



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KALP ve DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**LİPOTEİKOİK ASİT' İN ANJİYOGENEZİS
OLUŞTURMADAKİ ETKİNLİĞİ ve ARTERİYEL İSKEMİ
TEDAVİSİNDEKİ YERİ**

Dr.Özden Vezir

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Barlas N. AYTAÇOĞLU

MERSİN 2011



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KALP ve DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**LİPOTEİKOİK ASİT' İN ANJİYOGENEZİS
OLUŞTURMADAKİ ETKİNLİĞİ ve ARTERİYEL İSKEMİ
TEDAVİSİNDEKİ YERİ**

Dr.Özden Vezir

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Barlas N. AYTAÇOĞLU

**Bu tez BAP TF CTB (ÖV) 2010-3 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir**

MERSİN-2011

TEŐEKKÜR

Asistanlık süresi boyunca, bana büyük destek veren, başta değerli hocam Prof. Dr. Nehir SUCU olmak üzere, tezimin fikir babalığını yapan hocam Doç. Dr. Murat ÖZEREN' e, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen tez hocam Doç. Dr. Barlas N. AYTAÇOĞLU' na, Yrd. Doç. Dr. M.Kerem KARACA' ya, beraber çalıştığım Op. Dr. Necmi KÖSE, Op. Dr. Özgür BAYRI ve tüm asistan arkadaşlarıma, tezin hazırlanmasında yardım eden Prof. Dr. Lülüfer TAMER' e, Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŐ' a, Dr. Mehmet Ali SUNGUR' a, Dr. Lokman AYZ' a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Özden VEZİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ ve AMAÇ	7
Periferik Arteriyel Hastalık	7
Koroner Arter Hastalığı	8
Kardiyovasküler Hastalıklarda Tedavi ve Çalışmanın Amacı	9
GENEL BİLGİLER	11
Anjiyogenezis	11
Lipoteikoik Asit	14
VEGF	14
Anjiopöietin-1	16
Endostatin	16
Anjiostatin	17
GEREÇ ve YÖNTEM	18
Çalışma Protokolü	18
Biyokimyasal Parametreler ve Değerlendirme	19
Işık Mikroskopik Doku Takibi ve İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü	19
Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü	20
İstatistiksel Analiz	21
BULGULAR	22
Işık Mikroskobu Değerlendirilmesi	22
Elektron Mikroskopik Değerlendirme	25
TARTIŞMA ve SONUÇ	36
KAYNAKLAR	41
SİMGELER ve KISALTMALAR	48
ŞEKİLLER ve RESİMLER	49
TABLolar	50

ÖZET

Periferik arteriyel hastalık ve koroner arter hastalığı, dünyadaki mortalite ve morbiditenin en sık sebepleri arasında yer almaktadır.

Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde, baypas ve endarterektomi gibi cerrahi girişimler, ilaçlar, perkütan vasküler girişimler ve egzersiz uygulamalarını içeren metotlar uygulanmaktadır. Yeterli derecede revaskülarizasyon sağlanamayan hastalarda ise terapotik anjiyogenezis çalışmaları önemli bir seçenek olarak devam etmektedir.

Çalışmamızda, terapotik anjiyogenezis oluşturmak amacıyla, arka bacaklarında kronik arteriyel iskemi oluşturulan ratlara, intramusküler lipoteikoik asit (LTA) enjeksiyonu yapılarak anjiyogenezis sürecini değerlendirdik. Herbirinde onar rat bulunan toplam dört grup oluşturuldu. Sham grubuna sadece iskemi modeli oluşturuldu, SF (serum fizyolojik) grubuna iskemi oluşturulduktan sonra SF enjeksiyonu yapıldı, LTA grubuna iskemi oluşturulmasını takiben intramusküler LTA enjekte edildi, kontrol grubuna ise iskemi modeli oluşturulmadı ve herhangi bir işlem uygulanmadı. Ratlar otuz gün boyunca takip edildikten sonra sakrifiye edilerek gastroknemius kasından doku örnekleri alındı, ayrıca 5cc kan alınarak biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapıldı. Toplanan kan örneklerinde proanjiyogenik faktörlerden VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü) ve Anjiopietin-1 (Ang-1); anti-anjiyogenik faktörlerden endostatin ve anjiostatinin serumdaki düzeyleri ölçüldü. Alınan kas dokusu örnekleri ışık ve elektron mikroskopisi ile değerlendirildi.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda, LTA grubunda diğer gruplara göre Ang-1 düzeyi, yeni oluşan kapillerite sayısı, endostatin ve anjiostatin bakımından anlamlı derecede artış tespit edildi ($p < 0,05$). VEGF' nin de LTA grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında arttığı, fakat aradaki farkın anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0,05$).

Bulgularımız, kronik iskemi modelinde LTA' nın anjiyogenezisi etkin bir biçimde sağladığını, aynı zamanda proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik sitokinlerin her ikisinde birden artışa yol açarak anjiyogenezisin kontrollü bir süreçte geliştiğini telkin etmektedir, ancak, farklı LTA dozları ile yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Anjiyogenezis, kronik iskemi, lipoteikoik asit.

ABSTRACT

The Effectiveness of Lipoteichoic Acid In The Formation of Angiogenesis and Its Importance In The Treatment Of Arterial Ischemia

Peripheral arterial diseases and coronary arterial diseases constitute the most common reasons in terms of morbidity and mortality all over the world.

Surgical methods like bypass and endarterectomies and other methods that consist of medical therapies, percutaneous vascular interventions and specific exercises take part in the treatment of cardiovascular diseases. Studies in medical angiogenesis constitute an important method of therapy in patients in whom adequate revascularization fails to be established.

In our study we investigated and evaluated the angiogenesis process in rats in which ischemia was formed in the hind limbs and lipoteichoic acid (LTA) was injected intramuscularly in an effort to induce angiogenesis. Four rat groups were formed with 10 rats in each. The sham group contained rats with ischemia model only, the SF (saline) group contained rats with ischemia and injection of SF intramuscularly and the LTA group contained rats with ischemia and the injection of LTA intramuscularly. The control group rats had no ischemia formed and no injection. After following the rats for a 30 day period they were sacrificed and tissue specimens from their gastrocnemial muscles for histopathological analysis and blood samples of 5 cc. for biochemical analysis were retrieved. Vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin1 (Ang-1), endostatin and angiostatin as the proangiogenic and antiangiogenic cytokines were studied from the blood samples. The muscular specimens were evaluated under the light and with electron microscopes.

Ang -1 levels, number of newly developed capillaries, endostatin and angiostatin levels were found to be significantly higher ($p < 0,05$) in the LTA group. VEGF was also found to be higher in the LTA group when compared with the others but this difference did not reach to a statistical significance ($p > 0,05$).

Our results suggest that LTA helps in the development of angiogenesis effectively and also provides a controlled angiogenesis by stimulating both the proangiogenic and antiangiogenic cytokines simultaneously. New studies with different LTA doses may add more to the results of this study.

Key Words: Angiogenesis, chronic ischemia, lipoteichoic acid.

GİRİŞ ve AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar, dünya çapında mortalite ve morbiditenin majör nedeni olma yolunda gittikçe artan bir rol üstlenmektedir. Çalışmalar, tüm dünyada kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranının 1990 ve 2020 yılları arasında, %28,9' dan %36,3' e yükseleceğini göstermektedir ¹.

Periferik Arteriyel Hastalık

Periferik arteriyel hastalığa (PAH) sahip olan hastalar yürüdükleri zaman çalışan iskelet kas grubuna yetersiz oksijen dağılımı nedeniyle ağrı duyarlar; kladikasyo intermittans (Kİ). Bu semptomlar mevcut arteriyel kollateral yapının yeniden yapılanması (arteriyogenezis) veya kapilleritenin artmasıyla (anjyogenezis) azaltılabilir. Periferik arteriyel hastalıklarda ve gecikmiş yara iyileşmesinde anjyogenezisin yetersizliği söz konusudur.

Yeni girişimsel olmayan tekniklerle, belirti olmayan birçok kişinin PAH olduğu tespit edilebilir ².

PAH prevalansı %3-10 arasında değişirken 70 yaş üzerinde %15-20' ye çıkmaktadır ^{3,4}.

Kİ görülme sıklığı 40 yaş grubunda %3 civarında iken, 60 yaş grubunda %6' ya çıkmaktadır. Genç yaşlarda Kİ erkeklerde daha sık görülürken, erkek/kadın arasındaki bu farklılık yaş ilerledikçe ortadan kalkmaktadır.

PAH, ilerleyici bir tablo olmakla beraber klinik seyri şaşırtıcı şekilde stabil olabilir. Bu semptomatik stabilizasyon, gelişen kollaterallere, iskemik kasın metabolik adaptasyonuna, non-iskemik kas gruplarının devreye girmesine bağlıdır ⁵.

Kİ ilerleyerek, yürüme mesafesinin kısalmasına ve neticede kritik bacak iskemisine neden olmaktadır.

Kritik bacak iskemisi (KBİ), PAH' ın bir bulgusudur ve tipik istirahat ağrısı veya iskemik ülser ve/veya gangreni olan hastaları tanımlamaktadır. KBİ terimi kronik bir süreci belirtir ve akut bacak iskemisinden ayırt edilmelidir. Kritik iskemi tablosu hem ekstremitte için, hem de sistemik olarak kötüleşme işaretidir ve bu hastalarda ekstremitte kaybı riski %25' in üzerindedir. Daha da önemlisi 5 yıllık ölüm oranları %50' nin üzerindedir ⁶.

Hastaneye başvuru sırasında KBİ tanısı konulan hastaların %25' ine sadece medikal tedavi, %25' ine primer amputasyon, %50' sine ise revaskülarizasyon yapılmaktadır. Bir yıl sonra bu hastaların %20' sinde KBİ' nin

devam ettiği, %25' inde KBI' nin gerilediği, %30' unun ampute edilmiş olarak yaşamaya devam ettiği ve %25' inin de hayatını yitirdiği saptanmıştır ⁵.

Koroner Arter Hastalığı (KAH)

KAH; tek başına, dünyadaki mortalite ve morbiditenin majör nedenidir. Koroner arterlerin aterosklerozuna bağlı olarak gelişen koroner arteriyel kan akımındaki azalma iskemi gelişimine neden olur. İskemi ise; angina pektoris, miyokard infarktüsü, kronik iskemik kalp hastalığı ve bu üç durumdan birinin sonucu olabilecek ani kardiyak lme sebep olur. Bu hastalıkların, uzun yıllar süren sinsi bir prodrom safhası vardır ^{7, 8}.

KAH, Amerika Birleşik Devletleri' ndeki (ABD) kadın ve erkeklerin her ikisinde de tek başına en büyük mortalite (%36,4) nedenidir ^{1, 9, 10}. 2000 yılı itibariyle KAH yks bulunan 13-14 milyon Amerikalı yetişkinin, yıl sonunda 1,1 milyon akut koroner olaya maruz kalması beklenmiştir. ABD' de 2004 yılı itibariyle, 25 milyondan fazla insan aterosklerozisin klinik sonuşlarından en az birine sahiptir ve çok daha fazlasında da aterosklerozis, ciddi kardiyovasküler olayların habercisi olarak gizli kalmaktadır ¹¹. ABD' de 1999 yılında koroner arter hastalığı ve fel olayları için sağlık harcamalarının maliyeti yaklaşık olarak 150 milyon doları bulmuştur ¹². Türk Kardiyoloji Derneği'nin öncülüğünde yapılan TEKHARF (Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri) alışmasının 12 yıllık izlem verilerine göre, Türkiye' de 2 milyon koroner kalp hastasının bulunduğu ve yaklaşık 160 bin yurttaşımızın koroner kalp hastalığından ldğu tahmin edilmektedir. lke genelinde yılda yaklaşık 260 bin civarında koroner olay meydana gelmekte, bunların derhal fatal seyreden 85 bini çıkarılınca, 175 bin nonfatal koroner olaylı hasta tedaviye aday kalmaktadır. Bunların da dahil olduğu 2 milyon koroner hastadan yaklaşık 75-80 bin' i ilaveten hayatını kaybetmektedir. Böylece toplam koroner kalp hastası halen yılda 90-100 bin kadar artmaktadır. TEKHARF alışması, erişkinlerimizde yıllık koroner kalp hastalığı mortalitesini erkeklerde binde 5,2; kadınlarda ise binde 3,2 olarak bulmuştur. Avrupa lkelerinde koroner kalp hastalığından yıllık mortalitenin 45-74 yaş kesiminde erkeklerde binde 2 ile 9, kadınlarda binde 0,6 ile 3 arasında değiştiği bildirilmiştir. Halbuki TEKHARF alışması, ülkemizde aynı yaş kesiminde koroner kalp hastalığı mortalitesini erkeklerimizde binde 8,5; kadınlarıımızda binde 4,5 olarak belirlemiştir. Koroner mortalite açısından erkeklerde Letonya ve Estonya' dan sonra üçüncü sırada, kadınlarda ise birinci

sırada yer almaktayız ¹³. Nüfusumuz gelişmekte olan ülkelerdeki gibi genç yapıda iken, halkımızda koroner hastalık mortalitesinin, yaşlı nüfus yapısına sahip gelişmiş toplumlardaki kadar yüksek olması, hem günümüz, hem gelecek için kaygı vericidir.

