

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL TAM KAT KAROTİS ARTER KESİSİ SONRASI YAPILAN UÇ UCA
ARTER ANASTOMOZUNDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN İYİLEŞMEYE
OLAN ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Adnan ALTUN**

Samsun 2012

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ
ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL TAM KAT KAROTİS ARTER KESİSİ SONRASI YAPILAN UÇ UCA
ARTER ANASTOMOZUNDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN İYİLEŞMEYE
OLAN ETKİSİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Adnan ALTUN**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cengiz ÇOKLUK**

Samsun 2012

TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda bulunduğum 2006-2012 yılları arasında uzmanlık eğitimime mesleki bilgi ve deneyimleriyle katkıları olan değerli hocalarım:

Bu zorlu maratonda her zaman desteğini aldığım dostlarım Dr. Ercan YARAR, Dr. Eyüp GENÇ ve diğer asistan arkadaşlarıma;

Eğitim sürecinin servis ve ameliyathane aşamalarında birlikte çalıştığım tüm hemşire ve personel arkadaşlara;

Ekibimizin bir parçası olan değerli ameliyathane hemşiremiz Tülay ACAR YILMAZ'a;

PYO. TIP.1904.11.036 no'lu proje başvurumu onaylayarak projeme destekte bulunan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisine;

Ve elbette bu dönemde her sıkıntıyı beraber göğüslediğimiz aileme, eşim Aslı, oğlum A. Güneş ve kızım Bahar'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Adnan ALTUN

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
TEŞEKKÜR	I
KISALTMALAR	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
TABLO LİSTESİ	VII
1. GİRİŞ AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kök Hücre	3
2.1.1. Kök Hücre Tarihçesi	3
2.1.1.2. Kök Hücre Nedir?	3
2.1.1.3. Kök Hücre Türleri	5
2.1.1.4. Kök Hücre Tipleri Ve Kaynakları	6
2.1.1.4.1. Embriyonik Kök Hücre	7
2.1.1.4.2. Erişkin Kök Hücreler (ERKH)	7
2.1.2. Mezenkimal Kök Hücre	8
2.1.2.1. Klinikte Mezenkimal Kök Hücrelerin Başlıca Kullanılma Amaçları	13
2.1.2.2. Mezenkimal Kök Hücrenin Arter Duvarına Etkisi	13
2.2. Deney Hayvanı	14
2.2.1. Cerrahi Araştırmalarda Hayvan Kullanımı	14
2.2.2. Deney Hayvanı Olarak Rat Kullanımı	15
2.2.3. Deney Hayvanında Arter Anastomozu	15
2.2.3.1. Arterler	15
2.2.3.2. Büyük Tip Arterler	16
2.2.3.3. Arter Anastomozun İyileşmesi Mekanizması	18
2.2.3.4. Arter Anastomozunda Sütür Ve Arter Seçiminin Önemi	19
2.2.4. Rat Anatomisi	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	23
3.1.2. Akım Sitometri İle Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması	24
3.2. Deneyin Uygulanması	25
3.2.1. Cerrahi İşlem Öncesi ve Cerrahi İşlem	25
3.2.2. Anastomoz Hazırlığı	27
3.2.3. Uç Uca Anastomozun Uygulanması	29

3.2.4. Cerrahi İşlem Sonrası Bakım Ve Gözlem	30
3.2.5. Sakrifikasyon ve Histopatoloji İçin Örnek Alınması	30
3.3. Histopatolojik İşlemler	32
4. BULGULAR	37
5.TARTIŞMA	40
6. SONUÇ	46
7. KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR

i.m.	:	İntramüsküler
i.p.	:	İntraperitoneal
Lig.	:	Ligament
MKH	:	Mezenkimal Kök Hücre
a.	:	Arteria
n.	:	Nervus
NO	:	Nitrik Oksiid
ESM	:	Ekstrasellüler matriks
ERKH	:	Erişkin Kök Hücreler

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 1:	Kök hücrelerin yakınında kaynak (partner) hücrelerin varlığına bağlı olarak tanımlanan niş tipleri.	4
Şekil 2:	Kök hücre hiyerarşi tablosu.	5
Şekil 3:	Büyük arter tabakaları.	17
Şekil 4:	Rat boyun damarlarını gösteren anatomik illüstrasyon.	21
Şekil 5:	Ratlarda boyun yüzeysel ve derin kasların, karotis kommunis arter ile ilişkisi.	22
Şekil 6:	Cerrahi alan da cilt temizliği ve cerrahi alan antisepsisi.	26
Şekil 7:	Yüzeysel yağlı dokunun uzaklaştırılması ve yüzeysel kas yapıları.	27
Şekil 8:	Mikrodiseksiyon ile ilerlenerek karotis arterin ortaya konulması.	27
Şekil 9:	Yakınlaştırma klemplerinin uygulanması ve arterin tam kat kesisi.	28
Şekil 10:	Anastomoz hazırlığı ve adventisyanın sıyrılması.	29
Şekil 11:	Mezenkimal kök hücre uygulanan ve tromboze olmuş olan karotis arter.	31
Şekil 12:	a. Kontrol Grubu arter anastomozu patent damar lümeni. b. Mezenkimal kök hücre uygulanmış arter anastomozu patent damar lümeni.	33
Şekil 13:	a. Mezenkimal kök hücre uygulanmış arter anastomozu. b. Mezenkimal kök hücre uygulanmış arter anastomozu.	34
Şekil 14:	Kontrol Grubu lamina elastika interna, lamina elastika eksterna ve endotel devamlılığı net değerlendirilebiliyor.	34
Şekil 15:	MKH uygulanmış anastomoz hattı, damar duvarları intakt, lümen içinde rekanalize trombüs mevcut.	35

Şekil 16:	MKH uygulanmış anastomoz hattı, internal ve eksternal elastik laminalar devamlılığı net değerlendiriliyor, endotel devamlılığı parsiyel korunmuş.	35
Şekil 17:	MKH uygulanmış anastomoz hattını gösteren longitudinal kesi, lümen açık ve damar duvarı intakt, anastomoz hattında neointimal hiperplazi mevcut.	36
Şekil 18:	MKH uygulanmış ve uygulanmamış damar lümenindeki trombüs oluşumunu ve rekanalize oranları görülmektedir.	37

TABLO LİSTESİ

Tablo 1:	Kültürde çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri.	11
Tablo 2:	Lümen içindeki trombüs varlığını istatistiksel olarak gösteren ki- kare testi.	37
Tablo 3:	Lümen içindeki trombüs varlığını gösteren oranlar.	38
Tablo 4:	Endotel devamlılığı, trombüse bağlı damar lümeni açıklığı ve neointimal hiperplazi derecelendirilmesi.	39

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, deneysel tam kat arter kesisi sonrası uç uca uygulanan arter anastomozunda mezenkimal kök hücrenin iyileşmeye olan etkisinin histopatolojik olarak değerlendirmektir.

Çalışmada 24 adet dişi Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. İki gruba rastgele ayrılan denekler aynı cerrah tarafından tam kat karotis arter kesisine anastomoz uygulandı. Kontrol Grubunda anastomozun üzerine 1ml serum fizyolojik, Deney Grubuna ise 1 ml (1×10^6 hücre) mezenkimal kök hücre lokal olarak uygulandı. Anastomoz hattı ortada kalacak şekilde 8mm uzunluğunda cerrahik anastomoz hattını çepeçevre saracak şekilde serildi. Cerrahik'in üstüne sıvama tarzında BioGlue uygulandı. Böylece mezenkimal kök hücrenin anastomoz etrafında hapis edilmesi sağlandı. Bu uygulama esnasında damarın sistol ve diyastol esnasında rahat hareket edip etmediği gözlemlendi. Damarın basınç altında olmadığı anlaşıldıktan sonra cerrahi alan 2/0 ipek sütür ile kapatıldı.

Yaptığımız histopatolojik çalışma anastomoz iyileşme süresi göz önünde tutularak dört hafta sonra gerçekleştirilmiştir. Mezenkimal kök hücre uygulanan anastomoz hattında; endotel devamlılığı, damar lümeninin açıklığı (neointima hiperplazisine bağlı restenoz varlığı), internal ve eksternal elastik lamina, kas tabaka ve adventisyanın iyileşme kalitesi istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kök hücre uygulanan grup ile uygulanmayan grup arasında anlamlı fark olmadığı ortaya konuldu. Her iki grup damar içinde trombus açısından karşılaştırıldığında ise mezenkimal kök hücre uygulanan 12 denekten 8'inde (%66,6) trombus gelişirken, kök hücre uygulanmayan 12 denekten 3'ünde (% 25) trombus gelişmiştir. Kök hücre uygulanan damarlarda trombus gelişme olasılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Bu çalışma mezenkimal kök hücrenin lokal uygulamasının sistemik uygulamaya oranla beklenenden farklı sonuçlar oluşturabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Uç uca karotis arter anastomozu, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, histopatolojik inceleme, trombus.

ABSTRACT

The histopathological evaluation of the effect of mesenchymal stem cells on healing of anastomosed carotid arteries following experimental full-thickness cutting.

The objective of this study was to histopathologically evaluate the influence of mesenchymal stem cells on healing of experimental carotid artery anastomoses. Twenty four female Sprague-Dawley rats were used in this study. After random separation of the subjects into two groups, experimental carotid artery full-thickness cutting was performed to all subjects by the same surgeon, followed by end-to-end anastomosis. Anastomoses were locally treated with 1 ml %0.09 NaCl, and 1 ml mesenchymal stem cell suspension (1×10^6 cells) in control and trial groups, respectively. Keeping the anastomosis in the middle, an 8 mm sheet of surgicel was wrapped around the vessel and soaked with BioGlue in order to sequester the stem cells in the vicinity. Effortless pulsation was observed to be maintained all throughout the procedure. After vessel constriction was ruled out, surgical site was closed with 2/0 silk sutures. Criteria were set for histopathological evaluation of anastomotic healing. Histopathological evaluation was carried out after 4 weeks, taking the process of anastomotic healing into account. In respect to endothelial continuity, vessel patency (along with presence or absence of restenosis), integrities of internal and external elastic laminae, muscularis and adventitia; no statistically significant differences were present between trial and control groups.

In Trial and Control Groups, luminal thrombus was present in 8 (66,6%) and 3 (25%) of 12 subjects, respectively. The difference was statistically significant ($p < 0,05$). Recanalization was present in 6 of 8 and 2 of 3 subjects of Trial and Control Groups, respectively.

This study suggests that local application of mesenchymal stem cells may yield different results than would their systemic administration.

Key Words: End to end carotid arteries anastomosis, mesenchymal stem cells, histopathological evaluation, thrombose.

1. GİRİŞ AMAÇ

Mezankimal kök hücreler non-hemotopoetik multipotent hücreler olup mezankimal ve mezankimal olmayan hücrelere değişebilme özelliğine sahiptirler. Rejeneratif tıpta uygulanım alanları her geçen gün artmaktadır. Mezenkimal kök hücrenin diğer bir özelliği ise uygulanan deneğin farmokolojik olarak immun suprese edilmesine gerek olmamasıdır. Hastalıklı doku ve zedelenmiş doku tamirinde, mezenkimal kök hücre o dokunun fonksiyonel hücresine dönüşebilme özelliğine sahiptir. Vasküler yapının zedelenmesi sonucunda mezankimal kök hücre davranış paterni birçok çalışmada araştırılmış olup farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak genel kanı vasküler restenoz oluşumunu engellediğidir.

Literatür tarandığında (pubmed, google) tam kat arter kesi sonucunda lokal olarak uygulanmış mezankimal kök hücre çalışması saptanmamıştır. Bu çalışma bu açıdan oldukça değerli bilgiler verebilir. Bu çalışmada amaçlanan mezenkimal kök hücrenin arter katmanlarındaki (intima, media ve adventisya) etkileri ve anastomoz sonrası normal anatomik yapıya ne kadar yakın olduğunu histopatolojik olarak incelemektir. Yapılan bu incelemeler arterin her katı için ayrı ayrı ele alınarak bir skorlama oluşturuldu.

Mezankimal kök hücreler ile son dönemlerde yapılan çalışmalar zedelenmiş doku tamirinde umut verici deneysel ve klinik sonuçlar vermektedir. Mezankimal kök hücre hastalanmış veya hasar görmüş dokuya ulaşarak o dokunun hücre tipine uygun fonksiyonu yerine getirebilme kabiliyetine sahiptir (75). Ancak halen mezankimal kök hücrenin zedelenmiş damardaki stenoza etkisinin olumlu veya olumsuz olduğu net olarak bilinmemektedir. Chen ve arkadaşları rat aort'unda yaptıkları anjioplasti çalışmalarında Kontrol Grubuna oranla mezenkimal kök hücre verdikleri grupta damar restenozunda artma saptamışlardır (7). Ancak Wang ve arkadaşlarının yaptıkları rat femoral arteri tel ile zedeleme modelinde mezankimal kök hücrenin, zedelenmiş dokunun tamirini arttırdığı gözlenmiştir (14). Hashi ve arkadaşlarının çalışmalarında mezankimal kök hücreleri vasküler greftlere uygulanmış ve damar patensinin (akışkanlık) oldukça uzun sürdüğünü gözlemişlerdir (9).

Bütün bu bilgiler ışığında; lokal uygulanacak mezankimal kök hücrenin tam kat arter kesisi sonrası yapılacak olan anastomozun iyileşmesine katkısı Kontrol Grubu ile karşılaştırılarak ortaya konulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

2.1.1. Kök Hücre Tarihcesi

Kök hücre tarihçesi tıp bilimi tarihi düşünüldüğünde oldukça yeni sayılabilir. İlk kez 1878 yılında memeli yumurtalarını vücut dışında fertilize etme girişimleriyle başladığı düşünülmektedir. 1959'da Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk kez in-vitro fertilizasyonla tavşan oluşumu başarıldı. 1968 yılında Edwards ve Bavister in vitro olarak ilk kez insan yumurtasını fertilize ettiler (23). 1998'de Wisconsin-Madison üniversitesinde James Thomson ve ark.'ları, infertilite tedavisi gören çiftler üzerinde yaptığı çalışmada embriyonik kök hücrelerini ilk kez elde ettiler ve kültürde çoğaltmayı başardılar. Aynı dönemde Johns Hopkins Üniversitesinde John Gearhart primordial germ hücreleri olarak adlandırılan embriyonik germ hücrelerini fetal gonodal dokulardan izole etmeği başardılar. Bu hücrelerden yumurta ve sperm elde etmeyi başardılar (24).

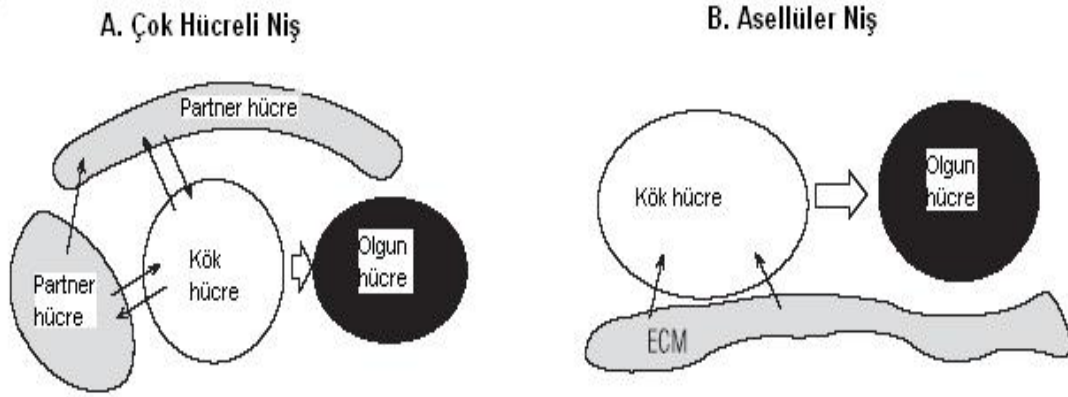
2.1.1.2. Kök Hücre Nedir?

Kök hücre canlı organizmada sürekli bölünerek kendini yenileyebilen ve gerekli uyaranlarla farklılaşarak başka hücre tipine dönüşebilen hücredir. Kök hücrenin belirlenmiş bir işlevi bulunmamaktadır. Kök hücre aldığı sinyal doğrultusunda hareket ederek çeşitli hücre tiplerine dönüşür.

Kök hücre tanım kriterleri:

1. Self- renewal: kendi kendini yenileyebilme yeteneği vardır.
2. Multi-lineage: tek bir hücreden birçok farklı hücre serisine farklılaşabilme yeteneği vardır.
3. Belli bir dokunun in-vivo fonksiyonel rekonstrüksiyonu; işlevsel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak heterojen bir topluluktur (25). Örnek hematopoetik kök hücrelerin heterojenitesi farklı belirteçler (CD34, CD38, c-kit, Sca 1 v.b.) taşımaları ile gösterilmiştir.
4. Uygun bir büyüme ortamına yerleşebilir ve bu ortamda çoğalabilme yeteneğine sahiptir.
5. Hasar sonrasında işlevsel doku oluşturabilir.

Bu özellikleri esnek ve geri dönüşümlü olarak kullanır. Kök hücrelerini destekleyen sınırlı fizyolojik mikroçevre “niş “ olarak adlandırılır. İlk kez Schofield tarafından ortaya atılmıştır. Niş, kök hücrenin yerleştiği bir bölgedir ve bu bölgede yer alan hücreler ile iletişimi içindedirler. Kök hücrelerin bulunduğu ortamda sinyal iletim yoluyla farklılaşmasını sağlayan destek hücre varlığı veya destek hücre yokluğuna göre 2 tip niş olduğu belirtilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Kök hücrelerin yakınında kaynak (partner) hücrelerin varlığına bağlı olarak tanımlanan niş tipleri. A. Çok hücreli niş: Tipik olarak birbirleri ve kök hücreler ile ilişkili iki ya da daha fazla tipte kaynak hücrelerinden oluşur. B. Asellüler (ekstrasellüler matriks) niş: Karakteristik özelliği kök hücre yüzeyinde özgül ekstrasellüler matriks (ESM) proteinleri ile etkileşen hücre adezyon moleküllerinin ifadenesidir.

