

**VASKÜLER ENDOTHELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE  
MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMASININ SIÇAN  
SIRT FLEBİ MODELİNDE KAPİLLER YOĞUNLUĞA  
ETKİSİNİN CD 31 İLE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CAPILLARY  
DENSITY WITH CD 31 VIA APPLICATION OF VASCULAR  
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND MESENCHYMAL  
STEM CELL ON RAT DORSAL FLAP MODEL**

**Ekin ERGİN**

**DOÇ. DR. ÖZER AYLİN GÜRPINAR**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı


beyan ederim.

07/07/2014

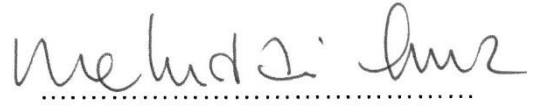
Ekin ERGİN

**Ekin ERGİN**'in hazırladığı "Vasküler Endotheliyal Büyüme Faktörü ve Mezenşimal Kök Hücre Uygulamasının Sıçan Sırt Flebi Modelinde Kapiller Yoğunluğa Etkisinin CD 31 İle İncelenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİMDALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

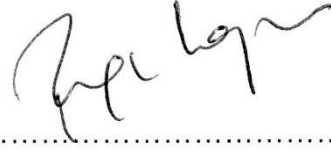
Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR  
Danışman



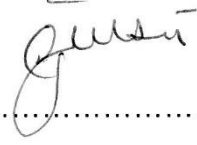
Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR  
Üye



Prof. Dr. Figen KAYMAZ  
Üye



Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU  
Üye



Prof. Dr. Mustafa KOCAKULAK  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

## ÖZET

# VASKÜLER ENDOTHELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ VE MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMASININ SIÇAN SIRT FLEBİ MODELİNDE KAPİLLER YOĞUNLUĞA ETKİSİNİN CD 31 İLE İNCELENMESİ

**Ekin ERGİN**

**Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR**

**Temmuz 2014, 72 sayfa**

Bu tez çalışmasında sıçanda modifiye edilerek oluşturulan sırt flebi modeli damarlanmanın etkisinin yorumlanması yönünde çalışılmıştır. Kontrol grubu, hücre grubu, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) grubu ve hücre+VEGF grubu çalışmada dört farklı deney grubu olarak tasarlanmıştır. Kontrol grubuna uygulama, besiyeri emdirilen jelatin matriks ile yapılmıştır. Diğer üç gruba VEGF ve hücre uygulaması jelatin matriks emdirilerek yapılmıştır. Hücre kaynağı olarak sıçan kasık bölgesinden izole edilen yağ doku kökenli mezenşimal kök hücreler (MKH) pasaj 4 aşamasında kullanılmıştır. Flep operasyonundan yedi gün sonra flepten alınan kesitler histolojik boyama yöntemleri ile incelenmiş ve kıl kökü, iskelet kası derecelendirilmesi yapılmıştır. Çalışmanın immünohistokimyasal basamağında CD 31 pozitif hücre sayımı yapılmış ve sonuç olarak hücre grubunda ortalama sayım değerinin diğer gruplara göre fazla çıktığı bulunmuştur. Bu veriyi destekler şekilde hücre grubunda nekroz alan yüzdesinin az, kıl kökü sayımının ve iskelet kasının iyi yönde olan durumu istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vermiştir. Sonuç, iskemi modellerinde MKH uygulamasının tek başına çalışılmasının damarlanmayı arttırıcı yönde etki edebileceği yönünde olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** MKH, VEGF, iskemi, CD 31.

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF THE EFFECT OF CAPILLARY DENSITY WITH CD 31 VIA APPLICATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND MESENCHYMAL STEM CELL ON RAT DORSAL FLAP MODEL**

**Ekin ERGİN**

**Master of Science, Department of Biology**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR**

**July 2014, 72 pages**

In this thesis study modified rat dorsal flap model had been studied to interpret the way of angiogenesis. Study was designed and divided into four different groups including control group, cell group, vascular endothelial growth factor (VEGF) group and cell+VEGF group. Giving medium had been applied with gelatine matrix in the control group. For other three groups giving VEGF and cell had been applied with gelatine matrix. As a cell source, mesenchymal stem cells isolated from rat inguinal region had been of the passage 4. Sections which were taken from flap, had been observed with histological staining method and then hair root and skeletal muscle score had been done at the seventh day after operation. To determine capillary density and to compare between groups, CD 31, an immunological marker, had been counted. Consequently, average of CD 31 count had been larger in cell group than other groups. To support the data, percentage of necrosis was found to be less, hair root count and muscle score was found in a good way to had be statistically significant. As a result, giving of MSCs seperately is better application for ischemic diseases to enhance angiogenesis.

**Keywords:** MSCs, VEGF, Ischemia, CD 31.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmalarım süresince beni destekleyen, uzun yıllardır eğitimci olarak desteğini aldığım ve bilgilerini benimle daima paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç Dr. Özer Aylin Gürpınar'a,

Tez çalışmamda bana histoloji laboratuvarı imkanlarını sunan ve değerli bilgilerini paylaşan daima sevgi ve saygıyla hatırlayacağım Sayın Prof. Dr. Figen Kaymaz'a, Tez deneylerimde bana yardımcı olan ve daima desteğini aldığım, bana her istediğimde vakit ayıran hocalarım, Araş. Gör. Handan Sevim'e, Araş. Gör. Esin Akbay'a ve Araş.Gör. Hanife Tanır Dönmez'e,

Laboratuvarda beraber çalışmaktan mutlu olduğum ve yardımlarını aldığım, çalışmalarımda bana destek olan sevgili arkadaşlarım Minela Jusovic ve Özbeyen Atalay'a,

Her zaman yanımda olan, daima desteklerini hissettiğim ve uzun yıllardır benimle yol arkadaşlığı yapan sevgili arkadaşlarım Tuğçe Özen'e, Oğuzhan Yaşarkan'a, Nefise Erdinçmer'e ve Burcu Olgun'a,

Yüksek lisans eğitimimde derslerde, tez dönemimde fikir alışverişi yaptığım ve destek aldığım hocalarım Araş. Gör. Seçil Karahisar'a ve Araş. Gör. Sevcan Aldemir'e,

Herşeyden önemlisi varlık sebebim olan, hayatta en değerli şeyin okumak olduğunu ve sorumluluk taşımak olduğunu öğreten, her zaman desteklerini aldığım, sevgilerini daima hissettiğim sevgili babam Ahmet Kadri Ergin'e ve annem Mevlüde Mihriban Ergin'e, uzakta da olsa desteğini hep hissettiğim sevgili kuzenim Ülkem Erkent'e, hayatım boyunca hep yanımda olan, sevgisini en derinden hissettiğim ve onsuz bir şey düşünmediğim en değerli varlığım olan sevgili ablam Deniz Çakmur'a ve eşi Ejder Çakmur'a sonsuz teşekkür ederim.

Ekin ERGİN

Ankara, Haziran 2014

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
TABLO DİZİNİ.....	vi
1.GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİ.....	2
2.1. Kan Damarları Sistemi .....	2
2.1.1. Arteriyel Sistem .....	3
2.1.2. Venöz Sistem .....	4
2.1.3. Kapiller .....	5
2.2. Anjiyogenezis .....	7
2.3. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) .....	10
2.4. Damar Hastalıkları .....	12
2.5. Kök Hücreler .....	14
2.5.1 Mezenşimal Kök Hücreler .....	16
2.5.2. Mezenşimal Kök Hücre Kaynakları .....	17
2.5.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Uygulama Alanları .....	19
2.6. Flep Modeli ve İyileşme Süreci .....	21
3.MATERYALLER VE YÖNTEM.....	24
3.1. MKH İzolasyonu ve Kültürü .....	24
3.2. Sıçanda Sırt Flebi Modelinin Oluşturulması .....	27
3.3. Deney ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması .....	28
3.4. Nekrotik Alan Yüzdesinin Hesaplanması .....	29
3.5. Histolojik Boyama Çalışmaları .....	30
3.6. CD 31 Hücre Yüzey Antijeninin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Tespiti ...	32
3.7. İstatiksel Analiz .....	34
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	35
4.1. MKH İzolasyonu ve Kültürü .....	35
4.2. Sıçanda Sırt Flebinin Oluşturulması .....	36
4.3. Deney ve Kontrol Gruplarının İncelenmesi .....	38

4.4. Nekrotik Alan Yüzdesinin Hesaplanması .....	38
4.5. Histolojik Boyama Çalışmaları .....	41
4.6. CD 31 Hücre Yüzey Antijeninin İmmunohistokimyasal Yöntemle Tespit Edilmesi .....	50
KAYNAKLAR .....	61
ÖZGEÇMİŞ .....	68
EKLER .....	69
EK-1 .....	69
EK-2 .....	70
EK-3 .....	71
EK-4 .....	72



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1. 1. Arterlerin genel yapısı [4] .....	3
Şekil 2.1.1. 2. Müsküler arter yapısı [3] .....	4
Şekil 2.1.2. 1. Müsküler arter (sol) ve ven (sağ) tabaklarının karşılaştırılması [4].....	4
Şekil 2.1.2. 2. Büyük ven yapısı.....	5
Şekil 2.1.3.1. Damar ağ yapısı.....	6
Şekil 2.1.3.2. Kapiller tipleri. A. Kesintisiz kapiller. B. Pencere kapiller. C. Sinüzoidal Kapiller [4].....	6
Şekil 4.2.1 Flep örneklerinin kesit için hazırlanması. Kontrol grubu (a), hücre grubu (b), VEGF grubu (c), hücre+VEGF(d). Hücre grubunda görülen kanlanma. ....	37
Şekil 4.5.1. Sırt flebinden alınan 1 cm <sup>2</sup> boyutundaki doku örnekleri (a, b).....	41
Şekil 4.5. 2.a. Kontrol grubunda dejenere olmuş kas dokusu (100X).....	41
Şekil 4.5. 2.b. Kontrol grubunda kan damarları ve dejenere olmuş kas dokusu gösterimi (200X). ....	42
Şekil 4.5.3.a Kontrol grubunda +3 değerini alan kas görüntüsü ve mononükleer hücre infiltrasyonu (100X) .....	43
Şekil 4.5. 3.b. Hücre grubunda +1 değerini alan kas görüntüsü ve kapiller görünüm (100X) .....	43
Şekil 4.5.3.c. VEGF grubunda +2 değerini alan kas görünümü (100X) .....	44
Şekil 4.5.3.d. Hücre+VEGF grubunda +3 değerini alan kas görünümü ve kapiller görünüm (100X) .....	44
Şekil 4.5.4.a. Kontrol grubunda dejenere +3 iskelet kası görüntüsü. Hücre infiltrasyonu ve kıl kökü yapısında azalma tespit edilmiştir (50X).....	45
Şekil 4.5.4.b. Hücre grubunda iskelet kası +1 görüntüsü (400X).....	46
Şekil 4.5.4.c. VEGF grubunda iskelet kası +2 görüntüsü (100X).....	46
Şekil 4.5.4.d. Hücre+ VEGF grubunda iskelet kası +3 görüntüsü. Yağ hücresi infiltrasyonu şekilde gösterilmiştir (50X).....	47
Şekil 4.5.5.a. Kontrol grubunda sağlıklı kıl kökü görünümü (100X) .....	48
Şekil 4.5.5.b Hücre grubunda sağlıklı kıl kökü görünümü (100X) .....	48
Şekil 4.5.5.c VEGF grubunda sayım yapılamayan ve iskelet kası açısından +3 değerini alan örnek (100X) .....	49
Şekil 4.5.5.d Hücre+VEGF grubunda kıl kökü görünümü (100X) .....	49
Şekil 4.6.1.a Kontrol grubunda oklar ile kapiller gösterimi (400X).....	51
Şekil 4.6.1.b. Hücre grubunda oklar kapiller gösterimi (400X).....	51
Şekil 4.6.1.c VEGF grubunda oklar ile kapiller gösterimi (400X) .....	52
Şekil 4.6.1.d Hücre+VEGF grubunda oklar ile kapiller gösterimi (400X) .....	52

## TABLO DİZİNİ

Tablo 4.4. 1 VEGF için verilen OD (570 nm) değerleriVEGF için verilen OD (570 nm) değerleri.....	40
Tablo 4.6. 1. a. Gruplar arasında CD 31 <sup>+</sup> hücre sayımı ortalama değerleri.....	50
Tablo 4.6. 2. CD 31 <sup>+</sup> hücre sayımının ortalamasının gruplar arasındaki değişimi .....	50
Tablo 4.6. 3. İstatistik için kullanılan veriler .....	53

# 1. GİRİŞ

Damar hastalıkları cerrahi müdahaleler sonucunda tedavisi mümkün olabildiği gibi, kimi zaman da mümkün olmayan ve hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen durumlardır. Günümüzde klinikte cerrahi imkanlara bağlı olarak stentler ve damar greftleri hazırlanması kalp-damar hastalıklarının tedavisinde kullanılırken; diabetes mellitus gibi hastalıklarda sekonder tablo olarak görülen kronik bacak iskemisi tedavisi mümkün olmayan noktadan sonra amputasyon ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, plastik cerrahide özellikle deri hasarlarında flep modelleri istenilen damarlanma düzeyine ulaşamadığı için ilerleyen nekroza bağlı olarak yine istenmeyen sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Klinik uygulamadaki bu yetersizlikler, klinik öncesi çalışmaların gerekliliğini de beraberinde getirmektedir. Son 10 yılda damarlanma ile ilgili olan çalışmalara bakıldığında kök hücre kavramının giderek yaygınlaştığı görülmektedir. Mezenşimal kök hücreler ise damar çevresinde kendini göstermesiyle, salgıladıkları zengin damarlanma faktörleri ve yangı bölgesine göç etme yetenekleri sayesinde çalışmalarda tercih edilen bir kaynaktır.

Buna bağlı olarak bu tez çalışmasında sıçan yağ dokusundan izole edilen mezenşimal kök hücrelerin sırt flebi modelinde damarlanmaya olan etkisi araştırılmış, yeni damar oluşumu CD 31+ endotel öncü hücrelerinin sayısı ile tespit edilmiştir. Sonuçlar, mezenşimal kök hücrelerin yeni damar oluşumunu desteklediği yönünde olmuştur.

## 2. GENEL BİLGİ

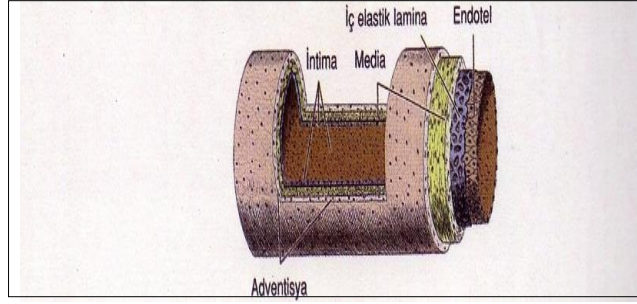
Organizmada hücrelerin yaşamı için gerekli maddelerin alınması ve hücre metabolizması sonucunda oluşan atık maddelerin uzaklaştırılması dolaşım sisteminin fonksiyonudur [1]. Dolaşımın temel kurallarından birisi her dokunun kendi kan akımını gereksinimlerine göre kendisinin belirlemesidir. Dokulara oksijen taşınması, glukoz, yağ asiti gibi besin maddelerinin dokuya taşınması, karbondioksitin dokulardan uzaklaştırılması gibi metabolik faaliyetler ve iyon konsantrasyonunun dengelenmesi, hormonların ve özgül maddelerin taşınması dolaşım sisteminin görevlerindedir [2]. Kalp ve kan damarlarından oluşan kan damarları sistemi kan ve çeşitli bileşenlerini vücutta taşımada görev alır [3].

### 2.1. Kan Damarları Sistemi

Kan damarlarının esas yapısını endotelyum kas dokusu ve elastik liflerce zengin bağ dokusu oluşturur. Damarlar; çap, histolojik yapı ve işlevlerine göre farklılık göstermektedir. Damarlar sistemi; arteriyel sistem, venöz sistem ve arterler ile venler arasında akışı sağlayan kapiller sistem olmak üzere 3 kısımda incelenmektedir [1].

Damarların yapısına bakıldığında genel yapı itibariyle kan damarları tunika intima, tunika media ve tunika adventisya olmak üzere üç katmandan oluşur (Şekil 2.1.1). Bu katmanların birbirlerinden farklılığını histolojik bileşenlerindeki farklılık sağlar [4].

1. Tunika intima: Damarın en iç tabakasıdır. Bu tabakada tek katlı endotel hücreleri gevşek bağ doku üzerinde yerleşmiştir.
2. Tunika media: Damarın orta tabakasıdır. Düz kas hücreleri baskın olarak bulunur. Düz kas hücreleri arasında değişen oranlarda elastik lifler, retiküler lifler, proteoglikanlar ve glikoproteinler vardır.
3. Tunika adventisya: Damarın dış tabakasıdır. Uzunlamasına dizilen kollajen ve elastik liflerden oluşur. İçinden geçtiği organın etrafını saran bağ dokusu ile kaynaşma özelliği gösterir [4].

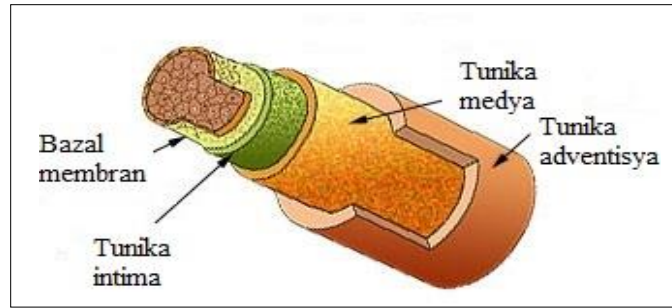


**Şekil 2.1. 1.** Damarların histolojik tabakları [4]

Ayrıca büyük damarlarda, adventisyada ve medianın dış kısmında çok sayıda dal yapan arteriyol, kapiler ve venüller şeklinde vasküler yapılar olan *vaso vasorum* yapıları bulunmaktadır.

### 2.1.1. Arteriyel Sistem

Kanı kalpten uzağa ileten sistem arterlerdir. Arterler yapılarında bulunan elastik doku sayesinde esnek özelliğe sahiptir [1].

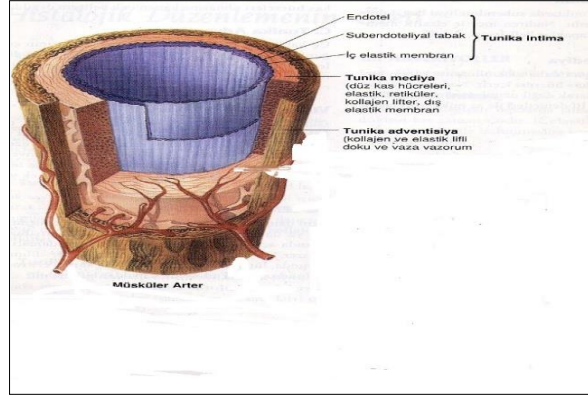


**Şekil 2.1.1. 1.** Arterlerin genel yapısı [4]

1. Elastik arterler: İletici ya da büyük arterlerdir. Kanı direkt olarak kalpten alan arterlerdir [3]. Buna bağlı olarak diyastolik basıncın oluşumundan sorumludur ve kan akışının düzenli olmasına yardımcı olur. Bu arter tipi aort ve onun dallarını kapsamaktadır. Mediada elastin yoğunken; tunika intima mükümler artere oranla kalındır. Bu damarda bulunan karotid cisimler oksijen ve karbondioksit değişimlerine duyarlı kemoreseptörlerdir ve bu özellikleri ile pH değişimlerine de duyarlıdır. Bu reseptörlerin iki tipi mevcuttur: Tip I hücrelerde dopamin, serotonin ve adrenalin içeren çok sayıda vezikül varken; tip II hücreler destekleyici özellik gösterirler (Şekil 2.1.1.2) [4].

2. Metarteriyoller: Arteriyel kanın sfinkterlerden geçişini kontrol eden yapılardır. İntima ve adventisya tabakları ince olup media tabaklarında da düz kas hücreleri seyrek dağılır [4].

3. Müsküler arterler: Dağıtıcı ya da orta arterlerdir (Şekil 2.1.1.2). Kanı çeşitli organlara dağıtırlar [3].

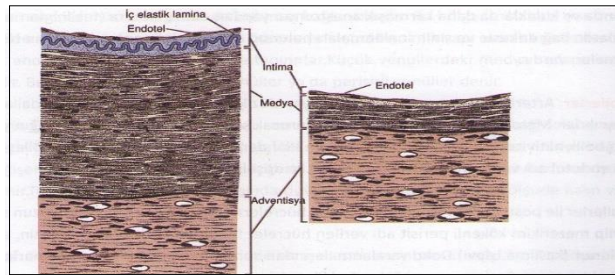


Şekil 2.1.1. 2. Müsküler arter yapısı [3]

4. Arteriyoller: Çapları 0.5 mm'den küçük olan arterlerdir. İntima tabakaları ince olup media tabakaları bir ya da iki katlı düz kas hücrelerinden oluşur. Ayrıca arterlerde media ve adventisya tabakalarını ayıran lamina elastika çok küçük arteriyollerde bulunmaz [4]. Damar duvarlarının vazokonstraksiyon ya da vazodilatasyonu yoluyla kan basıncını ve kapiller yataktaki kanın dağılımını düzenler [3].

### 2.1.2. Venöz Sistem

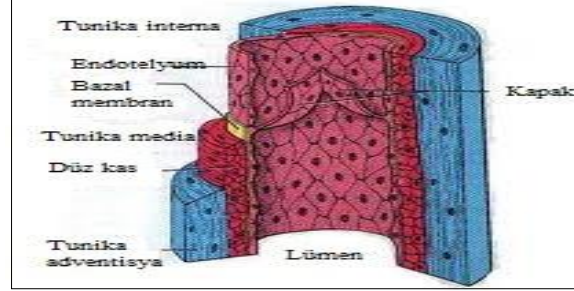
Venler kanı dokulardan uzaklaştıran damarlardır. Venler, arterler ile karşılaştırıldığında kas ve bağ doku oranında önemli ölçüde azalmalar olduğu görülür (Şekil 2.1.2.1). Buna bağlı olarak histolojik incelemelerde arterlere göre büyük çaplı oluşları ve arter duvarına göre ince duvara sahip olmaları ile ayırt edilirler [3].



Şekil 2.1.2. 1. Müsküler arter (sol) ve ven (sağ) tabakalarının karşılaştırılması [4]

Venlerde kanın geriye akışını önleyen kapakçıklar bulunmaktadır. Venler; büyük, orta ve küçük olmak üzere 3 kategoride incelenir ve küçük venler venüller olarak adlandırılmaktadır [3].

1. Büyük çaplı venler: İntima tabakaları inceyken; media tabakaları birkaç kat düz kas hücresi içerir (Şekil 2.1.2.2). En tipik özellikleri düz kas demetleri içeren adventisya tabakasının çok kalın ve çok gelişmiş olmasıdır [4].

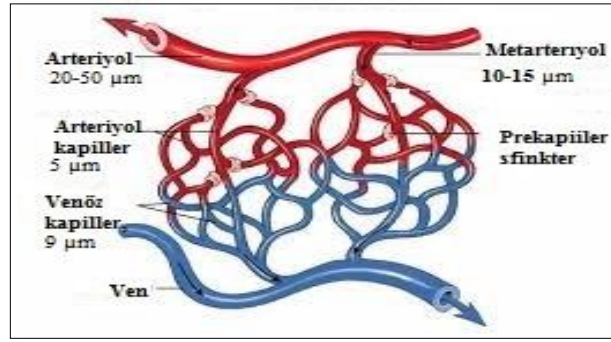


**Şekil 2.1.2. 2. Büyük ven yapısı**

2. Orta venler: İntima tabakaları endotel, bazal lamina, ince bir bağ dokusu ve kapakçıklar içerir. Media değişen oranlarda bağ doku elemanları ve düz kas hücrelerden oluşmaktadır. Adventisya tabakası kalınlaşmıştır.
3. Venüller: Kanı kapillerden alan ince damarlardır. Kan damarları arasında endotel hücrelerinin en gevşek bağlantılar yaptığı damar tipi venüllerdir. Buna bağlı olarak iltihabi yanıtlarda doku sıvısına sızan plazma ile ödem oluşumu görülmektedir. Kapiller damarlardan ayırt edilmeleri çaplarının daha büyük olmasıyla mümkündür. Medialarında kasılma özelliğinde olan perisitler bulunmaktadır [4]. Venüller üzerine etki eden ve vazodilatör özellikte olan histamin ve serotoninin komşu endotel hücrelerle hücrelerarası boşluğu arttırarak venüllerin daha geçirgen olmasını sağladığı bilinmektedir [3].

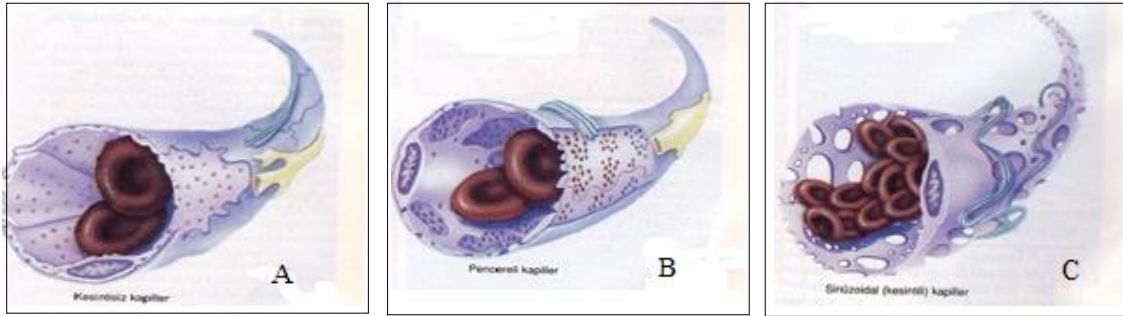
### **2.1.3. Kapiller**

Kapiller ince duvarlı damar ağını oluşturmaktadır ve metarteriyollerin devamı şeklinde oluşan yapılardır [4]. Kapiller 8-10 µm çapındaki ve genellikle 1 mm'den daha kısa olan dar vasküler kanal oluşturan ve endotel hücrelerden oluşan ağ yapısı şeklindeki damarlardır ( Şekil 2.1.3.1) . Bu yapı arteriyel sistem ve venöz sistem arasına yerleşmiştir. Bazal lamina ve perisitlerle olan ilişkilerine rağmen kapiller vazomotor aktivite göstermezler. Kan akımının kontrolü prekapiller sfinkterler ile olmaktadır [3].



