

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SIÇANDA MİYOKARDİYAL İSKEMİ SONRASI DOKU
ONARIMINDA İNSAN GÖBEK KORDONU STROMASI
KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
TEDAVİ EDİCİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Zeynep YIĞMAN

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN:
Prof. Dr. Alp CAN**

**ANKARA
2015**

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı : Zeynep YİĞMAN	Sınav tarihi: 15.6 / 2015
Anabilim/Bilim Dalı : Histoloji-Embriyoloji ABD	
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Alp CAN	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Sıcakta Milyardiyal İşlemi Sonrası Dolu Onarımında İnsan Göbeği Karbonu Strömisi Kaynaklı Metabolik Kök Hücrelerin Tedavi Edici Etkisinin Araştırılması	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Alp CAN Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Emre Erden Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Sibel Koca Anabilim/Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Miyokard infarktüsü, kalbin temel fonksiyonel birimi olan kalp kasında doku kaybıyla seyreden son derece ölümcül bir kalp hastalığıdır. Akut dönemden sonra sağ kalan hastalarda yaşam kalitesini bozan miyokard infarktüsü, dünya çapında yaygın ve tedavisi maliyetli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Günümüzde yaygın olan medikal ve invaziv tedavi yaklaşımları hastaların semptomlarını hafifleterek yaşam kalitelerini artırsa da, kalp fonksiyonları için gerekli olan ve kaybedilen dokuyu yerine koyma konusunda yetersiz kalmaktadır. Hücresel tedavi uygulamaları, miyokard infarktüsü sonrasında kaybedilen dokuyu yerine koymada ümit veren bir tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bir çok deneysel ve klinik çalışmayla iyileşmeye olan etkileri ortaya konulan çok sayıda hücresel tedavi seçeneği bulunmaktadır. İnsan göbek kordonu stromasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı tipte hücrelere dönüşme potansiyelleri bunun yanı sıra immunosüpresif, anjiyogenik, anti-apoptotik etkileri göz önüne alındığında bu hücreler de iyi bir tedavi adayı gibi görünmektedir.

İyi araştırmacılar, iyi akademisyenler yetiştirmek için gerek bilimsel donanımıyla gerekse sosyal yaşama dair tecrübeleriyle bizlere iyi bir örnek olan, hem fakülte hem uzmanlık eğitimim süresince bilgilerinden çokça istifade ettiğim, uzmanlık eğitimi ve tez çalışma aşamalarımnda bilgisini ve desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Alp Can'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince kıymetli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda desteklerini hissettiğim değerli hocalarım Sayın Prof. Dr Canan Akbay'a Sayın Prof. Dr. Cengiz Güven'e, Sayın Prof. Dr. Nurşen Saraç'a, Sayın Prof. Dr. Belgin Can'a, Sayın Prof. Dr. Esra Erdemli'ye, Sayın Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Oya Evirgen'e, Sayın Prof. Dr. Sevim Aydın'a, Sayın Doç. Dr. Özgür Çınar'a, Sayın Yard. Doç. Dr. Deniz Billur'a ve Sayın Uzm. Dr. Ferda Topal Çelikkan' a teşekkür ederim.

Tez çalışma aşamalarımnda yeri geldiğinde birlikte çalıştığım bu anlamda benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Tulga Ulus'a, Sayın Prof. Dr. Nilüfer Turan Dural'a, Sayın Doç. Dr. Fadıl Kara'ya ve Araş. Gör. Derya Özdemir'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar tecrübelerime olan önemli katkıları ve destekleri için Remzi Ata'ya, Hüseyin Solmaz'a, Erdoğan Çalışkan ve Nezihe Akçakaya'ya, ayrıca İlkay Bektaş ve Abdülkerim Dilbaz'a teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşı olmalarının ötesinde birçok durumda yanımda olan, varlıklarından mutluluk duyduğum çok değerli arkadaşlarım Bio. Zeynep Çakar'a, Uzm. Bio. Hakan Coşkun'a, Dr. Bio. Duru Aras'a, Uzm. Bio. E. Nazlı Hayırlı'ya, Vet. Hek. Masoud Afshani'ye, Uzm. Bio. Şule Kızıl'a, Vet. Hek. Pınar Bayram'a, Uzm. Dr. Hilal Göktürk'e ve Gülay Koç'a teşekkür ederim.

İdeallerimi ve hayallerimi gerçekleştirmek için beni her anlamda ve her anımda destekleyen ve adeta benimle birlikte çabalayan en değerli varlıklarım annem Perihan Gülhan'a, babam Seyfettin Gülhan'a, ablam Neslihan ve kardeşim Bilal'e ve sevgili eşim Metin'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Zeynep YIĞMAN

Ankara-2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KALBİN EMBRİYOLOJİSİ	3
2.1.1. Erken Dönemde Kalp Gelişimi	3
2.1.2. İleri Dönemde Kalp Gelişimi	5
2.2. KALBİN ANATOMİSİ VE YAPISAL ORGANİZASYONU	13
2.2.1. Endokardiyum	16
2.2.2. Miyokardiyum	17
2.2.3. Epikardiyum	21
2.2.4. Kalbin İleti Sistemi	22
2.2.5. Kalbin Kök/Öncü Hücreleri	24
2.2.6. Kalbin Damarları	25
2.2.7. Kalbin Lenfatikleri	25
2.2.8. Kalbin Sinirleri	25
2.3. MİYOKARD İNFARKTÜSÜ VE MİYOKARD İNFARKTÜSÜ SONRASINDA GÖRÜLEN HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER	26
2.4. GÖBEK KORDONU STROMASI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. iGKS-MKH’NİN İZOLE EDİLMESİ, KÜLTÜRÜ VE KRİYOPREZERVASYONU	29
3.1.1. iGKS-MKH’nin İzole Edilmesi ve Kültürü	29

3.1.2. iGKS-MKH'nin Kriyoprezervasyonu ve Çözülmesi.....	33
3.1.3. Nakil Öncesinde iGKS-MKH'nin İşaretlenmesi.....	34
3.2. HAYVANLARDA MİYOKARD İNFARKTÜSÜ OLUŞTURULMASI VE HÜCRELERİN HAYVANLARA UYGULANMASI	38
3.2.1. Hayvanlarda Miyokard İnfarktüsü Oluşturulması.....	38
3.2.2. Hücrelerin Hayvanlara Uygulanması.....	40
3.3. HAYVANLARDAKİ KARDİYAK İYİLEŞMENİN İZLENMESİ.....	41
3.4. KALP DOKULARININ ELDE EDİLMESİ VE İNFARKT ALANI DEĞERLENDİRMESİ VE MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN HAZIRLANMASI.....	41
3.4.1. Dokularda İnfarkt Alanı Değerlendirmesi.....	41
3.4.2. Dokuların Mikroskopik İnceleme İçin Hazırlanması	48
3.4.2.1. Dokuların Masson'un Trikrom Boyasıyla Boyanması	49
3.4.2.2. Kalp Dokularında Flüoresan İmmünohistokimyasal İnceleme.....	50
3.5. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ.....	52
4. BULGULAR	53
4.1. iGKS-MKH VE PBS GRUPLARININ EKOKARDİYOGRAFİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.....	53
4.3. MİKROSKOBİK İNCELEME SONUÇLARI.....	55
4.3.1. Masson'un Trikrom Boyası Sonrasında Gözlemlenen Bulgular.....	55
4.3.1.1. PBS Grubuna Ait Dokuların Masson'un Trikrom Boyası Bulguları	56
4.3.1.2. iGKS-MKH Grubuna Ait Dokuların Masson'un Trikrom Boyası Bulguları.....	59
4.3.2. iGKS-MKH Grubuna Ait Dokuların Flüoresan İmmünohistokimyasal İnceleme Bulguları	61
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇLAR.....	76
ÖZET	77

SUMMARY	80
7. KAYNAKLAR.....	83
8. EKLER	92
EK 1. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	92
EK 2. KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	93
EK 3. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL RAPORU	95

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
α-SMA	: α -Smooth Muscle Actin, α - Düz Kas Aktini
ATP	: Adenozin Trifosfat
AV	: Atriyoventriküler
BrdU	: 5-bromo-2'-deoxyuridine
CaCl₂.2H₂O	: Kalsiyum Klorür
Calcein AM	: Calcein Acetomethoxy
CD	: Cluster of Differentiation
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre Kare
cm H₂O	: Santimetre Su
CM-DiI	: Carbocyanine 1,1'-dioctadecyl-1-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate
CO₂	: Karbondioksit
cTnT	: Cardiac Troponin T
cTnI	: Cardiac Troponin I
CX	: Circumflexus, Sirkumfleks (Koroner Arter)
Cy3	: Cyanine 3
Cy5	: Cyanine 5
dk	: Dakika
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
EKO	: Ekokardiyografi
FBS	: Fetal Bovine Serum
FEF	: Fare Embriyonik Fibroblast Hücreleri
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
g	: Gram
GFP	: Green Fluorescent Protein
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HE	: Hematoksilin Eozin Boyası
HLA-DR	: Human Leukocyte Antigens-DR

hUC-MSC	: Human Umbilical Cord Stroma Derived Mesenchymal Stem Cells
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endothelial Cells, İnsan Göbek Kordonu Veni Endotel Hücreleri
IU	: İnternasyonal Ünite
iGKS-MKH	: İnsan Göbek Kordonu Stroması Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri
iGK-PVH	: İnsan Göbek Kordonu Perivasküler Hücreleri
iGK-SAMH	: İnsan Göbek Kordonu Subamniyotik Alan Mezenkimal Kök Hücreleri
İV	: İntravenöz
İVS	: İnterventriküler (Ventriküller Arası) septum
KCl	: Potasyum Klorür
kg	: Kilogram
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
KVS	: Kardiyovasküler Sistem
L	: Litre
LA	: Left Atrium, Sol Atriyum
LAD	: Left Anterior Descending, Sol Ön İnen (Koroner Arter)
LV	: Left Ventricle, Sol Ventrikül
LVEDD	: Left Ventricle End Diastolic Diameter, Sol Ventrikül Diyastol Sonu Çapı
LVEF	: Left Ventricle Ejection Fraction, Sol Ventrikül Ejeksiyon Fraksiyonu
LVESD	: Left Ventricle End Systolic Diameter, Sol Ventrikül Sistol Sonu Çapı
LVFS	: Left Ventricular Fractional Shortening, Sol Ventrikülün Fraksiyonel Kısalması
M	: Molar
MA	: Moleküler Ağırlık
MCF7	: Michigan Cancer Foundation-7 Hücreleri
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram

MgSO₄.7H₂O	: Magnezyum Sülfat
MHC	: Major Histocompatibility Complex, Temel Doku Uygunluğu Bileşeni
MI	: Myocardial Infarction
Mİ	: Miyokard İnfarktüsü
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
mmHg	: Milimetre Civa
mmol	: Milimol
NaCl	: Sodyum Klorür
NaHCO₃	: Sodyum Bikarbonat
O₂	: Oksijen
PBS	: Phosphate Buffered Saline, Fosfat Tamponlu Salin
PCR	: Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	: Paraformaldehit
RA	: Right Atrium, Sağ Atriyum
RCA	: Right Coronary Artery, Sağ Koroner Arter
RV	: Right Ventricle, Sağ Ventrikül
SA	: Sinuatriyal
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TTC	: Trifenil Tetrazolyum Klorid
uPKH	: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler
VKİ	: Vena Kava İnferiyor
VKS	: Vena Kava Superiyor
vWF	: von Willebrand Factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Bir çift kalp tüpünün oluşumunu gösteren şematik çizim.....	4
Şekil 2.2.	Yaklaşık 26 günlük bir embriyonda primordiyal kalbe açılan damar yapılarını gösteren şematik çizim.....	5
Şekil 2.3.	Endokardiyal kalp tüplerinin füzyonu (A) sonucu oluşan kalp tüpü ve kalp tüpü tabakalarının gösterildiği (B) şematik çizim	6
Şekil 2.4.	Kıvrılıp bükülme sürecinde kalp tüpünde oluşan bölgesel genişlemelerin ve darlıkların görüldüğü şematik çizim	7
Şekil 2.5.	Atriyoventriküler yastıkları (A), bunların füzyonunu (B) ve kalbin bölmelere ayrılmasını (C) gösteren şematik çizim.....	8
Şekil 2.6.	Atriyoventriküler kapakların ve korda tendinaların oluşumunu gösteren şematik çizim	9
Şekil 2.7.	Farklı gelişim evreleriyle kalbin bölmelere ayrılmasını gösteren şematik çizim.....	10
Şekil 2.8.	11-13 günlük bir fare embriyonuna ait hematoksilin-eozin (HE) boyalı frozen kesit preparasyonu.....	12
Şekil 2.9.	10 haftalık insan fetusuna ait HE boyalı parafin kesit.	13
Şekil 2.10.	Kalbin boşluklarının gösterildiği, HE boyalı bir sıçan kalbi mikrografı.....	14
Şekil 2.11.	Kalbin iç yüzünü döşeyen endokardiyum ve komşuluğundaki miyokardiyumun görüldüğü HE boyalı bir kalp kesiti	16
Şekil 2.12.	HE ile boyanmış insan kalp kası parafin kesitine ait bir mikroskopik görüntüdür.	18
Şekil 2.13.	HE ile boyanmış insan kalp kası parafin kesitinin büyük büyütme mikrografı.....	19
Şekil 2.14.	Miyokardiyumun dış kısmında, kalbin en dış tabakası epikardiyumun görüldüğü HE boyalı bir mikroskopik görüntü	21
Şekil 2.15.	Kalbin ileti sisteminin gösterildiği şematik çizim	22
Şekil 3.1.	Steril koşullarda laminer kabin içerisindeki cam Petri kabına aktarılan kordon örneği (A), uzun eksen boyunca açılarak damar	

yapıların görünür hâle getirildiği kordon parçası (B) ve damar yapıların uzaklaştırılmasıyla elde edilen ve hücre kaynağı olarak kullanılan kordon dokusu (C) gösterilmektedir	30
Şekil 3.2. Damar yapıları uzaklaştırılan kordon dokusunun diseksiyon makasıyla küçük parçalara ayrıştırılması (A) ve yeterince küçültülen parçaların flasklara aktarılması (B) görülmektedir.	31
Şekil 3.3. Eksplant etrafında çoğalan adherent hücreler	32
Şekil 3.4. Tipik morfolojileri ile adherent iGKS-MKH. Bar 500 µm.	32
Şekil 3.4. Sırasıyla calcein AM uygulanmayan negatif kontrol, 4 µM calcein AM ile 80 ve 220 dk. süresince inkübe edilen iGKS-MKH'nin flüoresan etkinliğini gösteren mikrograflar. Bar 200 µm.....	35
Şekil 3.5. Sırasıyla negatif kontrol grubu ve 4 µM calcein AM ile 80 ve 220 dk. süresince inkübe edilen iGKS-MKH'nin, pasajlama işleminden sonra flüoresan etkinliklerinin görüldüğü mikrograflar. Bar 100 µm.	35
Şekil 3.6. Hücrelerin dondurma-çözme işlemi sonrasındaki flüoresan etkinliklerinin görüldüğü mikrograflar. Negatif kontrol grubunda hücrelere kriyoprezervasyon uygulanmadı. Bar 100 µm.	36
Şekil 3.7. Pasajlandıktan 11 gün sonra fikse edilen calcein AM yüklü hücrelerin konfokal mikrografları görülmektedir. Bar 100 µm.	36
Şekil 3.8. Kriyoprezervasyon işleminden 5 gün sonra çözülerek 6 gün takip edilen ve ardından fikse edilen calcein AM yüklü hücrelerin konfokal mikrografları görülmektedir. Bar 100 µm.	37
Şekil 3.9. 2 µM calcein AM ile 60 dk. boyunca inkübe edilen hücrelerin mikrografları.....	37
Şekil 3.10. Trakea kanüle edilerek sıçanın soluması sağlandıktan ve gerekli cilt temizliği yapıldıktan sonra sol torakotomi (A) ile toraksın açılması ve kalbin eksplore edilmesi (B) gösterilmektedir.	39
Şekil 3.11. Sol ön inen koroner arterin orta kısmından kalıcı olarak ligasyonu (A; beyaz ok) ve hücrelerin ya da PBS'in infarkt sınırına enjeksiyonu (B) gösterilmektedir.	39

Şekil 3.12. Toraks boşluğuna dren yerleştirilmesi (A) ve anatomiye uygun bir biçimde toraksın kapatılarak girişimin sonlandırılması (B) gösterilmektedir.....	40
Şekil 3.13. Doğrudan fikse edilen (A) ve TTC solüsyonu içerisinde inkübe edildikten sonra fikse edilen (B) sağlıklı kalp dilimlerine ait görüntüler.	43
Şekil 3.14. Femoral ven yoluyla (A) ve pulmoner ven yoluyla (B) TTC perfüzyonunu takiben fikse edilen sağlıklı sıçan kalplerine ait görüntüler.	44
Şekil 3.15. Langendorff düzeneğinde, TTC'nin retrograd perfüzyon yoluyla koroner dolaşıma verilmesiyle boyanan iskemik hasarlı kalplere ait dilimlerin görüntüleri	44
Şekil 3.16. Sabit basınçlı Langendorff cihazına aorttan asılan bir kalbin TTC ile boyanmadan önceki (A) ve boyanmadan sonraki (B) görüntüleri.	46
Şekil 3.17. TTC uygulaması sonrası dilimlenip, infarkt alanı hesaplaması yapmak üzere iki cam levha arasına yerleştirilen kalp dokularına ait bir fotoğraf örneği görülmektedir.....	47
Şekil 3.18. Mİ sonrası, sırasıyla PBS uygulanan (A) ve iGKS-MKH nakledilen (B) sıçanların, TTC uygulamasını takiben infarkt alanı ölçümü yapılan kalplerine ait birer örnek görülmektedir.....	47
Şekil 3.19. İnsana özgü lamin A+C antikoru ile işaretlenen iGKS-MKH, MCF7 ve FEF hücrelerinin konfokal mikrografları.....	51
Şekil 3.20. İnsana özgü lamin A+C antikoru ile işaretlenen insan göbek kordonu, sıçan kalbi ve sıçan dili frozen kesitlerinin mikrografları.....	51
Şekil 3.21. Farklı doku tiplerinde alfa sarkomerik aktin ifadesini gösteren mikrograflar. Ekli küçük resimler negatif kontrollere aittir.....	52
Şekil 4.1. Sırasıyla PBS (A) ve iGKS-MKH gruplarından (B) hayvanlara ait ekokardiyografik görüntüler.....	54
Şekil 4.2. PBS ve iGKS-MKH uygulanan gruplarda infarkt alan büyüklüklerinin değişimini gösteren saplı kutu grafiği (p=0,006).....	55

Şekil 4.3.	Mİ sonrası PBS uygulanan kontrol grubundan bir sıçana ait kalbin, trikrom boyalı preparasyonları görülmektedir.	56
Şekil 4.4.	PBS kontrol grubundan bir sıçanın trikrom boyalı kalp kesiti.....	57
Şekil 4.5.	PBS kontrol grubundan bir hayvana ait kalp kesitlerinde sağlam miyokard dokusu arasında mavi boyalı fibrotik alanların küçük (sol) ve büyük (sağ) büyütme mikrografları.	58
Şekil 4.6.	PBS kontrol grubundan bir hayvana ait trikrom boyalı kalp kesitinde, mavi boyalı fibrotik alan görülmektedir.	58
Şekil 4.7.	Mİ sonrasında iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlardan birine ait kalp kesitlerinin, trikrom boyalı preparasyonları görülmektedir.	59
Şekil 4.8.	iGKS-MKH grubundan bir hayvanın trikrom boyalı kalp kesitinde, sağlam kardiomyositler arasındaki mavi boyalı fibrotik alanların küçük ve büyük büyütme mikrografları görülmektedir.	60
Şekil 4.9.	iGKS-MKH grubundan bir hayvanın kalp kesitinin trikrom boyalı preparasyonu görülmektedir.....	61
Şekil 4.10.	iGKS-MKH grubundan bir sıçanın, fibrozis tespit edilen kalp düzeylerinden alınan ardışık kesitlerden birinin konfokal mikroskopta alınan mikrografı görülmektedir.	62
Şekil 4.11.	iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlardan birine ait kalp kesitinin, Hoechst içeren kapatma mediumu ile kapatıldıktan sonra konfokal mikroskopla alınan görüntüsü görülmektedir.	63
Şekil 4.12.	Yeşil sinyal pozitifliği gösteren hücrelerin bulunduğu fibrotik alanların ardışık kesitleri insana özgü kardiyak troponin I ile inkübe edilerek incelendi.	64
Şekil 4.13.	Fibrozis ve hücre birikimi gösteren ardışık kesitlerde alfa sarkomerik aktinle inkübasyon sonrasına ait bir mikrograf görülmektedir.	65
Şekil 4.14.	Yeşil flüoresan gösteren hücrelerin tespit edildiği fibrotik doku kesitlerinden, alfa sarkomerik aktinle inkübe edilen bir örneğe ait mikrograf görülmektedir.	66

Şekil 4.15. iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlardan birine ait kalp kesitinin konfokal mikrografı. Fibrotik alanda çok sayıda hücre görülmektedir. 67

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 4.1. PBS grubu ve iGKS-MKH grubuna ait sıçanların EKO değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	53
Tablo 4.2. Gruplardaki infarkt alan yüzdelere ilişkin tanımlayıcı istatistikler.....	54

1. GİRİŞ

Miyokard infarktüsü (Mİ), belirgin ve uzun süreli iskemi sonucu gelişen geri dönüşümsüz miyokard hücre hasarı ve nekrozudur (1). Mİ'nin neden olduğu ölümlerin çoğu infarktüsün ilk 1 saati içinde olmakla birlikte (1), sağ kalan hastalarda kontraktıl doku kaybı ve kronik süreçteki yeniden yapılanma nedeniyle değişen düzeylerde kalp yetmezliği sorunu ortaya çıkmaktadır. Mİ tüm dünyada mortalite ve morbiditenin başlıca nedeni olan kalp yetmezliğinin en sık sebebidir (2). Birleşik Devletler'de kalp yetmezliği her yıl yaklaşık olarak 6 milyon insanı etkilemekte ve 300.000'den fazla insanın ölümüne neden olmaktadır ve 40 milyar dolardan fazla sağlık giderinden sorumludur (3). Mİ hastalarında güncel farmakolojik tedaviler, perkütan translüminal koroner anjiyoplasti gibi kateter temelli ve koroner arter baypas greftleme gibi cerrahi müdahaleler kalp yetmezliğinin semptomlarını hafifletmekte ve hastaların yaşam süresini iyileştirmektedir. Ancak bu tedavi yaklaşımlarının hepsi palyatif tedaviler olup, kalp yetmezliğinin temel sorunu olan kontraktıl doku kaybını ve onun yerini alan fibrotik doku gelişimini önleyememektedir (2-4). Bu temel sorunun giderilmesi için yapılan araştırmalarda, kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleri nedeniyle kök hücreler tedavi seçeneği haline gelmiştir. Kalp yetmezliğinde kardiyak rejenerasyon ve kardiyak fonksiyonların düzenlenmesi için kök hücre temelli tedavilerin denendiği çok sayıda temel ve klinik çalışma bulunmaktadır (2, 3). Kök hücre temelli tedavi yaklaşımlarına ilişkin bu çalışmalardan yola çıkarak hücrelerin, kardiyomiyositlere farklılaşarak, endojen kök hücreleri uyatarak, vaskülogeneze katılarak, apoptozu inhibe ederek ve ekstrasellüler matriksin yapılanmasını düzenleyerek etkinlik gösterdiği şeklinde potansiyel mekanizmalar ileri sürülmektedir (3, 5, 6).

Embriyonik kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH), kemik iliği kaynaklı kök hücreler, yağ dokusu mezenkimal kök hücreleri, iskelet kası miyoblastları, kardiyak kök hücreler gibi çok sayıda farklı kaynaktan elde edilen farklı hücre tipleri, kardiyak hasarın giderilmesi ve rejenerasyon etkileri açısından gerek temel gerekse klinik araştırmalara konu olmaya devam etmektedir (2-4, 6). Tamamlanmış çalışmalara bakıldığında, başta farklılaşma kapasitelerine bağlı

olmak üzere, ayrı bir takım özellikleri nedeniyle farklı hücre tiplerinin etkinliklerinin de farklı olduğu görülmektedir.

Biz de bu araştırmamızda, bir multipotent kök hücre olan insan göbek kordonu stroması kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (iGKS-MKH) miyokard infarktüsü sonrası uygulanmasının tedavi edici etkinliğini araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KALBİN EMBRİYOLOJİSİ

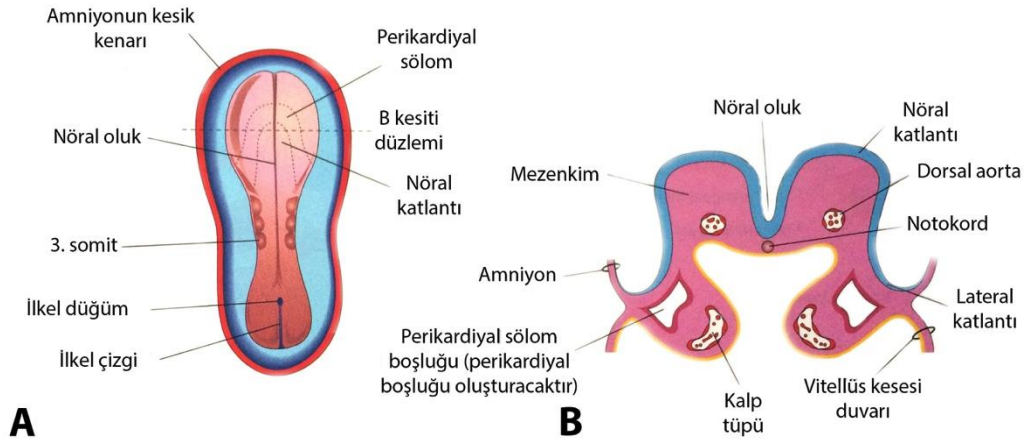
Kalp ve damar sistemi embriyoda ilk olarak işlev görmeye başlayan sistemdir (7). Embriyon döneminde 3. haftanın ortasına kadar metabolik gereksinimler yalnızca difüzyonla sağlanırken bundan sonraki süreçte metabolik gereksinimler tek başına difüzyon ile karşılanamamaktadır. Primordiyal kalp ve damar sistemi, hızlı gelişim nedeniyle metabolik gereksinimlerin artmasının bir sonucu olarak 3. haftanın ortasında oluşmaya başlar (7, 8). Kalp ve damar sistemi dört yapıdan gelişmektedir (7):

- Splanchnik mezoderm
- Paraksiyal ve lateral mezoderm
- Faringeal mezoderm
- Nöral krista hücreleri

2.1.1. Erken Dönemde Kalp Gelişimi

Kardiyak hücreler ilkel çizginin lateralindeki epiblastta yer alırlar ve buradan ilkel çizgi boyunca kraniyuma doğru göç ederek, orofarengeal membran ve nöral katlantıların rostralinde, lateral plak mezoderminin splanchnik tabakasına yerleşirler (8). Hücrelerden ilk göç edenler, kalbin kraniyal bölümlerini oluştururken daha sonrakiler sırasıyla sağ ventrikül, sol ventrikül ve sinüs venozus gibi daha kaudal kısımlarını oluşturur (8).

Kalbin oluşumu ön endodermden kaynaklanan sinyallerle uyarılmaktadır ve en erken oluşan yapı, 3. haftada kardiyojenik mezodermden ortaya çıkan ve anjiyoplastik kordonlar olarak adlandırılan endotel hücreleri dizisidir (7). Bu anjiyoplastik kordonlar içerisinde boşluk gelişerek iki adet kalp tüpüne dönüşür (Şekil 2.1) (7).



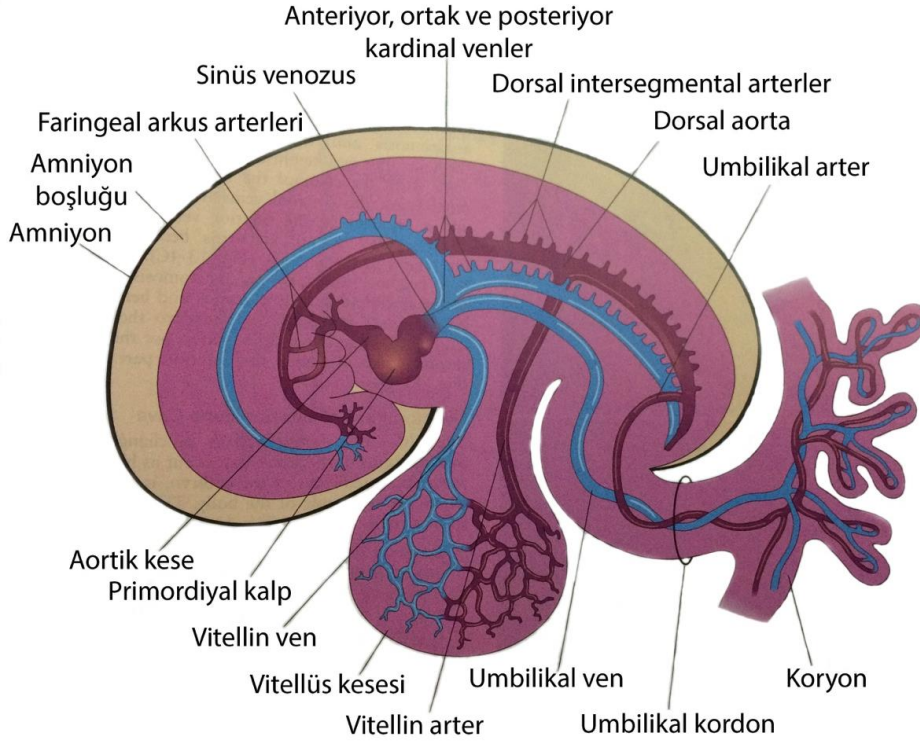
Şekil 2.1. Bir çift kalp tüpünün oluşumunu gösteren şematik çizim.

Yaklaşık 20 günlük bir embriyonun dorsal yüzden görünümü (A) ve kalp bölgesinden geçen bir transvers kesit görülmektedir (B). Kalp tüpleri perikardiyal solum boşluğunun hemen önünde kardiyojenik mezoderm bölgesinde görülmektedir (Keith L. Moore. The Developing Human, Clinically Oriented Embryology'den değiştirilerek alınmıştır).

Embriyon gövdesinin sefalokaudal ve lateral yönde katlanmasıyla birbirine yaklaşan bu iki kalp tüpü (endokardiyal tüp), kraniyal uçtan başlayarak kaudal uca doğru füzyona uğrayıp tek bir kalp tüpünü oluştururlar (Şekil 2.3) (7, 8).

Embriyon döneminin 4. haftasında bu kalp tüpünün venöz ucu olan sinüs venozusa üç çift ven drene olur (Şekil 2.2) (7, 8):

- Vitellüs kesesinden kanı getiren vitellin (omfalomezenterik) ven
- Koryondan iyi oksijenlenmiş kanı getiren umbilikal ven
- Embriyon gövdesinden kanı getiren ön ve arka kardinal venlerin birleşerek oluşturduğu ortak kardinal ven.

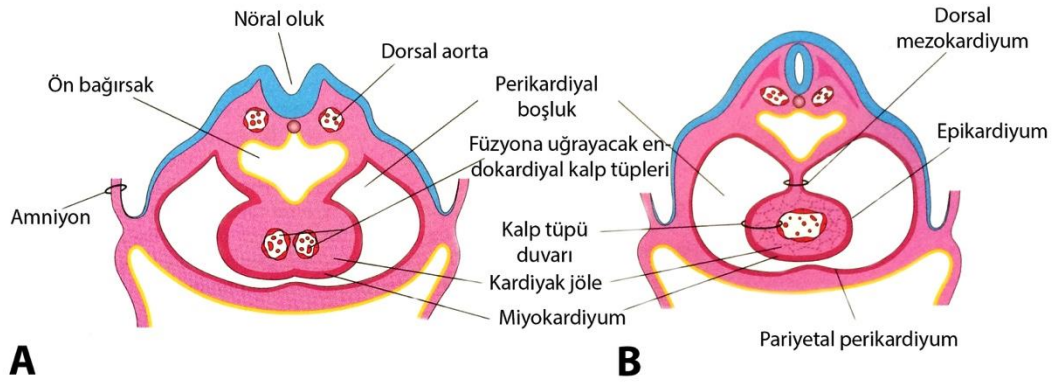


Şekil 2.2. Yaklaşık 26 günlük bir embriyonda primordiyal kalbe açılan damar yapılarını gösteren şematik çizim

(Keith L. Moore. The Developing Human, Clinically Oriented Embryology'den değiştirilerek alınmıştır).

2.1.2. İleri Dönemde Kalp Gelişimi

Endokardiyal tüplerin füzyonuyla oluşan kalp tüpünün etrafında, perikardiyal boşluğu çevreleyen splanknik mezodermden gelişen miyokardiyum şekillenir (7, 8). Miyokardiyum bir yandan kalınlaşırken bir yandan da kalp tüpüyle arasını dolduran ve kardiyak jöle adı verilen jelatinöz bir bağ dokusu sentezler (7, 8). Mezodermal bir doku olan septum transversumun yüzeyindeki mezotel hücreleri, epikardiyumu (visseral perikardiyum) oluşturmak üzere miyokardiyum üzerinde yayılır (7, 8). Epikardiyumun küçük bir kısmıysa akım çıkış kanalından gelişen mezotel hücrelerince oluşturulur (8). Bu şekilde kalp, endokardiyum adı verilen ve iç kısmını döşeyen bir endotel tabakası, onu dıştan çevreleyen ilkel bir miyokardiyum tabakası ve en dışta da epikardiyum olmak üzere üç tabakalı bir tüp haline gelir ve 22-23. günlerde kalp atımları başlar (Şekil 2.3.B) (7, 8).

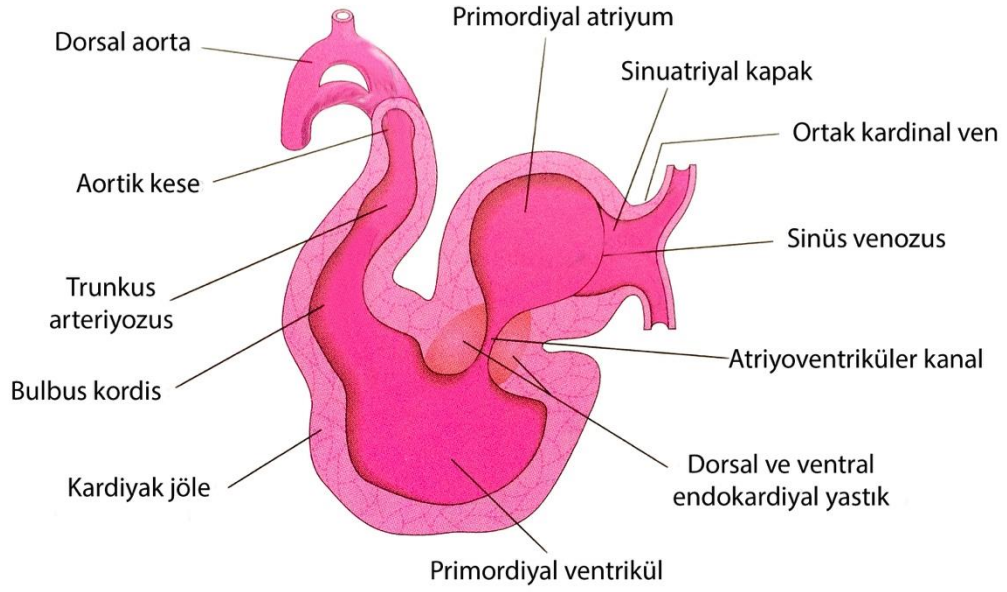


Şekil 2.3. Endokardiyal kalp tüplerinin füzyonu (A) sonucu oluşan kalp tüpü ve kalp tüpü tabakalarının gösterildiği (B) şematik çizim

(Keith L. Moore. The Developing Human, Clinically Oriented Embryology'den değiştirilerek alınmıştır).

