMC3115483.
15. Bigdeli AK, Gazyakan E, Schmidt VJ, Bauer C, Germann G, Radu CA, et al. Long-Term Outcome after Successful Lower Extremity Free Flap Salvage. *J Reconstr Microsurg.* 2019;35(4):263-9. Epub 20181016. doi: 10.1055/s-0038-1675146. PubMed PMID: 30326522.
16. Bui DT, Cordeiro PG, Hu QY, Disa JJ, Pusic A, Mehrara BJ. Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(7):2092-100. doi: 10.1097/01.prs.0000260598.24376.e1. PubMed PMID: 17519706.
17. Brown JS, Devine JC, Magennis P, Sillifant P, Rogers SN, Vaughan ED. Factors that influence the outcome of salvage in free tissue transfer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003;41(1):16-20. doi: 10.1016/s0266-4356(02)00260-7. PubMed PMID: 12576035.
18. Yip NW, Evans GR, Miller MJ, Reece GP, Langstein H, Chang D, et al. Thrombolytic therapy: what is its role in free flap salvage? *Ann Plast Surg.* 2001;46(6):601-4. doi: 10.1097/0000637-200106000-00005. PubMed PMID: 11405358.
19. Kakarala K, Emerick KS, Lin DT, Rocco JW, Deschler DG. Free flap reconstruction in 1999 and 2009: changing case characteristics and outcomes. *Laryngoscope.* 2012;122(10):2160-3. Epub 20120606. doi: 10.1002/lary.23457. PubMed PMID: 22674647.
20. Nelson JA, Fischer JP, Grover R, Kovach SJ, Low DW, Kanchwala SK, et al. Vein grafting your way out of trouble: Examining the utility and efficacy of vein grafts in microsurgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2015;68(6):830-6. Epub 20150218. doi: 10.1016/j.bjps.2015.02.008. PubMed PMID: 25812752.
21. Vargas CR, Iorio ML, Lee BT. A Systematic Review of Topical Vasodilators for the Treatment of Intraoperative Vasospasm in Reconstructive Microsurgery. *Plast Reconstr Surg.* 2015;136(2):411-22. doi: 10.1097/prs.0000000000001431. PubMed PMID: 25909299.
22. Ueda K, Harii K. Comparative study of topical use of vasodilating solutions. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2003;37(4):201-7. doi: 10.1080/02844310310016377. PubMed PMID: 14582751.

23. Lorusso R, Crudeli E, Lucà F, De Cicco G, Vizzardi E, D'Aloia A, Gelsomino S. Refractory spasm of coronary arteries and grafted conduits after isolated coronary artery bypass surgery. *Ann Thorac Surg.* 2012;93(2):545-51. Epub 20111228. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.09.078. PubMed PMID: 22206957.
24. Lemmer JH, Jr., Kirsh MM. Coronary artery spasm following coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg.* 1988;46(1):108-15. doi: 10.1016/s0003-4975(10)65869-9. PubMed PMID: 3289515.
25. Harskamp RE, McNeil JD, van Ginkel MW, Bastos RB, Baisden CE, Calhoon JH. Postoperative internal thoracic artery spasm after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 2008;85(2):647-9. doi: 10.1016/j.athoracsur.2007.08.015. PubMed PMID: 18222288.
26. Paterson HS, Jones MW, Baird DK, Hughes CF. Lethal postoperative coronary artery spasm. *Ann Thorac Surg.* 1998;65(6):1571-3. doi: 10.1016/s0003-4975(98)00098-8. PubMed PMID: 9647060.
27. Attaran S, John L, El-Gamel A. Clinical and potential use of pharmacological agents to reduce radial artery spasm in coronary artery surgery. *Ann Thorac Surg.* 2008;85(4):1483-9. doi: 10.1016/j.athoracsur.2007.10.042. PubMed PMID: 18355566.
28. Lin CL, Dumont AS, Zhang JH, Zuccarello M, Muroi C. Cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: mechanism and therapies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:679014. Epub 20140908. doi: 10.1155/2014/679014. PubMed PMID: 25276807; PubMed Central PMCID: PMC4172888.
29. Duff TA, Louie J, Feilbach JA, Scott G. Erythrocytes are essential for development of cerebral vasculopathy resulting from subarachnoid hemorrhage in cats. *Stroke.* 1988;19(1):68-72. doi: 10.1161/01.str.19.1.68. PubMed PMID: 3336905.
30. Rinkinen J, Halvorson EG. Topical Vasodilators in Microsurgery: What Is the Evidence? *J Reconstr Microsurg.* 2017;33(1):1-7. Epub 20160916. doi: 10.1055/s-0036-1592191. PubMed PMID: 27636540.
31. Gutterman DD. Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol.* 1999;277(4):H1265-72. doi: 10.1152/ajpheart.1999.277.4.H1265. PubMed PMID: 10516160.
32. Schwartz BG, Economides C, Mayeda GS, Burstein S, Kloner RA. The endothelial cell in health and disease: its function, dysfunction, measurement and therapy. *Int J Impot Res.* 2010;22(2):77-90. Epub 20091224. doi: 10.1038/ijir.2009.59. PubMed PMID: 20032988.
33. Hwang WS, Hur MS, Hu KS, Song WC, Koh KS, Baik HS, et al. Surface anatomy of the lip elevator muscles for the treatment of gummy smile using botulinum toxin. *Angle Orthod.* 2009;79(1):70-7. doi: 10.2319/091407-437.1. PubMed PMID: 19123705.
34. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J.* 2007;15(3):100-8. doi: 10.1007/bf03085963. PubMed PMID: 17612668; PubMed Central PMCID: PMC1847757.

35. Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(9):1631-74. doi: 10.1089/ars.2007.2013. PubMed PMID: 18598143.
36. Ueda M, Hirayama Y, Ogawa H, Nomura T, Terashi H, Sakakibara S. Vasodilating Effects of Antispasmodic Agents and Their Cytotoxicity in Vascular Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells-Potential Application in Microsurgery. *Int J Mol Sci*. 2023;24(13). Epub 20230629. doi: 10.3390/ijms241310850. PubMed PMID: 37446027; PubMed Central PMCID: PMC10341634.
37. He GW, Rosenfeldt FL, Buxton BF, Angus JA. Reactivity of human isolated internal mammary artery to constrictor and dilator agents. Implications for treatment of internal mammary artery spasm. *Circulation*. 1989;80(3 Pt 1):141-50. PubMed PMID: 2766521.
38. He GW, Yang CQ, Starr A. Overview of the nature of vasoconstriction in arterial grafts for coronary operations. *Ann Thorac Surg*. 1995;59(3):676-83. doi: 10.1016/0003-4975(94)01011-0. PubMed PMID: 7887711.
39. Liu JJ, Chen JR, Bradley CJ, Xie B, Johnston CI, Buxton BF. Autologous neutrophil derived supernatants inhibit endothelium dependent relaxation in human coronary bypass graft. *Cardiovasc Res*. 1994;28(9):1353-9. doi: 10.1093/cvr/28.9.1353. PubMed PMID: 7954645.
40. Kun X, Lefeng W, Rongjing D, Xincun Y. RhoA/ROK pathway related to the mechanism of higher susceptibility to spasm in RA than in IMA. *J Card Surg*. 2009;24(6):766-71. Epub 20090724. doi: 10.1111/j.1540-8191.2009.00888.x. PubMed PMID: 19682162.
41. Bodelsson M, Arneklo-Nobin B, Chester AH, Tadjkarimi S, Törnebrandt K, Yacoub M. Differential effect of hypothermia on the vascular tone and reactivity of the human coronary artery and graft vessels. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1991;32(3):288-94. PubMed PMID: 2055921.
42. Choudhary BP, Antoniadou C, Brading AF, Galione A, Channon K, Taggart DP. Diabetes mellitus as a predictor for radial artery vasoreactivity in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(11):1047-53. Epub 20070824. doi: 10.1016/j.jacc.2007.06.008. PubMed PMID: 17825713.
43. He GW, Liu ZG. Comparison of nitric oxide release and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization between human radial and internal mammary arteries. *Circulation*. 2001;104(12 Suppl 1):I344-9. doi: 10.1161/hc37t1.094930. PubMed PMID: 11568080.
44. Yu JT, Patel AJ, Malata CM. The use of topical vasodilators in microvascular surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(2):226-8. Epub 20100520. doi: 10.1016/j.bjps.2010.04.009. PubMed PMID: 20493793.