**Şekil 2.1.3 1.** Damar ağ yapısı.

Kapiller ağın yoğunluğu ve dokunun metabolik aktivite oranı arasında doğrudan ilişki vardır. Kapiller bazal laminanın ve endotel tabakasının sürekliliğine göre çeşitlere ayrılır ( Şekil 2.1.3.2. a, b, c) [3]:



**Şekil 2.1.3 2** Kapiller tipleri. A. Kesintisiz kapiller. B. Pencere kapiller.

C. Sinüzoidal Kapiller [4]

1. Kesintisiz (somatik) kapiller: Endotel hücreleri sıkı bağlı ve bazal lamina sürekli özelliktedir. Bu tip kılcal kan damarları bağ dokusunda, kas dokusunda, ekzokrin bezlerde ve sinir dokusunda bulunurlar [4].

2. Pencere (visseral) kapiller: Bazı tiplerinde endotel hücrelerinin duvarlarında hücre zarından ince yapıda bir kılıf olan diyafram bulunmakta; ancak bazılarında bu yapı bulunmamaktadır [3]. Diyafram bulundurmayan tipleri böbrek glomerülü için tipiktir. Bazal lamina her iki tip kapilerde süreklilik göstermektedir. Pencere kapiller madde alışverişinin yoğun olduğu böbrek, bağırsak ve endokrin bezlerde bulunur [4].

3. Sinüzoidal (kesintili) kapiller: Endotel hücreleri aralıklı ve bazal lamina kesintilidir. Endotel hücrelerinin bu konumu madde alışverişini için elverişlidir. Karaciğer, kemik iliği, dalak ve lenf nodlarında bulunur [4].

Kapiller ile venüllerde endotel hücrelerin etrafını kısmen saran uzun sitoplazmik uzantılara sahip mezenşimal kökenli perisit adı verilen hücreler bulunmaktadır.

Perisitlerde aktin, miyozin ve tropomiyozin bulunur. Doku yaralanmalarından sonra, perisitler yeni kan damarlarını oluşturmak üzere damarlanma sürecine katılırlar [4].

## **2.2. Anjiyogenezis**

Normal doku fonksiyonlarının devamı için dokuların oksijen gereksinimlerini karşılamaları gerekmektedir. Bu durum dokulara giden kan damarları sayesinde olmaktadır. Kan damarları oluşma mekanizmasında endotel hücreler, integrin ailesini kapsayan hücrelerarası bağlantılar ve damarlanma faktörlerinin rolü birbirleriyle sıkı sıkıya ilişkilidir. Anjiyogenezis damarlanma süreci için kullanabileceğimiz genel bir terim olmakla beraber yetişkinlerde patolojik durumlarda kendini gösterir ve kalp hastalıkları, yara iyileşmesi gibi durumlarda da iyileştirici özelliğindedir.

Doku gelişimi ve kan damarları oluşumu arasında doğrudan bir ilişki vardır ve buna bağlı olarak yeni kan damarlarının oluşumu fetal evrede olduğu gibi erişkin evrede de önem taşımaktadır [5]. Anjiyogenezis erişkinlerde yara iyileşmesi, endometriyum proliferasyonu, folikül olgunlaşması, koleteral dolaşım gibi fizyolojik süreçlerin yanı sıra tümör büyümesinde de görülmektedir [5,6].

Anjiyogenezis terimi yaygın olarak var olan damar yatağından yeni damar ağının oluşumunu ifade etmek için kullanılmaktadır ve yetişkinlerde yeni damarların oluşumundan sorumlu süreç anjiyogenezistir [7]. Bu süreç retinal neovaskülarizasyon gibi durumlarda ya da metastaz gibi durumlarda normalde varolan fizyolojik dengesinin dışında da ortaya çıkar.

Anjiyogenezis kavramıyla beraber sık karşılaştığımız; ancak anjiyogenezisten farklı olan vaskülogenezis ise endotel öncüsü hücrelerin olgun endotel hücrelere dönüşerek yeni kan damarı ağını oluşturmasıdır [8]. Oluşan bu primitif damarların büyümesi, genişlemesi ve yeniden modellenmesi ile ilgili süreç anjiyogenezis olup [9] bu iki süreç arasındaki ilişki bu şekilde ifade edilmektedir.

Anjiyogenezis, endotel hücrelerin aktivasyonunu sağlayan ve bu hücrelerin bölünmesini sağlayan anjiyogenik faktörler ile anti anjiyogenik faktörler arasındaki denge ile gerçekleşmektedir. Bu denge patolojik durumlarda bozulmaktadır. Anjiyogenik faktörler açısından en çok çalışılmış olan faktör vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) olarak bilinmektedir. Endotel hücre proliferasyonu incelendiğinde büyüme faktörü reseptörleri ve integrinlerin oluşturduğu sinyallerin varlığı görülmektedir [7].



Bu süreçte varolan damarların vazodilatasyonu, geçirgenliği arttırmakta ve çevredeki matriksin degradasyonunu sağlamaktadır. Bu durum endotel hücrelerin proliferasyonuna ve aktivasyonuna göç etmeleri ve yeni damar lümeni oluşturmaları için imkan sağlamaktadır. Filizlenen yeni damarlara ait endotel hücreleri lokal gereksinimlere göre farklılaşma göstermektedir. Bu durumda çevreden gelen sinyalci moleküller önem kazanmaktadır [9]. En son aşama ise damarların yeniden modellenmesi olan remodeling olarak ifade edilir. Anjiyogenezisin basamakları şu şekilde açıklanabilmektedir [10, 11]: Vazodilatasyon, endotel geçirgenlik ve periendotel destek, endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu, lümen formasyonu, endotel farklılaşma, remodeling. *Vazodilatasyon, endotel geçirgenlik ve periendotel destek:* Anjiyogenezis vazodilatasyon ile başlar. Bu süreç nitrik oksit molekülünü içermektedir [12]. VEGF transkripsiyonu nitrik oksit tarafından artırılır [9]. Vasküler geçirgenlik, VEGF molekülüne cevap olarak artmaktadır [12,13]. Endotel hücreler pasif durumda birbirlerine oldukça bağlı sıkı düzenlenmiş hücrelerdir. Hücreler arasındaki bağlantılar vasküler endotel-kaderin (VE) ve klaudinlerle sağlanmaktadır. Ayrıca endotel hücreler perisit hücrelerce etrafları sarılmış olarak bulunurlar. Bu hücreler endotel hücrelerin bölünmesini baskılamakta; aynı zamanda da VEGF ve anjiopietin-1 ( ANG-1) gibi hücre-sağ kalım sinyalleri üretmektedir. Endotel hücreler ve perisitler buldukları durum itibari ile hareketsiz bir membran oluşturmaktadır.

Pasif haldeki endotel hücreler hipoksi ve inflamasyon gibi durumlarda ve tümör hücrelerinin salgılayabildiği faktörler olan VEGF, VEGF-C, ANG-2, fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi faktörler aracılığı ile anjiyogenik bir sinyal aldıkları zaman, endotel hücreler tarafından matriks metalloproteinaz düzeyi artırılır ve perisitler matriks metalloproteinazların yönettiği proteolitik degradasyon ile buldukları membran yapısından ayrılır. Buna bağlı olarak olgun damarlar stabilize durumlarını kaybederken endotel hücreler buldukları yerden göç edebilme yeteğine kavuşur [11, 13]. VEGF geçirgenliğin düzenlenmesi hücrelerarası adezyon molekülleri olan platelet endotel hücre adezyon molekülü (PECAM-1) ve VE-kaderinin yeniden dağılımı sağlanarak ve hücre membranı yapısında bir seri kinaz molekülünün değişimini sağlanarak yapmaktadır [9,14].

*Endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu:* Prolifere olan endotel hücreler izleyecekleri yol belli olur olmaz uzak taraflara doğru göç ederler. Bu adımda

VEGF molekülünün çeşitli formları, anjiyopietin formları ve fibroblastik büyüme faktörü ve bunların reseptörleri arasında etkileşim olmaktadır [9, 12]. VEGF-B, plasminojen aracılı ekstrasellular matriks degradasyonu ile ilişkilendirilmektedir ve koroner arter fonksiyonunu düzenlediği düşünülmektedir. VEGF-C için yetişkinlerde anjiyogenezisi uyardığı keşfedilmiştir. VEGF-C reseptörü olan VEGFR3 embriyonik gelişim aşamasında yüksek oranlarda ifade edilmektedir ve anjiyogenezis için gereklidir. ANG1 Tie2 reseptörünün fosforillenmesi aracılığı ile endotel hücreler için kemotaksiyi sağlar ve filizlenmeyi uyarır. Böylece endotel ve periendotel hücreler arasındaki etkileşimi harekete geçirir. ANG2, VEGF ile birlikte uyum içinde anjiyogenik özellikteyken VEGF yokluğunda ANG2 damar gerilemesine yol açmaktadır [9].

*Lümen formasyonu:* Endotel hücreler sıralanarak lümen şeklini oluştururlar. Endotel hücrelerin kalın bir tabaka oluşturması ve varolan damarların bölünmesi damarların çaplarının ve uzunluklarının artmasına neden olur. Lümen şeklinin oluşması için birçok faktör rol oynamaktadır. Bu faktörlerden VEGF<sub>189</sub> çapta küçülmeye sebep olurken; VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> reseptörleri ile ilişki kurarak lümen şeklinin oluşmasını ve uzunluğunun artmasını sağlar. Ang 1 ve VEGF kombinasyonu ise lümen çapını artırır [12].

*Endotel sağ kalım:* Endotel hücreler birleşir birleşmez, dış faktörlere karşı önemli ölçüde dirençli hale gelir ve hayatta kalma özellikleri ile beraber yıllarca sessiz bir şekil de konumlarını korurlar [9]. VEGF, Ang1 gibi endotel sağ kalım faktörleri PI3-kinaz/Akt, Bcl-2 gibi sağ kalım sinyal yollarını aktive ederken; p53, p21, Bax ifadelerini baskıladığı bilinmektedir [12]. Bu durum endotel hücrelerin apoptozise girmesini baskılamaktadır ve oluşan damarların stabil durumlarını koruyabilmelerine zemin hazırlamaktadır.

Endotel hücre apoptozisi, vasküler gerileme olarak embriyoda görülmektedir. Bu durum doğal ve fizyolojik bir süreçtir. Endotel hücrelerin uzun yıllar boyunca sessiz kalıp durumlarını koruması tam olarak açıklanamamaktayken; bu hücrelerin spazm, trombus gibi durumlarda oluşan besin eksikliğine bağlı olarak salgılanan pro-apoptotik sinyaller ve anti-apoptotik etkinin baskılanmasıyla programlı hücre ölümüne gittikleri çalışmalarda gösterilmiştir. Bu durum damar gerilemesine sebep olmaktadır [9].

*Endotel farklılaşma:* Damar gelişimine bağlı olarak endotel hücreler lokal fizyolojik gereksinimleri karşılamak için dokunun gerektirdiği spesifik karakterleri kazanır.

Örneğin kan beyin bariyerinin gelişimi için astroglial hücrelerin etkileşimine ihtiyaç duyar. Bu hücreler, gliyal fibriler asidik protein, perisit ve yeterli oranda anjiyotensinojen ifade eder [9].

*Remodeling:* Vasküler ağın üç boyutlu yapısının oluşumu son aşamayı ifade etmektedir. Bu aşama özellikle terapötik çalışmaların hedefidir. Damarların olgunlaşması yeniden modellenme sürecini kapsamaktadır [12].

### **2.3. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)**

VEGF, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) ailesine ait bir proteindir. Kromozom bölgesi olarak altıncı kromozomun 6p12 lokasyonunda bulunmaktadır ve vasküler geçirgenliği artırma, anjiyogenezisi ve vaskülogenezisi uyarma, endotel hücre proliferasyonunu artırma, apoptozisi engelleme görevleri bulunmaktadır [15]. VEGF endotel hücrelere spesifik olarak bulunan homodimerik yapıdaki bir glikoproteindir. Anjiyogenezis ve vaskülogenezis için kritik düzenleyici rolüne ek olarak damar geçirgenliğinin arttırmada da görevlidir [16].

VEGF keşfi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar 1980'li yıllara dayanmaktadır [17]. 1983 yılında Sanger ve ark. tarafından deride kan damarı geçirgenliğini arttıran bir faktör olarak vasküler permeabilite faktörü bulunmuştur ve sonrasında 1989 yılında Ferrara ve ark. bu faktörü endotel hücre mitojeni olarak tanımlamıştır. Sonrasında yapılan genom çalışmalarıyla iki faktörün aynı yapıda olduğu ve aynı gen bölgesinde olduğu bulunmuştur ve adı VEGF olarak belirlenmiştir [17].

Çalışıldığı yıllar süresinde VEGF molekülünün birçok üyesi olduğu bulunmuştur. VEGF gen ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü (PIGF) üyelerinden oluşmaktadır. Bu üyelerin her biri reseptör tirozin kinaz (RTK) olan VEGF reseptörlerine farklı afinite göstermektedirler [16, 19].

Bu üyelerden en çok çalışılanı VEGF-A olarak bilinmektedir [18]. VEGF-A vücutta birçok fizyolojik ve patolojik süreçte kendini göstermektedir ve anjiyogenezis ile ilgili VEGF gen ailesinin en güçlü üyesi olup anti-VEGF tedaviler için en çok çalışılan üyedir [16].

VEGF-A yaygın olarak 5 izoformdan oluşmaktadır. Bunlar VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub> olarak ifade edilmektedir. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> ve VEGF<sub>189</sub> dokularda geniş yayılım göstermektedir. VEGF<sub>165</sub> ifadesi VEGF<sub>189</sub> ifadesine göre daha fazladır [16,18]. Bu numaralandırma izoformların içerdiği aminoasit sayısına göre yapılmıştır. VEGF'nin bu izoformları aynı zamanda heparin ve heparin sülfat bağlama yeteneklerine göre ayırt edilir. VEGF<sub>165</sub> anjiyogenezisi uyarma konusunda

potansiyeli en çok olan üyedir. VEGFA, PIGF varlığında endotel hücrelerin proliferasyonunu arttırabilirken; tek başına oldukça zayıf bir mitojenik etki göstermektedir [16].

VEGF-B, VEGFR1'e seçici olarak bağlanma özelliği gösterir ve ekstrasellüler matriks degradasyonu, hücre adezyonu ve migrasyonunda görev yapar.

VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR2 ve VEGFR3 reseptörlerine bağlanır ve lenfogenezisten sorumludur. Ayrıca VEGF-C yara iyileşmesi sürecinde de görev almaktadır. PIGF seçici olarak VEGFR1'e bağlanır ve VEGF üyeleri arasında endotel hücrelerde en fazla ifade edilen üyedir [16].

VEGF reseptörleri ilk olarak endotel hücre yüzeylerinde *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda VEGF bağlama bölgeleri olarak tanımlanmıştır. Sonrasında bu reseptörlerin kemik iliği kökenli hücrelerde kendini gösterdiği belirgin bir hal almıştır [20]. VEGF üç adet reseptör tirozin kinaza bağlanmaktadır. Bunlar VEGFR1, VEGFR2 ve VEGFR3 olarak sınıflandırılır. Bu sınıfa ek olarak son yıllarda bir diğer reseptör tipi olan nörofinler de gündeme gelmiştir.

VEGFR1 (flt-1) 80 kD ağırlığında transmembran yapıda bir proteindir. Bu reseptör VEGF-A, PIGF ve VEGF-B için bağlanma özelliği göstermektedir [19]. VEGFA'nın VEGFR1'e olan afinitesi VEGFR2'ye göre 10 kat daha fazla olup reseptör tirozin kinaz aktivitesi 10 kat daha azdır. Ayrıca VEGFR1, VEGF-A'nın VEGFR2'ye bağlanmaması için aldatici reseptör özelliği gösterir [19]. Bu özelliği ile ilişkili olarak VEGFR1 için VEGF-A aktivitesini inhibe edici özellik gösterdiği söylenebilir [20]. VEGFR1 endotel hücrelerde ifade edilmesine ek olarak monositlerde, osteoblastlarda, makrofajlarda, perisitlerde, hematopoietik kök hücrelerde, vasküler düz kas hücrelerinde de bulunmaktadır.

VEGFR2 (kdr/flk1) 230 kD ağırlığında bir glikoprotein olup VEGF-A, VEGF-C ve VEGF-D bağlanabilir. VEGF-A için VEGFR1'e göre daha düşük afiniteye sahiptir [19]. Bu reseptörün kilit rolü anjiyogenezis gelişimi ve hematopoiezdir. VEGFR2 VEGF'nin mitojenik, anjiyogenik ve geçirgenlik arttırıcı etkisinde esas aracıdır. VEGFR2, endotel hücrelere ek olarak hematopoietik kök hücrelerde, megakaryositlerde, retina öncüsü hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde ifade edilmektedir.

VEGR3 (flt-4) 170 kD ağırlığında glukozillenmiş bir proteindir. VEGF-C'ye bağlanır. Bu reseptör embriyonik endotel hücrelerinde gelişim boyunca ifade edilir ve

sonrasında kan damarlarında ifade oranı düşmeye başlar. Yetişkin dokularda lenfatik endotelyumlarla ifadesi sınırlı kalır [19].

Nörofilin1 ve nörofilin2 (NRP-1 ve NRP-2) VEGF molekülünün afinite gösterdiği ve reseptör tirozin kinaz olmayan ve VEGF-A, VEGF-B ve PIGF-2'nin bağlanma özelliği gösterdiği bir başka reseptör sınıfı olarak keşfedilmiştir [21]. NRP-1 VEGFR1 ve VEGR2 ile ilişkilidir. VEGR2, NRP-1 ile birlikte ko-reseptör şeklinde çalışıp VEGF<sub>165</sub> izoformuna daha hızlı bağlanabilmektedir [19,21].

#### **2.4. Damar Hastalıkları**

Türkiye istatistik kurumunun 2013 yılı ölüm istatistikleri oranına bakıldığında ülke genelinde ölümlere sebep olan 6 hastalık arasında dolaşım sistemi hastalıklarından kaynaklanan ölüm oranının %39.8 ile ilk sırayı aldığı ortaya konmuştur [22]. Buna ek olarak dolaşım sistemi hastalıkları nedeniyle gerçekleşen ölümlerin %38,8'i iskemik kalp hastalığı, %25,2'si serebro-vasküler hastalık, %17,7'si diğer kalp hastalıkları ve %12,8'i ise hipertansif hastalıklardan kaynaklandığı açıklanmıştır [22].

Damar hastalıklarında oluşan durumlara bağlı olarak invaziv tanı yöntemleri mevcuttur. Bu tanı yöntemlerine yardımcı olabilecek gözlemlerden en tipik olanı devamlı ya da aralıklı olarak görülebilen ağrıdır. Bu durum genellikle tıkaçıcı arter hastalıklarında erken dönemde ve egzersiz sırasında kendini gösterir. Buna ek olarak muayene esnasında gözlenen renk değişiklikleri, ülser, kangren, ödem, kan akımına bağlı oluşan ısı değişiklikleri de gözlenen durumlardır [23, 24].

Damar sistemine bakıldığında damarlar için tıkaçıcı olan süreçlerin dolaşım sistemi açısından risk teşkil ettiğini görürüz. Koroner veya periferik damalarda tıkanma veya daralma gibi durumlar söz konusu ise yüksek vasküler risk kavramı kendini gösterir. Risk faktörleri, çevresel ve genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır. Bu faktörlerin yol açtığı koroner, serebrovasküler ve periferik damar sistemindeki hastalıklarda temel sebep aterosklerozdur. Ateroskleroz durumunda aterosklerotik plak üzerinde trombüs oluşması aterotromboz olarak tanımlanır. Bu durumda büyük ve orta arterlerdeki patolojiye bağlı olarak vasküler bir hastalık durumu oluşmaktadır. Miyokard infarktüsü (MI), periferik arter hastalığı (PAH) ve inmenin birçok formunun altında aterotromboz yatmaktadır [25].

Koroner arter hastalığının patofizyolojisinde üç temel değişikliğin altı çizilmektedir:

1. Koroner sirkülasyonda oluşan ve damar büzülmesine sebep olan cevaplar
2. Platelet- damar duvarının etkileşiminin artması

3. Damar duvarındaki proliferatif cevaplar epikardiyal koroner arterlerin daralmasına sebep olur. Üç faktörün birleşmesi durumunda miyokardiyal infarktüs ve sonunda ölüm meydana gelir.

Yaşlanma, dejenere olan endotelyum, lipoproteinler ve hiperkolestrol, hipertansiyon, diyabet ve ateroskleroz vasküler hastalıklarda en önemli tanımlayıcılarıdır. Ateroskleroz bu faktörler tarafından uyarılan en yaygın kardiyovasküler hastalıktır. Ateroskleroz; morfolojik olarak platelet-damar duvarı etkileşiminin artması, endotel hücre polimorfizmi, vasküler düz kaslarda ve fibroblastlarda proliferatif değişiklikler, endotel aşınım, damarlarda kapak yapısının bozulması ve trombozis ile karakterizedir. Kan akımındaki stres durumu aterosklerotik lezyonların oluşmasının bir sonucudur. Yüksek kolestrol, sigara içme ve hipertansiyon sinerjik olarak plak oluşumunu arttırmaktadır [26].

Perifer arter hastalığı (PAH), alt ekstremitayı besleyen ana damarlarda arteriyel darlık ve tıkanmaya neden olan ateroskleroz sonucunda gelişir. PAH ilerleyen ateroskleroz sonucunda abdominal aort ve aortun bifurkasyon seviyesinin distalindeki arterlerde daralma veya tıkanıklık ile kendini gösteren bir hastalıktır [27, 28]. PAH için en klasik semptom alt ekstremitelerdeki kaslarda egzersiz sırasında artış gösteren ağrı ve huzursuzluk olup dinlenme esnasında bu durum kaybolmaktadır. Bu semptom intermitten kladikasyondur [27]. Ülkemizde Batı Avrupa ülkelerine kıyasla, total kolestrol düzeyleri düşük bulunmakla beraber, yaygın sigara içimi, obezite ve metabolik sendrom durumları ile hipertansiyon ve diyabet gibi hastalıklardaki artış önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır [28].

PAH için model oluşturabilecek çalışmalar deney hayvanlarında arka bacak kronik iskemi modellerinde yoğunlaşmaktadır. Klinik öncesi çalışmalar için sıçan ya da fare modelleri tercih edilmektedir. Oluşturulan modellerde kronik iskemiye iyileştirmeye yönelik olarak damarlanma sürecinin iskemi bölgesinde oluşturulması hedeflenmektedir. Ateroskleroz sonucunda oluşan PAH için kolleteral dallanmaların oluşması kaçınılmaz bir sonuç olmakla beraber kollateral dallanma çoğu zaman iskemi bölgesi için yetersiz kalmaktadır. Bu yetersizlik oluşan damarların bölgeyi beslemek için yeterli olmaması, dokunun zaten sağlıklı olan yapısından kaynaklanan beslenme eksikliğinin bu şekilde telafi edilememesi gibi sebeplerden kaynaklanmaktadır.

Bu yetersizliklerin giderilebilmesi için bölgede sadece damarlanmayı artırıcı çalışmaların yapılması yeterli değildir. Damarlanmayı artırıcı çalışmaların yanı sıra

damar stabilizasyonunu sağlayıcı koşulların sağlanması, oluşan damarların bölgedeki durumunun takip edilmesi de gereklidir.

Mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda da hücre bazlı tedavilerin düşünülmesi bir seçenek olarak görülmektedir. Hücre tedavisinde, endotel öncü hücrelerin uygulanması, mezenşimal karakterdeki kök hücrelerin uygulanması gibi çalışmaların yanı sıra büyüme faktörü salgılama açısından genetik olarak yeniden yapılandırılan hücrelerin iskemi bölgesine uygulanması yapılan çalışmalar arasında görülmektedir. Bu çalışmalar gerek hücrelerin salgıladıkları faktörlerin anjiyogenizisi destekleyici özelliğinin kullanılması gerekse hücrelerin işaretlenerek çalışma sırasında farklılaşması ve göç etme özelliklerinin takip edilmesi açısından önem taşımaktadır [ 29, 30, 31, 32, 33, 34. 35, 36, 37, 38].

## **2.5. Kök Hücreler**

Kök hücre, henüz işlevsel olarak farklılaşmamış, ancak uygun büyüme ortamına yerleşebilen, çoğalma yeteneği olan ve çoğalırken hem farklılaşabilen hem de kendi kaynağının devamını sağlayabilen hücreler olarak tanımlanmaktadır [39, 40]. Kök hücreler bölünmeleri esnasında hem farklılaşabilmeleri hem de popülasyonlarını koruyacak şekilde yedeklerini meydana getirmeleri ile asimetric bölünme özelliğine sahiptir [39].

Kök hücreler geniş bir tanım özelliğine sahip olmakla birlikte zigottan yetişkin bireye kadar olan gelişim evresinde farklı tiplerde bulunur [41, 42]. Bu hücreler buldukları sınıfa göre çeşitli farklılaşma aşamalarını gösterirler ve beş grupta incelenirler [41].

*Totipotent Kök Hücreler:* Bu hücreler hiç farklılaşmamış ve gelişimin erken aşamalarında görülen hücrelerdir [41]. Bu hücreler bir canlının tüm hücre tiplerini oluşturma özelliği taşımalarının yanı sıra plasenta hücrelerini oluşturabilen yani embriyonik ve ekstraembriyonik dokulara farklılaşan kök hücrelerdir [40, 41]. Zigot ve morula totipotent hücre kaynaklarıdır.

*Pluripotent Kök Hücre:* Bu hücreler ektoderm, endoderm ve mezoderm olmak üzere üç germ tabakasına farklılaşabilecek hücrelerden oluşan ve blastositin iç hücre tabakasından köken alan hücrelerdir [41].

*Multipotent Kök Hücre:* Bu hücreler birçok dokuda bulunur ve özgün doku hücrelerini oluştururlar. Erişkin kök hücre tipi olan mezenşimal kök hücre multipotent karaktere örnektir [41]. Bu hücreler yağ, kemik ve kıkırdak gibi mezoderm kökenli yapılara farklılaşırlar.