Kalp tüpü 23.-28. günler arasında kıvrılıp bükülme süreci geçirerek kardiyak halkaya dönüşür (7, 8). Bu dönüşüm sırasında kalp tüpünün kranial bölümü ventrale, kaudale ve sağa doğru kıvrılırken, kaudal bölümü de dorsale, kraniale ve sola doğru bükülür (8). Tüm bu süreçle eş zamanlı olarak kalp tüpünde bölgesel genişlemeler oluşur (8). Bu oluşumlar kaudalden kraniale doğru şu şekilde sıralanabilir (Şekil 2.4) (7, 8):

- Vitellin, umbilikal ve ortak kardinal venlerle gelen kanın toplandığı sinüs venozus
- Primordiyal atriyum
- Primordiyal ventrikül
- Bulbus kordis
- Konus kordis
- Trunkus arteriyozus.



Şekil 2.4. Kırılıp bükülme sürecinde kalp tüpünde oluşan bölgesel genişlemelerin ve darlıkların görüldüğü şematik çizim

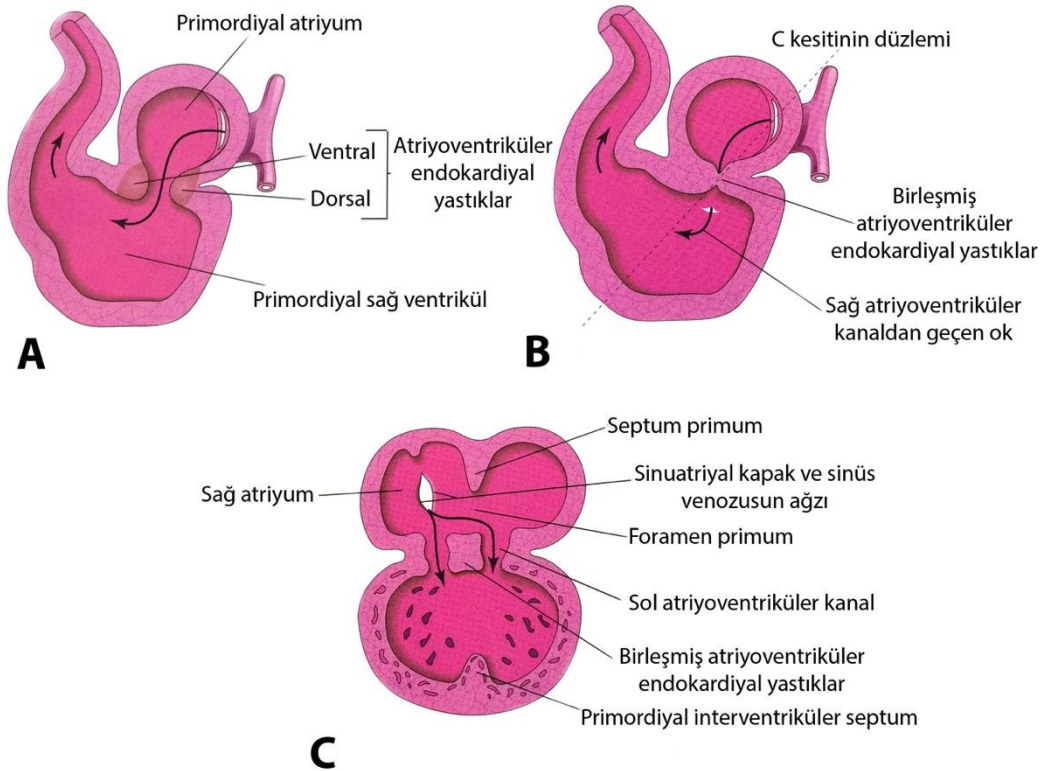
(Keith L. Moore. The Developing Human, Clinically Oriented Embryology'den değiştirilerek alınmıştır)

Bu genişlemeler arasında da dar yapılar halinde kalan atriyoventriküler bileşke içte atriyoventriküler kanalı (Şekil 2.4) oluştururken, dışarıdan bulboventriküler sulkus olarak belli olan sınır da içte primer interventriküler forameni oluşturur (8). Primer interventriküler foramenin proksimal ve distal kısımlarından ilkel trabeküller geliştikten sonra, trabeküler bir yapı kazanan primordiyal ventrikül primitif sol ventriküle dönüşürken, bulbus kordisin trabeküle hâle gelen üçte birlik proksimal kısmı da primitif sağ ventriküle dönüşür (8). Bulbus kordisin orta kısmı olan konus kordis, ventriküllerin akım çıkış kanallarını oluşturacak iken, uç kısmı olan trunkus arteriyozus ise aort ve pulmoner arterin köklerini ve ilk kısımlarını oluşturacaktır (8).

Halka şeklini alırken bir yandan da perikardiyal boşluk içine doğru büyüyen kalp, perikardiyal boşluğun dorsal kenarına dorsal mezokardiyum ile bağlıdır (Şekil 2.3B) (7, 8). Daha sonraki aşamalarda bu dorsal mezokardiyumun merkezi kısmı dejenere olarak perikardiyal boşluğun her iki tarafını birbirine bağlayan transvers

perikardiyal sinüse dönüşür ve kalp perikardiyal boşluğa sadece karnial ve kaudal uçlarından bağlı kalır (7).

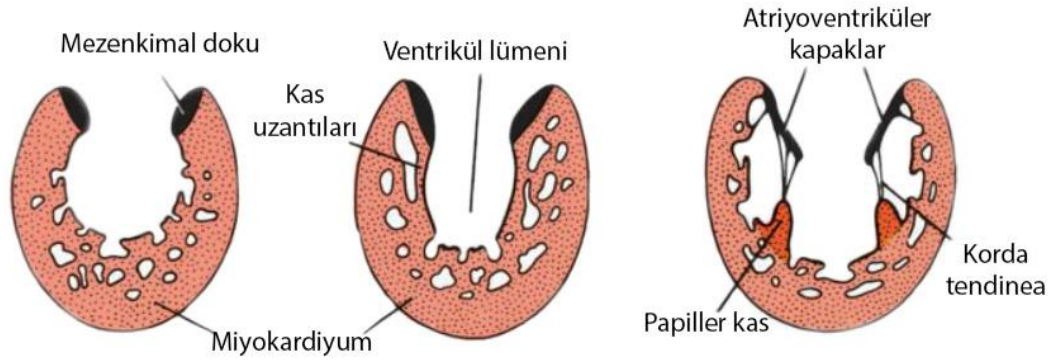
Primordiyal kalpte bölümlere ayrılma 4. haftanın ortalarında başlayarak 8. haftanın sonlarında tamamlanır ve farklı bölümlerin gelişimi eş zamanlı olarak gerçekleşir (7). Dördüncü haftanın sonlarına doğru atriyovenriküler (AV) kanalın ön ve arka duvarlarında mezenkim kökenli, kardiyak jöleden 2 adet endokardiyal yastık oluşur ve 5. hafta boyunca birbirine yaklaşan bu iki yapı birleşerek AV kanalı sağ ve sol olmak üzere ikiye böler (Şekil 2.5) (7, 8). Sağlı sollu bu iki kanal primordiyal atriyumu primordiyal ventrikülden kısmen ayırmakta ve endokardiyal yastıklar AV kapak işlevi görmektedir (7).



Şekil 2.5. Atriyovenriküler yastıkları (A), bunların füzyonunu (B) ve kalbin bölmelere ayrılmasını (C) gösteren şematik çizim.

C kesiti, B de gösterilen düzlemde kalbin koronal kesitidir (Keith L. Moore. The Developing Human, Clinically Oriented Embryology'den değiştirilerek alınmıştır).

AV endokardiyal yastıkların füzyonundan sonra, AV kanal açıklıklarının etrafı bölgesel mezenkim ile sarılırken kan akımının etkisiyle ventriküler taraftaki mezenkimal doku yer yer incelenerek perfore olur ve sonuçta ventrikül duvarına kas uzantılarıyla bağlanan kapakçıklar ortaya çıkar (8). Kas uzantılarının yerini zamanla bağ dokusu alır ve sol AV kanalda biküspid, sağ AV kanalda ise triküspid kapakçıklar, korda tendinea adı verilen bu bağ dokusu uzantılarla ventrikül duvarındaki kalın trabeküler yapılar olan papiller kaslara tutunur (Şekil 2.6) (8).



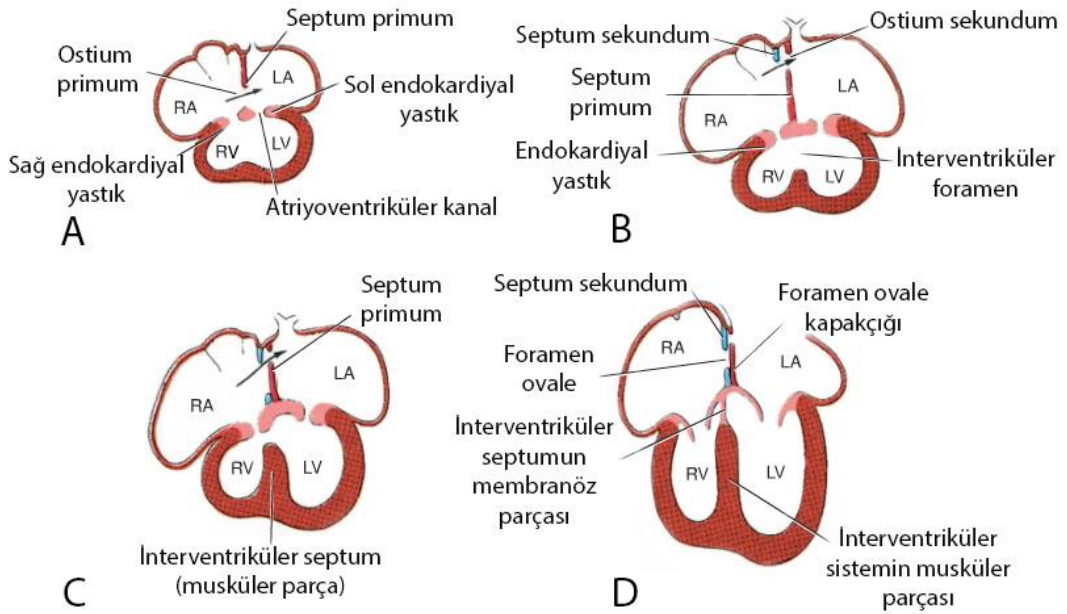
Şekil 2.6. Atriyoventriküler kapakların ve korda tendinaların oluşumunu gösteren şematik çizim

(T. W. Sadler. Langman Medikal Embriyoloji'den değiştirilerek alınmıştır).

Dördüncü haftanın sonunda, primordiyal atriyumun tepe kısmından endokardiyal yastıklara doğru, septum primum adı verilen ince bir membran uzayarak primordiyal atriyumu kısmen sağ ve sol yarılarına ayırır (Şekil 2.7A) (7). Septum primumun endokardiyal yastıklara doğru büyümeye devam etmesi sonucunda, bu iki yapı arasında kalan ve foramen primum (ostium primum) olarak adlandırılan açıklık da giderek küçülür ve bu iki yapının füzyonuyla kapanır (7, 8). Sağ atriyumdan sol atriyuma kan akışına izin veren foramen primum kapanmadan önce, apoptoz nedeniyle septum primumun orta kısmında oluşan doku kaybıyla ikinci bir açıklık olan foramen sekundum (ostium sekundum) şekillenir (Şekil 2.7.B) (7, 8).

Sağ atriyumun duvarında, septum primumun hemen yanında bu kez kalın musküler bir katlantı belirir. Septum sekundum adı verilen bu yapı 5. ve 6. haftalar süresince uzayarak foramen sekundumun üzerini örter (7). Septum sekundum da

atriyumları tam olarak ayırmayıp, üst ve alt uzantıları arasında foramen ovale adı verilen bir açıklık bulundurur (7, 8). Septum primumun sol atriyum çatısına yapışık olan kısmı zamanla gerileyip ortadan kalkarken, endokardiyal yastıklara bitişik haldeki geri kalan kısmı da foramen ovalenin kapakçığı gibi işlev görmeye başlar (Şekil 2.7.D) (7, 8). İntrauterin yaşamda bu kapakçık kanın sağ atriyumdan sol atriya doğru tek yönlü geçişine izin verirken, doğumu takiben akciğer solunumunun devreye girmesi sol atriyum basıncının sağa göre artmasına ve artan basınç da bu kapakçığın fonksiyonel olarak kapanmasına neden olur (7, 8). Doğumdan yaklaşık 3 ay sonra da kapakçık septum sekundum ile kaynaşarak fossa ovaleyi oluşturur (7).



Şekil 2.7. Farklı gelişim evreleriyle kalbin bölmelere ayrılmasını gösteren şematik çizim.

Sırasıyla 30 (A), 33 (B), 37 (C) günlük embriyon kalbinde ve yenidoğan kalbinde (D) septumların ve ilişkili yapıların görünümü. RA: Sağ atriyum, RV: Sağ ventrikül, LA: Sol atriyum, LV: Sol ventrikül. (T. W. Sadler. Langman Medikal Embriyoloji'den değiştirilerek alınmıştır).

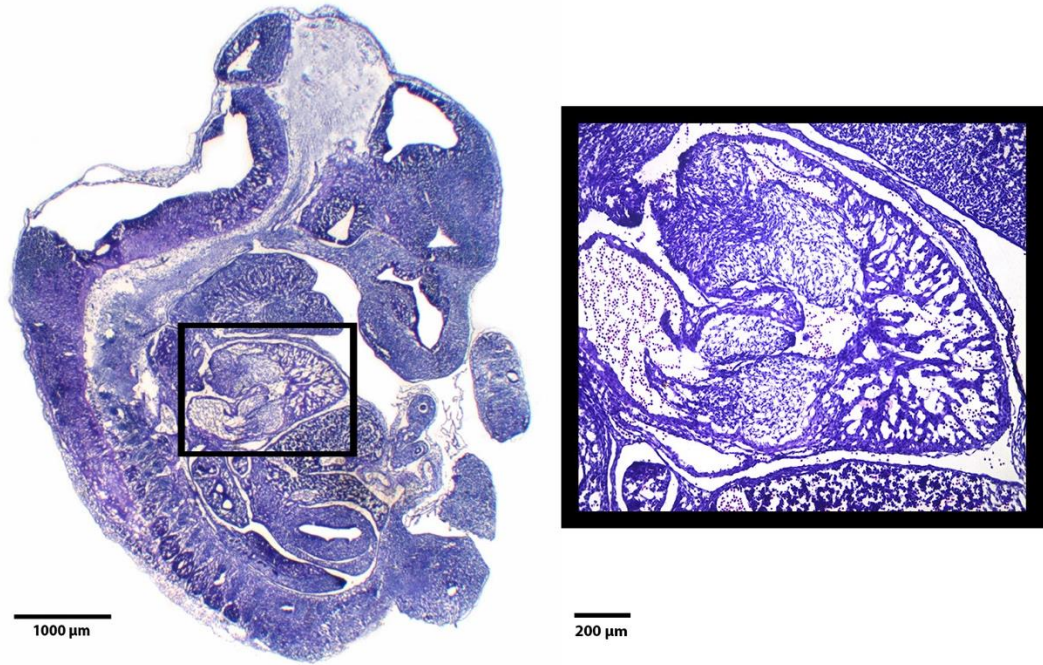
Primitif sol atriyumun arka duvarından başlangıçta tek bir pulmoner ven gelişirken, ilerleyen dönemde gelişmeye devam eden sol atriya giren pulmoner ven sayısı erişkinde olduğu gibi dörde ulaşır (8). Pulmoner venlerin katılımıyla

erişkinde sol atriyum duvarının büyük düz kısmı şekillenirken, trabeküler bir görünümü olan ve primordiyal atriyumdan köken alan atriyal appendiks ise sol atriyumun küçük bir kısmını oluşturur (7, 8). Primordiyal kalp halka şeklini alırken, sinüs venozus da sağ ve sol sinüs boynuzları adı verilen lateral genişlemeler gösterir (7). Soldan sağa şantların bir sonucu olarak sağ sinüs boynuzu genişleyerek 4. haftanın sonlarına doğru sol boynuzdan belirgin olarak daha büyük bir hâle gelir (7, 8). Bu şantlardan biri anterior kardinal venler anastomoz yaptığına oluşur. Soldakinden sağ anterior kardinal vene doğru oluşan bu şant sol brakiosefalik veni oluştururken, sağ anterior kardinal ven ve sağ ortak kardinal ven, superiyor vena kava'ya (VKS) dönüşür (7). Sinüs venozusun sağ boynuzu genişlemeye devam ederken, VKS ve inferiyor vena kava (VKİ) yoluyla tüm embriyo gövdesinden ve plasentadan gelen kanı toplamaktadır. Başlangıçta ayrı bir bölüm olan sinüs venozus, sol boynuzunun koroner sinüse dönüşmesi ve sağ boynuzunun da sağ atriyum duvar yapısına katılmasıyla sağ atriyumun düz parçası olan sinüs venaruma dönüşür (7). Sağ atriyumun geri kalan trabeküler kısmı ile sinüs venarumu, iç yüzde krista terminalis dış yüzde ise sulkus terminalis birbirinden ayırır (7, 8).

Primordiyal ventrikülün bölünmesi, musküler interventriküler septum adı verilen bir kabartının, ventrikül duvarının tabanında belirmesiyle başlar (Şekil 2.7.C) (7). Genişleyen iki primitif ventrikülün iç duvarlarının birleşmesiyle oluşan bu yapı, daha sonra septumdaki miyoblastların aktif proliferasyonu ile uzamaya devam eder (7, 8). Yedinci haftaya kadar, musküler interventriküler septumun serbest ucu ile birleşmiş endokardiyal yastıklar arasında, interventriküler foramen adı verilen ve iki ventrikül arasında bağlantı sağlayan bir açıklık bulunur (Şekil 2.7.B). Endokardiyal yastıktan uzayan doku, musküler interventriküler septumla birleşir ve yedinci haftanın sonunda interventriküler forameni kapatarak septumun membranöz kısmını oluşturur (Şekil 2.7.D) (7). Gelişen ventriküllerin iç yüzeyindeki kavitasyonlar sonucunda trabeküla karnea adı verilen musküler gruplar ağı oluşur. Bu musküler demetlerin bir kısmı da papiller kaslara ve korda tendinalara dönüşür (7).

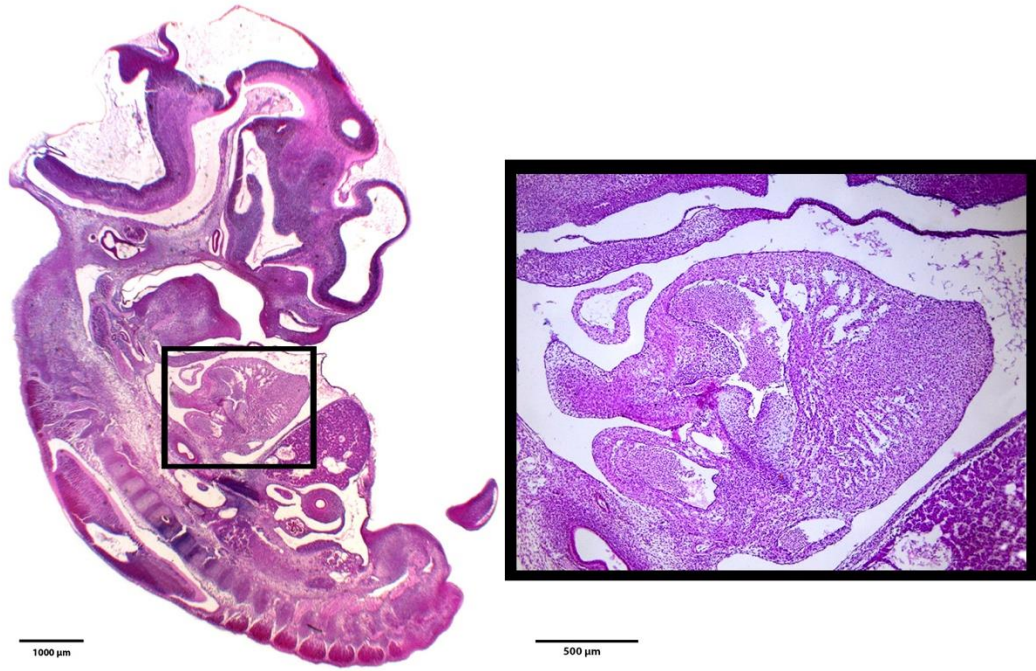
Bulbus kordis duvarındaki mezenkimal hücre proliferasyonu sonucu, beşinci haftada bir çift konus tümseği ve eş zamanlı olarak, bu tümseklerle devamlılık gösteren, bir çift de trunkus tümseği oluşur (7, 8). Nöral kristadan göç eden hücreler

bu tümsek bölgelerine yerleşerek konus kordis ve trunkus arteriozusta endokardiyal yastıkların oluşumunda yer alırlar (7, 8). Bu süreçte tümseklerin karşılıklı büyüyerek füzyona uğraması sonucunda, spiral seyirli bir aortikopulmoner septum oluşur. Bu septum konus kordis ve trunkus arteriozusu, çıkan aorta ve pulmoner trunkus olarak adlandırılan iki arteriyal kanala ayırır (7, 8). Ventrikül duvarlarıyla kaynaşan bulbus kordis, sağ ventrikülde konus arteriozusa dönüşürken, sol ventrikülde de aortik vestibulu oluşturur (7). Trunkus bölünmesi sonlanmak üzereyken aort ve pulmoner trunkus ağızlarının etrafındaki subendokardiyal dokudan semilunar kapakçıklar gelişmeye başlar (7, 8).



Şekil 2.8. 11-13 günlük bir fare embriyonuna ait hematoksilin-eozin (HE) boyalı frozen kesit preparasyonu.

Solda embriyona ait total sagittal kesit, sağda ise bu kesitteki kutu içinde yer alan kalbin büyütülmüş mikrografı görülmektedir.



Şekil 2.9. 10 haftalık insan fetusuna ait HE boyalı parafin kesit.

Solda fetüsün total sagittal kesiti, sağda ise bu kesitteki kutu içinde yer alan kalbin büyütülmüş mikrografi görülmektedir (Preparat Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD arşivinden alınmıştır).

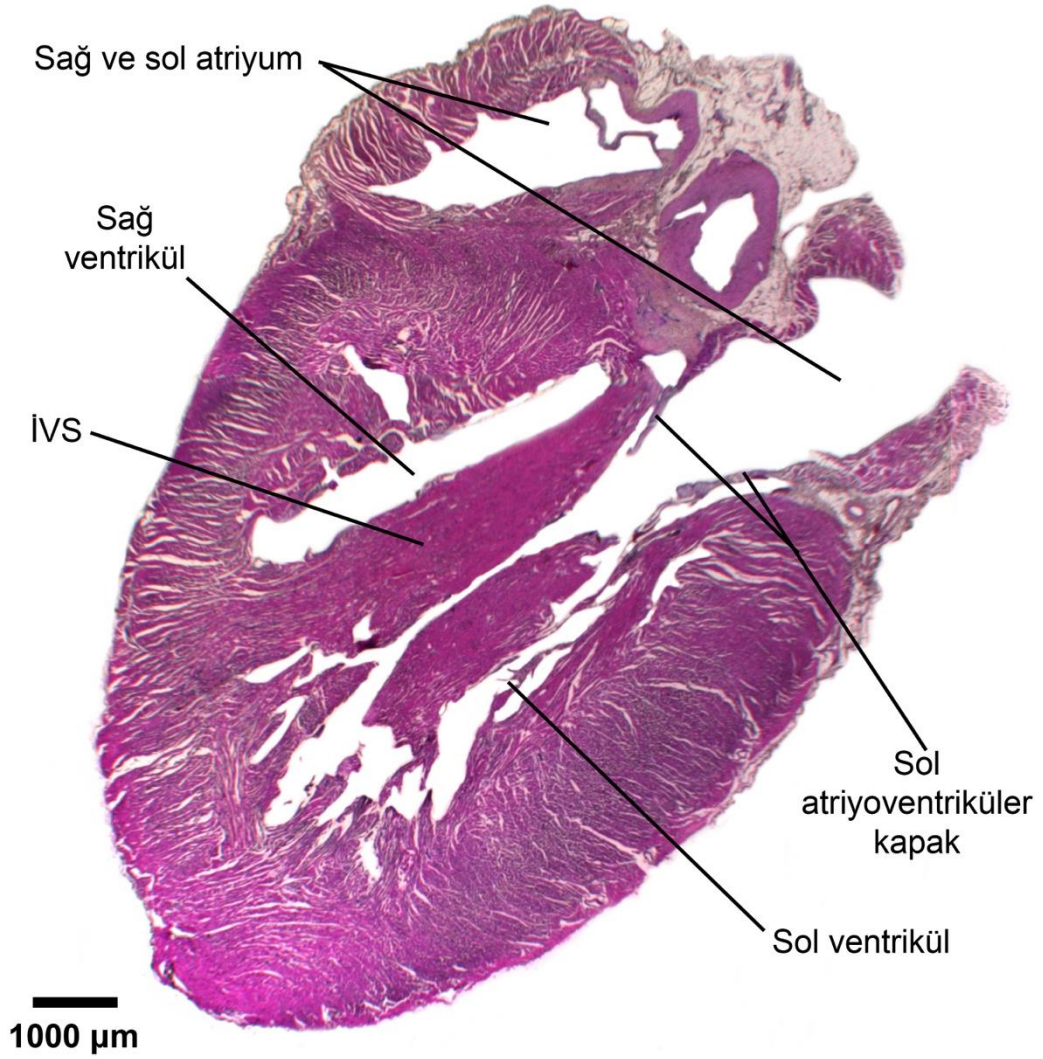
2.2. KALBİN ANATOMİSİ VE YAPISAL ORGANİZASYONU

Kalp ve damar sistemi (kardiyovasküler sistem, KVS), oksijen ve besin maddeleri gibi metabolitleri, sistemik etkiye sahip mediyatörleri dokulara taşıyan ve dokularda oluşmuş metabolik ürünlerin de vücuttan atılmak üzere boşaltım organlarına taşınmasını sağlayan sistemdir (9, 10).

KVS kalp, kan damarları ve lenfatik damarlardan oluşmaktadır. Bu sistemin merkezinde müsküler bir organ olan ve kanın damar yapılarına pompalanmasını sağlayan kalp bulunmaktadır (9, 11).

Kalp orta mediastende, sternumun arkasında, vertebral kolonun, torasik aortanın ve özofagusun önünde ve her iki akciğerin arasında ve diafragmanın üzerine yerleşmiş şekilde göğüs boşluğunda bulunan, koni şeklinde ve dört boşluklu bir organdır (10, 12, 13). Bu boşluklardan sağda ve solda küçük olanlara sırasıyla atriyum dekstrum (sağ atriyum, sağ kulakçık) ve atriyum sinistrum (sol atriyum, sol kulakçık) adı verilir. Boşluklardan sağda ve solda daha büyük olanlarıysa sırasıyla

ventrikülüs dekster (sağ ventrikül, sağ karıncık) ve ventrikülüs sinister (sol ventrikül, sol karıncık) olarak adlandırılmaktadır. Atriyumlar arasında interatriyal septum, ventriküller arasında ise interventriküler septum, kalbin sağ ve sol boşluklarını birbirinden ayırmaktadır (10, 14) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kalbin boşluklarının gösterildiği, HE boyalı bir sıçan kalbi mikrofotografı.

İVS: İnterventriküler (ventriküller arası) septum (Preparat Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD arşivinden alınmıştır).

Sağ atriyumda vücudun üst kısmından venöz kanı toplayan VKS ile vücudun alt yarısından venöz kanı toplayan VKİ açılmaktadır (9, 10, 12, 14). Bunların dışında kalbin venöz kanını taşıyan sinüs coronarius da sağ atriyumda açılmaktadır (12, 14, 15). Sağ atriyumda toplanan venöz kan, sağ atriyum ile sağ ventrikülün birbirine bağlayan triküspid kapak (sağ atriyoventriküler kapak) yoluyla sağ ventriküle geçmektedir ve buradan da sağ ventrikülün kasılmasıyla kan pulmoner arterler yoluyla akciğerlere pompalanmaktadır (9, 10, 14, 15).

Akciğerlerde oksijenize olan kan, ikişer adet sağ ve sol olmak üzere toplam dört adet kapaksız pulmoner ven yoluyla sol atriyumda boşalır. Sol atriyumdan mitral kapak yoluyla sol ventriküle geçen kan buradan da aort yoluyla koroner arterlere ve tüm vücuda dağıtılır (9, 10, 14, 15).

Atriyumları ve ventrikülleri oluşturan kalp kası hücreleri kalbin fibröz iskeletine tutunmaktadırlar (9, 14). Kalp kasına ve kapakçıklarına tutunma yüzeyi oluşturan, sıkı bağ dokusu özelliğindeki kalbin fibröz iskeletini oluşturan yapılar şunlardır (9, 10, 12, 14):

- Kalp kapakçıklarını çevreleyen dört adet anuli fibrozi.
- Anuli fibrozilerin arasında bulunan trigonum fibrozum dekstrum ve sinistrum.
- Ventriküllerin arasında bulunan septumun üst kısmını oluşturan membranöz septum (pars membranacea).

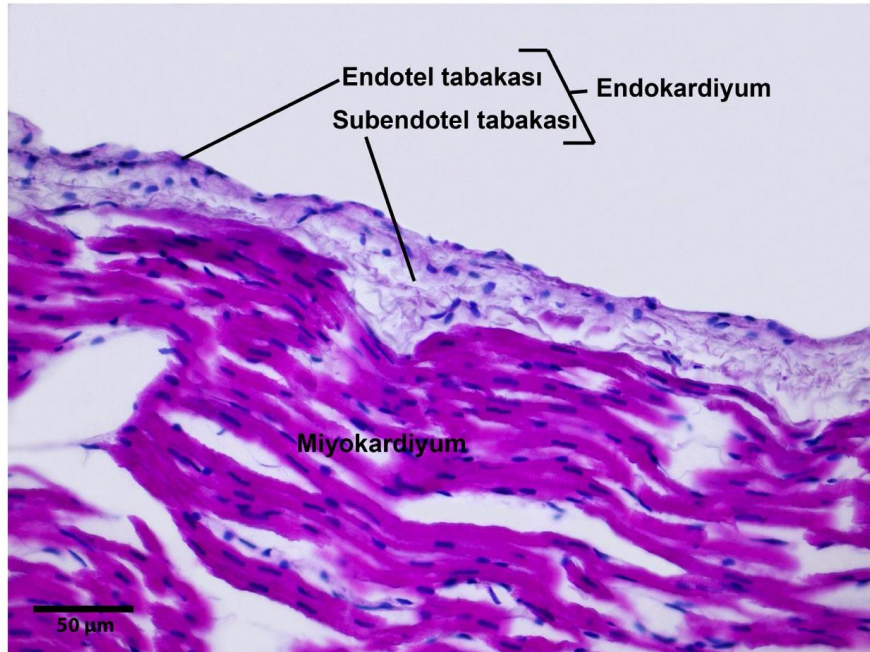
Kalbin fibröz iskeleti atriyumlar ile ventrikülleri oluşturan kas liflerini birbirinden ayırmakla birlikte bu kas lifleri için hem başlangıç hem de bitiş noktası olarak görev yapmaktadır (12, 14, 16). Dolayısıyla atriyum ve ventrikül kasları birbiriyle devamlılık göstermemektedir, bu ikisi arasındaki bağlantı atriyoventriküler demetle sağlanmaktadır (9, 12, 14).

Kalp duvarı içten dışa, endokardiyum, miyokardiyum ve epikardiyum adı verilen üç temel tabakadan oluşur (9-12, 14, 16, 17).

2.2.1. Endokardiyum

Kan damarlarındaki tunika intima'nın homologu olan endokardiyum, kalbin kanla temas halindeki en iç katmanıdır (9, 16, 17). Kalp boşluklarının iç yüzünü, papiller kasları, korda tendinaları ve kalp kapakçıklarını örten ince bir zar görünümündeki endokardiyum, histolojik olarak endotel, subendotel, muskuloelastik ve subendokardiyal tabaklardan oluşmaktadır (9, 12). Bu tabakalar kalbin değişik kısımlarında farklılık gösterebilmektedir (17). Örneğin papiller kas ve korda tendina bölgelerinde subendokardiyal tabaka bulunmamaktadır (16).

En içteki tek katlı yassı epitel hücrelerinin oluşturduğu endotel tabakasının hemen altında, elastik ve kollajen liflerden zengin bir gevşek bağ dokusu tabakası yer alır (9-11, 16, 17). Subendotel tabakası olarak adlandırılan bu tabakanın altında ise düz kas hücreleri ve elastik liflerden oluşan muskuloelastik tabaka bulunur (9). Bazı alanlarda bulunan ve bulunduğu yerde miyokardiyumdaki hücrelerin endomisyumu ile yakın ilişki halindeki subendokardiyal tabaka ise, endokardiyumun en dış tabakası olup, kan damarları, sinirler ve Purkinje liflerini içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır (9-11, 16, 17). Şekil 2.11'de bu tabakalardan bir kısmı görülebilmektedir.