Klinik kullanımda kök hücreler çoğalma yeteneğine göre iki gruba ayrılırlar;

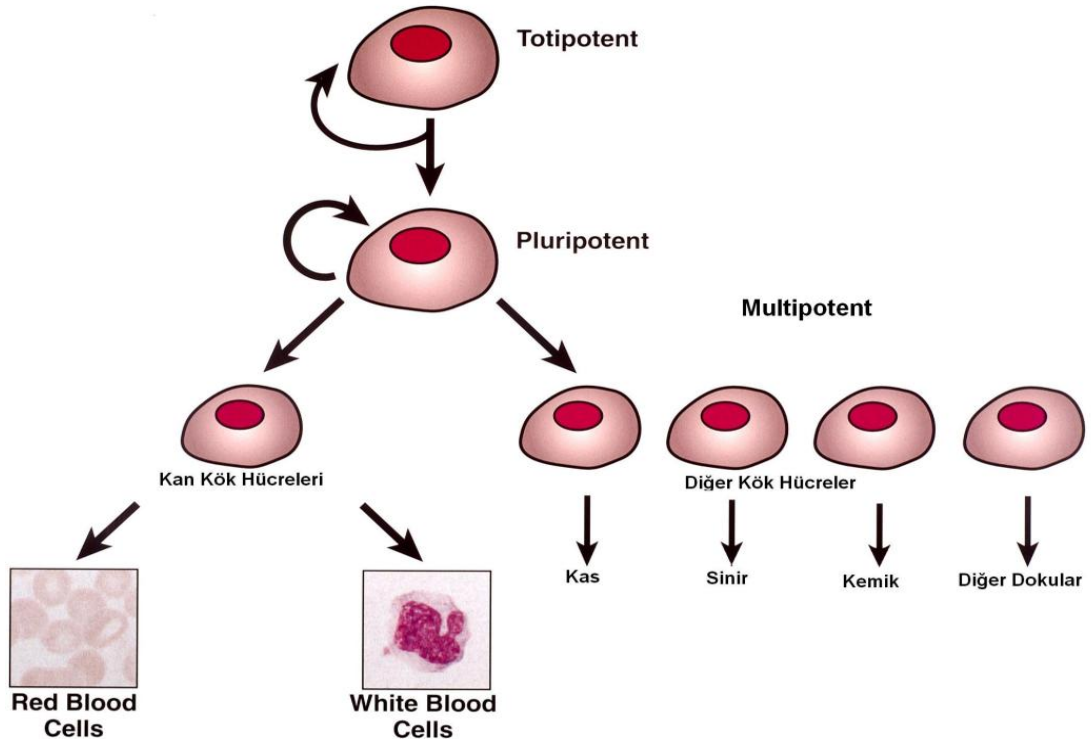
1. Potansiyel kök hücre: çoğalma yeteneğini durdurup sessiz hale gelebilen kök hücrelerdir.
2. Gerçek kök hücre: çoğalma yeteneğine sahip kök hücrelerdir.

Kök hücrelerde sonsuz çoğalma yeteneğine sahip değildir. Hücrelerin bölünme yeteneğini ve dolayısı ile ömrünü belirleyen etkenlerden en önemlisi doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve “telomer” adı verilen kısa DNA tekrar dizileri (insanda TTTAGG) ile beraberindeki protein yapılarıdır. Telomerin ana işlevi kromozom uçlarının parçalanmasını, dağılmasını ya da diğer kromozom uçları ile birleşmesini engelleyerek kromozomu genetik değişikliklere karşı korumaktır. Çevresel faktörler, hücre döngüsü ve oksidatif DNA hasarlanması gibi nedenlerden dolayı telomerik DNA her döngüde yaklaşık 35 baz çifti kadar kısalır. Bu nedenle telomer

kısalması hücre bölünmesini sayan bir saat gibidir. Her replikasyon sonrası telomer kısalmasını engelleyebilmek için telomeraz enzimi telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3' ucuna takarak kromozom kısalmasını engellemeye çalışır. İnsan germ, tümör ve kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği çok yüksektir. Bu nedenle telomeraz etkinliği kök hücrelerin bir belirteçidir ve telomeraz aktivitesinin yüksekliği çoğalabilme ve kendini yenileyebilme yeteneğini sağlar.

2.1.1.3. Kök Hücre Türleri

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre farklı özelliklere sahiptirler. Kök hücrelerin oluşum mekanizması belli bir hiyerarşik düzen içindedir ve bu hiyerarşik düzen içindeki konumuna göre her bir kök hücrenin farklılaşma potansiyeli bir diğerinden farklıdır (Şekil 2).



Şekil 2: Kök hücre hiyerarşi tablosu.

Bir kök hücrenin özelliklerinden olan farklılaşma, özelleşmemiş hücrelerin özelleşmiş hücrelere kaynaklık etmesidir. Bu kavramın içerisinde totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücre tipleri yer alır.

a. Totipotent kök hücreler

Her yönde farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme yeteneğinde olan kök hücrelerdir. Zigot, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonel hücredir. Bu hücreye her şeyi yapabilen anlamına gelen “*totipotent hücre*” denir. Bu terim embriyonun 5. gününe kadar tüm blastomerleri için geçerlidir (erken embriyonik dönem). Bu hücrelerin her birinden ayrı birey elde edilebilir (76).

b. Pluripotent kök hücreler

Gebeliğin 5. gününde “blastosöl” şekillenir. Embriyo bu dönemde blastosist olarak tanımlanır. Blastosist 3 yapıyı içine alır: Trofoblast, Blastosöl, Nodus embriyonalis. Blastosist hücreler pluripotent kök hücreler olarak sınıflandırılabilir. Bu hücreler, vücuttaki bütün dokulara kaynaklık edebilir fakat yeni bir birey meydana getiremez (76).

c. Multipotent kök hücreler

Fetal dönemde hücreler, biraz daha özelleşmiş erişkin kök hücrelerine dönüşür. Bu erişkin kök hücreleri de tipik olarak buldukları dokunun hücre tipini üretirler. Yani multipotent kök hücrelerin farklılaşması, daha sınırlı sayıda hücre dizesinedir. Bu tür hücrelere en iyi bilinen örnek, hematopoetik kök hücrelerdir (76).

2.1.1.4. Kök Hücre Tipleri Ve Kaynakları

Kök hücreler temelde iki kaynaktan elde edilirler:

1. Embriyonik kök hücre kaynakları:

- a. Abortus sonucu elde edilen fetal doku
- b. İn-Vitro Fertilizasyon (IVF) çalışmaları sırasında elde edilmiş embriyolar
- c. Sadece kök hücre elde etmek için oluşturulan embriyolar

2. Erişkin Kök Hücreler (ERKH)

- a. Dokulardan elde edilen kök hücre –erişkin kök hücre
- b. Göbek kordonu ve plasental kök hücre
- c. Kadavra kökenli kök hücre

- d. Partenot hücreleri (partenogenez-aseksüel) üreme: döllenmemiş yumurtaların in vitro olarak blastosist aşamasına kadar getirilerek pluripotent kök hücre serilerinin oluşturulması
- e. Fetus Kök Hücreleri

2.1.1.4.1. Embriyonik Kök Hücre

Embriyonik kök hücre, embriyonun blastokist aşamasında iç hücre kitlesinden ayrıştırılan ve in vitro şartlarda pluripotent özelliğini yitirmeden sonsuz sayıda bölünebilen hücredir.

Embriyonik kök hücrelerin üç önemli özelliği vardır:

1. Bu hücreler pre-implantasyon evresindeki embriyodan elde edilmelidirler
2. Farklılaşmadan çoğalabilirler
3. Üç germ tabakasının (mezoderm, endoderm, ektoderm) türevlerini de oluşturabilme potansiyellerine sahiptirler.

2.1.1.4.2. Erişkin Kök Hücreler (ERKH)

Erişkinde farklılaşmış (diferansiye) bir dokuda (kan, kemik iliği) bulunan indiferansiye hücrelerdir. Bu hücrelerin gerçekte görevleri dokunun devamlılığını sağlamak ve gerektiğinde dokuyu tamir etmektir. Somatik kök hücre terimi de ERKH yerine kullanılabilir. Organizmada kök ve öncül hücrelerin sayısı yaş ile ters orantılıdır. Bu nedenle vücudun yenilenme yeteneği yaş ilerledikçe erişkin kök hücrelerin sayısı ile orantılı olarak azalır. Vücutta dokuların yerine konulması ve yenilenmesinde iki temel mekanizma vardır: birincisi, farklılaşmış hücrenin çoğalma kapasitesinin artmasıdır (örn. Karaciğer, iskelet kası, damar endotel hücreleri). İkincisi, farklılaşmamış hücrelerin bir sistem dâhilinde farklılaşarak yenilenmeyi sağlamasıdır (örn. Hematopoetik kök hücre).

Erişkin kök hücreler farklılaşmadan önce progenitör hücreler olarak kaldıkları dönemde sınırlı çoğalma ve sınırlı fenotipik özelliklerinin imkân verdiği ölçüde bir işleme safhasından geçerler. Olgun dokulardaki hücrelerin bir kısmı çevrelerine uyum sağlamış, bölünmeden sessiz bekleyen, çeşitli fenotipik ekspresyon özellikleri gösteren progenitör hücrelerdir.

Erişkin Kök Hücre Tipleri ve Kaynakları

1. Germ Hücre Kökenli
 - a. Spermatogonial kök hücre
 - b. Oogonial kök hücre
2. Somatik Hücre Kökenli
 - a. Hematopoetik kök hücre
 - i. Kemik iliği kaynaklı hematopoetik kök hücre
 - ii. Periferik kan kaynaklı hematopoetik kök hücre
 - iii. Kordon kanı kaynaklı hematopoetik kök hücre
 - b. Mezenkimal kök hücre
 - i. Kemik iliği stroma kaynaklı mezenkimal kök hücre
 - ii. Diğer tüm organ ve dokulardaki stroma kaynaklı mezenkimal kök hücre
 - c. Karaciğer kök hücreleri
 - d. Nöronal kök hücreler
 - e. Epidermal kök hücreler
 - f. Göz kök hücreleri
 - g. Pankreas kök hücreleri
 - h. Bağırsak kök hücreleri

2.1.2. Mezenkimal Kök Hücre

Kİ ve diğer stromal dokulardan köken alan kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler mikroçevre ve sitokin desteği ile osteoblastlere, adipositlere, kondrositlere, kas hücrelerine, glial hücrelere ve hemen bütün mezental hücrelere dönüşebildiği gösterilmiştir (26, 27, 28). Kİ organizmanın en önemli kök hücre kaynaklarından biridir ve mezodermden köken alan hematopoietik, endotel ve MKH'leri içerir. Kİ mikroçevresinin bileşenlerinden olan MKH'ler hematopoezin gerçekleştirilmesinde önemli bir yere sahiptir.

Stromal kökenli MKH'lerin görevleri: Hemopoetik kök hücre (HKH)'nin stromaya tutunması, salgıladıkları çeşitli sekretuar faktörler ile hematopoietik progenitör hücrenin olgun hücreye farklılaşması, yine bu salınan faktörlerin inhibisyonu

ile kök hücrenin G₀ fazında kalarak kendi rezervini oluşturması, kendini yenilemesi, diğer dokulara mobilizasyonu ve migrasyonu gibi farklı biyolojik işlevleri vardır.

Mezenkimal kök hücreler başlıca iki kaynaktan bulunur:

1. Kemik iliği stroması
2. Diğer tüm organ ve dokulardaki stroma

Kemik iliği stroması, retiküler hücreler, adipositler, osteojenik hücreler, düz kas hücreleri, endotelial hücreler ve makrofajları da içeren heterojen bir hücre topluluğundan oluşmuştur. Kararlı durumda ya da doku hasarına yanıt olarak, stromal dokunun “turnover”ı ya da onarımı stromal dokuda bulunan kök hücre topluluklarının katılımı ile gerçekleşir. Kemik iliği stroması dışında, MKH’ler birçok organ ve dokuda bulunur. Bu hücreler konnektif doku hücrelerine dönüşerek stromayı oluşturmada, organ işlevlerinin yürütülmesinde önemli roller üstlenmektedirler. Diş pulpası, kas, kemik, kordon kanı, kordon stroması, deri, amnion sıvısı, periferik kan, sinoviyal sıvı gibi çok çeşitli alanlardan izole edilebilirler. Bu dokulardan elde edilen MKH’lerin kökenleri ne olursa olsun biyolojik ve fonksiyonel özellikleri çok benzerdir. Mezenkimal kök hücreler multipotentdir; kıkırdak, kemik, kas, tendon, ligament-, adipoz doku, sinir hücreleri, pankreas B hücreleri ve endotele farklılaşabilir. MKH’in in-vitro ve in-vivo çalışmalarda yalnızca mezodermal değil, endodermal dokulara da kaynaklık edebilen nadir pluripotent hücreler (erişkin multipotent progenitor hücre) olduğunu gösteren kanıtlar vardır.

Klinik çalışmalarda MKH tercih edilmesinin nedenleri:

1. Elde edilmesinin kolaylığı,
2. Hematopoetik kök hücreler ile yakın ilişkisi ve hematopoezde önemli fonksiyonları olması.
3. Hematopoetik kök hücrelerin biyolojisi ve klinik sonuçları iyi bilinen hücreler olması nedeniyle Kİ kaynaklı MKH’ler kullanılır.

Kemik iliği kökenli Mezenkimal kök hücreler iki farklı kök hücre kavramından oluşur:

1. **Bağlı olmayan (yönlendirilmemiş) MKH'ler;** koloni oluşturma kapasitesi düşük, granülsüz hücrelerle bir arada bulunan, geri dönüşüm yapabilen ve bir hücre döngüsü antijeni olan Ki-67'ye karşı yanıtız olan hücrelerdir.
2. **Bağlı (yönlendirilmiş) MKH'ler;** ise hızla çoğalan, koloni oluşturma kapasitesi yüksek olan hücrelerdir.

MKH'ler ile yapılan hücre döngüsü çalışmalarında hücrelerin büyük çoğunluğunun G0/G1 fazında beklediğini, %10'luk bir kısmının da S+G2+M fazında olduğunu göstermiştir. G0/G1 fazında bekleyen hücrelerin çoğunlukta olması bu hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir. İn-vitro olarak çoğaltılan MKH'in spesifik yüzey belirteçleri yoktur. CD34, CD45, CD11b/c ve gibi HKH belirteçleri negatif, CD105 (SH2-Endoglin), CD73 (SH3/SH4), CD44 (HCAM-1), CD90 (Thy-1), STRO-1 (fibroblast yüzey belirteçi), CD106 (VCAM-1) gibi belirteçler de pozitifdir. Kültürde çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri (Tablo 1)'de verilmiştir.

Tablo 1: Kültürde çoğaltılan mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik  zellikleri.

Antijen	CD numarası	Ekspresyon
VLA-2	CD49b	Pozitif
VLA-4	CD49d	Negatif
VLA-5	CD49e	Pozitif
LFA-1	CD11a	Negatif
E-selektin	CD62E	Negatif
P-selektin	CD62P	Negatif
L-selektin	CD62L	Negatif veya pozitif
PECAM	CD31	Negatif
LFA-3	CD58	Negatif veya pozitif
ICAM-1	CD54	Pozitif
ICAM-2	CD102	Pozitif veya negatif
ICAM-3	CD50	Pozitif veya negatif
VCAM-1	CD106	Pozitif veya negatif
HCAM-1	CD44	Pozitif
	CD34	Negatif
	CD45	Negatif
	CD14	Negatif
	CD13	Pozitif
Transferin reseptör	CD71	Pozitif veya negatif
Thy-1	CD90	Pozitif
Endoglin, SH2	CD105	Pozitif
SH3	CD73	Pozitif
SH4	CD73	Pozitif
HLA ABC		Negatif veya pozitif
HLA DR		Negatif

MKH'ler birçok büyüme faktörünü (GM-CSF, G-CSF, M-CSF gibi), reseptörlerini, çeşitli interl kinleri (IL-6, IL-7, IL-8, v.b.), reseptörlerini, hücre dışı matriks proteinleri (kollegen, fibronektin, laminin gibi) ve adezyon kuvvet moleküllerini sentezleme yeteneğine sahiptirler.

MKH'in değişik uyarınlarla çeşitli hücre tiplerine farklılaştığı ve bu hücrelerin işlev gördüğü birçok çalışma ile gösterilmiştir. MKH'in farklılaşma çalışmaları arasında en çok osteojenik ve adiposit hücrelere farklılaşma çalışılmıştır. Bu çalışmalarda Bone Morphogenic Protein (BMP) ve Transforming Growth Factor (TGF) ailesi ve sinyal ileti yolları analiz edilmiştir.

MKH'de immünojeniteyi sağlayan HLA-DR ve ko-stimülatör molekül ifadenmesi olmadığı için immünojenite düşüktür. İmmünsüpresif etkiyi yapan ise T lenfosit aktivasyonu, alloreaktif reaksiyonların önlenmesi, B lenfositlerin inhibisyonu, düzenleyici T hücrelerinin uyarılması ve solubl faktörlerin varlığıdır.

MKH'ler farklılaşma potansiyelleri (multipotent olmaları) ve immunsüpresif etkileri nedeniyle hücrel tedavilerde diğer KH türlerine göre daha çok tercih edilirler.

Klinikte, hücrel tedavilerde MKH tercih edilmesinin diğer nedenleri şunlardır:

1. Yüksek farklılaşma potansiyelleri: Mezodermal dokuların dışında diğer germ tabakalarına da farklılaşma,
2. Stromal kaynaklı oldukları için tüm doku hücrelerine destek hücre olarak, fonksiyon ve gelişimlerinde katkıda bulunma,
3. Hasarlı dokuya ulaşmada migrasyon yeteneklerini kullanma,
4. Gen tedavisine uygun olma (transfer kolaylığı, hızlı çoğalma ve dayanıklılık),
5. Füzyon yeteneği,
6. Enzim defekti olan hastalıklarda enzim üreten hücre olma,
7. İmmünsüpresif ve immünojenitesinin düşük olması nedeniyle doku uygunluğunun aranmaması,
8. Kemokinler, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile hücre ve /veya dokuda destek hücre olarak onarım, olarak sıralayabiliriz.

MKH'ler klinik kullanımda bu avantajları nedeniyle diğer kök hücre çeşitlerine göre avantajlı görünse de bazı teknik nedenler yüzünden dezavantajlı tarafları da vardır.

Klinikte MKH kullanımındaki dezavantajları:

1. Az sayıda oldukları için in-vitro ortamda çoğaltılmaları gerekir.
2. İn-vitro kültür ortamında kullanılan malzemeler ve uzun süreli kültür yapmanın dezavantajları (mikroorganizma kontaminasyonu, sitogenetik instabilite)
3. Tekrarlayan transplantların gerekmesi, direk hasarlı dokuya vermenin avantajlı olduğu durumlarda özel yöntem gerektirmesi

2.1.2.1. Klinikte Mezenkimal Kök Hücrelerin Başlıca Kullanılma Amaçları

1. Organ ve doku tamiri: MKH'in hayvan çalışmalarında kullanıldığı çok çeşitli organ hasarı ve hastalık modeli vardır (30,31).
2. Organ ve doku nakli: İmmünespresif etkisi ve özellikle HKH nakillerinde stromal destek sağlaması nedeniyle organ ve doku nakillerinde sıkça kullanılmaya başlanmış en çok da allojenik transplantasyonlar da Gravit Versus Host Hastalığı'nda (GVHH) iyi sonuçlar alınmıştır (32).
3. Otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanım: İmmünespresif etkisi nedeniyle kullanılabilceği düşünülmektedir Organ-doku nakilleri ve tamirinde birlikte kullanım: Çeşitli metabolik hastalıklarda, Kİ nakli ile birlikte MKH nakilleri denenmiştir. SLE de başarılı olmuştur (33). Diyabet tedavisinde birçok klinik çalışmada başarı sağlanmıştır (36, 37).
4. Çeşitli tümörlerin, kalıtsal hastalıkların tedavisinde (özellikle enzim bozukluklarında) ve yine bir tedavi yöntemi olarak gen terapi de hedef hücre olarak kullanım: Deneysel Lökodistrofi tedavisinde başarı sağlanmıştır (36).