*Oligopotent Kök Hücre:* Bu hücreler kendi kendilerini yenileyebilir ve iki veya daha fazla hücre soyuna farklılaşabilir. Hematopoietik kök hücreler oligopotent tipteki kök hücrelerin en belirgin örneğidir. Bu hücreler hem miyeloid hem de lenfoid soylara farklılaşabilmektedir [41].

*Unipotent Kök Hücreler:* Kendi kendilerini yenileyebilirler ve sadece tek tipteki hücre soyuna farklılaşabilirler.

Kök hücreler normal şartlar altında bölünmezken; aldıkları sinyale bağlı olarak bölünme özelliği veya göç etme özelliği gösterirler. Kök hücrelerin bu durumunu ise niş kavramı ile açıklamak mümkündür. Nişi oluşturan hücrelerarası matriks elemanları, komşu hücreler ve salgı faktörleri kök hücrelerin durumunda belirleyici rol oynar [39].

Bu sınıflandırma haricinde laboratuvar ortamında genetik olarak yeniden programlama yapılarak yetişkin somatik hücrelerinden elde edilen ve embriyonik kök hücre benzeri olarak tanımlanabilecek *indüklenmiş pluripotent kök hücre* kavramı bilinmektedir (41). 2007 yılında Nobel ödüllü bilim adamı *Yamanaka ve ark.* bu hücrelerin embriyonik kök hücrelerle olan benzer özelliklerini ortaya koymuştur ve bu hücrelerin üç germ tabakasına farklılaşma yeteneğinde olduklarını ifade etmiştir (41). Yenilenen teknolojiye paralel olarak somatik hücrelerin geriye döndürülmesi ve buna bağlı olarak yeniden programlanmaları ile ilgili çalışmalar mevcuttur.

Yetişkin kök hücreler farklılaşma yeteneklerine bağlı olarak birçok hücrenin öncüsü şeklinde yetişkin dokularda durumlarını korurlar. Yetişkin kök hücrelerin en tipik örnekleri hematopoietik kök hücreler ve mezenşimal kök hücrelerdir [39].

Hematopoietik kök hücreler kemik iliğinde ve dolaşımda bulunan kök hücrelerdir. Bu hücreler kendilerine ulaşan özgül sinyaller aracılığı ile buldukları nişten çıkarak dolaşıma katılır. Bu hücrelerin ayırt edici özelliği CD34<sup>+</sup> olmalarıdır. Bu kök hücre tipi bütün kan hücresi tiplerine dönüşebilme potansiyeli taşımaktadır [39].

Mezenşimal kök hücreler diğer bir erişkin kök hücre tipidir. Bu hücreler özellikle stromal kökenli olmaları nedeniyle destek hücre özelliği taşımaktadır ve buna bağlı olarak klinik öncesi çalışmaların yoğun olarak konusunu oluşturmaktadır [39]. Mezenşimal kök hücrelerin varlığı neredeyse tüm yetişkin dokularda gösterilmiştir. Bunlar arasında yağ kökenli mezenşimal kök hücreler, kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücreler, peridontal-ligament kökenli mezenşimal kök hücreler, sinoviyal membran kökenli mezenşimal kök hücreler, periostiyum kökenli



mezenşimal kök hücreler, deri kök hücreleri, Wharton's jeli kök hücreleri bulunmaktadır [42].

### 2.5.1 Mezenşimal Kök Hücreler

Patolojist Cohnheim 1867 yılında ilk kez hematopoietik özellikte olmayan hücreleri kemik iliğinde tanımlamıştır [41]. İlk yapılan bu gözlemlerde Cohnheim hücreler için fibroblast benzeri morfoloji gösterdiklerini, doku yaralanmasının olduğu bölgeye göç ettiklerini ve buna bağlı olarak rejenerasyon yeteneklerinin olduğunu hipotez olarak ileri sürmüştür. 1960'lı yıllarda Friendstein ve arkadaşları bu hücrelerin izolasyonu, kültürü ve osteojenik farklılaşması ile ilgili öncü çalışmalar yapmışlardır [41]. 20 yıl sonrasında ise Caplan ve arkadaşları bu hücreleri stromal ya da mezenşimal kök hücreler olarak bilim dünyasına tanıtmışlardır [43]. Bu tarihten itibaren MKH'ler en çok dikkat çeken hücre grupları olmuştur [41].

MKH'ler ile ilgili izolasyona ve uygulanan protokollere bağlı farklılıklar mevcut olsa da MKH'lerin salgıladığı faktörler, buna bağlı olarak çevrede yarattıkları değişiklikler ve immün düzenleyici etkileri hakkında görüş birliği sağlanmıştır [41, 44].

Temelde oluşabilecek görüş farklılıklarını tek bir çatı altında toplamak için Uluslararası Hücre Tedavisi Topluluğu/International Society for Cellular Therapy (ISCT) üç kriter tespit etmiştir [45]:

1. Mezenşimal kök hücreler standart kültür koşullarında buldukları kabın yüzeyine tutunabilmelidir
2. CD105, CD73, CD90 yüzey belirteçleri bakımından pozitif; ancak CD45, CD34, CD14, CD11b ve CD79 $\alpha$  yüzey belirteçleri için negatif olmalıdır
3. *In-vitro* ortamda yağ, osteoblast ve kondroblastlara dönüşebilmelidir [45].

MKH'ler günümüzde gerek ektopik özellik göstermeleri gerekse salgıladıkları faktörlerin çeşitliliği açısından önem teşkil etmektedir. Ayrıca MKH'lerin immün sistem baskılayıcı özellikte olmaları klinik açısından bu hücrelerin ilgi çekmesini sağlamıştır [40].

MKH'lerin allojenik lenfositler ile birlikte kültürleri yapıldığında lenfositlerin proliferasyonunun uyarılmaması MKH'lerin köken olarak immünojen olmayan bir yapıda olduklarını ispatlamıştır. Buna ek olarak MKH'ler lenfositlerin, antijen-sunucu hücrelerin ve doğal katil hücrelerin proliferasyonunu engellemektedir [46]. Bu durum MKH'lerin immün baskılayıcı özelliğini açıklamaktadır. Bu özellikler doğrultusunda MKH'ler hem immün sistemi baskılamaları hem de immün

sistemden kaçabilmeleri açısından allojenik nakile uygun olarak klinikte kullanım için en dikkat çekici adaylardır. MKH'ler insan lökosit antijen I grubunu (MHC Class I) çok düşük oranda ifade ederken insan lökosit antijen II grubunu (MHC Class II) hiç ifade etmezler ve buna bağlı olarak T lenfosit aktivasyonunu tetikleyici rolleri yoktur. Aynı zamanda MKH'ler allojenik olarak uyarılmış T hücre aktivasyonunu salgıladıkları hepatosit büyüme faktörü (HGF), prostaglandin E2 (PGE2) ve IL-10 gibi sitokinlerle engellerler [44].

MKH'lerin ilk izole edildiği kaynak kemik iliği olsa da sonraki çalışmalarda izolasyon kaynakları önemli ölçüde çeşitlenmiştir. İzole edildikleri kaynaklara bağlı olarak MKH'lerin potansiyellerinde de farklılıklar olduğu gösterilmiştir [42].

MKH'ler ve salgıladıkları faktörlerle ilgili yapılan çalışmalarda yağ kökenli olan MKH'lerin özellikle VEGF gibi damarlanma faktörleri miktarında daha yüksek sekresyon yaptıkları gösterilmiştir. Bu çalışmalarda temel olarak hücrelerin buldukları besiyeri ortamında ELISA ile ölçüm yapılmış ve büyüme faktörlerinin düzeyleri ölçülmüş ve yağ kökenli mezenşimal kök hücrelerin özellikleri buna göre yorumlanmıştır [47, 48, 49]. Buna ek olarak yağ kökenli hücrelerin kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerle karşılaştırıldığında daha proliferatif özellikte oldukları; mitoz, inflamasyon ve stres durumlarına cevap olarak daha yüksek düzeyde ifade edildikleri; yüksek düzeyde büyüme faktörü ve sitokin salgıladıkları ortaya konmuştur [47]. Ayrıca MKH trasplantasyonu ile ilgili çalışmalar sonucunda bu hücrelerin anjiyogenik özellik taşıyan ve kalbi koruyucu etkisi olan birçok parakrin salgı faktörü salgıladığı da gösterilmiştir [40]. MKH'lerin ektopik göçü de inflamasyon bölgesinden salgılanan stromal kökenli faktörünü (SDF-1) gibi faktörlerden etkilenip harekete geçmeleriyle açıklanabilir [50].

### **2.5.2. Mezenşimal Kök Hücre Kaynakları**

MKH'ler yağ dokudan, tendon, ligament, sinoviyal membran, trabeküler kemik, kemik iliği, embriyonik dokular, sinir sistemi, deri, periosteum ve kas yapılarından izole edilebilir [42]. İzolasyon kaynakları farklı olsa da temel olarak MKH'ler için hücre kültürü koşullarında çoğaltılmaları yapılmaktadır [43, 42].

Elde edildikleri kaynaklara bağlı olarak MKH'lerin farklı potansiyeller taşıdıkları gösterilmiştir. Örneğin yağ doku kökenli MKH'ler yüksek adipojenik özellik gösterirken; kemik iliği kökenli MKH'ler yüksek osteojenik potansiyel gösterir [43].

MKH'lerin elde edildikleri kaynaklar arasında yağ doku en az invaziv şekilde hücre izolasyonunun yapıldığı dokudur ve bu dokudan elde edilen hücre sayısı diğer

kaynaklara göre daha çok daha fazladır [42, 43]. 1g. Yağ dokudan alan başına 5.000 h/ml kök hücre elde edilirken; aynı koşullarda kemik iliğindeki sayı 1.000 ya da 100 hücre/ml olarak bulunmuştur [43].

Moleküler bulgular yağ kökenli MKH'ler ve kemik iliği kökenli MKH'ler arasındaki proliferasyon, farklılaşma potansiyeli ve parakrin etkilerin farklı oranlarda olduğunu altını çizmektedir [51]. Bu farklı oranların ortaya konduğu çalışmaların yapılması planlanan çalışmalarda kök hücre izole edebileceğimiz kaynağı ayırt etmemiz açısından faydalı olduğunu söyleyebiliriz.

Yağ doku, çevresindeki olgun adipositlerle beraber yüksek vasküler özellik gösteren bir dokudur. Vasküler özelliğe bağlı kapiller yatakla bağlantılı olan yağ doku birçok farklı tipte hücreyi barındırmaktadır. Yapılan son araştırmalar yağ dokunun sadece trigliserit deposu olmadığını, birçok biyoaktif molekül sentezleyen bir doku olduğunu ortaya koymaktadır. Bu biyoaktif moleküller lipid metabolizması, üreme, anjiyogenezis, inflamasyon süreçlerinde rol alan moleküllerdir [52]. Buna bağlı olarak yağ dokudan izole edilen MKH'ler pre-klinik ve klinik birçok araştırmaya konu olmaktadır.

Deri altı yağ dokudan izole edilen MKH'ler daha az invaziv yöntemlerle elde edildikleri için kemik iliği MKH kaynağına alternatif olarak gösterilmektedir. Yağ doku kökenli MKH'lerin kullanıldığı çalışma modelleri olan arka bacak kronik iskemi modeli ve miyokard enfarktüs modelinde bu hücrelerin anjiyogenezisi uyardığı ortaya koyulmuştur [51]. MKH'ler bu görevi özellikle VEGF gibi damarlanmayı uyarıcı etkisi olan faktörler salgılayarak yapmaktadır.

Bu özelliklerinin yanı sıra yağ doku kökenli MKH'ler ve kemik iliği kökenli MKH'ler arasında karşılaştırma yapıldığında yağ doku kökenli MKH popülasyonunun proliferasyon özelliğinin kemik iliği kökenli MKH popülasyonuna oranla daha fazla olduğu gösterilmiştir. Kültür ortamında 40. günde yağ doku kökenli MKH'ler, kemik iliği kökenli MKH popülasyonuna oranla 10 kat daha fazla çoğalma göstermiştir [51]. Ayrıca yağ doku kökenli MKH'ler, VEGF ve hepatosit büyüme faktörlerini (HGF) daha yüksek oranda salgılayan; kemik iliği kökenli MKH'ler hücre migrasyonu ile ilgili olan SDF-1 $\alpha$  daha yüksek oranda salgılamaktadır [50, 51, 52]. Buna ek olarak mitoz, inflamasyon ve stres cevapları ile ilgili genlerin yağ doku kökenli MKH popülasyonunda daha yüksek oranda ifade edildiği ortaya konmuş; organ gelişimi, morfogenezis ile ilgili genlerin de kemik iliği kökenli MKH'lere göre daha yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir [51].

Yapılan alışmalar, spesifik bir organ ya da doku onarımı için o bölgeden elde edilen MKH'lerin avantaj sağlayacağını da göstermektedir [39].

### **2.5.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Uygulama Alanları**

MKH'ler klinik kullanım açısından değerlendirildiğinde destek hcreti özelliğinde oldukları için ilgili doku hücrelerinin gelişimine ve fonksiyonuna katkı sağlar. Farklılaşma yetenekleri, salgıladıkları zengin faktör profili ve buna bağlı olarak matriks etkileşimleri, g etme yetenekleri ve buna bağlı olarak hasarlı dokuya ulaşmaları, immunsüpresif olma özelliklerinin yanı sıra non-immünojenik olmaları tercih edilmelerini sağlamaktadır [39]. Özetle, MKH'lerin immün sistem üzerindeki düzenleyici rolü, antiapoptotik, antifibrotik özellik göstermesi, anjiyogenezisi desteklemesi ve salgıladıkları çok sayıdaki faktörün düzenleyici etkileri bu hücrelerin rejeneratif tıp açısından iyi bir kaynak olduğunu göstermektedir. MKH'lerin g etme yetenekleri, rejenerasyona katkıda bulunmaları, kendi kendilerini yenileme özellikleri ve multipotent farklılaşma özelliğini *in vitro* ortamda sergilemelerine bağlı olarak *in vivo* ortamda bu özelliklerini sergileyebilmeye devam etmeleri oranları uygulamalar için önemli bir ölçüttür.

MKH'lerin sekresyon potansiyelleri yaralı dokunun mikroçevresinde rejeneratif özellik göstermelerini sağlamaktadır [43]. Kemik iliği kökenli MKH'lerin kullanıldığı tranplante edilen çalışmalarda yeniden damarlanmanın uyarıldığı ve bu hücrelerin fonksiyonel hücrelere farklılaştığı gösterilmiştir. Buna ek olarak MKH'ler salgıladıkları anjiyogenik ve hücre canlılığını koruyan faktörlerle doku rejenerasyonuna katkı sağlamaktadır [51].

MKH'lerin salgıladığı faktörlerin çeşitliliğine bağlı olarak proteomiks çalışmaları da gündeme gelmektedir.

MKH'lerin salgıladığı faktörlere ek olarak farklılaşmaya bağlı ya da transplante edildikleri alandaki hücreler ile ilişkilerine bağlı olarak ortaya konan çalışmalar vardır. Bunlar arasında MKH'lerin anjiyogenik potansiyelini yansıtan çalışmaların ön planda olduğu söylenbilir.

MKH'lerin anjiyogenik özellikleri ile ilgili çalışmalara bakıldığında yağ vasküler duvarında sayıca baskın olarak bulunan hücrelerin yağ doku kökenli MKH'ler olduğu gösterilmiştir [43]. Bu çalışmayı yapan grubun diğer bir çalışması ile bu hücrelerin endotel ağ yapısını *in vitro* koşullarda stabilize etme yeteneğinde oldukları gösterilmiştir. Buna ek olarak, MKH'ler endotel hücreler ile güçlü bir sinerji oluşturarak *in vivo* ortamda yeni kan damarlarının yapısına katılmaktadır.

Bu yeni kan damarları mevcut damarlar ile bağlantı kurabilen, kan akımını yöneten ve haftalarca damar ağı stabilizasyonunu sağlayabilen damarlardır. Ancak MKH'lerin bu alandaki kullanımı hedef dokudaki yerleşiminin yetersizliğinden dolayı ve kalıcı olarak uzun süreli planlı vaskülarizasyonun yetersiz kalmasından kaynaklanan sorunlar yüzünden hala tartışmalıdır [43].

Yağ dokusu kökenli MKH'ler anjiyogenik özelliğinin yanında hematopoiezisi destekleyici hücre özelliği göstermektedir. Bu özelliklerini salgıladığı VEGF, M-CSF, G-MCF, HGF, TGF- $\beta$  gibi faktörler ile gerçekleştirmektedir [43, 51].

MKH'ler immunmodulator ve immun sistemi baskılayıcı özelliklerinden dolayı graft versus host disease (GVHD) yani kemik iliği transplantasyonlarından sonra gelişen immün cevabı önlemede önemli rol oynamaktadır. Bu durumda allojenik transplantasyonlarda dahi GVHD önlenmektedir. MKH'lerin salgıladığı GM-CSF, G-CSF, SCF ve IL-6 sitokinlerinin varlığında bu duruma sebep olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu faktörler hematopoietik kök hücrelerin dokuya yerleşme, proliferasyon ve farklılaşma aktivitesini desteklemektedir [39].

MKH'lerin immünmodulator aktivitelerine ek olarak immünsupresif özellik göstermeleri ve immün özellik açısından insan doku uyum antijenlerini bulundurmamaları *in vivo* uygulamalarda tercih edilmelerini sağlamaktadır [39, 50]. 2012 yılında Uluslararası Sağlık Enstitüsü/National Institute Of Health (NIH) verilerine göre 218 tane sonuçlanmış ve MKH uygulanan hastalık mevcuttur. Bunlar içinde yer alanlar; multiple skleroz, tip-1 diyabet, GVHD, kardiyak hastalıkları, iskemik hastalıklar, serebral dolaşım hastalıkları, çeşitli otoimmün bağ doku hastalıkları, spinal kord yaralanmaları ve iskemik ekstremitte hastalıklarıdır [43].

MKH'ler için *in vitro* ortamda uyarı ile hepatosit, pankreatik ada hücreleri, nöral hücreler, endotel hücreler ve epitel hücrelere farklılaştıklarını gösteren çalışmalar mevcuttur [43, 53]. Yağ doku kökenli MKH'ler için kırık kemik, kas onarımı yapması veya rejenerasyonu sağlamasının yanı sıra perifer sinir rejenerasyonu, hepatik rejenerasyon, fonksiyonel miyokard enfarktüs rejenerasyonu yapabildiğini gösteren *in vivo* modeller mevcuttur [43].

Yapılan çalışmalarda anlaşılması ve geliştirilmesi gereken en önemli nokta MKH'lerin nasıl göç ettiği, farklılaştığı ve büyüdüğünün anlaşılmasının yanı sıra mevcut hücreler ile nasıl etkileşim kurduklarının, büyüme faktörlerini ve sitokinleri onarım için nasıl kullandıklarının açıklanmasıdır [43].

## 2.6. Flep Modeli ve İyileşme Süreci

Deri flebi kendi kan akımını sağlayabilir ve geniş deri hasralarının onarımı için plastik cerrahide sık kullanılan bir metottur [54]. Deri flebi operasyonlarında distal iskemik nekroz komplikasyon olarak görülmektedir. Bu durumun en temel sebeplerinden biri bölgede oluşan koagülasyon sisteminin aktive olmasına bağlı olarak vasküler trombozis oluşumunun görülmesi ve flep nekrozunun oluşmasıdır [55]. Flep operasyonları ile ilgili bir diğer komplikasyon flebin damarlanamaması ve bu duruma bağlı olarak canlılığını bu duruma bağlı olarak koruyamamasıdır. Flep bölgesinde iskemi nekroz oluşması ile karakterizedir. Flep nekrozu; yeterli kan akımının azalması, operasyon kaynaklı problemlerin olması, şeker hastalığı, sigara kullanımı, periferik arter hastalıklarının varlığı ile oluşmaktadır [41].

İskemik flep dokusunu kurtarmaya yönelik çalışmalar dışarıdan verilen ajanlar ve hücre uygulamaları ile flebin canlılığını korumasına yönelik çalışmalardır. Bu sebepten dolayı flep modelleri ile ilgili çalışmaların anjiyogenezis ve yara iyileşmesi ile yakından ilgili olduğu söylenebilir.

Anjiyogenezis; doku iyileşmesi, flep ve greftlerin iyileşmesi için ana tanımlayıcı süreçtir. Doku iyileşmesi veya anjiyogenezis için tek bir büyüme faktörü kullanımı yetersiz kalacağı için özellikle MKH gibi sitokin salgılama çeşitliliği fazla ve bu süreçler ile ilgili olan hücre kaynaklarının terapötik olarak kullanılması, lokal çevredeki etki açısından uzun süreli tedavilerde iyi sonuçların elde edilebilmesi açısından önemlidir [56].

Yara iyileşmesi sırasında plateletler VEGF olmak üzere birçok sitokini salgırlar. VEGF dolaşımda olan nötrofilleri ve monositleri yara bölgesine doğru çeker ve bu olay iyileşmenin normal bir sürecidir. VEGF buna ek olarak monositler, keratonositler, endotel hücreler tarafından iyileşme bölgesinde salgılanır ve kapilleri etkiler. Buna bağlı olarak vasküler geçirgenliğin artmasıyla endotel hücre bağlantıları etkilenir ve granülasyon dokusu oluşumu hızlandırılır. VEGF tarafından gerçekleştirilen reseptör aktivasyonu ile endotel hücreler proliferer olurlar ve göç etmeye başlar. Son olarak VEGF etkisi ile perisitler tekrar endotel hücrelerin etrafını kaplar ve vasküler stabilizasyon sağlanmış olur. Bu durum yara iyileşmesinde anjiyogenezis ve VEGF ilişkisini ortaya koymaktadır [19].

Yara iyileşmesi vücutta yangı oluşumuna paralel olarak ilerlemektedir. Yangı süreci hücreden salgılanan sitokinlere bağlı olarak düzenlenmektedir. Yangı oluşumunda ilk olarak bölgeye gelen hücreler nötrofiller, kompleman sistem

elemanları ve adezyon molekülleridir. Yangı derinin içi veya altında oluşan kızarıklık, şişlik, duyarlılık ve ağrı ile karakterizedir [5].

Deri, vücudu dış etkilere karşı koruyucu bir bariyer rolü oynamaktadır. Deri yaralanmaları ciddi problemler olup deride onarım yaralanma sonrası üç aşamada görülür. Bunlar inflamasyon, proliferasyon ve maturasyondur. Bu aşamalar çeşitli doku ve hücre etkileşimleri ile ilerlemektedir [57].

Epidermal bariyerin bozulması keratonisitlerden interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) salgılanmasına neden olur. IL-1 ve TNF- $\alpha$  çevredeki hücreleri uyarır. Doku yaralanması sonucunda buna ek olarak kan birleşenleri kan damarları dışına sızar. Aynı zamanda plateletler epidermal büyüme faktörü (EGF), PDGF, TGF- $\beta$  ve çok sayıda kemokin salgılar. Bu maddeler iyileşme sürecine katkı sağlar. Makrofajlar inflamasyon cevabın gelişmesinde ve dokudan yabancı cisimlerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. Makrofajlar granülasyon dokusunun gelişiminden köken alır ve çeşitli pro-inflamatuvar faktörleri ( IL-1, IL-6) ve büyüme faktörlerini (FGF, EGF, TGF- $\beta$  ve PDGF) salgılar. Yaralanmanın olduğu sırada EGF, TGF- $\beta$  ve FGF salgılanması epitel hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu yeniden epitel oluşumu için uyarır. Bu süreç hücre-hücre ve hücre-bazal membran ilişkisinin çözülmesi ile başlar ve keratonositlerin ekstrasellüler matriks üzerinden göçünü takip eder. Yara kapanmasının başarısı yani %100 epitel oluşumu, keratonositlerin tabakalaşması ve bariyeri tekrar oluşturmak üzere farklılaşmasıdır. Granülasyon ise yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra oluşmaya başlar. Aynı zamanda makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreler yaralanma bölgesine doğru hareket eder. Makrofajlar sadece inflamasyon cevabı geliştirmez, aynı zamanda VEGF ve FGF gibi anjiyogenezisi ilerleten faktörler salgılar. Bu faktörler yeniden damarlanmayı sağlamaktadır ve yeniden damarlanma yeni ESM organizasyonu, depolanması ve sentezi için temel bir olaydır. FGF, TGF- $\beta$  ve PDGF makrofajlardan salgılanır ve fibroblast infiltrasyonuna sebep olurlar. TGF- $\beta$  ve PDGF kontrolü altında fibroblastlar fenotipik olarak miyofibroblastlara dönüşür. Miyofibroblastlar ESM boyunca yara kapatmayı sağlayan destekçiler olarak sıralanırlar. Kollajen ve elastin fiberler granülasyon dokusuna katılır. Daha sonrasında elastin fiber ve kollajen iskeleti proteoglikanlar ve glikoproteinler ile doyurulur. Bu durum TGF- $\beta$  aracılı yeni kollajen sentezini içeren dokunun yeniden oluşma sürecidir. Bu sürecin en son aşaması skar doku oluşumudur. Kollajenin yeniden yapılanması granülasyon

dokudan skar dokuya dönüşüm olan ve kollajenin katabolizması ve sentezine bağlı süreçtir. Yara alanında kollajenin indirgenmesi fibroblastlar, endotel hücreler, epidermal hücreler ve makrofajlar tarafından salgılanan birçok matriks metalloproteinaz (MMP) tarafından kontrol edilir. Yara iyileşmesi sırasında proliferatif aşamada yeni granülasyon formunun oluşmasında anjiyogenezis önemli bir olaydır. Hayashi ve arkadaşları VEGF'nin insan deri yaralarında makrofajlarda ve miyofibroblastlarda ifade edildiğini keşfetmişlerdir [57].

Bu bilgiler ışığında MKH'ler salgıladıkları faktörler sayesinde yara iyileşmesini hızlandırır, yara kapanmasını ve granülasyon doku oluşumunu artırır, anjiyogenezisi uyarır. İlginç olarak bu pozitif sonuçlar MKH'lerin epitel hücrelere farklılaşması sonucunda olmamakta, belirgin şekilde MKH'lerin salgıladıkları ve deri yaralanmalarında hücrel cevabı düzenleyen faktörler ile olmaktadır. Bu çalışmaların ilerlemesi için MKH ve yara dokusundaki diğer hücreler arasındaki ilişkinin açıklanması gerekmektedir. Bu durumda MKH'lerin yaralanmalarda salgıladığı faktörler de açıklanabilecektir [58].