Şekil 2.11. Kalbin iç yüzünü döşeyen endokardiyum ve komşuluğundaki miyokardiyumun görüldüğü HE boyalı bir kalp kesiti

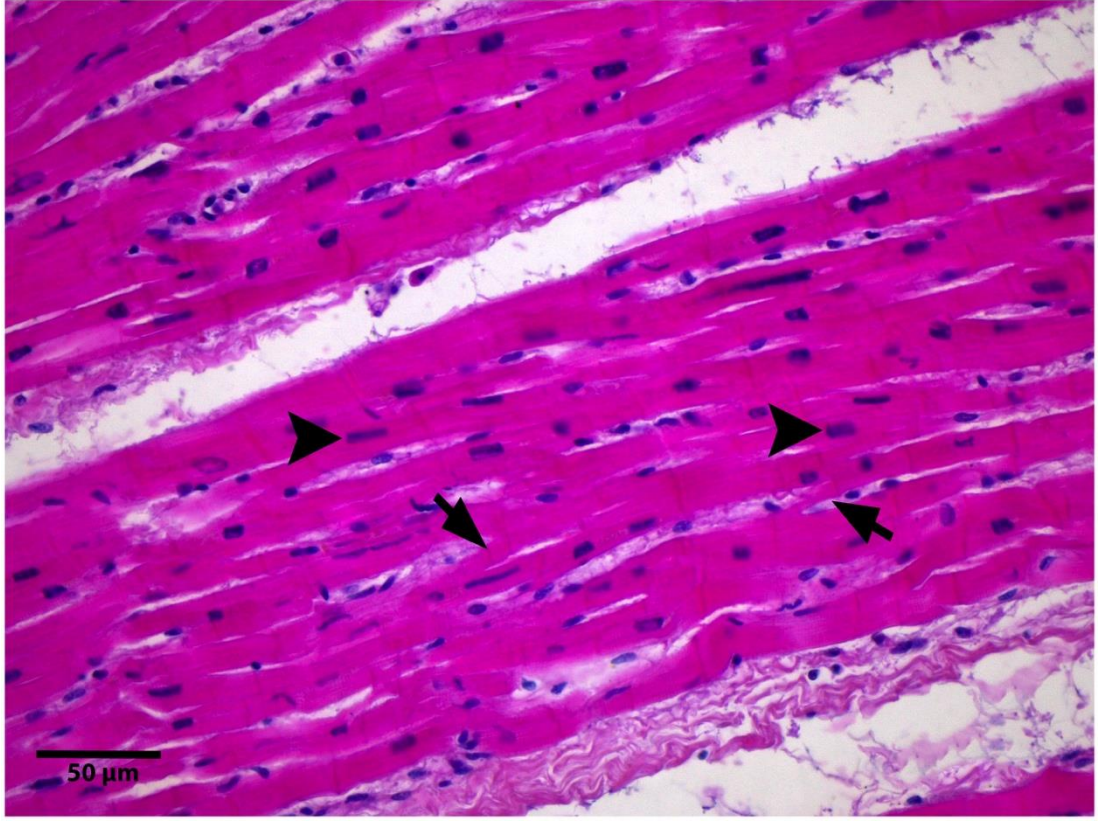
(Preparat Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD arşivinden alınmıştır).

Aynı temel histolojik yapıyı sergileyen tüm kalp kapakçıkları, orta kısımlarında yer alan fibröz bağ dokudan bir çatıyı, her iki tarafından endokardiyumun örttüğü, endokardiyum katlantılarıdır (9-12, 17). Avasküler yapılar olan kalp kapakçıkları fibröz bağ dokusu yapılarıyla kalbin fibröz isketine bağlanır (9-11, 13). Atriyumlarla ventriküller arasında yer alan kapakçıklardan sağdaki triküspid, soldaki ise biküspid (mitral) kapak olarak adlandırılır (9, 10, 12, 13, 17). Bu kapakçıkların serbest kenarları, korda tendinalarla ventrikül boşluklarının papiller kaslarına tutunur (13). Pulmoner arter ve aort kapakçıkları ise semilunar kapaklar olarak bilinir (9, 10, 17). Bu kapakçıklar atrioventriküler kapaklara göre daha kalın olup, korda tendinalara tutunmazlar (13).

2.2.2. Miyokardiyum

Kalp duvarının en kalın ve orta tabakası olan miyokardiyum, kan damarlarındaki tunika medyanın karşılığıdır (9, 11, 16, 17). Miyokardiyumu oluşturan kardiyomiyositlerin büyük bir kısmı kalbin pompa aktivitesini gerçekleştirirken, bir kısmı da endokrin salgı yapmak ya da kalbin uyarı-ileti sistemini oluşturmak üzere özelleşirler (9, 16).

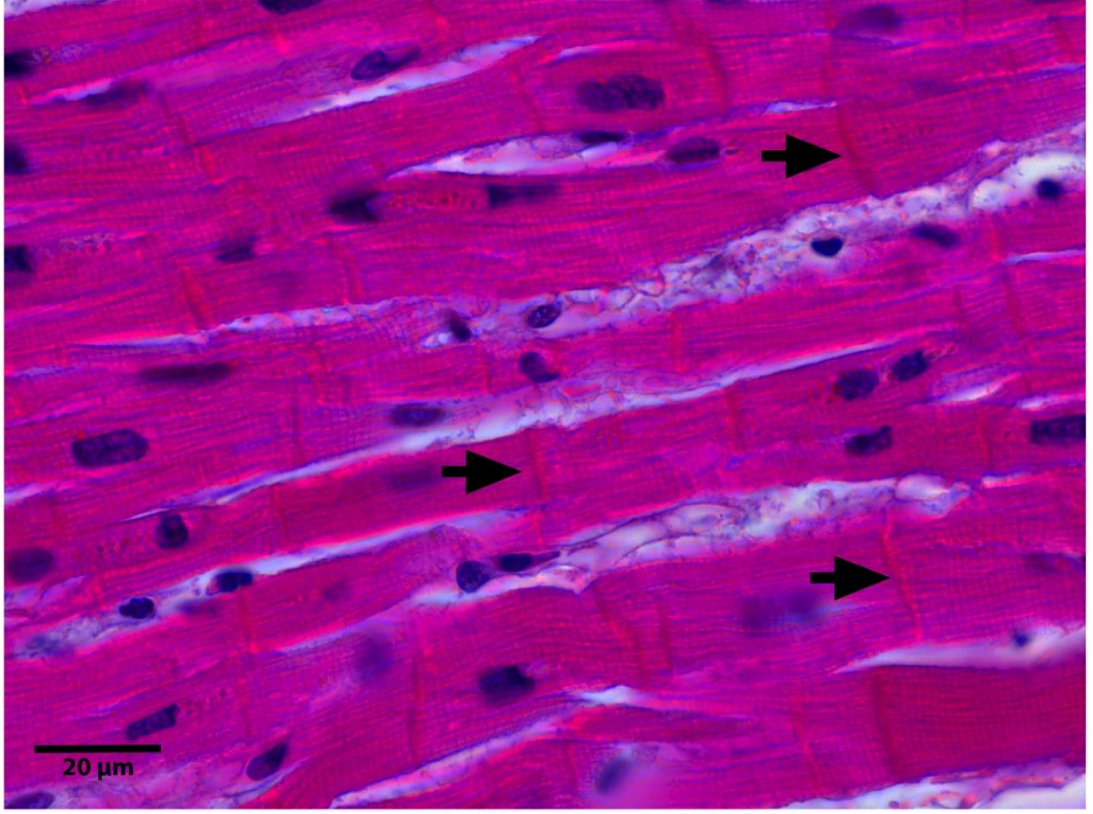
Kalbin kontraktilitesinden sorumlu olan kardiyomiyositler, gelişimleri sırasında, iskelet kası liflerinde olduğu gibi füzyona uğramış multinükleer hücreler oluşturmak yerine, uzantılarıyla kompleks bağlantılar oluşturan tek çekirdekli hücreler olarak gelişirler (11). Bir kas lifi içindeki hücreler genellikle yan dallar vererek komşu liflerdeki hücrelere bağlanırlar (Şekil 2.12) (11).



Şekil 2.12. HE ile boyanmış insan kalp kası parafin kesitine ait bir mikrograf görülmektedir.

Kardiyomiyositlere özgü nükleus yapısı ok başları ile gösterilmektedir. Tipik yan dallanmalar oklarla gösterilmektedir (Preparat Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD arşivinden alınmıştır).

Erişkin bir kalp kası hücresi yaklaşık 15μm çapında ve 85-100 μm uzunluğunda, yan dallanmalar yapan, enine çizgilenme gösteren, merkezi yerleşimli bir adet soluk boyanan nükleusa sahip hücrelerdir (11, 16, 17). Kalp kasına özgü bir yapı olan diskus interkalarisler, iki komşu hücreyi birbirine bağlayan ve yoğun bağlantı kompleksi içeren yapılardır (Şekil 2.13). Bu bölgelerde yer alan bağlantı komplekslerinden desmozomlar ve fasya adherensler hücreleri sıkıca birbirine bağlayıp kontraktıl aktivite nedeniyle hücrelerin birbirinden ayrılmasını engellerken, oluklu bağlantılar da hücreler arası hızlı iyon akışına izin vererek hücrelerin eş zamanlı uyarılmasını ve fonksiyonel bir sinsityum gibi işlev görmesini sağlar (10, 11, 16, 17).



Şekil 2.13. HE ile boyanmış insan kalp kası parafin kesitinin büyük büyütme mikrografı

Kardiyomiyositlerdeki sarkomer yapısına uyan enine çizgilenme ve oklarla gösterilen kalp kasına özgü interkalar disk bölgeleri görülmektedir (Preparat Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD arşivinden alınmıştır).

Kalp kası hücrelerini, kapillerlerden zengin ince bir endomisyum kılıfı çevreler (11). Birbirlerine bağ dokusu ile bağlanan kardiyomiyositler ağ oluşturarak hücre tabakları halinde bir araya gelir ve karmaşık spiral bir yapı olan miyokardiyumu oluşturur (11, 17). Birbirinden fibröz kalp iskeletiyle ayrılan atriyum ve ventrikül kasları ayrı ayrı çalışabilmektedir (12). Atriyum boşluklarını saran kaslar iki tabakalı olup, birbirinin devamı olmayan bu liflerden yüzeyel tabaka lifleri atriyumların her ikisini birden sararken, derin tabaka lifleri atriyumları ayrı ayrı çevrelemektedir (12). Ventriküllerin kas tabakası atriyumlara göre daha kalın olmakla beraber düzenlenişi de daha karmaşıktır. Ventrikül miyokardiyumu 3 tabakaya sahiptir ve birbirinin devamı olmasına rağmen her tabaka farklı yönde

seyreder (12). Ventrikül duvarındaki bir kas lifi, fibröz iskeletten başlayarak, 3 tabakalı miyokardiyumu oluşturacak şekilde bazı noktalarda yön değiştirip tekrar fibröz iskelete geri döner (12). Dış ve iç tabakada longitudinal seyreden kas lifleri, en kalın tabaka olan orta tabakada sirküler bir seyir gösterir ve dış tabaka kas lifleri her iki ventrikülü birden sararken, orta ve iç tabakanın lifleri interventriküler septumun yapısına katılıp bir ventrikülden diğerine geçmez (12). İç tabakadaki kas liflerinin bir kısmı da trabeküla karneaları ve sağ ventrikülde üç, sol ventrikülde ise iki adet olan papiller kasları oluşturmak üzere bu yapılarda sonlanırlar (12).

Kalp kası hücrelerinden özellikle atriyum duvarında bulunan bir kısım hücreler, kan basıncı ve elektrolit dengesinin düzenlenmesine katılan, atriyal natriüretik faktör gibi hormonları salgılayan özelleşmiş hücrelerdir (9-11, 16, 17).

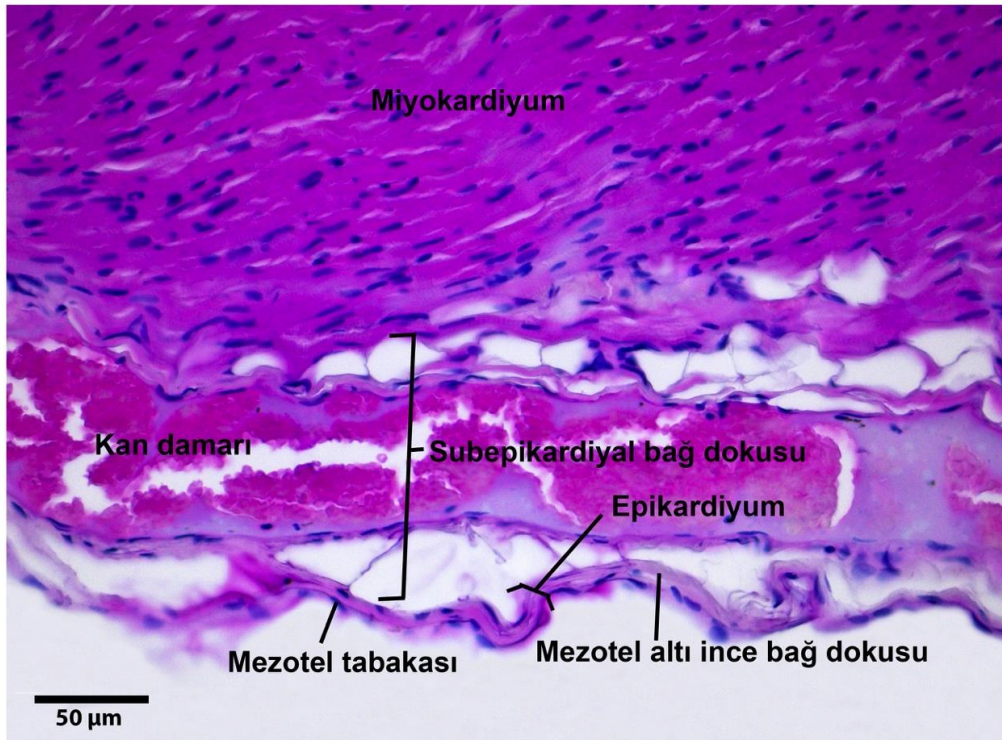
Kalbin ileti sistemini oluşturmak üzere özelleşen kalp kası hücreleri de olağan kardiyomiyositler gibi enine çizgilenme gösterir ancak bu hücrelerde interkalar diskler nadirdir (9).

Miyokardiyumun fonksiyonel birimi olan kardiyomiyositler bu tabakadaki hücre popülasyonunun yaklaşık %30 kadarını oluşturup, geri kalan %70'lik kısmını ise kardiyomiyositler arası doku bölgesinde yerleşen ve burdaki damar ve sinir gibi oluşumların yapısına katılan hücreler oluşturmaktadır (18). Popescu ve ark. kardiyopulmoner baypass cerrahisine giden farklı yaş gruplarından kalp hastalarının sağ atriyal appendiks örneklerini toplayarak yaptıkları çalışmalarında, kardiyomiyositler arasındaki doku bölgesinde yer alan hücreleri ve bunların oranlarını belirlemişlerdir. Bu hücreler arasında en çok sayıda olan endotel hücrelerini, vasküler düz kas hücreleri ve perisitler takip etmektedir (18). Sinir sonlanmalarını çevreleyen Schwann hücreleri, endositotik vezikül ve lizozomlarıyla belirgin makrofaj ve kollajen lifleriyle yakın ilişki içerisindeki fibroblastların düzeyleri ise birbirine benzer bulunmuştur (18). Geri kalan çok küçük bir popülasyonu ise telositlerin ve kardiyak kök hücreleri oluşturduğu tespit edilmiştir (18).

2.2.3. Epikardiyum

Tek katlı yassı epitel (mezotel) ve bunun altında mezotel tabakasını destekleyen ince bir bağ dokusu tabakası birlikte, kalbin en dış tabakası olan epikardiyumu oluşturur (9-11). Kan damarlarındaki tunika adventisyanın karşılığı olan epikardiyum, kalbi dıştan saran çift yapraklı bir seröz zar olan perikardiyumun visseral yaprağıdır (9-11, 16, 17). Paryetal perikardiyum denilen dış yaprakla visseral perikardiyum arasında perikard boşluğu bulunmaktadır (9, 10, 12, 13). Perikard boşluğunda az miktarda bulunan kaygan seröz sıvı ise kalbin kontraksiyonları sırasında bu iki yaprağın birbirine sürtünmesini en aza indirerek kalbin hareketlerini kolaylaştırır (9-13, 17).

Mezotel ve altında ince bir bağ dokusundan oluşan epikardiyum ile miyokardiyum arasında, subepikardiyal bağ dokusu olarak adlandırılan ve içerisinde koroner damarların, sinir yapılarının ve gangliyonlarının bulunduğu, yağ hücrelerinden de zengin gevşek bir bağ dokusu tabakası bulunur (Şekil 2.14) (9, 11, 17).

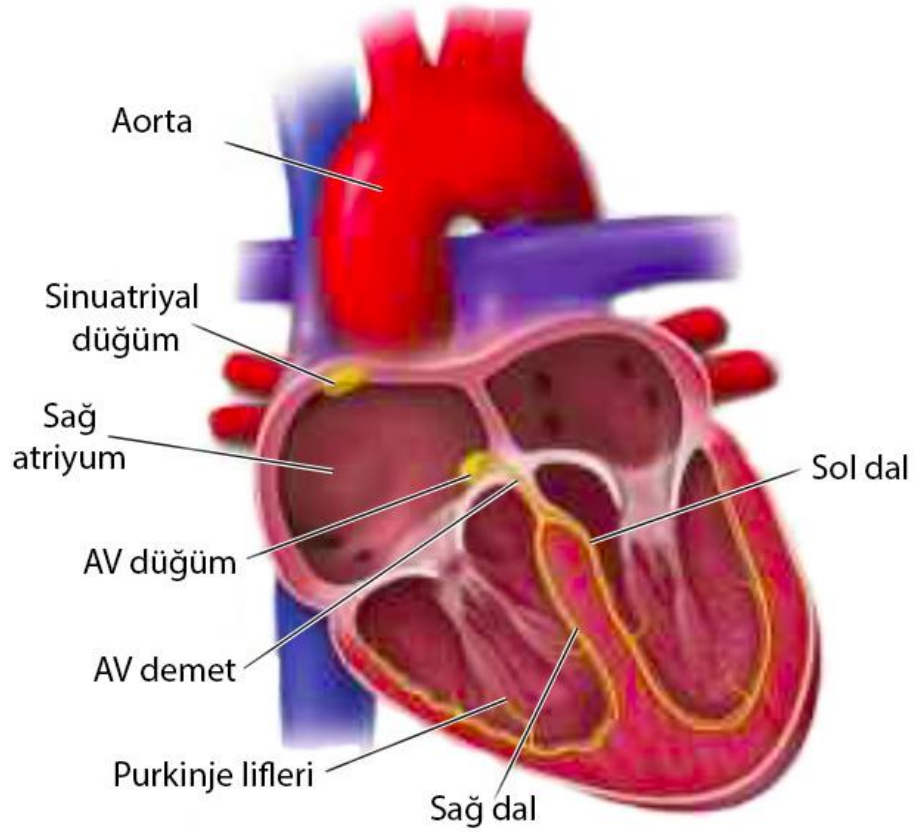


Şekil 2.14. Miyokardiyumun dış kısmında, kalbin en dış tabakası epikardiyumun görüldüğü HE boyalı bir mikrograf

(Preparat Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD arşivinden alınmıştır).

2.2.4. Kalbin İleti Sistemi

Kalbin ileti sistemini oluşturan yapılar sırasıyla, sinuatriyal düğüm (SA düğüm, Keith-Flack nodülü), atriyal intrenodal yollar, atriyoventriküler düğüm (AV düğüm, Aschoff-Tawara nodülü), atriyoventriküler demet, AV demetin sağ ve sol dalları ve Purkinje lifleridir (Şekil 2.15) (9-13, 16).



Şekil 2.15. Kalbin ileti sisteminin gösterildiği şematik çizim.

(M. H. Ross. Histology A Text And Atlas'dan değiştirilerek alınmıştır).

Kalp hızının temel düzenleyicisi olan SA düğümdeki hücreler, dinlenme halindeki bir erişkinde, dakikada ortalama 70 kez depolarize olabilmektedir (9, 10, 12, 13). Kalp gelişiminin erken evrelerinde, primordiyal atriyum ve ventrikülün birbiriyle devamlılık gösterdiği süreçte atriyum kalbin uyarı merkeziyken daha sonra bu görevi sinüs venozus yerine getirmeye başlar (7, 8). Beşinci haftada sinüs

venozusun duvarında gelişen SA düğüm, sinüs venozusun sağ atriyum katılmasıyla birlikte VKS girişine yakın bir yerde, sağ atriyum duvarında lokalize kalır (7-10).

SA düğümünden çıkan uyarıların, internodal yolla ulaştığı AV düğüm, sağ atriyumun septal duvarının arka kısmında, triküspid kapağın üzerinde yer alır (9, 12, 13, 16). Buradaki hücreler kendileri uyarı çıkarabilmekle beraber temelde SA düğümün kontrolü altındadırlar (9). Benzer yapıdaki SA ve AV düğüm kas hücreleri, olağan kardiyomiyositlerden daha küçüktür (9-11). İleri derecede dallanan bir ağ oluşturmuş bu hücrelerin arasında, kapillerlerden zengin, otonom sinir sisteminin sempatik ve parasempatik sinir liflerini ve periferik gangliyonları da içeren bir bağ dokusu bulunur (9). Bu düğümlerdeki kas hücreleri olağan kardiyomiyositlere doğru uzanır ve aralarında belirgin bir sınır yoktur (9).

AV düğümünden uyarılar, AV demeti ve bunun dalları aracılığıyla, ventriküllerin subendokardiyal bağ dokusu içinde seyreden Purkinje liflerine iletilir (9, 10). Bağ dokusu bir kılıfla sarılarak miyokardiyumdan ayrılan AV demet, birbirine yan dallarla bağlanarak uzunlamasına demet oluşturan kas hücrelerinden meydana gelir (9). AV demet, membranöz interventriküler septumun orta kısımlarında sağ ve sol dallarına ayrılır, bu dallarıyla birlikte AV demete His huzmesi de denilmektedir (12). AV demeti oluşturan hücreler, demetin başlangıç kısmında düğüm hücrelerine benzer bir yapıdayken, Purkinje liflerine doğru giderek çapları artmaktadır. Özelleşmiş bir kalp kası hücre tipi olan Purkinje lifleri ise His demetinin son dalları olup, ventriküler miyokardiyum içine doğru uzanarak buradaki kardiyomiyositlerle devam ederler (9). Çok geniş çaplı olan Purkinje lifleri, olağan kardiyomiyositlere göre daha açık renklidir ve sitoplazmalarının miyofibrilsiz merkezi kısmında bol glikojen ve mitokondriyon içermektedir (9-11, 16, 17).

Kalbin ileti sistemindeki tüm yapılar SA düğüm gibi kendi ritmik uyarılarını oluşturabilmekle birlikte, SA düğümünden kaynaklanan uyarıların frekansı daha yüksek olduğu için tüm sistem SA düğümün kontrolü altındadır (9).

2.2.5. Kalbin Kök/Öncü Hücreleri

Kalpte yer alan önemli kardiyak doku bileşenleri atriyum, ventrikül ve ileti sisteminin kardiyomiyositleri, kalbin fibröz iskeleti ve kapaklarını oluşturan ayrıca kas liflerinin arasını dolduran bağ dokusu elemanları, kardiyak boşlukları ve kalbin dış yüzeyini saran epitel dokusu, kalbi besleyen damarların epitel ve düz kas hücreleri olmak üzere çeşitlilik göstermektedir (13, 19). Bu çeşitliliğin bir parçası da kardiyak kök hücrelerdir.

Kalbin kendini yenilemeyen, sonuna kadar farklılaşmış hücrelerden oluşan bir organ olduğu yönündeki görüşler artık ortadan kalkmaktadır (19, 20). Epitel ve kemik iliği gibi hızlı yenilenen doku tiplerine göre oldukça yavaş olsa da, erişkin hayatta da kardiyomiyositlerin kendini yenilediğine dair bulgular vardır (20). Son çalışmalarla kalpte, c-kit, Sca-1 gibi kök hücre belirteçlerini ifade eden ve çoğalan hücrelerde görülen telomeraz aktivitesine sahip küçük hücreler olduğu ortaya konulmuştur (20). Kardiyomiyosit farklılaşmasının değişik evrelerindeki erken ve geç dönem kardiyak belirteçleri ifade ediyor olmaları, bu hücrelerin kardiyoblast ve ardından da kardiyomiyositlere dönüşmek üzere kararlanmış hücreler olabileceğini göstermektedir (20).

Kalbin kök/öncü hücrelerinden biri olan c-Kit⁺ hücreler, çoğunlukla kalbin apeksinde olmakla birlikte ventrikül ve atriyum duvarında yer alırlar (19). Bu hücreler multipotent özellikte olup kardiyomiyositlere, endotel hücrelerine ve düz kas hücrelerine dönüşebilmektedir (19). c-Kit⁺ hücrelerden çok daha fazla sayıda olup tüm kalp hücrelerinin %2'sini oluşturan Sca-1⁺ öncü hücrelerin ise kendini yenileme ve multipotensi gibi özellikleri tam olarak ortaya konulmamış olmakla birlikte kardiyogenezdeki etkileri de bilinmemektedir (19). Bunlardan başka Islet-1, kardiyosfer hücreler ve yan küme (side population) hücreler memeli türlerinde tanımlanmış olan diğer kardiyak kök/öncü hücrelerdir (20).

2.2.6. Kalbin Damarları

Koroner damarlar olarak bilinen kalbin kan damarları, iki koroner arter ve bir venden oluşmaktadır (10). Sağ ve sol koroner arterler, aortanın ilk dalları olup, aortik kapakların hemen yakınından çıkmaktadır (10, 13, 14). Musküler arter özelliğindeki bu koroner arterler, subepikardiyal tabakada bir ağ oluşturur (9). Bunların çok sayıdaki dalları olan küçük arter ve arteriyoller ise kardiyomiyositler arasındaki bağ dokusunda dağılırlar (9). Sağ ve sol koroner arterin belli başlı dallanmaları olmak üzere, klinik açıdan önemi olan ana koroner arter yapıları, kalbin arka yüzünü besleyen sağ koroner arter (RCA; right coronary artery) ve sol ventrikül duvarını besleyen sol koroner arterin iki dalıdır. Sol koroner arterin bu iki dalı ise, sol ventrikülün septal ve ön duvarını ve apikal bölgeyi besleyen sol ön inen (LAD; left anterior descending) koroner arter ve sol ventrikül yan ve arka duvarını besleyen sirkumfleks (CX; circumflexus) koroner arteridir (13).

Kalbin venöz drenajını sağlayan kardiyak venler, kalbin arka yüzündeki koroner sinüse açılır ve koroner sinüs de sağ atriyuma boşalır (10, 13).

2.2.7. Kalbin Lenfatikleri

Kalbin lenf kılcal damarları, içten dışa doğru subendotelyal tabakada, kardiyomiyositlerin etrafında ve epikardiyumda bulunmaktadır (9). Bu tabakalardaki lenf damarları epikardiyum altı lenf pleksusuna açılır (12, 14). Bu peksustan devam eden lenf damarları ise, koroner damarlarla birlikte seyrederek, tek bir lenfatik damar halinde birleşip, genellikle sağ taraf inferiyor trakeobronşiyal lenf düğümüne drene olur (12, 14).

2.2.8. Kalbin Sinirleri

Otonom sinir sistemiyle kontrol edilen kalbin, parasempatik innervasyonu vagus yoluyla olurken, simpatik sinir lifleri ise simpatik trunkustan kaynaklanır (10-12). Bu liflerin subepikardiyal bölgede oluşturduğu sinir ağından çıkan lifler ise

kardiyomiyositler üzerinde sonlanır (9). Otonom sinir sistemiyle kalbin frekansı ve kontraktilitesi değiştirilebilir (9-12). SA ve AV düğüm bölgelerinde yoğun olarak bulunan otonom sinir sistemi pleksusları, SA düğümün ritmini veya AV demetteki iletim hızını değiştirerek kalbin hızını düzenleyebilmektedir (9).

Vagus sinirinin içerisinde seyreden afferent lifler, arkus aorta, VKS ve akciğer damarlarından aldığı basınç impulslarını beyinde ilgili bölgelere ilettiğinde, bu uyarılara yanıt olarak kalp ve akciğerlerde otonom sinir sistemiyle bir takım düzenlemeler yapılır (10, 12).

Sıcak, soğuk ve dokunma gibi uyarılara duyarlı olmayan miyokardiyumda iskemi sonucu oluşan ağrı duyusu, simpatik liflerle medulla spinalise taşınmaktadır (12).

2.3. MİYOKARD İNFARKTÜSÜ VE MİYOKARD İNFARKTÜSÜ SONRASINDA GÖRÜLEN HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Miyokardiyumun iskemik nekrozu şeklinde tanımlanan Mİ, kalbi besleyen koroner arterlerde uzun süreli oklüzyon yapabilen herhangi bir durumda ortaya çıkabilmektedir. Bununla birlikte çoğu Mİ olgusunda koroner oklüzyonun, aterosklerotik plak rüptürü zemininde gelişen akut koroner trombus nedeniyle geliştiği ortaya koyulmuştur (21).

Koroner kan akımının kesintiye uğraması, saniyeler içerisinde kardiyomiyositlerde aerobik glikolizin ve adenosin trifosfat (ATP) üretiminin azalmasına neden olur. Bunun fonksiyonel bir yansıması olarak da, iskeminin ilk dakikalarında belirgin bir kontraktilite kaybı oluşur (21, 22).

Mİ sonrasında infarkt alanlarında lezyonun yaşına göre, ilerleyici mikroskobik ve makroskobik değişiklikler oluşmaktadır (21). Mikroskobik değişiklikler ele alındığında infarktüsün ilk 24 saati içerisinde ödem ve kanamanın da eşlik ettiği koagülasyon nekrozu oluşmaktadır (21, 23). Nekroz alanında nötrofil infiltrasyonu ile karakterize akut inflamasyon 1-3. günlerde belirginleşir (21-24). Bu süreçte kardiyomiyositlerde enine çizgilenme ve nukleus kaybolur (21, 24). Üçüncü

günden itibaren, infarkt sınırından başlayarak ölü kardiyomiyositler nötrofil ve makrofajlarca temizlenirken bu süreçle beraber fibrovasküler bir granülasyon dokusu da gelişmeye başlar (21, 22). İlk birkaç günlük süreçte nötrofil infiltrasyonu ile belirgin olan hücre artışının yerini, yaklaşık bir hafta içerisinde mononükleer hücre yani kronik inflamasyon hücreleri infiltrasyonu alır (23, 24). Bu hücrelerin çoğu makrofajlar olup, nekrotik kardiyomiyositleri ve nötrofil artıklarını ortadan kaldırır (21, 24). Yeni damar gelişimi ve kollajen birikimiyle, 10-14 günler arasında olgunlaşan granülasyon dokusunda, 2-8. haftalar boyunca kollajen depolanması artışı ve hücre bileşiminde azalma görülür (21). Lezyonun kenarından merkezine doğru gelişen bu iyileşme süreci 2. aydan itibaren yoğun kollajen yapısı içeren skar formasyonu ile devam eder (21). Sekizinci haftada başlayan skar formasyonu 10 yıllık lezyonda da benzer bir görünüm sergilediği için, tam iyileşme sonrası lezyonun yaşını tahmin etmek güçtür (21, 22).

Kardiyomiyosit rejenerasyonu için, kalpte yer alan, multipotent özellikteki kardiyak kök/öncü hücrelerinin kardiyomiyositlere, düz kas hücrelerine ve endotel hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmiş olmakla birlikte, bu hücreler Mİ gibi büyük doku kaybının olduğu durumlarda, bu potansiyellerine rağmen yetersiz kalmaktadırlar (25). Benzer biçimde dolaşımdaki kök hücrelerle miyokard rejenerasyonu olabilmekle birlikte, miyokard nekrozu durumunda lezyon skar ile sonuçlanıp ciddi bir rejenerasyon olmamaktadır (21).

2.4. GÖBEK KORDONU STROMASI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ

Dıştan amniyon zarıyla örtülü göbek kordonu, Wharton peltesi adı verilen müköz bağ dokusu bir stroma içerisinde 2 adet umbilikal arter ve 1 adet umbilikal ven içeren bir oluşumdur (19).

Göbek kordonu stromasından elde edilen kök hücreler (GKS-MKH), MKH tanımlamasına uyan multipotent hücrelerdir. Bu hücreler uygun kültür koşullarında adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşma gösterebilmektedir (19, 26). MKH belirteçleri olan CD73, CD90, CD105 gibi belirteçleri yüksek oranda ifade eden GKS-MKH, CD45, CD34 ve CD31 gibi

hematopoyetik veya endotel hücre belirteçlerini bulundurmazlar (26, 27). Ayrıca bu hücreler MHC I moleküllerine sahipken, immün red yanıtıyla ilişkili bir tip II MHC molekülü olan HLA-DR'yi bulundurmazlar (19, 26, 27). Miyofibroblast özelliğindeki bu kök hücrelerin α -düz kas aktini, F-aktin ve desmin gibi kas belirteçlerini de yüksek düzeyde ifade ettikleri ortaya konulmuştur (26, 28). GKS-MKH, MKH tanımlaması için gerekli özelliklere sahip olmakla birlikte embriyo ve yetişkin kök hücrelerinin de özelliklerini göstermektedir (19). Farklılaşma potensileri bakımından embriyo kök hücrelerine yakın olan bu hücrelerin, embriyo kök hücreleri gibi teratom geliştirmemesi bu hücrelere karşı bir üstünlük olarak kabul edilebilir.

GKS-MKH farklılaşma potensilerine ek olarak, salgıladıkları sitokin ve kemokinlerle immün yanıtı düzenlenmekte, apoptozu önlenmekte ve tümör kitlelerini küçültebilmektedir (19,27). Bu özellikleriyle GKS-MKH hücrelerel tedaviler için iyi bir adaydır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. iGKS-MKH’NİN İZOLE EDİLMESİ, KÜLTÜRÜ VE KRIYOPREZERVASYONU

Deney hayvanlarına nakledilmesi planlanan hücrelerin elde edilmesi için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 17.01.2014 tarih ve 46004091-302.14.06/2326 sayılı izni ile 5 adet insan göbek kordonu temin edildi.

iGKS-MKH’nin elde edilmesi, çoğaltılması ve tanımlanması işlemleri, Can ve Balcı (2011)’e göre yapıldı (28).

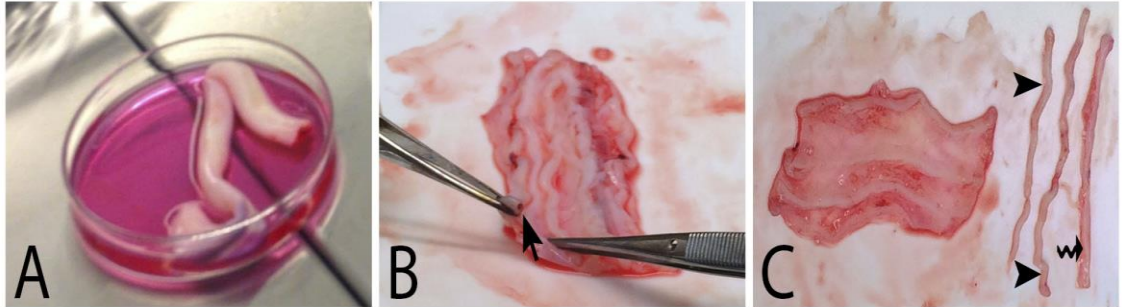
Kordon seçiminde cinsiyet ayırımı gözetilmedi. Mikrobiyal kontaminasyondan kaçınmak için sezeryan uygulanmış, miadında komplikasyonsuz gebeler tercih edildi (28). Bebek çıkarıldıktan sonra, plasentaya yakın ucundan 15 cm uzunluğunda kordon parçası kesildi. Kesilen kordon sıvazlanarak içerisindeki kan uzaklaştırıldı ve %3 penisilin ve streptomisin (Sigma), 5 µg/mL amfoterisin B (Sigma) eklenmiş Leibovitz L-15 medium (Sigma; L4386) taşıma solüsyonu içerisine alındı (28). Bu şekilde temin edilen her bir kordon örneği 100 mL’lik taşıma solüsyonu içerisinde ve soğutulmuş bir cam taşıma kabında, mümkün olduğunca çabuk hücre kültür laboratuvarına nakledildi (28).