Kardiyovasküler Hastalıklarda Tedavi ve Çalışmanın Amacı

Bilindiği üzere kardiyovasküler hastalıklarda temel problem arteriyel akımın yavaşlaması veya tamamen ortadan kalkmasıyla meydana gelen iskeminin hedef organ veya dokularda yarattığı hasarlanmadır.

KAH' da meydana gelen kronik iskeminin tedavisinde temel hedefler, semptomları azaltmak, yaşamı uzatmak, miyokard hasarını azaltmak ve tekrarını önlemektir. Bu amaçla genellikle anti-iskemik ilaçlar, anti-platelet ajanlar, anti-koagülanlar ve gerektiğinde perkütan koroner girişim ve stent uygulaması veya koroner arter baypas cerrahisi ile gerçekleştirilir ¹⁴.

Benzer şekilde PAH tedavisinde de amaç hastanın semptomlarının düzeltilmesinin yanında hastalığın ilerlemesinin engellenmesi, gerek lokal, gerekse sistemik komplikasyonların azaltılması olmalıdır. Bu amacı gerçekleştirecek olan en iyi tedavi, temel olarak risk faktörlerinin azaltılmasını içerir. Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, egzersiz özellikle Kİ bulunan periferik arter hastalarında yürüme mesafesinde önemli düzelmeye sağlamaktadır. Hastalarda düzelen kalp-akciğer rezervinin de etkisi ile yürüme mesafesinde ortalama %150 oranında düzelmeye sağlanır ¹⁵. En başarılı sonuçlar bir fizyoterapist nezaretinde uygulanan egzersizlerden elde edilmekle beraber, haftada üç gün birer saatlik tempolu yürüme tavsiyesi de belirgin bir etki sağlayabilmektedir ¹⁶.

Arteriyel iskemide, mevcut kollateral damar yapısının artırılması tedavi seçeneklerinden biridir. Genetik ve doku mühendisliğindeki ilerlemeler sonucunda mevcut tedavi yöntemleriyle hastalığın ilerleyişinin durdurulamadığı hasta gruplarında anjiyogenezisi sağlamaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmalarla anjiyogenik faktörleri kodlayan genlerin veya anjiyogenik büyüme proteinlerinin (vasküler endotel büyüme faktörü - VEGF, fibroblast büyüme faktörü - FGF gibi) hedef organa ulaştırılmaları ile yeni damarların gelişmesinin sağlanması (anjiyogenezis) hedeflenmiştir. Literatürde "gen tedavisi" olarak adlandırılan bu tedavi protokolünde hedef, VEGF veya anjiyogenik proteinleri kodlayan genlerin avirülan virüslere (sitomegalovirüs,

Epstein-Barr virüs gibi) transfekte edildikten sonra iskemik hedef organa ulaştırılmasıdır.

Bunun dışında, kronik arteriyel iskemide anjiyogenezisi artırmak amacıyla son yıllarda kök hücrelerle ilgili çalışmalar yapılmış, embriyonel ve periferik kök hücreler anjiyogenezis oluşturmada kullanılmıştır¹⁷.

KAH ve PAH gibi kronik iskemik hastalıklarda, karmaşık bir patofizyolojik mekanizma yoluyla iskemik dokuda anjiyogenezis meydana gelmektedir. Anjiyogenezis sürecinde proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik sitokinlerin rol oynadığı bilinmektedir^{18, 19}.

Lipoteikoik asit (LTA) ise gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan bir maddedir ve sitokin sentezinin potent bir indükleyicisidir²⁰.

İskemik alanda anjiyogenezis sağlayarak yapılabilecek yeni bir tedavi gündeme getirmek amacıyla, çalışmamızda majör sitokin stimülanı olan LTA'nın, anjiyogenezis oluşturmadaki etkinliğini ve kronik iskemideki yerini araştırdık.

GENEL BİLGİLER

Anjiyogenezis

Anjiyogenezis yeni kapiller damar gelişimini ifade etmektedir. Biyolojik olarak, embriyonik gelişme, yara iyileşmesi ve organ hipertrofisi gibi fizyolojik olaylar döneminde görülmektedir. Anjiyogenezis, ekstraselüler matriks, çözülebilir (solubl) faktör ve hücreler arasındaki etkileşim sonucu; endotelial hücrelerin farklılaşması, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreder²¹.

Anjiyogenezis, oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstraselüler matriks (ECM) ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynarlar^{22, 23}. ECM; hücreler arasındaki boşlukları dolduran, hücreleri birbirine bağlayan ve destekleyen kompleks bir yapıdır. Besin ve madde alışverişini sağlayan hücre dışı ortam olarak da adlandırılabilir²⁴.

Endotel hücreleri, anjiyogenez süreci içinde rol oynayan ana hücrelerden biridir²⁵. Anjiyogenez sürecinde yer alan moleküller, tümör hücreleri, monosit, makrofaj, fibroblast, mast hücresi, trombosit gibi ortamdaki diğer hücrelerden kaynaklanır veya kollajen matriksin yıkımı sonrasında açığa çıkarlar²⁶. Henüz tüm anjiyogenik etkileşimlerin niteliği açıklığa kavuşmamıştır. En büyük olasılık, anjiyogenik uyarıcılar ile anjiyogenez inhibitörleri arasındaki dengenin, damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlıyor olmasıdır. Anjiyogenik uyarıların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalışı anjiyogenez başlatmaktadır^{18,19}. Temel anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler Tablo 1' de gösterilmektedir^{27, 28}.

Tablo 1: Proanjyogenik ve anti-anjyogenik faktörler.

Proanjyogenik faktörler	Antianjyogenik faktörler
VEGF	Endostatin, vazostatin
VEGF-B	Anjiostatin
VEGF-C	α ve γ -interferon
VEGF-D	Trombospondin (TSP)
FGF (Fibroblast büyüme faktörü)	Fibronektin
Anjiopietin-1	Trombosit faktör-4 fragment
TGF α ve TGF β	Epidermal büyüme faktörü fragmenti
Angiogenin	Doku metalloproteinaz inhibitörleri
TNF- α	Retinoik asit
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri)	Talidomid
HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1)	Anti-VEGF
Bradikinin ve trevleri	İL-1
İL-2	İL-12
İL-6	Toremifen sitrat
İL-8	NM-3
G-CSF (Granülosit koloni stimülan faktör)	TNP-470
GM-CSF (Granülosit-makrofaj stimülan faktör)	Kortikosteroidler
EGF (Epidermal büyüme faktörü)	Tip-1 kollajen peptidleri
IGF-1 (İnsülin benzeri büyüme faktörü-1)	Anjiostatin plazminojen fragmenti
Hepatosit büyüme faktörü	Prolaktin
Plasental büyüme faktörü	XVIII-kollajen fragmenti
Vitaxin α V β 3	β HPP
12-lipoksijenaz (12-LOX)	Anti-vitaxin, anti- α V β 3

Yeni damar oluşumu aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir:

Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkılması

Anjiyogenez süreci damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlar²⁹. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ECM bileşenlerinin yıkımına neden olur. ECM' nin enzimatik yıkılımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler³⁰. Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metaloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirir.

Endotel Hücrelerinde Göçme ve Çoğalma

Anjiyogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücrelerini aktive eder. Endotel hücreleri ekstraselüler matrikse göç eder ve çoğalır. Bu süreçte en etkili anjiyogenik faktör VEGF' dir³¹.

Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM' de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. ECM proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur³².

Anjiyogenezisin klinik kullanımı hem anti-anjiyogenik hem de proanjiyogenik şekilde olabilir. Günümüzde antianjiyogenik yöntemler daha çok kanser tedavisinde kullanılırken, proanjiyogenik metodlar kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yeni alternatifler olarak araştırılmaktadır^{33, 34}.

İnsanlar üzerinde yapılan ilk proanjiyogenik çalışmalarından bir tanesi Almanya' da fibroblast büyüme faktörü-1 (FGF-1) kullanılarak koroner arter hastalığı tedavisinde uygulanmış olup^{35, 36}, bu yöntemlerin koroner arter,

periferik damar hastalığı ve yaraların tedavisinde kullanılması halen araştırılmaktadır³⁷.

Lipoteikoik Asit (LTA)

LTA, gram pozitif bakterilerin hücre duvarında, duvara sıkıca tutunmuş olan ve açıl grubu içeren bir komponenttir. Bakterilerin hücreye yapışmasını, kolonizasyonunu ve invazyonunu kolaylaştırma fonksiyonuna sahip bir adezyon molekülüdür³⁸.

LTA, kompleks bir glikolipid grubunun eklendiği poligliserolfosfat yapıda amfibik bir moleküldür. LTA, sukrozun bulunduğu ortamda karyojenik bakteriler tarafından bol miktarda üretilir. LTA, streptokoklar gibi gram pozitif bakterilerin membranlarında hidrofobik güçler tarafından sıkı bir biçimde tutulmasına rağmen bakteriler düşük pH'lı ortamda yetiştirildiklerinde LTA'nın önemli bir bölümü bir çok inflamatuvar mediatörün ekspresyonunu indüklediği ECM'ye aktarılabilir³⁹.

LTA, CD14 ile etkileşime girerek, inflamatuvar sitokin üretimine neden olan NF- κ B aktivasyonunu indüklerken IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin makrofaj ve monositlerden salınmasına da neden olur^{40, 41}. Ayrıca LTA, TLR2 yoluyla da hücre aktivasyonunu artırmaktadır⁴².

LTA, vasküler düz kas hücrelerinden, indüklenebilir nitrik oksit sentaz salınımını, ayrıca insan pulmoner epitel hücrelerinde siklooksijenaz-2 üretimini artırır^{43, 44}.

Hücrel aktivite ve sitokin sentezinin potent indükleyicisi olan LTA, lökositleri aktive ederek inflamatuvar cevabın başlamasına neden olacak kapasiteye de sahiptir¹⁸.

Yüksek seviyede saflaştırılmış LTA, en az 10ng/ml LTA olacak şekilde hazırlanan dozda tüm kanda sitokin cevabını indüklemiş, S.aureus gibi LTA'nın da majör bir immünoestimulan komponenti temsil ettiği gösterilmiştir⁴⁵.

VEGF

VEGF, heparin bağlayan homodimerik glikoprotein yapısında, 45 kDa'lık bir molekül olup bilinen en potent proanjyogenik sitokindir ve anjyogenezis sürecinin normal ve patolojik dokularda gelişiminde önemli rol oynar⁴⁶.

VEGF ailesi ilk keşfedildiğinde, kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlattığı için Vasküler Permeabilite Faktörü olarak isimlendirilmişti⁴⁷. 1980lerin sonunda ise, bu aileden ilk özel anjyogenik büyüme faktörü ayrıştırıldı

ve buna vaskülotropin veya vasküler endotelial büyüme faktörü adı verildi. Daha sonraları da diğerleri bu aileye eklendi.

Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır⁴⁸. Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru, VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde oldukça yükselir. Yine VEGF yetişkinde akciğer alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir⁴⁹. Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF yapımına ait mesajcı ribonükleik asitlerin (mRNA) sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'nin demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda; aktive makrofajlarda, arteriyelleri çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir⁵⁰.

VEGF, özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir⁵¹. VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde, vaskülogenez ve anjiyogenez için önemli ve gereklidir⁵². Endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve farklılaşmasına sebep olur⁵³. VEGF, anjiyogenez sırasında dokular içine ilerleyen kapillerlerin penetrasyonunu sağlayan kollajenaz ve plazminojen aktivatörlerinin ekspresyonuna da yardımcı olur⁵⁴. Nitrik oksid (NO), anjiyogenezin VEGF bağımlı bir mediyatörüdür. Endotel hücre migrasyonunda rol alır. VEGF nitrik oksid sentaz enzimi uyararak NO salınımını artırmaktadır⁵⁵. Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar; embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardiyal iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve patofizyolojik olaylardır⁵⁶.

VEGF reseptörlerinin aktivasyonu ile fosfolipaz C, fosfoinozitol-3kinaz ve rasGTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinleri fosforile olur. Bu aktivasyon, anjiyogenezin ilk basamağında kan damarları

bazal membranının yıkılması için gerekli olan protezların üretimi, spesifik integrinlerin ekspresyonu ve sonunda hücre proliferasyon, migrasyon ve farklılaşması ile sonuçlanır⁵⁷.