2.1.2.2. Mezenkimal Kök Hücrenin Arter Duvarına Etkisi

Günümüzde doku ve hücre tamirinde mezenkimal kök hücrelerin etkileri her geçen gün daha çok laboratuarda araştırılmaktadır. Etki mekanizmaları tam olarak anlaşılabilmesi için birçok deney yapılmaktadır. Bütün bu deneylerin sonucunda mezenkimal kök hücrelerinin genel bir tamirci hücre olduğu, doku tamiri veya yeniden doku modellenmesi gereken bölgede bulunduğu gösterilmiştir (35, 37). Mezenkimal

kök hücreleri ilk önce kemik iliğinde olduğu saptanmıştır ancak günümüzde birçok dokuda da var olduğu gösterilmiştir (38, 39). Arter duvarında tunika media ilk bakışta homojen bir görüntü verse de tunika mediadaki kas hücreleri heterojen olduğu ve kültür ortamında hücrelerin farklılaştığı gösterilmiştir (40, 41).

Bu farklılaşma, tunika mediadaki bu kas hücrelerin mezenkimal kök hücre alt grubu olmasından kaynaklanmaktadır. Son yıllardaki in-vivo çalışmalarda hasarlı dokulara, arter duvarında ki hücrelerinin dolaşım sistemi içine göç ettiği ve kemik iliğinden gelen mezenkimal kök hücrelerden daha farklı olduğu gösterilmiştir (42, 43).

Kemik iliğinden alınan kök hücrelerin damar hücrelerine dönüşme potansiyeli bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerinin kültür ortamında damar düz kaslarına dönüştüğü gösterilmiştir (38, 44).

Yine başka bir çalışmada kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerinin hasarlı damarlarda, damar düz kas hücrelerine ve endotel hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir (44). Kök hücreler hasarlı damar tamirinde rol alırlar ve normal vasküler doku oluştururlar, ancak ektojik doku ve ateroskleroza neden olabildikleri de bilinmektedir. Ektojik doku ve ateroskleroz oluşturma nedenleri metabolik hastalıklar ve diabet suçlansa da mekanizması tam olarak bilinmemektedir (42). Bütün bu çalışmaların sonucunda yetişkin arter duvarı mezenkimal kök hücre için hem alıcı hem de kaynak olduğu anlaşılmaktadır. Doku yaralanması olduğunda yağ dokusu, kas, damar duvarı ve özellikle kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri dolaşıma katılarak yara iyileşmesinde önemli rol alırlar (42).

2.2. Deney Hayvanı

2.2.1. Cerrahi Araştırmalarda Hayvan Kullanımı

Tıbbi araştırmaların kaçınılmaz bir basamağı hayvanların deneysel amaçlarla kullanımınıdır. Bu basamak, gönüllü bile olsalar insanlarda kullanılması mümkün olmayan kontrollü, ileriye dönük (prospektif) hastalık ya da ameliyat modelleri üzerinde araştırmalar yapmak, klinikteki sorunları deneysel ortamda hazırlanan senaryolar çerçevesinde ele alıp çözümler üretmeye çalışmak için gereklidir. Modern tıbbın birçok ilerlemeyi hayvanlar üzerinde yapılmış deneylere borçlu olduğu gerçeği inkâr edilemez.

Ancak hayvanlar üzerinde tıbbi amaçlı araştırma yapmak hayvanlara eziyet anlamına gelmez (46).

Russell ve Brunch 1959 yılında hayvanlar üzerinde yapılacak deneylerde gözetilmesi gereken etik ilkeleri basitçe “3R” ile formüle etmişlerdir. İlk “R” “*replacement*” ilkesini ifade eder. Bunun anlamı, mümkün olan her koşulda canlı hayvan yerine “cansız model” kullanarak çözüm aramaktır. Cansız modeller çoğu zaman cerrahi araştırmalarda gerekli olan karmaşık fizyolojik süreçleri araştırmak için yetersiz kalmalarına rağmen eğitim amaçlı bazı çalışmalarda mümkün olabilir. İkinci “R” “*reduction*” karşılığıdır. Reduction yada “sayıca azaltma” araştırmacının tutarlı bir istatistiksel sonuç alabileceği yada en fazla bilgiyi sağlayabileceği en az sayıda hayvan kullanması gereğine işaret eder. Üçüncü ve belki de en önemli “R” ise “*refinement*” ya da “nezaket” olarak belirlenir. Bu terim hayvana verilecek ağrı ve eziyeti en aza indirecek yöntemleri kullanmak gerektiğinin ifadesidir (46).

2.2.2. Deney Hayvanı Olarak Rat Kullanımı

Literatürde yapılacak üstünkörü bir tarama bile deneysel mikrocerrahide en sık kullanılan hayvanın sıçan olduğunu ortaya koyar. Bunda şaşırtıcı bir yan yoktur. Laboratuvar sıçanları kolay ve hızlı üreyebilen hayvanlar oldukları için deneysel amaçla edinilmeleri zor değildir. Sıçanlar küçük ve dayanıklı hayvanlardır ve bu sayede çok sayıda hayvana uygun bakım ve beslenme koşulları daha kolay ve düşük maliyetle hazırlanabilir. Ayrıca deneysel amaçlı kullanımlarının rahat olması ve cerrahi araştırmaların nispeten basit koşullarda yürütülebilmesi en önemli üstünlükleridir. Bakım kolaylıkları sayesinde temel şartlara sahip herhangi bir laboratuvarında bu hayvanla çalışmak için uygun ortam kolayca bulunur. Bu nedenlerle sıçan, çok sayıda hayvan kullanılması gereken çalışmalarda hem en pratik hem de en ekonomik seçenektir (22).

2.2.3. Deney Hayvanında Arter Anastomozu

2.2.3.1. Arterler

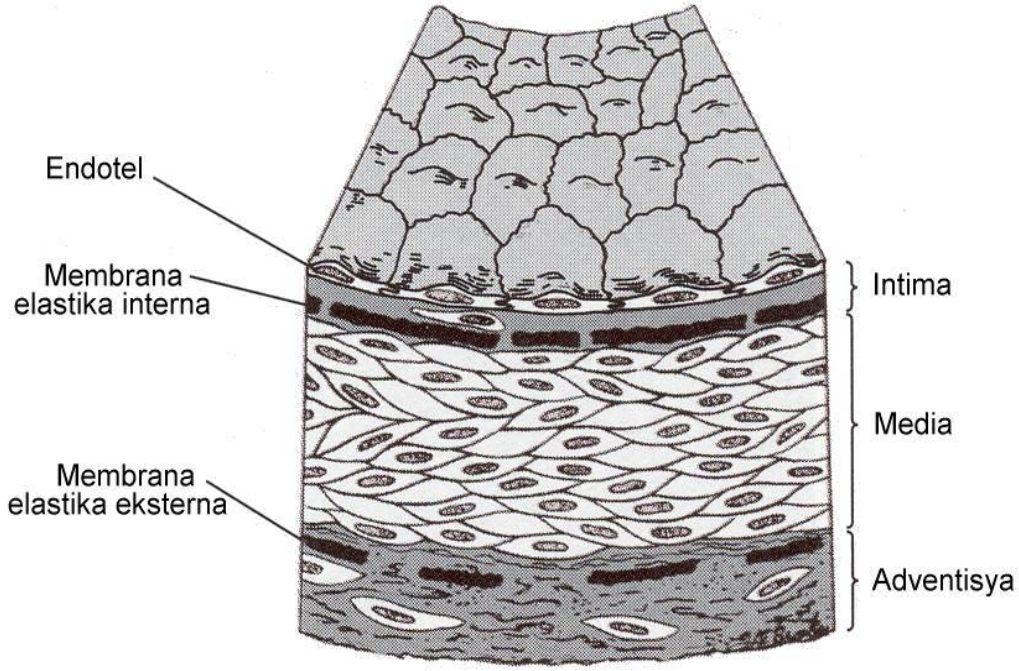
Memelilerde ihtiyaç duyulan besin, oksijen, hormonlar, protein yapı taşları ve kanın şekilli elamanlarını vücudun bütün bölümlerine ulaştıran kan damarlarıdır.

Kalbin pompaladığı kanı kapiller yatağa götürürler ve kalpten uzaklaştıkça çapları azalmaktadır. Arterler kalpten uzaklıklarına göre üç farklı şekilde sınıflandırılırlar. Bunlar, büyük tip arterler, orta tip arterler ve küçük tip arterlerdir (47).

1. **Büyük tip arterler:** Aorta, arteria pulmonalis, arteria carotis communis, arteria subclavia ve arteria iliaca communis.
2. **Orta tip arterler:** Arteria brakialis, arteria femoralis, arteria radialis ve dalları.
3. **Küçük arterler:** Çapları daha küçük ve duvar yapıları daha ince olan arterler.

2.2.3.2. Büyük Tip Arterler

Büyük tip arterler elastik arterler veya iletiler arterler olarak ta adlandırılmaktadır. Bu arterlerin media tabakasındaki elastik fibriller oldukça fazladır. Kalbin sistol esnasında bu elastik fibriller uzar ve diastolde bu fibriller geri çekilerek kan basıncının korunmasını sağlarlar. Bu sayede büyük tip arterler kalp atışlarının aralıklı olmasına rağmen kan akımının devamını sağlayarak yardımcı pompa görevini gerçekleştirirler. Büyük tip arterlerin çapları duvarlarına göre daha kalındır. Büyük tip arterler 3 tabakadan oluşur; bunlar tunika intima, tunika media ve tunika adventisyadır (Şekil 3)'te büyük arter tabakaları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3: Büyük arter tabakaları (Ross R, Glomset J.A; The pathogenesis of atherosclerosis, N Engl J Med 1976; 295:369 alınmıştır.)

Arterlerin tabakaları:

1. **Tunika intima:** Lümeneye bakan kısımda endotel hücre dizisi, hemen altında bazal lamina ve fibroelastik bağ dokusundan oluşan subendotelyal tabaka vardır. Subendotelyal tabakanın üstünde lamina elastika interna mevcuttur. Lamina elastika interna, elastik fibrillerin yoğunlaştığı bir tabakadır. Bazal membran ve endotel katmanlarını birbirinden ayırır. Bazal membranın beslenmesine yardımcı oluklar içerir. Literatürde ve deneysel çalışmalarda, lümeden lamina elastika interna'ya kadar olan kısım neointima olarak adlandırılır.
2. **Tunika media:** İnternal elastik laminadan, external elastik laminaya kadar olan kısmı içerir. Arterlerin en sağlam katmanıdır. Sirküler olarak seyreden düz kas hücrelerinden meydana gelir. Bu tabakada çok sayıda elastik membran bulunmaktadır. Bu membranlar arasında kollajen fibriller ve düz kas hücreleri mevcuttur. Bu kas hücreleri elastin, kollajen, proteoglikanlar üretirler. Ekstrasellüler matriks düz kas hücreleri tarafından oluşturulur. Düz kas hücreleri sinirsel uyarılara yanıt vererek damarın çapını daraltarak damardan geçen kan akımını azaltabilir. Elastik fibriller ise damarın daralması ve genişlemesi arasında uyumu sağlar. Kollajen fibriller ise damara gerilme

kapasitesini kazandırır. Kollajen fibriller ileri derecede trombojeniktir. Kollajen fibriller kan akımıyla temas etmeleri durumunda trombosit yapışmasını tetikler ve ekstrinsik pıhtılaşmaya neden olur.

3. **Tunika adventisya:** Arterin en dış tabakası olup kollojen ve elastik fibrillerin longitudinal olarak seyretmesi ile oluşur. Büyük tip arterlerde diğer arterlere oranla daha incedir. Kollojen fibriller damarların sistolde aşırı dilate olmasını engeller. Bu tabakada ayrıca fibroblastlar, düz kas hücreleri, bağ dokusu hücreleri, vaza vazorumlar ve sinirler mevcuttur. Tunika adventisya da tunika media yakınında ki bölgede çevre bağ dokusu ile devam eden elastik fibrillerden oluşan lamina elastika externa mevcuttur. Damar anastomozu esnasında adventisya tabakasının fazla diseke edilmesi tunika mediada hasar oluşturur. Tunika adventisya da kollojen fibriller olması nedeniyle trombojeniktir.

2.2.3.3. Arter Anastomozun İyileşmesi Mekanizması

Vasküler rekonstrüktif girişimlerden sonra, arterde oluşan iyileşme mekanizmasının iyi bilinmesi oluşacak komplikasyonların önlenmesi açısından hayati önem taşır. Birçok klinik gereksinim ve deneysel araştırmalar için vasküler anastomozlar günümüzde sıklıkla uygulanmaktadır. Operatif veya travmatik olarak arterin hasar görmesinin ardından her organizmanın öncelikli görevi kanamayı durdurmak ve bozulan anatomik bütünlük ile fonksiyonel yapının onarılmasını sağlamaktır (48, 49, 50).

Lokal hasarda organizmanın ilk cevabı inflamasyon sürecinin başlamasını sağlamak ve rejenerasyon ile doku ve hücre bütünlüğünü yeniden oluşturmaktır (41). Hasar gören damarlarda 5-10 dakikalık geçici vazokonstriksiyon oluşur (51, 52, 53, 54).

Vazokonstriksiyonun nedeni hemoztazın sağlanması ve kan akımının miktarının azaltılmasıdır (55, 56). Vazokonstriksiyon ile eş zamanlı olarak damardan çıkan trombositler endotel altındaki kollejen ile teması sonucunda trombositler küsmeleşir ve hegamam faktörünün aktifleşmesiyle pıhtılaşma mekanizması harekete geçer (52, 53, 54, 55, 56, 57). Aktive olan trombositler granüllerinde bulunan büyüme faktörünü (PDGF), transforme edici faktörü (TGF- β), trombosit faktör IV, fibrinoktin, serotonin, tromboksan A₂, fibrinojen, von Willebrand faktör ile tümör nekroz faktörü – alfa (TNF-

α) ve interlekin-1 (IL-1), gibi sitokinleri salgılar. (52, 58, 59, 61). Bu salgılanan faktör ve sitokinler damar iyileşmesinde erken ve geç dönemde rol alırlar.

Vasküler rekonstrüksiyon girişimlerden sonra akut trombüs oluşumuna bağlı ani tıkanma ve geç dönemdeki daralma veya restenoz nedeni; düz kas hücre migrasyonu, proliferasyon ve ekstrasellüler matriks birikimi sonucu oluşan neointimal hiperplazidir (62, 63, 64).

Hiperplastik tunika intima kalınlaşması; arterin, hemodinamik strese karşı normal adaptasyonu olduğu kadar, arteriyel yaralanmanın karakteristik bir özelliğidir. Arteriyel anastomozun başarısız olmasının en önemli nedeni, erken ve geç dönemdeki akut trombotik tıkanma ve restenozdur. Trombüs oluşumunun engellenebilmesi için heparin kullanılması birçok cerrahi merkezde rutin bir uygulamadır. Düz kas hücre proliferasyonunun engellenebilmesi için birçok farmakolojik ajan kullanılmış ancak şu ana kadar etkili bir ajan bulunamamıştır (62, 65, 66) .

2.2.3.4. Arter Anastomozunda Sütür Ve Arter Seçiminin Önemi

Mikrovasküler anastomoz tekniğinin tanımlanması, mikrocerrahide en kritik cerrahi basamaklarından biri olmuştur. İlk damar anastomoz tanımı Alexis Carrel tarafından yapılmıştır (67, 68). Carrel tarafından ortaya konulan prensipler doğrultusunda ilerleyen mikrocerrahi deneyimi, gelişen teknolojiyle birlikte yeni sütür materyelleri, cihazları, ilaçlar bulunmuştur. Mikrovasküler anastomozda bütün amaç anastomoz sonrası damar patensini en yüksek yapan, damarı normal anatomik yapısına en uygun şekilde kavuşmasını sağlayan, lümeninde en az trombus oluşturucu, kolay öğrenilebilir, hızlı uygulanabilir ve maliyeti en ucuz olan tekniklerin geliştirilebilmesidir.

Arteriyel rekonstrüksiyonlarda aşırı intimal hiperplazinin nedeni olarak ön planda hemodinamik değişiklikler sorumlu tutulmaktadır. Anastomoz hattından geçen akımın türbülansı, basınç farkları ve damar duvarına uygulanan gerilme kuvveti intimayı uyarak, düz kas hücre proliferasyonuna yol açar (69). Hemodinamik değişikliklerin yanında yabancı madde karakterinde olan dikiş ve greft materyalinin yol açtığı immun reaksiyonlar ve endotel hasarı da neointimal hiperplazi gelişiminde rol oynar.

Arteriyel hasar oluştuktan sonra, bu bölge trombositlerle kaplanır. Adezyon sonrası trombositler granüllerindeki vasoaktif ve trombotik faktörleri (serotonin, ADP, fibrinojen, Von Willibrand faktör) ve ayrıca büyüme faktörlerini (platelet-derived growth factor, transforming growth factor, epidermal growth factor) salgırlar (70). Büyüme faktörleri düz kas hücre proliferasyonunu başlatırlar. Hasara cevap olarak media tabakasında çoğalmaya başlayan düz kas hücreleri, intimaya göç ederek intimal hiperplaziye neden olurlar. Farklı uyarılar, trombositleri farklı derecede uyarırlar. Bu nedenle değişik dikiş materyalleri damar duvarında yaptıkları hasara ve trombojenitelerine bağlı olarak trombositleri farklı derecede uyararak, neointimal hiperplazi oluşumuna değişen oranlarda sebep olacaklardır. Polipropilen 1962'den beri gerilim kuvvetini koruması, dış yüzeyinin düz olup minimal doku reaksiyonuna sebep olması, kullanım kolaylığı ve esnekliği gibi nedenlerden dolayı en yaygın kullanılan anastomoz materyalidir (72). Önemli dezavantajı ise yaşam boyu dokuda yabancı cisim olarak kalmasıdır.