3.1.1. iGKS-MKH’nin İzole Edilmesi ve Kültürü

Steril koşullarda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji anabilim dalındaki Kök Hücre Araştırma Laboratuvarı’na getirilen kordonlara gerekli mekanik izolasyon teknikleri uygulanarak kök hücrelerin izolasyonu sağlandı (28).

- Kordon örnekleri steril bir biçimde diseksiyonun yapılacağı laminar akışlı kabin (Holten Laminair Model 1.2) içine alındı.

- Uzun bir penset yardımıyla taşıma için kullanılan şişeden çıkarılan kordon, taşıma solüsyonu bulunan cam bir Petri kabına aktarıldı (Şekil 3.1.A).
- Petri kabına aktarılan kordondan 6-7 cm'lik parçalar kesilerek her bir parça diseksiyon yapılacağı zamana kadar taşıma solüsyonu içerisinde tutuldu.
- 6-7 cm'lik kordon parçaları penset yardımıyla tekrar sıvazlanarak damarlarındaki kan iyice uzaklaştırıldı. Sonra sırayla her bir parça diseksiyonun yapılacağı Teflon platform üzerine alındı.
- Kordon parçaları, iki adet dişli penset yardımıyla uzun eksenleri boyunca açıldı. Etraf dokudan tipik görünümleriyle ayırt edilebilen iki adet arter ve bir adet ven, dişli penset kullanılarak kordonun uzun eksenini boyunca çıkarılarak uzaklaştırıldı. İşlemin sonunda düz, pembemsi beyaz bir doku elde edildi (Şekil 3.1.B ve C)

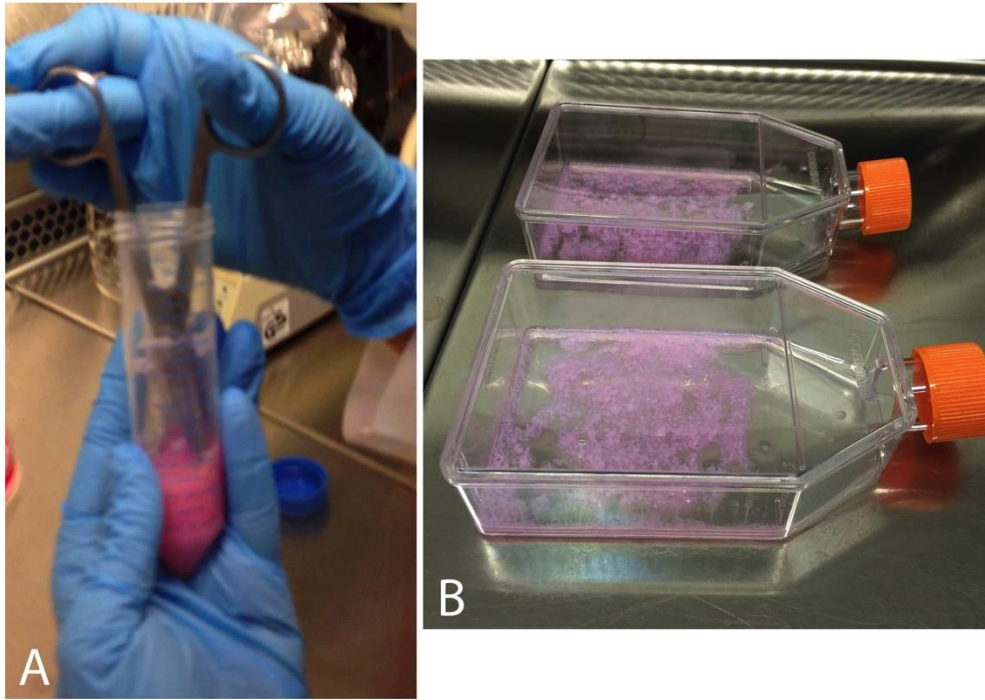


Şekil 3.1. Steril koşullarda laminar kabin içerisindeki cam Petri kabına aktarılan kordon örneği (A), uzun eksenini boyunca açılarak damar yapılarının görünür hâle getirildiği kordon parçası (B) ve damar yapılarının uzaklaştırılmasıyla elde edilen ve hücre kaynağı olarak kullanılan kordon dokusu (C) gösterilmektedir

(Düz ok ve ok başları umbilikal arteri, kıvrıntılı ok umbilikal veni işaret etmektedir).

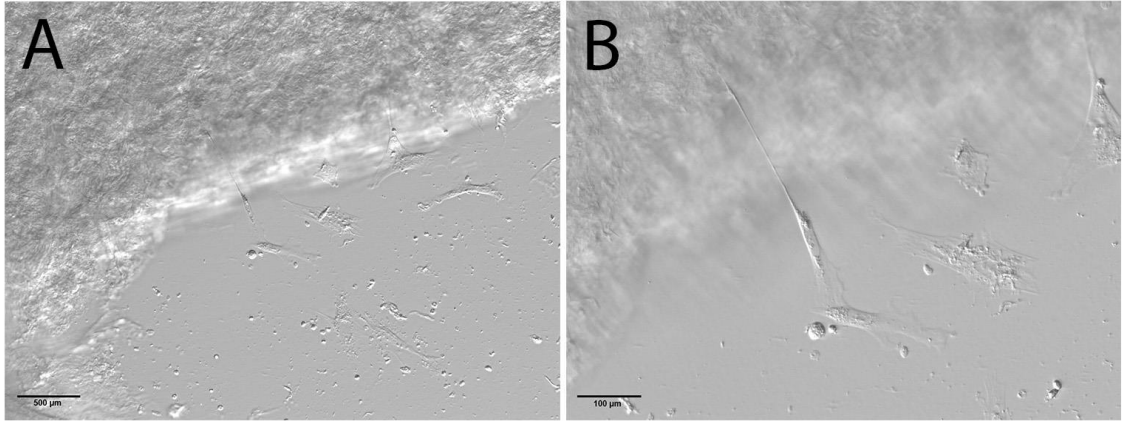
- Bu şekilde damar yapıları uzaklaştırılan tüm kordon parçaları 50 mL'lik santrifüj tüpü (CELLSTAR®; 227261) içerisine alındı ve bir diseksiyon makası kullanılarak 2-3 mm'lik kordon parçaları elde edildi (Şekil 3.2.A).

- Küçültülen kordon parçalarının üzerine 20 mL kültür vasatı eklendi. Kültür vasatı olarak %1 oranında penisilin ve streptomisin (Sigma), 2,5 µg/mL amfoterisin B (Sigma) ve %10 oranında FBS (Fetal Bovine Serum; Sigma F9665) içeren DMEM HAM'S F12 (Biochrom; T 481-01) vasatı kullanıldı.
- Ardından 250 g'de 5 dk. süreyle 4°C'de santrifüj (Hettich, Tuttlingen) edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Kültür vasatı ilavesi ve santrifüj işlemi iki kere daha tekrarlanarak doku parçaları yıkandı.
- Son santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine kültür vasatı eklendi ve tekrar süspansiyon edildi.
- Elde edilen doku parçaları süspansiyonu 75 cm² flasklara (Corning®; #430641) dağıtıldı (Şekil 3.2.B).



Şekil 3.2. Damar yapıları uzaklaştırılan kordon dokusunun diseksiyon makasıyla küçük parçalara ayrıştırılması (A) ve yeterince küçültülen parçaların flasklara aktarılması (B) görülmektedir.

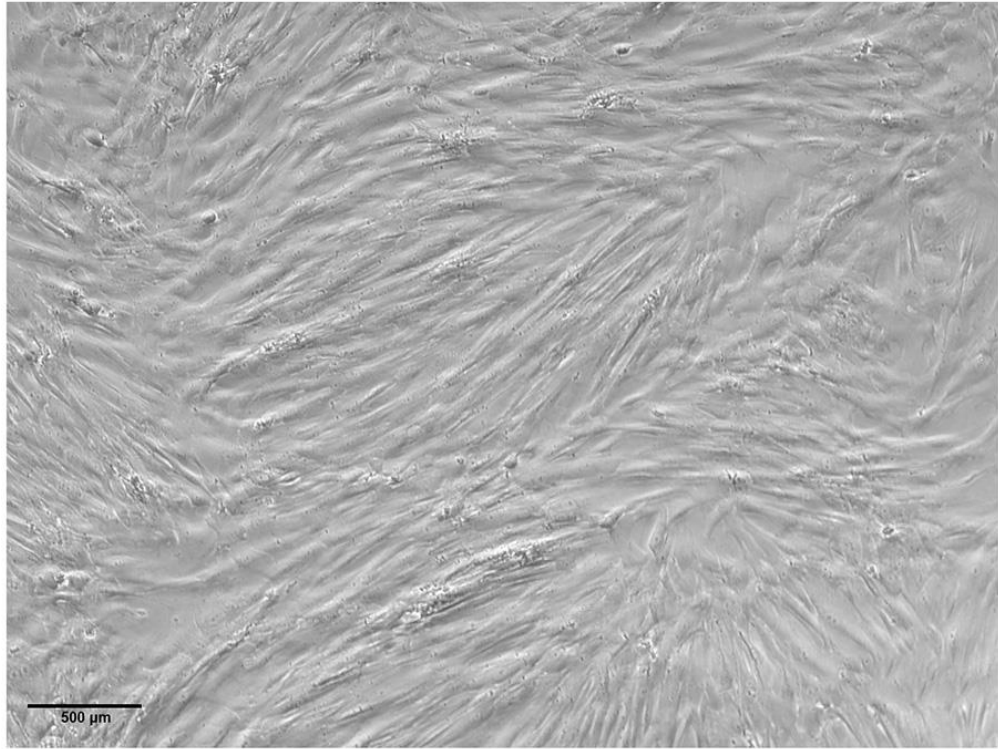
- Eksplantlar %5 CO₂ içeren nemli bir ortam olan 37°C'lik inkübatörde (Sanyo MCO-20AIC) 1 hafta süreyle inkübe edildi. Bir haftanın sonunda eksplantların etrafında adherent hücreler izlenmeye başlandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Eksplant etrafında çoğalan adherent hücreler

Hücrelerin görüldüğü küçük (A) ve büyük (B) büyütmelede alınmış mikrograflar. Bar 500 µm (A) ve 100 µm (B).

Bu süreçten itibaren hücrelerin üzerindeki vasat çekilip önceden ısıtılmış, 8-10 mL kültür vasatı flasklara eklenerek, her iki günde bir kültür vasatı değiştirildi. Hücreler %80-90 konfluent olduklarında (Şekil 3.4), eksplantlar kültür vasatı ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve hücreler için kriyoprezervasyon işlemi uygulandı.



Şekil 3.4. Tipik morfolojileri ile adherent iGKS-MKH. Bar 500 µm.

3.1.2. iGKS-MKH'nin Kriyoprezervasyonu ve Çözülmesi

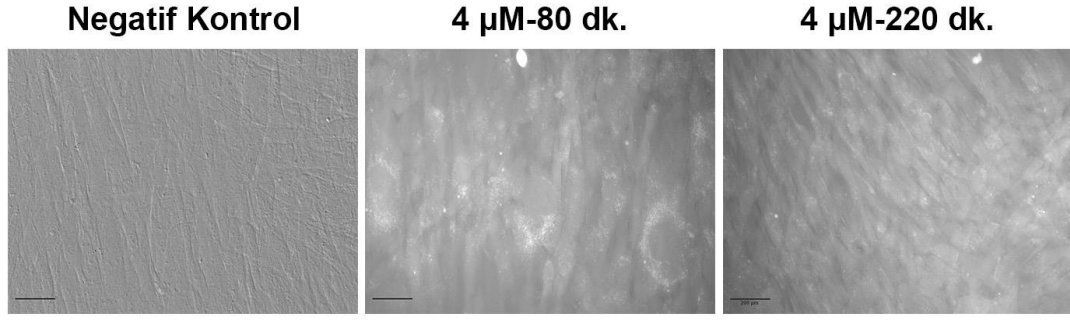
- Hücreler %80-90 konfluent olduklarında tripsin-EDTA (Biochrom; L2143) uygulamasıyla süspanse hâle getirilerek 200 g'de 10 dk. süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine dondurma vasatı ilave edildi ve hücreler tekrar süspanse hâle getirildi. Dondurma vasatı olarak %20 oranında FBS (Fetal Bovine Serum; Sigma; F9665) içeren DMEM HAM'S F12 (Biochrom; T 481-01) kullanıldı.
- Toplamda 1×10^6 hücre olacak şekilde her bir 2 mL'lik kriyo tüp (Grenier Bio One) içerisine 1350 µL hücre süspansiyonu konuldu. Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma; D4540) oranı %10 olacak şekilde bu süspansiyon üzerine yavaş bir biçimde 150 µL DMSO damlatılarak toplam hacim 1.5 mL tamamlandı.
- Hücrelerin soğuk ortama yavaş geçişi için kriyotüpler 10 dk. süreyle 4°C'de tutulduktan sonra dondurma kabı (Mr. Frosty®; Nalgene Labware) içerisinde -80°C'ye taşınarak bir gece boyunca da bu ortamda bekletildi. Ardından uzun süreli saklamak üzere hücreler sıvı azot tankına taşındı.
- Nakil öncesi hazırlık için, hücreleri çözmek üzere azot tankından çıkarılan kriyotüpler doğrudan 37°C'lik su banyosuna (Memmert) alındı. Donmuş hücre süspansiyonu çözöldüğünde 150 g'de 10 dk. süreyle santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilerek DMSO uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine kültür vasatı ilave edilerek hücreler süspanse hâle getirildi ve 75 cm² flasklara dağıtıldı.
- Her iki günde bir hücreler üzerindeki kültür vasatı tazelendi.
- %80-90 konfluent olduklarında, sıçanlara nakledilmek üzere, hücreler calcein AM ile işaretlendi.

3.1.3. Nakil Öncesinde iGKS-MKH'nin İşaretlenmesi

Calcein'in polar olmayan, acetomethoxy türevi calcein-AM, ester formda olup canlı hücre membranını kolaylıkla geçebilmekte ve hücre içine girdiğinde hücre içi esterazlarla hidrolize uğramaktadır (29, 30). Reaksiyon sonucu açığa çıkan polar calcein molekülü flüoresan etkinlik göstermeye başlar ve aynı zamanda sağlam hücre membranına sahip hücre içerisinde tuzaklanır (29, 30).

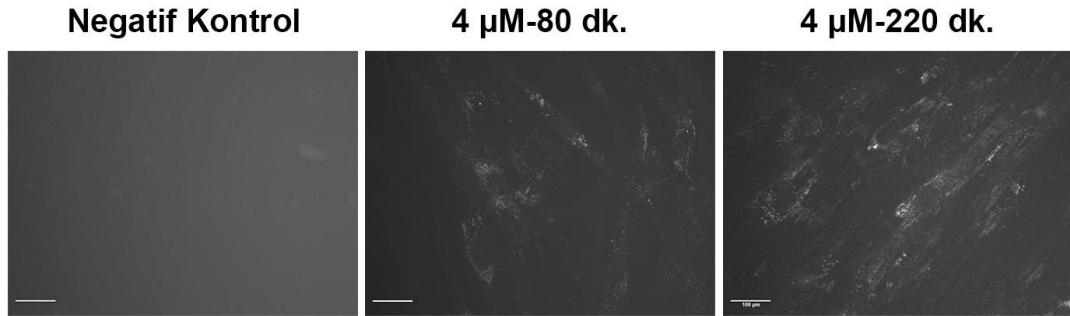
Belirgin bir flüoresans etkinliğe sahip olan calcein, hücre içi moleküllere kovalent bağlanmayan ya da hücre membranının yapısına katılmayan bir boya için oldukça uzun süreli bir işaretleme sağlayabilmekte olup hücre fonksiyonları üzerine herhangi bir olumsuz etkisi tespit edilmiş değildir (31). Calcein AM, kemik oluşumunun değerlendirildiği çalışmalar (32-34), lenfosit migrasyonunun izlendiği kısa süreli migrasyon çalışmaları (35, 36), kısa süreli intravital konfokal/multifoton mikroskopik incelemeler (37) gibi çok sayıda in vivo çalışmada ve hücre canlılık analizleri (38, 39) başta olmak üzere çok sayıda farklı in vitro süreçlerde farklı amaçlarla kullanılmıştır. Ayrıca nekzulardan geçebilen calcein AM, kardiyomiyositlerle eşkültürü yapılan farklı hücrelerin kardiyomiyositlerle ne düzeyde interaksiyona geçtiğinin belirlenmesi için de kullanılabilir (40-42). Bu çalışmada ise calcein AM, nakledilecek hücrelerin daha sonradan elde edilen dokularda tespit edilebilmesi için bir işaretleyici olarak kullanıldı.

Calcein AM (BD Biosciences; 354216) uygulamasıyla ilgili üretici firma 1-10 μ M derişimde ve hücre tipine göre 15 dk.- 4 saat inkübasyonu önermektedir. Bu geniş aralıklardaki doz ve inkübasyon süresini iGKS-MKH'nde optimize etmek için bir deney planı yapıldı. Bunun için öncelikle 4 μ M calcein AM ile bir grubu 80 dk. diğer grubu 220 dk. inkübe edecek şekilde iki deney grubu oluşturuldu. Kuyucuklu kültür kaplarına ektiğimiz hücreler %80-90 konfluent olduklarında 80 ve 220 dk. gruplarından ikişer kuyucuk örnek 4 μ M calcein AM içeren DMEM HAM'S F12 ile 37°C'de belirtilen süreler kadar inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol grubu ise bu süreçte calcein AM içermeyen DMEM HAM'S F12 ile inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra hücreler incelenerek görüntüleri alındı (Şekil 3.4).

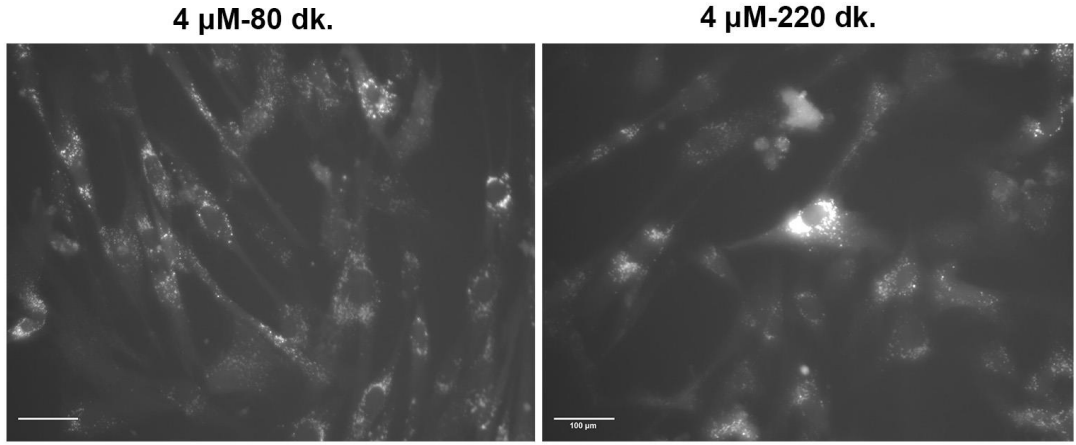


Şekil 3.4. Sırasıyla calcein AM uygulanmayan negatif kontrol, 4 μ M calcein AM ile 80 ve 220 dk. süresince inkübe edilen iGKS-MKH'nin flüoresan etkinliğini gösteren mikrograflar. Bar 200 μ m.

Başarılı bir inkübasyonun ardından, pasajlama ve dondurma-çözme süreçlerinin flüoresan etkinlik üzerine olan etkilerini tespit etmek üzere, yükleme işleminden 3 gün sonra, her bir deney grubundan birer kuyucuk hücre pasajlanırken diğer kuyucuktaki hücreler ise donduruldu. Dondurma işleminden 5 gün sonra dondurulmuş yüklü hücreler de çözülüp takibe alındı. Pasajlanan (Şekil 3.5) ve kriyoprezarvasyon yapılan (Şekil 3.6) her bir grubun flüoresan etkinlikleri gözlemlenerek görüntüleri alındı.

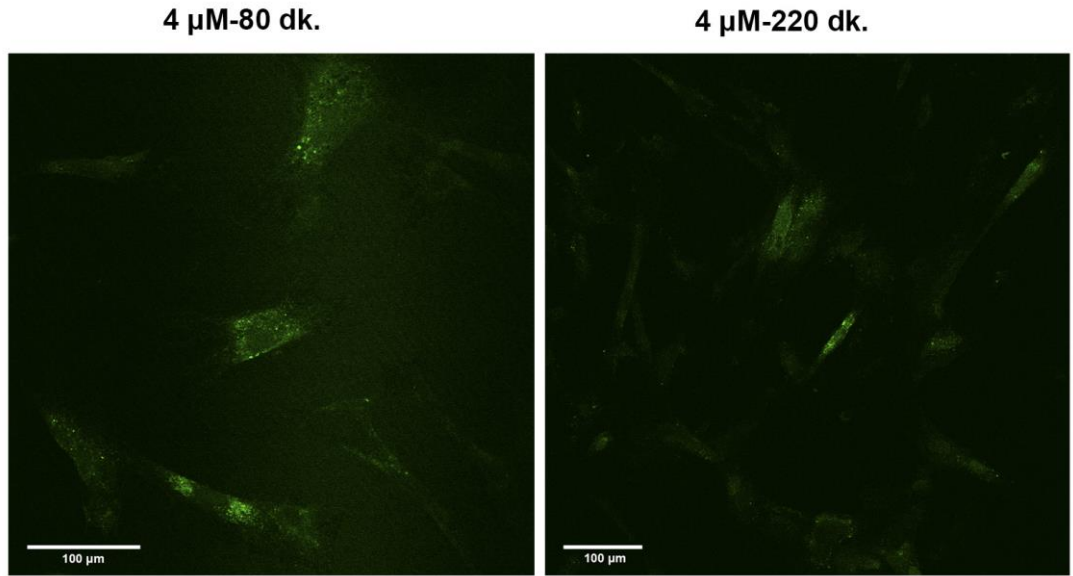


Şekil 3.5. Sırasıyla negatif kontrol grubu ve 4 μ M calcein AM ile 80 ve 220 dk. süresince inkübe edilen iGKS-MKH'nin, pasajlama işleminden sonra flüoresan etkinliklerinin görüldüğü mikrograflar. Bar 100 μ m.

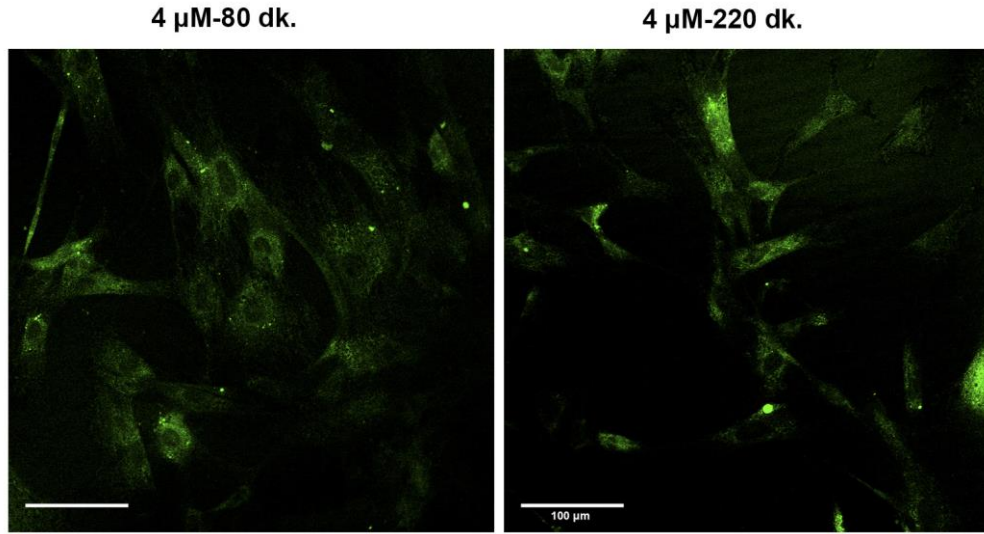


Şekil 3.6. Hücrelerin dondurma-çözme işlemi sonrasındaki flüoresan etkinliklerinin görüldüğü mikrograflar. Negatif kontrol grubunda hücelere kriyoprezervasyon uygulanmadı. Bar 100 µm.

Bundan sonraki aşamada ise calcein AM ile inkübasyondan 14 gün sonra tüm deney gruplarından hücreler fikse edilerek konfokal mikroskopta gözlemlendi (Şekil 3.7 ve şekil 3.8).

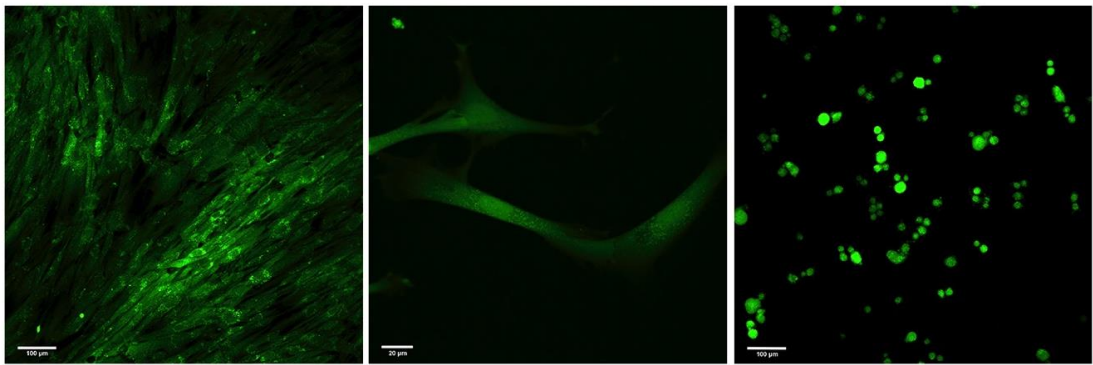


Şekil 3.7. Pasajlandıktan 11 gün sonra fikse edilen calcein AM yüklü hücrelerin konfokal mikrografları görülmektedir. Bar 100 µm.



Şekil 3.8. Kriyoprezervasyon işleminden 5 gün sonra çözülerek 6 gün takip edilen ve ardından fikse edilen calcein AM yüklü hücrelerin konfokal mikrografları görülmektedir. Bar 100 µm.

İnkübasyon süreleri karşılaştırılan bu deney gruplarında, tüm süreçler boyunca sinyal düzeyi bakımından belirgin bir farklılık tespit edilmediği gibi pasajlama ve kriyoprezervasyon süreçlerinin hücrelerdeki calcein AM sinyalini olumsuz etkilemediği gözlemlendi. Bir sonraki aşamada calcein AM dozu ve uygulama süresi azaltılarak inkübasyon prosedürü yeniden denendi. Bunun için hücreler 2 µM konsantrasyonda calcein AM ile 60 dk. boyunca 37°C’de inkübe edildi. Yükleme işleminden sonra hücrelerin konfokal görüntüleri (Şekil 3.9) alındı.



Şekil 3.9. 2 µM calcein AM ile 60 dk. boyunca inkübe edilen hücrelerin mikrografları.

Sırasıyla adherent haldeki hücrelerin küçük ve büyük büyütmelerde alınan ve en solda da hücrelerin süspansiyon hâle getirildikten sonra alınan mikrografları görülmektedir. Bar sırasıyla 100, 20 ve 100 µm.

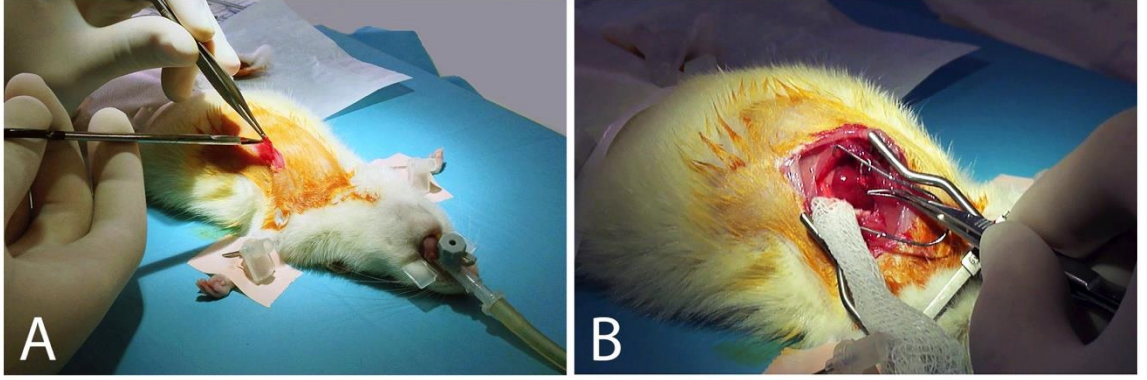
Tüm bu deney aşamalarından sonra nakledilecek iGKS-MKH'nin işaretlenmesi için calcein AM inkübasyonunun 2 µM konsantrasyonda ve 60 dk. süreyle yapılmasına karar verildi.

3.2. HAYVANLARDA MİYOKARD İNFARKTÜSÜ OLUŞTURULMASI VE HÜCRELERİN HAYVANLARA UYGULANMASI

Deney hayvanları ile yaptığımız bu çalışma için Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan 20.12.2013 tarih ve 66332047-604.01.02/229-28237 sayılı karar ile etik onay alındı. 32 adet sekiz haftalık 200-250 g ağırlığında, erkek, Wistar türü albino sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saat gece/gündüz periyodunda, 22°C sıcaklıktaki hayvan barınma yerlerinde, standart sıçan yemi ve musluk suyuyla beslendi. Mİ modellerinin oluşturulması, hücre nakli ve deneklerin izlenmesi ile ilgili deneyler Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

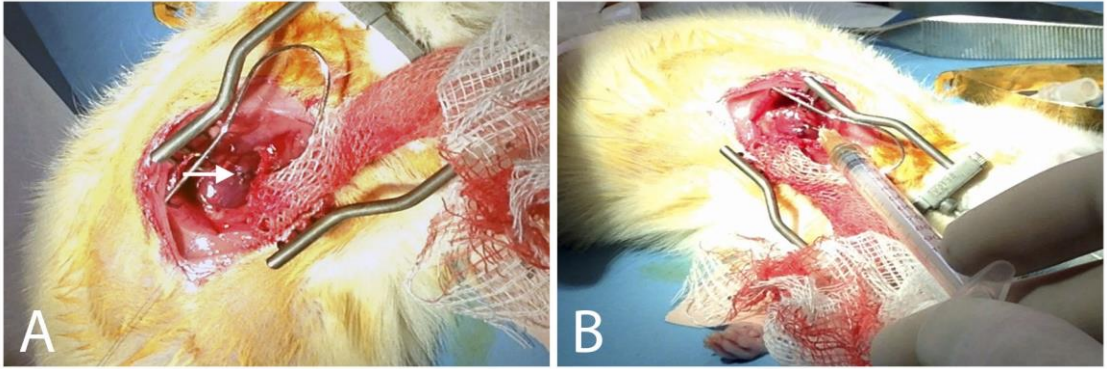
3.2.1. Hayvanlarda Miyokard İnfarktüsü Oluşturulması

Operasyon öncesi anestezi için sıçanlara intraperitoneal olarak 70 mg/kg ketamin (Ketalar®) ve 10 mg/kg ksilazin (Alfazyne®) verildi. Anestezi sağlandıktan sonra trakea kanüle edildi ve hızla kanül ventilatöre (SAR- 830 Ventilator) bağlanarak sıçanların dakikada 60-70 kez %95 O₂ ve %5 CO₂ gaz karışımıyla doyurulmuş oda havası soluması sağlandı. Sol midklavikular hattan torakotomi insizyonu yapılarak cilt ve cilt altı dokular geçildi. Toraks boşluğuna girilerek künt diseksiyonla perikardiyum sıyrıldı ve kalp explore edildi (Şekil 3.10.A ve B).



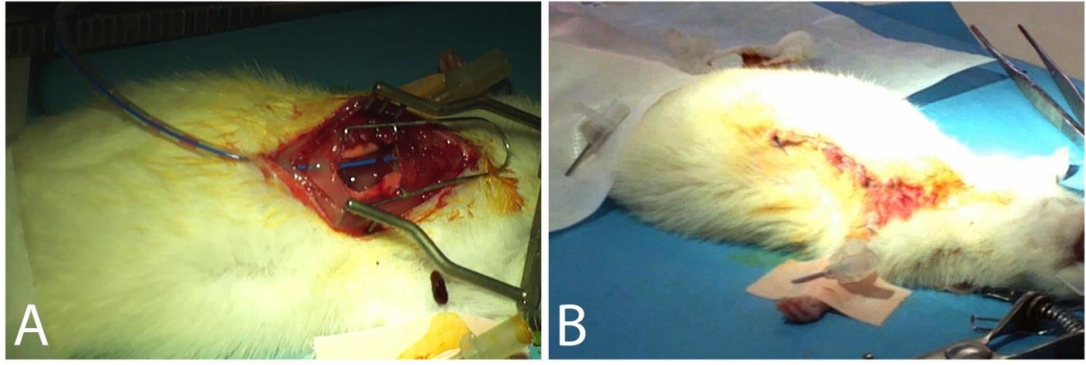
Şekil 3.10. Trakea kanüle edilerek sıçanın soluması sağlandıktan ve gerekli cilt temizliği yapıldıktan sonra sol torakotomi (A) ile toraksın açılması ve kalbin eksplere edilmesi (B) gösterilmektedir.

Sol ön inen koroner arter diseksiyon alanından görülerek orta kısmından 6/0 prolene suture ile bağlandı (Şekil 3.11.A). Bu sırada suture distalindeki miyokardın rengindeki bölgesel soluklaşmanın gözlemlenmesiyle infarkt bölgelerinin oluştuğu doğrulandı. Ardından insülin enjektörü yardımıyla infarkt sınırında tek bir bölgeye, PBS ya da iGKS-MKH enjekte edildi (Şekil 3.11.B).



Şekil 3.11. Sol ön inen koroner arterin orta kısmından kalıcı olarak ligasyonu (A; beyaz ok) ve hücrelerin ya da PBS'in infarkt sınırına enjeksiyonu (B) gösterilmektedir.

Sonrasında katlar kapatılmadan önce pnömotoraks ya da hemotoraks gelişmesini önlemek için toraks boşluğuna nelaton dren yerleştirildi (Şekil 3.12.A). Katların anatomiye uygun olarak kapatılmasını takiben cilt insizyonunun son sutureasyonundan önce dren aspire edilerek çekildi (Şekil 3.12.B).



Şekil 3.12. Toraks boşluğuna dren yerleştirilmesi (A) ve anatomiye uygun bir biçimde toraksın kapatılarak girişimin sonlandırılması (B) gösterilmektedir.

Deney süresince termostatlı ısıtıcı ile hayvanın vücut sıcaklığının $37\pm1^{\circ}\text{C}$ olması sağlandı. Deney sonunda sıçanlara subkütan yoldan analjezik (Meloksikam; Maxicam[®]) ve antibiyotik (Enrofloksasin; Baytril[®]) uygulandı. Oksijenlendirilmiş ve ısıtıcı ped yardımıyla uygun ısı sağlanmış bir ortamda sıçanların anesteziden uyanması beklendi ve ardından bireysel kafeslere alınarak burada barındırıldı. Deney gününden 2 gün sonrasına kadar günde bir kez analjezik ve antibiyotik uygulanmaya devam edildi.