Anjiopietin-1 (Ang-1)

Ang-1, 70 kDa ağırlığında, Tie-2 reseptörler için bağlanma noktasına sahip glikoprotein yapıda bir moleküldür. Ang-1' i kodlayan gende bozulma, gelişen fare embriyosunda ciddi vasküler anomalilere sebep olur ki bu da embriyonun 13. gününde ölümüne yol açar. Bu durum ise normal embriyonik damarlanmada Ang-1' in kritik rol oynadığını gösterir⁵⁸.

Anjiopietin, vasküler homeostaz ve anjiyogenezisin önemli modülatörü olan bir proteindir ve şu ana kadar 4 formu tanımlanmıştır fakat en çok Ang-1 ve 2' nin etkileri araştırılmıştır. Anjiopietinin Tie-1 ve Tie-2 olmak üzere, tirozin kinaz yapısında olan iki reseptörü vardır ve halen tartışmalı olsa da etkisini daha çok Tie-2 reseptörü üzerinden yaptığı düşünülmektedir. VEGF vasküler yapıların oluşumunun erken döneminde etkili olurken, Ang-1 vasküler yapıların geç dönem stabilizasyon ve yeniden yapılanması üzerinde etkilidir. VEGF' nin vasküler geçirgenlik üzerinde yaptığı artışın, Ang-1 tarafından engellendiği gösterilmiştir^{59, 60, 61, 62}. Anjiyogenezis üzerine etkilerinin yanı sıra Ang-1' in kök hücreleri üzerinde protektif etkisi olduğu düşünülmektedir⁶³. Bazı çalışmalarda Ang-1' in diyabetik retinopatiyi azalttığı gösterilmiştir⁶⁴. Hayvan çalışmalarında da anjiopietinin vasküler yapıların matürasyonu için gerekli olduğu gözlenmiştir⁶⁵. Ayrıca Ang-1, kardiyak allogreft aterosklerozunun oluşumuna karşı da koruyucudur⁶⁶.

Endostatin

Kollajen tip XVIII' in karboksi terminalinden elde edilen ve 20 kDa molekül ağırlığında bir bileşeni olan endostatin, ilk olarak O'Reilly ve arkadaşları tarafından fare hemanjiyoendotelyoma hücrelerinden izole edilmiştir. Endotelial hücrelerin çoğalmasını ve migrasyonunu önler⁶⁷.

Endostatin, Tip XVIII kollajenin trimerize olmuş C-terminalinin parçalanması ile oluşmaktadır. Bu parçalanmanın sistein proteinaz grubu enzimlerden katepsin L, serin proteinaz elastaz ve MMP' ler aracılığı ile olabileceği gösterilmiştir. MMP' ler dışında da diğer proteazlar endostatinin hem oluşumunda hem de stabilitesini sağlamada görev alırlar^{68, 69}. Endostatin; heparan sülfat, proteoglikan ve glikozaminoglikanlarla birlikte vasküler bazal

membranda lokalize olmaktadır ⁷⁰. Yapılan çalışmalarda endostatının anjiyogenezi baskıladığı gösterilmiştir ^{71, 72}. Endostatının 65 farklı tümör tipinde etkili olduğu ve insan genomunda patolojik anjiyogeneze sorumlu olanların %12' sini modifiye ettiği gösterilmiştir. Kanser tedavisinde FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan ilk antianjiyogenik moleküldür. Ayrıca ekstrasellüler matriksten köken aldığı anlaşılan ilk antianjiyogenik ajandır. Rekombinan endostatin ilk olarak E.Coli'de üretilmiştir ^{73, 74}.

Anjiostatin

Potansiyel tedavi edici antikanser ajan olarak anjiostatının keşfi, subkutan olarak implante edilmiş Lewis Lung (akciğer) karsinomasının (3LL) uzaklaştırılmasını takiben akciğer metastazlarının büyümesindeki artış ile sonuçlanan araştırmadan köken alır. Metastatik tümör büyümesinin primer tümör kitlesi tarafından engellenmesi bazı klinik çalışmalarda incelenmiştir. Göğüs ve kolon karsinomalı hastalarda bir kısım primer tümör kitlesinin cerrahi olarak çıkarılması uzak alanlardaki metastazların hızlı bir şekilde büyümesi ile sonuçlanabilir. Anjiostatin, dolaşımdaki bir anjiyogenezis inhibitörü olup 3LL tümörü taşıyan farelerin idrar ve serumunda Folkman Laboratuvarı tarafından keşfedilmiştir. Bu inhibitör, büyüyen primer tümör varlığında dolaşımda çoğalır ve primer tümörün uzaklaştırılmasından sonra dolaşımdan kaybolur. Bu yüzden primer Lewis akciğer karsinomasının kesilip alınması dolaşan anjiostatının azalması ile sonuçlanır ve bu da anjiyogenezis ve akciğerdeki mikrometastazların büyümesini hızlandırır ^{75, 76, 77, 78}. İn vivo olarak anjiostatin, metastazların anjiyogeneze bağımlı büyümesi kadar deneysel primer tümör büyümesini de engeller ⁷⁹. Kemirgen anjiostatini ile uyumluluk sergileyen ve in vitro olarak insan plazminojenin elastaz proteolizi ile üretilen proteolitik parçalar endotel hücreleri üzerinde inhibitör aktiviteye sahiptir. Başlangıç çalışmalarında elde edilen insan anjiostatini 40, 42 ve 45 kDa olarak 3 moleküler ağırlık içerir ve her üç molekül de endotel hücre çoğalmasını benzer şekilde inhibe eder ⁸⁰. Anjiostatin 3LL tümör büyümesi ile ilişkili olarak in vivo tarzda keşfedilmesine rağmen, tümör hücrelerinin direkt olarak anjiostatini üretmeleri mümkün değildir. Çünkü tümör hücreleri anjiostatin ve plazminojen üretimi için gerekli olan mRNA sentezinden yoksundur. Anjiostatin in vitro olarak plazminojenin sınırlı elastaz sindirimi sayesinde üretilebilir ⁸¹.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, T. C. Mersin Üniversitesi Etik Kurul Başkanlığı' nın, 24.02.2010 tarihli, 2010/14 sayılı kararı ile etik kurul onayı almıştır.

Çalışma Protokolü

Ortalama 250g ağırlığında, onar rattan oluşan dört grup oluşturuldu. Grup-A Kontrol grubu, Grup-B İskemi grubu, Grup-C SF (serum fizyolojik) grubu, Grup-D LTA grubu olarak adlandırıldı.

Grup A (Kontrol grubu): On rattan oluşan bu gruptaki ratlar anestezi (Ketamine 75mg/kg, Xylazine 10mg/kg i.p.) verilip uyutulduktan sonra ekssanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi. Biyokimyasal parametreler için intrakardiyak 5cc kan alındı, her iki gastroknemius kasından histopatolojik incelemeler için doku örneği alındı, işlem sonrası ratlar hayvan laboratuvarı yetkilisi tarafından usulüne uygun olarak imha edildi.

Grup B (Sham grubu): On rattan oluşan bu gruptaki ratlar anestezi (Ketamine 75mg/kg, Xylazine 10mg/kg i.p.) verilip uyutulduktan sonra, alt ekstremitte uyluk iç yüzleri Betadin ile temizlenerek, sol ve sağ femoral arter bölgelerinde inguinal seviyede her iki femoral arter 3/0 ipek ile ligate edilerek bağlanmak suretiyle iskemi oluşması sağlandı. Ratların işlem sonrası analjezisi için Flunixin 2,5mg/kg 1x1 sc/im başlandı. Ratlar otuz gün takip edildi, bu süre zarfında vital bulgular kontrol edildi. Otuz gün sonra ratların anestezi (Ketamine 75mg/kg, Xylazine 10mg/kg i.p.) takiben ekssanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi, biyokimyasal parametreler için intrakardiyak 5cc kan alındı, her iki gastroknemius kasından histopatolojik incelemeler için doku örneği alındı, işlem sonrası ratlar hayvan laboratuvarı yetkilisi tarafından usulüne uygun imha edildi.

Grup C (SF grubu): On rattan oluşan bu gruptaki ratlar anestezi (Ketamine 75mg/kg, Xylazine 10mg/kg i.p.) verilip uyutulduktan sonra alt ekstremitte uyluk iç yüzleri Betadin ile temizlenerek sol ve sağ femoral arter bölgelerinde inguinal seviyede her iki femoral arter 3/0 ipek ile ligate edilerek bağlandı ve iskemi oluşması sağlandı. İskemi oluşturulduktan 24 saat sonra, 1ml steril %0.9 NaCl, aseptik koşullarda, ratların seçilen bölgesine (M.gastroknemius) dört noktadan olacak şekilde enjekte edildi. Ratların işlem sonrası analjezisi için Flunixin 2,5mg/kg 1x1 sc/im başlandı. Ratlar otuz gün takip edildi, bu süre zarfında vital bulgular kontrol edildi. Otuz gün sonra ratların

anestezisini (Ketamine 75mg/kg, Xylazine 10mg/kg i.p.) takiben ekssanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi, biyokimyasal parametreler için intrakardiyak 5cc kan alındı, her iki gastroknemius kasından histopatolojik incelemeler için doku örneği alındı, işlem sonrası ratlar hayvan laboratuvarı yetkilisi tarafından usulüne uygun imha edildi.

Grup D (LTA grubu): On rattan oluşan bu gruptaki ratlar anestezi (Ketamine 75mg/kg, Xylazine 10mg/kg i.p.) verilip uyutulduktan sonra alt ekstremite uyluk iç yüzleri Betadin ile temizlenerek sol ve sağ femoral arter bölgelerinde inguinal seviyede her iki femoral arter 3/0 ipek ile ligate edilerek bağlandı ve iskemi oluşması sağlandı. İskemi oluşturulduktan 24 saat sonra, Staphylococcus aureus' tan elde edilen LTA (liyofilize ampül olarak, Sigma Chemical St. Louis. MO), steril %0.9 NaCl içinde sulandırılarak 1 mg/kg dozunda toplam 1ml olacak şekilde, aseptik koşullarda ratların seçilen bölgesine (M.gastroknemius), dört noktadan enjekte edildi. Ratların işlem sonrası analjezisi için Flunixin 2,5mg/kg 1x1 sc/im başlandı. Ratlar otuz gün takip edildi, bu süre zarfında vital bulgular kontrol edildi. Otuz gün sonra ratların anestezisini (Ketamine 75mg/kg, Xylazine 10mg/kg i.p.) takiben ekssanguinasyon yöntemiyle sakrifiye edildi, biyokimyasal parametreler için intrakardiyak 5cc kan alındı, her iki gastroknemius kasından histopatolojik incelemeler için doku örneği alındı, işlem sonrası ratlar hayvan laboratuvarı yetkilisi tarafından usulüne uygun imha edildi.

Biyokimyasal Parametreler ve Değerlendirme

Ratlardan alınan 5cc kan tüp içerisine konuldu, 10.000 devir/dk' da 5 dakika santrifüje edilerek toplanan serumda ELISA test yöntemiyle VEGF (RayBio® Rat VEGF ELISA Kit, Norcross, USA), Ang-1 (ELISA Kit for Rat Angiopoietin-1, Uscn Life Science Inc. Wuhanve, USA), endostatin (ELISA Kit for Rat Endostatin, Uscn Life Science Inc. Wuhanve, USA), anjiostatin (ELISA Kit for Rat Angiostatin, Uscn Life Science Inc. Wuhanve, USA) değerleri hesaplandı (Tablo 6). Serum VEGF düzeyi: LTA' nın VEGF' yi uyarması ile anjiyogenezis yaptığını göstermek için kullanıldı. Ang-1 serum düzeyi: LTA' nın Ang-1 salınımını uyarması ile anjiyogenezis yaptığını göstermek için kullanıldı. Serum anjiostatin ve endostatin düzeyi: LTA' nın majör sitokin stimülatörü olması nedeniyle anjiyogenezisi önleyen faktörlerden anjiostatin ve endostatin üzerine nasıl bir etkisi olduğunu göstermek amacıyla kullanıldı.