45. Demaria RG, Vernhet H, Aya G, Oliva-Lauraire MC, Juan JM, Dauzat MM. Experimental model for comparative evaluation of pharmacologically induced vasodilation of arterial wall mechanical properties. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;42(3):389-94. doi: 10.1097/00005344-200309000-00010. PubMed PMID: 12960684.
46. Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev*. 2000;80(2):717-66. doi: 10.1152/physrev.2000.80.2.717. PubMed PMID: 10747206.
47. Kerschner JE, Futran ND. The effect of topical vasodilating agents on microvascular vessel diameter in the rat model. *Laryngoscope*. 1996;106(11):1429-33. doi: 10.1097/00005537-199611000-00024. PubMed PMID: 8914915.
48. Nayyar P, Kumar P, Nayyar PV, Singh A. BOTOX: Broadening the Horizon of Dentistry. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(12):Ze25-9. Epub 20141205. doi: 10.7860/jcdr/2014/11624.5341. PubMed PMID: 25654058; PubMed Central PMCID: PMC4316364.
49. Gao YJ, Stead S, Lee RM. Papaverine induces apoptosis in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Life Sci*. 2002;70(22):2675-85. doi: 10.1016/s0024-3205(02)01525-4. PubMed PMID: 12269394.
50. Evans GR, Gherardini G, Gürlek A, Langstein H, Joly GA, Cromeens DM, et al. Drug-induced vasodilation in an in vitro and in vivo study: the effects of nicardipine, papaverine, and lidocaine on the rabbit carotid artery. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100(6):1475-81. doi: 10.1097/00006534-199711000-00015. PubMed PMID: 9385959.
51. Hou SM, Seaber AV, Urbaniak JR. Relief of blood-induced arterial vasospasm by pharmacologic solutions. *J Reconstr Microsurg*. 1987;3(2):147-51. doi: 10.1055/s-2007-1006978. PubMed PMID: 3560041.
52. Stevens JW, Simpson E, Harnan S, Squires H, Meng Y, Thomas S, et al. Systematic review of the efficacy of cilostazol, naftidrofuryl oxalate and pentoxifylline for the treatment of intermittent claudication. *Br J Surg*. 2012;99(12):1630-8. Epub 20121003. doi: 10.1002/bjs.8895. PubMed PMID: 23034699.
53. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs*. 1987;34(1):50-97. doi: 10.2165/00003495-198734010-00003. PubMed PMID: 3308412.
54. Hýza P, Veselý J, Schwarz D, Vasků A, Streit L, Choudry U, Sukop A. The efficacy of magnesium sulfate on resolving surgically provoked vasospasm of the flap pedicle in an experiment. *Acta Chir Plast*. 2009;51(1):15-9. PubMed PMID: 19642332.
55. Monteiro DT, Santamore WP, Nemir P, Jr. The influence of pentoxifylline on skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg*. 1986;77(2):277-81. doi: 10.1097/00006534-198602000-00019. PubMed PMID: 3945689.
56. Suárez Nieto C, Suárez García MJ, Barthe García P. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg*. 1992;45(2):113-6. doi: 10.1016/0007-1226(92)90169-x. PubMed PMID: 1562834.

57. Ichioka S, Nakatsuka T, Sato Y, Shibata M, Kamiya A, Harii K. Amrinone, a selective phosphodiesterase III inhibitor, improves microcirculation and flap survival: a comparative study with prostaglandin E1. *J Surg Res.* 1998;75(1):42-8. doi: 10.1006/jsre.1998.5266. PubMed PMID: 9614855.
58. Endoh M. Amrinone, forerunner of novel cardiotonic agents, caused paradigm shift of heart failure pharmacotherapy. *Circ Res.* 2013;113(4):358-61. doi: 10.1161/circresaha.113.301689. PubMed PMID: 23908328.
59. Ichioka S, Nakatsuka T, Ohura N, Sato Y, Harii K. Topical application of amrinone (a selective phosphodiesterase III inhibitor) for relief of vasospasm. *J Surg Res.* 2000;93(1):149-55. doi: 10.1006/jsre.2000.5971. PubMed PMID: 10945957.
60. Beekman WH, Sluimers JE, Kort WJ, van der Meulen JC. Resolution of experimental microvascular vasoconstriction in rats by topical application of lidocaine hydrochloride in varying concentrations. *Ann Plast Surg.* 1988;21(6):570-5. doi: 10.1097/0000637-198812000-00014. PubMed PMID: 3239936.
61. Geter RK, Winters RR, Puckett CL. Resolution of experimental microvascular spasm and improvement in anastomotic patency by direct topical agent application. *Plast Reconstr Surg.* 1986;77(1):105-15. doi: 10.1097/00006534-198601000-00016. PubMed PMID: 3941832.
62. Beekman WH, Dammeijer PF, Sluimers JE, Kort WJ, van der Meulen JH. Improvement in blood flow and diameter of the postanastomotic rat tail artery by topical application of lidocaine in varying concentrations. *Ann Plast Surg.* 1990;24(3):248-51. doi: 10.1097/0000637-199003000-00009. PubMed PMID: 2316986.
63. Ohta I, Kawai H, Kawabata H, Masada K, Ono K. Topical use of Xylocaine for relieving vasospasm: effect of concentration. *J Reconstr Microsurg.* 1991;7(3):205-8. doi: 10.1055/s-2007-1006780. PubMed PMID: 1890678.
64. Johnstone RE, Wax MK, Bishop DJ, Chafin JB. Large doses of topical lidocaine during microvascular surgery are not associated with toxic blood concentrations. *Anesthesiology.* 1995;82(2):593-6. doi: 10.1097/00000542-199502000-00034. PubMed PMID: 7856922.
65. Yokoyama T, Kadota S, Takeuchi K, Tosa Y, Kadomatsu K, Shimizu Y, Hosaka Y. Changes in the blood flow and prevention of vasospasm of the femoral artery by topical application of lidocaine in rats. *Ann Plast Surg.* 2011;67(2):178-83. doi: 10.1097/SAP.0b013e3181e7dbb6. PubMed PMID: 21233700.
66. Kirsten R, Nelson K, Kirsten D, Heintz B. Clinical pharmacokinetics of vasodilators. Part I. *Clin Pharmacokinet.* 1998;34(6):457-82. doi: 10.2165/00003088-199834060-00003. PubMed PMID: 9646008.
67. Kimball MM, Velat GJ, Hoh BL. Critical care guidelines on the endovascular management of cerebral vasospasm. *Neurocrit Care.* 2011;15(2):336-41. doi: 10.1007/s12028-011-9600-1. PubMed PMID: 21761272.