3.2.2. Hücrelerin Hayvanlara Uygulanması

Mİ oluşturulan sıçanlar PBS (kontrol) grubu ve iGKS-MKH grubu olmak üzere rastgele iki gruba ayrıldı. Miyokardiyumdaki bölgesel soluklaşmanın gözlenerek infarktüsün başarıyla gerçekleştiğinin doğrulanmasının ardından sıçanlara ya PBS (kontrol) ya da iGKS-MKH uygulandı. Bunun için PBS grubundan hayvanlara sadece 250 μL PBS infarkt sınırında tek bir bölgeye enjekte edildi. iGKS-MKH grubundan hayvanlara ise 250 μL PBS içerisinde süspanse edilen, calcein AM işaretli $2,2 \times 10^6$ hücre infarkt sınırında tek bir bölgeye enjekte edildi.

3.3. HAYVANLARDAKİ KARDİYAK İYİLEŞMENİN İZLENMESİ

Girişimden 3 hafta sonra iGKS-MKH ve PBS grubundaki hayvanlara S8-3 probu olan bir ultrason sistemi (IE 33, Philips Medical System, WA, USA) kullanılarak transtorasik ekokardiyografi (EKO) yapıldı. Bunun için PBS grubundan 6, iGKS-MKH grubundan ise 3 sıçan rastgele seçildi. EKO değerlendirmesi sırasında, iki boyutlu görüntüleme kullanılarak papiller kas düzeyinden sol ventrikülün kısa bir eksen görüntüsü alındı. Sol ventrikülün ön ve arka duvarları boyunca iki boyutlu M-mod kaydı alındı. Sol ventrikül diyastol sonu (LVEDD; Left Ventricle End Diastolic Diameter) ve sistol sonu çapları (LVESD; Left Ventricle End Systolic Diameter) ölçüldü ve Teichholz yöntemi kullanılarak sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (LVEF; Left Ventricle Ejection Fraction) hesaplandı. Bu değerlendirmeler, deney modeli oluşturulmadan önce rastgele seçilen 3 sıçanda yapılan bazal ekokardiyografik değerlerle karşılaştırıldı.

3.4. KALP DOKULARININ ELDE EDİLMESİ VE İNFARKT ALANI DEĞERLENDİRMESİ VE MİKROSKOBİK İNCELEME İÇİN HAZIRLANMASI

Deneye dahil edilen 32 hayvandan bir kısmı cerrahi prosedür ve Mİ komplikasyonları nedeniyle intraoperatif ve perioperatif süreçte öldü. iGKS-MKH grubundan 8, PBS grubundan ise 8 sıçan yaşadı. Mİ oluşturma ve eş zamanlı intramiyokardiyal hücre ya da PBS uygulamasından 3 hafta sonra tüm hayvanlar sakrifiye edildi.

3.4.1. Dokularda İnfarkt Alanı Değerlendirmesi

Otopsi materyallerinde makroskopik gözlemler, Mİ'den en az 18-24 saat sonra Mİ'nin kesin tanısını koymada, lokalizasyonunu ve boyutlarını belirlemede kullanılabilmektedir (43). Histolojik yaklaşımlar ise in vivo infarkt gelişiminden sadece 12-18 saat sonra yapıldığında güvenilir sonuç veren, zaman alıcı ve pahalı yöntemlerdir (43). Tetrazolyum boyalarının kullanıldığı makroskopik yöntemler ise,

diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında infarktüstten daha kısa bir süre (1-6 saat) sonra, iskemik hasar sonucu oluşan miyokard nekrozunun tanımlanmasında oldukça faydalı tekniklerdir (43).

Tetrazolyum tuzlarının kullanıldığı histokimyasal yöntemler, makroskopik ve mikroskopik yöntemlere göre çok sayıda avantajları bulunan, infarktı lokalize etmenin yanı sıra infarkt boyutunun ölçümü için de kullanılan güvenilir ve kesin yöntemler olup, infarktüsün tanısai makroskopik ya da histolojik değişimlerinin ortaya çıkmasından çok daha önce, deneysel infarkt oluşumunun makroskopik olarak tanımlanmasını sağlayabilmektedir (43).

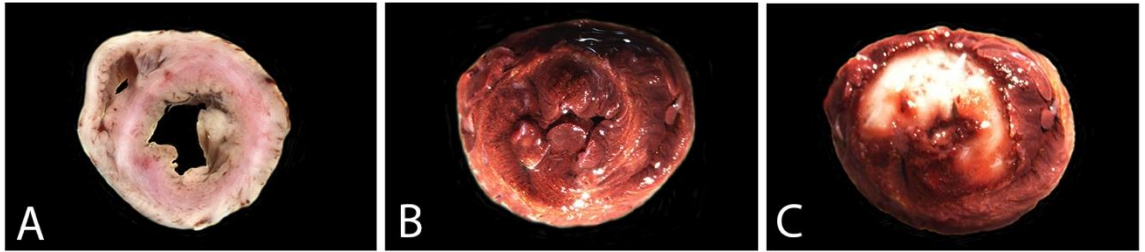
Tetrazolyum testinin (boyamasının) temel etkinliği, canlı hücrelerdeki oksidatif enzim sistemlerine dolayısıyla hücresel solunuma dayanmaktadır. Dokuya tetrazolyum tuzları uygulandığında, sağlam bir oksidatif enzim sistemi ve uygun bir substrat varlığında, substratın oksidasyonu sonucunda indirgenen koenzim, elektronları tetrazolyum molekülüne nakletmekte ve tetrazolyum indirgenerek renkli bir molekül olan formazana dönüşmektedir (43). Bu reaksiyonun hızı, bir çok biyokimyasal reaksiyonda olduğu gibi, substrat ve koenzim konsantrasyonuna bağlıdır, ortam pH'sı ve sıcaklığı gibi değişkenlerden etkilenmektedir (43). Canlılığını yitiren doku bölgelerinde ise oksidatif enzim aktivitesi ortadan kalktığı için tetrazolyum tuzları renkli bir ürün olan formazana dönüşmemektedir ve bu nedenle nekrotik alanlarda renk değişimi oluşmamaktadır (43).

Bu çalışmamızda iGKS-MKH ve PBS grubu hayvanlarının infarkt boyutlarını karşılaştırmak için bir tetrazolyum tuzu olan trifenil tetrazolyum klorid (TTC) molekülü kullanıldı. Canlı miyokardiyumda dehidrojenazların etkinliği sonucu TTC indirgenerek koyu kırmızı renkli monoformazana dönüşmektedir ve doku bu nedenle kırmızı renk almaktadır (24, 43, 44). Buna karşın nekrotik alanlar, bu reaksiyon gerçekleşmediği için soluk kalmaktadır (21, 24, 43, 44).

İnfarkt alanı ölçümü için yaygın olarak kullanılan TTC testi farklı biçimlerde uygulanabilmektedir. Dilimlenen kalp parçalarının solüsyon içinde inkübe edilerek boyanması (45-48) deneysel modellerde en sık kullanılan yöntem olmakla birlikte, çıkan aortadan infüzyon yoluyla solüsyonun koroner dolaşıma verilmesi (49),

intravenöz yolla solüsyonun infüzyonu (43, 50) gibi, daha etkin bir boyanma sağladığını söyleyebileceğimiz yöntemler de kullanılmaktadır. Hızlı, etkili ve kolay bir yöntem olmasına rağmen kalp dilimlerinin solüsyon içinde inkübasyonu, dilimlerin sadece yüzeylerinin boyanmasıyla sonuçlanmaktadır (43). Perfüzyon yönteminde ise dokunun tamamının boyanması hassas bir nekroz alanı ölçümü sağlamaktadır (43).

Kendi deneylerimiz için en uygun TTC uygulama yöntemini tespit etmek üzere, sağlıklı ve iskemik nekroz gerçekleştirdiğimiz sıçan kalplerinde farklı yöntemler denenerek dokuların boyanma özellikleri karşılaştırıldı. İlk olarak sağlıklı sıçan kalpleri dilimlenerek dilimlerin bir kısmı boyama prosedürü uygulanmadan fikse edildi. Diğer dilimler ise pH'sı 7,4'e ayarlanmış %1'lik TTC içeren fosfat tamponu içerisinde 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra fikse edilen kalp dilimleri, stereomikroskop altında yüzeylerinden bistüriyle bir miktar kesilerek incelendi ve incelenen bu kesitlerin görüntüleri alındı. TTC'nin sadece yüzeyel bir boyanma yapıp doku derinliklerine diffüze olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.13).

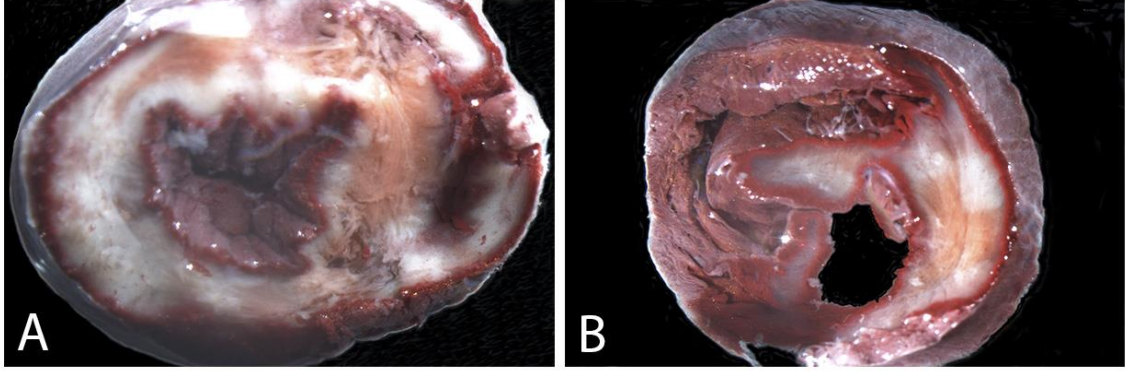


Şekil 3.13. Doğrudan fikse edilen (A) ve TTC solüsyonu içerisinde inkübe edildikten sonra fikse edilen (B) sağlıklı kalp dilimlerine ait görüntüler.

TTC ile inkübe edilen sağlıklı kalp diliminin kırmızıya boyandığı görülmektedir. Bu dilimin yüzeyinden bir kesit alınarak incelendiğinde ise boyanmanın sadece yüzeyel olduğu, derindeki doku bölgelerinin ise boyanmadığı görülmektedir (C).

İkinci aşamada sağlıklı sıçanlara femoral ve pulmoner ven yoluyla TTC perfüzyonu yapılarak kalpler boyandı. Çıkarılan kalpler fiksatifte bekletildikten sonra dilimlenerek stereomikroskop altında incelendi ve görüntülendi. Solüsyon içerisinde immersiyon yöntemine göre daha fazla bir boyanma sağlamakla birlikte kalbin

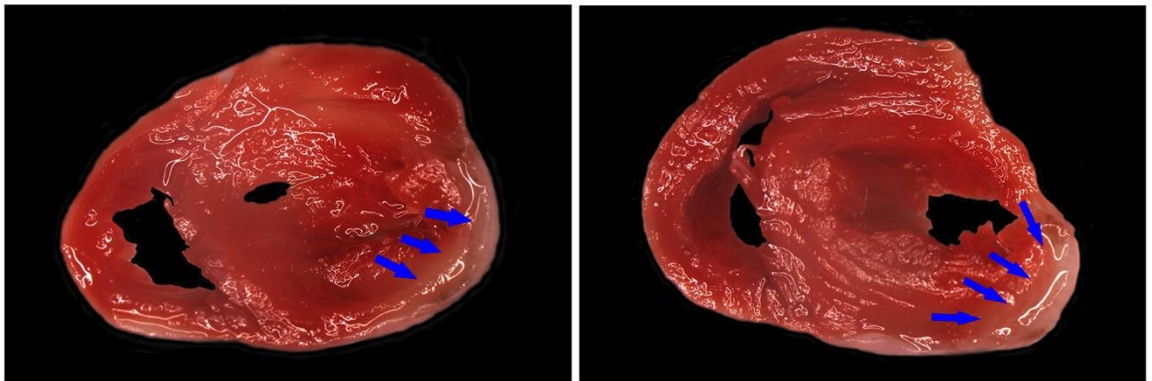
tamamını kapsayan etkili bir boyanma gerçekleşmediği görüldü (Şekil 3.14). Bu durum perfüzyon süresince kalbin kontraktilesini yeterince sağlayamamış olmamızla ilgili olabilir.



Şekil 3.14. Femoral ven yoluyla (A) ve pulmoner ven yoluyla (B) TTC perfüzyonunu takiben fiks edilen sağlıklı sıçan kalplerine ait görüntüler.

Kalpler stereomikroskop altında dilimlendikten sonra incelendiğinde dokuların tamamının boyanmadığı görülmektedir.

Son olarak Mİ modeli oluşturduğumuz bir sıçanın kalbi, Langendorff düzeneği kullanılarak TTC ile aorttan retrograd perfüze edildi. Fiksasyonu takiben doku dilimlenerek incelendiğinde, ligasyonun distalinde kalan sol ventrikül duvarında nekrotik alanların soluk boyanırken geri kalan sağlam kalp bölgelerinin tamamen kırmızıya boyandığı gözlemlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Langendorff düzeneğinde, TTC'nin retrograd perfüzyon yoluyla koroner dolaşıma verilmesiyle boyanan iskemik hasarlı kalplere ait dilimlerin görüntüleri

Oklar sol ventrikül duvarının soluk renkteki nekrotik alanlarını göstermektedir.

Bu incelemelerden elde ettiğimiz veriler doğrultusunda bu çalışmadaki tüm TTC uygulamaları Langendorff düzeneği kullanılarak yapıldı. İnfarkt alanı değerlendirmesi için PBS grubundan 4, iGKS-MKH grubundan 7 sıçana ait kalp örnekleri kullanıldı. Bunun için anestezi altındaki sıçanlara, femoral ven yoluyla 500 IU/kg dozunda heparin (Mustafa Nevzat) verildikten sonra toraks hızla açıldı. Perikardiyektomi yapılarak kalp izole edildi. Kalp dokuları, çıkarılır çıkarılmaz, bileşimi aşağıda belirtilen, taze hazırlanmış buzlu Krebs Henseleit çözeltisi içerisinde alındı.

Krebs-Henseleit Çözeltisinin Bileşimi (MA) (mmol/L):

Sodyum Klorür (NaCl) (118) 6,95 g /L

Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) (25)2,1 g/L

Anhidr Glukoz (11)1,82 g/L

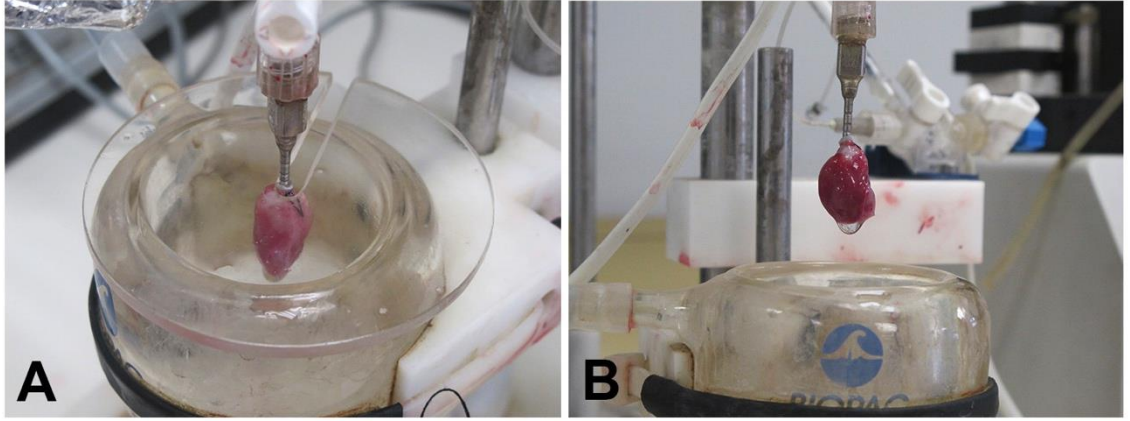
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄) (1.2)0,16 g/L

Potasyum Klorür (KCl) (4.7)0,36 g/L

Magnezyum Sülfat (MgSO₄.7H₂O) (1.2) 0,29 g/L

Kalsiyum Klorür (CaCl₂.2H₂O) (2.5)0,36 g/L

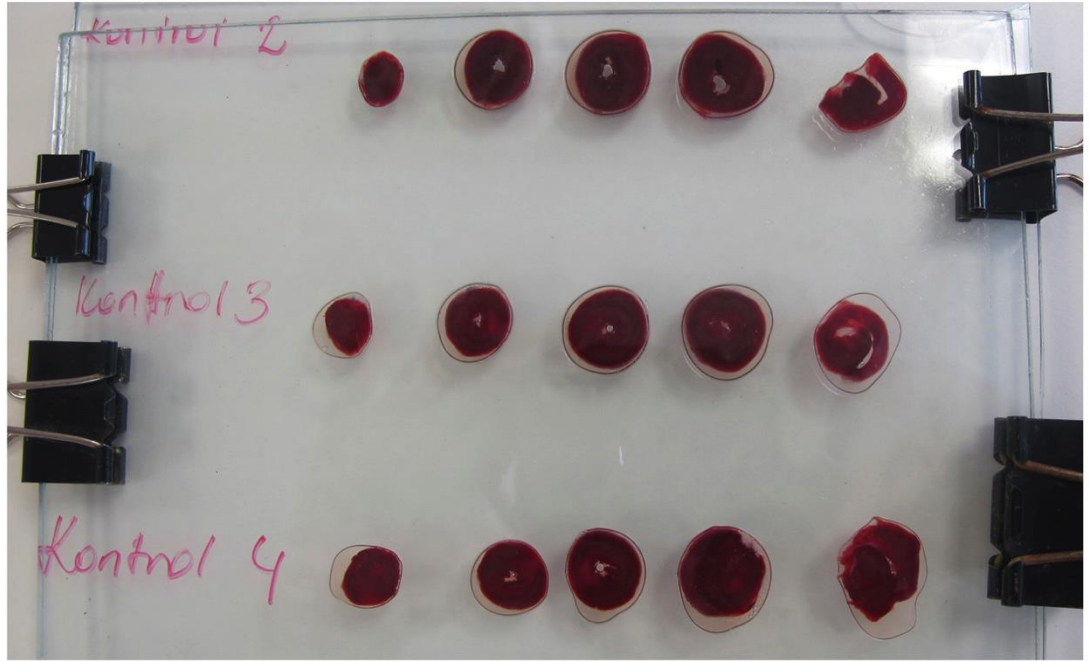
Buzlu Krebs Henseleit çözeltisi içerisinde alınan kalp dokuları daha sonra hızlı bir şekilde, pH'sı 7,4 sıcaklığı 37°C olan ve %95 O₂, %5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılan Krebs-Heinseleit çözeltisi ile retrograd olarak perfüze edilmek üzere sabit basınçlı Langendorff cihazına aorttan asıldı (Şekil 3.16.A). Krebs Henseleit rezervuarı, perfüzyon boyunca istenilen sabit basıncı (100 cm H₂O=75 mmHg) sağlamak için izole organ banyosundan 100 cm yukarıda olacak şekilde yerleştirildi. Perfüzyon sırasında ritmik ve belirgin kontraksiyonların gözlenmesini takiben Krebs solüsyonu kesilerek bu kez, aşağıda hazırlanışı verilen, pH'sı 7,4'e ayarlanmış %1'lik TTC (Sigma; T8877) içeren fosfat tamponu ile kalpler 37°C'de 20 dk. süreyle perfüze edilerek boyandı (Şekil 3.16.B).



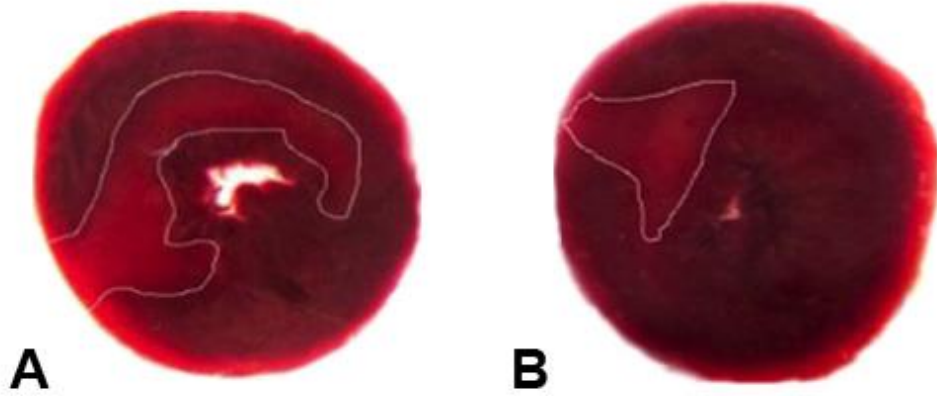
Şekil 3.16. Sabit basınçlı Langendorff cihazına aorttan asılan bir kalbin TTC ile boyanmadan önceki (A) ve boyanmadan sonraki (B) görüntüleri.

TTC çözeltisinin hazırlanması: Fosfat tamponu hazırlanırken 0,1 M NaH_2PO_4 ve 0,1 M Na_2HPO_4 çözeltilerinden, 100 mL için sırasıyla 22,6 mL ve 77,4 mL karıştırılarak stok solüsyon hazırlandı. pH'yı azaltmak için ilk çözeltiden (NaH_2PO_4), artırmak için ikinci çözeltiden (Na_2HPO_4) stok solüsyona eklenerek pH 7,4 olacak şekilde ayarlandı. Gerekli miktarda TTC tartılarak %1'lik TTC çözeltisi hazırlandı.

Her bir sıçan kalbi için 40 mL TTC çözeltisi uygulamasının ardından dokuda canlılığını koruyan alanlar, TTC ile koyu kırmızı renkte boyanırken nekrotik bölge ise soluk sarımsı renkte boyandı. Boyama işleminin bitmesinin ardından askıdan alınan kalpler fiksasyon için %3,5'luk paraformaldehit (PFA) solüsyonu içerisine alındı. Boyalı alanlarla soluk alanlar arasındaki kontrastın artması (51, 52) ve dokuların sertleşmesi için birkaç saat süreyle %3,5'luk PFA'da bekletilen her bir kalp infarkt alanı incelemesi yapılmak üzere bistüri yardımıyla apeks-bazis yönünde 2-3 mm kalınlıkta transvers dilimlere ayrıldı. Kalp dilimleri iki cam levhanın arasına yerleştirildi ve kenarlara takılan iki klemp yardımıyla sıkıştırıldı. Image J bilgisayar programı yardımı ile $100 \times$ infarkt alan/tüm alan eşitliği ile oransal olarak infarkt alanı hesaplaması yapmak üzere, cam levhalar arasına yerleştirilen dokuların fotoğrafları çekildi (Şekil 3.17 ve şekil 3.18).



Şekil 3.17. TTC uygulaması sonrası dilimlenip, infarkt alanı hesaplaması yapmak üzere iki cam levha arasına yerleştirilen kalp dokularına ait bir fotoğraf örneği görülmektedir.



Şekil 3.18. Mİ sonrası, sırasıyla PBS uygulanan (A) ve iGKS-MKH nakledilen (B) sıçanların, TTC uygulamasını takiben infarkt alanı ölçümü yapılan kalplerine ait birer örnek görülmektedir.

Beyaz çizgiyle sınırlandırılan alanlar, infarkt nedeniyle soluk kalan bölgelerdir.

3.4.2. Dokuların Mikroskopik İnceleme İçin Hazırlanması

İnfarkt alanı hesaplaması yapmak üzere fotoğraflama işlemini takiben dokular tekrar %3,5'luk PFA solüsyonuna alındı. Yeterli bir fiksasyon için dokular 5 gün süreye %3,5'luk PFA içerisinde bekletildi. Bu süre içerisinde etkin bir fiksasyon sağlamak amacıyla solüsyon bir kere değiştirildi. Fiksasyon sonrasında dokular, kriyomatrikse gömülmeden önce, kriyoprotektif aşamadan geçirildi. Bunun için dokular 4°C'de 1-24 saat süreyle 1,2 M süktroz (%0,1 PFA içerisinde) çözeltisinde bekletildi. Süktroz çözeltisinden çıkarılan dokular musluk suyunda kısa süreli yıkayıp hafifçe kurulandıktan sonra kriyomatrikse gömüldü. Kriyomatrikse gömülen doku blokları kesit aşamasına kadar -80°C'de saklandı. Planlanan histokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler için doku örneklerine ait bloklardan kriyomikrotom (SHANDON; Cryotome SME) ile 10 µm kalınlığında seri frozen kesitler alındı. Daha önceden Poli-L-Lizin (Sigma; P8920) ile kaplanmış lamalar üzerine alınan kesitler, boyama işlemine kadar kısa süreliğine -20°C'de tutuldu.

Seri frozen kesitlerden belli aralıklarla alınan örnekler, Mİ sonrasında kalpteki iyileşme alanlarını ve fibrotik değişimleri incelemek için Masson'un trikrom boyası ile boyandı. Bu boyalarla hazırlanan preparasyonlar Zeiss Axioimager model ışık mikroskopunda incelenerek yorumlandı ve görüntüleri alındı.

Trikrom boyalı presparasyonlarda fibrotik alanların gözlendiği frozen kesitlerin serilerinde, iGKS-MKH'nin varlığının gösterilebilmesi için kesitler calcein AM sinyali açısından ve ayrıca insan hücre çekirdeklerine özgü olarak bağlanan Anti-Lamin A + C (ABCAM; ab108595) antikoru ile inkübasyonu takiben incelendi. Bunun yanı sıra Mİ sonrasında sıçan kalbine nakledilen iGKS-MKH'nin farklılaşma gösterip göstermediğini belirlemek için seri frozen kesitler, monoklonal α -sarkomerik aktin antikoru (SIGMA; A2172) ve sadece insana özgü antijenlerle etkileşen anti-cardiac troponin I antikoru (ABCAM; ab52862) ile inkübe edilerek incelendi.

İmmünflüoresan inceleme için hazırlanan kesitlerin değerlendirilmeleri ve görüntülenmeleri Zeiss LSM510 model mikroskop konfokal sistemiyle yapıldı.

3.4.2.1. Dokuların Masson'un Trikrom Boyasıyla Boyanması

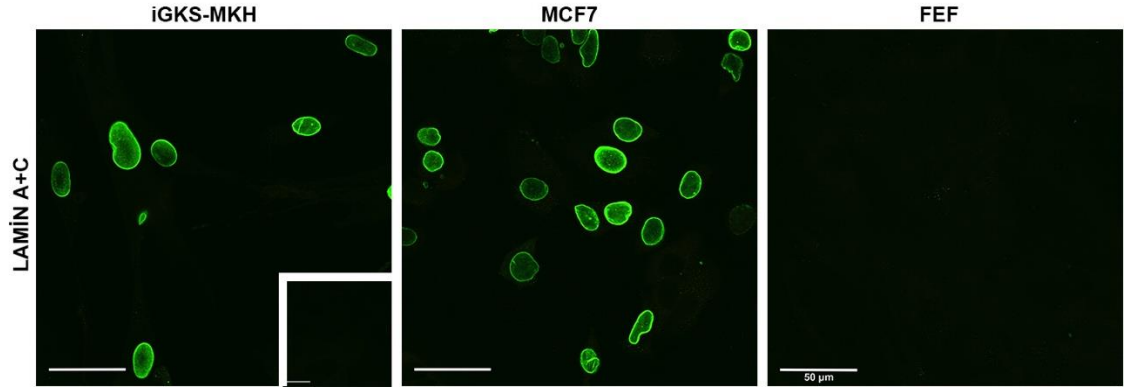
Kalp dokusuna ait frozen kesitleri Masson'un trikrom boyasıyla boyamak için sırasıyla şu aşamalar uygulandı (53, 54):

- Kriyomikrotom ile 10 µm'lik frozen kesitler alındı.
- İnkübasyon solüsyonunun akmasını engellemek için dokuların etrafı PapPen® ile çizildi.
- Renkleri yoğunlaştırmak ve doku bileşenleri arasındaki karışıklığı artırmak için Bouin'in solüsyonunda (54) oda sıcaklığında bir gece boyunca dokular tekrar fikse edildi.
- Kesitlerden sarı rengi uzaklaştırmaya kadar distile su ile yıkama yapıldı.
- Çekirdekleri siyaha boyamak için Weigert'in demirli hematoksilin solüsyonuyla (54) dokular 5 dk. inkübe edildi.
- Fazlalık hematoksilini uzaklaştırmak ve siyah rengi yoğunlaştırmak için dokular 10 dk. süreyle distile suyla yıkandı.
- Kas liflerini kırmızıya boyamak için kesitler 5 dk. süreyle %1'lik Biebrich Scarlet-asit fuksin solüsyonunda (54) bekletildi.
- Üç kere birer dk. süreyle distile suyla yıkama yapıldı.
- Dokular kollajen liflerindeki kırmızı boyanma giderilene kadar fosfomolibdik- fosfotungustik asit (54) solüsyonunda bekletildi.
- Kollajen liflerini boyamak üzere dokular 5 dk. kadar %2,5'lük anilin mavisi (54) içerisinde bekletildi.
- Üç kere birer dk. süreyle distile suyla yıkama yapıldı.
- %1'lik asetik asit ile farklılaştırma yapıldı.
- İki kere birer dk. süreyle distile suyla yıkama yapıldı.
- Dokular sırasıyla %70, %90, %100'lük etanollerden geçirildi.
- Ksilen ile şeffaflandırma yapıldı.
- Entellan ile kapatıldı.

3.4.2.2. Kalp Dokularında Flüoresan İmmünohistokimyasal İnceleme

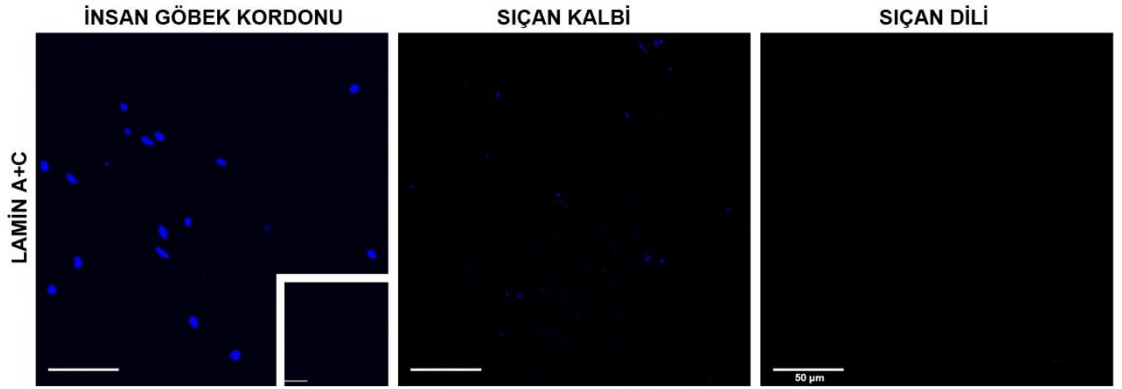
- Kriyomikrotom ile 10 µm'lik frozen kesitler alındı.
- Kesitlerin oda sıcaklığına kadar ısınması sağlandı ve dokuların etrafı PapPen® ile çizildi.
- PBS-Tween 20 (%0,2-0,5) ile bir kere yıkama yapıldı (15 dk.).
- Spesifik olmayan bağlanmayı ve fon boyanmasını önlemek için 30 dk. süreyle oda sıcaklığında bloklama yapıldı.
- Dokular 4°C'de bir gece ve ilaveten 37°C'de de 2 saat süreyle primer antikorla inkübasyona bırakıldı.
- PBS-Tween 20 (%0,2-0,5) ile bir kere yıkama yapıldı (15 dk.).
- FITC (Fluorescein isothiocyanate), Cy3 (Cyanine 3) ya da Cy5 ile konjuge sekonder antikorla 37°C'de 2 saat süreyle inkübasyon yapıldı.
- PBS-Tween 20 (%0,2-0,5) ile bir kere yıkama yapıldı (15 dk.).
- Hoechst içeren kapatma mediumu kullanılarak kapama yapıldı.
- İnceleme yapılana kadar kısa süreliğine -20°C'de saklandı.
- Antikorların dilüsyon ve boyama prosedürlerinin optimizasyonu sırasında belirli bazı antikorlar için %1 SDS (sodium dodecyl sulfate) kullanılarak antijen artırımı yapılırken, bazı antikorların uygulaması sırasında ise bloklama yapılmadı.
- Bazı kesitlerin boyanması sırasında nükleusu işaretlemek için TO-PRO®-3 Iodide (642/661) (Molecular Probes; T3605) kullanıldı.

Deney materyallerinde kullanılan antikorlar farklı hücre ve dokularda test edilerek konsantrasyon ve uygulama prosedürleri optimize edildi. Bunun için anti-Lamin A + C antikorlu iGKS-MKH, MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7) meme kanseri hücreleri ve fare embriyonik fibroblast (FEF) hücreleri olmak üzere üç farklı hücre tipinde (Şekil 3.19) ve insan göbek kordonu, sıçan kalbi ve sıçan dili frozen kesitleri olmak üzere farklı doku tiplerinde (Şekil 3.20) denenerek görüntü analizleri ve ön değerlendirmeleri yapıldı.



Şekil 3. 19.İnsana özgü lamin A+C antikoruna ile işaretlenen iGKS-MKH, MCF7 ve FEF hücrelerinin konfokal mikrografları.

iGKS-MKH mikrografına ekli küçük resim negatif kontrolü göstermektedir. Beklendiği gibi FEF hücrelerinde sinyal yoktur. Yeşil sinyal lamin A+C, sekonder antikor FITC konjugedir. Tüm mikrograflarda bar 50 µm'dir.



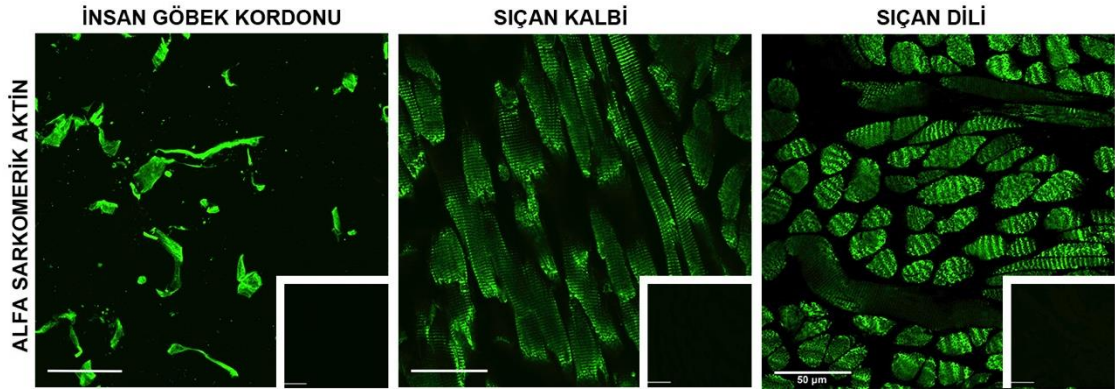
Şekil 3.20.İnsana özgü lamin A+C antikoruna ile işaretlenen insan göbek kordonu, sıçan kalbi ve sıçan dili frozen kesitlerinin mikrografları.

