T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİSİ

ANABİLİM DALI

RATLARDA POLİMERE DEPOLANMIŞ ENDOTEL HÜCRELERİYLE ARTİFİSYEL KAPİLLER AĞ OLUŞTURMA MODELİ

DR.NİJAT SÜLEYMANOV

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2018

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİSİ

ANABİLİM DALI

RATLARDA POLİMERE DEPOLANMIŞ ENDOTEL HÜCRELERİYLE ARTİFİSYEL KAPİLLER AĞ OLUŞTURMA MODELİ

DR.NİJAT SÜLEYMANOV

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ:

PROF.DR. ERDEM ERİNÇ SİLİSTRELİ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....**i**
TEŞEKKÜR.....**ii**
TABLO LİSTESİ.....**iii**
ŞEKİL LİSTESİ.....**iv**
KISALTMALAR.....**vi**
ÖZET.....**vii**
ABSTRACT.....**viii**
GİRİŞ VE AMAÇ.....**1**
GENEL BİLGİLER.....**3**
GEREÇ VE YÖNTEM.....**13**
BULGULAR.....**22**
TARTIŞMA.....**45**
SONUÇ ve ÖNERİLER.....**48**
KAYNAKLAR.....**49**
EKLER.....**56**

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile eğitimime katkıda bulunan değerli bilgi ve tecrübeleriyle nitelikli bir eğitim almamı sağlayan hocalarım Sayın **Prof.Dr. Öztekin Oto**, Sayın **Prof.Dr. Baran Uğurlu**, Sayın **Prof.Dr. H. Hüdai Çatalyürek**, Sayın **Prof.Dr. A.Cenk Erdal**, Sayın **Prof.Dr. S.Kıvanç Metin**, Sayın **Prof. Dr. Özalp Karabay**, ayrıca tezimi yöneten, tezimin ve projemin gerçekleşmesinde büyük emeği olan Sayın hocam **Prof.Dr. Erdem Erinç Silistreli**'ye

Tezimin gerçekleşmesinde büyük yardımlarını ve desteklerini gördüğüm İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı üyelerinden Sayın **Dr.Öğr.Üyesi Emel Sokullu**, fakültemizin Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı üyelerinden Sayın **Prof.Dr. Osman Yılmaz**, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı üyelerinden Sayın **Prof.Dr. Bekir Uğur Ergür**, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı üyelerinden Sayın **Dr.Öğr.Üyesi**. **Tuğra Gençpınar**'a

Bu projenin ve tezin gerçekleştirmesinde en başından ve en az benim kadar benimle beraber çok emeği geçen Perfüzyon Teknikleri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmakta olan Sayın **Merve Serin**'e

Uzun, yorucu ve bir o kadar da zevkli geçen asistanlığım boyunca iyi ve kötü günlerimi paylaştığım asistan arkadaşlarıma, servis ve yoğun bakımımızın hemşire ve personellerine, ameliyathanemizin hemşire ve personellerine, perfüzyonistlere, poliklinik çalışanlarımıza;

Beni bugünüme getirene kadar her türlü zorluğa göğüs geren, sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam **Dr.Şahsuvar Süleymanov'a**

Annem öğretmen **Aida Süleymanova'ya**, hem kardeşim hem ekip arkadaşım **Dr.Nihad Süleymanzade'ye** ve tüm akrabalarıma

Zorlu TUS yolculuğumda manevi desteğini esirgemeyen hem dostum hem meslektaşım değerli **Dr.Yalchın Mırzayev'e** ve sevgili kuzenim **Anar Hasanov**'a saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr.Nijat Süleymanov

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Periferik Arter Hastalıklarında Medikal Tedavi Yaklaşımları

Tablo 2. Anjiyogenezi Etkileyen Faktörler Listesi

Tablo 3: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının Damar Skoru Açısından Karşılaştırılması

Tablo 4: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının Damar Skoru Açısından Karşılaştırılması

Tablo 5: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının Damar Skoru Açısından Karşılaştırılması

Tablo 6: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının Damar Skoru Açısından Karşılaştırılması

Tablo 7: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-CD31 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 8: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-CD31 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 9: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının anti-CD31 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 10: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının anti-CD31 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 11: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-α-SMA İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 12: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-α-SMA İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 13: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının anti-α-SMA İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 14: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının anti-α-SMA İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 15: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-VEGF İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 16: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-VEGF İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 17: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının anti-VEGF İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 18: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının anti-VEGF İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 19: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-ANG-1 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 20: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-ANG-1 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 21: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının anti-ANG-1 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

Tablo 22: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının anti-ANG-1 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Periferik Arter Hastalarına Genel Yaklaşım

Şekil 2: MTT Canlılık Testi Sonuçları

Şekil 3: İmplante Edilen Polimer Parçacığı

Şekil 4: Operasyon Öncesi Hazırlıklardan Bir Kesit

Şekil 5: Sıçanların İmplant İşlemi İçin Hazırlanmasından Bir Kesit

Şekil 6. Polimer Parçasının Yerleştirilmesinden Bir Kesit

Şekil 7: İmplantasyonun Yapılmasından Sonra Doku Kesiti

Şekil 8: İşlemler Tamamlandıktan Sonra Dokuların Kapatılmasından Kesitler

Şekil 9: Operasyondan Sonra İyileşmiş İnsizyon Görüntüsü

Şekil 10: Kontrol grubuna ait kas dokusu kesiti (H&E)

Şekil 11: Kontrol grubuna ait kas dokusu kesiti (Masson Trikrom)

Şekil 12. 14. gün boş polimer grubuna ait kas dokusu kesiti (H&E)

Şekil 13: 14. gün boş polimer grubuna ait kas dokusu kesiti (Masson Trikrom)

Şekil 14: 28. gün boş polimer grubuna ait kas dokusu kesiti (H&E)

Şekil 15: 28. gün boş polimer grubuna ait kas dokusu kesiti (Masson Trikrom)

Şekil 16: 14. dolu polimer grubuna ait kas dokusu kesiti (H&E)

Şekil 17: 28. gün dolu polimer grubuna ait kas dokusu kesiti (H&E)

Şekil 18: Gruplara ait kas dokusu kesitleri (Anti-ANG-1 Antikoru**)**

Şekil 19: Gruplara ait kas dokusu kesitleri (Anti-CD 31 Antikoru**)**

Şekil 20: Gruplara ait kas dokusu kesitleri (Anti-VEGF Antikoru**)**

Şekil 21: Gruplara ait kas dokusu kesitleri (Anti-α-SMA Antikoru**)**

KISALTMALAR

PAH: Periferik Arter Hastalığı

HT: Hipertansiyon

DM: Diyabetes Mellitus

İK: İntermittan Klodikasyo

ABİ: Ayak Bileği Brakiyal İndeksi

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

FBS: Fetal Bovin Serum

EGM-2: Endothelial Cell Growth Medium-2

IF: İmmun floresan

PFA: Paraformaldehit

PBS: Phosphate Buffered Saline

PLLA: Poli L-Lactide

PEG: Poli etilen glikol

MTT: Dietiltiazol Difenil Tetrazolyum Bromür

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12

PAD: Peripheral Arterial Disease

ANG-1: Anjiyopoietin-1

α-SMA: Alfa-Smooth Muscle Actin

ÖZET

Giriş: Periferik arter hastalığı özellikle ilerleyen yaşlarda görülme sıklığı artan ateroskleroz temelinde gelişen önemli bir hastalıktır. Alt ekstremitelerde arteriyel lümenin tıkanmasına, kan akışının azalması ve malperfüzyona neden olur. Günümüzde gelişmiş medikal tedavi yöntemleri semptomların azaltılmasına ve hastalığın daha iyi seyretmesine fayda göstermekle birlikte genellikle kalıcı çözüm olmaz. Medikal ve klasik cerrahi tedavinin etkisiz kaldığı durumlarda PAH'lı kişilere uygulanacak tedaviler için yeni alternatif modeller geliştirilmesi önem arzetmektedir. Bu çalışmada; periferik arter hastalığı olan kişilerin tedavisinde kullanılması için ratlarda polimere depolanmış endotel hücreleriyle artifisyel kapiller ağ oluşturma modeli geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırma 35 adet Wistar-Albino sıçanın 5 farklı gruba ayrılmasıyla yürütülmüştür. Poli etilen glikol yapıdaki polimerin içerisine çoğaltılmış "İnsan Umblikal Veni Endotel Hücreleri" (HUVEC) konulmuştur. Hücre yüklü polimer sıçanların arka bacak kısımlarına implante edilmiş ve sıçanlar 14. ve 28. günlerde sakrifiye edilerek incelenmek üzere doku örneği alınmıştır. İmmünohistokimyasal incelemede oluşan damar yapısının incelenmesi için VEGF, CD31, α-SMA, ANG-1 belirteçleri kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Bulgular: Endotel skorlaması ve VEGF evrelemesine göre boş polimerler ile dolu polimerler arasında hem 14.gün hem de 28.gün alınan kesitlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Ayrıca dolu polimerlerin 14. ve 28. Gün alınan kesitleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. 28.gün alınan kesitlerde damar oluşumu daha fazla gözlenmiştir. ANG-1 ve α-SMA parametrelerinin incelenmesinde sadece 28.günde alınan boş ve dolu polimerler arası damar oluşumu açısından istatistiksel olarak fark saptanmıştır. CD31'in incelenmesi sonucu ise buna ek olarak 14.gün alınan boş ve dolu polimerlerin damar oluşumu açısından da fark saptanmıştır.

Sonuç: Literatürdeki diğer bulgular ve bu çalışmanın bulguları ile sıçanlara kültüre edilmiş endotel hücreleri implante edilmesiyle damar oluşumunun arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmada görülen dolu polimerlerin 28.günde alınan örneklerde daha fazla damar oluşturması damar oluşumu açısından optimum süreyi bulabilmek amacıyla daha farklı çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. Epidemiyolojik kanıt piramidinin en üstünde yer alan randomize kontrollü klinik çalışmalara konu olabilmesi için hayvan deneyleriyle en iyi hücre tipi, en iyi biyomateryal ve optimum süre bulunmalıdır.

Anahtar Kelimeler: periferik arter hastalığı, sıçan, polietilen glikol, anjiyogenez, VEGF

ARTIFICIAL CAPILLARY NETWORK MODELLING WITH ENDOTHELIAL CELLS WHİCH STORED IN POLYMER IN RATS

Dr.Nijat SÜLEYMANOV

Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Cardiovascular Surgery Narlıdere, İzmir (nijat.suleymanov@deu.edu.tr)

ABSTRACT

Aim: Peripheral arterial disease is an important disease that develops on the basis of atherosclerosis, especially in the elderly. It causes obstruction of the arterial lumen in the lower extremities, decreased blood flow and malperfusion. Advanced medical treatment methods benefit from the reduction of symptoms and better monitoring of the disease, but usually there is no permanent solution. In cases where medical and classical surgical treatment is ineffective, it is important to develop new alternative models for the treatment of PAD patients. The aim of this study is to develop an artificial capillary network model with endothelial cells stored into polymers in rats for use in the treatment of people with peripheral arterial disease.

Materials and Methods: The study was carried out by dividing 35 Wistar-Albino rats into 5 different groups. HUVEC stored in polymer of polyethylene glycol structure. The cell-loaded polymer was implanted into the hind limb of the rats and tissue samples were taken for examination on days 14 and 28. VEGF, CD31, α-SMA, ANG-1 markers were used to investigate the vascular structure of immunohistochemical examination. Statistical significance was accepted as $p < 0,05$.

Results: Statistically significant difference was found between the filled polymers and empty polymers on the 14th and 28th day according to the endothelial scoring and VEGF staging. There was also a statistically significant difference between the 14th and 28th day sections of the filled polymers. Vascular formation was more observed in the sections taken on the 28th day. ANG-1 and α-SMA parameters were found statistically significant difference between empty and filled polymers on day 28. As a result of examining CD31, there was also a difference between the empty and full polymers taken on the 14th day.

Conclusion: With the findings of other studies in the literature and the findings of this study, it has been concluded that the vessel formation is increased by implanting the stem cells into

the animals. In this study, more vascular formation in the samples taken on the 28th day revealed that more studies should be done in order to find the optimum time for vessel formation. In order to be subject to randomized controlled clinical studies (at the top of the epidemiological evidence pyramid) the best cell type, best biomaterial and optimum time should be found with animal experiments.

Key words: peripheral arterial disease, rat, polyethylene glicol, anjiogenesis, VEGF

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Periferik arter hastalığı (PAH) özellikle ilerleyen yaşlarda görülme sıklığı artan ateroskleroz temelinde gelişen önemli bir hastalıktır (1-3). PAH çeşitli sebeplerle alt ekstremitelerde arteriyel lümenin tıkanmasına, kan akışının azalması ve malperfüzyona neden olur (4).

PAH'ın tüm nüfus içindeki sıklığı yaklaşık %13'tür. Tıpkı hipertansiyon (HT) ve kalp hastalıkları gibi yaş arttıkça görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir. PAH'ı olan kişilerde benzer risk faktörlerinden ötürü kardiyak ve serebrovasküler hastalıkların da görülme sıklığı artmıştır. PAH için değiştirilebilir risk faktörleri diyabetes mellitus (DM), HT, sigara kullanımı, hiperlipidemi, ve metabolik sendrom olarak bildirilmektedir. Erkeklerde kadınlardan daha sık görülmektedir (2,5-7). Periferik arter hastalığı yaygınlığı 65 yaş üzerindeki kadınlarda %17, erkeklerde ise %20 olarak bildirilmektedir (8). Türkiye'de diğer Avrupa ülkelerine kıyasla ateroskleroza neden olan kolesterol seviyeleri daha düşük bulunsa da, sigaranın yaygın kullanımı, obezite ve metabolik sendrom, DM ve HT gibi risk faktörlerinin de yaygın olması sebebiyle PAH'ın görülme sıklığı benzer durumdadır (9).

PAH ile ilgili klinik belirtiler damarların belirgin ölçüde tıkanması sonucu ortaya çıkmaktadır. PAH'ı olan kişilerin yaklaşık üçte birinin asemptomatik olabileceği tarama çalışmalarının sonucunda görülmüştür (8). Semptomatik kişilerde intermittan klodikasyo (İK) olarak isimlendirilen yürümek veya koşmakla artan, istirahatle azalan veya tamamen ortadan kaybolan, baldır veya bacak ağrısı görülmektedir (10). Bu ağrı hastalığın ilerlemesiyle istirahatte bile geçmeyecek hale gelebilir (8).

PAH tanısında sistolik kan basıncı ayak bileği-brakiyal indeksi (ABİ) kullanılmaktadır. Ayak bileği-brakiyal indeksi ölçümü invaziv olmayan ve toplumda tarama yapmaya uygun bir yöntemdir. Anjiyografi ile tanı konmasına benzer duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. ABİ 1.0-1.3 arası iken normal olarak kabul edilmektedir. ABI'nin 0.9'dan küçük olması PAH için tanı koydurucudur (8,11-13).

PAH tedavisinde sigarayı bırakma, dengeli beslenme ve düzenli fiziksel aktivite gibi yaşam tarzı değişikliklerinin yanı sıra hiperlipidemi, HT, DM gibi aterosklerotik risk faktörlerinin tıbbi tedavisi gereklidir. PAH'lı kişilerde tedaviye uyum olmaması, morbidite ve mortalitenin artması ve amputasyona neden olacak iskemilerin oluşmasına sebebiyet verebilir (14).

Anjiyogenez var olan vasküler sistemden yeni kan damarı oluşumu sürecidir (15). Terapötik anjiyogenez, dokuların perfüzyonu için gerekli olan vasküler devamlılığın sağlanması için anjiyogenik etki elde edilmesi işlemidir (16). Yetersiz anjiyogenez nedeniyle kan akımının azalmasından kaynaklanan kalp ve diğer dokulardaki hipoksi birçok kardiyovasküler hastalığın seyrini belirler. PAH da bu grup hastalıklardan bir tanesidir (16).

Periferik arter hastalığı taşıdığı riskler nedeniyle erken tanı konması önem arz eden bir hastalıktır (17). Günümüzde gelişmiş medikal tedavi yöntemleri semptomların azaltılmasına ve hastalığın daha iyi seyretmesine fayda göstermekle birlikte genellikle kalıcı çözüm olmaz. İleri evre hastalarda medikal tedavi tek başına yetersiz kalabilmektedir. Bu tip durumlarda cerrahi müdahale ile revaskülarizasyon prognozun iyileştirilmesi için en önemli seçenek olarak yerini korumaktadır (18). Ancak cerrahi müdahale ile damar replasmanının mümkün olmadığı durumların varlığında başka tedavi alternatiflerinin kullanılması gerekmektedir.

Aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların etkin tedavisinde terapötik anjiyogenez müdahaleleri güncel araştırmalarda sıkça ele alınmaktadır (16). Literatüre göre terapötik anjiyogenez çalışmaları bu hastalıkların tedavisinde oldukça umut vadetmektedir (19-21). Medikal ve klasik cerrahi tedavinin etkisiz kaldığı durumlarda PAH'lı kişilere uygulanacak tedaviler için yeni alternatif modeller geliştirilmesi önem arzetmektedir. Bu amaçla da hayvan deneyleri dahil olmak üzere yeni tekniklerin denenmesi gelecekte ileri evre PAH'lı kişilerin tedavisi için yol gösterici olacaktır.

Bu çalışmada; periferik arter hastalığı olan kişilerin tedavisinde kullanılması için ratlarda polimere depolanmış endotel hücreleriyle artifisyel kapiller ağ oluşturma modeli geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Periferik Arter Hastalığı

2.1.1 Tanım

PAH için literatürde yapılan farklı tanımlar aşağıda sıralanmıştır:

"Periferik arter hastalığı; abdominal aortun bifurkasyonu sonrası arterlerinin tıkayıcı lezyonlarını ifade eder" (17).

"Periferik arter hastalığı; ateroskleroz sonucunda bir veya birden fazla periferik arterin parsiyel ya da total tıkanıklığı olarak tanımlanmaktadır" (22,23).

"Periferik arter hastalığı genel olarak ateroskleroz ve tromboembolik fizyopatolojik süreç sonucunda aorta ve visseral dalları ile alt ekstremite arterlerinde yapısal ve fonksiyonel değişiklik meydana gelmesiyle oluşan bir hastalıktır" (24).

PAH aterosklerozun sebep olduğu vücuttaki tüm damarların etkilendiği sistemik hastalığın bir parçası olarak, alt ekstremitelerdeki kan dolaşımının, arteryel sistemdeki aterosklerotik oluşumlara bağlı tıkanmasıdır şeklinde özetlenebilir.

2.1.2 Epidemiyoloji

PAH prevalansının 40 yaş üzeri kişilerde arttığı saptanmaktadır. 50 yaş öncesinde %5 iken, 65 yaş civarında %10; 80 yaş ve üzerindekilerde %25 sıklıkta görülmektedir. 70 yaş ve üzerinde %14,5 saptanmıştır (25,26).

Dünya genelinde PAH prevalansının %3-12 arasında olduğu bildirilmektedir (27).

Framingham çalışması'nda erkeklerde İK'nin görülme sıklığı 35-45 yaş arası erkeklerde binde 0,4'den 65 yaş ve üstü erkeklerde binde 6'ya yükseldiği tespit edilmiştir (28).

İsveç'te 60 yaş üzeri popülasyonda son yıllarda gerçekleştirilen bir araştırmada prevalansı %18 olarak bildirilmiştir (29).

PARTNER kısaltmalı çalışmada 70 yaş üzeri hastalar ile yaşı 50-69 aralığında olmasına rağmen PAH açısından en azından bir tane ek risk faktörü taşıyan toplam 6979 hasta dahil edilmiştir. Sonuç olarak %29 sıklık tespit edilmiştir (30). Bu çalışmanın risk faktörü olanlarda yapılması sıklığın bu kadar yüksek çıkmasına neden olmuş olabilir.

Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise; İzmir'de bir huzurevinde PAH prevalansı %5,9 olarak bildirilmiştir (31). Ancak bu çalışmadaki düşük sıklık da risk altındaki nüfusun tamamının ele alınmayışından kaynaklanmış olabilir.

2.1.3 Risk Faktörleri

Ateroskleroz risk faktörleri PAH için de risk faktörü olarak kabul edilmektedir (32).

1) Ateroskleroz için değiştirilemeyen risk faktörleri

-Yaş

-Cinsiyet

-Irk

-Akrabalarda benzer öykü

2) Ateroskleroz için değiştirilebilir risk faktörleri

-Sigara ve tütün ürünleri kullanımı

-Kan basıncı yüksekliği

-Hiperkolesterolemi

- Hareketsiz yaşam tarzı

3) Ek faktörler

-Ekzojen östrojenler

-Homosistein ve LpA

Bir kişide periferik arter hastalığı riskinin arttığını gösteren risk faktörleri ise (33)

-Yaşın 70'den büyük olması

-Yaş 50-69 arası iken DM veya sigara kullanım öyküsü

-Yaş 40-49 arası iken DM ve bir ateroskleroz risk faktörü varlığı

-İK varlığını düşündürecek bacak ağrıları veya istirahatte bile iskemik ağrı

-Alt ekstremite nabızlarında anormal bulgu

-Bilinen ateroskleroz öyküsü

Yapılan çalışmalarda PAH riski sadece sigara içenlerde 2,3 kat, sigara içen ve DM olan hastalarda 3,3 kat, sigara içen DM ve HT olan hastalarda 6,3 kat artmıştır (34,35).

2.1.4 Klinik Bulgular ve Sınıflandırma

Periferik arter hastalığında klasik olarak en sık görülen semptom intermittan klodikasyodur (36). İK; alt ekstremite kaslarında görülen ağrı ve huzursuzluk hissidir. Çoğu zaman semptomlar baldır bölgesinde yerleşimlidir, ancak bazen uyluk ve kalçayı da etkilediği olur. PAH'lı hastaların 1/3'ünde tipik İK görülür. Çoğunlukla asemptomatik evredeki hastalar da klinik olarak PAH'lıdır.

ACC/AHA'nın 2005 yılı PAH kılavuzunda 50 yaş üstü hastalarda PAH prezentasyonu şöyle bildirilmiştir: (37)

-Asemptomatik : %20-50

-Atipik bacak ağrısı : %40-50

-Klasik klodikasyo : %10-35

-Kritik bacak iskemisi : %1-2

Klinik pratikte iki farklı evreleme türü kullanılmaktadır (38).

1)Fontaine Sınıflaması:

Evre 1: Asemptomatik

Evre 2a: Hafif klodikasyo

Evre 2b: Orta-Ciddi Klodikasyo

Evre 3: İskemik istirahat ağrısı

Evre 4: Ülserasyon veya gangren

2)Rutherford Sınıflaması

Kategori 0 Evre 0: Asemptomatik (Fontaine Evre 1)

Kategori 1 Evre 1: Hafif klodikasyo (Fontaine Evre 2a)

Kategori 2 Evre 1: Orta dereceli klodikasyo (Fontaine Evre 2b)

Kategori 3 Evre 1: Ciddi klodikasyo (Fontaine Evre 2b)

Kategori 4 Evre 2: İskemik istirahat ağrısı (Fontaine Evre 3)

Kategori 5 Evre 3: Minor doku kaybı (Fontaine Evre 4)

Kategori 6 Evre 4: Majör doku kaybı (Fontaine Evre 4)

2.1.5 Tanı

Tanı için ilk olarak İK sorgulanmalıdır. Ağrının dinlenme esnasında dahi olması darlığın daha şiddetli olduğunu gösterir. Sedanter ve yaşlı kişilerde İK yerine bacaklarda gerginlik hissi, soğukluk, his kaybı gibi yakınmalar olabilir. Belli bir yaştan sonra İK yakınmaları yerine bacaklarda gangrenlerin görülmesi daha olasıdır (39).

Ekstremite nabızlarının iki taraf karşılaştırılmalı olarak kontrol edilmesinin tanıda değeri büyüktür.

Noninvaziv yöntemler PAH tespitinde güvenilir ve kullanışlı yöntemlerdir. Bu noninvaziv yöntemler ABİ ölçümü, Egzersiz Treadmill testi, Doppler Ultrasonografi, Manyetik Rezonans Anjiyografi ve Bilgisayarlı Tomografik Anjiyografi olarak sıralanabilir (40). Periferik arter hastalığı tanısında konvansiyonel anjiyografi ise halen altın standarttır (41).

ABİ arteriyel darlık şüphesi olan kişilere yapılabilecek ucuz ve kolay bir testtir. Ayak bileği ve koldan sistolik basınçlar ölçülür. Bu ölçüm ayak bileği/brakiyal kan basıncı indeksi veya oranı olarak tanımlanır. Normal ABİ değeri 1.0-1.3 arasındadır. ABİ'nin 0,9'un altında olduğu durumlar PAH için tanı koydurucudur (8,42).

Doppler Ultrasonografi incelemesi, periferik arterlerin hem anatomik olarak incelenmesinde hem de mevcut arteriyel darlıkların hemodinamik öneminin ortaya konmasında kullanılan önemli bir tanısal araçtır. Doppler Ultrasonografinin özgüllüğü %95, duyarlılığı ise %80-90 olarak rapor edilmiştir (43).

2.1.6 Tedavi

PAH tedavisinde ilk aşama ateroskleroz risk faktörlerinin mümkünse ortadan kaldırılmaya çalışılmasıdır. Bunun için yaşam tarzı değişikliği, sigarayı bırakma gibi durumlara eğilinmelidir. Bunların yeterli olmadığı hastalarda medikal tedaviden başlamak üzere kademeli olarak mevcut tedavi olanakları değerlendirilmelidir.

2.1.6.1 Medikal Tedavi

Aterosklerozun damar tıkanıklığı etkisini ortadan kaldıracak olan anti-hiperlipidemik, anti-hipertansif, anti-trombositer ilaçlar PAH'ın medikal tedavisinin ilk aşamasıdır. Bunlar PAH'a spesifik tedaviler değildir.

Silostazol; vazodilatör, metabolik ve antitrombosit aktivitesi olan bir fosfodiesteraz III inhibitörüdür. Bu ilacın faydaları 1751 hastayı kapsayan randomize kontrollü altı çalışmanın meta-analizinde tanımlanmıştır. Silostazol plaseboya kıyasla maksimum yürüme mesafesinde 50-70 m iyileşme sağlamıştır. Silostazol tedavisi aynı zamanda yaşam kalitesi ölçümlerinde de genel bir iyileşme sağlamıştır. Silostazolü pentoksifilin ile karşılaştıran bir çalışmada silostazol daha etkili bulunmuştur (44-46). Naftidrofuril hakkında literatürde yapılan bir analize göre ağrısız yürüme mesafesini arttırıcı etkisi ortaya konmuştur (45). Ancak naftidrofuril hakkında genel anlamda sonuçların çelişkili olması ve Türkiye'de bulunmaması nedeniyle kullanımının olmadığını hatırlatmak gerekir (38). Revaskülarizasyona uygun olmayan hastalarda etkin medikal tedavi seçeneği olarak iloprost perfüzyonu ile amputasyondan kaçınma veya major amputasyon olasılığının minor amputasyona dönüşmesi ihtimalinden literatürde söz edilmektedir (38).

Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü mitojenik ajanlardır ve yeni damarların gelişmesini uyarırlar. Temel fibroblast büyüme faktörü proteini arter içine verildiğinde klodikasyolu hastaların egzersiz performansında artış gözlenmiştir. Yeni uygulamalarda ajan, kas içine (intramüsküler) viral vektörler ile gen tedavisi olarak verilmiştir. Ancak VEGF ile yapılan ilk çalışmalar iyi sonuçlanmamıştır. Bu yüzden anjiyojenik büyüme faktörlerinin klodikasyo tedavisindeki genel etkinlikleri ile ilgili daha çok çalışmalara ihtiyaç vardır (47,48).

Tablo 1. Periferik Arter Hastalıklarında Medikal Tedavi Yaklaşımları

Kalp krizi, felç ve kardiyovasküler nedenli ölüm risklerinin azaltılması için	**Yaşam kalitesinin düzeltilmesi ve ampütasyonun engellenmesi için**
Tütün ürünü kullanımı bırakılması	Tütün ürünü kullanımı bırakılması
Yürüme egzersiz programı	Yürüme egzersiz programı
Kan basıncı kontrolü	Silostazol
Antiagregan tedavi	İyi ayak bakımı
Yüksek doz statin tedavisi	Revaskülarizasyon

Tablo 1'de PAH için güncel medikal tedavi yaklaşımları sunulmuştur (38).

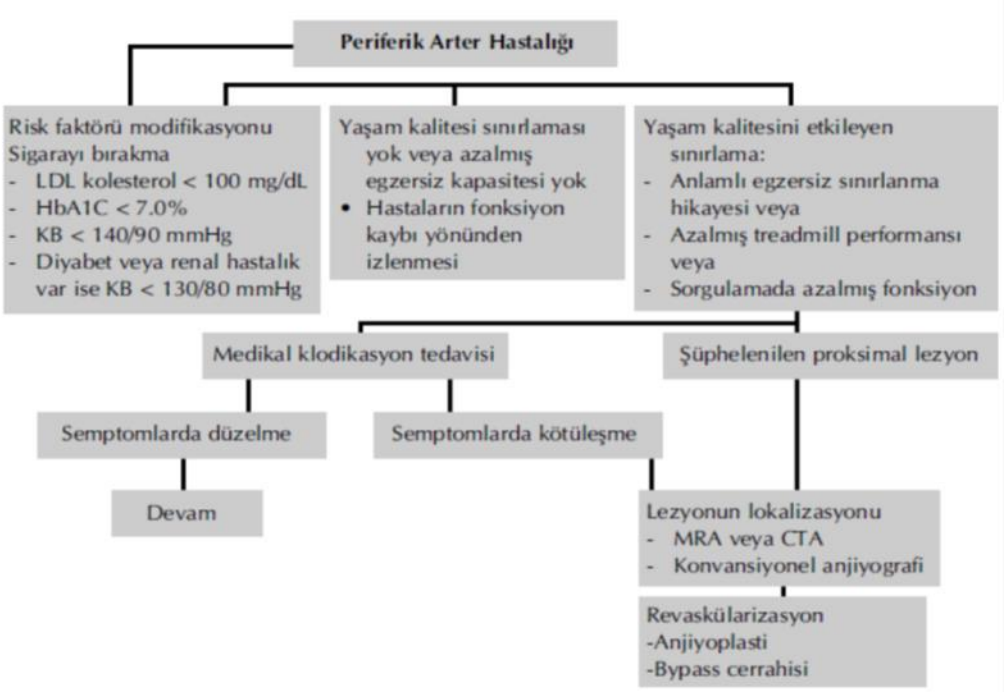
2.1.6.2 Girişimsel ve Cerrahi Tedaviler

Yöntem olarak cerrahi müdahaleyi ve girişimsel radyolojik yöntemleri içeren endovasküler cerrahi olmak üzere başlıca iki revaskülarizasyon yöntemi vardır. Hastadaki lezyonun sayısı ve derecesi, lokalizasyonu, eşlik eden hastalıkları yani sistemik riskleri ve kısa uzun dönem beklentilere göre bu iki yöntemden hangisinin seçileceğine karar verilir. Örneğin tek, kısa ve daraltıcı bir lezyonda endovasküler tedavinin başarısı oldukça yüksek iken, uzun tıkalı ve çok sayıda segmentin hastalıklı olduğu durumlarda endovasküler yöntemlerin başarı şansı azalmaktadır. Daha objektif bir karar mekanizması lezyonların lokalizasyon, uzunluk ve özelliğine göre geliştirilmiştir

Endovasküler cerrahi tedavi için temel endikasyonlar lezyonu yerine bağlı olarak değişmekle beraber yaşam kalitesini ciddi boyutta etkileyen ve uygulanan tedavi yöntemlerine yeterince yanıt vermeyen klodikasyo, ekstremiteyi tehdit eden iskemi, istirahat ağrısı ve ekstremitede iyileşmeyen yaralardır. Bazen de cerrahi girişim öncesi bypass damarına kan akımını arttırmak için proksimaldeki lezyonlar için endovasküler girişim gerekli olabilir. Klodikasyo tedavisinde endovasküler tedavi medikal ya da konservatif tedavi yöntemlerine göre kısa dönem için daha başarılı sonuçlar vermektedir. Endovasküler yöntemlerde başarıya etkiyen en önemli faktör distal damar yatağının durumudur (49).

Diğer tedavi yöntemlerinin denenip başarısız kaldığı olgularda eğer cerrahi risk düşükse cerrahi tedavi uygulanabilir. Diğer tüm yöntemlere cevap vermeyen ve yaşam kalitesini büyük oranda bozan durumlarda gerekirse klodikasyo için cerrahi tedavi

uygulanabilir. Ancak cerrahi tedavi hiçbir zaman klodikasyo için ilk basamak tedavisi değildir. Klodikasyo'nun kritik iskemiye ilerlemesini de engellemez. Öte yandan kritik iskemi varlığında cerrahi tedavi tek başına ya da endovasküler tedavi ile birlikte en önemli tedavi seçeneğini oluşturur.



Şekil 1. Periferik Arter Hastalarına Genel Yaklaşım (38)

2.2 Anjiyogenez

Anjiyogenez, büyüme ve gelişme ile yara iyileşmesi gibi süreçlerde olması beklenen bir olaydır. Bununla beraber bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir. Anjiyogenezi tetikleyen ve önleyen faktörler arasındaki denge bozulduğu takdirde dengenin bozulduğu yön lehine anjiyogenezde eksiklik veya fazlalık görülebilir (15).

Kanser, romatoid artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi inflamatuar hastalıklarda, maküler dejenerasyon gibi değişik göz hastalıklarında patolojik olarak anjiyogenez meydana gelmektedir. Periferik arter hastalıkları, kalp yetmezliği, infertilite ve gecikmiş yara iyileşmesi gibi durumlarda ise anjiyogenezde yetersizlikler saptanmıştır (50).

Yeni oluşan mikrodamarların olgunlaşması ve yapılandırılması proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengeye bağlıdır. Bu süreç mikrovasküler düzeyde birden çok proanjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörün koordinasyonu ile olmaktadır. Bu faktörler

tümör hücreleri, monosit ve fibroblast gibi ortamdaki hücrelerden veya kollajen matriksin yıkımı sonrasında ortaya çıkabilir. (51)

Tablo 2. Anjiyogenezi Etkileyen Faktörler Listesi

Anjiyogenezi inhibe edenler	**Anjiyogenezi uyaranlar**
Trombospondin	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
Anjiyostatin	Ana Fibroblast büyüme faktörü
Endostatin	Asit Fibroblast büyüme faktörü
AaAt	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
Vazostatin	Hepatosit büyüme faktörü
Prolaktin	Epidermal büyüme faktörü
Troponin 1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
Anjiyopoetin-2	Dönüşen büyüme faktörü a
Alfa interferon	Dönüşen büyüme faktör b
Gamma interferon	Tümör nekrozis faktör α
İnterlökin 12	Plasental büyüme faktörü
Fibronektin	Anjiyopoetin-1
Metalloproteinaz doku inhibitörleri	Anjiyogenin
Plazminojen aktivatör inhibitör 1	Pleotrofin
Platelet faktör 4	Interlökin 8
Pigment epitelyal hücre faktörü	Granulosit koloni uyarıcı faktör

Bu faktörler içerisinde en önemli olanı vasküler endotelyal büyüme faktörüdür (VEGF). Endotel hücreleri üzerinde mitojenik bir etkiye sahiptir (52).

Literatürde bahsedilen terapötik anjiyogenez modelleri (53)

1)Protein Bazlı Tedaviler

-VEGF ailesi

- Fibroblast büyüme faktörü

-Platelet kaynaklı büyüme faktörü

-Plasental büyüme faktörü

-Hepatosit büyüme faktörü

2) Anjiyogenez İçin Gen Tedavileri

Gen tedavisi, günümüzde gelişen rekombinant DNA teknolojisi aracılığı ile uygulama alanına giren bir tedavi yöntemidir. Hücrede eksik olan veya fonksiyonuna ait bir anomali bulunan gene ait bir parçanın, uygun bir vektör aracılığı ile hedef hücrelere gönderilmesi, bu tedavinin esasını oluşturmaktadır. Burada taşıyıcı molekül olarak genetik olarak işlenmiş DNA virüsleri veya retrovirüsler sıklıkla kullanılmaktadır. Aktarılan gen, içine girdiği hücre tarafından kabul edilmekte ve bu gen ürünü hücre içinde eksik olan fonksiyonları oluşturulmaya başlanmaktadır (54). Tedavide istenen geni içeren vektörün belli bir bölgeye kolayca aktarılabilmesidir.

3) Hücre Tedavileri

Dünyada kök hücre çalışmaları geniş ilgi uyandırmakta ve araştırma sayısı her yıl artarak devam etmektedir (55). Yakın geçmişte genetik bilimi ve doku mühendisliğindeki ilerlemelerle, mevcut tedavi yöntemleriyle hastalığın ilerleyişinin durdurulamadığı hasta gruplarında, anjiyogenezisi sağlamaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (56-58). Kök hücre veya öncül hücrelerin kullanılarak anjiyogenez ile doku iyileşmesini sağlayan hücre tedavileri gelecek için oldukça umut vadetmektedir. Şu anda literatürde öne çıkan klinik çalışmalar kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin PAH hastalarına damar içi veya kas içi enjeksiyonuyla verilmesi üzerinedir. Yapılan çalışmalarda kemik iliği mezenşimal kök hücrelerinin kemik iliği mononükleer kök hücrelerine üstünlük sağladığı gösterilmiştir. Aynı durumda mezenşimal hücrelerin 4 hafta önceden iyileşme sağladığı görülmüştür. Ancak kemik iliği mezenşimal hücreleri elde etmenin zorluğu ve metodun invazivliği sebebiyle kullanılması nadir görülmektedir. Periferik mononükleer kan hücreleri ile kemik iliği mononükleer kök hücrelerinin kıyaslandığı çalışmada periferik hücrelerin bazı alanlarda

üstünlük sağlayabildiği gösterilmiş. Tedaviden oniki hafta sonra periferik hücre kullanılan deneklerde sıcaklığın daha çok arttığı, ABİ indeksinin daha fazla düzeldiği, istirahat ağrısını daha çok azalttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada klasik ilaç tedavilerine göre hücre tedavilerinin üstünlük sağladığı da gösterilmiştir (59,60)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Kapsamı

Araştırma 35 adet 200-250 gr ağırlığında dişi Wistar-Albino cinsinde sıçan ile yürütülmüştür. Araştırma için Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 29/2017 protokol nolu kararı ile onay alınmıştır. Etik Kurul onay formu ektedir (Ek-1)

35 adet hayvan deney için şu şekilde gruplandırılmıştır.

Grup 1: Sham grubudur. 7 adet hayvan deneyin başladığı gün hiçbir ek işleme tabi tutulmadan anestezi altında etik kurallara uygun şekilde normal doku örneği alınarak sakrifiye edilmiştir. Hayvanlarda görülen normal anatomik damar yapısı ile deney sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Grup 2: 7 adet hayvana deneyin başladığı gün içinde hücre olmayan polimer yapısı yerleştirilmiş ve takip edilen 14.günde anestezi altında etik kurallara uygun şekilde doku örneği alınarak hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Grup 3: 7 adet hayvana deneyin başladığı gün içinde hücre olmayan polimer yapısı yerleştirilmiş ve takip edilen 28.günde anestezi altında etik kurallara uygun şekilde doku örneği alınarak hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Grup 4: 7 adet hayvana deneyin başladığı gün içine endotel hücresi depolanmış polimer yapısı yerleştirilmiş ve takip edilen 14.günde anestezi altında etik kurallara uygun şekilde doku örneği alınarak hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

Grup 5: 7 adet hayvana deneyin başladığı gün içine endotel hücresi depolanmış polimer yapısı yerleştirilmiş ve takip edilen 28.günde anestezi altında etik kurallara uygun şekilde doku örneği alınarak hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

3.2 Araştırmada Kullanılan Araç-Gereç

Araştırmada 35 adet, 200-250 gr ağırlığında, Wistar-Albino cinsi genç erişkin 3 aylık dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar standart sıçan yemi ve şebeke suyu ile sınırsız olarak beslenmişlerdir. Laboratuvarda 22 santigrat derece %55 nem ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olma şartları sağlanmıştır.

3.2.1 Endotel Hücrelerinin Hazırlanması

Bu çalışmada polimer yapı içerisinde "İnsan Umblikal Veni Endotel Hücreleri" kullanılmıştır. Literatürdeki adı "Human Umbilical Vein Endothelial Cells" (HUVEC) idir. Hücreler 110.000 hücre/ml. yoğunlukta %2 Fetal Bovin Serum (FBS) içeren Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM-2) serum ortamı içinde kültive edildi. 1300 devirde 5 dakikalık santrifüj sonrası pellet %10 insan plazması içeren EGM-2 besiyerinde pipetaj ile homojen dağıtılarak bir adet jelatin kaplı T25 flaska aktarıldı ve 37°C'de %5 karbondioksit etüvünde inkübasyona alındı. Hücreler slayt üzerine ekilerek CD31 için immun floresan (IF) olarak boyandı. Paraformaldehit (PFA) ile sabitlenen hücreler Phosphate Buffered Saline (PBS) yani fosfat tamponlu tuz ile yıkandıktan sonra % 0.1 Triton X-100 ile permeabilize edildi. Yüzey serum ile 30 dakika 37 santigrat derecede bloke edildikten sonra hücreler bir gece boyunca 40 santigrat derecede 1:100 seyreltilmiş anti-CD31 birincil antikor çözeltisi içinde bekletildi. HUVEC hücrelerinin damar ağı oluşturma potansiyellerini değerlendirmek amacıyla anjiyogenez testi yapıldı. Pasaj 2-3 HUVEC hücreleri jelatin kaplı T25 flaska alındı ve üzerlerine yeterince heparin içermeyen EGM-2 + % 10 insan kan plazması eklendi. Flask %5 karbondioksit etüvünde inkübasyona bırakıldı. Bir hafta sonunda hücreler konfokal mikroskopta incelendi.

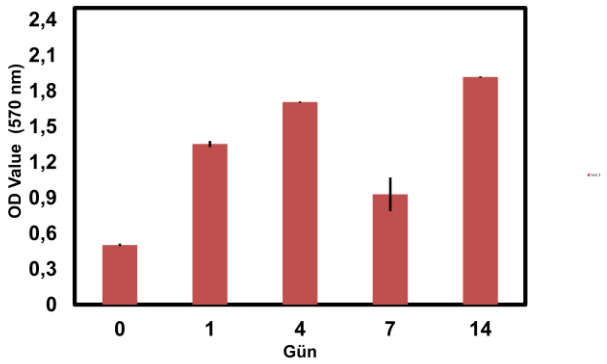
3.2.2 Üç Boyutlu Makro Gözenekli Nanofibröz Poli L-Lactide (PLLA) Doku İskelelerinin Üretimi

Viskozitesi yaklaşık 1,6 dl/g olan PLLA tetrahidrofuranda çözdürülür. Çözelti düşük vakum altında, şekerle hazırlanmış kalıba dökülür. Polimer-şeker kompoziti, faz ayrımı için gece boyunca 20 santigratta tutulur. Daha sonra kompozit, tetrahidrofuranı uzaklaştırmak için 2 gün boyunca sikloheksanda bekletilir. Ardından, elde edilen kompozitler 2 gün boyunca liyofilize edilerek solvent uzaklaştırılır. Şeker küreleri, distile suyla yıkanarak uzaklaştırılır ve gözenek boyutu 60-150 um olan makro gözenekli nanofibröz doku iskeleleri elde edilir. Daha sonra doku iskeleleri, çapları 5 mm ve kalınlığı 1 mm olan dairesel diskler şeklinde kesilip hazırlanır.

3.2.3 Endotel Hücrelerin MTT Karakterizasyonu

Üç boyutlu makro gözenekli nanofibröz polietilen glikol (PEG) doku iskelelerinin sitotoksik etkileri dietiltiazol difenil tetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılığı testi kullanılarak belirlendi. MTT testi; çeşitli kimyasal ajanların sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmakta olup hızlı, kesin ve duyarlı sonuçlar vermektedir.

MTT bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat dehidrogenaz enzimine spesifiktir. Bu yöntemde canlı hücrelerin mitokondrisinde yer alan süksinat dehidrogenaz enzimi MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen formazan tuzları oluşturur. MTT yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen değer, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri artış göstermektedir. Bu test ile çapraz bağlanmış hidrojellerin sitotoksik etkileri 24, 48, 72 saat muamele sürelerinde HUVEC sağlıklı hücre hattında belirlenmiştir. Söz konusu hidrojellerin ön denemeler sonucunda belirlenecek olan çeşitli konsantrasyonları hücre hatları ile muamele edildi. Uygulamada MTT test kitinin protokolü takip edildi.



Şekil 2: MTT Canlılık Testi Sonuçları

Hücrelerin çoğalması optik yoğunluk değerleri ile takip edildi. Hücre sayısının 4. güne kadar logaritmik olarak arttığı, ancak 7. günde bir azalmanın olduğu görülmektedir. 14. gündeki optik yoğunluk değeri, çoğalmaya devam eden hücre sayısında önemli bir düşüş olmasına rağmen hücre sayısının arttığını göstermektedir. 4. günden sonra; jellerin merkezinde bulunan hücrelerin, statik kültür koşulları nedeniyle yeterli bir besin ve oksijene erişemediğini ve öldüğünü göstermektedir. Arayüzdeki hücreler ise besin ve oksijen kaynağına ulaşmışlar ve çoğalmaya devam edebilmişlerdir.

3.2.4 Endotel Hücrelerin Polimerik Taşıyıcılar Üzerinde Çoğaltılması ve Kılcal Damar Ağı Oluşumunun Değerlendirilmesi

Polimerik taşıyıcıların her bir yüzü 15 dakika ultraviyole ışığa maruz bırakıldı. HUVEC pasaj 2-3 kaldırıldı ve PEG üzerine 24 kuyucuklu plakalara ekildi. “EGM-2 + %5 insan kan plazması + 2 U/mL heparin” ve “Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient

Mixture F-12 (DMEM/F12) + % 10 insan kan plazması + 4 U/mL heparin + % 0.2 primocin + % 0.5 litre glutamine" olmak üzere iki farklı besiyeri kullanıldı. Kuyucuğun içindeki polimerik taşıyıcılara besiyeri içinde kuyucuk başına 75.000 hücre ekildi ve %5 karbondioksit etüvünde inkübasyona bırakıldı. 5 günlük inkübasyondan sonra kültür sona erdirildi. HUVEC kültürü anti-CD31 antikoru ile boyanıp floresan mikroskopta incelendi.

Çalışmada farklı literatürler ışığında polimerik taşıyıcılara aynı prosedür baz alınarak 15.000 hücre ile EGM-2 + % 5 insan kan plazması + 2 U/mL heparin ve DMEM + % 5 insan kan plazması + 2 U/mL heparin + % 0.2 primocin içeren (1:1) karışım besiyeri ve tek başına DMEM + % 5 insan kan plazması + 2 U/mL heparin + % 0.2 primocin içeren besiyerine hücre ekimi yapıldı. İki haftalık inkübasyon sonrası endotel hücreli taşıyıcılar endotel hücre belirteci olan CD31 faktörü için IF olarak boyandı ve damar ağı varlığının saptanması için floresan mikroskopta incelendi (61).

3.2.5 Vasküler Dokuların Doku Mühendisliği İle Oluşturulması

3 boyutlu nanofibröz PEG iskeleleri 30 dakika boyunca %70'lik etanol içinde önceden ıslatılır, ardından PBS ile üç kez 30 dakika yıkanıp ve her biri 2 saat süreyle hücre kültürü ortamında iki kez yıkanır. 5 x 105 insan HUVEC türevi endotel hücreleri ekilir. 24 saat inkübasyonun ardından hücre iskele yapıları sıçanlara implant edilir.

3.2.6 İmplantların Histolojik İncelenmesi

Deneklerden alınan doku örnekleri histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fiske edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlerden rutin ışık mikroskobik incelemeler için hematoksilen-eozin ve masson trikrom boyamaları yapıldı.

3.2.6.1 İmmünohistokimyasal İncelemeler

Alınan kesitler öncelikle 60 ºC'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Ardından

dokular 15 dakika 370 santigrat derecede tripsin ile muamele edildi. 3 kez fosfat tamponlu saline (PBS) ile yıkanan kesitler 10 dakika hidrojen peroksit ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 1 saat bloklama solüsyonu (TA125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile bekletildi. Primer antikor olan rat spesifik anti-VEGF antikoru (1:100; Bios, 1932R, Rb aVit), anti-CD 31 antikoru (1:100), anti-α SMA antikoru ve anti-ANG 1 antikoru ile + 4 ºC' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain Kit, San Francisco, USA) ile 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminabenzidinamine (DAB) (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.2.6.2 Semikantitatif İmmunohistokimyasal Analiz

Hücrelerdeki VEGF, α SMA, CD 31 ve ANG 1 moleküllerinin dağılımını belirlemek için Anti- VEGF, Anti- α SMA, Anti- CD 31 ve Anti- ANG 1 Antikor boyaması yapıldı. Gruplar arası moleküllerinin dağılımını belirlemek için, her denekten elde edilen kas dokusu örneklerinden immun tutulum yoğunluğuna göre semikantitatif ölçümler yapıldı.

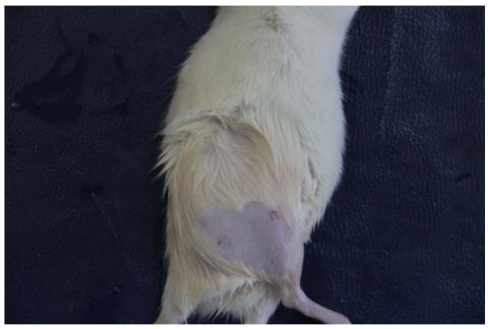
3.3 Araştırmanın Uygulama Şekli

Hücre yüklü polimer sıçanların arka bacak lateral femur kaslarından musculus biceps femoris ile musculus quadriceps femorisin arasına gömülmüştür. Burası hayvanın hareketlerini kısıtlamayan yaşam kalitesini ve refahını en az etkileyen bölge olduğu için seçilmiştir. Daha sonra 14. ve 28. günlerde aynı bölgeden örnekler alınıp preparatlar hazırlanmış ve immünohistokimyasal inceleme ile ışık mikroskobu altında kapiller ağ yapısı oluşumlarına bakılmıştır.

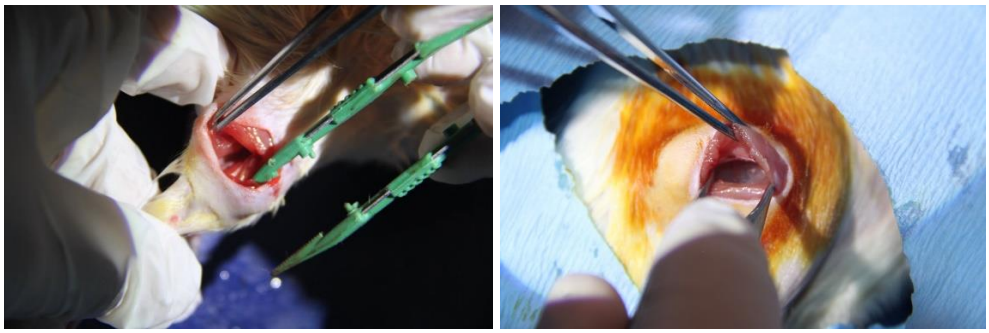


Şekil 3: İmplante Edilen Polimer Parçacığı

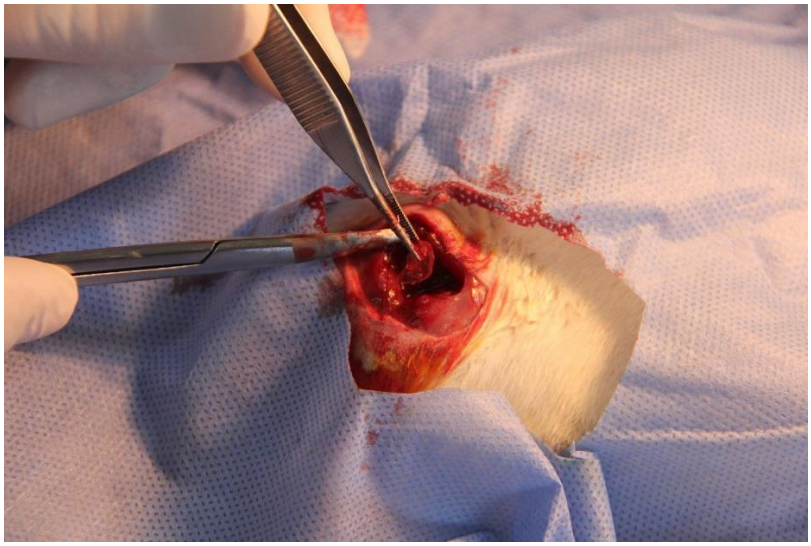
Tüm gruplardaki sıçanlar 45 mg/kg Ketamin/ 7mg /kg Xylazin intraperitonel uygulama yoluyla anestezi altına alınmıştır. Daha sonra hayvanlar supin pozisyonu verilerek tespit edilmiştir. Daha sonra arka bacak bölgesi traş ve dezenfeksiyonu yapılarak asepsi sağlanmıştır.



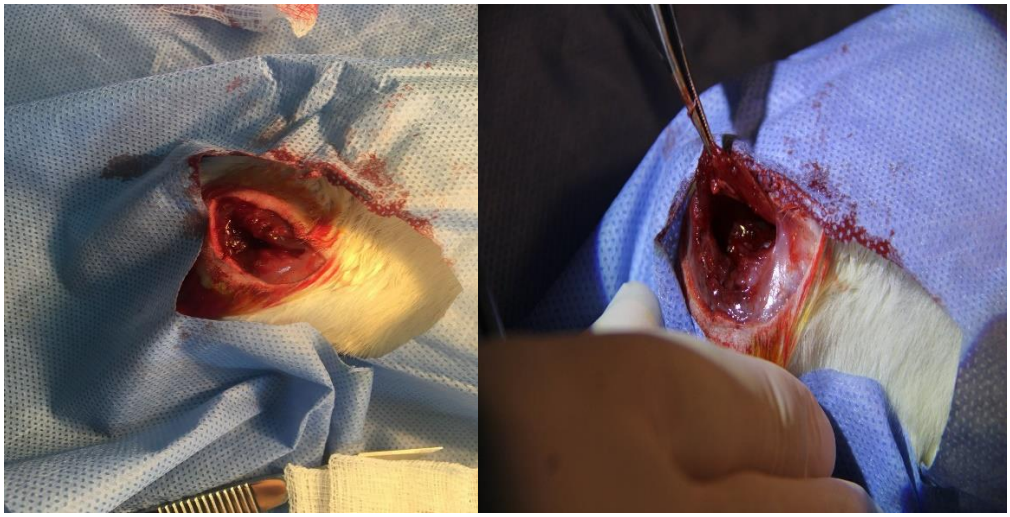
Şekil 4: Operasyon Öncesi Hazırlıklardan Bir Kesit



Şekil 5: Sıçanların İmplant İşlemi İçin Hazırlanmasından Bir Kesit



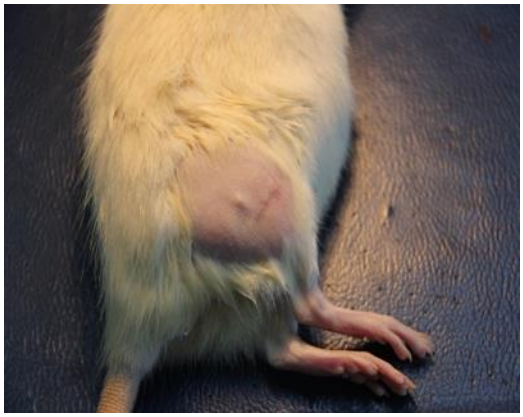
Şekil 6. Polimer Parçasının Yerleştirilmesinden Bir Kesit



Şekil 7: İmplantasyonun Yapılmasından Sonra Doku Kesiti



Şekil 8: İşlemler Tamamlandıktan Sonra Dokuların Kapatılmasından Kesitler



Şekil 9: Operasyondan Sonra İyileşmiş İnsizyon Görüntüsü

Grup 1'deki (sham) sıçanlara hücre implantasyonu yapılmamış sadece musculus biceps femoris ile musculus quadricesp femorisin arasından doku örneği alınmıştır. Tüm katlar anatomik plana uygun olarak 6-0 prolen sütur ile steril olarak kapatılmıştır.

3.4 Araştırmada Kullanılan Terimler

VEGF: VEGF, 46 kDa ağırlığında, homodimerik, heparine bağlı glikoprotein yapısında bir moleküldür. VEGF'in etkisini gösterebilmesi için, endotel hücreleri ve lenf damarları üzerinde bulunan özgün transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması gereklidir. Bağlanma sonucu aktifleşen VEGF reseptörleri hücre içerisinde sinyal iletisi sağlayan bir dizi proteini fosforilize eder. Bu olay da ikincil habercilerin oluşmasına katkıda bulunarak, endotel hücrelerin çoğalmasını ve göçünü sağlar (51).

CD 31: 130 kDa olup immünoglobulin süperfamilyasına aittir ve normal koşullarda damar endotelinde yüksek düzeyde bulunmaktadır. Bu molekül, diğer proteinlerin endotele yanaşmasına ve onların kenetlenmesine yardımcı olur (20,21).

ANG-1: Kırkaltı kDa ağırlığında, glikoprotein yapıda molekül olan anjiyopoietinler amino terminal ucunda anjiyopoietine spesifik alan içeren glikoprotein yapıda moleküllerdir. Anjiyopoietinler etkilerini Tie 2 reseptör üzerinden gösterirler. Tie 2 reseptöre bağlanıldığında, reseptörde dimerizasyon, otofosforilasyon ve hücre içi sinyal iletim yollarında aktivasyon başlar. Aktiflenen hücre içi iletim sistemine bağlı damar stabilizasyonu kontrolü sağlanır (20,51).

α-SMA: Vasküler düz kas aktinlerinin bir izoformudur. Vasküler hareketlilik ve kasılmaya katkıda bulunan vasküler düz kas hücrelerinde tipik olarak eksprese edilir (20,57).

3.5 Araştırma Verisinin Düzenlenmesi ve Analizi

Araştırma verisi SPSS 22.0 istatistik paket programı aracılığıyla değerlendirilmiştir. Araştırmada sınırlı sayıda hayvan kullanıldığı için verilerin normal dağılıma uygunluğu incelenmeden non-parametrik analiz yöntemleri tercih edilmiştir. Tanımlayıcı değişkenler ortanca (min:maks) şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel yöntem olarak Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

İmmunohistokimyasal incelemede damar oluşumunu belirlemek için semi-kantitatif skorlama sistemi kullanılmıştır. Grade 1; çok az pozitif boyanma olduğunu ve boyanın hafif tutulduğunu göstermektedir. Grade 2; grade 1 ile 3 arasında bir tutulum olup orta derecede boyanmaya işaret etmektedir. Grade 3; tüm görüntü sahasında güçlü boyanma olduğunu ve neredeyse eşit derecede dağıldığını ifade etmektedir. Sıfır ise hiçbir immünolojik reaksiyon olmadığı anlamına gelmektedir (62).

Endotel skorlama sisteminde ise her bir sıçan için alınan örneklerden üç farklı alanda sayım yapılarak endotel sayılarının ortalaması verilmiştir.

4.BULGULAR

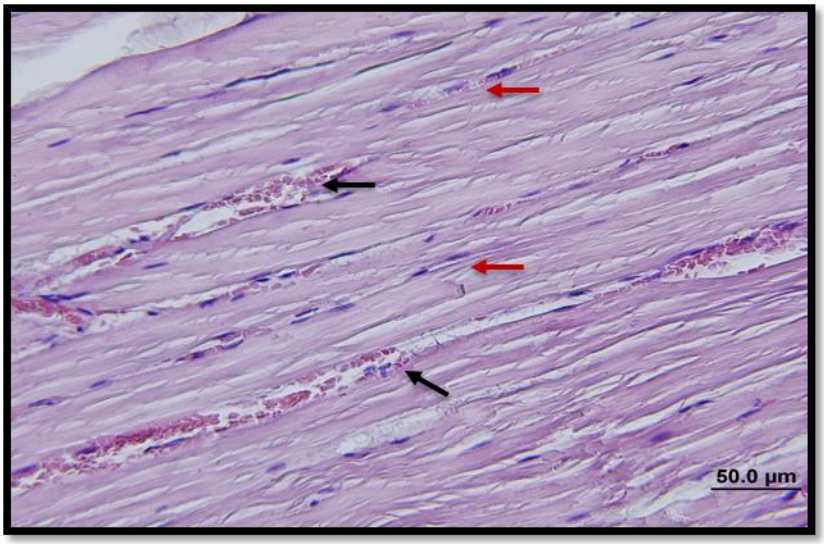
Hematoksilen Eozin ve masson-trikrom boyamalar uygulanarak kontrol, 14 ve 28. günlerdeki PLLA polimerin boş ve deneklere implante edilen dolu şekilleri incelenmiştir. İmmünsitokimyasal olarak da CD31, ANG-1, A-SMA, VEGF antikorları ile immün boyamalar yapılmıştır.

4.1 Histokimyasal Bulgular

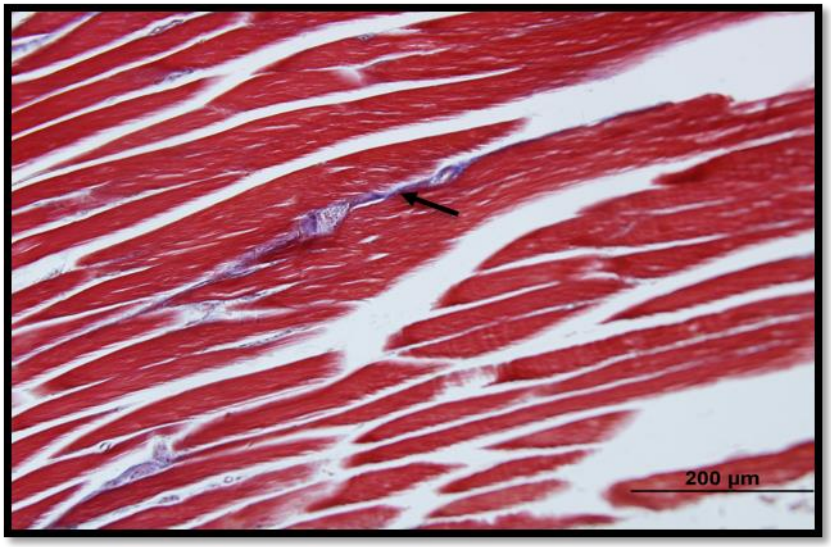
Kontrol grubunda çizgili kasa ait kesitlerde çizgili kas hücrelerinin normal olarak gözlendiği, herhangi bir deformasyon, çizgilenme kaybı, mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem, bağ dokusu artışı rastlanmadı ve damarsal yapıların olağan olduğu gözlendi.

Bağ dokusu içeriğinin tüm gruplarda kültür süresi uzadıkça artmaya eğilimli olduğu dikkati çekti. 14 ve 28 günlük boş polimerin implante edildiği gruplarda yer yer bazı alanlarda mononükleer hücre infiltrasyonu, damarlanmada ve etraftaki bağ doku oluşumunda artış gözlendi. Bu bulgular 28 günlük grupta daha yoğun olarak izlendi. 28 günlük boş polimer grubunda etrafını saran bağ doku ve kas dokusunun polimeri iyice sardığı hatta bazı bölgelerde dejenerasyona uğratarak polimeri hacimce azalttığı gözlendi.

KONTROL GRUBU

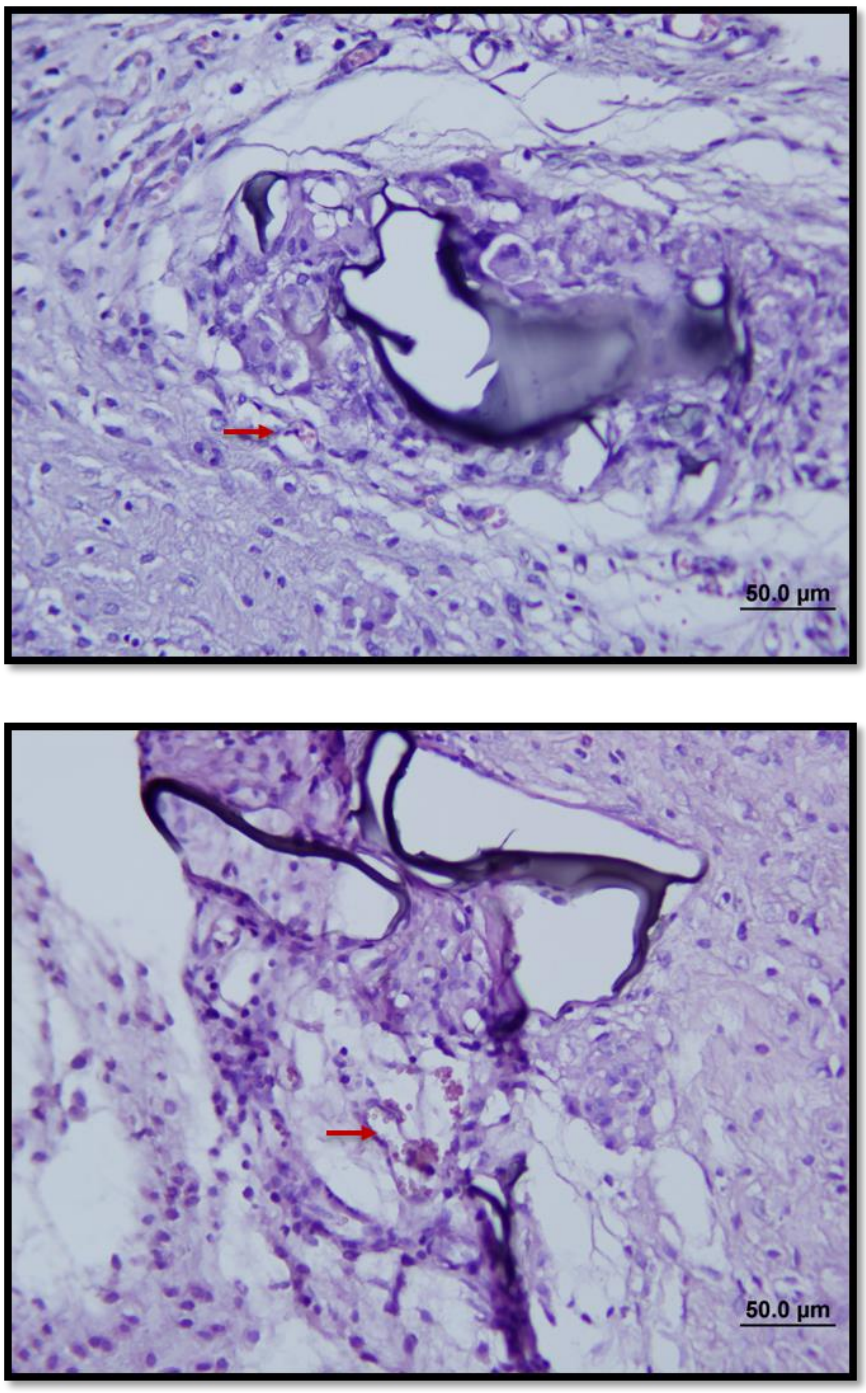


Şekil 10: Kontrol grubuna ait kesit. Çizgili kas hücreleri (↔) ve kan damarları (→)görülmektedir. H&E x40 büyütme. Bar 50.0µm.



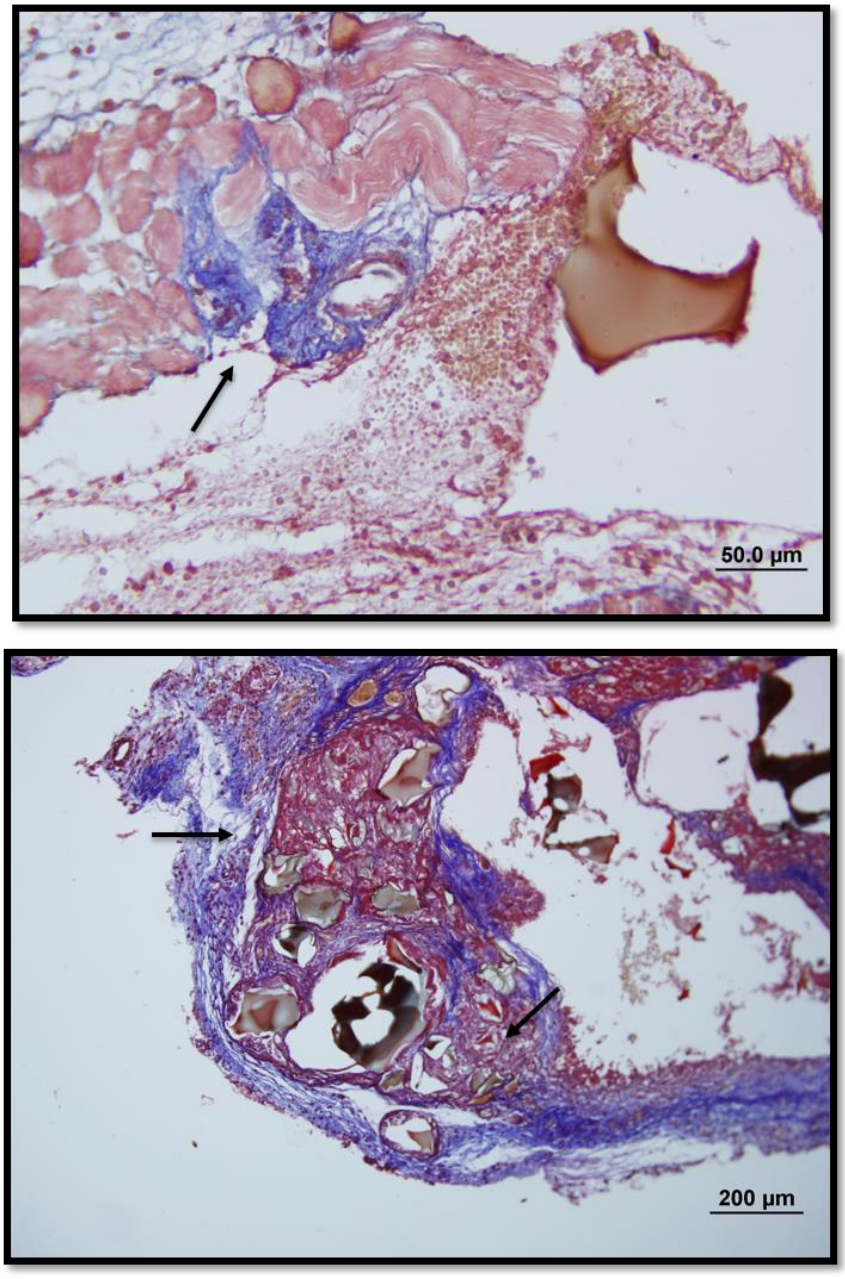
Şekil 11: Kontrol grubuna ait kesit. Normal bağ dokusu yapısı görülmektedir. Masson Trikrom 10 büyütme. Bar 200µm.

14 GÜN BOŞ POLİMER



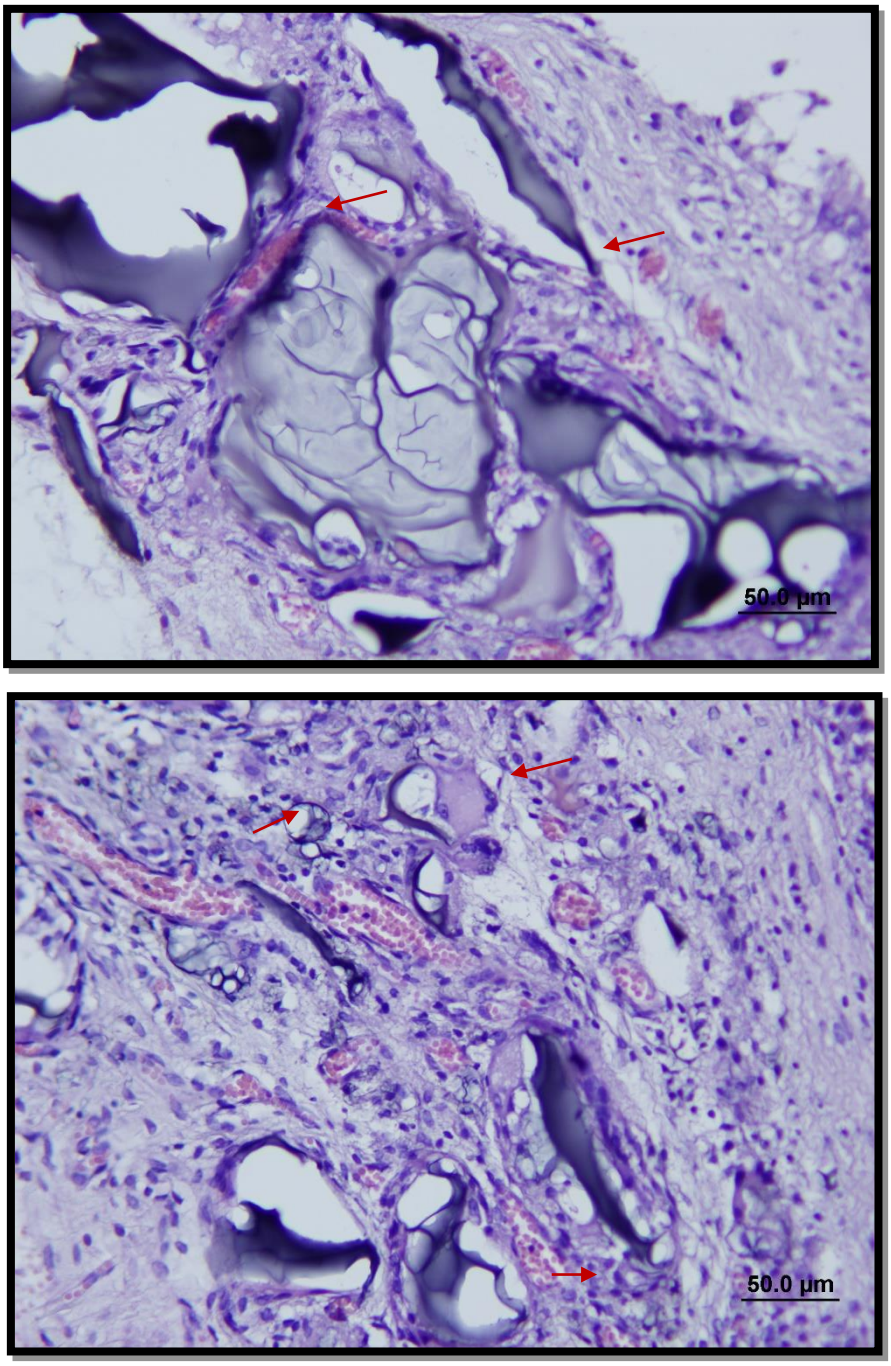
Şekil 12: 14. gün boş polimer içeren kas dokusuna ait kesit. Polimer etrafındaki kas dokuda, yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu ve kan damarları (→) görülmektedir. H&E x40 büyütme. Bar 50.0µm.

14 GÜN BOŞ POLİMER



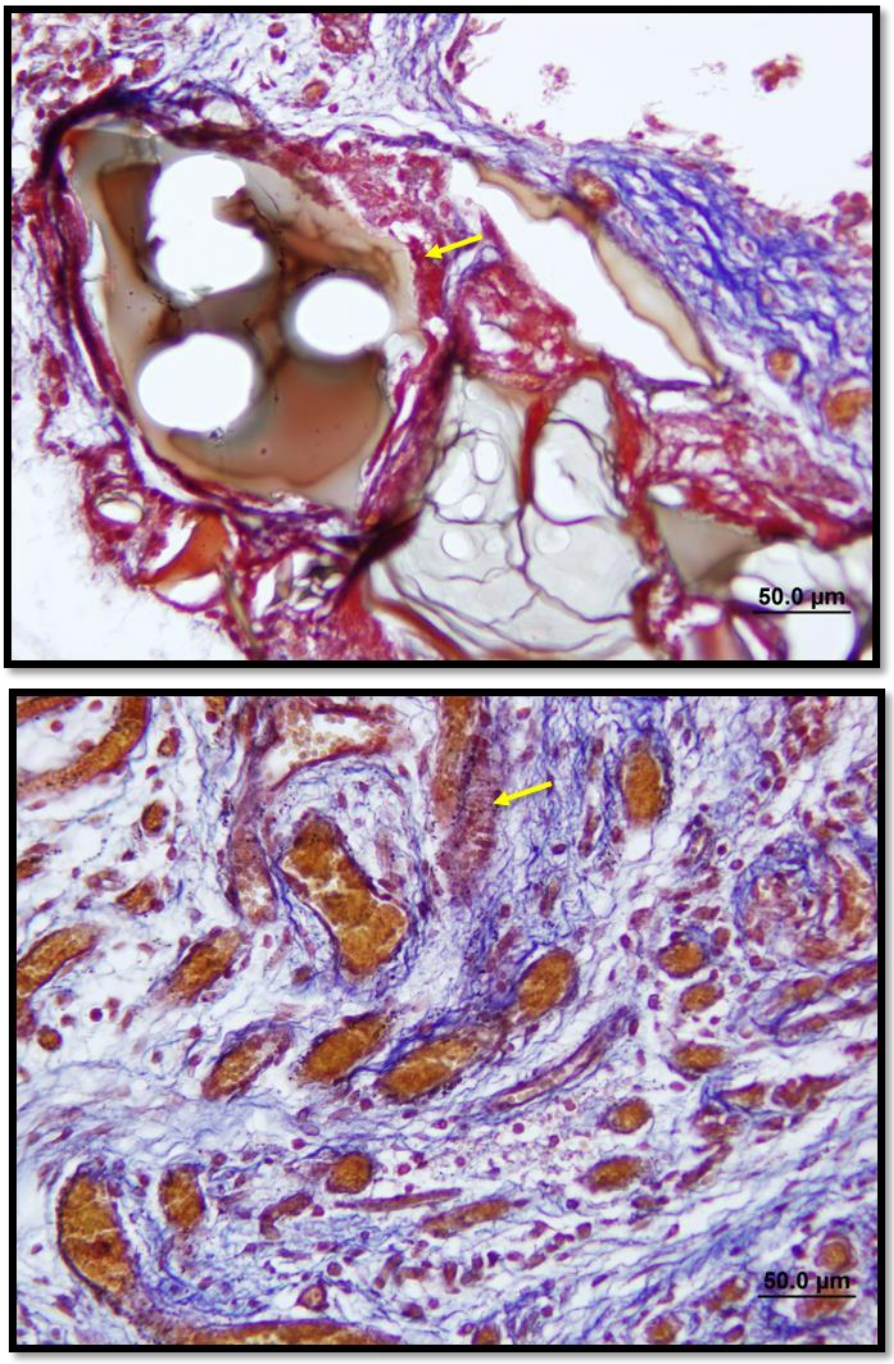
Şekil 13: 14. gün boş polimer grubuna ait kesit. boş skafoldun implante edildiği alanların etraftaki bağdoku (⟶)oluşumunda artış gözlendi. Masson Trikrom.

28 GÜN BOŞ POLİMER



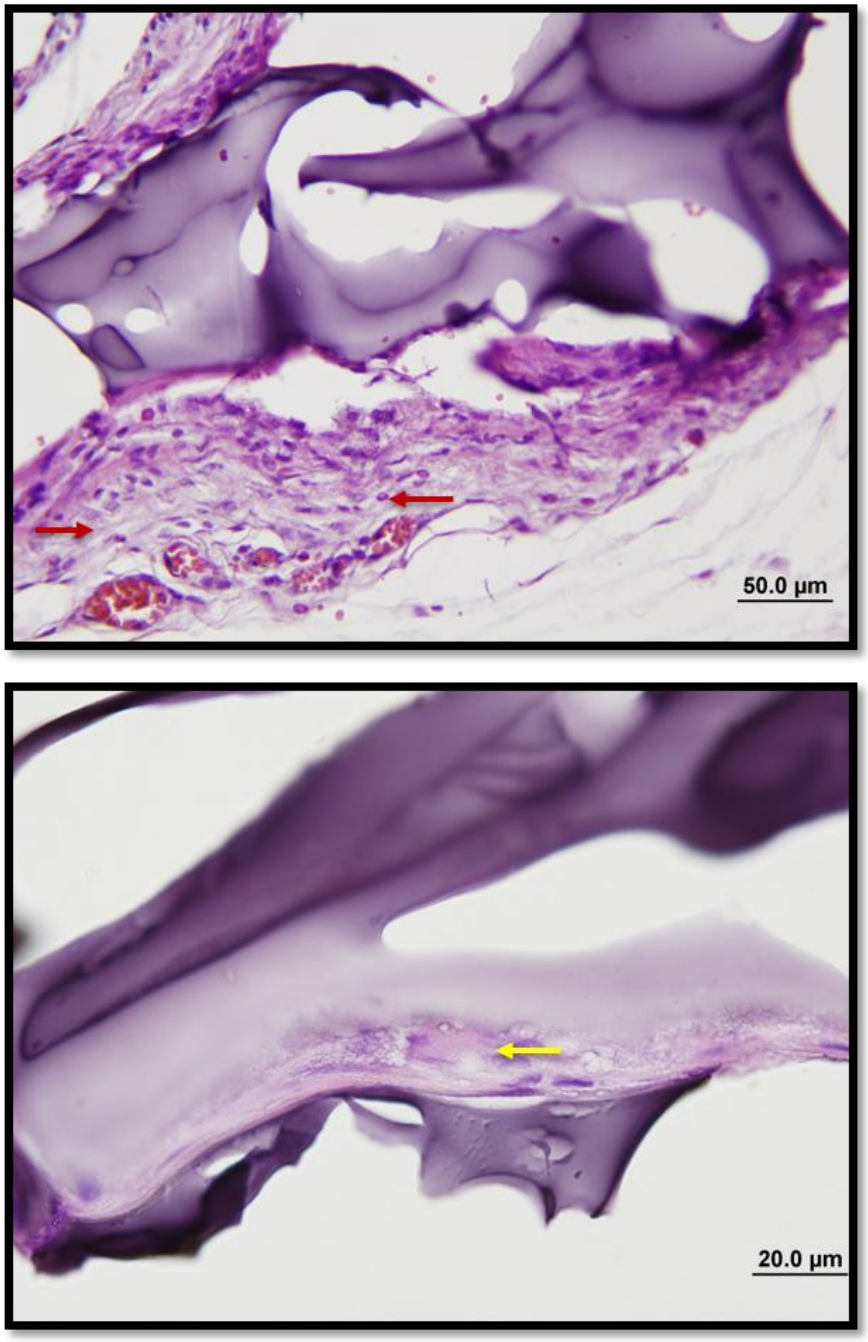
Şekil 14: 28. gün boş polimer içeren kas dokusuna ait kesit. Polimer etrafındaki kas dokuda, yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu ve kan damarları (→) görülmektedir. H&E x40 büyütme. Bar 50.0µm.

28 GÜN BOŞ POLİMER



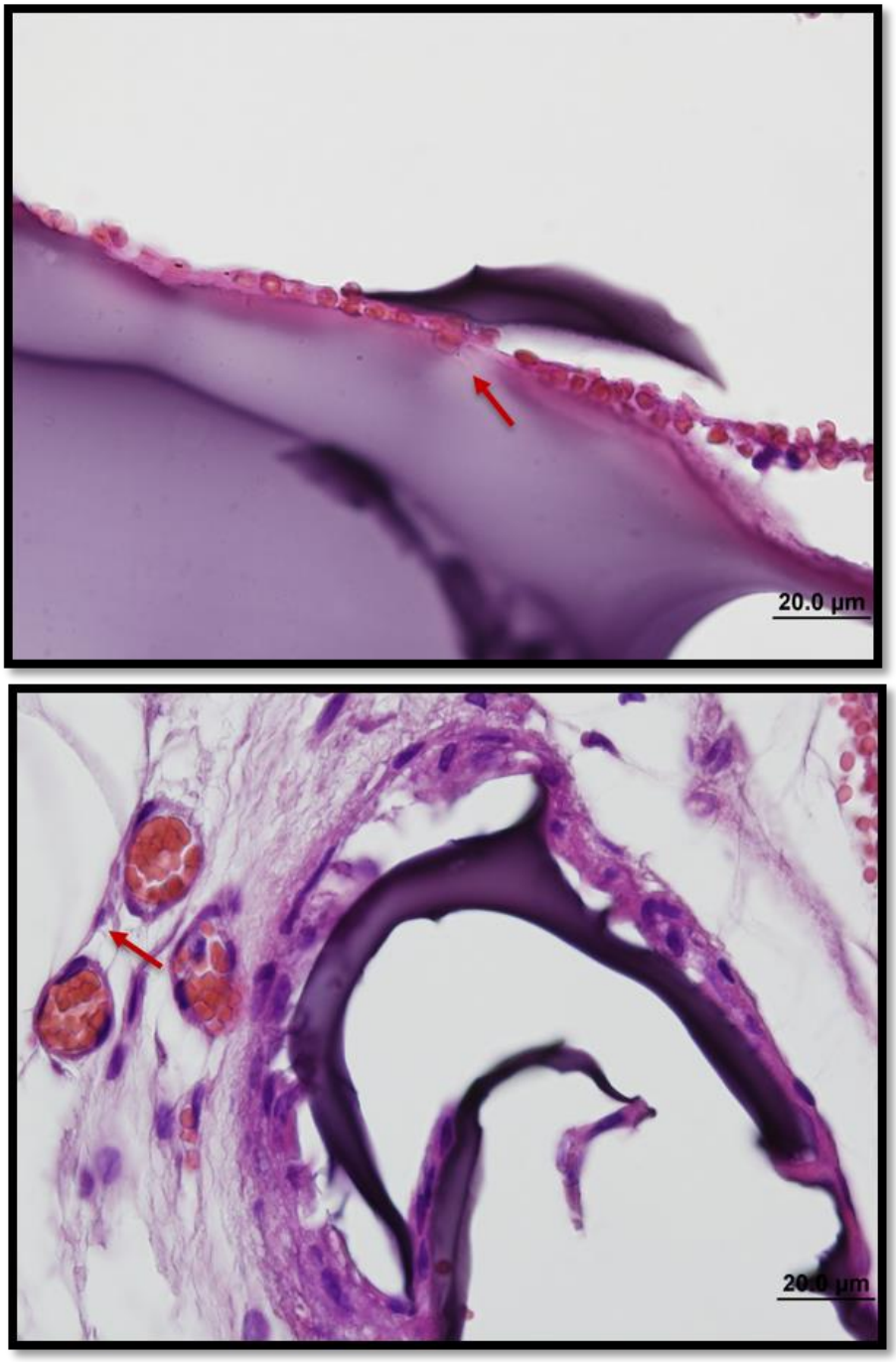
Şekil 15: 28. gün boş polimer grubuna ait kesit. boş skafoldun implante edildiği alanların etraftaki bağdoku (→) oluşumunda artış gözlendi. Masson Trikrom 40 büyütme. Bar 200µm.

14 GÜN DOLU POLİMER



Şekil 16: 14. gün dolu polimer içeren kas dokusuna ait kesit. Polimer etrafındaki kas dokuda, yer yer mononükleer hücre infiltrasyonu ve kan damarlarında diğer gruplara göre artış olduğu (→) görülmektedir. Skafoltun içindeki hücrelerin (→) grup oluşturma eğiliminde olduğu görülmektedir. H&E x40 büyütme. Bar 50.0µm.

28 GÜN DOLU POLİMER



Şekil 17: 28 günlük dolu polimer grubunda etrafını saran bağ doku ve kas dokusunun skafoldu iyice sardığı hatta bazı bölgelerde dejenerasyona uğratarak skafoldun hacimce azaldığı ve kan damarlarında artış olduğu (⟶) görülmektedir. H&E x100 büyütme. Bar20.0µm.

Tablo 3: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının Damar Skoru Açısından Karşılaştırılması

	Damar Skoru Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	4 (2:5)	***p=0,002**
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	10,5 (7:13)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 14.günde alınan örneklerinde damar skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Dolu polimer grubunun damar skorunun daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 4: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının Damar Skoru Açısından Karşılaştırılması

	Damar Skoru Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	5,5 (3:6)	***p=0,002**
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	14 (12:18)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 28.günde alınan örneklerinde damar skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Dolu polimer grubunun damar skorunun daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 5: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının Damar Skoru Açısından Karşılaştırılması

	Damar Skoru Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	10,5 (7:13)	***p=0,029**
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	14 (12:18)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Dolu polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde damar skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). 28.günde alınan dolu polimer grubunun damar skorunun daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 6: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının Damar Skoru Açısından Karşılaştırılması

	Damar Skoru Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	4 (2:5)	*p=0,107
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	5,5 (3:6)	

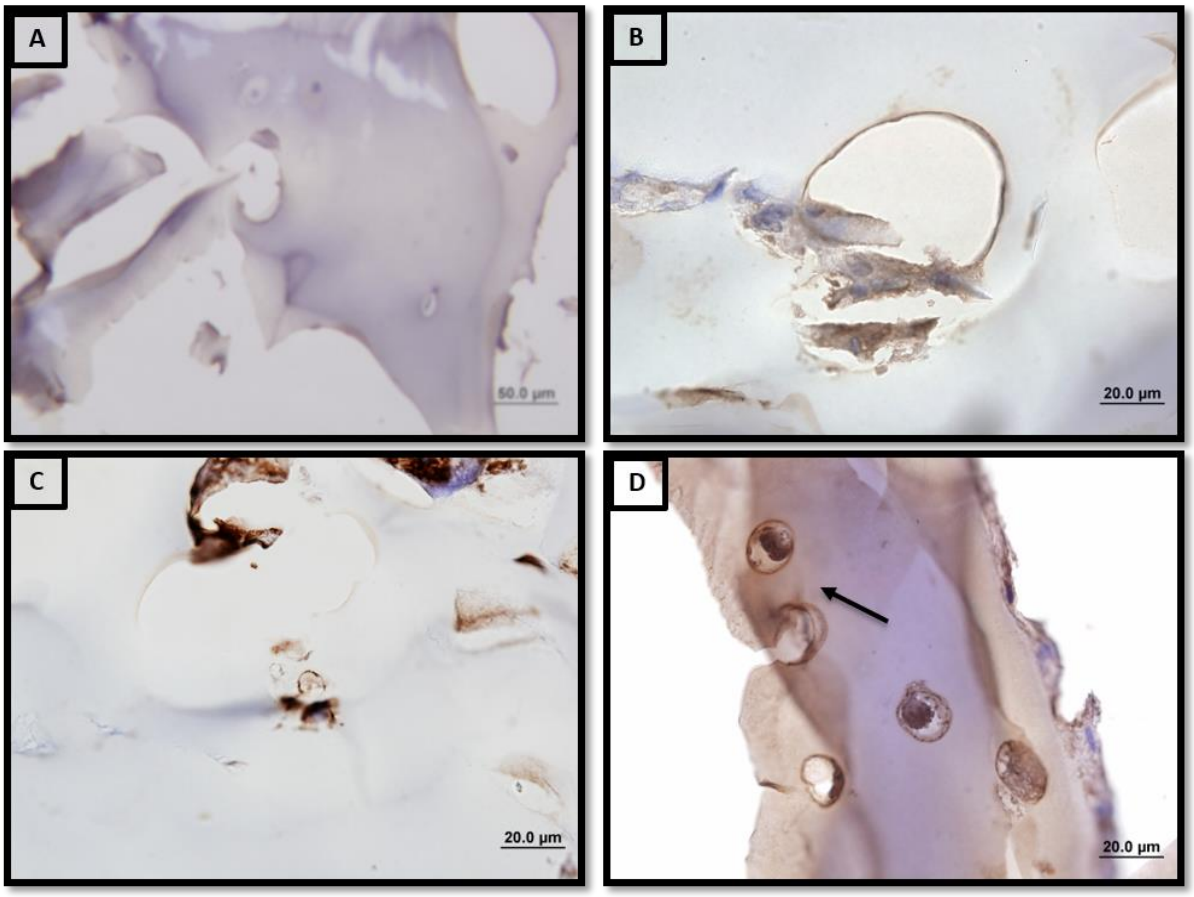
*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde damar skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

4.2 İmmünohistokimyasal Bulgular

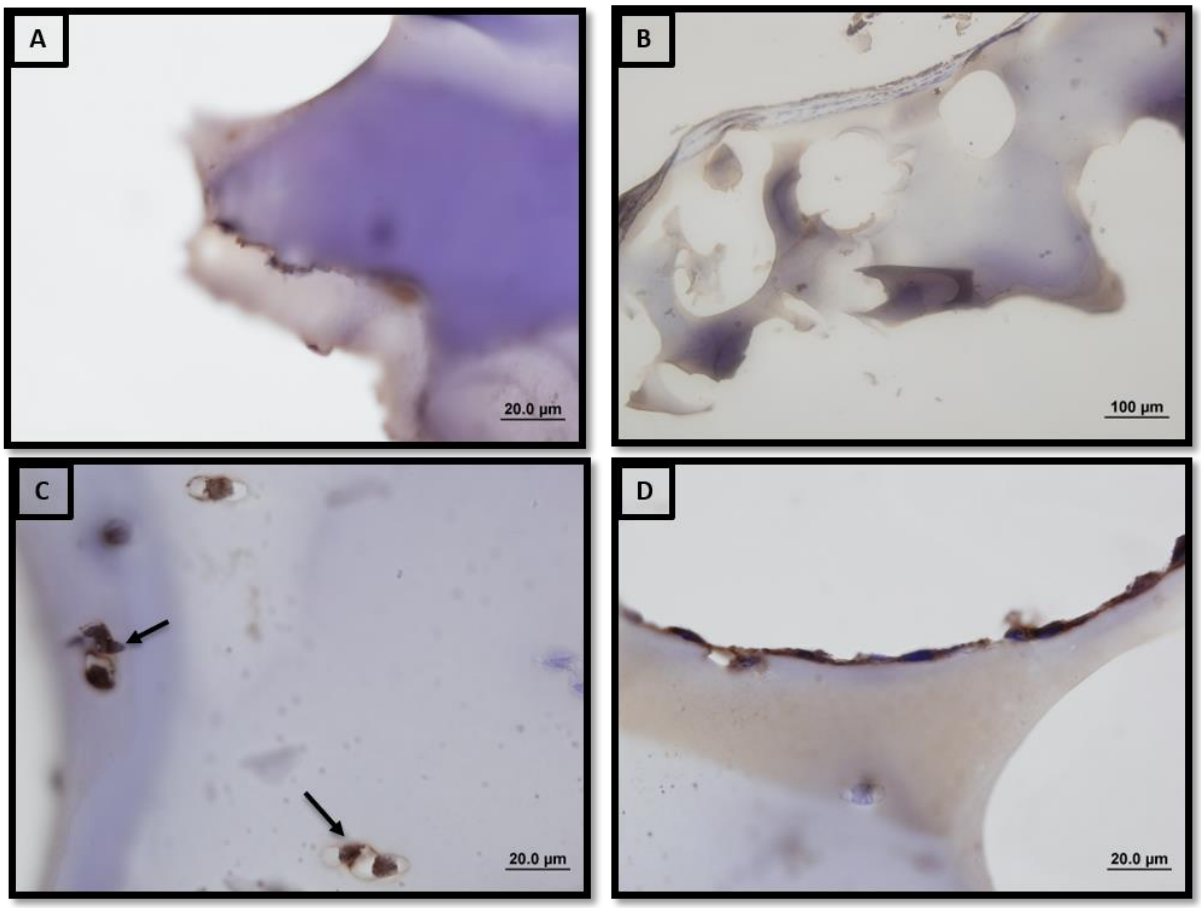
Gruplara ait yapılan CD-31/ ANG-1/ alfa-SMA/ VEGF immünohistokimyasal boyamalarında da 14. gün dolu polimer grubuna göre, 28. gün dolu polimer grubunda immünpozitif boyanmanın daha yoğun olduğu izlendi. Bazı kesitlerde hücrelerin küme oluşturmaya eğilimli olduğu ve bazı hücrelerinde çizgisel olarak dizilim eğiliminde oldukları dikkati çekti. Bazı kesitlerde hücrelerin 2'li 3'lü yapılar oluşturduğu dikkati çekti.

Anti-ANG-1 Antikoru



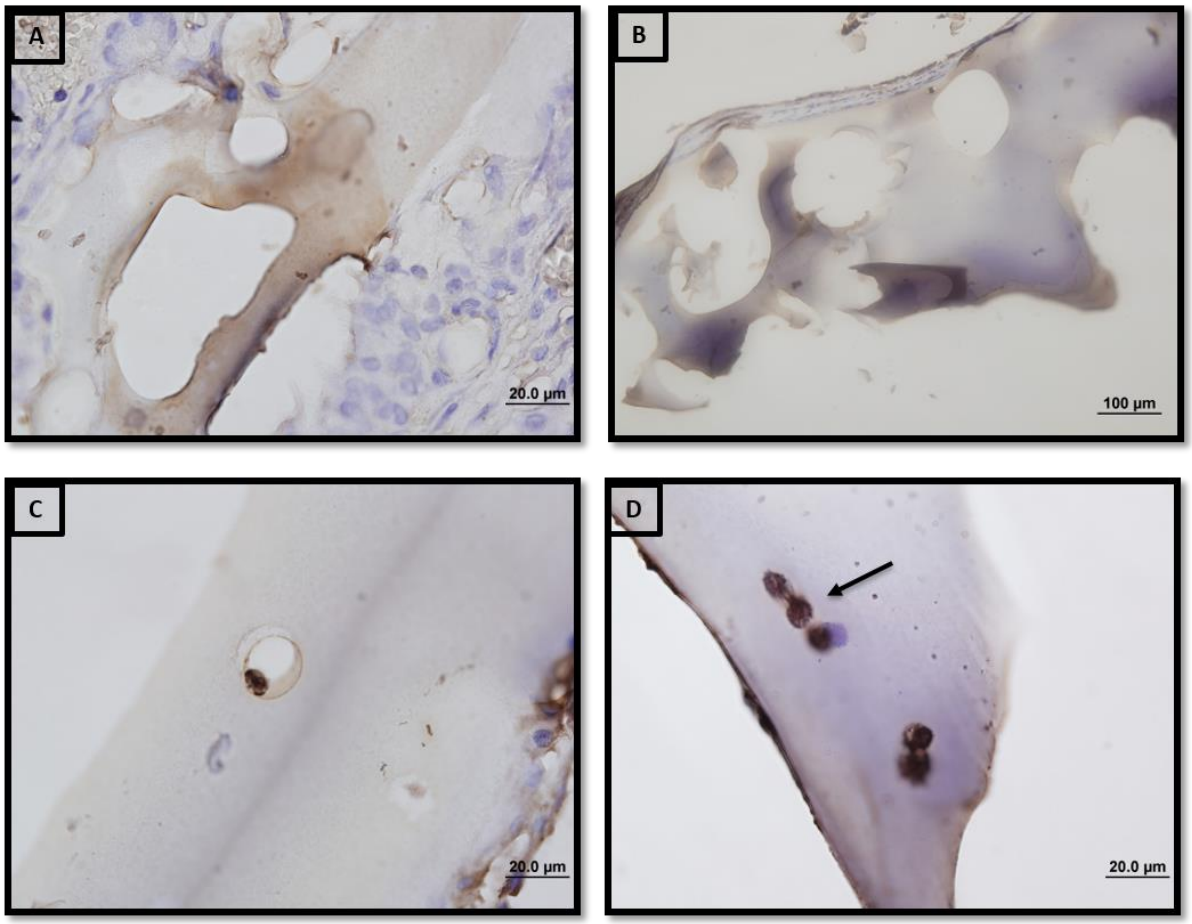
Şekil 18: 14. gün boş polimer (A),28. gün boş polimer (B), 14. gün dolu polimer (C) ve 28. gün dolu polimer (D) grublarına ait kesitler. 28. gün dolu polimer grubuna ait kesitlerde hücrelerin (→) çizgisel olarak dizilim eğiliminde oldukları gözlendi. Angiopoetin 1 x100 büyütmede. Bar 20µm.

Anti-CD-31 Antikoru



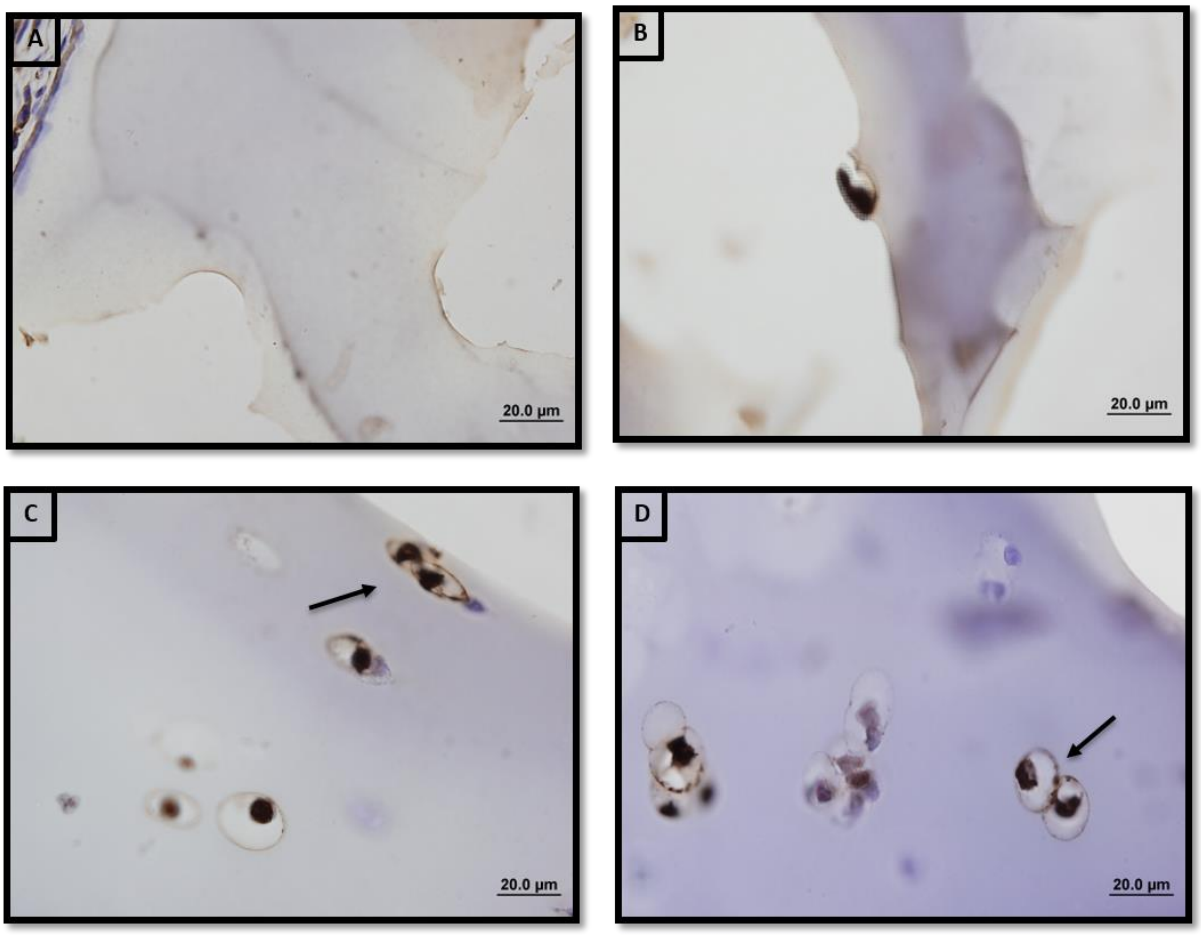
Şekil 19: 14. gün boş polimer (A),28. gün boş polimer (B), 14. gün dolu polimer (C) ve 28. gün dolu polimer (D) gruplarına ait kesitler. 28. gün dolu polimer grubuna ait kesitlerde hücrelerin (➞) oluşturma eğiliminde oldukları gözlendi. CD 31 x100 büyütmede. Bar 20µm.

Anti-VEGF Antikoru



Şekil 20: 14. gün boş polimer (A),28. gün boş polimer (B), 14. gün dolu polimer (C) ve 28. gün boş polimer (D) grublarına ait kesitler. 28. gün dolu polimer grubuna ait kesitlerde hücrelerin (→) çizgisel olarak dizilim eğiliminde oldukları gözlendi VEGF x100 büyütmede. Bar 20µm.

Anti–α-SMA Antikoru



Şekil 21: 14. gün boş polimer (A),28. gün boş polimer (B), 14. gün dolu polimer (C) ve 28. gün dolu polimer (D) gruplarına ait kesitler. 28. gün dolu polimer grubuna ait kesitlerde hücrelerin (⟷) küme oluşturma eğiliminde oldukları gözlendi. a SMA x100 büyütmede. Bar 20µm.

Tablo 7: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-CD31 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-CD31 Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	1 (1:2)	***p=0,005**
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	2 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 14.günde alınan örneklerinde anti-CD31 evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Dolu polimer grubunun anti-CD31 evrelemesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 8: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-CD31 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-CD31 Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	2 (1:2)	***p=0,002**
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	3 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 28.günde alınan örneklerinde anti-CD31 evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Dolu polimer grubunun anti-CD31 evrelemesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 9: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının anti-CD31 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-CD31 Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	2 (2:3)	*p=0,107
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	2 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Dolu polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde anti-CD31 evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 10: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının anti-CD31 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-CD31 Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	1 (1:2)	*p=0,298
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	2 (1:2)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde anti-CD31 evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 11: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-α-SMA İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-α-SMA Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	1 (0:2)	*p=0,053
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	2 (1:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 14.günde alınan örneklerinde anti-α-SMA evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 12: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-α-SMA İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	Anti-α-SMA Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	1 (1:2)	***p=0,004**
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	3 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 28.günde alınan örneklerinde anti-α–SMA evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p<0,05). Dolu polimer grubunun anti-α-SMA evrelemesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 13: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının anti-α-SMA İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-α-SMA Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	2 (1:3)	*p=0,100
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	2 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Dolu polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde anti-α-SMA evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 14: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının anti-α-SMA İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-α-SMA Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	1 (0:2)	*p=0,775
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	1 (1:2)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde anti-α-SMA evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 15: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-VEGF İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-VEGF Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	1 (1:2)	***p=0,007**
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	2 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 14.günde alınan örneklerinde anti-VEGF evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Buna göre dolu polimer gurubunun anti-VEGF evrelemesi daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 16: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-VEGF İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-VEGF Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	1 (1:2)	***p=0,003**
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	3 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 28.günde alınan örneklerinde anti-VEGF evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Dolu polimer grubunun anti-VEGF evrelemesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 17: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının anti-VEGF İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-VEGF Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	2 (2:3)	***p=0,037**
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	2 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Dolu polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde anti-VEGF evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0,05$). Buna göre 28.günde alınan dolu polimer grubunda anti-VEGF evrelemesi daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 18: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının anti-VEGF İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-VEGF Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	1 (1:2)	*p=0,591
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	1 (1:2)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde anti-VEGF evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 19: 14. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-ANG-1 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-ANG-1 Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	1 (1:2)	*p=0,058
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	2 (1:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 14.günde alınan örneklerinde anti-ANG-1 evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 20: 28. Günde Alınan Boş ve Dolu Polimer Gruplarının anti-ANG-1 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-ANG-1 Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	1 (1:2)	***p=0,004**
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	3 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş ve dolu polimer gruplarının 28.günde alınan örneklerinde anti-ANG-1 evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p<0,05). Dolu polimer grubunun anti-ANG-1 evrelemesinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 21: 14. ve 28. Günde Alınan Dolu Polimer Gruplarının anti-ANG-1 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-ANG-1 Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Dolu Polimer Grubu (Grup 4)	2 (1:3)	*p=0,100
Dolu Polimer Grubu (Grup 5)	3 (2:3)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Dolu polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde anti-ANG-1 evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

Tablo 22: 14. ve 28. Günde Alınan Boş Polimer Gruplarının anti-ANG-1 İmmünohistokimyasal Evrelemesi Açısından Karşılaştırılması

	anti-ANG-1 Evrelemesi Ortanca (Min:Maks)	
Polimer Grupları		
Boş Polimer Grubu (Grup 2)	1 (1:2)	*p=0,99
Boş Polimer Grubu (Grup 3)	1 (1:2)	

*Mann-Whitney U Testi uygulanmıştır.

Boş polimer gruplarının 14. ve 28. günde alınan örneklerinde anti-ANG-1 evrelemesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

5.TARTIŞMA

Epidemiyolojik çalışmalarda 65 yaşın üzerindeki yaş grubunun yaklaşık %15-20'sinde PAH tespit edilmiştir (63). PAH'ın medikal tedavisinde antiagreganlar, oral antikoagülanlar, eritrosit fleksibilitesini artıran ilaçlar, hiperlipideminin düzeltilmesi, diyabetin kontrolü, prostaglandin analogları, silostazol, hiperbarik oksijen tedavisi bugüne kadar kullanılan tedavi metodlarındandır (38). Küratif cerrahi tedavinin yapılamadığı durumlarda ise sempatektomi, sempatik blokaj, enfekte dokunun debridmanı palyatif amaçlı kullanılan cerrahi yaklaşımlar olarak günümüze kadar kullanılmıştır. Ancak iskemik ayak ülseri oluşan hastaların %12-15'inde her türlü medikal tedaviye rağmen 3-5 yıl içerisinde ekstremite amputasyonu gerekmektedir (55). Yakın geçmişte genetik bilimi ve doku mühendisliğindeki ilerlemelerle, mevcut tedavi yöntemleriyle hastalığın ilerleyişinin durdurulamadığı hasta gruplarında, anjiyogenezisi sağlamaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (56-58).

2001'de Japonya'da yapılan çalışmada HGF sentezi için insan genomu aktarılan sıçanlarda anjiyogenezin anlamlı derecede arttığı görülmüştür (64).

2002'de Japonya'da PAH açısından Fontaine evre 3 ve 4 olan 115 hastada yapılan bir çalışmada kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin gastrocnemius kasına enjeksiyon yöntemiyle tedavisi sonucu; ABİ ve ağrısız yürüme mesafesinde artışın anlamlı olduğu gösterilmiştir. Benzer etkiler daha az hastanın katıldığı benzer protokollü çalışmalarda da gösterilmiştir. Aynı çalışmanın 3 yıllık sonuçlarında katılanların %60'ının amputasyondan kurtulduğu görülmüştür (65,66). Benzer şekilde 2007 yılında Almanya'da yapılan çalışmada kişilere kendi kemik iliği hücreleri intramuskuler ve intraarteriyel olarak infüze edilmiş ve hastalarda ağrısız yürüme mesafesinde ve ABİ'de anlamlı değişkenlikler olduğu görülmüştür (67).

Konu hakkında yapılan bir metaanalizde 19 randomize kontrollü klinik çalışmanın incelenmesi sonucu; hücre bazlı tedavilerin ampütasyon oranlarını %37 düşürdüğü görülmüştür. Aynı zamanda yara iyileşmesini %59 arttırdığı saptanmıştır. Hücre tedavilerinin ABİ'yi daha fazla yükselttiği saptanmıştır. Hücre tedavisi uygulananlarda istirahat ağrısında belirgin azalma gözlenmiştir. Ancak hücre tedavisinin İK semptomu üzerine herhangi bir etkisi saptanmamıştır. Çalışmalarda hücre tipi olarak kemik iliğinden veya periferik kandan elde edilmiş endotel kök hücreler kullanılmıştır (68).

İnsan üzerinde yapılan randomize kontrollü klinik çalışmalar haricinde hayvanlar üzerinde de farklı yöntemlerle elde edilmiş hücrelerin, farklı hücre ekim tekniklerinin, farklı

kapiller ağ oluşturma modellerinin denendiği literatürde görülmektedir. İnsan kaynaklı ploripotent kök hücrelerinin farelere intramuskuler enjekte edilerek verildiği bir çalışmada, kontrol grubunda izotonik solüsyon verilen farelere göre tedavi grubunda daha fazla damar oluştuğu görülmüştür (69).

Literatürde sıçanlar üzerinde farklı tip kök hücreler kullanılarak farklı tip modellerin denendiği çalışmalarda benzer sonuçlar alındığı görülmektedir. Toplam 13 çalışmanın benzer bulgusu kılcal damar yoğunluğunda artış, kollateral damar oluşumunda artış, yeni damar yapısı oluşumunda artış şeklinde özetlenebilir. Bunlar deneylerin olumlu sonuçlandığının göstergesidir (70-82). Aynı zamanda yeni modellemeler için de yol gösterici olmuştur.

2010'da Almanya'da yapılan bir çalışmada sıçanlara polimer yapı yerine ipek fibroin ile hücre ekimi yapılıp anjiyogenez oluşumu 14.günde değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmanın prosedüründe bir gruba hiçbir ekim yapılmamış, bir gruba sadece human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) ve bir gruba da HDMEC ile birlikte primary human osteoblasts (HOS) hücreleri ipek fibroin içerisine doldurularak verilmiştir. Damar oluşumu açısından sadece HDMEC+HOS olan grupta farklılık olduğu tespit edilmiştir (83). Bizim araştırmamız da benzer şekilde boş polimer grubuyla hücre dolu polimer grubu arasında damar tutulumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.

Çalışmamızda yeni damar oluşumu 5 farklı parametre ile değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bunlardan ilki endotel skorlamasıdır. Buna göre boş polimerler ile dolu polimerler arasında hem 14.gün hem de 28.gün alınan kesitlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Ayrıca dolu polimerlerin 14. Ve 28. Gün alınan kesitleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. 28.gün alınan kesitlerde damar oluşumu daha fazla gözlenmiştir. Bu bulgu daha uzun sürelerle tedavide daha fazla damar oluşabileceğini göstermektedir. Optimum sürenin bulunması için daha farklı sürelerle deney yapılması yerinde olacaktır.

VEGF'nin immünohistokimyasal olarak evrelendirildiği parametre de endotel skorlaması ile benzer sonuçlar vermiştir. Ancak ANG-1 ve SMA incelemelerinde daha farklı sonuçlar elde edilmiştir. ANG-1 ve SMA parametrelerinin incelenmesinde sadece 28.günde alınan boş ve dolu polimerler arası damar oluşumu açısından istatistiksel olarak fark saptanmıştır. Diğer kıyaslamalarda saptanmamıştır. CD31'in incelenmesi sonucu ise buna ek olarak 14.gün alınan boş ve dolu polimerlerin damar oluşumu açısından da fark saptanmıştır.

Hem bizim çalışmamızda hem de literatürdeki benzer çalışmalarda hücre dolu implantların yeni damar oluşumuna anlamlı derecede olumlu katkı sağladığı görülmektedir. Damar oluşumunu en iyi gösteren endotel skorlaması ve VEGF gibi parametrelerde hem süreyle ilişkili olarak hem de hücre konulmasıyla ilişkili olarak damar tutulumunu arttıran bulgular saptanmıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Ratlarda polimere depolanmış HUVEC hücreleriyle artifisyel damar ağı geliştirme modelinin denendiği bu çalışmada bu amaçla 35 adet Wistar-Albino tipi sıçan 5 gruba ayrılarak çalışma yürütülmüştür. PLLA olarak isimlendirilen polimer yapının boş ve endotel hücresi dolu hali deneyin başladığı gün operasyonla hayvanların arka bacağına implante edilmiştir. Hematoksilen-Eozin, Masson-Trikrom ve immunhistokimyasal boyamalar uygulanarak 14. ve 28. günlerde alınan doku örnekleri incelenmiştir. İmmünohistokimyasal olarak da CD31, ANG-1, α-SMA, VEGF antikorları ile immün boyamalar yapılmıştır.

Endotel skorlaması ve VEGF evrelemesinin incelenmesi ile; Boş ve dolu polimerlerin 14. ve 28. gün alınan örneklerinde damar oluşumu açısından anlamlı fark saptanmıştır. Ayrıca 14 ve 28. günde alınan dolu polimerler arasında da anlamlı fark saptanmıştır. Ancak damar oluşumunu inceleyen tüm parametrelerde görülen ortak anlamlı bulgu 28.günde boş ve dolu polimerlerin damar oluşumu açısından karşılaştırılmasında görülmüştür. Bu çalışmanın da en önemli bulgusu olarak ön plana çıkmıştır.

Literatürdeki diğer bulgular ve bu çalışmanın bulguları ile hayvanlara kök hücre implante edilmesiyle damar oluşumunun arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Bu çalışmada görülen dolu polimerlerin 28.günde alınan örneklerde daha fazla damar oluşturması damar oluşumu açısından optimum süreyi bulabilmek amacıyla daha farklı çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymuştur.

Bu sonuçlar ışığında önerilerimiz;

Nihayi amacı insanlarda yeni tedavi yöntemleri geliştirmek olan hayvan deneylerinde bu çalışmaya benzer şekilde farklı biyomateryaller ile hücre implante edilmesinin denenip süre, hücre türü ve kullanılacak materyal açısından optimum sonuca ulaşılması gerekmektedir. Daha sonra bu yöntemler epidemiyolojik kanıt piramidinin en üstünde yer alan randomize kontrollü klinik çalışmaların da konusu olabilecektir

Literatürdeki kısıtlı sayıda çalışma göz önüne alındığında; periferik arter hastalığında tedavi umudu tükenenlere alternatif olabilecek hücre tedavileri için yeni çalışmalarda daha fazla kaynak ayrılması yerinde olacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. Aronow, Wilbert S. "Management of peripheral arterial disease of the lower extremities in elderly patients." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*59.2 (2004): M172-M177.
2. Kempczinski RF. The chronically ischemic leg: An overwiew. In: Rutherford RB, editors. Vascular surgery. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. p. 917-27.
3. Beard JD. Chronic lower limb ischemia. West J Med 2000;173:60-3.
4. Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). J Vasc Surg 2000;31:S1-S296.
5. Shammas NW. Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease. Vasc Health Risk Manag. 2007;3:229-34.
6. Taylor LM, Moneta GL, Porter JM. Natural history and nonoperative treatment of chronic lower extremity ischemia. In: Rutherford RB, editor. Vascular surgery. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. p. 928-43.
7. Shields DA, Scurr JH. Treatment of the critically ischaemic lower limb. Postgrad Med J 1994;70:5-9.
8. Welten GM, Schouten O, Chonchol M, Hoeks SE, Bax JJ, Van Domburg RT, et al. Prognosis of patients with peripheral arterial disease. J Cardiovasc Surg (Torino) 2009;50:109-21.
9. Tokgözoğlu, Lale, and Ergün Bariş Kaya. "Atherosclerotic vascular disease and risk factors in Turkey: from past to present." Journal of atherosclerosis and thrombosis 15.6 (2008): 286-291.
10. Aronow WS. Peripheral arterial disease. Geriatrics. 2007;62:19-25.
11. Criqui MH, Fronek A, Klauber MR, Barrett-Connor E, Gabriel S. The sensitivity, specificity, and predictive value of traditional clinical evaluation of peripheral arterial disease: results from noninvasive testing in a defined population. Circulation 1985;71:516–522.
12. Carter SA. Indirect systolic pressures and pulse waves in arterial occlusive disease of the lower extremities. Circulation 1968;37:624–637
13. Fowkes FG. The measurement of atherosclerotic peripheral arterial disease in epidemiological surveys. Int J Epidemiol 1988;17:248–254.

14. Gardner AW, Afaq A. Management of lower extremity peripheral arterial disease. J Cardiopulm Rehabil Prev 2008;28:349-57.
15. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 2003;9(6):653-660
16. Zimmerman MA, Selzman CH, Raeburn CD, Calkins CM, Barsness K, Harken AH. Clinical applications of cardiovascular angiogenesis. J Card Surg. 2001 Nov-Dec; 16(6):490-7.
17. Karabay, Özalp, et al. "İskemik periferik arter hastalığı: Bir tarama çalışması." Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi 20.3 (2012): 450-457.
18. Hiatt WR. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. N Engl J Med 2001;344:1608-21.
19. Zachary I, Morgan RD. Therapeutic angiogenesis for cardiovasculardisease: biological context, challenges, prospects. Heart. 2011; 97(3):181-9.
20. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. Cancer Treat Res. 2004;117:3-32.
21. Atkins GB, Jain MK, Hamik A. Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011; 31(7):1476-84.
22. Olin JW, Sealove BA. Peripheral artery disease: current insight into the disease and its diagnosis and management. Mayo Clin Proc 2010; 85:678.
23. Criqui MH, Fronek A, Barrett–Connor E. The prevalance of peripheral arterial disease in a defined population. Circulation 1985;71:510-5.
24. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzer NR, ve ark. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. Circulation. 2006;113:463-654.
25. Selvin, E, Erlinger, TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. Circulation 2004; 110:738.
26. Karabacak A, Özhan H. Ateroskleroz risk faktörleri-I: Genetik, fizyolojik ve diğer özellikler. TurkKlin J CardiolSpec Top 2011;4(1):19–24.
27. Wann, L. S. "ACCF/AHA Task Force Members: 2011 ACCF/AHA/HRS focused update on the management of patients with atrial fibrillation (updating the 2006 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." Circulation 123 (2011): 104-123.

28. Kannel, William B., and Daniel L. McGee. "Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham study." Jama 241.19 (1979): 2035-2038.
29. Sigvant B, Wiberg-Hedman K, Bergqvist D, Rolandsson O, Andersson B, Persson E, Wahlberg E. A population-based study of peripheral arterial disease prevalence with special focus on critical limb ischemia and sex differences. J Vasc Surg 2007;45:1185-91.
30. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA ve ark. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASCII). Eur J Vasc Endovasc Surg 2007;33:S1-75.
31. Tekin, Nil, et al. "Prevalence of peripheral arterial disease and related risk factors in Turkish elders." BMC family practice 12.1 (2011): 96.
32. Ikem R, Ikem I, Adebayo O, Soyoye D. An assessment of peripheral vascular disease in patients with diabetic foot ulcer. AnnSaudiMed 2010; 20(4):114–7.
33. T. C. Collins, N. J. Petersen, M. Suarez-Almazor, and C. M. Ashton, “The prevalence of peripheral arterial disease in a racially diverse population,” Archives of Internal Medicine, vol. 163, no. 12, pp. 1469–1474, 2003
34. Taylor LM, Moneta GL, Porter JM. Naturel Histort and Nonoperative Treatment of Chronic Lower Extremity Ischemia. In: Rutherford RB, (Ed) Vascular Surgery 5.th ed. WB Sauunders Co, 2000 pp: 928-943
35. Selvin E, Wattanakit K, Steffes MW, Coresh J, Sharrett AR. HbA1c and Peripheral Arterial Disease in Diabetes. Diabetes Care. 2006 Apr.29(4):877-82
36. McDermott MM. The magnitude of the problem of peripheral arterial disease: epidemiology and clinical significance. CleveClin J Med 2006;73(Suppl 4):S2–7.
37. Ridker, PM, Stampfer, MJ, Rifai, N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. JAMA 2001; 285:2481.
38. Türk Kalp Damar Cerrahisi Derneği Periferik Arter ve Ven Hastalıkları Tedavi Kılavuzu-2016, s.10
39. Classification, epidemiyology, risk factors, and natural history of perpheral arterial disease. Novo S. Diabetes Obes Metab.2002 Mar;4 Suppl 2
40. Alan T. Periferik arter hastalığı Damar Hastalıkları Atlası. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2010:67-83.

41. Pemberton M, London NJM. Colout flow duplex imaging of occlusive arterial disease of the lower limb. BrJSurg 1997;84:1360-3
42. Lin, JW, Kaufman, JA, Bluemke, DA, et al. Atherosclerotic vascular disease conference: Writing Group IV: imaging. Circulation 2004.
43. Visser K, Hunink MG. Peripheral arterial disease: Gadolinium-enhanced MR angiography versuscolor-guidedduplex US-a meta-analysis. Radiology 2000;216:67-77.
44. Momsen AH, Jensen MB, Norager CB, Madsen MR, Vestersgaard-Andersen T, Lindholt JS. Drug therapy for improving walking distance in intermittent claudication: a systematic review and meta-analysis of robust randomised controlled studies. Eur J Vasc Endovasc Surg 2009;38:463-74.
45. De Backer T, Vander Stichele R, Lehert P, Van Bortel L. Naftidrofuryl for intermittent claudication: meta-analysis based on individual patient data.BMJ 2009; 338:b603.
46. Regensteiner JG, Ware JE Jr, McCarthy WJ, Zhang P, Forbes WP, Heckman J, et al. Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials. J Am Geriatr Soc 2002;50:1939-46.
47. Cooke JP, Losordo DW. Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies. Circ Res 2015;116:1561-78.
48. Gupta NK, Armstrong EJ, Parikh SA. The current state of stem cell therapy for peripheral artery disease. Curr Cardiol Rep 2014;16:447.
49. Whyman MR, Fowkes FG, Kerracher EM, et al. Randomised controlled trial of percutaneous transluminal anjioplasty for intermittent claudication. Eur J Vasc Endovasc Surg 1996;12:167-72.
50. Li WW, Hutnik M, Gehr G. Antiangiogenesis in haematological malignancies. Br J Haematol 2008;143(5):622-31
51. Erdem F, Gündoğdu M. Anjiojenesis ve anti-anjiojenik tedavi. AÜTD 2005;37(1):1-6.
52. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. Cancer research. 2000;60(2):203-12.
53. Makarevich, Pavel Igorevich, and Yelena Viktorovna Parfyonova. "Therapeutic Angiogenesis: Foundations and Practical Application." Physiologic and Pathologic Angiogenesis-Signaling Mechanisms and Targeted Therapy. InTech, 2017.

54. Francis, S.C., Katovich, M.S., Gelband, C.H., Raizado, M.R.: Gene therapy in cardiovascular disease, Current status. Am J. Pharmacogenomics. 2001: 1(1); 55-56
55. AKAR, Ahmet Rüçhan, et al. "Periferik Vasküler Hastalıklarda Anjiogenezis Amaçlı Kök Hücre Uygulamaları." Turkiye Klinikleri Journal of Surgical Medical Sciences 2.43 (2006): 51-58.
56. Laschke MW, Harder Y, Amon M, et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. Tissue Eng 2006;12:2093-104.
57. Koch S, Yao C, Grieb G, Prevel P, Noah EM, Steffens GC. Enhancing angiogenesis in collagen matrices by covalent incorporation of VEGF. J Mater Sci Mater Med 2006;17:735-41
58. Dunehoo AL, Anderson M, Majumdar S, Kobayashi N, Berkland C, Siahaan TJ. Cell adhesion molecules for targeted drug delivery. J Pharm Sci 2006;95:1856-72.
59. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. Diabetes research and clinical practice. 2011;92(1):26–36.
60. Huang PP, Yang XF, Li SZ, Wen JC, Zhang Y, Han ZC. Randomised comparison of G-CSFmobilized peripheral blood mononuclear cells versus bone marrow-mononuclear cells for the treatment of patients with lower limb arteriosclerosis obliterans. Thrombosis and haemostasis. 2007;98(6):1335–42.
61. Hu, Jiang, et al. "Patient-specific cardiovascular progenitor cells derived from integration-free induced pluripotent stem cells for vascular tissue regeneration." *Biomaterials* 73 (2015): 51-59.
62. Ergür, Bekir Uğur, et al. "The effects of α-lipoic acid on aortic injury and hypertension in the rat remnant kidney (5/6 nephrectomy) model." Anatolian journal of cardiology 15.6 (2015): 443.
63. Diehm C, Kareem S, Lawall H. Epidemiology of peripheral arterial disease. Vasa 2004;33:183-9.
64. Taniyama, Y., et al. "Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease." Gene therapy 8.3 (2001): 181.
65. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous

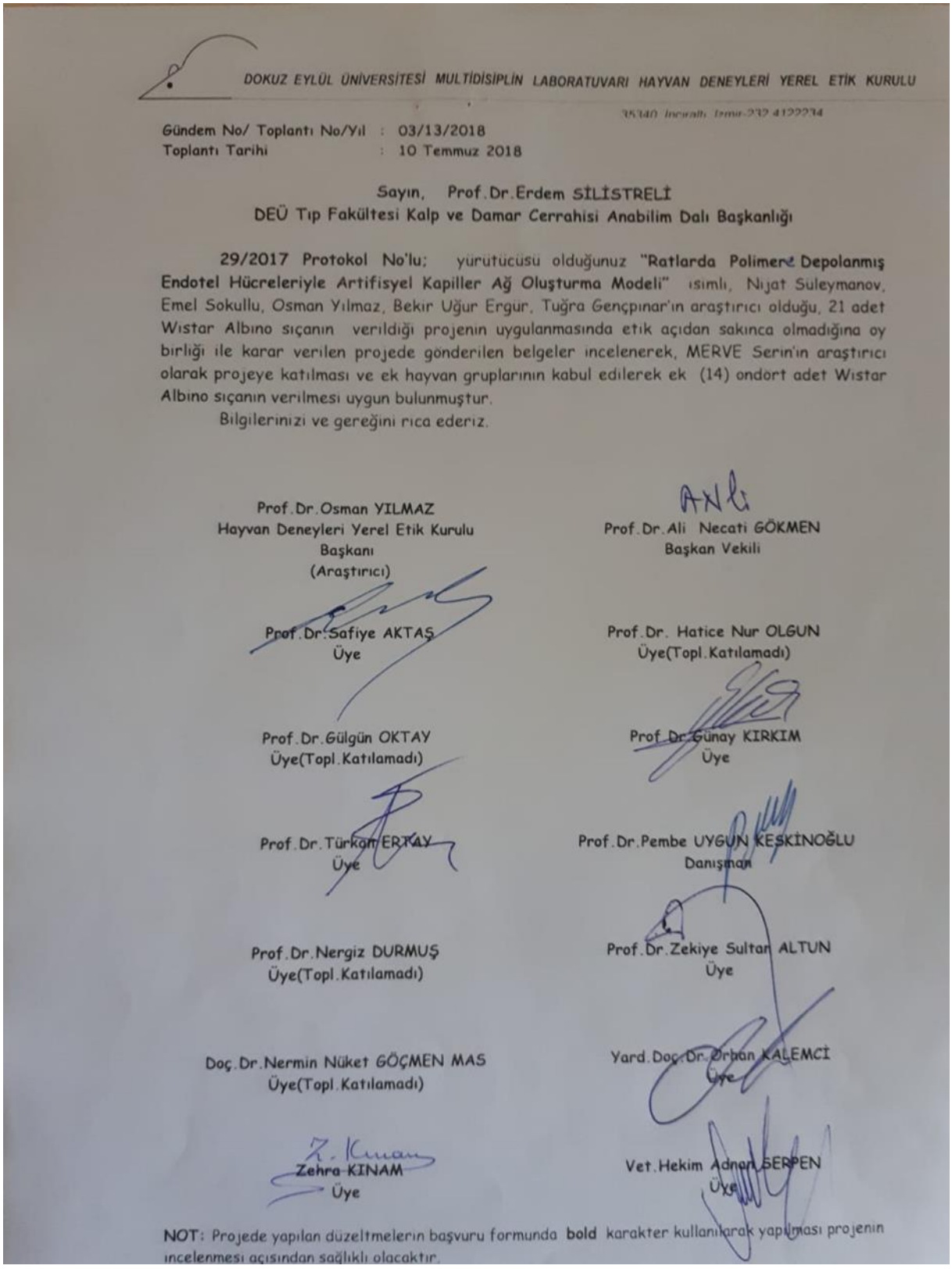
transplantation of bone marrow cells: a pilot study and randomized controlled trial. Lancet 2002;360:427e35.

66. Lenk K, Adams V, Lurz P, Erbs S, Linke A, Gielen S, et al. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischaemia. Eur Heart J 2005;26(18):1903e9.
67. Bartsch, Thomas, et al. "Transplantation of autologous mononuclear bone marrow stem cells in patients with peripheral arterial disease (the TAM-PAD study)." Clinical Research in Cardiology 96.12 (2007): 891-899.
68. Rigato, Mauro, Matteo Monami, and Gian Paolo Fadini. "Autologous cell therapy for peripheral arterial disease: systematic review and meta-analysis of randomized, non-randomized, and non-controlled studies." Circulation research (2017): CIRCRESAHA-116.
69. Rufaihah, Abdul Jalil, et al. "Endothelial cells derived from human iPSCS increase capillary density and improve perfusion in a mouse model of peripheral arterial disease." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 31.11 (2011): e72-e79.
70. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. Circ Res 2004; 94: 230–238.
71. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964–967.
72. Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. Circulation 2002; 106: 2019–2025.
73. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. Circulation 2004; 109: 1543–1549.
74. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells Express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. Circulation Res 2004; 94: 678–685.
75. Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, et al. Beneficial effects of concurrent autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemiainduced angiogenesis in the mouse hindlimb. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 17202–17206

76. Takagi Y, Omura T, Yoshiyama M, et al. Granulocyte-colony stimulating factor augments neovascularization induced by bone marrow transplantation in rat hindlimb ischemia. J Pharmacol Sci 2005; 99: 45–51.
77. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue- derived stromal cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25: 2542–2547.
78. Yoon KH, Lee JH, Kim JW, et al. Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. Lancet 2006; 368: 1681–1688.
79. Li S, Zhou B, Han ZC. Therapeutic neovascularization by transplantation of mobilized peripheral blood mononuclear cells for limb ischemia. A comparison between CD34+ and. Thromb Haemost 2006; 95: 301–311.
80. Sica V, Williams-Ignarro S, de Nigris F, et al. Autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the diabetic mouse hindlimb. Cell Cycle 2006; 5: 2903–2908.
81. Jeon O, Song SJ, Bhang SH, et al. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs. J Biomed Sci 2007; 14: 323–330.
82. Zhang H, Zhang N, Li M, et al. Therapeutic angiogenesis of bone marrow mononuclear cells (MNCs) and peripheral blood MNCs: transplantation for ischemic hindlimb. Ann Vasc Surg 2008; 22: 238–247.
83. Unger, Ronald E., et al. "The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature." Biomaterials 31.27 (2010): 6959-6967.

EKLER

Ek-1



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340 İnciraltı İzmir-232 4122734

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 03/13/2018
Toplantı Tarihi : 10 Temmuz 2018

Sayın, Prof.Dr.Erdem SİLİSTRELİ
DEÜ Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığı

29/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Ratlarda Polimere Depolanmış Endotel Hücreleriyle Artifisyel Kapiller Ağ Oluşturma Modeli" ısımlı, Nijat Süleymanov, Emel Sokullu, Osman Yılmaz, Bekir Uğur Ergür, Tuğra Gençpınar'ın araştırıcı olduğu, 21 adet Wistar Albino sıçanın verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilen projede gönderilen belgeler incelenerek, MERVE Serin'in araştırıcı olarak projeye katılması ve ek hayvan gruplarının kabul edilerek ek (14) ondört adet Wistar Albino sıçanın verilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı
(Araştırıcı)

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye

Prof.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman

Prof.Dr.Nergiz DURMUŞ
Üye(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye(Topl.Katılamadı)

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCİ
Üye

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.