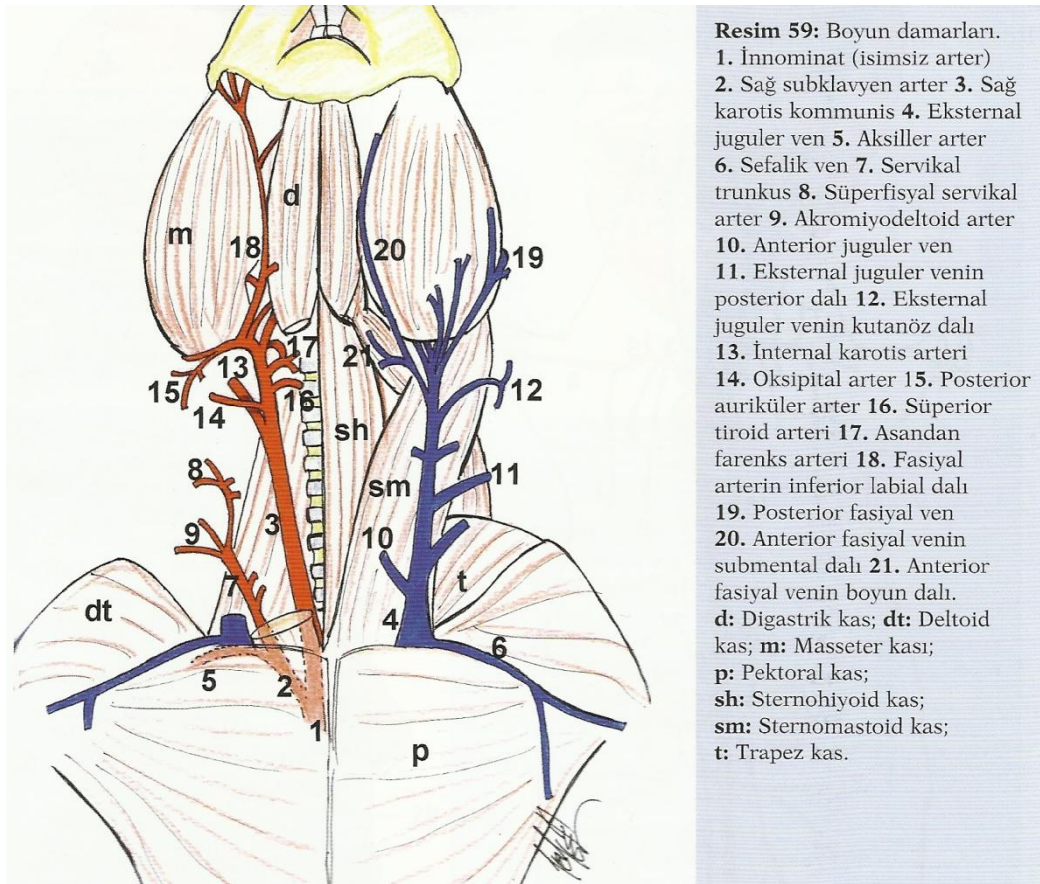
Yaptığımız çalışmada proleni seçme nedenimiz monofilament yapılı ve son derece hareketsiz oluşu, yüksek gerilme mukavemetini koruması, doku reaksiyonunun çok az olması ve diğer sentetik absorbe edilemeyen ameliyat ipliklerinin çoğundan daha iyi düğüm tutma özelliğinin olmasıdır (18). Uç uca anastomoz mikrocerrahi araştırmalarında en sık kullanılan yöntemdir (52). Sıklıkla sıçanlarda femoral arter veya karotis arter tercih edilmektedir. Yaptığımız deneysel çalışmada Sprague-Dawley rat kullanıldı.

Çalışmamızda karotis arter kullanma nedenlerimiz:

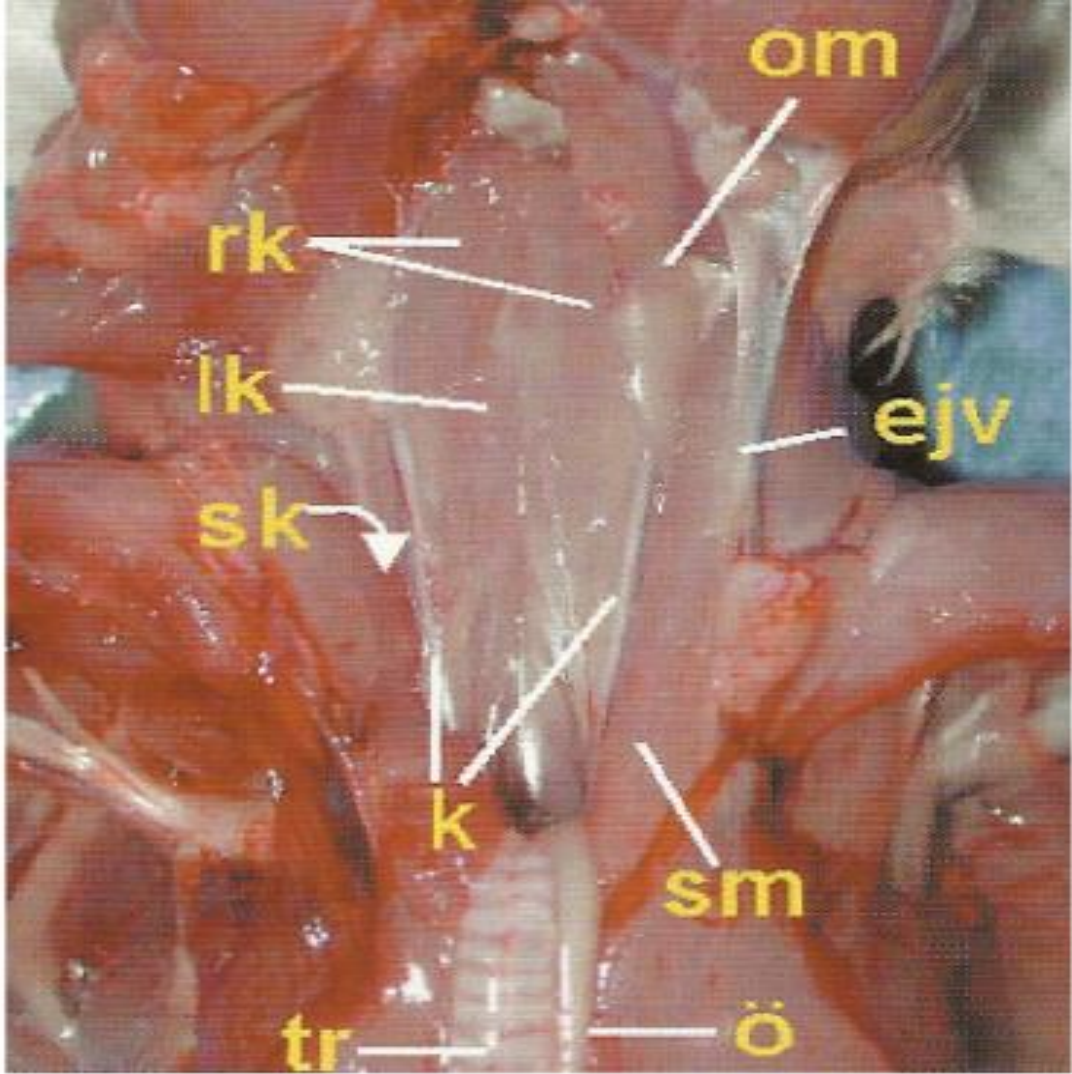
1. Karotis arter dış çapının daha geniş olması. (Sprague-Dawley rat femoral arter dış çapı 0,8-1mm ve karotis arter dış çapı 1- 1,1mm).
2. Femoral arterin debisinin karotis artere oranla daha az olması, bu nedenle spazm yeteneğinin daha fazla olması.
3. Tunika media tabakasının karotis arterde daha kalın olması.
4. Yapılacak teknik hata sonucunda karotis femoral arterde tıkalıcı trombüs olma ihtimalinin daha fazla olması.

2.2.4. Rat Anatomisi

Ratlarda karotis arter tüm memelilerde olduğu gibi beyne giden kanın önemli bir miktarını taşır. Ratların önemli bir özelliği posterio sirkülesyonu sağlayan vertebral arter sistemi, karotis arter devre dışı kalsada beynin beslenmesine yeterlidir. Bu sayede karotis artere uygulanacak anastomozlar daha az mortalite ve morbiditeye neden olur. Ancak karotis diseksiyonu çok dikkatli yapılmalıdır, çünkü diseksiyon esnasında trakea ve N. Vagus zedelenabilir. Karotis arter diseksiyonu esnasında boynun fazla gerilmesi, servikal lukasyon veya trakea obstrüksiyonuna neden olup solunum bozulabilir. Karotis arter derin yerleşimli olası diseksiyonu zorlaştıran diğer bir nedendir. Rat boyun damarları Şekil 4'te gösterilmiştir. Şekil 5'te ise ratlarda karotid arter ile çevre yapıların ilişkisi gösterilmektedir.



Şekil 4: Rat boyun damarlarını gösteren anatomik illüstrasyonu (Deneysel Mikrocerrahi Mehmet Bayramiçi; 2005; s:154).



Şekil 5: Ratlarda boyun yüzeysel ve derin kasların, karotis kommunis arter ile ilişkisi. Trakea ve özofagus uzaklaştırıldıktan sonraki görünüm. ejv: eksternal juguler ven, sm:sternomastoid kas, om: omohyoid kası, rk: rektus kapitis kası, lk: longus kapitis kası, sk: Skalenyus kası, k: A. Karotis kommunis ve n. vagus, tr: trakea, ö: özofagus (Deneysel Mikrocerrahi Mehmet Bayramiçli; 2005; s:135).

Rat'lar üzerinde yapılan deneysel çalışmada; rat anatomisine tam hakim olmak cerrahiden kaynaklanan mortalite ve morbidite risklerini azaltmak açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda 24 adet rat kullanılmış ve her birini sağ karotis arter tam kat kesisi sonrası uç uca anastomozu gerçekleştirilmiştir. Deneklerin cerrahi esnada hemodinamiğini bozacak ölçüde kan kaybı olmadı. Kontrol Grubunda iki rat'da aspirasyon sonrası solunum sıkıntısı gelişti. Derin trakeal aspirasyon sonrası rat'ın solunum paterni'nin düzenli olduğu görüldü. Cerrahi sonrası takiplerde herhangi bir komplikasyona rastlanmadı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırmaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi etik kurulu onayı alınarak başlanmıştır. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisinin bilimsel araştırma projesi (BAP) desteği ile çalışmada kullanılan denekler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Cerrahi işlemler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde uygulanmıştır. Kök hücre elde edilmesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında, Histopatolojik işlemler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yapılmıştır.

3.1. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Deneklerde kullanılan mezenkimal kök hücre, 19 Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik ünitesinden temin edilmiştir.

Kök hücre elde edilmesi sırasındaki aşamalar aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

Kemik iliği vericisi olarak 5 adet erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı. Bu sıçanlardan eter inhalasyonu ile anestezi altında her birinden 8-10 ml olmak üzere eksternal intrakardiyak yol ile kan alındı. Alınan kanlar 4000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilerek otolog serum elde edildi. Eter inhalasyonuna devam edilerek öldürülen Hhayvanlarının femur, tibia ve humeruslarının medüller kavitelelerinden yıkama yöntemi kullanılarak kemik iliği alındı. Bu işlem sırasında önceden heparinle yıkanmış dulbecco's modified eagle's medium-low glucose (DMEM-LG) çekilmiş insülin enjektörleri kullanıldı. Her kemik için 1 cc toplamda ise hayvan başına 8-12 cc DMEM-LG kullanıldı. Hücreler eşit hacimdeki Ficoll solüsyonu (1.077 g/mL) üzerine tüp içerisinde yayıldı. Elde edilen solüsyondan mononükleer hücreleri ayırmak amacıyla dansite gradiyent yöntemi kullanılarak 900 devirde 30 dakika süre ile santrifüj edildi. İnterfazdan toplanan mononükleer hücrelerden 3 ml'si akım sitometri çalışması için Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarına götürüldü. Geride kalan kısım 3 ml'lik daha önceden 200 mL/L FBS (Fetal Bovine Serum), 100 U/mL penisilin, 100 U/mL streptomisin ve 20 mL/L L-glutamin eklenerek hazırlanmış olan DMEM-LG besiyeri içinde 25 cm²lik (T25) hücre kültür kaplarına

10⁶/mL konsantrasyonun da yayılarak ekildi. Hücreler 37 °C ve 50 mL/L CO₂ içeren % 95 nem oranına sahip CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. İlk üç gün besiyerleri hergün sonrasında ise miktarı 5 ml'ye çıkarılarak 3 günde bir değiştirildi. İnvert mikroskopta hücrelerin kültür kabının %75'ini kapladığının görüldüğü 14. günde hücreler pasajlandı. Pasaj işlemi için kültür kaplarına içerisindeki besiyerini aldıktan sonra 1,5 ml Tripsin-EDTA-C konuldu. 2-3 dakikalık elle perküsyon sonrasında 37 °C'lik inkübatörde 3-5 dakika arası tutuldu ve tekrar elle 2 dakika kadar perküte edilen hücrelerin mikroskopta yapıştıkları plastik yüzeyden kalktıkları görüldü. Hücreler bu şekilde toplam 5 kez pasajlandı. Pasajlanan 12 kültür kabından tripsin-EDTA-C ile kaldırılan hücreler süspansiyon haline getirilip akım sitometri çalışması için Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarına götürüldü. Pasajlanarak çoğaltılan diğer hücre kültürleri yine aynı yöntem kullanılarak tripsin-EDTA-C ile kaldırıldı. % 10 Dimetil sulfoksit (DMSO) ve % 20 FBS içeren DMEM-LG'den 1,5ml eklenerek 2ml'lik kriyotüplerde daha sonra deneyde kullanılmak üzere -80 °C' ye kaldırıldı.

3.1.2. Akım Sitometri İle Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması

İnterfazda toplanan mononükleer hücreler, ekim yapılmadan önce alınmış 3 ml'lik tüplere konuldu ve her hücre dizini için 6 tüp kullanıldı. Tüplerin üzerleri sırasıyla yüzey belirteçlerinin adları ve Kontrol Grubu olarak yazıldı. Sonra her tüpe hücre konsantrasyonu 1x10⁶ olacak şekilde getirilen hücre süspansiyonundan 100'er µl konuldu. Birden beşe kadar olan tüplere yüzey belirteçleri sırası ile 10'ar µl eklendi. Altıncı tüpe belirteç konulmadı. Tüpler vortekslendi. 4 °C'de karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildikten sonra üzerine daha önceden hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan 1 ml eklendi ve 1400 devir/dakikada 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan hücre çökeltisine tekrar 0.5 ml yıkama solüsyonu eklenerek akım sitometri cihazında tanımlandı. Bu işlemde HKH (Hematopoetik Kök Hücre) ve MKH (Mezankimal Hük Hücre) hücre belirteçleri (CD11b/c, CD44, CD45, CD90, CD106)'nin kullanımı sonucunda CD11b/c [%97 (+)], CD44 [%1 (-)], CD45 [%99 (+)], CD90 [%34 (+)] ve CD106 [%11 (-)] olduğu gösterildi.

Aynı işlemler, pasajlanan kültür kabından tripsin-EDTA-C ile kaldırılarak toplanan hücrelerden oluşan örneklerle de tekrarlandı. Aynı belirteçlerin kullanımı

sonucunda CD11b/c [%5 (-)], CD44 [%97 (+)], CD45 [%1 (-)], CD90 [%97 (+)] ve CD106 [%30 (+)]olarak tanımlandı.

Bütün bu çalışmalar Dominici ve arkadaşlarının belirlediği (The International Society for Cellular Therapy position statement) ölçütler uygulanmıştır (12). Mezenkimal kök hücrenin başka bir hücreye farklılaşma kapasitesinin belirlenen standartlarda olduğunu göstermektedir (12).