Ekli küçük resim negatif kontrolü göstermektedir. İnsan dokusundaki tipik sinyale karşın sıçan dokularında sinyal gözlenmedi. Mavi sinyal lamin A+C, sekonder antikor Cy5 konjugedir. Bar tüm mikrograflar için 50 µm'dir.

Bu deneyler sonucunda, sonraki deneylerde Lamin A+C antikorunun 1:100 oranında PBS içerisinde dilüe edilerek kullanılmasına karar verildi.

Benzer biçimde alfa sarkomerik aktin antikoruna insan göbek kordonu, sıçan kalbi ve sıçan dili frozen kesitlerinde denenerek antikor uygulama prosedürü ve konsantrasyonu optimize edildi. Preparasyonlar konfokal mikroskopta

görüntülenerek değerlendirildi (Şekil 3.21). Sonraki çalışmalar için alfa sarkomerik aktin antikorunun 1:100 oranında PBS içerisinde dilüe edilmesine karar verildi.



Şekil 3.21. Farklı doku tiplerinde alfa sarkomerik aktin ifadesini gösteren mikrograflar. Ekli küçük resimler negatif kontrollere aittir.

Yeşil sinyal alfa sarkomerik aktin, sekonder antikor FITC konjügedir. Bar tüm mikrograflar için 50 µm'dir.

3.5. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

Verilerin kontrol ve tedavi grupları arasında karşılaştırılmasını temel alan çalışmada, deney hayvanları ile çalışılmış dolayısıyla, örneklem büyüklüğü de göz önünde bulundurularak parametrik olmayan test yöntemleri kullanılmıştır. Bağımsız iki grubun sürekli bir ölçüm değeri bakımından kıyaslanması amacıyla Mann Whitney U testi uygulanmış, sonuçlar ortanca (minimum-maksimum) başta olmak üzere ortalama $\pm$ standart sapma gibi tanımlayıcı istatistiklerle özetlenmiştir. Ayrıca infarkt alanı değişkeni için gruplardaki dağılımın görsel olarak da ifade edilebilmesi amacıyla saplı kutu (box plot) grafiği çizilmiştir. SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 paket programı kullanılarak elde edilen istatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık seviyesi $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

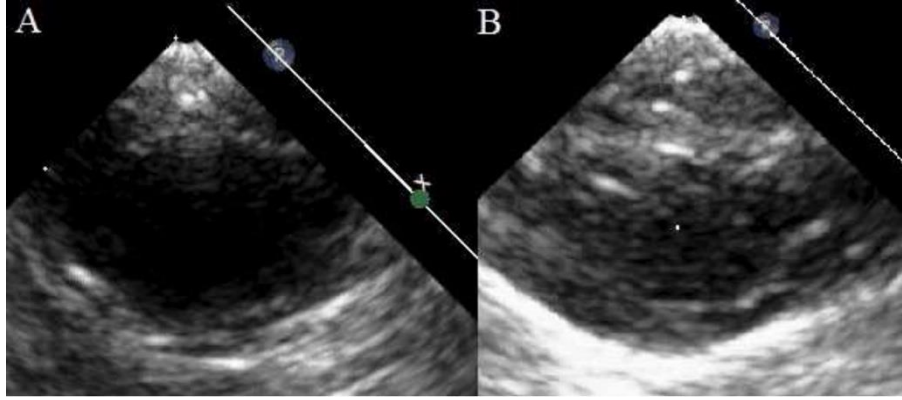
4.1. iGKS-MKH VE PBS GRUPLARININ EKOKARDİYOĞRAFİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

Ekokardiyografik değerlendirme sonucunda elde edilen ortalama değerler ve gözlemler Tablo 4.1’de özetlendi. Sonuçlar ele alındığında sol ventrikül diyastol sonu çapının gruplar arasında benzer olduğu ($p=0,259$); PBS grubuyla karşılaştırıldığında, iGKS-MKH grubunun ejeksiyon fraksiyonu değerinin belirgin olarak iyileşme gösterdiği tespit edildi ($p=0,037$). Sol ventrikül duvar hareketleri incelendiğinde ise, PBS grubundan sıçanların sol ventrikül ön duvarında akinezi tespit edilirken, iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlarınkinde hipokinezi izlendi (Şekil 4.1).

Tablo 4.1. PBS grubu ve iGKS-MKH grubuna ait sıçanların EKO değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması

	Bazal Değerler (Sağlıklı Sıçan) (n=3)	PBS Grubu (n=6)	iGKS-MKH Grubu (n=3)	P değeri*
Sol Ventrikül Diyastol Sonu Çapı (LVEDD)	5,71±0,22	5,56±0,15	5,67±0,04	0,259
Sol Ventrikül Ejeksiyon Fraksiyonu (LVEF)	68,3±2,93	43,3±4,16	52,3±2,89	0,037
Duvar Hareket Anormalliği	Yok	Sol ventrikül ön duvarda akinezi	Sol ventrikül ön duvarda hipokinezi	

*, PBS grubu ile iGKS-MKH grubu arasındaki karşılaştırmaya ait P değeri.



Şekil 4.1. Sırasıyla PBS (A) ve iGKS-MKH gruplarından (B) hayvanlara ait ekokardiyografik görüntüler.

A. Sol ventrikül ön duvarında akinezi izlendi. B. Sol ventrikül ön duvarında hipokinezi izlendi.

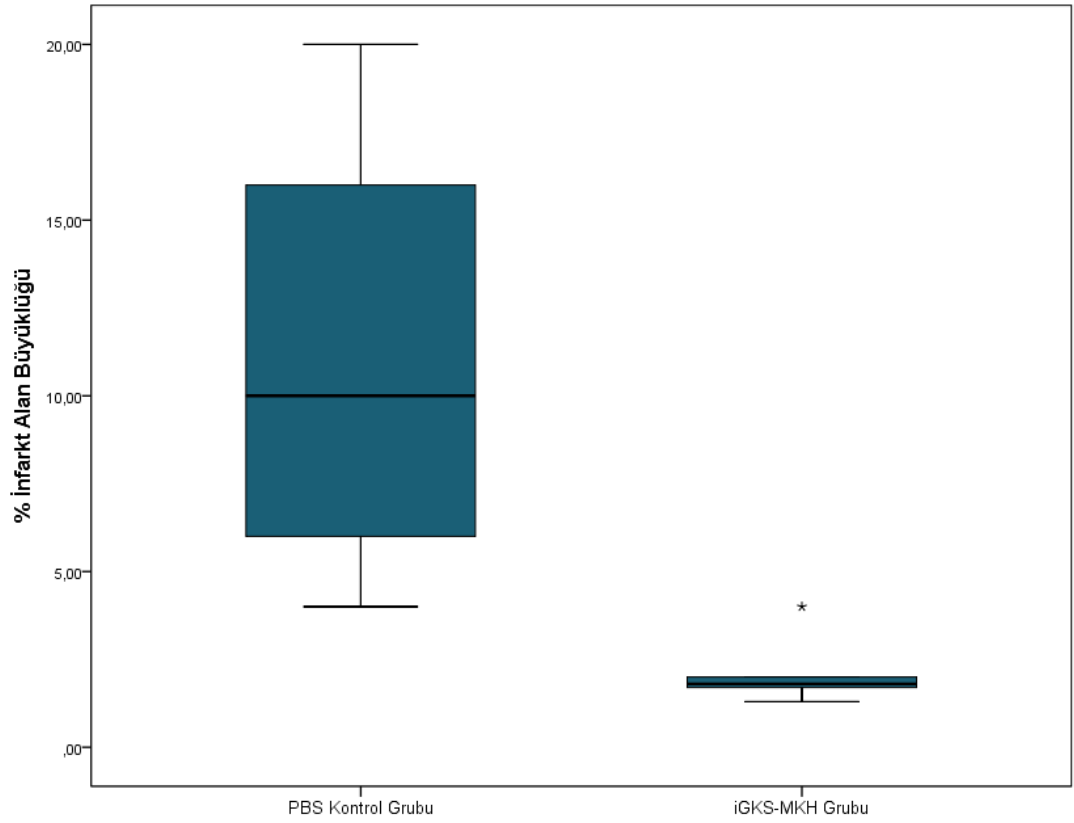
4.2. İNFARKT ALANI BÜYÜKLÜKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfarkt alanı büyüklüklerinin değerlendirilmesi Mİ'ü takiben PBS ya da iGKS-MKH uygulamasından 3 hafta sonra yapıldı (Tablo 4.2). Bu değerlendirme için PBS grubundan 4, iGKS-MKH grubundan 7 sıçana ait kalp örnekleri kullanıldı.

Tablo 4.2. Gruplardaki infarkt alan yüzdelere ilişkin tanımlayıcı istatistikler.

Gruplar	İnfarkt Alanı (%) Ortalama±S.Sapma [Ortanca (Minimum – Maksimum)]	P
PBS Grubu	11,00 ± 6,83 [10 (4-20)]	0,006
iGKS-MKH Grubu	2,07 ± 0,88 [1,80 (1,30 – 4,00)]	

TTC testi sonrası yapılan değerlendirmede, iGKS-MKH grubunda infarkt alanının, PBS grubununkine göre belirgin azaldığı ve bu azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p=0,006) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. PBS ve iGKS-MKH uygulanan gruplarda infarkt alan büyüklüklerinin değişimini gösteren saplı kutu grafiği (p=0,006).

4.3. MİKROSKOBİK İNCELEME SONUÇLARI

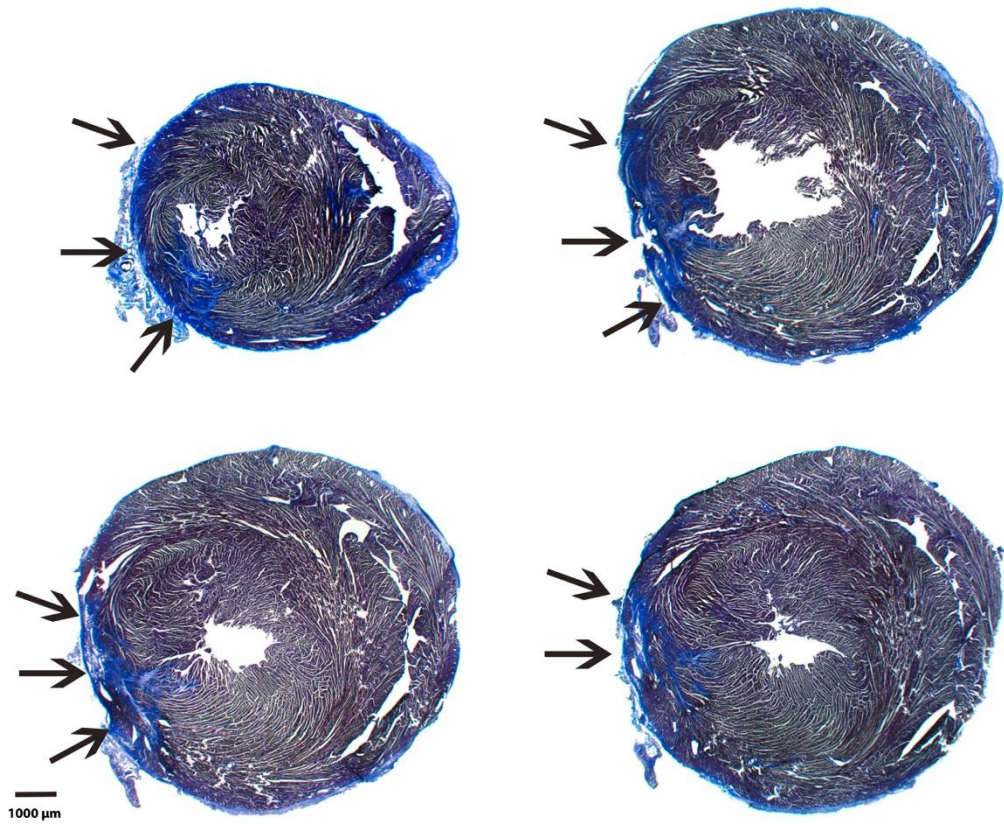
Kalp dokularındaki değişimlerin mikroskopik analizi için, ardışık kesitler Masson'un trikrom boyasıyla boyanarak ve ayrıca bazı antikorlarla inkübe edilerek incelendi.

4.3.1. Masson'un Trikrom Boyası Sonrasında Gözlemlenen Bulgular

PBS kontrol ve iGKS-MKH tedavi grubu sıçanlarının kalplerinde fibrotik alanların değerlendirilmesi için seri frozen kesitler Masson'un trikrom boyası ile boyandı.

4.3.1.1. PBS Grubuna Ait Dokuların Masson'un Trikrom Boyası Bulguları

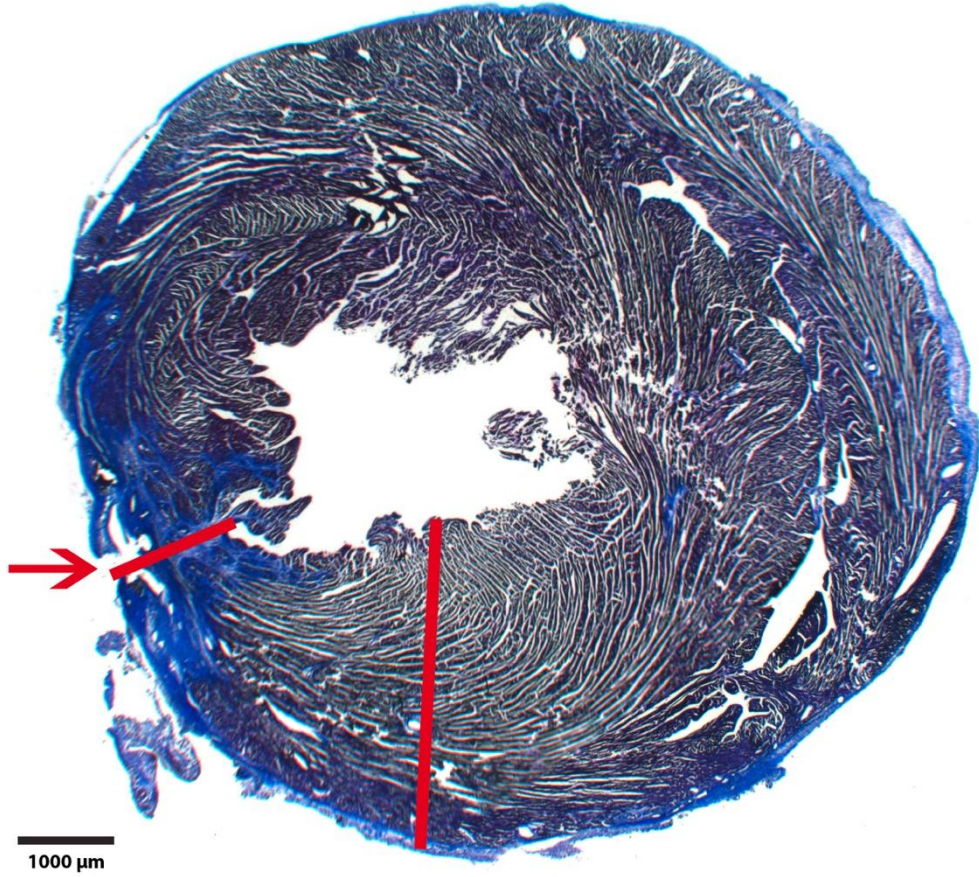
PBS kontrol grubu sıçan kalplerinin seri frozen kesitleri alındıktan sonra, her 18-20 kesitte biri seçilerek, seçilen tüm bu kesitlere Masson'un trikrom boyama prosedürü uygulandı. Şekil 4.3'de bu presparasyonlardan fibrotik alan görülen, ardışık düzeylere ait kesitlere yer verildi.



Şekil 4.3. Mİ sonrası PBS uygulanan kontrol grubundan bir sıçana ait kalbin, trikrom boyalı preparasyonları görülmektedir.

Kesitler LAD ligasyon hattının distalindeki kalp dokusunun farklı düzeylerinden elde edilmiştir. Oklar anilin mavisi ile boyanan kollajen liflerinin oluşturduğu fibrotik dokuyu göstermektedir.

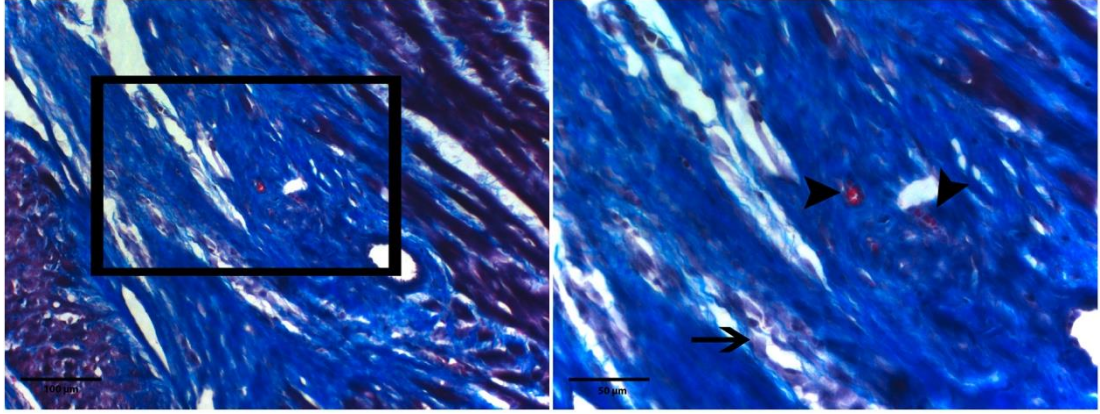
PBS kontrol grubunun trikrom boyalı preparasyonları incelendiğinde, nekrotik alanların kollajenden zengin bir bağ dokusu oluşumuyla yani fibrozisle onarıldığı ve fibrozis nedeniyle sol ventrikül duvarının lokal olarak incelendiği görüldü ancak bu incelmeye yönelik ölçümler ve istatistiksel değerlendirmeler henüz yapılmadı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. PBS kontrol grubundan bir sıçanın trikrom boyalı kalp kesiti.

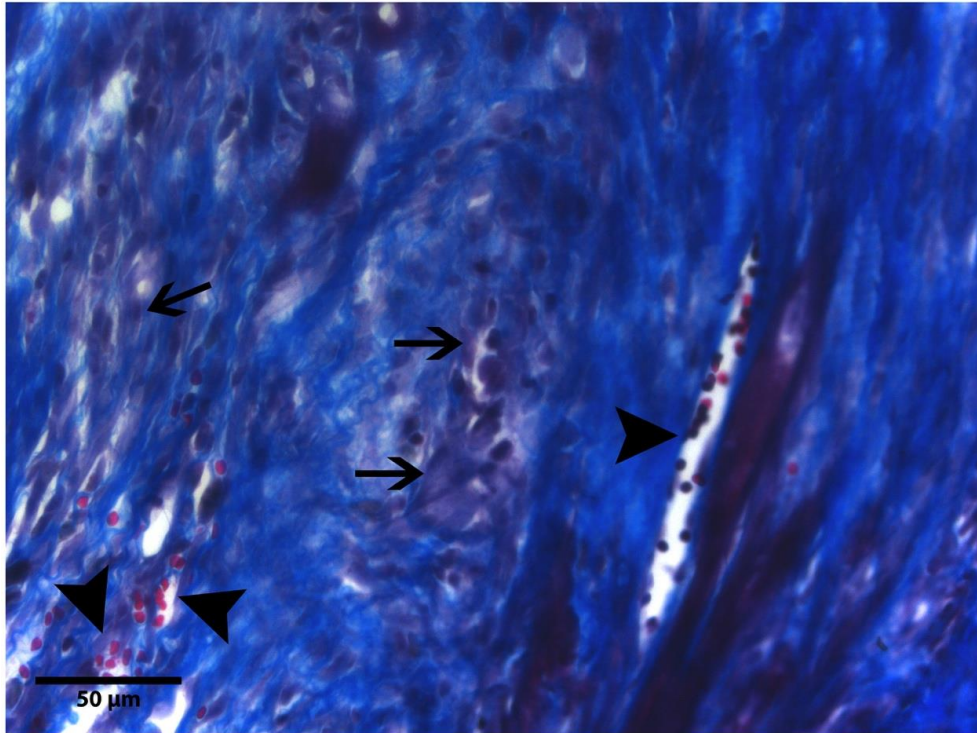
Fibrozis nedeniyle sol ventrikül duvarında oluşan incelme kırmızı okla gösterilmektedir.

Bu alanlar büyük büyütme altında daha detaylı bir biçimde incelendiğinde, hücresel bileşenlerin ve vasküler yapıların son derece az olduğu, kollajen liflerin daha yoğun olduğu ve kollajen liflerin de çoğunlukla kalın lif demetleri halinde organize olduğu tespit edildi (Şekil 4.5 ve şekil 4.6).



Şekil 4.5. PBS kontrol grubundan bir hayvana ait kalp kesitlerinde sağlam miyokard dokusu arasında mavi boyalı fibrotik alanların küçük (sol) ve büyük (sağ) büyütme mikrografları.

Sağdaki mikrograf, soldaki mikrografta çerçeve ile sınırlandırılmış alanın büyük büyütme görüntüsüdür. Sağdaki mikrografta ok başları vasküler yapıları, ok ise nispeten sellüler bağ dokusu bölgesini işaret etmektedir. Bar sırasıyla 100 µm ve 50 µm'dir. Boya Masson'un trikrom boyası.

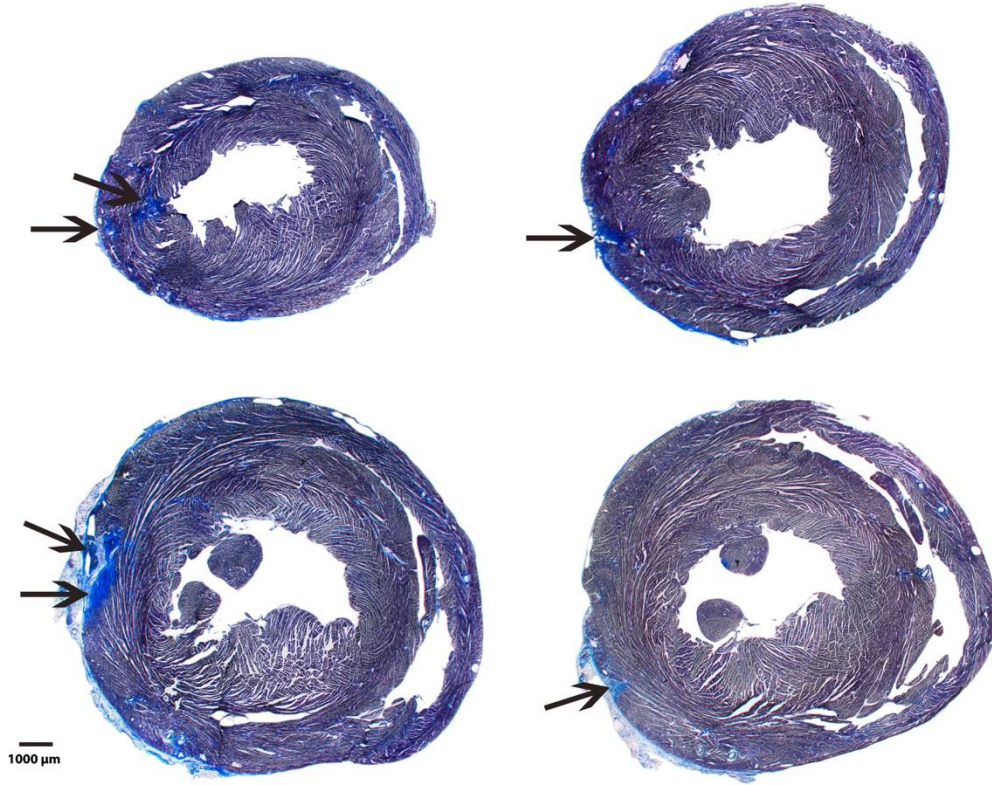


Şekil 4.6. PBS kontrol grubundan bir hayvana ait trikrom boyalı kalp kesitinde, mavi boyalı fibrotik alan görülmektedir.

Yoğun kollajen ağı organizasyonu içerisinde az sayıda vasküler yapılanma (ok başları) ve hücresel içerik (oklar) dikkati çekmektedir.

4.3.1.2. iGKS-MKH Grubuna Ait Dokuların Masson'un Trikom Boyası Bulguları

PBS kontrol grubunda uygulandığı gibi, iGKS-MKH grubu sıçan kalplerinden de 10 µm'lik seri frozen kesitler alınıp, her 18-20 kesitte biri seçilerek, seçilen tüm bu kesitler Masson'un trikom boyası ile boyandı. Şekil 4.7'de bu dokulardan fibrotik alan görülen farklı düzeylerdeki kesitlere yer verilmiştir.

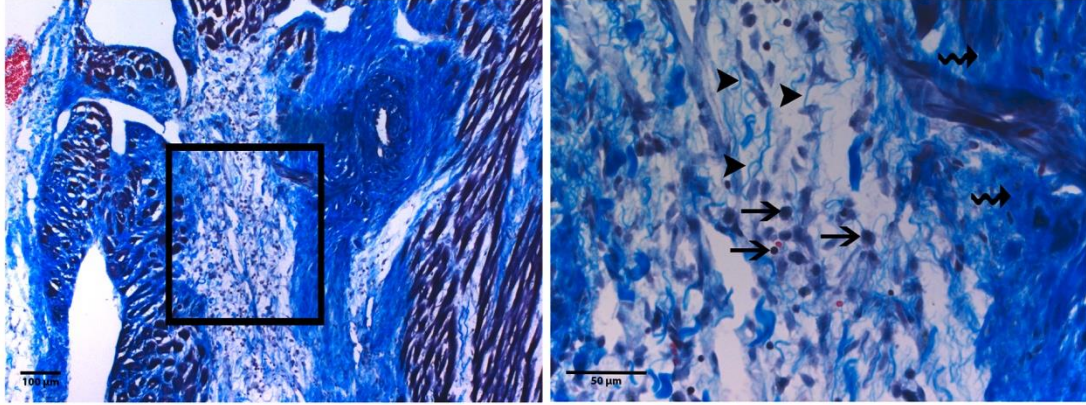


Şekil 4.7. Mİ sonrasında iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlardan birine ait kalp kesitlerinin, trikrom boyalı preparasyonları görülmektedir.

LAD ligasyonunun distalinde kalan kalp dokusunun farklı düzeylerinden alınan kesitlerde oklarla fibrotik alanlar gösterilmektedir.

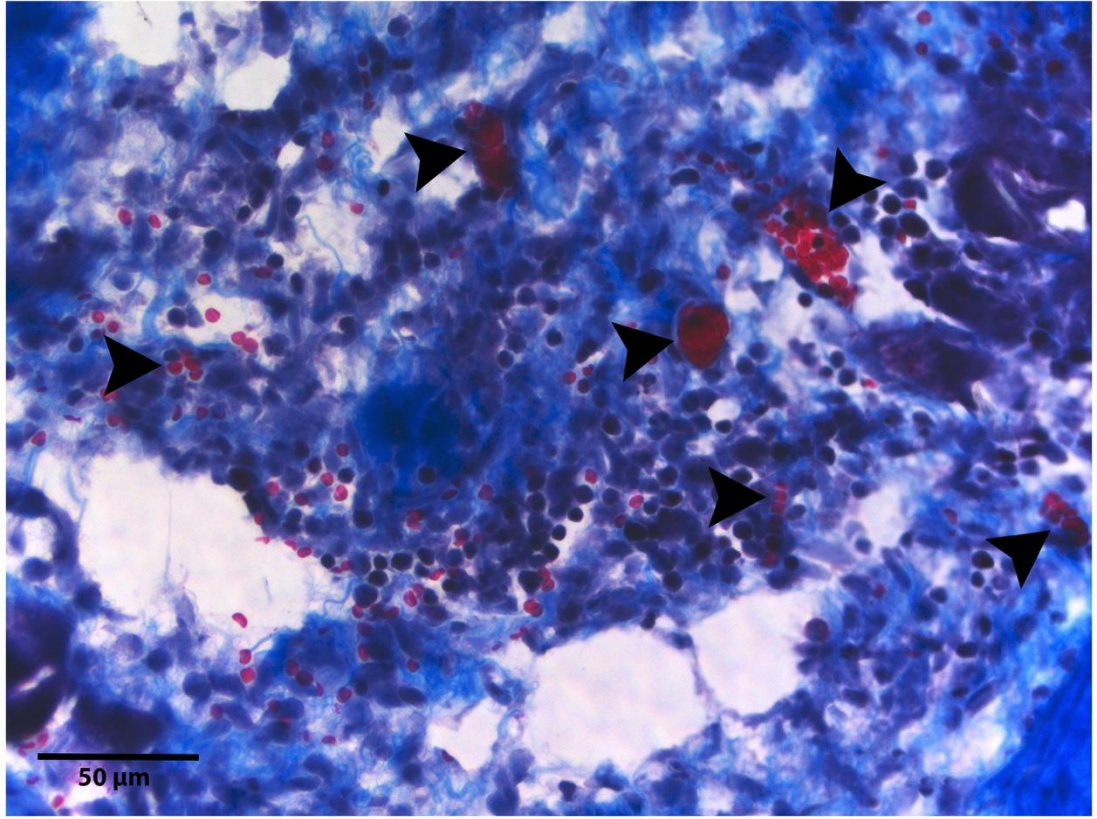
Bu preparasyonların ışık mikroskopik analizlerinde, mavi boyalı fibrotik alanların PBS kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, daha küçük olduğu ve sol ventrikül duvarında görece daha az bir harabiyete yol açtığı görüldü (Şekil 4.7).

Büyük büyütmelerde incelendiğinde fibrotik alanlarda, yer yer ince ve yer yer kalın kollajen lif demetlerinin yanı sıra, PBS kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücresel içeriğin ve gevşek bağ dokusu alanlarının daha fazla olduğu ve vaskülarizasyonun da nispeten daha yoğun olduğu görüldü (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.8. iGKS-MKH grubundan bir hayvanın trikrom boyalı kalp kesitinde, sağlam kardiyomiyositler arasındaki mavi boyalı fibrotik alanların küçük ve büyük büyütme mikrografları görülmektedir.

Sağdaki mikrograf, soldaki mikrografta siyah çerçeve ile sınırlandırılmış alanın büyük büyütme görüntüsüdür. Sağdaki mikrografta ince kollajen lif yapılarıyla (ok başları) belirgin bir gevşek bağ dokusu, kaba kollajen lif demetlerinden (kıvrık oklar) oluşan sıkı bağ dokusuyla komşuluk halindedir. Gevşek bağ dokusunda, bir kaç tanesi oklarla gösterilmiş olan çok sayıda yuvarlak şekilli hücre bulunmaktadır. Bar sırasıyla 100 µm ve 50 µm'dir.



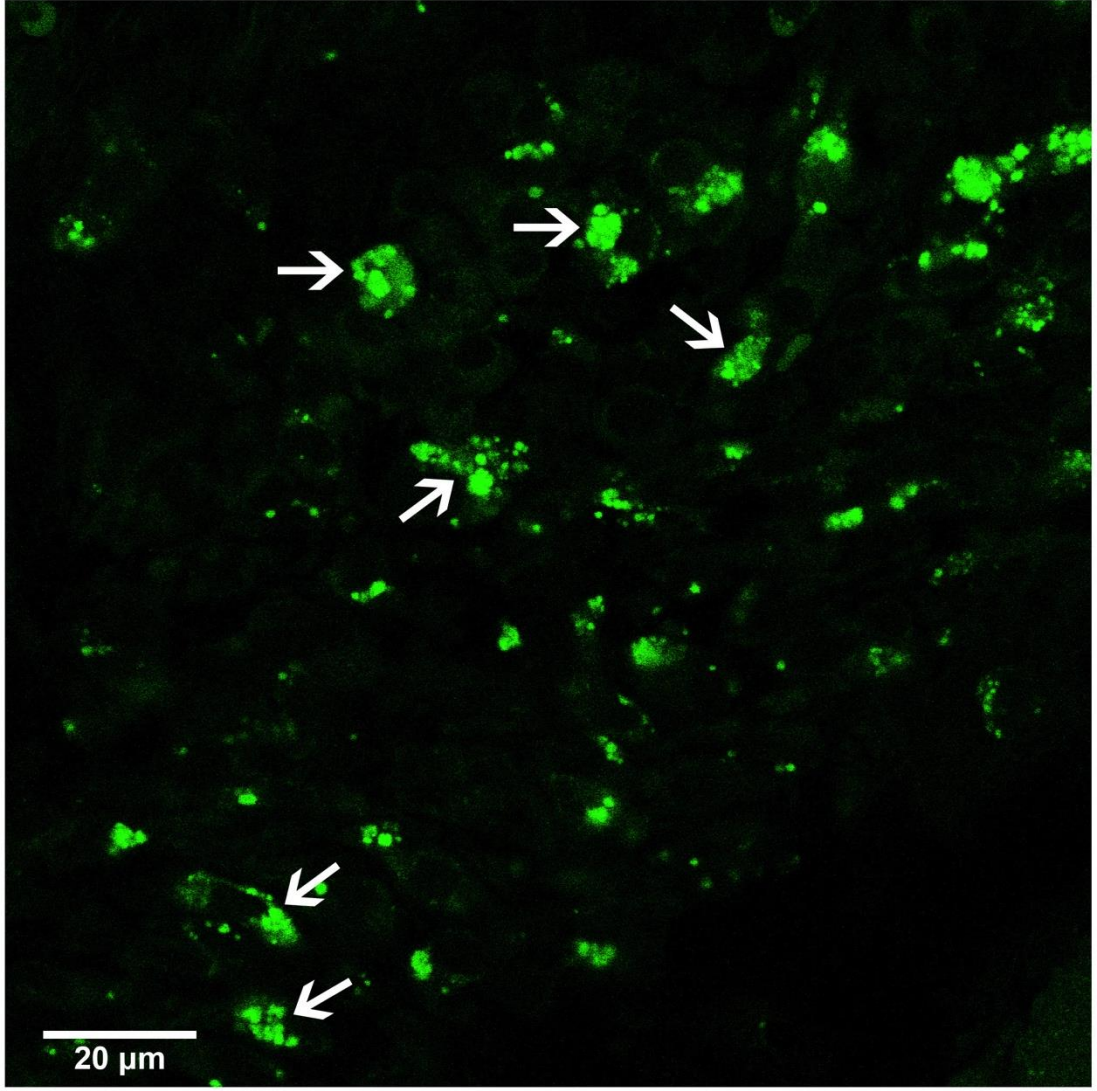
Şekil 4.9. iGKS-MKH grubundan bir hayvanın kalp kesitinin trikrom boyalı preparasyonu görülmektedir.

Fibrotik alanda içleri eritrositle dolu çok sayıda damar yapısı (ok başları) dikkati çekmektedir. Vasküler yapıların yanı sıra, alanda çok sayıda yuvarlak şekilli hücre infiltrasyonu görülebilmektedir.

Bu kesitlerdeki görülen hücrelerin tanımlanmasına yönelik ardışık kesitlerde ileri analizlere başvuruldu.