Travma, yanma veya ameliyat sonrasında deri transplantasyonu yapılan çalışmalar gündeme geldiği zaman MKH'ler de gündeme gelmektedir. Transplante edilecek derinin yani flebin yapısı MKH'ler ile birlikte uygulandığında canlılığını daha uzun süre koruyabildiğini de yapılan çalışmalar göstermiştir [58].

Bütün bu çalışmalar göz önüne alındığında, bu tez çalışması kapsamında, MKH'lerin ve büyüme faktörlerinin gerek yara iyileşmesi sürecinde gerekse damar hastalıklarına bağlı olarak ortaya çıkan iskemi sürecinde etkilerinin incelenmesi için sırt flebi modeli seçilmiştir.



### 3. MATERYALLER ve YÖNTEM

Bu tez çalışması beş basamakta yapılmıştır:

1. MKH'lerin izolasyonu ve kültürü
2. Sıçanlarda iskemik sırt flebi modelinin oluşturulması
3. Deney ve Kontrol ve gruplarının uygulanması
4. Nekrotik alan yüzdesinin hesabı
5. Histolojik boyama çalışmaları
6. CD31 yüzey antijeninin immunohistokimyasal boyama yöntemiyle tespit edilmesi
7. İstatiksel Analiz

#### 3.1. MKH İzolasyonu ve Kültürü

Bu çalışmada yağ dokusu mezenşimal kök hücreleri, sıçanların (Wistar albino, erkek, 6-8 haftalık, 350 g) kasık bölgesindeki deri altı yağ dokusundan izole edilmiştir. Hücre izolasyonu için kullanılan sıçanlar ile ilgili gerekli etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi Etik Kurullarından alınmıştır ( H.Ü. Etik Kurulları, Protokol No: 2013-13-05) (EK-1). İzolasyona hazırlanmak üzere sıçanlar anestezide alınmıştır. Xylazine (10 mg/kg) (Richter Pharma AG, Austria) ve ketamin (50 mg/kg) (Richter Pharma AG) anestezisi için kullanılmıştır. Anestezisi intramuskular olarak yapılmıştır. Yağ dokusu mezenşimal kök hücrelerinin izolasyonu için primer eksplant kültür yöntemi kullanılmıştır. Yağ dokusuna ulaşmak için ilk olarak sıçanın kasık bölgesinde yaklaşık iki cm uzunluğunda bir insizyon yapılmış ve bu bölgeden içeri girilerek yağ doku alınmıştır. Sıçanın kasık bölgesi operasyondan sonra üç numara atravmatik ipek ile kesikli dikiş tekniği ile dikilmiş ve sıçanın anestezisi sonrası takibi yapılmıştır. Yağ doku alınır alınmaz %10 fetal bovine serum (FBS) (Sigma,USA), %0.2 penisilin-streptomisin (v/v) (Sigma, USA) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's F12 (DMEM / F12) (Sigma, USA) taşıma besiyerine alınmış ve bundan sonraki işlemler steril hava kabini içinde gerçekleştirilmiştir. Taşıma besiyeri içinde doku 2-3 mm'lik parçalara ayrılmış ve kontaminasyonu engellemek için 2-3 kez yıkanmıştır. Ardından doku parçaları 6 kuyucuklu kültür kabına alınmıştır (Şekil 3.1.1). Dokuların üzerlerine birer damla %20 FBS, %0.1 penisilin-streptomisin (v/v) içeren besiyeri damlatılmış ve dokular 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> - %95 hava içeren standart kültür ortamında 20 dakika inkübe edilmiştir.



**Şekil 3.1. 1** Altı kuyucuklu kültür kabında hazırlanan primer eksplant kültür

Bu sayede dokuların kültür kabı yüzeyine tutunması sağlanmış ve dokudan ayrılacak hücreler için uygun bir ortam oluşturulmuştur. 20 dakika sonunda dokuları yüzeyden kaldırmayacak ve yüzeylerini kaplayacak şekilde %20 FBS, %0.1 penisilin-streptomisin (v/v) içeren besiyeri damlatılmış ve dokular gece boyu beklemek üzere inkübasyona bırakılmıştır. İzolasyonun ertesi gününden itibaren kültürün takibi mikroskopik (IX70 Olympus, Japan) olarak yapılmıştır ve MKH kaynaklı olan sitokinlerin farklılaşmaya yol açmaması için besiyeri değişimi izolasyonun ilk beş günü hergün yapılmıştır.

İzolasyonun beşinci gününde kuyucuklarda bulunan yağ doku parçaları uzaklaştırılmış ve kuyucuklara %20 FBS, %0.1 penisilin-streptomisin (v/v) içeren besiyeri eklenerek bir gün süre ile inkübasyona devam edilmiştir. Bu aşamadan sonra hücreler tripsinizasyon yöntemi kullanılarak pasajlanmıştır. Bu işlemde ilk olarak kuyucuklardaki besiyeri alınmış ve 0.5 ml tripsin ile (Sigma, USA % 0.25 Trypsin/EDTA ) kuyucuklar yıkandıktan sonra kuyucuklara 0.5 ml tripsin eklenmiş ve hücreler yüzeyden kalkıp süspanse hale gelinceye kadar bekletilmiştir. Sonrasında kuyucukların her birine tripsinin inaktivasyonunu sağlamak ve hücreleri toplamak üzere 2 ml %20 FBS içeren DMEM/F12 besiyeri eklenmiş ve hücreler yüzeyden toplanıp santrifüj tüpüne alınarak 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış ve alt kısımda kalan hücre peleti %20 FBS içeren DMEM/F12 ile homojenize edilmiş ve 25 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip kültür kaplarına alınmıştır (Şekil 3.1.2 ). Bu işlem ile pasaj 1 aşamasındaki hücreler elde edilmiştir. Pasaj 2 aşamasından itibaren inkübasyona 75 cm<sup>2</sup> flasklarda (Şekil 3.1.2) ve % 10 FBS ile devam edilmiştir. Hücreler pasaj 1 aşamasından sonra pasaj 2 ve pasaj 3 aşamasına kadar pasajlanmış ve pasaj 4 olacak şekilde çoğaltılmış ve çalışmanın *in vivo* aşamasında kullanılmak üzere dondurulmuştur.



**Şekil 3.1. 2** 25 cm<sup>2</sup> (üst) ve 75 cm<sup>2</sup> (alt) flasklar

Hücreler kademeli dondurma yöntemi kullanılarak dondurulmuştur. Bunun için, tripsinizasyon işleminde olduğu gibi hücreler toplanmış, süspansiyon edilen hücreler % 10 FBS içeren DMEM-F12 ile 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra süpernatant atılmış ve hücre pelleti bu kez %50 FBS, %40 DMEM/F12 ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, USA) içeren dondurma besiyeri ile homojenize edilerek kriyotüplere alınmıştır. Bu hücreler ilk olarak 72 saat süre ile -80°C'de bekletilmiş sonrasında -196 °C'de sıvı azot içeren tanka alınmıştır. Böylece hücreler in vivo uygulama aşamasında kadar saklanmıştır. Çalışmanın in vivo aşamasında flebe uygulanması gereken hücre miktarı 3 milyon hücre/ ml olarak belirlenmiş ve bunun için istediğimiz hücre sayısını oluşturan 75 cm<sup>2</sup>lik bir flask bir kriyotüp olacak şekilde in vivo uygulamalar için hazırlanmıştır. Mezenşimal kökenli hücrelerin izole edileceği kaynakların heterojen potansiyel taşıdıkları bilinmektedir [42]. Buna bağlı olarak pasaj 3 ya da pasaj 4 aşamasının hem hücrelerin sitogenetik yapılarını korumaları açısından hem de daha saf mezenşimal kök hücre popülasyonu elde etmek amacıyla uygulama için uygun kaynaklar olduğu düşünülmektedir [39]. Çalışmamızda buna bağlı olarak pasaj 4 aşaması uygulama yapılmak üzere seçilmiştir.

### 3.2. Sıçanda Sırt Flebi Modelinin Oluşturulması

Flep modeli deney hayvanları açısından bakıldığında yara iyileşmesi, damarlanma konularında oldukça yoğun çalışılmaktadır. Çalışmamızda buna bağlı olarak modifiye edilmiş olarak Mc Farlene sırt flebi modeli  $3 \times 10 \text{ cm}^2$  boyutlarında olacak şekilde [60] 6 aylık ortalama ağırlıkları 331 g olan Sprague-Dawley erkek sıçanlarda uygulanmıştır (Şekil 3.2.1 a, b).

Flep modeli için deney hayvanları gerekli etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Biriminden 24 adet olarak alınmıştır (H.Ü. Etik Kurulları, Protokol No: 2013-22-02) (EK-2). Anestezi Xylazine ve ketamin kullanılarak intraperitoneal olarak yapılmış ve anestezi sonrası hayvanın takibi yapılmıştır.



**Şekil 3.2 1** Deney hayvanının operasyon için hazırlanışı (a) ve flep modelinin oluşturulması (b)

Sırt flebi oluşturulduktan sonra (Şekil 3.2.1 b) grupların ayırımına uygun Şekil de vücutta eriyebilen jelatin matrik kullanılarak (GELITA-SPON, Absorbable Gelatin Sponge) uygulama yapılmış (Şekil 3.2.2) ve flep sürekli dikiş tekniği ile üç numara atravmatik ipek cerrahi ip kullanılarak dikilmiştir.



**Şekil 3.2 2**  $1 \times 1.5 \text{ cm}^2$  boyutunda hazırlanan jelatin matriksler.

### 3.3. Deney ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda dört ayrı deney grubu oluşturulmuştur:

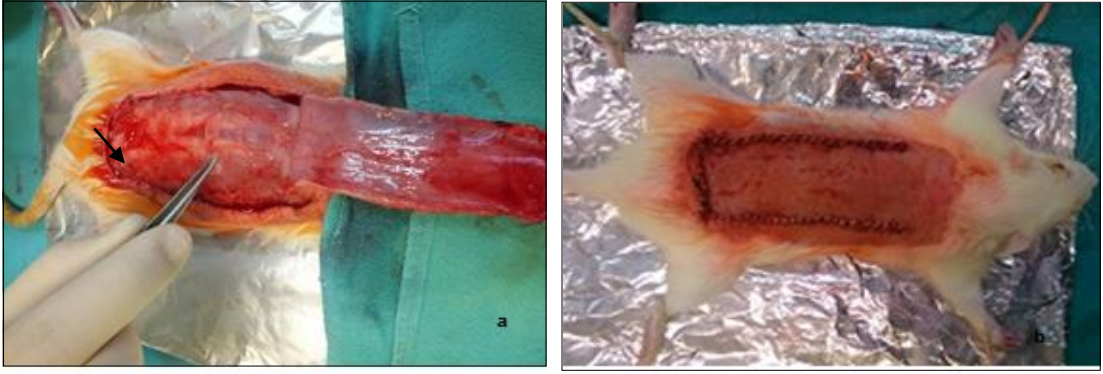
1. Grup : Kontrol
2. Grup: MKH grubu
3. Grup: VEGF grubu
4. Grup: MKH+ VEGF grubu

Her grupta 6 adet sıçan kullanılmıştır. Gruplardaki fleplerden operasyonun 7. günde histolojik çalışmalar için kesit alınmış ve fotoğraflamalar yapılarak % nekroz alanı tayin edilmiştir.

1. *Kontrol Grubu:* Flep oluşturulduktan sonra flebin altı ayrı bölgesine gelecek şekilde jelatin matrislere 50 µl besiyeri emdirilmış ve uygulama yapılmıştır (şekil 3.3.1.a) Uygulama sonrasında sırt flebi sũrekli dikiş tekniği ile kapatılmıştır (şekil 3.3.1 b).

2. *MKH grubu:* Bu grup için ilk olarak *in vivo* uygulamalar için dondurulan hũcreler uygulamaya uygun olacak şekil de hazırlanmıştır. -196 °C'de bulunan pasaj 4 aşamasındaki hũcreler alınmış ve 37 °C'de su banyosunda çõzdũrũldũkten sonra 800 rpm'de 5 dakika sũre ile santrifũj yapılmıştır. Hũcreler 1 ml'lik tũplere alınarak ũzerlerine serumsuz besiyeri eklenmiş ve bir kez daha 800 rpm'de 5 dakika sũre - santrifũj yapılmıştır. Sonrasında sũpernatant atılmış ve hũcre peleti jelatin spona emdirilerek oluşturulmuş sırt flebinin 6 farklı bölgesine kontrol grubunda olduğu gibi uygulanmıştır (şekil 3.3.1 a ve b).

3. *VEGF grubu:* Çalışmamızda VEGF ekzojen olarak verilmiş olup liyofilize rekombinant sıçan VEGF'i kullanılmıştır (Biosource, Invitrogen Carlsbad CA, USA). VEGF ( 10 µg liyofilize) kullanım için uygun konsantrasyonda olacak şekilde 100 µl DMEM F-12 kullanılarak sulandırılmış ve sonrasında 5 ml DMEM ile beş ayrı tũpe bõlũnerek kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. VEGF uygulaması her bir jelatin matriske 50 µl VEGF emdirilerek flebin altı farklı bölgesine yapılmış ( şekil 3.3.1 a ve b) ve uygulama sonrası flep kapatılmıştır.



**Şekil 3.3. 1** Sırt flebine jelatin matriks (↔) uygulama yapılması (a), sırt flebinin dikilmesi (b)

4. *MKH+VEGF grubu*: Daha önce dondurulmuş olan hücreler, -196 °C'den alınarak 37°C sıcak su banyosunda hızla çözündürülmüştür. Bu hücreler 800 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından hücreler bir ependof tüpüne alınarak serumsuz besiyeri içinde ve 800 rpm'de 5 dakika süreyle tekrar santrifüj edilmiştir. Böylece dondurma besiyeri tamamen uzaklaştırılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra hücrelerin üzerine 50 µl VEGF eklenmiştir. Bu süspansiyon karışım jelatin matrikslere emdirilerek aynı şekilde flebe uygulanmıştır ( Şekil 3.3.1 a ve b ).

#### **3.4. Nekrotik Alan Yüzdesinin Hesaplanması**

Uygulamadan 7 gün sonra, nekrotik alan %'sinin hesaplanması için yüksek doz anestezi verilerek ötanazi yapılmıştır. Ardından sıçanlar sırtüstü olacak şekilde bir kurutma kağıdının üzerine alınmış ve dört grup için ayrı ölçümler yapılmıştır (Şekil 3.4.1).



**Şekil 3.4. 1** Nekroz alan hesabı yapmak için hazırlanan sıçan

### 3.5. Histolojik Boyama Çalışmaları

Çalışmamızda histolojik boyama teknikleri olan *Hematoksilen&Eozin* ve *Masson's trichome* kullanılmıştır. Bu boyama yöntemleri aynı zamanda immunohistokimya için kesit alınacak derinliğin tayin edilebilmesi sağlanmıştır.

Doku boyama tekniğinde fiksasyon ve doku takibi aşamaları boyanın dokuya tamamen nüfus etmesi için önemli basamaklardır. Çalışmamızda sırt flebinden kesit almak için operasyondan sonraki 7. günde deney hayvanlarına yüksek dozda anestetik madde uygulanarak ötenazi yapılmıştır. Ötenazi sonrasında flep bölgesinden nekrozun yoğun olduğu kısım olan kaudal kısmın yaklaşık 1 cm uzağından 1 cm<sup>2</sup> kalınlığında doku örnekleri alınmıştır. *Hematoksilen&Eozin* boyama ve *Masson's Trichome* boyama basamakları için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nın uyguladığı deney prosedürü izlenmiştir. Alınan doku örneklerinin %10 buffer formalin içinde 3 gün süre ile tespit edilmesi yapılmıştır. 3 gün sonunda dokular takip için doku takip cihazına verilmiştir.

Takip cihazından alınan dokular 60 °C'de bulunan parafin ile doku takip kasetlerine gömülmüştür ve parafin bloklar hazırlanmıştır. Sonrasında 1 gün süre ile parafin bloklar buzdolabında kesit alınmak üzere tutulmuştur.

Kesit almak için ilk olarak jelatinli su hazırlanmıştır. Bu suyu hazırlamadaki amaç dokunun lam üzerinde boyama aşamaları esnasında kalkmayacak şekilde tutunmasını sağlamaktır. Hazırlanan suyun sıcaklığı 45 °C olarak belirlenmiştir. Kesit alma işlemi için mikrotom kullanılmış olup kesitler 3 mikron kalınlığında alınmıştır. Alınan kesitler, jelatin ve distile su ile hazırlanan havuza alınmıştır ve burada kesitlerin açılması bir süre beklendikten sonra lam üzerine alınmıştır.

Lam üzerine alınan kesitler gece boyunca deparafinizasyon için etüvde bekletilmiştir. Etüvden alınan kesitler *Hematoksilen&Eozin boyama* (EK 3) ve *Masson's Trichome* boyama (EK 4) için aşağıdaki yöntemlere uygun olarak hazırlanmıştır.

*A. Hematoksilen&Eozin boyama:*

1. Ksilen 15 dakika X3 kez bekletme
2. Ksilene konan asansörün dışarıda bekletilerek ksilenin uçurulması
3. %96 alkol 10 dakikaX2 kez, % 80 alkol 10 dakika X1 kez bekletilme
4. Çeşme suyu ile yıkama yapılması
5. Önceden süzölmüş hematoksilen boyada 15 dakika bekletilmesi
6. Çeşme suyunda yıkama yapılması
7. Asit alkolX2 kez batırıp çıkartılması
8. Çeşme suyu ile 2-3 kez yıkama yapılması
9. Amonyaklı suX 2 kez batırıp çıkartılması
- 10.Çeşme suyu ile 2-3 kez yıkama yapılması
- 11.Eozin boyasında 1 dakika bekletimesi
12. %80 alkol 1 kez, %96 alkol 2 kez batırıp çıkartılması
- 13.Dışarıya çıkartılan asansörün kurummasının beklenmesi ve asansörün ksilende en az 45 dakika bekletilmesi
14. Entellan kullanılarak preparatların kapatılma işlemi yapılması

Bu basamaklar sonucunda hazırlanan preparatlarda boyanın gerektirdiği şekilde çekirdeklerin mavi-mor renkte boyandığı ve sitoplazmanın kırmızıya renkte boyandığı mikroskop altında görülmüştür.

Bu aşamadan sonra *Masson's Trichome* boyama yapılmıştır. Bu boyama yöntemi için de daha önceki boyamada kullanılan parafin bloklar kullanılmıştır. Bloklardan alınan kesitlere aşağıdaki boyama prosedürü uygulanmıştır:



### *B. Masson's Trichome Boyama:*

1. Preparatlar 40- 45 dakika ksilen içerisinde tutulması ve sonrasında ksilenin uçurulması
2. %100 absol veya %96 alkol içerisinde 15 dakika bekletilme
3. %80 alkol içerisinde 15 dakika tutulan preparatlar distile su ile yıkama yapılması
4. Bouin solüsyonuna konan preparatlar 1 saat boyunca 56<sup>0</sup>C'de etüvde tutulması
5. Çeşme suyu ile yıkama yapılması
6. Süzölmüş hematoksilen içerisinde 20 dakika bekletilme
7. Çeşme suyu ile yıkama yapılması
8. Asit alkole batırıp çıkarılması
9. Çeşme suyunda yıkama yapılması
10. Amonyaklı suya batırıp çıkarılması
11. Çeşme suyunda yıkama yapılması
12. Trichome içerisinde 15 dakika bekletilme
13. Yıkama yapılmaksızın 2 dakika asetik aside preparatlar dizilimi
14. Sonrasında % 80 alkol ve % 96 alkol batırıp çıkarılması
15. Preparatlardan alkolü uçurmak amacıyla kurutma işleminin yapılması ve preparatların ksilende 15 dakika tutulması
16. Entellan aracılığı ile preparatlar kapatılması

Boyama sonunda preparatlar mikroskop altında incelendiğinde bağ doku elemanlarının mavi yeşil, kas yapının kırmızı renkte boyandığı görölmüştür.

### **3.6. CD 31 Hücre Yüzey Antijeninin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Tespiti**

İmmunohistokimya antijeni dokudaki yeri ile tanımlayan bir tekniktir. Bu yüzden özel olarak hazırlanan antikorların, çalışılacak dokudaki antijenlere özel olarak çalışması prensibi olarak da tanımlanmaktadır [61].

Çalışmamızda anti-rat primer antikor ( Santa cruz, sc-1506, USA) ve bu antikora uyumlu olarak seçtiğimiz sekonder antikor boyama kiti ( Santa cruz, sc- 2024, USA) kullanılmıştır.

İmmunohistokimyasal çalışmalar H.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji& Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. İmmunohistokimya için yapılan denemeler sonucunda primer antikorun konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından aşağıdaki prosedür uygulanmıştır:

1. Parafine gömülü dokulardan üç mikron kalınlığında kesitler adheziv özellikte lamlara alınarak dört saat boyunca etüvde deparafinizasyon yapılmıştır.
2. Etüvden alınan dokular on beş dakika X2 kez ksilolde ve her birinde on dakika olmak üzere sırasıyla % 96, % 80, % 70 alkol derecelerinden geçirilmiştir.
3. Beş dakika distile su içerisinde dokular tutulmuştur.
4. pH=6 olmak üzere 1:10 oranında sulandırılan sitrat tampon solüsyonu hazırlanarak şale içerisinde antijen geri çağırma işlemi 95 Watt mikrodalga fırında on beş dakika süre ile üç kez yapılmıştır.
5. Yirmi dakika kadar preparatların şale içerisinde soğuması beklenmiştir.
6. İki dakika süre ile 1:10 oranında kullanılan stok PBS ile yıkama yapılmıştır.
7. %1 oranında hazırlanan hidrojen peroksidad solüsyonu ile hidrojen peroksit blokajı yapılmıştır. Hidrojen peroksit 1:10 oranında sulandırılan stok PBS ile sulandırılmıştır. Hazırlanan solüsyon her preparattaki kesitlerin üzerine 50 µl gelecek şekilde damlatılmıştır.
8. PBS ile beş dakika süreyle iki kez yıkama yapılmıştır.
9. Sekonder kit içerisinde çıkan goat anti serum ile serum blokaj bir saat süre ile yapılmıştır. Bunun için stok serum % 1,5 oranında olacak şekilde PBS ile sulandırılmıştır ve her preparattaki kesitlerin üzerine 50 µl gelecek şekilde damlatılmıştır.
10. Serum blokaj ardından yıkama yapılmaksızın anti-rat primer antikor 1:100 oranında %1,5'lik serum blokaj solüsyonu ile sulandırılmış ve primer antikor damlatıldıktan sonra +4 °C gece boyunca inkübasyon yapılmıştır.
11. PBS ile beş dakika süreyle üç kez yıkama yapılmıştır.
12. Goat anti-rat sekonder antikor damlatılmış ve bir saat süre ile oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.
13. PBS ile beş dakika süreyle üç kez yıkama yapılmıştır.
14. Avidin+biyotin kompleksi hazırlanmış ve kesitlerin üzerine 50 µl gelecek şekilde yarım saat süre ile oda sıcaklığında beklenmiştir.
15. Kromojen olarak DAB solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon susbrat buffer (5 damla) ve peroksidad susbrat (1 damla) ve DAB (1 damla) ile 1.6 ml distile su içerisinde hazırlanmış ve kesitlerin üzerine damlatılarak beş dakika süre ile beklenmiştir.
16. Preparatlar distile su içerisinde 5 dakika süreyle iki kez yıkama yapılmıştır.
17. Preparatlar on saniye boyunca hematoksilen içerisinde bekletilmiştir.

18. Distile su ile yıkama yapılmıştır.

19. Sırasıyla her birinde bir dakika olmak üzere preparatlar %70, %80, %96 alkol derecelerinden geçirilmiştir.

20. 30 dakika boyunca iki kez olmak koşuluyla ksilende bekletilen preparatlar entellan yardımıyla kapatılmıştır.