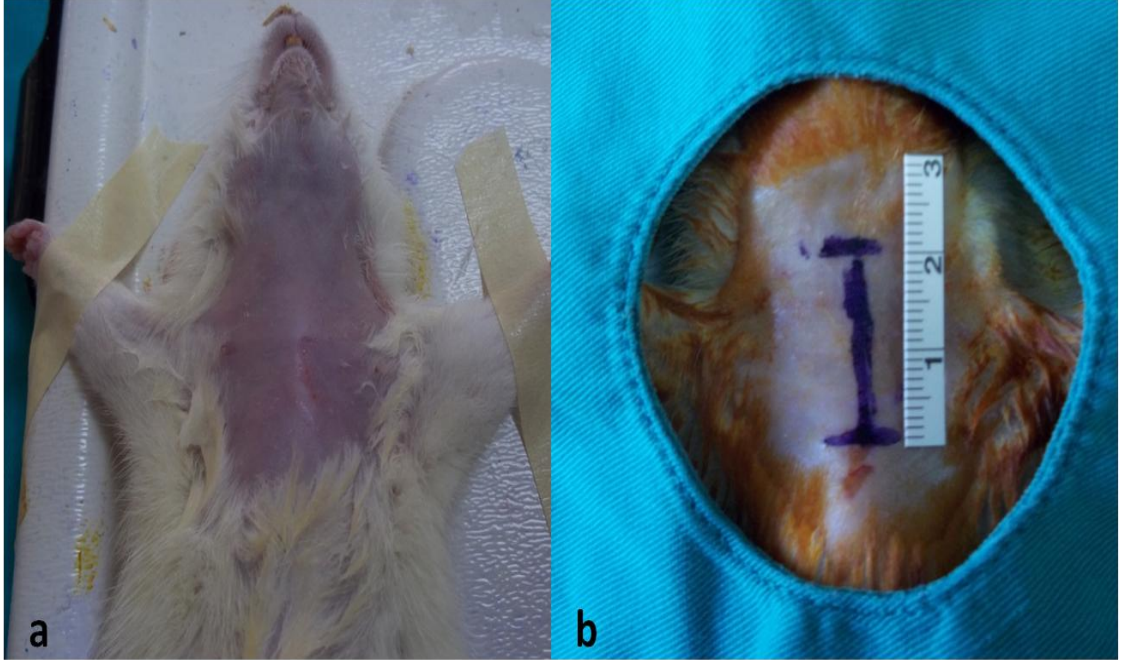
3.2. Deneyin Uygulanması

3.2.1. Cerrahi İşlem Öncesi ve Cerrahi İşlem

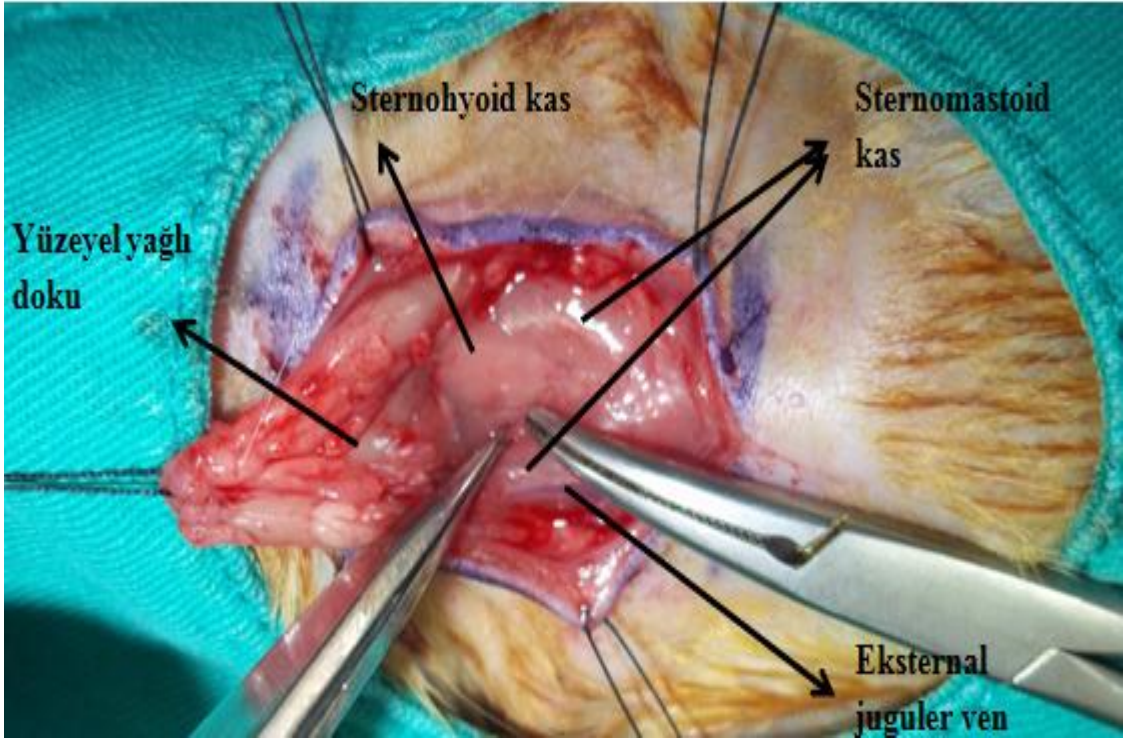
Yaptığımız Deneysel çalışmada 24 adet ortalama ağırlıkları 200-300 gr olan dişi Spraque - Dawley cinsi rat kullanıldı. Bu ratın tercih edilmesindeki en önemli etken anatomik olarak iyi tanımamız ve damar anastomozu uyguladıktan sonra damar lümeninde tromboz oluşma ihtimalinin diğer rat'lara oranla daha az olmasıdır (74). Rat'lar Kontrol Grubu ve Deney Grubu olmak üzere iki gruba ayrıldı ve her iki grup 12 adet rat olacak şekilde oluşturuldu. Yapılacak olan cerrahi işlem öncesi antibiyotik profilaksisi amacıyla ratlara 10 mg/kg sefazolin sodyum (Cefozin® Bilim İlaç) intramüsküler (i.m.) olarak uygulandı. Xylazine (Rompun® Bayer) 5-10 mg/kg intraperitoneal (i.p.) yolla sedatize edilen deneklere cerrahi işlem öncesi ketamin (Ketalar® Parke Davis) 50 – 150 mg/kg intraperitoneal (i.p.) uygulanarak derin anestezi etkisi sağlandı (74). Preoperatif anesteziyi takiben denekler cerrahi masada supine pozisyon verilerek her bir ekstremitesi ve üst çene yapışkan bantlar kullanılarak uygun şekilde tespit edildi (Şekil 6). Cerrahi alan temizliğini takiben povidin iyot (%10) (Betadin® Kansuk) solüsyonu kullanılarak cilt antisepsisi sağlandı.

Cerrahi masada tespit edilen deneklerin cilt antisepsisini takiben alt çeneden manubrium'a uzanan orta hat insizyonu 15 no'lu bisturi yardımıyla cilt-cilt altı geçilerek yapıldı. Hemostaz sağlandıktan sonra cilt altı yağlı doku süperior pediküllü fleb gibi kaldırılarak orta hatta bulunan sternohyoid kas ve aşağıda “ V “ harfi şeklinde birleşen her iki yandaki sternomastoid kaslara ulaşıldı (Şekil 7). Anastomoz için seçilmiş olduğumuz sağ karotis arter tarafındaki sternomastoid kası örten deri ve deri altı yağ dokusu laterale sıyrıldıktan sonra bu yağlı plan içinde juguler ven bulunarak

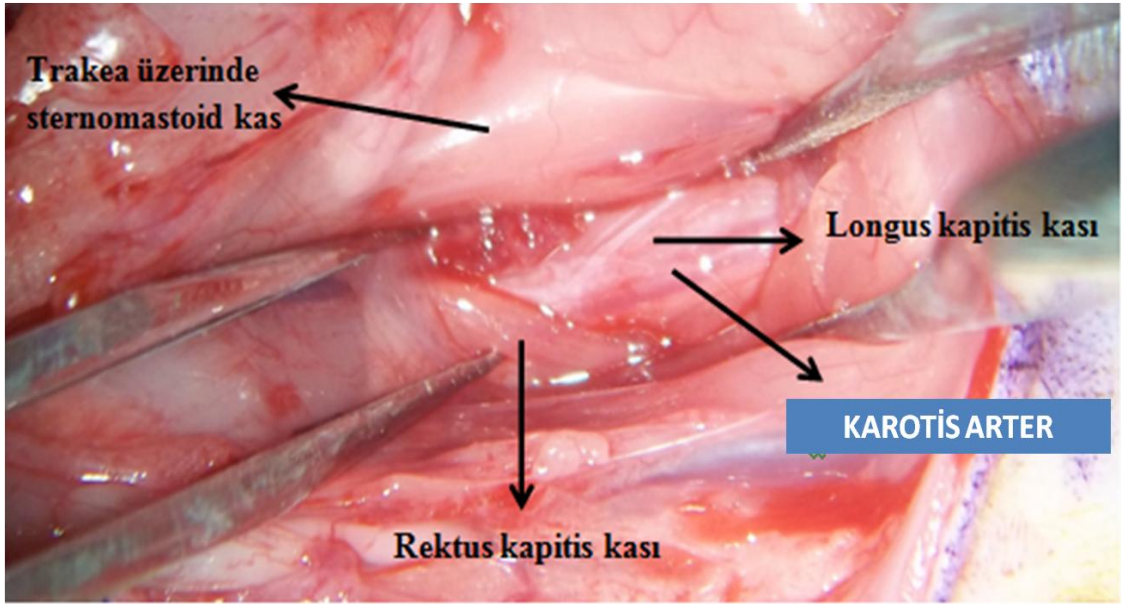
korundu. Sternomastoid kas laterale alınıp künt diseksiyon ile ilerlenerek kaudalde karotis artere ulaşıldı. Kranial kısımdaki karotis arteri örten omohiyoid kas ekarte edilerek uzaklaştırılıp N. Vagus ile birlikte uzanan uzun bir karotis arter segmenti ortaya konuldu. Mikroskop büyütme x10 getirilip N. Vagus, karotis arter üzerinden künt diseksiyon ile uzaklaştırıldı. Böylece rat'ın sağ karotis arteri uzun bir segment olarak ortaya konuldu (Şekil 8).



Şekil 6: Cerrahi alan da cilt temizliği ve cerrahi alan antisepsisi **a.** Spraque - Dawley cinsi rat anestezi sonrası supine pozisyonun verilmesi, **b.** Cilt antiseptiği uygulandıktan sonra cerrahi insizyon hattının belirlenmesi.



Şekil 7: Yüzeysel yağlı dokunun uzaklaştırılması ve yüzeysel kas yapıları.

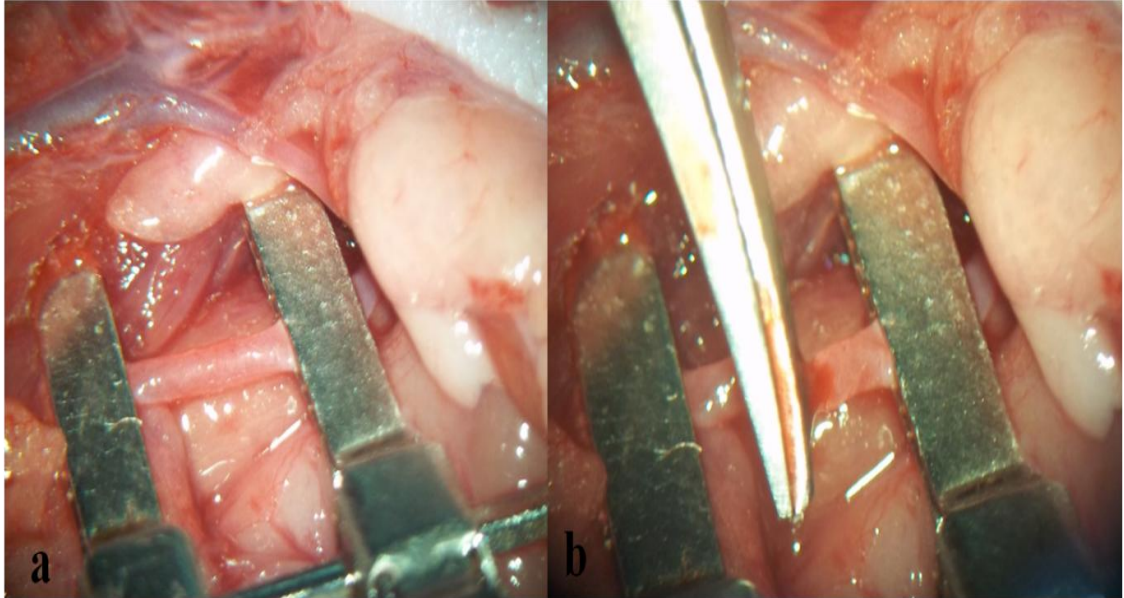


Şekil 8: Mikrodiseksiyon ile ilerlenerek karotis arterin ortaya konulması.

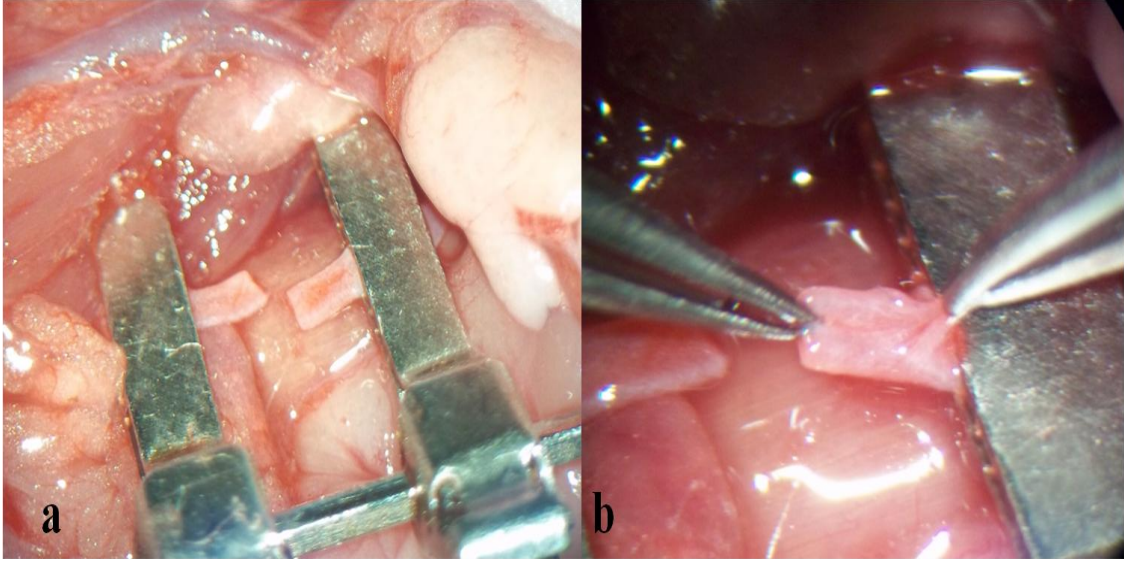
3.2.2. Anastomoz Hazırlığı

Anastomoz hattını ortaya koyabilmek için iki mikroklempten oluşan “yaklaştırma klempleri” kullandık. Mikroskopta 10x büyütme kullanılarak yaklaştırma

klemplerinden önce akım yönüne göre kaudal de kalan klemp yerleştirildi. Ardından kranial kısımdaki klemp yerleştirildi. Arterin kesilmesiyle oluşabilecek %25-30' luk retraksiyonu engellemek için önce klempler birbirine yaklaştırılarak damar segmenti boşaltıldı (Şekil 9) (Buncke ve ark 1975). Mikroskopta 16x büyütmeye geçilerek her iki klemp arasının orta noktasından bir kerde kesilerek sağ karotis arter tam kat kesisi elde edildi. Ardında tekrar 10x büyütmeye geçilerek ortam ve lümen içi hafif ılık Serum Fizyolojik ile yıkanarak damar içinde kalmış olan kan veya trombüsler ortamdan uzaklaştırılıp arterin spazma girmeside engellenmeye çalışıldı. (Şekil 9). Mikroskopta 16x büyütmeye geçilerek kesik damar kenarlarındaki adventisya tabakası, anastomoz yapılacak alanın uç kısımlarından kesilerek uzaklaştırıldı (Şekil 10). Ortam tekrar SF ile yıkanarak saatçi penseti yardımıyla kesik olan damarların ağızları anastomoz için genişletildi. Yaklaştırma klempleri, klemp penseti yardımıyla her iki taraftan yaklaştırılarak kesik damar ağızlarının birbirine yakın olması sağlandı.



Şekil 9: Yakınlaştırma klemplerinin uygulanması ve arterin tam kesisi **a.** Yaklaştırma klempleri konulmuş karotis arter, **b.** Keskin bir mikro makas ile tek hamlede anastomoz hattının tam kat kesilmesi.



Şekil 10: Anastomoz hazırlığı ve adventisyanın sıyırılması **a.** Tam kat kesilen karotis arterin lümen içi steril serum fizyolojik ile yıkanması, **b.** Adventisya tabakasının mikropensetler ile sıyırılması.

3.2.3. Uç Uca Anastomozun Uygulanması

Bütün deneklerde uygulanan anastomoz tekniği “önce arka yüz” tekniği olup mikroskop altında 20x büyütmede 10/0 prolene (Prolene® ETHICON) iplik kullanılarak ilk dikiş arka yüzde 270° hizasına gelen noktaya atıldı. İkinci dikiş 90° denk gelecek şekilde atıldı. Her iki dikişin orta noktalarına birer dikiş daha atılıp onlarında orta noktalarına biri dikiş daha atıldı. Toplam 8 dikiş atılarak anastomoz sonlandırıldı.

Anastomoz sonrası deneklere uygulanan yöntem Kontrol ve Deney Grubu için farklılık göstermemektedir;

Kontrol Grubu: Kontrol Grubundaki deneklere anastomoz uygulandıktan sonra anastomoz bölgesine 1ml serum fizyolojik uygulandı. Anastomoz hattı ortada kalacak şekilde 8mm uzunluğunda surgicel (surgicel® ETHICON) anastomoz hattını çepeçevre saracak şekilde serildi. Surgicel’in üstüne sıvama tarzında doku yapıştırıcısı olan BioGlue (BioGlue® CryoLife) uygulandı. Bu uygulama esnasında damarın sistol ve diyastol esnasında rahat hareket edip etmediği gözlemlendi. Damarın basınç altında olmadığı anlaşıldıktan sonra cerrahi alan 2/0 ipek suture ile kapatıldı.

MKH verilen Deney Grubu: Deney Grubundaki deneklere anastomoz uygulandıktan sonra anastomoz bölgesine 1ml (1×10^6 hücre) mezenkimal kök hücre uygulandı. Anastomoz hattı ortada kalacak şekilde 8mm uzunluğunda cerrahik (Surgicel® ETHICON) anastomoz hattını çepeçevre saracak şekilde serildi. Surgicel'in üstüne sıvama tarzında doku yapıştırıcısı olan BioGlue (BioGlue® CryoLife) uygulandı. Bu uygulama esnasında damarın sistol ve diastol esnasında rahat hareket edip etmediği gözlemlendi. Damarın basınç altında olmadığı anlaşıldıktan sonra cerrahi alan 2/0 ipek sütür ile kapatıldı.

Cerrahi işlem sonrası her bir deneğin juguler venine 150 ünites/kg i.v. bolus şeklinde heparin (Nevparin® Mustafa Nevzat) uygulandı.

3.2.4. Cerrahi İşlem Sonrası Bakım Ve Gözlem

Cerrahi işlem sonrasında rat'lar Kontrol ve Deney Grupları ayrı kafeslerde dört rat olacak şekilde gruplar halinde ayrı kafeslerde takip edildi. Cerrahi işlem sonrasında post-operatif analjezi amacıyla rat'lara üç gün boyunca içme suyunun her ml'sinde 2 mg parasetamol olacak şekilde analjezi uygulandı.

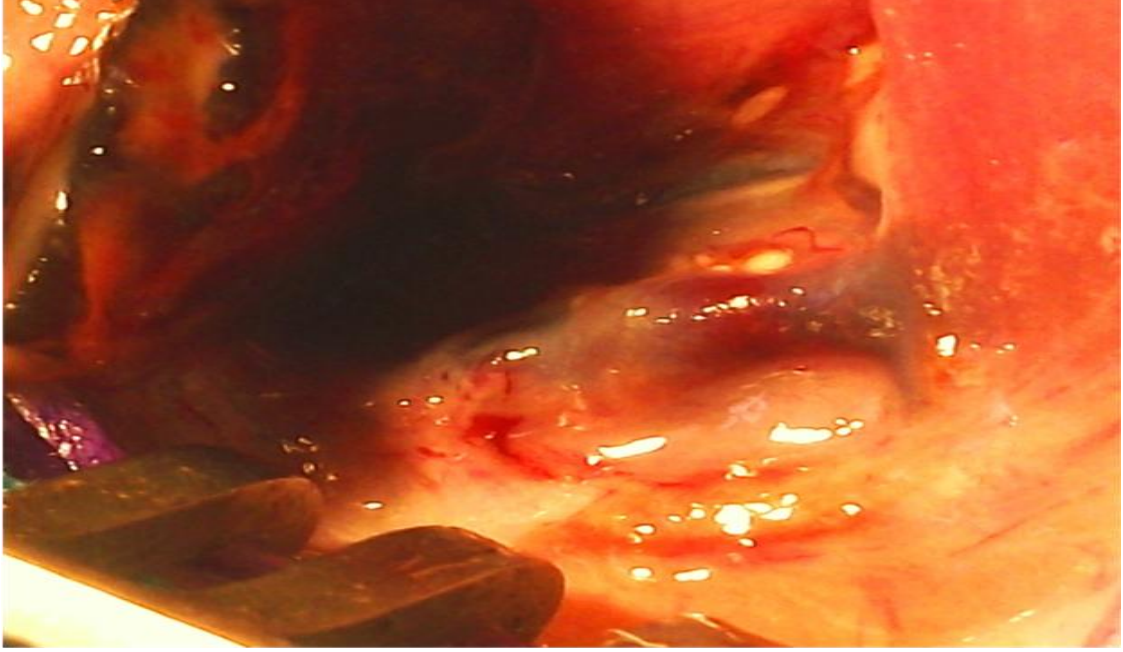
Ratlar cerrahi işlem sonrası erken dönemde kanama, aspirasyon sonrası solunum yetmezliği açısından takip edildi. Cerrahi işlem sonrasında cerrahi alanda kanama olmadı. Kontrol Grubunda iki rat'da aspirasyon sonrası solunum sıkıntısı gelişti. Derin trakeal aspirasyon sonrası rat'ın solunum paterni'nin düzenli olduğu görüldü.