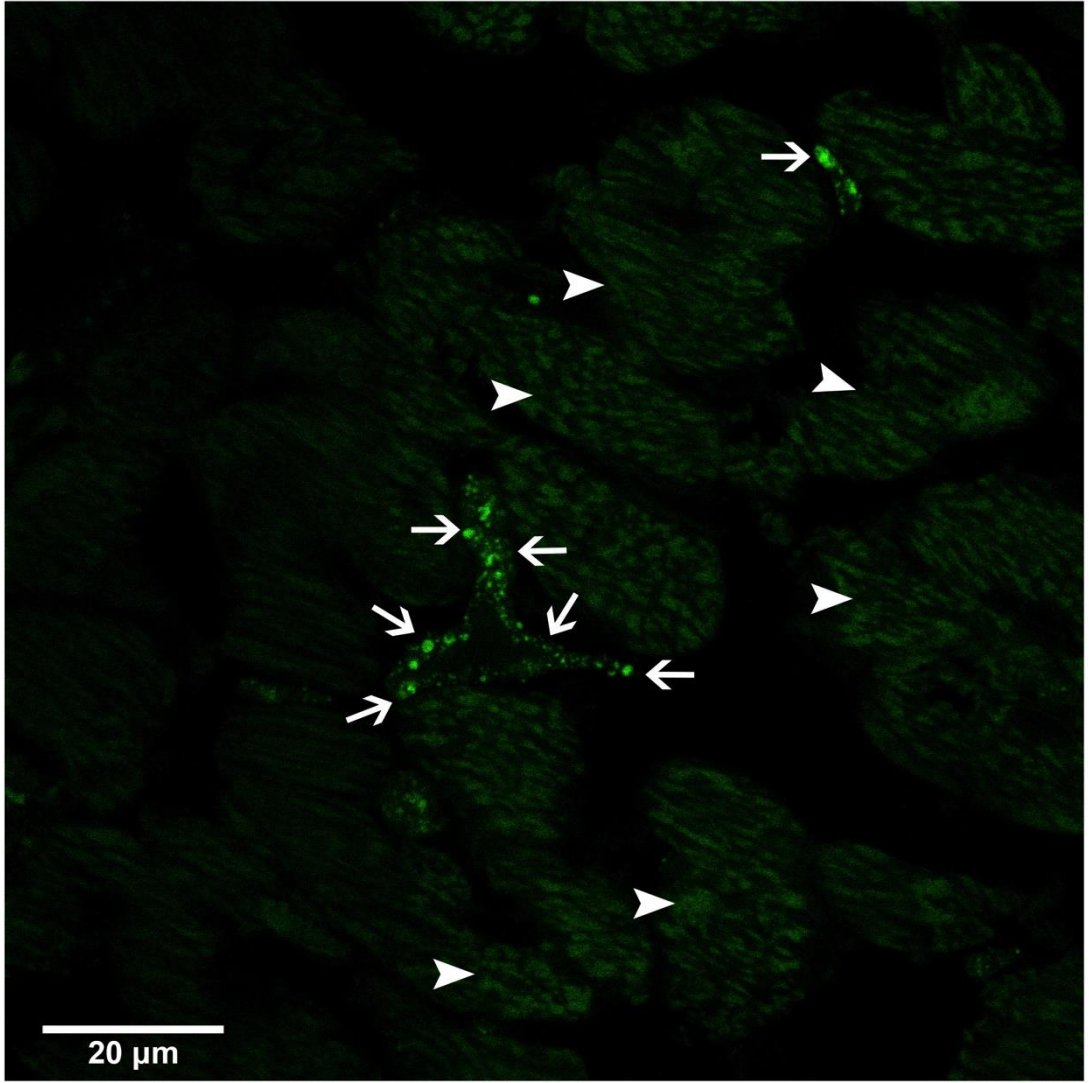
4.3.2. iGKS-MKH Grubuna Ait Dokuların Flüoresan İmmünohistokimyasal İnceleme Bulguları

iGKS-MKH grubundan sıçanların, fibrozis tespit edilen kalp düzeylerinden alınan ardışık kesitler konfokal mikroskopta incelendiğinde, çoğunlukla fibrotik alanda olmak üzere (Şekil 4.10), daha az miktarda da fibrozise komşu sağlam miyokard dokusu içerisinde (Şekil 4.11) yeşil fluoresan veren hücreler tespit edildi.



Şekil 4.10. iGKS-MKH grubundan bir sıçanın, fibrozis tespit edilen kalp düzeylerinden alınan ardışık kesitlerden birinin konfokal mikroskopta alınan mikrografı görülmektedir.

Fibrotik alanda, bir kaç tanesi oklarla gösterilen, yeşil sinyal veren çok sayıda hücre görülmektedir. Bu hücrelerin calcein AM ile işaretlenmiş iGKS-MKH olduğu düşünülmektedir.

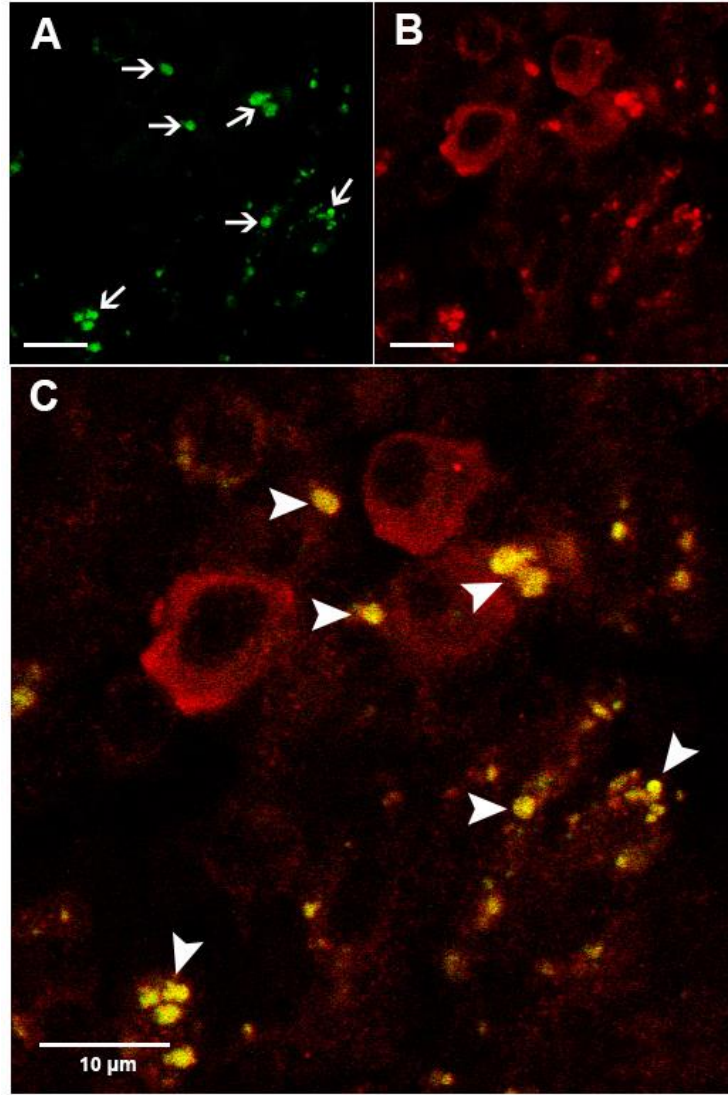


Şekil 4.11. iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlardan birine ait kalp kesitinin, Hoechst içeren kapatma mediumu ile kapatıldıktan sonra konfokal mikroskopla alınan görüntüsü görülmektedir.

İnfarkta komşu alanda, bir kısmı ok başları ile gösterilen sağlam miyokard dokusu otoflüoresans vermektedir. Bu dokuda sağlam kardiomyositler arasında yeşil sinyali ile, calcein AM yüklü olduğu düşünülen hücreler (oklarla işaret edilen alanlar) dikkati çekmektedir.

Bu hücrelerin nakil öncesinde calcein AM ile işaretlenmiş iGKS-MKH olduğu düşünüldü. Bunu doğrulamak için sadece insana özgü antijenlerle etkileşen Lamin A+C antikoruyla inkübe edilen kesitlerde yoğun fon boyanması nedeniyle sağlıklı bir değerlendirme yapılamadı. Ancak, yine sadece insana özgün antijene bağlanan

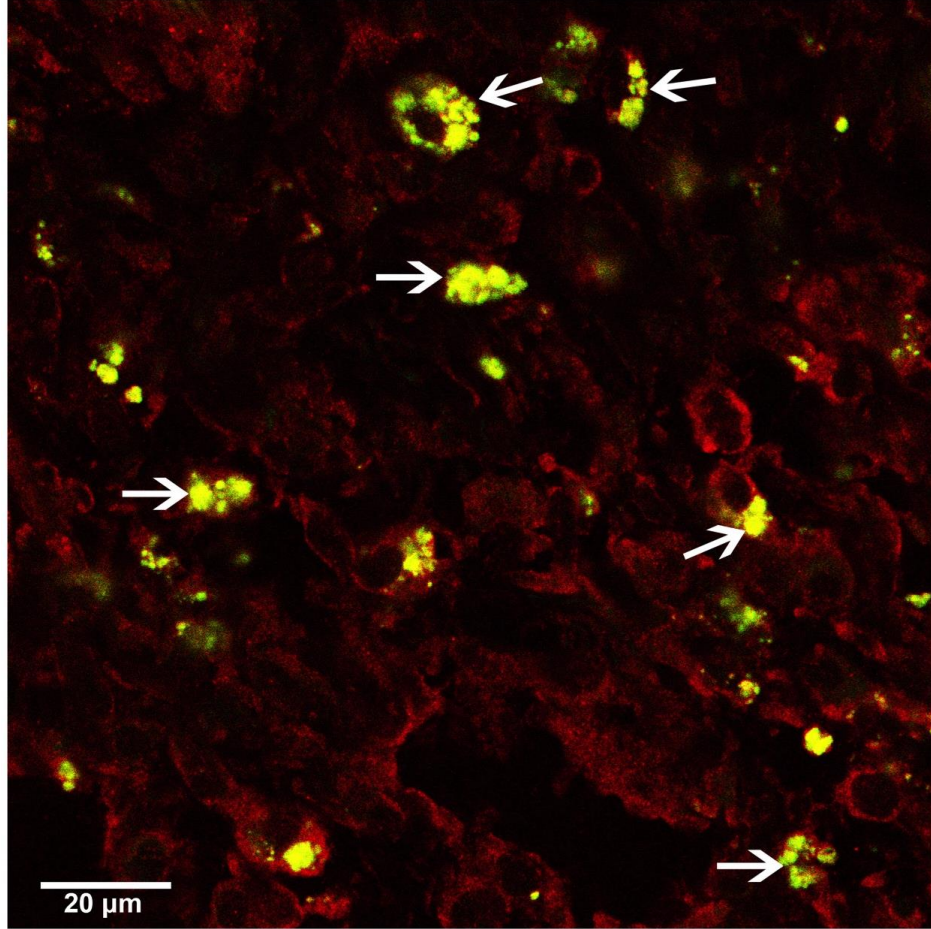
kardiyak troponin I antikoruyla yapılan inkübasyon sonrasında, yeşil flüoresan veren bu hücrelerin özellikle fibrotik alanda olanlarında kardiyak troponin I sinyalinin pozitif olduğu tespit edildi (Şekil 4.12). Bu veri bu hücrelerin nakledilen iGKS-MKH olduklarını doğrulamakla birlikte, bu hücrelerin kardiyak yönde bir farklılaşmaya gittiklerini de gösteren bir bulgudur.



Şekil 4.12. Yeşil sinyal pozitifliği gösteren hücrelerin bulunduğu fibrotik alanların ardışık kesitleri insana özgü kardiyak troponin I ile inkübe edilerek incelendi.

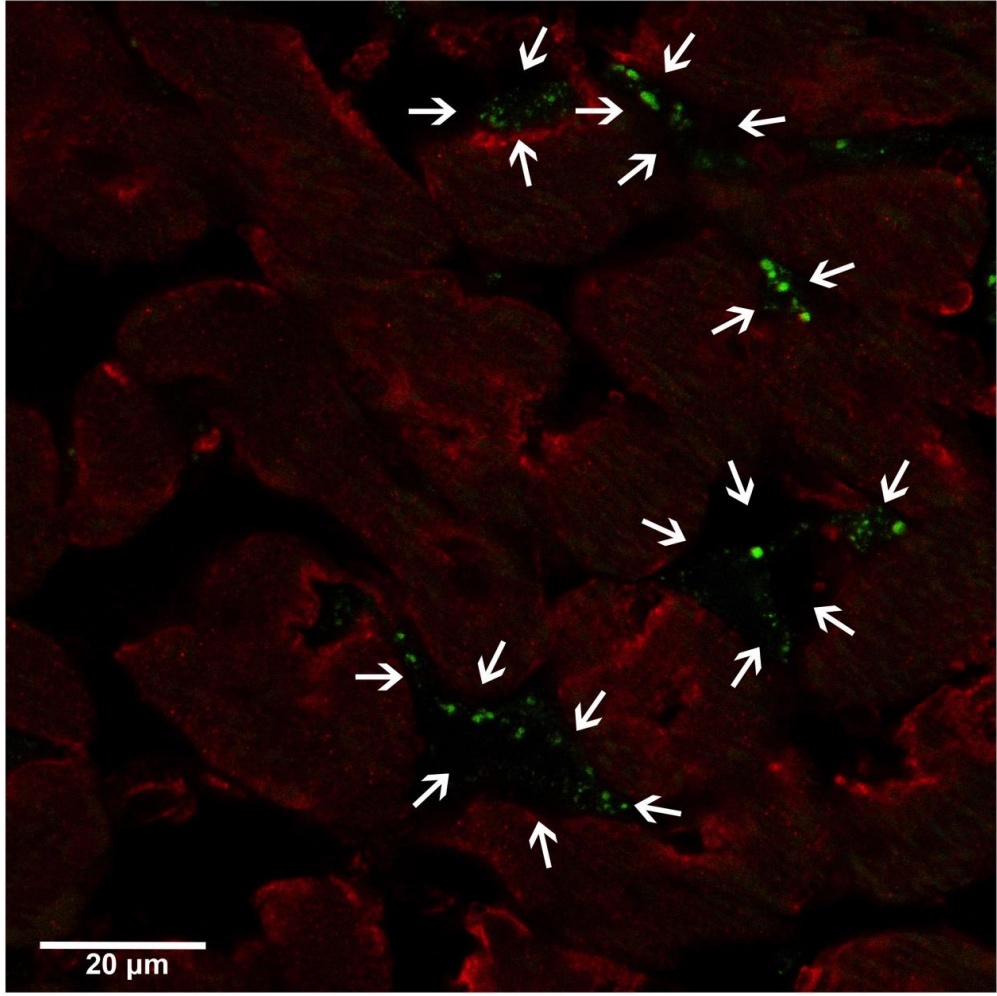
Bu kesitlerden birine ait mikrograf görülmektedir. Bu kesitte yine yeşil flüoresan veren ve calcein AM ile işaretli olduğu düşünülen hücreler tespit edildi (oklar bu sinyallerin bir kısmını işaret etmektedir) (A). Aynı alanda kardiyak troponin I (kırmızı sinyal) pozitifliği gösteren hücrelerin (B), yer yer calcein AM sinyali de içerdiği (ok başlarıyla gösterilen sarı renkli alanlar) (C) görülmektedir. Yeşil sinyal calcein AM, kırmızı sinyal Cy3 konjuge sekonderle inkübe edilen insana özgü kardiyak troponin I.

Dahası, ardışık kesitlerde alfa sarkomerik aktin antikoruyla yapılan inkübasyonlarda, fibrotik alanlarda yeşil flüoresan veren bu hücrelerin alfa sarkomerik aktin açısından da pozitif oldukları görüldü (Şekil 4.13). Bu veri de yine farklılaşmayı destekler bir bulgu olarak yorumlandı. İnfarkta komşu sağlam miyokardiyumda, kardiyomiyositler arasında yer alan ve yeşil flüoresan veren hücrelerin ise alfa sarkomerik aktin sentezlemediği tespit edildi (Şekil 4.14).



Şekil 4.13. Fibrozis ve hücre birikimi gösteren ardışık kesitlerde alfa sarkomerik aktinle inkübasyon sonrasına ait bir mikrogram görülmektedir.

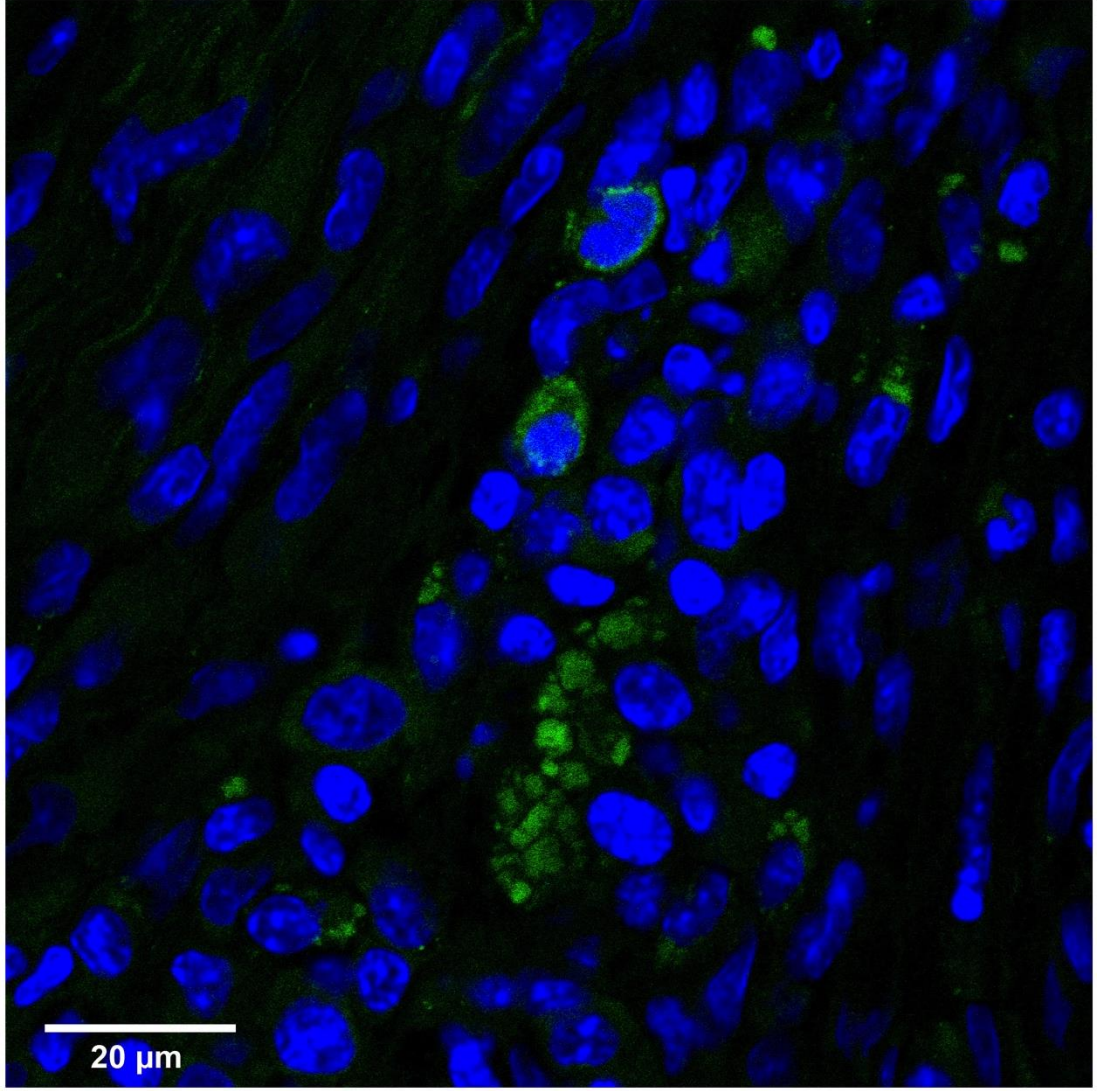
Alfa sarkomerik aktin pozitifliğinin (kırmızı sinyal) bazı alanlarda calcein AM sinyali ile çakıştığı (bir kısmının oklarla gösterildiği sarı sinyaller) görülmektedir. Kırmızı sinyal Cy3 konjuge sekonderle inkübe edilen alfa sarkomerik aktin.



Şekil 4.14. Yeşil flüoresan gösteren hücrelerin tespit edildiği fibrotik doku kesitlerinden, alfa sarkomerik aktinle inkübe edilen bir örneğe ait mikrogram görülmektedir.

Fibrotik alan komşuluğundaki sağlam dokuda kardiyomiyositler alfa sarkomerik aktin pozitifliği (kırmızı sinyal) gösterirken, bu hücreler arasında yer alan ve calcein AM pozitif olduğu düşünülen hücrelerin (oklarla sınırlandırılan alanlar) alfa sarkomerik aktini sentezlemediği görüldü. Yeşil sinyal calcein AM, kırmızı sinyal Cy3 konjuge sekonderle inkübe edilen alfa sarkomerik aktin.

Bazı kalp kesitlerinde ise fibrotik alanlardaki hücrelerin az bir kısmında yeşil flüoresan görülürken büyük bir kısmında ise sinyal alınamadı (Şekil 4.15). Yeşil flüoresan vermeyen bu hücreler, flüoresan etkinliğini kaybetmiş iGKS-MKH olabileceği gibi, sıçana ait bir hücresel infiltrasyon da olabilir. Bu bakımdan bu hücrelerin tanımlanmasına yönelik ilave analizler gerekmektedir.



Şekil 4.15. iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlardan birine ait kalp kesitinin konfokal mikrofrafı. Fibrotik alanda çok sayıda hücre görülmektedir.

Hücrelerin küçük bir kısmında yeşil sinyal görülürken, geri kalanlarında yeşil sinyal alınamamıştır. Yeşil sinyal sitoplazmik lokalizasyondaki calcein AM, mavi sinyal nükleusları belirlemek için kullanılan To-Pro3'ya aittir.

5. TARTIŞMA

İnsan göbek kordonu stromasından elde edilen mezenkimal kök hücreler (iGKS-MKH), birçok hücre tipine farklılaşma potensine sahip bir çeşit multipotent mezenkimal kök hücrelerdir. Farklılaşma potensileri ele alındığında, embriyonik/uPK hücreler ile erişkin kök hücreler arasında bir skalada yer aldığını söyleyebileceğimiz bu hücrelerin, invaziv olmayan biçimde ve kolay elde edilebiliyor olmaları, kullanım kolaylığı ve tedavi edici etkilerine yönelik ortaya konulmuş olumlu ve bazı durumlarda da diğer kök hücrelere göre üstün kabul edilebilecek özellikleri nedeniyle hücresel tedavi için iyi bir kaynak niteliğinde olduğu söylenebilir. Bu nedenle bu hücreler aslında güncel çalışmalar için bir ilgi odağı halindedir.

iGKS-MKH miyokardiyal yetmezlikle seyreden hastalıkların tedavisi amacıyla da etkinliği araştırılan kök hücrelerden biridir. Miyokardiyal yetmezliğin tedavisinde bu hücrelerin kullanıldığı, devam eden ya da tamamlanmış deneysel ve klinik çalışmalar bulunmaktadır. Ancak yine de miyokard hasarını tedavi amaçlı kullanımlarına yönelik yapılan gerek deneysel gerekse klinik çalışmaların sınırlı sayıda olduğu söylenebilir. Biz de bu çalışmamızla miyokardiyal yetmezliğin tedavisinde iGKS-MKH'nin kullanılmasına ilişkin deneysel çalışmalara katkıda bulunmayı hedefledik.

iGKS-MKH ile yapılan miyokardiyal onarım ve rejenerasyona ilişkin deneysel çalışmalar bu hücrelerin elde edilmesi, tanımlanması, özellikleri ve davranış biçimlerine ilişkin oldukça faydalı ve tutarlı bilgiler sunmaktadır. Bu deneysel çalışmalarda göbek kordonunun farklı kompartmanlarından elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda iGKS-MKH, kordonun tamamından herhangi bir bölge ayırmaksızın elde edilerek kullanılırken (55-60), bir kısım çalışmalarda ise insan göbek kordonu perivasküler hücreleri (iGK-PVH) (61, 62) ve subamniyotik alan mezenkimal kök hücreleri (iGK-SAMH) (63, 64) tedavi etkinlikleri açısından araştırılmıştır. Biz ise bu çalışmada vasküler yapıları

uzaklaştırdıktan sonra geriye kalan kordonun tamamından elde ettiğimiz stromal MKH'ni kullandık.

Bu deneysel çalışmaların her birinde kullanılan hücreler, MKH belirteçleri (56-64) açısından taranmıştır. Wu ve arkadaşları, elde ettikleri iGKS-MKH'nin CD29, CD44, CD90, CD105, CD166 ve MHC I belirteçlerini yüksek düzeyde ifade ederken, CD31, CD34, CD38, CD45, CD106 ve MHC II belirteçlerini ifade etmediklerini göstermişlerdir (56). Lilyanna ve ark. ile Martinez ve ekibi ise, akım sitometriyle incelediklerinde iGK-SAMH-GFP-Fluc hücrelerin MKH belirteçleri olan CD73, CD90 ve CD105'i %95'den daha fazla bir oranda ifade ettiklerini saptamışlardır. Ayrıca bu hücrelerin hemotopoyetik kök hücre (CD34, CD45 ve CD117) ve endotelial kök hücre (CD31) belirteçleri açısından negatif oldukları da teyit edilmiştir (63, 64). Li ve arkadaşları da elde ettikleri iGKS-MKH'nin yüksek düzeyde CD90 ve CD105 belirteçlerine karşın düşük düzeyde CD34 ve CD45 ifade ettiklerini tespit etmişlerdir (59). Benzer biçimde Zhang ve ekibi, Wharton peltesinde elde ettikleri hücrelerin, mezenkimal kök hücrelere özgü CD73, CD90 ve CD105 antijenleri açısından pozitif iken, CD14, CD31, CD34, CD45 gibi hematopoyetik ve endotel hücresi yüzey antijenleri ve ayrıca immün rejeksiyon ilişkili hücre yüzey belirteci HLA-DR açısından negatif olduklarını bildirmişlerdir (60). Bunun yanı sıra farklı kökenden hücrelere farklılaşma potensileri, osteojenik ve adipojenik (56, 57, 60, 63, 64) ve ayrıca kondrojenik (60, 63, 64) yönde kolayca farklılaşabilmeleriyle ortaya konulmuştur.

Donör hücrelerin hayvan kalplerinde varlığını gösterebilmek ve bu hücreleri takip edebilmek için çalışmaların bir kısmında, nakil öncesinde hücreler CM-DiI (carbocyanine 1,1'-dioctadecyl-1-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) (56, 58), BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) (57) ve GFP (green fluorescent protein) (62, 63) ile işaretlenmiştir. Bu çalışmada ise biz, yeşil renkte flüoresan etkinlik gösteren calcein AM ile hücreleri işaretledik ve bu sinyalin in vivo koşullarda 2-3 hafta süresince korunduğunu saptadık.

iGKS-MKH'nin kullanıldığı deneysel çalışmalarda, NIH nude immün yetmezlikli (63, 64) veya sağlıklı sıçan (56) kullanılan Mİ modelleri, NOD/SCID gamma null immün yetersiz (61, 62) ya da C57BL/6 farelerde oluşturulan fare Mİ

modelleri (55, 60), tavşan Mİ modeli (57, 59), minyatür domuz modeli (58) gibi farklı özellikte deney hayvanları ile Mİ modelleri oluşturulduğu görülmektedir. Sağlıklı sıçan Mİ modeli kullanılan çalışmada (56) ve tavşan Mİ modelinde (57) hücrel tedavi sonrasında hayvanlara immün süpresyon amacıyla siklosporin uygulandığını belirtmek gerekir. Bu çalışmamızda biz, deneysel Mİ modeli oluşturmak üzere erkek sıçanları kullandık ve herhangi bir immün süpresyon prosedürü uygulamadık. Mİ'ün ve komplikasyonlarının oldukça mortal süreçler olması nedeniyle gerek iGKS-MKH ve gerekse PBS grubundan çok sayıda hayvan girişim sırasında ya da girişimden çok kısa bir süre sonra öldü. Ancak ölüm oranları açısından iki grup arasında bir farklılık olmadığı için bu ölümlerin hücre uygulamasıyla ilgili bir rejeksiyondan kaynaklandığını düşünmemekteyiz.

Mİ tedavisine yönelik yapılan bu deneysel çalışmalarda, Mİ oluşturmak için, sol koroner arter (56, 59) veya onun bir dalı olan sol ön inen (LAD) koroner arter (55, 57, 58, 60-64) ligasyonu uygulanmıştır. Biz bu çalışmamızda mortaliteyi minimize ederek ölen hayvan sayısını azaltmak üzere yaygın bir infarkttan ziyade daha sınırlı bir alanda infarkt oluşturmayı hedefledik. Bu nedenle LAD koroner arteri orta kısmından kalıcı olarak bağladık.

Deneylerde kullanılan hayvanların çeşitliliğinin yanı sıra tedavi için uygulanan hücre dozları, uygulanma zamanları, uygulama yolları ve uygulama öncesi prosedürler açısından da oldukça farklı yaklaşımlar sergilenmiştir. Çalışmaları bu açıdan ele alacak olursak; Wu ve ark., Mİ'den 2 hafta sonra, CMDiİ işaretli 5×10^6 iGKS-MKH'ni 200 μ L PBS içerisinde süspanse ederek periinfarkt bölgeye enjekte etmiş ve nakilden 4 hafta sonra hayvanları sakrifiye etmişlerdir (56). Dayan ve ekibi ise Mİ'den 48 saat sonra, 200 μ L DMEM içerisinde süspanse ettikleri 2×10^6 iGK-PVH'ni kuyruk veninden intravenöz (İV) yolla uygulayarak, Mİ'den 16 hafta sonra da hayvanları sakrifiye etmiştir (61). Latifpour ve ark., tavşanlarda Mİ gerçekleştirdikten 1 saat sonra, BrdU işaretli 5×10^6 iGKS-MKH'ni 50 μ L PBS içerisinde süspanse ederek subepikardiyal enjeksiyonla periinfarkt alana uygulamış ve hücre naklinden 30 gün sonra da hayvanları sakrifiye ederek kalp dokularını toplamıştır (57). Zhang ve ark., minyatür domuzda Mİ oluşturduktan sonra, CMDiİ işaretli 4×10^7 adet iGKS-MKH'ni 2 mL PBS içerisinde süspanse ederek, enfarkt

çevresindeki 9-10 bölgeye, her bir bölgeye 0,2 mL olacak şekilde enjekte etmişler ve girişimden 6 hafta sonra hayvanları sakrifiye etmişlerdir (58). Yannarelli ve ekibi, Mİ indüksiyonundan 15 dk. sonra, GFP ile işaretlenmiş $0,5 \times 10^6$ iGK-PVH'ni 50 μ L PBS içerisinde süspanse edip infarkt sınırına enjekte ederken, 200 μ L PBS içerisindeki aynı dozda hücreyi bir de kuyruk veninden İV yolla uygulamış; Mİ'den 14 gün sonra da hayvanları sakrifiye etmiştir (62). Nascimento ve ark., LAD koroner arter ligasyonundan sonra 20 μ L %5 BSA/PBS içerisindeki 2×10^5 iGKS-MKH'ni, 4 bölgeye intramiyokardiyal enjeksiyon yoluyla uygulamış ve cerrahiden 14 gün sonra hayvanları sakrifiye etmişlerdir (55). Li ve ark. ise çalışmalarında (59) iGKS-MKH ile insan kordon kanı CD34⁺ hücrelerinin kotransplantasyonun Mİ üzerine etkilerini araştırdıkları için, Mİ'den 4 hafta sonra Mİ oluşturdıkları tavşan modellerinden bir gruba sadece PBS içerisinde süspanse ettikleri 5×10^6 iGKS-MKH, diğer bir gruba ise yine PBS içerisinde süspanse ettikleri 5×10^6 iGKS-MKH ve 5×10^5 /kg CD34⁺ hücre kombinasyonunu infarkt sınırında 4 bölgeye enjekte ederek uygulamışlardır. Nakilden 4 hafta sonra da hayvanları sakrifiye etmişlerdir (59). Zhang ve ark., H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile ön koşullanmanın iGKS-MKH'nin Mİ tedavisindeki teröpatik potansiyelleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Bunun için, LAD ligasyonundan 3 saat sonra, bir gruba ön koşullanma yapılmış 1×10^6 adet iGKS-MKH'ni, diğer bir gruba da ön koşullanma yapılmamış aynı sayıda iGKS-MKH'ni kuyruk veninden uygulamış ve 28 gün sonra da hayvanları sakrifiye etmişlerdir (60). Hücrelerin uygulanma biçimine ilişkin başka bir örnek de greft uygulamaları olup, geri kalan iki çalışma (63, 64) da bu yönleriyle diğerlerinden farklıdır. Lilyanna ve ark., çalışmalarında GFP ve firefly luciferase ile işaretlenen iGK-SAMH'ni (iGKSAMH-GFP-Fluc) kullanmış ve Mİ'den 2 hafta sonra, 2×10^6 adet hücre içeren greftleri skar alanı üzerine uygulamışlardır (64). Martinez ve ekibi ise, $1,5 \times 10^4$ adet iGKSAMH-GFP-Fluc içeren anjiyogenik küreler üretilip bu kürelerin her birinin etrafını 2×10^3 miktarında HUVEC ile kaplamışlardır. Daha sonra 150 anjiyogenik küre yani $2,25 \times 10^6$ iGKSAMH-GFP-Fluc ve 3×10^5 HUVEC içeren greftler üretilip, Mİ'den 2 hafta sonra skar dokusu üzerine bu greft yapısı implante edilmiştir (63). Çoğu çalışmayla tutarlı bir biçimde bu çalışmamızda biz, 250 μ L PBS içerisinde süspanse ettiğimiz, calcein AM işaretli $2,2 \times 10^6$ hücreyi tek bir bölgeden infarkt sınırına enjekte ettik. Mortalitesi yüksek cerrahi prosedürleri

tekrarlamamak ve ayrıca iyileşmenin erken dönemini değerlendirebilmek için, iGKS-MKH ve PBS tedavilerini, enfarktüsü intraoperatif olarak doğrular doğrulamaz uyguladık ve sakrifikasyonu da girişimden sonraki 3. haftada gerçekleştirdik.

Hücrelerin veriliş yollarından İV infüzyon, lokal uygulamalarla karşılaştırıldığında; insan Alu sekansının Real-Time PCR analizi, hücre infüzyonundan 24 saat sonra çoğu hücrenin akciğerde tuzaklandığını göstermiştir (61, 62). Ayrıca Yannarelli ve ark., iGK-PVH'ni intramiyokardiyal uyguladıklarında kardiyak fonksiyonların iyileştiğini kaydederken, aynı dozda hücreyi İV yolla verdiklerinde kardiyak fonksiyonlarda hiçbir düzelme görmemişlerdir (62). Bu uygulama yollarına ilişkin veriler doğrultusunda lokal uygulamaların sistemik uygulamalara göre daha avantajlı olduğunu düşündüğümüz için hücre tedavisini intramiyokardiyal olarak lezyon sınırına uygulamayı tercih ettik.