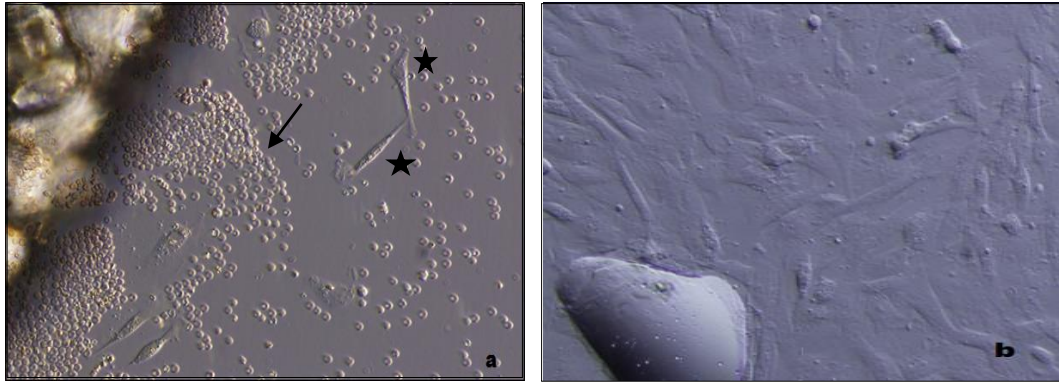
### **3.7. İstatiksel Analiz**

Çalışmanın istatiksel analiz basamağı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. İlk olarak istatiksel olarak hangi testin kullanılacağına karar vermek amacıyla tanımlayıcı istatiksel yöntemler uygulanmıştır. Böylece ortalama, ortanca, minimum, maksimum ve standart sapma değerleri bulunmuştur. İstatiksel olarak Kruskal- Walls testi ve Fisher-Fremann- Halton testleri kullanılmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde örneklem sayısının arttırılmasına bağlı istatiksel olarak anlamlı farklılıkların oluşabileceği öngörülmüştür.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

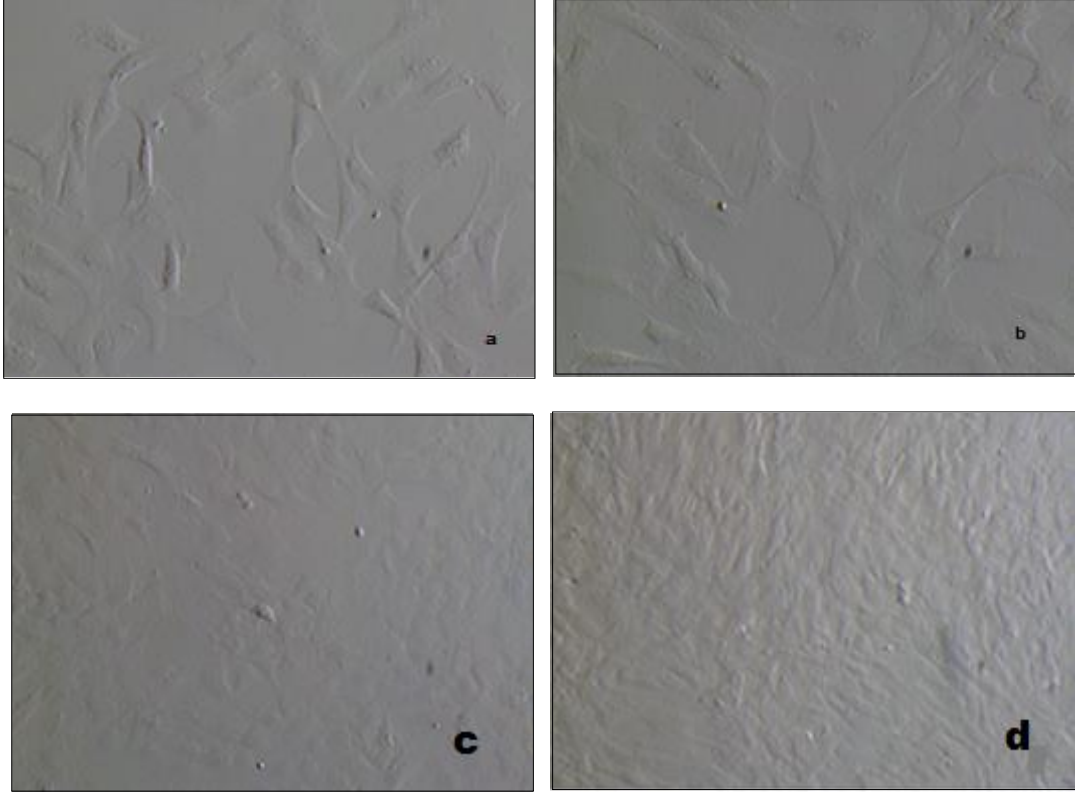
### 4.1. MKH İzolasyonu ve Kültürü

Çalışmamızda MKH'ler sıçanın kasık bölgesinde deri altından primer eksplant kültür yöntemi kullanılarak izole edilmiştir. Herhangi bir enzimatik yöntem kullanılmamış ve doku parçaları izole edildikten sonra doğrudan altı kuyucuklu kültür kaplarına alınıp ve primer dokudan MKH'lerin ayrılarak kültür kabının yüzeyine tutunması sağlanmıştır. İnkübasyonun 18. ve 24. saatinde fibroblastik morfolojiye sahip MKH'lerin dokudan ayrılarak kültür kabının yüzeyine tutunmaya başladıkları görülmüştür ( Şekil 4.1.1 a, b)



**Şekil 4.1. 1** İnkübasyonun 24. Saatinde primer dokudan ayrılan MKH'ler (★) ve ortamdaki eritrositler ( ↙ ) (a) (100X) ve inkübasyonun ilerleyen günlerinde fibroblastik hücre görünümü (b) (200X)

İnkübasyonun başlangıcında eritrositlerin de ortamda olduğu bilinmektedir; ancak besiyerinin değiştirilmesiyle ortamdan tamamen uzaklaştırılmışlardır. İnkübasyonun devam eden günlerinde hücreler çoğalmış, eritrositler ortamdan tamamen uzaklaşmış ve fibroblastik morfoloji belirginleşmiştir ( Şekil 4.1.1. b). Bu aşamada hücrelerin pasajları yapılmıştır. Bundan sonra yüzeyi tamamen kaplayarak konfluent hale gelen hücreler pasaj 4'e kadar çoğaltılmıştır (Şekil 4.1.2. a, b, c, d).



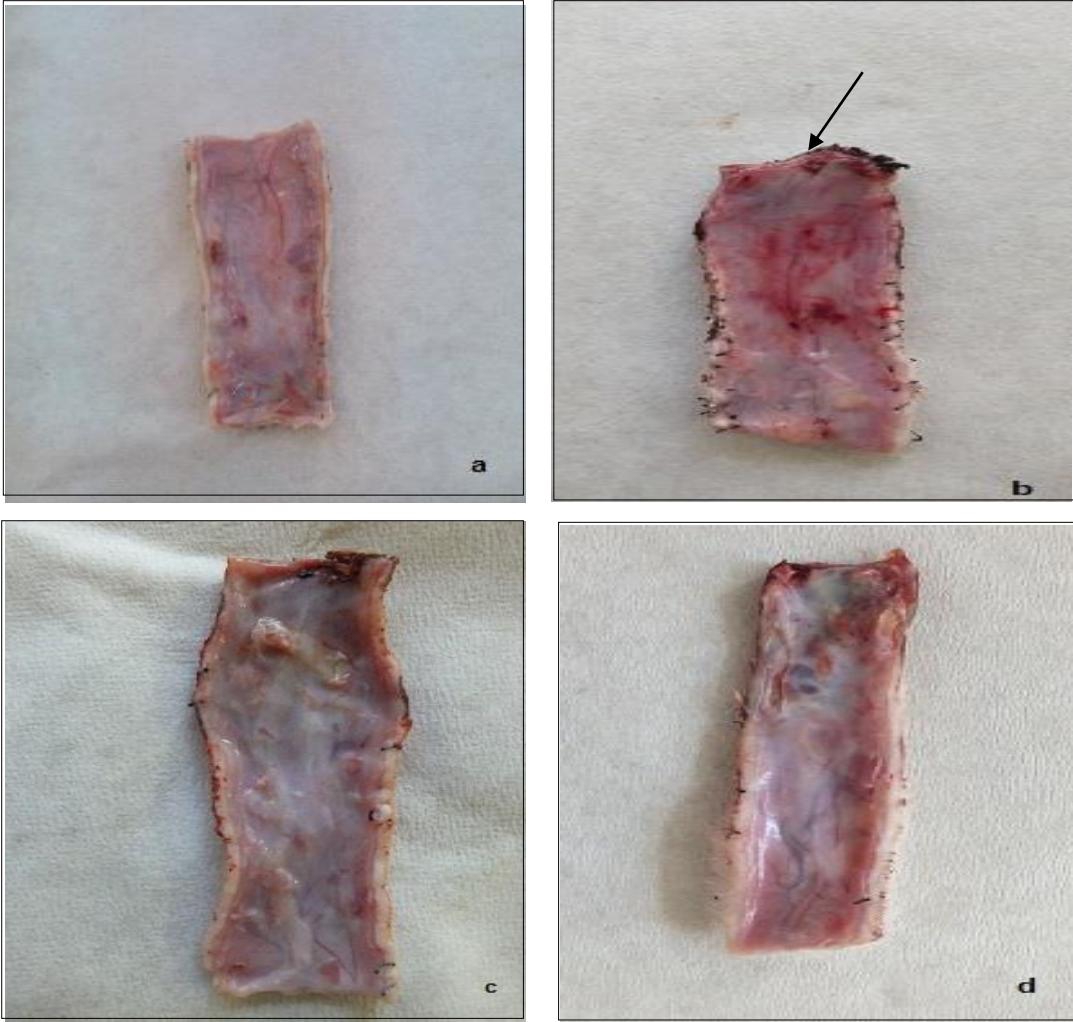
Şekil 4.1. 2 Farklı pasajlarda MKH'lerin görüntüsü (100X). Pasaj 1 (a), pasaj 2 (b) pasaj 3 (c), pasaj 4 (d)

Pasaj 4'e kadar hücrelerin morfolojilerinde bir değişiklik olmadığı ve fibroblastik morfolojinin korunduğu gösterilmiştir.

#### **4.2. Sıçanda Sırt Flebinin Oluşturulması**

Tüm gruplar için uygulamaların yapılmasından 7 gün sonra incelemeye geçilmiştir. Bunun için sıçanlara yüksek doz anestezi uygulanarak ötanazi yapılmıştır. Ardından hayvan sırt üstü olacak şekilde düz bir zemin üzerine yatırılmış (Şekil 3.4.1) ve nekrotik alan yüzdesi hesaplanmış, histolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar yapılmıştır.

Histolojik incelemeden önce flep tamamen kesilerek çıkartılmış ve cilt altındaki kanlanma da makroskopik olarak gözlenmiştir (Şekil 4.2.1 a, b, c, d).

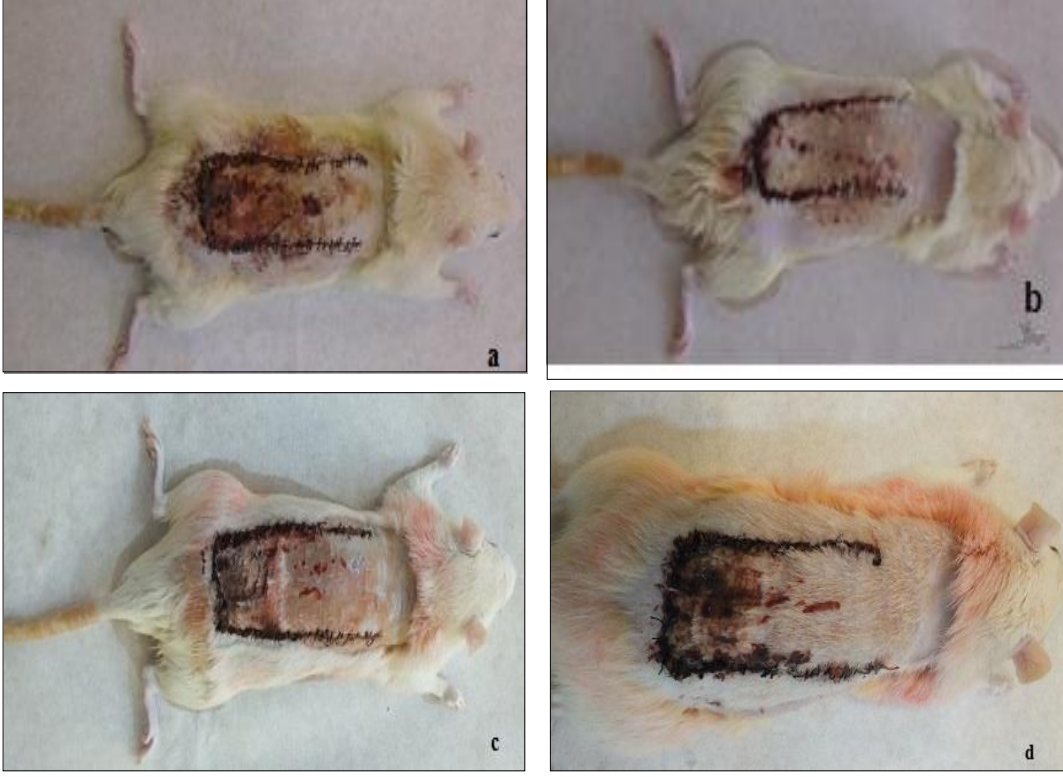


**Şekil 4.2. 1** Flep örneklerinin kesit için hazırlanması. Kontrol grubu (a), hücre grubu (b), VEGF grubu (c), hücre+VEGF(d). Hücre grubunda görülen kanlanma (↘).

Yukarıdaki sonuçlarımız ile uyumlu olarak en fazla kanlanmanın hücre grubunda olduğu gösterilmiştir. Bu da MKH'lerin anjiyogenezise katkı sağladığı konusunda önemli bir sonuçtur.

### 4.3. Deney ve Kontrol Gruplarının İncelenmesi

Operasyonun 7. Gününde deney sonlandırılmış ve yukarıda da ifade edildiği gibi deney hayvanı hazırlanarak incelemeye alınmıştır. Tüm gruplar için makroskopik olarak bakıldığında farklılıklar görülmüştür (Şekil 4.3.1).



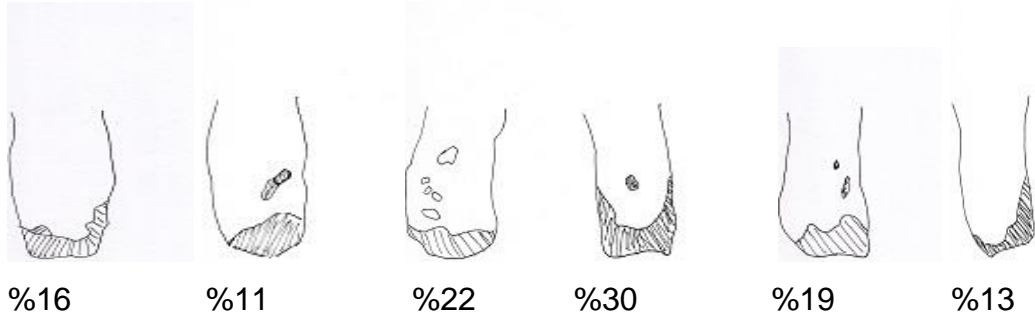
**Şekil 4.3. 1** Flep modelinde 7. günde nekrotik alanların makroskopik görünümü. kontrol grubu (a), hücre grubu (b), VEGF grubu (c), hücre+VEGF grubu (d).

### 4.4. Nekrotik Alan Yüzdesinin Hesaplanması

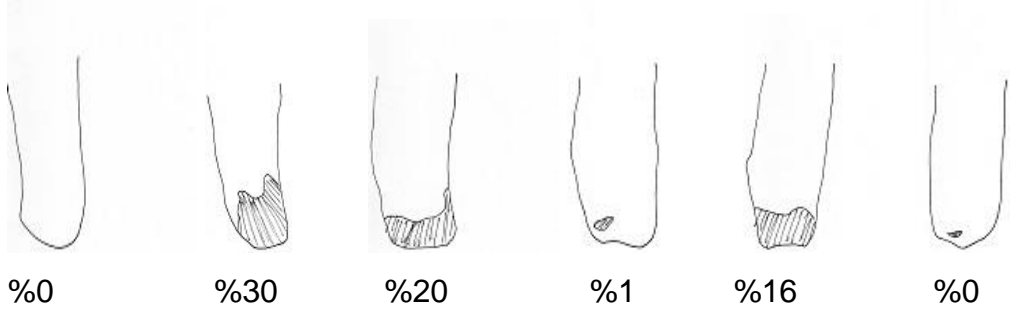
Çalışmada  $3 \times 10 \text{ cm}^2$  boyutlarında modifiye edilmiş McFarlane flep modeli kullanılmıştır. İskemik flep yapısı saydam kağıtlara kopyalanarak çizildikten sonra elektronik ortama aktarılmış piksel sayımı yapılmış ve % nekroz alanı hesaplanmıştır (Şekil 4.4.1)

1. Kontrol Grubu: % 18.5
2. Hücre Grubu: %11
3. VEGF grubu: %10
4. Hücre+VEGF Grubu: %31

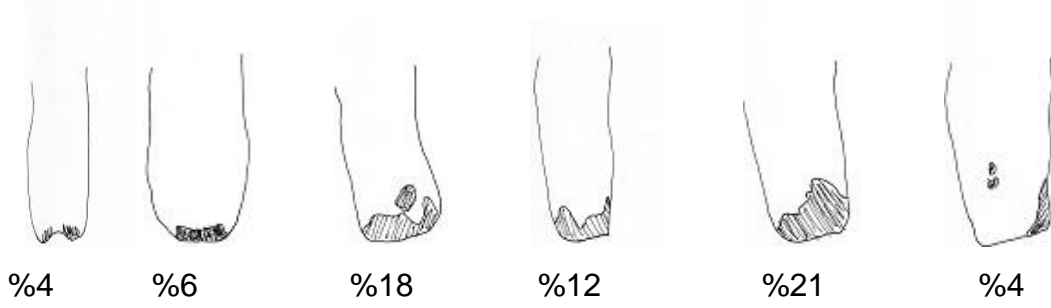
Gruplar arasındaki değerlere bakıldığında en az nekrotik alan hücre grubunda bulunmuştur. Nekrotik alan ortalaması en yüksek olan grup ise hücre+VEGF grubu olarak tespit edilmiştir ( $p=0.08$ ).



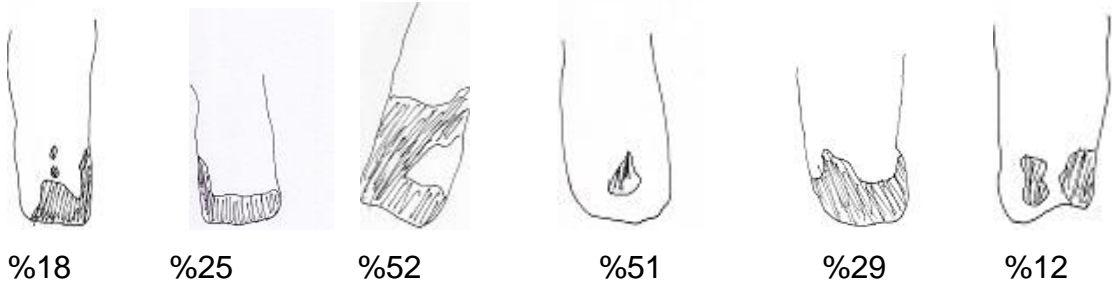
a



b



c.



d.

**Şekil 4.4. 1** Gruplarda nekrotik alan %'sinin hesaplanması. Kontrol grubu (a), hücre grubu (b), VEGF grubu (c), hücre+VEGF grubu (d)



Nekrotik alan hesaplamaları sonucunda en yüksek nekroz ortalamasına sahip olan grubun hücre+VEGF grubu olduğu görülmüştür. Bu sonuç damarlanmanın yoğun olarak görülmesinin beklendiği hücre+VEGF grubu için beklenen durum görülmediğinden VEGF'nin MKH üzerinde baskılayıcı etkisi olabileceği yönünde yorumlanarak VEGF'nin MKH üzerindeki etkisi incelenmek istenmiştir.

Buna bağlı olarak *in vivo* uygulamalarda kullandığımız dozda VEGF (10µg/5000ml) 20.000 hücre/ml olacak şekilde MKH'ler üzerine *in vitro* olarak uygulanmış ve MKH'lerin VEGF'nin uygulama konsantrasyonunda canlılığı MTT testi ile tayin edilmiştir.

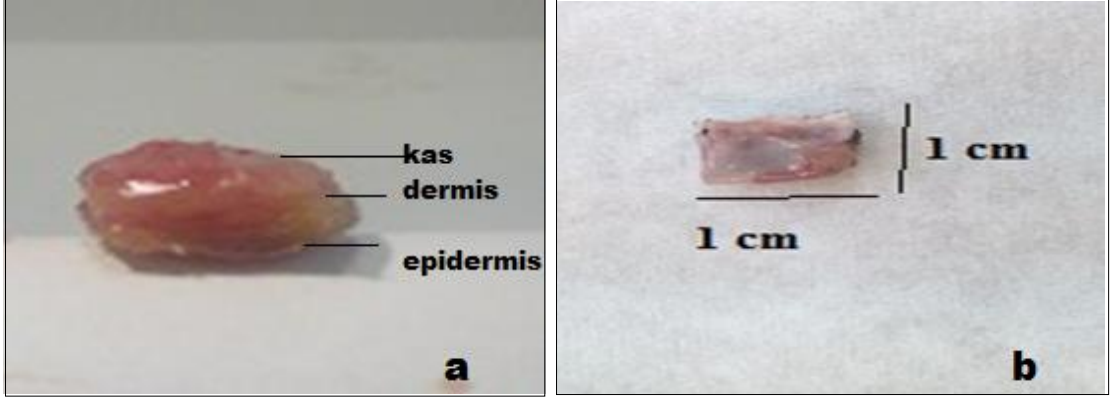
**Tablo 4.4. 1** VEGF için verilen OD (570 nm) değerleri VEGF için verilen OD (570 nm) değerleri

Gruplar (Besiyeri+MKH)	OD değerleri	Gruplar (Besiyeri+MKH+VEGF)	OD değerleri
n <sub>1</sub>	0.169	n <sub>1</sub>	0.154
n <sub>2</sub>	0.389	n <sub>2</sub>	0.115
n <sub>3</sub>	0.209	n <sub>3</sub>	0.100
n <sub>4</sub>	0.406	n <sub>4</sub>	0.121
n <sub>5</sub>	0.277	n <sub>5</sub>	0.113
n <sub>6</sub>	0.963	n <sub>6</sub>	0.336

Yapılan test sonucunda ilk 24 saat içerisinde alınan MTT sonuçları yorumlanmıştır. Bunun sebebi VEGF'nin MKH'ler üzerinde akut etkisinin çalışmamızda ön plana çıkmasıdır. Bu verilere göre VEGF'nin MKH üzerinde baskılayıcı etkisinin olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

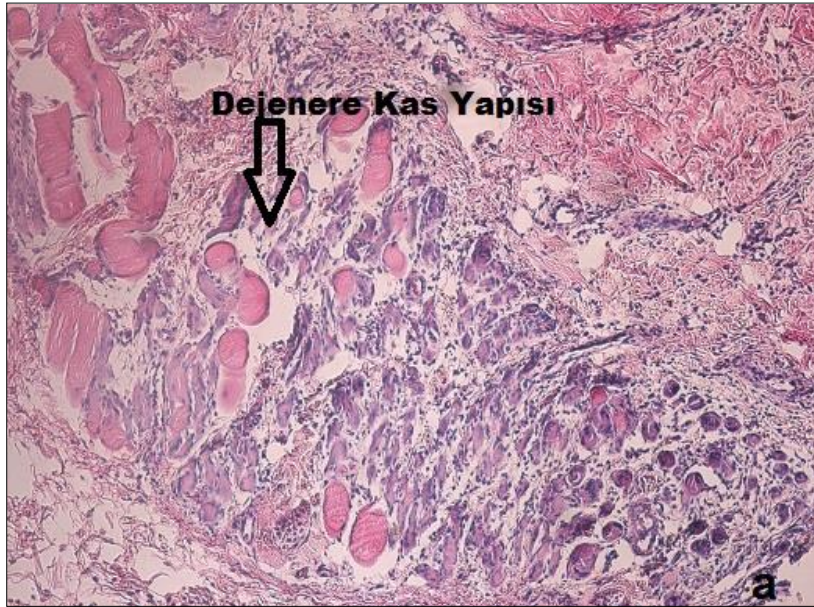
#### 4.5. Histolojik Boyama Çalışmaları

Histolojik boyamalar için flepten 1X1 cm<sup>2</sup> boyutunda kesitler alınmış ( Şekil 4.5.1.a, b) ve incelemeler yapılmıştır.

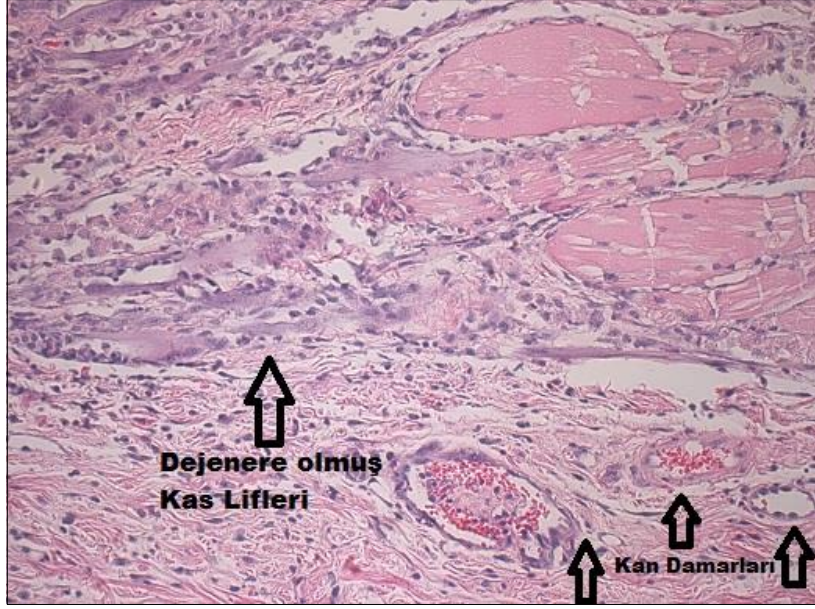


Şekil 4.5. 1. Sırt flebinden alınan 1 cm<sup>2</sup> boyutundaki doku örnekleri (a, b)

Çalışmamızda Hematoksilen&Eozin boyama yapılmış ve mononükleer hücre infiltrasyonu, kas dejenerasyonu, kan damarları gözlenmiştir (Şekil .4.5.2 a, b)



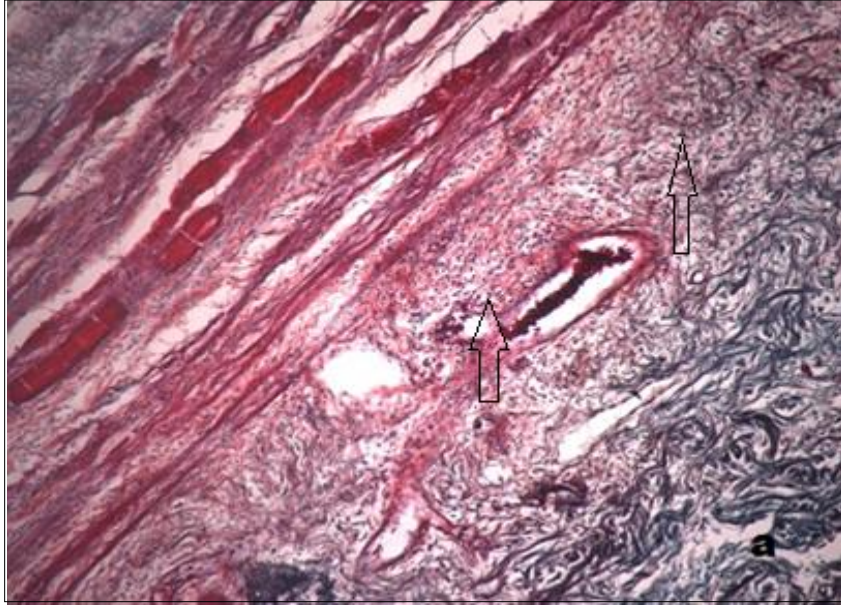
Şekil 4.5. 2.a. Kontrol grubunda dejenere olmuş kas dokusu (100X)



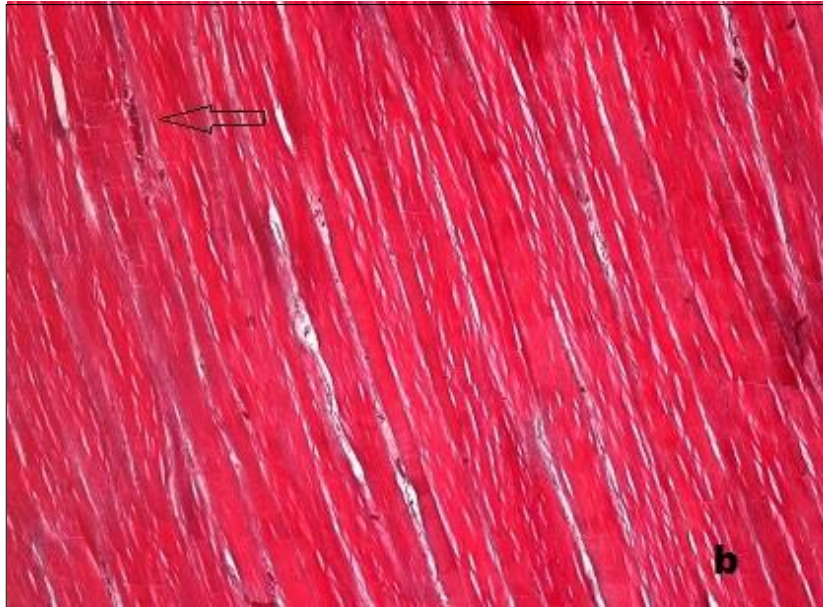
**Şekil 4.5.2.b.** Kontrol grubunda kan damarları ve dejenere olmuş kas dokusu gösterimi (200X)

Ayrıca çalışmamızda Masson's trichome boyama yapılmıştır. Masson's trichome boyanın sağladığı zemindeki tezatlık sayesinde bağ doku elemanları kastan rahatlıkla ayırt edilebilmiş ve bu boyama ile kastaki dejenerasyon durumu derecelendirilmiştir.

Kas derecelendirmesi için 100X büyütme kullanılmıştır (Şekil 4.5.3 a, b, c, d).



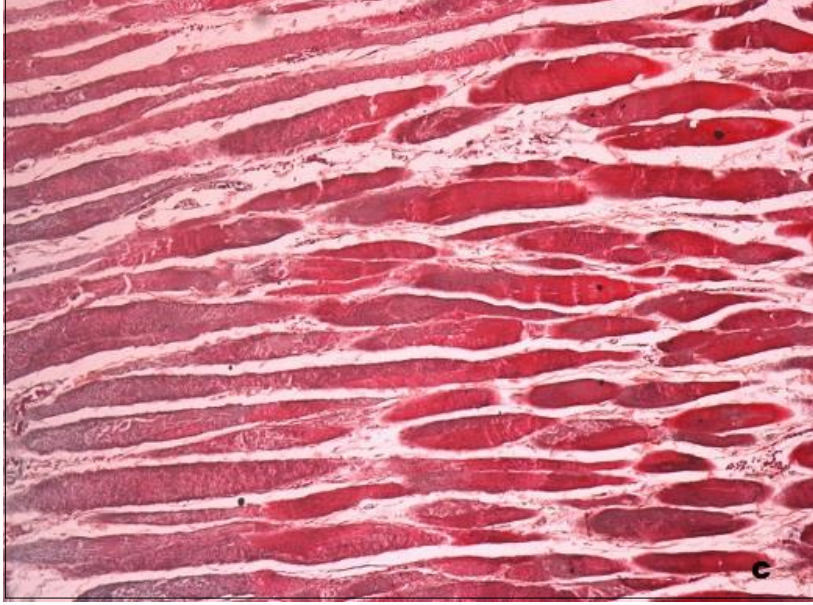
**Şekil 4.5.3.a.** Kontrol grubunda +3 değerini alan kas görüntüsü ve mononükleer hücre infiltrasyonu (↔) (100X)



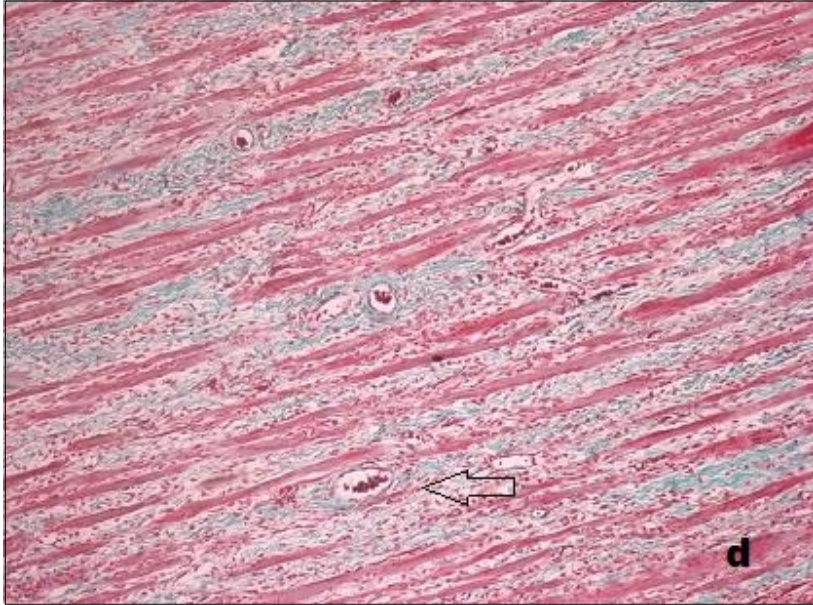
**Şekil 4.5.2.b** Hücre grubunda +1 değerini alan kas görüntüsü ve kapiller görünüm (↔) (100X)

Şekillerde görüldüğü üzere kas dejenerasyonunun +3 olarak derecelendirildiği grupta (Şekil 4.5.3.a) kas lifleri arasındaki bağ doku yoğunluğunun arttığı ve liflerin tamamen ayrıldığı ve bölgede yoğun mononükleer hücre infiltrasyonunun olduğu görülmektedir. Bu durum kas proteinlerindeki bozulma sonucunda ayrılan lifler arasına giren bağ doku kaynaklı bir görünümdür. +1 değerini alan hücre grubuna baktığımızda ise (Şekil 4.5.3.b) kas liflerinin sağlıklı yapıda olduğu görülmektedir.

+2 değerini alan gruba bakıldığında mononükleer hücre infiltrasyonunun nispeten az olduğu görülmektedir (Şekil 4.5.3. c). Hücre+VEGF grubunda da kaslar çoğunlukla +3 değerini almıştır (Şekil 4.5.3.d).



**Şekil 4.5.3.c** VEGF grubunda +2 değerini alan kas görünümü (100X)



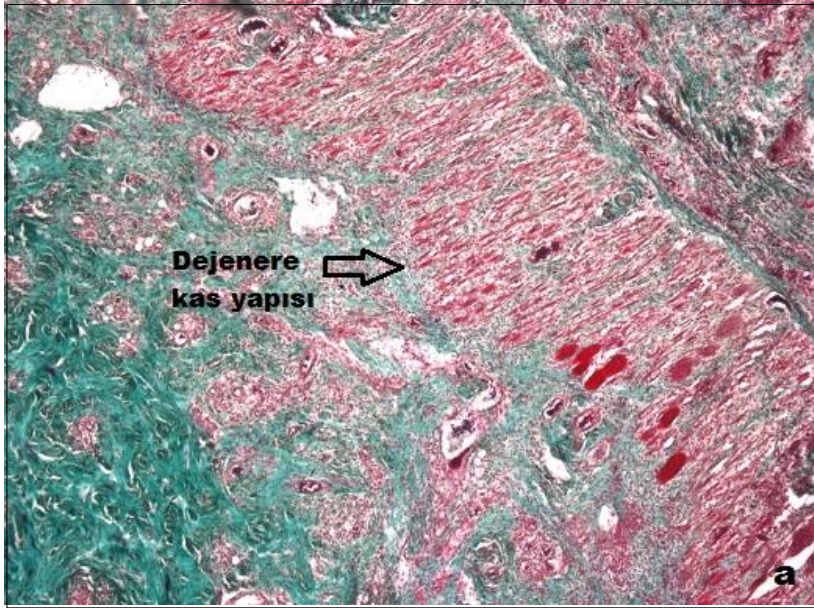
**Şekil 4.5.3.d.** Hücre+VEGF grubunda +3 değerini alan kas görünümü ve kapiller görünüm (⇔) (100X)

Buna bağlı olarak dejenerasyon derecesi en yüksek olan kas +3 değerini, orta derece dejenerasyon +2 değerini ve en az dejenerasyon yani en iyi durumdaki kas + 1 değerini almıştır ( Tablo 4.5.1) ve istatistiksel hesaplamalar buna bağlı kalınarak yapılmıştır ( Fisher-Freeman- Halton test). Sonuç olarak gruplar arası farklılık olduğu bulunmuştur (p=0.02).

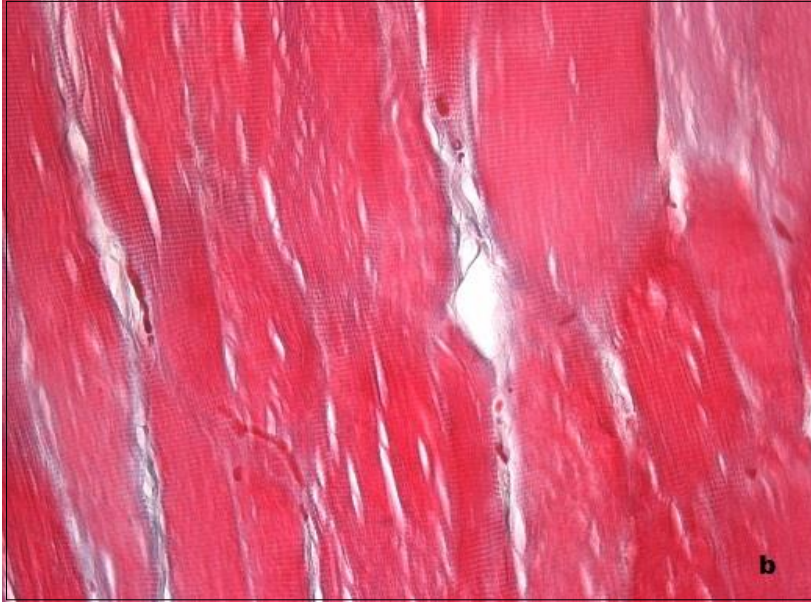
**Tablo 4.5. 1. Kas derecelendirmesinin istatistik için hazırlanması**

Kas derecesi	+1	+2	+3
Kas durum tayini	En iyi durumda	Orta durumda	En kötü durumda

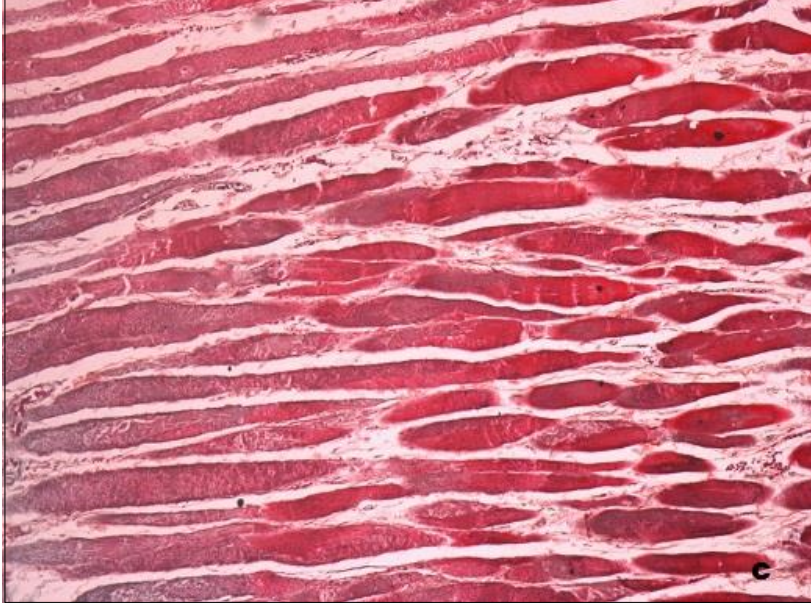
Derecelendirme yapıldıktan sonra preparatın rastgele bölgeleri seçilerek görüntülemeler yapılmış ve dejenerasyonu destekleyecek bulgular taranmıştır. Sonuç olarak dejenerasyon için belirleyici faktörler kas liflerinin birbirinden ayrılması, yağ hücre infiltrasyonu, dejenere olan kas lifleri arasına giren bağ doku elemanlarının durumu olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5.4. a, b, c, d).



**Şekil 4.5.4.a.** Kontrol grubunda dejenere +3 değerinde iskelet kası görüntüsü. Hücre infiltrasyonu ve kıl kökü yapısında azalma tespit edilmiştir (50X)

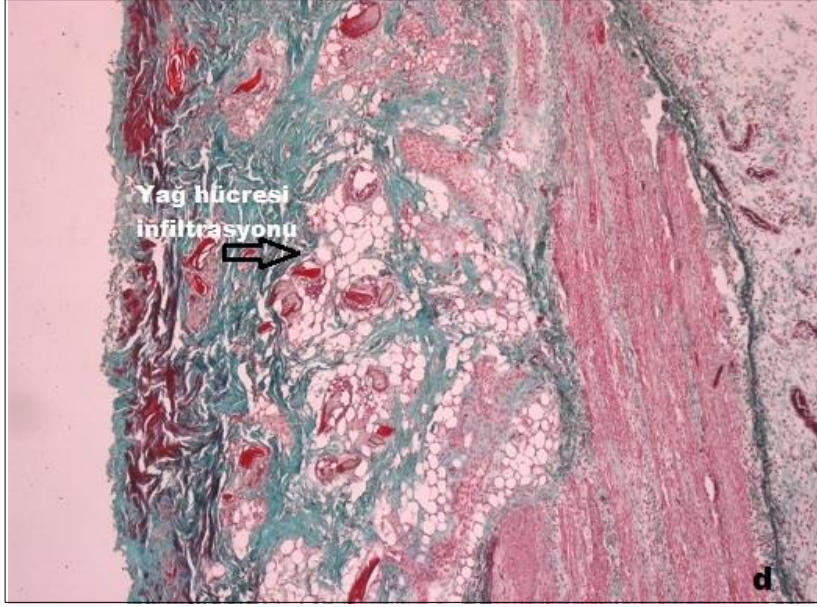


**Şekil 4.5.4.b** Hücre grubunda iskelet kasının +1 değerinde görüntüsü (400X)



**Şekil 4.5.4.c** VEGF grubunda iskelet kasının +2 değerinde görüntüsü (100X)

Yukarıdaki şekiller karşılaştırıldığında hücre grubundaki iskelet kası oldukça iyi durumdayken; VEGF grubunda dejenerasyon görülmektedir.

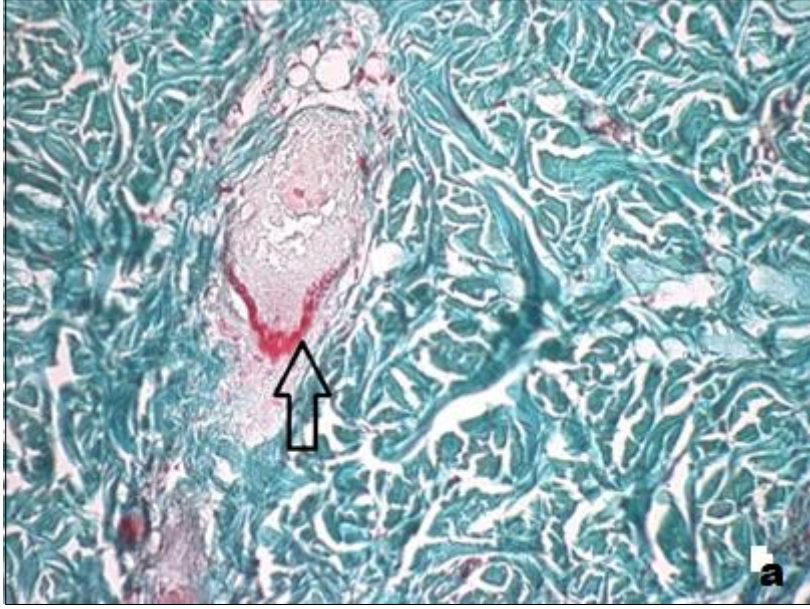


**Şekil 4.5.4.d.** Hücre+ VEGF grubunda iskelet kası +3 görüntüsü. Yağ hücresi infiltrasyonu şekilde gösterilmiştir (50X).

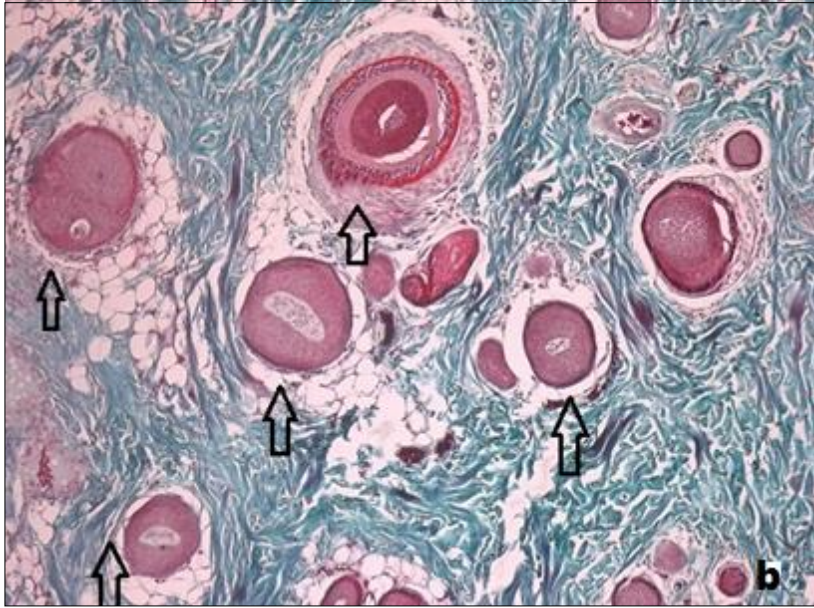
İskelet kasındaki derecelendirmeye bağlı olarak kontrol grubu tamamen + 3 değerini alan tek gruptur. Bu durum, kontrol grubunda iskelet kası açısından flebin en kötü durumda olduğunu ortaya koymaktadır. Yağ dokunun infiltrasyon özelliğine bağlı olarak hücre+VEGF grubunun diğer gruplara göre daha fazla infiltrasyon gösterdiği tespit edilmiştir.

Ayrıca mikroskopik incelemeler esnasında kıl kökü sayımı yapılması uygun görülmüştür. Kıl kökü sayımı da 100X büyütme ile yapılmıştır. Kıl kökü sayımında sağlıklı durumda olanlar (Şekil 4.5.5.b) ve sağlıklı olmayanlar veya durumu tespit edilemeyenler (Şekil 4.5.5.a) olmak üzere sayım yapılmış ve istatistiksel hesap sağlıklı olan kıl kökü sayısı üzerinden yapılmıştır.



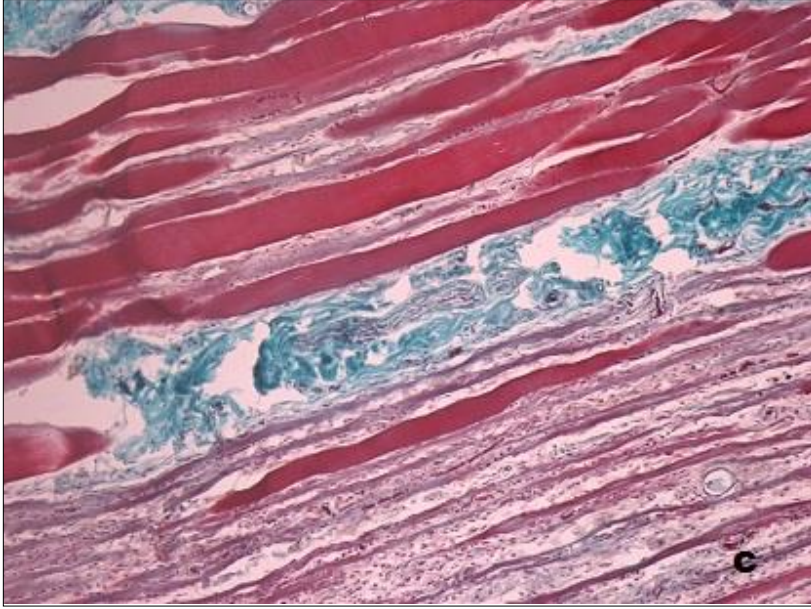


**Şekil 4.5.5.a** Kontrol grubunda sağlıklı kıl kökü görünümü (↑) (100X)

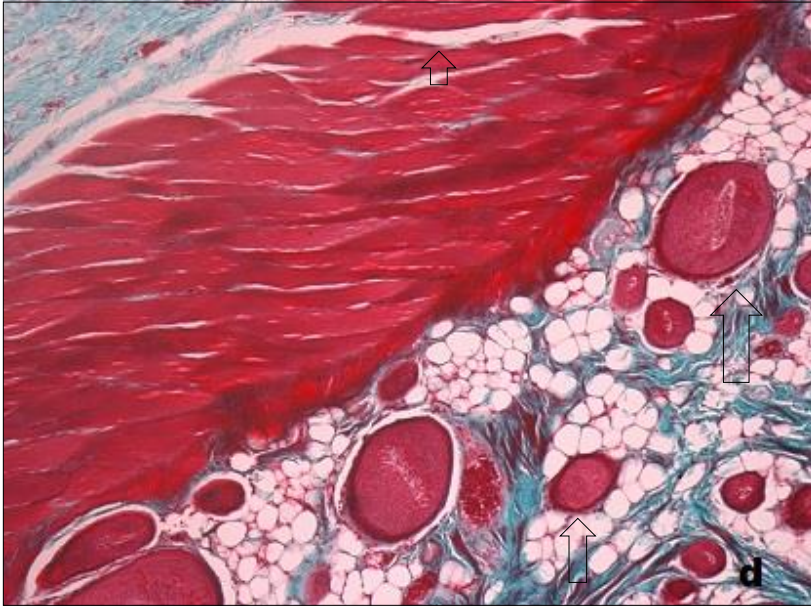


**Şekil 4.5.5.b.** Hücre grubunda sağlıklı kıl kökü görünümü (↑) (100X)

Kıl kökü açısından bakıldığında ortalaması en yüksek olan grup hücre grubudur. Bu durum kıl kökü ve iyileşme açısından değerlendirildiğinde hücre grubunun iyileşme açısından diğer gruplara göre fark yarattığını göstermektedir. Hücre grubundaki farklılık istatistiksel olarak da gösterilmiştir (  $p=0.017$ , Kruskal Walls testi).



**Şekil 4.5.5.c.** VEGF grubunda sayım yapılamayan ve iskelet kası açısından +3 değerini alan örnek (100X)



**Şekil 4.5.5.d.** Hücre+VEGF grubunda kıl kökü görünümü ( ↑ ) (100X)

Kıl kökü sayısı hücre grubunda kontrol grubuna göre ( $p=0.04$ ) ve hücre grubunda hücre+VEGF grubuna göre ( $p= 0.035$ ) anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

#### 4.6. CD 31 Hücre Yüzey Antijeninin İmmunohistokimyasal Yöntemle Tespit Edilmesi

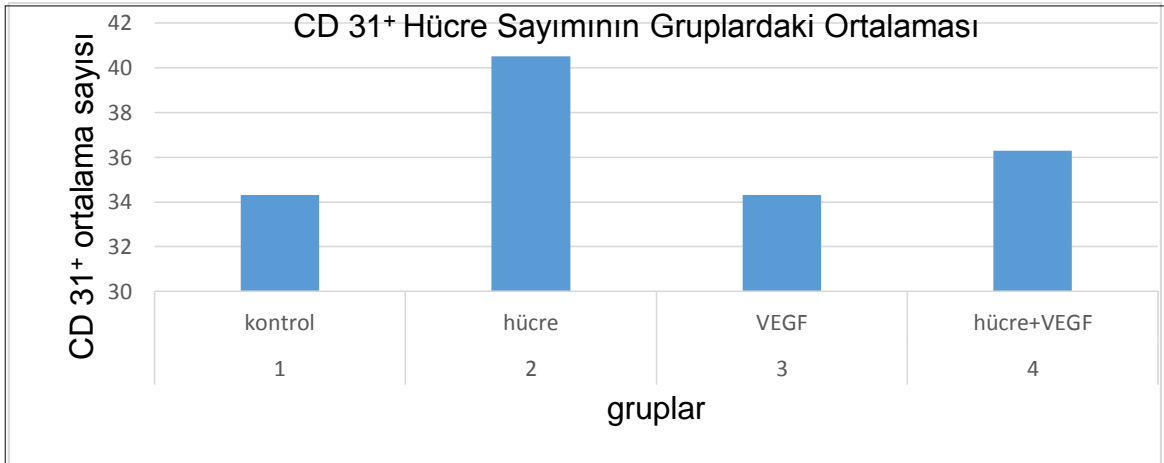
İmmunohistokimyasal yöntem basamağı için yapılan ön çalışmalar sonucunda sonuç olarak 1:50 oranında primer antikor ile +4 °C'de gece boyunca bekleme yapılarak boyamanın devam etmesine karar verilmiştir. Buna bağlı olarak CD 31 immunohistokimyasal boyama yöntemi tamamlanmış ve 400X büyütmede rastgele seçilen 5 alanda sayım yapılmıştır ( Şekil .4.6.1 a, b, c, d ). Sayım esnasında kapiller yapılar sayılarak CD 31<sup>+</sup> olan hücrelerin sayımının spesifik olmasına dikkat edilmiştir. Sayım yapılan tüm alanlarda fotoğraf çekilmiştir.

Sayım sonucunda istatikselsel olarak CD31 miktarı bakımından gruplarda benzer ortalamalar olduğu tespit edilmiştir (p=0,674). Ancak ortalama değerler karşılaştırıldığında hücre grubunda CD31 ortalamasının yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 4.6.1 a, b).

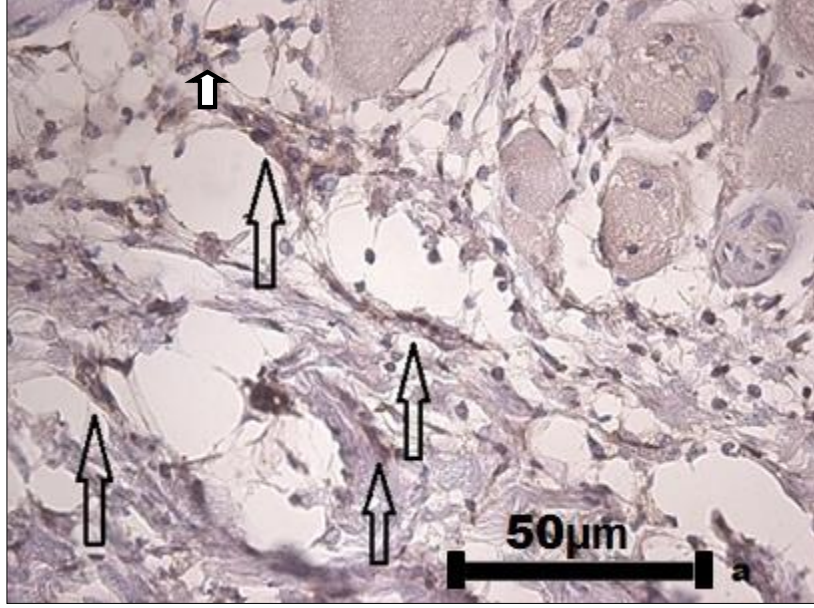
**Tablo 4.6. 1. a.** Gruplar arasında CD 31<sup>+</sup> hücre sayımı ortalama değerleri

Grup İsmi	CD 31 sayımı ortalaması
Kontrol	34.3
Hücre	40.5
VEGF	34.3
Hücre+VEGF	36.3

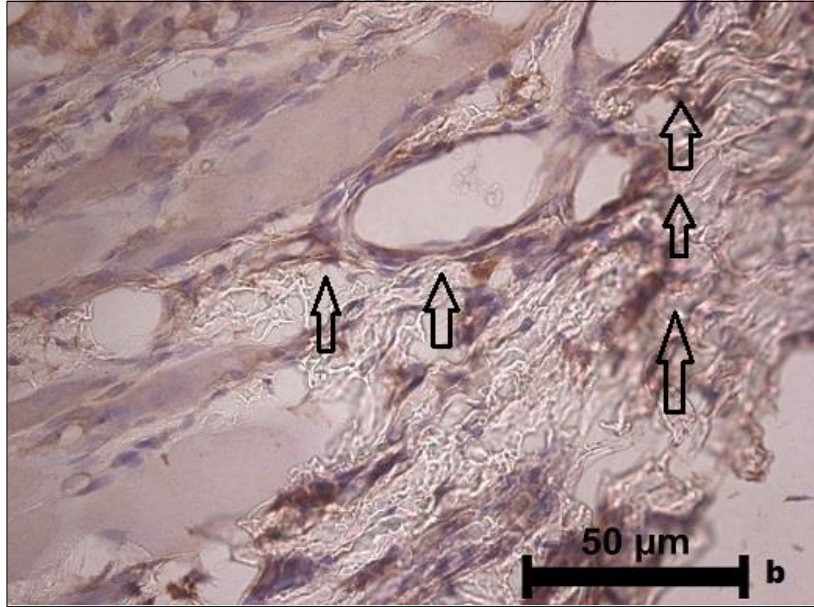
**Tablo 4.6. 2.** CD 31<sup>+</sup> hücre sayımı ortalamasının gruplar arasındaki değişimi



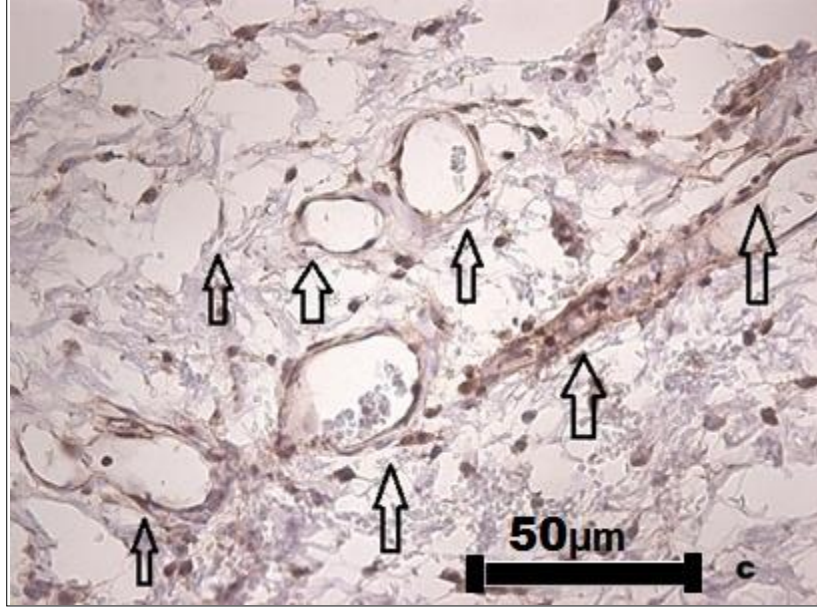
CD 31<sup>+</sup> hücre sayımının yapılaşımın gruplara göre gösterimi aşağıdaki şekillerde verilmiştir ( Şekil 4.6.1.a, ,b, c, d):



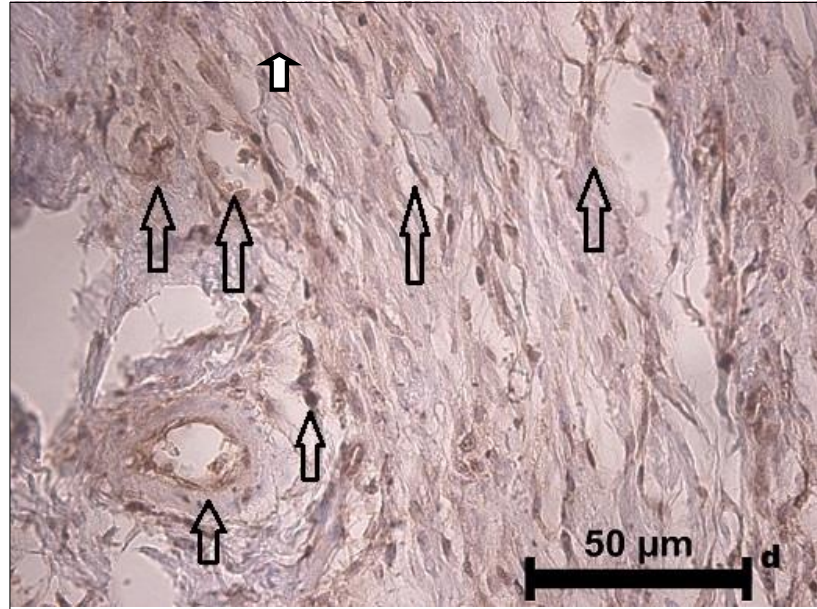
Şekil 4.6. 1.a. Kontrol grubunda oklar (↑) ile kapiller gösterimi.



Şekil 4.6.1.b. Hücre grubunda oklar (↑) ile kapiller gösterimi.



Şekil 4.6.1.c. VEGF grubunda oklar (↑) ile kapiller gösterimi.



Şekil 4.6.1.d. Hücre+VEGF grubunda oklar (↑) ile kapiller gösterimi.

Gruplardan toplanan kıl kökü sayısı, iskelet kası derecelendirmesi, % nekroz alanı değerleri ve CD 31+ hücre sayımı aşağıdaki tabloda olduğu şekilde ifade edilmiştir (Tablo 4.6.2). Çıkan sonuçlar hücre grubu ve diğer gruplar karşılaştırıldığında hücre grubunda azalan nekrotik alan, artan kapiller yoğunluk ve kıl kökü sayısında artışı göstermektedir.

**Tablo 4.6. 3.** İstatistik için kullanılan veriler

Grup İsmi	Kıl Kökü Sayısı	İskelet Kası Derecelendirme	% Nekroz değeri	CD 31+ hücre sayımı
Kontrol 1	0	+3	%16	51
Kontrol 2	0	+3	%11	13
Kontrol 3	0	+3	%22	38
Kontrol 4	0	+3	%30	50
Kontrol 5	9	+3	%19	23
Kontrol 6	0	+3	%13	31
Hücre 1	30	+1	%0	26
Hücre 2	35	+2	%30	38
Hücre 3	24	+3	%20	45
Hücre 4	0	+2	%1	45
Hücre 5	48	+1	%16	43
Hücre 6	15	+2	%0	46
VEGF 1	2	+3	%4	51
VEGF 2	33	+3	%6	32
VEGF 3	1	+3	%18	42
VEGF 4	0	+3	%12	1
VEGF 5	0	+3	%21	43
VEGF 6	2	+2	%4	37
H + VEGF 1	0	+3	%18	38
H + VEGF 2	0	+3	%25	45
H + VEGF 3	0	+2	%52	28
H + VEGF 4	0	+3	%51	34
H + VEGF 5	0	+3	%29	35
H + VEGF 6	8	+3	%12	35

Besin, gaz, sinyal molekülü, kan akımı ve immün hücreler normal fizyolojik koşullarda esas olarak kan damarları tarafından iletilen ve taşınan yapılardır. Kan damaraları ile ilgili mekanizmaların açıklığa kavuşturulması kanser, diyabetik retinopati ve birçok iskemik durumlarının tedavisinin önünü açmak için önem taşımaktadır. İskemik durumlara baktığımız zaman damarlanmanın yeterli düzeyde sağlanamaması [62] problem teşkil etmektedir. Buradan hareketle deri flebi modelinde iskemi sonrası MKH'nin damarlanmaya olan katkısı araştırılmıştır. MKH'ler salgıladıkları faktörlerle iskemi çalışmalarında damarlanmayı sağlamak açısından kullanılan hücrelerdir. Buna bağlı olarak çalışmamızda hücre grupları MKH'lerin iskemi üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için oluşturulurken; hücre+VEGF grubu MKH'nin bir ürünü olan VEGF'nin etkisinin hücre ile beraber ekzojen olarak verildiğinde nasıl bir etki yaratabileceğinin araştırılması için oluşturulmuştur.

Yapılan çalışmalar VEGF<sub>165</sub> geni aktarılmış hücrelerin sırt flebinde canlılığı arttırıcı yönde etki yaptıklarını göstermektedir [63]. Yani VEGF ifadesi flep canlılığı için istenilen bir durumdur. Ancak çalışmamızda hücre+VEGF grubunda CD 31<sup>+</sup> hücre sayımı az, nekrotik alanın fazla olması, iskelet kasının kötü durumda derecelendirilmesi VEGF'nin ekzojen olarak verilen formunun MKH'lerle birlikte olduğunda akut etki olarak damarlanma sürecinin aleyhinde olabileceğini göstermiştir. VEGF grubu ile benzer sonuçlar gösteren hücre+VEGF grubu hücre grubundan tamamen farklı sonuçlar vermiş ve bu durum ekzojen olarak verilen faktörün flepte iskemi sürecinde beklenen yönde etki etmediğini göstermiştir. Buna bağlı olarak VEGF'nin MKH'ler üzerinde etkili olup fonksiyonlarını baskılayabildiği ya da canlılığını azaltabildiği düşünülmüş ve bunun için MTT analizleri yapılmıştır.

MTT sonuçları, sadece besiyeri içinde inkübe edilmiş MKH'nin canlılığının, VEGF ile birlikte inkübe edilmiş MKH'nin canlılığından daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bu durum VEGF'nin ekzojen olarak uygulandığında MKH proliferasyonunu baskılayabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

VEGF, anjiyogenezis için temel bir molekül olsa da damar stabilizasyonu olmaksızın oluşan kapiller hızla apoptozise ve gerilemeye gittikleri bilinmektedir. Buna bağlı olarak yapılan çalışmalarda VEGF ile birlikte damar stabilizasyonunda rolü olan Anjiopietin1 (Ang1) ve Anjiopietin2 (Ang2) molekülleri de incelenmiştir [64, 65].

Anjiyopietin molekülleri, VEGFA'dan daha sonra tanımlanan bir moleküldür. Tie1 ve Tie2 reseptörlerine etki ederek endotellere spesifik olarak bulunurlar [66]. Ang1, VEGFA kadar endoteller üzerinde mitojen etki göstermemektedir [67]. Ancak Ang1 ve VEGFA koordineli çalışan moleküllerdir. Yapılan çalışmalarda Ang1 molekülünün vasküler gelişimin stabilizasyon basamağı için önemli olduğu gösterilmiştir [65]. Ang1 mutant farelerde VEGF sürecine bağlı basamakların doğru şekilde ilerlediği; ancak damar stabilizasyonunun ve remodeling aşamasının aksadığı ortaya konmuştur [65]. Ang1 molekülünün doğal antogonisti olarak bulunan Ang2 molekülü ile birleşen VEGF molekülü, damarlardaki stabilizasyonu bozarak Ang1 etkisini inhibe etmektedir [65].

Endotel hücrelerin etrafını saran perisitler Ang1 salgılamaktadır ve bu sayede damar stabilizasyonu sağlanmaktadır ve perisitler bu şekilde etki göstererek endotel hücreler ile sıkı bir bağlanma sağlamaktadır. Damar stabilizasyonunu sağlayan Ang1 MKH'ler tarafından da salgılanan bir faktördür; ancak biyolojik aktivite açısından VEGF salınımı MKH'lerde daha yüksek seviyededir [30].

Çalışmamızda hücre grubu ve hücre+VEGF grubu karşılaştırıldığında hücre grubunda daha sağlıklı bir tablonun ortaya çıktığını görmekteyiz. Bu durum VEGF'ün ekzojen olarak verildiğinde hızla indirgenmesi ve MTT testi sonuçlarında görüldüğü gibi MKH canlılığı bastırmasıyla ilişkilendirilebilir. Hücre+VEGF grubunda MKH'ler baskılandığı için salgılamaları gereken faktörleri salgılayamamış ve ortamda ekzojen olarak verilen VEGF'nin degrades olması sonucunda damarlanma hücre+VEGF grubunda yoğun olarak görülememiştir.

VEGF'nin anjiyogeneziste endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunu sağladığı yönünde görüş birliği mevcut olsa da endotel hücre sağkalımı ve buna bağlı olarak damar stabilizasyonu üzerindeki etkisi ile ilgili aydınlatılması gereken mekanizmalar bulunmaktadır [19,21, 66, 67]. Bu durum VEGF'nin sahip olduğu konsantrasyona, pH değerine ve etkilediği reseptör tipine bağlıdır [7, 66]. Çünkü hücre yüzeyinde aktive olan reseptör tipine bağlı olarak aktive olan sinyal yolu farklı olacağından anjiyogeneziste bu ilişki endotel hücrelerin yüzeyindeki reseptör tipi ve aktive olan yol ile ilişkili olarak önem taşımaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda hücre ve hücre+VEGF grupları karşılaştırıldığında, ekzojen olarak verilen VEGF yerine, gelen uyarılara göre ifade bulacak ve ortamda daha uzun süreli etki edecek MKH uygulamasının avantajlı olabileceği yorumlanmıştır.



Bu doğrultuda hücre grubu ve VEGF grubu karşılaştırıldığında MKH'lerin mevcut olarak buldukları dokudan gelen sinyallere bağlı olarak VEGF salgılayabildikleri düşünüldüğünden dokunun ihtiyacına göre oluşan bu cevabın ekzojen olarak verilen VEGF'ye göre daha sağlıklı olduğu söylenebilir. MKH uygulamasının diğer bir avantajının MKH'lerin iyileşme için salgıladıkları sitokinler olduğu ayrıca MKH'lerin yaralı dokuya yerleşerek dokunun ihtiyacına göre cevap oluşturdukları yönünde olabilir. Bu durum çalışmamızın sonucunda ekzojen bir faktör etkisi altında kalmaksızın yapılacak MKH uygulamasının avantajlı olabileceği yönünde yorumlanmıştır.

Anjiyogenezis çözünebilir faktörler ve ECM içinde çözünmeyen faktörler ile ilişkilidir. Bu çok basamaklı süreç var olan damarların etrafındaki membranın degrade olmasıyla başlar ve endotelial hücre migrasyonunu, proliferasyonunu ve fonksiyonel damar ağı yapısının oluşumunu içerir [68]. Kapiller ağın gelişim süreci olan bu adımlar açısından anjiyogenezis süreci ve ECM elemanları yakından ilişkilidir [65].

Anjiyogenezis çalışmalarında kapiller morfoloji ve değişen ECM koşulları önem kazanmaktadır [69]. Bu yüzden gerek hücre uygulama çalışmalarında gerekse doku mühendisliği çalışmalarında bu ilişki ön plandadır. Bu çalışmaların ortak amacı iskemiye bağlı oluşan ve zayıf damarlanmanın sonucu olarak kendini gösteren patolojik durumun tersine çevrilmesi yani yeni damar oluşumunun artırılması ve hızlandırılması yönündedir. Bu doğrultuda çalışmamızda uygulama alanı olarak hemen hemen tüm flep bölgesi (altı farklı bölge) olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Flep çalışmalarına bakıldığında [55, 70, 71, 72] özellikle kaudal bölgede nekrozun arttığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak kaudal kısımdaki damarlanmanın tespiti damarlanma açısından belirleyici olmaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda flepte nekrotik alanın başladığı bölgenin bitişinden itibaren yaklaşık 1 cm aralık verilerek kaudal bölgeden kesitler alınması uygun görülmüştür. Kapillerin etrafındaki bazal membran ve ECM degradesyonu anjiyogenezis için ilk adımlardır. Buna bağlı olarak anjiyogenik süreçleri başlatacak uyarılar önem kazanmaktadır. Bu faktörlerin en çok çalışılanı ve endotel hücrelere spesifik olarak bulunan molekül VEGF'dür [73]. Çalışmamızda VEGF tercih edilmesinin nedeni bu olmuştur.

Flep modelinde flebin oluşturulma sürecine bağlı olarak oluşan travma sonucunda bölgede onarım sürecine bağlı olarak birçok sitokin salgılandığı düşünülmektedir. Flep çalışmalarının yanı sıra yara dokusu ile ilgili olarak yapılan ve büyüme faktörlerini içeren proteomiks çalışmalarında gerek damarlanma ile ilgili faktörlerin gerekse yara iyileşmesi ile ilgili faktörlerin ortamdaki varlığı gösterilmiştir [74]. Ancak hangi ortamda bulunmalarının dışında hangi yolla uygulanırsa uygulansın büyüme faktörlerinin iyileşme bölgesinde uzun süreli etki edemediği ve bu bölgeye tutunamadıkları bilinmektedir [63]. Çünkü yara dokusu mikroçevresi büyüme faktörlerinin hızlı degradasyonunu teşvik etmektedir [41, 63, 75]. Tez çalışmasındaki amacımız kan akımı kesilen flebin tekrar dikilmesi sonucunda damarlanmanın sağlanması, kan akımının sağlıklı olmasına bağlı olarak akımın hızlanması ve flebin canlı dokusunu koruyabilmesi olarak belirlenmiştir. VEGF uygulanan grubun ve hücre grubunun ayrı ayrı oluşturulması flep canlılığının VEGF uygulandığında ve MKH uygulaması yapıldığında karşılaştırılması için imkan sunmuştur.

Ekzojen olarak verilen VEGF damarlanmayı arttırsa da, VEGF grubu ve hücre grubu karşılaştırıldığında VEGF etkisinin sınırlı kaldığı görülmüştür. Buna neden olarak VEGF'nin hızlı degrade olmasını gösterebiliriz. Buna ek olarak diğer önemli bir yorum ekzojen olarak uygulanan faktörün etkisinin mevcut olarak bulunan endotel hücrelerin sayısı yüzünden sınırlı olduğu şeklindedir. Bu yüzden damarlanma süreci gibi dinamik bir sürecin hücre uygulamaları ile desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu uygulamalar için MKH iyi bir kaynak olarak düşünülebilir. Çünkü MKH'ler salgıladıkları faktörlerle çevrede bulunan hücreleri uyabilirler ve bu uyarım, faktör uygulamasında faktörün indirgenme süresinin çabukluğu düşünüldüğünde çevredeki hücreler üzerinde daha uzun süreli etki göstermektedir.

MKH'lerin özellikle HGF ve VEGF biyolojik aktivite düzeyi gösterecek şekilde salgıladıklarının ve MKH'lerin yara bölgesine yerleşme ve bu bölgede farklılaşabilme özelliklerinin biliniyor olması [30] bu hücrelerin *in vivo* olarak çalışmasını ön plana almaktadır. MKH'lerin hem yönelimsel hem de besleyici özellik göstermeleri iyileşme, onarım gibi damarlanma sürecinin de içinde bulunduğu olayları desteklemesini sağlar [76]. Çalışmamızda hücre grubunun CD31<sup>+</sup> hücre sayımı açısından diğer gruplara göre daha yüksek sonuç vermesi bu bilgiler ışığında yorumlanması uygulanan hücrelerin farklılaşma göstererek veya

salgıladıkları faktörler yardımıyla damarlanma sürecine katkı sağladıkları yönünde olmuştur.

Yapılan araştırmalarda [71, 75] MKH uygulanan gruplarda kapiller yoğunlukta daha fazla artış olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamız da bu veriyi destekleyici yönde sonuç vermiştir. Ancak kapiller yoğunlukta artışın MKH'lerin farklılaşmasına bağlı olup olmadığı tespit edilememiştir. Kapiller yoğunlukta artışın tespiti vasküler endotel hücreler için immünolojik belirteç olan ve endotel öncüsü belirteç olan CD31 [77] ile yapılmış ve hücre grubunda diğer gruplara kıyasla daha fazla sayıda CD31 varlığı tespit edilmiştir.

CD31 boyanmasına bakıldığında insan yağ dokusundaki damarların boyandığı bir çalışmada [78] küçük arter ve venlerde CD31'in kesikli boyama gösterdiği ve özellikle hücre-hücre bağlantı bölgelerinde yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Kapiller damarlarda ise sürekli boyanma gösterdiği ifade edilmiştir [78].

Hücre grubundaki CD 31<sup>+</sup> hücre sayısının fazla olması MKH'lerin parakrin etki göstererek endotel hücreleri üzerinde etki ettikleri şeklinde yorumlanmıştır. Yağ doku kökenli MKH'lerin fonksiyonel olarak damar stabilizasyonunu sağlayan perisitlerle benzerlik gösterdiği hatta bunlara farklılaşabildiğini gösteren bir çalışma [79] bu yorumu güçlendirmektedir. MKH'lerin mikrodamarlarla ilişki kurarak perisitler gibi endotelleri stabil durumda tuttukları bilinmektedir [79].

Dokunun yeniden organize olma süreci koagülasyon, inflamasyon, doku formasyonu ve yeniden modellenme adımlarını içerir. Bu adımlardan doku formasyonu sürecinde anjiyogenezis görülmektedir [74]. Buna bağlı olarak flep canlılığının karşılaştırıldığı gruplarda CD 31<sup>+</sup> hücre sayısının yapılması kapiller yoğunluk açısından anjiyogenezisi dokunun yeniden organize olma süreciyle yorumlamamızı sağlamıştır.

Mikrovasküler yoğunluğun CD 31 yüzey belirteci ile çalışmalarda yorumlanması [72] CD 31<sup>+</sup> hücre sayısını yapmamız gerektiğine karar vermemizi sağlamıştır. CD 31<sup>+</sup> hücre sayısının fazla olduğu grup olan hücre grubu için kapiller yoğunluk yüksek orandadır diyebiliriz. Bunun yanı sıra damarlanma süreci ile uyumlu olmasını beklediğimiz iskelet kası derecesinin hücre grubunda iyi derecede sonuç vermesi doku organizasyonunu destekler yöndedir.

Dokular, hücreleri, hücrelerarası bağlantılar ve hücrelerin birbirleri ile tutundukları ekstrasellüler matriks ortamını içeren yapılardır. Buna bağlı olarak dokularda hücreleri çekirdek, sitoplazma olarak ayırt edebilmek için ve destek doku, bağ

doku gibi hücrelerin varlığını sürdürdüğü ortamları ayırt edebilmek için histolojik boyama teknikleri kullanılmaktadır. Buna bağlı olarak çalışmamızda kullanılan histolojik boyamalar kas derecelendirilmesi gibi flep yapısının yorumlanmasını kolaylaştırmıştır.

İskelet kasındaki dejenerasyona bakıldığında bu durumun atrofi ile ilişkilendirildiği görülmektedir [80, 81]. Yapılan çalışmalarda [80] kas derecelendirilmesi açısından kullanılan ölçütler çalışmamıza uyarlanmıştır [80, 81]. Çalışmalarda kullanılan ölçütler fibrozis oluşumu, yağ doku infiltrasyonu göz önüne alınarak yapılmıştır. Kas hastalıkları ya da kasın mekanik hasarı sonucu oluşan kronik kas dejenerasyonu, atrofi, fibrozis ve daha sonraki dönemlerde oluşan yağ hücresi infiltrasyonuna bağlı olarak kas dokusu yapısındaki bozukluklar ile karakterize edilir [81]. İskelet kası hasarındaki birikimler onarım kapasitesini sınırlamaktadır [82]. Bu durum kan akımındaki bozukluklara bağlı olarak kasılma proteinlerinin ve miyofibrillerin yıkım hızının artmasına bağlı oluşan atrofi ile karakterizedir. Atrofi, kastaki rejenerasyon ve dejenerasyon dengesinin bozulmasıyla beraber kendini gösteren bir süreçtir. Atrofi sonucunda kasılma proteinlerindeki azalmaya bağlı olarak kasta fonksiyonel kayıplar meydana gelir [81].

Çalışmamızda yapılan derecelendirmede de +3 değerini alan yüksek oranda dejenere kasların görüntüsüne bakıldığında, fibrozisin ve hücre infiltrasyonunun olduğu ve bölgede yağ doku birikimin arttığı görülmektedir. Her ne kadar fibroz doku iyileşme sürecinde kas dokunun yerini doldursa da fonksiyonel olarak kas doku özelliği göstermediği için dejenerasyonda önemli bir belirteçtir. Ayrıca kapiller yoğunluk derecesi verebilen yani kan damarı yoğunluğunu yorumlayabileceğimiz CD 31+ hücre sayısının hücre grubunda fazla oranda bulunması iskelet kasının hücre grubunda daha iyi durumda bulunması ile ilişkilendirilebilmiştir. Birçok histolojik boyama kas lifi durumlarını, nekroz ve inflamasyon varlığını ortaya koymaktadır. Ayrıca yağ birikimi kaslarda patolojik durumu işaret etmektedir.

Çalışmamızda da damarın kası besleme özelliği ön plana alınarak iskelet kasındaki rejenerasyon durumu damarlanma ile ilişkilendirilmiş ve hücre grubunun kontrol ve hücre+VEGF grubuna göre iskelet kası açısından anlamlı olarak iyi durumda kasa sahip olduğu bulunmuştur. Bu veriler CD 31+ hücre sayımı ile yorumlandığında yine hücre grubunun diğer gruplara göre daha yüksek sonuç verdiği görülmüştür.

CD 31 belirtecinin sayı olarak hücre grubunda fazla çıkması iskelet kasının hücre grubunda nispeten iyi olması ve nekroz alanının hücre grubunda nispeten az olmasıyla ilişkilendirilebilir ve bu sonuç beklediğimiz durumu karşılamaktadır.

Kas dejenerasyonu açısından bakıldığında kontrol grubunu ve VEGF+hücre grubunun ( bir denek +2 değerini almıştır) tamamen +3 değerini almış olduğu görülmektedir ve bu iki grup CD 31 açısından da hücre grubuna göre daha düşük oranda sayıma sahiptir. Ayrıca yağ doku infiltrasyonu açısından bakıldığında hücre+VEGF grubunun kontrol grubuna göre daha fazla yağ doku infiltrasyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum zaten nekrozun yoğun olarak görüldüğü ve CD 31+ hücre sayımının nispeten az olduğu VEGF+hücre grubunda beklenen bir durum olarak yorumlanmıştır.

Kıl kökü sayımı açısından bakıldığında hücre grubundaki sağlıklı kıl kökü sayısı kontrol grubuna ve hücre+VEGF grubuna göre iskelet kasında olduğu gibi anlamlı derecede farklı çıkmıştır. Bu durum da hücre grubundaki diğer verilerle uyum göstermektedir.

İskelet kası ve kıl kökü bakımından diğer gruplardan anlamlı derecede farklılık gösteren hücre grubunun verileri, CD 31+ hücre sayımı açısından diğer gruplara oranla yüksek ortalama göstermesiyle desteklenmiştir.

İnsan vücudunda hasar görmüş damarların tedavisinde klasik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda MKH'ler bir kaynak olarak görülmektedir. MKH'ler salgıladıkları faktörler sayesinde anjiyogenezis sürecinde rol oynar. Burada en önemli nokta, MKH'lerin doku hasarına ve ihtiyaca göre cevap oluşturmasıdır. Bu durum iyileşme süreci için tam da istenen bir husustur. Bu nedenle ekzojen olarak eklenen, faktörlere ihtiyaç kalmaksızın tek başına MKH'ler dokunun iyileşmesi sırasında sürece katkı sağlayabileceklerdir. Güvenilirliği, kolay elde edilebilirliği ve etkinliği yağ dokusu MKH'lerin klinik olarak kullanılabilirliğini de mümkün kılmaktadır. Bu nedenle, MKH'ler hücresel tedaviler için çok iyi bir kaynak olarak görülmektedir. Çeşitli klinik uygulamaları olmasına rağmen, bu konuda düzenlenen toplantılarda araştırmacıların sonuç olarak vardığı nokta, daha fazla çalışmaların yapılması gerektiğidir. MKH'lerin moleküler düzeyde özelliklerinin daha iyi bilinmesi ortam koşullarına göre verdikleri cevapların tespit edilmesi ve güvenilir işaretleyici moleküller ile işaretlenip canlı vücudunda görüntülenebilmesi gelecekte bu hücrelerin çok daha güvenle kullanılabilmesine imkan sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Erbenği,T., *Histoloji 2*, 2. Baskı, Güneş Kitabevi, **1990**.
- [2] Guyton, A.,C., Hall, J., E., *Tıbbi Fizyoloji*,(Çev:Çavuşoğlu,H., Yeğen, B.,Ç.), Nobel Tıp Kitabevi, 11. Basım. **2007**.
- [3] Leslie P. Gartner, James L. Hiatt, *Renkli Histoloji Atlası*, (Çev: Atilla Dağdeviren, Sevda Müftüoğlu, Gülten Karabay), Güneş Kitabevleri, **2009**.
- [4] Uzm. Dr. Vedat Çimen, *Fizyoloji-Histoloji- Embriyoloji*, Özkan Matbaacılık, 2008.
- [5] William F. Ganong, Tıbbi Fizyoloji, (Çev: Türk Fizyolojik Birimler Derneği), Barış Kitabevi, **1996**.
- [6] Seçkin, İ., Ertürkoğlu, A.Ş., *Özel Histoloji Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, **2008**.
- [7] Olgar,Ş., Yetgin, S., Anjiyogenezis, *Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Dergisi* 46, 139-147,**2003**.
- [8] Tekeli,S.,Ö., Emerk, K., Endotel Progenitör Hücreler. *Marmara Medical Journal*, 20 (1), 59-65, **2007**.
- [9] Conway, E.,M., Collen,D., Carmeliet,P., Molecular Mechanism Of Blood Vessel Growth, *Cardiovascular Research*, 49, 507-521, **2001**.
- [10] Aktaş, A.,S., *Kemoterapinin Kolon Kanseri, Meme Kanseri Ve Mide Kanserinde Vegf Düzeylerine Etkisinin İn Vivo Ve İn Vitro İncelemesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [11] Zilla, P., Greisler, H.,P., *Tissue Engineering Intelligence Unit 1*, **1999**.
- [12] Carmeliet, P., Mechanism Of Angiogenesis And Arteriogenesis, *Nature Medicine*, 386, 671-674, **1997**.
- [13] Carmeliet, P., Jain, R.K., Molecular Mechanism And Clinical Applicatons Of Angiogenesis, *Nature*, 473, 298-307, **2011**.
- [14] Hasan, J., Shnyder, S.D., Bibby, M., Quantative Angiogenesis Asssays İn Vivo- A Rewiev, *Angiogenesis*, 7, 1-16, **2004**.
- [15] Pubmed, [Http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Gene/7422](http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Gene/7422), (Haziran, **2014**)
- [16] Bhisitkul, R.,B., Vasular Endothelial Growth Factor Biology: Clinical Implications Fo Ocular Treatments, *The British Journal Of Ophthalmology*, 90, 1542-1547, **2006**.

- [17] Erol,N., Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Ve Anti-Vegf Ajanlar, *Retina-Vitreus*, 15, 35-40, **2007**.
- [18] Yazır,Y., Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf): Reseptörleri Ve Fonksiyonları, *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 29 (3), 128-136, **2007**.
- [19] Byrne, A.M., Angiogenic And Cell Survival Functions Of Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf), *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 9, 777-794, **2005**.
- [20] Ferrara, N., Gerber, H., Lecouter,J., The Biology Of Vegf And Its Receptors, *Nature*, 9, 669-676, **2003**.
- [21] Xie,K.,Wei,D.,Shi,Q., Huang,S., Constitutive And Inducible Expression And Regulation Of Vascular Endothelial Growth Factor, *Cytokine&Growth Factor Reviews*,15, 297-324, **2004**.
- [22] Türk İstatistik Kurumu, <http://www.tuik.gov.tr/PrehaberBultenleri.do?id=16162> (Nisan, **2014**).
- [23] Lai, W., Ho, J.C.,Y., Chan, Y., Attenuation Of Hind-Limb Ischemia In Mice With Endothelial-Like Cells Derived From Different Sources Of Human Stem Cells, **2013**, *Journal Pone*, <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0057876>
- [24] A. Yüksel Bozer, İ.İlhan Günay, *Damar Hastalıkları Ve Cerrahisi*, H.Ü. Yayınları, **1984**.
- [25] Kumral, E., *Yüksek Vasküler Risk*, Güneş Tıp Kitabevleri, **2007**.
- [26] Callow, A., Ryan, U., *Vascular Endothelium Physiological Basis Of Clinical Problems II*, Nato Ası Series, **1992**.
- [27] Türk Kalp Damar Cerrahisi Derneği, *Periferik Arter Ve Ven Hastalıkları Tedavi Kılavuzu*, **2008**.
- [28] İskemik Periferik Arter Hastalığı: Bir Tarama Çalışması, *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi*, **2012**.
- [29] Goto, T., Fukuyama,N., Akı, A., Search For Appropriate Experimental Methods To Create Stable Hind-Limb Ischemia In Mouse, *Tokai Journal Experimental Clinical Medicine*, 31, 118-122, **2006**.
- [30] Nakagami, H., Morishita, R, Maeda, K., Adipose Tissue-Derived Stromal Cells As A Novel Option For Regenerative Cell Therapy, *Journal Of Atherosclerosis And Trombosis*, 13, 77-81, **2006**.

- [31] Babuccu, O., Peksoy, I., Hosnuter, M., Evaluation By Scintigraphy Of Hindlimb Ischemia In A Rat Model, *Journal Of Reconstructive Microsurgery*, 20,405-410, **2004**.
- [32] Moon, H.,M., Kim, Y., S., Kim, Y.,J., Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Postnatal Neovascularization In A Mouse Model Of Hindlimb Ischemia, *Cell Physiology Biochemistry*, 17, 279-290, **2006**.
- [33] Miranville, A., Heeschen, C., Sengenoz, C., Improvement Of Postnatal Neovascularization By Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells, *Journal Of The American Heart Association*, 110,349-355, **2004**.
- [34] Couffinhal,T., Silver,M., Zheng, L.,P., Mouse Model Of Angiogenesis, *American Journal Of Pathology*, 152, 1667-1679, **1998**.
- [35] Crawford S., R., Hashmi, F.,F., Jones, J.,E., A Novel Model Of Acute Murine Hindlimb Ischemia, *American Journal Physiology Heart Circ Physiology*, 292, H830-837, **2007**.
- [36] Brenes, R.,A., Jadowiec, C.,C., Bear, M., Toward A Mouse Model Of Hindlimb Ischemia To Test Therapeutic Angiogenesis, *Journal Vascular Surgery*, 56 (6), 1669-1679, **2012**.
- [37] Westerweel, P.E., Rookmaaker, M.B., Zonneveld, A., A Study Of Neovascularization In The Rat Ischemic Hindlimb Using Araldite Casting And Spalteholtz Tissue Clearing, *Cardiovascular Pathology*, 14, 294-297, **2005**.
- [38] Limbourg, A., Korff, T., Napp, L.,C., Evaluation Of Postnatal Arteriogenesis And Angiogenesis In A Mouse Model Of Hind-Limb Ischemia, *Nature Protocols*, **2009**, <http://www.nature.com/nprot/journal/v4/n12/full/nprot.2009.185.html>
- [39] Tüba Kök Hücre Çalışma Grubu, *Kök Hücre Biyolojisi Ve Klinik Uygulamalar, Türk Bilimler Akademisi Raporları*, **2009**.
- [40] Beksaç, M., Çörtoğlu, S., Kansu, E., *Kök Hücre Araştırmalarında Güncel Kavramlar, Türk Bilimler Akademisi Raporları*, **2005**.
- [41] Kolios, G., Moodley,Y., Introduction To Stem Cells And Regenerative Medicine, *Respiration*, 85, 3-10, **2013**.
- [42] Lu, F., Mizuno, H., Uysal, C., A., Improved Viability Of Random Pattern Skin Flaps Through The Use Of Adipose-Derived Stem Cells, *Plastic Reconstructive Surgery*, 121, 50-58, **2008**.
- [43] Baer, P.,C., Geiger,H., Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cell: Tissue Localization, Characterization, And Heterogeneity, *Stem Cells International*, 2012, 812693, **2012**.



- [44] Orbay, H., Tobita, M., Mizuno, H., Mesenchymal Stem Cells Isolated From Adipose And Other Tissues: Basic Biological Properties And Clinical Applications, *Stem Cell International*, 461718, **2012**.
- [45] Türk Hematoloji Derneği Eğitim Çalışmalarından, *Mezenşimal Kök Hücre Kursu Kurs Kitabı*, [www.Thd.Org.Tr](http://www.Thd.Org.Tr), Ekim, **2008**.
- [46] Dominici, M., Blanc, K.,L., Mueller, I., Minimal Criteria For Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society For Cellular Therapy Position Statement, *Cytotherapy*, 8, 315-317, **2006**.
- [47] Hoch, A.,I., Binder, B.,Y., Genetos, D., C., Differentiation-Dependent Secretion Of Proangiogenic Factors By Mesenchymal Stem Cells, *Journal Pone*, **2012**, [Http://Www.Plosone.Org/Article/Info%3adoi%2f10.1371%2fjournal.Pone.0035579](http://www.Plosone.Org/Article/Info%3adoi%2f10.1371%2fjournal.Pone.0035579).
- [48] Nakanishi, C., Nagaya, N., Ohnishi, S., Gene And Protein Expression Analysis Of Mesenchymal Stem Cells Derived From Rat Adipose Tissue And Bone Marrow, *Circulation Journal*, 75, 2260-2268, **2011**.
- [49] Blaber, S.,P., Webster, R.,A., Hill, C., J., Analysis Of In Vitro Secretion Profiles From Adipose-Derived Cell Populations, *Journal Of Translational Medicine*, **2012**, [Http://Www.Translational-Medicine.Com/Content/10/1/172](http://www.Translational-Medicine.Com/Content/10/1/172)
- [50] Augello, A., Kurth, T.B., Bar, C.D., Mesenchymal Stem Cells: A Perspective From In Vitro Cultures To In Vivo Migration And Niches, *European Cells And Materials*, 20, 121-133, **2010**.
- [51] Caplan, A.,I., Dennis, J.,E., Mesenchymal Stem Cells As Trophic Mediators, *Journal Cell Biochemistry*, 98, 1076-1084, **2006**.
- [52] Baek, S., J., Kang, S.,K., Ra. J.,C., In Vitro Migration Capacity Of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Reflects Their Expression Of Receptors For Chemokines And Growth Factors, *Experimental And Molecular Medicine*, 43, 596-603, **2011**.
- [53] Mizuno, H., Adipose- Derived Stem Cells For Tissue Repair And Regeneration: Ten Years Of Research And A Literature Review, *Journal Nippon Medical School*, 76 (2), 56-66, **2009**.
- [54] Karaoz, E., Okcu, A., Ünal, Z., S., Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Efficiently Differentiate Into Insulin-Producing Cells In Pancreatic Islet Microenvironment Both In Vitro And In Vivo, *Cytotherapy*, 0, 1-14, **2013**.
- [55] Leng, X., Zhang, Q., Zhai, X., Local Transplant Of Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells Improves Skin Flap Survival In A Mouse Model, *Tohoku Journal Experimental Medicine*, 227, 191-197, **2012**.
- [56] Kerem, H., Akdemir, O., Ates, U., The Effect Of Melatonin On A Dorsal Skin Flap Model, *Journal Of Investigative Surgery*, 27(2), 57-64, **2014**.

- [57] Uysal, C.,A., Ogawa, R., Lu, F., Effect Of Mesenchymal Stem Cells On Skin Graft To Flap Prefabrication, *Transplantation Surgery And Research*, 65, 237-244, **2010**.
- [58] Kondo, T., Ishida, Y., Molecular Pathology Of Wound Healing, *Forensic Science International*, 203, 93-98, **2010**.
- [59] Anne M. Hocking, Mesenchymal Stem Cell Therapy For Cutaneous Wounds, *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 1(4), 166–171, **2012**.
- [60] Camargo, C., P., Margarido, N., F., Guendelini, E., Description Of New Experimental Model Skin Flap For Studying Skin Viability In Rats, *Acta Cirurgica Brasileira*, 29 (3), 167-171, **2014**.
- [61] Polak, J., M., Noorden, S.,V., *Introduction To Immunocytochemistry*, Second Edition, **1997**.
- [62] Ghajar, C.,M., George,S.,C., Putnam, A.,J., Matrix Metalloproteinase Control Of Capillary Morphogenesis, *Critical Reviews Eukaryot Gene Expression*, 18 (3), 251-278, **2008**.
- [63] Yi, C., Xia, W., Zheng, Y., Transplantation Of Endothelial Progenitor Cells Transferred By Vascular Endothelial Growth Factor Gene For Vascular Regeneration Of Ischemic Flaps, *Journal Of Surgical Research*, 135, 100-106, **2005**.
- [64] Benjamin, L.E., Hemo, I., Keshet, E., A Plasticity Window For Blood Vessel Remodeling Is Defined By Pericyte Coverage Of The Preformed Endothelial Network And Is Regulated By Pdgf-B And Vegf, *Development*, 125, 1591-1598, **1998**.
- [65] Gale, N., W., Yancopoulos, G.,D., Growth Factors Acting Via Endothelial Cell-Specific Receptor Tyrosine Kinases: Vegfs, Angiopoietins, And Ephrins In Vascular Development, *Genes&Development*, 13,1055-1066, **1999**.
- [66] Peters, G., K., Vascular Endothelial Growth Factor And The Angiopoietins: Working Together To Build Better Blood Vessel, *Circulation Research*, 83,342-343,**1998**.
- [67] Rafii, S., Lyden, D., Therapeutic Stem And Progenitor Cell Transplantation For Organ Vascularization And Regeneration, *Nature Medicine*, 9, 702-712, **2003**.
- [68] Ghajar,C., M., Ghajar, M.S., Blevins, K., S., Mesenchymal Stem Cells Enhance Angiogenesis In Mechanically Viable Prevascularized Tissues Via Early Matrix Metalloproteinase Upregulation, *Tissue Engineering*, 12, 2875-2887, **2006**.
- [69] Laschke, M.,W., Menger, M., D., Vascularization In Tissue Engineering: Angiogenesis Versus Inosculation, *European Surgical Research*, 48, 85-92, **2012**.

[70] Angelos, P.,C., Winn, S.,R., Kaurin, D.S., Evaluating Revascularization And Flap Survival Using Vascular Endothelial Growth Factor In A Irradiated Rat Model, *Archives Facial Plastic Surgery*, 13(3), 185-189, **2011**.

[71] Schlosser,S., Dennler, C., Schweizer, R., Paracrine Effects Of Mesenchymal Stem Cells Enhance Vascular Regeneration In Ischemic Murine Skin, *Microvascular Research*, 83, 267-275, **2012**.

[72] Zheng, Y., Yi, Chenggang, Xia, W., Mesenchymal Stem Cells Transduced By Vascular Endothelial Growth Factor Gene For Ischemic Random Skin Flaps, *Plastic Reconstructive Surgery*, 121,59-69, **2008**.

[73] Chavakis,E., Dimmeler, S., Regulation Of Endothelial Cell Survival And Apoptosis During Angiogenesis, *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*, 22,887-893, **2002**.

[74] Edwards, S.,S., Zavala,G., Prieto,C.,P., Functional Analysis Revealsangiogenic Potential Of Human Mesenchymal Stem Cells From Wharton's Jelly In Dermal Regeneration, *Angiogenesis*, **2014**, [Http://Link.Springer.Com/Article/10.1007%2fs10456-014-9432-7](http://Link.Springer.Com/Article/10.1007%2fs10456-014-9432-7).

[75] Ji-Chang, W., Lin, X., Xiao-Bin, S., Transplantation Of Hypoxia Preconditioned Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improves Survival Of Ultra-Long Random Skin Flap, *Chinese Medical Journal*, 124 (16), 2507-2511, **2011**.

[76] Zhang, Q., Su, W., Shi, S., Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Elicit Polarization Of M2 Macrophages And Enhance Cutaneous Wound Healing, *Stem Cells*, 28, 1856-1868, **2010**.

[77] Feng, D., Nagy, J.,A., Pyne, K., Ultrastructural Localization Of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (Pecam-1, Cd 31) In Vascular Endothelium, *Journal Of Histochemistry&Cytochemistry*, 52 (1), 87-101, **2004**.

[78] Lin, G., Garcia, M., Ning, H., Defining Stem And Progenitor Cells Within Adipose Tissue, *Stem Cells And Development*, 17, 1053-1064, **2008**.

[79] Traktuev, D.,O., Prater D.,N., Clauss, S., M., Robust Functional Vascular Network Formation In Vivo By Cooperation Of Adipose Progenitor And Endothelial Cells, *Circulation Research*, 104, 1410-1420, **2009**.

[80] Hack,A.,A., Cordier, L., Shoturma,D.,I., Muscle Degeneration Without Mechanical Injury In Sarcoglycan Deficiency, *Cell Biology*, 96, 10723–10728, **1999**

[81] Yüzbaşıoğlu, A., *Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, **2008**.

[82] Grobler, L., A., Collins, M., Lambert, M., I., Skeletal Muscle Pathology İn Endurance Athletes With Acquired Training Intolerance, *British Journal Of Sports Medicine* , 38, 697–703, **2004**.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Ekin ERGİN.  
Doğum Yeri : Ankara  
Medeni Hali : Bekar  
E-post : ekinergin@gmail.com  
Adresi : Kuzgun sok. 59/6 Aşağı Ayrancı/Çankaya- ANKARA.

### Eğitim

Lise : Ayrancı Yabancı Dil Ağırlıklı Lise  
Lisans : Hacettepe Üniversitesi  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce(B1), Almanca( A2)

### İş Deneyimi

#### Deneyim Alanları

Hücre kültürü laboratuvar teknikleri, deney hayvanları çalışma yöntemleri, histolojik boyama teknikleri

#### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

- 1- Proje Adı: Adipoz Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerinin ve Vasküler Endotheliyal Büyüme Faktörünün Rat Femoral Arter İskemi Modelinde Etkilerinin İncelenmesi, H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi, 2013, 12.600 TL.
- 2- Proje Adı: Yağ Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin Damarlanma Faktörleri Açısından İncelenmesi, H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi, 2013, 18.900 TL.

#### Tezden Üretilmiş Yayınlar

#### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

## EKLER

### EK-1

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/48

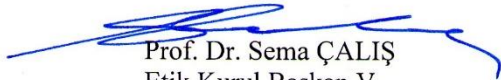
28 Şubat 2013

### HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

<b>TOPLANTI TARİHİ</b>	: 18.02.2013 (PAZARTESİ)
<b>TOPLANTI SAYISI</b>	: 2013/03
<b>DOSYA KAYIT NUMARASI</b>	: 2013/04
<b>KARAR NUMARASI</b>	: 2013/04-04
<b>ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ</b>	: Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR
<b>HAYVAN DENEYLERİNDEN</b>	
<b>SORUMLU ARAŞTIRMACI</b>	: Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR
<b>YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR</b>	: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR, Arş. Gör. E AKBAY, Bilim Uzm. Öğm. Ekin ERGİN
<b>ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve</b>	: 3 adet Rattus rattus
<b>SAYISI</b>	

Üniversitemiz Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2013/04 kayıt numaralı "*Sıçan Adipoz Kökenli Mezenşimal Kök Hücre Karakterizasyonu, İzolasyonu ve Ko-Kültürlerini: (Birlikte kültür) Hazırlanması*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

  
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkan V.

EK-2

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

Sayı: 52338575 -83

06 Haziran 2013

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI**

**TOPLANTI TARİHİ** : 28.05.2013 (SALİ)  
**TOPLANTI SAYISI** : 2013/05  
**DOSYA KAYIT NUMARASI** : 2013/22  
**KARAR NUMARASI** : 2013/22-02  
**ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ** : Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR  
**HAYVAN DENEYLERİNDEN**  
**SORUMLU ARAŞTIRMACI** : Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR  
**YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR** : Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR, Bilim Uzm. Öğr. Ekin ERGİN  
**ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI** : 40 adet Wistar Albino rat (dişi)

Üniversitemiz Fen Fakültesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Özer Aylin GÜRPINAR'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2013/22 kayıt numaralı "*Rat Yağ Dokusunda İzole Edilen Mezenşimal Kök Hücrelerin Femoral Arter Nekroz Modelinde Damar Rejenerasyonuna Etkisinin İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

  
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Başkan

### **EK-3**

Hematoksilen&Eozin Boyama Hazırlığı:

Hematoksilen İçin Maddeler:

- 1- Hematoksilen kristali: 7.5 g.
- 2- %100'lük alkol 75 cc.
- 3- Amonyum veya potasyum olum 150 g.
- 4- Distile su 1500cc
- 5- Merkuri oksit 7.5 g.

Hematoksilen Hazırlanışı:

- 1- Hematoksilen alkolde kaynatılarak eritilir.
- 2- Amonyum veya potasyum olumda suda kaynatılarak eritilir.
- 3- Bu iki çözelti sıcakken birbirine karıştırılır. Hemen tekrar kaynatılır. Sıcakken ateş üzerinden alınır.
- 4- Yavaş yavaş merkuri oksit eklenir.
- 5- Çözelti koyu menekşe rengini alır almaz soğutulur.

Eozin İçin Maddeler:

- 1- Eozin (suda eriyen)
- 2- Distile Su
- 3- %95'lik alkol 125 cc
- 4- Distile su 375 cc
- 5- CH<sub>3</sub>COOH 2 damla

Eozin Hazırlanışı:

- 1- 3 g. eozin 100cc distile suda eritilir.
- 2- Bu karışıma 120 cc. %95'lik alkol eklenir.
- 3- 375 cc distile suda eklendikten sonra 2 damla CH<sub>3</sub>COOH damlatılır.



## EK-4

Masson's Trichome Boya Hazırlığı:

Bouin Solusyonu: Pikrik asit 75 cc

%30-40 formaldehit 25 cc

Glasiyal CH<sub>3</sub>COOH 5 cc

Trichome Boyası: Chromotrope 2R 0.6 g.

Light Green 0.3 g.

Glasiyal CH<sub>3</sub>COOH 1 cc

Fosfotunguistik asit 0.8 g.

Distile su 100 cc

Asetik Asit Solusyonu: 100 cc H<sub>2</sub>O'ya 5 cc CH<sub>3</sub>COOH

Asit Alkol Hazırlamak İçin: 1000 cc %70 alkol

10 cc HCl

Amonyaklı Su: Bir miktar distile su ile birkaç damla NH<sub>3</sub> karıştırılır.