Işık Mikroskopik Doku Takibi ve İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü

Dokular 24 saat %10 tamponlanmış nötral formalinde fikse edildikten sonra akar suda yıkandı. Daha sonra artan derecede alkollerden (%80, %90 ve %96) geçirilerek dehidrate edildi, ksilol ile şeffaflandırıldı ve parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler adeziv poli-L-lizin kaplı lamlara alındı. Kesitler deparafinize edilip rehidrate edildikten sonra distile su ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için metanolde %3' lük hazırlanmış hidrojen peroksitte 10 dakika bekletildi. Nonspesifik antikor bağlanmasını yok etmek için oda ısısında blok solüsyonu (Novocastra[®], RE7104) ile 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra kesitlerin üzerine %5 sığır serum albümin solüsyonunu içeren PBS' de (Phosphate buffered saline) hazırlanmış 1/100 dilüsyondaki tavşan poliklonal IgG Von Willebrand Factor primer antikoru (Abcam[®], ab-6994) damlatıldı ve +4 °C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün önce biotin ile bağlanmış sekonder antikor solüsyonunda (Sensi Tek[®], ABF125) 10 dakika, ardından Streptavidin-peroksidaz solüsyonu (Novocastra[®], RE7102) ile 20 dakika inkübe edildi ve PBS ile yıkandı. Son aşama olarak peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 1 dakika beklendi. Kesitler distile suda 5 dakika yıkandıktan sonra hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için ayrılan kesitlere primer antikor içermeyen %0,5 PBS-BSA (Phosphate buffered saline-Bovine serum albumin) damlatıldı. İncelemeler, Olympus BX50 marka ışık mikroskobu ile yapıldı ve Nikon Coolpix 5000 dijital kamera ile resimleri çekildi.

İmmunohistokimyasal değerlendirme için; tüm gruplarda her bir kesitte X400 büyütmede 10 farklı alanda, Von Willebrand Factor ile immun işaretlenmiş endotele sahip kapillerler sayıldı.

Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Dokular, fosfatlı tuz tamponu ile hazırlanmış %2,5' luk gluteraldehit solüsyonu ile 4–6 saat tespit edildi. Fosfatlı tuz tamponu ile yıkanan dokular, daha sonra %1' lik osmium tetraoksit ile 1 saat süreyle +4°C' de ikinci kez fikse edildi ve artan derecede alkollerden (%50, %60, %70, %80, %90, %96) geçirildi. Propilen oksit ile şeffaflandırıldıktan sonra araldite gömüldü. Bloklardan, Leica UCT ultramikrotom ile alınan 70nm' lik kesitler, uranil asetat

ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Tüm incelemeler, JEOL JEM 1011 marka elektron mikroskobu ile yapıldı ve ITEM dijital görüntüleme programı ile fotoğraflandı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, anjiostatin, endostatin, VEGF, Ang-1 ve damar sayısı bakımından grupların karşılaştırılması için Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) testi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren grupların belirlenmesi amacıyla ise Tukey HSD post hoc test istatistiğinden yararlanılmıştır. Veriler ortalama \pm standart sapma cinsinden tablo halinde özetlenmiştir. İstatistik analizlerde $p < 0,05$ ise, sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. İstatistik analizler SPSS v.11.5 ve MedCalc v.11.3 paket programları ile yapılmıştır.

BULGULAR

Işık Mikroskobu Değerlendirilmesi

Her bir rattan alınan bir örnekte X40 büyütmede on farklı alanda kapillerler sayıldı (Tablo 2, 3, 4, 5) (Resim 1, 2, 3, 4).

Tablo 2: A Grubundaki kapillerite sayıları.

Rat sayısı	İncelenen bölgelerdeki kapiller sayısı									
	1	10	12	11	13	9	7	10	8	9
2	7	6	6	8	7	4	5	9	8	10
3	9	7	12	9	8	11	6	9	8	5
4	15	18	6	9	9	7	4	10	8	9
5	8	8	3	11	9	10	11	8	12	10
6	6	9	10	3	9	8	13	4	6	5
7	6	6	9	8	13	12	3	9	12	8
8	14	12	13	11	8	15	9	8	10	10
9	12	14	8	4	4	4	8	11	9	13
10	15	18	9	9	12	5	6	12	14	14
Ortalama: 10 Standart sapma: 1,44										

Tablo 3: B Grubundaki kapillerite sayıları.

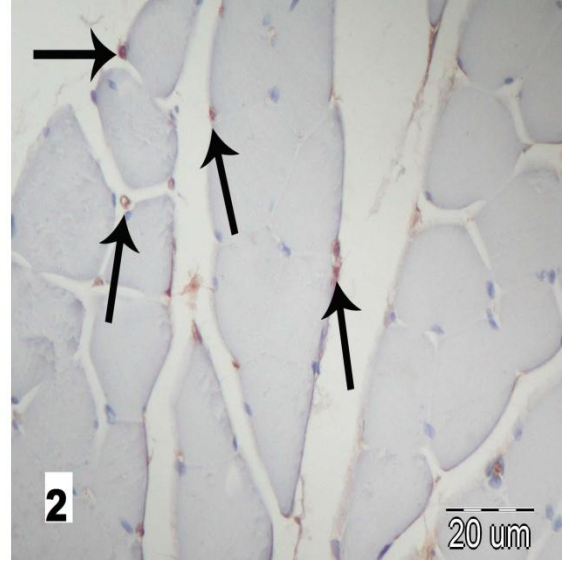
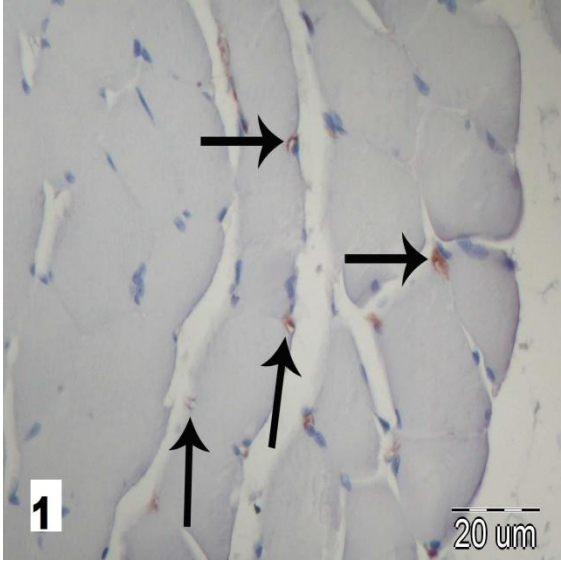
Rat sayısı	İncelenen bölgelerdeki kapiller sayısı									
1	11	7	18	8	21	9	12	17	9	21
2	17	13	10	12	5	7	7	12	12	11
3	9	12	5	5	4	10	8	4	5	8
4	10	12	13	9	8	14	17	6	8	8
5	11	9	9	12	8	7	12	15	7	9
6	12	8	10	12	8	12	15	8	10	8
7	11	6	9	9	4	10	8	8	13	11
8	22	18	19	20	14	13	21	14	9	20
9	27	21	15	17	16	14	33	31	15	16
10	32	25	19	37	22	30	30	27	21	18
Ortalama: 13,41 Standart sapma: 6,00										

Tablo 4: C Grubundaki kapillerite sayıları.

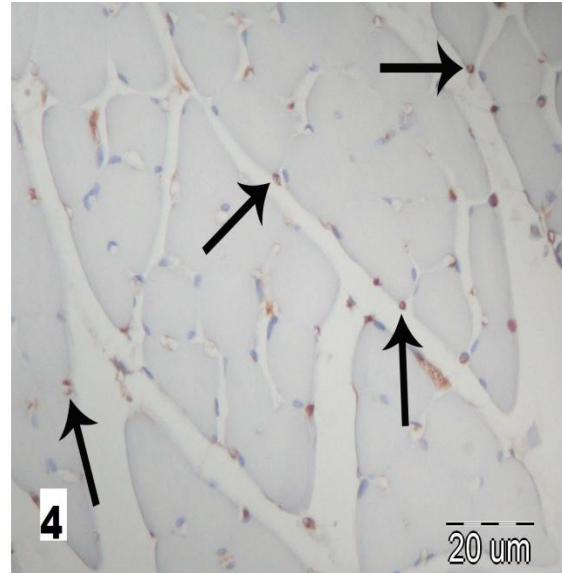
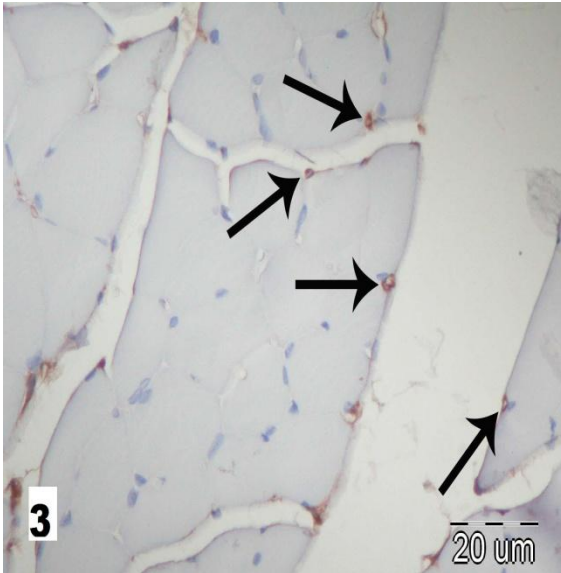
Rat sayısı	İncelenen bölgelerdeki kapiller sayısı									
1	9	17	12	10	17	12	9	4	11	13
2	19	18	18	22	17	15	11	25	19	20
3	9	13	13	6	12	9	11	12	7	14
4	18	17	13	15	21	18	9	8	23	11
5	10	7	6	12	17	10	9	18	11	10
6	7	10	9	13	11	5	5	12	6	6
7	25	17	20	22	22	13	28	15	18	16
8	10	8	9	8	8	10	15	18	9	11
9	18	17	18	21	23	15	14	10	12	14
10	13	18	12	17	19	22	24	16	21	17
Ortalama: 13,94 Standart sapma: 3,98										

Tablo 5: D Grubundaki kapillerite sayıları.

Rat sayısı	İncelenen bölgelerdeki kapiller sayısı									
1	18	13	23	21	15	20	19	21	14	23
2	15	17	18	30	17	25	20	23	19	17
3	37	12	32	28	17	21	15	13	18	18
4	25	33	31	25	22	18	13	17	20	10
5	13	11	16	15	9	11	18	18	15	17
6	9	11	8	12	13	10	15	17	20	8
7	35	22	21	28	17	15	21	20	10	13
8	29	21	27	18	20	17	30	28	11	14
9	34	28	25	30	33	17	19	21	17	25
10	17	15	21	16	18	20	20	15	13	16
Ortalama: 19,16 Standart sapma: 3,72										



Resim 1 ve 2: Sırasıyla A grubunda ve B grubunda Von Willebrand Faktör ile immun işaretlenmiş endotele sahip kapillerler (oklar, indirekt immunoperoksidaz X1200).



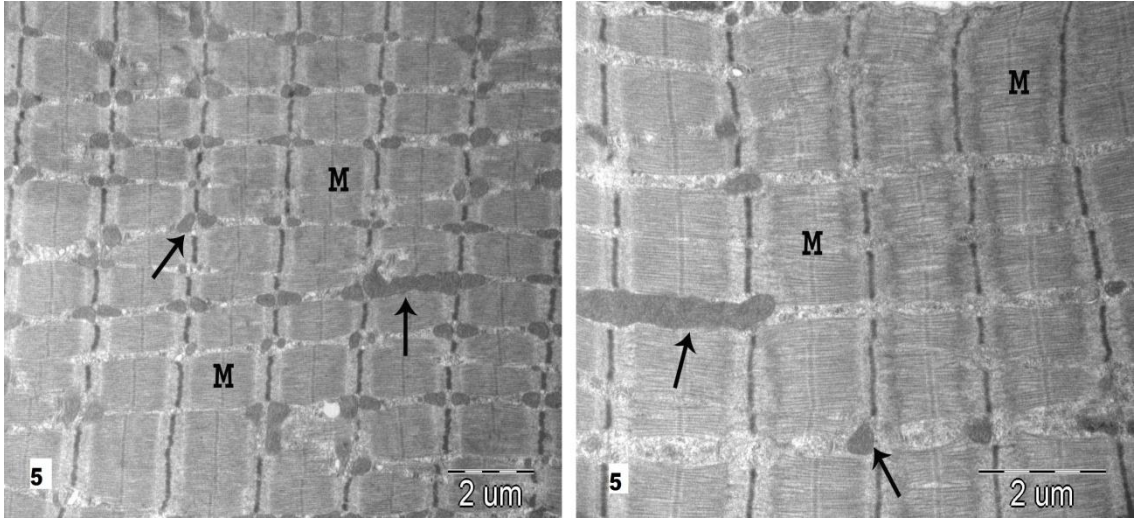
Resim 3 ve 4: Sırasıyla C grubunda ve D grubunda Von Willebrand Faktör ile immun işaretlenmiş endotele sahip kapillerler (oklar, indirekt immunoperoksidaz X1200).