Mİ indüksiyonundan önce ve sonrasında kardiyak işlevlerin değerlendirilmesi için ekokardiyografik incelemeler yapılmış ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (LVEF), sol ventrikül diyastol sonu çapı (LVEDD), sol ventrikül sistol sonu çapı (LVESD), sol ventrikülün fraksiyonel kısalması (LVFS) ve sol ventrikül duvar kalınlığı gibi miyokardiyal fonksiyonları ve hasarı yansıtan parametreler incelenmiştir. Ekokardiyografik analizler sonucunda, iGK-PVH'nin kısa dönemde kalp fonksiyonlarını iyileştirdiği ve uzun dönemde de kardiyak yeniden yapılanmayı azalttığı ortaya konmuştur (61). İnsan göbek kordonu mezenkimal kök hücreleriyle yapılan diğer deneysel çalışmalarda da sonuçlar benzer biçimde, Mİ sonrası hücresel tedavi uygulamanın sol ventrikül fonksiyonlarını iyileştirdiği yönündedir (55-60, 62-64). Bizim çalışmamızda ise hayvanlardan bir kısmına Mİ öncesinde ve sakrifikasyondan önce transtorasik ekokardiyografik inceleme yapılmıştır. Bu incelemeyle LVEDD ile LVEF değerleri tespit edilerek duvar hareketlilikleri karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar diğer çalışmalarinkilerle tutarlıydı. Mİ sonrasında iGKS-MKH ile tedavinin, LVEF değerinde ve duvar hareket bozukluğunda iyileşme sağladığını tespit ettik.

Elde edilen doku kesitlerinin immünohistokimyasal ve histokimyasal incelemelerinde ise, donör hücrelerinin varlığı ve in situ davranışları, kalp

dokularındaki apoptoz, vaskülarizasyon düzeyleri, skar alanının boyutları gibi bir takım özellikler incelenmiştir.

Nakil öncesi yapılan işaretlemeler kullanılarak, donör hücrelerinin infarkt bölgesinde gösterildiği çalışmalarla (56-58, 62, 63) benzer biçimde biz de, iGKS-MKH grubundan elde ettiğimiz kalp dokularının lezyonlu ve lezyona komşu bölgelerinde calcein AM ile işaretli iGKS-MKH'nin varlığını tespit ettik.

Deneyisel çalışmalardaki histopatolojik analizler sonucunda, infarkt alanlarındaki donör hücrelerinin, kardiyomiyosit belirteci olan cTnT (cardiac troponin T), troponin I, F-aktin (filamentous actin) ya da endotelial bir belirteç olan vWF (von Willebrand factor) açısından pozitif oldukları tespit edilmiştir (56-58). Yine bu hücrelerde α -SMA (α -smooth muscle actin; α -düz kas aktini) açısından pozitiflik de gözlenmesi (56, 63) üzerine, bu hücrelerin kardiyak rejenerasyona katılan kardiyomiyosit, vasküler yapılanmaya katılan düz kas hücreleri ve endotel hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahip olduğu yorumu yapılmıştır (56). Bizim çalışmamızda iGKS-MKH nakledilen sıçanlara ait kalp kesitlerinde, calcein AM sinyali aldığımız hücrelerin bir kas belirteci olan α -sarkomerik aktin ve kardiyak troponin I pozitifliği göstermesi de kardiyomiyojenik farklılaşmayı destekler bulgulardır. İnfarkt alanlarının analizinde, iGKS-MKH'den farklılaşan kardiyomiyositlerin connexin 43 sentezleyerek, daha önceden var olan yerleşik (host) kardiyomiyositlerle aralarında nekuslar oluşturdukları gözlenmiştir (57, 58). Kardiyak yönde farklılaşmalarının yanı sıra, donör hücrelerinin yerleşik kardiyak kök hücreleri uyardığı ve farklılaşmalarını düzenlediği ve ayrıca yerleşik kardiyomiyositlerin de proliferasyonunu uyardığı ortaya çıkarılmıştır (58).

Hücre naklinden sonra nekrotik kalp dokusunda ve infarkt çevresinde damar yoğunluğunun belirgin düzeyde arttığı (55, 56, 58, 59, 62-64) ve dahası nakledilen bazı iGKS-MKH'nin vasküler yapılarda yer alarak anjiyogeneze katıldığı gözlenmiştir (56, 63). Ayrıca nakledilen iGKS-MKH'lerinin iskemik miyokardiyumda VEGF salgıladığı ve teröpatik yeniden damar oluşumuna katıldığı ortaya konmuştur (56).

Mİ sonrasında, göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri ile tedavinin skar boyutunu küçülttüğü (57-59, 63, 64) ve infarkta komşu alanlarda apoptotik hücre sayısını azalttığı tespit edilmiştir (55, 56, 58, 61). Bizim çalışmamızda infarkt alanı analizleri için yapılan TTC testi sonuçlarında da diğer çalışmalarla benzer biçimde, iGKS-MKH ile tedavinin infarkt boyutlarını küçülttüğü gözlemlendi.

Dayan ve ark., Mİ sonrasında iGKS-MKH uygulamasının, dolaşımda bulunan ve ayrıca kardiyak dokuyu infiltre eden anti inflamatuvar monosit/makrofajları artırdığını, bununla ilişkili olarak da infarkt dokusunda proinflamatuvar sitokinler azalmışken anti inflamatuvar sitokinlerin arttığını tespit etmişlerdir (61). Bu bulgu iGKS-MKH'nin immün modülatör özelliklerini destekler nitelikteki önemli bir bulgudur.

Li ve ark., Mİ modeli oluşturdukları tavşanların bir kısmını sadece iGKS-MKH'ni naklederek, bir kısmına da insan göbek kordonu kanından elde ettikleri CD34⁺ hücrelerle iGKS-MKH'ni birlikte naklederek (kotransplantasyon) tedavi etmişlerdir. Tedaviye yanıtları karşılaştırdıklarında kalbin işlevlerinde iyileşmenin, infarkt alanındaki küçülmenin ve vaskülarizasyonun, iGKS-MKH'nin CD34⁺ hücrelerle birlikte uygulandığında daha belirgin olduğunu tespit etmişlerdir (59). Ayrıca cTnI (cardiac troponin I) pozitif hücreleri infarkt çevresinde sadece kotransplantasyon grubunda tespit etmeleri üzerine, bu yöntemin kardiyomiyojenik farklılaşmayı uyurabileceği yorumunu yapmışlardır (59).

Zhang ve ark., in vitro oksidatif ön koşullanan iGKS-MKH'nin infarktüs bölgesindeki oksidatif strese daha iyi uyum sağlayacağı ve böylece teröpatik etkilerini daha da arttıracığı şeklindeki hipotezlerinden yola çıkarak, Mİ oluşturdukları farelerin bir kısmına H₂O₂ ile ön koşullanan iGKS-MKH'ni diğer bir gruba da ön koşullanma yapılmayan iGKS-MKH'ni nakletmişlerdir (60). Bu iki grubun verilerini karşılaştırdıklarında, ön koşullanan iGKS-MKH ile tedavi edilen farelerde kardiyak fonksiyonların ve mikrovasküler yoğunluğun belirgin düzeyde daha iyi olduğu, fibrozisin ise yine belirgin olarak daha hafif olduğunu tespit etmişlerdir (60).

iGKS-MKH'nin yalın uygulamalarının yanı sıra, Li ve ark.'nın yaptığı çalışmada olduğu gibi kotransplantasyon modellemeleri (59) ya da Zhang ve ark.'nın çalışmalarında olduğu gibi hücreyi infarkt mikroçevresine adapte etmeye yönelik uygulamalar (60) tedavi etkinliğini artırıyor gibi görünmektedir. Bu nedenle iGKS-MKH'nin bu tip modellerle kullanıldığı daha çok sayıda çalışmayla bu olumlu bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak Mİ modelleriyle yapılan bu deneysel çalışmalarla benzer bir biçimde iGKS-MKH ile yapılan tedavinin klinik düzelmeye ve mikroskopik düzeyde iyileşmeye katkıda bulunduğunu, bu iyileşme sürecinde iGKS-MKH'nin kardiyak yönde farklılaşabildiğini gözlemledik. Birbiriyle tutarlı bu deneysel çalışma sonuçlarının daha çok sayıdaki deneysel çalışmalarla ve ayrıca klinik çalışmalarla da desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

Sıçan Mİ modelinde, PBS uyguladığımız kontrol ve iGKS-MKH uyguladığımız hücresel tedavi gruplarını karşılaştırdığımız ve bu şekilde iGKS-MKH'nin tedavi edici etkilerini araştırdığımız bu çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları şu şekilde özetleyebiliriz;

- Ekokardiyografik incelemeler sonucunda, Mİ sonrası iGKS-MKH ile tedavinin kardiyak fonksiyonları iyileştirdiği görüldü.
- TTC testiyle yapılan analizler sonucunda, PBS kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlarda infarkt alanının azaldığı tespit edildi.
- Masson'un trikrom boyalı preparasyonlar incelendiğinde, iGKS-MKH ile tedavi edilen sıçanlarda fibrotik alanın daha sınırlı olduğu ve PBS kontrol grubuyla karşılaştırıldığında fibrotik alandaki hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu görüldü.
- Konfokal mikroskopik analizlerde, nakledilen hücrelerin daha çok lezyonlu alanda ve bir miktarda lezyona komşu sağlam alanlarda varlığını sürdürdüğü gözlemlendi.
- İleri analizlerde bu hücrelerin kardiyak troponin I ve alfa sarkomerik aktin gibi kardiyak yönde farklılaştıklarını gösteren proteinleri sentezledikleri görüldü.

Elde ettiğimiz tüm bu bulguların sonucunda, Mİ sonrasında iGKS-MKH ile tedavinin, kalbin işlevlerinde iyileşme sağladığını, miyokard kaybını azalttığını ve kardiyak onarımı düzenlediğini düşünüyoruz.

ÖZET

Sıçanda Miyokardiyal İskemi Sonrası Doku Onarımında İnsan Göbek Kordonu Stroması Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Tedavi Edici Etkisinin Araştırılması

Miyokard infarktüsü (Mİ) mortalitesi ve morbiditesi oldukça yüksek olan yaygın bir sağlık problemidir. Güncel farmakolojik ve girişimsel tedavi yaklaşımları sağ kalımı ve hastanın yaşam kalitesini artırmakla birlikte temel sorun olan kardiyak doku kaybını düzeltmemektedir. Bu temel sorunun çözümüne yönelik Mİ tedavi uygulamalarında, rejeneratif özellikleri nedeniyle, kök hücreler hedef haline gelmiştir. Mİ tedavisinde kemik iliği mezenkimal kök hücreleri başta olmak üzere, iskelet kası miyoblastları, adipoz doku mezenkimal kök hücreleri, embriyonik kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler, kardiyak kök hücreler gibi çok sayıda farklı kök hücre tipi denenmiştir ve denenmektedir.

Bir tür multipotent kök hücre olan göbek kordonu stroması mezenkimal kök hücrelerinin, farklılaşma potensileri, elde edilmelerindeki ve kullanımlarındaki kolaylıklar, immün modülasyon gibi, tedavide diğer kök hücrelere göre üstün kabul edilebilecek özellikleri nedeniyle bu çalışmamızda sıçan Mİ modellerinde insan göbek kordonu stroması mezenkimal kök hücrelerinin tedavi edici etkisi araştırıldı.

Deney modeli oluşturmak için sağlıklı 32 adet sekiz haftalık, 200-250 g ağırlığında, erkek, Wistar türü albino sıçanlar kullanıldı. Mİ oluşturmak üzere LAD koroner arteri orta kısmından kalıcı olarak bağlanan sıçanlar rastgele, PBS ve iGKS-MKH tedavisi verilen deney grupları olmak üzere iki gruba ayrıldı. Mİ, miyokardiyumdaki bölgesel soluklaşma ve hareket bozukluğu ile görsel olarak teyit edilir edilmez, PBS grubu sıçanlara sadece 250 µL PBS, iGKS-MKH grubuna ise yeşil flüoresan etkinliğe sahip calcein AM ile işaretlenerek 250 µL PBS içerisinde süspanse edilmiş $2,2 \times 10^6$ iGKS-MKH intramiyokardiyal enjeksiyon yapılarak uygulandı.

PBS grubundan yaşayan 8 adet sıçan ve iGKS-MKH grubundan yaşayan 8 adet sıçan, Mİ ve PBS ya da hücre uygulamasını takip eden 3. haftada sakrifiye edildi. Sakrifikasyondan önce PBS grubundan 6, iGKS-MKH grubundan 3 sıçana EKO değerlendirmesi yapıldı. Kalp fonksiyonlarının değerlendirilmesi için yapılan EKO incelemesinde LVEDD, LVEF parametreleri ölçüldü ve duvar hareket anormallikleri değerlendirildi. Sakrifikasyonu takiben PBS grubundan 4, iGKS-MKH grubundan 7 sıçanın kalbi TTC ile boyandıktan sonra dilimlenerek fotoğraflandı ve Image J bilgisayar programı yardımı ile $100 \times$ infarkt alan/tüm alan eşitliği ile infarkt alanları oransal olarak hesaplandı. Toplanan tüm kalp dokularının seri frozen kesitleri alındıktan sonra, belli aralıklarla bu kesitlerden bir kısmına trikrom boyaması yapıldı ve ardından ışık mikroskobu altında fibrotik alanlar değerlendirildi. Ayrıca hücre tedavisi uygulanan gruptan hayvanların kalp dokusu seri frozen kesitlerinde, nakilden önce calcein AM ile işaretlenmiş iGKS-MKH'nin varlığı, yeşil calcein sinyali ya da insana özgü antijenlerle etkileşen anti-lamin A+C antikoru kullanılarak araştırıldı. Bunun yanı sıra kardiyomiyojenik farklılaşmayı tespit edebilmek için yine seri frozen kesitlerde alfa sarkomerik aktin ve sadece insana özgü antijenlerle etkileşen kardiyak troponin I antikorlarıyla işaretlemeler yapılarak kesitler konfokal mikroskopta incelendi.

EKO değerlendirmesi sonucunda, PBS grubuyla karşılaştırıldığında, iGKS-MKH grubunun LVEF değerinin belirgin olarak iyileştiğinin ($p=0,037$) tespit edilmesi; yine PBS grubunun sol ventrikülünde akinezi izlenirken iGKS-MKH grubunda ise hipokinezi tespit edilmesi hücre tedavisiyle sağlanan fonksiyonel iyileşme lehine bulgulardır.

İnfarkt alanı ölçümlerine göre, Mİ ve hücre uygulamasından 3 hafta sonra yapılan değerlendirmede, iGKS-MKH grubunda infarkt alanının PBS grubununkine göre belirgin olarak azaldığı ve bu azalmanın anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,006$).

Kalp kesitlerinin TK boyalı preparasyonlarında, PBS kontrol grubunda fibrotik alanların daha yaygın olduğu ve bu alanların da yoğun kollajen ağı içerdiği gözlemlendi. Hücre ile tedavi edilen gruplarda ise, fibrotik alanların daha sınırlı olduğu ve PBS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu alanların kollajen liflerin yanı sıra hücreden ve vasküler yapılardan daha zengin olduğu tespit edildi. TK prosedürü

uygulanan kesitlerin diğ er serileri konfokal mikroskopta incelendiğ inde ise,  oğ unlukla fibrotik alanda olmak üzere yer yer de fibrozise kom  u alanlarda yeşil sinyal pozitifliğı gösteren hücreler tespit edildi. Nakil öncesinde calcein AM ile işaretlenen hücreler olduğı d    n len bu hücreler ileri analiz edildiğ inde, bir kısmının insana özgü antijenlerle etkileşen kardiyak troponin I pozitifliğı g sterdiğı ve yine bu hücrelerin alfa sarkomerik aktin açısından da pozitif olduğı tespit edildi.

Tüm bu veriler birlikte ele alındığında, iGKS-MKH ile tedavinin, M  sonrasında infarkt boyutlarını azalttığı, miyokardiyal faklılaşma göstererek onarım sürecine katıldığı ve kalp fonksiyonlarında iyileşmeye katkıda bulunduğı söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Miyokard infarktüsü, insan göbek kordonu stroması mezenkimal kök hücreleri, kök hücre tedavisi, kardiyak rejenerasyon

SUMMARY

Investigating The Therapeutic Effects of Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stromal Stem Cells in Tissue Repair After Myocardial Ischemia in Rats

Myocardial infarction (MI) is a worldwide health problem with a high mortality and morbidity. Current pharmacological and interventional treatment approaches increase survival and improve life quality of patient, but fails to prevent cardiac tissue loss that constitute essential problem of MI. In the treatment applications of MI as an approach for solution of this essential problem, stem cells have been under the focus because of their regenerative characteristics. In treatment of MI, primarily bone marrow mesenchymal stem cells and number of various stem cell types have been experienced such as skeletal muscle myoblasts, adipose tissue mesenchymal stem cells, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells and cardiac stem cells.

In the present study, due to their characteristics, which can be considered as superiority in treatment compared to the other stem cells such as convenience in their isolation and usage, differentiation potency and immune modulation, we investigated the therapeutic effects of human umbilical cord stroma derived mesenchymal stem cells (hUC-MSC), a kind of multipotent stem cell, in the rat MI model.

In order to create an experimental MI model, 32 healthy, 8-week old, weighing 200-250 g, male Wistar albino rats were used in this study. MI is carried out by a permanent ligation of LAD coronary artery at middle portion and confirmed visually by direct observation of regional myocardial paleness and disruption in contractility. Then, rats were randomly assigned to two groups as PBS group and hUC-MSC treatment group. PBS group was injected only with 250 μ L PBS into the infarct border zone, whereas the hUC-MSC group was injected with 2.2×10^6 hUC-MSC suspended in 250 μ L PBS, intramyocardially into the infarct border zone. Before transplantation, hUC-MSC was labeled with calcein AM, a green fluorescent molecule.

Eight surviving rats from each PBS and the hUC-MSC groups were sacrificed at 3rd weeks after MI and PBS or cell transplantation. Before the rats were sacrificed, 6 rats from the PBS group and 3 rats from the hUC-MSC group were taken into echocardiographic examination for the evaluation of heart functions. By the echocardiographic examination, left ventricle end diastolic diameter (LVEDD) and left ventricle ejection fraction (LVEF) was calculated and wall motion abnormalities were evaluated. After the rats were sacrificed, hearts of 4 rats from the PBS group and 7 rats from the hUC-MSC group were stained with triphenyl tetrazolium chloride (TTC), and sliced to be observed microscopically. By using Image J Software, infarcted areas were calculated proportionally based on $100 \times \text{infarcted area/all areas on photographed heart slice}$. After getting frozen cross-sections series of all harvested heart tissues, some of these sections with a determined interval were stained with trichrome for evaluation of fibrotic areas using light microscope. Moreover, in serial frozen cross-sections of heart tissues of animals from the cell treatment group, existence of the hUC-MSC transplanted after the incubation with calcein AM was investigated by either using green calcein signal or using human-specific anti-lamin A+C antibody. Additionally, to identify the cardiomyogenic differentiation of these cells, serial frozen cross-sections were incubated with α -sarcomeric actin and human-specific cardiac troponin I antibodies and then examined in the confocal microscope.

As a result of the echocardiographic evaluation, it was determined that the hUC-MSC group's LVEF value has improved remarkably in comparison with the PBS group ($p=0,037$); whereas akinesia of the PBS group persisted on the left ventricles. Hypokinesia was determined in the hUC-MSC group; these observations suggest that there has been functional recovery through cellular treatment.

According to the measurements of the infarcted area, evaluated 3 weeks after the MI induction and cell transplantation, it was determined that infarct area in the hUC-MSC group was notably reduced in comparison with the PBS group and this reduction was found statistically significant ($p=0,006$).

By the evaluation of trichrome stained preparations of the heart cross-sections, it was observed that fibrotic areas in the PBS control group were more

extensive, and these areas were found containing dense collagen network. Concerning the group administered cell treatment, it was determined that fibrotic areas were more limited; and when it is compared with the PBS control group, these areas were found rich in cell and vascular structures as well as collagen fibers. When other cross-sections that consecutive series of trichrome stained sections, are examined on the confocal microscope, there were cells, exhibiting green-signal positivity, determined in mostly fibrotic areas as well as partly in the fibrosis-neighboring areas. When these cells, that are considered as the ones labeled with the calcein AM before the transplantation, are further analyzed, it was determined that a part of them were expressing human specific cardiac troponin I; and again that these cells were positive for α -sarcomeric actin too.

Taken together, it can be concluded that the treatment of hUC-MSC has reduced infarct size after the MI, contributed in regenerative process by exhibiting myocardial differentiation and contributed in improvement of heart functions.

Key words: Myocardial infarction, human umbilical cord derived mesenchymal stromal stem cells, stem cell therapy, cardiac regeneration

7. KAYNAKLAR

1. Iliçin G. İç hastalıkları. Ankara: Güneş; 2005.
2. Matar AA, Chong JJ. Stem cell therapy for cardiac dysfunction. SpringerPlus. 2014;3:440.
3. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. Circulation research. 2013;113 (6):810-34.
4. Goumans MJ, Maring JA, Smits AM. A straightforward guide to the basic science behind cardiovascular cell-based therapies. Heart (British Cardiac Society). 2014;100 (15):1153-7.
5. Menasche P. Stem cell therapy for chronic heart failure: lessons from a 15-year experience. Comptes rendus biologiques. 2011;334 (7):489-96.
6. Joggerst SJ, Hatzopoulos AK. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. Expert reviews in molecular medicine. 2009;11:e20.
7. Moore KLPTVNTMG. The developing human: clinically oriented embryology. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2013.
8. Sadler TWBAC. Langman medikal embriyoloji2011.
9. Akbay CS, B. Kalp Damar Sistemi. In: Tekelioğlu M, editor. ÖZEL HİSTOLOJİ İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp A.Ş. Tıp Kitapları Ve Bilimsel Yayınları; 2002. p. 23-48.

10. Ross MHPW. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2011.
11. Junqueira LCUMAL. Junqueira's basic histology: text and atlas. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
12. Arinci KEA. Anatomi. Ankara: Günes kitapevi; 1997.
13. Copstead LE, Banasik JL. Pathophysiology. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier; 2010.
14. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Clinically oriented anatomy. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
15. Gray H, Standring S, Ellis H, Berkovitz BKB. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. Edinburgh; New York: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.
16. Kierszenbaum ALTLL. Histology and cell biology: an introduction to pathology. Philadelphia, PA: Saunders; 2012.
17. Ovalle WK, Netter FH, Chovan J, M,ft,oglu S, Kaymaz F, Atilla P. Netter temel histoloji. Ankara: G,nes Tip Kitabevleri; 2009.
18. Popescu LM, Curici A, Wang E, Zhang H, Hu S, Gherghiceanu M. Telocytes and putative stem cells in ageing human heart. Journal of cellular and molecular medicine. 2015;19 (1):31-45.
19. Can A. KÖK HÜCRE Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. 1 ed. Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevi; 2014 2014.
20. Penn MS. Stem Cells And Myocardial Regeneration. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 2007.

21. Robbins SL, Kumar V. Robbins temel patoloji: (basic pathology). Istanbul: Nobel Tip Kitabevi; 2008.
22. Cohn LH. Cardiac surgery in the adult New York: McGraw-Hill Medical; 2008.
Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=215846>.
23. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. The American journal of pathology. 1978;90 (1):57-70.
24. Saukko P. Knight's Forensic Pathology, 3Ed: Hodder Education; 2004.
Available from: <http://www.mylibrary.com?id=264142>.
25. Koudstaal S, Jansen Of Lorkeers SJ, Gaetani R, Gho JM, van Slochteren FJ, Sluijter JP, et al. Concise review: heart regeneration and the role of cardiac stem cells. Stem cells translational medicine. 2013;2 (6):434-43.
26. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem cells (Dayton, Ohio). 2007;25 (2):319-31.
27. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. Stem cells (Dayton, Ohio). 2007;25 (11):2886-95.
28. Can A, Balci D. Isolation, culture, and characterization of human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells. Methods Mol Biol. 2011;698:51-62.

29. De Clerck LS, Bridts CH, Mertens AM, Moens MM, Stevens WJ. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. *Journal of immunological methods*. 1994;172 (1):115-24.
30. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2001;8 (6):1131-5.
31. Parish CR. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and cell biology*. 1999;77 (6):499-508.
32. Rauch DA, Hurchla MA, Harding JC, Deng H, Shea LK, Eagleton MC, et al. The ARF tumor suppressor regulates bone remodeling and osteosarcoma development in mice. *PloS one*. 2010;5 (12):e15755.
33. Pennypacker BL, Chen CM, Zheng H, Shih MS, Belfast M, Samadfam R, et al. Inhibition of cathepsin K increases modeling-based bone formation, and improves cortical dimension and strength in adult ovariectomized monkeys. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2014;29 (8):1847-58.
34. Suzuki T, Hayakawa T, Kawamoto T, Gomi K. Bone response of TGF-beta2 immobilized titanium in a rat model. *Dental materials journal*. 2014;33 (2):233-41.
35. Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *Journal of immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1998;160 (10):5037-44.

36. Yanagawa Y, Masubuchi Y, Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing. *Immunology*. 1998;95 (4):591-4.
37. Zhong Z, Ramshesh VK, Rehman H, Liu Q, Theruvath TP, Krishnasamy Y, et al. Acute ethanol causes hepatic mitochondrial depolarization in mice: role of ethanol metabolism. *PloS one*. 2014;9 (3):e91308.
38. Bernard A, He Z, Gauthier AS, Trone MC, Baubeau E, Forest F, et al. Femtosecond laser cutting of endothelial grafts: comparison of endothelial and epithelial appplanation. *Cornea*. 2015;34 (2):209-17.
39. Kummrow A, Frankowski M, Bock N, Werner C, Dziekan T, Neukammer J. Quantitative assessment of cell viability based on flow cytometry and microscopy. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2013;83 (2):197-204.
40. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*. 2003;107 (7):1024-32.
41. Boomsma RA, Geenen DL. Evidence for Transfer of Membranes from Mesenchymal Stem Cells to HL-1 Cardiac Cells. *Stem cells international*. 2014;2014:653734.
42. Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Annals of hematology*. 2005;84 (11):715-21.

43. Fallon JT. Postmortem: histochemical techniques. *Myocardial Infarction*: Springer; 1982. p. 373-84.
44. Kansal SK, Jyoti U, Sharma S, Kaura A, Deshmukh R, Goyal S. Effect of zinc supplements in the attenuated cardioprotective effect of ischemic preconditioning in hyperlipidemic rat heart. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2015.
45. Silambarasan T, Manivannan J, Priya MK, Suganya N, Chatterjee S, Raja B. Sinapic acid protects heart against ischemia/reperfusion injury and H9c2 cardiomyoblast cells against oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;456 (4):853-9.
46. Zhang YL, Yao YT, Fang NX, Zhou CH, Gong JS, Li LH. Restoration of autophagic flux in myocardial tissues is required for cardioprotection of sevoflurane postconditioning in rats. *Acta pharmacologica Sinica*. 2014;35 (6):758-69.
47. Liu C, Liu Y, Yang Z. Myocardial infarction induces cognitive impairment by increasing the production of hydrogen peroxide in adult rat hippocampus. *Neuroscience letters*. 2014;560:112-6.
48. Radhiga T, Rajamanickam C, Senthil S, Pugalendi KV. Effect of ursolic acid on cardiac marker enzymes, lipid profile and macroscopic enzyme mapping assay in isoproterenol-induced myocardial ischemic rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2012;50 (11):3971-7.
49. Han JH, Lim SY, Lee MS, Lee WW. Sodium [(1) (8)F]fluoride PET/CT in myocardial infarction. *Molecular imaging and biology: MIB: the official publication of the Academy of Molecular Imaging*. 2015;17 (2):214-21.

50. Suranyi P, Kiss P, Brott BC, Simor T, Elgavish A, Ruzsics B, et al. Percent infarct mapping: an R1-map-based CE-MRI method for determining myocardial viability distribution. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*. 2006;56 (3):535-45.
51. Zeng R, Chen YC, Zeng Z, Liu WQ, Jiang XF, Liu R, et al. Effect of mini-tyrosyl-tRNA synthetase/mini-tryptophanyl-tRNA synthetase on ischemic angiogenesis in rats: proliferation and migration of endothelial cells. *Heart and vessels*. 2011;26 (1):69-80.
52. Hochhauser E, Cohen R, Waldman M, Maksin A, Isak A, Aravot D, et al. P2Y2 receptor agonist with enhanced stability protects the heart from ischemic damage in vitro and in vivo. *Purinergic signalling*. 2013;9 (4):633-42.
53. Markus A. Rüegg & Sarina Meinen (Biozentrum, University of Basel B, Switzerland). Histopathology in Masson Trichrome stained muscle sections <MDC1A_M.1.2.003.pdf> 2014. Available from: http://www.treat-nmd.eu/downloads/file/sops/cmd/MDC1A_M.1.2.003.pdf.
54. Prophet EBAFIoP. Laboratory methods in histotechnology. Washington, D.C.: American Registry of Pathology; 1992.
55. Santos Nascimento D, Mosqueira D, Sousa LM, Teixeira M, Filipe M, Resende TP, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem cell research & therapy*. 2014;5 (1):5.
56. Wu KH, Zhou B, Yu CT, Cui B, Lu SH, Han ZC, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord derived stem cells in a rat myocardial infarction model. *The Annals of thoracic surgery*. 2007;83 (4):1491-8.

57. Latifpour M, Nematollahi-Mahani SN, Deilamy M, Azimzadeh BS, Eftekhari-Vaghefi SH, Nabipour F, et al. Improvement in cardiac function following transplantation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells. *Cardiology*. 2011;120 (1):9-18.
58. Zhang W, Liu XC, Yang L, Zhu DL, Zhang YD, Chen Y, et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction. *Coronary artery disease*. 2013;24 (7):549-58.
59. Li T, Ma Q, Ning M, Zhao Y, Hou Y. Cotransplantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord blood-derived CD34 (+) cells in a rabbit model of myocardial infarction. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;387 (1-2):91-100.
60. Zhang J, Chen GH, Wang YW, Zhao J, Duan HF, Liao LM, et al. Hydrogen peroxide preconditioning enhances the therapeutic efficacy of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Chinese medical journal*. 2012;125 (19):3472-8.
61. Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Filomeno P, Wang XH, Davies JE, et al. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic research in cardiology*. 2011;106 (6):1299-310.
62. Yannarelli G, Dayan V, Pacienza N, Lee CJ, Medin J, Keating A. Human umbilical cord perivascular cells exhibit enhanced cardiomyocyte reprogramming and cardiac function after experimental acute myocardial infarction. *Cell transplantation*. 2013;22 (9):1651-66.

63. Martinez EC, Vu DT, Wang J, Lilyanna S, Ling LH, Gan SU, et al. Grafts enriched with subamniotic-cord-lining mesenchymal stem cell angiogenic spheroids induce post-ischemic myocardial revascularization and preserve cardiac function in failing rat hearts. *Stem cells and development*. 2013;22 (23):3087-99.
64. Lilyanna S, Martinez EC, Vu TD, Ling LH, Gan SU, Tan AL, et al. Cord lining-mesenchymal stem cells graft supplemented with an omental flap induces myocardial revascularization and ameliorates cardiac dysfunction in a rat model of chronic ischemic heart failure. *Tissue engineering Part A*. 2013;19 (11-12):1303-15.

8. EKLER

EK 1. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Değerli Anne Adayı,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda "Sıçanda miyokardiyal iskemi sonrası doku onarımında insan göbek kordonu stroması kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkisinin araştırılması" adlı çalışmamızın yürütülmesi planlanmaktadır.

Vücudumuzdaki organların çoğu hasarlandığında kendisini tam olarak yenileyemez ve eskisi gibi işlev göremez (örneğin kalp krizi sonrası kalbin kendini yenileyememesi gibi). Kök hücreleri vücudumuzun çeşitli dokularında bulunabilen ve uygun koşullar sağlandığında farklı hücreleri oluşturabilen hücrelerdir. Bu hücreler anneyi bebeğe bağlayan göbek bağında (göbek kordonunda) da bulunur. Göbek kordonu doğumdan sonar kesilir ve bebekten ayrılır, eşe (plasentaya) bağlı olarak eşle birlikte atılır. Bu çalışmada göbek kordonunun zaten doğum sonrasında bebek çıktıktan sonra atılmış olan bu kısmı kullanılacaktır. Göbek kordonunda kontrollü dondurma ve uygun ortam parametreleri çalışıldıktan sonra, laboratuvarında kök hücreleri elde edilecek ve bu hücrelerin ileride tedavilerde kullanılabilmesi için incelemeler yapılacaktır.

Vücuttan zaten atılmış olan materyal kullanılacağı için bu uygulama sırasında gönüllü olan siz ve bebeğiniz herhangi bir rahatsızlık yaşamayacaksınız.

Araştırmaya gönüllü olarak katılmaktasınız. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz, araştırmanın istediğiniz herhangi bir evresinde araştırmayı bırakabilirsiniz. Onayınız olmaksızın araştırmacılar tarafından araştırma dışı bırakılabiliyorsunuz.

Sizinle birlikte bu çalışmaya 5 anne adayları katılmaktadır.

Araştırma için gönüllüler hiçbir mali yük altına girmeyecektir. Sizden alınan göbek bağı başka bir çalışmada kullanılmayacaktır.

ONAM FORMU

"Sıçanda miyokardiyal iskemi sonrası doku onarımında insan göbek kordonu stroması kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkisinin araştırılması" başlıklı çalışma bana sözlü olarak açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım. Çalışmaya kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

☐ Benden alınan göbek bağına başka çalışmalarda kullanılmasına onay vermiyorum.

Hastanın adı- soyadı Tarih İmza

Veli adı- soyadı Tarih İmza

Tanıklık eden kurum Tarih İmza
yetkilisinin adı- soyadı

EK 2. KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sıçanda miyokardiyal iskemi sonrası doku onarımında insan göbek kordonu stroması kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkisinin araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Alp Can			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
	Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Çalışması				
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLE N BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	SIGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☐			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01-18-14	Tarih: 13 Ocak 2014		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>C. Yurdaydin</i>
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>M. Gürel</i>
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>T. Özçelikay</i>
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>N. Puralı</i>
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>C. Atbaşoğlu</i>
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>S. Öztürk</i>
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>S. Sivri</i>
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>Z. Şenocak</i>
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>B. Çakır</i>
Prof.Dr.Güngör UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>G. Utkan</i>
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>D. Öztuna</i>
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	<i>N. Kutlay</i>
Gülsüm ASLAN	Arkeoloji	-	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	<i>G. Aslan</i>

*:Toplantıda Bulunma

ANKARA İLAHİYESİ
ETİK KURULU

EK 3. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL RAPORU



Ü.Ü.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : 66332047-604.01.02/ 229-28237
KONU :

20/12/2013

Sayın

Prof.Dr.Nilüfer N.TURAN DURAL
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Nilüfer N.TURAN DURAL, Alp CAN ve Tulga ULUS'tan oluşan, G.Ü.ET-13.089 kod numaralı ve **“Sıçanda Miyokardiyal İskemi Sonrası Doku Onarımında İnsan Göbek Kordonu Stroması Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Tedavi Edici Etkisinin Araştırılması”** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-13.089 and entitled **“Investigation of Treatment Effect of Human Umbilical Cord Stroma-Derived Mesenchymal Stem Cells After Miyocardial Ischemia in Rat”** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste

Prof.Dr. Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı