T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

FARE KUYRUĞUNDA OLUŞTURULAN SEKONDER LENFÖDEM MODELİNDE EMBRİYONİK KÖK HÜCRE VE KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN LENFANJİYOGENEZ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. HASAN GÜÇ

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Cenk Demirdöver

İZMİR-2014

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından

Proje no: 2013.KB. SAG.051, talep no: 201311 ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. ÖZET	**1**
2. İNGİLİZCE ÖZET	**3**
3. GİRİŞ VE AMAÇ	**5**
4. GENEL BİLGİLER	**9**
4.1. LENFATİK SİSTEM	**9**
4.1.1. Yapısal Elementler	**9**
4.1.2. Lenfatik Vasküler Sistem	**9**
4.1.3. Lenf Nodları ve Lenfatik Bölgeler	**14**
4.1.4. Lenf Sisteminin Fizyolojisi	**15**
4.1.4.1. Mikrosirkülasyonun Temel Prensipleri	**18**
4.1.4.2. İnterstisyum Ve İnterstisyel Akım	**18**
4.2. LENFANJİOGENEZİS	**19**
4.2.1. Lenfatik Sistem Gelişimi	**20**
4.2.2. Lenfatik Endotel Hücre Belirteçleri	**22**
4.2.2.1. VEGF	**22**
4.2.2.2. VEGF Reseptörleri ve benzeri reseptörler	**27**
4.2.2.3. Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF)	**31**
4.2.2.4. Kollajen-1	**32**
4.2.2.5. Desmoplakin	**32**
4.2.2.6. Podoplanin	**33**
4.2.2.7. Prospero-related homeobox 1 (Prox-1)	**33**
4.2.2.8. LYVE-1	**34**
4.2.2.9. Kemokin CCL21	**39**
4.3. LENFÖDEM	**40**
4.3.1. Lenfödemin Tanımı	**40**
4.3.2. Lenfödem Sınıflaması	**40**
4.3.2.1. Klinik Sınıflama	**40**
4.3.2.2. Etiyolojik Sınıflama	**42**
4.3.3. Lenfödem Gelişiminde Risk Faktörleri	**45**
4.3.4. Lenfödem İnsidansı	**46**

4.3.5. Lenfödemde Tanı ve Değerlendirme **47**
4.3.6. Lenfödemde Tedavi Yöntemleri **51**
4.3.6.1. Lenfödemde Fizik Tedavi **51**
4.3.6.2. Lenfödemde Medikal Tedavi **54**
4.3.6.3. Lenfödemde Cerrahi Tedavi **54**
4.3.7. Lenfödem Komplikasyonları **60**
4.4. KÖK HÜCRELER **60**
4.4.1. Kök Hücre Çeşitleri ve Kaynakları **63**
4.4.2. Embriyonik Kök Hücreler **64**
4.4.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü ve Farklılaşması **68**
4.4.3. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler **70**
4.4.3.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) **75**
4.4.3.1.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları **77**
4.4.3.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve Farklılaşması **78**
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER **84**
5.1. CERRAHİ İŞLEMLER **84**
5.1.1. Sekonder Lenfödem Modelinin Oluşturulması **84**
5.1.2. Kök Hücre, Vasat ve Serum Fizyolojik Enjeksiyonları **86**
5.2. GRUPLAR **88**
5.2.1. Grup 1 **88**
5.2.2. Grup 2 **89**
5.2.3. Grup 3 **90**
5.2.4. Grup 4 **91**
5.2.5. Grup 5 **93**
5.3. EMBRİYONİK KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ **94**
5.3.1. Jelatin kaplı kapların hazırlanması ve STO hücrelerinin kültürü **94**
5.3.2. Embriyonik Kök Hücre Kültürü **95**
5.4. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ **97**
5.4.1. Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Kültürü **97**
5.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Brd-U İle İşaretlenmesi **99**
5.4.3. Hücrelerin Farklılaştırılması **99**
5.4.4. Hücre Farklılaştırılmasının Değerlendirilmesi **100**
5.5. DEĞERLENDİRME **101**

5.5.1. Sakrifikasyon Protokolü **101**
5.5.2. Lenfödem Gelişiminin Değerlendirilmesi **101**
5.5.3. Histomorfolojik Analiz **104**
5.5.3.1. Mezenkimal ve Embriyonik kök hücrelerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile İncelenmesi **104**
5.5.3.2. Işık Mikroskobik İnceleme **105**
5.5.3.3. Parafin Doku Takibi **105**
5.5.3.4. Hematoksilen-Eozin Boyaması **106**
5.5.3.5. İndirekt İmmunoperoksidaz Yöntemi **107**
5.5.4. İstatistiksel Analiz **107**
6. BULGULAR **108**
6.1. Kuyruk Çap Ölçümleri **108**
6.1.1. Kuyruk Çap Ölçümlerinin Gruplar içi Dağılım **108**
6.1.1.1. Grup 1 **108**
6.1.1.2. Grup 2 **109**
6.1.1.3. Grup 3 **110**
6.1.1.4. Grup 4 **111**
6.1.1.5. Grup 5 **112**
6.1.2. Gruplararası Çap Değerlendirmesi **114**
6.2. Histolojik Bulgular **121**
6.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları **121**
6.2.2. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları **124**
6.2.2.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Dağılımı **126**
6.2.2.2. Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2) Dağılımı **129**
6.2.2.3. Lyve-1 Dağılımı **132**
6.2.2.4. Prox Dağılımı **135**
6.2.2.5. İmmunohistokimyasal Sonuçların Genel Değerlendirilme **137**
7. TARTIŞMA **140**
8. SONUÇ ve ÖNERİLER **149**
9. KAYNAKLAR **151**

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Lenf damarlarının farklı bölümlerinin katmanları

Şekil 2: Lenfatik damar organizasyonu

Şekil 3: Kapak segmentinin yapısı ve fonksiyonu

Şekil 4: Lenfatik sistem anatomisi

Şekil 5: Lenf nodu anatomisi

Şekil 6: Lenfatik damar sistemi

Şekil 7: Lenf Kapillerinden Emilen Sıvı

Şekil 8: Lenf nodlarının lenfatik sistemde yerleşimi

Şekil 9: Lenfatik Endotelyal Hücre

Şekil 10: Lenfatik Damar Gelişimi

Şekil 11: VEGF ailesi ve reseptörleri

Şekil 12: VEGF'in transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzenlenmesi

Şekil 13: VEGF-B'nin proanjiyojenik etkileri

Şekil 14: VEGF ailesinin bağlandığı tirozin kinaz reseptörleri

Şekil 15: Nörofilin 1 ve 2 reseptörleri

Şekil 16: Lenfatik spesifik belirteçler

Şekil 17: Lenfatik damar embriyolojisi

Şekil 18: LYVE-1 moleküler yapısı

Şekil 19: Lenfatik endotel ve tümör hücresi üzerinde LYVE-1 ekspresyonu

Şekil 20: Gode Testi

Şekil 21: Charles Prosedürü, eksizyon + kısmi kalınlıkta deri grefti ile onarım

Şekil 22: Modifiye Homans Prosedürü

Şekil 23: Thompson ve Sistrunk Prosedürü

Şekil 24: Lenfatik greftleme ve transpozisyonu

Şekil 25: Kök Hücre tipleri ve farklılaşabildikleri hücreler

Şekil 26: Kök Hücre Kaynakları

Şekil 27: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve pluripotensi

Şekil 28: Pre ve post implantasyon dönemindeki embriyo gelişimi ve farklılaşan yapılar

Şekil 29: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve kültürü

Şekil 30: Bazı erişkin kök hücreler ve vücutta bulundukları yerler

Şekil 31: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri

Şekil 32: Hematopoietik kök hücre serisi

Şekil 33: Fare Kuyruğunun Lenfatik Modeli

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: Lenfatik ve kan damarı belirteçleri

Tablo-2: Lenfödem gelişimindeki risk faktörleri

Tablo-3: Fare ve insanlarda en iyi tanımlanan embriyonik kök hücre göstergeleri

Tablo-4: SF grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Tablo-5: EKHV grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Tablo-6: MKHV grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Tablo-7: EKH grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Tablo-8: MKH grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Tablo-9: Parafin Doku Takibi

Tablo-10: Hematoksilen-Eozin Boyama Takibi

Tablo-11: SF grubunun günlük kuyruk çap ölçümleri

Tablo-12: EKHV grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Tablo-13: MKHV grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Tablo-14: EKH grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Tablo-15: MKH grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Tablo-16: Tüm gruplara ait minimum, maksimum ve medyan kuyruk çap ölçümlerinin günlük dağılımı

Tablo-17: Grup içi kuyruk çap değişimi yüzdesi

Tablo-18: MKH ile EKH Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Tablo-19: EKH ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Tablo-20: MKH ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Tablo-21: MKHV ile EKHV Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Tablo-22: EKHV ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Tablo-23: MKHV ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Tablo-24: Gruplara göre kuyruk çapındaki minimum, maksimum ve medyan düşme miktarı (mm)

Tablo-25: Grupların belirteçlere göre histolojik boyanma paternlerinin derecelendirilmesi

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Lenfödemin klinik evrelemesi
Resim 2: Konjenital lenfödem tanılı hasta
Resim 3: Stemmer bulgusu ve gode bırakan ödem
Resim 4: Kompresyon bandajı ve kompresyon çorabı
Resim 5: Aralıklı pnömatik kompresyon cihazının kullanımı
Resim 6: Lenfatikovenöz anastomoz
Resim 7: Mezenkimal kök hücre farklılaşma potansiyeli
Resim 8: Adipojenik farklılaşma
Resim 9: Osteojenik farklılaşma
Resim 10: Kondrojenik farklılaşma
Resim 11: Kuyrukta sekonder lenfödem modelinin oluşturulması
Resim 12: Dijital mikrometre
Resim 13: Embriyonik kök hücre transportu ve embriyonik kök hücre enjeksiyonu
Resim 14: Mezenkimal kök hücre transportu ve Mezenkimal kök hücre enjeksiyonu
Resim-15: Embriyonik ve Mezenkimal Kök Hücre Vasatları
Resim-16: Kültür için feeder layer tabakası olarak kullanılan STO fibroblast hücreleri
Resim-17: STO hücreleri kültüre edildikten sonra konfluent olmaları sağlandı
Resim-18: STO üzerinde ok ile gösterilen embriyonik kök hücreler (A) ve daire içine alınmış embriyonik kök hücre kolonisi (B)
Resim-19: Hanging drop tekniği ve embriyonik cisim eldesi
Resim-20: Embriyonik cisim ve farklılaşan hücreler (A), Farklılaşma vasatı içinde hücreler (B)
Resim-21: Mezenkimal kök hücre eldesi ve kültürü: Erişkin erkek fareden uzun kemiklerin diseksiyonu (A), Uzun kemiklerden mezenkimal kök hücrelerin yıkama yöntemi ile eldesi (B)
Resim-22: Elde dilen mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırma yapmadan kültürleri (A), Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırma ortamına alındıktan 15 gün sonraki kültürü (B)
Resim-23: Kültüre edilen embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerin LYVE-1 ve Prox immunoreaktivitesi
Resim-24: Kuyruk çap değişimi: Cerrahi öncesi görünüm (A), Cerrahinin 5. günü görünüm (B), Cerrahinin 15. günü görünüm (C)
Resim-25: 3. gün kuyruk HE boyama kesitleri
Resim-26: 5. gün kuyruk HE boyama kesitleri

Resim-27: 7. gün kuyruk HE boyama kesitleri
Resim-28: 21. gün kuyruk HE boyama kesitleri
Resim-29: Cerrahi modelin 5. gününde HE boyama kesiti, yoğun PNL infiltrasyonu ve ödeme ait yer yer boşluklar görülmekte
Resim-30: Embriyonik kök hücre grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri
Resim-31: Embriyonik kök hücre vasat grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri
Resim-32: Mezenkimal kök hücre grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri
Resim-33: Mezenkimal kök hücre vasat grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri
Resim-34: Serum fizyolojik kontrol grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri
Resim-35: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi
Resim-36: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi
Resim-37: Mezenkimal kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi
Resim-38: Mezenkimal kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi
Resim-39: Serum fizyolojik kontrol grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi
Resim-40: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi
Resim-41: Embriyonik kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi
Resim-42: Mezenkimal kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi
Resim-43: Mezenkimal kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi
Resim-44: Serum fizyolojik kontrol grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi
Resim-45: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi
Resim-46: Embriyonik kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi
Resim-47: Mezenkimal kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi
Resim-48: Mezenkimal kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi
Resim-49: Serum fizyolojik kontrol grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi
Resim-50: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde Prox immunoreaktivitesi
Resim-51: Embriyonik kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde Prox immunoreaktivitesi
Resim-52: Mezenkimal kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde Prox immunoreaktivitesi
Resim-53: Mezenkimal kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde Prox immunoreaktivitesi
Resim-54: Serum fizyolojik kontrol grubu kuyruk kesitlerinde Prox immunoreaktivitesi

GRAFİK LİSTESİ

Grafik-1: SF grubu deney modeli özeti
Grafik-2: EKHV grubu deney modeli özeti
Grafik-3: MKHV grubu deney modeli özeti
Grafik-4: EKH grubu deney modeli özeti
Grafik-5: MKH grubu deney modeli özeti
Grafik-6: Grup içi kuyruk çap değişimi yüzdesi
Grafik-7: MKH ile EKH grubunun çap değişim yüzdesi karşılaştırması
Grafik-8: EKH ile SF grubunun çap değişim yüzdesi karşılaştırması
Grafik-9: MKH ile SF grubunun çap değişim yüzdesi karşılaştırması
Grafik-10: MKHV ile EKHV grubunun çap değişim yüzdesi karşılaştırması
Grafik-11: EKHV ile SF grubunun çap değişim yüzdesi karşılaştırması
Grafik-12: MKHV ile SF grubunun çap değişim yüzdesi karşılaştırması
Grafik-13: Grupların İHK belirteçlerine göre histolojik boyanma paternlerinin derecelendirilmesi

KISALTMALAR

MALT: Mukoza İle Birleştirilmiş Lenfatik Doku (Mucosa Associated Lymphoid Tissue)

LEC: Lenfatik Endotelyal Hücre (Lymphatic Endothelial Cell)

PROX-1: Prospero İle İlgili Homeobox-1 (Prospero-Related Homeobox-1)

LYVE-1: Lenfatik Damar Endotelyal Hyaluronan Reseptörü-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor -1)

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGF-A: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A)

VEGF-B: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör-B (Vascular Endothelial Growth Factor-B)

VEGF-C: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör-C (Vascular Endothelial Growth Factor-C)

VEGFR-1: Vasküler Büyüme Faktör Reseptörü-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1)

VEGFR-2: Vasküler Büyüme Faktör Reseptörü-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2)

VEGFR-3: Vasküler Büyüme Faktör Reseptörü-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3)

CCL21: Kemokin Ligand 21 (Chemokine Ligand 21)

CCL30: Kemokin Ligand 30 (Chemokine Ligand 30)

IL-8: İnterlökin-8 (Interleukin-8)

ICAM-1: İntrasellüler Adezyon Molekülü-1(Intercellular Adhesion Molecule-1)

PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet-Derived Growth Factor)

PlGF: Plasenta Büyüme Faktörü (Placental Growth Factor)

cDNA: Bütünleyici Deoksiribonükleik Asit (Complementary Deoxyribonucleic Acid)

mRNA: Mesajcı Ribonükleik Asit (Messenger Ribonucleic Acid)

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)

KGF-7: Keratinosit Büyüme Faktörü-7 (Keratinocyte Growth Factor-7)

TNF-α: Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (Tumor Necrosis Factor-Alpha)

TGF- β1: Transforme edici Büyüme Faktörü- Beta1 (Transforming Growth Factor-Beta 1*)*

PGE_2: Prostaglandin E_2 (Prostaglandin E_2)

CO: Karbonmonoksit (Carbon Monoxide)

Flt: Fms Geni Benzeri Tirozin Kinaz-1 (Fms-Like Tyrosine Kinase-1)

Flk-1: Fetal Karaciğer Kinazı-1 (Fetal Liver Kinase-1)

PAI-1: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)

KDR: Kinaz Ek Alanı İçeren Reseptör (Kinase Insert Domain Receptor)

NRP-1: Nörofilin-1 **(**Neurophilin-1)

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü (*Fibroblast Growth Factor)*

FGFR: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü (*Fibroblast Growth Factor Receptor)*

HA: Hiyaluronik Asit (Hyaluronic Acid)

EST: Kısa cDNA Dizisi (Expressed Sequence Tag)

DVT: Derin Ven Trombozu (Deep Venous Thrombosis)

İVF-ET: İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi (In Vitro Fertilization-Embryo Transfer)

SSEA-1: Embriyonik Evre Spesifik Antijen-1 (Stage Specific Embryonic Antigen-1)

Oct4: Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü-4 (Octamer-Binding Transcription Factor-4)

Tbn: Taube Nuss (Taube Nuss)

ZP: Zona Pellusida (Zona Pellucida)

ICM: Hücre içi kitlesi (Intracellular Mass)

B: Blastosel (Blastocoel)

PrEN: Primitif Endoderm (Primitive Endoderm)

Ve: Visseral Endoderm (Visceral Endoderm)

Pe: Parietal Endoderm (Parietal Endoderm)

T: Trofoblast (Trophoblast)

Exe: Ekstraembriyonik Ektoderm (Extraembriyonic Ectoderm)

Exve: Ekstraembriyonik Visseral Endoderm (Extraembriyonic Visceral Endoderm)

A: Amniyon (Amnion)

EPC: Embriyonik Plasental Zon (Embryonic Placental Zone)

M: Mezoderm (Mesoderm)

EKH: Embriyonik Kök Hücre (Embryonic Stem Cell)

LIF: Lösemi İnhibe Edici Faktör (Leukemia Inhibitory Factor)

BMP: Kemik Morfojenik Proteini **(**Bone Morphogenic Protein)

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı **(**Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

MKH: Mezenkimal Kök Hücre (Mesenchymal Stem Cell)

HKH: Hematopoietik Kök Hücre (Haematopoietic Stem Cell)

G-CSF: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör (Granulocyte Colony-Stimulating Factor)

GM-CSF: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

M-CSF: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (Macrophage Colony-Stimulating Factor)

FCS: Fetal Buzağı Serumu (Fetal Calf Serum)

CFU-F: Fibroblast Koloni Şekillendirme Ünitesi **(**Colony Forming Unit Fibroblast)

ISCT: Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society For Cellular Therapy)

MSC: Mezenkimal Stromal Hücre (Mesenchymal Stromal Cell)

FCS/FBS: Fetal Buzağı Serumu/Fetal Sığır Serumu (Fetal Calf Serum/Fetal Bovine Serum)

DMEM-LG: Dulbecco'nun Düşük Glikozlu Modifiye Eagle Mediumu **(**Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose)

DMEM-HG: Dulbecco'nun Yüksek Glikozlu Modifiye Eagle Mediumu **(**Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose)

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)

DMSO: Dimetilsülfoksit (Dimethylsulfoxide)

IBMX: İzobütilmetilksantin (Isobutylmethylxanthine)

BHA: Bütillenmiş Hidroksianisol (Butylated Hydroxyanisole)

FSK: Forskolin (Forscolin)

VA: Valproik Asit (Valproic Acid)

KCl: Potasyum Klorür (Potassium Chloride)

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)

GFAP: Glial Fibriler Asidik Protein (Glial Fibrillary Acidic Protein)

BAP: Bilimsel Araştırma Projesi (Scientific Research Project)

BM-MNC: Kemik İliği Kaynaklı Mononükleer Hücre (Bone-Marrow Mononuclear Cell)

BM-MSC: Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell)

PECAM-1: Trombosit Endotelyal Hücre Adezyon Molekülü (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule)

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince her türlü konuda engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Can Karaca'ya;

Baba şevkatini bizlerden hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ali Barutçu'ya, özellikle mikro cerrahi eğitimimde deneyimlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Mustafa Yılmaz'a, Prof. Dr. Adnan Menderes'e ve Prof. Dr. Haluk Vayvada'ya;

Uzmanlık tezimi hazırlamamda katkı ve görüşlerini esirgemeyen ayrıca tüm cerrahi eğitimim sürecinde göstermiş olduğu sabırdan ötürü danışman hocam Sayın Doç. Dr. Cenk Demirdöver'e;

Tez projesinin hazırlanması, yapım ve değerlendirme aşamasındaki desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. H.Seda Vatansever'e

Hayatım boyunca her koşulda sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen babama, anneme ve tüm aile bireylerime;

Ve her anımı keyifle paylaştığım, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hayatıma girdiği andan beri huzurlu olmamı sağlayan sevgili eşim Dr. Zeynep Gülsüm Güç'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hasan GÜÇ

1. ÖZET

Lenfödem, lenfatik disfonksiyon sonucu proteinden zengin interstisyel sıvının deri ve subkutan doku içerisinde birikmesidir. Tüm dünyada 140-200 milyon lenfödem olgusunun var olduğu tahmin edilmektedir. Lenfödem etiyolojisine göre primer ve sekonder lenfödem şeklinde sınıflandırılır. Etiyolojisi bilinmeyen ya da konjenital lenfatik fonksiyon bozukluğu sonucu oluşan olgular primer lenfödem olarak adlandırılır. Var olan bir nedene ikincil gelişen diğer tüm olgular sekonder lenfödem olarak adlandırılır.

Sekonder lenfödem edinsel bir problemdir. Enfeksiyon, travma, cerrahi ablasyon, radyasyon, tümör, lenfoproliferatif hastalıklar ya da yaralanmaya bağlı gelişebilir ABD'de malignite ve radyoterapi en sık sekonder lenfödem sebepleridir.

Cerrahi dışı tedavi için temel stratejiler manüel lenf drenaj, ekstremite elevasyonu, kompresyon tedavisi ve lenfatik akışa yönelik egzersizlerin kombinasyonu olarak tanımlanabilir. Lenfödem tedavisinde cerrahi prosedürler genelde temel yaklaşımlardan biri değildir. Cerrahi tedavi temelde ablatif prosedürler ve fizyolojik prosedürler olarak ikiye ayrılmaktadır. Kronik lenfödem hastalarının yaşam kalitesinde önemli miktarda bozulmakta, bu hasta popülasyonu ciddi beden imge bozuklukları gözlenmektedir. Hastalar dönem dönem akut enflamatuar ataklar geçirmekte ağrı, cilt kalitesinin bozulması ve ciddi hareket kısıtlılıkları yaşamaktadırlar. Yaşam boyu düzenli bakım ve yoğun kontroller altında olmalarından dolayı ciddi tedavi maliyetleri gözlenmektedir.

Lenfanjiyogenez üzerine etkili birden fazla büyüme faktörü tanımlanmıştır, yapılan son çalışmalar bu büyüme faktörlerinin lenfatik sistemin gelişiminde anahtar rol oynayarak düzenleyici görevi üstlendiğini göstermiştir. Hastalıkların patogenezlerinin daha ayrıntılı anlaşılması, hücresel düzeyde birçok reseptör ve molekül tanımlanmasıyla birlikte tedavi yöntemleri de moleküler hedeflere yönelik geliştirilmeye başlamıştır. Böylelikle lenfanjiyogenez, lenfödem için umut verici tedavi yöntemi olarak gündeme gelmiştir ve lenfatik büyüme faktörleri ile ilgili araştırmalar artış göstermiştir. Bu sitokinler vasküler endotelyal büyüme faktörü-C (VEGF-C) ve D, hepatosit büyüme faktörü (HGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF-2), adrenomedullin ve anjiyopoetin-1 ve -2'yi içerir. Ancak sitokinlerin etkinliğinin kısa süreli olduğu bilinmektedir.

Yüksek bir prevalansta görülen ve ciddi morbiditeye neden olan lenfödem tedavisinde yeni modalitelere ihtiyaç duyulmaktadır. Lenfanjiyogenez lenfödem için umut verici tedavi yöntemi olarak gündeme gelmiştir. Bu çalışmada fare kuyruğunda sekonder lenfödem modeli

oluşturularak tedavide lenfanjiyogenezin etkisinin araştırıldı. Bu amaçla farklı gruplara diferansiye edilmiş embriyonik kök hücre, diferansiye edilmiş kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, embriyonik kök hücre vasatı, mezenkimal kök hücre vasatı ve serum fizyolojik tedavileri verilerek lenfanjiyogenez üzerine olan etkileri gözlemlendi.

Çalışmada 50 adet 28-35 gram ağırlığında Bulb-C suşu kullanıldı, farelerin kuyruğunda sekonder lenfödem modeli oluşturulmasının ardından her grupta dokuz fare olmak üzere fareler toplam beş gruba ayrıldı. Postoperatif beşinci gün birinci gruba diferansiye edilmiş embriyonik kök hücre, ikinci gruba diferansiye edilmiş kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, üçüncü gruba embriyonik kök hücre vasatı, dördüncü gruba mezenkimal kök hücre vasatı ve kontrol grubuna %0,9 NaCI verildi. Farelerin günlük olarak kuyruk çap ölçümleri yapıldı ve 15. günde sakrifiye edildi. Kuyruktaki lenfanjiyogenez gelişimi ve lenfödemin durumu histolojik olarak HE ve immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. İmmunohistokimyasal belirteç olarak VEGF, FGF-2, LYVE-1 ve Prox kullanıldı.

Makroskobik sonuçlar gözden geçirildiğinde embriyonik ve mezenkimal kök hücre verilen gruplarda diğer üç gruba oranla belirgin olarak kuyruk çaplarında küçülme ile lenfödem miktarında azalma saptandı ve istatistiksel olarak yapılan değerlendirmede bu değişim anlamlı bulundu.

Histolojik olarak yapılan değerlendirmede VEGF, FGF-2, LYVE-1 ve Prox immunohistokimyasal belirteç olarak kullanılarak tedavilerin lenfanjiyogenez üzerindeki etkileri karşılaştırıldı. Embriyonik kök hücre grubunda serum fizyolojik kontrol grubu ve vasat gruplarına göre belirgin derecede lenfanjiyogenezin tetiklendiği görüldü. Mezenkimal kök hücre grubunda da serum fizyolojik kontrol grubu ve vasat gruplarına göre lenfanjiyogenezi gösteren histolojik belirteçlerin artmış ekspresyonları saptandı. Bununla beraber farklı kök hücre kaynaklarından elde edilmiş olan embriyonik ve mezenkimal kök hücre grupları arasında tedavi etkinliği açısından farklılık gözlenmedi. Sonuç olarak diferansiye edilmiş embriyonik ve mezenkimal kök hücrenin lenfödem tedavisinde başarıyla kullanılabileceği hayvan modelinde gösterildi.

2. İNGİLİZCE ÖZET

Lymphedema is an accumulation of the protein-rich interstitial fluid in the skin and subcutaneous tissue as a result of lymphatic dysfunction. All over the world, 140 to 200 million cases of lymphedema is estimated to exist. Lymphedema is classified as primary and secondary lymphedema by etiology. The cases which has unknown etiology or results from congenital lymphatic dysfunction are called primary lymphedema. All other cases secondary to an existing cause are called secondary lymphedema.

Secondary lymphedema is an acquired problem. It may be due to infection, trauma, surgical ablation, radiation, tumor, lymphoproliferative disease or injury. Malignancy and radiotherapy are the most common cause of secondary lymphedema in the USA.

Basic strategies for non-surgical treatment can be defined as a manual lymph drainage, limb elevation, compression therapy and combination of exercises for lymphatic flow. Surgical procedures in the treatment of lymphedema are not usually one of the main approaches. Surgical treatments are basically divided into two sections as ablative procedures and physiological procedures. Life quality of the patients with chronic lymphedema deteriorates substantially, severe body image disturbances are observed in this patient population. The patients undergo acute inflammatory attacks from period to period and experience the pain, impairment of skin quality and severe limitation of motion. Serious treatment costs are observed because of that they are under regular maintenance and intensive checks for lifetime.

Multiple growth factors have been identified which affect lymphangiogenesis, recent studies showed that this growth factors take on the task of regulating by playing a key role in the development of the lymphatic system. Treatment methods intended molecular targets began to develop in conjunction with more detailed understanding of the pathogenesis of diseases and identification of many receptors and molecules at the cellular level. Thus, lymphangiogenesis has been raised as a promising treatment method for lymphedema and research activities related to the lymphatic growth factors has been increased. These cytokines include vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and D, hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor (FGF-2), adrenomedullin and angiopoetin-1 and -2. However the effectiveness of cytokines are known to be short-lived.

In the treatment of lymphedema which has a high prevalence and significant morbidity, new modalities is needed. Lymphangiogenesis have emerged as a promising treatment for lymphedema. In this study, the effect of lymphangiogenesis on the treatment by means of creating secondary lymphedema model on the tail of a mouse is investigated. For this purpose, differentiated embryonic stem cells, differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells, embryonic stem cell medium, mesenchymal stem cell medium and saline were administered to the different groups and their effects on lymphangiogenesis were observed.

50 Bulb-C strain between 28-35 grams were used in the study. The mice were categorized into five group which contains nine mice subsequent to establishment of secondary lymphedema on mice tail. At post-operatively day 5, differentiated embryonic stem cells were given to the first group, differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the second group, embryonic stem cell medium to the third group, mesenchymal stem cell medium to the fourth groups and 0.9%NaCl to the control group. Tail diameter measurements of the mice were performed on a daily and all of mice were sacrificed at day 15. The development of lymphangiogenesis and lymphedema status on the tail were evaluated histologically HE and immunohistochemically. VEGF, FGF-2, LYVE-1 and Prox were used as immunohistochemically markers.

Looking at the macroscopic results, significant reduction in diameter of the tail and a decrease in the amount of lymphedema were determined in the groups given embryonic and mesenchymal stem cell compared with the other three groups, and this change in the evaluation found a statistically significant

In histological evaluation, the effects of lymphangiogenesis on the treatments were compared by using VEGF, FGF-2, LYVE-1 and Prox as markers. Lymphangiogenesis was triggered in embryonic stem cell group compared with saline control group and medium groups. Increased expression of histological markers showing lymphangiogenesis were determined in the mesenchymal stem cell group compared with saline control group and medium groups. However, no significant differences between embryonic and mesenchymal stem cell groups which derived from different stem cell sources were observed in terms of treatment effectiveness. Consequently, it was shown in animal models that differentiated embryonic and mesenchymal stem cells can be used successfully in the treatment of lymphedema.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Lenfödem, lenfatik disfonksiyon sonucu proteinden zengin interstisyel sıvının deri ve subkutan doku içerisinde birikmesidir. Tüm dünyada 140-200 milyon lenfödem olgusunun var olduğu tahmin edilmektedir. Lenfödem etiyolojisine göre primer ve sekonder lenfödem şeklinde sınıflandırılır. Etiyolojisi bilinmeyen ya da konjenital lenfatik fonksiyon bozukluğu sonucu oluşan olgular primer lenfödem olarak adlandırılır. Var olan bir nedene ikincil gelişen diğer tüm olgular sekonder lenfödem olarak adlandırılır.

Sekonder lenfödem edinsel bir problemdir. Enfeksiyon, travma, cerrahi ablasyon, radyasyon, tümör, lenfoproliferatif hastalıklar ya da yaralanmaya bağlı gelişebilir. Ciddi bakteriyel enfeksiyonlar sonucu gözlenebildiği gibi paraziter (filariyazis gibi) enfeksiyonlar sonrasında da ortaya çıkabilmektedir. ABD'de malignite ve radyoterapi en sık sekonder lenfödem sebepleridir. Meme kanseri cerrahisi sonrasında ipsilateral üst ekstremitede lenfödem görülme sıklığı %30 olarak bildirilmiştir. Ayrıca alt ekstremite maligniteleri sonrası inguinal diseksiyon olguların %20'sinde lenfödem geliştiği gösterilmiştir.

Lenfödem subkutan kompartmana sınırlıdır, derin kas kompartmanları etkilenmez. Sıvı oluşumu lenfatik transport kapasitesini aştığında, proteinden zengin sıvı damar dışına kaçar. Yüksek protein içeren ödem Starling eşitliğinde sapmaya neden olur ve bu durum daha fazla sıvının birikimi ile sonuçlanır. Zamanla düşük oksijen basıncı, azalmış makrofaj fonksiyonu ve proteinden zengin sıvının artan miktarda varlığı kronik enflamatuar duruma ve onu takip eden fibrozise neden olur.

Cerrahi dışı tedavi için temel stratejiler manuel lenf drenaj, ekstremite elevasyonu, kompresyon tedavisi ve lenfatik akışa yönelik egzersizlerin kombinasyonu olarak tanımlanabilir. Lenfödem tedavisinde cerrahi prosedürler genelde temel yaklaşımlardan biri değildir. Cerrahi tedavi temelde ablatif prosedürler ve fizyolojik prosedürler olarak ikiye ayrılmaktadır. Kronik lenfödem hastalarının yaşam kalitesinde önemli miktarda bozulmakta, bu hasta popülasyonu ciddi beden imge bozuklukları gözlenmektedir. Hastalar dönem dönem akut enflamatuar ataklar geçirmekte ağrı, cilt kalitesinin bozulması ve ciddi hareket kısıtlılıkları yaşamaktadırlar. Yaşam boyu düzenli bakım ve yoğun kontroller altında olmalarından dolayı ciddi tedavi maliyetleri gözlenmektedir. Bu nedenle kronik lenfödem tedavisinde güncel yaklaşımlar ve yeni tedaviler aranmaktadır.

Lenfanjiyogenez üzerine etkili birden fazla büyüme faktörü tanımlanmıştır, yapılan son çalışmalar bu büyüme faktörlerinin lenfatik sistemin gelişiminde anahtar rol oynayarak

düzenleyici görevi üstlendiğini göstermiştir. Böylelikle lenfanjiyogenez, lenfödem için umut verici tedavi yöntemi olarak gündeme gelmiştir ve lenfatik büyüme faktörleri ile ilgili araştırmalar artış göstermiştir. Bu sitokinler vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)-C ve D, hepatosit büyüme faktörü (HGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF-2), adrenomedullin ve anjiyopoetin-1 ve -2'yi içerir. Ancak sitokinlerin etkinliğinin kısa süreli olduğu bilinmektedir.

VEGF-C, trombosit kaynaklı büyüme faktörü / vasküler endotelyal büyüme faktörü (PDGF/VEGF) ailesinin bir üyesi olan, anjiyogenez, lenfanjiyogenezi, endotel hücre büyümesi ve endotel permeabilitesini etkileyen bir proteindir. VEGF-C ve VEGF-D, lenf damarları üzerinde eksprese edilen ve lenfatik endotel hücrelere (LEC) sinyal taşıyan VEGFR-3'e bağlanır. VEGF-C lenfatik damarların normal gelişimi için gereklidir. Ayrıca, VEGF-C anjiyogenez ve lenfanjiyogenezi tetikleyerek, insanlardaki çeşitli kanser ve metastatik tümörlerde etki göstermektedir. Yakın zamanlı bir çalışmada tavşan lenfödem modelinde, lenfödem oluşumundan dört hafta sonra verilen tek doz VEGF-C'in lenfödem tablosunda regresyona yol açtığı gözlenmiştir.

Transkripsiyon faktörleri arasında yer alan Prox-1, bir homeobox transkripsiyon faktörüdür ve lenfanjiyogenezin önemli bir düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Embriyonik gelişim sırasında Prox-1 kardinal venin alt grubu olan endotelyal hücrelerden salınır ve bu hücrelerden primer lenfatik pleksus oluşturulur. Prox-1 olmayan farelerde venlerden lenfatik endotel hücre (LEC) göçünün sekteye uğradığı ve lenfatik damar gelişiminin gözlenmediği gösterilmiştir. Prox-1 ayrıca VEGFR-3, LYVE-1, Podoplanin ve İntegrin-α gibi çeşitli lenfatik endotel hücre (LEC) belirteçlerini indükler ve vasküler endotelyal hücre belirteçlerini (örneğin,VEGFR2 ve VE-Cadherin) baskılar.

LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial Receptor 1) lenfatik endotel hücreleri üzerinde bulunan bir transmembran reseptördür. LYVE-1'in fonksiyonları tanımlanmaya devam ederken, potansiyel rolü lenfatik endotel hücre yüzeylerine Hyaluronan (HA) transport ve döngüsünün sağlanmasıdır. Buna ek olarak LYVE-1 lenfoid doku ve / veya lenfanjiyogenezin için bir işaretleyici olarak gösterilmiştir. HA deri ve bağ dokusunun önemli bir bileşeni olmasının yanı sıra hücre migrasyonu, doku morfolojisi, inflamasyon ve tümör metastaz gelişiminde de olası rolleri vardır.

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF), anjiyogenez, yara iyileşmesi ve embriyonik gelişmede (beyin, ekstremite, akciğer, kalp, kas, kemik, kan, deri, göz) rol oynarlar. Fibroblast büyüme faktörleri hücre ve dokuların çoğalması ve farklılaşması süreçlerinde kilit oyunculardır. Endotel

hücre çoğalması, göç etmesi ve yeni kan damarı oluşumunun uyarılması FGF-2'nin en iyi karakterize edilen fonksiyonlarıdır.

Bağ dokunun esas proteini ve memelilerde en çok bulunan protein olan kollajen-1, insan vücudunda da en çok bulunan kollajen tipidir. Vertebralı dokularının yapısal bütünlüğü için gerekli majör fibriler ekstrasellüler bir proteindir. Tip 1 kollajenin sentezi, yara iyileşmesi doku morfogenezi ve fibrozisi içeren birçok biyolojik olayda artar ve TGF-β, IL-1, TNF-α, vitamin D ve C gibi birçok ekstrasellüler sinyal molekülü tarafından normal ve patolojik durumlarda sentezi kontrol edilir. Skar dokusunda bulunur, tamir ile dokunun iyileşmesinde en son üründür. Tendon, deri, arter duvarında, miyofibrillerin endomisyumunda, fibrokartilajda ve kemik ve dişin organik parçalarında da bulunur. Deneysel granülasyon dokusunun oluşumunun 7. gününde tip 1 kollajen histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak saptanabilir. Bununla beraber yeni sentez edilen kollajen ile önceden bulunan kollajen arasında ayırım yapmak skar dokusunun oluşumunun takibi için önemlidir.

Kök hücreler, bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneği olan, özelleşmemiş, farklılaşabilen, hasar gören bir dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen, in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile hücrelerin farklılaşmalarını sağlayabilen hücrelerdir. Kök hücreler sınırsız bölünebilme ve kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Bu özellikleri bakımından kök hücreler hastalıkların tedavisinde veya doku tamirinde kullanılabileceğinden yola çıkılarak, kanser, sinir sistemi hastalıkları (Alzheimer, Parkinson vb.), metabolik hastalıklar (Diabet vb.), organ yetmezlikleri, romatizmal hastalıklar, kalp hastalıkları, kemik veya ortopedik hastalıklar, deri kaybına neden olan bir çok durum (travma, yanık, dermatolojik hastalıklar) gibi birçok alanda önce deneysel modellerde, günümüzde ise klinik olgularda kullanılmaya başlanmıştır.

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, multipotent ve pluripotent olarak sınıflandırılırlar. Totipotent hücreler, sınırsız farklılaşma ve farklı dokulara yönlenebilmelerinden dolayı vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip embriyonik hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir (3,5 günlük embriyo) ve pluripotenttirler. Embriyonik kök hücreler vücuttaki her hücre ve doku tipine farklılaşabilme kapasiteleri ile doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında büyük bir potansiyele sahiptirler.

Embriyonik kök hücrelerin çeşitli hücrelere farklılaşabilme özelliklerinden yararlanılarak doku hasarında daha hızlı iyileşmenin sağlanması veya sinir hücresi gibi hasarlandıktan sonra yerine konması mümkün olmayan hücrelere farklılaştırılarak yara tamirlerinde kullanılması son

yıllardaki en önemli araştırma konularındandır. Uygun kültür ortamı sağlandığında bu hücreler farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile bu hücrelerin farklılaşması da sağlanabilir. Lenfanjiyogenez aşamasında embriyonik kök hücrelerin VEGF-A, VEGF-C gibi sitokinlerle diferansiye edilmesi mümkündür.

Kemik iliği kök hücreleri elde edilmesinin kolay olması, neoplastik diferansiyasyonun düşük olması, etik sorunların olmaması nedeniyle en fazla araştırma yapılan ve klinik kullanımı olan kök hücrelerdir. Kemik iliğinde hematopoietik kök hücreler, hemanjiyoblastlar, multipotent erişkin progenitör hücreler ve mezenkimal kök hücreler (MKH) izole edilen kök hücrelerdir. Bunlar içinde MKH'ler mezodermal kaynaklı adipositler, osteoblastlar, kondrositler, tenositler, iskelet kas hücreleri ve viseral stromal hücrelere diferansiye olabilmektedirler. Ancak MKH'ler bunun yanında ektodermal kaynaklı (nöronlar gibi) ve endodermal kaynaklı (hepatositler gibi) dokulara da diferansiye olabilmektedir. Bu noktadan hareketle yapılan çalışmalarda, kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelerin (BM-MNCs) iskemik bacak modellerinde anjiyogenezi indüklediği gösterilmiştir. Conrad ve ark.2009 yapmış oldukları çalışmayla kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin implantasyonu ile lenfanjiyogenezin de indüklendiği gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler genellikle farklı dokulara dönüşebilme potansiyeli olan progenitör hücreler içeren kemik iliğinden elde edilmektedir.

Yüksek bir prevalansta görülen ve ciddi morbiditeye neden olan lenfödem tedavisinde yeni modalitelere ihtiyaç duyulmaktadır. Lenfanjiyogenez lenfödem için umut verici tedavi yöntemi olarak gündeme gelmiştir. Bu çalışmada fare kuyruğunda sekonder lenfödem modeli oluşturularak tedavide lenfanjiyogenezin etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla farklı gruplara diferansiye edilmiş embriyonik kök hücre, diferansiye edilmiş kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre, embriyonik kök hücre vasatı, mezenkimal kök hücre vasatı ve serum fizyolojik tedavileri verilerek lenfanjiyogenez üzerine olan etkilerinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. LENFATİK SİSTEM

4.1.1. YAPISAL ELEMENTLER

Lenfatik sistem; interstisyel sıvıdan kan dolaşımına sıvı transferi sağlayan ve immun sistem ile beraber çalışarak ekzojen maddelere karşı koruyucu filtre görevi gören bir sistemdir. Kardiyovasküler sistemin aksine merkezi bir pompaya sahip değildir; bir drenaj sistemidir. Bu drenaj sistemi sayesinde, hücreler arası sıvıdan kan kapillerine geçemeyen plazma proteinleri ve büyük moleküllü maddeler venöz yatağa aktarılır. Lenfatik sistemin yapısal elementleri; lenfatik organlar, lenf sıvısı ve lenf damarlarıdır.[1, 2]

Lenfatik organlar primer ve sekonder olarak ikiye ayrılırlar.

- Primer lenfatik organlar: Kemik iliği ve timüs bezi,
- Sekonder lenfatik organlar: Dalak, lenf nodları ve mukoza ile birleştirilmiş lenfatik dokudur (MALT).

Lenfatik sistemin üç ana fonksiyonu vardır.

1- Dokuların sıvı dengesinin ayarlanmasına yardım eder. Her gün yaklaşık 30 litre sıvı kan kapillerinden intrasellüler bölgeye geçiş yapar. Bunun 27 litresi tekrar kan kapillerlerine geri döner. Hücreler arası sahada kalan yaklaşık 3 litrelik sıvı, lenf kapillerlerindeki lenfa'dır. Lenfa, lenf damarları yolu ile venöz sisteme taşınarak dolaşım sistemine geri döner.

2- Lenfatik sistem, immun sistemin bir parçası olarak da tanımlanabilir. Lenf nodları lenfayı süzme görevini yürüterek mikroorganizma ve diğer ekzojen maddelerin temizlenmesini sağlarlar.

3- Lenfatik sistem, sindirim sisteminden yağların ve diğer besinlerin emilmesine yardım eder. İnce bağırsaklarda bu işi yapan özel lenf damarlarına ***laktosel*** (***lactocele)*** denir. Emülsiyon şeklindeki yağlar, laktosellerden emilerek lenf damarları yolu ile dolaşım sistemine katılır. Emülsiyon şeklindeki yağlardan oluşan süte benzeyen bulanık sıvıya ***şilöz (chylus)*** denir.

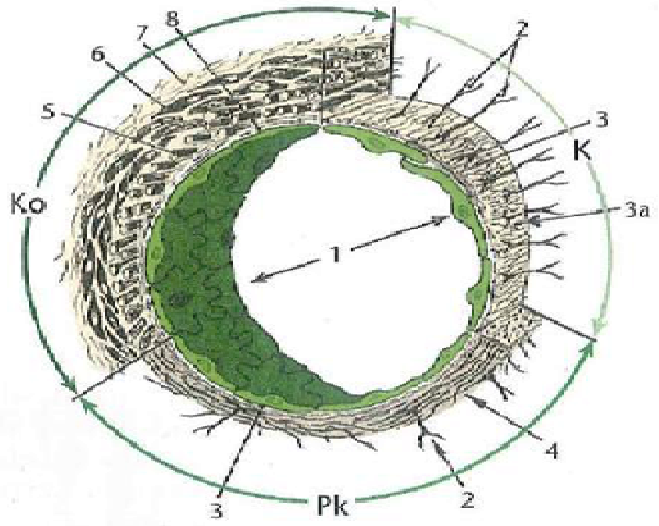
4.1.2. LENFATİK VASKÜLER SİSTEM

Lenfatik vasküler sistem venöz sisteme paralel yerleşim gösteren bir drenaj sistemidir.[3] Karakteristik olarak lenf damar sistemi periferde başlar. Bunlara başlangıç lenf damarları denir.

Üzerinde lenf nodlarının yerleştiği toplayıcı kanallarla devam eder ve venöz sisteme drene olması şeklinde bir yol izlerler. Gövde kollektörleri ile venöz sistemin buluşma yeri sağ ve soldaki venöz açılardır. Vena jugularis interna ve vena subklavia birleşerek vena brakiosefalika'yı oluştururlar. Bu iki venin birleştiği bölge venöz açı (angulus venosus) olarak adlandırılmaktadır. ***Duktus Lenfatikus Dekster*** ve ***Duktus Torasikus*** bu bölgeden venöz sisteme dökülür.

Lenf vasküler sistemi, damar duvarının histolojik yapısına göre tanımlandığında;

Lenf Kapillerleri: Kan kapillerlerine göre daha geniş ve çok düzensizlerdir. Hücrelerarası alanda, fibrositlerin çalışma ağına gömülü parmak veya meşe ağacı yaprağı şeklindedirler, kan kapillerlerinin yanında bulunurlar (Şekil-1).

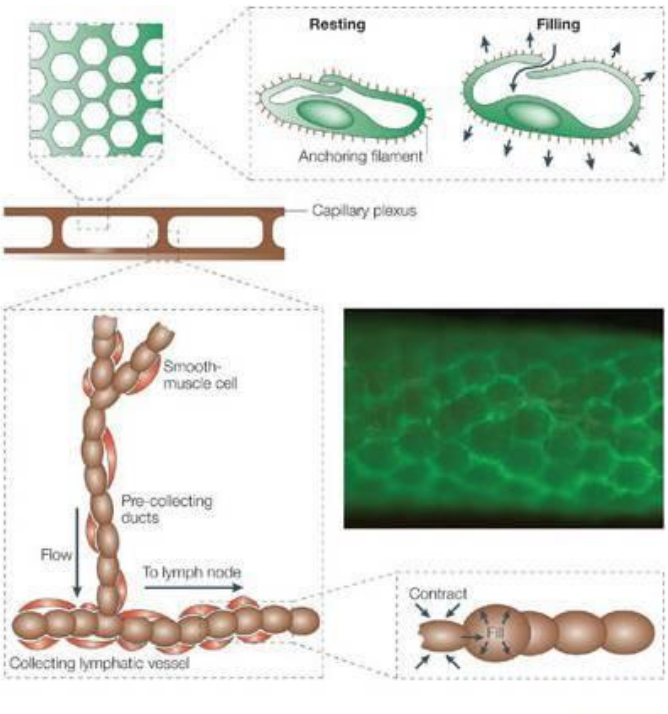


K	Kapillerler	3a	Subendotelyal retiküler fibril ağı	
Pk	Prekollektörler	4	Konnektif doku tabakası	
Ko	Kollektörler ve lenf trunkusları	5	Longitudinal kas tabakası	Orta
1	Endotelyum	6	Sirküler kas tabakası	
2	Anchor flamentleri	7	Adventisya	
3	Temel membran	8	İntima	

Şekil-1: Lenf damarlarının farklı bölümlerinin katmanları[1]

Başlangıç kısımları kapalıdır. Lenf kapillerlerinin çapı, kan kapillerlerine göre daha geniştir. Lenf kapillerlerinin duvarı sadece endotel tabakasından oluşmaktadır ve kapakçıkları yoktur. "*Ankor Filamentleri*" çevre dokulardaki endotel hücrelerinin lenfatiklerinin birbirine bağlar ve lenfanın lenfatik kanallara giriş hızını kontrol eder. Ödem esnasında bu filamentler

gerilime ikincil şişer ve böylece endotel hücrelerinin arası açılarak genişler. *Ankor Filamentleri* ayrıca interstisyumun elastik ve kollajenöz duyu lifleri ile de bağlantıdadır.[4](Şekil-2)



Şekil-2: Lenfatik damar organizasyonu[5]

Prekollektörler: Lenf sıvısını kapiller ağdan alıp kollektörlere yönlendirirler. Duvarlarının birçok bölümünde kapakçıklara sahiptirler ve drene etme fonksiyonları vardır.

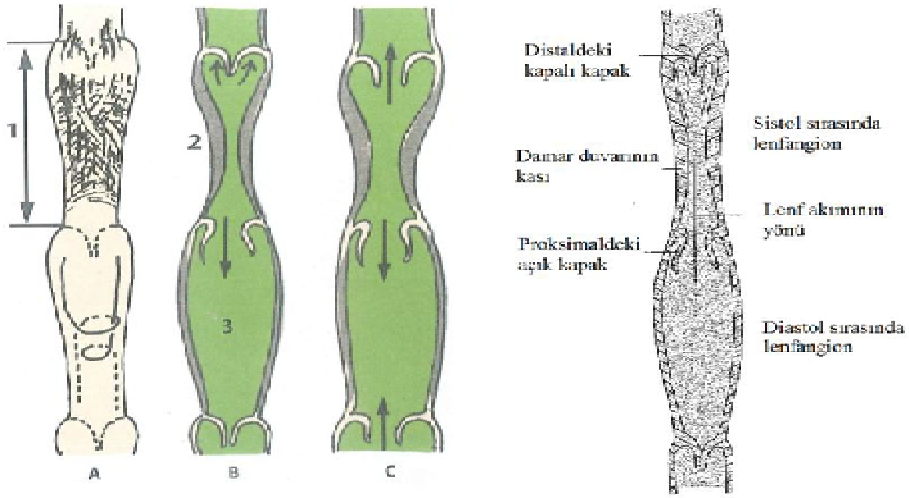
Kollektörler: Lenf kapillerleri birbirlerine yaklaşarak lenf damarlarını meydana getirirler. Lenf damarları, venlerin yapısına benzer özellikler göstermelerine karşın, birçok kapakçıkları ve çok ince duvar yapıları ile venlerden ayrılırlar. Lenf damarları birbirleri ile anastomoz yapar ve çapları gittikçe büyür. Histomorfolojik olarak venlerde bulunan üçlü katmana benzer yapıdadırlar: Tunica intima, Tunica media ve Tunica externa / Tunica adventitia.

Tunica intima: Endotel ve longitudinal lifleri içeren ince bir bağ dokusu tabakası yapar.

Tunica media: Büyükçe lenf damarlarında, sirküler ve oblik düz kas demetlerinden meydana gelmiş müsküler tabakadır. Arasını bağ dokusu doldurmuştur.

Tunica externa / Tunica adventitia: Kollajen demetlerden ve elastik liflerden yapılmıştır. Düz kas lifleri ve küçük besleyici kan damarları mevcuttur.

Kollektörler primer olarak çift kapaklı düzenlenmiş olup bütünüyle pasif bir fonksiyona sahiptirler. Lenf sıvısının geriye akımını önler ve lenf akımının merkeze doğru devamlılığını sağlarlar. Fonksiyonel olarak kollektörler kapak segmentlerine (Lenfanjiyon) bölünmüştür (Şekil-3).



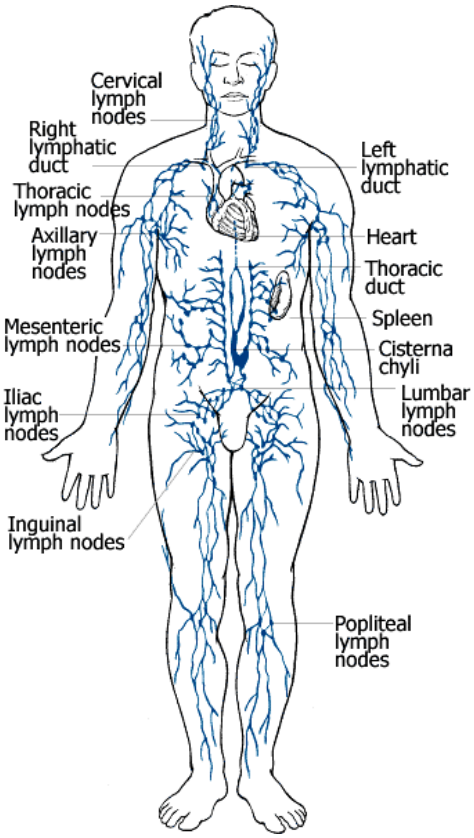
Şekil-3: Kapak segmentinin yapısı ve fonksiyonu[1]

A. Kas kompozisyonu, B. Normal fonksiyon, C. Kapak yetmezliği ile dilate lenf damarı ve reflü

1. Kapak segmenti 2. Kontrakte segment (boşalma fazı) 3. Gevşemiş segment (dolma fazı)

İki kapak arasında kalan bölüm olan lenfanjiyondaki kontraksiyonlar lenfi merkeze doğru pompalar. Kollektörlerin içindeki her bir lenfanjiyon, başlı başına bir ünite gibi çalışır. Lenfanjiyon, lenf kalbi (sistol ve diastol) olarak da tanımlanmaktadır. Lenfanjiyonların çalışması kalpte olduğu gibi Frank-Starling Yasası'na göre düzenlenmektedir. Lenfanjiyon kaslarının pompalama aktivitesi (dakikada frekansı = ortalama 10 pulsasyon) ortaya çıkan bu ritmik harekete lenfanjiyomotor fonksiyon (=lenfanjiyomotorik hareket) denilmektedir.

Lenf trunkusları (Trunkus lymphaticus): Lenf damarlarının daha geniş çaplı ve daha uzun olan bölümlerine *lenfatik trunkus* denir. En büyük lenf damarlarıdır. Lenfatik trunkuslar içlerindeki lenf sıvısını daha geniş lümenli olan *lenfatik duktus'*lara aktarır. Bulundukları kadranlar içerisinde, iç organlardan ve ekstremitelerden gelen lenfi venöz kan dolaşımına boşaltırlar (Şekil-4).



Şekil-4: Lenfatik sistem anatomisi[6]

Sisterna şili (Cisterna chyli): Birinci ve ikinci lumbal vertebraların korpuslarının önünde, aortanın arka sağ tarafında ve diafragmanın sağ kurusunun yan tarafında bulunur. Duktus torasikus'a oranla daha geniştir. Sisterna şili'ye trunkus lumbalis dekster, trunkus lumbalis sinister, trunkus intestinalis'ler açılır. Trunkus lumbalis'ler; nodi lymphatici aortici lateralisten çıkan efferent lenf damarlarının birleşmesinden oluşur. Bunlar alt ekstremiteden, pelvis organları ve duvarından, böbreklerden, glandula suparenalislerden ve karın duvarının büyük bölümünden gelen derin lenf sıvılarını toplar. Trunkus intestinalis'ler mide, bağırsaklar, pankreas, dalak ve karaciğerin alt yüzünden lenf sıvısını toplar.

Topografik olarak lenf damar sistemi 3 bölüme ayrılır:

- Deri ve epidermisi drene eden ***Yüzeyel Lenf Sistemi,***
- Kaslar, eklemler, tendonlar ve sinirlerdeki lenf sistemi olan ***Derin Lenf Sistemi.***

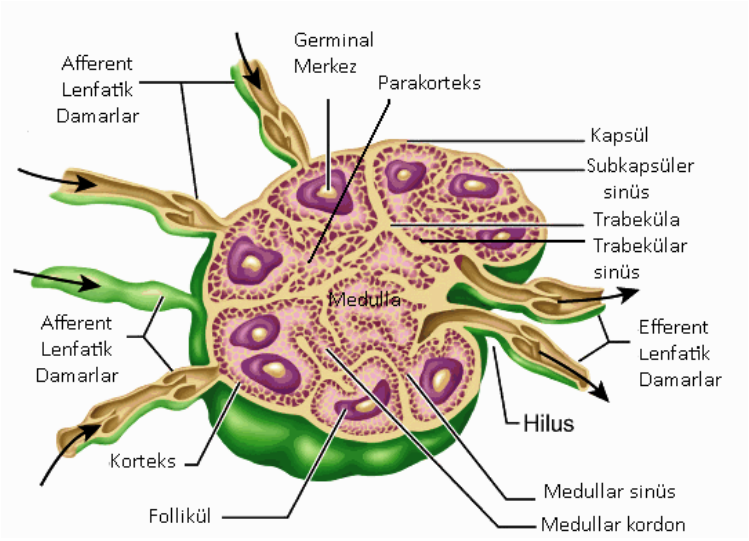
Derin kollektörler, genel bir vasküler kılıf içinde yer alan arterleri takip ederler ve arterlere eşlik eden venlerin etrafını çevreleyecek şekilde bir yol izlerler. Derin ve yüzeyel lenf sistemi birbirlerine ***perfore lenf damarları*** ile bağlanmışlardır. Perfore lenf damarlarının çoğu lenf sıvısını derin bölgelerden yüzeye yönlendirir.

- Organların lenf sistemi, organların kendi yapısına adaptedir ve organların özelliklerine spesifik uyumluluk gösterir.

4.1.3. LENF NODLARI VE LENFATİK BÖLGELER

İnsanlar yaklaşık olarak 600-700 lenf noduna sahiptir. Lenf nodlarının uzunlukları 2-30 mm arasında değişir ve görünümleri genellikle fasulye ya da böbrek biçimindedir. Lenf nodlarının süzme fonksiyonu vardır. Çeşitli hücrelerden patojenleri, yabancı maddeleri ve metabolik atıkları alarak lenf sisteminin temizleme istasyonları olarak çalışırlar. Bitişik oldukları kan damarlarına ya da yerleşimlerine göre isimlendirilirler. Sıklıkla derinde, yağ dokusu içine gömülüdürler. Normalde lenf nodları palpe edilemezler; ancak zayıf veya atletik insanlarda palpasyonları mümkün olabilir.

Lenf noduna arterlerinin ve sinirlerinin girdiği; venlerinin çıktığı yere ***hilus*** denilir. Vas lymphaticum efferens'ler hilustan başlar. Lenf, lenf noduna konveks yüzeyindeki afferent damarlarla girer ve lenf nodunun hilusundan kan damarları (arter ve ven) ile birlikte efferent damarlar şeklinde çıkar (Şekil-5). Daha çok periferde yerleşimli olan Tip I lenf nodunun tüm afferent damarları marjinal sinüs içine akarken; daha merkezi yerleşimli olan Tip II lenf nodunun bir afferent damarı ilerideki veya gerideki diğer bir noda gider ve sadece yan dalları boyunca marjinal sinüsle bağlıdır.



Şekil-5: Lenf nodu anatomisi[2]

Lenf nodunun üzerini örten ***kapsül***ün yapısında çoğunlukla kollajen lifler, elastik bağ dokusu ve düz kas lifleri bulunur. İnguinal ve mezenterik lenf nodülleri daha fazla kas lifi içerir. Kapsülün uzantısı olan ***trabekula***lar lenf nodlarını bölmelere ayırır.

Korteks: Kapsülün hemen altındaki bölgedir. Burada lenfanın içinden geçerek süzüldüğü sinüsler düzensiz yerleşmişlerdir. Bunlar;

Sinüs subkapsüllaris: Korteks ile kapsül arasında bulunurlar.

Sinüs peritrabeküläris: Trabeküllerin çevresinde bulunurlar. Sinüslerde makrofajlar bulunur. Makrofajlar lenf sıvısındaki antijen ve yabancı maddeleri fagosite ederler.

Lenf nodlarında 2 tip follikül bulunur:

Primer follikül: Aktif olmayan B hücreleri çoğunluktadır. Primer follikülde bulunan dendritik hücreler, lenfadaki antijeni tutarak B hücrelerine sunarlar.

Sekonder follikül: Akif olmayan B hücreleri ve folliküler dendritik hücreler bulunur. B hücreleri uyarılınca follikülün merkezine göç eder.

Germinal Merkez: Sekonder folliküllerin merkezinde aktive olan B hücrelerinin bulunduğu bölgelerdir. B hücrelerinin aktive olması ve çoğalması sonucu germinal merkez genişler ve lenf nodları büyür.

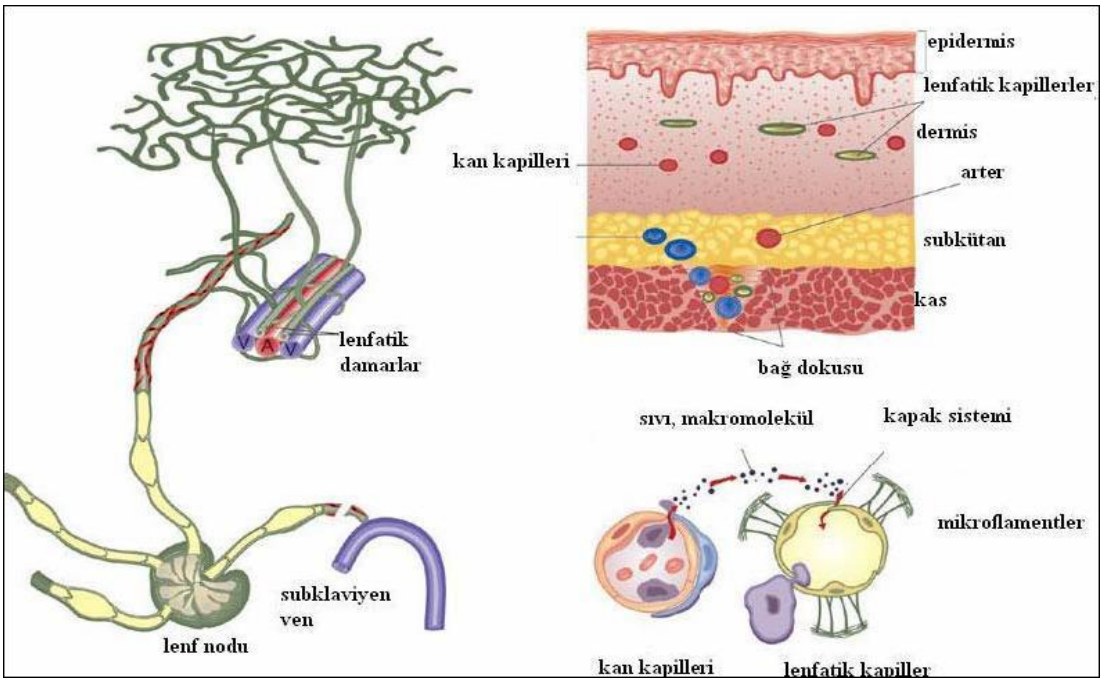
Parakortikal bölge: Korteks ile medulla arasında bulunan bölgedir. Aktive olmayan T hücreleri ve folliküler dendritik hücreler bulunur.

Medulla: Medulla hilusa yakın olan en içteki bölgesidir.

Medüller sinüsler: Lenfa, sinüs subkapsüllaris ve sinüs peritrabeküläris'ten süzülerek medüller sinüslere gelir. Vas lymphaticum efferens ile lenf nodunu terk eder. Medullar kordlarda aktive olmuş T hücreleri ve plazma hücreleri bulunur.

4.1.4. LENF SİSTEMİNİN FİZYOLOJİSİ

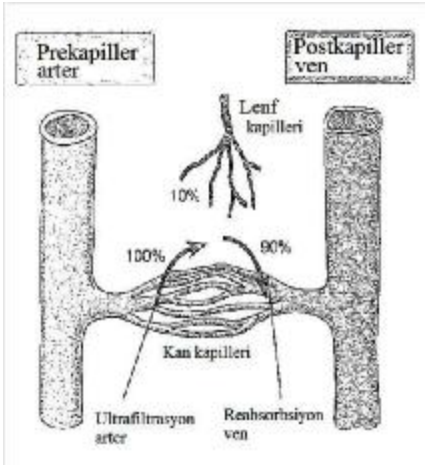
Lenf, lenf kapillerlerinde, interstisyuma lokalize olmuş interstisyal sıvıdan gelişmektedir. Lenf sıvısı yüksek protein ihtiva eden bir sıvıdır. Lenf damar sistemi, venlere paralel seyretmesi ve venlere benzer yapıya sahip olmasına rağmen kan damar sistemine göre bazı farklılıklar gösterir (Şekil-6).



Şekil-6: Lenfatik damar sistemi[7]

1. Lenf sistemi kan dolaşım sistemi gibi kapalı bir dolaşım sistemi değil, yarım bir dolaşım sistemidir.

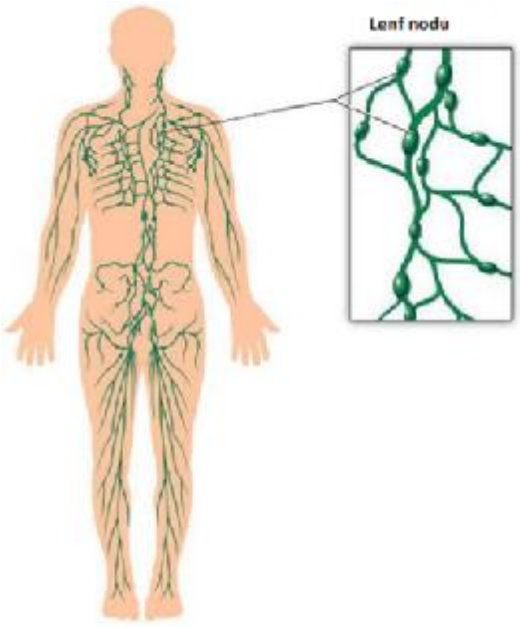
2. Kan dolaşım sisteminin pompası kalp iken lenf dolaşım sisteminin merkezi bir pompası yoktur. Kapalı olan kan dolaşım sisteminde kan kalpten çıkar; arter kılcalları aracılığıyla kapiller ağa getirilir. Kapiller yatakta kan ve doku arasında sıvı ve madde değişimleri sağlanır. Arteriyel kapillerlerden hücreler arasına filtre olan sıvının çoğu kapillerlerin venöz uçlarında kana reabsorbe olur; fakat sıvının 1/10'i kadarı venöz kapiller yerine lenfatik kapillerlerle kana döner (Şekil-7).



Şekil-7: Lenf Kapillerinden Emilen Sıvı[8]

Lenfatikler yoluyla dolaşıma dönen az miktardaki sıvı son derece önemlidir; çünkü protein gibi venöz kapillerlere re-absorbe olamayan büyük moleküllü maddeler hemen hemen hiç engellenmeden lenfatik kapillerlere geçerler.

3. Lenf dolaşımı kan dolaşımı gibi kesintisiz değildir; lenf sistemi istasyonları olan lenf nodülleri tarafından kesintiye uğrar (Şekil-8).



Şekil-8: Lenf nodlarının lenfatik sistemde yerleşimi[6]

Plazma ile interstisyel sıvı arasındaki maddelerin (su ve küçük organik-inorganik moleküller) geçişini sağlayan en önemli mekanizma "*difüzyon*"dur. Hücrelerin beslenmesi ve atıkların uzaklaştırılması primer olarak difüzyon yoluyla olmaktadır. Difüzyonda geçiş yönü, yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğrudur. Dakikada yaklaşık 240 litre kan hiçbir enerji harcaması olmadan difüzyona uğrar.[9]

Kan plazmasında bulunan proteinler makro moleküllerdir. Bu moleküller kolloidler olarak tanımlanır. Total konsantrasyonları 100 ml kan plazmasında yaklaşık %7 gr'dır. Kolloidler - albümin, globülin, fibrinojen, lipoprotein- seçici geçirgenlik (semi permeabilite) gösteren membranlardan geçemezler fakat geçiş yönü düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru olacak şekilde suyun yer değişimine neden olurlar. Suyun konsantrasyon farkından doğan bu hareketine (difüzyonun tek yönlü olmasına) '*ozmoz*'; ozmoz yoluyla yer değiştiren suyun yaptığı basınca '*ozmotik basınç*' denilmektedir. Plazmadaki proteinlerin kendileri için yarı geçirgen membranda difüzyon yoluyla su çekerek oluşturdukları basınç '*kolloid ozmotik basınç*' ya da '*onkotik basıncı*' olarak ifade edilmektedir. İnsanların kan plazmasında kolloid ozmotik

basınç yaklaşık 25mm/Hg'dır. Kan kapiller basıncının ortalama değeri ile plazmadaki bu proteinlerin ozmotik çekim kuvveti arasındaki korelasyon '*Starling Dengesi*' olarak tariflenmektedir.

Kolloid ozmotik basıncı geçecek bir mekanik basınç oluşturulmasına '*ultrafiltrasyon*' denir. Plazma proteinleri için yarı geçirgen olan kan kapillerlerinden, proteinlerin (Kolloidlerin) dışarıya çıkması için gerekli basınç kalp tarafından sağlanır. Kalpten aortla çıkan kanın basıncı 100 mm/Hg'dır. Kan yol boyunca basınç kaybederek ilerler. Prekapiller arter öncesi 85 mm/Hg'ya düşer. Kapiller ağa 30-35 mm/Hg'lık basınçla girilir. Kapiller ağın çıkışında, venöz alanda kan, 8-10 mm/Hg ile kapiller ağı terk eder. Kalbe geri dönüşte büyük venlerde 0 mm/Hg ve bazı yerlerde (-) değerlere ulaşır. Bu değerler yatan bir kişinin kan dolaşımındaki basınç değerleridir. Dikey pozisyonda yerçekimi ile bu değerler değişmektedir.

4.1.4.1. MİKROSİRKÜLASYONUN TEMEL PRENSİPLERİ

Kan kapiller basıncı sabit bir değer değildir. Kan basıncı kapillerlerin başından sonuna dek devamlı azalır ve '*kan kapiller basıncı*' tanımı ortalama basınç değerini tanımlar. Arteriyel segmentteki ortalama kan kapiller basıncı doğal olarak venöz segmentten daha yüksektir. Prekapiller arterioller '*vazomotor hareket*' (arteriolün pulsasyonu) vasıtasıyla kan kapiller basıncını etkiler. Bir arteriolün besleme alanında ortalama 10-20 kapiller vardır. Kan kapiller basıncı vazomotor hareketin sistolü esnasında azalır, diastolü esnasında artar. Vazomotor hareket primer olarak dokunun oksijen konsantrasyonu ile regüle edilir. Prekapiller arteriol duvarlarının kas yapısını innerve eden sempatik sinir sistemi aktive olduğunda damar duvarında vazokonstrüksiyon gerçekleşir. Kapillerde kan akımı azalır, kapiller kan basıncı düşer. Vazodilatasyon durumunda ise kan akımı artar, kapiller kan basıncı yükselir.[10]

4.1.4.2. İNTERTİSYUM ve İNTERTİSYEL AKIM

Hücreler arası boşluk elastik bir interstisyumdur. İntertisyum, değişik polisakkaritleri (hyaluronan) içeren matriksle doldurulmuştur. Hyaluronan formlar; hücrelerarası boşluğun kollajen ve elastik fibrillerle doldurulduğu küçük filamentlerin oluşturduğu bir ağdır. Bu elastik fibriller, lenfatik başlangıçlarının 'ankor' filamentleriyle bağlantı halindedirler. 'Ankor' filamentleri interstisyumun elastik fibril ağının devamı şeklindedir. Vazomotor hareket,

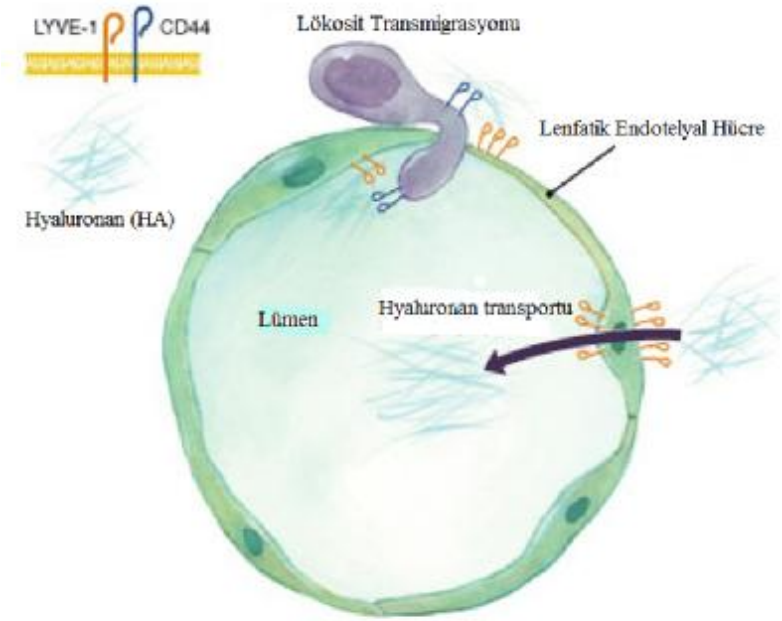
interstisyel sıvıyı prelenfatik kanalların içine doğru süren önemli bir itici güçtür. Dokular difüzyon ve ultrafiltrasyonla beslenirken; atık ürünlerini yine difüzyonla ve buna ilaveten reabsorbsiyonla uzaklaştırırlar.

4.2. LENFANJİOGENEZİS

Lenfatik sistem, kardiyovasküler sistemle birlikte doku homeostazında önemli bir rol oynar. Görevi dokuda oluşan lenf sıvısını alarak venöz sisteme iletmektir. Lenfoid sistem, timus, dalak, lenfatik damarlar, lenf nodları, tonsiller, mukozal lenfoid dokular ve Peyer plaklarından oluşur. Lenfatik damarlar bir ağ gibi bütün vücudu dolaşan, bir ucu açık olan kapalı bir sistemdir ve en son duktus torasikus aracılığıyla venöz sisteme açılır. Lenf sıvısı ise vasküler sistemden ekstravaze olarak doku aralığına sızan proteinden zengin bir sıvıdır. Lenfatik sistem bu sıvıyı dokudan, lenf kapillerleri aracılığıyla alır ve giderek genişleyen lenfatik damarlar ve duktus torasikus üzerinden tekrar venöz sisteme verir. Bu dönüş solunum sırasında oluşan basınç değişikliği veya iskelet kasları ile damar düz kaslarının hareketleri sırasında oluşan basınç farkı sayesinde gerçekleşir.

Lenfatik sistem, immun yanıtın oluşumu ve devamını sağlamak gibi çok önemli bir göreve de sahiptir. Lenfosit ve antijen sunan dendritik hücre gibi immun sistem hücrelerini deriden alıp, bölgesel lenf nodlarına taşıyarak immun yanıtı başlatır. Ayrıca barsaklarda bulunan lakteal lenf damarları ile yağ ve yağda eriyen A, D, E ve K vitaminlerini gastrointestinal sistemden alarak venöz sisteme taşırlar. Lenfatik sistemin, lenfödem, enflamatuar hastalıklar ve tümör metastazı gibi birçok patolojik durumda ne kadar önemli rol oynadığı bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir.

Lenfatik kapillerler, tek sıra lenfatik endotelyal hücrelerden (LEC) oluşur (Şekil-9). Kan damarlarının anatomik yapısından farklı olarak, lenfatik endoteli çevreleyen bir kas tabakası, perisit ve devamlılık gösteren bir bazal membran yoktur. Fakat lenfatik endotel hücreleri birbirlerinin üstünde kayarak bir valf yapısı oluştururlar. Bu özellik sayesinde lenf sıvısının, geriye kaçışı önlenmiş olur.[11] Ayrıca lenfatik endotel hücreleri elastik filamentlerle ekstrasellüler matrikse tutunurlar. Böylece dokudaki intersellüler basıncın değişimine göre lenfatik kapillerin kollabe olması engellenir.[12] İnterstisiyel basınç arttığında, filamentlerin gerilmesi, üst üste binmiş endotel hücrelerinin aralarının açılarak lenfatik sıvı, makromolekül ve hücrelerin lenfatik kapillerlere geçişini sağlar.



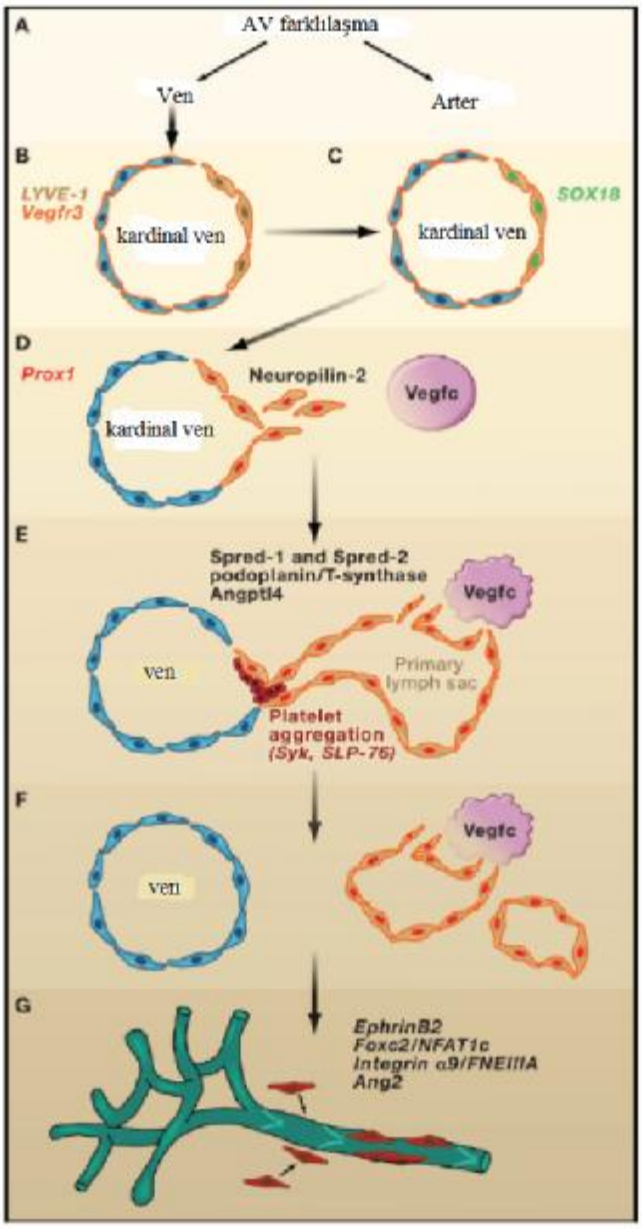
Şekil-9: Lenfatik Endotelyal Hücre[13]

Lenfatik sistem, santral sinir sistemi, retina, kemik iliği ve plasenta dışında hemen hemen bütün organ ve dokularda bulunmaktadır. Bu kadar önemli olmasına karşın bilimsel olarak daha çok vasküler sistem üzerinde durulmuş, lenfatik endotele spesifik belirteçlerin bilinmemesi, lenfatik sistemin gelişimi ve fonksiyonuna ait moleküler regülasyonunu anlamamızı zorlaştırmıştır. Son yıllarda bu belirteçlerin keşfedilmesi lenfanjiyogenezin oluş mekanizmalarının ve hastalıklarda, özellikle onkolojik süreçlerdeki rolünün anlaşılmasına katkıda bulunmuştur.

4.2.1 Lenfatik Sistem Gelişimi

Vaskülogenez ve embriyonik lenfanjiyogenezin gelişim mekanizmaları hakkında iki teori ortaya atılmıştır. Birinci teori lenfatik endotelin lenfanjiyoblastlardan, kan damarı endotelinin ise anjiyoblastlardan de nova olarak şekillenmesi, ikinci teori önceden var olan kan kapillerlerinden anjiyogenezin, venlerden de lenfanjiyogenezin filizlenmesidir.[14] Embriyogenez sırasında lenfatik damarların gelişimi, kan damarlarından başlamakta ve bunu yöneten birçok sinyal bulunmaktadır. Bu teori ilk olarak *Florance Sabin* tarafından bir asır önce ileri sürülmüş ve günümüze kadar en fazla kabul gören görüş olarak kalmıştır.[15,16] Genetik çalışmalar, lenfatikleri indükleyen sinyallere cevap veren bazı venöz endotelyal hücrelerin lenfatik kökenine dönüştüğü ve son olarak da lenfatiklere tomurcuklandığını desteklemektedir. Prox-1 bir homeobox transkripsiyon faktörüdür

ve trans-diferansiyasyonun başlangıcında ve tomurcuklanmada kritik bir rol oynar. Scheneider ve ark.'nın kuşlar üzerinde yaptığı bir çalışma da lenfatik damarların primitif lenfanjiyoblastlardan köken aldığını kuvvetlendirmektedir. Sonuçta her iki mekanizma da lenfatik sistemin gelişimi için katkıda bulunmaktadır (Şekil-10).



Şekil-10: Lenfatik Damar Gelişimi[17]

Yakın zamanda yapılan çalışmalarla PROX-1 ve LYVE-1 gibi lenfatik endotele spesifik belirteçlerin bulunması bu teoriyi desteklemektedir. Bugün için tanımlanmış birçok lenfatik belirteç bulunmaktadır (Tablo-1).

Belirteç	Fonksiyonu	LD	KD
Prox 1	Transkripsiyon Faktörü	++	-
Podoplanin	Transmembran Glikoprotein	++	-
LYVE-1	Hyaluronik asit lenfatik endotel reseptörü	++	-
VEGFR-3	Vasküler büyüme faktör reseptör -3	+	-/ (+)
Neurofilin-2	Semaforin ve büyüme faktör reseptörü	+	-/ (+)
Makrofaj Mannoz Reseptör 1	L-selektin reseptör	+	-
CCL21	CC-kemokin	+	-
CCL30	CC-kemokin	+ (++)	- (++)
Dezmoplakin	Zonula adherens ankor proteini	+	-
Plakoglobin	Hücre kavşağında Cadherin'i hücre iskeletine bağlar	+	-
Integrin 9	Adhezyon molekülü, osteopontin ve tenascin reseptörleri	+	-
CD44	Hyaluronik asit reseptör	-	+
VEGF-C	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör-C	-	+
VEGFR-1	Vasküler Büyüme Faktör Reseptörü-1	-	+
Neuropilin-1	Semaforin ve büyüme faktör reseptörü	-	+
Endoglin/CD105	Düşük afiniteli TGF-beta reseptörü	-	+
CD34	L-selektin Reseptörü	-/ (+)	++
IL-8	CXC-kemokin	-	+
N-Cadherin	Adezyon molekülü	-	+
ICAM-1/CD54	Adezyon molekülü	-	+
Integrin 5	Adezyon molekülü, Fibronektin reseptör subünitesi	-	+
Kollagen IV	Ekstrasellüler matriks proteini	-/ (+)	++
Versikan	Kondritin sülfat proteoglikanı	-	+
Laminin	Bazal membran molekülü	-/ (+)	++
Kollajen XVIII	Bazal membran molekülü	-/ (+)	++

Tablo-1: Lenfatik ve kan damarı belirteçleri

4.2.2. Lenfatik Endotel Hücre Belirteçleri

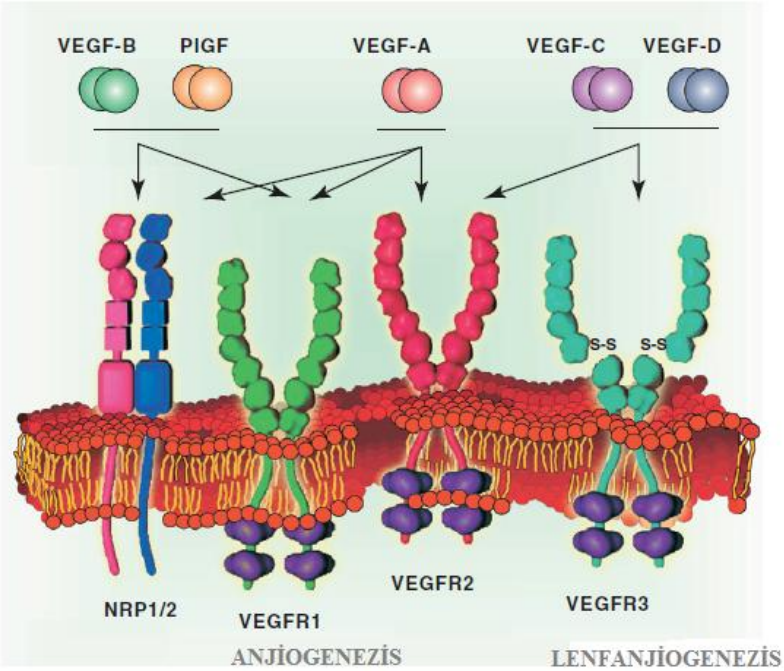
4.2.2.1 VEGF

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir.[18] Endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve diferansiyasyonuna sebep olur.[19] VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez, lenfanjiyogenez ve anjiyogenez için önemli ve gereklidir.[20] Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı birçok

fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardiyal iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır. Bu yüzden de son yıllarda ilgi odağı haline gelmekte ve birçok araştırmaya konu olmaktadır.[21]

VEGF ailesi ilk keşfedildiğinde, kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlattığı için Vasküler Permeabilite Faktörü olarak isimlendirilmiştir.[22] 1980'lerin sonunda ise, bu aileden ilk özel anjiyogenik büyüme faktörü ayrıştırılmış ve buna vaskülotropin veya vasküler endotelyal büyüme faktörü adı verilmiştir.[23]

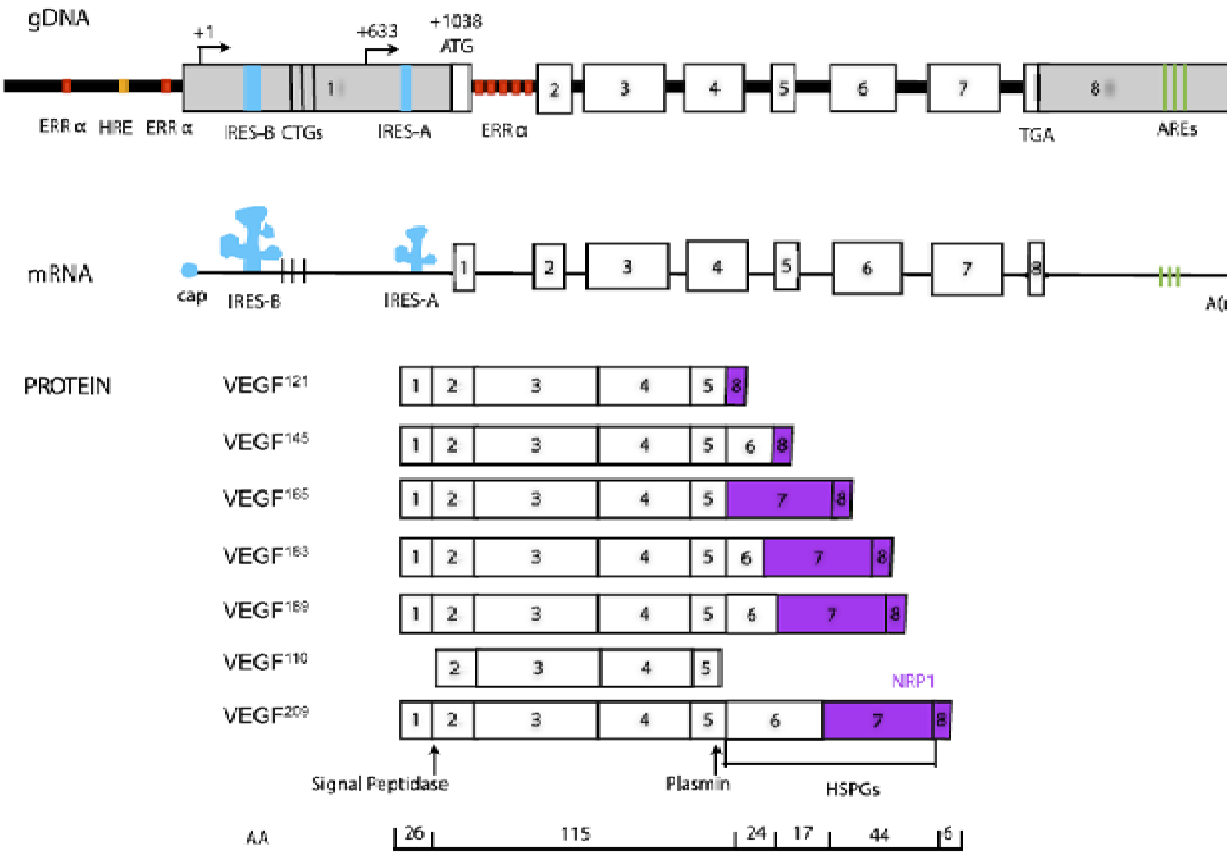
Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri (PDGF) süper ailesinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Aynı zamanda VEGF ailesinin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PlGF) adı verilen altı üyeden meydana geldiğini göstermiştir.[24,25] (Şekil-11)



Şekil-11: VEGF ailesi ve reseptörleri[26]

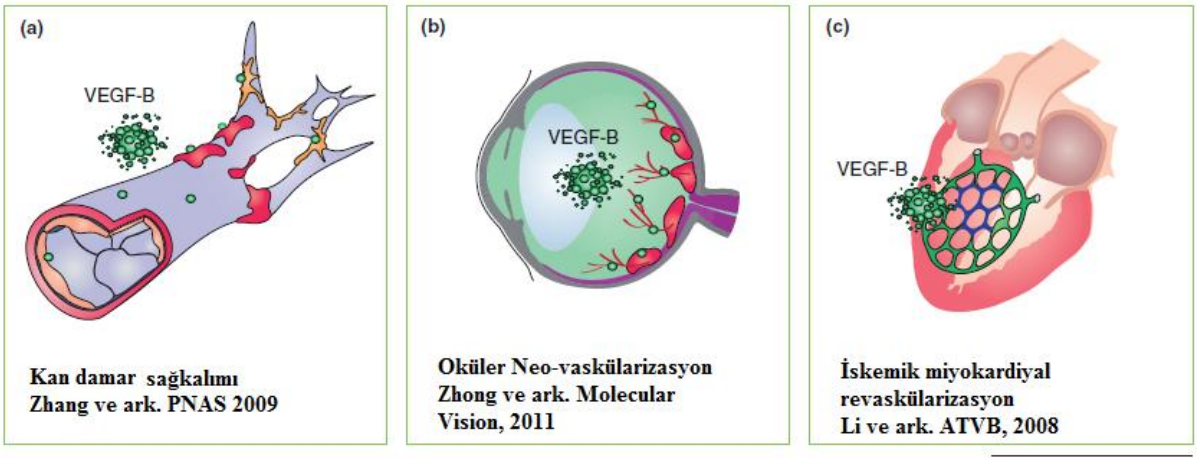
VEGF'nin cDNA dizileri salgı aktivitesini düzenleyen hidrofobik ve sekretuar bir baş olan N-terminal dizilerinde şifrelenmiştir.

VEGF-A geni, kromozom 6p21.3'teki lokalizasyonda kodlanmıştır. Aynı zamanda Human-VEGF olarak bilinir. VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bunlar $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{183}$, $VEGF_{189}$ ve $VEGF_{206}$ olarak isimlendirilmişlerdir ve isimlerindeki sayılar içerdikleri amino asit sayılarını göstermektedir.[27,28] (Şekil-12) Bu izoformlardan $VEGF_{121}$ hariç, hepsi heparine bağlanmaktadır. $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$ ve $VEGF_{165}$ salgılandığında kolayca diffüze olur ve erimiş formları sıvılarda saptanabilir. $VEGF_{189}$ ve $VEGF_{206}$ ise salgılandığı halde hücre aracılı olarak kalır ve varlıkları testlerle kolayca saptanamaz. $VEGF_{206}$, VEGF'ün orijinal karakteristik formu olup, yaklaşık 34-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir[16,18]. $VEGF_{165}$, $VEGF_{121}$'in aksine hücre yüzeyindeki veya ekstrasellüler matriksteki proteoglikanlara ve heparine bağlanan formdur. $VEGF_{189}$ heparin ve heparan sülfat proteoglikanına bağlanmayı tetikler ve artırır. Anjiyogenezi sağlamakta ve damarsal geçirgenliği artırmada çok önemlidir. Yeni damar oluşumu ile hematojen metastazlarda rol oynar.[29]



Şekil-12: Vasküler endotelyal büyüme faktörünün transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesi[30]

VEGF-B, başlangıçta VEGF-A ile %23'ü homolog olan bir sinyal peptidinin bölünmesinden sonra, 186 amino asitli bir protein olarak oluşur. Sonra, ekson-6'da oluşan bir alternatif uç birleştirme (splicing) ile tamamen farklı terminal COOH- grupları içeren 167 amino asitli bir proteine dönüşür.[31] VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır (Şekil 13).[32]



Şekil-13: VEGF-B'nin pro-anjiyogenik etkileri[27]

VEGF-C, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 amino asitten oluşmuştur. VEGF-C 4. kromozomda 4q34.1-q34.3 lokalizasyonunda bulunan gen tarafından kodlanmaktadır. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiyogenez) rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelyal hücrelerde mitojenik etki yapar.[33] Yapılan bir deneyde, transgenik farenin derisinde VEGF-C'nin fazla salgılanmasının endotel hücre proliferasyonuna ve lenfatik damarlarda genişlemeye neden olduğu, bununla beraber vasküler doku oluşmadığı rapor edilmiştir.[34] VEGF-C'nin Kaposi sarkomunda önemli oranda rol aldığı görülmüştür.[35]

VEGF-D, 334 amino asitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında aynı amino asitler içeren bir proteindir. X kromozomunda Xp22.31 lokalizasyonunda bulunan gen tarafından kodlanmaktadır. C-terminal uçlarında zengin Sistein domain'leri içerir. Bu da VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzer işlevler yapar.

VEGF-E, VEGF-A ile amino asit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür.

PlGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 aminoasite sahiptir. Daha sonra yeni amino asitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında

benzeşen ve 152 aminoasit içeren son şekli oluşur. VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir.

Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır.[36] Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde oldukça yükselir. Yine VEGF yetişkinde akciğer alveoler hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir.[37] Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'ün demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arteriolleri çevreleyen fibroblastlarda, akciğer bronşiyol epitelinde, koroid pleksus epitelinde ve renal glomerül viseral epitelinde varlığı gösterilmiştir.

VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü (KGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekrozis faktör-α (TNF-α), transforming büyüme faktörü- β1 (TGF- β1) ve interlökin- β1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Böylece bu maddelerin mitojenik olmadığı, VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi artırdıkları gösterilmiştir.

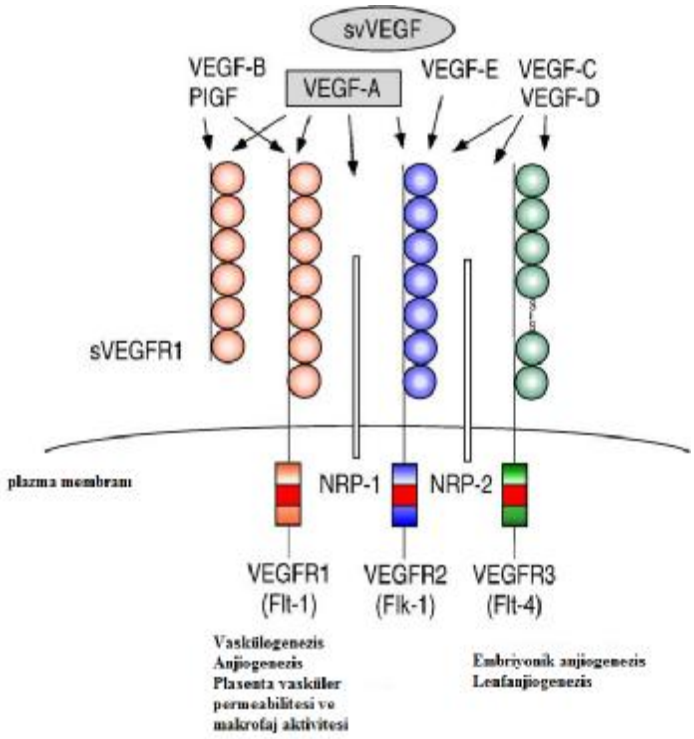
Ayrıca protein büyüme faktörlerinin haricinde, forbol esterleri ve prostoglandin E_2 (PGE_2) gibi bazı küçük mediatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri görülmüştür.[38]

Hipoksi, belki de, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiyogenezi başlatan en etkili stimuluslardan biridir. Buna örnek olarak büyüyen tümörlerin VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir[24]. Tümörlerin hipoksik merkezleri oluşması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilebilir. Yine tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'ü artırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmiştir. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, CO tarafından da inhibe edilmektedir.[39] Hipoksinin yanında azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır.

4.2.2.2. VEGF Reseptörleri

VEGFR-1

VEGFR-1 ve VEGFR-2, yüksek affiniteli VEGF reseptörleridir ve VEGFR-3 ile birlikte reseptör tirozin kinazların flt (Fms-like tyrosine kinase-1) alt-ailesini oluştururlar (Şekil-14).



Şekil-14: VEGF ailesinin bağlandığı tirozin kinaz reseptörleri[40]

Yaklaşık 180 kDa'luk bir glikoprotein olan VEGFR-1 tanımlanan ilk VEGFR'dir ve VEGF'ye karşı en yüksek affiniteye sahiptir.[41] VEGFR-1, VEGF dışında PIGF ve VEGF-B gibi benzer büyüme faktörleri tarafından da paylaşılmaktadır. Farelerdeki ekspresyonu erişkinlerde ve embriyolarda endotel hücrelerine sınırlıdır. Bunun dışında ayrıca iyileşmekte olan cilt yaralarındaki neovaskülarizasyonda da eksprese edilmektedir. Sessiz (inaktif durumdaki) endotel hücrelerinde olduğu kadar prolifere olan endotel hücrelerinde de VEGFR-1 mRNA'sının bulunması, bu reseptörün endotelin sürdürülmesinde sürekli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. VEGFR-1 vaskülogenez süresince esansiyeldir: VEGFR-1 oluşturamayan fareler embriyonik dönemde 8,5. günde ölmektedir. Bu farelerde hem embriyonik hem de embriyo dışı yerlerde endotel hücreleri normal bir şekilde forme olabilmekte ancak doğru bir şekilde bir araya gelerek kan damarları halinde organize olamamaktadırlar. Bu defekt, mezenkimal hücrelerin hemanjiyoblast haline gelebilmek için VEGFR-1 'in gerekli olduğunu göstermektedir.

VEGFR-1'in VEGF stimulasyonuna yanıt olarak gerçekleşen tirozin fosforilasyonunun tespit edilmesi zordur ve endotel hücrelerinde bu reseptör aracılığıyla düzenlenen belirgin, görünür direkt proliferatif, migratuar ya da sitoskletal (hücre iskeleti ile ilgili) etki söz konusu değildir. Ancak VEGFR-1, endotel hücrelerinde doku faktörünün, uPA'nın ve plazminojen aktivatör inhibitörü-I'in (PAI-1'in) upregüle edilmiş ekspresyonundan da sorumlu tutulmuştur. VEGFR-1'in diğer hücre tiplerinde başka monositlerde doku faktörünün indüklenmesi ve kemotaksis ve vasküler düz kas hücrelerinde matriks metalloproteinaz ekspresyonunun artırılması da rol alabilir.

VEGFR-2

VEGFR-2 (kinaz-insert-domaini-içeren reseptör; KDR) 200 – 230 kDa'luk yüksek affiniteli bir VEGF reseptörüdür.[42] Ayrıca VEGF-C ve VEGF-D için de reseptör görevi yapabilmektedir. İnsanlarda, tirozin kinaz reseptörleri için yapılan endotelyal cDNA taramaları sırasında tanımlanan bu reseptör, daha önceden keşfedilmiş olan fare fetal karaciğer kinazı-I (flk-1) ile %85 oranında ortak bir sekans kimliğine sahiptir. VEGFR-2 oluşturamayan fareler, endotelyal ve hematopoietik prekürsörlerin gelişiminde çeşitli defektler göstererek embriyoda 9,5. günde ölmektedir. Bu tür prekürsör hücrelerde olduğu kadar endotel hücrelerinde, başlangıç aşamalarında bulunan hematopoietik kök hücrelerde ve umbilikal kordun stromasında normalde VEGFR-2 reseptörleri eksprese edilmektedir. Ancak inaktif durumda bulunan erişkin damarlarında VEGFR-2 mRNA'sı down-regüle edilmiş gibi görünmektedir. VEGFR-1 her ne kadar VEGF için daha yüksek bir affiniteye sahip olsa da, VEGFR-2 ligand ile bağlandıktan sonra Tirozin ile çok daha etkin bir şekilde fosforile edilir. Sonrasında intrasellüler pek çok yolak aktive olur ve endotel hücrelerinde mitojeneze, kemotaksise ve morfolojik değişikliklere yol açar.

VEGFR-3

Vasküler endotel büyüme faktörü reseptör-3 molekülü yüksek oranda glikolize olmuş, klas III hücre yüzey tirozin-kinaz reseptörüdür. Diğer klas III tirozin kinaz reseptörü olan FMS ile ilişkili olduğu için 'fms- like tyrosine kinase 4' (Flt-4) olarak da isimlendirilir. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ailesinin A, B,C, D, E, F ve Plasental büyüme faktörü (PlGF) olmak üzere yedi üyesi bulunmaktadır. VEGF ailesi, vaskülogenez veya fizyolojik patolojik anjiyogenezde endotel hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde çok önemli bir regülatör rol oynamaktadır.[43,44] Bu büyüme faktörlerine ait VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 olarak adlandırılan üç adet reseptör bulunur. Bunlardan VEGFR-3, yalnızca endotel hücrelerinde bulunduğu düşünülen bir tirozin kinaz reseptörüdür ve ligandları büyüme faktörlerinden VEGF-C

ve VEGF-D'dir. Alitalo ve ark'nın 2002'de VEGF-C'yi lenfanjiyojenik bir faktör olarak tanımlamalarından sonra[45] VEGFR-3 lenfatik damarlara spesifik belirteçlerden biri olarak kullanılmaya başlanmıştır. VEGF-C, D / VEGFR-3 sinyal iletim sisteminin, lenfatik sisteme spesifik kabul edilerek çok fazla araştırmaya konu olması, VEGFR-3'ün de günümüzde üzerinde en fazla çalışma yapılan lenfatik damar endotel reseptörü olmasına neden olmuştur.[46]

VEGFR-3, LYVE-1'in aksine, ilk oluşan primitif kan ve lenf damarlarında yüksek oranda eksprese olur ve bu nedenle her iki damar yapısının gelişiminde kritik rol oynar.[47] VEGFR-3, lenfatik endotel hücrelerinin proliferasyonu ve lenfatik damarların şekillenmesinde kullanılan moleküler mekanizmaların merkezinde yer alır. Erken fetal dönemde kan damarları ve mezenkimal dokuda sekrete olur, fetal dönemin ortasında venöz ve lenfatik endotelde lokalize olarak arteriyel damar endotelinden kaybolur.[48] VEGFR-3, geninin inaktive edildiği çalışmalarda, erken fetal dönemde kardiyovasküler sistemde ölümcül anomalilerin ortaya çıktığı tespit edilmiş buna bağlı olarak da vasküler sistemin, lenfatik sistemden önce geliştiği sonucuna varılmıştır.[49] Transgenik fare modelinde solubl VEGFR-3-Ig füzyon proteininin fazla miktarda sekrete olması sağlandığında, deride dermal lenfatiklerin oluşmadığı, daha derinlerde bulunan lenfatik damarların ise hipoplastik olduğu görülmüştür.[50] VEGFR-3'deki *missens* mutasyonlar herediter lenfödem ile ilişkilendirilmiş benzer bir durumun fare lenfödem modelinde de olduğu gözlemlenmiştir.[51,52,53] Diğer bir çalışmada ise deneysel, fare kornea transplantasyon modeli oluşturulmuş ve VEGFR-3'ün adaptif immunitede görev aldığı sonucuna varılmıştır.[54]

VEGFR-3'ün lenfatik endotele spesifik olduğunu destekleyen araştırmalar bulunmakla birlikte[55] farklı yerlerde eksprese olduğunu gösteren çalışmalarda mevcuttur. 2000 yılında Partanen ve ark'nın VEGFR-3 antikoru kullanarak yaptığı çalışmada VEGFR-3'ün başka endotel hücrelerinde de eksprese olduğu gösterilmiş ve fenestre kapillerlerin bulunduğu kemik iliği, dalak, karaciğer sinüzoidleri, böbrek glomerülleri, hipoplazik tiroid, paratiroid, adrenal bez, koroid pleksus endotel hücrelerinde de VEGFR-3 ekspresyonu belirlenmiştir. VEGFR-3'ün, tümör dokusu içinde yeni damarların oluşumu sırasında prolifere kan kapillerinde, yara granülasyon dokusu içinde ve fenestrasyon özelliğine sahip bazı kan damarlarında da eksprese olduğu gösterilmiştir.[56,57] Bu nedenlerle VEGFR-3, tek başına lenfatik damar belirteci olarak kullanılması için gerekli olan özgüllüğe sahip olmadığı düşünülmektedir.[58]

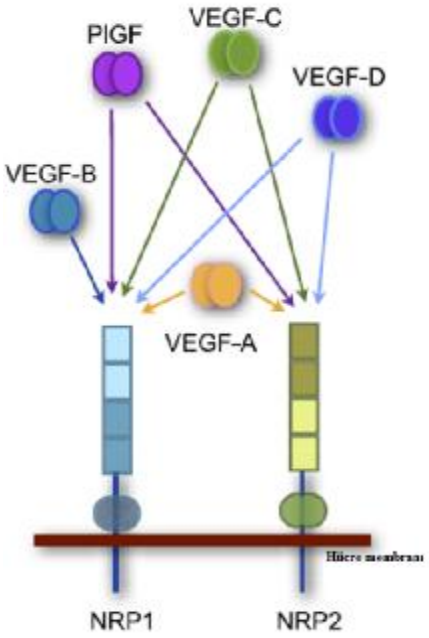
VEGFR-3 ile ligandları VEGF-C ve D'nin tümörün lenfatik yayılımı ile ilgili olduğunu gösteren birçok deneysel model ve klinikopatolojik çalışma bulunmaktadır. Malign hücre dizilerinde yapılan araştırmalar lenfatik yayılımın lenfanjiyojenik büyüme faktörlerinden direk etkilendiğini göstermektedir.[59,60,61,62] Ancak, altta yatan moleküler mekanizmalar ve tümör

lenfanjiyogenezinin metastazdaki rolü açıklığa kavuşturulamamıştır. VEGFR-3 ile ilgili mRNA düzeylerinin ölçümüne dayanan kantitatif bir çalışmada, kolorektal kanserlerde lenfatik metastazla arasında korelasyon gösterilmiş[63] ancak VEGFR-3'ün makrofajlarda ve tümör kapillerinde de eksprese olması ölçülen düzeylerin lenfatik metastazla olan ilişkisini göstermede yeterli olup olmadığının sorgulanmasına neden olmuştur.

VEGF Benzeri Reseptörler

Nörofilinler

I^{125} işaretli VEGF kullanılarak yapılan çapraz-bağlantı denemeleri, VEGFR'lere karşılık gelmeyen VEGF reseptörlerinin mevcut bulunduğuna işaret etmektedir. Bu reseptörler, VEGF'nin ekzon 7 tarafından kodlanan domain'ini tanırlar ve dolayısıyla da $VEGF_{121}$'e değil ama $VEGF_{165}$'e bağlanırlar. Bu tür reseptörlerden biri nörofilin-1'dir (NRP-1) (Şekil-15). NRP-1, Kollapsin/Semaforin ailesinin belirli üyeleri için nöronal bir reseptör olarak daha önceden karakterize edilmiş olan 120 – 130 kDa ağırlığında bir glikoproteindir. NRP-1'in tümör kökenli hücreler ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere çok geniş bir doku dağılımı mevcuttur. Embriyonik nöronlar üzerinde bulunan NRP-1 akson büyümesinin kontrolünden ve Semaforin ailesine mensup olan belirli üyelerin bağlanması yoluyla akson büyümesine kılavuzluk etmekten sorumlu tutulmaktadır. Fare embriyolarında yapılan çalışmalar NRP-1'in anjiyogenezde ve vaskülogenezde de bir rolünün olduğunu düşündürmektedir. Aşırı NRP-1 ekspresyonu embriyoda 17,5. günde aşırı derecede fazla kan damarları oluşturarak ölüme yol açmaktadır. Bu kan damarları dilate ve hemorajiye yatkın durumdadırlar. NRP-1 defektif fareler embriyoda 10,5–12,5. günler arasında kardiyovasküler anomaliler nedeniyle ölmektedir.



Şekil-15: Nörofilin 1 ve 2 reseptörleri[31]

NRP1, $VEGF_{165}$ için bir ko-reseptör şeklinde etki ederek bu izoformun VEGFR-2'ye bağlanmasını ve biyoaktivitesini artırmaktadır.[64] Endotel hücrelerinde indirekt etkili bir anjiyogen olan TNF-α tarafından hem NRP-1 hem de VEGFR-2 upregüle edilmektedir. NRP-1'in sadece çok kısa bir intrasellüler domain'i vardır ve VEGFR-2'nin bulunmadığı hücrelerde $VEGF_{165}$'e karşı yanıtlar gözlenmemektedir. Kemik iliği stroma hücrelerinde $VEGF_{165}$ bağlanmasının eritropoietin düzeylerini ve Flt-3 ligandı ekspresyonunu artırdığı göz önüne alındığında NRP-1 sinyallemesi hematopoeze de katkıda bulunuyor olabilir.

NRP-1 reseptörü anjiyogenez, vaskülogenez ve sinir sisteminin gelişimi gibi çok çeşitli süreçlerde rol oynamaktadır. $VEGF_{165}$ periferik sinir sisteminde bulunan hücrelerin proliferasyonu ve sağkalımı ile birlikte aksonal büyümeyi stimüle eden nörotrofik bir faktör şeklinde etki edebilmektedir.[65]

4.2.2.3. Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF)

Anjiyogenez, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim ve tümörogenezde yer alan büyüme faktörleri ailesidir.[66] FGF ailesinin moleküler ağırlığı 16-18 kDa arasındadır.

Fibroblast büyüme faktörlerinin bilinen iki esas grubu vardır: asidik FGF (FGF-1) ve bazik FGF (FGF-2)[67]. FGF faktörleri heparine yüksek affinite gösterirler ve bu yüzden heparin bağlayan büyüme faktörü olarak isimlendirilirler. Birçok hücrenin ve dokunun proliferasyon ve

farklılaşmasında FGF'ler anahtar rol oynarlar.[68] İnsanlarda 22 adet FGF ailesi üyesi tanımlanmıştır.

Fibroblast büyüme faktörü reseptörü ailesinin 4 üyesi bulunmaktadır; FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4. Genellikle mitojen olarak etki göstermelerine rağmen düzenleyici, morfolojik ve endokrin etkileri de vardır. FGF'lerin gelişim sırasındaki görevleri, mezoderm indüksiyonu, antero-posterior aksın belirlenmesi, ekstremitelerin oluşumu, nöral indüksiyon, beyin gelişimi, dokularda anjiyogenez, keratinosit organizasyonu ve yara iyileşmesini içerir.[69] FGF-2 veya bazik FGF, yara yerinde hasarlanmış endotel hücrelerinden ve makrofajlardan salgılanır ve FGF-2 aktivitesi bloke edilirse yara anjiyogenezi neredeyse tamamen durur.

Kan damarı oluşumunu stimüle ettikleri kadar yara iyileşmesinde de önemli rol alırlar. FGF-1 ve FGF-2 anjiyogenezi ve fibroblastların proliferasyonunu stimüle ederek, yara iyileşmesinin erken evresinde yara kavitesini, boşluğunu dolduran, granülasyon dokusunu oluştururlar. FGF-2 hasarlı endotel hücrelerinden salınarak yara bölgesinde arttığı gösterilmiştir.

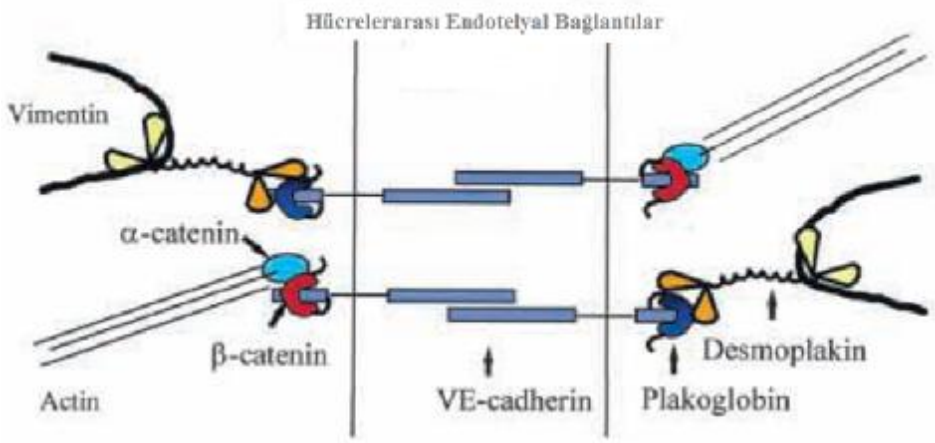
4.2.2.4. Kollajen-1

Bağ dokunun esas proteini ve memelilerde en çok bulunan protein olan kollajen-1, insan vücudunda da en çok bulunan kollajen tipidir. Vertebralılardaki dokuların yapısal bütünlüğü için gerekli majör fibriler ekstrasellüler bir proteindir. Tip 1 kollajenin sentezi, yara iyileşmesi doku morfogenezi ve fibrozisi içeren birçok biyolojik olayda artar ve TGF-β, IL-1, TNF-α, vitamin D ve C gibi birçok ekstrasellüler sinyal molekülü tarafından normal ve patolojik durumlarda sentezi kontrol edilir. Skar dokusunda bulunur, tamir ile dokunun iyileşmesinde en son üründür. Tendon, deri, arter duvarında, miyofibrillerin endomisyumunda, fibrokartilajda ve kemik ve dişin organik parçalarında da bulunur.[70] Kutanöz doku defektlerinin yeniden yapılanmasında tip 1 kollajen, dermisin esas yapısal bileşeni olarak merkezi bir role sahiptir. Deneysel granülasyon dokusunun oluşumunun 7. gününde tip 1 kollajen histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak saptanabilir. Bununla beraber yeni sentez edilen kollajen ile önceden bulunan kollajen arasında ayırım yapmak skar dokusunun oluşumunun takibi için önemlidir.[71]

4.2.2.5. Desmoplakin

Lenfatik endotel hücrelerinin birbirlerine yapışma yerlerindeki sitoplazmik ankor proteinleridir.[72,73] İntermediyan filamentlerle plazma membranlarını birbirine bağlarlar. 1999'da

Sawa ve ark. tarafından küçük lenfatik damarların belirteci olduğu, fakat daha büyük lenfatik damarlarda eksprese olmadığı gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda vasküler endotel hücre kültürlerinde saptanmasına karşın 2001'de Ebata ve ark. özellikle lenfatik kapillerde eksprese olduğunu, lenfatik spesifik bir belirteç olarak kullanılabileceğini doğrulamıştır.[74] (Şekil-16)



Şekil-16: Lenfatik spesifik belirteçler[75]

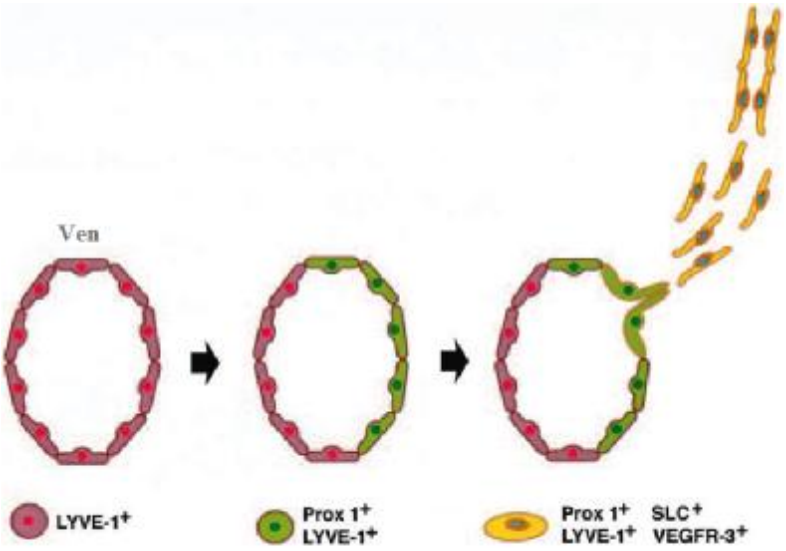
4.2.2.6 Podoplanin

Glomerüler filtrasyonu düzenleyen müsin tipi bir transmembran glikoproteinidir. Esas olarak renal korpüsküllerde bulunan podosit membran proteini olarak tanımlanmış, in vivo ve in vitro çalışmalarda sadece lenfatik endotel hücrelerinde tespit edilmiştir.[76] Biyolojik fonksiyonu bugün için tam olarak bilinmiyor olsa da in vitro çalışmalarda, hücre iskeletini oluşturan moleküllerden biri olan aktini yöneterek hücre hareketlerinde görev aldığı gösterilmiştir.[77] Podoplanin ekspresyonu bulunmayan farelerde lenfödem geliştiği, lenf damarlarının dilate olduğu, sıvı transportunun bozulduğu bu nedenle doğumda solunum yetmezliği ile öldükleri gösterilmiştir.[78] 2005 yılında Schacht ve ark. D2-40 antikorunu tanımlamış ve Podoplanin'in endotel dışındaki hücrelerden de eksprese olduğunu göstermişlerdir. Podoplaninin skuamöz hücre karsinomlarında ve bazı germ hücreli tümörlerde de eksprese olması tümör progresyonu üzerinde rolü olabileceğini düşündürmektedir.[79, 80]

4.2.2.7 Prospero-Related Homeobox 1 (Prox-1)

Drosophilia melonagaster'de bulunan prospero geninin homoloğu olarak izole edilmiş bir nükleer transkripsiyon faktörüdür.[81] Embriyoda lenfanjiyogenezin başlaması için juguler ven endotel hücrelerinin bazılarında Prox-1'in eksprese olması zorunluluktur. Prox-1'i genetik olarak

çıkarılmış farelerde lenfatik filizlenmenin etkilenmediği fakat lenfatik sistemin de gelişimini tamamlayamadığı tespit edilmiştir.[82,83] Aynı zamanda Prox-1 yokluğunda, LYVE-1'in de içinde bulunduğu lenfatik endotele özgü belirteçlerin ekspresyonu yapılamaz. Buna karşın kan damarlarının belirteçleri eksprese olmaya devam eder. Yani, vasküler belirteçlerden, lenfatik belirteçlerin ekspresyonuna geçişi sağlayan Prox-1'dir.[84,85] VEGFR-3 vasküler endotel hücrelerinde lenfanjiyogenez başlamadan öncede eksprese olmakta, Prox-1 ekspresyonundan sonra ise lenfatik endotele farklılaşan endotel hücrelerindeki ekspresyonu artmakta, vasküler hücrelerdeki ekspresyonu ise azalmaktadır.[86] Fakat Prox-1'in ekspresyonunu tetikleyen mekanizmalar hala bilinmemektedir.[87] (Şekil-17)

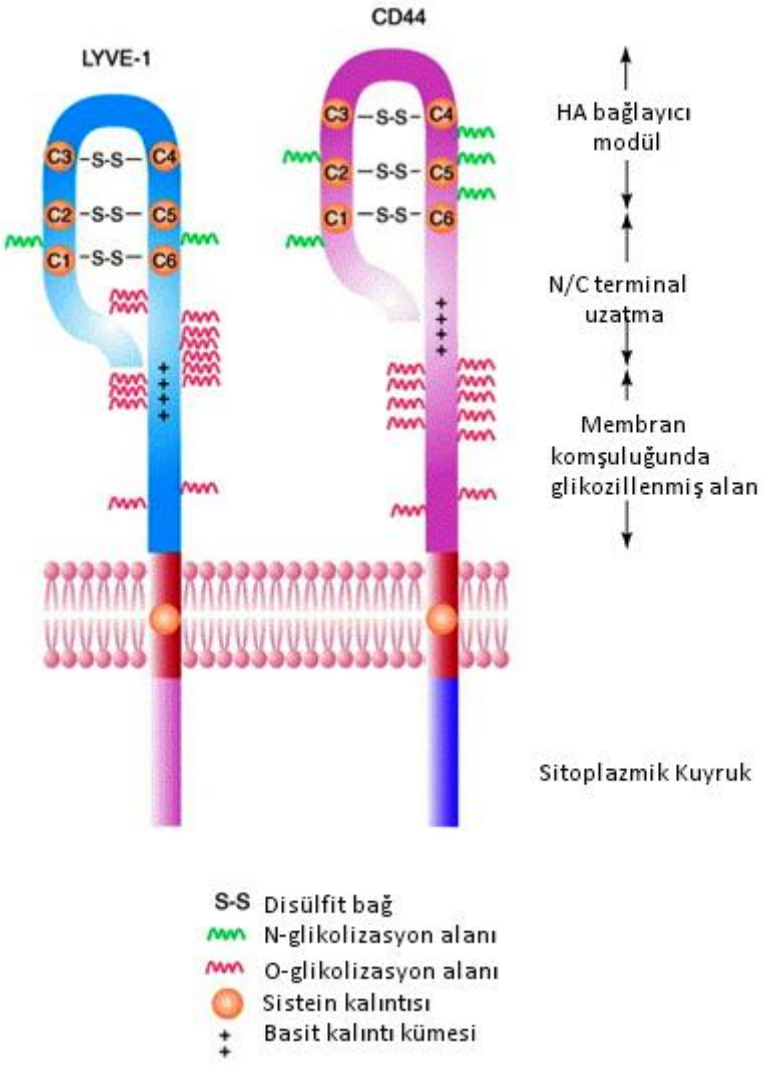


Şekil-17: Lenfatik damar embriyolojisi[88]

4.2.2.8 LYVE-1

Tip1 integral membran glikoproteini ve hiyaluronik asit (HA) reseptörüdür.[89] Yapısal olarak diğer bir HA reseptörü olan, CD44 ile benzerlik gösterir, 322 aminoasitten oluşur, bunun 21 tanesi transmembran kısmında ve 63 tanesi sitoplazmik kuyrukta yer alır. CD44'de olduğu gibi N-terminal ucunda, glikolize olmuş 'link modül' denilen kısım bulunur ve bu özellik bütün 'link süper ailesi' ne ait proteinlerde mevcuttur. LYVE-1 cDNA'sı, Expressed Sequence Tag (EST) veri tabanında, CD44 aminoasit dizilimi üzerinden araştırılarak tanımlanmıştır.[90] CD44 ile LYVE-1 , %43 oranında benzerlik gösterir ve bu benzerlik daha çok HA-bağlanan kısım olan link modülde görülmektedir.[91, 92]

Link modül, transmembran başlangıcı veya sap olarak adlandırılan kısımla devam eder ve bu bölüm yoğun bir şekilde O glikolizasyonla modifiye olmuştur. Sap kısmı proteinin kütlesine en fazla katkıda bulunan kısımdır, 20 kD'dan daha büyüktür ve çift oluşturmamış bir sistein aminoasiti (Cys101) içerir. Nightingale T ve Jackson DG'a göre bu sistein molekülü, intermoleküler disülfit köprüleri oluşturarak iki LYVE-1'in dimerik bir yapı oluşturmasına katkıda bulunuyor olabilir. Fakat LYVE-1'lerin kovalent bağlanarak dimerik bir yapı oluşturmasının fizyolojik önemi var mıdır sorusu henüz açıklığa kavuşmamıştır.[93] CD44 ile en fazla benzerliğin bulunduğu link modül, hidrofobik çekirdeği saran iki adet helezondan oluşmaktadır ve bunlar disülfit köprüleri ile stabilize edilirler. Dört adet merkezi sistein aminoasiti (C2- C5) ve daha aşağı kanat kısmında ise iki adet sistein aminoasiti (C1 ve C6) bulunur, bunlar disülfit köprüleri ile birbirine bağlanmıştır. Bu kısım LYVE-1 ve CD44'ün her ikisinde de birbirinin aynıdır ve aminoasit dizilimi olarak %57 benzerlik gösterirler. CD44'de link modülde çeşitli mutasyonlar saptanmasına karşın LYVE-1'de herhangi bir mutasyon tanımlanmamıştır. İki molekül bu kadar çok benzerlik göstermesine karşın, bir takım farklılıklar da gösterirler ve yapısal farklılıklar esas olarak en çok Sap kısmında bulunur. Bu bölüm her iki molekülde de O-glikolizasyonla modifiye olmuştur fakat LYVE-1'de, CD44'e göre daha kısadır. Bu moleküller arasındaki bir diğer fark da link modüldedir. CD44'de burada beş adet siyalize N glikan bulunurken, LYVE-1'de bu sayı ikidir (Şekil-18).



Şekil-18: LYVE-1 moleküler yapısı[94]

LYVE-1, link modül özelliğinden dolayı, link süper ailesinin bir üyesi olarak kabul edilmekte ve bu nedenle HA reseptörü olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Bu görüşü desteklemek amacıyla yapılan çalışmada transfekte edilmiş hücrelerden eksprese olan LYVE-1'in fluoresanla boyanmış HA'e bağlandığı saptanmış ve solubl olarak sadece ekstrasellüler kısmı eksprese olduğunda ise Fc füzyon proteininin hem biotinlenmiş solubl, hem de immobilize yüksek moleküler ağırlıklı HA'e bağlandığı saptanmıştır. Hiyaluronik aside olan spesifitesini ölçmek için moleküller arası bağlanma kompetisyonu prensibine dayanan '*competetive binding* ' çalışmaları oluşturulmuştur. Bunun için heparan sülfat ve kondroitin sülfat gibi çok saf glikozaminoglikanlar kullanılarak HA ile yan yana konulmuş ve LYVE-1'in HA'e olan özgüllüğünün CD44'ten daha fazla olduğu görüşüne varılmıştır. Bununla birlikte LYVE-1'in HA'e bağlanma affinitesi kesin olarak belirlenememiş, Fc füzyon protein HA-bağlanma eğrisi

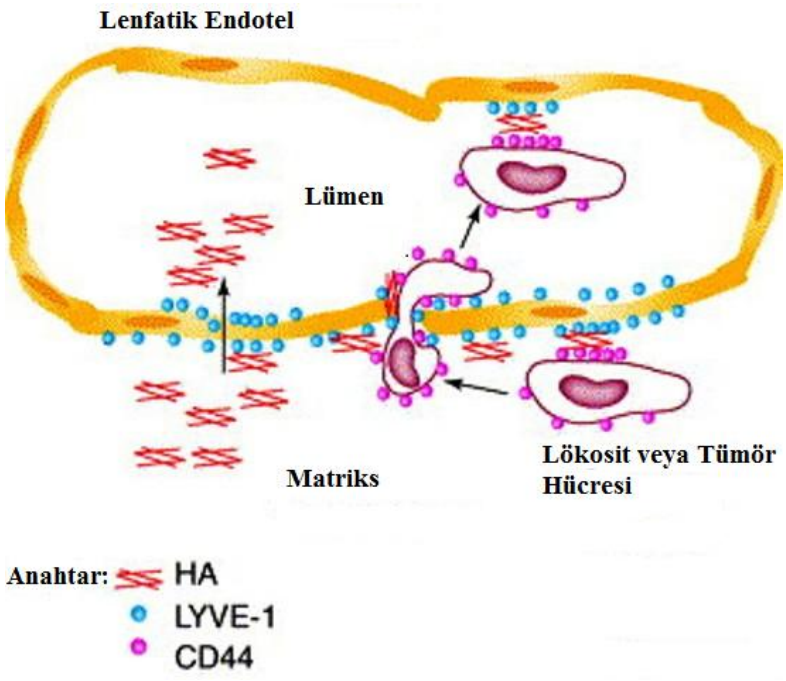
temel alınarak karşılaştırıldığında CD44'e benzer olduğu (yaklaşık 10^{-4} Kd) gözlemlenmiştir.[95] Ancak, LYVE-1'in hiyaluronik aside bağlanma affinitesine ait daha güvenilir bir öngörü için monometrik LYVE-1 preparatları ile ölçüm yapılması gereklidir. LYVE-1'in moleküler yapısı kadar hangi dokularda sentezlendiği önemlidir. Lenfatik endotel hücrelerinde ve lenf nodu sinüzoidlerinde spesifik olarak eksprese olduğu ilk olarak proteinin kendisini de tanımlayan Banerji ve ark. tarafından 1999 yılında immumohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Kan damar endotelinde saptanamamış, deri, intestinal ve sekonder lenfoid organlarda bulunan lenfatik damar endotelinde ise karakteristik olarak boyanma göstermiştir. Daha sonraki çalışmalarda fare bağırsak ve pankreatik dokularında immunoelektron mikroskobik çalışma ile bu reseptörün lenfatik damarların hem luminal, hem de ekstraluminal yüzeyinde bulunduğu tespit edilmiştir.[96]

Embriyogenez sırasında LYVE-1'in kardinal vende, PROX-1 gibi kendiliğinden, ilk lenfatik kesenin tomurcuklanmasından hemen önce eksprese olmaya başladığı, erişkin dönemde ise lenfatik damar ve sinüzoidlerde sekrete olurken duktus torasikusta bulunmadığı gösterilmiştir.[97] Ayrıca devamlılık göstermeyen insan ve fare karaciğer sinüzoidlerinde, insan dalak sinüzoidlerinde bol miktarda bulunmaktadır. Normal kan damarlarında eksprese olmamasına karşın lenfatik endotelde eksprese olması nedeniyle, lenfatik belirteç olarak kullanılabileceği anlaşılmaktadır.[98]

Bu bulgular farklı laboratuarlarda yapılan kapsamlı araştırmalarla desteklenmiştir. Ayrıca baş–boyun epitelyal hücreli tümörleri,[99,100]deri melanomları,[101,102] tiroid,[103] prostat,[104] pankreas,[105] meme,[106,107] serviks kanserleri,[108] erken evre mide[109] ve erken evre kolon[110] kanserlerinde yapılan çeşitli insan doku çalışmalarında, lenfatik damarlarla kan damarlarını ayırmak için kullanılabilecek güvenilir bir belirteç olduğu kanaatine varılmıştır. Bununla birlikte LYVE-1 ekspresyonunun bazı durumlarda, örneğin inflamasyona yanıt olarak azalması söz konusu olabilmektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda tümöre eşlik eden lenf damarlarında LYVE-1'in gösterilememesi[111, 112] LYVE-1 / Podoplanin veya LYVE-1 / PROX-1 gibi birden fazla belirteçle çalışmanın önemini ortaya koymuştur.

LYVE-1'in, son zamanlarda yapılan çalışmalarda inflamasyon olan veya tümör tarafından infiltre edilmiş doku içinde bulunan, makrofaj benzeri hücreler üzerinde de eksprese olduğu belirlenmiştir (Şekil-19)[85]. Bu bilginin önemi ve doğruluğu korneal neovaskülarizasyon sırasında oluşan lenfanjiyogenez[113] ve transplant böbrek rejeksiyonu çalışmalarıyla desteklenmiştir. Bu hücrelerin LYVE-1+/CD68+ şeklinde işaretlendiği ve yeni oluşan lenfatik damarların içinde bulundukları gösterildi. Bu LYVE-1+ makrofaj benzeri hücrelerin, belki de kemik iliğinden

kaynaklanan progenitör hücreler olabileceği ve VEGF-C'nin uyardığı lenfanjiyogenez sırasında lenfatik endotel hücrelerine dönüştüğü bir görüş olarak ileri sürülmüştür.



Şekil-19: Lenfatik endotel ve tümör hücresi üzerinde LYVE-1 ekspresyonu[85]

LYVE-1'in nereden eksprese olduğu kadar, görevinin ne olduğu hakkında da çeşitli görüşler bulunmaktadır. HA'e bağlandığına göre ya hiyaluronik asit metabolizmasında rol alıyor veya lökositlerin lenf damarları veya lenf nodları içindeki gidiş-gelişlerini düzenliyor olabilirler. Bu konuyla ilgili yapılan araştırmalardan bazı olasılıklar ortaya çıkmıştır. LYVE-1, HA taşıyıcısı rolüyle, hiyaluronik asit katabolize edilmek üzere endotel hücreleri tarafından alınmasına aracılık ediyor veya HA'nın afferent lenfatik damar lümenine geçişini sağlayarak, sonrasında lenf nodları tarafından tutulup, degrade edilmesinde rol alıyor olabilir. Bu her iki durum, LYVE-1 ile transfekte edilmiş fibroblastlarda, yüksek molekül ağırlıklı HA'i LYVE-1'in internalize ettiği gösterilerek desteklenmiştir. Bu internalizasyon CD44'de görüldüğü gibi klatrin veya kaveolin aracılı yolakları kullanarak gerçekleşmektedir. Weigel ve ark'nın 2003 yılında yaptığı çalışma, HA'in lenf nodları tarafından alınarak degrade edilmesine LYVE-1'in aracılık ettiği görüşünü destekler niteliktedir.[114]

Glikozaminoglikanların sinüzoidlerinden geçişi rastgele ve herhangi bir reseptörle ilişkili değilken, Hiyaluronik aside tamamen spesifik ve lenfatik endotelin hem luminal hem de bazolateral kısmında eşit olarak bulunduğu elektron mikroskopla gösterilmiş olan LYVE-1

reseptörünün varlığı, LYVE-1'in HA'nın hücre içine girişindeki rolüyle uyumlu görünmektedir. Buna karşıt görüş olarak öne sürülen; lenfatik damarlar zaten birçok makromoleküle geçirgen ve endotel hücreleri arasında da gevşek bağlantılar varken neden HA, spesifik bir reseptöre ihtiyaç duysun sorusuna cevap Sabaratnam'dan gelmiştir. Sinoviyal sıvıdan HA'nın, lenfatik damarlara geçişiyle ilgili yaptığı araştırmada, HA'nın sinoviyal aralıktan, interstisiyel matrikse herhangi bir aracı moleküle ihtiyaç duymadan geçebildiğini ancak lenfatik damarlara kendiliğinden, aracı LYVE-1'in göreviyle ilgili bir başka bir tartışmada hücre adezyonuna aracılık edip- etmediği konusudur. Plazma membranında yüksek oranda eksprese olduğuna göre, önemli bir yapısal görevde üstlenmesi gerektiği düşünülmektedir. Belki de esas görevlerinden bir tanesi de, hiyaluronik asidi aracı olarak kullanarak, hücrelerin lenfatik damarlara girişlerini, göç etmelerini sağlamaktır. Bu olay moleküler düzeyde tam olarak açıklığa kavuşturulmamasına rağmen lenfatik damarların CD44 eksprese eden lökositleri taşıdığı ve CD44'ün HA'nın diğer endotellere tutunmasına aracılık ettiği bilinmektedir.

LYVE-1 de, bu göç eden hücrelerin, lenfatiklere giriş-çıkışını veya lenfatiklerdeki yolculuğunu, hiyaluronik asidi geçici olarak luminal yüzde tutarak kontrol ediyor olabilir. Bu görüş, 96'lık doku kültür plakalarında, LYVE-1 tarafından tutulmuş HA moleküllerine, *solubl*-CD44 moleküllerinin bağlanıp, immobilize olduklarının tespit edilmesi ile desteklenmiştir. Yine de görevlerinin tam olarak tanımlanabilmesi için daha fazla in vitro çalışmaya gereksinim olduğu açıktır.

4.2.2.9 Kemokin CCL21

Sekonder lenfoid kemokin veya Exodus-2 olarak da bilinmektedir. Lenfatik endotel hücrelerinden sekrete olurlar, kan damarlarının endotelinde ise bulunmazlar, reseptörü de kemokin reseptör-7'dir (CCR-7).[115] Lenfositlerin ve antijenle uyarılmış dendritik hücrelerin, dokudan lenfatik damarlara girerek, sekonder lenfatik organlara gidişine aracılık eder. Bu nedenle immun regülasyonda ve inflamasyonda önemli rol oynar ve CCL21'in malign melanom xenotransplantlarda lenf nodu metastazını artırdığı gösterilmiştir.[116]

Yeni tanımlanan LEC spesifik moleküller mannoz reseptör 1, plakoglobin, İntegrin 9, kemokin CCL 20'dir. Fakat sonuncusunun kan damarlarında da güçlü bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir. Kan damarlarına spesifik moleküller ise VEGFR-1, nörofilin-1, endoglin, CD34, ICAM-1, İntegrin 5, N-kadherin, kollagen IV, versikan, laminin, kollagen XIII'tür.[117] Bu moleküllerin çoğunun regülasyonları ve fonksiyonları hala net olarak anlaşılamamış olup, araştırmalar devam etmektedir.

4.3. LENFÖDEM

4.3.1. Lenfödemin Tanımı

Lenfödem; lenfatik dolaşım sisteminde malformasyon, gelişme geriliği veya kazanılmış bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan, interstisyel hücre boşluklarında proteinden zengin sıvının birikmesidir.[118] İnterstisyumdan sıvı drene eden ve bu sıvıyı kan dolaşımına geri döndüren fizyolojik lenfatik drenajın başarısızlığı, vücudun etkilenmiş bölgelerinde deri ve subkutanöz dokularda proteinden zengin sıvının toplanmasına ve anormal birikimine neden olmaktadır.[119, 120, 121]

Lenfödem lenfatik sistemin yetmezliğinden kaynaklanan bir durumdur. Lenfatik sistemin yetmezliğinin üç şekli vardır. Birincisi dinamik yetmezlik olarak adlandırılır ve lenfatik yükün, lenfatik sistemin taşıma kapasitesini aştığı durumlarda ortaya çıkar. Dinamik yetmezlikte lenfatik sistem anatomik ve fonksiyonel olarak normaldir ancak taşıması gereken yük fazladır. İkinci şekilde lenfatik damarların yetmezliği sonucu lenfatik sistemin taşıma kapasitesi normal protein yükünün altına düşer ve bu durum mekanik yetmezlik olarak adlandırılır. Üçüncü yetmezlik durumunda ise lenfatik sistemin taşıma kapasitesi; sistemin normal işleyişinin bozulması sonucu azalır ve bu durum güvenlik kapağı yetmezliği olarak adlandırılır.

Kronik lenfödemde histopatolojik bulgular olarak şunlar görülür:

-Lenf damarlarının bazal membranlarında kalınlaşma
-Elastin fibrillerinin parçalanması ve dejenerasyonu
-Fibroblastların ve enflamatuar hücrelerin sayılarının artması
-Patolojik kollajen fibrillerinin artması

Bütün bunların sonucu olarak progresif subkutanöz fibrozis gelişir.

4.3.2. Lenfödem Sınıflaması

4.3.2.1. Klinik Sınıflama

Klinik Sınıflandırma I

Evre I: Geri dönüşlü evre, reversibl evre olarak da adlandırılır. Ödem yumuşak yağ kıvamındadır ve elevasyon ile azalır. Ekstremitede gode bırakır. Proteinden zengin ödemdir. Fibrosklerotik doku değişikliği yoktur.

Evre II: Spontan geri dönüşü olmayan evre, irreversibl evre olarak da adlandırılır. Ödem yumuşak kıvamını kaybederek sertleşmeye başlar. Daha az gode bırakır. Ekstremitedeki ödem elevasyon ile azalmaz. Fibrosklerotik doku değişimi ile birlikte bağ doku proliferasyonu vardır.

Evre III: Lenfostatik Elefantiyazis evresi olarak adlandırılır. Ekstremitede mukoz mantar enfeksiyonları mevcuttur (Resim-1).

Evre IV: Steward Treves Sendromu (Lenfanjiyosarkom).[122]



Resim-1: Lenfödemin klinik evrelemesi[123]

Lenfödem erken dönemlerinde gode bırakır, ancak hücrelerarası fibrozis geliştiğinde gode bırakmaz. Lenfödemin derecesine göre cilt değişikliklerine tüy ve tırnak değişiklikleri de eklenebilir (Şekil-20).



Şekil-20: Gode Testi[124]

Klinik Sınıflandırma II

Klinik evresine göre lenfödem değerlendirilirken ekstremite çaplarına göre başka bir sınıflandırma daha yapılmıştır:

1. Hafif Şiddette Lenfödem: Her iki ekstremite arasında 1,5-3 cm arası fark olması.

2. Orta Şiddette Lenfödem: Her iki ekstremite arasında 3-5 cm arası fark olması.

3. Şiddetli Lenfödem: Her iki ekstremite arasında 5 cm'den fazla fark olması.[125]

Klinik Sınıflandırma III

1. Hafif Şiddette Lenfödem: Her iki ekstremite arasında 250 ml'den az fark olması.

2. Orta Şiddette Lenfödem: Her iki ekstremite arasında 250-500 ml arasında fark olması.

3. Şiddetli Lenfödem: Her iki ekstremite arasındaki farkın 500 ml'den fazla olması.

4.3.2.2. Etiyolojik Sınıflama

Lenfödem ilk olarak 1934 yılında Allen tarafından sınıflandırılmıştır.[126] 1957 yılında Kinmonth lenfödemi etiyolojisine göre primer veya sekonder olarak tanımlamıştır.[127]

1. Primer (İdiopatik) Lenfödem

Çoğu primer lenfödem tipi lenf damarları veya lenf nodüllerinin gelişim anormalliği ile ilgilidir. Primer (idiopatik) lenfödemin; inguinal lenf nodu fibrozisi hariç, etiyopatogenezi halen bilinmemektedir. Lenf damarları ve/veya lenf nodlarının gelişimsel defekti (malformasyon, displazi) sonucu oluşur. Aplazi, atrezi, hipoplazi, hiperplazi, lenfanjiyoma olarak isimlendirilir. Ortaya çıkmasını tetikleyen faktörlere göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- Tetikleyici faktörün olmadığı, iyatrojenik nedenle,
- Minör yaralanmalar sonucu,
- Enfeksiyon (Erizipel) varlığında,

- Böcek sokması/ısırması sonucu,
- Periyodik idiopatik ödem sendromu,
    - Premenstrüel sendrom (PMS),
    - Menstrüel siklustan bağımsız ödem sendromları,
- İmmobilizasyon (uçak yolculuğu sonrası).

Primer lenfödem açığa çıktığı yaşa göre sınıflandırıldığında:[128, 129]

-Lenfödem Konjenitum: Doğum esnasında vardır veya 2 yaşına kadar ortaya çıkar. Konjenital olduğunda şişlik genellikle bir ekstremitededir. Fakat her iki ekstremitede, genital bölgede hatta yüzde bile görülebilir. Bilateral ayak şişliği ve tüm alt ekstremite ödemi, konjenital lenfödemde diğer primer lenfödem formlarına göre daha çok görülür.

-Lenfödem Prekoks: 35 yaşından önce açığa çıkan, en çok görülen (%94) primer lenfödem tipidir. Sıklıkla pubertede açığa çıktığı gibi 3. dekatta bile ortaya çıkabilir. Cinsiyete göre, östrojen hormonu sebebiyle kadın/erkek görülme sıklığı 10/1'dir. Ödem alt ekstremitede sıklıkla diz altında görülür ve unilateraldir.

- Lenfödem Tarda: Görülme sıklığı (%10) nadirdir. Tipik olarak 35 yaşından sonra görülür.

Primer lenfödem genetik olarak sınıflandırıldığında:

-Tip I konjenital ailesel lenfödem (Nonne-Milroy hastalığı): Milroy hastalığı diğer adıyla primer konjenital lenfödem, lenf damarlarının intrauterin dönemde gelişimsel anomalisine bağlı olarak ortaya çıkar. Otozomal dominant geçiş gösterir. Aile öyküsü olabilir. Etiyolojisinde lenfatik damarlara özgü tirozin kinaz reseptörünün anormal fosforilasyonu rapor edilmiştir. Bu hastalığın geni olan VEGFR-3 (FLT-4) 5q kromozomunun telomerik kısmının 5q34-q35 bölgesinde bulunmaktadır.[130] Milroy hastalığında lenfödem doğumdan itibaren mevcuttur. En sık alt ekstremiteler, kollar, yüz ve genital bölgede görülür. Lenfödem alt ekstremitede genellikle bilateraldir. Ödem sıklıkla ayak sırtındadır, diz üstüne çıkmaz, sert ve ağrısızdır ve ilerleyen yaşlarda iz bırakmaz. Zamanla ekstravasküler alanda protein birikimi ve fibrozis ile ciltaltı doku sertleşir. Deride hiperkeratoz olabilir. Lenf akımının obstrüksiyonu streptokok veya stafilokok enfeksiyonlarına neden olur. Bunun sonucunda tekrarlayan sellülit ve lenfanjit atakları lenfatik harabiyeti artırır. Ayrıca, ayakta mantar ve egzematiform deri lezyonları görülebilir.[131, 132] (Resim-2)



Resim-2: Konjenital lenfödem tanılı hasta[133]

- Tip II lenfödem prekoks (Meige Hastalığı): Meige hastalığı olarak bilinen lenfödem prekoks, primer lenfödem en yaygın biçimidir. Meige Hastalığı doğumdan sonra ve 35 yaşından önce klinik olarak belirgin hale gelir. Bu durum tüm primer lenfödem olguların %65-80'ni oluşturmaktadır ve en sık ergenlik döneminde ortaya çıkar. Olguların yaklaşık %70'inde tutulum tek taraflıdır, sol alt ekstremitede hastalık sağa göre daha sık görülmektedir. Histolojik olarak değerlendirildiğinde tutulum alanının hipoplastik model göstermesi olasıdır, bu hastalarda lenfatiklerin kalibre ve sayısında azalma gözlenmektedir. Meige Hastalığı kadınlarda erkeklere oranla dört kat fazla görülmektedir. Genellikle başlangıcının menarş döneminde olması patogenezde östrojenin rolü olduğunu düşündürmektedir.[134]

2. Sekonder Lenfödem

Sekonder lenfödem, radyoterapi, cerrahi müdahale, travma, inflamasyon veya neoplastik bozukluk sonucu lenf yollarının obstrüksiyonu veya kesintisi sonucu gelişen, mekanik sorunlara ikincil oluşan lenfödem tipidir. Lenf kanallarının drenaj kapasitesinin azalması ve aşırı lenf yapımı, dinamik yetersizliğin nedenidir. Sekonder lenfödem, lenfödemin en çok görülen şeklidir ve genellikle onkolojik cerrahinin bir komplikasyonu olarak açığa çıkar.[135] Sekonder lenfödem, primer lenfödeme göre daha sık görülür. Sekonder lenfödem nedenleri arasında kronik venöz yetersizlik, filariyazis, tekrarlayan enfeksiyonlar, bölgesel lenf düğümü cerrahisi, radyoterapi, maligniteler ve travmalar sayılabilir. En sık neden, maligniteler ve malignite ile ilişkili cerrahi ve radyoterapi gibi tedavilerdir. Sekonder lenfödeme neden olan faktörler;

-Tümörler

-Posttravmatik

-Lenfanjit

-Retroperitoneal fibrozis

- Kordon dolanması

- Yeni doğanda Hair-tourniquet sendromu

- Postenfeksiyöz: Kronik-obstrüktif lenfanjit/lenfadenit

- Yapay lenfödem

- İyatrojenik lenfödem

- Amiloidoz

- Skar dokular

4.3.3. Lenfödem Gelişiminde Risk Faktörleri

Lenfödem gelişimindeki risk faktörleri, tedaviyle ilişkili faktörler, hastalıkla ilişkili faktörler, hasta ve klinikle ilişkili faktörler şeklinde üç grupta toplanabilir.[136] (Tablo-2)

Gruplar	**Risk Faktörleri**
Tedaviyle ilişkili faktörler	Cerrahi Radyoterapi Kemoterapi Kombine tedavi
Hastalıkla ilişkili faktörler	Hastalığın evresi Patolojik lenf nodu sayısı Tümörün lokalizasyonu
Hasta ve klinikle ilişkili faktörler	Hastanın yaşı Obezite-vücut kitle indeksi (BMI) Hipertansiyon Enfeksiyon-inflamasyon hikayesi Ekstremitenin aşırı kullanımı Tedaviye kadar geçen süre Dominant el tarafından operasyon Tedaviden sonra uzun zaman geçmesi

Tablo-2: Lenfödem gelişimindeki risk faktörleri

Bu risk faktörleri içerisinde radyoterapi ve lenf diseksiyonunun derecesi daha önemlidir. Lenf nodu diseksiyonuna radyoterapi de eklenirse risk daha fazla artmaktadır.[137] Schrenk ve ark'nın yapmış oldukları bir çalışmada sentinel lenf nodu biyopsisi yapılan hastalar ile aksiller lenf diseksiyonu yapılan hastalar karşılaştırılmış ve sentinel biyopsi olanlarda riskin daha az olduğu rapor edilmiştir.[138] Goffman ve ark'nın çalışmasına göre lenfödem gelişimi için alınan lenf nodu sayısı ve tümörün büyüklüğü önemlidir.[139] Bu çalışmada beşten az lenf nodu çıkarılan hastalarda lenfödem saptanmamıştır.

4.3.4. Lenfödem İnsidansı

Lenfödemi olan dünyadaki hasta sayısı yaklaşık 140-250 milyondur. Endüstrinin gelişmiş olduğu ülkelerde daha çok sekonder lenfödem (onkolojik teşhis ve tedaviler -özellikle meme kanseri- sonucunda) rapor edilmektedir[113].

Primer lenfödem, 20 yaşın altında 1,15/100,000 oranında belirtilmiş, intrauterin gelişimsel defekt ve etkilenim ile ilişkilendirilmiştir.[140] Prevelans olarak 10,000 canlı doğumda her 6 bebekten birinde konjenital lenfödeme rastlandığı tahmin edilmektedir.[114]

Sekonder lenfödemin insidansı yıllara ve değerlendirme seçeneklerine göre farklılıklar göstermektedir. Petrek JA ve ark'nın derlemesinde meme kanseri sonrası gelişen lenfödem insidansı %6-30 olarak bildirilmiştir.[141] Thompson M ve ark'nın yaptıkları çalışmada sentinel lenf nodu biyopsisi sonrası kolda gelişen lenfödem insidansının %0-13 ve aksiller lenf nodu diseksiyonu sonrası gelişen lenfödem insidansının %7-77 olduğunu belirtmişlerdir.[142] Johansson K ve ark'nın yaptığı retrospektif çalışmada lenfödem insidansı %38 bulunmuşken, Norman ve ark'nın yaptığı prospektif çalışmada ise bu oran %48 olarak bulunmuştur.[143,144] Mastektomi sonrası lenfödem gelişmesi ile ilgili en kapsamlı araştırmayı Almanya'da Schüneman ve ark. 5868 hastada 11 yıllık takiple yapmışlardır. Bu hastaların %24'ünde lenfödem geliştiği gösterilmiştir.[145] Lenfödem cerrahiden uzun yıllar sonra da gelişebilmektedir. Literatürde radikal mastektomiden 30 yıl sonra bile gelişen lenfödem olgusu bulunmaktadır.[146]

4.3.5. Lenfödemde Tanı ve Değerlendirme

Lenfödemin teşhisine basit diagnostik prosedürlerle başlanmalıdır. Medikal hikaye, inspeksiyon ve palpasyon önemlidir. Böylece lenfödemin sınıflaması/seviyesi ve lenfödemi diğer kronik ödemlerden ayıran, kutanöz fibrozis, subkutan fibrozis, ***Stemmer+*** (ayak ikinci parmağının üzerindeki derinin parmakla tutulmaya çalıştığında başparmakla işaret parmağı arasında sıkıştırılıp yukarı kaldırılamamasıdır) ve gode bulgusu (Resim-3) gibi fiziki özellikleri belirlenir.[119]

Ekstremitelerdeki lenfödemin tipik özellikleri:

- Genellikle unilateraldir. Eğer bilateral ise bu durum genellikle asimetriktir. Bir bacak (veya bir kol) genellikle diğerinden daha fazla şişmiş durumdadır. Bilateral simetrik lenfödeme ekstremitelerde nadir rastlanır.
- Gelişen bazı özel durumlar (elefantiyazis, venöz konjesyonla birlikte görülen siyanoz, kronik venöz yetersizliğin son safhası ve Klippel-Trenaunay Sendromu) dışında cilt rengi genellikle değişmemiş olarak görülmektedir.
- Stemmer's işareti teşhiste büyük anlam taşımaktadır.
- El ve ayağın dorsumu şişmiştir.
- Doğal cilt katlantıları derinleşmiştir.
- Dokunulduğunda cilt ısısı normal görünmektedir.
- Lenfödem genellikle ağrılı değildir. Kompleks olmayan lenfödemde nekroz ve ülserasyonlar görülmez.



Stemmer (+) Gode (+)

Resim-3: Stemmer bulgusu ve gode bırakan ödem[129]

Lenfödemin takibinde kullanılan volümetrik ölçüm halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin lenfödem değişimlerini daha iyi yansıttığı düşünülmektedir. Fakat bu yöntemin klinik uygulamadaki zorluğu nedeniyle, genellikle rutinde kullanılan yöntem çevresel ölçümdür. Bu yöntem daha düşük maliyet ve kullanım kolaylığı nedeniyle tercih edilmektedir.

Çevresel ölçüm metodu belirli kemiksel bölgeler (ulnar stiloid, olekranon, lateral epikondil, metakarpofalangeal eklemler) referans alınarak uygulanır. Geleneksel yöntem, olekranonun veya lateral epikondilin 10 cm altından ve üstünden kolların çevresinin ölçülmesidir. Ayrıca kolun eşit aralıklarla ölçülmesi de diğer bir yöntemdir. Ölçümlerde, hastanın kilosundaki değişikliklerin kol çevresine etkisini dışlayabilmek için hem lenfödemli hem de sağlam kol ölçülüp aradaki fark alınır. Çevresel ölçümlerde her iki kol arasında 2 cm veya daha fazla fark olması lenfödem açısından anlamlıdır.

Volümetrik ölçüm metodunda, hastanın ekstremitesi içi su dolu bir su tankına daldırılır ve taşan suyun hacmi ölçülür. Her iki kolun taşırdığı su hacmi arasındaki fark lenfödemin miktarını belirler.

Deri tonometresinde ise cilde uygulanan basıncın miktarı ölçülür. Basınca karşı verilen doku direncini ölçerek fibrotik endurasyon hakkında bilgi verir.[147] Yumuşak dokudaki basılabilme derecesi lenfödem miktarı ile orantılıdır.

Lenfödem tanısı için çeşitli görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu görüntüleme yöntemleriyle hem lenfödem tanısı konulmakta hem de etiyolojiye yönelik sonuca ulaşılabilmektedir.

1-Lenfosintigrafi

Lenfosintigrafi en sık tercih edilen tanı yöntemi olup; uygun büyüklük ve özellikteki radyokolloidlerin veya radyo işaretli makromoleküllerin (Teknesyum 99^{m} işaretli insan serum albumin'i), doku planlarına verilmesinden sonra lenfatik kanallar aracılığıyla alınarak, bölgesel lenf nodlarında depolanıp lenfatik sistemin anatomisi ve fonksiyonları hakkında bilgi edinmemizi sağlayan minimal invaziv bir görüntüleme yöntemidir. Daha çok radyokolloidin lenf sistemince tutulması, sistem boyunca lenf akımı ve lenf nodunun fagositer fonksiyonu hakkında önemli bilgi vermektedir. Radyokolloid doku aralığına verildikten sonra, partiküller başlangıç lenfatiklerinde gerek porlar gerekse de pinositoz yoluyla lümene geçer. Lümene giren partikül, lenf noduna doğru lenf kanalları boyunca akar. Lenf nodunda, doku makrofajları tarafından fagosite edilirler.

Burada uzunca bir süre stabil kalan radyokolloid, görüntüleme olanağı sağlamaktadır. Enjeksiyon sonrası hareket, lenfatik akımı artırarak radyokolloidlerin lenfatik tutulumunu artırmaktadır.[148]

Lenfosintigrafinin zamanlaması önemlidir. Lenf akımının lenf noduna ilk ulaştığı anı yakalamak olası ikinci lenf noduna ulaşmadan görüntülenmelidir. Bu zaman süresi farklı çalışmalarca 30 dakikadan 120 dakikaya kadar belirtilmektedir. Lenfosintigrafinin zamanlaması radyofarmasötiğin özellikleri ve lenf sıvısının hızı lenfosintigrafiyi etkilemektedir. Bundan dolayı doğru sentinel lenf nodu için tek statik sintigrafik görüntü yerine dinamik sintigrafi uygulanması daha çok tercih edilir. Bu yöntemde lenfosintigrafik görüntüler enjeksiyondan 3-4 dakika sonra alınmaya başlanır ve sentinel lenf nodu görüntülenene kadar statik görüntülerle takip edilir.

Bir saatte 12 görüntü alınır. Birinci saat ve üçüncü saatte 20 dakikalık tüm vücut taraması yapılır. Bölgesel lenf nodu aktivitesi 15-60 dakikalar arası maksimum olmalıdır. (Daha uzun süre devamı patoloji göstergesidir)

Bir lenfosintigrafinin patolojik değerlendirildiği durumlar;

- Enjeksiyon bölgesinden alınmayan veya geç alınan Tc^{99m} varlığı
- Dermal geri akımın gözlenmesi (Kutanöz patern; dermal kollateraller ile)
- Azalmış, zayıf veya hiç olmayan bölgesel lenf nodu varlığı
- Ekstravazasyon, lenfosel, lenfanjiyektazi gibi durumlarda anormal lokalizasyonlu birikim varlığı olarak sayılabilir.

Primer lenfödem, sekonder lenfödemden duktus hipoplazisi/aplazisi ile ayırt edilebilir.

Lenfödem için lenfosintigrafi işleminin sensitivitesi %92, spesifisitesi %100'e yakındır.

2-Bilgisayarlı Tomografi

Lenfödemin tanısından çok etiyolojisine göre yapılacak değerlendirme açısından önemlidir. Kitle veya tümör ayırıcı tanısında kullanılmaktadır.

3-Manyetik Rezonans

Lenf nodu ve geniş lenfatiklerin anatomisini ortaya koymada faydalıdır. Sekonder lenfödemde etiyoloji için kullanılmaktadır. Kitle basısı, vasküler malformasyon, yumuşak doku tümörlerinde tanıyı destekler. Lipoödem ile kronik venöz ödem- lenfödem ayırıcı tanısında kullanılır. Lipoödem lenfatik sistemin bir hastalığı olmamasına rağmen her iki hastalık da bacakların şişmesine sebep olduğundan lipoödeme genellikle yanlış olarak lenfödem tanısı

konmaktadır. Tamamen farklı hastalıklar olmasına rağmen lipoödemin ilerleyen evrelerinde lenfödem de ortaya çıkabilir.

Lipoödemi lenfödemden ayıran özellikler şöyle sıralanabilir:

-Lipoödem, aşırı yağlanma her iki bacağı eşit etkilediğinden simetriktir. Lenfödem simetrik değildir ve genellikle sadece bir bacakta görülür.

- Lipoödemde ayak bileği seviyesinde şişlik biter ve ayak etkilenmez. Lenfödemde ise ayaklar da etkilenir. Primer lenfödem genellikle ayaklardan başlar ve yukarıya doğru ilerler. Sekonder lenfödem ise uyluk bölgesinden başlayıp aşağıya ilerleyerek ayağı da tutar.

- Lipoödem, özellikle dokunulduğunda aşırı ağrıya sebep olabilir. Lenfödem de ağrıya yol açar, ancak bu kadar ciddi değildir.

-Lipoödem sıklıkla morarma ve deri altında kanamaya sebep olur. Lenfödemde bu bulgular görülmez.

-Lenfödemin tanısında kullanılan "Stemmer İşareti" lipoödemde görülmez.

-Lipoödemde subkutan yağ dokusunda artış varken damarlanmada artış olmaz, süperfisyel/derin lenfatik oranında venöz ödem ve lenfödemin aksine artış vardır.

4-Lenfanjiyografi

Lokal anestezi kullanılarak yapılan invaziv bir işlemdir. Subkutan dokuya verilen kontrast madde subdermal ve süperfisyel dermal lenfatikler tarafından hızla toplanır. 1 ml izosulfan mavisi (Lyphazurine) 1-2. parmaklar arasına enjekte edilir. Küçük transvers bir insizyon yapılarak lenf damarı disseke ve kanüle edilir (30 G kateter ile). Yağda çözünür kontrast olan etiyodize yağ 1-7 ml/8 saatte uygulanır. Eğer tam obstrüksiyon varsa kontrast madde birkaç hafta ya da ay boyunca ilk bölgede kalabilir. İnvaziv olduğu için çok tercih edilen bir yöntem değildir, tercih edildiği durumlar;

–Mikrovasküler lenfatik rekonstrüksiyon planlanan hastalar
–Lenfanjiyektaziler
–Şilöz reflü
–Şilöz asit
–Şilotoraks sayılabilir.

Komplikasyonları içerisinde iyot alerjisi, obstrüktif lenfanjit, pulmoner emboli (spontan lenfovenöz fistüllerden doğru) sayılabilir ve işlem sırasında ağrı görülebilir.

4.3.6. Lenfödemde Tedavi Yöntemleri

4.3.6.1. Lenfödemde Fizik Tedavi

Fizyoterapi uygulamalarında amaç, lenfödemi azaltmak, doku fibrozisini ve lenfödemin yeniden oluşmasını engellemek ve böylece kişinin yaşam kalitesini yükseltmektir.[149] Fizyoterapi yaklaşımları; kompleks boşaltıcı fizyoterapi, manüel lenfatik drenaj, kompresyon tedavisi ve aralıklı pnömatik kompresyon cihazlarından oluşmaktadır.

Kompleks boşaltıcı fizyoterapi, iki fazdan oluşan bir tedavi programıdır:

I. faz 4 hafta veya daha fazla süren lenfödemi azaltma fazıdır.
II. faz ise azaltılmış volümün cilt bakımı, kompresyon çorabı ve egzersiz ile korunma fazıdır.

Faz I	**Faz II**
1. Cilt bakımı	5. Kompresyon çorabı
2. Manüel lenfatik drenaj	6. Ölçümler
3. Kompresyon bandajı	7. Cilt bakımı
4. Egzersiz	8. Egzersiz[150]

Bu tedavi programı içinde önlemler ve ekstremite bakımını kapsayan hasta eğitimi de yer alır. Hastanın katılımı ve uyumu başarılı sonuç alınması için önemlidir. Kompleks boşaltıcı fizyoterapi ekstremite volümünü azaltır, lenf transportunu sağlar, lenfatik kontraksiyonu artırır, lenf akımını artırır ve protein birikmesini engellediğinden uzun dönemde faydalı olur.[151]

Manüel lenfatik drenaj, derinin tam altındaki yüzeyel lenf damarlarına hafif basınç uygulanması ile yapılan manüel bir tekniktir ve amacı ödemli bölgeden lenf sıvısını alıp vücudun diğer bölgelerine akışını sağlamaktır. El ve parmakların basıncının 30-45 mmHg olması idealdir[111]. Manüel lenfatik drenaj ile lenf damarlarını çevreleyen düz kaslar mekanik olarak uyarılarak lenfatik akış hızı ve lenf sıvısının ileriye doğru hareketi artırılır. Manüel lenfatik drenaj yakın drenaj bölgelerinin (boyun, karşı aksilla gibi) stimülasyonu ile başlar. Daha sonra etkilenen bölgenin tedavisine geçilir. Ekstremitenin proksimal kısmı önce drene edilir, sonra distale doğru ilerlenir. Distalden proksimale gitmek kontrendikedir. Genellikle bir ekstremite için 45 dakika gerekmektedir. Fizyolojik açıdan bakıldığında Manüel lenfatik drenaj, lenf kollektörlerinin

intrinsik kontraktibilitesini stimüle ederek protein atılımı ve transportunu artırır. Ayrıca lenf ve doku sıvısının ileriye hareketi ile birikmiş lenf sıvısının bölgesel lenf nodülü tarafından eliminasyonu sağlanır. Tedavinin amacı lenf transport oranını artırmak, lenfödemi azaltmak, doku fibrozisini önlemek ve lenfödemin yeniden oluşumuna engel olmaktır. Manüel lenfatik drenaj lenfatik kontraktibiliteye etkisi olmayan diğer terapötik masajlarla karıştırılmamalıdır. Manüel lenfatik drenaj sırasında uygulanan yumuşak doku basıncı lenf kapillerlerinin daha iyi dolmasını sağlar ve transport kapasitesini artırır. Bunu da cilt lenfatiklerini dilate ederek ve lenf kollektörlerini geliştirerek sağlar.[152]

Kompresyon tedavisi eksternal basınç sağlamak amacı ile değişik şekillerde uygulanabilmektedir. Bunlar; kompresyon bandajları ve kompresyon çoraplarıdır (Resim-4).



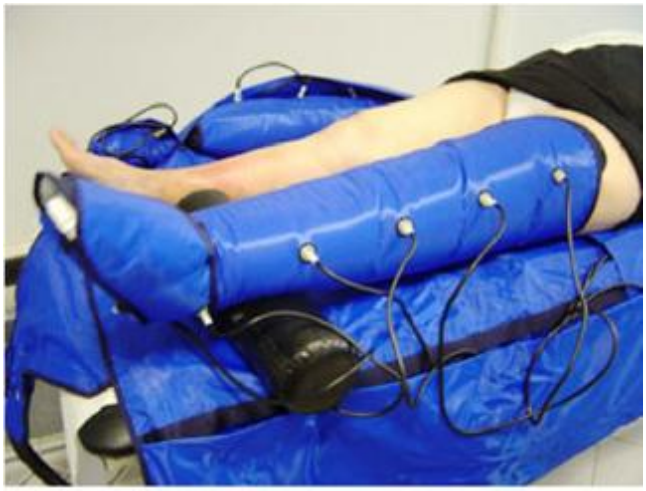
Resim-4: Kompresyon bandajı ve kompresyon çorabı[123]

Kompresyon bandajının etkileri:

-İnterstisyel basınç artacağından, efektif ultrafiltrat azalır.
-Kas ve eklem pompasının etkisi düzelir. Venöz ve lenfatik transport yükselir.
-Reflü engellenir. Böylelikle tedavinin başarısı korunmuş olur.
-Reabsorbsiyon yüzeyi büyümüş olur.
-Özel sünger ve kompres parçalarının kullanılması, lokal basınç artışı sağlar. Böylelikle lenf sıvısının sıkıştırılması ve prolifere olmuş bağ dokunun gevşemesi sağlanır.
-Venler üzerine etkisi ise kanın hızlı akışı nedeni ile tromboz profilaksisidir.
-Lenfatik akımı geliştirir.
-Venöz dönüşü düzenler.
-Ekstremitenin volümünü azaltır ve şekillendirir.
-Cilt bütünlüğünü sağlar.
-Cildi travmalardan korur.

Tedavinin ikinci aşamasında kullanılan kompresyon giysileri, azalmış olan volümü devam ettirmek ve elastikiyetini kaybetmiş cildi desteklemek için kullanılır. Bu etkilerini venöz dönüşü artırarak, lenfatik akışı hızlandırıp protein birikimini engelleyerek ve kapillerlerin dolmasını kolaylaştırarak gösterirler. Kompresyon giysileri, kullanım kolaylığı ve günlük aktivitelere engel olmaması avantajı ile ekstremiteyi travmalara karşı korur ve ekstremitenin şeklini düzeltir.

Aralıklı pnömatik kompresyon cihazları ekstremitelerin akut ve kronik lenfödemi, venöz staz, venöz ve arteriyel ülserlerin tedavisi ve derin ven trombozunun önlenmesinde de kullanılır. Ebat, işlev ve fiyat açısından farklı çeşitleri olan pnömatik pompalar ekstremiteyi çevreleyen tek veya çok bölmeli pompalardır. Basit pompalar ekstremite üzerine sabit basınç uygular. Çok segmentli olanlar ise ekstremite üzerinde distalden proksimale doğru azalan basınç uygulayarak değişik döngülerde ve basınçlarda ekstremitenin distal ucundan proksimal kısmına doğru lenf akımını stimüle eder.[153] (Resim-5)



Resim-5: Aralıklı pnömatik kompresyon cihazının kullanımı[154]

0-300 mmHg arasında değişen basınca sahip olan bu cihazlar ayarlanabilir bir zaman periyodu içinde ekstremiteye sabit ya da kesikli basınç uygulaması yaparak çalışır. Tanıya göre değişmesine rağmen tedavi basınçları genellikle 30-60 mmHg arasındadır. Kompresyon tedavisi sırasında ekstremitenin vaskülarizasyonu iyi olmalıdır. Yoksa kompresyon tedavisi arteriyel kan akışını baskılayarak şiddetli iskemi ve nekrozlara sebep olur. Kompresyon tedavisi; ekstremite iskemik ise, enfeksiyon, lokal veya yakın bölgede malignite varsa, antikoagulan tedavi, akut DVT ve inflamatuar ödem mevcutsa kontrendikedir.

4.3.6.2. Lenfödemde Medikal Tedavi

Medikal tedaviler, diğer lenfödem tedavileri yanında adjuvan tedavi olarak kullanılır. Kullanılan temel ilaçlar; Benzopironlar (Kumarin), flavonoidler, antibiyotikler ve diüretiklerdir. En sık kullanılan medikal tedavi ilaç grubu diüretikler olup kapiller kan basıncını azaltarak etkilerini oluştururlar. Ancak interstisyel alanda proteinden zengin sıvı birikimini etkilememektedirler. Oluşan bu sıvı inflamasyona ve fibrozise neden olmaktadır. Akut olarak şişliği giderebilmelerine rağmen zamanla interstisyel alanda protein konsantrasyonunun artmasıyla lenfödemde ilerleme görülebilmektedir.[155] Bu nedenle uzun süreli kullanımları önerilmemektedir.[156]

Kumarin'in lenfödeme faydası kutanöz makrofajları stimüle ederek lokal proteolize sebep olmasına bağlanmaktadır. Kumarin ayrıca immun sistemin hücresel elemanlarını da stimüle ederek protein reabsorbsiyonunu artırabilir. Çalışmalar Kumarin'in özellikle filariyal elefantiyaziste etkili olduğunu ve ödem volümünün %55 oranında azaldığını göstermiştir.[157]

4.3.6.3. Lenfödemde Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedavi tüm hastaların %5-10'una uygulanır. Temel endikasyonları arasında bozulmuş fonksiyon ve azalmış hareket kapasitesi, tekrarlayan selülit ve lenfanjit atakları, geçmeyen ağrı, lenfanjiyosarkom ve kozmetik nedenler olarak sayılabilir. Eksizyonel operasyonlar ve lenfatik rekonstrüksiyonlar olmak üzere iki tip cerrahi yaklaşım bulunmaktadır. Eksizyonel cerrahi ile subkutan yağ tabakası redükte edilir ve dermal bir flep kas içine yüzeyelden derine doğru bir anastomoz oluşturacak şekilde yerleştirilir. Lenfatik rekonstrüksiyonda ise lenfo-lenfatik anastomoz, lenfo-venöz anastomoz, lenfovenöz-lenfatik anastomoz, lenf nodu-venöz anastomoz ve lenf kolektör transplantasyonu yapılmaktadır.

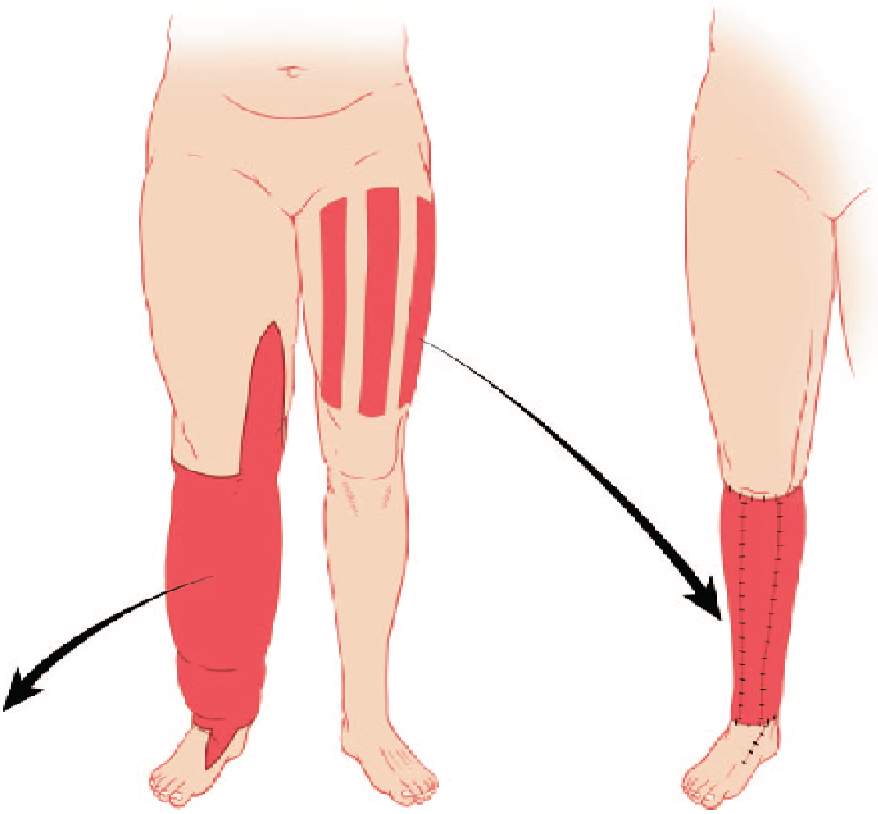
A-Eksizyonel Operasyonlar

Lenfödemli cilt altı dokusu ve bir miktar cildin eksizyonudur.

1-Charles Prosedürü

Tibial tuberositeden malleole kadar tüm cilt ve cilt altı dokusunun eksizyonudur. En radikal eksizyonel operasyondur. Yoğun fibrozis varsa derin fasya da eksize edilir. Yara genelde

etkilenmemiş bir başka ekstremiteden alınan kısmi kalınlıkta ya da tam kat cilt grefti ile kaplanır. Sık geçirilmiş selülit, hiperkeratoz, dermatit gibi problemler nedeniyle güç işlemlerdir. Bu teknik rekonstrüksiyon ya da flep prosedürü uygulanamayan hastalara saklanmalıdır. Uzun dönem sonuçları orta-kötüdür (Şekil-21).



Şekil-21: Charles Prosedürü, eksizyon + kısmi kalınlıkta deri grefti ile onarım[158]

2-Modifiye Homans Prosedürü

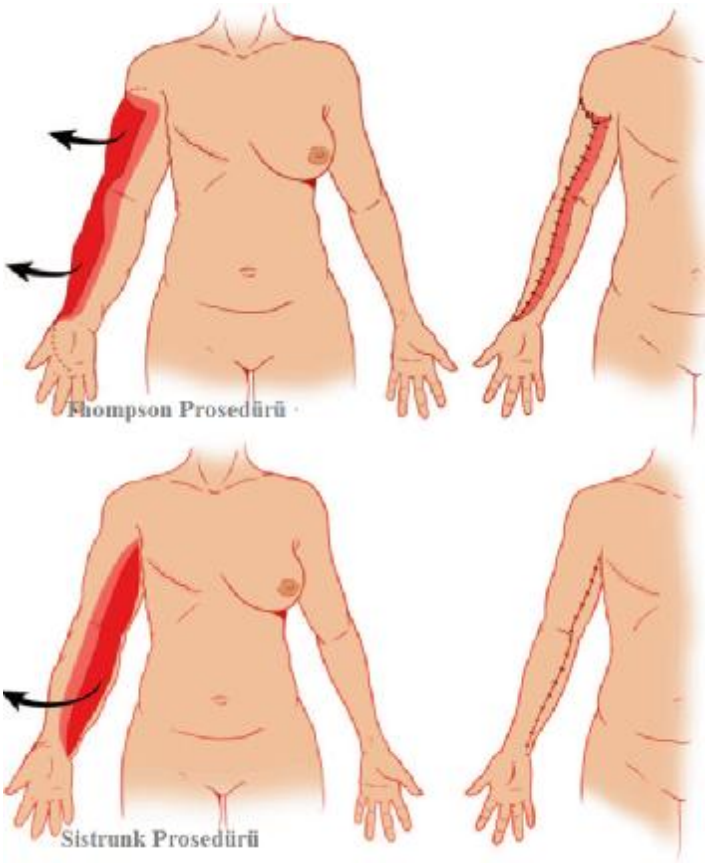
Üstte cilt dokusu bırakılacak şekilde fibrotik subkutan dokunun eksizyonudur. Proksimalde pnömatik bir turnike ile işlem esnasında hemostaz sağlanır. Tibial sınırın 1 cm posteriorundan uzunlamasına medial bir insizyon yapılır. Orta kalınlıkta (1-1,5 cm) subkutan doku baldırın orta-sagital ekseninin anterior ve posteriorundan eksize edilir. Fazla miktardaki cilt çıkarılır ve yara flepleri alttaki fasyaya kesintisiz temas edecek şekilde kapatılır (Şekil-22). Subkutan ya da dermal sütür kullanılmaz. Sonuçlar eksize edilen doku miktarına bağlıdır, genelde %65-80 oranında yeterli büyüklük redüksiyonu sağlanır.



Şekil-22: Modifiye Homans Prosedürü[159]

3-Thompson Prosedürü

Subkutan flep prosedürüdür. Amaç normal fonksiyonlu bir lenfatik dokunun hastalıklı sahaya kaydırılmasıdır. Bir miktar fibrotik dokunun eksizyonu da beraberinde yapılır. Cilt altı dokusunun eksizyonundan sonra derin kas kompartmanının içine flep ucu dezepitelize edilerek gömülür. Teoride bu gömülen flep kendi subdermal lenfatik pleksusu ile derin lenfatik kanallar arasında bağlantı sağlayacaktır. Ancak bu gösterilememiştir. Asıl faydası ödemli cilt ve cilt altı dokusunun eksizyonundan kaynaklanmaktadır. Sonuçta Modifiye Homans Prosedüründen daha iyi sonuçları yoktur (Şekil-23).



Şekil-23: Thompson ve Sistrunk Prosedürü[159]

B-Lenfatik Rekonstrüksiyonlar

Lenfatik obstrüksiyon tedavisinin en direkt ve fizyolojik metodu lenfatik transportunun iyileştirilmesidir. Geçmişte omentum yerleştirerek veya lenfödemli bölgeye bir ileum segmenti taşıyarak (mezenterik köprü operasyonu) yapılan lenfatik bağlantılar çok marjinal sonuçlar elde etmiştir. Günümüzde mikrovasküler tekniklerdeki son gelişmeler lenfatik kanalların doğrudan rekonstrüksiyonuna izin vermektedir. Ancak bu işlem lenf obstrüksiyonu ekstremitenin proksimalindeyken yani distaldeki lenfatikler intakt iken uygulanabilmektedir. Primer lenfödemde hastalık genelde yaygın olduğundan bu hastalar rekonstrüksiyon için zayıf adaylardır.

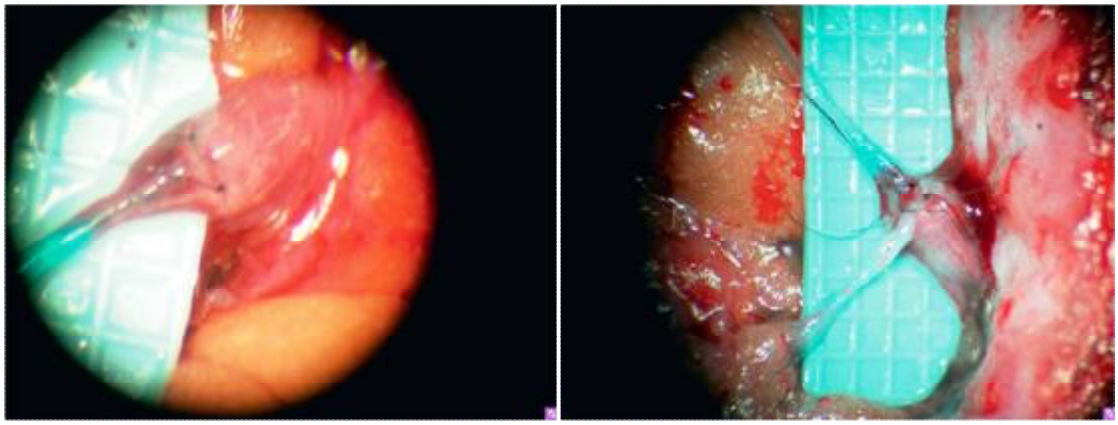
1-Lenfovenöz Anastomozlar

Değişik derecede başarı oranları vardır. Lenfanjiyografi ile spontan lenfovenöz fistül oluşumu gösterilince gündeme gelmiştir (Doğal kompensatuar mekanizmalar) (Resim-6). Bu teknik subkutan fibrozis gelişmeden ve lenfatik skleroz oluşmadan yapılmalıdır. Mikrovasküler

cerrahi teknikleriyle 2mm damar anastomozları mümkün olabilmektedir. Lenfovenöz anastomoz endikasyonları;

- Yeni başlamış sekonder lenfödem
- Daha önceden selülit ya da lenfanjit geçirmemiş olmak
- Konservatif yöntemlerden fayda görmemiş olmak
- Venöz hipertansiyon olmaması (akımı tersine çevirebilir)

Preoperatif olarak lenfosintigrafi uygulanmalıdır. Seçilmiş vakalarda direkt-kontrastlı lenfanjiyografi uygulanabilir. İdeal hasta grubu proksimal pelvik lenfatik obstrüksiyonu ve dilate infrainguinal lenf damarları olan hastalardır. Hastalar 24-48 saat önceden hospitalize edilir. Bacak elevasyonu veya aralıklı kompresyon uygulanır. Postoperatif kompresyon bandajı ve 30° elevasyon uygulanır. Süperfisyel medial lenfatik dokunun damarları disseke edilir. İzosulfan mavi de kullanılabilir. (Küçük sinirler ve fibröz bandların ayırımında yararlıdır).6-8 adet 11/0 monofilaman dikişlerle anastomoz tamamlanır. Her hasta için 2-4 adet anastomoz yapılır. Sonuçlar değerlendirildiğinde; deneysel çalışmalara göre 3-8 ay sonra %50, 46 ay sonra 5/14 anastomoz patent bulunmuştur (4'ü sekonder, biri primer lenfödem). 90 hastalık bir seride %73 sübjektif iyileşme, %42 uzun dönem iyileşme saptanmıştır. Postoperatif takipte bacak çevre ölçümü ve lenfosintigrafi kullanılabilir.

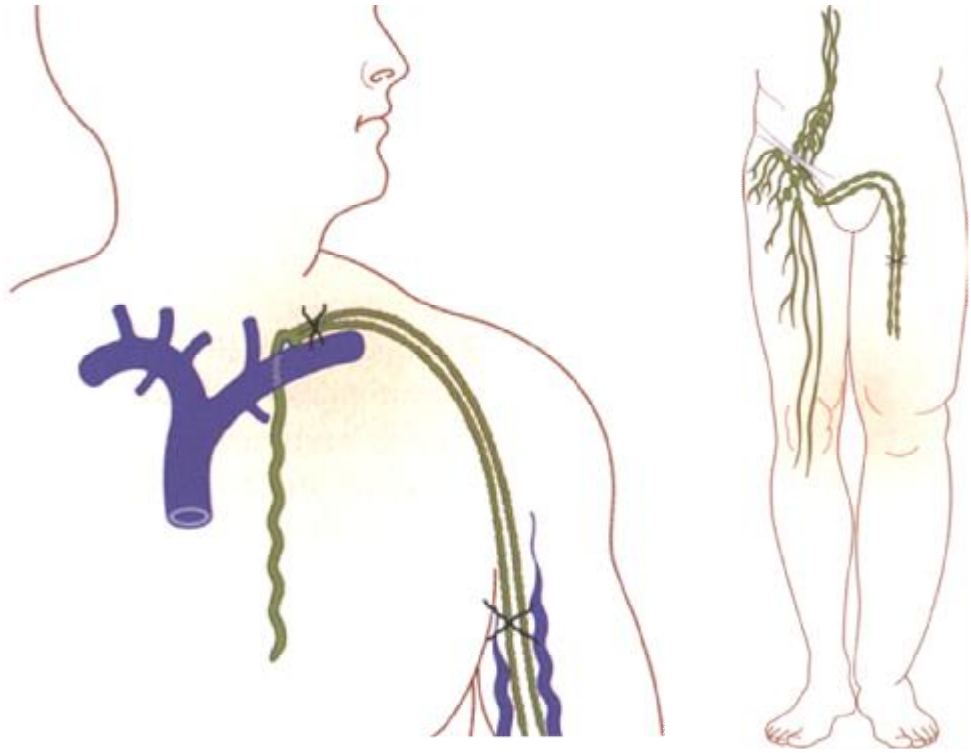


Resim-6: Lenfatikovenöz anastomoz[160]

2-Lenfatik Greftleme

Venöz hipertansiyon nedeniyle geri akım gibi problemler görülmediğinden çekici bir tekniktir. Kan ile ilişkisi olmadığından (trombosit ve prokoagulan faktörler) venöz anastomozlardan daha iyi patensi sonuçları vardır. Preoperatif değerlendirme lenfovenöz anastomozdaki gibidir, lenfosintigrafi önerilir.

Bu teknik özellikle unilateral sekonder lenfödemde (postmastektomi gibi) ya da proksimal alt ekstremite obstrüksiyonunda kullanılır. Donör bacakta normal bir lenfatik sistem olduğu preoperatif gösterilmelidir. Postmastektomi lenfödeminde bacak medial lenfatiğinden alınan majör sağlam lenfatik doku kola ototransplante edilir. Distal anastomoz ön kolda epifasyal ve subfasyal lenf damarları ile ucuca yapılır. Proksimal anastomoz ise en iyi boyunda torasik duktusun geniş desendan lenf damarlarından birine yapılır. Alt ekstremitede işlem transpozisyon şeklindedir (sağlam dokudan hasta dokuya doğru). Kros femoral greftlemede uzunlamasına bacak insizyonu ile 2-3 lenfatik damar ekspoze edilir, distalden ligate edilerek transekte edilir ve pubisin üstünden subkutan tünel oluşturularak kontrlateral tarafa taşınır, uc-uca anastomoz edilir. Çalışmalar 3 yıl sonunda %80 başarı göstermektedir. Uzun dönem patensisi bilinmemektedir (Şekil-24).



Şekil-24: Lenfatik greftleme ve transpozisyonu[161]

Komplikasyonları arasında en sık enfeksiyon görülür, selülit ve lenfanjit riski artmaktadır. Enfeksiyon cilt altı yabancı cisim ve mikroorganizma klirensinin azalmasına bağlıdır. Ayrıca protein birikimi bakteri için kültür ortamı oluşturmaktadır. En sık etken β-hemolitik Streptokoklar ve Stafilokok'lardır. Lenfanjit hızla proksimale yayılarak daha büyük lenf damarlarına zarar verebilir. Venöz sisteme ulaşınca sepsise neden olabilir.

4.3.7. Lenfödem Komplikasyonları

Lenfödemde kol hareketleri sırasında hissedilen rahatsızlık sebebiyle, eklem hareketlerinde azalma veya kayba varan sonuçlar oluşabilir. Eklem hareket açıklığındaki kısıtlılık kişinin günlük yaşam aktivitelerini ve kendine bakımını da etkiler. Özellikle dominant elde oluşan lenfödem ve ağrı hastalarda ek bir emosyonel strese neden olur. Ağrı genellikle yumuşak dokuların gerilmesine bağlı olarak ortaya çıkabildiği gibi tromboz, enfeksiyon, sinir hasarı veya tümör rekürensiyle de ilişkili olabilir. Yapılan bir çalışmada yaklaşık olarak hastaların %30'unda ağrının tedavi ile gerilediği gösterilmiştir.

Bosompra ve ark'nın yaptığı çalışmalarında mastektomi geçiren 148 hastadan %35'i ödem, %15'i orta şiddette ağrı ve %34'ü kolun günlük kullanım ve kuvvetinde azalmadan şikayet etmişlerdir.[162] Lenfödemli kol normal bir kola göre enfeksiyonlara daha açıktır ve enfeksiyon, lenfödemde tedaviyi de engelleyen önemli bir problemdir. Böyle bir durumda öncelikle enfeksiyon tedavi edilmeli, daha sonra lenfödem tedavisine geçilmelidir. Bu yüzden enfeksiyonu oluşmadan önlemek daha önemlidir. Velonovich ve Szymanski meme kanserine bağlı cerrahi geçiren hastalardan, lenfödem gelişen hastaların yaşam kalitesinin, gelişmeyenlere oranla daha düşük olduğunu saptamıştır.[163] Üst ekstremitenin tekrarlayan kullanımı ya da egzersizden kaçınılması şeklindeki davranışlar da hastaların genel iyilik hali ve yaşam kalitesini olumsuz etkiler. Tobin ve ark. lenfödemi olan kadınlarda depresyon, anksiyete, öfke, beden imajında değişim, cinsel yaşamda sorunlar, sosyal uyumsuzluk ve kanserle baş etmede yetersizlik görüldüğünü belirlemişlerdir.

4.4. KÖK HÜCRELER

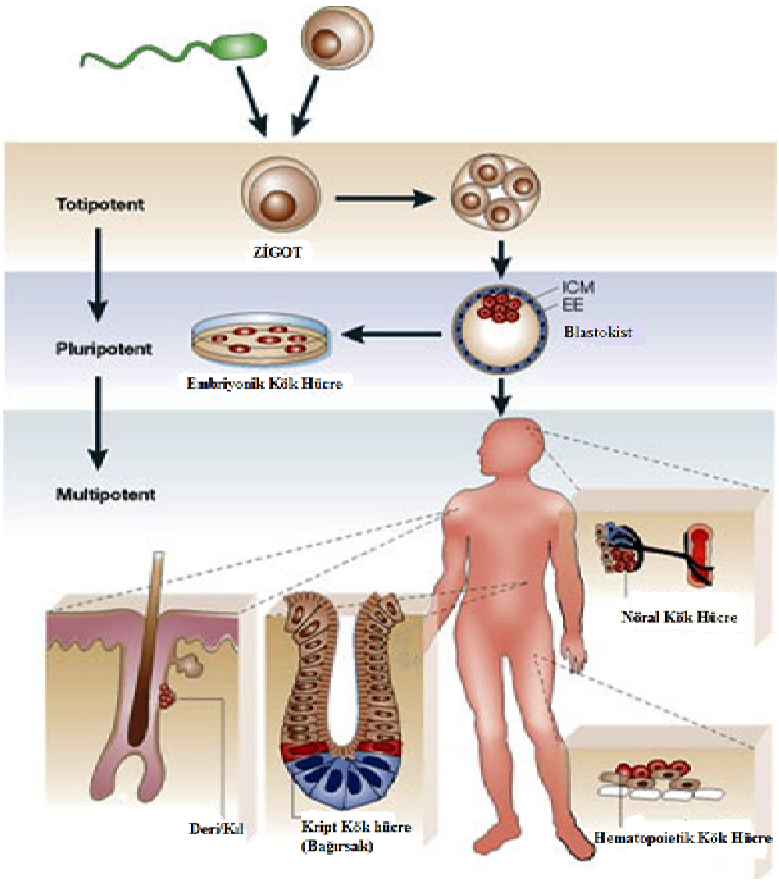
Kök hücre çalışmaları laboratuarda in vitro fertilizasyon embriyo transferi (İVF-ET) çalışmaları ile başlamış, 1968 yılında Edwards ve ark. tarafından insan ovumunun in vitro fertilizasyonu gerçekleştirilmiştir.[164] 1981 yılında Evans ve Kaufman'ın fare embriyonik kök hücrelerini elde etmeleri ile çalışmalar hız kazanmıştır.[165] İnsan embriyonik kök hücre çalışmalarına preimplantasyon tanı amacı ile başlanmıştır. 1998 yılında Thomson ve ark., ailelerin yazılı izni ile araştırma amaçlı olarak bağışlanmış embriyolardan, in vitro uygun koşullarda ektoderm, mezoderm ve endoderm kökenli hücreleri farklılaştırarak, insan embriyonik kök hücre serileri elde etmişler ve bu alanda çığır açmışlardır.[166]

Kök hücreler, bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneği olan, özelleşmemiş, farklılaşabilen, hasar gören bir dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen, in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile hücrelerin farklılaşmalarını sağlayabilen hücrelerdir. Bu özellikleri sayesinde sayılarını sabit tutarlar ve gerektiğinde kendilerinden sonraki hücrelere farklılaşmaya başlayarak görev yapacağı hücrelerin çoğalmasını, gelişimini ve olgunlaşmasını sağlamaktadırlar. Kök hücrelerin bölünmesi ve farklılaşmış yavru hücreler oluşturmasının yanı sıra yeni kök hücre de oluşturabilmektedir. Hayat boyu farklılaşmış hücrelerin üretiminde kaynak olarak görev yapabilmektedir.[167,168]

Kök hücreleri tanımlayabilmek için birtakım kriterlerler tanımlanmıştır.[169]

- Kök hücreler uzun süre bölünebilme ve kendini yenileyebilme (self-renewal) özelliğine sahiptir. Hücrelerin uzun bölünebilmesini belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda yer alan telomer denen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir (TTAGGG).
- Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Bir kök hücre, kalp kasında olduğu gibi kanı vücuda pompalamak için komşu hücrelerle birlikte çalışmaz. Eritrositlerde olduğu gibi oksijeni dokulara taşıyamaz. Ancak özelleşmiş hücrelere dönüşmek için kaynak oluşturabilir.
- Kök hücreler, özelleşmemiş hücrelere kaynaklık edebilirler. Bu olaya farklılaşma (diferansiyasyon) denir. Kök hücreler birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. En iyi örneği zigottur.
- Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilirler. Hematopoietik kök hücreler, sinir kök hücrelerinde[170] ve karaciğer öncüllerinde[171] gösterilmiştir.
- Kök hücreler, *in-vivo* koşullarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşabilirler. Örnek olarak embriyonik ya da erişkin kök hücrelerin blastokiste enjekte edildiğinde farklı hücrelere dönüşebilmesidir.

Kök hücreler üç germ yaprağına doğru gösterdikleri farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücreler olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır.[172] (Şekil-25)



Şekil-25: Kök Hücre Tipleri ve Farklılaşabildikleri Hücreler[173]

Totipotent kök hücreler: **"**Totus", tam, bölünmemiş; "Potentia" güç anlamına gelmektedir. Fertilizasyon ile spermiyum ve ovumun birleşmesi ile oluşan zigot, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonik hücredir. Bu hücreye her şeyi yapabilen anlamında *"totipotent hücre"* denir. Bu terim embriyonun 5. gününe kadar olan tüm blastomerleri için geçerlidir. Zigot en önemli ve ilk totipotent hücre olarak kabul edilir. Totipotent hücreler farklılaşma kapasitesine bakıldığında, vücuttaki tüm hücre ve dokulara farklılaşabilen hücre tipidir. Bu hücreler embriyonik ve embriyonik olamayan dokulara farklılaşabilirler. Totipotent hücreler gelişmenin ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşebilirler.

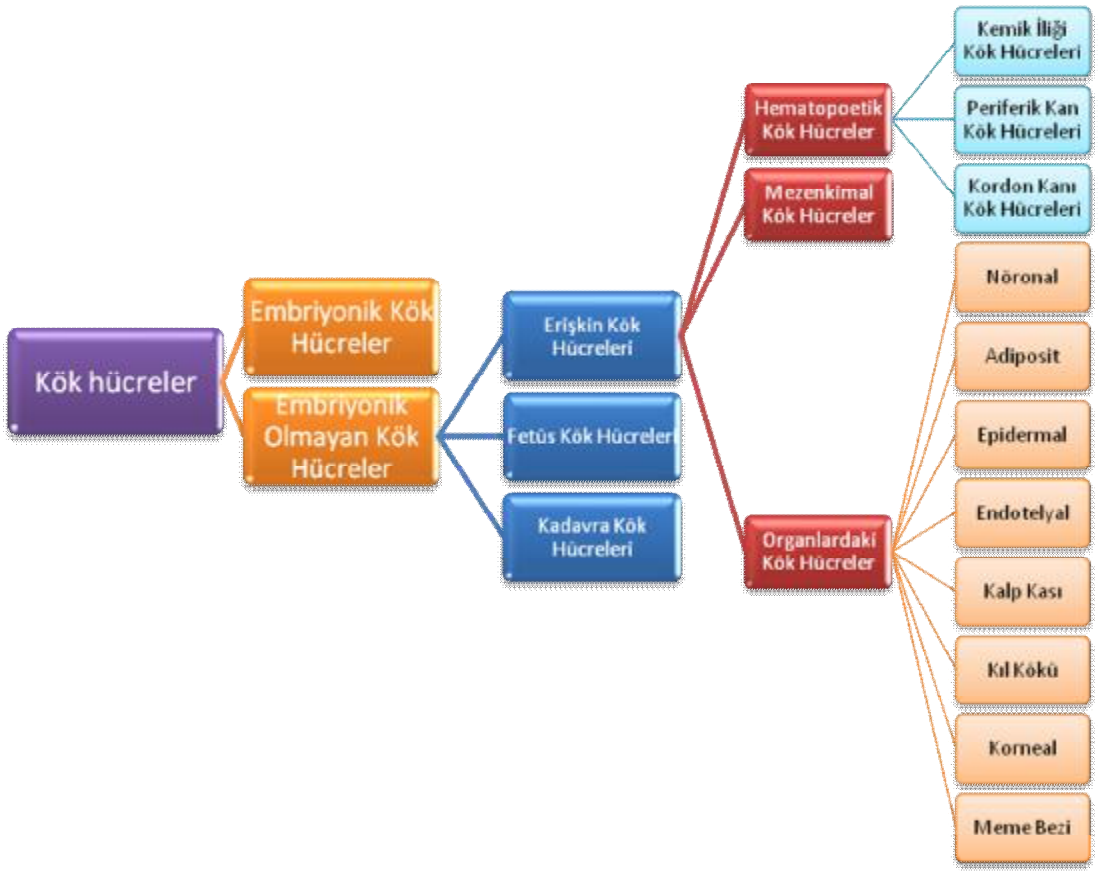
Pluripotent kök hücreler; embriyonun blastokist evresinden itibaren ve fetusta bulunabilen hücrelerdir**.** Embriyonik olmayan hücrelere farklılaşamazlar. Bu özellikleriyle totipotent hücrelerden ayrılırlar. Bu hücreler ektoderm, mezoderm ve endorderme ait tüm hücrelere farklılaşabilirler. Fetusun gonadal hücreleri pluripotent hücrelerdir.

Multipotent kök hücreler; sadece bir germ yaprağına ait hücre türlerine dönüşebilen hücrelerdir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, hücreler biraz daha özel görevlere sahip olur.

Somatik ya da erişkin kök hücresi olarak tanımlanan hücrelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreleri, tipik olarak bulundukları dokunun hücre türlerini oluşturmaktadır. Örneğin, kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücreler, kırmızı ve beyaz kan hücreleriyle birlikte trombositler gibi pek çok farklı kan hücresine kaynaklık etmektedir. Yine kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ise fibroblastlara, osteoblastlara, kondroblastlara ve yağ hücrelerine farklılaşabilmektedir. Sinir kök hücreleri, bütün sinir hücre türlerini oluşturabilmektedir. Bazı erişkin kök hücreler ise sadece tek bir olgun hücre tipine farklılaşabilmektedir (korneal kök hücre gibi). Sınırlı ya da self-renewal yeteneği olmayan ve sadece sınırlı bir hücre tipine farklılaşan bu hücreler "*progenitör hücre*" veya "*prekürsör hücreler*" şeklinde tanımlanmaktadır.[174]

4.4.1. Kök Hücre Çeşitleri ve Kaynakları

Kök hücreler esas itibariyle iki farklı kaynaktan elde edilmektedir: Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler (Şekil-26).



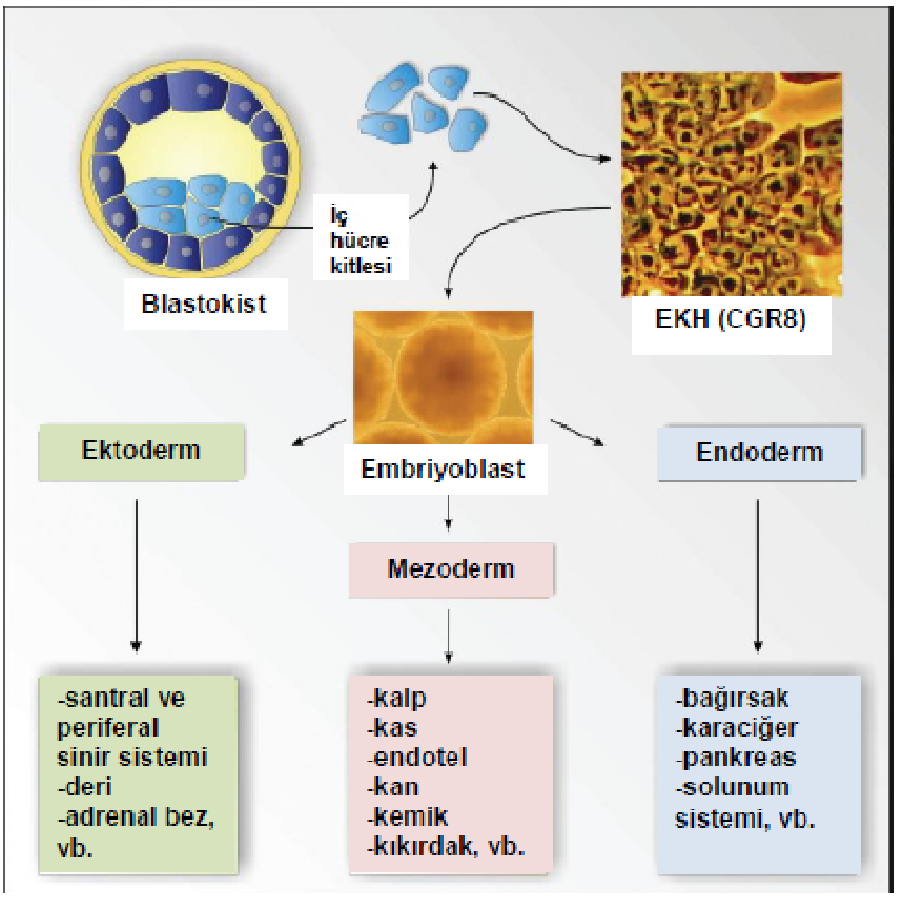
Şekil-26: Kök Hücre Kaynakları[187]

4.4.2. Embriyonik Kök Hücreler

Bilim adamları, farelerden pluripotent embriyonik kök hücreleri ilk olarak 1970'lerde keşfetti. Çok geçmeden bu primitif hücrelerin şaşırtıcı çok yönlülüğünü belirlediler. Bu hücrelerin olağanüstü umut açığa çıkarmasından yaklaşık 20 yıl sonra ise insan pluripotent embriyonik kök hücreleri tanımlandı. İnsan embriyonik kök hücreleri blastokist evresindeki erken insan embriyolarının bozulması ve özel kültür koşulları altında çoğaltılmasıyla elde edilmektedir. İnsan blastokist kökenli pluripotent kök hücre hatlarının normal karyotipe sahip oldukları ve yüksek seviyede telomeraz aktivitesi gösterdiği ve primitif embriyonik kök hücreleri tanımlayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ettiği gösterilmiştir.[175]

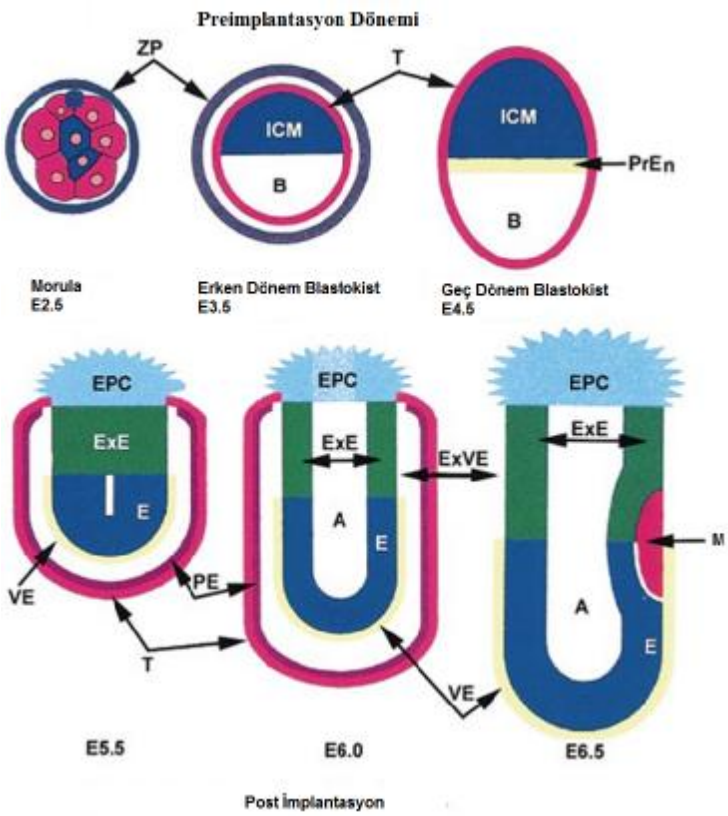
Embriyonik kök hücreler blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir. Uygun kültür ortamı sağlandığında bu hücreler farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile bu hücrelerin farklılaşması da sağlanabilir. Embriyonik kök hücrelerin bu hücrelere farklılaşabilme özelliklerinden yararlanılarak doku hasarında daha hızlı iyileşmenin sağlanması veya sinir hücresi gibi hasarlandıktan sonra yerine konması mümkün olmayan hücrelere farklılaştırılarak yara tamirlerinde kullanılması son yıllardaki en önemli araştırma konularındandır.

Embriyonun ilk hücresel farklılaşması morulayı oluşturan hücrelerin blastokist hücrelerine farklılaşmasıdır. Morulanın dış tarafında bulunan hücreler sıvı transportunu sağlayan ve blastoselin oluşmasında rol oynayan trofoblast epitel hücrelerine farklılaşır. İçte bulunan morula hücreleri ise blastokistin iç hücre kitlesini oluşturur. İç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotent kök hücreler olup embriyoyu oluşturacak olan tüm dokuların esas kaynağıdır (Şekil-27). İç hücre kitlesini oluşturan hücreler onların esas kaynağı olan totipotent morula hücreleri gibi artık totipotent değildirler, çünkü morula hücreleri embriyo dışı oluşumları oluşturacak olan hücrelerden farklılaşır.



Şekil-27: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve pluripotensi[176]

Fare embriyosunda yarıklanma dönemi ile birlikte başlayan farklılaşma süreci iç hücre kitlesi ve trofoblast hücrelerinin oluşması ile devam eder. Yaklaşık 32-hücreli olduğunda ise (Embriyonik gün olarak 3,5. güne uyar) iç hücre kitlesinin farklılaşması başlar. Bu dönemde DNA metilasyonu gerçekleşmesi ile somatik hücre farklılaşması ve gastrulasyon süreci ile devam eder. Yaklaşık 4 günlük fare embriyosunda blastosel tarafında bulunan iç hücre kitlesi hücreleri primitif endodermi (PrEN), iç kısımda bulunan polarize olmayan 20 kadar pluripotent hücre ise primitif ektoderme farklılaşır (Şekil-28). Hücrelerin proliferasyonu 6 günlük embriyoda başlar. 5,5. güne kadar epiblast hücreleri totipotent olarak kalırlar ve iç hücre kitlesi hücreleri gibi alkalen fosfataz, E-kadherin, SSEA-1 ve Oct4 pozitiftir. Bu dönemdeki embriyoda trofoblast hücrelerden ziyade iç hücre kitlesini oluşturan hücrelerde birçok faktör salgılanır. Örneğin embriyonik gelişimin erken dönemlerinde organizasyondan sorumlu İntegrin-β1, epiblast hücrelerini apoptozisden koruyan taube nuss (tbn) veya Smad 2 gibi erken farklılanmayı önleyici faktörler salgılanır.[177]



Şekil-28: Pre ve post-implantasyon dönemindeki embriyo gelişimi ve farklılaşan yapılar[153].

ZP: Zona pellucida, **ICM**: İç hücre kitlesi, **B**: Blastosel, **PrEN**: Primitif endoderm, **VE**: Visseral endoderm, **PE**: Parietal endoderm, **T**: Trofoblast, **ExE**: Ekstraembriyonik ektoderm, **ExVE**: Ekstraembriyonik visseral endoderm, **A**: Amnion, **EPC**: Embriyonik plasental zon, **A**: Amniyonik kavite, **M**: Mezoderm

Prensipte embriyonik kök hücreler vücuttaki her hücreyi oluşturabilir ve farklılaşmış bir hücreyi meydana getirebilir. Kolombiya üniversitesindeki araştırıcılar fare EKH'lerinin spinal öncü hücrelerine ve motor nöronlarına farklılaştığını gösterdiler. İnsan EKH ile şimdiye kadar yapılan ksenograft ve in vitro deneme çalışmalarında, hematopoietik hücre, kardiyomiyosit ve epitel hücreleri gibi birçok hücre tipinin oluştuğu bildirilmiştir.

İnsan EKH'lerini fare embriyonik fibroblast hücreleri yerine insan fetal ve erişkin fibroblast besleyici tabaka kullanarak uzun süre farklılaşmadan kültüre edilmiştir. Normal karyotipe sahip bu hücreler Oct-4, Nanog, Sox-2, SSEA.3/4, TRA1-60 ve GCTM-2 gibi hücre yüzeyi ve nükleer antijenleri eksprese etmektedirler. İlginç olarak insan ve fare EKH'lerinin antijenik özellikleri birbirinden farklılıklar gösterebilmektedir (Tablo-3).[178]

Diferansiye Olmayan EKH belirteçleri	İnsan	Fare
Hücre-yüzeyi ve nükleer antijenler		
SSEA.1	-	+
SSEA.3/4	+	-
TRA1-60/81	+	-
GCTM-2	+	-
CD133 / Prominin	+	+
Oct-4	+	+
Nanog	+	+
Sox-2	+	+
Rex-1	+	+
SSEA.3/4	+	-
Enzimatik aktiviteleri		
Alkalen fosfataz	+	+
Telomeraz	+	+
İn vitro kültür gereksinimleri		
Besleyici-hücre bağımlı	+	+
LIF bağımlı	-	+
FGF-4	-	+
Büyüme Özellikleri		
Trofoblast oluşturabilme	+	-
İn vivo teratom oluşumu	+	+

Tablo-3: Fare ve insanlarda en iyi tanımlanan embriyonik kök hücre göstergeleri

İnsan ve fare EKH'lerinde Oct-4, Nanog ve Sox-2 transkripsiyon faktörleri ve alkalen fosfataz yüksek oranda eksprese edilmektedir[179]. Fonksiyonel çalışmalar pluripotent kök hücrelerin kaderini devam ettiren bu transkripsiyon faktörlerinin benzer rollerini akla getirmektedir. Örneğin insan EKH'lerinde genetik manipülasyonlarla Oct-4'ün azalan ekspresyonu trofoektodermal farklılaşmaya neden olmaktadır.[180] Oct-4, Nanog ve Sox-2'nin nükleer transkripsiyonel mekanizmasının genomik etkileşim bölgelerinin analizi diferansiye olmayan kök hücrelerde var olan olası nükleer transkripsiyel sisteminin parçalarını göstermektedir.[181] Bu transkripsiyon faktörleriyle fare ve insan EKH'lerinin intrinsik kontrolünün benzerliklerine rağmen ekstrensik faktörlerin etkileri oldukça farklıdır. Fare EKH'leri besleyici hücre varlığında yaşamını sürdürebilmesi için LIF (lösemi inhibe edici faktör) sitokinine bağımlı olmasına rağmen insan EKH'leri için zorunlu değildir. Bundan başka Aktivin ve TGF-β (tümör

büyüme faktör-β) insan EKH'lerinin self-renewal'ını desteklerken BMP (bone morphogenic protein) ise fare EKH'lerinin farklılaşmasını uyarır ve kendi kendini yenileyebilmesini desteklemektedir.[182]

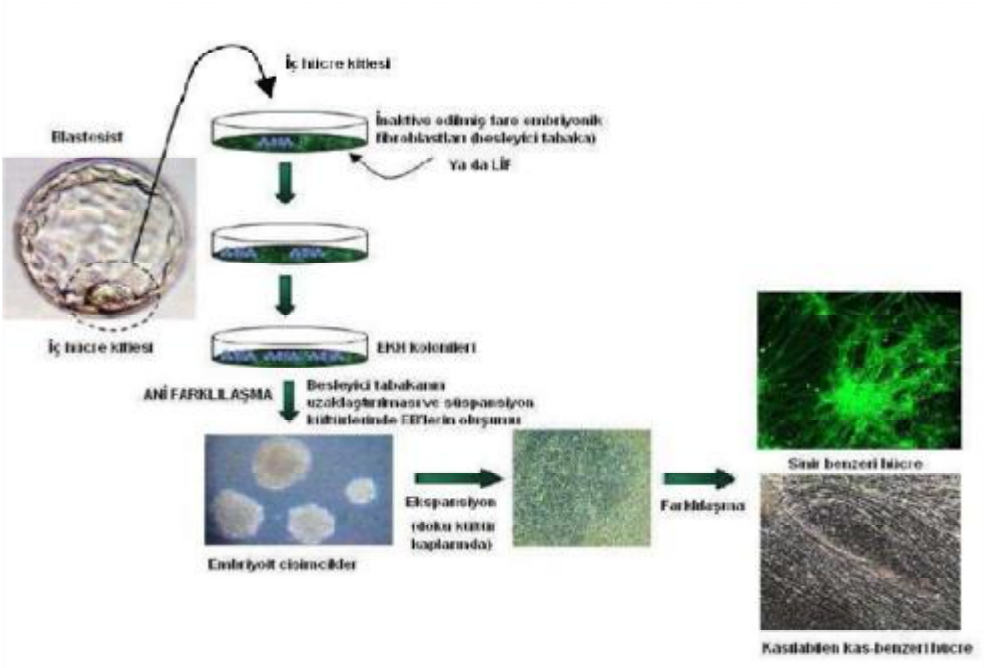
Pluripotensi çok hücreli organizmalarda temel bir biyolojik fonksiyondur. Farklı kök hücre tiplerinde, olasılıkla evrimsel olarak çok sayıda genetik sistemlerle korunmaktadır. Embriyodaki pluripotentliğin düzenlenmesindeki moleküler temelinin çok az bilinmesine rağmen çeşitli genlerin pluripotent hücrelerin gelişimi için zorunlu olduğu tanımlanmıştır. Bunlar transkripsiyon faktör Oct.4, FoxD3 ve yeni genleri içermektedir. Homozigot fare embriyosunda bu genlerin herhangi birisinin yetersizliği embriyoda pluripotent serinin bozulmasına neden olmaktadır. İç hücre kitlesinin uygun gelişimi Oct-4 gen ekspresyon seviyesiyle doğrudan ilişkilidir. Orta aşırı ekspresyon, ekstra embriyonik endoderme farklılaşmasına sebep olurken yetersiz ekspresyon ise trofoektoderme farklılaşmayı zorlamaktadır. Erken embriyonik dönemde ifade edilen transkripsiyon faktörleri kök hücre pluripotensini düzenlemektedir. Hücrelerin kendisini yenilemesinde ve farklılaşmadan kalmasında önemli rol oynamaktadır.

Yapılan çalışmalar, EKH'lerin pluripotensi ve kendini yenileyebilmesi için Oct-4 ve Nanog transkripsiyon faktörlerinin zorunlu olduğunu göstermektedir. Bu transkripsiyon faktörleri özellikle embriyonik dönemde transkripsiyonel düzenleyici, büyüme faktörleri, sinyal molekülleri, DNA hasar-yanıt sensörleri ve lineage-özgü genlerin baskılanmasını kodlayan genleri kontrol etmektedir.

4.4.2.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü ve Farklılaşması

İnsan ve fare EKH'lerinin morfolojisi ve büyüme özellikleri birbirinden farklıdır. Fare EKH birbirleri ile bir koloni şeklinde tek tek hücrelerin ayırt edilemeyecek şekilde büyür ve alttaki fibroblast tabaka hücrelerinden ayrı hücre kolonileri şeklinde ayırt edilirler. Hem fare hem de insan EKH'leri büyümeleri için altta bir hücre tabakasına ihtiyaç duyarlar. Genellikle hem fare hem de insan EKH'leri için fare fibroblast hücreleri kullanılmaktadır, fakat bu hücreler konfluent olduktan sonra, farklılaşmaları durdurulmuş olmaları gerekmektedir. İnsan EKH'lerinin fare fibroblast hücreleri üzerinde üretildikleri sırada virus ile bulaş olabileceğinden bu alt tabaka olmadan üretilebilmesi üzerine çalışmalar sürmektedir. Fibroblast tabakalarından oluşabilecek olumsuz etkiler göz önüne alınarak EKH kültürüne olanak sağlayacak kimyasal ürünle kullanılmaktadır.[183] Bunlara örnek olarak içerisinde esas olarak Laminin ve kollajen içeren Matrijel'dir. Bir ekstrasellüler yapı olarak görev alan Matrijel üzerinde yapılan EKH kültürleri ile fibroblast tabakaları üzerinde yapılan kültürler arasında farklılık gözlenmemiştir. Bir grup

araştırmacı da fibroblast tabaka olmadan serum içeren kültür vasatı içerisine bFGF ilave edildiğinde hiçbir etki gözlenmemiş iken, serum olmayan ortamda bFGF ilavesi insan EKH'lerinin farklılaşmasını inhibe ettiği ve kök hücre özelliğinin devam ettiği gözlenmiştir. Diğer bir grup ise serum içermeyen fakat FGF-2 bulunan kültür ortamında Laminin veya Matrijel içeren bir bazal membran üzerinde insan EKH'leri üretilmiştir. Bu konuda farklı denemeler sürmektedir. Hem fare hem de insan EKH kültür ortamları birbirine benzerdir. EKH kültür ortamı için öncelikle bir bazal ortam gereklidir. Bazal ortam Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal sığır serumu, esansiyel olmayan amino asit, sodyum purivat, β-merkaptoetanol, L-glutamin, penicilin/streptomisin ve Lösemi İnhibe Edici Faktör (LIF) varlığında kültüre edilir. Fare EKH'leri her 2 günde bir, insan EKH'leri her gün vasat değişimi gereklidir. İnsan EKH, fare EKH aksine tek hücre halinde kaldıklarında çoğalma özelliği gösteremezler. O nedenle insan EKH'leri tek tek hücre halinden farklı olarak grup hücre şeklinde pasajları sağlanmalıdır. Oluşturulan koloniler farklılaştırılmak üzere uygun kültür ortamına alınmalıdır. Fare EKH kolonileri rutin pasaj işlemlerinden (tripsinizasyon işlemi) sonra damla yöntemi ile, insan EKH kolonileri manüel olarak kolonilerin mekanik olarak parçalanması ile elde edilen hücrelerin uygun kültür ortamına alınarak farklılaştırılması sağlanır. İnsan EKH tripsin veya kollajenaz kullanılarak enzimatik olarak da elde edilebilir. Fakat daha çok tercih edilen yöntem mekanik yöntemdir. Fare EKH her 3 günde bir, insan EKH'de 5-7 günde bir pasaj yapılabilir. Farklılaştırılma için gerekli olan kültür ortamı, yukarıda tarif edilen EKH kültür ortamından LIF'in çıkartılması ile sağlanır (Şekil-29).



Şekil-29: Embriyonik kök hücrelerin blastokistten eldesi ve kültürü[184]

EKH damla metodu ile farklılaştırılmaları sağlanabilir. Damla metodu daha çok fare EKH için uygulanır iken, insan EKH farklılaştırılmalarında manüel olarak kolonilerin parçalanması ile elde edilen hücre grupları direkt olarak farklılaşmayı sağlayıcı kültür ortamına konularak elde edilir. Bununla beraber damla metodu insan EKH'leri içinde kullanılabilir.

4.4.3. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Farklılaşmış (özelleşmiş) kaynaklardan elde edilir. Multipotenttirler. Köken aldıkları özelleşmiş doku ve ilişkili diğer dokular gelişir.

1- Erişkin (somatik) kök hücre

• Hematopoietik kök hücre (HKH);
    o Kemik iliği kaynaklı kök hücreler.
    o Periferik kan kaynaklı kök hücreler.
• Stromal kök hücre;
    o Mezenkimal kök hücre (MKH).
    o Multipotent erişkin kök hücre.
    o Erişkin kemik iliği kökenli indüklenebilir multilineage kök hücre.
    o İnsan kemik iliği kökenli kök hücre.
• Organ spesifik kök hücreler.

2- Fetal kök hücre

3- Kadavradan elde edilen kök hücre.

4- Kordon kanı veya plasental kök hücre.

5- Partenot hücreleri (partenogenez)

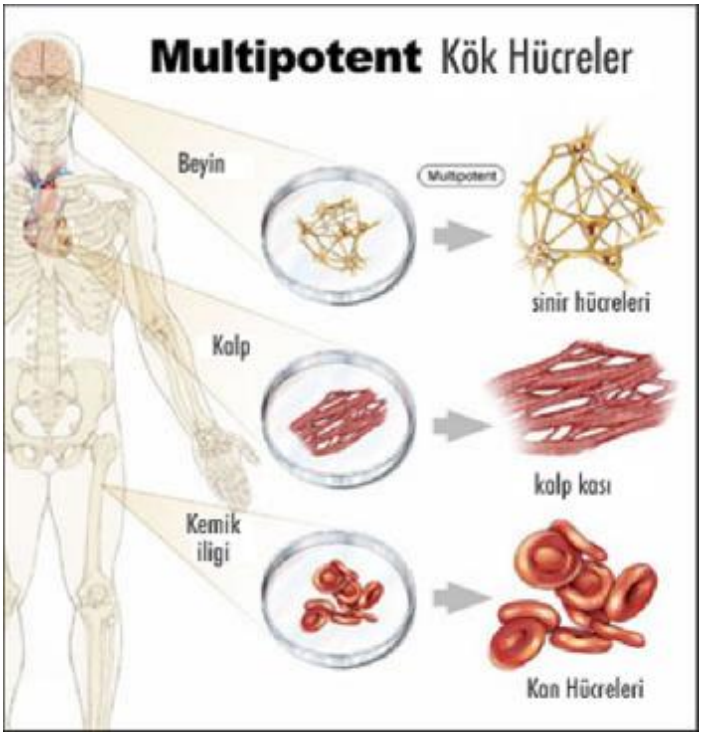
Erişkin (Somatik) Kök Hücre:

Embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha sonraki basamaklarında görülen bu hücreler, organizmanın yaşamı boyunca daha sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korurlar. Erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğindedirler. Daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır ve multipotent kök hücrelerdir. Bu hücrelerin, vücut dışında embriyonik kök hücreler kadar uzun süre

özelliklerini koruyarak çoğalma yetenekleri yoktur. Kişinin immun sistemine uyum gösterirler, ancak tüm hücre tiplerine dönüşemedikleri için kullanımları sınırlıdır, teratokarsinom oluşturmazlar. Günümüzde, erişkin kök hücrelerin diğer organ ve dokulara farklılaşması yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Organizmada ancak belirli birkaç hücre türüne dönüşebilen erişkin kök hücreleri, laboratuar koşullarında gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında birçok farklı hücre türüne dönüşebilmektedirler.

En iyi tanımlanmış embriyonik olmayan kök hücreler Hematopoietik kök hücreler olmakla birlikte, erişkin kök hücrelerin beyin, barsak, kas, deri/kıl follikülü, kalp, akciğer ve son zamanlarda meme bezi gibi çeşitli doku ve organlarda varlığı gösterilmiştir, hücresel fenotipik yüzey belirteçleri ile ayırt edilebilmektedirler.

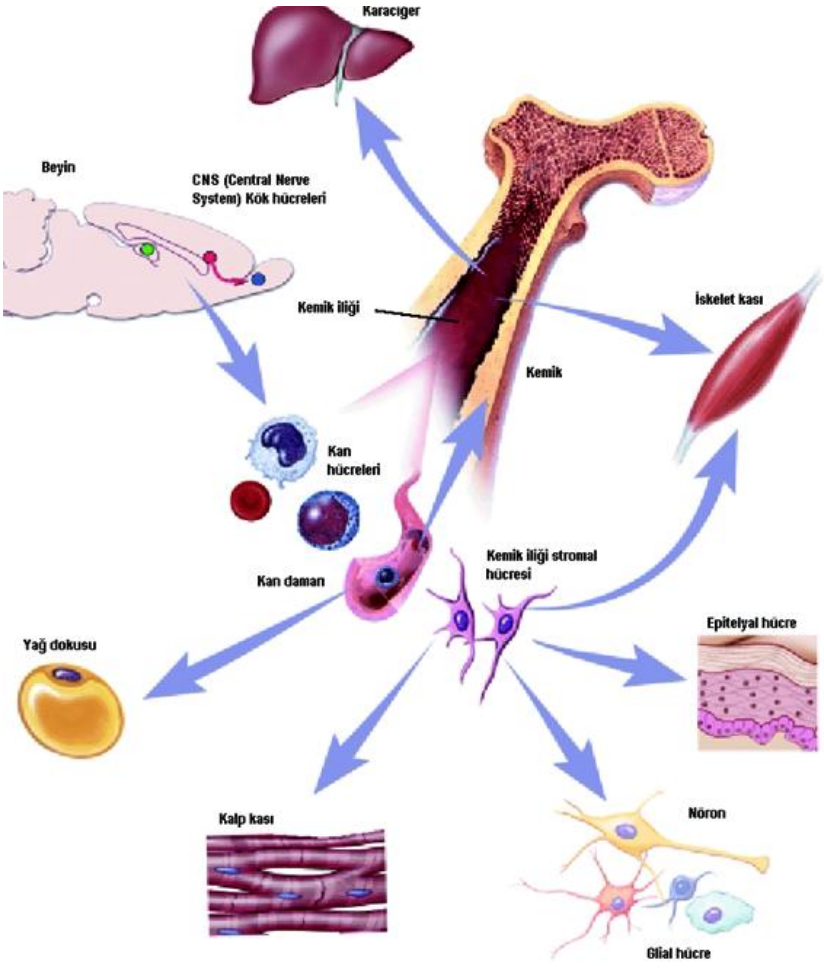
Erişkin kök hücrelerin fizyolojik işlevi doku homeostazını sağlamakla birlikte doku hasarından sonra rejenerasyonu sağlarlar. Dokular içindeki erişkin kök hücreler bölünme yeteneklerini kaybederlerse hasarlı veya hastalıklı dokuların tamiri ve yenilenmeleri imkansız hale gelir. Erişkin kök hücreler biyolojik, genetik ve moleküler özellikleri ile kendilerinden sonraki dokuya özgül hücrelere farklılaşarak dokuyu yenilemektedirler.[185] Bir organizma olgunlaşırken, kök ve öncül hücrelerin sayısı azalır. Dolayısıyla, erişkinlerdeki dokular az sayıda kök ve öncül hücre içermektedir ve bu hücreler farklı anatomik yerleşimlerle sınırlıdırlar (Şekil-30).



Şekil-30: Bazı erişkin kök hücreler ve vücutta bulundukları yerler[186]

Hematopoietik Kök Hücreler (HKH):

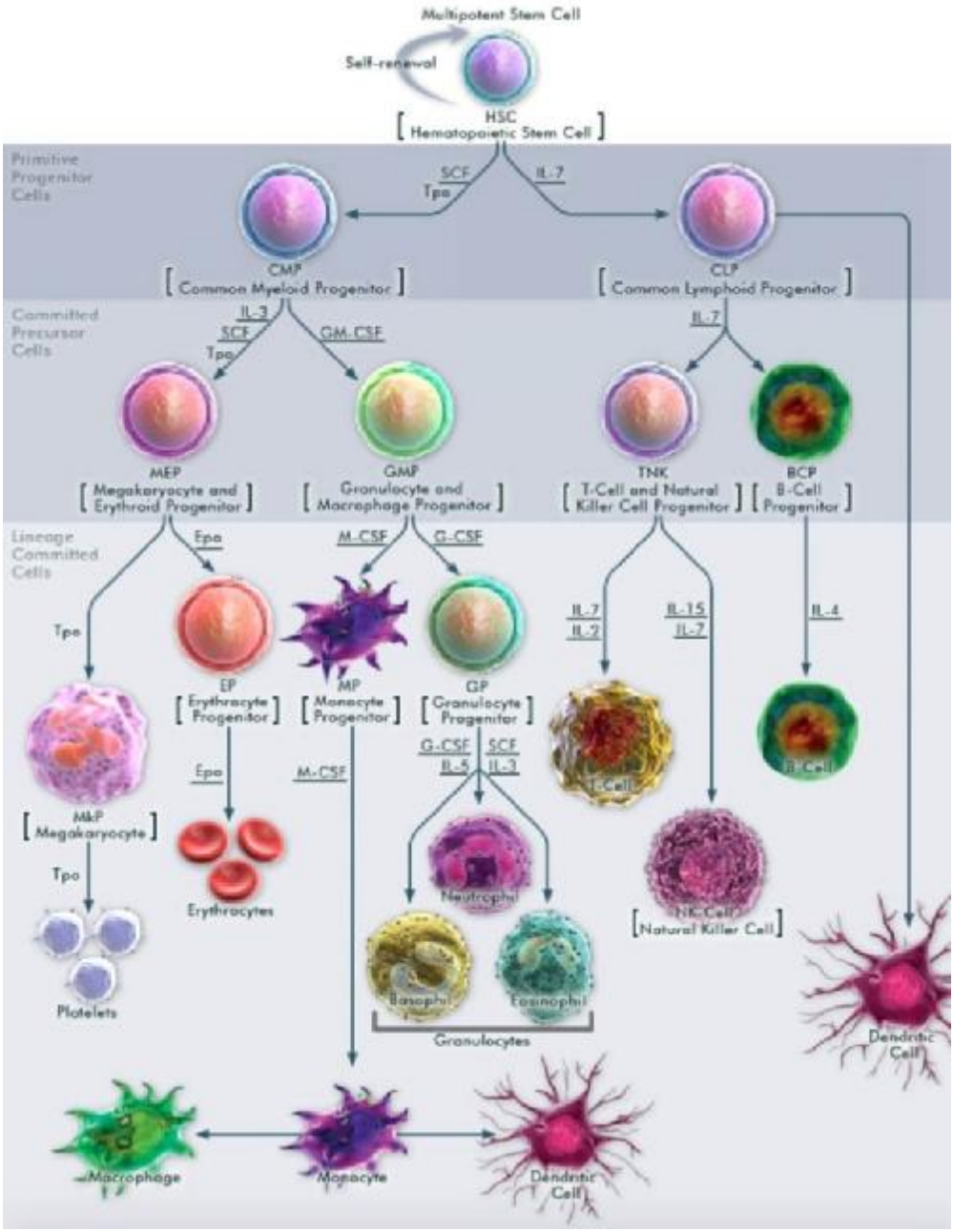
Üzerinde en çok çalışılan ve tedavide yaygın olarak kullanılan erişkin kök hücrelerdir. Kendi kendine yenileyebilme ve bütün matür kan hücrelerine farklılaşabilme özellikleri vardır. Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetal karaciğerden elde edilebilirler. Dokudaki toplam hücrelerin %0,005 kadarını oluşturan HKH'in büyük çoğunluğu kemik iliğinde bulunmaktadır. Erişkin dokularda bulunan kök hücreler esas olarak sessiz (quiescent) durumdadırlar. Tek bir HKH birçok alıcıda yeniden yeterli primitif soyunu (progeny) oluşturabilmesine rağmen onların potansiyelini devam ettiren ya da onların kendi kendilerini yenilemelerini düzenleyen moleküler mekanizmaları çok bilinmemektedir (Şekil-31).



Şekil-31: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri[187]

Yüzey belirteçleri başlıca, CD34, CD14, CD45 ve CD133'dür. İntrensek ve ekstrensek sinyaller ile farklılaşmaları düzenlenmektedir. HKH mikroçevresi (niche) tanımlanması ile gelişmenin kök hücre ile çevresi arasındaki etkileşim ile dengede olduğu belirlenmiştir. Son yapılan çalışmalar ile Wnt, Notch, kemik morfojenik protein (BMP), sonic hedgehog ve fibroblast büyüme faktörü'nün HKH hücre farklılaşmasını kontrol ettiği gösterilmiştir.

Osteoblastik ve damarsal mikroçevre, HKH'nin çoğalma, farklılaşma, mobilizasyon ve homing gibi davranışlarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Dolaşımdaki kök hücreler kemik iliği mikroçevresi ile temasa geçerek, endotel ve adezyon moleküleri aracılığı ile buraya yerleşirler. Kök hücre faktörü kemik iliğinde stromal hücreler tarafından salınır ve HKH üzerindeki c-kit antijenine bağlanır. Kök hücre faktörünün, İnterlökin-1 (IL-1) IL-3 veya IL-6 ile kombinasyonları HKH'lerin eritroid ve myeloid yönde çoğalmalarını sağlar. Sessiz fazdan çoğalma fazına geçmesi için uyarılar gereklidir. Kültür ortamına eritropoietin, G-CSF, GM-CSF veya M-CSF eklenmesi HKH'lerin myeloid öncü hücrelere farklanmasını sağlar (Şekil-32).



Şekil-32: Hematopoietik kök hücre serisi[188]

Normal fizyolojik durumda, HKH ve erişkin kök hücreler, sessiz dönemde uzun süre kalabilirler. Hücre siklusu regülatörlerinden, p21 CIP1 ve p18 INK4C'in HKH'lerin sessiz kalmalarını düzenledikleri gösterilmiştir. Sessiz dönemlerinden ayrıldıklarında, kök hücreler intrensek ve ekstrensek uyarıcı sinyallerin etkisine bağlı olarak kendini yeniler ya da progenitör hücreye farklanırlar. Bu sinyaller pozitif ve negatif regülatörler arasındaki dengeyi oluşturur. Wnt sinyal yolağı, kök hücrenin kendini yenilemesinde anahtar faktördür. Notch ve hedgehog sinyal yolakları da HKH kendini yenileme için düzenleyici rol oynamaktadır. Diğer sinyaller olan BMP ve TGF-β yolakları kök hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicisidirler. BMP ve Wnt sinyali arasındaki karşılıklı etkileşim kök hücrenin geleceği için çok önemlidir. Pozitif ve negatif regülatörler arasındaki çok hassas denge kök hücrenin kendini yenileme ve farklılaşma yolunda gelişmesi in vivo olarak problemli olabilir. Örneğin, Wnt sinyalinin kök hücre ya da progenitörler de genetik değişikliğe uğraması, lösemi ve diğer kanserlerin gelişmesine yol açmaktadır.[189]

Kordon Kanı Kök Hücreleri:

Bebeğin doğumunun ilk yarım saati içerisinde alınan plasenta ve göbek kordon kanı erişkin kök hücreler için önemli bir kaynaktır. Kordon kanı kök hücrelerinin avantajları: genç hücreler olmaları; yaşayabilme yeteneklerinin yüksek olması; fazla sayıda elde edilebilir olmaları ve alıcıya kolay uyum sağlamalarıdır. Kordon kanı elde edildikten sonra eritrositler uzaklaştırılarak, dondurularak, sıvı nitrojen içerisinde kordon kanı bankacılığı arşivinde saklanır. Göbek kordon kanı, kök hücre kaynağı olarak 1988 yılından beri çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Partenot Hücreleri (Partenogenez):

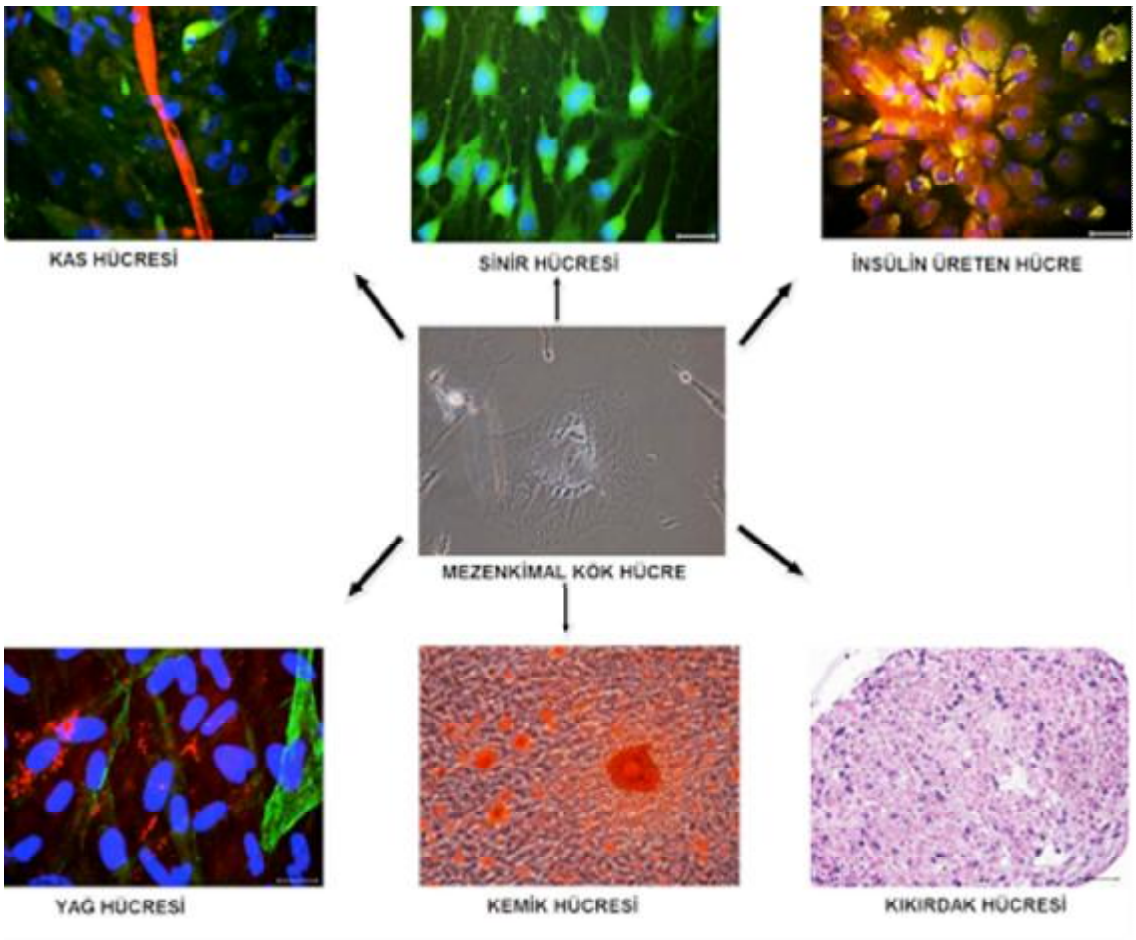
Fare dahil birçok memeli hayvanın oositi, ortamda sperm olmaksızın embriyonik gelişimi başlatılmak üzere uyarılabilmektedir.[190] Özellikle kök hücre ya da klonlama çalışmalarında, nükleer transferin uygulandığı alıcı oositin aktivasyonu, bu prosedürlerin en önemli aşamasıdır. Bunun dışında, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim sırasında meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin çalışılması için model olarak partenotlar kullanılabilmektedir.

Partenogenetik aktivasyon; spermatozoon girişi olmaksızın gerçekleşen embriyonik gelişim sürecidir ki alt düzey canlılarda yeni bir birey oluşumu ile sonuçlanabilir. Ancak

memelilerde partenogenetik aktivasyon ile elde edilen embriyolar olan partenotlar, türe göre değişiklik gösterir şekilde farklı evrelere kadar gelişebilir ise de hiç doğum elde edilememiştir. Spontan partenotlar olarak da isimlendirilen in vivo oluşan partenotlara nadiren rastlanır ve bunların farklı germ tabakalarından köken alan tümörlerin (teratom) primer nedeni olduğu düşünülmektedir. İn vitro olarak partenot eldesi için kullanılan ilk yöntem; 1939 yılında tavşanlara uygulanan ısıtma yoluyla partenogenetik embriyo eldesidir. Ardından domuz ve tavşanlarda başka bir aktivatör olmadan başarılı bir şekilde partenogenezi sağlayan elektriksel uyarım uygulanmıştır. 1970'li yıllarda, fare oositlerinin aktivasyonu için anestezik ya da hiyaluronidaz uygulaması denenmiştir. Bu yöntemler dışında ise; kalsiyum iyonoforları, etanol, stronsiyum gibi kimyasal ajanları kullanarak ya da İnozitol 1, 4, 5-trifosfat (IP3) reseptörlerinin azaltılarak düzenlenmesi yolları ile aktivasyon sağlanmıştır. Stronsiyum, fare oositlerinin aktivasyonu için sıklıkla kullanılan bir ajandır.

4.4.3.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal kök hücreler bağ dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilir (Resim-7). Bunun yanı sıra tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler. Bu hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, FCS (fetal buzağı serumu) kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. Yıllar sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoietik özellikte olmayan (non-hematopoietik) pluripotent kök hücreler olduğu, her üç germ yaprağından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneği bulunduğu ortaya konmuştur. Önceleri, CFU-F (Colony forming unit fibroblast) ve "Kemik iliği stromal fibroblast"ları denilen bu hücreler daha sonra mezenkimal kök/stromal hücre olarak tanımlanmışlardır.



Resim-7: Mezenkimal kök hücre farklılaşma potansiyeli[185]

Araştırmacılar arasında, mezenkimal kök hücrelerin tipik özelliklerini tanımlamada bazen çelişkiler yaşanmaktadır. Birçok laboratuar, birbirinden çok da önemli farklılıklar içermeyen protokolleri izleyerek MKH izolasyonu ve bu hücrelerin çoğaltılması, farklılaşmaya yönlendirilmesi için çeşitli metotlar kullanmaktadır. Farklı dokulardan morfolojik ve biyolojik olarak benzer özelliklere sahip MKH'ler izole edilebilmektedir. Kemik iliğinden izole edilen ve kültür ortamına ekilen mezenkimal kök hücreler, hızlı plastik adezyon yeteneği ile yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahiptirler. Kültür ortamlarında morfolojik olarak incelendiklerinde fuziform şekilli, fibroblast benzeri görünüm arz ederler. İmmunofenotipik özellikleri itibariyle CD34, CD45, HLADR ve CD14 gibi tipik hematopoietik belirteçleri göstermezler. Buna karşın CD105 (SH_2), CD73 ($SH_{3/4}$) gibi hematopoietik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederler.

Ancak yine de hücrelerin farklılaşma ve immunomodulatör özellikleri, in vivo etkinliği gibi konularda hücrelerin geliştirildiği çevre koşullarına bağlı değişiklikler olduğu bildirilmektedir. Bu nedenlerden ötürü Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), hem temel

araştırmalar hem de preklinik çalışmalar için insan MKH'lerini tanımlamada gerekli kriterleri önermiştir.

Uluslararası Hücre Tedavileri Derneği (ISCT) mezenkimal kök hücreler için 3 tanımlayıcı özellik önermektedir.

1-Standart kültür ortamında plastiğe yapışabilmeleri,

2- CD105, CD73 ve CD90 taşımaları, ancak CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR taşımamaları,

3- İn vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri[191]

Bu hücrelerin, ISCT tarafından, "kök hücre" olarak isimlendirilmek yerine "mezenkimal stromal hücre" veya "multipotent mezenkimal stromal hücre/ MSC" olarak adlandırılmaları önerilmiştir. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalarda, hücrelerin, bağ dokusu yanında endodermal ve ektodermal kökenli farklı hücrelere dönüşebilme özelliklerinin de gösterilmiş olması, bu hücrelerin halen birçok araştırıcı tarafından "mezenkimal kök hücre" olarak bahsedilmesine neden olmaktadır.[192]

Mezenkimal kök hücrelerin yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitelerine sahip olmaları doku mühendisliği için ideal aday olmalarına neden olmuştur. Ayrıca engrafmanı hızlandırıcı ve immunmodülatör etkilerinin keşfi kemik iliği transplantasyonunda klinik kullanıma girmelerine olanak sağlamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin başta hematopoietik kök hücre nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeline sahip olmaları bu hücrelere olan ilgiyi giderek artırmıştır.

4.4.3.1.1.Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH'ler için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoietik, endotel ve mezenkimal kök/progenitör hücreler bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda 1x10 mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arasında değişen sayıda MKH mevcut olduğu gösterilmiştir. Kemik iliği dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Solid dokulardan hücre izolasyonunda enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kemik/ periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasiyal dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinoviyal sıvı, hatta

periferik kandan da adezyon özellikleri nedeniyle ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür. Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokudan bağımsız olarak plastik doku kültür kaplarına yapışabilme, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi birçok özellikleri vardır. Bu özellikler büyük ölçüde benzerlik gösterir. Ancak farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özelliklerinde, köken alınan doku tipine göre bazı değişiklikler olabildiği de gösterilmiştir. Bulundukları mikroçevreye ve organizmada ihtiyaç duyulma haline bağlı olarak, MKH'lerin biyolojik özellikleri ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler olduğu da gösterilmiştir. Bununla ilişkili olarak da spesifik bir dokunun onarımı için, o bölgeden elde edilen kök hücrelerin kullanımının avantajları olacağı gündeme gelmiştir. Periferik kanda MKH varlığı ise tartışmalıdır. Periferik kanda osteojenik farklılaşma yeteneği olan hematopoietik olmayan ve MKH karakterinde hücreler olduğu gösterilmiştir. Özellikle ağır hasar olan durumlarda, kemik kırığı, multi organ yetmezliği hallerinde periferik kandan MKH izole edildiği gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerle yapılan çalışmalar hep in vitro olduğundan, hücrelerin dokularda yerleşimi, yuvaları/ niş (niche) bölgeleri detaylı incelenmemiştir; yine de özellikle son zamanlardaki çalışmalarda, hücrelerin dokularda perisitler gibi perivasküler yerleşimde olduğu, komşu hücrelerin olgunlaşma, farklılaşma ya da sessiz kalma gibi hücresel fonksiyonlarını koordine ettikleri bildirilmiştir.

4.4.3.1.2.Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve Farklılaşması

Hücrelerin in vitro kültür ortamında çoğalması için çok özel koşullar gerekmemekte, ve %10-15 FCS/FBS (fetal calf/bovine serum) içeren kültür ortamında plastik flask tabanına yapışma (adezyon) göstermiş olan hücreler, fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedirler. Farklı dokulardan MKH kültürü hazırlığı için eritrositlerin uzaklaştırılması veya solid dokularda hücre süspansiyonu hazırlanması gerekmektedir. Kemik iliğinden izolasyon için dansite gradient yöntemi ile mononükleer (tek çekirdekli) hücre süspansiyonu hazırlanırken diğer dokulara genellikle enzimatik ayrıştırma uygulanmaktadır. Bu amaçla, sık kullanılan enzimler kollajenaz tip-1 (3 μg/ml), dispaz (4 μg/ml) karışımıdır.

Süspansiyon haline getirilen hücreler kültür vasatı içinde, kültür kaplarına (T25, T75 'lik flakslar) konularak %5 CO_2 içeren 37ºC'lik ve %95 nemli inkübatörde inkübasyona bırakılır. Kültür vasatı olarak sıklıkla DMEM-LG veya alfa-MEM kullanılmaktadır. Ekilen heterojen hücre topluluğu içinde bulunan çok az sayıdaki MKH'lerin çoğaltılması için büyüme faktörleri ve diğer uyaranların eklenmesi gerekmemekte, ancak serum içeren bir ortam hazırlanmaktadır. Bu amaçla,

en sık olarak kullanılan yöntem, buzağı serumu olan FBS (fetal bovine serum) %10-15 gibi yüksek oranlarda kültür vasatına eklenmesidir. Hücre çoğalma yeteneği, FBS'nin kalitesi ile doğrudan ilişkilidir. Farklı serilerden (batch) serum kullanılması, hücre çoğalma hızını direkt etkilemektedir. Bu nedenle, MKH geliştirmek için seçilmiş FBS örnekleri hazırlanması gerekmektedir. Klinik kullanım amaçlı MKH hazırlığında ise FBS yan etkileri nedeniyle insan serumu, plazması, trombosit lizatı gibi MKH çoğalmasına olumlu etkisi olacak faktörlerden zengin solüsyonlar tercih edilmektedir.

Mezenkimal kök hücreler, standart kültür koşulları altında plastik doku kültür kaplarına yapışmaktadır. Bununla birlikte MKH'ler, çok özel koşullar sağlanarak doku kültür flasklarına yapışma sağlanmadan da çoğaltılabilmektedirler. Standart şartlarda kültüre bırakılan hücre topluluğu içinden küçük bir kısmı, saatler içerisinde plastik kabın tabanına adezyon göstermeye başlamaktadır. 24-48 saat sonra yapışmayan hücrelerin uzaklaştırılmasını takiben ve çoğalmaya başlayan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında %0,2 tripsin-EDTA ile yapışan hücreler kaldırılarak düşük konsantrasyonlarda yeni kültür kaplarına ekim yapılarak çoğaltılır. Devam eden pasajlarda yaklaşık 7-10 günde bir, hücreler pasajlanarak istenen sayıya ulaşmak için çoğaltılır. Kültürler sırasında günde bir taze vasat eklenerek optimal kültür şartları temin edilmeye çalışılır. İstenilen aşamada hücreler, yedekleme, ileri çalışmalar veya klinik uygulamalarda kullanılmak amacıyla dondurularak saklanabilir. Dondurma vasatı olarak da sıklıkla DMEM-LG, %20 FBS (veya alternatifi) ve %10 dimetilsülfoksit (DMSO) karışımı kullanılır. Hücreler önce -80˚C'de 24 saat bekletilir sonra da sıvı nitrojene konularak saklanır. Klinik amaçlı kullanılacak hücrelerin dondurulmasında ise kontrollü dondurucular kullanılabilir.

Hücrelerin çoğalma hızı; ekimde hücre dansitesi, kültür vasatı özellikleri, hücrelerin alındığı doku, verici yaşı, hayvan türü ve ortam koşullarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Kültürde hücre sayısının ikiye katlanma zamanının (population doubling time) yaklaşık 30-36 saat olduğu bildirilmiştir. Hücrelerin ilerleyen pasajlara kadar çoğalma ve diğer özelliklerini taşıdıkları bilinmektedir. Ancak bu konuda da farklı koşullarda farklı potansiyel taşıdıkları gösterilmiş, bazı çalışmalarda hücrelerin belirli bir pasaj sayısından sonra (örneğin; P8) çoğalmayı durdurduğu bildirilmiştir. Sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile yapılan çalışmalarda, düşük ve yüksek hücre yoğunluğunun büyüme kinetiğini ve farklılaşma potansiyellerini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Yaklaşık 200 hücre/cm^2 yoğunluğunda kültür edilen örneklerin 2000 hücre/cm^2 yoğunluktaki örneklere kıyasla büyüme kinetiklerinin daha yüksek olduğu, fakat hücre yoğunluğunun farklılaşma potansiyelleri üzerinde fazla etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

İlk pasaj sonrası MKH kültürlerinde genellikle morfolojik olarak homojen görünüm elde edilse de, hücrelerin tek tek düşürülerek oluşturulan klonal hücre analizlerinde, çoğalma özellikleri yönünden heterojen hücre populasyonları dikkati çekmektedir. Hücrelerin büyük bir çoğunluğu hücre siklusunun G_0/G_1 fazında iken, yaklaşık %10 olan bir kısmının çoğalmayı beklediği gösterilmiştir.

Pasaj sayılarının artmasıyla birlikte fazla manipüle edilmiş hücrelerde stres belirtileri ortaya çıkmakta ve bunların hücrelerin in vivo durumundan sapmalara yol açabileceği bilinmektedir. Birçok çalışmada ilerleyen pasajlarda MKH'lerde sitogenetik bozukluk, telomer kısalması geliştiği bildirilmiştir. Telomeraz aktivitesi MKH'ler de yüksek olarak bulunmaktadır. Bu da in vitro çoğalma kapasitelerini korumaları ile ilişkilidir. Hücrelerde bu istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasını önlemek amacıyla MKH'lerin ideal olarak pasaj 3'ten sonra kullanılması tercih edilmemektedir. Bu durum özellikle klinik uygulamalarda önem taşımaktadır.

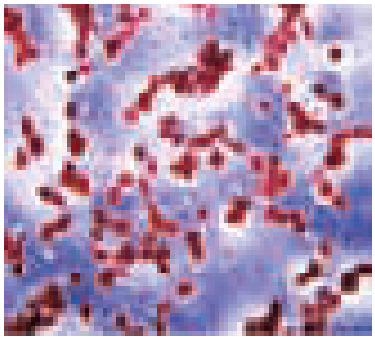
Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında başta bağ doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. Caplan ve ark.'nın ardından çeşitli araştırıcılar in vitro koşullarda uygun stimülanlarla osteojenik (kemik yapıcı), adipojenik (yağ yapıcı), kondrojenik (kıkırdak yapıcı), miyojenik (kas yapıcı) farklılaşma kapasitelerini ve hematopoietik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir. İlerleyen zamanda MKH'lerden pankreas beta hücreleri, hepatosit, endotel ve epiteloid hücrelere dönüşüm olduğu, yine uygun koşullar sağlandığında, nöronal hücreler (nöron, glial hücre, astrosit) geliştiği de gösterilmiştir. Bunlar içinde, özellikle nörona farklılaşmanın mümkün olup olmadığı halen tartışmalıdır. Uygun stimulanlarla nöronal morfolojiye sahip ve nöronal antijenleri taşıyan hücreler görülmekle beraber bu hücrelerin gerçek nöron özelliklerinde ve fonksiyonunda olduğu kanıtlanmamıştır. Farklılaşma potansiyeli ile ilgili diğer bir konu ise, MKH'lerin, adiposit, osteosit gibi kendi kökeninden değil de farklı bir doku hücresine (hepatosit, pankreas beta hücresi gibi) transdiferansiasyon oranının in vivo koşullarda çok düşük olduğudur. Ancak çok az sayıda hücrede transdiferansiasyon gelişebildiği, o nedenle de bu mekanizmanın hasar tamirinde ancak sınırlı bir etkisi olabileceğidir. Bağ doku dışındaki dokularda hasar onarımındaki temel mekanizmaların yukarıda bahsedilen destek hücresi, immunmodulatör özellikleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Buna karşılık, bağ doku kökenli dokuların onarımında MKH'lerin farklılaşma özelliğinin daha aktif rolü olabileceği düşünülmektedir.

Mezenkimal kök hücreler, in vitro ortamda kolaylıkla farklılaşmaya yönlendirilebilmektedir. Adipojenik, osteojenik, +/- kondrojenik farklılaşma özelliklerin in vitro

gösterilmesinin MKH tanımlaması için şart olduğu bildirilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda benzer veya farklı uyaranlara maruz bırakılarak günler içerisinde çok sayıda hücrenin farklı tipte hücreye dönüşüm gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir.

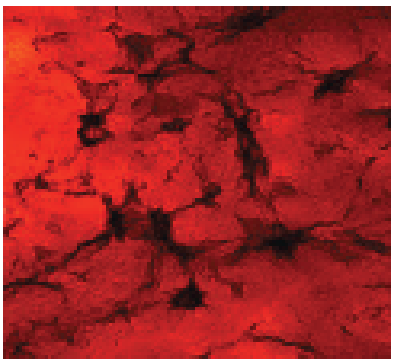
Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri:

Adipojenik farklılaşma: %0-100 oranında konfluent olana kadar geliştirilen MKH'ler üzerine, büyüme ortamı yerine DMEM-LG içerisinde %10 FCS, 1 µM Deksametazon, 60 µM İndometazin, 500µM IBMX (izobütilmetilksantin) ve 5µg/ml İnsülin ile hazırlanan adipojenik kokteyl konularak farklaşma uyarılır. Üç hafta sonra analiz edilir (Resim-8).



Resim-8: Adipojenik farklılaşma[193]

Osteojenik farklılaşma: %50-60 oranında konfluent olana kadar geliştirilen MKH'ler üzerine, büyüme vasatı yerine, DMEM-LG içerisinde %10 FCS, 100nM Deksametazon, 10nM Betagliserofosfat ve 0,2mM Askorbik asit ile hazırlanan osteojenik farklılaşma vasatı konularak farklılaşma uyarılır. 3 hafta sonra kültürdeki ekstrasellüler matrikste kalsifikasyon, kalsiyum fosfat depoları belirgin olarak tespit edilir (Resim-9).



Resim-9: Osteojenik farklılaşma[193]

Kondrojenik farklılaşma: Hücreler, bir hücre pelletinde kültür edilerek boyutlu bir ortam sağlanmış olur. Hücre pelleti üzerine DMEM-HG içerisinde 100 nM Deksametazon, 10ng/ml TGFβ3, 50 µg/ml Askorbik asit ve 50 mg/ml ITS + Premiks ilave edilerek hazırlanmış olan kıkırdaklaşma vasatı konularak 37°C ve %5 CO_2 koşullarında farklılaşmaya bırakılır. Yine 3 hafta sonra doku kesitinde kıkırdak gelişimi incelenir (Resim-10).



Resim-10: Kondrojenik farklılaşma[193]

Nöronal farklılaşma: Doku kültür kapları içindeki hücreler üzerine, DMEM-LG içerisinde 200 µM BHA bütillenmiş Hidroksianisol,10 µM Forskolin (FSK), 20 mM Valproik asit (VA), %2 DMSO, 25mM KCl, 1µM Hidrokortizon, 5µg/ml İnsulin ve %1 Penisilin/Streptomisin ile hazırlanan farklılaşma vasatı konulur. Kırk beşinci dakika ile 24. saat arasındaki morfolojik değişiklikler takip edilir.

Farklılaşma çalışmalarında hedeflenen farklılaşmış hücrelere dönüşüm olup olmadığını göstermek için histokimyasal, immunhistokimyasal veya immunfluoresan yöntemler kullanılarak özgül işaretler araştırılır. Ayrıca ekspresyon analizleri ile de farklılaşmalar teyit edilir ve kantitatif yöntemlerle de karşılaştırmalı analizler yapılabilir.

Mezenkimal kök hücrelerin, kendi dizinleri dışındaki farklı hücre dizilerine de farklılaşabilme niteliği, özellikle rejeneratif tıp ile ilgili dallarda çok ilgi uyandırmış, bu konuda çok sayıda çalışma yapılmış ve "kök hücre plastisitesi" adı altında toplanmıştır. Kök hücre plastisitesi, bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara farklılaşma özelliğini tanımlamaktadır Kemik iliği kökenli kök hücreler ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin miyoblast, endotel, hepatik, kardiyak, renal ve nöral hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir. İn vitro farklılaşma protokollerinde bu amaçla çeşitli biyoaktif moleküller ve TGF beta, FGF4, HGF, VEGF gibi moleküller eklenmiştir. Endotel hücresi geliştirmek için VEGF 10ng/ml + Fibronektin + Deksamethazon + Askorbik asit 2-fosfat, epiteloid hücreler ve hepatosite farklılaşma için fibroblast büyüme faktör (FGF) ve hepatosit büyüme faktör (HGF) eklenmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin in vivo transdiferansiasyon potansiyeline ilişkin çok sayıda hayvan deneyi vardır. Bu çalışmalarda, MKH'lerden in vivo olarak pulmoner Tip 1 alveoler epitel hücreleri, iskelet kası ve kalp kası hücreleri, hepatosit, nöronal hücre, astrosit, ince barsak epitel hücreleri geliştiği dokuda immunfloresan, immunhistokimya teknikleri ile gösterilmiştir. Astrositler için GFAP (glial fibriler asidik protein) ekspresyonu, iskelet kası için distrofin, kalp kası için kardiyak Troponin, epitel hücre belirteci olarak Sitokeratin, hepatosit farklılaşmasını kanıtlamak üzere de Albumin ekspresyonuna bakılması yaygın kullanılan yöntemlerdir. Hücrelerin bu çok yönlü farklılaşması heyecan verici olsa da dokuda çok az sayıda hücrede farklılaşma gözlenmiş olması, hasar tamirinde diğer mekanizmaların rolünü akla getirmiştir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda ise, allogeneik kemik iliği transplantasyonu yapılan osteogenezis imperfekta hastalarına MKH verilmesinden sonra, kemiklerde verici kökenli osteositlerin varlığı gösterilmiş ve hastalarda klinik cevap elde edilmiştir. Başka bir çalışmada ise GVHH nedeniyle anne kökenli (maternal) MKH verilen hastanın barsak epitel hücreleri arasında verici kökenli hücrelere rastlanmış olması, intravenöz yolla verilen MKH'lerin barsak epitel hücresine dönüştüğünü göstermiştir. İlerleyen çalışmalar, bu farklılaşmanın mikroçevre koşulları ile ilişkisi olduğunu, özellikle ağır hasar olan hallerde, hücrelerin hasarlı bölgeye migrasyon ve hasar iyileşmesine katkılarının bulunduğunu göstermiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (D.E.Ü.T.F.) Deney Hayvanları Etik Kurulu onayı alındıktan sonra çalışmanın yürütülmesi amacıyla Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (B.A.P) Koordinasyon Müdürlüğünden destek alındı.

Çalışma 50 adet 28-35 gram ağırlığında Bulb-C suşu fareler üzerinde yapıldı. D.E.Ü.T.F. Deney Hayvanları Araştırma Laboratuarı tarafından sağlanan hayvanlar yine aynı laboratuarda 'D.E.Ü.T.F. Deney Hayvanları Araştırma Laboratuarı Usul ve İşleyiş' esasları doğrultusunda bakımları yapıldı.

Cerrahi işlem uygulanacak farelere 80-100 mg/kg Ketamin (Ketalar™, 002038, Eczacıbaşı Sağlık Ürünleri Sanayi ve Ticaret AŞ., Lüleburgaz, Türkiye) ve 5-10 mg/kg Xylazine (Alfazyne™, 0804125-11, Alfasan, Woerden, Holland) olacak şekilde intraperitoneal olarak işlemden hemen önce uygulandı.

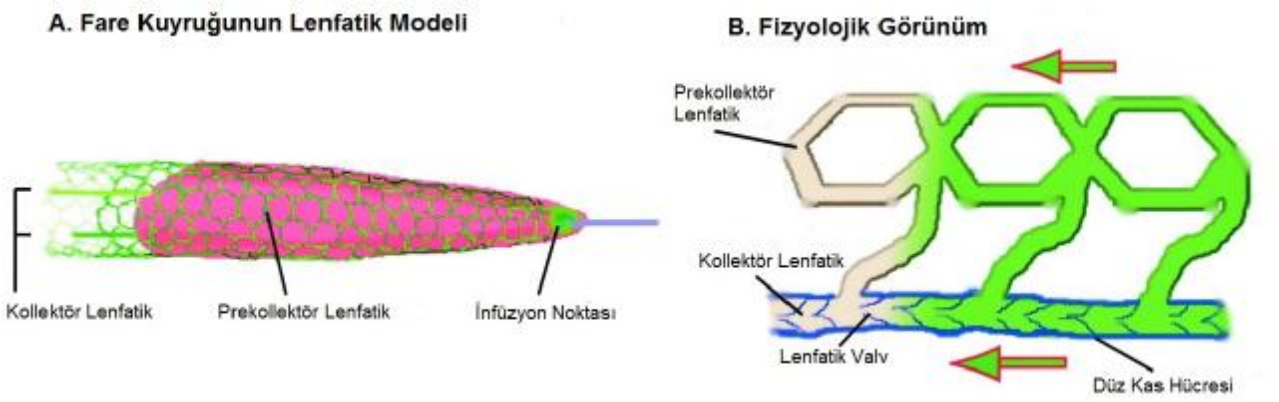
Deney hayvanları birbirlerine zarar vermemeleri için ayrı ayrı standart plastik kafeslerde muhafaza edildi. Deney hayvanları bulunduğu ortam, uluslararası hayvan deney ve bakım kılavuzlarına göre standart laboratuar koşulları (sıcaklık 23±2 °C, 12 saat gündüz/gece siklusu) sağlanarak günlük takip edildi. Farelere standart yem ve su verilerek beslenmeleri sağlandı.

5.1. CERRAHİ İŞLEMLER

Deney hayvanlarının anestezisi ve cerrahi işlemleri Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırmaları Laboratuarı'nda yapıldı. Cerrahi işlemler asepsi-antisepsi kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi. Cerrahi yapılacak alan Oktenidin dihidroklorür (Octenisept™) ile yıkanarak hazırlandı. Cerrahi işlemler mikroskop altında (Olympus Ome®) ve bipolar elektrokoter kullanılarak gerçekleştirildi.

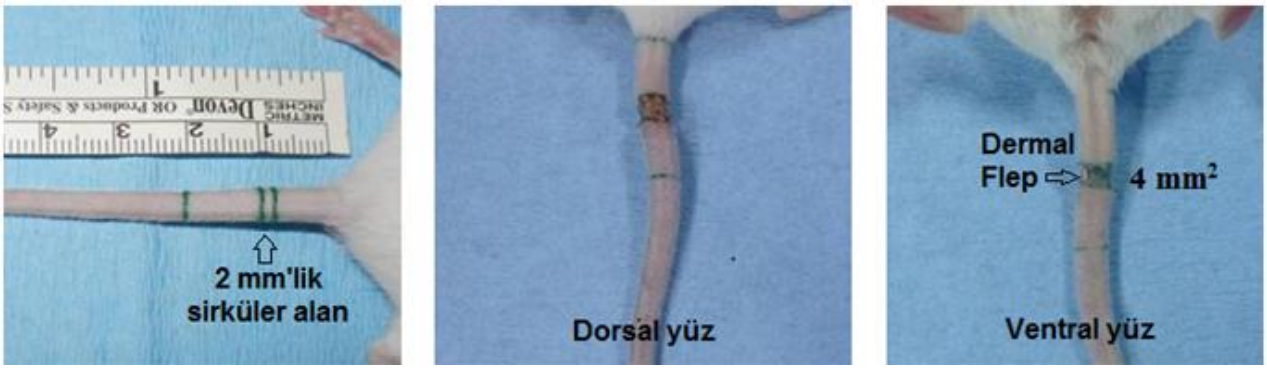
5.1.1. Sekonder Lenfödem Modelinin Oluşturulması

Fare kuyruğunda yapılan önceki çalışmalarda kuyruk lenfatik modeli, nükleer işaretleme yöntemleri kullanılarak sintigrafik olarak gösterilmiştir (Şekil-33).



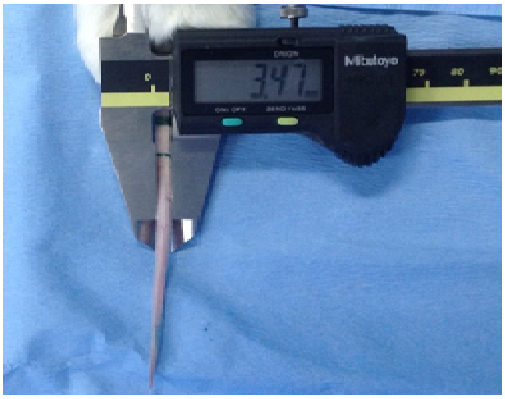
Şekil-33: Fare Kuyruğunun Lenfatik Modeli[193]

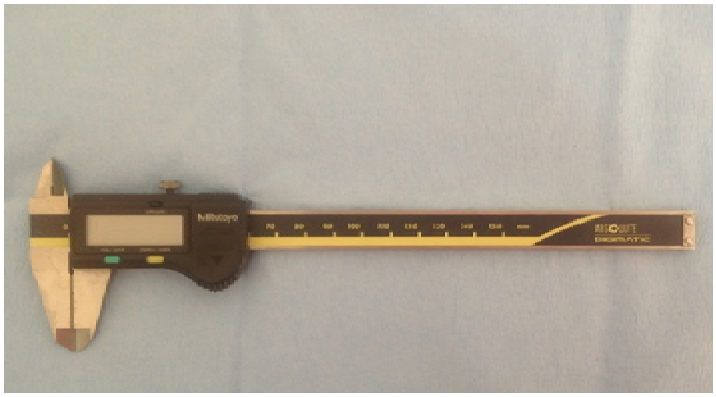
Cerrahi işlem uygulanacak farelere 80-100 mg/kg Ketamin ve 5-10 mg/kg Xylazine olacak şekilde intraperitoneal olarak işlemden hemen önce uygulandı. Bu modelden yola çıkılarak kuyrukta sekonder lenfödem oluşturmak amacıyla cerrahi işlem öncesi standardizasyon için kuyruk kökü 1 cm distalden işaretlendi. İşaret çizgisi başlangıç kabul edilerek 2 mm genişliğinde sirküler alan belirlendi. Kuyruğun ventral yüzündeki belirlenen alan içerisinde 4 mm^2 dermal flep alanı oluşturuldu. Ventral yüzdeki 4 mm^2 dermal flep intakt kalacak şekilde cilt dokusu koterize edilerek sirkümferansiyel eksize edildi (Resim-11). Cerrahi işlem sonrası fareler gruplara göre sınıflandırılıp ve grup içi isimlendirilip ikili şekilde kafeslere alındı.



Resim-11: Kuyrukta sekonder lenfödem modelinin oluşturulması

Bu işlem ile daha önce şematize edilen subkutanöz lenfatik damarların harabedildiği kabul edildi. Cerrahi işlem sonrasında oluşturulan sekonder lenfödemin klinik takibi yapıldı. Bu amaçla insizyonun 1 cm distalinden işaretleme yapılarak günlük kuyruk çap ölçümü gerçekleştirildi. Çap ölçümü dijital mikrometre (Mitutoyo®) kullanılarak yapıldı (Resim 12).



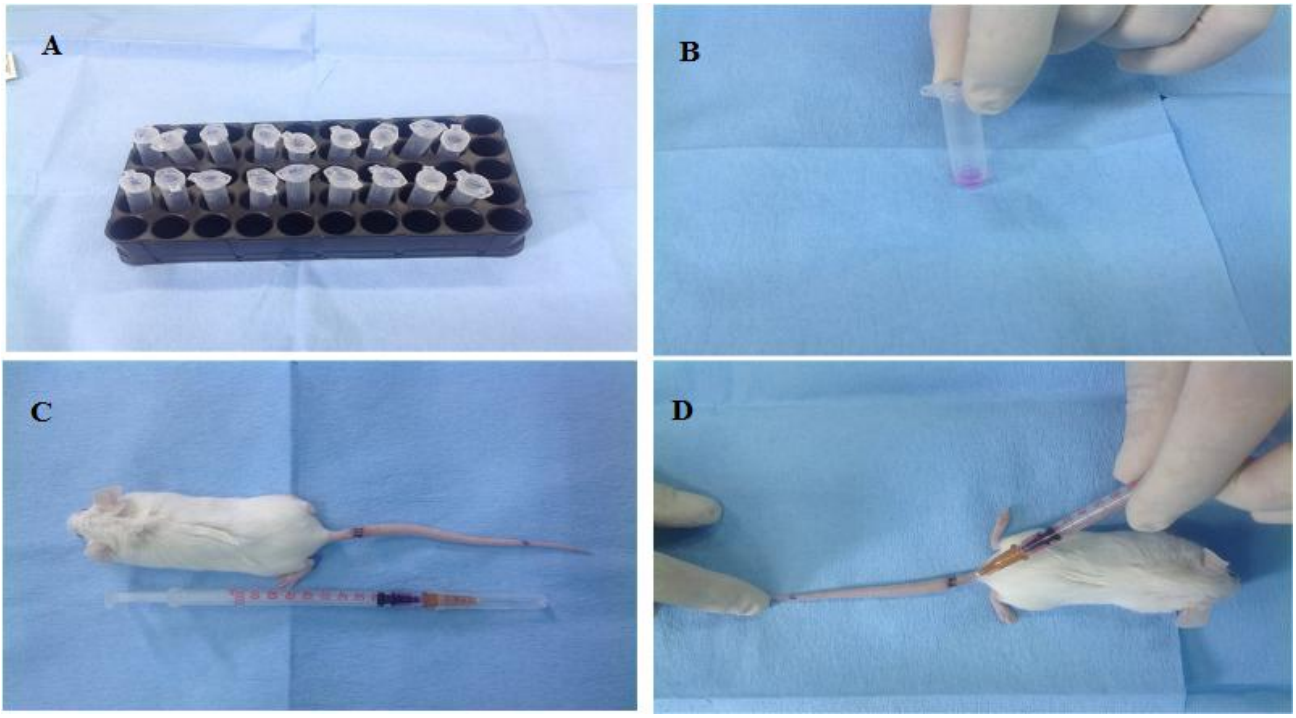


Resim-12: Dijital mikrometre

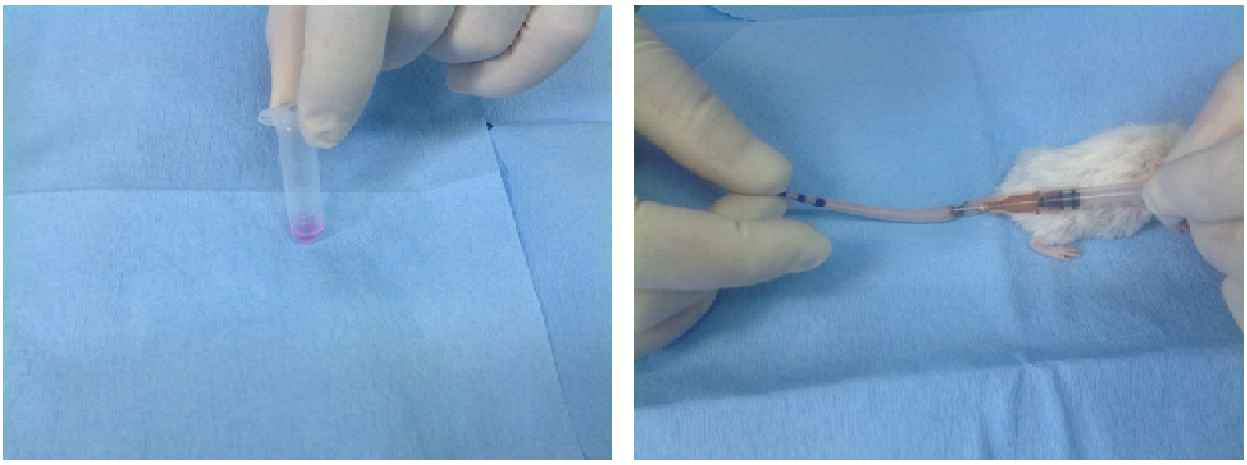
5.1.2. Kök Hücre, Vasat ve Serum Fizyolojik Enjeksiyonları

Sekonder lenfödem modelinin cerrahi olarak oluşturulmasının ardından günlük çap takipleri yapılarak makroskobik değişim dokümante edildi. Ön çalışma aşamasında histolojik olarak lenfödem gelişiminin gösterilmesi ve doğru enjeksiyon zamanının tespit edilmesi amacıyla fareler üçüncü, beşinci ve yedinci günlerde sakrifiye edildi, kesitler HE ile boyanarak incelendi ve enjeksiyon için en uygun zamanın beşinci gün olduğu belirlendi (Bu konudaki geniş açıklama ve HE boyama görünümleri ileride tartışılmıştır).

Hazırlanmış olan embriyonik kök hücre ve mezenkimal kök hücre içeren solüsyonlar her fare için ayrı eppendorflar içinde teslim alındı. Standart miktarda ($25x10^5$ hücre/ml) hücre içeren 0,06 cc kök hücre solüsyonları insulin enjektörüyle oluşturulan cerrahi modelin distal ucundan iki ayrı alana eşit miktarlarda (0,03 cc) enjekte edildi (Resim-13 ve Resim-14)



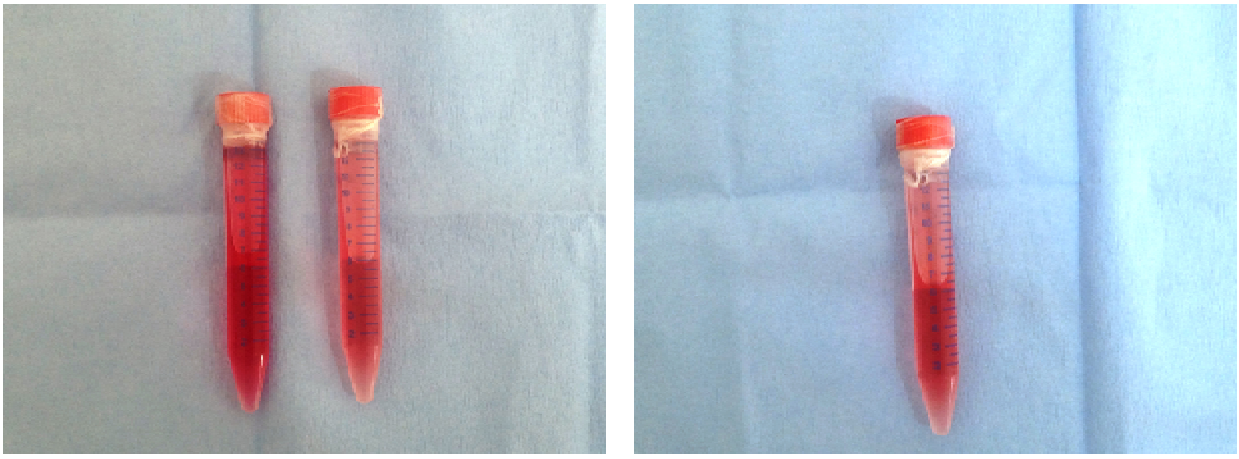
Resim-13: Embriyonik kök hücre transportu ve embriyonik kök hücre enjeksiyonu



Resim-14: Mezenkimal kök hücre transportu ve Mezenkimal kök hücre enjeksiyonu

Embriyonik ve mezenkimal kök hücre vasatları (Resim-15) tüpler içerisinde teslim alınarak insulin enjektörüne her fare için 0,06 cc çekilerek benzer şekilde ilgili gruplardaki farelere enjekte edildi. Serum fizyolojik grubundaki farelere cerrahi işlemin beşinci gününde %0,09 NaCl solusyonu 0,06 cc insulin enjektörüyle kuyrukta belirlenen lokalizasyona diğer

gruplardaki gibi enjekte edildi. Enjeksiyon işlemlerinin tamamlanmasının ardından günlük çap ölçümlerine devam edilerek fareler 15. güne kadar takip edildi.



Resim-15: Embriyonik ve Mezenkimal Kök Hücre Vasatları

5.2. GRUPLAR

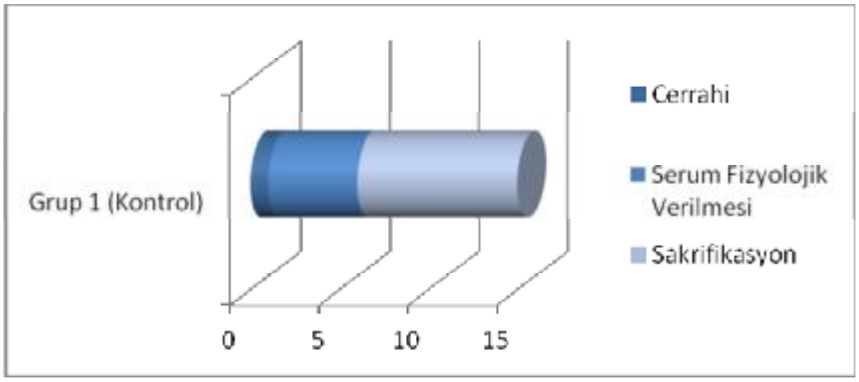
5.2.1. Grup 1

Grup 1 çalışma kapsamında serum fizyolojik kontrol grubu olarak kabul edildi. Gruba 28-35 gram ağırlığında toplam 9 fare alındı. SF kontrol grubundaki farelerin başlangıçta ölçülen minimum kuyruk çapı 3,48 mm; maksimum kuyruk çapı 3,92 mm ve ortalama kuyruk çapı 3,78 mm bulundu. Gruptaki farelerin başlangıç kuyruk çap ölçümleri Tablo-4'de gösterilmiştir.

SF Kontrol Grubu	
Grup	**Kuyruk Çapı (mm)**
SF-1	3,48
SF-2	3,83
SF-3	3,75
SF-4	3,73
SF-5	3,88
SF-6	3,77
SF-7	3,89
SF-8	3,92
SF-9	3,81

Tablo-4: SF grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Çap ölçümleri yapılan ve her biri birden dokuza numaralandırılan farelere, sekonder lenfödem modeli oluşturulması bölümünde bahsedilen standardizasyonda cerrahi işlem uygulandı. Cerrahinin beşinci gününde her farenin kuyruğuna 0,06 cc %0,09 NaCl enjekte edildi ve günlük çap ölçümüyle takibe alınan fareler 15. gün sakrifiye edildi (Grafik-1).



Grafik-1: SF grubu deney modeli özeti

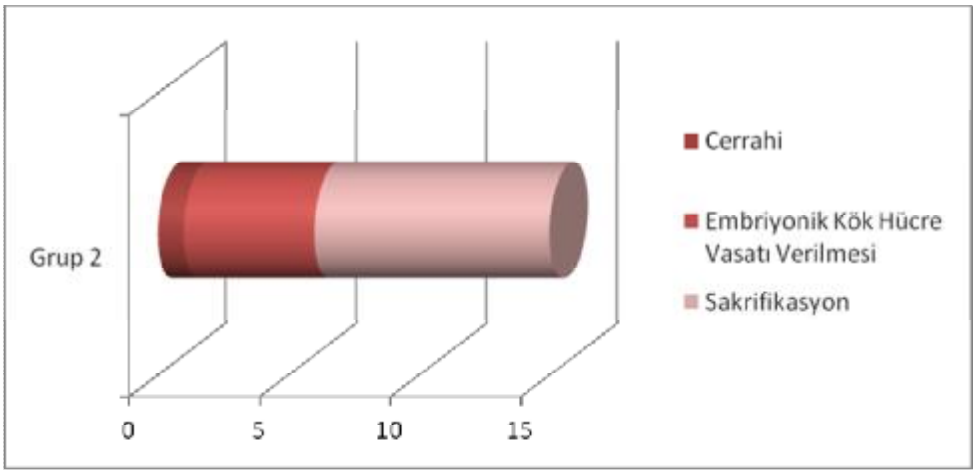
5.2.2. Grup 2

Grup 2 çalışma kapsamında embriyonik kök hücre vasatı grubu olarak kabul edildi. Gruba 28-35 gram ağırlığında toplam 9 fare alındı. Embriyonik kök hücre vasatı grubundaki farelerin başlangıçta ölçülen minimum kuyruk çapı 3,68 mm; maksimum kuyruk çapı 3,75 mm ve ortalama kuyruk çapı 3,71 mm bulundu. Gruptaki farelerin başlangıç kuyruk çap ölçümleri Tablo-5'te gösterilmiştir.

EKHV Grubu	
Grup	**Kuyruk Çapı (mm)**
EKHV-1	3,74
EKHV -2	3,69
EKHV -3	3,71
EKHV -4	3,73
EKHV -5	3,72
EKHV -6	3,75
EKHV -7	3,72
EKHV -8	3,68
EKHV -9	3,69

Tablo-5:EKHV grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Çap ölçümleri yapılan ve her biri birden dokuza numaralandırılan farelere, sekonder lenfödem modeli oluşturulması bölümünde bahsedilen standardizasyonda cerrahi işlem uygulandı. Cerrahinin beşinci gününde her farenin kuyruğuna 0,06 cc embriyonik kök hücre vasatı enjekte edildi ve günlük çap ölçümüyle takibe alınan fareler 15. gün sakrifiye edildi (Grafik-2).



Grafik-2: EKHV grubu deney modeli özeti

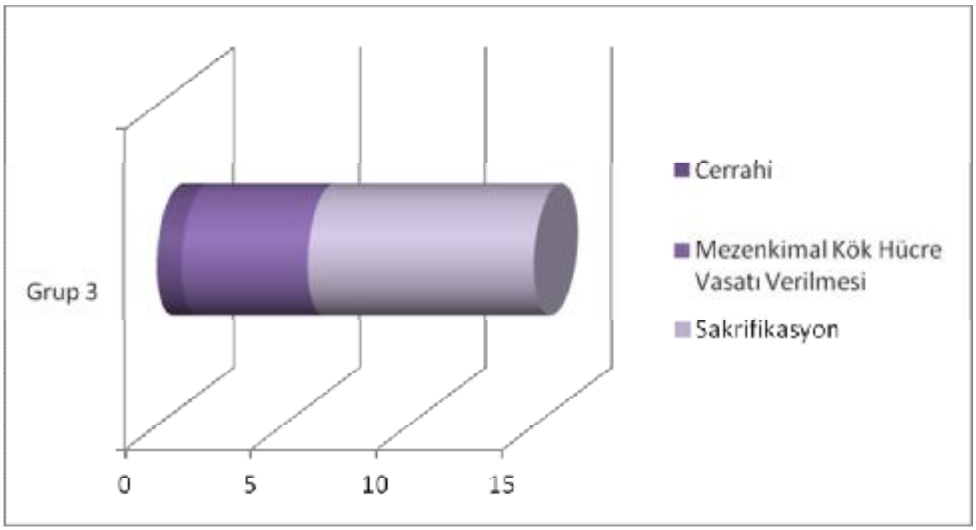
5.2.3. Grup 3

Grup 3 çalışma kapsamında mezenkimal kök hücre vasatı grubu olarak kabul edildi. Gruba 28-35 gram ağırlığında toplam 9 fare alındı. Mezenkimal kök hücre vasatı grubundaki farelerin başlangıçta ölçülen minimum kuyruk çapı 3,64 mm; maksimum kuyruk çapı 3,76 mm ve ortalama kuyruk çapı 3,70 mm bulundu. Gruptaki farelerin başlangıç kuyruk çap ölçümleri Tablo-6'da gösterilmiştir.

MKHV Grubu	
Grup	**Kuyruk Çapı (mm)**
MKHV-1	3,64
MKHV -2	3,75
MKHV -3	3,69
MKHV -4	3,68
MKHV -5	3,67
MKHV -6	3,76
MKHV -7	3,74
MKHV -8	3,73
MKHV -9	3,71

Tablo-6: MKHV grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Çap ölçümleri yapılan ve her biri birden dokuza numaralandırılan farelere, sekonder lenfödem modeli oluşturulması bölümünde bahsedilen standardizasyonda cerrahi işlem uygulandı. Cerrahinin beşinci gününde her farenin kuyruğuna 0,06 cc mezenkimal kök hücre vasatı enjekte edildi ve günlük çap ölçümüyle takibe alınan fareler 15. gün sakrifiye edildi (Grafik-3).



Grafik-3: MKHV grubu deney modeli özeti

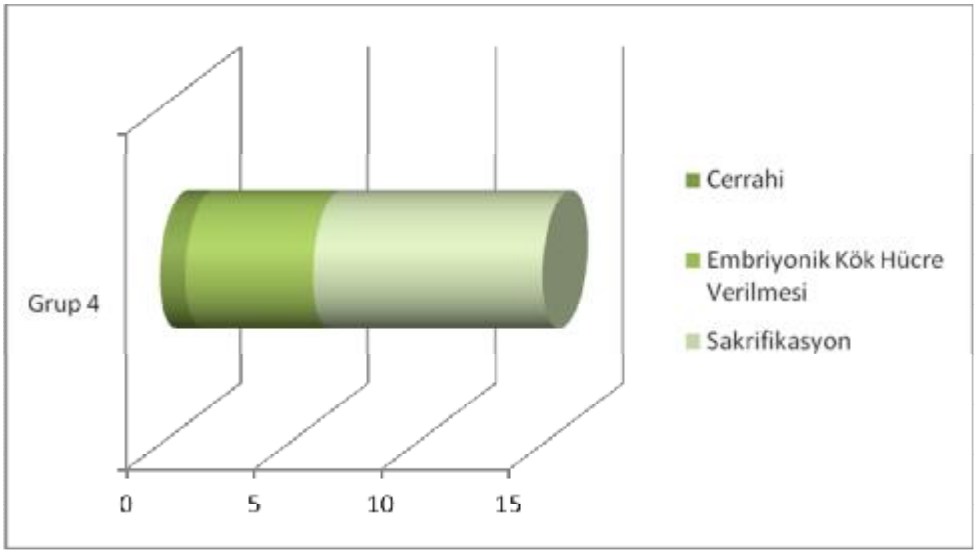
5.2.4. Grup 4

Grup 4 çalışma kapsamında embriyonik kök hücre grubu olarak kabul edildi. Gruba 28-35 gram ağırlığında toplam 9 fare alındı. Embriyonik kök hücre grubundaki farelerin başlangıçta ölçülen minimum kuyruk çapı 3,68 mm; maksimum kuyruk çapı 3,75 mm ve ortalama kuyruk çapı 3,71 mm bulundu. Gruptaki farelerin başlangıç kuyruk çap ölçümleri Tablo-7'de gösterilmiştir.

EKH Grubu	
Grup	**Kuyruk Çapı (mm)**
EKH-1	3,74
EKH -2	3,69
EKH -3	3,71
EKH -4	3,73
EKH -5	3,72
EKH -6	3,75
EKH -7	3,72
EKH -8	3,68
EKH -9	3,69

Tablo-7: EKH grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Çap ölçümleri yapılan ve her biri birden dokuza numaralandırılan farelere, sekonder lenfödem modeli oluşturulması bölümünde bahsedilen standardizasyonda cerrahi işlem uygulandı. Cerrahinin beşinci gününde her farenin kuyruğuna 0,06 cc embriyonik kök hücre enjekte edildi ve günlük çap ölçümüyle takibe alınan fareler 15. gün sakrifiye edildi (Grafik-4).



Grafik-4: EKH grubu deney modeli özeti

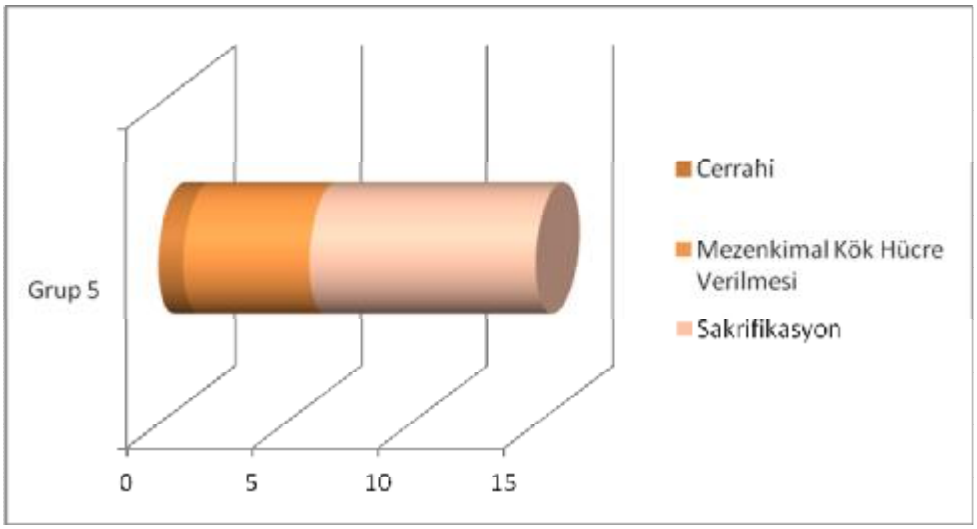
5.2.5. Grup 5

Grup 5 çalışma kapsamında mezenkimal kök hücre grubu olarak kabul edildi. Gruba 28-35 gram ağırlığında toplam 9 fare alındı. Mezenkimal kök hücre grubundaki farelerin başlangıçta ölçülen minimum kuyruk çapı 3,44 mm; maksimum kuyruk çapı 3,75 mm ve ortalama kuyruk çapı 3,57 mm bulundu. Gruptaki farelerin başlangıç kuyruk çap ölçümleri Tablo-8'de gösterilmiştir.

MKH Grubu	
Grup	**Kuyruk Çapı (mm)**
MKH-1	3,57
MKH -2	3,44
MKH -3	3,58
MKH -4	3,49
MKH -5	3,51
MKH -6	3,60
MKH -7	3,61
MKH -8	3,60
MKH -9	3,75

Tablo-8: MKH grubu başlangıç kuyruk çap ölçümleri

Çap ölçümleri yapılan ve her biri birden dokuza numaralandırılan farelere, sekonder lenfödem modeli oluşturulması bölümünde bahsedilen standardizasyonda cerrahi işlem uygulandı. Cerrahinin beşinci gününde her farenin kuyruğuna 0,06 cc mezenkimal kök hücre vasatı enjekte edildi ve günlük çap ölçümüyle takibe alınan fareler 15. gün sakrifiye edildi (Grafik-5).

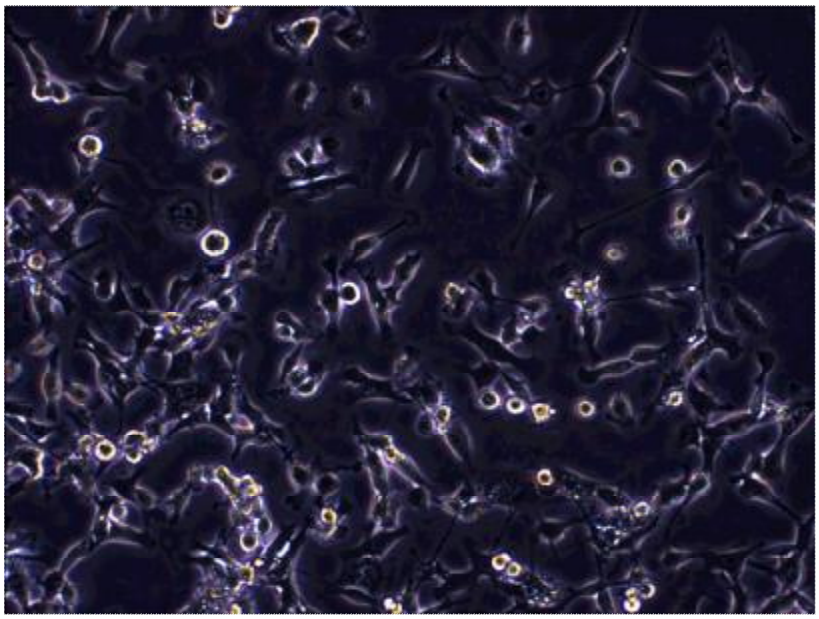


Grafik-5: MKH grubu deney modeli özeti

5.3. EMBRİYONİK KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ

5.3.1. Jelatin kaplı kapların hazırlanması ve STO hücrelerinin kültürü

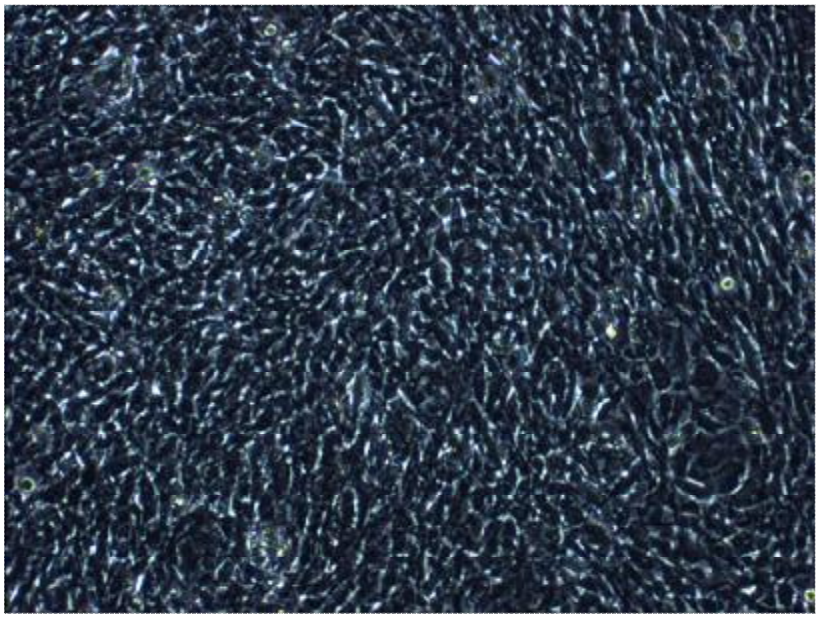
Fare fibroblast hücrelerinin kültürü için kültür kapları öncelikle jelatin'in (G-9391 Sigma) %0,1 oranında distile su ile hazırlanan karışımının steril edilmesinden sonra 5 dk oda sıcaklığında beklenilmesi ile kültür kapları kaplandı. Jelatinin fazlası alındıktan sonra tüm gece oda sıcaklığında steril ortamda kuruması beklendi. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD hücre kültürü stoklarında bulunan fare fibroblast hücreleri (STO, 86032003, ECACC) 37^0C sıcak su banyosu içerisinde eritildikten sonra 1 ml hücre, 5 ml kültür vasatı (Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM, D-6171, Sigma, %10 fetal sığır serumu [F-4135, Sigma], %1 L-glutamin [G-3202, Sigma] ve %1 Penisilin/Streptomisin [P-0781, Sigma]) içerisinde 5 dk 1000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra kültüre edildi. STO hücreleri kültürün 3. gününde çoğalmaya başladıkları ve 1 haftalık süreçte de kültür kabını tamamen kapladıkları gözlendi. STO hücreleri fibroblast benzeri şekilde fuziform yapıda oldukları gözlendi (Resim-16).



Resim-16: Kültür için feeder layer tabakası olarak kullanılan STO fibroblast hücreleri

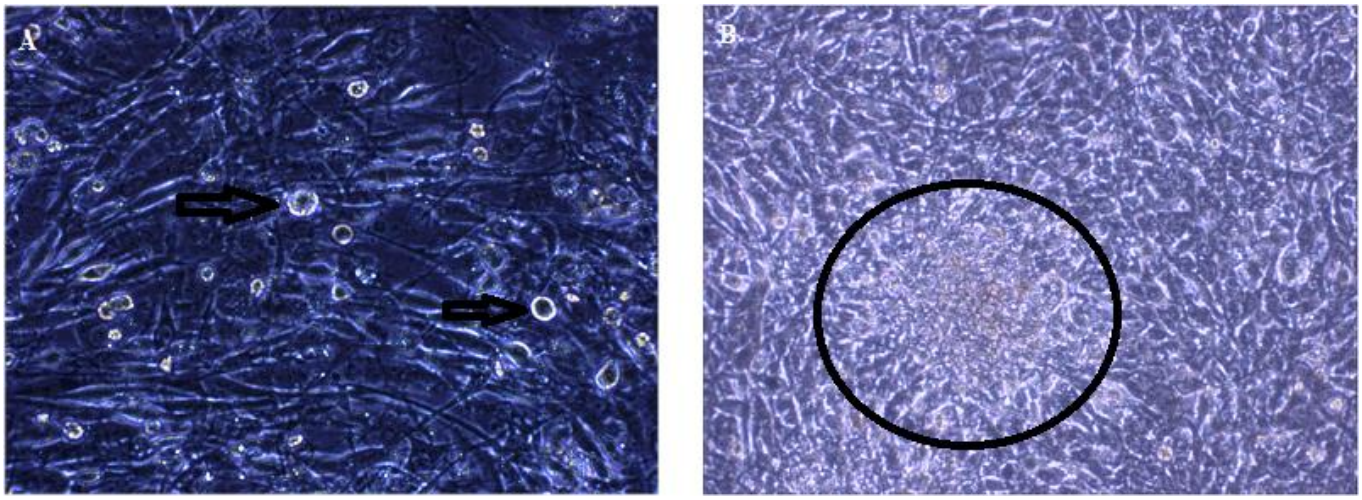
5.3.2. Embriyonik Kök Hücre Kültürü

STO hücreleri embriyonik kök hücre kültüründe embriyonik kök hücrelerin çoğalması için destek tabakası olarak kullanılmaktadır. Bu işlem için STO hücrelerinin canlı kalması fakat çoğalmaması gerekmektedir. Bu amaç için hücreler 20 µg/ml Mitomisin-C (M-0440, Sigma) ile 1,5 saat 37^{o}C de %5 CO_2 ortamda inkübe edildikten sonra hücreler steril fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution, P-4417, Sigma) ile yıkandı ve embriyonik kök hücre kültür vasatı ilavesi yapıldı. STO hücreleri bu süreçte kültür kabını tamamen kaplamışlardı (Resim-17).



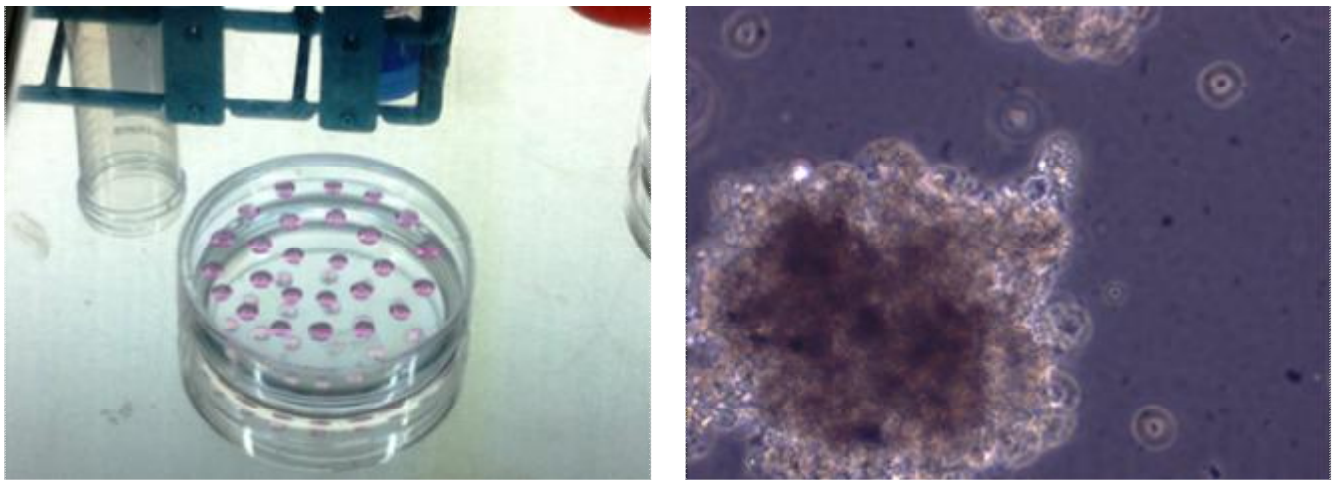
Resim-17: STO hücreleri kültüre edildikten sonra konfluent olmaları sağlandı

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD hücre kültürü stoklarında bulunan fare embriyonik kök hücresi (CGR8, 07032901, ECACC) açıldı ve STO hücreleri üzerinde kültüre edildi. Kültüre edilen hücrelerin 3. gününde koloni oluşturmaya başladıkları, 1. haftasında ise kolonilerin altta bulunan STO hücrelerinden kolaylıkla ayrıldıkları gözlendi (Resim-18A). Koloniler sınırları belli olarak, altta bulunan hücrelerin üzerinde yukarıya ve perifere doğru büyüdükleri izlendi. Kültüre devam edildiğinde ise kolonilerin büyüdükleri, fakat farklılaşmadan devam ettikleri izlendi (Resim-18B).



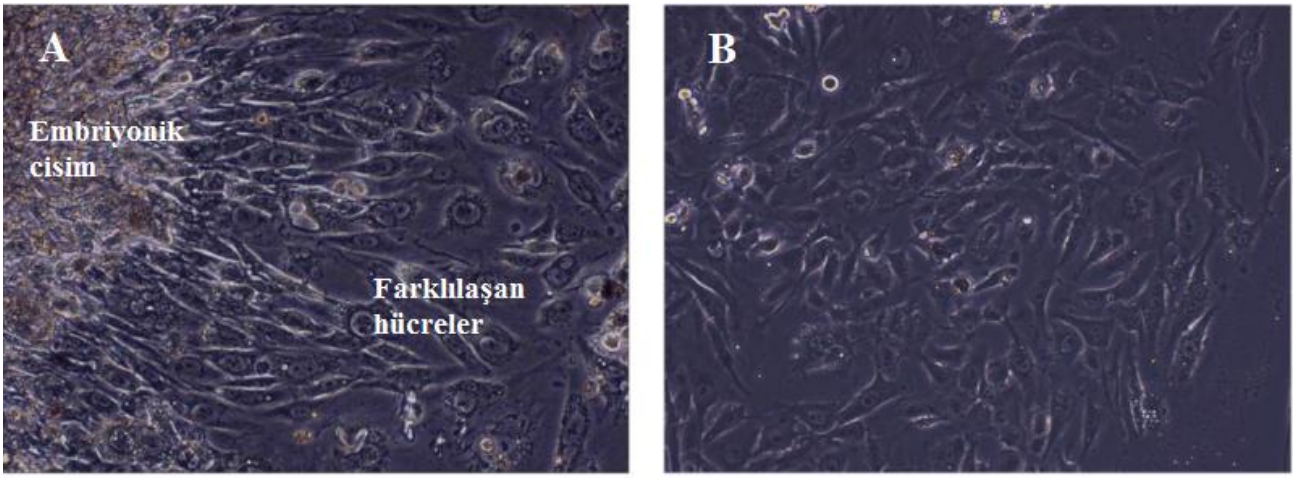
Resim-18: STO üzerinde ok ile gösterilen embriyonik kök hücreler (A) ve daire içine alınmış embriyonik kök hücre kolonisi (B)

Embriyonik kök hücre farklılaşması sağlanması için embriyonik kök hücreleri toplandıktan sonra hanging drop tekniği ile hücreler konuldu ve 2 gün süre ile hücrelerin inkübasyonu sağlandıktan sonra embriyonik cisimlerin oluşması sağlandı (Resim-19).



Resim-19: Hanging drop tekniği ve embriyonik cisim eldesi

Embriyonik cisimler dışta endoderm içte ektoderm olmak üzere iki faklı hücre grubundan oluşmuş olup, iki hücre grubu arasında bazal membran yapısı gözlenmekte idi. Elde edilen embriyonik cisimler kollajen kaplı kültür kabına alındı. Farklılaşma kültür vasatı içerisinde bulunan hücreler pasajlanarak 15 gün kültüre edildiler (Resim-20).

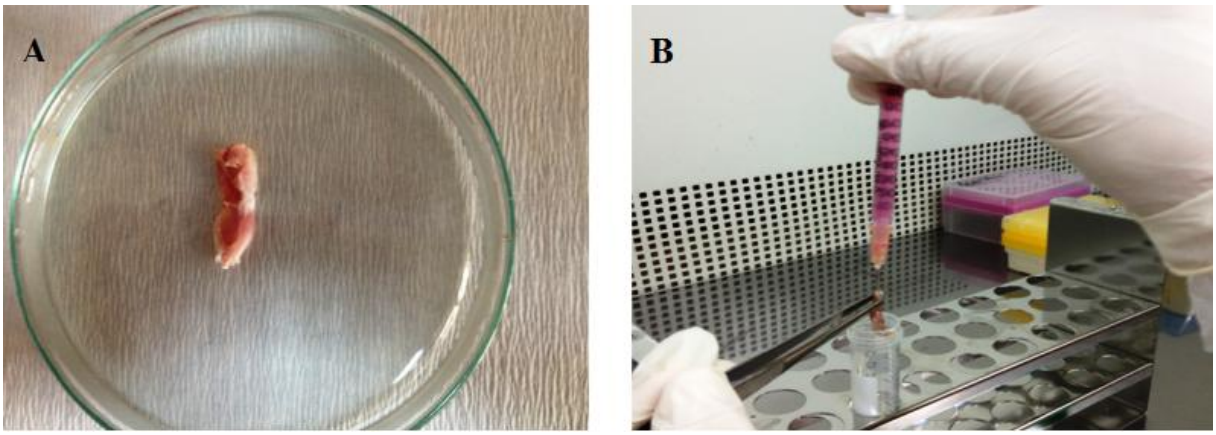


Resim-20: Embriyonik cisim ve farklılaşan hücreler (A), Farklılaşma vasatı içinde hücreler (B)

5.4. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ

5.4.1.Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Kültürü

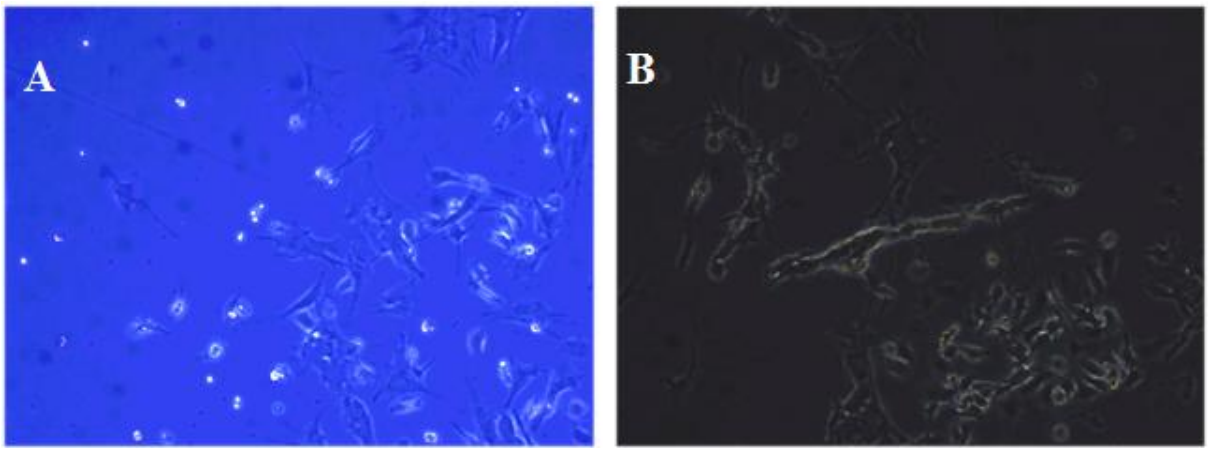
Bu çalışmada 28-35 gr ağırlığındaki BulB/C fareler kullanıldı. Genel anestezi altında, İntraperitoneal 20 mg/kg Ketamin (Eczacıbaşı/Türkiye) ve 5 mg/kg Xylazine (Eczacıbaşı/Türkiye) ile asepsi-antisepsi kurallarına uyularak, steril koşullar altında, femur ve tibialar çıkartılarak steril PBS (Biochrom L-1815) içine alındı. Femur ve tibialar steril hava kabini içinde, çevrelerindeki kas dokusundan dikkatlice temizlendi. Metafizeal uçları kesildi, insülin enjektörü ile kemik iliği boşluğuna primer besi ortamı (α-MEM [Sigma M-4526], %15 FCS [Biochrom S-O115], %0,4 penisilin [Biochrom A-2213], %0,4 streptomisin [Biochrom A-2213, %0,1 Amfoterisin B [Biochrom A-2612], %1 Gentamisin [Biochrom A-2712]) verildi ve kemik iliği besi ortamı içinde toplandı (Resim-21).



Resim-21: Mezenkimal kök hücre eldesi ve kültürü: Erişkin erkek fareden uzun kemiklerin diseksiyonu (A), Uzun kemiklerden mezenkimal kök hücrelerin yıkama yöntemi ile eldesi (B)

Santrifüj tüpü içindeki kemik iliği pipetlenerek hücre süspansiyonu haline getirildi. Kemik iliği, primer besi ortamı içinde 5 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Santrifüj sonunda süpernatant dökülerek hücreler primer besi ortamı ile süspanse edildi ve 25 $cm^{2'}$lik hücre kültür kabında, 37°C'de ve %5 CO_2 koşulunda inkübasyona kaldırıldı.

Fare kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler kültür vasatı içerisine alınarak kültüre edildi (Resim-22). Kültürün 3. gününde hücrelerin kültür kabına yapışmaya başladıkları gözlenir iken kültür kabına yapışmayan hücrelerin de olduğu saptandı. Kültür kabına yapışmayan hücrelerin özellikle eritrositer seriye ait hücreler oldukları gözlendi. Kültür vasatının iki günde bir değiştirilmesi ile yapılan kültür sonrasında, kültürün 6. gününde kültür kabına yapışan hücreleri sayısının arttığı ve yüzen hücrelerinde azaldığı izlendi.



Resim-22: Elde dilen mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırma yapmadan kültürleri (A), Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırma ortamına alındıktan 15 gün sonraki kültürü (B)

Kültür kabına yapışan hücrelerin epiteloid karakterde oldukları görüldü. Kültürün 9. gününde ise kültür kabına yapışmış hücrelerin sayısının arttığı ve yer yer konfluent (kültür kabının kaplanması) izlendi. Hücreler konfluent olduktan sonra hücreler kaldırılarak bir kısmı immunohistokimyasal analiz için pasajlandı. Kalan hücreler ise steril enjektörlere alınarak deneklere verilmek üzere hazırlandı. Kültürün 9. gününde pasaj yapılan hücreler ertesi günü (kültürün 10. günü) farklılaşma vasatı ile farklılaşmaya devam edildi ve 10. gün hücreler Brd-U ile işaretlendi.

5.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Brd-U İle İşaretlenmesi

Bromodeoksiüridin (Brd-U), bir timidin analoğudur. Brd-U genellikle canlı dokulardaki çoğalan hücrelerin saptanmasında kullanılır. Brd-U, yeni sentezlenen DNA'ya hücre siklusunun S fazında bağlanır. Böylelikle S fazında işaretlenen hücreleri daha sonra incelenme olanağı sağlar. Mezenkimal kök hücreleri Brd-U ile işaretlemek amacı ile hücreler Brd-U işaretleme seti (2750, Milipore, California, USA) içerisindeki 1:1000 oranında dilüe Brd-U ile 37ºC'de 1 saat inkübe edildi. Uygulamadan sonra kültür vasatı ile 3 defa 5'er dakika yıkanan hücreler, kültür vasatı aspire edildikten sonra tripsin/EDTA solüsyonu ile hücrelerin kültür kabından kalkmaları sağlandı. Bir kısım hücre kültür kabından kaldırılmadan immunohistokimyasal boyama için saklandı. Diğer toplanan hücreler santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atılarak alttaki hücre peleti üzerine kültür vasatı ilavesi yapılarak her bir deneğe verilmek üzere steril enjektörler içine alındı. Hücre miktarı $25x10^5$ hücre/ml idi.

5.4.3. Hücrelerin Farklılaştırılması

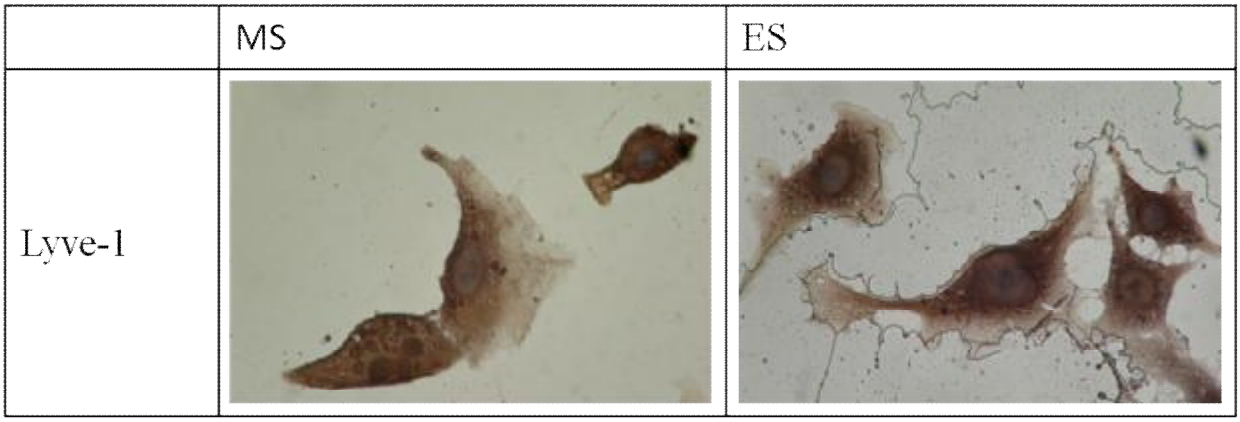
Hem mezenkimal hem de embriyonik cisimlerden alınan hücreler kollagen 1 (MILLIPORE 08-115) kaplı kültür kaplarına alındıktan sonra 1 gece hücre tipine uygun kültür vasatı içerisinde kültüre edildi. Hücrelerin yapışması sağlandıktan sonra Embriyonik kök hücre veya Mezenkimal kök hücre vasatı içerisine lenfatik diferansiyasyon amacı için vasküler endotelyal büyüme faktörü VEGF-A (30 ng/ml) (CST-E, 5314SC) ilavesi yapılarak kültür vasatı 2 günde bir değiştirilerek 2 hafta süre ile kültüre edildi. İki hafta sonunda hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile toplanarak bir kısmı immunohistokimya analizi için 24 gözlü kültür kaplara alındı. Hücreler 1 gece inkübatörde bekletildikten sonra immunohistokimya analizi için %4

paraformaldehit solüsyonu ile 30 dk tespit edildi ve indirekt immunoperoksidaz tekniği ile incelendi.

5.4.4. Hücre Farklılaştırılmasının Değerlendirilmesi

Hem mezenkimal hem de embriyonik cisimlerden alınan hücreler farklılaşma kültür vasatı içerisinde 15 gün süre ile her 2 günde bir vasat değiştirilerek kültüre edildiğinde transfer edilemeden önce hücreler pasajlandı. Bir kısım hücre immunohistokimyasal analiz için tespit edildi. Hücrelerin farklılaşma karakterizasyonu için ise VEGF ilavesi-kollajen etkisi ile immunohistokimyasal analiz soncunda her iki kök hücre grubunda da LYVE-1 ve Prox-1 immunoreaktivitelerinin pozitif olduğu gözlendi. ES hücrelerindeki immunoreaktivite pozitifliğinin mezenkimal kök hücrelerden farklılaştırılan hücrelere oranla daha fazla olduğu görüldü. Sonuç olarak embriyonik kök hücrelerin kullanılan farklılaştırma ortamında lenfatik diferensiyasyonunun daha iyi olduğu izlendi. LYVE-1 ve Prox-1 immunoreaktivitesi pozitifliği sonucunda hücrelerin lenf endotel hücrelerine farklılaştıkları düşünüldü. Hücrelerin farklılaşma süreci immunohistokimyasal analizi ile belirlendikten sonra, embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerden farklılaştırılan hücreler tripsin EDTA ile toplandı ve $25x10^5$ hücre/ml de olacak şekilde deneklere infiltre edilmek üzere hazırlandı.

Kültüre edilen embriyonik ve mezenkimal kök hücreler farklılaştırma ortamına alındıktan sonra hücre şekillerinin değiştikleri gözlendi (Resim-23). Fuziform yapıda olan mezenkimal kök hücrelerin epiteloid karakterde olduğu, embriyonik kök hücrelerin de epiteloid karakterlerini korudukları izlendi.



Resim-23: Kültüre edilen embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerin LYVE-1 ve Prox-1 immunoreaktivitesi

5.5. DEĞERLENDİRME

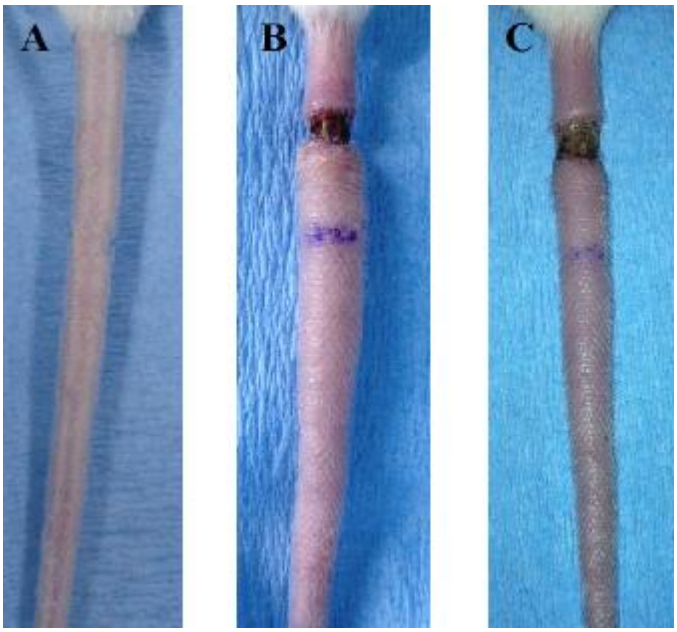
5.5.1. Sakrifikasyon Protokolü

Gruplarda açıklandığı gibi fareler cerrahi işlemden 15 gün sonra sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sırasında farelere 80-100 mg/kg Ketamin ve 5-10 mg/kg Xylazine olacak şekilde intraperitoneal olarak işlemden hemen önce uygulandı. Sakrifikasyon öncesi kuyruk çap ölçümü yapılarak kaydedildi. Kuyruk kök kısmından bistüri ile kesilerek ampute edildi. Grup içi sınıflamaya göre isimlendirilen kaplar içine formol konularak kuyruk fikse edildi. Örnekler Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD'na histolojik inceleme amaçlı teslim edildi.

5.5.2. Lenfödem Gelişiminin Değerlendirilmesi

Oluşturulan cerrahi modelde lenfödem gelişimi makroskobik olarak çap ölçümleriyle değerlendirilirken ön çalışma aşamasında histolojik olarak HE boyama ile doğrulandı.

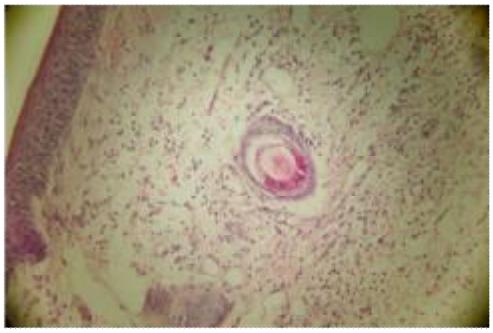
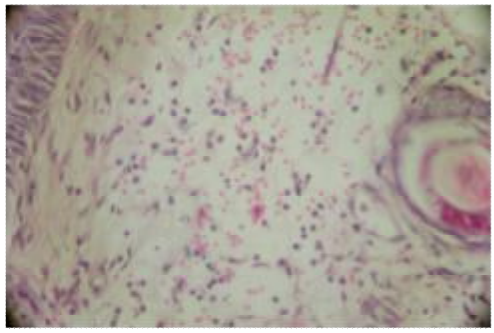
Sekonder lenfödem modelinin cerrahi olarak oluşturulmasının ardından günlük çap ölçümü dijital mikrometre (Mitutoyo®) kullanılarak yapıldı. Her grubun kendi içindeki çap ölçümleri ve çap değişimleri konusunda bulgular bölümünde geniş bilgi verilmiştir. Resim 24'te başlangıç, beşinci ve onbeşinci günlerdeki kuyruk çap değişimi görülmektedir. Makroskobik lenfödem en fazla cerrahi sonrası 5. günde izlenmektedir.



Resim-24: Kuyruk çap değişimi: Cerrahi öncesi görünüm (A), Cerrahinin 5. günü görünüm (B), Cerrahinin 15. günü görünüm (C)

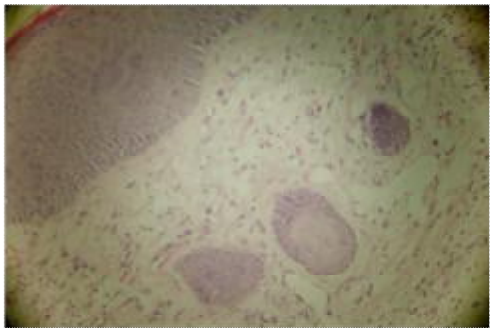
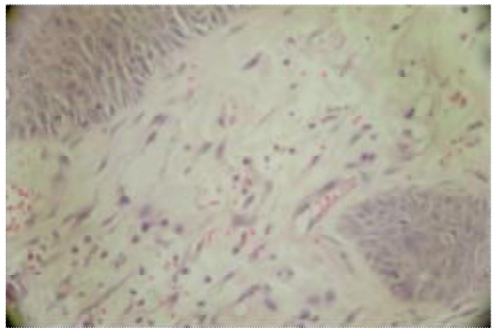
Hem lenfödem gelişiminin histolojik olarak gözlenmesi hem de kök hücre enjeksiyonunun hangi gün yapılmasının uygun olduğunun belirlenmesi amaçlı ön çalışma yapıldı. Cerrahi olarak sekonder lenfödem modeli oluşturulan dört farklı fare sırasıyla üçüncü, beşinci, yedinci ve yirmi birinci günlerde sakrifiye edildi. Sakrifikasyon öncesi fare kuyruklarına herhangi bir vasat, kök hücre ya da serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmadı. Kuyruk uygun kesitlerin alınmasının ardından HE ile boyanarak değerlendirildi.

Sekonder lenfödem modelinin 3. gününde kuyruğun HE boyanması incelendiğinde yoğun polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu gözlendi. Mevcut polimorf nüveli lökositlerin verilecek olan kök hücreleri fagosite etme olasılığı göz önünde bulundurularak enjeksiyonun 3. günde yapılmaması planlandı. Histolojik kesitlerde lenfödem lehine bulguların başladığı gözlendi (Resim-
25).

	x200	x400
3. gün		

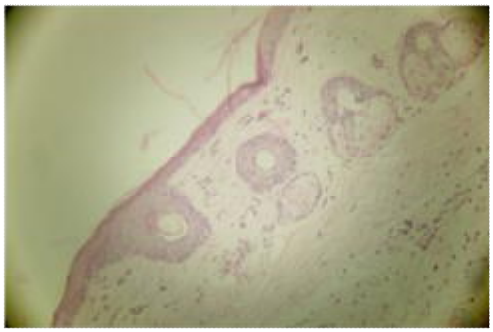
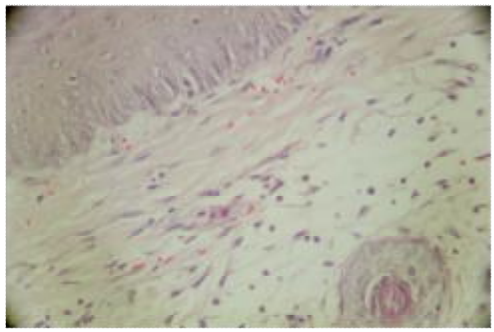
Resim-25: 3. gün kuyruk HE boyama kesitleri

Cerrahinin 5. gününde sakrifiye edilen farelerin kuyruk kesitlerinin HE boyamasında PNL infiltrasyonunun 3. güne göre azaldığı gözlendi. Lenfödem açısından değerlendirildiğinde ödeme yönelik bulguların en yoğun olarak beşinci günde izlendiği görüldü. Bu nedenle kök hücre ve vasat enjeksiyonları 5. günde yapıldı (Resim-26).

	x200	x400
5. gün		

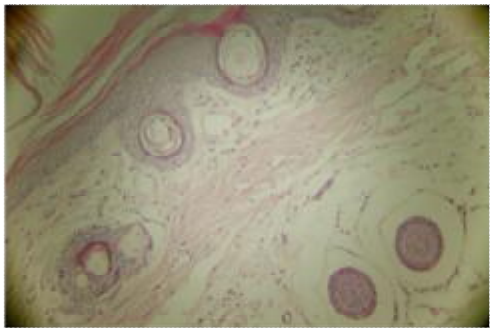
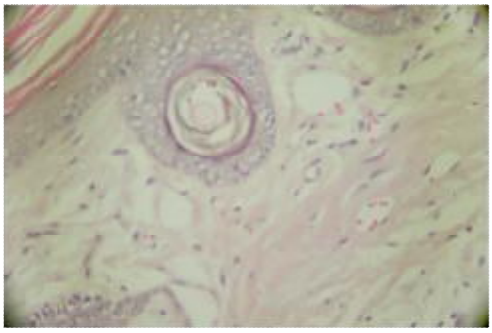
Resim-26: 5. gün kuyruk HE boyama kesitleri

Lenfödem modeli oluşturulmasının 7. günü sakrifiye edilen farenin kuyruk kesitlerinin HE mikroskobik bakısında PNL infiltrasyonunun 3. ve 5. Günlere göre daha fazla azaldığı gözlendi. Ödem bulgularının kısmen regrese olduğu saptandı (Resim-27)

	x200	x400
7. gün		

Resim-27: 7. gün kuyruk HE boyama kesitleri

Cerrahinin 21. günü sakrifiye edilen farenin kuyruk HE bakısında polimorf nüveli lökosit infiltrasyonun gerilediği gözlendi. Lenfödem açısından değerlendirildiğinde ödem bulgularının şiddetinin azaldığı ve net olarak saptanamadığı belirlendi (Resim-28). Bu nedenle çalışma grubundaki fareler cerrahi sonrası 15. günde sakrifiye edilerek tedavi yanıtı ile lenfödem spontan regresyonunun ayırt edilmesi sağlandı.

	x200	x400
21.gün		

Resim-28: 21. gün kuyruk HE boyama kesitleri

5.5.3. Histomorfolojik Analiz

5.5.3.1. Mezenkimal ve Embriyonik kök hücrelerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile İncelenmesi

Hücreler Lyve-1 ve Prox-1 immunohistokimya analizi için hücrelerin bir kısmında kültür vasatı uzaklaştırılarak bir defa steril PBS ile yıkandıktan sonra %4'lük paraformaldehit ile 30 dk tespit edildi. Tespit işleminden sonra 3 kez 5 dk PBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dk %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2, K31355100, Merck, Darmstadt, Germany) uygulandıktan sonra, hücreler 3 defa PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için hücreler %0,1 Triton-X 100 (A4975,0100, Applichem, Darmstadt, Germany) ile 15 dk buz üstünde inkübe edildi ve 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra 1 saat bloklama solüsyonu (K023, DBS, California, USA) konarak bekletildi. 1/50 dilüsyonda anti-Lyve-1 ve anti-Prox-1 antikorları ile bir gece +4 C^o'de inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkanan hücreler anti-mouse ve anti-rabbit biotinlenmiş ikincil antikoru (KP500, DBS, California, USA) ile 30 dk inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dk yıkanan hücreler Streptavidin hidrojen peroksidaz (KP500, DBS, California, USA) ile 30 dk bekletildikten sonra tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) kromojeni 5 dk uygulandı ve distile su ile 15 dk yıkandı. Mayer's Hematoksilen (02274390059, J.T. Barker, Deventer, Holland) ile 5 dk boyama yapıldıktan sonra hücreler distile su ile 15 dk yıkanarak direkt olarak kapatma medyumu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı ve Olympus marka BX 40 mikroskop ile incelendi.

5.5.3.2. Işık Mikroskobik İnceleme

Deneklerden alınan örnekler %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24- 48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve dokular bloklanarak rotatuar mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm'lik kesitler alındı. Dokunun morfolojisini incelemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyaması yapıldı. Ayrıca Lyve-1, Prox-1, VEGF ve FGF2 dağılımları indirekt immunohistokimya analizi ile incelendi.

5.5.3.3 Parafin Doku Takibi

Tespit edilen kuyruk örnekleri, 3 hafta süre ile %10 EDTA solüsyonu içerisinde tutularak kuyruk örneklerinin kesilebilir olması sağlandı. Daha sonra örnekler 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika %60'dan %80"e artan etil alkol serilerinden geçirildi. %95 alkol içerisinde 1'er saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1'er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen:parafin içerisinde 30 dakika 60˚ C'lik etüvde tutulan örnekler birer saat 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo-9).

İşlem	**Madde**	**Süre**
Tespit	%10 formalin	**24- 48 saat**
	Akar su	**1 gece**
Dehidratasyon	%60 etil alkol	**30 dakika**
	%70 etil alkol	**30 dakika**
	%80 etil alkol	**30 dakika**
	%95 etil alkol	**1 saat**
	%95 etil alkol	**1 saat**
Şeffaflaştırma	Ksilen-Alkol	**30 dakika**
	Ksilen	**1 saat**
	Ksilen	**1 saat**
Emdirme 60˚C etüvde	Ksilen-Parafin	**30 dakika**
	Parafin	**1 saat**
	Parafin	**1 saat**
Gömme	**Parafin**	

Tablo-9: Parafin Doku Takibi

Alınan 5 µm'lik kesitlere histokimyasal inceleme için Hematoksilen-Eozin ve Masson Trikrom boyaları, immunohistokimyasal inceleme için indirekt immunohistokimya boyaması yapıldı.

5.5.3.4. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Rotatuar mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚ C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dk akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dk Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo-10).

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60˚C etüvde	**1 gece**
Deparafinizasyon	Ksilen	**30 dakika**
	Ksilen	**30 dakika**
Rehidratasyon	%95 alkol	**2 dakika**
	%80 alkol	**2 dakika**
	%70 alkol	**2 dakika**
	%60 alkol	**2 dakika**
Yıkama	Akar su	**5 dakika**
Boyama	Hematoksilen	**30 dakika**
Yıkama	Akar su	**5 dakika**
Diferansiyasyon	Asit alkol	**2-3 saniye**
Boyama	Eozin	**2 dakika**
Yıkama	Akar su	**5 dakika**
Dehidratasyon	%80 alkol	**1 dakika**
Dehidratasyon	%95 alkol	**1 dakika**
Şeffaflaştırma	Ksilen	**1 saat**
Kapama	**Entellan**	

Tablo-10: Hematoksilen-Eozin Boyama Takibi

5.5.3.5. İndirekt İmmunoperoksidaz Yöntemi

Örneklerden alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Pap pen (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan %0,5'lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H_2O_2 uygulandı. 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika bloklama solüsyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile işleme alındı. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-Lyve1, anti-Prox-1, anti-VEGF ve anti-FGF2 ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diamimobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) ile 5 dk boyandı. Mayer’s Hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı.

İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek, immunoreaktiviteler negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.

5.5.4. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında toplam beş grupta dokuzar adet fare değerlendirilmeye alındı. İstatistiksel analiz SPSS 15.0 programı kullanılarak yapıldı. SPSS parametreleri olarak farelerin başlangıç, infüzyon günü (5. gün), yedinci, dokuzuncu ve onbeşinci gün kuyruk çap ölçümleri kaydedildi. Histolojik kriterler olarak lenfanjiyogenez ve anjiyogenez göstergesi kabul edilen Lyve-1, Prox-1, FGF-2 ve VEGF-C boyanma paternleri derecelendirildi. Kuyruk çap ölçümleri standart istatistiksel yöntemler ile hesaplandı. Kuyruk çapındaki değişim indekslerinin gruplar arası ve grup içi istatistiksel analizi için Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Testi yöntemi kullanıldı. Grup içi karşılaştırma analizleri Mann-Whitney Test yöntemi ile yapıldı.

6. BULGULAR

6.1. Kuyruk Çap Ölçümleri

Çalışmaya toplam beş grupta 45 fare dahil edildi, gruba dahil olan fareler dışında 5 fare kemik iliğinden mezenkimal kök hücre eldesi için kullanıldı. Farelerin cerrahi işlemi iyi tolere ettiği, cerrahi sonrası izlem ve enjeksiyon aşamalarında sorun yaşanmadığı görüldü.

6.1.1. Kuyruk Çap Ölçümlerinin Gruplar içi Dağılım

Çalışma başlangıcında projeye alınan fareler ağırlık, yaş, cins ve cinsiyetleri açısından standardize edildi. Ancak yapısal olarak kuyruk çapları bazal ölçümlerinde farklılık tespit edildiğinden istatistiksel değerlendirme objektif olması amacıyla çap artışına göre yapıldı.

Klinik olarak lenfödem için uygulanan tedavinin başarı kriterlerinden biri de tedavi sonrası lenfödemin gerilemesi ve ödemli alanın çapında küçülme olmasıdır. Çalışma kapsamında lenfödem gelişen tüm gruplarda cerrahi sonrası ölçülen kuyruk çaplarında artış oldu. Çap artışını belirlemek amacıyla her farenin 15. gün kuyruk çap ölçümünden başlangıç kuyruk çap değeri çıkarıldı, milimetre cinsinden çap değişim değeri bulundu. Daha sonra bulunan bu değer yüzde olarak hesaplandı ve her grup için ortalama alındı. Bu hesaplamaların tamamı SPSS 15.0 programında Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanılarak yapıldı. 15. gün ölçülen kuyruk çapı değerinin düşük çıkması tedaviye yanıt alındığını gösterdiğinden, çap artış oranının azalması başarılı tedavi uygulandığını gösterdi. Benzer şekilde çap artış oranının yüksek bulunması ile tedavi başarısızlığı doğru orantılı kabul edildi.

Her grubun kendi içinde çap artış oranları hesaplandığı gibi gruplar arası karşılaştırma da Mann-Whitney U yöntemi ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve anlamlılıkları p değeri üzerinden belirtildi.

6.1.1.1. Grup 1

Serum fizyolojik kontrol grubu çalışma kapsamında Grup 1 olarak isimlendirildi. Serum fizyolojik kontrol grubundaki farelerin günlük çap ölçümleri Tablo-11'de gösterilmiştir.

SERUM FİZYOLOJİK KONTROL GRUBU					
Denek	**Günlere Göre Kuyruk Çapı (mm)**				
	Başlangıç	**5. gün**	**7. gün**	**9. gün**	**15. gün**
SF-1	3,48	5,29	5,51	5,43	4,65
SF-2	3,83	5,69	5,56	5,51	5,38
SF-3	3,75	5,54	5,68	5,70	4,76
SF-4	3,73	5,20	5,18	5,14	4,92
SF-5	3,88	5,36	5,18	5,19	4,98
SF-6	3,77	5,70	5,23	5,17	4,95
SF-7	3,89	5,13	5,01	4,90	4,82
SF-8	3,92	5,25	5,17	4,90	4,84
SF-9	3,81	6,06	6,10	6,14	4,96

Tablo-11: SF grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Serum fizyolojik kontrol grubuna dahil edilen farelerin başlangıçta ölçülen kuyruk çapının medyan değeri 3,81 mm (minimum 3,48mm-maksimum 3,92 mm) ve sakrifikasyon öncesi ölçülen 15. gün kuyruk çapı medyan değeri 4,92 mm (minimum 4,65 mm-maksimum 5,38 mm) bulundu.

Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanılarak yapılan çaptaki değişim analizinde başlangıç çapına göre en fazla çap artışı serum fizyolojik kontrol grubunda (%30,18) saptandı. Bu bulgu lenfödem tedavisi açısından en başarısız grubun serum fizyolojik kontrol grubu olduğunu göstermiş oldu. Grupların birbiri arasındaki değerlendirmeleri ileride tartışılmıştır.

6.1.1.2. Grup 2

Grup 2 çalışma kapsamında embriyonik kök hücre vasat grubu olarak kabul edildi. Embriyonik kök hücre vasatı grubundaki farelerin günlük çap ölçümleri Tablo-12'de gösterilmiştir.

EMBRİYONİK KÖK HÜCRE VASAT GRUBU					
Denek	**Günlere Göre Kuyruk Çapı (mm)**				
	Başlangıç	**5. gün**	**7. gün**	**9. gün**	**15. gün**
EKHV-1	3,74	4,90	4,96	4,98	5,48
EKHV -2	3,69	5,24	5,41	5,61	5,16
EKHV -3	3,71	5,32	5,17	4,48	4,32
EKHV -4	3,73	5,12	5,15	5,17	4,40
EKHV -5	3,72	5,44	5,23	5,10	4,73
EKHV -6	3,75	6,38	6,05	5,22	4,87
EKHV -7	3,72	4,17	4,23	4,40	4,44
EKHV -8	3,68	4,30	4,35	4,41	4,13
EKHV -9	3,69	4,31	4,40	4,52	4,33

Tablo-12: EKHV grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Embriyonik kök hücre vasat grubuna dahil edilen farelerin başlangıçta ölçülen kuyruk çapının medyan değeri 3,72 mm (minimum 3,68 mm-maksimum 3,75 mm) ve sakrifikasyon öncesi ölçülen 15. gün kuyruk çapı medyan değeri 4,44 mm (minimum 4,13 mm-maksimum 5,48 mm) bulundu.

Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanılarak yapılan çaptaki değişim analizinde embriyonik kök hücre vasat grubunda %19,35 oranında değişim saptandı.

6.1.1.3. Grup 3

Grup 3 çalışma kapsamında mezenkimal kök hücre vasatı grubu olarak kabul edildi. Mezenkimal kök hücre vasatı grubundaki farelerin günlük çap ölçümleri Tablo-13'te gösterilmiştir.

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VASAT GRUBU					
Denek	**Günlere Göre Kuyruk Çapı (mm)**				
	Başlangıç	**5. gün**	**7. gün**	**9. gün**	**15. gün**
MKHV-1	3,64	4,92	5,10	5,42	5,07
MKHV -2	3,75	5,02	5,23	5,15	4,85
MKHV -3	3,69	4,48	4,72	5,07	4,63
MKHV -4	3,68	5,26	4,92	4,86	4,53
MKHV -5	3,67	4,91	4,93	4,99	4,78
MKHV -6	3,76	5,04	4,97	4,85	5,17
MKHV -7	3,74	4,17	4,23	4,40	4,44
MKHV -8	3,73	4,30	4,35	4,41	4,13
MKHV -9	3,71	4,31	4,40	4,52	4,33

Tablo-13: MKHV grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Mezenkimal kök hücre vasat grubuna dahil edilen farelerin başlangıçta ölçülen kuyruk çapının medyan değeri 3,71 mm (minimum 3,64 mm-maksimum 3,76 mm) ve sakrifikasyon öncesi ölçülen 15. gün kuyruk çapı medyan değeri 4,77 mm (minimum 4,46 mm-maksimum 5,17 mm) bulundu.

Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanılarak yapılan çaptaki değişim analizinde mezenkimal kök hücre vasat grubunda %27,88 oranında değişim saptandı. Serum fizyolojik kontrol grubundan sonra ikinci en yüksek değişim oranı mezenkimal kök hücre vasat grubunda gözlendi.

6.1.1.4. Grup 4

Grup 4 çalışma kapsamında embriyonik kök hücre grubu olarak kabul edildi. Embriyonik kök hücre grubundaki farelerin günlük çap ölçümleri Tablo- 14'te gösterilmiştir.

EMBRİYONİK KÖK HÜCRE VASAT GRUBU					
Denek	**Günlere Göre Kuyruk Çapı (mm)**				
	Başlangıç	**5. gün**	**7. gün**	**9. gün**	**15. gün**
EKH-1	3,71	5,20	4,82	4,71	4,25
EKH -2	3,70	5,20	5,02	5,59	4,46
EKH -3	3,67	5,35	5,33	4,81	4,50
EKH -4	3,74	4,76	4,88	4,40	4,34
EKH -5	3,68	4,99	4,95	4,68	4,30
EKH -6	3,44	5,54	5,31	4,74	4,23
EKH -7	3,74	5,08	4,87	4,56	4,09
EKH -8	3,87	5,61	5,28	4,65	4,37
EKH -9	3,98	5,64	5,79	5,77	4,88

Tablo-14: EKH grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Embriyonik kök hücre grubuna dahil edilen farelerin başlangıçta ölçülen kuyruk çapının medyan değeri 3,71 mm (minimum 3,44 mm-maksimum 3,98 mm) ve sakrifikasyon öncesi ölçülen 15. gün kuyruk çapı medyan değeri 4,34 mm (minimum 4,09 mm-maksimum 4,88 mm) bulundu.

Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanılarak yapılan çaptaki değişim analizinde en düşük değişim oranı embriyonik kök hücre grubunda (%16,84) saptandı. Bu sonuç doğrultusunda makroskobik değerler göz önüne alındığında en iyi iyileşmenin embriyonik kök hücre grubunda olduğu gözlendi.

6.1.1.5. Grup 5

Grup 5 çalışma kapsamında mezenkimal kök hücre grubu olarak kabul edildi. Mezenkimal kök hücre grubundaki farelerin günlük çap ölçümleri Tablo-15'te gösterilmiştir.

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VASAT GRUBU					
Denek	**Günlere Göre Kuyruk Çapı (mm)**				
	Başlangıç	**5. gün**	**7. gün**	**9. gün**	**15. gün**
MKH-1	3,71	5,20	4,82	4,71	4,25
MKH -2	3,70	5,20	5,02	5,59	4,46
MKH -3	3,67	5,35	5,33	4,81	4,50
MKH -4	3,74	4,76	4,88	4,40	4,34
MKH -5	3,68	4,99	4,95	4,68	4,30
MKH -6	3,44	5,54	5,31	4,74	4,23
MKH -7	3,74	5,08	4,87	4,56	4,09
MKH -8	3,87	5,61	5,28	4,65	4,37
MKH -9	3,98	5,64	5,79	5,77	4,88

Tablo-15: MKH grubu günlük kuyruk çap ölçümleri

Mezenkimal kök hücre grubuna dahil edilen farelerin başlangıçta ölçülen kuyruk çapının medyan değeri 3,58 mm (minimum 3,44 mm-maksimum 3,75 mm)ve sakrifikasyon öncesi ölçülen 15. gün kuyruk çapı medyan değeri 4,43 mm (minimum 4,01 mm-maksimum 4,81 mm) bulundu. Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanılarak yapılan çaptaki değişim analizinde mezenkimal kök hücre grubunda %21,77 oranında değişim saptandı. Bütünlük oluşturması açısından tüm gruplara ait minimum, maksimum ve medyan kuyruk çap ölçümleri Tablo-16'da özetlenmiştir.

GRUPLAR		Başlangıç	5. gün	7. gün	9. gün	15. gün
EKH	Minimum (mm)	3,44	4,76	4,82	4,40	4,09
	Maksimum (mm)	3,98	5,64	5,79	5,77	4,88
	Medyan (mm)	3,71	5,20	5,02	4,71	4,34
EKHV	Minimum (mm)	3,68	4,17	4,23	4,40	4,13
	Maksimum (mm)	3,75	6,38	6,05	5,61	5,48
	Medyan (mm)	3,72	5,12	5,15	4,98	4,44
MKH	Minimum (mm)	3,44	4,65	4,75	4,43	4,01
	Maksimum (mm)	3,75	5,65	5,86	5,43	4,81
	Medyan (mm)	3,58	5,43	5,34	4,82	4,43
MKHV	Minimum (mm)	3,64	4,48	4,72	4,77	4,46
	Maksimum (mm)	3,76	5,49	5,33	5,42	5,17
	Medyan (mm)	3,71	4,99	4,97	5,07	4,77
SF	Minimum (mm)	3,48	5,13	5,01	4,90	4,65
	Maksimum (mm)	3,92	6,06	6,10	6,14	5,38
	Medyan (mm)	3,81	5,36	5,23	5,19	4,92
TOTAL	Minimum (mm)	3,44	4,17	4,23	4,40	4,01
	Maksimum (mm)	3,98	6,38	6,10	6,14	5,48
	Medyan (mm)	3,71	5,20	5,18	4,99	4,63

Tablo-16: Tüm gruplara ait minimum, maksimum ve medyan kuyruk çap ölçümlerinin günlük dağılımı

6.1.2. Gruplararası Çap Değerlendirmesi

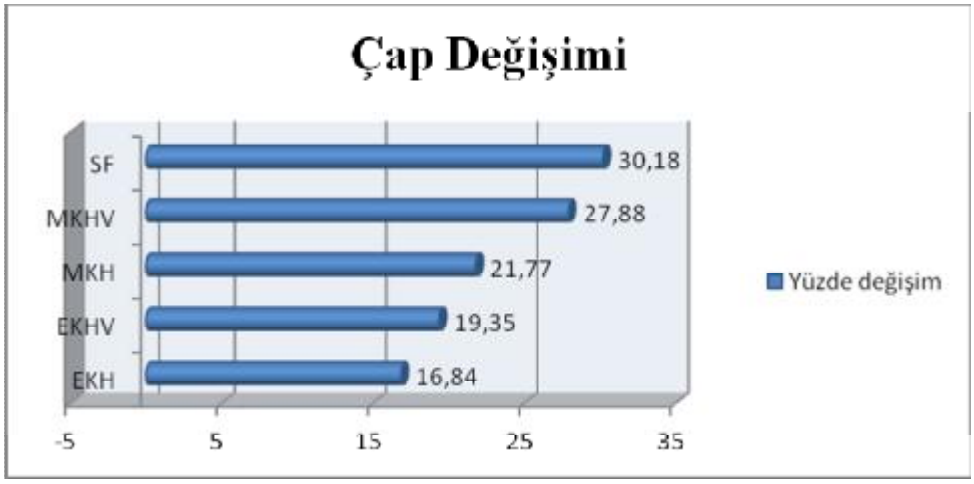
Lenfödem seyri sırasında her gruba enjekte edilen tedavi modalitelerinin farkını göstermek ve etkinliğini ölçmek amacıyla çap artış oranları hesaplandı. Çap artışını belirlemek amacıyla her farenin 15. gün kuyruk çap ölçümünden başlangıç kuyruk çap değeri çıkarıldı ve yüzde olarak hesaplandı.

Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanılarak yapılan çaptaki değişim analizinde başlangıç çapına göre en fazla artış serum fizyolojik kontrol grubunda (%30,18) gözlendi. Çap değişiminin en az olduğu grup embriyonik kök hücre grubu (%16,84) oldu. Bu

doğrultuda lenfödem geliştikten sonra kuyruğa serum fizyolojik enjekte edilen grupta iyileşme gözlenmediği; lenfödem tedavisinde en iyi yanıtın kuyruğa embriyonik kök hücre enjeksiyonu yapılan grup olduğu tespit edildi. Grup içi çap değişim oranları genel parametrelere oranla istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulundu (*p* 0,03). Gruplar arası çap değişimleri yüzde cinsinden Tablo-17 ve Grafik-6'da belirtilmiştir.

Gruplar	Kuyruk Çap değişimi (%)
EKH	16,84
EKHV	19,35
MKH	21,77
MKHV	27,88
SF	30,18

Tablo-17: Grup içi kuyruk çap değişimi yüzdesi



Grafik-6: Grup içi kuyruk çap değişimi yüzdesi

Hesaplanan çap değişim yüzdeleri parametre olarak kabul edilerek gruplar ikişerli olarak Mann-Whitney U Test yöntemi ile karşılaştırıldı ve *p* değerleri üzerinden istatistiksel anlamlılıkları hesaplandı.

İlk olarak tedavi yanıtı konusunda çalışmanın temelini oluşturan embriyonik kök hücre ve mezenkimal kök hücre grupları karşılaştırıldı. Embriyonik ve mezenkimal kök hücre enjeksiyonlarının lenfödemin gerilemesine ne kadar katkı sağladığını karşılaştırmak için ölçüm parametrelerine dayanan çap değişim yüzdeleri kullanıldı. Yapılan istatistiksel analiz sonucu

mezenkimal kök hücre grubu ile embriyonik kök hücre grubu arasında çap değişimi açısından anlamlı fark gözlenmedi (*p* 0,145). (Tablo-18 ve Grafik-7)

MKH Grubu ile EKH Grubu Çap Değişimi Karşılaştırması		
	Değişim Oranı	*p* Değeri
MKH	11,33	0,145
EKH	7,67	

Tablo-18: MKH ile EKH Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması



Grafik-7: MKH ile EKH Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Lenfödem modeline embriyonik kök hücre enjeksiyonun terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlı kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Embriyonik kök hücre grubu ile serum fizyolojik kontrol grubu arasında çap değişimi açısından yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı değişim embriyonik kök hücre grubunda gözlendi ($p<0,001$). Böylece kontrol grubuna göre embriyonik kök hücre enjeksiyonun lenfanjiyogenezi tetiklediği ve lenfödemin gerilemesinde etkinliğinin olduğu istatistiksel olarak gösterildi (Tablo-19 ve Grafik-8).

EKH Grubu ile SF Grubu Çap Değişimi Karşılaştırması		
	Değişim Oranı	*p* Değeri
EKH	14	0,001
SF	5	

Tablo-19: EKH ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

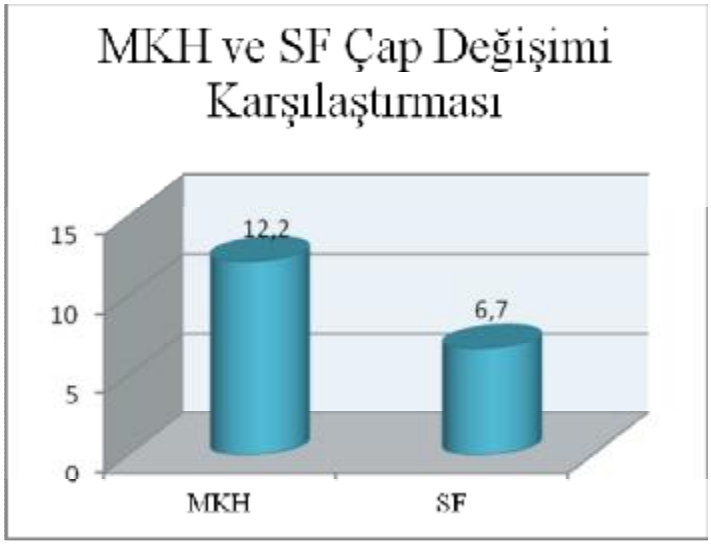


Grafik-8: EKH ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Lenfödem modeline mezenkimal kök hücre enjeksiyonun terapötik etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlı kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Mezenkimal kök hücre grubu ile serum fizyolojik kontrol grubu arasında çap değişimi açısından yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı değişim mezenkimal kök hücre grubunda gözlendi (p 0,03). Böylece kontrol grubuna göre mezenkimal kök hücre enjeksiyonun lenfanjiyogenezi tetiklediği ve lenfödemin gerilemesinde etkinliğinin olduğu istatistiksel olarak gösterildi (Tablo-20 ve Grafik-9).

MKH Grubu ile SF Grubu Çap Değişimi Karşılaştırması		
	Değişim Oranı	p Değeri
MKH	12,2	0,03
SF	6,7	

Tablo-20: MKH ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

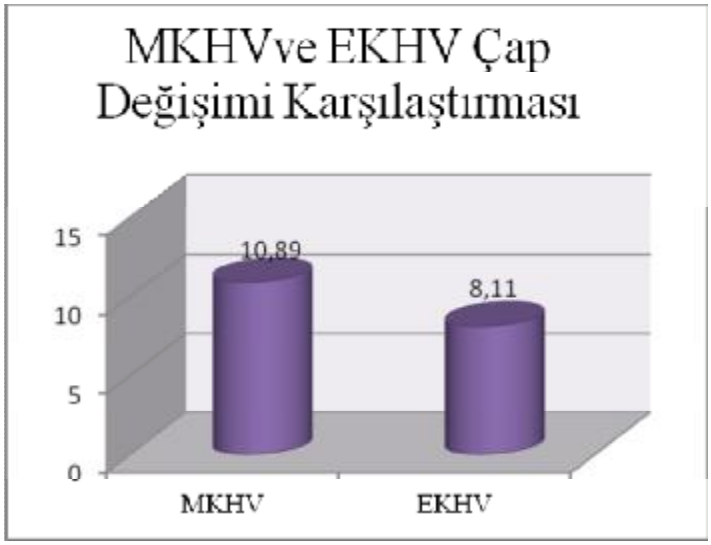


Grafik-9: MKH ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Lenfanjiyogenez ve lenfödemin gerilemesine terapötik etkinliği araştırılan diğer bir grup kök hücre vasatları oldu. Mezenkimal kök hücre vasatı verilen deney grubu ile embriyonik kök hücre vasatı verilen deney grubu karşılaştırıldığında, çap değişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı (*p* 0,27). (Tablo-21 ve Grafik-10)

MKHV Grubu ile EKHV Grubu Çap Değişimi Karşılaştırması		
	Değişim Oranı	*p* Değeri
MKHV	10,89	0,27
EKHV	8,11	

Tablo-21: MKHV ile EKHV Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması



Grafik-10: MKHV ile EKHV Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Kök hücre vasatlarının tedavi etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla kontrol grubu ile karşılaştırmaları yapıldı. Embriyonik kök hücre vasat grubu ve serum fizyolojik kontrol grubu arasında çap değişimi açısından yapılan değerlendirmede anlamlı istatistiksel fark bulunmadı (*p* 0,145). (Tablo-22 ve Grafik-11)

EKHV Grubu ile SF Grubu Çap Değişimi Karşılaştırması		
	Değişim Oranı	*p* Değeri
EKHV	7,67	0,145
SF	10,33	

Tablo-22: EKHV ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

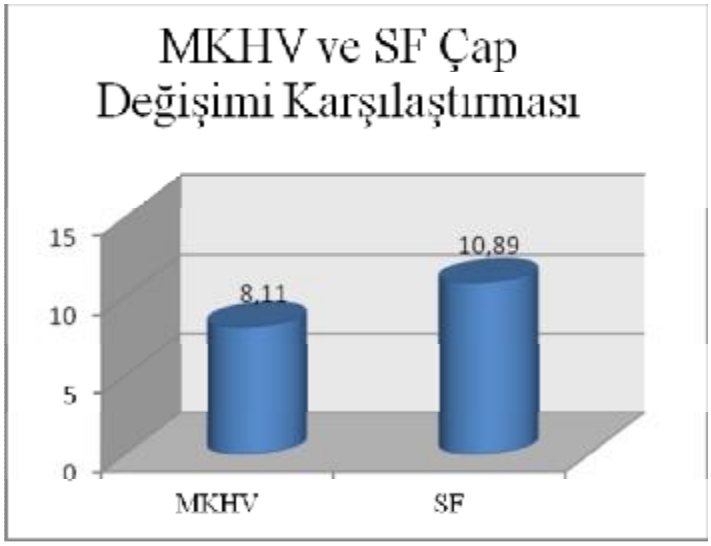


Grafik-11: EKHV ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Benzer şekilde mezenkimal kök hücre vasat grubu ile serum fizyolojik kontrol grubu lenfödem tedavisindeki terapötik etkinliğin değerlendirilmesi açısından karşılaştırıldı. Yapılan istatistiksel analizde mezenkimal kök hücre vasat grubu ile serum fizyolojik kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmadı (p= 0,453). (Tablo-23 ve Grafik-12)

MKHV Grubu ile SF Grubu Çap Değişimi Karşılaştırması		
	Değişim Oranı	*p* Değeri
MKHV	8,11	0,453
SF	10,89	

Tablo-23: MKHV ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması



Grafik-12: MKHV ile SF Grubunun Çap Değişim Yüzdesi Karşılaştırması

Lenfödem modelinin oluşturulmasından sakrifikasyona kadar geçen süre içinde en yüksek çap ölçümü cerrahinin beşinci gününde gözlendi. Lenfödem tedavisine yanıt alınan gruplarda çapta küçülme beklendiğinden en yüksek çap olan 5. gün çapı ile 15. gün kuyruk çapı (sakrifikasyon öncesi) farkı hesaplanarak düşme miktarı olarak isimlendirildi.

Lenfödemin gerilediği, lenfanjiyogenezin gözlendiği yani verilen tedavi sonrası iyileşme olan gruplarda kuyruk çapındaki düşme miktarının daha fazla olması beklendi. Gruplara göre yapılan değerlendirmede kuyruk çapındaki düşme miktarı en fazla mezenkimal ve embriyonik

kök hücre enjeksiyonu yapılan farelerde gözlendi. Bu analiz kök hücre tedavisi alan gruplarda lenfödemin daha hızlı gerilediği, terapötik etkinliğin en fazla kök hücre gruplarında olduğunu gösterdi. Kuyruk çapındaki en az miktarda düşüş ise mezenkimal kök hücre vasat grubunda bulundu. Gruplara göre kuyruk çapındaki düşme miktarı Tablo-24'te gösterilmiştir, negatif değişim değerleri kuyruk çapında düşme olmadığını aksine 5. gün çapına göre artış olduğunu göstermektedir.

Gruplara Göre Kuyruk Çapındaki Düşme Miktarı (mm)			
	Minimum	Maksimum	Medyan
EKH	0,42	1,31	0,85
EKHV	-0,58	1,51	0,17
MKH	0,40	1,43	0,99
MKHV	-0,15	0,82	0,13
SF	0,28	1,1	0,41

Tablo-24: Gruplara göre kuyruk çapındaki minimum, maksimum ve medyan düşme miktarı (mm)

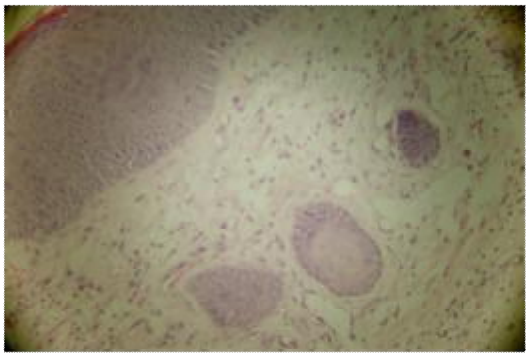
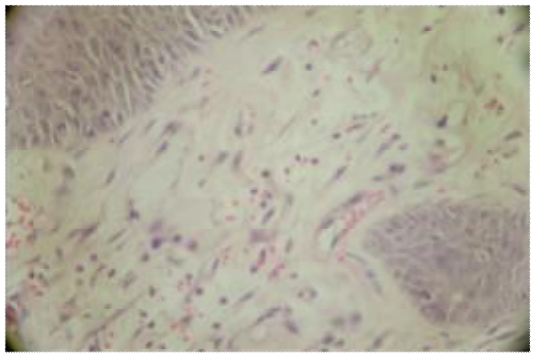
6.2. Histolojik Bulgular

6.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları

Deneklerden alınan örnekler %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24- 48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve dokular bloklanarak rotatuar mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm'lik kesitler alındı. Dokunun morfolojisini incelemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyaması yapıldı.

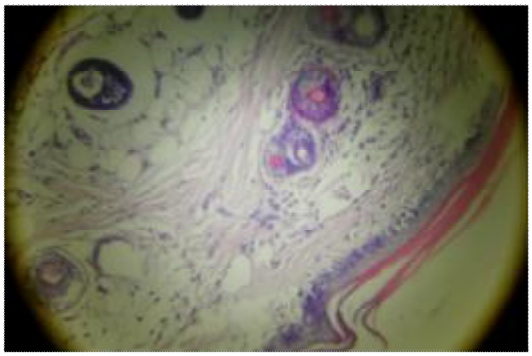
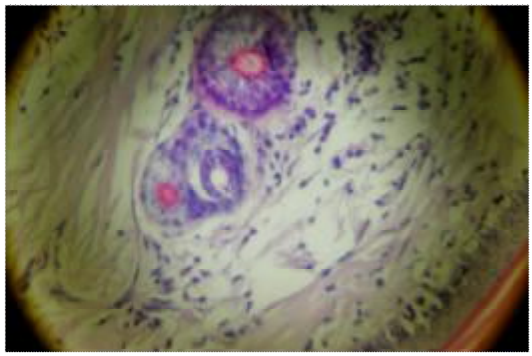
Ön çalışma aşamasında cerrahi model oluşumunun beşinci gününde lenfödem histolojisini değerlendirmek için kuyruk kesiti alınarak HE boyama yapıldı. Deneysel modelin transvers kesitlerinde 5. günde epidermisin korunduğu ve çok katlı keratinize yassı epitelin gözlemlendiği görüldü. Epitel altında papiller dermis ve dermiste polimorfonükleer hücre infiltrasyonu olduğu, yer yer boşlukların yer aldığı ve ödeme ait bulguların olduğu görüldü (Resim-29). Cerrahi

modelinin 5. günde ödemin tam olarak histolojik açıdan belirgin olduğunun tespitinden sonra mezenkimal ve embriyonik kök hücreler deneysel modele transferi edildi.

	x200	x400
5.gün		

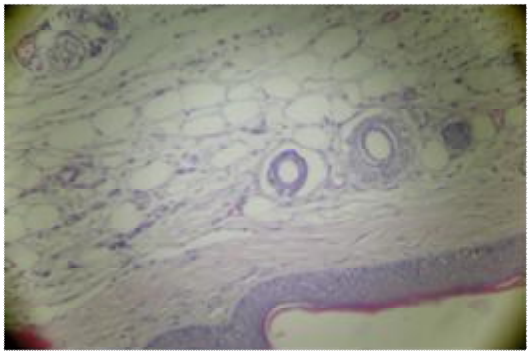
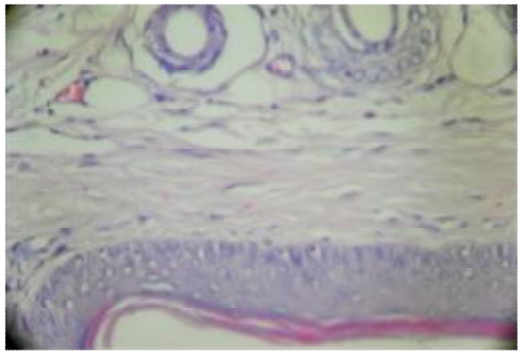
Resim-29: Cerrahi modelin 5. gününde HE boyama kesiti, yoğun PNL infiltrasyonu ve ödeme ait yer yer boşluklar görülmekte

Lenfödem modelinin oluşturulmasının 5. gününde embriyonik kök hücre enjeksiyonu yapılan grubun kuyruk kesitleri Hematoksilen-Eozin ile boyanarak değerlendirildi. Embriyonik kök hücre kaynağından farklılaştırılan hücrelerin kuyruğa transferinden sonra alınan kesitlerde polimorfonükleer lökositlerin azaldığı, epidermis ve dermisin normal yapısını koruduğu ve ödeme ait bulguların olmadığı gözlendi (Resim-30). Böylelikle histolojik anlamda embriyonik kök hücre verilen grupta tedavi etkinliği gösterilmiş oldu.

	x200	x400
EKH		

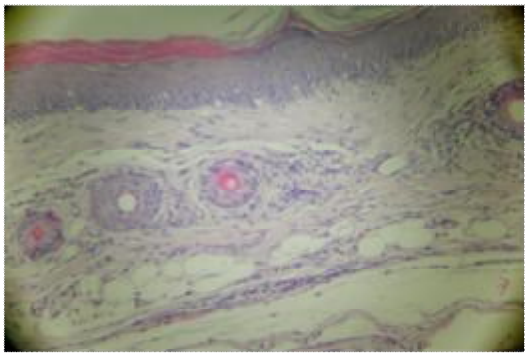
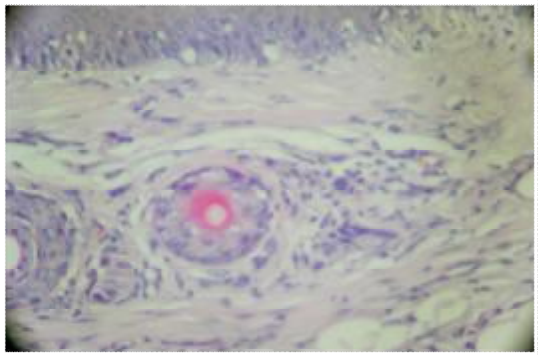
Resim-30: Embriyonik kök hücre grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri

Embriyonik kök hücre vasatı verilen grubun kuyruk kesitlerinin HE bakısında ödeme ait bulguların devam ettiği görüldü (Resim-31). Bu bulgu doğrultusunda embriyonik kök hücre vasatının lenfanjiyogenez üzerine etki etmediği ve lenfödem tedavisinde terapötik etkisi olmadığı gözlemlendi.

	x200	x400
EKHV		

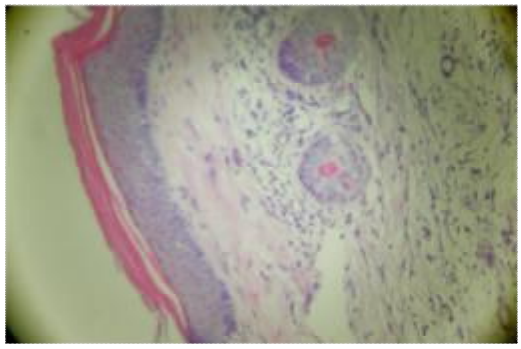
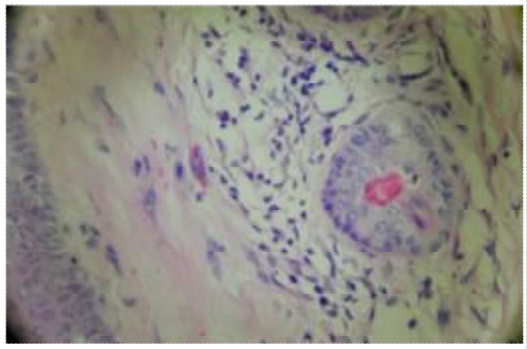
Resim-31: Embriyonik kök hücre vasat grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri

Mezenkimal kök hücre kaynağından farklılaştırılan hücrelerin kuyruğa transferinden sonra alınan kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyanarak değerlendirildi. Embriyonik kök hücre grubuna benzer şekilde histolojik kesitlerde polimorfonükleer lökositlerin azaldığı, epidermis ve dermisin normal yapısını koruduğu ve ödeme ait bulguların olmadığı gözlendi (Resim-32). Bu bulgu lenfödem tedavisinde mezenkimal kök hücre enjeksiyonunun ödemin gerilemesinde etkili olduğunu göstermiş oldu.

	x200	x400
MKH		

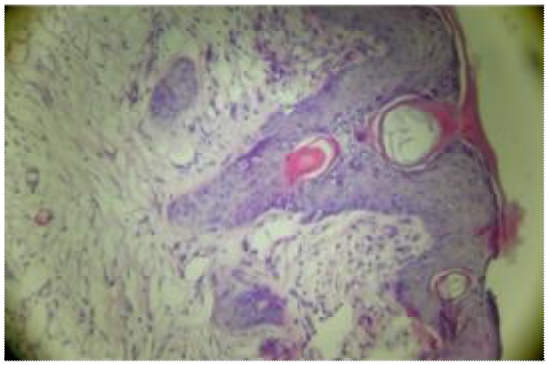
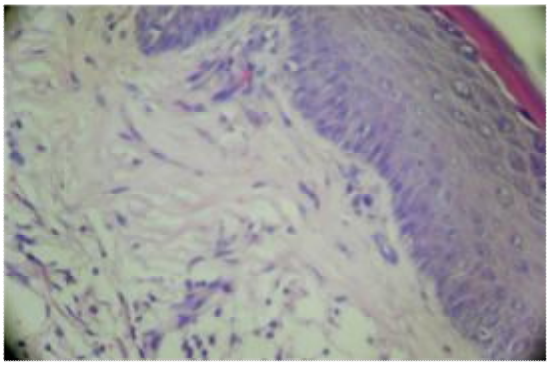
Resim-32: Mezenkimal kök hücre grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri

Cerrahinin 5. gününde kuyruğa mezenkimal kök hücre vasatı enjekte edilen grubun kuyruk kesitleri HE ile incelendiğinde ödem bulgularının sürmekte olduğu ve iyileşme izlenmediği gözlendi (Resim-33). Mezenkimal kök hücre vasatı enjeksiyonunun lenfödemin gerilemesinde etkin olmadığı gösterilmiş oldu.

	x200	x400
MKHV		

Resim-33: Mezenkimal kök hücre vasat grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri

Serum fizyolojik kontrol grubunun HE boyama kesitleri ödemin devamlılığı açısından değerlendirildi. Histolojik bakıda papiller dermis ve dermiste polimorfonükleer hücre infiltrasyonu olduğu, yer yer boşlukların gözlemlendiği ve ödeme ait bulguların devam etmekte olduğu gözlemlendi (Resim-34). Bulgular doğrultusunda serum fizyolojik enjeksiyonunun lenfödem tedavisinde etkinliğinin olmadığı saptandı.

	x200	x400
SF		

Resim-34: Serum fizyolojik kontrol grubunun kuyruk kesiti HE boyama kesitleri

6.2.2. İmmunohistokimyasal Boyama Sonuçları

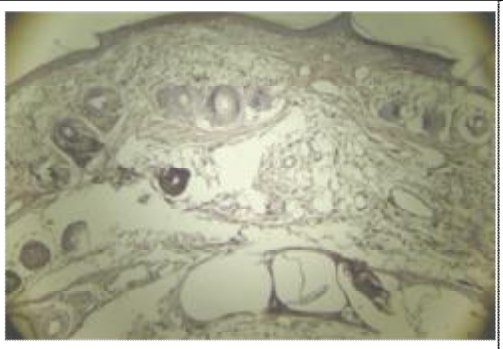
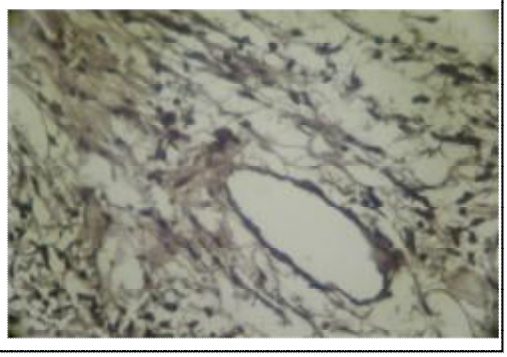
Örneklerden alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için hazırlandı ve indirekt immunoperoksidaz yöntemi ile primer antikorlar olan anti-Lyve-1, anti-Prox-1, anti-VEGF ve anti-FGF-2 uygulanarak incelendi.

Daha önce bahsedildiği gibi VEGF vaskülogenez, lenfanjiyogenez ve anjiyogenez için gerekli multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. FGF-2 ise anjiyogenezi ve fibroblastların proliferasyonunu stimüle eder, yara iyileşmesinde rolü gösterilmiştir. Prox-1 embriyoda lenfanjiyogenezin başlaması için eksprese olması zorunlu bir moleküldür. Embriyoda vasküler belirteçlerden, lenfatik belirteçlerin ekspresyonuna geçişi sağlayan Prox-1 'dur. Lyve-1'in normal kan damarlarında eksprese olmamasına karşın lenfatik endotelde eksprese olması nedeniyle, lenfatik belirteç olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır. Görevlerinden bir tanesi de, hiyaluronik asidi aracı olarak kullanarak, hücrelerin lenfatik damarlara girişlerini, göç etmelerini sağlamaktır.

Böylelikle çap ölçümlerine ve HE kesitlerde ödemin derecelendirilmesine ilaveten indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak kuyruk kesitleri lenfanjiyogenezin histolojik belirteçleri açısından değerlendirildi.

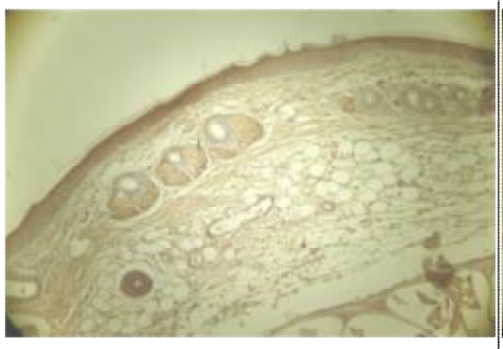
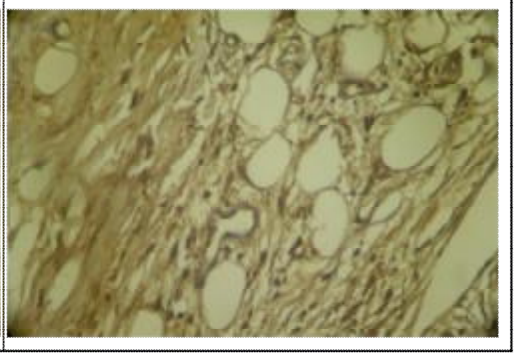
6.2.2.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Dağılımı

Embriyonik kök hücre grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak VEGF immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Embriyonik kök hücre grubunda orta şiddette VEGF immunoreaktivitesi saptandı (Resim-35).

	x200	x400
EKH Grubunda VEGF Aktivitesi		

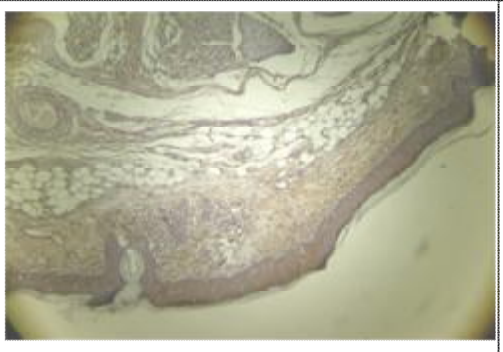
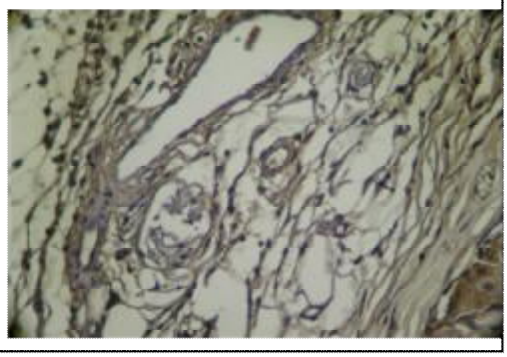
Resim-35: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi

Embriyonik kök hücre vasat grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak VEGF immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Embriyonik kök hücre vasat grubunda zayıf şiddette VEGF immunoreaktivitesi saptandı (Resim-36).

	x20	x40
EKHV Grubunda VEGF Aktivitesi		

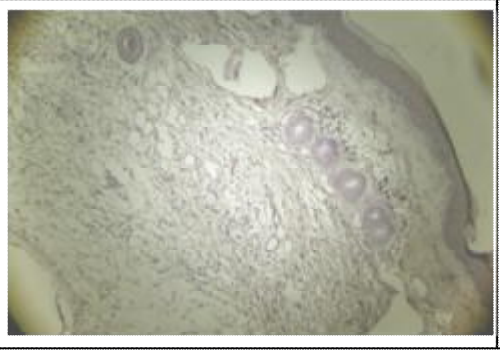
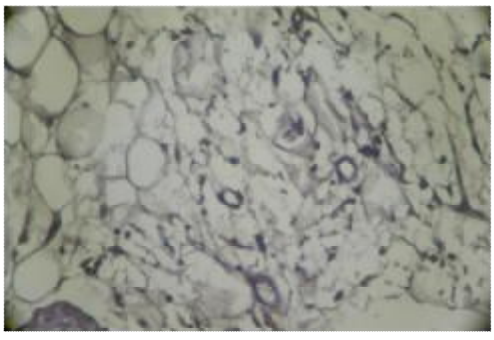
Resim-36: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi

Mezenkimal kök hücre grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak VEGF immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Mezenkimal kök hücre grubunda da embriyonik kök hücre grubuna benzer şekilde orta şiddette VEGF immunoreaktivitesi saptandı (Resim-37).

	x20	x40
MKH *Grubunda VEGF Aktivitesi*		

Resim-37: Mezenkimal kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi

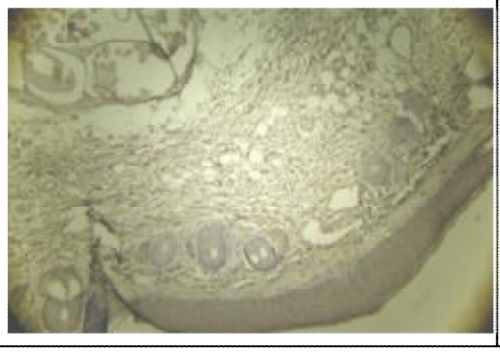
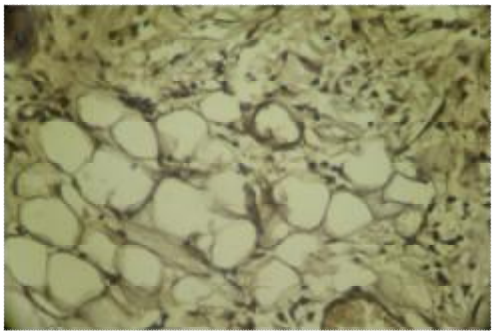
Mezenkimal kök hücre vasat grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak VEGF immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Mezenkimal kök hücre vasat grubunda VEGF immunoreaktivitesi yer yer pozitif saptandı (Resim-38).

	x20	x40
MKHV *Grubunda VEGF Aktivitesi*		

Resim-38: Mezenkimal kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi

Serum fizyolojik kontrol grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak VEGF immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Serum fizyolojik

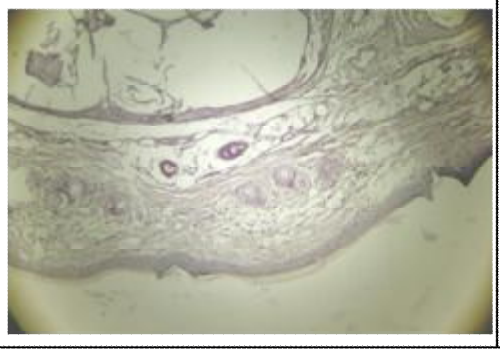
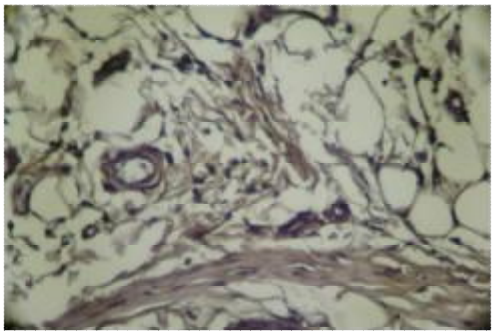
kontrol grubunda VEGF immunoreaktivitesi değerlendirildiğinde yer yer pozitiflik saptandığı gözlendi (Resim-39).

	x20	x40
SF Grubunda VEGF Aktivitesi		

Resim-39: Serum fizyolojik kontrol grubu kuyruk kesitlerinde VEGF immunoreaktivitesi

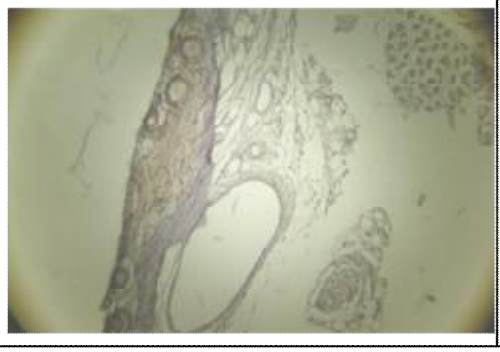
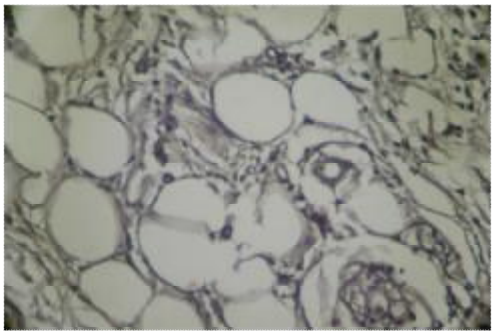
6.2.2.2. Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2) Dağılımı

İndirekt immunperoksidaz yöntemi kullanılarak değerlendirilen embriyonik kök hücre grubuna ait kuyruk kesitleri FGF-2 immunoreaktivitesi açısından derecelendirildi. Embriyonik kök hücre grubunda FGF-2 immunoreaktivitesi negatif saptandı (Resim-40).

	x20	x40
EKH Grubunda FGF-2 Aktivitesi		

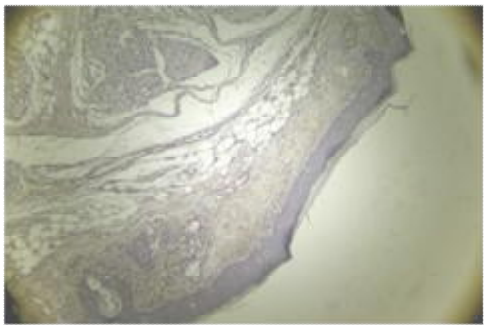
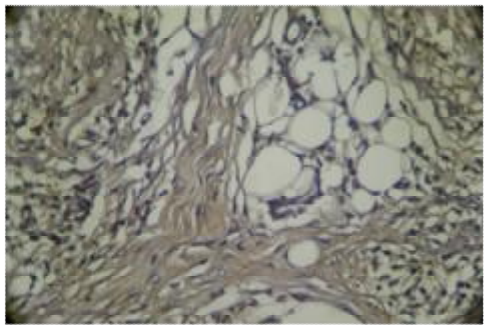
Resim-40: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi

İndirekt immunperoksidaz yöntemi kullanılarak değerlendirilen embriyonik kök hücre vasat grubuna ait kuyruk kesitleri FGF-2 immunoreaktivitesi açısından derecelendirildi. Embriyonik kök hücre vasat grubunda FGF-2 immunoreaktivitesi yer yer pozitif saptandı (Resim-41).

	x20	x40
EKHV Grubunda FGF-2 Aktivitesi		

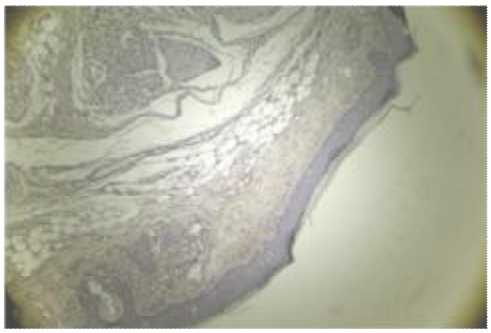
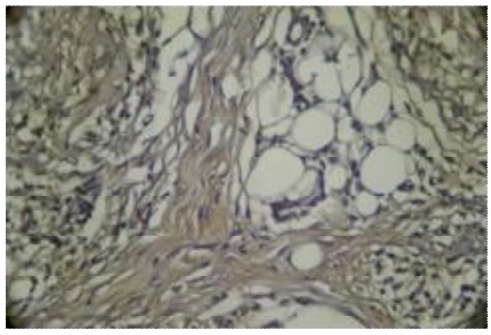
Resim-41: Embriyonik kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi

Mezenkimal kök hücre grubuna ait kuyruk kesitleri indirekt immunperoksidaz yöntemi kullanılarak FGF-2 immunoreaktivitesi açısından derecelendirildi. Mezenkimal kök hücre grubunda FGF-2 immunoreaktivitesi zayıf şiddette pozitif saptandı (Resim-42).

	x20	x40
MKH *Grubunda FGF-2 Aktivitesi*		

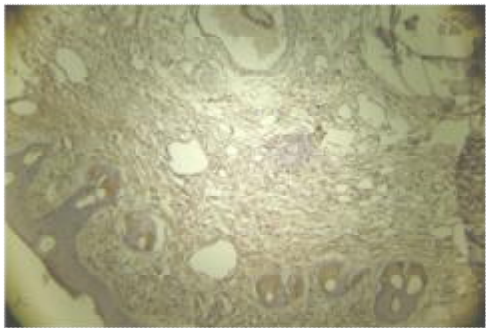
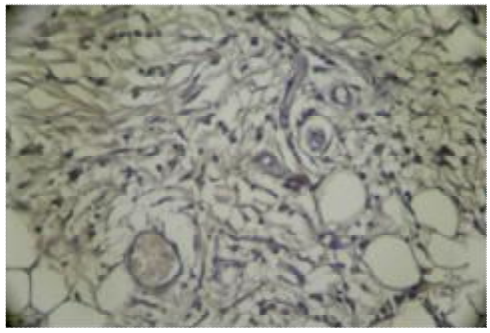
Resim-42: Mezenkimal kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi

Mezenkimal kök hücre vasat grubuna ait kuyruk kesitleri indirekt immunperoksidaz yöntemi kullanılarak FGF-2 immunoreaktivitesi açısından derecelendirildi. Mezenkimal kök hücre vasat grubunda FGF-2 immunoreaktivitesi, embriyonik kök hücre grubuna benzer şekilde negatif bulundu (Resim-43).

	x20	x40
MKHV *Grubunda FGF-2 Aktivitesi*		

Resim-43: Mezenkimal kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi

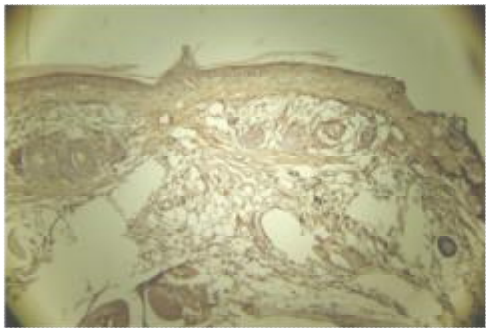
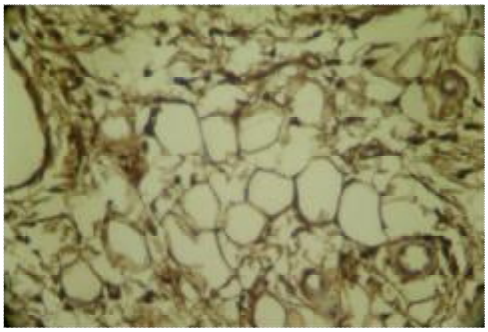
Serum fizyolojik kontrol grubuna ait kuyruk kesitleri indirekt immunperoksidaz yöntemi kullanılarak FGF-2 immunoreaktivitesi açısından derecelendirildi. Serum fizyolojik kontrol grubunda FGF-2 immunoreaktivitesi negatif bulundu (Resim-44).

	x20	x40
SF Grubunda FGF-2 Aktivitesi		

Resim-44: Serum fizyolojik kontrol grubu kuyruk kesitlerinde FGF-2 immunoreaktivitesi

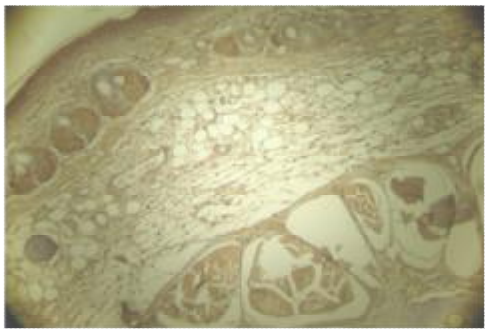
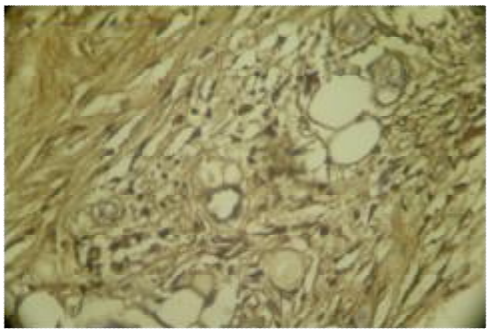
6.2.2.3. Lyve-1 Dağılımı

Embriyonik kök hücre grubunun immunohistokimyasal analizi sonrasında Lyve-1 immunoreaktivitesi değerlendirildi. Embriyonik kök hücre grubunda Lyve-1 immunoreaktivitesi kuvvetli pozitif saptandı (Resim-45).

	x20	x40
EKH *Grubunda* Lyve-1 *Aktivitesi*		

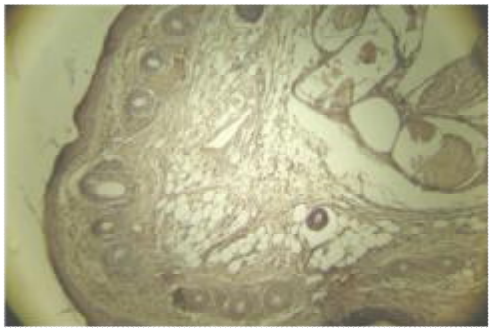
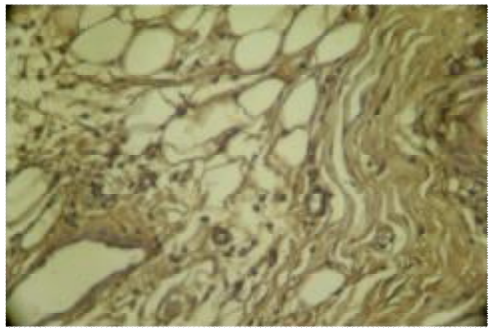
Resim-45: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi

Embriyonik kök hücre vasat grubunun immunohistokimyasal analizi sonrasında Lyve-1 immunoreaktivitesi değerlendirildi. Embriyonik kök hücre vasat grubunda Lyve-1 immunoreaktivitesi orta şiddette pozitif saptandı (Resim-46).

	x20	x40
EKHV *Grubunda* Lyve-1 *Aktivitesi*		

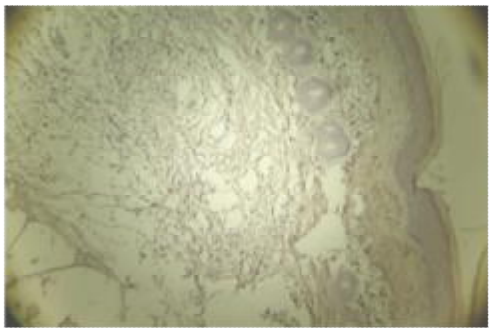
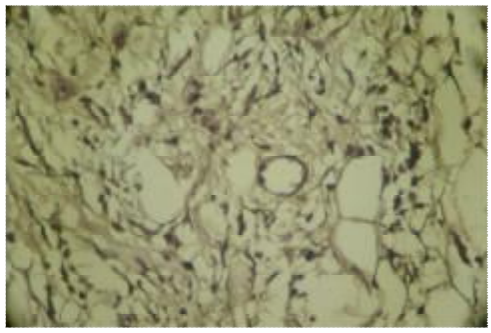
Resim-46: Embriyonik kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi

Mezenkimal kök hücre grubuna ait farelerin kuyruk kesitlerinin immunohistokimyasal analizi yapıldı ve Lyve-1 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Mezenkimal kök hücre grubunda Lyve-1 immunoreaktivitesi kuvvetli pozitif saptandı (Resim-47).

	x20	x40
MKH *Grubunda* Lyve-1 *Aktivitesi*		

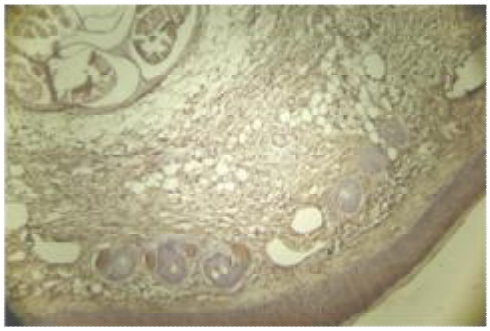
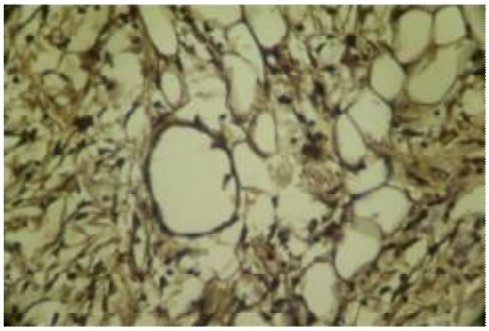
Resim-47: Mezenkimal kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi

Mezenkimal kök hücre vasat grubuna ait farelerin kuyruk kesitlerinin immunohistokimyasal analizi yapıldı ve Lyve-1 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Mezenkimal kök hücre vasat grubunda Lyve-1 immunoreaktivitesi çok zayıf şiddette pozitif saptandı (Resim-48).

	x20	x40
MKHV *Grubunda* Lyve-1 *Aktivitesi*		

Resim-48: Mezenkimal kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi

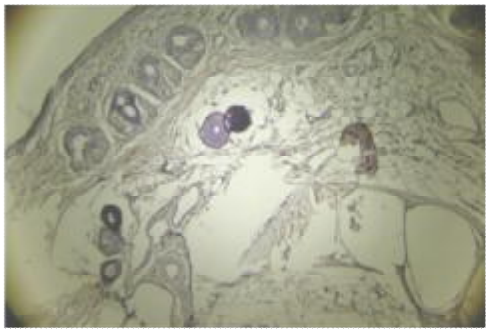
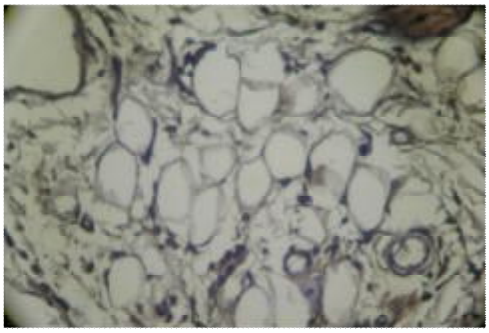
Serum fizyolojik kontrol grubunun immunohistokimyasal analizi sonrasında Lyve-1 immunoreaktivitesi değerlendirildi. Serum fizyolojik kontrol grubunda Lyve-1 immunoreaktivitesi zayıf şiddette pozitif saptandı (Resim-49).

	x20	x40
SF *Grubunda* Lyve-1 *Aktivitesi*		

Resim-49: Serum fizyolojik kontrol grubu kuyruk kesitlerinde Lyve-1 immunoreaktivitesi

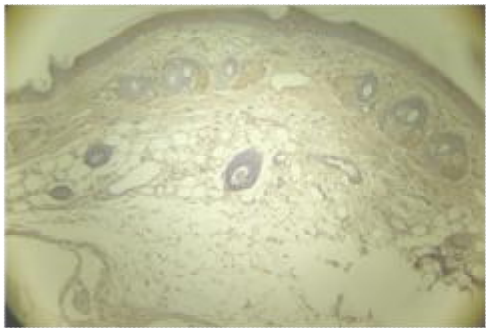
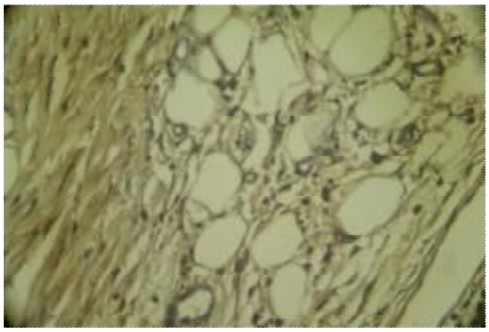
6.2.2.4. Prox-1 Dağılımı

Embriyonik kök hücre grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak Prox-1 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Embriyonik kök hücre grubunda zayıf şiddette Prox-1 immunoreaktivitesi saptandı (Resim-50).

	x20	x40
EKH *Grubunda* Prox-1 *Aktivitesi*		

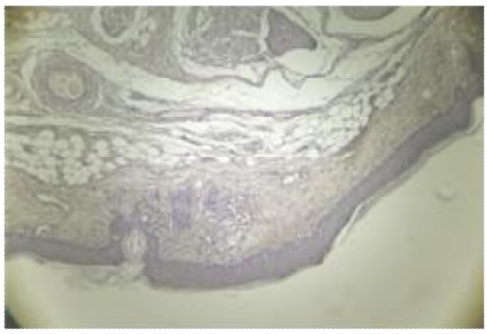
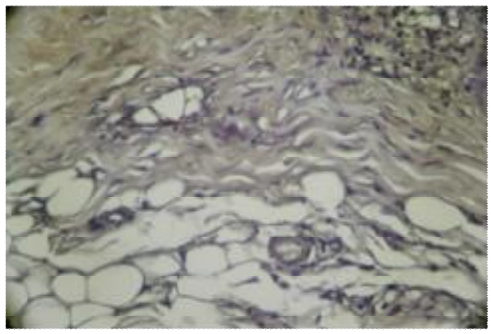
Resim-50: Embriyonik kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde Prox-1 immunoreaktivitesi

Embriyonik kök hücre vasat grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak Prox-1 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Embriyonik kök hücre vasat grubunda yer yer pozitif Prox-1 immunoreaktivitesi saptandı (Resim-51).

	x20	x40
EKHV *Grubunda* Prox-1 *Aktivitesi*		

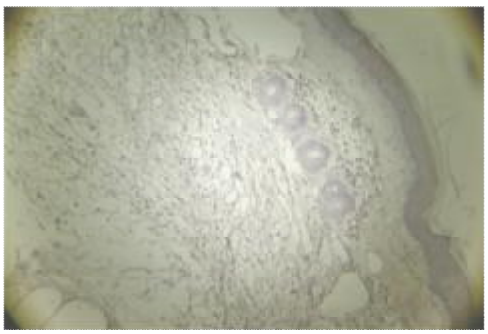
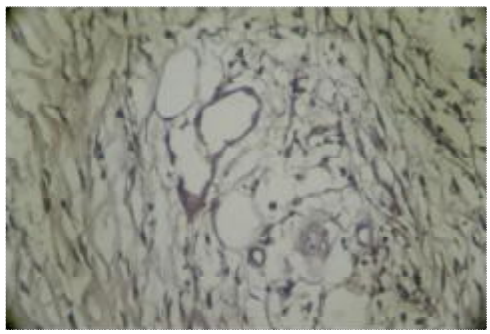
Resim-51: Embriyonik kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde Prox-1 immunoreaktivitesi

Mezenkimal kök hücre grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak Prox-1 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Mezenkimal kök hücre grubunda, embriyonik kök hücre grubuna benzer şekilde zayıf şiddette Prox-1 immunoreaktivitesi saptandı (Resim-52).

	x20	x40
MKH *Grubunda* Prox-1 *Aktivitesi*		

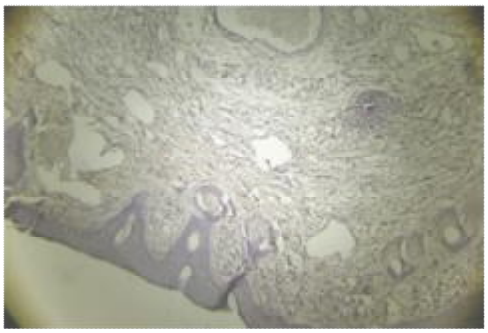
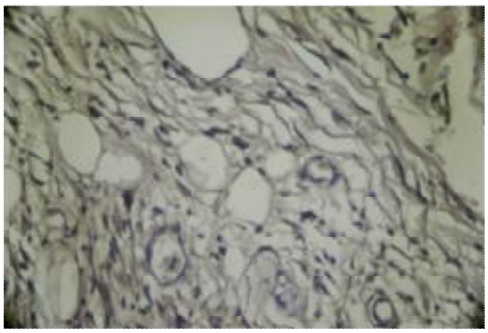
Resim-52: Mezenkimal kök hücre grubu kuyruk kesitlerinde Prox-1 immunoreaktivitesi

Mezenkimal kök hücre vasat grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak Prox-1 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Mezenkimal kök hücre vasat grubunda Prox-1 immunoreaktivitesi negatif saptandı (Resim-53).

	x20	x40
MKHV *Grubunda* Prox-1 *Aktivitesi*		

Resim-53: Mezenkimal kök hücre vasat grubu kuyruk kesitlerinde Prox-1 immunoreaktivitesi

Serum fizyolojik kontrol grubundaki farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunoperoksidaz yöntemi kullanılarak Prox-1 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Serum fizyolojik kontrol grubunda, mezenkimal kök hücre vasat grubuna benzer şekilde Prox-1 immunoreaktivitesi negatif saptandı (Resim-54).

	x20	x40
SF *Grubunda* Prox-1 *Aktivitesi*		

Resim-54: Serum fizyolojik kontrol grubu kuyruk kesitlerinde Prox-1 immunoreaktivitesi

6.2.2.5. İmmunohistokimyasal Sonuçların Genel Değerlendirilmesi

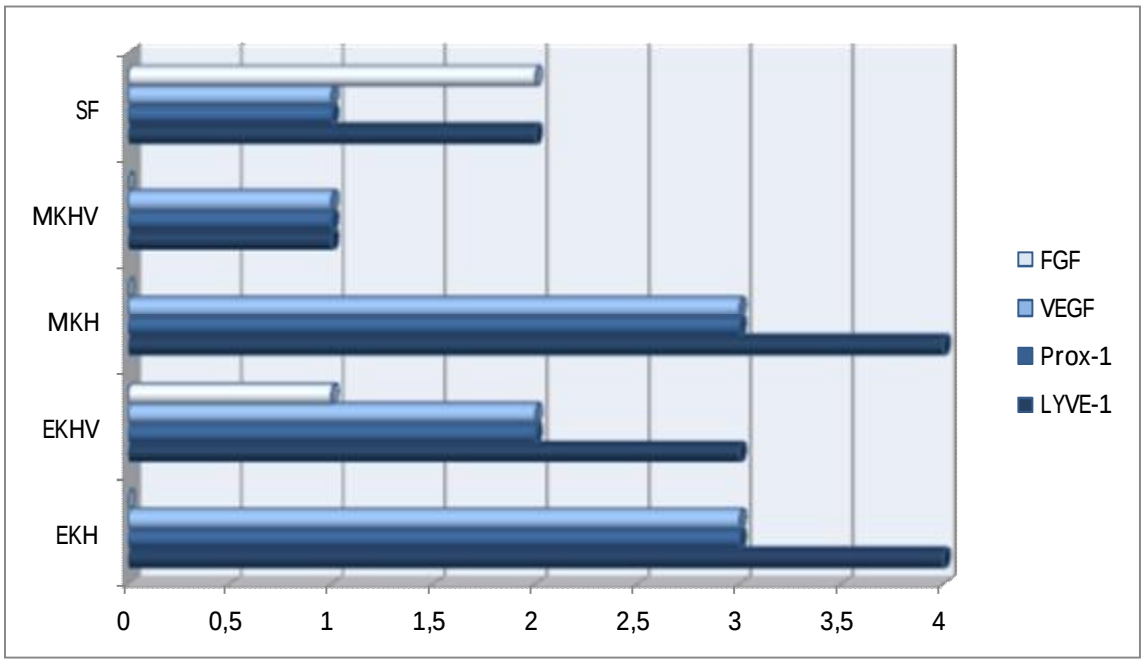
Deney gruplarının immunohistokimyasal analizi sonrasında Lyve-1 immunoreaktivitesinin sadece serum fizyolojik verilen grupta zayıf şiddette, mezenkimal kök hücre vasatı verilen grupta çok zayıf şiddette, mezenkimal ve embriyonik kök hücrelerinin verildiği gruplarda ise kuvvetli pozitif iken, embriyonik kök hücre vasatı verilen grupta orta şiddete olduğu görüldü. Prox-1 immunoreaktivitesi ise, SF ve MKHV verilen gruplarda negatif iken, MKH veya EKH verilen gruplarda zayıf şiddette olduğu, EKHV verilen gruplarda yer yer pozitif olduğu gözlendi.

VEGF immunoreaktivitesi SF grubunda ve MKHV verilen grupta yer yer pozitif iken, EKHV verilen grupta zayıf şiddette, MKH veya EKH hücre verilen grupta ise orta şiddette olduğu izlendi.

FGF-2 immunoreaktivitesi SF, MKHV ve EKH gruplarında negatif iken, EKHV grubunda yer yer pozitif, MKH grubunda ise zayıf şiddette olduğu görüldü (Tablo-25 ve Grafik-13).

Histolojik Parametreler	EKH	EKHV	MKH	MKHV	SF
Lyve-1	+++	++	+++	-/+	+
Prox-1	+	+/-	+	-	-
VEGF	++	+	++	+/-	-/+
FGF2	-	+/-	+	-	-

Tablo-25: Grupların belirteçlere göre histolojik boyanma paternlerinin derecelendirilmesi



Grafik-13: Grupların İHK belirteçlerine göre histolojik boyanma paternlerinin derecelendirilmesi

Anjiyogenez ve lenfanjiyogenez belirteçlerinin histolojik boyanma paternlerine göre yapılan derecelendirilmesi grup içi her dokuz farede de aynı özellikte homojen bulunduğundan gruplar arası karşılaştırma istatistikleri yapılamadı.

Embriyonik ve mezenkimal kök hücre transferi sonrasında Lyve-1 immunoreaktivitesinin artmış olması deneysel modelde lenfanjiyogenezin tetiklendiğini göstermektedir. Bununla beraber Prox-1 immunoreaktivitesi gruplar arasındaki karşılaştırıldığında embriyonik ve

mezenkimal kök hücre verilen gruplarda bir miktar artış olduğunun gözlenmesi hücre verilen gruplarda Prox-1 salınımın tetiklendiğini gösterdi. Fakat embriyonik ve mezenkimal kök hücre gruplarında Lyve-1 salınımının Prox-1'a oranla daha fazla olduğu izlendi. VEGF immunoreaktivitesinin özellikle MKH veya EKH verilen grupta diğer gruplara oranla daha fazla olması, hücre transferi sonrasında lenfanjiyogenezin tetiklendiğini gösterdi. FGF-2 immunoreaktivitesinin gruplar arasında çok fazla farklılık göstermediği saptandı.

Sonuç olarak embriyonik ve mezenkimal kök hücre tedavisi sonrasında esas olarak lenfanjiyogenezin tetiklendiği, anjiyogenezin de az olsa tetiklendiği görüldü. Bununla beraber farklı kök hücre kaynaklarından elde edilmiş olan embriyonik ve mezenkimal kök hücre grupları arasında farklılık gözlenmedi.

7. TARTIŞMA

Lenfödem, lenfatik sistemdeki anatomik veya işlevsel tıkanıklık sonucu, proteinden zengin sıvının interstisyel boşlukta birikmesi sonucu oluşur. Primer lenfödem, lenfatik sistemin embriyolojik gelişim bozukluğu (aplazi, hipoplazi, hiperplazi); sekonder lenfödem, lenf akımının sonradan oluşan bir nedenle azalması sonucu gelişir .

Sekonder lenfödemin birçok nedeni vardır, ancak başlıca nedenler arasında malignite ve maligniteye yönelik tedaviler yer almaktadır. Meme kanseri, jinekolojik kanserler, kolon ve mesane ile ilgili maligniteler ve pelvik sarkomlarda evre IV hastalarda bile, yaşam sürelerinin artması sonucu, daha fazla lenfödem olgusuna rastlanmaktadır.[194] Bu maligniteler arasında klinikte lenfödem prezentasyonuyla en çok karşılaşılan durum meme kanseridir, yapılan çalışmalar en çok bu konuda olduğundan sekonder lenfödem prototipi olarak meme kanseri ele alınmıştır.

Golshan ve Smith, meme kanseri tedavisine bağlı gelişen lenfödem görülme oranının ortalama %10-35 olduğunu belirtmektedir.[195] Schunemann ve Willich, 5868 hastayı 11 yıl takip ettikleri çalışmalarında, lenfödem görülme oranını %24 olarak saptamışlardır.[196] Gürsoy, lenfödem görülme oranının meme kanseri tedavisinden bir yıl sonra %13-50, 10 yıl sonra %28 ve 20 yıl sonra %49 olarak değişiklik gösterdiğini belirtmektedir.[197]

Cerrahi tedavi temelde ablatif prosedürler ve fizyolojik prosedürler olarak ikiye ayrılmaktadır. Ablatif tedaviler arasında yer alan debulking cerrahide lenfödem dokusu rezeke edilmektedir.[198] Liposuction debulking prosedür olarak hala uygulanmaktadır ve lenfödem tedavisinde Brorson ve Svensson iyi sonuçlar rapor etmiştir.[199]

Fizyolojik operasyonlarla lenfatik drenajı geliştirmek için yeni kanallar oluşturulur. Bu amaçla yapılan cerrahi prosedürler arasında lenfatiko-lenfatik bypass; Baumeister tekniği ile lenfatik rekonstrüksiyon; mikrovasküler lenf nodu transferi; lenfovenöz bypass ve lenfovenöz şant operasyonları yer almaktadır.

Lenfödem tedavisinde uygulanan cerrahi girişimler tedavideki ilk seçenekler arasında yer almaz. Bununla birlikte, tıbbi tedavi ile genellikle palyatif sonuçlar elde edilir ve tıbbi tedavi kesildiğinde lenfödem tablosu yeniden ortaya çıkabilir. Artan fibröz ve yağ doku gibi sekonder doku değişiklikleri yapılacak cerrahi girişimleri zorlaştıracağından konservatif tedavi sonrası erken dönemde cerrahi önerilmektedir.

Sonuç olarak çeşitli cerrahi prosedürler lenfödem tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak ne zaman ve nasıl cerrahi uygulanacağı hala tartışma konusudur. Çeşitli çalışmalar lenfödem tedavisi hakkında bilgi vermiştir; bununla birlikte araştırma verilerinin çoğu klinik geribildirimlerle elde edilmiştir. Lenfatik sistemin frajilitesi lenfödemle ilgili çalışmaları sınırlandırırken günümüzde, histolojik olarak lenfatik sistemi incelemek için çeşitli immunohistokimyasal belirteçler kullanılabilir duruma gelmiştir.[200,201] Lenfödemi araştırmak için çeşitli deneysel hayvan modelleri geliştirilmiştir.[202,203,204] Eğer bu kanıta dayalı deneysel hayvan modelleri kullanılabilirse lenfödem için kesin tedaviler geliştirmeye yardımcı olabilir. Bu noktada kök hücre tedavileri tıbbın birçok alanında olduğu gibi lenfödem tedavisinde de umut ışığı olmuştur.

İnsan embriyonik kök hücreleri, insan dokularının hücre kaynaklarını erken farklılaşmanın biyolojik-moleküler temellerini ve hastalıkların tedavilerinde yol gösterebilecek bilgileri bizlere sağlaması beklenmektedir. 2001 yılından bugüne insan EKH'lerinin nöral, kardiyak, endotelyal, hematopoietik, pankreatik, hepatik, kemik ve trofoblast hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir. Bu temel araştırmalar, miyokard infarktusu, Parkinson hastalığı diabetes mellitus ve osteoartrit gibi hastalıkların gelecekteki tedavilerine temel teşkil edebilecek bilgileri sağlamaktadır.

Mezenkimal kök hücreler kolay elde edilebilir olmaları, güçlü çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri ile rejeneratif tıbbın önemli elemanı haline gelmişlerdir. Bu özellikleri ile hücresel biyoloji ve gen tedavilerinin temel elemanlarından biri olan MKH'ler bu gün birçok klinik çalışmada denenmektedir. MKH dokulara bir kez yerleştikten sonrada uzun süreli ve sabit bir engraftman göstermektedir.[205] Bu noktada MKH'lerin hasarlı dokulara lokal enjeksiyonu dışında sistemik enjeksiyon sonrası da hasarlı dokulara göç edebildikleri bilinmektedir.[206]

Kalp hastalıklarında değişik hücresel tedavi ürünleri enfarktüs sonrası 30 dan fazla çalışmada uygulanmış ve etkili ve güvenli oldukları rapor edilmiştir. MKH uygulanan iki klinik çalışma vardır. Bu çalışmalardan birinde 8-10 $x10^9$ diğerinde 1-2 $x10^6$ hücre intra koroner olarak verilmiştir. Her iki çalışmada da kontrol grubuna göre önemli düzelmeler gözlenmiştir.[207] Kardiak hastalıklardakine benzer bulguların vasküler hastalıklarda rapor edilmiş ve uygulamaların emniyetli, etkili olduğu rapor edilmiştir.

Osteogenez imperfekta kollagen tip sentezinde bozukluğa yol açan 100'den fazla genetik defektin bilindiği bir hastalıktır. Allojenik kök hücre naklinin bu hastalarda faydalı olduğu uzun süredir bilinmektedir. Ancak doku uyumu olmayan bir erkekten elde edilen MKH'lerin in utero

uygulandığı bebekteki olumlu veriler bu alanda MKH'nin önünü açabilecek gibi durmaktadır. Genetik olarak manipüle edilmiş otolog MKH uygulamalarında da olumlu sonuçlar edinilmiştir.

Nörolojik hastalıklarda yapılan ilk çalışma Mazzini ve ark.'nın 2003'te yayınladığı ALS çalışmasıdır. Bu çalışmada 7 hastaya intratekal olarak MKH'ler T7-9 seviyesinden enjekte etmişlerdir. Bu hastalarda 6 ay sonra yapılan değerlendirmede işleme bağlı bir olumsuzluk rapor edilmezken proksimal kas tonusunda azalma ilerleyen yıllarda hastalığın progresyonunda durma rapor etmişlerdir.[208] Bu ilk rapor bu alanda MKH önemli yeni yaklaşımlara işaret etmektedir. Nörolojik bilimlerde yapılan bir başka çalışmada Hurler (Otozomal lizozomal depo hastalığı-Mukopolisakkoridoz) ve Metakromatik lökodistrofi (Otozomal lökodistrofi) de 2-6 $x10^6$ allogeneik MKH'ler intravenöz olarak infüze edilmiş ve olumlu değişiklikler rapor edilmiştir.[209]Spinal kord hasarlarında MKH ile yapılmış bir çalışma yoktur ancak Park ve ark'nın[210] yaptığı bir çalışmada kemik iliği kök hücreleri lezyon alanına enjekte edilmiş ve iv GM-CSF kullanılmış ve olumlu nörolojik değişiklikler rapor edilmiştir.

MKH'lerin klinikte kullanıldığı bir başka uygulama alanı da kronik iyileşmeyen yara ve diyabetik ülserlerde yapılan çalışmalardır. Bu ilk çalışmalarda sonuçlarının yüz güldürücü olduğu vurgulanmaktadır.[211] Bu gün Türkiye'den yapılmış klinik MKH uygulaması ile ilgili tek yayın Çaylan R ve ark[212] tarafından yayınlanan olgu sunumudur. Bu sunumda yapılan destek tedavisi ve sinir greft uygulamasından 2 ay sonra klinik düzelme göstermeyen, iyatrojenik fasiyal paralizi bir hastada bir hastada otolog MKH uygulaması sonucu paralizinin House-Brackmann grade VI den grade III'e düzeldiğini rapor etmişlerdir.

Günümüzde beklenen yaşam süresinin uzaması ve malignite hastalarında tedavi seçeneklerinin artmasıyla bu hastalıklara bağlı komplikasyonlar daha sık gözlenir hale gelmiştir. Tıbbın geldiği son noktada artık hedef sadece hastaları hayatta tutmak değil hayatı en konforlu şekilde yaşamalarını sağlamaktır. Bu bağlamda yüksek bir prevalansta görülen ve ciddi morbiditeye neden olan lenfödem tedavisinde yeni modalitelere ihtiyaç duyulmaktadır. Kök hücre ve moleküler bazlı tedavilerde son yıllarda çok sayıda olumlu sonuç elde edilmesi lenfödem konusunda da bu alanda daha çok çalışma yapılmasını teşvik etmiştir. Moleküler ve hücresel tedavi kapsamında lenfanjiyogenez lenfödem için umut verici tedavi yöntemi olarak gündeme gelmiştir.

Lenfanjiyogenezin gelişim mekanizmaları hakkında iki teori ortaya atılmıştır. Birinci teori lenfatik endotelin lenfanjiyoblastlardan, kan damarı endotelinin ise anjiyoblastlardan de novo olarak şekillenmesi, ikinci teori önceden var olan kan kapillerlerinden anjiyogenezin, venlerden

de lenfanjiyogenezin filizlenmesidir. [213]Embriyogenez sırasında lenfatik damarların gelişimi, kan damarlarından başlamakta ve bunu yöneten birçok sinyal bulunmaktadır.

Lenfatik endotel hücreleri üzerinde lenfanjiyotik büyüme faktörleri olan vasküler endotelyal growth faktör-C (VEGF-C) ve vasküler endotelyal growth faktör reseptör-3 (VEGFR-3)'ün keşfiyle birlikte lenfanjiyogenezin moleküler mekanizmaları anlaşılmaya başlanmıştır.[214,215] VEGF ailesi dışında hepatosit büyüme faktörü (HGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF-2), adrenomedullin ve anjiyopoetin-1 ve -2'nin lenfanjiyogenez üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. [216,217]

Szuba ve ark.'nın çalışmasında,[218] rekombinant VEGF-C enjeksiyonunun hayvan modellerinde lenfanjiyogenezi uyarıldığı gösterilmiştir. Ancak VEGF-C tedavisinin etkisinin kısa süreli olması ve tekrarlayan tedavilere ihtiyaç duyulması kısıtlayıcı özellikleridir. VEGFR-3 reseptörüne bağlanan VEGF ilk tanımlanan ve en güçlü olan lenfanjiyogenetik faktörlerden biridir.[219] VEGF-C geninin fazla ekspresyonu ise lenfatik damar yoğunluğunu artırır ve lenfatik hiperplaziye neden olur, malignite durumunda ise bu anormal formasyon peritümöral lenfatik artışına ve metastazlara neden olur. Bu durum Skobe ve ark.'nın meme kanserli hastalarda yaptığı çalışmada gözlenmektedir.[220]

Tüm bu bilgiler ve bulgular ışığında çalışmamızda lenfödeme tedavi edici bir yaklaşım sunabilmek amacıyla kök hücre destekli tedaviyle lenfanjiyogenezin oluşturulması hedeflendi. Çalışmamızda beş farklı grup oluşturuldu, literatürde mezenkimal ve embriyonik kök hücreyle yapılan çalışma bulunmaması nedeniyle temel tedavi modalitesi diferansiye edilmiş embriyonik ve mezenkimal kök hücreler olarak belirlendi. Tomoya ve ark.'nın[221] 2006'da yaptığı çalışmaya benzer şekilde embriyonik kök hücreler kültüre edildi, ardından uygun vasatlarla inkübe edilerek lenfatik endotelyal hücrelere farklılaşması sağlandı. Böylelikle çalışma gruplarımızdaki farelerin kuyruklarına diferansiye edilmiş embriyonik kök hücre, diferansiye edilmiş mezenkimal kök hücre, embriyonik kök hücre vasatı, mezenkimal kök hücre vasatı veya serum fizyolojik postoperatif beşinci günde enjekte edildi.

Çalışmanın dizaynı sırasında kontrol grubu ve kök hücre grupları dışında iki adet de vasat grubu yer aldı. Çünkü embriyonik ve mezenkimal kök hücrelerin lenfatik diferansiyasyonunu sağlamak için kullanılan vasatlar içerisinde vasküler endotelyal büyüme faktörü-A(VEGF-A) yer aldı. Lenfanjiogenezis patofizyolojisi açıklanırken belirttiğimiz gibi VEGF-A lenfatiklerin gelişiminde sitokin olarak rol alır ve daha önce yapılan çalışmalarda tek başına lenfödem tedavisinde kullanılmıştır. Bu nedenle kök hücre gruplarının tedavi sonucu değerlendirilirken

etkinliğin kök hücreye mi yoksa hücrenin diferansiye edildiği vasatta bulunan VEGF-A'ya mı bağlı olduğunu anlamak için kök hücre gruplarına ilave olarak hem embriyonik kök hücre vasat grubu hem de mezenkimal kök hücre vasat grubu oluşturuldu.

Çalışmada cerrahi olarak oluşturulan fare kuyruğundaki lenfödem modeli Slavin ve ark[222] ile Jin ve ark'dan[223] farklı olarak gerçekleştirildi. Modelin standardizasyonu için kuyruk kökü 1 cm distalden işaretlendi. İşaret çizgisi başlangıç kabul edilerek 2 mm genişliğinde sirküler alan belirlendi. Kuyruğun ventral yüzündeki belirlenen alan içerisinde 4 mm^2 dermal flep alanı oluşturuldu. Ventral yüzdeki 4 mm^2 dermal flep intakt kalacak şekilde cilt dokusu koterize edilerek sirkümferansiyel eksize edildi.

Shimizu ve ark.'nın[224] 2012 yılında yayınlanan çalışmasında lenfödem modeli oluşturulduktan sonra kuyruk çap ölçümleri ile fareler takibe alınmış, cerrahi sonrası birinci gün fare kuyruklarına sırasıyla adipoz kökenli kök hücre ve VEGF-C enjekte edilmiş , kontrol grubu kapsamındaki üçüncü gruba da serum fizyolojik verilmişti. Çalışmamızda da benzer şekilde cerrahi model oluşturulmasının ardından kuyruk çap ölçümleri dijital mikrometre kullanılarak günlük olarak yapıldı. Ancak terapötik amaçlı yapılan enjeksiyonlar postoperatif beşinci gün yapıldı. Enjeksiyon için ideal günü belirlemek amacıyla ön çalışma aşamasında cerrahi model oluşturulduktan bir, üç ve beş gün sonra fareler sakrifiye edilerek kuyruk kesitleri alındı. Kesitlerin Hematoksilen-Eozin ile boyanarak yapılan mikroskobik bakısında sekonder lenfödem modelinin bir ve üçüncü gününde yoğun polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu gözlendi. Mevcut polimorf nüveli lökositlerin verilecek olan kök hücreleri fagosite etme olasılığı göz önünde bulundurularak enjeksiyon 5. günde yapıldı.

Denekler cerrahinin 15. gününde sakrifiye edildi ve kuyruk kök kısmından bistüri ile kesilerek ampute edildi. Grup içi sınıflamaya göre isimlendirilen kaplar içine formol konulan kuyruk fikse edildi, histolojik değerlendirme HE ve immunohistokimyasal yöntemlerle yapıldı. Sakrifikasyon günü de dahil olmak üzere tüm gruplardaki farelerin günlük kuyruk çap ölçüm takipleri yapıldı.

Çalışmaya dahil edilen beş deney grubunda da cerrahi model sonrası ölçülen kuyruk çaplarında artış oldu. Klinik olarak lenfödem için uygulanan tedavinin başarı kriterlerinden biri de tedavi sonrası makroskobik olarak lenfödemin gerilemesi ve ödemli alanın çapında küçülme gözlenmesi olduğundan histolojik kriterlere ek olarak çap ölçümleri de analiz edildi.

Çalışmamızda immunofluoresans bakı olanağı bulunmadığından histolojik değerlendirme HE boyama ve immunohistokimyasal boyama yapılarak gerçekleştirildi. İmmunohistokimyasal

bakıda FGF-2, VEGF, Lyve-1 ve Prox-1 belirteç olarak kullanıldı. Bu immunohistokimyasal belirteçlerin seçimi sırasında ve sonuçların karşılaştırılması sırasında baz aldığımız çalışmalara örnek vermek gerekirse Shimizu ve ark.'nın çalışmasında fare kuyruğunun histolojik kesitlerinin analizi immunohistokimyasal olarak Lyve-1 ve podoplanin ile değerlendirilmiş, VEGF-C miktarı da ölçülmüştür. Eşzamanlı kuyruk kesitleri immunofluoresans yöntemle Lyve-1 ve PECAM–1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) ekspresyonu da incelenmiştir.

Masako ve ark.'nın[225] çalışmasında ise immunohistokimyasal ve immunblot yöntemleriyle değerlendirildiğinde Prox-1'in lenfanjiyogenezde artış gösterdiği ve lenfatik endotelyal hücre yüzeylerinde ekspresyonunun fazlalaştığı gösterilmiş, bu etkinin TGF-Beta ile azaldığı belirtilmiştir. Yine Saharinen ve ark.'nın[226] çalışmasında Prox-1 ekspresyonunun lenfatik vasküler gelişimin patogenezindeki rolü gösterilmiştir.

Shimizu ve ark.'nın lenfödem modelinde adipoz kökenli kök hücre tedavisini değerlendirdiği çalışmada lenfanjiyogenez gelişen gruplarda hem immunohistokimyasal hem de immunofluoresans bakılarda artmış Lyve-1 ekspresyonu gösterilmiştir. Yine Bohmer ve ark.[227] lenfanjiyogenez gelişimini araştırdıkları çalışmada flow sitometri ve immunohistokimyasal yöntemlerle Lyve-1 ve PECAM-1 ekspresyonları lenfatik yapılarda gösterilmiştir.

Çalışmamızdaki makroskopik ve histolojik sonuçları birlikte her bir grup için tek tek değerlendirmek gerekirse;

Embriyonik kök hücre grubunda yer alan farelerin lenfödem oluşmadan önceki başlangıç kuyruk çapları ve tedavi sonrası kuyruk çapları kullanılarak istatistiksel olarak (Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi) çap değişim oranları hesaplandı. Tüm gruplar arasında en düşük çap değişim oranı embriyonik kök hücre grubunda (%16,84) saptandı. Bu sonuç doğrultusunda makroskobik değerler göz önüne alındığında en iyi iyileşmenin embriyonik kök hücre grubunda olduğu gözlendi. Çünkü çap değişim oranının küçülmesi; lenfödem tedavisi sonucu elde edilen kuyruk çapının cerrahi öncesi kuyruk çapına yaklaştığını gösterdi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında embriyonik kök hücre enjeksiyonun lenfanjiyogenezi tetiklediği ve lenfödemin gerilemesinde etkinliğinin olduğu istatistiksel olarak gösterildi(p<0,001).

Lenfödem modelinin oluşturulmasından sakrifikasyona kadar geçen süre içinde en yüksek çap ölçümü cerrahinin beşinci gününde gözlendi. En yüksek çap olan 5. gün çapı ile 15. gün kuyruk çapı (sakrifikasyon öncesi) arasındaki fark hesaplanarak düşme miktarı olarak isimlendirildi. Lenfödemin gerilediği, verilen tedavi sonrası iyileşmenin gözlendiği gruplarda kuyruk çapındaki düşme miktarının daha fazla olması beklendi. Gruplara göre yapılan

değerlendirmede kuyruk çapındaki düşme miktarı en fazla embriyonik ve mezenkimal kök hücre enjeksiyonu yapılan farelerde gözlendi. Bu analiz kök hücre tedavisi alan gruplarda lenfödemin daha hızlı gerilediği, terapötik etkinliğin en fazla kök hücre gruplarında olduğunu gösterdi.

Histolojik olarak embriyonik kök hücre grubu değerlendirildiğinde H-E boyamada polimorfonükleer lökositlerin azaldığı, epidermis ve dermisin normal yapısını koruduğu ve ödeme ait bulguların olmadığı gözlendi. Bu bulgu lenfödem tedavisinde embriyonik kök hücre enjeksiyonunun ödemin gerilemesinde etkili olduğunu göstermiş oldu.

İmmunohistokimyasal analiz sonrasında embriyonik kök hücrelerinin verildiği grupta Lyve-1 immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif, VEGF immunoreaktivitesi orta şiddette pozitif, Prox-1 immunoreaktivitesi zayıf şiddette ve FGF-2 immunoreaktivitesinin negatif olduğu izlendi. Sonuç olarak embriyonik kök hücre tedavisi sonrasında esas olarak lenfanjiyogenezin tetiklendiği, anjiyogenezin de az olsa tetiklendiği görüldü.

Mezenkimal kök hücre grubunda yer alan farelerin Bonferonni düzeltmeli Kruskal-Wallis Test yöntemi kullanılarak yapılan çaptaki değişim analizinde %21,77 oranında değişim saptandı. Embriyonik kök hücre grubuna göre daha yüksek bir oran olmakla birlikte kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha iyi tedavi yanıtı gözlendiği görüldü.

Kuyruk çapındaki düşme miktarı açısından değerlendirildiğinde embriyonik kök hücre grubuyla birlikte düşme miktarı en fazla mezenkimal kök hücre gruplarında gözlendi. Tedavi yanıtı konusunda çalışmanın temelini oluşturan embriyonik kök hücre ve mezenkimal kök hücre grupları makroskobik veriler doğrultusunda karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel açısından anlamlı fark gözlenmedi(p 0,145).

Histolojik olarak mezenkimal kök hücre grubu değerlendirildiğinde H-E boyamada polimorfonükleer lökositlerin azaldığı, epidermis ve dermisin normal yapısını koruduğu ve ödeme ait bulguların olmadığı gözlendi. Bu bulgu embriyonik kök hücre grubuna benzer şekilde lenfödem tedavisinde mezenkimal kök hücre enjeksiyonunun da ödemin gerilemesinde etkili olduğunu göstermiş oldu.

İmmunohistokimyasal analiz sonrasında embriyonik kök hücrelerinin verildiği grupta Lyve-1 immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif , VEGF immunoreaktivitesi orta şiddette pozitif, Prox-1 immunoreaktivitesi zayıf şiddette ve FGF-2 immunoreaktivitesinin ise zayıf şiddette olduğu izlendi. Sonuç olarak embriyonik ve mezenkimal kök hücre tedavisi sonrasında

lenfanjiyogenezin artış gösterdiği gözlendi. Bununla beraber farklı kök hücre kaynaklarından elde edilmiş olan embriyonik ve mezenkimal kök hücre grupları arasında farklılık gözlenmedi.

Serum fizyolojik kontrol grubu değerlendirildiğinde; çaptaki değişim analizinde başlangıç çapına göre en fazla çap artışı serum fizyolojik kontrol grubunda (%30,18) saptandı. Bu bulgu lenfödem tedavisi açısından en başarısız grubun serum fizyolojik kontrol grubu olduğunu göstermiş oldu. Bu doğrultuda lenfödem geliştikten sonra kuyruğa serum fizyolojik enjekte edilen grupta iyileşme gözlenmediği; lenfödem tedavisinde en iyi yanıtın kuyruğa embriyonik kök hücre enjeksiyonu yapılan grup olduğu tespit edildi. Grup içi çap değişim oranları genel parametrelere oranla istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulundu(p 0,03).

Histolojik açıdan serum fizyolojik kontrol grubunun HE boyama kesitleri ödemin devamlılığı açısından değerlendirildi. Histolojik bakıda papiller dermis ve dermiste polimorfonükleer hücre infiltrasyonu olduğu, yer yer boşlukların gözlemlendiği ve ödeme ait bulguların devam etmekte olduğu gözlemlendi.

İmmunohistokimyasal analiz sonrasında serum fizyolojik kontrol grubunda Lyve-1 immunoreaktivitesinin zayıf pozitif, VEGF immunoreaktivitesi yer yer pozitif, Prox-1 immunoreaktivitesi negatif ve FGF-2 immunoreaktivitesinin negatif olduğu izlendi. Böylelikle serum fizyolojik enjeksiyonunun lenfödem tedavisinde hiçbir terapötik etkinliği olmadığı gösterilmiş oldu.

Embriyonik ve mezenkimal kök hücre vasat gruplarında yapılan çaptaki değişim analizinde sırasıyla %19,35 ve %27,88 oranında değişim saptandı. Serum fizyolojik kontrol grubundan sonra ikinci en yüksek değişim oranı mezenkimal kök hücre vasat grubunda gözlendi. Lenfanjiyogenez ve lenfödemin gerilemesine terapötik etkinliği araştırılan diğer bir grup kök hücre vasatları oldu. Mezenkimal kök hücre vasatı verilen deney grubu ile embriyonik kök hücre vasatı verilen deney grubu birbirileriyle karşılaştırıldığında, çap değişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı(p 0,27). Yine her bir vasat grubunun kontrol grubuyla yapılan analizlerinde istatistiksel açıdan anlamlı fark gözlenmedi(EKHV ile SF p 0,145; MKHV ile SF p 0,453)

Histolojik açıdan embriyonik ve mezenkimal kök hücre vasatı enjekte edilen grupların kuyruk kesitleri HE ile incelendiğinde ödem bulgularının sürmekte olduğu ve iyileşme izlenmediği gözlendi. Böylelikle embriyonik ve mezenkimal kök hücre vasatı enjeksiyonlarının lenfödemin gerilemesinde etkin olmadığı gösterilmiş oldu.

Vasat gruplarının immunohistokimyasal analizi sonrasında Lyve-1 immunoreaktivitesinin mezenkimal kök hücre vasatı verilen grupta çok zayıf şiddette, embriyonik kök hücre vasatı verilen grupta orta şiddete; Prox-1 immunoreaktivitesinin mezenkimal kök hücre vasatı verilen grupta negatif, embriyonik kök hücre vasatı verilen grupta yer yer pozitif olduğu gözlendi. VEGF immunoreaktivitesi mezenkimal kök hücre vasatı verilen grupta yer yer pozitif iken, embriyonik kök hücre vasatı verilen grupta zayıf şiddette; FGF-2 immunoreaktivitesi mezenkimal kök hücre vasatı grubunda negatif iken, embriyonik kök hücre vasatı grubunda yer yer pozitif saptandı.

Sonuç olarak tüm gruplar değerlendirildiğinde; embriyonik kök hücre ve mezenkimal kök hücre gruplarında hem vasat gruplarıyla hem de serum fizyolojik kontrol grubuyla karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde çap değişimi olduğu gözlendi. Hem embriyonik kök hücrenin hem de mezenkimal kök hücrenin tedavi amaçlı olarak kullanıldıklarında kuyruk çapında anlamlı gerileme olduğu kanıtlanmış oldu.

Çalışmamıza dahil edilen farelerin kuyruk kesitleri indirekt immunohistokimyasal incelemeyle Lyve-1,Prox-1 ve VEGF immunoreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde en kuvvetli pozitiflikler embriyonik ve mezenkimal kök hücre gruplarında gözlendi. Artmış VEGF aktivitesi ile lenfanjiyogenezin korelasyon gösterdiğini destekleyen literatürdeki benzer çalışmaların sonuçları doğrultusunda, embriyonik ve mezenkimal kök hücre tedavilerinin lenfanjiyogenezi arttığı şeklinde yorumlandı. Yine Prox-1 ve Lyve-1 ile ilgili yukarıda bahsedilen çalışmalarla bu belirteçlerin lenfanjiogenezisi göstermedeki etkinliği kanıtlandığından, uyguladığımız kök hücre tedavilerinin lenfanjiogenezisi tetiklediği gösterilmiş oldu.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hastalıkların patogenezlerinin daha ayrıntılı anlaşılması, hücresel düzeyde birçok reseptör ve molekül tanımlanmasıyla birlikte tedavi yöntemleri de moleküler hedeflere yönelik geliştirilmeye başlamıştır. Doksanlı yılların başından bu yana sadece tıpta değil bilimin her alanında kök hücre temelli yoğun çalışmalar yapılmış, bu amaçla da çeşitli kök hücre kaynakları kullanılmıştır.

Embriyonik kök hücreler çoğalmaları kontrol edilebilen ve sınırsız farklılaşma ve çoğalma kapasitelerinden dolayı en sık kullanılan kök hücre kaynaklarıdır. Bu kaynaklardan bir diğeri olan mezenkimal kök hücre ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin lokal enjeksiyonunun kollajen oluşumunu ve organizasyonunun artırdığı gösterilmiştir.[228] Mezenkimal kök hücrelerin bir avantajı da yüksek anjiyojenik etkileridir. Deneysel iskemi ve diyabet modellerinde bu hücrelerin endotel hücrelerine diferansiye olarak gösterdiği yüksek etkiler ile VEGF, anjiyopoetin-1 ve bFGF gibi anjiyojenik faktörlerin salgılanmasındaki tetikleyici etkisi kanıtlanmıştır.[229]

Yapılmış olan bu çalışmalardan yola çıkarak moleküler mekanizması halen aydınlatılmakta olan lenfödemde diferansiye edilmiş embriyonik ve mezenkimal kök hücre tedavilerinin etkilerini araştırdık. Bu amaçla in vitro ortamda embriyonik ve mezenkimal kök hücreleri çeşitli aşamalardan geçirerek lenfatik endotelyal hücrelere diferansiye ettik ve sekonder lenfödem modeli oluşturduğumuz farelerin kuyruklarına enjekte ettik. Diferansiyasyon aşamasında kullanılan sitokinlerin etkilerini kök hücre tedavilerinin etkilerinden ayırt edebilmek için çalışma gruplarına kontrol grubunun yanı sıra hücre kültür vasatlarından oluşturulan grupları da ekledik. Böylelikle her tedavi modalitesinin lenfödem üzerindeki etkisini net olarak gözlemleme şansını yakaladık.

Sonuçlar hem makroskobik olarak kuyruk çap ölçümlerindeki gerileme ile hem de mikroskobik bakıda Hematoksilen-Eozin ve immunohistokimyasal boyamalar ile değerlendirildi. Makroskobik kriterler gözden geçirildiğinde embriyonik ve mezenkimal kök hücre verilen gruplarda diğer üç gruba oranla belirgin olarak kuyruk çaplarında küçülme ile lenfödem miktarında azalma saptandı ve istatistiksel olarak yapılan değerlendirmede bu değişim anlamlı bulundu.

Histolojik olarak yapılan değerlendirmede VEGF, FGF-2, LYVE-1 ve Prox-1 immunohistokimyasal belirteç olarak kullanılarak tedavilerin lenfanjiyogenez üzerindeki etkileri karşılaştırıldı. Embriyonik kök hücre grubunda serum fizyolojik kontrol grubu ve vasat

gruplarına göre anlamlı derecede lenfanjiyogenezin tetiklendiği görüldü. Mezenkimal kök hücre grubunda da serum fizyolojik kontrol grubu ve vasat gruplarına göre lenfanjiyogenezi gösteren histolojik belirteçlerin artmış ekspresyonları saptandı. Bununla beraber farklı kök hücre kaynaklarından elde edilmiş olan embriyonik ve mezenkimal kök hücre grupları arasında tedavi etkinliği açısından farklılık gözlenmedi.

Bu çalışmada lenfödem tedavisinde diferansiye edilmiş embriyonik ve mezenkimal kök hücre tedavilerinin sonuçları irdelenmiştir. Hastalıkların patogenezindeki moleküler yolakların daha iyi anlaşılmasıyla birlikte daha çok sitokin, reseptör ve hedef molekül tanımlanacak ve bölünebilme, kendini yenileyebilme yeteneği olan, özelleşmemiş, farklılaşabilen, dokuya nakledildiğinde dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen kök hücreler daha fazla hastalıkta terapötik amaçla kullanılabilecektir. Bu tedavi modalitelerinin kliniğe entegre edilmesi için hayvan modellerinde yapılan daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

9. KAYNAKLAR

[1] Kubik S, Kretz O. Földi's Textbook of Lymphology for Physicians and Lymphedema Therapists. 2nd edition. Munich, Mosby-Elsevier. 2006;1-149.

[2] Lawenda BD, Mondry TE, Johnstone PAS. Lymphedema: A Primer On The Identification And Management Of A Chronic Condition In Oncologic Treatment. CA A Cancer Journal for Clinicians.2009;59(1):8-24.

[3] Kerchner K, Fleischer A, Yosipovitch G. Lower Extremity Lymphedema. Journal of the American Academy of Dermatology. 2008;59(2):324-31.

[4] Rautenfeld BD, Claus P. Terminal Vascular System (Microcirculation), Intertitial Connective Tissue, Lymph Capillaries and Precollectors. In: Földi M, Földi E. (Ed.), Földi's Textbook of Lymphology for Physicians and Lymphedema Therapists. 2nd edition. Munich, Mosby-Elsevier.2006;151-9.

[5] Gwendalyn JR, Veronique A, Melody AS. Dendritic Cell Trafficking To Lymph Nodes Through Lymphatic Vessels. Nature Reviews Immunology. 2005;5:617-8.

[6] http://www.gorhams.dk/html/the_lymphatic_system.html

[7]Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. Nature. 2005;438:946.

[8]Guyton AC. Textbook Of Medical Physiology 7 th Edition. İstanbul: W.B. Saunders Company.1986;213-29.

[9] Földi M, Földi E. Physiology and Pathophysiology of the Lymphatic System. In: Földi M, Földi E. (Ed.), Földi's Textbook of Lymphology for Physicians and Lymphedema Therapists. 2 nd edition. Munich, Mosby-Elsevier.2006;179-222.

[10] Kerchner K, Fleischer A, Yosipovitch G. Lower Extremity Lymphedema. Journal of the American Academy of Dermatology. 2008;59(2):324-31.

[11] Witte MH, Witte CL. Lymphatics And Blood Vessels, Lymphangiogenesis And Hemangiogenesis: From Cell Biology To Clinical Medicine. Lymphology. 1987;20:257-66.

[12] Gerli R, Solito R, Weber E, Agliano M. Specific Adhesion Molecules Bind Anchoring Filaments And Endothelial Cells İn Human Skin Initial Lymphatics. Lymphology. 2000;33:148-57.

[13] David GJ, Remko P, Steven C, Suneale B. LYVE-1, The Lymphatic System And Tumor Lymphangiogenesis**.** Trends In Immunology. 2001;22(6):319.

[14] Wilting J, Neeff H, Christ B. Embryonic Lymphangiogenesis. Cell Tissue Res. 1999;297:1-11.

[15] Pipsa P, Saharinen A. Lymphatic Vasculature: Development, Molecular Regulation and Role In Tumor Metastasis and Inflammation. Trends in Immunology. 2004;25(7):387-95.

[16] Sabin FR. On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. Am. J. Anat. 1902;1:367-91.

[17] Alitalo K, Carmelie P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. Cancer Cell. 2002;1:219-27.

[18] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000; 407:242-8.

[19] Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. Biochemical Pharmacology. 2004; 68:1017-21.

[20] Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. Nature. 1995;376:62.

[21] Zachary I. Molecules in focus VEGF. Int J Biochem Cell Biol. 1998;30:1169-74.

[22] Ferrara N. Role of VEGF in regulation of physiological angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol. 2001;80:1358-66.

[23] Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. J Biol Chemistry. 1996; 271:603-6.

[24] Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. J Surg Oncol. 2004; 87:95-104.

[25] Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 2003; 9:669-76.

[26]Xuri, L, Anil K, Fan Z, Chunsik L, Zhongshu T. Complicated life, complicated VEGF-B. Trends in Molecular Medicine. 2012;18(2):324-32.

[27] Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue-beyond blood vessels. Exp Neurol. 2004;187:246-53.

[28] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of VEGF. Endocrine Reviews. 1997;18:4-25.

[29] Ellis L, Fidler I. Angiogenesis and metastasis. Eur J Cancer. 1996;32: 2451-60.

[30] Carmen A, Dıether L, Massımılıano M, Peter C. Role and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System. Physiol Rev. 2009;89:607-48.

[31] Ortega N, L'faqihi FE, Plouet J. Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. Biol Cell.1998;90:381-90.

[32] Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. Semin Thromb Hemost. 2000; 26:561-609.

[33] Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med.2003; 9:669-76.

[34] Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplazia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. Science.1997; 276:1423-5.

[35] Detmar M. Tumor angiogenesis. J. Investig. Dermatol Symp Proc.2000;5:20-3.

[36] Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. Reprod Domest Anim. 2004;39:206-16.

[37] Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. Am J Physiol.1993;264:995-1002.

[38]Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. J Clin Invest.1994;93:2490-6.

[39] Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature.1992;359:843-5.

[40] Masabumi S, Lena CW. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Experimental Cell Research. 2006;312: 549-60.

[41]Shibuya M,Yamaguchi S,Yamane M,Ikeda T, Tojo A, Matsushime H. Nucteotide sequence and expression by of a novel human reseptor type tyrosine kinase gene closely related to the fms family. Oncogene.1990;5:519-24.

[42]Terman BI, Dougher Vermazen M, Maglione D,Lassam NJ, Gasporadowicz D. Identification of the KDR tyrosine kinase a reseptor for vascular endothelial cell growth factor. Biochem Biophys Res Commun.1992;187:1579-86.

[43] Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their intibitors. Nat Med. 1999;5(12):1359-64.

[44] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med. 2000;6(4):389-95.

[45] Seiji Kato. Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. Anatomical Science International. 2006;81:71-83.

[46] Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(8):3566-70.

[47] Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. Physiol Rev. 2002;82(3): 673-700.

[48] Kukk E, Lymboussaki A, Taira S. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. Development.1996;122:3829-37.

[49] Dumont DJ, Jussila L, Taipale J. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. Science. 1998;282(5390):946-9.

[50] Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. Nat Med. 2001;7:199-205.

[51] Irrthum A, Karkkainen MJ, Devriendt K, Alitalo K, Vikkula M.Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. Am J Hum Genet. 2000;67: 295-301.

[52] Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson MA. Missense mutations interfere withVEGFR-3 signalling in primary lymphedema. Nat Genet.2000;25:153-9.

[53] Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:1267-82.

[54] Chen L, Hamra P, Cursiefen C, Zhang Q, Pytowski B, Streilein JW. Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. Nat Med. 2004;10:13-5.

[55] Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, Thomas-Crusells J, Fletcher CD, Alitalo K. Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. Am J Pathol. 1998;153:395–203.

[56] Partanen TA, Arola J, Saaristo A. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. FASEB J. 2000;14(13):2087-96.

[57] Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. Am J Pathol. 2000;156(5):1499-504.

[58] Kenta N. Biomarkers of Lymphatic Function and Disease. Mol Diag Ther. 2007;11(4):227-38.

[59] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yla-Herttuala S, Jaattela M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. Cancer Res. 2001;61:1786-90.

[60] Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber, E. Tumor associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. Am J Pathol. 2002;161:947-56.

[61]He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla- Herttuala S. Vascular endothelial cell growth factor receptor-3 mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. Cancer Res. 2005;65:4739-46.

[62] Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med.2001;7:186-91.

[63] Jayasinghe C, Simiantonaki N, Michel-Schmidt R, Kirkpatrick CJ. Endothelial VEGFR-3 Expression In Colorectal Carcinomas Is Associated With Hematogenous Metastasis. Oncology Reports. 2009;22:1093-100.

[64] Soker S,Takashima S, Miao H, Neufeld G, Klagsbrun M. Neurophilin -1 is expressed by endothelial and tumor cells and an isoform-specific reseptor for vascular endothelial growth factor. Cell.1998;92:735-45.

[65]Sondel M, Loundberg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. J Neuro sci.1999;19:5731-40.

[66] Guo L, Degenstein L, Fuchs E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. Genes and Development.1996;10:165-75.

[67] Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. J. R. Soc. İnterface. 2006;4:413-37.

[68] Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin D. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. Endocrine Reviews. 1997;18:26-45.

[69] Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J. Biol. Chem. 1996;271:292-7.

[70] Liska DAJ, Reed MJ, Sage EH, Bornstein P. Cell-specific Expression of αl(I) Collagen-hGH Minigenes in Transgenic Mice. The Journal of Cell Biology. 1994;125:695-704.

[71] Scharffetter K, Kulozik M, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Hatamochi A. Localization of Collagen α1(1) Gene Expression During Wound Healing by In Situ Hybridization. J. Invest. Dermatol. 1989;93:405-12.

[72] Claudio Scavelli. Lymphatics at the cross roads of angiogenesis and lymphangiogenesis. J. Anat. 2004;204:433-49.

[73] Schmelz M, Moll R, Kuhn C, Franke WW. Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells. II. Different types of lymphatic vessels. Differentiation. 1994;57:97–117.

[74] Leah N, Cueni, et all. New Insights into the Molecular Control of the Lymphatic Vascular System and its Role in Disease. Journal of Investigative Dermatology. 2006;126:2167-77.

[75] Kowalczyk AP, Navarro P, Dejana E, Bornslaeger EA, Green KJ. VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a

pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. J.Cell Sci. 1998;111:3045-57.

[76] Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G. Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. J Exp Med. 2001;194:797-808.

[77] Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N. T1alpha/ podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. EMBO J. 2003;22:3546-56.

[78] Ramirez MI, Millien G, Hinds A, Cao Y, Seldin DC, Williams MC. T1alpha, a lung type i cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. Dev Biol. 2003;256:61-72.

[79] Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz- Guerra M, Cruzes J. Characterization of human pa2.26 antigen (t1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. Int J Cancer. 2005;113:899-910.

[80] Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. Am J Pathol. 2005;166:913-21.

[81] Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe CQ, Gruss P. Prox1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. Mech Dev. 1993;44:3-16.

[82] Kenta Nakamura. Biomarkers of Lymphatic Function and Disease. Mol Diag Ther. 2007; 11(4):227-38.

[83] Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. Cell. 1999;98(6):769-78.

[84] Oliver G, Harvey N. A stepwise model of the development of lymphatic vasculature. Ann NY Acad Sci. 2002;979:159-65.

[85] Nadja E, Tobler. Tumor and lymph node lymphangiogenesis impact on cancer metastasis. J. Leukoc. Biol. 2006;80:691-6.

[86] Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa Y, Detmar M. Prox-1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. Dev. Dyn. 2002;225:351-7.

[87] Petrova TV, Makinen T, Makela TP. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. EMBO J. 2002;21:4593-9.

[88] Oliver G, Detmar M. The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. Genes Dev. 2002;16(7):773-83.

[89] Marc G, Achen K. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread—New players begin to emerge. Int. J. Cancer. 2006;119:1755-60.

[90] Suneale Banerji. LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan. The Journal of Cell Biology.1999;144(4):789-801.

[91] Prevo R, Banerji S, Ferguson D, Jackson DG. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. J Biol Chem. 2001;276(19):420-30.

[92] Jackson DG. The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. Trends Cardiovasc Med.2003;13:1-7.

[93] David G, Jackson S. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. APMIS. 2004;112: 526-38.

[94] David GJ, Remko P, Steven C, Suneale B. LYVE-1, The Lymphatic System And Tumor Lymphangiogenesis. Trends İn Immunology. 2001;22(6):123-30.

[95] Skelton T, Zheng C, Nocks A, Stamenkovic I. Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan. J Cell Biol. 1998;140:431-46.

[96] Mandriota S, et all. Vascular endothelial growth factor-C mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. EMBO J. 2001;20:672-82.

[97] Ivan der Auwera, et all.First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. British Journal of Cancer. 2006;95:1611-25.

[98] Carla Mouta Carreira, et all. LYVE-1 Is Not Restricted to the Lymph Vessels: Expression in Normal Liver Blood Sinusoids and Down-Regulation in Human Liver Cancer and Cirrhosis. Cancer Research. 2001;61:8079-84.

[99] Nigel JP, Beasley, et all. Intratumoral Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer. Cancer Research. 2002;62:1315-20.

[100] Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. Cancer Res. 2003;63:1920-6.

[101] Oddbjørn Straume, et all. Independent Prognostic Impact of Lymphatic Vessel Density and Presence of Low-Grade Lymphangiogenesis in Cutaneous Melanoma. Clinical Cancer Research. 2003;9:250-6.

[102] Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG.Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. Am J Pathol. 2003;162:1951-60.

[103] Francis T, Hall, et all. Intratumoral Lymphatics and Lymph Node Metastases in Papillary Thyroid Carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003;129:716-9.

[104] Lutz Trojan, et all. Lymph and Blood Vessel Architecture in Benign and Malignant Prostatic Tissue: Lack of Lymphangiogenesis In Prostate Carcinoma Assessed with Novel Lymphatic Marker Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor (LYVE-1). The Journal Of Urology. 2004;172:103-7.

[105] Von Marschall Z, Scholz A, Stacker SA, Achen MG, Jackson DG, Alves, F. Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer. Int J Oncol. 2005;27:669-79.

[106] Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. J Pathol. 2003;200:195-206.

[107] Bono P, Wasenius VM, Heikkila P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. Clin Cancer Res. 2004;10:7144-9.

[108] Van Trappen PO, Steele D, Lowe DG, Baithun S, Beasley N. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D, and their receptor VEGFR-3, during different stages of cervical carcinogenesis. J Pathol. 2003;201:544-54.

[109] Ai Fujimoto MD, et all. Significance of Lymphatic Invasion on Regional Lymph Node Metastasis in Early Gastric Cancer Using LYVE-1 Immunohistochemical Analysis. Am J Clin Pathol. 2007;127:82-8.

[110] Kenta Nakamura, et all. Biomarkers of Lymphatic Function and Disease. Mol Diag Ther. 2007;11(4):227-38.

[111] Rubbia-Brandt L,Terris B, Giostra E, Dousset B, Morel P, Pepper MS. Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor-C expression correlate with malignant behavior in human pancreatic endocrine tumors. Clin Cancer Res. 2004;10:6919-28.

[112] Stessels, F., Van den Eynden, G., Van der Auwera, I., Salgado, R, Van den Heuvel, E., Harris, A.L., Jackson, D.G., Colpaert, C.G., Van Marck, E., Dirix, L.Y., Vermeulen, P.B. (2004). Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. Br J Cancer 90: 1429-36

[113]Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. J Clin Invest. 2005; 115:2363-72.

[114] Weigel JA, Raymond RC, McGary CT, Singh A, Weigel PH. A blocking antibody to the hyaluronan (HA) receptor for endocytosis (HARE) inhibits HA clearance by perfused liver. J Biol Chem.2003;278:9808-12.

[115] Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G. Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. J Exp Med. 2001;194:797-808.

[116] Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of cc chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of b16 murine melanoma. J Natl Cancer Inst. 2001; 93:1638-43.

[117] Hirakawa S, Detmar M. New insights into the biology and pathology of the cutaneous lymphatic system. J Dermatol Sci. 2004;35:1-8.

[118] Szuba A, Coke JP, Yousuf S, Rockson SG. Decongestive Lymphatic Therapy for Patients with Cancer-releated or Primary Lymphedema. Am J Med. 2000;109: 296-300.

[119]Cordero FI, Langa MJ, Cordero AF, Jimeno JM. Predictive factors of response to decongestive therapy in patients with breast-cancer-related lymphedema. Annals of Surgical Oncology. 2010; 17(3):744-51.

[120] Földi E, Földi M. Lymphostatic Diseases. In: Földi M, Földi E. (Ed.), Földi's Textbook of Lymphology for Physicians and Lymphedema Therapists. 2nd edition. Munich: Mosby-Elsevier; 2006:223-317.

[121] Rockson SG. Lymphedema. Current Treatment Options in Cardiovascular Med. 2006;8(2): 129-36.

[122] Bakar Y. Mastektomi sonrası gelişen lenfödemde fizyoterapinin etkinliği. Doktora tezi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2005.

[123] http://www.medscape.org/viewarticle/723452_transcript

[124] http://lenfodem.com/base/lenfodem-nedir/lenf-odem-tanisi-nasil-konulur/

[125] Ramos SM, O'Donnell LS, Knight G. Edema Volume, Not Timing, Is the Key to Success in Lymphedema Treatment. Am J Surg. 1999;178:311-5.

[126] Allen, EV, Ghormley RK. Lymphedema of the extremities: etiology, classification and treatment; report of 300 cases. Annals of Internal Medicine. 1934;54(4):606-24.

[127] Kinmonth JB, Taylor GW, Tracy GD, Marsh JD. Primary lymphoedema, Clinical and lymphangiographic studies of a series of 107 patients in which the lower limbs were affected. British Journal of Surgery.1957;45(189):1-10.In: Szuba A, Rockson SG. Lymphedema: classification, diagnosis and therapy. Vascular Medicine. 1998;3:145-56.

[128] Kerchner K, Fleischer A, Yosipovitch G. Lower extremity lymphedema. Journal of the American Academy of Dermatology.2008;59(2):324-31.

[129] Szuba A, Rockson SG. Lymphedema:classification, diagnosis and therapy. Vascular Medicine. 1998;3:145-56.

[130] Irrthum A, Karkkainen MJ, Devriendt K, Alitalo K, Vikkula M. Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. Am J Hum Genet. 2000;67:295-301.

[131] Mehta SD, Robinson RJ, Bern SA. Pedal manifestations of Milroy's disease. J Am Pediatr Med Assoc.1996;86:400-2.

[132] Camitta BM. The lymphatic system. In: Behrman RE, Klieg-man RM, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics, 17th ed. Philadelphia: WB Saunders,2004; 1677-88.

[133] http://www.anatomybox.com/milroys-disease/

[134] Thielitz A, Bellutti M, Bonnekoh B, Franke I, Wiede A, Lotzing M, et al. Progressive lipolymphedema associated with increased activity of dermal fibroblasts in monoclonal gammopathy of undetermined significance: is there a causal relationship? Lymphology. 2012;45:124-9.

[135] Bruna J, Miller AJ, Beninson J. A simple clinical classification of lymphedema. Eur J Plas Surg.1999;22:404-5.

[136] Kocak Z, Overgaard J. Risk factors of arm lymphedema in breast cancer patients. Acta Oncol. 2000;39:389-92.

[137] Ryttov N, Holm NV, Qvist N, Blichert-Toft M. Influence of adjuvant irradiation on the development of late lymphedema and impaired shoulder mobility after mastectomy for carcinoma of the breast. Acta Oncol. 1988;27:667-70.

[138] Schrenk P, Rieger R, Shamiyeh A, Wayand W. Morbidity following sentinel lymph node biopsy versus axillary lymph node dissection for patients with breast carcinoma. Cancer. 2000;88:608-14.

[139] Goffman TE, Laronga C, Wilson L, Elkins D. Lymphedema of the arm and breast in irradiated breast cancer patients: Risk in an era of dramatically changing axillary surgery. Breast J. 2004;10:405-11.

[140] Smeltzer DM, Stickler GB, Schirger A. Primary lymphedema in children and adolescents: a follow-up study and review. Pediatrics. 1985;76(2):206-18.

[141] Petrek JA, Heelan MC. Incidence of breast carcinoma-related lymphedema. American Cancer Society Lymphedema Workshop Supplement to Cancer. 1998;83(12):2776-81.

[142]Thompson M, Korourian S, Tillman RH, Adkins L, Mumford S, Westbrook K.C. Axillary reverse mapping (ARM): a new concept to identify and enhance lymphatic preservation. Annals of Surgical Oncology. 2007;14(6):1890-5.

[143] Norman SA, Localio AR, Potashnik SL, Torpey HAS, Kalan MJ, Weber AL. Lymphedema in breast cancer survivors: incidence, degree, time course, treatment, and symptoms. Journal of Clinical Oncology.2009;27(3):390-7.

[144] Johansson K, Branje E. Arm lymphoedema in a cohort of breast cancer survivors 10 years after diagnosis. Acta Oncologica. 2010;49(2):166-73.

[145] Schünemann H, Willich N. Lymphedema after breast carcinoma. A study of 5868 cases. Dtsch Med Wochenschr. 1997;122:536-41.

[146] Brennan MJ, Weitz J. Lymphedema 30 years after radical mastectomy. Am J Phys Med Rehabil.1992;71:12-4.

[147] Piller NB, Clodius L. The use of a tissue tonometer as a diagnostic aid in extremity lymphoedema: a determination of its conservative treatment with benzo-pyrones. Lymphology. 1976;9:127-32.

[148] Robert E Henkin. Nuclear Medicine. 1996;1505.

[149] Moffatt CJ, Franks PJ, Doherty DC. Lymphoedema: an underestimated health problem. QJM. 2003;96:731-8.

[150] Rockson SG, Miller LT, Senie R, Brennan MJ, Casley-Smith JR, Foldi E. American Cancer Society Lymphedema Workshop. Workgroup III: Diagnosis and management of lymphedema. Cancer. 1998;83:2882-5.

[151] McNeely ML, Magee DJ, Lees AW, Bagnall KM, Haykowsky M,Hanson J. The addition of manual lymph drainage to compression theapy for breast cancer related lymphedema: a randomized controlled trial. Breast Cancer Res Treat. 2004;86:95-106.

[152] Leduc O, Leduc A, Bourgeosis P, Belgrado JP. The physical treatment of upper limb edema. Cancer. 1998;83:2835-9.

[153] Petrek JA, Senie RT, Peters M, Rosen P. Lymphedema in a Cohort of Breast Carcinoma Survivors 20 Years after Diagnosis. Cancer. 2001;92:1368-77.

[154] http://www.varismerkezi.com.tr/derin_ven_trombozu.asp

[155] Uzkeser H. Mastektomi sonrası gelişen lenfödemin tedavisinde manuel lenfatik drenaj ve intermittant pnömatik kompresyon pompasının etkinliğinin karşılaştırılması.Uzmanlık tezi, Erzurum, Atatürk Üniversitesi, 2009.

[156] Szuba A, Achalu R, Rockson SG. Decongestive lymphatic therapy for patients with breast carcinoma-associated lymphedema. A randomized, prospective study of a role for adjunctive intermittent pneumatic compression. Cancer. 2002;95:2260-7.

[157] Casley-Smith JR, Morgan RG, Piller NB. Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5,6 benzo-(a)-pyrone. N Eng J Med. 1993;329:1158-63.

[158] Suami H, Chang DW. Overview of Surgical Treatments for Breast Cancer–Related Lymphedema. Plast Reconst Surg. 2010;126:1853-63.

[159] http://www.elsevierimages.com/image/25108.htm

[160] Chang DW. Lymphaticovenular Bypass For Lymphedema Management In Breast Cancer Patients: A Prospective Study. Plast Reconstr Surg.2010;126:752-8.

[161] Peter G, Byung-Boong L, John B, Stanley GR. General Principles And Indications In Lymphedema. 2007;978-97.

[162] Bosompra K, Ashikaga T, O'Brien P, Nelson L, Skelly J. Swelling, Numbness, Pain, And Their Relationship To Arm Function Among Breast Cancer Survivors: A disablement Process Model Perspective. The Breast Journal. 2002;8(6):338-48.

[163] Velanovich V, Szymanski W. Quality of Life of Breast Canser Patients with Lymphedema. The American Journal of Surgery. 2003;177:184-8.

[164] Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. Nature.1969; 221(5181):632-5.

[165] Evans MJ, Kaufman MH. Establisment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. Nature.1981; 292:154-6.

[166] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science.1998;282(5391):1145-7.

[167] Karaöz E, Ovalı E. Kök hücreler. Trabzon:Celepler matbaası, 2004;17-68.

[168] Sue O'Shea K, Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, Biol. Reprod. 2004;71:1755-65.

[169] Verfaille CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: Hype and reality. Hematology. 2002;1:369 -91.

[170] McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat Med. 1999;5(12):1410-2.

[171] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vitro. Nature Med.2000;6:1229-34.

[172] Montoya FU, Verfaillie CM, Hu WS. Culture Systems for Pluripotent Stem Cells. J. Of Bioscience and Bioengineering. 2005;100:12-27.

[173] http://www.nature.com/nrm/journal/v6/n9/fig_tab/nrm1713_F1.html

[174] Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells. 2001;19(3):193-204.

[175] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Jones JM, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science.1998; 282(5391):1145-7.

[176] Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy, J.Cell Mol. Med.2004;8(4):465-73.

[177] Vatansever HS. Embriyonik Kök Hücreler. Sağlıkta Birikim.2009;1(5):25-44.

[178] Bioani M, Schöler HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6:872-84.

[179] Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. Nat Biotechnol.2007; 25:803-16.

[180] Matin MM, Walsh JR, Gokhale PJ, et al. Specific knockdown of Oct-4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. Stem Cells. 2004;22:659-68.

[181] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell. 2005;122:947-56.

[182] Avery S, Innis K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. Stem Cells Dev. 2006;15:729-40.

[183] Mallon BS, Park K-Y, Chen KG, Hamilton RS, McKay RDG. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. İnt. J. Biochem. & Cell Biol. 2006; 38(7):1063-75.

[184] http://kogem.kocaeli.edu.tr/

[185] Çamurdanoğlu BZ, Kansu E. Erişkin ve hematopoetik kök hücreler. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi. 2011;20:41-51.

[186] http://www.kokhucredernegi.org.tr/tur/kok_hucre/eriskin.htm

[187] http://www.innovationsstemcellcenter.com/patient-education/what-is-an-adult-stem-cell/

[188]http://www.ebioscience.com/resources/pathways/hematopoiesis-from-multipotent-stem-cells.htm

[189] İnan S, Özbilgin K. Kök Hücre Biyolojisi. Sağlıkta Birikim. 2009;1(5):11-23.

[190] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. 3rd Ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.

[191] Ural AU. Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları. Türkiye Klinikleri J Hem Onc. 2008;1:62-6.

[192] Çetinkaya DU. Mezenkimal kök hücreler. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları. 2009;20:53-62.

[193] Jeroen H, Timothy PP, Satoshi K, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Regulates Microlymphatic Flow via Collecting Lymphatics. Circ Res. 2004;95:204-9.

[194] Cheville AL. Current and future trends in lymphedema management: implications for women's health. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2007;18:539-53.

[195] Golshan M, Smith B. Prevention and management of arm lymphedema patient with breast cancer. The Journal of Supportıve Oncology.2006;4(8):381-6.

[196] Schunemann H, Willich N. Lymphoedema of the arm after treatment of cancer of the breast. a study of 5 868 cases. Dtsch Med Wochenschr. 1997;122(17):536-41.

[197] Gursoy AA. Meme kanseri tedavisine bağlı lenfödem ve hemşirelik bakımı. C.U. Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi.2005;9(2):18-25.

[198] Charles RH. Elephantiasis scroti. In: Latham A, English TC, eds. A system of treatment. London:Churchill;1912.

[199] Brorson H, Svensson H. Liposuction combined with controlled compression therapy reduces arm lymphedema more effectively than controlled compression therapy alone. Plast Reconstr Surg.1998;102:1058-67.

[200] Banerji S, Ni J, Wang SX, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymphspecific receptor for hyaluronan. J Cell Biol. 1999;144:789-801.

[201] Wigle JT, Harvey N, Detmar M, et al. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. EMBO J. 2002;21:1505-13.

[202] Hadamitzky C, Pabst R. Acquired lymphedema: an urgent need for adequate animal models. Cancer Res. 2008;68:343-5.

[203] Suami H, Chang DW. Overview of surgical treatments for breast cancer-related lymphedema. Plast ReconstrSurg. 2010;126:1853-63.

[204] Shin WS, Szuba A, Rockson SG. Animal models for the study of lymphatic insufficiency. Lymphat Res Biol. 2003;1:159-69.

[205] Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. Curr Opin Hematol. 2000;7:358-63.

[206] Niyibizi C, Wang S, Mi Z, Robbins PD. The fate of mesenchymal stem cells transplanted into immunocompetent neonatal mice: implications for skeletal gene therapy via stem cells. Mol Ther. 2004;9:1525-2016.

[207] Chen SL, FangWW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. Am J Cardiol.2004;94:92-5.

[208] Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C. Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: A methodological approach in humans. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 2003;4:158-61.

[209] Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). Bone Marrow Transplant. 2002.30:215-22.

[210] Park HC, Shim YS, Ha Y, Yoon SH, Park SR, Choi BH. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte–macrophage colony stimulating factor. Tissue Eng.2005;11:913-22.

[211] Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. Tissue Eng. 2007;131:299-312.

[212] Caylan R, Bektas D, Dikmen T, Bektas Ö, Omay SB, Ovali E. Mesenchymal stem cells in iatrogenic facial nerve paralysis: a possible role in the future. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2006;10:406-8.

[213] Wilting J, Neeff H, Christ B. Embryonic lymphangiogenesis. Cell Tissue Res.1999;297:1-11.

[214] Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. Trends Immunol. 2004;25:387-95.

[215] Takahashi M, Yoshimoto T, Kubo H. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis.Int J Hematol. 2004;80:29-34.

[216] Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, et al. Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. EMBO J. 2001;20:672-82.

[217] Veikkola T, Alitalo K. Dual role of Ang2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. Dev Cell. 2002;3:302-4.

[218] Szuba A, Skobe M, Karkkainen MJ, Shin WS, Beynet DP, Rockson NB.Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. FASEB J. 2002;16:1985-7.

[219]Bahram F, Claesson-Welsh L. VEGF-mediated signal transduction in lymphatic endothelial cells. Pathophysiology. 2010;17:253-61.

[220] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. NatMed. 2001;7:192-8.

[221] Tomoya K, Hajime K, Chikashi S, Yoshihide U. Differentiation of Lymphatic Endothelial Cells From Embryonic Stem Cells on OP9 Stromal Cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26:2070-6.

[222] Slavin SA, Van den Abbeele AD, Losken A, Swartz MA, Jain RK. Return of lymphatic function after flap transfer for acute lymphedema. Ann Surg. 1999;229:421-7.

[223] Jin D, Harada K, Ohnishi S, Yamahara K, Kangawa K, Nagaya N. Adrenomedullin induces lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphoedema. Cardiovasc Res.2008;80:339-345.

[224] Shimizu Y, Shibata R, Satoshi S. Therapeutic Lymphangiogenesis With Implantation of Adipose-Derived Regenerative Cells. J Am Heart Assoc.2012;17:198-209.

[225] Masako O, Caname I, Hiroshi I, Kunihiko K. Inhibition of endogenous TGF-b signaling enhances lymphangiogenesis. Blood. 2008;111:4571-9.

[226] Saharinen P, Tammela T, Marika J, Karkkainen A. Lymphatic vasculature: development,molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. TRENDS in Immunology. 2004;25(7):145-54.

[227]Bohmer R, Neuhaus B, Buhren S, Dayong Z. Regulation of Developmental Lymphangiogenesis by Syk+ Leukocytes. Developmental Cell. 2010;18:437-49.

[228] McFarlin K, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. Wound Repair Regen. 2006;14(4):471-8.

[229] Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. Stem Cells. 2007;25(10):2648-59.