Elektron Mikroskopik Değerlendirme

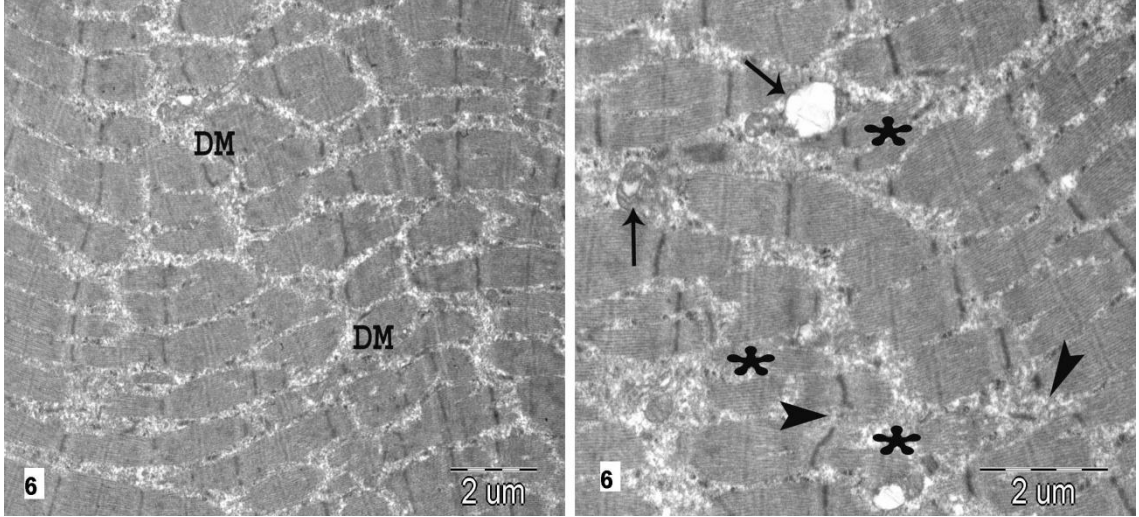
Grup A: Normal morfolojik özelliklere sahip kas hücreleri izlendi. Hücrelerdeki organeller, myofibrillerin yapısı ve düzenlenişi normal görünümdeydi (Resim 5).

Grup B ve Grup C: Her iki grubun bulguları benzerdi. Hücrelerdeki myofibrillerin düzenlenişinde bozulmalar, bazı myofibrillerde yer yer incelme ve harabiyet saptandı. Miyofibrillerde bazı bölgelerde Z bandlarında kayıp ve düzensizlikler gözlemlendi. Miyofibriller arasındaki mitokondriyonlarda şişme ve krista kayıpları gibi dejenerasyon bulguları görüldü (Resim 6,7).

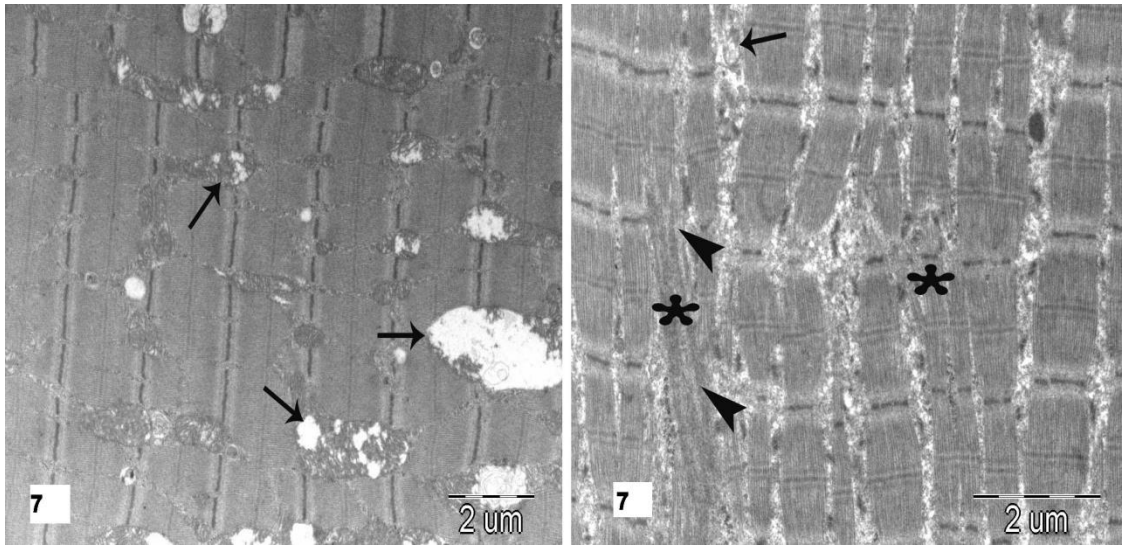
Grup D: Bu gruptaki bulgular kontrol grubundakilerle benzerlik göstermekteydi. Kas hücrelerindeki myofibrillerin düzenlenişi ve yapısı normal görünümdeydi. Pleomorfik görünümdeki mitokondriyonlar normal yapıdaydı (Resim 8).



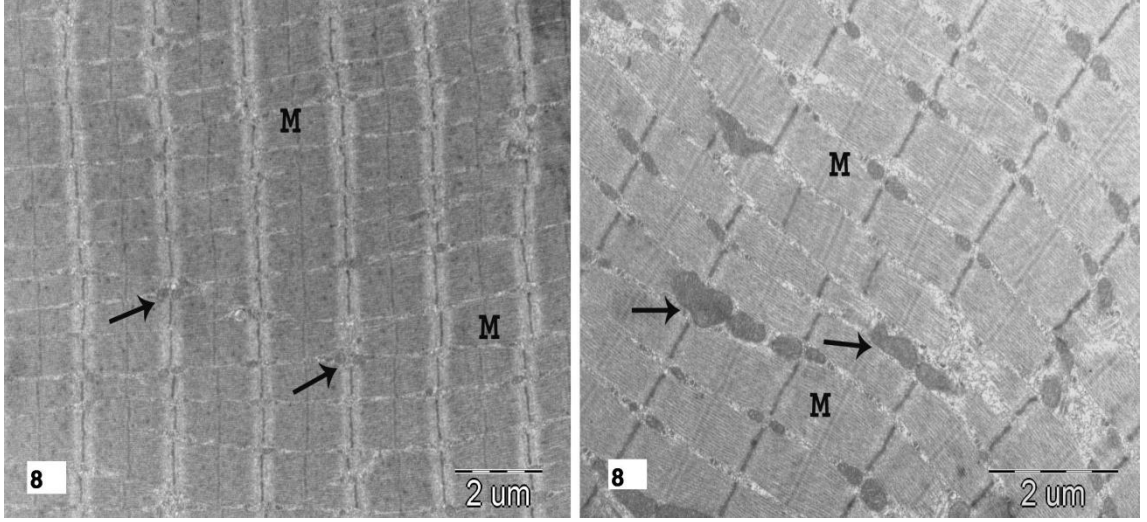
Resim 5: A grubunda normal kas yapısının elektron mikroskopik görünümü. Normal yapıda miyofibriller (M) ve mitokondriyonlar (oklar), (X10000).



Resim 6: B grubunda yer yer dejenere olmuş miyofibriller (DM), (X10000). Dejenere mitokondriyonlar (oklar), yer yer incelmış ve hasarlanmış miyofibriller (asteriskler), Z bandlarında kopma ve düzensizlik (ok başları), (X15000).



Resim 7: C grubunda miyofibriller arasındaki mitokondriyonlarda şişme ve krista kaybı (oklar), (X10000). miyofibrillerde düzensizlik, bazı bölgelerde incelme ve kopma (asteriskler), Z bandlarında düzensizlik ve kayıp (ok başları), dejenere mitokondri (ok), (X15000).



Resim 8: D grubunda normal yapıda miyofibriller (M) ve mitokondriyonlar (oklar), (X10000), (X15000).

Tablo 6: Biyokimyasal değerler.

Grup	Anjiostatin pg/ml	Endostatin ng/ml	VEGF pg/ml	Ang-1 ng/ml
A1	1,136	48,45	38,1	15,92
A2	1,19	44,65	12,29	16,38
A3	1,219	39,71	24,12	14,94
A4	1,294	41,8	21,8	14,56
A5	0,927	45,6	11,06	14,48
A6	0,843	48,26	51,32	13,8
A7	0,884	26,79	22,2	15,54
A8	1,135	35,53	23,74	10,39
A9	1,057	41,23	27,2	19,79
A10	1,122	39,9	9,03	14,18
B1	0,996	47,31	25,28	13,95
B2	0,873	42,18	17,1	16,45
B3	1,044	42,37	31,74	12,28
B4	1,264	40,28	22,96	15,24
B5	1,279	46,17	55,3	15,09
B6	1,205	35,53	9,83	16,98
B7	1,31	46,36	13,908	16,76
B8	1,234	50,54	15,58	21
B9	1,294	45,22	32,88	17,74
B10	1,135	42,75	29,86	14,86
C1	0,972	47,69	38,84	21,68
C2	1,082	48,83	26,82	18,5
C3	1,325	46,93	22,96	17,82
C4	1,149	47,5	20,24	21,15
C5	1,02	51,3	21,8	16,76
C6	1,176	49,02	15,2	15,16
C7	1,702	43,32	42,54	11,52
C8	1,205	46,17	20,64	16,98
C9	1,294	42,94	25,28	13,19
C10	1,095	45,98	25,1	18,2
D1	1,604	50,16	37,74	20,24
D2	1,373	48,564	37,36	25,32
D3	1,549	47,747	20,24	21,53
D4	1,408	42,389	24,12	24,41
D5	1,219	49,59	29,48	18,35
D6	1,234	52,44	15,91	22,77
D7	1,335	53,96	36,98	15,01
D8	1,325	55,1	29,48	21,46
D9	1,373	45,752	37,36	19,78
D10	1,357	47,88	29,48	17,01

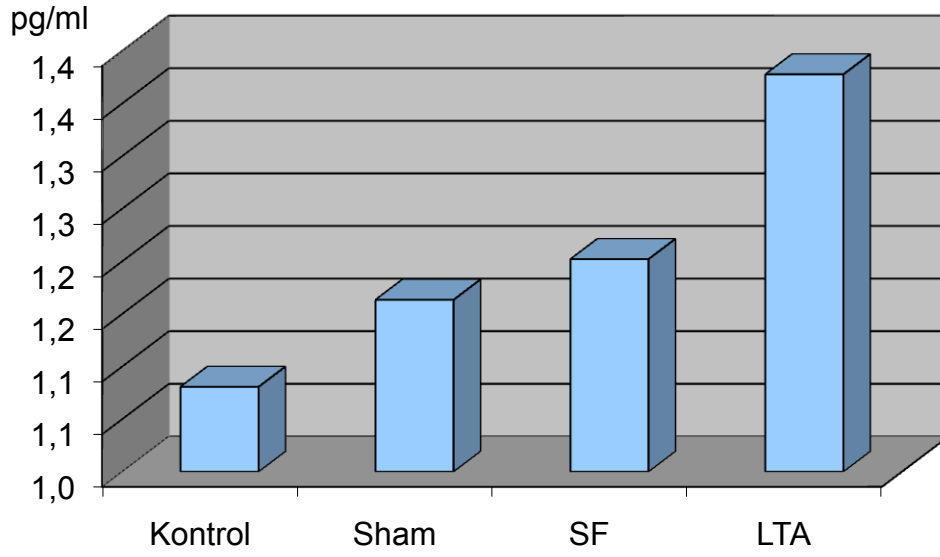
Tablo 7: Grupların ortalamaları bakımından karşılaştırılması.

	Grup	N	Ort	St. Sp.	Min	Max
Anjiostatin (pg/ml)	Kontrol	10	1,081	0,150	0,84	1,29
	Sham	10	1,163	0,148	0,87	1,31
	SF	10	1,202	0,208	0,97	1,70
	LTA	10	1,378	0,121	1,22	1,60
Endostatin (ng/ml)	Kontrol	10	41,192	6,478	26,79	48,45
	Sham	10	43,871	4,196	35,53	50,54
	SF	10	46,968	2,547	42,94	51,30
	LTA	10	49,358	3,820	42,39	55,10
VEGF (pg/ml)	Kontrol	10	24,086	12,876	9,03	51,32
	Sham	10	25,444	13,148	9,83	55,30
	SF	10	25,942	8,471	15,20	42,54
	LTA	10	29,815	7,787	15,91	37,74
Ang-1 (ng/ml)	Kontrol	10	14,998	2,353	10,39	19,79
	Sham	10	16,035	2,369	12,28	21,00
	SF	10	17,096	3,187	11,52	21,68
	LTA	10	20,588	3,216	15,01	25,32
Damar sayısı	Kontrol	10	9,10	1,44	7,0	11,4
	Sham	10	13,41	6,00	7,0	26,1
	SF	10	13,94	3,98	8,4	19,6
	LTA	10	19,16	3,72	12,3	24,9

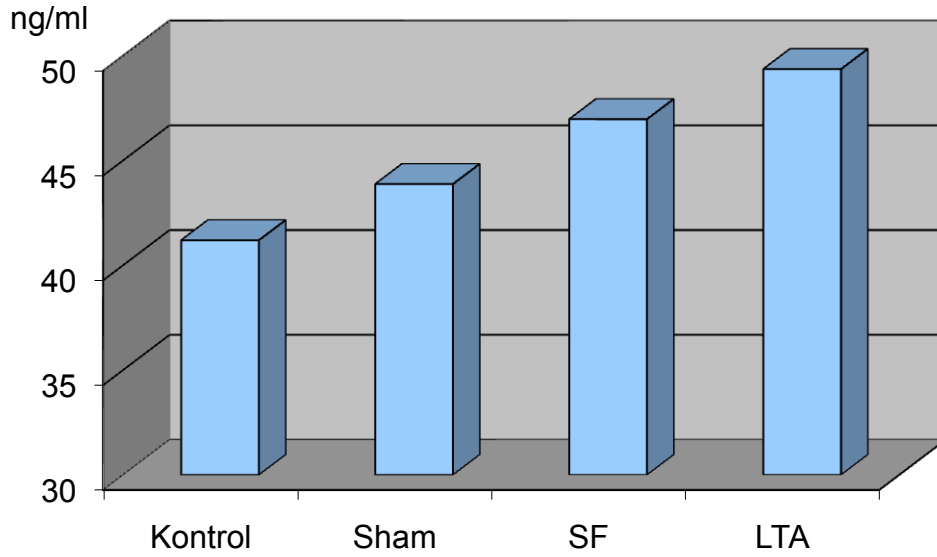
Gruplar arasındaki farklılıklar incelendiğinde Anjiostatin ($p=0,002$), Endostatin ($p=0,001$), Ang-1 ($p=0,001$) ve ortalama damar sayısı ($p=0,001$) bakımından gruplar arasındaki farklılık istatistik açıdan önemli bulunurken, sadece VEGF ($p=0,676$) bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık yoktur.

Tablo 8: Gruplardaki artış düzeylerinin oransal olarak (% cinsinden) karşılaştırması.

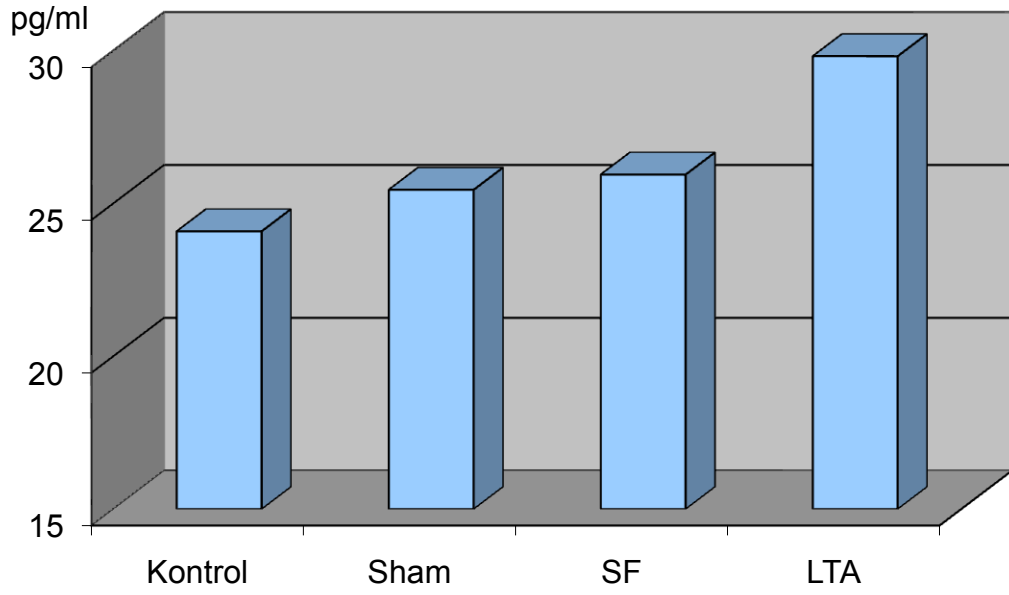
		Kontrol	Sham	SF
Anjiostatin	Kontrol			
	Sham	7,65		
	SF	11,22	3,32	
	LTA	27,48	18,42	14,62
Endostatin	Kontrol			
	Sham	6,50		
	SF	14,02	7,06	
	LTA	19,82	12,51	5,09
VEGF	Kontrol			
	Sham	5,64		
	SF	7,71	1,96	
	LTA	23,79	17,18	14,93
Ang-1	Kontrol			
	Sham	6,91		
	SF	13,99	6,62	
	LTA	37,27	28,39	20,43
Kapiller ortalama	Kontrol			
	Sham	47,36		
	SF	53,19	3,95	
	LTA	110,55	42,88	37,45



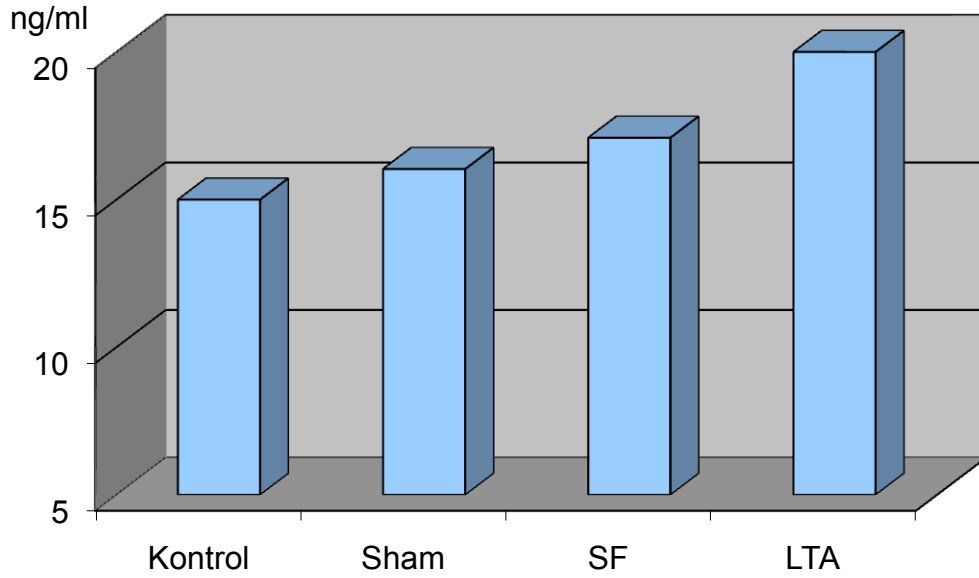
Şekil 1: Gruplardaki serum anjiostatin düzeyleri. Post hoc test sonucunda anjiostatin bakımından görülen farklılığın LTA ile kontrol grupları ($p=0,001$) ve LTA ile Sham grupları ($p=0,024$) arasında olduğu, diğer grupların birbirine benzer olduğu gözlenmiştir.



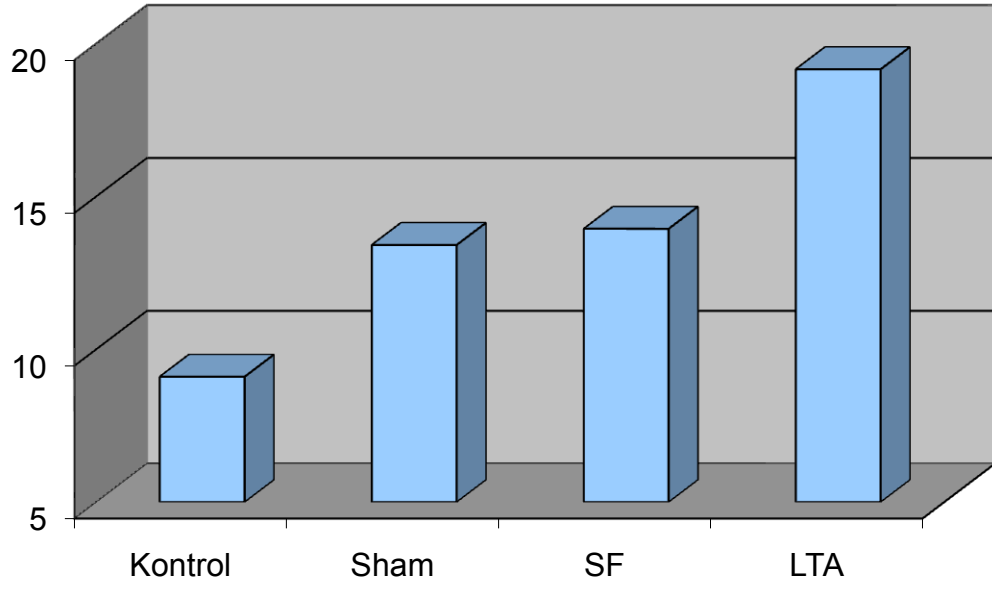
Şekil 2: Gruplardaki serum endostatin düzeyleri. Endostatin bakımından görülen farklılığın LTA ile kontrol grupları ($p=0,001$), LTA ile Sham grupları ($p=0,046$) ve SF ile kontrol grupları ($p=0,033$) arasında olduğu, diğer grupların birbirine benzer olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3: Gruplardaki serum VEGF düzeyleri. LTA grubundaki artış fazla olmasına rağmen ($p=0,676$) VEGF bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık yoktur.



Şekil 4: Gruplardaki serum Ang-1 düzeyleri. Ang-1 bakımından görülen farklılığın LTA ile kontrol grupları ($p=0,001$), LTA ile Sham grupları ($p=0,005$) ve LTA ile SF grupları ($p=0,041$) arasında olduğu, diğer grupların birbirine benzer olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5: Gruplardaki ortalama kapiller sayısı. Damar sayısı (kapiller) bakımından görülen farklılığın LTA ile kontrol grupları ($p=0,001$), LTA ile Sham grupları ($p=0,018$) ve LTA ile SF grupları ($p=0,036$) arasında olduğu, diğer grupların birbirine benzer olduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Damar hastalıkları nedeniyle ortaya çıkan arteriyel iskemi sonucunda organ perfüzyonu bozulmakta ve işlev kaybına neden olmaktadır. Periferik damar hastalıklarında kronik iskemi evresinde öncelikle Kİ ortaya çıkmakta, ilerleyen süreçte ise kritik bacak iskemisi, iskemik ülser ve sonunda ekstremitte kaybına kadar giden bir süreç meydana gelmektedir. Koroner arter hastalıklarında da benzer bir durum söz konusu olmakla birlikte kardiyak iskemi, ekstremitte iskemisine göre daha fatal seyreden bir duruma yol açmaktadır.

Terapotik anjiyogenezis, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde önemli bir seçenektir ve arzu edilmeyen sonuçlar göz önüne alındığında önemi her geçen gün biraz daha artmaktadır.

Kronik iskemi sürecinde, iskemik dokudaki damar endotel hücreleri göç etmek ve çoğalmak üzere uyarılır. Membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar, ancak anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler. Normal, hastalıklı ya da hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiyogenik büyüme faktörleri yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar³⁰. Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluşuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. ECM proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücre göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar. Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur³².

Düzensiz bir süreçte meydana gelen anjiyogenezis, neoplastik olmayan endometriyozis, romatoid artrit, psöriazis, hemanjiom gibi hastalıklarda söz konusudur^{82, 83, 84}. Bu örneklerde olduğu gibi, proanjiyogenik ve antianjiyogenik sitokinler arasındaki dengenin bozulması nedeniyle ortaya çıkan kontrolsüz anjiyogenezis istenmeyen sonuçlar ortaya çıkarabilir.

Terapotik anjiyogenez oluşturmak amacıyla, sadece proanjiyogenik faktörlerin uyarılması veya hedef organa ulaştırılması yoluyla hedeflenen terapotik anjiyogenezis sürecinde, yeni kapiller oluşumunun belirli bir aşamada durdurulması işlemi, organizmanın antianjiyogenik sistemlerinin kapasitesine bırakılmaktadır.

Antianjiyogenik sitokinlerden bir tanesi olan anjiostatin, antikanser ajan olarak birçok çalışmada kullanılmış ve etkinliğini tümör anjiyogenezisini baskılamakla gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda, gruplar karşılaştırıldığında, antianjiyogenik bir faktör olan anjiostatatinin, LTA verilen grupta; kontrol, sham ve SF gruplarına göre sırasıyla % 27,48 ($p=0,001$) , %18,42 ($p=0,024$) ve %14,62 ($p>0,05$) oranında arttığını saptadık. Ayrıca, anlamlı fark yaratmamasına rağmen, iskemi yaratılan sham ve SF gruplarında, kontrol grubuna göre anjiostatatinin sırasıyla %7,65 ve %11,22 oranında artış gösterdiği saptandı. Bu bulgu ise organizmanın iskemiye cevabında, anjiyogenezis sürecinde proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin aynı anda artmaya başladığını göstermekle beraber, sham ve SF gruplarındaki artışın kontrol grubuna göre anlamlı fark yaratmaması iki farklı hipotezle açıklanabilir: Birincisi; ratlarda oluşturulan iskemiden sonraki 1 aylık sürede, anjiyogenezis oluşum sürecinde antianjiyogenik faktörlerin artış sırası henüz gelmemiştir, ikincisi ise organizmanın anjiyogenez sırasında antianjiyogenik faktörlerin salınımında yetersizliği söz konusudur.

Endostatatinin antianjiyogenik etkisinin temelinde yer alan biyolojik mekanizmalar arasında endotel hücre migrasyonunun inhibisyonu, hücre döngüsünün duraklaması ve apoptozis indüksiyonu yer almaktadır. Endotel hücrelerinde endostatatinin $\alpha5\beta1$ integrine bağlanması ile Src-kinaz sinyal ileti yolağının aktive olduğu gösterilmiştir. Ayrıca endostatatinin integrinler aracılığı ile RhoA-GTPaz aktivitesini baskıladığı ve Ras ve Raf ailesine ait sinyal ileti yollarını da inhibe ettiği bildirilmektedir. Bu etkiler sonucunda endostatatinin hücre iskeletinin organizasyonunda yer alan aktin monomerlerinin birbirinden ayrılmasına, hücre-matriks etkileşimlerinin bozulmasına ve endotel hücre migrasyonunun yavaşlamasına neden olduğu, bunlara bağlı olarak da anjiyogenez baskıladığı gösterilmiştir^{71, 72, 85}.

Çalışmamızda, endostatin bakımından görülen farklılığın LTA ile kontrol grupları ($p=0,001$), LTA ile sham grupları ($p=0,046$) ve SF ile kontrol grupları

($p=0,033$) arasında olduğu, diğer grupların birbirine benzer olduğu gözlenmiştir. Bu analizde dikkati çeken nokta ise, ratlara verilen SF' in endostatini anlamlı derecede artırmasıdır, fakat SF ve sham grubu arasında anlamlı fark yoktur. Bu durumda, SF' in LTA ile beraber verileceği yeni bir çalışmaya ihtiyaç vardır.

Antianjiyogenik faktörlerden olan anjiostatin ve endostatin düzeylerinin, öngörüldüğü üzere LTA verilen grupta anlamlı derecede artış göstermesi (Şekil 1, 2), LTA' nın majör sitokin stimülanı olmasının doğal sonucu olarak karşımıza çıkmıştır. LTA verilen grupta yeni oluşan kapilleritenin anlamlı derecede artması ise iskemik dokuda zaten artmış olan proanjiyogenik faktörlerin LTA yoluyla daha çok artması, antianjiyogenik faktörlerin artışına rağmen dengenin proanjiyogenik faktörlere doğru kaymasının sonucu olarak anjiyogenezis sürecinin antianjiyogenik sistemlerce belki de daha geç dengelenmesi sonucunda yeni kan damarlarının sayısı kontrol, sham ve salin gruplarına göre daha yüksek oranda gerçekleşmiştir.

Arteriyel iskemide tedavisinde medikal ve cerrahi yöntemler üzerinde halen araştırmalar devam etmektedir. Bu amaçla, 1990lı yılların sonunda gen tedavisi çalışmaları birçok merkezde uygulanmıştır. Kaliforniya Üniversitesi Kardiyovasküler Araştırma Enstitüsü' nde Kan ve arkadaşları, ratlarda sol ana koroneri bağlayarak miyokard iskemisi oluşturmuştur. İskemik miyokard bölgesine birçok noktadan, normal miyokard dokusuna da belli bir bölgeden adenovirüs vektörlüğünde VEGF enjeksiyonu yapılmış ve üç ay sonunda histopatolojik olarak anjiyogenezis araştırılmıştır. Sonuçta VEGF enjeksiyonunun iskemik miyokard bölgelerinde anjiyogenezise yol açarken sağlam miyokard segmentinde bu etkiyi oluşturmadığı tespit edilerek VEGF' nin potent bir vaskülojenik ajan olduğu bildirilmiştir ⁸⁶.

Almanya' da Völklingen Kalp Merkezi' nde, Huwer ve arkadaşları, anatomik olarak koroner bypass yapılması uygun olmayan ve diffüz periferik arter hastalığı olan 24 hastayı çalışmaya almıştır. Miyokard iskemisi olan bölgelere 1000µg VEGF¹⁶⁵ enjeksiyonu yapılmıştır. Operasyondan yedi gün sonra tüm hastalara ^{99m}Tc-sestamibi-SPECT yapılmıştır. Preoperatif skar dokusu olduğu tespit edilen bölgelerde canlı aktivitelerin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca hastaların tamamına postoperatif 3. ayda koroner anjiyografi ve ventrikülografi yapılarak, beş hastada ventrikül fonksiyonlarının iyileştiği, altı

hastada yeni kollateral oluştuğu, yedi hastada var olan kollateral akımın arttığı, üç hastada iskemik miyokard segmentinin küçüldüğü saptanmıştır ⁸⁷.

Yapılan diğer deneysel çalışmalarda, ekzojen VEGF uygulamaları ile korneda ⁸⁸, kas dokusunda ⁸⁹, miyokarda ⁹⁰, retinada ⁹¹, korpus luteumda ⁹² ve lenf nodlarında ⁹³ anjiyogenezis oluştuğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda, LTA verdiğimiz grupta VEGF, diğer gruplara oranla daha çok yükselmesine rağmen anlamlı bir fark saptanamamıştır. VEGF; LTA grubunda, kontrol, sham ve SF grubuna göre sırasıyla %23,79 , %17,18 ve %14,93 oranında daha fazla artış göstermiştir. VEGF' nin, SF grubunda sham grubuna göre %1,96 daha fazla arttığı saptanmıştır. VEGF' deki artışın anlamlı derecede olmaması verilen LTA dozuyla ilişkili olabilir.

G. Merino ve arkadaşları LTA' nın üveit yaptığını göstermek için yaptıkları deneysel çalışmada, sırasıyla, 3.75, 7.5, 15 ve 30 mg/kg dozunda LTA kullanmışlardır ⁹⁴. Literatürde, LTA' nın anjiyogenezis üzerine etkisinin araştırıldığı her hangi bir araştırma örneği olmadığından, bu çalışmada 1ml volüm içerisinde 1mg/kg LTA olacak şekilde doz ayarlaması yaptık. Bu şekilde ayarlandığında her bir rat için toplam 250µg LTA, 4 ayrı noktadan intramusküler olarak enjekte edildi. Bu durum göz önünde bulundurularak farklı dozlarda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda LTA verilen grup ile diğer gruplar arasında Ang-1 artışı yönünden anlamlı fark bulunmuştur (Şekil 4, p<0,05). Kim ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Ang-1 ile, granülosit koloni stimüle edici faktör tarafından mobilize edilen periferik kökenli kök hücrelerin vaskülojenik potansiyelinin arttığı⁹⁵, Kou-Gi Shyu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, sadece Ang-1' i kodlayan plazmid DNA' sının direkt intramusküler enjeksiyonunun tavşanların iskemik bacaklarında revaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir ⁵⁹. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da LTA grubundaki yeni oluşan kapiller sayısındaki anlamlı artışla paralellik gösteren Ang-1 düzeylerinin yüksekliği, LTA' nın iskemik dokuda anjiyogenezisi arttırdığını gösteren kanıtlardan bir tanesidir. Nykänen ve arkadaşları, yaptıkları deneysel çalışmada, kardiyak allogreft arteriyosklerozunda Ang-1' in koruyucu etkisi olduğunu ve arteriyel endoteli stabilize ettiğini göstermişlerdir ⁶⁷. Ayrıca Tou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Ang-1' in, anjiopietin-2 ve yüksek kan şekeri düzeyi ile baskılanan miyokardiyal endotel fonksiyonu üzerine koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir ⁹⁶.

LTA grubunda Ang-1' in hedeflenen düzeyde anlamlı derecede artış göstermesiyle sadece anjiyogenez üzerine olumlu etkilerinden değil, aynı zamanda yeni oluşan kapiller endotelini stabilize edici özelliğinden, ayrıca ateroskleroza karşı koruyucu etkisinden de yararlanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmadaki gruplarda yeni oluşan kapilleritenin ışık mikroskopu kullanılarak yapılan değerlendirilmesinde, LTA grubunda SF grubuna göre ($p=0,036$), sham grubuna göre ($p=0,018$) ve kontrol grubuna göre ($p=0,001$) anlamlı olarak artış olması LTA' nın anjiyogenezis oluşturmadaki etkinliğinin en belirgin kanıtlarından bir tanesidir. Sham ve SF gruplarında kontrol grubuna göre kapillerite artışı sırasıyla %47,36 ($p>0,05$) ve %53,19 ($p>0,05$) oranında tespit edilmiştir. Kapillerite değerlendirilmesinde LTA dışındaki grupların arasında anlamlı fark olmaması ise, iskemi oluşturulduktan sonraki 1 aylık süreçte organizmanın iskemiyeye verdiği cevapta anjiyogenezis oluşturma yönünden yetersiz kaldığının göstergesidir.

Elektron mikroskopik incelemede, LTA verilen gruptaki kas dokusunun, iskemi oluşturulmamış kontrol grubu ile benzer özelliklere sahip olduğu, sham ve SF gruplarında ise iskemik dejenerasyon olduğu tespit edildi. Bu durumda LTA' nın anjiyogenezi uyararak kas dokusunun rejenerasyonunu kolaylaştırdığı söylenebilir.

Literatür incelendiğinde, anjiyogenezis oluşturmada kullanılan yöntemler genellikle tek bir proanjiyogenik faktör üzerinden araştırılmıştır. Çalışmamızda LTA' nın, ikisi proanjiyogenik ve ikisi antianjiyogenik faktörlerden olmak üzere toplam 4 tanesi üzerine olan etkisini araştırdık. LTA' nın farklı dozlarda bilinen tüm proanjiyogenik faktörler üzerine etkisi ve aynı zamanda anjiyogenezis oluşturma potansiyeli ileriki çalışmalar olarak düşünülmüştür.

Bu çalışmada arteriyel iskemi için, alt ekstremitte kas dokusu hedef organ olarak belirlenmiştir. Benzer bir çalışma miyokardiyal iskemi modeli oluşturularak yapılabilir. Bu durumda LTA' nın miyokard dokusunda yeni kollateral oluşturma süreci araştırılabilir.

LTA' nın, gösterildiği üzere, proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin her ikisini de artırma potansiyeli olduğundan anjiyogenez sürecinin daha kontrollü olacağını düşünmekteyiz. Tüm bulgular ve değerlendirmelerin ışığı altında, LTA' nın arteriyel iskemi tedavisinde kullanılabilecek yeni bir ajan olması için ilk adımı atmış olduğumuza inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Hennekens CH. Increasing burden of cardiovascular disease current knowledge and future directions for research on risk factors. *Circulation* 1998; 97: 1095-1102.
2. Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, et al. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation* 1985; 71: 510-5.
3. Hiatt WR, Hoag S, Hamman RF. Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study. *Circulation* 1995; 91(5): 1472-1479.
4. Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Circulation* 2004; 110(6): 738-743.
5. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33 (Suppl 1): 1-75.
6. Tierney S, Fennessy F, Hayes D. ABC of arterial and vascular disease, secondary prevention of peripheral vascular disease. *BMJ* 2000; 320: 1262-5.
7. Thom TJ, Kannel WB, Silbershatz H, D'Agostino RB. Birleşik Devletlerde Kardiyovasküler Hastalıklar ve Önleyici Yaklaşımlar. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA (eds). *Hurst' s The Heart*. 10. Baskı. İstanbul: AND Ltd. Şti, 2002: 3.
8. Kantarcı M, Duran C, Durur I ve ark. Koroner Arterlerin Değerlendirilmesinde Multi Dedektör BT Anjiyografi: Teknik, Anatomi ve Varyasyonlar. *Bilgisayarlı Tomografi Bülteni* 2004; 2: 90-99.
9. Fox KAA, Steg PG, Eagle KA, et al. Decline in Rates of Death and Heart Failure in Acute Coronary Syndromes, 1999-2006. *JAMA* 2007; 297(17): 1892-1900.

10. Manninen V, Huttunen JK, Heinonen OP, et al. Relationships between baseline lipid and lipoprotein values and the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Am J Cardiol* 1989; 63: 42-47.
11. Pocock SJ, Shaper AG, Phillips AN. HDL-Cholesterol, triglycerides and total cholesterol in ischaemic heart disease. *Br Med J* 1989; 298: 998-1002.
12. Jellinger PS. The American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for The Diagnosis and Treatment of Dyslipidemia and Prevention of Atherogenesis. *Endocrine Practice* 2000; 6(2): 162-213.
13. Onat A, Sansoy V, Soydan İ, Tokgözoğlu L, Adalet K. TEKHARF; Oniki Yıllık İzleme Deneyimine Göre Türk Erişkinlerinde Kalp Sağlığı. *Argos İletişim*. İstanbul: 2003, 1-44.
14. Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2007; 28(13): 1598–1600.
15. Leng GC, Fowler B, Ernst E. Exercise for intermittent claudication: Supervised programmes should be universally available. *BMJ* 2001; 323: 703.
16. Gardner AW, Poehlman ET. Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain: a meta analysis. *JAMA* 1995; 274: 975-80.
17. Durdu S, Akar A, Arat M, Eren NT, Özyurda Ü. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade II-III thromboangiitis obliterans. *J Vasc Surg* 2006; 44(4): 732-739.
18. Distler JW, Hirth A, Kurowska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nuclear Med* 2003; 47: 149-161.
19. Shaker M. Angiogenesis and myogenesis. In: Kipshidze N, Fareed J, Moses JW, Serruys PW (eds). *Textbook of Interventional Cardiovascular Pharmacology*. 1st ed. London: Informa Healthcare, 2007: 393-407.
20. Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 171–179.

21. Nie D, Tang K, Diglio C, Kenneth VH. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood* 2000; 95: 2304-2311.
22. Hu DE, Hori Y, Fan TP. Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation* 1993; 17: 135-3.
23. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signalling during development. *Nat Med* 2003; 9: 661-8.
24. Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelshon JA, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (eds). *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: Saunders, 1995, 206-32.
25. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991; 64: 327-6.
26. Deveci D. Angiogenesis under physiological and pathological conditions: angiogenic and antiangiogenic treatments. *Genel Tıp Dergisi* 2003; 13: 179-6.
27. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol* 2002; 21: 33-49.
28. Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 49: 117-37.
29. Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14: 53-65.
30. Achen MG, Stacker SA. The VEGF family proteins which guide the development of the vasculature. *Int Exp Path* 1998; 79: 255-5.
31. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 49: 138-62.
32. Konukoğlu D, Turhan SM. Molecular basis of angiogenesis mechanisms and tumor angiogenesis. *Cerrahpaşa J Med* 2005; 36: 42-48.
33. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenetic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
34. Folkman J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Sci Am*. 1996; 275:150 –154.

35. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann TJ. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors. *Circulation* 1998; 97: 645-650.
36. Stegmann TJ. A human growth factor in the induction of neoangiogenesis. *Exp Opin Invest Drugs* 1998; 7: 2011-2015.
37. Wagoner LE, Merrill W, Jacobs J, et al. Angiogenesis protein therapy with human fibroblast growth factor (FGF-1): Results of a phase I open label, dose escalation study in subjects with CAD not eligible for PCI or CABG. *Circulation* 2007; 116: 443.
38. Alkan ML, Beachey EH. Excretion of lipoteichoic acid by group A streptococci. Influence of penicillin on excretion and loss of ability to adhere to human oral mucosal cells. *J Clin Invest* 1978; 61(3): 671–677.
39. Telles PDS, Hanks CT, Machado MAAM, Nör JE. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *JDR* 2003; 82(6): 466-470.
40. Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, et al. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* 2001; 276(25): 22041-22047.
41. Keller R, Fischer W, Keist R, Bassetti S. Macrophage response to bacteria: Induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 1992; 60: 3664-3672.
42. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan and lipoteichoic acid induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274(25): 17406-9.
43. Auguet M, Lonchamp MO, Delaflotte S, Goulin-Schulz J, Chabrier PE, Braquet P. Induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1992; 297: 183–185.
44. Lin CH, Sheu SY, Lee HM, et al. Involvement of protein kinase C- γ in IL-1 β -induced cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 36–43.
45. Morath S, Wendel A, Hartung T. Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. Identification of lipoteichoic acid as a major cytokine-stimulatory principle of *staphylococcus aureus*. *Abstr Intersci*

- Conf Antimicrob Agents Chemother Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother. 1999; 29 (39): 73.
46. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1994; 71: 374-379.
 47. Ferrara N. Role of VEGF in regulation of physiological angiogenesis. *EXS* 2005; 94: 209-31
 48. Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004; 39: 206-16.
 49. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993; 264: 995-1002.
 50. Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chemistry* 1996; 271: 603-6.
 51. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-8.
 52. Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62.
 53. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 1017-2.
 54. Ferera N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
 55. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB J* 1999; 13: 10-22.
 56. Zachary I. Molecules in focus VEGF. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 1169-74.
 57. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-1039.
 58. Shyu KG, Manor O, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Direct Intramuscular Injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not

- angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb. *Circulation* 1998; 98: 2081-2087.
- 59.** Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic Responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 257.
- 60.** Koh GY, Kim I, Kwak HJ, Yun MJ, Leem JC. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. *Exp Mol Med* 2002; 34: 1-11.
- 61.** Metheny-Barlow LJ, Li LY. The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis. *Cell Res* 2003; 13: 309.
- 62.** Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000; 6: 460.
- 63.** Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche, *Cell* 2004; 118: 149.
- 64.** Jousseen M, Poulaki V, Tsujikawa A, et al. Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. *Am J Pathol* 2002; 160: 1683 -1693.
- 65.** Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* Oct 2003; 314: 61-8.
- 66.** Nykänen AI, Krebs R, Saaristo A, et al. Angiopoietin-1 protects against the development of cardiac allograft arteriosclerosis. *Circulation* 2003; 107: 1308-1314.
- 67.** O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-285.
- 68.** Felbor U, Dreier L, Bryant RA, et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J* 2000; 19: 1187-1194.
- 69.** Ferreras M, Felbor U, Lenhard T et al. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Letter* 2000; 486: 247-251.
- 70.** Sasaki T, Hohenester E, Timpl R. Structure and function of collagen derived endostatin inhibitors of angiogenesis. *IUBMB Life* 2002; 53: 77-84.

71. Bix G, Iozzo V. Matrix revolutions: 'Tails' of basement-membrane components with angiostatic functions. *Trends in Cell Biology* 2005; 15: 52-59.
72. Abdollahi A, Hahnfeld P, Maercker C, et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Molecular Cell* 2004; 13(5): 649-663.
73. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006; 57: 1-18.
74. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res* 2006; 312: 594-607.
75. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79(2): 315-328.
76. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2:563-572.
77. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 1997; 74:111-122.
78. Ring P, Johansson H, Hoyhtya M, et al. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) in human colorectal cancer: A predictor of tumor stage. *Br J Cancer*, 1997; 76: 805-811.
79. Li M, Huang X, Zhu Z, Zhao Q, Wong M, Gorelik E. The therapeutic efficacy of angiostatin against weakly- and highly- immunogenic 3LL tumors. *In Vivo* 2002; 16(6): 577-82.
80. Tutton MG, George ML, Eccles SA, Burton S, et al. Use of plasma MMP-2 and MMP-9 levels as a surrogate for tumour expression in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2003; 107(4): 541-550.
81. Pesta M, Holubec L Jr, Topolcan O, et al. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. *Anticancer Research* 2007; 27: 1863-1868.
82. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 253-70.
83. Jakeman LB, Winer J, Bennet GL, Altar CA, Ferrera N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992; 89: 244-253.

84. Sato T, El-Assal ON, Ono T, Yamanoi A, Dhar DK, Nagasue N. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver. *J Hepatol* 2001; 34: 690-8.
85. Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, et al. Endostatin: Current concepts about its biological role and mechanisms of action. *Biochemistry* 2007; 72(3): 235-246.
86. Su H, Joho S, Huang Y, et al. Adeno-associated viral vector delivers cardiac-specific and hypoxia-inducible VEGF expression in ischemic Mouse hearts. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(46): 16280-5.
87. Symes JF. Focal angiogenic therapy for myocardial ischemia. *J Card Surg* 2000; 15: 283-290.
88. Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12(4): 242–9.
89. Springer ML, Chen AS, Kraft PE, et al. VEGF gene delivery to muscle: Potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell* 1998; 2(5): 549–58.
90. Zhang D, Gai L, Fan R, et al. Efficacy and safety of therapeutic angiogenesis from direct myocardial administration of an adenoviral vector expressing vascular endothelial growth factor 165. *Chin Med J* 2002; 115(5): 643–8.
91. Hofman P, Blaauwgeers HG, Vrensen GF, et al. Role of VEGF-A in endothelial phenotypic shift in human diabetic retinopathy and VEGF-A-induced retinopathy in monkeys. *Ophthalmic Res* 2001; 33(3): 156–62.
92. Fraser HM, Lunn SF. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. *Br Med Bull* 2000; 56(3): 787–97.
93. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 2002; 1(3): 219–27.
94. Merino G, Fujino Y, Hanashiro RK. Lipoteichoic acid as an inducer of acute uveitis in the rat. *IOVS* 1998; 39(7), 1251-1256.
95. Lee CS, Kim MS, Cho HJ, Hur j, Kwon YW, Choi SY. Priming with angiopoietin-1 augments angiogenic potential of peripheral blood stem cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor. *Circulation* 2008; 118: 515.

- 96.** Tuo QH, Xiong GZ, Zeng H, et al. Angiopoietin-1 protects myocardial endothelial cell function blunted by angiopoietin-2 and high glucose condition. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 32(1): 45-51.

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	: Alfa
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Ang-1	: Anjiopietin-1
β	: Beta
βHPP	: β hidrojenozomal processing peptidaz
cc	: Santimetre küp
CD14	: Monosit farklılaşma antijeni 14
DAB	: Diaminobenzidin
ECM	: Ekstraselüler matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
γ	: Gama
G-CSF	: Granülosit-koloni stimülan faktör
GM-CSF	: Granülosit makrofaj-koloni stimülan faktör
HIF-1	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
İL	: İnterlökin
KAH	: Koroner arter hastalığı
KBİ	: Kritik bacak iskemisi
kDA	: Kilo dalton
Kİ	: Kladikasyo intermittans
LTA	: Lipoteikoik asit
mg/kg	: Miligram/kilogram
MMP	: Matriks metalloproteinaz
mRNA	: Haberci ribonükleik asit
NFκB	: Nükleer faktör kappa B
ng/ml	: Nanogram/mililitre
NM-3	: İzokumarin
NO	: Nitrik oksit

PA	: Plazminojen aktivatörü
PAH	: Periferik arteriyel hastalık
PBS	: Fosfatla tamponlanmış salin
PBS-BSA	: Fosfatla tamponlanmış salin –Sığır serum albumini
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
pg/ml	: Pikogram/mililitre
SF	: Serum fizyolojik
TEKHARF	: Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri
TGFα	: Değişirici büyüme faktörü α
TGFβ	: Değişirici büyüme faktörü β
Tie-1/2	: Tirozin kinaz yapısında anjiopietin reseptörü 1/2
TLR	: Toll benzeri reseptör
TNFα	: Tümör nekroz faktörü α
TNP-470	: Fumagillin analogu
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü
3LL	: Akciğer Lewis kanseri

ŞEKİLLER ve RESİMLER

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Gruplardaki serum anjiostatin düzeyleri)	32
Şekil 2 (Gruplardaki serum endostatin düzeyleri)	32
Şekil 3 (Gruplardaki serum VEGF düzeyleri)	33
Şekil 4 (Gruplardaki serum anjiopoietin düzeyleri)	33
Şekil 5 (Gruplardaki ortalama kapiller sayısı)	34

Resimler	Sayfa No
Resim 1 (Işık mikroskopi A grubu)	25
Resim 2 (Işık mikroskopi B grubu)	25
Resim 3 (Işık mikroskopi C grubu)	25
Resim 4 (Işık mikroskopi D grubu)	25
Resim 5 (Elektron mikroskopi A grubu)	26
Resim 6 (Elektron mikroskopi B grubu)	27
Resim 7 (Elektron mikroskopi C grubu)	27
Resim 8 (Elektron mikroskopi D grubu)	28

TABLULAR

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Proanjyogenik ve anti-anjyogenik faktörler)	12
Tablo 2 (A Grubundaki kapillerite sayıları)	22
Tablo 3 (B Grubundaki kapillerite sayıları)	23
Tablo 4 (C Grubundaki kapillerite sayıları)	23
Tablo 5 (D Grubundaki kapillerite sayıları)	24
Tablo 6 (Biyokimyasal değerler)	29
Tablo 7 (Grupların ortalamaları bakımından karşılaştırılması)	30
Tablo 8 (Gruplardaki artış düzeylerinin oransal olarak karşılaştırması)	31