İşlem sonrası rat'ların cerrahi alanına antiseptik sprey (Neo Caf® İntervet) püskürtülerek yara yeri enfeksiyonu engellenmeye çalışıldı. Günde bir defa davranış, aktivite kontrolü, günlük gıda ve su tüketimi ve cerrahi işlem yapılan bölgede akıntı, kızarıklık ve şişme gibi enfeksiyon veya enflamasyon belirtileri izlendi. Yapılan 30 günlük izlemde rat'lar da davranış değişikliği, aktivite de azalma ve yara yeri enfeksiyonu gözlenmedi.

3.2.5. Sakrifikasyon ve Histopatoloji İçin Örnek Alınması

Denekler eter kavanozuna bırakılarak ötenazi işlemi gerçekleştirildi. Cilt, cilt altı geçilerek sağ karotis artere uygulanmış olan anastomoz hattına ulaşıldı ve anastomoz

hattı ortada kalacak şekilde 1cm'lik arter kesilerek daha önceden hazırlanmış olan 2x3cm kartonların üstüne her iki uç kısımdan zımbalanarak yerleştirildi. Zaman kaybetmeden içinde formaldehit olan tüplerine konuldu. Deney ve Kontrol Grubunun patolojik spesmenleri ayrı ayrı numaralandırılarak patolojiye gönderildi.



Şekil 11: Mezenkimal kök hücre uygulanan ve tromboze olmuş olan karotis arter.

3.3. Histopatolojik İşlemler

Deneklerden çıkarılan örneklerin tamamı 24 saatlik tamponlanmış nötral formalin (%10) tespitine alındı. Tespit sonrası tüm dokular anastomoz hattını gösteren transvers kesitler ile makroskopik tanımlanması yapıldı. Gecelik doku takip işlemi sonrası hazırlanan parafin bloklardan 4-6 mikronlu kesitler alındı ve Hemotaksilen Eozin (HE) ile ışık mikroskobu altında değerlendirilme yapıldı.

Anastomoz hattının histopatolojik değerlendirme kriterleri:

1. Anastomoz hattında endotel devamlılığı

0 puan: endotel yok

1 puan: endotel var, devamlılık kesintiye uğramış

2 puan: endotel duvarı devamlı

2. Neointima hiperplazisine bağlı damar lümeninin açıklığı (restenoz varlığı / yokluğu)

0 puan: neointimal hiperplazisi var, lümen tamamen kapalı

1 puan: neointimal hiperplazi

2 puan: neointimal hiperplazisi yok

3. Trombüse bağlı damar lümeninin açıklığı (trombüs varlığı / yokluğu)

0 puan: tromboze, lümen tamamen kapalı

1 puan: lümen kısmen açık, trombüs rekanalize olmuş

2 puan: trombüs yok, lümen tamamen açık

4. Anastomoz hattında internal elastik lamina devamlılığı

Devamlılık: (var 2 puan, kısmen 1 puan, yok 0 puan)

Harabiyet: (yok 2 puan, kısmen 1 puan, var 0 puan)

Kayıp: (yok 2 puan, kısmen 1 puan, var 0 puan)

İncelme: (yok 2 puan, kısmen 1 puan, var 0 puan)

5. Anastomoz hattında eksternal elastik lamina devamlılığı

Devamlılık: (var 2 puan, kısmen 1 puan, yok 0 puan)

Harabiyet: (yok 2 puan, kısmen 1 puan, var 0 puan)

Kayıp: (yok 2 puan, kısmen 1 puan, var 0 puan)

İncelme: (yok 2 puan, kısmen 1 puan, var 0 puan)

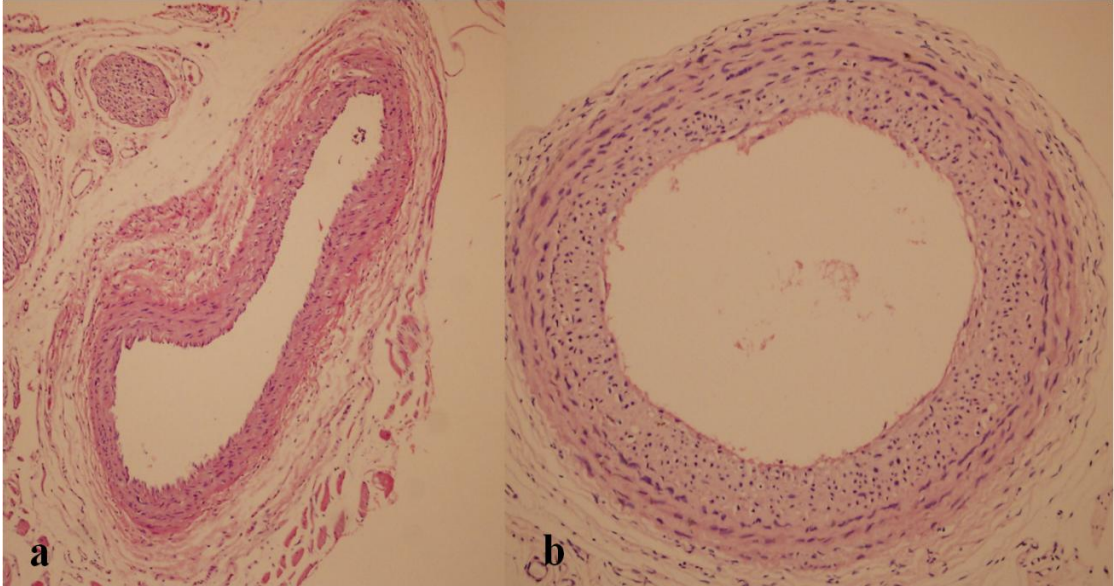
6. Anastomoz hattında musküler tabaka

- a) musküler tabaka devamlılığı
 - 0 puan: musküler tabaka devamlılığı yok
 - 1 puan: musküler tabaka devamlılığı kısmen var
 - 2 puan: musküler tabaka devamlılığı var
- b) striktür musküler
 - 0 puan: musküler tabakada striktür var
 - 1 puan: musküler tabakada striktür yok
- c) spazm
 - 0 puan: musküler tabakada spazm var
 - 1 puan: musküler tabakada spazm yok

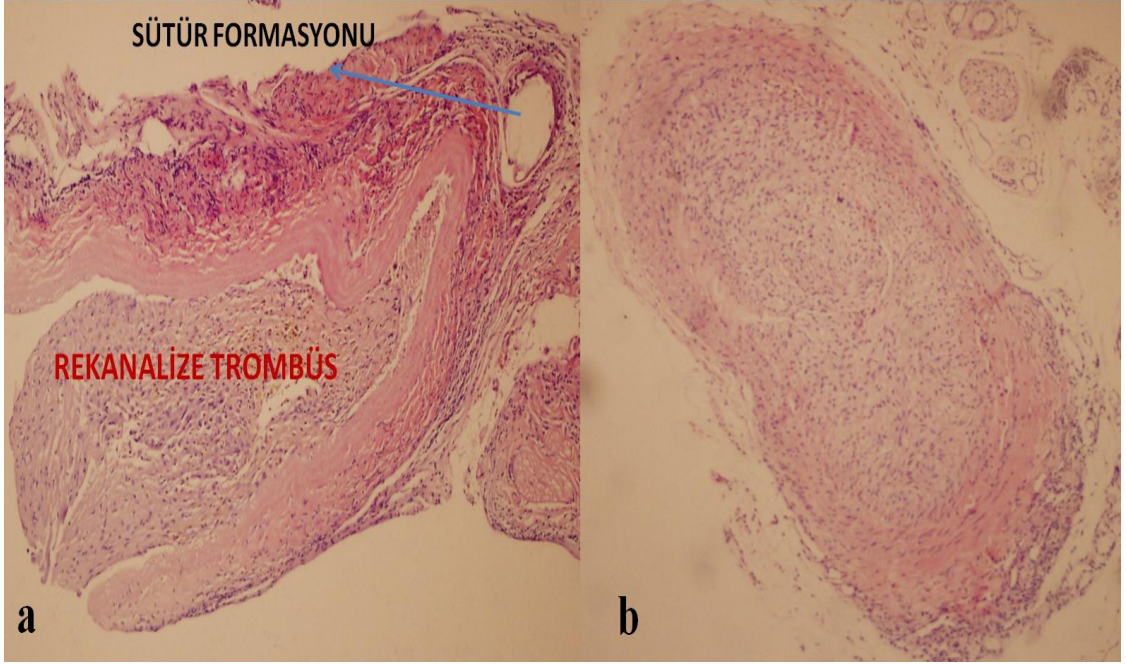
7. Anastomoz hattında adventisyal tabakanın değerlendirilmesi.

- a) fibrozis: (yok 0 puan, var 1 puan)
- b) infiltrasyon: (yok 0 puan, var 1 puan)

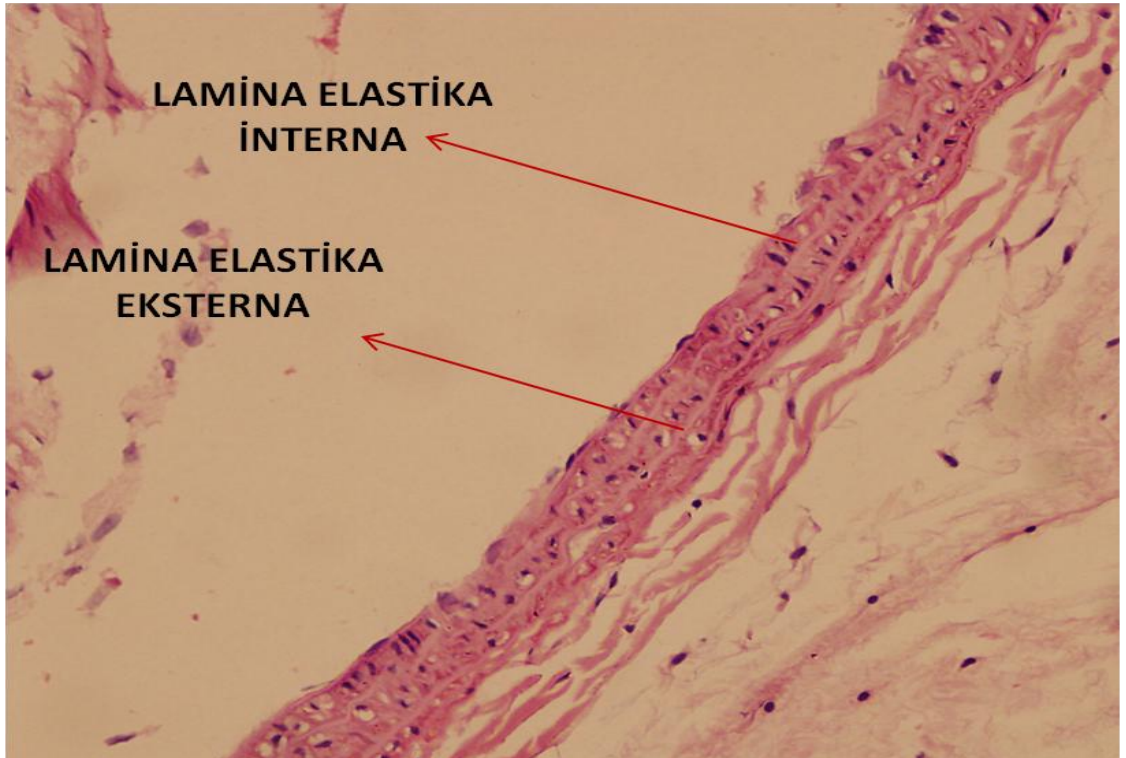
Kontrol ve Deney Grubundaki spesmenler ışık mikroskopunda değerlendirilerek oluşturduğumuz tabloda skorlaması yapıldı. Anastomoz hattında damar tabakalarının iyileşme oranları MKH uygulanan Deney Grubu ile Kontrol Grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. MKH uygulanan Deney Grubundaki anastomozlarda; damar lümeninde oluşan trombüsün istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi.



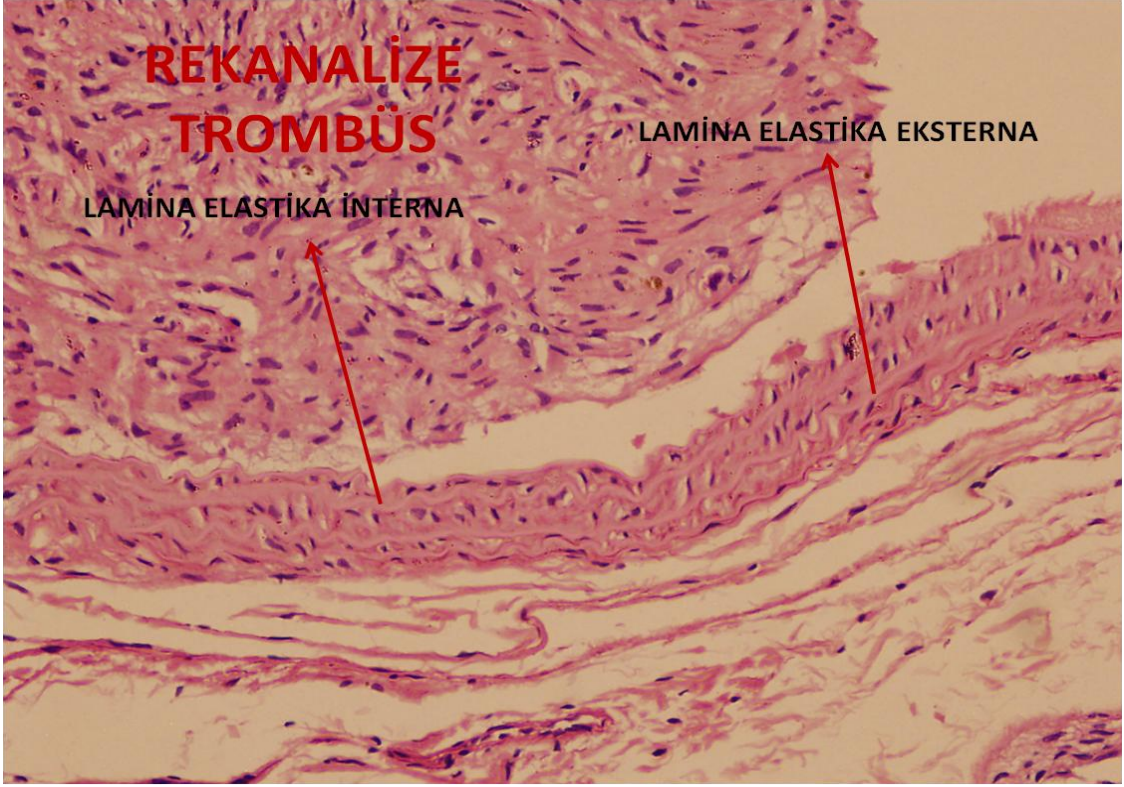
Şekil 12: a. Kontrol Grubu arter anastomozu patent damar lümeni (x100 HE), **b.** MKH uygulanmış arter anastomozu patent damar lümeni (x200 HE).



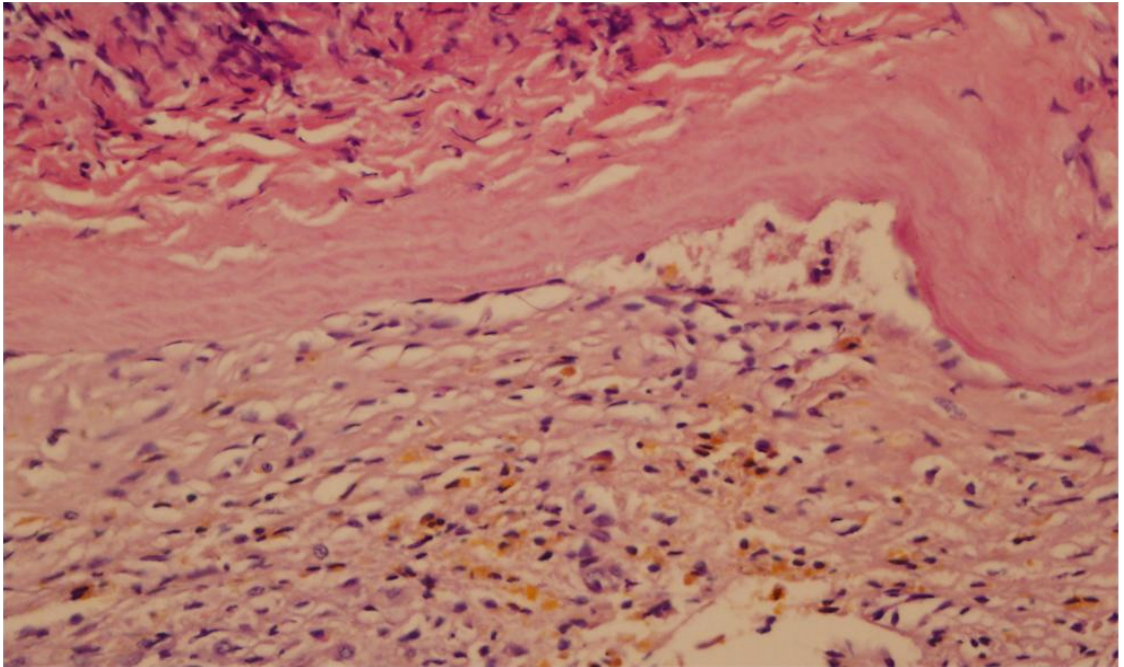
Şekil 13: a. MKH uygulanmış arter anastomozu, damar duvarı intakt, rekanalize trombüs mevcut (x100 HE), b. MKH uygulanmış arter anastomozu, damar duvarı intakt, rekanalize trombüs mevcut (x100 HE).



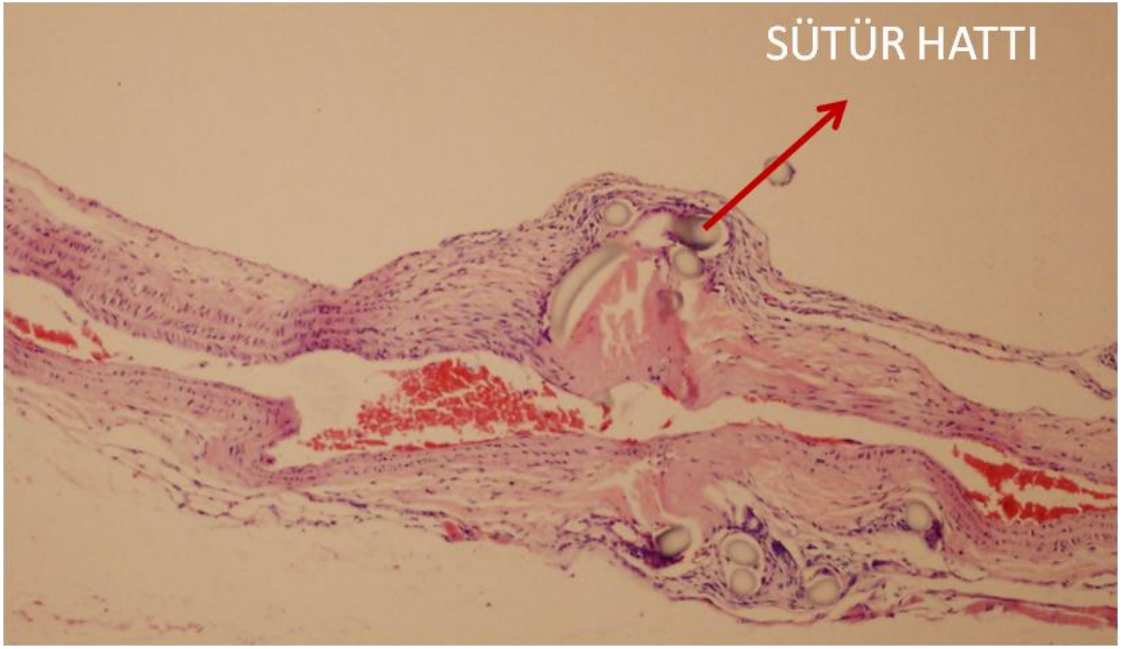
Şekil 14: Kontrol Grubu lamina elastika interna, lamina elastika eksterna ve endotel devamlılığı net değerlendirilebiliyor (x400 HE).