68. Weinzwieg N, Lukash F, Weinzwieg J. Topical and systemic calcium channel blockers in the prevention and treatment of microvascular spasm in a rat epigastric island skin flap model. *Ann Plast Surg.* 1999;42(3):320-6. doi: 10.1097/00000637-199903000-00015. PubMed PMID: 10096625.
69. Coons JC, McGraw M, Murali S. Pharmacotherapy for acute heart failure syndromes. *Am J Health Syst Pharm.* 2011;68(1):21-35. doi: 10.2146/ajhp100202. PubMed PMID: 21164062.
70. Zelis R. Mechanisms of vasodilation. *Am J Med.* 1983;74(6b):3-12. doi: 10.1016/0002-9343(83)90848-3. PubMed PMID: 6344631.
71. Costabile RA, Mammen T, Hwang K. An overview and expert opinion on the use of alprostadil in the treatment of sexual dysfunction. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9(8):1421-9. doi: 10.1517/14656566.9.8.1421. PubMed PMID: 18473716.
72. Li J, Wang B, Wang Y, Wu F, Li P, Li Y, et al. Therapeutic effect of liposomal prostaglandin E(1) in acute lower limb ischemia as an adjuvant to hybrid procedures. *Exp Ther Med.* 2013;5(6):1760-4. Epub 20130410. doi: 10.3892/etm.2013.1061. PubMed PMID: 23837069; PubMed Central PMCID: PMC3702693.
73. Hyza P, Streit L, Schwarz D, Kubek T, Vesely J. Vasospasm of the flap pedicle: the effect of 11 of the most often used vasodilating drugs. Comparative study in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134(4):574e-84e. doi: 10.1097/prs.0000000000000570. PubMed PMID: 25357051.
74. Dunn CL, Brodland DG, Griego RD, Huether MJ, Fazio MJ, Zitelli JA. A single postoperative application of nitroglycerin ointment does not increase survival of cutaneous flaps and grafts. *Dermatol Surg.* 2000;26(5):425-7. doi: 10.1046/j.1524-4725.2000.99307.x. PubMed PMID: 10816228.
75. Kutun S, Ay AA, Ulucanlar H, Tarcan O, Ay A, Aldan M, et al. Is transdermal nitroglycerin application effective in preventing and healing flap ischaemia after modified radical mastectomy? *S Afr J Surg.* 2010;48(4):119-21. PubMed PMID: 21542401.
76. Coruh A, Abaci K, Gunay GK. Effect of topical nitroglycerine on the survival of ischemic flow-through venous flaps in rabbits. *J Reconstr Microsurg.* 2004;20(3):261-6. doi: 10.1055/s-2004-823114. PubMed PMID: 15088211.
77. Smith DK, Dolan RW. Effects of vasoactive topical agents on the survival of dorsal skin flaps in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;121(3):220-3. doi: 10.1016/s0194-5998(99)70175-0. PubMed PMID: 10471861.
78. Zhang J, Lipa JE, Black CE, Huang N, Neligan PC, Ling FT, et al. Pharmacological characterization of vasomotor activity of human musculocutaneous perforator artery and vein. *J Appl Physiol* (1985). 2000;89(6):2268-75. doi: 10.1152/jappl.2000.89.6.2268. PubMed PMID: 11090578.
79. Spokas EG, Folco G, Quilley J, Chander P, McGiff JC. Endothelial mechanism in the vascular action of hydralazine. *Hypertension.* 1983;5(2 Pt 2):1107-11. doi: 10.1161/01.hyp.5.2_pt_2.1107. PubMed PMID: 6826220.

80. Rowbotham MC. Pharmacologic management of complex regional pain syndrome. *Clin J Pain*. 2006;22(5):425-9. doi: 10.1097/01.ajp.0000194281.74379.01. PubMed PMID: 16772796.
81. Notodihardjo HW, Ogawa Y, Kusumoto K. The blood flow patterns of microsurgical procedures in rats with topical and systemic vasodilators. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1998;32(3):249-54. doi: 10.1080/02844319850158570. PubMed PMID: 9785427.
82. Erbguth FJ. Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov Disord*. 2004;19 Suppl 8:S2-6. doi: 10.1002/mds.20003. PubMed PMID: 15027048.
83. Erbguth FJ. From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *J Neural Transm (Vienna)*. 2008;115(4):559-65. Epub 20070426. doi: 10.1007/s00702-007-0728-2. PubMed PMID: 17458494.
84. Monheit GD, Pickett A. AbobotulinumtoxinA: A 25-Year History. *Aesthet Surg J*. 2017;37(suppl_1):S4-s11. doi: 10.1093/asj/sjw284. PubMed PMID: 28388718; PubMed Central PMCID: PMC5434488.
85. Pellett S. Learning from the past: historical aspects of bacterial toxins as pharmaceuticals. *Curr Opin Microbiol*. 2012;15(3):292-9. Epub 20120530. doi: 10.1016/j.mib.2012.05.005. PubMed PMID: 22651975.
86. Lamanna C, Mc EO, Eklund HW. The purification and crystallization of *Clostridium botulinum* type A toxin. *Science*. 1946;103(2681):613. PubMed PMID: 21026141.
87. Burgen AS, Dickens F, Zatman LJ. The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction. *J Physiol*. 1949;109(1-2):10-24. doi: 10.1113/jphysiol.1949.sp004364. PubMed PMID: 15394302; PubMed Central PMCID: PMC1392572.
88. Magoon E, Cruciger M, Scott AB, Jampolsky A. Diagnostic injection of Xylocaine into extraocular muscles. *Ophthalmology*. 1982;89(5):489-91. doi: 10.1016/s0161-6420(82)34764-8. PubMed PMID: 7099568.
89. Drachman DB. ATROPHY OF SKELETAL MUSCLE IN CHICK EMBRYOS TREATED WITH BOTULINUM TOXIN. *Science*. 1964;145(3633):719-21. doi: 10.1126/science.145.3633.719. PubMed PMID: 14163805.
90. Scott AB, Rosenbaum A, Collins CC. Pharmacologic weakening of extraocular muscles. *Invest Ophthalmol*. 1973;12(12):924-7. PubMed PMID: 4203467.
91. Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1980;17(1):21-5. doi: 10.3928/0191-3913-19800101-06. PubMed PMID: 7365644.
92. Flanders M, Tischler A, Wise J, Williams F, Beneish R, Auger N. Injection of type A botulinum toxin into extraocular muscles for correction of strabismus. *Can J Ophthalmol*. 1987;22(4):212-7. PubMed PMID: 3607594.
93. Botulinum toxin therapy of eye muscle disorders. Safety and effectiveness. American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 1989;Suppl:37-41. PubMed PMID: 2779991.

94. Hellman A, Torres-Russotto D. Botulinum toxin in the management of blepharospasm: current evidence and recent developments. *Ther Adv Neurol Disord.* 2015;8(2):82-91. doi: 10.1177/1756285614557475. PubMed PMID: 25922620; PubMed Central PMCID: PMC4356659.
95. Wellman-Labadie O, Zhou Y. The US Orphan Drug Act: rare disease research stimulator or commercial opportunity? *Health Policy.* 2010;95(2-3):216-28. Epub 20091229. doi: 10.1016/j.healthpol.2009.12.001. PubMed PMID: 20036435.
96. Clark RP, Berris CE. Botulinum toxin: a treatment for facial asymmetry caused by facial nerve paralysis. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84(2):353-5. PubMed PMID: 2748749.
97. Rohrich RJ, Janis JE, Fagien S, Stuzin JM. The cosmetic use of botulinum toxin. *Plast Reconstr Surg.* 2003;112(5 Suppl):177S-88S; quiz 88S, 92S; discussion 89S-91S. doi: 10.1097/01.Prs.0000082208.37239.5b. PubMed PMID: 14504502.
98. Carruthers A. History of the clinical use of botulinum toxin A and B. *Clin Dermatol.* 2003;21(6):469-72. doi: 10.1016/j.clindermatol.2003.11.003. PubMed PMID: 14759577.
99. Carruthers JD, Carruthers JA. Treatment of glabellar frown lines with C. botulinum-A exotoxin. *J Dermatol Surg Oncol.* 1992;18(1):17-21. doi: 10.1111/j.1524-4725.1992.tb03295.x. PubMed PMID: 1740562.
100. Keen M, Kopelman JE, Aviv JE, Binder W, Brin M, Blitzer A. Botulinum toxin A: a novel method to remove periorbital wrinkles. *Facial Plast Surg.* 1994;10(2):141-6. doi: 10.1055/s-2008-1064563. PubMed PMID: 7995530.
101. Binder WJ, Brin MF, Blitzer A, Schoenrock LD, Pogoda JM. Botulinum toxin type A (BOTOX) for treatment of migraine headaches: an open-label study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;123(6):669-76. doi: 10.1067/mhn.2000.110960. PubMed PMID: 11112955.
102. Jackson JL, Kuriyama A, Hayashino Y. Botulinum toxin A for prophylactic treatment of migraine and tension headaches in adults: a meta-analysis. *Jama.* 2012;307(16):1736-45. doi: 10.1001/jama.2012.505. PubMed PMID: 22535858.
103. Ramachandran R, Yaksh TL. Therapeutic use of botulinum toxin in migraine: mechanisms of action. *Br J Pharmacol.* 2014;171(18):4177-92. doi: 10.1111/bph.12763. PubMed PMID: 24819339; PubMed Central PMCID: PMC4241086.
104. Walker TJ, Dayan SH. Comparison and overview of currently available neurotoxins. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2014;7(2):31-9. PubMed PMID: 24587850; PubMed Central PMCID: PMC43935649.
105. Smith TJ, Hill KK, Raphael BH. Historical and current perspectives on Clostridium botulinum diversity. *Res Microbiol.* 2015;166(4):290-302. Epub 20141012. doi: 10.1016/j.resmic.2014.09.007. PubMed PMID: 25312020; PubMed Central PMCID: PMC43935649.

106. Barash JR, Arnon SS. A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *J Infect Dis.* 2014;209(2):183-91. Epub 20131007. doi: 10.1093/infdis/jit449. PubMed PMID: 24106296.
107. Dover N, Barash JR, Hill KK, Xie G, Arnon SS. Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *J Infect Dis.* 2014;209(2):192-202. Epub 20131007. doi: 10.1093/infdis/jit450. PubMed PMID: 24106295.
108. Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(8):535-49. Epub 20140630. doi: 10.1038/nrmicro3295. PubMed PMID: 24975322.
109. Montal M. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:591-617. doi: 10.1146/annurev.biochem.051908.125345. PubMed PMID: 20233039.
110. Singh BR. Botulinum neurotoxin structure, engineering, and novel cellular trafficking and targeting. *Neurotox Res.* 2006;9(2-3):73-92. doi: 10.1007/bf03033925. PubMed PMID: 16785103.
111. Humeau Y, Doussau F, Grant NJ, Poulain B. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie.* 2000;82(5):427-46. doi: 10.1016/s0300-9084(00)00216-9. PubMed PMID: 10865130.
112. Kumar R, Dhaliwal HP, Kukreja RV, Singh BR. The Botulinum Toxin as a Therapeutic Agent: Molecular Structure and Mechanism of Action in Motor and Sensory Systems. *Semin Neurol.* 2016;36(1):10-9. Epub 20160211. doi: 10.1055/s-0035-1571215. PubMed PMID: 26866491.
113. Inoue K, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohyama T, Takeshi K, Moriishi K, et al. Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infect Immun.* 1996;64(5):1589-94. doi: 10.1128/iai.64.5.1589-1594.1996. PubMed PMID: 8613365; PubMed Central PMCID: PMC173966.
114. Bryant AM, Davis J, Cai S, Singh BR. Molecular composition and extinction coefficient of native botulinum neurotoxin complex produced by *Clostridium botulinum* hall A strain. *Protein J.* 2013;32(2):106-17. doi: 10.1007/s10930-013-9465-6. PubMed PMID: 23334849.
115. Carli L, Montecucco C, Rossetto O. Assay of diffusion of different botulinum neurotoxin type a formulations injected in the mouse leg. *Muscle Nerve.* 2009;40(3):374-80. doi: 10.1002/mus.21343. PubMed PMID: 19618426.
116. Stone HF, Zhu Z, Thach TQ, Ruegg CL. Characterization of diffusion and duration of action of a new botulinum toxin type A formulation. *Toxicon.* 2011;58(2):159-67. Epub 20110531. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.012. PubMed PMID: 21658400.
117. Panicker JN, Muthane UB. Botulinum toxins: pharmacology and its current therapeutic evidence for use. *Neurol India.* 2003;51(4):455-60. PubMed PMID: 14742921.
118. Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, Omori A, Ito T, Takahashi M, Kozaki S. Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem.* 1994;269(14):10498-503. PubMed PMID: 8144634.

119. Jin R, Rummel A, Binz T, Brunger AT. Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature*. 2006;444(7122):1092-5. Epub 20061213. doi: 10.1038/nature05387. PubMed PMID: 17167421.
120. Chai Q, Arndt JW, Dong M, Tepp WH, Johnson EA, Chapman ER, Stevens RC. Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B. *Nature*. 2006;444(7122):1096-100. Epub 20061213. doi: 10.1038/nature05411. PubMed PMID: 17167418.
121. Zhang Y, Varnum SM. The receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotype C binds phosphoinositides. *Biochimie*. 2012;94(3):920-3. Epub 20111118. doi: 10.1016/j.biochi.2011.11.004. PubMed PMID: 22120109; PubMed Central PMCID: PMC3277684.
122. Couesnon A, Shimizu T, Popoff MR. Differential entry of botulinum neurotoxin A into neuronal and intestinal cells. *Cell Microbiol*. 2009;11(2):289-308. Epub 20081030. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01253.x. PubMed PMID: 19016790.
123. Couesnon A, Molgó J, Connan C, Popoff MR. Preferential entry of botulinum neurotoxin A Hc domain through intestinal crypt cells and targeting to cholinergic neurons of the mouse intestine. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002583. Epub 20120315. doi: 10.1371/journal.ppat.1002583. PubMed PMID: 22438808; PubMed Central PMCID: PMC3305446.
124. Lang T. SNARE proteins and 'membrane rafts'. *J Physiol*. 2007;585(Pt 3):693-8. Epub 20070503. doi: 10.1113/jphysiol.2007.134346. PubMed PMID: 17478530; PubMed Central PMCID: PMC32375502.
125. de Paiva A, Meunier FA, Molgó J, Aoki KR, Dolly JO. Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):3200-5. doi: 10.1073/pnas.96.6.3200. PubMed PMID: 10077661; PubMed Central PMCID: PMC15919.
126. Duchen LW, Strich SJ. The effects of botulinum toxin on the pattern of innervation of skeletal muscle in the mouse. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*. 1968;53(1):84-9. doi: 10.1113/expphysiol.1968.sp001948. PubMed PMID: 4297234.
127. Dressler D, Benecke R. Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil Rehabil*. 2007;29(23):1761-8. doi: 10.1080/09638280701568296. PubMed PMID: 18033601.
128. Roger Aoki K. Botulinum neurotoxin serotypes A and B preparations have different safety margins in preclinical models of muscle weakening efficacy and systemic safety. *Toxicon*. 2002;40(7):923-8. doi: 10.1016/s0041-0101(02)00086-7. PubMed PMID: 12076646.
129. Billante CR, Zeale DL, Billante M, Reyes JH, Sant'Anna G, Rodriguez R, Stone RE, Jr. Comparison of neuromuscular blockade and recovery with botulinum toxins A and F. *Muscle Nerve*. 2002;26(3):395-403. doi: 10.1002/mus.10213. PubMed PMID: 12210370.

130. Arnold PB, Campbell CA, Rodeheaver G, Merritt W, Morgan RF, Drake DB. Modification of blood vessel diameter following perivascular application of botulinum toxin-A. *Hand (N Y)*. 2009;4(3):302-7. Epub 20090205. doi: 10.1007/s11552-009-9169-8. PubMed PMID: 19194764; PubMed Central PMCID: PMC2724620.
131. Sketelj J, Crne-Finderle N, Sket D, Dettbarn WD, Brzin M. Comparison between the effects of botulinum toxin-induced paralysis and denervation on molecular forms of acetylcholinesterase in muscles. *J Neurochem*. 1993;61(2):501-8. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb02152.x. PubMed PMID: 8336138.
132. Matic DB, Lee TY, Wells RG, Gan BS. The effects of botulinum toxin type A on muscle blood perfusion and metabolism. *Plast Reconstr Surg*. 2007;120(7):1823-33. doi: 10.1097/01.prs.0000287135.17291.2f. PubMed PMID: 18090744.
133. Green DP. Operative hand surgery. *Operative hand surgery* 1988. p. xxv, 811-xxv, .
134. Morris JL, Jobling P, Gibbins IL. Botulinum neurotoxin A attenuates release of norepinephrine but not NPY from vasoconstrictor neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(6):H2627-35. Epub 20020829. doi: 10.1152/ajpheart.00477.2002. PubMed PMID: 12388237.
135. Stone AV, Koman LA, Callahan MF, Eckman DM, Smith BP, Plate JF, Smith TL. The effect of botulinum neurotoxin-A on blood flow in rats: a potential mechanism for treatment of Raynaud phenomenon. *J Hand Surg Am*. 2012;37(4):795-802. Epub 20120303. doi: 10.1016/j.jhsa.2012.01.021. PubMed PMID: 22386546.
136. Lee Y, Lee CJ, Choi E, Lee PB, Lee HJ, Nahm FS. Lumbar Sympathetic Block with Botulinum Toxin Type A and Type B for the Complex Regional Pain Syndrome. *Toxins (Basel)*. 2018;10(4). Epub 20180419. doi: 10.3390/toxins10040164. PubMed PMID: 29671801; PubMed Central PMCID: PMC5923330.
137. Park TH, Park JH, Chang CH, Rah DK. Botulinum Toxin A Upregulates Rac1, Cdc42, and RhoA Gene Expression in a Dose-Dependent Manner: In Vivo and in Vitro Study. *J Craniofac Surg*. 2016;27(2):516-20. doi: 10.1097/scs.0000000000002272. PubMed PMID: 26963302.
138. Żebryk P, Puszczewicz MJ. Botulinum toxin A in the treatment of Raynaud's phenomenon: a systematic review. *Arch Med Sci*. 2016;12(4):864-70. Epub 20150108. doi: 10.5114/aoms.2015.48152. PubMed PMID: 27478469; PubMed Central PMCID: PMC4947604.
139. Neumeister MW. The role of botulinum toxin in vasospastic disorders of the hand. *Hand Clin*. 2015;31(1):23-37. Epub 20141125. doi: 10.1016/j.hcl.2014.09.003. PubMed PMID: 25455354.
140. Goldberg SH, Gehrman MD, Graham JH. Botulinum toxin A and B improve perfusion, increase flap survival, cause vasodilation, and prevent thrombosis: a systematic review and meta-analysis of controlled animal studies. *Hand*. 2023;18(1):22-31.
141. Neumeister MW. Botulinum toxin type A in the treatment of Raynaud's phenomenon. *J Hand Surg Am*. 2010;35(12):2085-92. doi: 10.1016/j.jhsa.2010.09.019. PubMed PMID: 21134617.

142. Chester AH, Panda R, Borland JA, Tadjkarimi S, Schyns CJ, O'Neil GS, Yacoub MH. Effect of mode of application of papaverine on the contractile response of the internal mammary artery. *Br J Surg.* 1994;81(4):527-31. doi: 10.1002/bjs.1800810414. PubMed PMID: 8205426.
143. Clemens MW, Higgins JP, Wilgis EFS. Prevention of anastomotic thrombosis by botulinum toxin a in an animal model. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123(1):64-70. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181904c31. PubMed PMID: 19116537.
144. Murakami E, Iwata H, Imaizumi M, Takemura H. Prevention of arterial graft spasm by botulinum toxin: an in-vitro experiment. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009;9(3):395-8. Epub 20090629. doi: 10.1510/icvts.2009.207076. PubMed PMID: 19564207.
145. Hassanpour SE, Tarahomi M, Daryani A. Thrombosis Prevention with Botulinum Toxin A after Traumatic Crush Injury in a Rat Model. *J Reconstr Microsurg.* 2018;34(3):206-10. Epub 20171115. doi: 10.1055/s-0037-1607437. PubMed PMID: 29141256.
146. Upton J, Garcia J, Liao E. Botox to the rescue. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123(1):38e. doi: 10.1097/PRS.0b013e318194d22f. PubMed PMID: 19116528.
147. Janz BA, Thomas PR, Fanua SP, Dunn RE, Wilgis EF, Means KR, Jr. Prevention of anastomotic thrombosis by botulinum toxin B after acute injury in a rat model. *J Hand Surg Am.* 2011;36(10):1585-91. Epub 20110819. doi: 10.1016/j.jhsa.2011.07.008. PubMed PMID: 21855233.
148. Tanyeli O, Duman I, Dereli Y, Gormus N, Toy H, Sahin AS. Relaxation matters: comparison of in-vitro vasodilatory role of botulinum toxin-A and papaverine in human radial artery grafts. *J Cardiothorac Surg.* 2019;14(1):15. Epub 20190121. doi: 10.1186/s13019-019-0837-7. PubMed PMID: 30665449; PubMed Central PMCID: PMC6341691.
149. Laarakker AS, Borah G. Botulinum Toxin A Salvage of Ischemic Hand Trauma. *Plast Reconstr Surg.* 2020;145(1):161-4. doi: 10.1097/prs.0000000000006379. PubMed PMID: 31881617.
150. Markatos K, Karamanou M, Saranteas T, Mavrogenis AF. Hallmarks of amputation surgery. *Int Orthop.* 2019;43(2):493-9. Epub 20180612. doi: 10.1007/s00264-018-4024-6. PubMed PMID: 29948012.
151. Tamai S, Usui M, Yoshizu T. Experimental and Clinical Reconstructive Microsurgery 2003.
152. Carrel A, Guthrie CC. Anastomosis of blood vessels by the patching method and transplantation of the kidney. 1906 [classical article]. *Yale J Biol Med.* 2001;74(4):243-7. PubMed PMID: 11697483; PubMed Central PMCID: PMC6341691.
153. Howell WH, Holt E. TWO NEW FACTORS IN BLOOD COAGULATION—HEPARIN AND PRO-ANTITHROMBIN. *American Journal of Physiology-Legacy Content.* 1918;47(3):328-41. doi: 10.1152/ajplegacy.1918.47.3.328.

154. Eviş SA EU. The investigation of the effect of botulinum toxin A over the development of neointimal hyperplasia at the arteries and venous grafts used for the reconstruction of arterial defects in an experimental rat model. 2017.
155. Hayhurst JW, O'Brien BM. An experimental study of microvascular technique, patency rates and related factors. *Br J Plast Surg.* 1975;28(2):128-32. doi: 10.1016/s0007-1226(75)90175-7. PubMed PMID: 1156728.
156. Harashina T. Use of the united suture in microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg.* 1977;59(1):134-5. doi: 10.1097/00006534-197701000-00030. PubMed PMID: 318750.
157. Gelderman PW, Berendsen W. Re-endothelialization of microvascular carotid end-to-side anastomosis in the rat. *J Neurosurg.* 1979;51(6):785-95. doi: 10.3171/jns.1979.51.6.0785. PubMed PMID: 387921.
158. Acland RD, Trachtenberg L. The histopathology of small arteries following experimental microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg.* 1977;60(6):868-75. doi: 10.1097/00006534-197712000-00004. PubMed PMID: 928552.
159. Davies MG, Hagen PO. Pathobiology of intimal hyperplasia. *Br J Surg.* 1994;81(9):1254-69. doi: 10.1002/bjs.1800810904. PubMed PMID: 7953384.
160. Morrison AD, Berwick L, Orci L, Winegrad AI. Morphology and metabolism of an aortic intima-media preparation in which an intact endothelium is preserved. *J Clin Invest.* 1976;57(3):650-60. doi: 10.1172/jci108321. PubMed PMID: 1249201; PubMed Central PMCID: PMCPMC436698.
161. Thurston JB, Buncke HJ, Chater NL, Weinstein PR. A scanning electron microscopy study of micro-arterial damage and repair. *Plast Reconstr Surg.* 1976;57(2):197-203. doi: 10.1097/00006534-197602000-00012. PubMed PMID: 1250891.
162. Urbaniak JR, Soucacos PN, Adelaar RS, Bright DS, Whitehurst LA. Experimental evaluation of microsurgical techniques in small artery anastomoses. *Orthop Clin North Am.* 1977;8(2):249-63. PubMed PMID: 331181.
163. Bellón JM, Buján J, Hernando A, Honduvilla NG, Jurado F. Arterial autografts and PTFE vascular microprostheses: similarities in the healing process. *Eur J Vasc Surg.* 1994;8(6):694-702. doi: 10.1016/s0950-821x(05)80649-8. PubMed PMID: 7828746.
164. Lykoudis EG, Papalois AE, Gravvanis AI, Frangia KB, Stamatopoulos CN, Ioannovich JD. Microvascular repair with 1-mm polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts: effect of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) on the patency rate and healing process. *Microsurgery.* 2000;20(7):324-30. doi: 10.1002/1098-2752(2000)20:7<324::aid-micr3>3.0.co;2-q. PubMed PMID: 11119287.
165. Lanzetta M. Use of the 3M precise microvascular anastomotic system in hand surgery. *J Hand Surg Am.* 1995;20(5):725-30. doi: 10.1016/s0363-5023(05)80421-6. PubMed PMID: 8522736.
166. Hastings OM, Jain KM, Hobson RW, 2nd, Swan KG. A prospective randomized study of three expanded polytetrafluoroethylene (PTFE) grafts as small arterial substitutes. *Ann Surg.* 1978;188(6):743-7. doi: 10.1097/00006534-197812000-00005. PubMed PMID: 367297; PubMed Central PMCID: PMCPMC1397008.

167. Lanzetta M. Clinical use of microvascular PTFE grafts. *Microsurgery*. 1995;16(6):412-5. doi: 10.1002/micr.1920160612. PubMed PMID: 8531645.
168. Harris JR, Seikaly H. Evaluation of polytetrafluoroethylene micrografts in microvascular surgery. *J Otolaryngol*. 2002;31(2):89-92. doi: 10.2310/7070.2002.18928. PubMed PMID: 12019749.
169. Bayramiçli M, Tetik C, Sönmez A, Gürünlüoğlu R, Baltacı F. Reliability of primary vein grafts in lower extremity free tissue transfers. *Ann Plast Surg*. 2002;48(1):21-9. doi: 10.1097/0000637-200201000-00003. PubMed PMID: 11773726.
170. Furr MC, Cannady S, Wax MK. Interposition vein grafts in microvascular head and neck reconstruction. *Laryngoscope*. 2011;121(4):707-11. doi: 10.1002/lary.21353. PubMed PMID: 21433015.
171. Godina M. Arterial autografts in microvascular surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1986;78(3):293-4. doi: 10.1097/00006534-198609000-00002. PubMed PMID: 3737752.
172. Lemson MS, Tordoir JH, Daemen MJ, Kitslaar PJ. Intimal hyperplasia in vascular grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000;19(4):336-50. doi: 10.1053/ejvs.1999.1040. PubMed PMID: 10801366.
173. Ishikawa M, Sasajima T, Kubo Y. Re-endothelialisation in autogenous vein grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1996;11(1):105-11. doi: 10.1016/s1078-5884(96)80143-2. PubMed PMID: 8564478.
174. Kökçü DD, Yenisey YDDM, Güler YDDAU. DIŞ HEKİMLİĞİNDE KAN AKIMI ÖLÇÜMÜ VE LASER DOPPLER FLOWMETRY. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 2005;2005(1):55-64.
175. Riva C, Ross B, Benedek GB. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol*. 1972;11(11):936-44. PubMed PMID: 4634958.
176. Fazekas A, Olgart L, Gazelius B, Kerezoudis N, Edwall L. Effects of angiotensin II on blood flow in rat submandibular gland. *Acta Physiol Scand*. 1991;142(4):503-7. doi: 10.1111/j.1748-1716.1991.tb09186.x. PubMed PMID: 1950599.
177. Tooke JE, Ostergren J, Lins PE, Fagrell B. Skin microvascular blood flow control in long duration diabetics with and without complications. *Diabetes Res*. 1987;5(4):189-92. PubMed PMID: 3311558.
178. Johansson K, Ahn H, Lindhagen J, Tryselius U. Effect of epidural anaesthesia on intestinal blood flow. *Br J Surg*. 1988;75(1):73-6. doi: 10.1002/bjs.1800750127. PubMed PMID: 2962690.
179. Hoffmann U, Schneider E, Bollinger A. Flow motion waves with high and low frequency in severe ischaemia before and after percutaneous transluminal angioplasty. *Cardiovasc Res*. 1990;24(9):711-8. doi: 10.1093/cvr/24.9.711. PubMed PMID: 2146018.
180. Choi CM, Bennett RG. Laser Dopplers to determine cutaneous blood flow. *Dermatol Surg*. 2003;29(3):272-80. doi: 10.1046/j.1524-4725.2003.29042.x. PubMed PMID: 12614422.

181. Staberg B, Serup J. Allergic and irritant skin reactions evaluated by laser Doppler flowmetry. *Contact Dermatitis*. 1988;18(1):40-5. doi: 10.1111/j.1600-0536.1988.tb05488.x. PubMed PMID: 2964989.
182. Walmsley D, Goodfield MJ. Evidence for an abnormal peripherally mediated vascular response to temperature in Raynaud's phenomenon. *Br J Rheumatol*. 1990;29(3):181-4. doi: 10.1093/rheumatology/29.3.181. PubMed PMID: 2357499.
183. Limbird TJ. Application of laser Doppler technology to meniscal injuries. *Clin Orthop Relat Res*. 1990;(252):88-91. PubMed PMID: 2406079.
184. Fredriksson I, Fors C, Johansson J. *Laser Doppler Flowmetry – A Theoretical Framework*. 2012.
185. Cakir B, Oreroğlu AR, Doğan T, Akan M. A complete subperichondrial dissection technique for rhinoplasty with management of the nasal ligaments. *Aesthet Surg J*. 2012;32(5):564-74. doi: 10.1177/1090820x12445471. PubMed PMID: 22745445.
186. Humeau A, Steenbergen W, Nilsson H, Strömberg T. Laser Doppler perfusion monitoring and imaging: novel approaches. *Med Biol Eng Comput*. 2007;45(5):421-35. Epub 20070306. doi: 10.1007/s11517-007-0170-5. PubMed PMID: 17340155.
187. Oberg PA. Laser-Doppler flowmetry. *Crit Rev Biomed Eng*. 1990;18(2):125-63. PubMed PMID: 2242676.
188. Ahn J, Pogrel MA. The effects of 2% lidocaine with 1:100,000 epinephrine on pulpal and gingival blood flow. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(2):197-202. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90426-7. PubMed PMID: 9503456.
189. Burnier P, Niddam J, Bosc R, Hersant B, Meningaud JP. Indocyanine green applications in plastic surgery: A review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2017;70(6):814-27. Epub 20170220. doi: 10.1016/j.bjps.2017.01.020. PubMed PMID: 28292569.
190. Holm C, Mayr M, Höfter E, Becker A, Pfeiffer UJ, Mühlbauer W. Intraoperative evaluation of skin-flap viability using laser-induced fluorescence of indocyanine green. *Br J Plast Surg*. 2002;55(8):635-44. doi: 10.1054/bjps.2002.3969. PubMed PMID: 12550116.
191. Phillips BT, Lanier ST, Conkling N, Wang ED, Dagum AB, Ganz JC, et al. Intraoperative perfusion techniques can accurately predict mastectomy skin flap necrosis in breast reconstruction: results of a prospective trial. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(5):778e-88e. doi: 10.1097/PRS.0b013e31824a2ae8. PubMed PMID: 22544108.
192. Holm C, Tegeler J, Mayr M, Becker A, Pfeiffer UJ, Mühlbauer W. Monitoring free flaps using laser-induced fluorescence of indocyanine green: a preliminary experience. *Microsurgery*. 2002;22(7):278-87. doi: 10.1002/micr.10052. PubMed PMID: 12404345.

193. Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, Pätälä T, Spillmann T, Tuchin VV, et al. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *Int J Biomed Imaging*. 2012;2012:940585. Epub 20120422. doi: 10.1155/2012/940585. PubMed PMID: 22577366; PubMed Central PMCID: PMC3346977.
194. Kanuri A, Liu AS, Guo L. Whom should we SPY? A cost analysis of laser-assisted indocyanine green angiography in prevention of mastectomy skin flap necrosis during prosthesis-based breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(4):448e-54e. doi: 10.1097/prs.0000000000000025. PubMed PMID: 24675199.
195. Ritschl L, Schmidt L, Fichter A, Hapfelmeier A, Kanatas A, Wolff K-D, Mücke T. Prediction of Flap Necrosis by Using Indocyanine Green Videoangiography in Cases of Venous Occlusion in the Epigastric Flap Model of the Rat. *Journal of Reconstructive Microsurgery Open*. 2018;03(02):e62-e9.
196. Michael Z, Tobias JBu, Victoria E, Jenny P, Rinat L-S, Hassan A, et al. Treatment of Breast Cancer Lytic Skeletal Metastasis Using a Model in Nude Rats. In: Esra G, Mehmet G, editors. *Breast Cancer*. Rijeka: IntechOpen; 2011. p. Ch. 22.
197. Chen KT, Mardini S, Chuang DC, Lin CH, Cheng MH, Lin YT, et al. Timing of presentation of the first signs of vascular compromise dictates the salvage outcome of free flap transfers. *Plast Reconstr Surg*. 2007;120(1):187-95. doi: 10.1097/01.prs.0000264077.07779.50. PubMed PMID: 17572562.
198. Cusano A, Fernandes R. Technology in microvascular surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010;22(1):73-90. doi: 10.1016/j.coms.2009.11.001. PubMed PMID: 20159479.
199. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth*. 2014;58(5):515-23. doi: 10.4103/0019-5049.144643. PubMed PMID: 25535411; PubMed Central PMCID: PMC4260295.
200. Salgado CJ, Moran SL, Mardini S. Flap monitoring and patient management. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(6 Suppl):e295-e302. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181bcf07b. PubMed PMID: 19952698.
201. Harris JR, Seikaly H, Calhoun K, Daugherty E. Effect of diameter of microvascular interposition vein grafts on vessel patency and free flap survival in the rat model. *J Otolaryngol*. 1999;28(3):152-7. PubMed PMID: 10410347.
202. Crowell RM, Yasargil MG. Experimental microvascular autografting. Technical note. *J Neurosurg*. 1969;31(1):101-4. doi: 10.3171/jns.1969.31.1.0101. PubMed PMID: 4893895.
203. Zhang F, Oliva A, Kao SD, Newlin L, Buncke HJ. Microvascular vein grafts in the rat cutaneous free-flap model. *J Reconstr Microsurg*. 1994;10(4):229-33. doi: 10.1055/s-2007-1006589. PubMed PMID: 7965996.
204. Monsivais JJ. Microvascular grafts: effect of diameter discrepancy on patency rates. *Microsurgery*. 1990;11(4):285-7. doi: 10.1002/micr.1920110407. PubMed PMID: 2147733.

205. Zhang F, Oliva A, Kao SD, Newlin L, Buncke HJ. Microvascular vein-graft patency in the rat model. *J Reconstr Microsurg.* 1994;10(4):223-7. doi: 10.1055/s-2007-1006588. PubMed PMID: 7965995.
206. Ahn CY, Borud LJ, Shaw WW. Analysis of suturing techniques in the microvascular anastomosis of vessels of unequal diameter. *Ann Plast Surg.* 1994;32(5):469-73. doi: 10.1097/0000637-199405000-00005. PubMed PMID: 8060069.
207. Victor MF, Kimbiris D, Iskandrian AS, Mintz GS, Bemis CE, Procacci PM, Segal BL. Spasm of a saphenous vein bypass graft. A possible mechanism for occlusion of the venous graft. *Chest.* 1981;80(4):413-5. doi: 10.1378/chest.80.4.413. PubMed PMID: 6974087.
208. Shi X, Guan Y, Jiang S, Li T, Sun B, Cheng H. Renin-angiotensin system inhibitor attenuates oxidative stress induced human coronary artery endothelial cell dysfunction via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Arch Med Sci.* 2019;15(1):152-64. Epub 20180308. doi: 10.5114/aoms.2018.74026. PubMed PMID: 30697266; PubMed Central PMCID: PMC6348342.
209. Mariotti R, Bentivoglio M. Botulinum toxin induces nitric oxide synthase activity in motoneurons. *Neurosci Lett.* 1996;219(1):25-8. doi: 10.1016/s0304-3940(96)13167-0. PubMed PMID: 8961295.
210. Blain B, Zhang F, Jones M, Richards L, Fischer K, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC. Vascular grafts in the rat model: an anatomic study. *Microsurgery.* 2001;21(3):80-3. doi: 10.1002/micr.1014. PubMed PMID: 11372067.
211. Simsek T, Demir A, Engin MS, Yildiz L, Kelahmetoglu O, Bek Y, Bayrak IK. Comparison of oversized artery and vein grafts for interpositional pedicle lengthening in rat femoral artery. *J Reconstr Microsurg.* 2014;30(1):35-40. Epub 20130724. doi: 10.1055/s-0033-1351353. PubMed PMID: 23884881.
212. Arnold PB, Merritt W, Rodeheaver GT, Campbell CA, Morgan RF, Drake DB. Effects of perivascular Botulinum Toxin-A application on vascular smooth muscle and flap viability in the rat. *Ann Plast Surg.* 2009;62(5):463-7. doi: 10.1097/SAP.0b013e3181903252. PubMed PMID: 19387141.
213. Elmas C, Ayhan S, Tuncer S, Erdogan D, Calguner E, Basterzi Y, et al. Effect of fresh and stored botulinum toxin a on muscle and nerve ultrastructure: an electron microscopic study. *Ann Plast Surg.* 2007;59(3):316-22. doi: 10.1097/SAP.0b013e31802e0912. PubMed PMID: 17721223.

7. ÖZET

SIÇAN MODELİNDE BOTULİNUM-A TOKSİNİNİN DAMAR GREFTİ ANASTOMOZUNDA VAZOSPAZM VE TROMBÜS OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Çalışmamız, vasküler greftlerle oluşturulmuş bir anastomozda lokal BoNT-A'nın uygulamasının cerrahi sonrası 3 günlük erken dönemde vasküler etkilerini göstermek için, BoNT enjeksiyonları uygulanan arter ve ven greftleri ve bunların kontrol grupları olmak üzere toplamda 4 grup 28 rat ile gerçekleştirildi.

Anastomozların patensi, anastomozların kanlandığı dokuların perfüzyonu ve anastomozların spazmojenlere yanıtları hem makroskobik olarak hem de ICG anjiyografi ve Lazer Doppler akımölçer gibi görüntüleme yöntemleri kullanılarak değerlendirildi. BoNT-A'nın vasküler çapa etkisi ilk ve ikinci cerrahide yapılan damar çapı ölçümleriyle analiz edildi ve toksinin ilk cerrahi sonrası tromboze olmayan anastomozlardaki akım ölçümleri kaydedildi. Aynı zamanda anastomoz açıklıkları ve anastomozun kanlandığı ekstremitelerdeki kaslarının dejenerasyon bulguları histolojik olarak incelendi.

Çalışma sonucunda BoNT uygulanan hem arter hem de ven greftlerinde kontrol gruplarına kıyasla hem spontan gelişmiş, hem de stres testiyle oluşturulmuş trombüs oranlarının daha düşük olduğu görüldü ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Arter, ven ve damar grefti çaplarının BoNT uygulamasıyla arttığı; ancak en az vasküler çap artışının damar grefti segmentlerinde olduğu görüldü. ICG anjiyografi görüntülemelerinde spazm testine iskemik yanıtın BoNT uygulamasıyla azaldığı, BoNT uygulanan anastomozların 3 günlük süre içinde akımlarında artma ; stres yanıtında ise azalma eğiliminde olduğu görüldü. Genel histolojik dejenerasyon skorları gruplar arası anlamlı farklılık

göstermedi ve histolojik olarak tespit edilen tromboze anastomoz sayısı klinik olarak tespit edilen tromboze anastomoz sayısına benzerdi.

Hem arterlerde hem de venlerde damar çaplarında artışa neden olduğu bilinen perivasküler BoNT-A uygulamasının denerve dokular olan vasküler greftler üzerinde de olumlu etkilerini gösterebildiği ve vasküler greftlerin çaplarında artışa; spazmojenlere yanıtlarında azalmaya sebep olduğu için postoperatif dönemde trombüs görülme ihtimalinin en yüksek olduğu ilk 3 günde etkili olabileceği ve başta vasküler spazm olmak üzere vasküler komplikasyonların görülme sıklığını azaltarak mikrocerrahi operasyonların revizyon oranlarını düşürebileceği sonucuna varıldı.

Anahar kelimeler: Vasküler greft, vazospazm, Botulinum

8. SUMMARY

THE EFFECT OF BOTULINUM-A TOXIN ON VASOSPASM AND THROMBUS FORMATION IN VASCULAR GRAFT ANASTOMOSIS IN A RAT MODEL

Our study was conducted with 28 rats in 4 groups, including artery and vein grafts to which BoNT injections were applied and their control groups, to show the vascular effects of local BoNT-A application in an anastomosis formed with vascular grafts in the early 3-day postoperative period.

The patency of the anastomoses, the perfusion of the tissues supplied by the anastomoses and the response of the anastomoses to spasmogenes were evaluated both macroscopically and using imaging methods such as ICG angiography and Laser Doppler flowmetry. The effect of BoNT-A on the vascular diameter was analyzed by vessel diameter measurements performed in the first and second surgeries. It was investigated whether it had an effect on the flow in anastomoses that were not thrombosed after the first surgery. At the same time, anastomosis gaps and degeneration findings of extremity muscles supplied with blood by anastomosis were examined histologically.

As a result of the study, it was observed that both spontaneous and stress test-induced thrombus rates were lower in both artery and vein grafts applied with BoNT compared to control groups, but these rates were not found to be statistically different. It was observed that artery, vein and vein graft diameters increased with BoNT application; however, the least vascular diameter increase was in the vascular graft segments. In ICG angiography imaging, it was observed that ischemic response to spasm test decreased with BoNT application, and anastomoses applied with BoNT tended to increase their flow within 3 days and decrease in stress

response. General histological degeneration scores did not show significant difference between the groups, and the number of thrombosed anastomoses detected histologically was similar to the number of thrombosed anastomoses detected clinically.

It was concluded that perivascular BoNT-A application, which is known to cause an increase in vessel diameters in both arteries and veins, may also have positive effects on vascular grafts, which are denervated tissues, and may be effective in the first 3 days of the postoperative period, when the probability of thrombus is highest, since it causes an increase in the diameters of vascular grafts and a decrease in their response to spasmogens, and may reduce the revision rates of microsurgical operations by reducing the frequency of vascular complications, especially vascular spasm.

Key words: Vascular graft, vasospasm, Botulinum