Şekil 15: MKH uygulanmış anastomoz hattı, damar duvarları intakt, lümen içinde rekanalize trombüs mevcut (x400 HE).



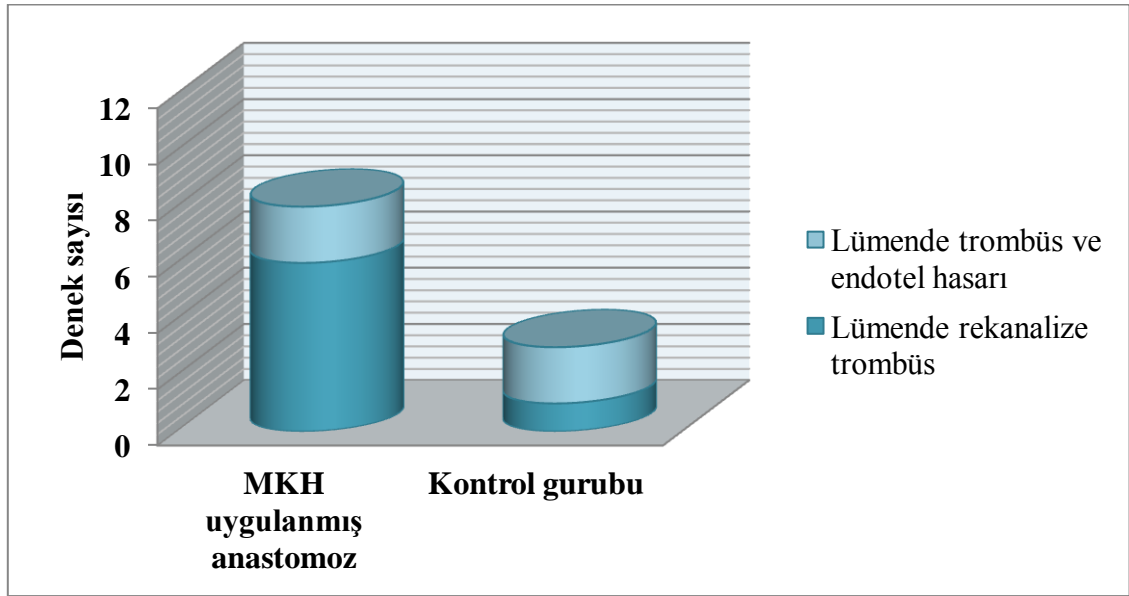
Şekil 16: MKH uygulanmış anastomoz hattı, internal ve eskternal elastik laminalar devamlılığı net değerlendiriliyor, endotel devamlılığı parsiyel korunmuş (x400 HE).



Şekil 17: MKH uygulanmış anastomoz hattını gösteren longitudinal kesi, lümen açık ve damar duvarı intakt, anastomoz hattında neointimal hiperplazi mevcut (x100 HE).

4. BULGULAR

Araştırmadan elde edilen veriler SPSS 16,0 paket program kullanılarak ki kare testi ile değerlendirildi. Kullanılan ki kare testi için anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Mezenkimal kök hücre uygulanan ve kök hücre uygulanmayan arter anastomoz hattının histopatolojik değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar Şekil 18’de verilmiştir



Şekil 18: MKH uygulanmış ve uygulanmamış damar lümenindeki trombüs oluşumunu ve rekanalize oranları görülmektedir.

Elde edilen verilerin SPSS 16,0 kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmelerin çıktılarını “output” Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Lümen içindeki trombüs varlığını istatistiksel olarak gösteren ki- kare testi.

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,196 ^a	1	,041		
Continuity Correction ^b	2,685	1	,101		
Likelihood Ratio	4,332	1	,037		
Fisher's Exact Test				,100	,050
Linear-by-Linear Association	4,021	1	,045		
N of Valid Cases ^b	24				

Tablo 3: Lümen içindeki trombüs varlığını gösteren oranlar.

		Damar lümeninde trombüs		Total
		Damar lümeninde trombüs oluşmuş	Damar lümeninde trombüs yok	
Kök hücre Uygulanmış mı?	Hayır	3	9	12
	Kök hücre uygulanmış (hayır)	25,0%	75,0%	100,0%
	Damar lümeninde trombüs	27,3%	69,2%	50,0%
	Evet	8	4	12
	Kök hücre uygulanmış (evet)	66,7%	33,3%	100,0%
	Damar lümeninde trombüs	72,7%	30,8%	50,0%
Total		11	13	24
Kök hücre uygulanmış mı?		45,8%	54,2%	100,0%
Damar lümeninde trombüs		100,0%	100,0%	100,0%

Her iki grup karşılaştırıldığında mezenkimal kök hücre uygulanan 12 denekten 8'inde (%66,6) trombüs gelişirken, kök hücre uygulanmayan 12 denekten 3'ünde (% 25) trombüs gelişmiştir (Tablo 3). Kök hücre uygulanan damarlarda trombüs gelişme olasılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. [$\chi^2 = 4,19$, $sd = 1$, $p < 0,05$, (OR=0,167), (0,028<OR<0,983)].

Tablo 4: Endotel devamlılığı, trombüse bağlı damar lümeni açıklığı ve neointimal hiperplazi derecelendirilmesi*.

Rat No	MKH	Anastomoz hattında endotel devamlılığı	Trombüse bağlı damar lümeninin açıklığı	Neointima hiperplazisine bağlı damar lümeninin açıklığı
1	1	2	1	2
2	1	2	2	2
3	1	1	1	1
4	1	2	2	2
5	1	1	1	2
6	1	1	1	2
7	1	1	1	2
8	1	2	2	2
9	1	2	2	2
10	1	2	1	2
11	1	0	0	0
12	1	0	0	0
13	0	1	2	2
14	0	2	2	2
15	0	1	1	1
16	0	2	2	2
17	0	2	2	2
18	0	2	2	2
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	2	2	2
22	0	2	2	2
23	0	2	2	2
24	0	2	2	2

* Tablo 4 için: MKH uygulanmış mı? 1=evet, 0= hayır; anastomoz hattında endotel devamlılığı; 0= endotel yok, 1= endotel var devamlılık kesintiye uğramış, 2 = endotel devamlılığı mevcut; tromboze bağlı damar lümeninin açıklığı; 0= tromboze, lümen tamamen kapalı, 1= rekanalize tromboze, lümen kısmen açık, 2= trombüs yok, lümen tamamen açık; neointima hiperplazisine bağlı damar lümeninin açıklığı; 0= lümen tamamen kapalı, 1= hafif neointimal hiperplazi, 2=neointimal hiperplazi yok.

MKH uygulanan Deney Grubu ile uygulanmayan Kontrol Grubu karşılaştırıldığında; internal ve eksternal elastik lamina, musküler tabaka ve adventisya iyileşmesi açısından fark saptanmamıştır.

5.TARTIŞMA

Vasküler anastomoz ve yara iyileşmesi üzerine birçok deney yapılmış ve bu sayede cerrahi alanda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Vasküler anastomozun başarılı olması kan akımının gerekli dokuya ulaşmasını sağlamaktadır. Anastomoz yapılan damarın dokuyu yeterince besleyememesi, dokuda iskemiye neden olur, buda cerrahi mortalite ve morbiditenin artmasına neden olabilir. Yapılan anastomozun normal anatomik yapıya yakın bir şekilde iyileşmesi bu yüzden hayati önem taşımaktadır. Anastomozun normal anatomik yapı ve fonksiyonunu koruyabilmesi için birçok klinik deney, değişik suture teknikleri ve sutureler, değişik farmakolojik ajanlar ve son yıllarda kök hücreler ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Anastomozun sağlıklı olması uygulanan mikro cerrahi tekniğe ve damarın normal anatomik yapısına en yakın şekilde iyileşmesine bağlıdır. Damar bütünlüğü bozulduktan sonraki en önemli patolojik tıkanma nedeni yeni oluşan intima (neointimal) tabakasının hiperplazisidir (1, 2). Hiperplazi aynı zamanda geç dönem oluşan okluzyonun da ana sebebinin oluşturmaktadır. Yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine rağmen anastomoz sonrası restenoz halen klinik olarak önemli bir problemdir (3).

Damarın tunika intimadaki endotel hücrelerinin bütünlüğünün bozulması veya hasar görmesi stenoz oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Endotel hücrelerinin hasar görmesi sonucunda vasoprotektif mediatörler olan; nitrik oksid (NO) ve prostaglandinlerin sekresyonunun azalır (4). NO ve prostoglandinler azalması sonucunda hasarlı bölgede inflamasyonu ve platelet adezyonunun artması, stenoz oluşumunda önemli rol oynamaktadır (4). Ayrıca uygun teknik kullanılmaması sonucunda damarın adventisya tabakasının hasar görmesi de restenoza neden olabilir (5). Son yıllarda yapılan çalışmalarda; kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin damarda hasarlı bölgeye dolaşım sistemiyle gelerek damarın yeniden yapılanmasına katkıda buldukları gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreleri non-hematopoetik multipotent hücreler olup hem mezenkimal hücrelere hem de non-mezenkimal hücrelere farklılaşma yeteneklerine sahiptirler. Bu hücrelerin kemik iliğinden az miktarda aspirasyon sonucunda çoğaltılabilmesi, immunogenetik özelliklerinin az olması nedeniyle immünsüpresyona gerek duyulmaması deneysel çalışmalarda kullanımını artırmaktadır (6). Yapılan birçok klinik çalışmaya rağmen mezenkimal kök hücrelerinin

anastomoz sonrası oluşan restenozun engellenmesine pozitif katkısı tam olarak saptanmamıştır. Chen ve arkadaşlarının 2007 yılında rat'lar üzerinde yaptıkları aortik anjioplasti deneysel çalışmada mezenkimal kök hücreyi lokal olarak uygulamışlar ve mezenkimal kök hücre uygulanan grupta restenozun, Kontrol Grubundan istatistiksel olarak daha fazla olduğunu saptamışlardır (7). Wu ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin hasar görmüş damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini ve restenozu azalttığını göstermiştir (8). Yine başka bir çalışmada mezenkimal kök hücrelerini içeren vasküler greftler ile yapılan deneysel araştırmada, damar patensinin uzun dönemde çok iyi sonuç verdiği gösterilmiştir (9).

MKH uygulanmasında immünsüpresyon gerektirmemesinin nedeni B ve T lenfositlerinin fonksiyonunu suprese etmesinden kaynaklanmaktadır. T lenfositler hasarlı damar alanında inflamasyona neden olup; büyüme faktörlerinin açığa çıkmasını sağlayarak hücre proliferasyonunu artırır. Hücre proliferasyonunun artması damar restenozun neden olabilmektedir. Allogenic mezenkimal kök hücrelerin T lenfosit aktivitesini azaltarak damar restenozunu engellemesinde katkıda bulunur. Cerrahi sonrası mezenkimal kök hücre verilen deneklerin, bu hücre nedeniyle ölme oranları %5'in altındadır. Mezenkimal kök hücre deney hayvanlarına ve insanlara tedavi amaçlı dolaşım sistemine enjeksiyonunun histopatolojik sorun yaratmadığı bilinmektedir (11). Yaptığımız deneysel çalışmada mezenkimal kök hücre etkinliğini diğer çalışmalarla karşılaştırabilmek için Dominici ve arkadaşlarının belirlediği (The International Society for Cellular Therapy position statement) ölçütler uygulanmıştır (12). Çalışmamızda mezenkimal kök hücreler lokal olarak anastomoz bölgesine uygulanmış olup, hiçbir denekte alerjik reaksiyon veya patolojik klinik belirtiyeye rastlanmamıştır.

Arter anastomozu sonrası mezenkimal kök hücrenin arter duvarının yeniden yapılandırılmasındaki olumlu etkileri 3 ana hipotezle sunulmuştur; (a) dolaşımdaki mezenkimal kök hücreler, arter hasarı sonucu ortaya çıkan kimyasallar sayesinde hasarlı dokuya ulaşarak düz kas hücrelerine ve endotel hücrelerine dönüşürler. Böylece vasküler dokunun hızlı rejenerasyonuna neden olarak vasküler hücre proliferasyonunu sınırlandırır. Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mezenkimal kök hücre ile damar düz kas hücrelerinin teması sonrasında, mezenkimal kök hücreler damar düz kas hücrelerine dönüştüğünü göstermiştir (13). (b) Hasarlı dokuya ulaşan mezenkimal kök

hücreler VEGF ve bFGF gibi sitokinleri üreterek damarın hasarlı tarafındaki yerleşik hücrelerin aktivasyonunun arttırırlar, böylece hasarlı yüzeyin aktive edilen hücrelerce hızla kapatılması sağlanır. (c) Hasarlı damar duvarına yerleşen mezenkimal kök hücre lokal veya sistemik immün süpresyon etkisi ile inflamasyon reaksiyonunu sınırlandırır ve böylece hücre proliferasyonunu ve göçünü engeller.

Arter hasarı sonucunda sistemik verilen mezenkimal kök hücrelerin hasarlı dokuya ulaşip ulaşmadığı, ulaşırsa ne zaman ulaştığını gösteren çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda mezenkimal kök hücrenin hasarlı dokuda olduğunu gösteren mezenkimal kök hücre mRNA'sı, genetik belirteçler, işaretlenmiş mezenkimal kök hücreleri veya immunofloresan teknikler kullanılmıştır. Forte ve arkadaşlarının yaptıkları genetik çalışma; kök hücre verildiğini gösteren mRNA seviyelerini, sadece anastomoz yapılmış damarda değil aynı zamanda anastomoz yapılmamış damarda da arttığı gösterilmiştir (10). Amalia ve arkadaşlarının karotis arter anastomozu üzerine yaptıkları çalışmada işaretli mezenkimal kök hücreler kullanılmış ve mezenkimal kök hücrenin sistemik enjeksiyon sonrası hasarlı arter duvarında üç gün sonra tespit edildiği saptanmıştır (4). Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada rat femoral arterine hasar vererek, deneğe sistemik yoldan yedi gün sonra mezenkimal kök hücre vermişler ve immunofloresan teknik kullanılarak mezenkimal kök hücrenin hasarlı arter duvarında bir gün tespit etmişlerdir (14). Diğer çalışmaya oranla erken tespit edilmesinde, doku hasarının geç dönemine denk gelmesi ve bu yüzden sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin dolaşımında daha çok olması düşünülebilir. Çünkü mezenkimal kök hücrenin hasarlı dokuya ulaşmasını sağlayan, hasarlı dokudan sistemik dolaşıma yoğun bir şekilde salgılanan sitokinler ve büyüme faktörleridir.

Bizim çalışmamızda rat'ın sağ karotis arter anastomozu gerçekleştirildikten sonra anastomoz hattının üzerine 1ml (1×10^6 hücre) mezenkimal kök hücre uygulandı. Anastomoz hattı ortada kalacak şekilde 8mm uzunluğunda surgicel (surgicel® ETHICON) anastomoz hattını çepeçevre saracak şekilde serildi. Surgicel'in üstüne sıvama tarzında doku yapıştırıcısı olan BioGlue (BioGlue® CryoLife) uygulandı. Böylece mezenkimal kök hücrenin anastomoz etrafında hapis edilmesi sağlandı. Bu uygulama esnasında damarın sistol ve diyastol esnasında rahat hareket edip etmediği gözlemlendi. Damarın basınç altında olmadığı anlaşıldıktan sonra cerrahi alan 2/0 ipek

sütür ile kapatıldı. BioGlue kullanma nedenimiz; doku yapıştırma, anastomozlarda ve homostaz sağlanmasında sık kullanılan güvenli bir ajan olmasıdır (15). Karl ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada BioGlue kullanılarak yapılan rat arter anastomozunda %100' kadar damar patensi sağlandığını bildirmiştir (16). Mikrocerrahi uygulayan birçok cerrah BioGlue ile yapılan anastomozlarda daha az sütürasyona gerek duyulduğunu ve cerrahi süreyi kısalttığını gösteren çalışmalar yapmıştır (17 - 19). Özellikle çapı 1mm veya daha az olan arter anastomozlarında BioGlue sıklıkla kullanılmakta olup artere uygun şekilde uygulandığında artere fazladan basınç uygulamadığı belirtilmiştir (16, 20). Yaptığımız çalışmada BioGlue anastomoz hattına uygulanmamış olup, anastomoz hattının çevre doku ile ilişkisinin kesilmesi için kullanılmıştır. Anastomoz yapılan artere fazladan basınç oluşturmamasına özellikle dikkat edilmiştir.

Hasar görmüş arter duvarının iyileşme süreci incelendiğinde, anastomoz hattındaki tunica intima tabakasının dört hafta sonra belirgin hiperplaziye ulaştığı belirtilmektedir (14, 21, 22). Mezenkimal kök hücre uygulanmış deneklerde, arter anastomoz hattının dört hafta sonra morfolojikal ve morfometrik analizi yapılmış ve mezenkimal kök hücre varlığı saptanmıştır (4, 14). Anastomoz hattındaki endotel iyileşmesi ise birinci haftada tamamlanmaktadır (20). Yaptığımız çalışmada mezenkimal kök hücrenin intima hiperplazisine etkisini daha net anlayabilmek için dört hafta gibi uzun bir süreden sonra sakrifikasyon işlemi gerçekleştirdik.

Günümüzde nano teknoloji ile yapılan biyolojik materyaller doku mühendisliğinde yeni ufuklar açmaktadır. Nano teknoloji kullanılarak üretilmiş damar greftleri birçok klinik araştırmada kullanılmaktadır. Craig ve arkadaşlarının nano fibröz yapı iskelesinden oluşan damar greftleri ile yaptığı araştırmada, mezenkimal kök hücre ile kombine edilen nano fibröz damar greftini doku iyileşmesinde daha etkili olduğu gösterilmiştir (20). Aselüler damar greftini (mezenkimal kök hücre ile kombine edilmeyen) intimayı kalınlaştırıp restenoza neden olduğu, mezenkimal kök hücre ile kombine edilen damar greftinin ise mükemmel sonuç verdiğini göstermiştir (22). Mezenkimal kök hücre ile kombine edilen damar greftinin hasarlı damarın endotelini ve düz kasını normal anatomik dokuya yakın reorganizasyonunun olduğu ve restenozun olmadığı tespit edilmiştir (21). Yine aynı çalışmada nano fibröz damar greftinin platelet

adezyonuna neden olarak damarda trombüs oluşturduğu, ancak mezenkimal kök hücre ile kombine edilen damar greftinin endotel hücresi benzer etki ile platelet adezyonunu engellediğini göstermiştir. Mezenkimal kök hücre yüzey antijeni olan heparan sülfat proteoglanların; platelet adezyonunu engellediği yine bu çalışma ile gösterilmiştir (21). Bütün bu bilgiler ışığında mezenkimal kök hücrenin antitrombojenik etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Yaptığımız deneysel çalışma histopatolojik verilere dayanmaktadır. Tam kat karotis arter kesisi sonrası uç-uca anastomoz yaptık. Bütün mikrocerrahi uygulamalar bu konuda oldukça deneyimli bir cerrah tarafından, cerrahi araştırma laboratuvarında standart şartlar altında gerçekleştirildi. Kontrol Grubunda anastomozun üzerine 1ml serum fizyolojik, Deney Grubuna ise 1 ml (1×10^6 hücre) mezenkimal kök hücre lokal olarak uygulandı. Mezenkimal kök hücrenin anastomoz hattının iyileşme kalitesine olan etkisinin histopatolojik olarak incelenmesi ve Kontrol Grubu ile karşılaştırılabilmesi için kıstaslar oluşturduk.

Bu inceleme kıstasları;

1. Anastomoz hattında endotel devamlılığı
2. Neointima hiperplazisine bağlı damar lümeninin açıklığı (restenoz varlığı / yokluğu)
3. Trombüse bağlı damar lümeninin açıklığı (trombüs varlığı / yokluğu)
4. Anastomoz hattında internal elastik lamina devamlılığı
5. Anastomoz hattında eksternal elastik lamina devamlılığı
6. Anastomoz hattında musküler tabaka yapısı
7. Anastomoz hattında adventisyal tabakanın değerlendirilmesi olarak belirlendi.

Yaptığımız histopatolojik çalışmada mezenkimal kök hücre uygulanan anastomoz hattında; endotel devamlılığı, neointimaya hiperplazisine bağlı damar lümeninin açıklığı, internal ve eksternal elastik lamina, musküler tabaka ve adventisyanın iyileşme kalitesi istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kök hücre uygulanan grup ile uygulanmayan grup arasında anlamlı fark olmadığı ortaya konuldu. Ancak, damar lümeninde trombüs varlığı açısından incelendiğinde; mezenkimal kök hücre uygulanan 12 denekten 8'inde (%66,6) trombüs gelişirken, kök hücre uygulanmayan 12

denekten üç'ünde (% 25) trombüs gelişmiştir. Kök hücre uygulanan ve sekiz anastomozda trombüs gelişen damarların altı tanesinde rekanalizasyon gelişmiştir. Kök hücre uygulanmayan grupta ise üç damarda trombüs gelişmiş ve bunların bir tanesinde rekanalizasyon gelişmiştir. Kök hücre uygulanan damarlarda trombüs gelişme olasılığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. [$\chi^2 = 4,19$, $sd = 1$, $p < 0,05$, (OR=0,167), (0,028<OR<0,983)]. Bu sonuç mezenkimal kök hücrenin anti-trombotik (21) etkisiyle gelişmektedir.

Anastomoz hattına lokal olarak uygulanan mezenkimal kök hücrenin, damar tabakalarına etkisi, kök hücre uygulanmayan ile aynı düzeyde olmuştur. Ancak kök hücre uygulanan anastomozlar da trombüs gelişme oranı istatistiksel olarak anlamlıdır. Bilindiği üzere MKH'lar sistemik verildiğinde, mezenkimal kök hücre yüzey antijeni olan heparan sülfat proteoglanları platelet adezyonunu engellemektedir. Lokal verilen MKH'ların trombojenik etkisinin olması neointimal hiperplazi neden olmasıyla açıklanabilir. Çalışmamızda MKH verilen Deney Grubunda üç anastomoz hattında neointimal hiperplazi mevcuttu ve Kontrol Grubundan istatistiksel olarak anlamlı değildi. Anastomoz hattında cerrahi ve BioGlue uygulamanızın verdiği mekanik baskı sonucunda tromboz olduğunu düşünülebilir ancak her iki gruba da aynı mekanik etki olduğundan, Deney Grubundaki trombüs sayısının mekanik etkiden kaynaklanmadığı ortaya çıkmaktadır.

6. SONUÇ

- Bu çalışma Mezenkimal Kök Hücrenin lokal uygulanmasının, sistemik uygulamaya oranla beklenenden farklı sonuçlar oluşturabileceğini göstermektedir.
- Anastomoz hattına lokal olarak uygulanan Mezenkimal Kök Hücrenin, anastomoz hattının iyileşmesine anlamlı katkısı yoktur.
- Anastomoz hattına lokal olarak uygulanan Mezenkimal Kök Hücrenin, damar lümeninde trombüs oluşturmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Donaldson MC, Mannick JA, Whittlemore AD. Causes of primary graft failure after in situ saphenous vein bypass grafting. *J Vasc Surg* 1992; 15: 113-8.
2. Mechanisms of vein graft failure: the location, distribution, and characteristics of lesions that predispose to graft failure. *Semin Vasc Surg* 1993; 6: 78-91.
3. Lal BK. Recurrent carotid stenosis after CEA and CAS: Diagnosis and management. *Semin Vasc Surg* 2007; 20: 259–266.
4. Amalia F, Mauro, Monica M, Liberato B, Francesco R, Marisa D. F, Maurizio C, Marilena C, Antonino C, And Umberto G. Mesenchymal Stem Cells Effectively Reduce Surgically Induced Stenosis in Rat Carotids. *J. Cell. Physiol* 2008; 217: 789–799.
5. Khurana R, Zhuang Z, Bhardwaj S, Murakami M, De Muinck E, Yla-Herttuala S, Ferrara N, Martin JF, Zachary I, Simons M. Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation* 2004; 110: 2436–2443.
6. Beggs KJ, Lyubimov A, Borneman JN, Bartholomew A, Moseley A, Dodds R, Archambault MP, Smith AK, McIntosh KR. Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons. *Cell Transplant* 2006; 15: 711–721.
7. Chen XC, Shan HW, Qu HL, Ge JB, Ge ZP. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation aggravates postangioplasty aortic restenosis in rats. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2007; 35: 802–806.
8. Wu X, Huang L, Zhou Q, Song Y, Li A, Jin J, Cui B. Mesenchymal stem cells participating in ex vivo endothelium repair and its effect on vascular smooth muscle cells. growth. *Int J Cardiol* 2005; 105: 274–282
9. Hashi CK, Zhu Y, Yang GY, Young WL, Hsiao BS, Wang K, Chu B, Li S. Antithrombotic property of bone marrow mesenchymal stem cells in nanofibrous vascular grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11915–11920.
10. Forte A, Finicelli M, De Luca P, Nordström I, Onorati F, Quarto C, Sante' P, Renzulli A, Galderisi U, Berrino L, De Feo M, Hellstrand P, Rossi F, Cotrufo M,

- Cascino A, Cipollaro M. Injury to rat carotids caused time-dependent changes in gene expression in contralateral uninjured carotids. *Clin Sci* 2008; DOI: 10.1042/CS20080080.
11. Ma J, Ge J, Zhang S, Sun A, Shen J, Chen L, Wang K, Zou Y. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2005; 100: 217–223.
 12. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315–317.
 13. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol* 2006; 109: 74–81.
 14. Wang CH, Cherng WJ, Yang NI, Kuo LT, Hsu CM, Yeh HI, Lan YJ, Yeh CH, Stanford WL. Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 54–60.
 15. Padubidri AN, Browne E. A new method of applying fibrin glue at the microvascular anastomotic site: the “paintbrush” technique. *Microsurgery* 1996; 17: 428–430.
 16. Karl P, Tilgner A, Heiner H. A new adhesive technique for microvascular anastomosis: a preliminary report. *Br J Plast Surg* 1981; 34: 61–63.
 17. Padubidri AN, Browne E, Kononov A. Fibrin glue assisted end-to-side anastomosis of rat femoral vessels: comparison with conventional suture method. *Ann Plast Surg* 1996; 37: 41–47
 18. Sugiura K, Nakatsucki Y, Yagi R, et al. A new method for venous interposition grafts using fibrin glue. *Microsurgery* 1985; 6: 125–128.

19. Han SK, Kim SW, Kim WK. Microvascular anastomosis with minimal suture and fibrin glue: experimental and clinical study. *Microsurgery* 1998; 18: 306–311.
20. Onur E, Kemal U, Ş Ozay O, Bulent S, Damlanur S, and Lutfu B, Anastomosis With Fish-Mouth Technique Using Fibrin Glue, *J Craniofac Surg* 2011; 22: 1047–1051.
21. Craig K. H, Yiqian Z, Guo-Yuan Y, William L. Y, Benjamin S. H, Karin W, Benjamin C, and Song L, Antithrombogenic property of bone marrow mesenchyma stem cell in nanofibrous vasculer grafts. *PNAS* 2007; 11915–11920.
22. Shinichiro O, Shigeki M, Yoshihisa T, Masataka E, Takehisa M, and Ryuji T, Experimental use of an elastomeric surgical sealant for arterial hemostasis and its long-term tissue response. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2010; 10:258-261.
23. Wei-Ming Y, Wei L, Yan-Wen B, Xiao-Peng H, Wen-Yu S, Xin-Yan P, Xing-Hua G, and Xue-Ping W. Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Reduce Neointimal Formation, and Enhance Endothelial Function in a Rat Vein Grafting Model; *STEM CELLS AND DEVELOPMENT* 2008; 17: 785–794.
24. Trounson, A.O., Gardner, D.K., Baker, G., Barnes, F.L., Bongso, A., Bourne, H., Calderon, I., Cohen, J., Dawson, K. Et al. *Handbook of in vitro fertilization* (Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.:CRC Press) (2000 b)
25. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
26. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 20002; 87: 1442-1446.
27. Pittenger, M.F., Marshak, D.R. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. Marshak, D.R., Gardner, D. Gottlieb, D. Eds. (Cold Spring Harbor. New York: Cold Spring Harsor Laboratory Press) 2001; 349-374.

28. Prockop, D.J, Marrow stromal cell as stem cell for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
29. Pittenger, M.F. Mackay, A.H. Beck, S.C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; 1999; 284:143-147.
30. Joshi, S.S., Tarantolo, S.R., Kuszynski, C.A., Kessinger, A.: Antitumor therapeutic potent of activated human umbilical cord blood cells against leukemia and breast cancer. *Clin. Cancer. Res* 2000; 6: 4351-4358.
31. Lagasse, E. Connors, H., Al Dhalimy, M., Reitsma, M, Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., Grompe, M.: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo *Nat.Med* 2000; 6: 1229-1234.
32. Childs, R., Chernoff, A., Contentin, N., Bahceci, E., Schrupp, D., Leitman, S., Read, E.J., Tisdale, J., Dunbar, C., Linehan, W.M. Young, N.S. Barrett. A.J. Regression of metastatic renal cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *N. Engl. J.Med* 2000; 343: 750–758.
33. Traynor, A.E., Schroeder, J., Rosa, R.M., Cheng, D., Stefka, J., Mujais, S., Baker, S., Burt, R.K. Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high dose chemotherapy and haematopoietic stemcell transplantation: a phase I study. *Lancet* 2000; 356: 707.
34. Shapiro, J. Lakey, J.R.T. Ryan, E.A, Karbutt, G.S., Tath, E., Warnock, G.I., Kneteman, N.M., Rajatte, R.V. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N.Engl. J.Med* 2000; 343: 230–238.
35. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528–1530.
36. Dufayet de la Tour, D., Halvorsen, T., Derneterca, C., Tyrberg, B., Itkin-Ansari, P., Loy, M., Yoo, S.J., Hao, S., Bassie, S., Levine, F.: b-cell differentiation from a human pancreatic cell line in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol* 2001; 15: 476–483.

37. Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 2002; 9: 648–652.
38. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7: 211–228.
39. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235–242.
40. Babaev VR, Bobryshev YV, Stenina OV, Tararak EM, Gabbiani G. Heterogeneity of smooth muscle cells in atheromatous plaque of human aorta. *Am J Pathol* 1990; 136: 1031–1042.
41. 46. Martin GM, Ogburn CE, Wight TN. Comparative rates of decline in the primary cloning efficiencies of smooth muscle cells from the aging thoracic aorta of two murine species of contrasting maximum life span potentials. *Am J Pathol* 1983; 110: 236–245.
42. Moeen A, Yin T, Linda L. D. Mesenchymal Stem Cells and the Artery Wall *Circ Res* 2004; 95: 671-676.
43. Montfort MJ, Olivares CR, Mulcahy JM, Fleming WH. Adult blood vessels restore host hematopoiesis following lethal irradiation. *Exp Hematol* 2002; 30: 950–956.
44. Kashiwakura Y, Katoh Y, Tamayose K, Konishi H, Takaya N, Yuhara S, Yamada M, Sugimoto K, Daida H. Isolation of bone marrow stromal cell-derived smooth muscle cells by a human SM22alpha promoter: in vitro differentiation of putative smooth muscle progenitor cells of bone marrow. *Circulation* 2003; 107: 2078–2081.
45. Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin’oka T, Ikada Y, Kurosawa H. First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation* 2003; 108: 1729–1734.
46. Bayramiçli M., *Biyolojik Özellikler ve Bakım Koşulları (içinde) Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri* ISBN:975-596-021-X, A4 Ofset Matbaacılık, İstanbul 2005; S:101–102.

47. Ross R, Glomset J.A; The pathogenesis of atherosclerosis, N Engl J Med 1976; 295: 369.
48. Govindarajan, R. Vijayakumar, M., Rao, C.V., Shirwaikar, A., Mehrotra, S., Pushpangadan, P. Healing potential of anogeissus latifolia for dermal wounds in rats, Acta Pharm 2004; 54: 331–338.
49. Rigler D.J. Inflammation and repair. In Veterinary Pathology, 6nd Ed., Edited by Jones, T.C., Hunt, R.D., King, N.W. 1997; pp: 150–157
50. Regan, M.C. Barbul, A. The cellular biology of wound healing. In: Wound Healing. Edited by Schlag, G. Redl, H. Vol:1 pp: 3-17 Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Printed in German. (1994).
51. Broughton II, G., Janis, J.E., Attinger, C.E. The basic science of wound healing, Plast Reconstr Surg (2006) 117 (Suppl.) 12S–34S.
52. Erbil, Y. Yara iyileşmesi In: Genel Cerrahi. Edited by Kalaycı, G. pp:51–59 Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. İstanbul Healing potential of anogeissus latifolia for dermal wounds in rats, Acta Pharm 2002; 54: 331–338.
53. Hedlund, C.S. Surgery of the integumentary system. In: Small Animal Surgery, 2th Edition, Edited by Fossum, T.W. 2002; pp: 134–137.
54. Theoret, C.L. Update on wound repair, Clin. Tech. Equine Pract 2004; 3: 110-122.
55. Steven, J.P. Physiology of wound healing and surgical wound care, ASAIO 2000; 46: S2–S5.
56. Strodbeck, F Physiology of wound healing, Newborn Infant Nurs Rev 2001; 1: 43–52.
57. Aukhil, I. Biology of wound healing, Periodontol 2000; 22: 44–50.
58. Brunicardi, F.C, Andersen, D.A., Billiar, T.R., Dunn, D.L., Hunter, J.G., Matthews, J.B., Pollock, R.E., Schwartz, I.S Wound healing. In: Schwartz's Principles of Surgery 2005; pp: 310–325.

59. Govindarajan R, Vijayakumar M, Rao, C.V, Shirwaikar A, Mehrotra S, Pushpangadan, P. Healing potential of *Anogeissus latifolia* for dermal wounds in rats. *Acta Pharma* 2004; 54(4): 331–8.
60. Li, J., Chen, J., Kirsner, R. Pathophysiology of acute wound healing, *Clin Dermatol* 2007; 25: 9–18.
61. Beanes, S.R., Dang. C., Soo, C., Ting, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β , *Expert Rev Mol Med* 2003; 21: 1–11.
62. Clowes AW. Pathologic intimal hyperplasia as a response to vascular injury and reconstruction. In: Rutherford RB, ed. *Vascular Surgery*. Philadelphia: WB Saunders 1995; pp: 285–293.
63. Zarins CK, Bassiony HS, Glagov S. Intimal Hyperplasia. In: Haimovici H, ed. *Vascular Surgery. Principles and Techniques*. Cambridge Massachusetts: Blackwell Science 1996; pp: 678–687.
64. Schwatz RS. Pathophysiology of restenosis: Interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodelling. *Am J Cardiol* 1998; 81: 4E–17E.
65. Nikol S, Höfling B. Gene therapy for restenosis: Progress or frustration. *J Invas Cardiol* 1998; 10: 506–14.
66. Lefkovits J, Topol EJ. Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 40: 141–58.
67. Transfusion by Carrel's End-to-end Suture Method. With Report of Cases. Eugene H. Pool and R. D. McClure. Chen L, Chiu DT: Spiral interrupted suturing technique for microvascular anastomosis: a comparative study. *Microsurgery* 1986; 7: 72–8.
68. Grondin CM, Campeau L, Lesperance J. Comparison of late changes in internal mammary artery and saphenous vein grafts in two consecutive series of patients 10 years after operation. *Circulation* 1984; 70: 208–215.
69. Schwartz Donohoe. Myointimal thickening in experimental vein grafts is dependent on wall tension. *J Vasc Surg* 1992; 15: 176–186.

70. Reidy M. A reassessment of endothelial injury and arterial lesion formation. *Lab Invest* 1985; 53: 513–20.
71. Megerman J, Hamilton G, Schmitz-Rixen T. Compliance of vascular anastomoses with polybuter and polypropylene sutures. *J Vasc Surg* 1993; 18: 827-834.
72. Brian C. C, Chao-Ying C, Kenneth D. F, Yvonne D. A prothrombotic phenotype in the Copenhagen rat strain; *Thrombosis Research* 2005; 115: 153–157.
73. Eroğlu F. Eroğlu H.E. *Ratlarda Analjezi ve Anestezi (içinde) Küçük Deney Hayvanlarından Rat* (Editör O. Yücel, O. Genç), www.jcam.com.tr
74. Çifci M. *Kültüre Kemik İliği Kök Hücrelerinin Uç-İçe Onarılmış Periferik Sinir Rejenerasyonundaki Etkisi*, Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun 2008; 40-43.
75. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*; 2001; 226: 507-520.