



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**KRONİK İNTERMİTTANT HİPOKSİNİN TROMBOSİTLERİN
ANJİOGENEZ FONKSİYONLARINA VE AKCİĞERDE
MULTİPOTENT EPİTELYAL KÖK/ PROGENİTÖR
HÜCRELERİN YERLEŞİMİNE ETKİSİ**

Dr. Ayşe DEMİRCİ ŞAHİN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KRONİK İNTERMİTTANT HİPOKSİNİN TROMBOSİTLERİN
ANJİOGENEZ FONKSİYONLARINA VE AKCİĞERDE
MULTİPOTENT EPİTELYAL KÖK/ PROGENİTÖR
HÜCRELERİN YERLEŞİMİNE ETKİSİ**

Dr. Ayşe DEMİRCİ ŞAHİN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün
22L0230002 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2023**

Ankara Üniversitesi

Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kronik İntermittant Hipoksinin Trombositlerin Anjiogenez Fonksiyonlarına ve Akciğerde Multipotent Eitelyal Kök/ Progenitör Hücrelerin Yerleşimine Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değêrlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımca yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler **Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu** tarafından, **16/06/2021** tarihinde, **2021-11-91** numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşe Demirci Şahin

Tarih:

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Tıpta Uzmanlık Tezi

Yazar Ayşe Demirci Şahin

Gönderim Tarihi: 24-Tem-2023 01:18PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2136022861

Dosya adı: turnitin_i_in.docx (7.89M)

Kelime sayısı: 16731

Karakter sayısı: 123082

KRONİK İNTERMİTTANT HİPOKSİNİN TROMBOSİTLERİN
ANJİOGENEZ FONKSİYONLARINA VE AKCİĞERDE MULTİPOTENT
EPİTELYAL KÖK/ PROGENİTÖR HÜCRELERİN YERLEŞİMİNE
ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**6**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**4**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN

Adı, Soyadı: Ayşe DEMİRCİ ŞAHİN

Anabilim/Bilim Dalı: Fizyoloji ABD

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ

Sınav tarihi:

..... / / 202...

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER

Tezin Başlığı: Kronik İntermittant Hipoksinin Trombositlerin Anjiogenez Fonksiyonlarına ve Akciğerde Multipotent Epitelyal Kök/ Progenitör Hücrelerin Yerleşimine Etkisi

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. Metin BAŞTUĞ

Fizyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sibel DİNÇER

Fizyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ

Fizyoloji Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Trombositler orkestra şefi gibi fizyopatolojik bir çok olayı yönetirler. Trombositlerin bu farklı yönleri ile beni tanıştıran, tıpta uzmanlık eğitimim süresince hoşgörüsü, bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, her koşulda bana ışık tutan çok değerli hocam Prof. Dr. Metin Baştuğ'a,

Tez çalışmamda özveri ile beni destekleyen, bilgi ve tecrübesi ile her zaman yanımda olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Emel Güneş'e,

Laboratuvar çalışmalarım ve tezimin yazım aşamalarında sınırsız desteği ile her zaman yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Fırat Akat'a,

Bilgi ve tecrübeleri ile deneylerimde desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Güvem Gümüş Akay'a,

Çalışmamda histolojik değerlendirmeleri büyük bir titizlikle yürütüp yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Deniz Billur'a, Dr. Ayşe Yozgat'a ve Doç. Dr. Erkan Tuncay'a,

Eğitim hayatımda daima yardımcı ve destekleyici olan, geçirdiğim bu sürece değer katan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nın tüm kıymetli hocalarına,

Bu süreçte tüm destekleri ile her zaman yanımda olan Dr. Hazal Şimşek'e, Dr. Osman Barış Ünver'e, Dr. Süleyman Köse'ye, Dr. Göktuğ Ömercioğlu'na,

Hayatımın her koşulunda yanımda olan, bana her zaman güvenen ve destek olan canım annem Makbule Demirci'ye ve babam Refik Demirci'ye, hayatımı kolaylaştıran ve her türlü yolculuğumda bana destek olan canım ablam Tuğba Demirci Ercoskun'a, ağabeyim Yunus Demirci'ye ve kardeşim Yekta Demirci'ye, hayatımın her alanında olduğu gibi tez çalışmamda da bana yardımcı olan ve hep yanımda olan sevgili eşim Uğur Şahin'e, hayatıma neşe ve mutluluk katan canım kızlarım Sena'ya ve Defne'ye,

En içten teşekkür, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Ayşe Demirci Şahin

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu	iii
Kabul Onay Sayfası	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Önsöz	v
İçindekiler	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller Dizini	xi
Tablolar Dizini	xii

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	11
4.1. Hipoksi	11
4.1.1. Oksijenin Hücrede Roller	11
4.1.2. Aralıklı Hipoksi	13
4.1.3. Kronik Hipoksi ile Aralıklı Hipoksi Arasındaki Farklar	15
4.2. Trombositler	16
4.2.1. Trombosit Mitokondrisi	17
4.2.2. Trombosit Granülleri	17
4.2.2.1. Yoğun Granüller	18
4.2.2.2. α -granüller	18
4.2.3. Reseptör-Ligand Etkileşimleri	19
4.2.4. Trombosit Kaynaklı SDF-1	20
4.2.4.1. SDF-1 Tanımı	20
4.2.4.2. SDF-1 Reseptörleri	21
4.2.4.3. SDF-1'in Düzenlenmesi	22
4.2.4.4. SDF-1'in Trombosit Etkisi	23
4.2.4.5. SDF-1'in Megakaryosite Etkisi	23
4.2.4.6. SDF-1'in Embriyogeneze Etkisi	25
4.2.4.7. SDF-1'in Progenitör Hücrelere Etkisi	25
4.2.4.8. SDF-1'in Akciğer Dokusuna Etkisi	26
4.2.5. Trombosit Kaynaklı VEGF	27
4.2.6. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	28
4.2.7. Trombosit Kaynaklı PAİ-1	29
4.2.8. Trombosit Kaynaklı Endostatin	30
4.2.9. Trombosit Kaynaklı Trombospondin-1	31
4.2.10. Trombositler ve Anjiogeneze	32
4.3. Akut Akciğer Hasarı	33
4.3.1. Patogeneze	34
4.4. Kök Hücre	37
4.4.1. Farklılaşma Potansiyeline Göre Kök Hücre Sınıflandırması	37
4.4.2. Kökenine Göre Kök Hücre Sınıflandırması	38
4.4.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (ESC)	38
4.4.2.2. Fetal Kök Hücreler	39
4.4.2.3. Perinatal Kök Hücreler	39
4.4.2.4. Yetişkin ve Somatik Kök Hücreler	39

4.4.2.5. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPS)	40
4.4.3. Çeşitli Kökenlerden Kök Hücrelerin Fenotipleri	40
4.4.4. Endotelyal Progenitör Hücreler (EPC)	41
4.4.5. Kök Hücre ve Hipoksi	41
5. GEREÇ ve YÖNTEM	42
5.1. Etik Yaklaşım	42
5.2. Deney Hayvanları	42
5.3. Kronik Aralıklı Hipoksi Uygulaması	43
5.4. Akut Akciğer Hasarı Oluşturulması	43
5.5. Doku Örneklerinin Alınması	44
5.5.1. Trombositten Zengin Plazma Hazırlanması	44
5.5.2. Histoloji İçin Örnek Hazırlama ve İmmüno Floresan İncelemeler	47
3.6. ELİSA Ölçümleri	48
3.7. İstatistiksel Analiz	48
6. BULGULAR	49
6.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı	49
6.2. Hücre Sayısı	50
6.3. Trombositlerden Ölçülen Proanjiogenik Faktörler	51
6.3.1. SDF-1	51
6.3.2. VEGF	52
6.3.3. PDGF	53
6.4. Trombositlerde Bulunan Antianjiogenik Faktörler	55
6.4.1. PAİ-1	55
6.4.2. Endostatin	56
6.4.3. Trombospondin	57
6.5. Akciğer Dokusunda İmmüno Floresan Boyama ile Endotelyal Progenitör Hücrelerin Değerlendirilmesi	59
7. TARTIŞMA	61
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
9. KAYNAKLAR	74
10. EKLER	85
Ek-1: Etik Kurul Onayı	85
Ek-2: Etik Kurul Onayı	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACD-A	: Antikoagülanlı Sitrat Dekstroz Solüsyonu
ADP	: Adenozin Difosfat
AH	: Akciğer Hasarı
ALI	: Akut Akciğer Hasarı
Ang	: Anjiyopoietin
ARDS	: Akut Sıkıntılı Solunum Sendromu
ATP	: Adenozin Trifosfat
5-HT	: 5-Hidroksitriptamin
Ca²⁺	: Kalsiyum
CCL	: C-C Motif Kemokin
Cl⁻	: Klor
CO₂	: Karbondioksit
COMP	: Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini
CPAP	: Sürekli Pozitif Havayolu Basıncı
CXCL	: Kemokin (C-X-C Motif) Ligand
CXCR	: Kemokin Reseptörü
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ELİSA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi
EPC	: Endotelyal Progenitör Hücreler
ERK	: Hücre Dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
ESC	: Embriyonik Kök Hücre
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
FiO₂	: Solunan Oksijen Fraksiyonu
GM-CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GP	: Glikoprotein
gr	: Gram
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF-1	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1
IGF	: İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü
IL	: İnterlökin

iPS	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
JAK	: Janus Kinaz
K⁺	: Potasyum
kDa	: Kilo Dalton
KH	: Kronik Aralıklı Hipoksi
kPa	: Kilo Pascal
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
m	: Metre
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MSC	: Multipotent Kök Hücreler
Na⁺	: Sodyum
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
ng/L	: Nanogram/Litre
OCS	: Açık Kanaliküler Sistem
OSAS	: Obstrüktif Uyku Apne Sendromu
PAİ-1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü-1
PaO₂	: Kanda Çözünmüş Oksijenin Parsiyel Basıncı
PAR-AP	: Proteazla Aktifleşen Reseptör
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PCEC	: Pulmoner Kapiller Endotel Hücre
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDGFR	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
PF-4	: Trombosit Faktör-4
PFA	: Paraformaldehit
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-Kinaz
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PSC	: Pluripotent Kök Hücreler
ROS	: Reaktif oksijen radikalleri
SDF-1	: Stromal Hücre Kaynaklı Faktör-1
sICAM-1	: Çözünmüş Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1
STAT	: Sinyal Dönüştürücü Ve Transkripsiyon Aktivatörü
TFP	: Trombositten Fakir Plazma
TGFβ	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
TPAR1	: Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) Tarafından Bastırılmış Gen 1
TZP	: Trombosit Zengin Plazma
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VPC	: Vasküler Progenitör Hücreler
vWF	: Von Willebrand Faktörü
YTS	: Yoğun Tübüler Sistem



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 5.1.	Hipoksi Uygulamasının Yapıldığı Kamara Sistemi	43
Şekil 5.2.	Tam Kandan Elde Edilen Trombositten Zengin Plazma	45
Şekil 5.3.	İnvitrogen Countess Otomatik Hücre Sayım Cihazı ile Trombositten Zengin Plazmada Bulunan Hücrelerin Sayılması	46
Şekil 5.4.	Üç Aşamalı Yıkama Prosedürü Sonucunda Elde Edilen Trombosit Örnekleri	47
Şekil 6.1.	Deney hayvanlarının ilk ve son ağırlıkları	49
Şekil 6.2.	TZP’de bulunan toplam ve mililitrede hesaplanan hücre sayıları	50
Şekil 6.3.	TZP’den elde edilen süpernatantta SDF-1 konsantrasyonu (A), hücre başına düşen SDF-1 konsantrasyonu düzeyleri (B)	52
Şekil 6.4.	TZP’den elde edilen süpernatantta VEGF konsantrasyonu (A), hücre başına düşen VEGF konsantrasyonu düzeyleri (B)	53
Şekil 6.5.	TZP’den elde edilen süpernatantta PDGF konsantrasyonu (A), hücre başına düşen PDGF konsantrasyonu düzeyleri (B)	54
Şekil 6.6.	TZP’den elde edilen süpernatantta PAİ-1 konsantrasyonu (A), hücre başına düşen PAİ-1 konsantrasyonu düzeyleri (B)	55
Şekil 6.7.	TZP’den elde edilen süpernatantta endostatin konsantrasyonu (A), hücre başına düşen endostatin konsantrasyonu düzeyleri (B)	57
Şekil 6.8.	TZP’den elde edilen süpernatantta trombospodin konsantrasyonu (A), hücre başına düşen trombospodin konsantrasyonu düzeyleri (B)	58
Şekil 6.9.	Kontrol, AH, KH ve KH+AH gruplarına ait immunofloresan işaretli mikrograflarda akciğere yerleşen CD133+, VEGFR2+ hücrelere ait görüntüler izlenmektedir. Alveol duvarında CD133 (kırmızı) ile, VEGFR2 (yeşil) ile işaretli olarak gözlenmektedir. Birleştirilmiş (merge) görüntüde her iki antikoru birlikte ifade eden hücrelerin varlığı AH grubunda yüksek, kontrol grubunda düşük düzeyde izlenirken, KH ve KH+AH gruplarında birlikte ifadelenme görülmemektedir.	60

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 6.1. Deney hayvanlarının ilk ve son ağırlıkları (Ort.±S.S.)	50
Tablo 6.2. TZP’de bulunan toplam ve mililitrede hesaplanan hücre sayıları [Ort±S.S., Toplam Hücre Sayısı= (Hücre sayısı x Elde Edilen TZP ml. hacmi)]	51
Tablo 6.3. TZP’den elde edilen süpernatantta SDF-1 konsantrasyonu (ng/L; ortalanca, min;maks) ve hücre başına düşen SDF-1 konsantrasyonu düzeyleri (SDF- 1/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min;maks).	52
Tablo 6.4. TZP’den elde edilen süpernatantta VEGF konsantrasyonu (ng/L; ortalanca, min;maks), hücre başına düşen VEGF konsantrasyonu düzeyleri (VEGF/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min;maks)	53
Tablo 6.5. TZP’den elde edilen süpernatantta PDGF konsantrasyonu (ng/L, ortalanca±SS), hücre başına düşen PDGF konsantrasyonu düzeyleri (PDGF/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min;maks)	54
Tablo 6.6. TZP’den elde edilen süpernatantta PAİ-1 konsantrasyonu (ng/L, ortalanca±SS), hücre başına düşen PAİ-1 konsantrasyonu düzeyleri (PAİ- 1/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min;maks)	56
Tablo 6.7. TZP’den elde edilen süpernatantta endostatin konsantrasyonu (ng/L, ortalanca±SS), hücre başına düşen endostatin konsantrasyonu düzeyleri (Endostatin/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min;maks)	57
Tablo 6.8. TZP’den elde edilen süpernatantta trombospodin konsantrasyonu 1×10^{-5} (ng/L, ortalanca, min;maks), hücre başına düşen trombospodin konsantrasyonu düzeyleri (Trombospodin/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min;maks).....	58

1. ÖZET

Giriş: Trombosit granülleri, neo-alveolarizasyona aracılık eden proanjiyogenik stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1/CXCL12) içerir. Trombosit kaynaklı SDF-1'in kemik iliğinde kök hücrelerin mobilizasyonunun sağlandığı, hemo-vasküler bir niş oluşturarak kök hücreleri topladığı da gösterilmiştir. SDF-1 aynı zamanda kök hücrelerin endotelial progenitor hücrelere (EPC'ler) dönüşmesi için güçlü bir uyarıcıdır. Trombositler SDF-1'den başka vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve matriks metaloproteinazlar gibi molekülleri de serbestleştirerek anjiyogenezi uyarır. Trombositler plazminojen aktivatörü inhibitörü-1 (PAİ-1), endostatin, trombospondin gibi antianjiyogenik faktörleri de içerir. Trombositler hem proanjiyogenik hem de antianjiyogenik faktörler içerdiği için, trombositlerin anjiyogenezi nasıl uyarabildiği veya inhibe edebildiği ve bu durumun hangi çevresel faktörlerle düzenlendiği kesin olarak bilinmemektedir.

Amaç: Bu çalışmanın amacı kronik aralıklı hipoksinin trombosit kaynaklı proanjiyogenik ve antianjiyogenik moleküller üzerindeki etkisini, akciğer hasarı sonrasında endotelial progenitor hücrelerin dokuya yerleşimini artırıp artırmadığını ve endotelial progenitor hücrelerin doku hasarı bölgesine yerleşmesinin trombosit kaynaklı SDF-1 seviyesindeki olası bir değişiklikten etkilenip etkilenmediğini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: 10 haftalık, erkek Wistar Albino türü sıçanlar Kontrol, Akciğer Hasarı (AH), Kronik Aralıklı Hipoksi (KH), Kronik Aralıklı Hipoksi + Akciğer Hasarı (KH+AH) grupları olarak ayrıldı. Hipoksi uygulaması hipobarik hipoksik kamarada 42 gün boyunca, günde 6 saat, 3.000 metre yüksekliğe karşılık gelen atmosferik basınç (69,3 kPa, 520 mmHg, $\approx$ %14 O₂) ortamında yapıldı. Akciğer hasarı oluşturmak için intratrakeal yoldan lipopolisakkarit 100 µg/100g dozunda verildi. Akciğer hasarından 3 gün sonra hayvanlar feda edildi, kan ve akciğer örnekleri alındı. Kan örneklerinden trombositler ayrıldı, sayıldı ve daha önce bildirilmiş üç aşamalı bir prosedür ile yıkandı. Trombositlerin parçalanması ile elde edilen süpernatant örneklerinde VEGF, SDF-1, PDGF, endostatin, trombospondin-1, PAİ-1 konsantrasyonları ölçüldü. Akciğer dokusunda immüno Floresan yöntem ile EPC varlığı değerlendirildi.

Bulgular: Sıçanların ağırlığında hipoksi öncesi ve sonrası önemli farklılık yoktu. KH+AH grubunun mililitredeki hücre sayısı ($p<0,001$) ve toplam elde edilen hücre sayısı ($p<0,001$) diğer gruplardan yüksek bulundu. KH grubunun SDF-1 konsantrasyonları kontrol ($p<0,01$) ve AH ($p<0,05$) gruplarından düşük bulundu. KH grubunda PAİ-1 konsantrasyonu kontrol grubundan ($p<0,05$) yüksek bulundu. AH grubunun endostatin konsantrasyonu, kontrol ($p<0,01$) ve KH+AH ($p<0,01$) gruplarına göre yüksek bulundu. Trombospondin konsantrasyonu KH grubunda kontrol ($p<0,01$), AH ($p<0,01$) ve KH+AH ($p<0,05$) gruplardan yüksek bulundu. Hücre başına düşen SDF-1 konsantrasyonu KH+AH gruplarında kontrol ($p<0,001$) ve AH ($p<0,01$) gruplarına göre düşük bulundu. Hücre başına düşen VEGF, PDGF, PAİ-1, endostatin, trombospondin konsantrasyonları KH+AH grubunda kontrol ($p<0,001$), AH ($p<0,001$) ve KH ($p<0,05$) gruplarından düşük bulundu. İmmünfloresan görüntülemelerde EPC'ler kontrol grubuna göre AH grubunda daha yoğun gözlenirken, KH ve KH+AH gruplarında EPC'ler gözlenmedi.

Sonuç: Çalışmamızın sonucunda hipoksiye bağlı olarak proanjiogenik faktörlerden olan SDF-1'in azaldığı ve buna bağlı olarak akciğer hasarı sonrasında hasarlı dokuya EPC'lerin yerleşiminin azaldığı görülmüştür. VEGF ve PDGF konsantrasyonlarında ise hipoksiye bağlı anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Antianjiogenik faktörlerden olan PAİ ve trombospondin-1 konsantrasyonu ise KH'ye bağlı olarak artarken, endostatin konsantrasyonu AH'na bağlı olarak artmıştır. KH+AH grubunda hücre başına düşen tüm faktör konsantrasyonları diğer gruplara göre oldukça düşük bulundu. Bu durumun KH'nin megakaryositlere olan etkisine bağlı olabileceği düşünüldü. Sonuçlarımız KH'nin trombosit fonksiyonlarını değiştirdiğini göstermektedir, ancak bu alanda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: trombosit, kronik aralıklı hipoksi, SDF-1, anjiogenez, akciğer hasarı

2. ABSTRACT

Introduction: The granules of platelets contain proangiogenic stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12), which mediates neo-alveolarization. It has also been shown that platelet-derived SDF-1 mobilizes stem cells from the bone marrow and recruits them by forming a hemo-vascular niche. SDF-1 is also a potent stimulator of stem cells to transform into endothelial progenitor cells (EPCs). Platelets promote angiogenesis by releasing molecules besides SDF-1, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and matrix metalloproteinases. Platelets also contain antiangiogenic factors such as plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), endostatin and thrombospondin. Since platelets contain both proangiogenic and antiangiogenic regulatory proteins, it is not known exactly how platelets can stimulate or inhibit angiogenesis and by which environmental factors this is regulated.

Aim: The aim of this study was to investigate the effect of chronic intermittent hypoxia on platelet-derived proangiogenic and antiangiogenic molecules, whether it improves endothelial progenitor cell placement in tissue after lung injury, and whether the placement of endothelial progenitor cells at the tissue damage site is affected by a possible change in platelet-derived SDF-1 level.

Materials and methods: Male Wistar Albino rats of 10 weeks of age were allocated into Control, Lung Injury (AH), Chronic Intermittent Hypoxia (KH), Chronic Intermittent Hypoxia + Lung Injury (KH+AH) groups. Hypoxia was applied in the hypobaric hypoxic chamber for 42 days, 6 hours a day, at an altitude of 3,000 meters, in an atmospheric pressure (69.3 kPa, 520 mmHg, $\approx 14\%$ O₂) environment. Lipopolysaccharide was administered intratracheally at a dose of 100 μ g/100g to induce lung injury. Animals were sacrificed 3 days after lung injury and blood and lung samples were taken. Platelets were separated from blood samples, counted and washed via a previously described three-step procedure. VEGF, SDF-1, PDGF, endostatin, thrombospondin-1, PAI-1 concentrations were measured in the supernatant samples obtained after the lysis of platelets. Presence of EPC in lung tissue was evaluated by immunofluorescence method.

Results: There was no significant difference in the weight of the rats before and after hypoxia. The number of cells per milliliter ($p < 0.001$) and the total number of cells obtained in

the KH+AH group ($p<0,001$) were higher than the other groups. SDF-1 concentrations of KH group were lower than the control ($p<0,01$) and AH ($p<0,05$) groups. PAI-1 concentration in the KH group was higher than the control group ($p<0,05$). Endostatin concentration was significantly higher in the AH group than the control ($p<0,01$) and KH+AH ($p<0,01$) groups. Thrombospondin concentration was higher in the KH group than control ($p<0,01$), AH($p<0,01$) and KH+AH ($p<0,05$) groups. SDF-1 concentration per cell was lower in the KH+AH groups compared to the control ($p<0,001$) and AH ($p<0,01$) groups. VEGF, PDGF, PAI-1, endostatin, and thrombospondin concentrations per cell were lower in the KH+AH group than control ($p<0,001$), AH ($p<0,001$) and KH ($p<0,05$) groups. In immunofluorescent imaging, EPCs were observed more intensely in the AH group compared to the control group, while EPCs were not observed in the KH and KH+AH groups.

Conclusions: Our results demonstrated that SDF-1, one of the proangiogenic factors, decreased after to hypoxia, and accordingly, the placement of EPCs to the damaged tissue decreased after lung injury. No significant changes were observed in VEGF and PDGF concentrations after hypoxia. The concentrations of antiangiogenic factors, including PAI-1 and thrombospondin-1, increased due to chronic hypoxia, while the concentration of endostatin increased due to lung injury. In the KH+AH group, all factor concentrations per cell were found to be considerably lower than other groups. This might be related to the effect of chronic hypoxia on megakaryocytes. Our results show that chronic hypoxia may alter platelet functions, however, more studies are needed in this area.

Key Words: platelets, chronic intermittent hypoxia, SDF-1, angiogenesis, lung injury

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Memelilerde akciğer hasarı (AH) ya da akciğerin rezeksiyonu kalan akciğer alveollerinde kütle ve gaz değişim fonksiyonunun restorasyonuna yol açar. Bu kompanse edici akciğer büyümesi ve/veya yenilenme süreci yeni fonksiyonel alveoler birimlerin oluşum sürecidir. Akciğer rezeksiyonu ile de tetiklenen neo-alveolerizasyon başta alveoler epitel hücreleri, endotelyal hücreler ve mezenkimal hücreler olmak üzere birkaç hücre tipinin artışı ile oluşan bir süreçtir (1). Vasküler hücre proliferasyonu ve mezenkimal kök hücrelerin migrasyonunu içeren pulmoner vasküler remodalizasyon birçok akciğer hastalığının ve onarımının anahtar özelliğidir. Bütün bu hücresel süreçlerde rol oynayan büyüme faktörleri ve inflamatuvar mediatörlerin moleküler mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır (2).

Rafii S. ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada farelerde akciğer dokusunun bir kısmının alınması sonrası sağlam akciğer dokusunda oluşan fonksiyonel alveoler üniteye ve kök hücrelerdeki artışın trombosit aktivasyonuna bağlı olduğu, trombositopenik farelerde alveoler üniteye artışın oluşmadığını göstermişlerdir. Akciğer lobu kaybının kalan sağlıklı akciğerlerde alveoler rejenerasyonu nasıl tetiklediği tam olarak bilinmese de trombositlerin rolüne işaret edilmiştir (1).

Pulmoner dolaşımdan sürekli olarak geçen trombositler aktive olduklarında sadece hemostatik mekanizmalarda rol almakla kalmazlar, aynı zamanda doku onarımında da önemli role sahiptirler. Granüllerinde çeşitli ve zengin peptit ve lipid mediyatörler barındıran trombositler endotel hücreleri ile birlikte çoklu patofizyolojik süreçleri yönetir. Strese yanıt olarak trombositler aktive olup hasarlı endotele yapışır ve alfa granül içeriklerini serbestleştirirler. Trombositler hasarlı bölgeye lokalize bir şekilde yüksek konsantrasyonlarda anjiyogenez düzenleyici molekülleri biriktirebilirler (1, 3).

Aktive trombositler akciğer alveollerinin rejenerasyonunun başlatılmasında önemlidir. Trombositler neo-alveolerizasyona aracılık etmek için granüllerinde proanjiyogenik stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1/ CXCL12) barındırırlar. Alveoler rejenerasyon mezenkimal kök hücrelerin aktivasyonu, anjiyogenik faktörler, vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) ve fibroblast büyüme faktörleri (FGF'ler) dahil olmak üzere çeşitli sinyal moleküllerinin sinerjik etkilerinin koordineli bir sürecidir (1, 2).

Trombosit biyogenezinde akciğer mikrosirkülasyonu da önem taşır. Akciğer mikrosirkülasyonunu doğrudan görüntüleyerek yapılan bir çalışmada çok sayıda megakaryositin akciğerde bulunduğu ve pulmoner dolaşımdan dinamik olarak trombositleri serbest bıraktıkları gösterilmiştir. Trombosit biyogenezine akciğer katkısı toplam trombosit üretiminin yaklaşık %50'si veya saatte 10 milyon trombosit üretimi ile önemlidir. Kemik iliğinde trombositopeni gelişmesi ve kök hücre eksikliği koşullarında bu progenitörler akciğerlerden dışarı göç edebilir, kemik iliğini doldurabilir, kan trombositlerini yeniden oluşturabilir ve çoklu hematopoietik soylara katkıda bulunabilirler. Bu bulgular akciğerleri terminal trombosit üretiminin birincil bölgesi ve önemli hematopoietik potansiyele sahip bir organ olarak konumlandırır (4).

Trombosit kaynaklı SDF-1 'in trombositte özgü genetik silinmesi ile alveoler rejenerasyondaki rolü ortaya çıkarılmıştır. Trombositopenik farelerde alveoler rejenerasyonun bozulduğu gösterilmiştir. SDF-1 geninin trombositte özgü genetik silinmesi (SDF-1^{-/-}) ile alveoler rejenerasyonun bozulduğu gözlemlenmiş, SDF-1^{+/+} trombositlerin bu farelere transfüzyonu ile alveoler rejenerasyon düzelmiştir. Trombosit kaynaklı SDF-1'in bu etkisinin mezenkimal kök hücrelerin hücre zarında bulunan kemokin reseptör 4 ve 7 (CXCR4 ve 7)'yi uarması ile pro-rejeneratif matriks metalloproteinaz 14 (MMP14)'ün oluşmasına bağlı olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda trombosit kaynaklı SDF-1'in hemovasküler bir niş oluşturarak akciğerlere kök hücreleri topladığı da gösterilmiştir (1, 2) .

SDF-1 endotelial progenitör hücrelerin (EPC'ler) oluşması için kök hücrelerin güçlü bir uyarıcısıdır. EPC'ler doğrudan yeni oluşan damarlara yerleşen ve parakrin faktörler salgılayarak yeni damarların büyümesini artıran kemik iliği kaynaklı hücrelerdir. SDF-1 için ana reseptör olan CXCR4 yalnızca EPC'lerde değil, aynı zamanda olgun endotelial hücrelerde, nöral öncüllerde ve düz kas öncüllerinde de bulunur ve bütün bu hücrelerin yaralı ve onarım gerektiren alanlara göçünde kritik öneme sahiptir. SDF-1/CXCR4 aksının aktivasyonu EPC'lerin hayatta kalmalarını ve endotelial hücrelere farklılaşmasını sağlar (5).

Xu J. ve ark. (2007)'nın çalışmasında trombosit kaynaklı SDF-1'in kök hücrelerde bulunan CXCR4 reseptörüne bağlanması ile kemik iliğinden kök hücrelerin mobilizasyonunun sağlandığı gösterilmiştir. SDF-1/CXCR4 aksının yabancı tip ve MMP-9'un genetik olarak susturulduğu farelerde bleomisinle oluşturulmuş akciğer hasarı modelindeki rolü araştırılmış, akciğerlerdeki hasarın büyüklüğü ile SDF-1 ve CXCR4 ifade eden hücre sayılarındaki artışın uyumlu olduğu gösterilmiştir (6) .

Doku ve/veya organ hasarıyla ilgili uyaranlara yanıt olarak nişlerden dolaşıma geçen öncül hücreler hasar bölgesine çekilerek doku yenilenmesine dahil olur. Stellos K. ve ark.'nın (2008) çalışmasında aktive olmamış trombositlerin yüzeyinde SDF-1'in ekspresyonu düşük bulunmuştur. Ancak aktive olmaları ile SDF-1 yüzey ekspresyonunun önemli oranda arttığı gösterilmiştir. İskemi / reperfüzyon hasarından sonra farelerin mikro sirkülasyonunda trombosit kaynaklı SDF-1'in kemik iliği kaynaklı CD34+ kök hücrelerinin hasarlı endotele adezyonunu ve bu hücrelerin EPC'lere farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir (7).

Trombositlerin kültür ortamında endotel hücrelerini uyardığı ve in vitro ortamda kılcal damar benzeri yapıların oluşumunu desteklediği bilinmektedir. Trombositler SDF-1'den başka VEGF, FGF, epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve MMP'ler gibi molekülleri de serbestleştirerek anjiyogenezi başlatır (8).

Trombosit granülleri anjiyogenez inhibitörleri olan endostatin, platelet faktör-4, trombospondin-1, alfa 2-makroglobulin, plazminojen aktivatör inhibitörü-1(PAİ-1) ve anjiyostatini de içerir. Bir dizi deneysel veri ve klinik araştırma trombositlerin anjiyogenezin ana düzenleyicileri olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte trombositler hem proanjiyogenik hem de antianjiyogenik düzenleyici proteinler içerdiği için, trombositlerin anjiyogenezi nasıl uyatabildiği veya inhibe edebildiği ve bu durumun hangi çevresel faktörlerle düzenlendiği net değildir (8, 9) .

Trombosit aktivasyonu anjiyogenik faktörlerin sekresyonunu ve trombosit yüzeyindeki SDF-1 ekspresyonunu uyarır. İlginç bir şekilde bu anjiyogenik faktörlerin, özellikle SDF-1 ve endostatinin trombosit yüzey ekspresyonu ile ortama salınmaları senkronize değildir. Örneğin, tüm agonistlerin trombosit SDF-1 ve endostatin ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı, ancak Proteazla Aktifleşen Reseptör-4 (PAR4-AP)'ün uyarılması ile sadece endostatin salgılandığı gösterilmiştir. Bu durum trombosit yüzeyinde eksprese olan SDF-1 ile trombositlerden salınan plazma SDF-1 seviyeleri arasındaki zayıf korelasyonu açıklayabilir. Artmış trombosit SDF-1 yüzey ekspresyonu anjiyogenez açısından önemlidir ve hasarlı damarlarda EPC'lerin yerleşmesini artırabilir (9) .

Anjiyogenez süreci anjiyogenezin uyarıcıları ve inhibitörlerinin lokal olarak sürekli etkileşimi ile düzenlenir ve bunlardaki dengesizlik çok sayıda inflamatuvar ve malign yanıt, iskemik ve immün bozukluğa neden olur. Italiano J. ve ark. (2008)'nın çalışmasında trombositlerin anjiyogenez düzenleyici proteinler içeren birden çok tipte, en az iki farklı α -granül içermesi olasılığı gösterilmiştir. Bununla birlikte α ve yoğun granüllerin farklılaşma

mekanizmaları bilinmemektedir (8) . Zhou B. ve ark. (2013)'nın çalışmasında açık yaraya trombositten zengin ve trombositten fakir plazma uygulanmış, trombositten zengin plazmanın yara bölgesine daha fazla kan akışını sağladığı gösterilmiştir (10) .

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) son yıllarda kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Trombosit aktivasyonu ile transmembran PDGF reseptörü (PDGFR)'nün uyarılmasının ardından hücrelerin hayatta kalması, çoğalması ve göçüyle sonuçlanan sinyalizasyon izlenir. Bu nedenle PDGFR aktivasyonu hücresel homeostaz ve ayrıca patofizyolojik proliferatif bozuklukların oluşumunda önemli rol oynar. PDGFR sinyalizasyonunun düzenlemesinin pulmoner vasküler remodalizasyonda önemi gösterilmiştir. Genetik bir yaklaşımla pulmoner vasküler yeniden yapılanmada PDGFR aktivasyonunun ana rolü doğrulanmıştır. İmmünohistokimyasal bulgular pulmoner vasküler yeniden yapılanmada SDF-1/CXCR4 aksının rolü olduğunu ve SDF-1 ile PDGF sinyali arasında potansiyel bir etkileşime işaret eder (11) .

Aralıklı hipoksi hücreleri, dokuları, organları ve tüm organizmayı daha yoğun ve/veya kronik hipoksi, iskemi ve diğer streslerden koruması nedeniyle klinik tıp ve atletizm antrenmanları için giderek daha ilgi çeken bir yöntem haline gelmektedir. Serebrovskaya, T. ve ark. (2011)'nın çalışmasında iki haftalık normobarik döngüsel hipoksi programı proinflamatuvar sitokinleri bastırırken dolaşımdaki hematopoetik kök hücreleri, kompleman aktivasyonunu, dolaşımdaki trombositleri ve nötrofillerin fagositik ve bakterisidal aktiviteleri artırdığı gösterilmiştir. Aralıklı hipoksiden en az yedi gün sonra devam eden bu yanıtın inflamasyonu şiddetlendirmeden vücudun bağışıklık yanıtını güçlendirmeye hizmet edebileceği düşünülmüştür (12).

Feng W. ve ark. (2011)'nin çalışmasında hipoksiye bağlı anjiyogenez değerlendirilmiş, kemik iliğinden kök hücrelerin dolaşıma geçmesi için hipoksik bölgeler ile kemik iliği arasında iletişim kurulduğu ve bunun trombositopenik farelerde azaldığı gösterilmiştir (2).

Hipoksiye bağlı anjiyogenezde kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin iskemik dokuya yerleşimi, iskemik dokunun kemik iliği ile etkileşimi önemlidir. Kemik iliğinin proanjiyogenik hücreleri serbest bırakması için sinyalin dolaşım yoluyla iletilmesi durumunda, bu sinyalin organizmanın diğer kısımlarına ulaşmasını önlemek ve iletişimin özgüllüğünü sağlamak için bir araca ihtiyaç vardır. Bu nedenle trombositlerin hipoksik ve hasarlı dokular ile kemik iliği arasında iletişimin korunmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Önemli olan trombositlerin seçici olarak proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörleri hücreye alıp, hücreden

salabilmeleridir. Bu nedenle trombositlerin büyüme faktörleri ve sitokinler için düzenlenmiş bir saklama alanı görevi gördüğü düşünülmektedir (2) .

VEGF gibi SDF-1 de hipoksi tarafından düzenlenir (5). İskemik hastalıklarda hipoksiye bağlı trombosit fenotipi değişmekte ve sinyal iletim yolu proteinlerinin ekspresyonundaki değişiklikler nedeniyle trombosit yanıtlarında değişiklikler oluşmaktadır. Bu nedenle trombosit fenotipi ve işlevi iskemik ve hipoksik hastalıklarda daha iyi karakterize edilmelidir (13) .

Hipoksinin kök hücrelere olan etkisi ortaya çıkan birçok adaptasyon süreci açısından önemlidir. Yaklaşık 40 yıldır kök hücrelerin hipoksiye hızla yanıt verebildiği bilinmektedir. Araştırmalar hipoksinin hematopoietik CD34+ kök hücrelerin çoğalmasını engellediğini ancak ikincil kültürlerde koloni oluşturan hücre üretme kapasitesini koruduğunu göstermiştir. Oksijen varlığı kök hücrelerinin pluripotent özelliği ile farklılaşma arasındaki dengeyi derinden etkiler. Hipoksinin farklı yoğunlukları ve süreleri kök hücre gelişimi üzerinde önemli ve çeşitli etkilere sahip olabilir, ancak farklı süre ve yoğunluktaki aralıklı hipoksinin insan kök hücreleri üzerindeki etkileri hakkında bilgiler yetersizdir (12) .

Mevcut literatür bilgilerine göre trombosit fonksiyonlarından anjiogenezin modülasyonu doku rejenerasyonu için önemlidir. Literatürde trombositlerin proanjiogenik ve antianjiogenik faktörleri hasarlı bölgede lokal olarak salgılayarak endotel hasarının iyileşmesi ve bu alana kök hücrelerin yerleşmesi ile ilgili bilgiler mevcuttur. Ancak kronik aralıklı hipoksi (KH) varlığında trombosit fonksiyonlarını belirleyen faktörler düzeyinde etkilenme olup olmadığı ve kök hücrelerin davranışları ile ilgili çalışmalar yetersizdir.

Amaç ve Hedef:

Bu çalışmanın amacı kronik aralıklı hipoksinin;

- 1) Trombosit proanjiogenik ve antianjiogenik mediyatörler üzerinde etkisini,
- 2) Akciğer hasarı sonrasında endotelial progenitör hücrelerin dokuya yerleşimini artırıp artırmadığını ve
- 3) Trombosit kaynaklı SDF-1 düzeyindeki muhtemel değişikliğin endotelial progenitör hücrelerin doku hasarı olan bölgeye yerleşimine etkisi olup olmadığını araştırmaktır.

Bu amaçla kronik aralıklı hipoksiye maruz bırakılan sıçanlara lipopolisakkarit verilerek akciğer hasarı oluşturuldu. Akciğerlerden alınan örneklerde immünfloresan yöntem ile kök

hücrelerin yerleşimi incelendi. Kan örneklerinden elde edilen trombositten zengin plazma (TZP)'da proanjiogenik (SDF-1, VEGF, PDGF) ve antianjiogenik (PAİ-1, endostatin, trombospondin) faktörlerin düzeyleri ölçüldü.

Çalışmanın Hipotezleri:

6 haftalık KH sonrası

- 1) Trombositlerde bulunan proanjiogenik faktörlerin artması ve antianjiogenik faktörlerin azalması,
- 2) Akciğer hasarı sonrasında trombosit kaynaklı proanjiogenik faktörlerden SDF-1'in etkisi ile endotelyal progenitör hücrelerin doku hasarı olan bölgelere yerleşimini artırması beklenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Hipoksi

Aerobik metabolizma için memelilerde oksijen gereklidir. Bu süreçte mitokondride enerji veren bir maddenin (örneğin şekerler, yağlar) oksijenle birleştirilmesiyle CO₂ ve H₂O ile enerji üretilir. Hipoksi hücrede düşük oksijen içeriği ve kısmi basınç durumudur. Hücre tipine, metabolik gereksinimlerine ve hipoksiye uyum sağlama yeteneğine bağlı olarak çeşitli hipoksi seviyelerine verilen yanıt, adaptasyondan hücre ölümüne kadar değişebilir (14) .

Dört tip hipoksi vardır

1. Hipoksemik tip; dokulara giden kandaki oksijen basıncının hemoglobini doyuramayacak kadar düşük olduğu hipoksi,
2. Anemik tip; fonksiyonel hemoglobin miktarının çok az olduğu ve dolayısıyla kanın oksijen taşıma kapasitesinin çok düşük olduğu hipoksi,
3. Hipoperfüzyon tip; dokulara kan akışının azaldığı veya düzensiz dağıldığı hipoksi,
4. Histotoksik tip; dokuda hücrelerin toksisite nedeni ile oksijeni uygun şekilde kullanamadığı hipoksidir (15).

4.1.1. Oksijenin Hücrede Roller

Memeli hücreleri adenosin trifosfat (ATP) yoluyla enerji üretimi için oksijene ihtiyaç duyar. Hücresel solunumda glikoliz ve ardından Krebs döngüsü yoluyla ATP üretilir. Aerobik koşullarda glikoz molekülü başına 38 ATP molekülü verirken, anaerobik koşullarda glikoz molekülü başına sadece 2 ATP oluşur. Hücrenin herhangi bir oksijen kaynağına yakınlığı enerji üretim mekanizmasını düzenler. Örneğin, büyük eklemlerin avasküler eklem kıkırdağında bulunan kondrositler, %1 ile %6 arasında değişen oksijen gerilimleri yaşarlar ve enerji ihtiyaçları için esas olarak glikoliz kullanırlar. Lokal oksijen konsantrasyonları hücresel farklılaşmayı da yönlendirebilir. Tibia kortekslerinden izole edilen hücrelerin in vitro olarak yüksek (%35) oksijen konsantrasyonları altında tutulduğunda kemiğe ve düşük oksijen (%5) konsantrasyonları altında tutulduğunda kıkırdağa farklılaştığını gösterilmiştir. Kıkırdak ve kemiğin oksijenle yönlendirilen farklılaşmasına ilişkin başka çalışmalar da bulunmaktadır (16).

Oksijen seviyesi hücre farklılaşmasını ve buna bağlı olarak multiorganogenezi düzenler. Oksijen seviyesi organ ve doku tiplerinin yanı sıra embriyodan yetişkin vücuduna kadar değişir. Oksijen akciğerden geçer ve daha sonra damar dolaşım sisteminden geçerek her organa daha küçük miktarlarda ulaşır, oksijen seviyesi vücutta kan dolaşımında yüzde iki ila on oranında tutulur (17).

Çalışmalar oksijen seviyelerinin hücrel enerji üretimini, metabolizmayı, proliferasyonu ve farklılaşmayı düzenlediğini bildirmiştir. Aynı zamanda doku düzeyinde oksijen değerlerindeki farklılığın komşu organların fonksiyonlarında ve sinyalizasyonunda düzenleyici roller oynuyor gibi görünmektedir. Bunlar, hücre tipine, doku işlevine, hastalık durumuna ve organ ortamına bağlı olarak değişir (17).

Oksijen varlığı epitelizasyon, kollajen sentezi ve anjiyogenez için kritik olmasına rağmen, oksijenin eksikliği (hipoksi) yara iyileşmesinde önemli fizyolojik sinyaldir. Oksijen konsantrasyonu özellikle yaranın merkezinde düşer. Yaranın neden olduğu akut hipoksinin sitokinlerin indüksiyonu ve çeşitli hücre içi sinyal yolları ile hücrel proliferasyonu, migrasyonu, ve farklılaşmayı düzenlediği için yara iyileşmesinin tüm fazları sırasında önemli bir sinyal olduğuna inanılmaktadır (16).

Doku hipoksisine üç genel anormallik neden olabilir: hipoksemi, dokulara oksijen iletiminin bozulması ve doku oksijen ekstraksiyonu/kullanımının bozulması (14).

Hipoksinin etkileri hem klinik olarak kardiyorespiratuar hastalıkların patofizyolojik mekanizmalarını ayırt etmekle, hem de yüksek irtifaya yanıt olarak meydana gelen adaptif değişiklikleri anlamakla ilgilidir. İnsanlar yüksek irtifalara çıktıkça, oksijeni verimli kullanmak için hipoksiye uyum sağlarlar. Hipoksiye alışma sürecinde, ventilasyonda artış, dokulara oksijen dağıtımını sağlamak için kardiyovasküler sistemdeki adaptasyonlar ve oksijenin metabolik süreçlerde daha verimli kullanılmasına izin veren doku seviyesindeki değişiklikler gözlenir. Çalışmalar gen ifadesini bu değişikliklerin nasıl düzenlendiğini belirlemeye odaklanmıştır. Organların moleküler ve genomik seviyesine hipoksiye verdiği yanıtlar ile ilgili bilimsel veriler olmakla birlikte trombositlerin hipoksiye yanıtı ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır (18).

Hem kronik hipoksi, hem de kronik hiperoksi, stres uyaranları olarak kabul edilir. Bu koşullarda, oksijen radikalleri (ROS) üretilir. Bunlar hücre membranlarının yapısal ve fonksiyonel bileşenlerine zarar verir. Aerobik organizmalarda oksijen kaynağının %90'ından

fazlası mitokondri tarafından kullanılır. Mitokondri, yüksek irtifadaki adaptasyon mekanizmalarıyla ilgili olduğundan, kronik hipoksi, yaşlanma sürecinin bazı yönleriyle de ilişkilendirilmiştir (19).

Hipoksik ve hiperoksik koşullarda hücrelerin oksijeni kullanımı, metabolik işlevlerin enzimatik aktivitelerini etkiler. Farklı türlerin metabolik hızları yaşam süreleri ile ilişkilendirilmiştir. Artan metabolizma hızı artan enerji harcaması nedeniyle daha kısa bir yaşam süresi ile sonuçlanır. Ayrıca artan metabolik hız, yoğun egzersiz ve stres yaşlanmayı etkileyebilecek ROS salınımını indükler (19).

Kronik hipoksinin akut ve kronik etkileri hakkında çok şey bilinmesine rağmen, aralıklı hipoksinin etkileri hakkında daha az şey bilinmektedir. Hipoksiye tekrar tekrar maruz kalma hem yararlı hem de olumsuz etkileri açısından incelenmiştir. Örneğin, tekrarlayan hipoksinin fonksiyonel faydaları hem hastalardaki terapötik değeri hem de sporculardaki performans değeri için araştırılmıştır. Bununla birlikte, uyku apne sendromu ve prematüre apnesi ile ilişkili aralıklı hipokseminin klinik patolojisi, kronik döngüsel hipoksinin uzun vadeli olumsuz sonuçlarının olabileceğini düşündürmektedir (18, 20).

4.1.2. Aralıklı Hipoksi

Aralıklı hipoksinin temel özelliği, normoksi dönemlerinin arasına serpiştirilmiş tekrarlayan hipoksi dönemlerinin bütünüdür. Bununla birlikte bu tanım uygulama aralığını anlamayı sağlamaz. Neyin "aralıklı hipoksi" olarak tanımlanması gerektiğine dair gerçek bir fikir birliği olmadığı gibi, aralıklı hipoksinin biyolojik etkisini tanımlayan temel değişkenlere ilişkin gerçek bir anlayış da yok gibi görünmektedir (20). Bu değişikliklerin tam doğası dinamik olarak uygulama tipine bağlı olabilirken, yanıtlar aralıklı hipoksinin kümülatif bir etkisi olduğunu da düşündürmektedir. Aralıklı hipoksinin kronik olması, yanıtın koruyucu yanıtın patolojik yanıt eşliğini geçip geçmediğini de belirleyebilir (18).

Literatürde araştırmacısının perspektifine bağlı olarak değişiklik gösteren çok sayıda aralıklı hipoksi protokolü bulunmaktadır. Bu protokolleri birbirlerinden beş farklı düzlemde ayırabiliriz:

- 1) Hipoksinin şiddeti (soluk havasında bulunan O₂ %2- %16)
- 2) Hipoksik epizodunun süresi (15-30 saniye- 12 saat)
- 3) Günlük hipoksi/reoksijenizasyon sikluslarının sayısı (3- 2400)

- 4) Hipoksi uygulama şekli (Günlük birden fazla epizotlar veya haftada 3 gün gibi)
- 5) Protokolün toplam süresi (2-90 gün).

Literatür verileri incelendiğinde ılımlı hipoksinin (soluk havasında bulunan O₂ %9-16), düşük epizot sayısının (3-15 epizot/gün) yararlı etkilere sebep olurken, şiddetli hipoksinin (soluk havasında bulunan O₂ %3-8) ve yüksek epizot sayısının (48-2.400 epizot/gün) patolojik etkilere sebep olduğu görülmektedir (20).

Akut ve kronik hipoksinin etkileri uzun yıllardır değerlendirilmektedir. Aralıklı hipoksi insanlarda hipoksik maruziyetin en yaygın şekli olmasına rağmen, bu konudaki çalışmalar son yıllarda yeni başlamıştır. Aralıklı hipoksi şiddetli egzersiz, uçak yolculukları, yüksek irtifaya maruz kalma, yenidoğanlarda uyku, obstrüktif uyku apnesi sendromu (OSAS) ve çeşitli solunum yolu hastalıkları gibi fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda gözlenebilir (21).

Aralıklı hipoksik antrenmanın ölümcül hipoksiden kurtulmayı sağlamasının yanı sıra bazı hastalıklarda koruma sağladığı ve sporcularda egzersiz performansını iyileştirdiği öne sürülmüştür. Aralıklı hipoksinin klinik kullanımı, hastayı bir dizi hastalık sürecinin stresine hazırlamada faydalı bir terapötik modalite olarak kabul edilmektedir. Strese adaptasyon, daha sonra hastalığın genel stresine karşı koruma sağlayabilen stres proteinlerinin ve antioksidan sistemlerin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanır. Bu düşüncüyü destekleyen çok sayıda çalışma vardır. Aralıklı hipoksik epizodların, kronik hipoksiye benzer adaptasyonlar ürettiği ve bu adaptasyonların, çeşitli hastalık süreçlerinin oksidatif stresinden koruma sağladığı düşünülmektedir (18).

Aralıklı hipoksik antrenman, sporcularda egzersiz performansını artırmak için yararlı bir strateji olarak kabul edilmektedir. Antrenmanlar pulmoner rehabilitasyonun temel bir bileşenidir (22). Kronik hipoksinin olumsuz etkilerini önlemek için hematolojik ve solunumsal adaptasyonların oluşumunu desteklemede aralıklı hipoksi önemli görülmektedir. Protokoller farklılık gösterse de aralıklı hipoksi antrenman programlarının çoğunun sonuçları oldukça etkileyicidir. Aralıklı hipoksik antrenmanlar; egzersiz süresini, toplam eritrosit sayısını ve hemoglobini artırır, egzersize kalp hızı yanıtını azaltır ve ventilasyon eşik düzeylerini artırarak egzersize bağlı laktat yükünü sağa kaydırır (18).

Aralıklı hipoksinin faydalarının yanı sıra zararları da vardır. Kronik aralıklı hipoksi muhtemelen pulmoner vasküler yeniden şekillenme ve pulmoner hipertansiyon ile ilişkili olarak sağ ventrikül kalp kütesini önemli ölçüde artırır. Aralıklı hipoksi fetal büyümeyi önemli

ölçüde azalttığından, özellikle fetüste normal gelişim üzerinde de zararlı etkileri vardır. Bununla birlikte OSAS olan hastalarda hipertansiyon, gelişimsel kusurlar, nöropatolojik ve nörobilişsel kusurlar, oksidatif hasara karşı artan duyarlılık bulunur ve muhtemelen miyokard ve beyin enfarktüsü riskleri artmıştır. Kronik aralıklı hipoksi, aralıklı hiperkapni ve uyku düzensizliğinin birlikte olduğu bu hastalıkta hücresel, moleküler ve genomik düzeydeki tepkiler üzerindeki yanıtları ve etkilerini anlamak önemlidir (18).

OSAS'ta olduğu gibi kronik aralıklı hipoksinin sistemik arteriyel hipertansiyona neden olduğu, sağlıklı insanlarda yüksek irtifada olduğu gibi kronik hipoksinin pulmoner arteriyel hipertansiyona aracılık ettiği bilinmektedir. İklim koşullarına adapte olmuş ya da olmamış yüksek irtifada yaşayan her bireyde sistemik kan basıncının yükseldiği bulunmuştur. Yüksek irtifaya maruziyette bu artış ilk olarak yeterli doku oksijenasyonunu sağlamak için adaptasyon sürecinin bir parçasıdır. Submaksimal ve maksimal egzersiz yüksek irtifadaki gibi sistemik kan basıncını yükseltir. Kan basıncında bu yükselmenin artan sempatik uyarıdan kaynaklandığı ve alfa adrenerjik blokaj ile hafifletilebildiği ancak ortadan kaldırılamadığı gösterilmiştir. Sempatik aktivitedeki artışa hipoksik kemorefleks mekanizmalarının aracılık ettiği bilinmektedir (23).

4.1.3. Kronik Hipoksi ile Aralıklı Hipoksi Arasındaki Farklar

Kronik ve aralıklı hipoksiye maruz kalmaya verilen yanıtlarda bazı önemli farklılıklar vardır.

1. Hipoksiye karşı bifazik solunum tepkisi vardır yani, ventilasyonda başlangıçta bir artışın ve ardından 3-5 dakika sonra hipoksik ventilatuar düşüşün olduğu, zamana bağlı yanıttır. Kronik hipokside ventilasyondaki ilk artış önemli ölçüde azalmıştır ve hipoksik ventilasyondaki düşüş fazladır. Aralıklı hipoksi kronik hipoksinin aksine, hipoksik ventilasyondaki düşüşü ortadan kaldırır. Bu durum aralıklı hipoksinin solunumun nöral aktivitesini değiştirme özelliği ile bağlantılı olabilir.
2. Aralıklı hipoksi solunum aktivitesinin serotonerjik bağımlı fasilasyonu ile normoksik ventilasyon süresini uzatır, ancak kronik hipoksi bunu yapamaz.
3. Aralıklı hipoksiye verilen yanıtlardaki varyasyonlar genetik farklılıklar tarafından da belirlenebilir (18).

4.2. Trombositler

Trombositler, megakaryositlerden ayrılarak oluşurlar. Bir megakaryositin parçalanması ile yaklaşık 500 trombosit üretebilirler. Trombositler megakaryositlerin sitoplazmasından ayrıldıktan sonra kan dolaşımında 9 ila 11 gün arasında dolaşırlar. Çekirdeksiz hücrelerdir ve hücresel bölünme geçirdiğine dair bir kanıt yoktur, ancak son araştırmalarda mRNA'yı işleme ve protein sentezi de dahil olmak üzere birçok beklenmedik hücresel işlevleri tanımlanmıştır (24, 25).

Trombositlerin yapısında mitokondri ve sitoplazmalarında rastgele dağılan spesifik granüller, lizozomlar, karmaşık bir zar sistemi ile iskelet bileşenleri (mikrotübüller ve aktin filamentleri) olup, sitoplazmasında enerji kaynağı olarak büyük miktarda glikojen vardır (26, 27). Hücre membranı iki belirgin yapıdan oluşur: Sitozol ve çevreleyen ortam arasında bağlantılara izin veren açık kanaliküler sistem (OCS) ve önemli metabolik enzimleri depolayan yoğun tübüler sistem (YTS)(27).

Yoğun granüller fosfatlar, nükleotidler, katyonlar ve biyoaktif aminler içerir. α -granüller büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler gibi çeşitli proteinleri içerir. Lizozomlar proteinleri, karbonhidratları ve fosfatları hidrolize eden enzimler içerir. Trombosit hücre zarı serotonin, ADP ve interleukin-1 (IL-1) gibi trombositin kendi bileşenlerine yönelik reseptörler dahil olmak üzere çeşitli reseptörleri ifade eder. Trombositler, çekirdekleri olmamasına rağmen mRNA, mikroRNA, mitokondrial DNA içerirler. Bu nedenle, trombositler protein üretebilir. Aktive trombositler mitokondriyi serbest bırakır, mitokondriyal zardan yağ asitleri ve lizofosfolipitler, fosfolipazA2 salarak inflamasyonu destekler (26).

Olgunlaşan megakaryositler diğer granül hücreler gibi, bol miktarda ribozom ve protein sentezinin meydana geldiği kaba endoplazmik retikulum içerir. Megakaryosit gelişiminin bu aşamasında sitoplazma, hücre iskeleti proteinleri, trombosit özgü reseptörler, salgı granülleri, mitokondri ve lizozomlar gibi normal hücresel organellerle dolar (28).

YTS prostaglandinlerin biyosentezi için ana bölgedir. Bu hücre içi zar organeli araşidonik asitten tromboksan oluşum sürecini katabolize eden fosfolipid değiştirici enzimleri, yani siklooksijenaz ve tromboksan sentetazı depolar (27).

4.2.1. Trombosit Mitokondrisi

Mitokondri, enerji ve redoks metabolizmasını, stres direncini ve hücre ölümünü düzenleyen fizyolojik sinyal yollarında ve ayrıca birçok hastalığın patogenezinde yer alır . Bu organel şekil, sayı ve boyut olarak çok dinamiktir. Mitokondrinin iç ve dış zarı vardır. Mitokondri iç zarı, elektron taşıma sistemini oluşturan bir dizi protein kompleksinin bulunduğu, sıralı redoks reaksiyonlarının, besin oksidasyonundan üretilen elektronları moleküler oksijene dönüştüğü yerdir (29).

Çekirdeksiz hücreler olmalarına rağmen, trombositler, hücre fizyolojisine ve patolojik durumlara katılımı giderek daha fazla kanıtlanmış olan fonksiyonel olarak aktif mitokondriye sahiptir (30).

Trombosit mitokondrisi enerji metabolizmasındaki klasik rolleriyle birlikte trombosit aktivasyonu, kalsiyum metabolizması, reaktif oksijen radikalleri üretimi ile de ilişkilidir. Trombosit aktivasyonunda mitokondri geçirgenliği artar, reaktif oksijen radikalleri üretiminde artış olur. Mitokondri ayrıca farklı agonistler tarafından tetiklenen trombosit apoptozuna da aracılık eder (29).

4.2.2. Trombosit Granülleri

Trombositler üç tip salgı aracı içerir: Yoğun granüller, α -granüller ve lizozomlar. Trombositler sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi geniş bir aktif madde yelpazesi içerirler. Bugüne kadar trombositin kendi fonksiyonlarını ve çevredeki ortamla iletişimi sağlayan 1.100'den fazla trombosit kaynaklı protein tanımlanmıştır. İnflamasyonu yöneten, bağışıklık hücrelerini uyaran ve hatta mikrobiyal organizmalara saldıran askerlerdir. Hasarlı dokunun onarımına yardımcı olan büyüme faktörlerini ve onarımı durdurucu molekülleri bölgesel olarak belli bir alana salar. Anjiogenezin başlatılması ve sınırlandırılmasını düzenlerler (31).

Granüller salgı vezikülleridir: Salgılanan çözünür moleküllerin bir kısmı hücre dışı sıvıya yayılır. Bazı proteinler ise trombositlerin yüzeyine yapışır, hücre zarının periferik proteinleri haline gelir. Granüllerin salgılanması, düzenlenmiş bir ekzositoz yolu ile olur, granül membranı plazma zarına dahil olur (27).

Trombositler dış ortamda uygun koşullarda tutulduklarında birkaç gün boyunca protein sentezlemeye devam ederler. Bu bulgular, trombositlerin son derece farklılaşmış durumlarına rağmen, biyosentetik olarak önceden düşünülen daha karmaşık olduğunu göstermektedir. Ayrıca trombositlerin çevresel uyarılara yanıt olarak fenotipik kompozisyonlarını düzenleyebileceği öne sürülmektedir(25). Trombositler, depoladıkları bir dizi modülatör ve aktif bileşikleri salgılayarak damar hasarına ve dolaşımdaki moleküllere yanıt veren son derece reaktif bir hücredir(27).

4.2.2.1. Yoğun Granüller

Yoğun granüller en küçük trombosit granülleridir (ortalama çap 150 nm). Açık bir alan ve tek bir zarla çevrili yoğun opak yoğun bir çekirdeğin varlığı ile karakterize edilirler (27).

Yoğun granüller hem ağır hem de elektron yoğun oldukları için bu adla anılır. Elektron demetini emerler ve bu nedenle, boyanmamış bütün trombosit preparatlarının elektron mikroskobu ile görüntülendiğinde özünde yoğundurlar. Erken megakaryosit döneminde yoğun granüller oluşur, burada olgunlaşma sırasında adenin nükleotidleri ve serotonin ile doldurulurlar (27).

Yoğun granül bileşenleri, protein olmayan küçük moleküllerdir. ADP/ATP oranı 1,5 olan yüksek konsantrasyonlarda adenin nükleotidleri (toplam trombosit içeriğinin %65'i) içerirler. Bu adenin nükleotid havuzu metabolik olarak inerts ve trombositlerin radyoaktif-etiketli fosfat inkübasyonu ile etiketlenmediği için metabolik havuzdan ayırt edilebilir. Yoğun granüller 65 milimolar konsantrasyonda serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) içeren depolama granülleridir ve bu nedenle orijinal olarak 5-HT organelleri olarak adlandırılmıştır. Yoğun granüllerde, adenin nükleotidleri ve pirofosfat moleküller arası kuvvetler tarafından bir arada tutulan kalsiyum ve serotonin ile sıkı kompleksler oluşturur. Bu ağır kompleks yoğun granüllere özgü olarak iki özellik kazandırır: Yüksek miktarda kalsiyum iyonize halde değildir ve bu durum yüksek stabiliteye katkıda bulunur; Yoğun granüller çok yüksek bir konsantrasyon gradyanı yoluyla serotoninini stabilize eder, stabilize olan serotonin konsantrasyonu, plazmadakinden 1000 kat daha yüksek olabilir (27).

4.2.2.2. α -granüller

Trombosit α -granüllerinde anjiogenezi başlatan ve sonlandıran/sınırlandıran proteinler bulunur. α -granüller boyut ve sayı olarak ana granül popülasyonunu temsil ederler. Von Willebrand Faktörü (vWF), multimerin ve faktör V α -granüllerde bulunur (27).

Trombosit başına yaklaşık 50-80 α -granül vardır. Bunlar trombosit hacminin kabaca %10'unu oluşturur, yoğun granüllerden 10 kat daha fazladır. Trombosit başına toplam α -granül membran yüzey alanı $14 \mu\text{m}^2$ 'dir, yaklaşık olarak OCS'ye eşittir (32).

α -granüllerde bulunan başlıca proanjiyogenik faktörler; VEGF, PDGF, FGF, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) ve İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü (IGF), anjiyopoetin, SDF-1 (CXCL12) veya Matriks Metalloproteinazlardır (MMP-1,-2 ve -9). α -granüller ayrıca trombospondin-1, trombosit faktör-4 (PF-4/CXCL4), anjiyostatin, endostatin ve metalloproteinazların spesifik doku inhibitörleri gibi anti-anjiyogenik faktörler içerir. Bu büyüme faktörleri, çeşitli inflamatuvar hücrelerden de salınır. Ancak, trombositlerin damar hasarı bölgelerinde birikme hızı, onları bu mitojenik araçların ilgili bir kaynağı haline getirmektedir. Bu hipotez önkol insizyonu ile yapılan bir çalışmada tıkaç oluşumundan sonraki ilk dakikalarda VEGF konsantrasyonlarının üç kat arttığı bulgusu ile desteklenmiştir. Ayrıca VEGF'nin in vivo oluşan trombüs içinde de biriktiği bilinmektedir (27, 33) .

Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin farklı α -granüllerde bulunduğu gösterilmiştir. PAR1 stimülasyonuna (anjiyogenik faktörlerin salınmasına neden olan) ve PAR4 stimülasyonuna (antianjiyogenik faktörlerin salınmasına neden olan) yanıt olarak anjiyogenik faktörlerin farklı zamanlarda salgılandığı gösterilmiştir. Kemokin mikrodizileri kullanan PAR1 ve PAR4 agonistlerine yanıt olarak α -granül içeriklerinin salgılanmasını değerlendiren kapsamlı bir dizi çalışmada granüllerin olaya bağlı salgısı gösterilememiştir. Çalışmalar tarafından desteklenen temel düşünce α -granüllerin içeriğinin rastlantısal olarak dağıldığıdır (34).

4.2.3. Reseptör-Ligand Etkileşimleri

Akış koşulları altında, özellikle yüksek akış kesme hızlarında, trombositlerin kan damarı duvarına ilk yapışması endotel yüzeyinde veya subendotelyal matriste hareketsizleştirilmiş VWF ile trombosit reseptörü glikoprotein (GP) Ib-IX arasındaki etkileşimi gerektirir. VWF ve GPIb α , birbirlerine olan yakınlıklarını artıran konformasyonel değişikliklere uğrayarak artan kesme kuvvetine yanıt verirler, trombosit yapışmasına izin veren kaymaya dayanıklı "yakalama bağları" veya "esnek bağlar" oluştururlar. GPIb α 'nın sitoplazmik alanı filamin A ile etkileşim yoluyla trombosit plazma zarının altında yatan aktin filamentlerine bağlanır. Bu etkileşim membran yapısını ve trombosit şeklini korumak için kritiktir ve ayrıca trombosit adezyonu sırasında kesme kuvvetine direnmek için önemli bir yapısal güçlendirir (33).

Aktive trombositlerin dolaşımdaki lökositleri etkilediği gösterilmiştir. Damar duvarına yapışık olan trombositler bölgeye lökositleri toplayabilir, bu da sonunda damar duvarında ve dokuda lökosit infiltrasyonuna yol açar. Bu bağlanmadan sorumlu reseptör etkileşimleri PSGL-1'in P-selektin ile bağlanması ve ardından Mac-1 aracılığıyla GPIIb/IIIa'ya [40] ve/veya JAM-C [41] ve ICAM-2 dahil olmak üzere trombosit zarının diğer reseptörlerine bağlanmasıdır. Farklı koşullar altında fibrinojen (GPIIb/GPIIIa'ya bağlı) veya yüksek moleküler ağırlıklı kininojen (GPIIb'ya bağlı) gibi proteinlerin bağlanması gerekebilir. Bu yapışma süreçlerinin ardından, lökosit içindeki inflamatuvar kaskatlar aktive olur ve aterogenez gibi damar hasarının ilerlemesine katkıda bulunur (33).

4.2.4. Trombosit Kaynaklı SDF-1

4.2.4.1. SDF-1 Tanımı

Kemokinler 8 ila 12 kDa peptit yapısındadır ve hücre yerleşmesi, aktivasyonu ve farklılaşması ile ilgili kemoatraktan sitokinler olarak işlev görürler. Kemokinler spesifik G-protein-bağlı transmembran reseptörlerine bağlanır. Çoğu kemokin birden fazla reseptöre bağlanır ve/veya aynı reseptör birden fazla kemokine bağlanabilir. Kemokinler yapıları içindeki sisteinin yerleşimine bağlı olarak (CXCL, CCL, CX3CL1 ve XCL1/2) sınıflandırılır (35).

Kemokin terminolojisine göre CXCL12 olarak adlandırılan stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1), üç farklı grup tarafından bağımsız olarak keşfedilmiştir ve pre-B-hücresi büyüme uyarıcı faktör (PBSF), stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1) veya tetradecanoylphorbol-13-acetate tarafından bastırılmış gen 1 (TPAR1) olarak tanımlanmıştır (35).

SDF-1, çok çeşitli hücre tipleri ve çeşitli dokuların stroma hücreleri tarafından eksprese edilir (36). SDF-1'in mRNA ekspresyonu akciğerde, beyinde, kalpte, karaciğerde, böbrekte, dalakta, lenf düğümlerinde, midede, gastrointestinal sistemde, kasta, akciğer kaynaklı fibroblastlarda, kalp ve gelişen beyincik hücrelerinde gösterilmiştir. Özellikle kemik iliği stromal hücrelerinde ve özellikle B hücre lenfopoezisini destekleyen hücrelerde yüksek seviyelerde bulunur. Bu durum inflamasyondan ziyade immünitadaki önemine işaret etmektedir (35, 37, 38).

SDF-1 integrinler gibi bağlanma moleküllerinin aktivasyonu ile hücrelerin stroma ve endotelial hücrelere bağlanmasını sağlar (35).

SDF-1 tarafından uyarıldıktan sonra hücreler, muhtemelen NF-kB yolunun aktivasyonu yoluyla daha fazla MMP (örneğin, MMP-9), nitrik oksit ve VEGF salgılar (35).

SDF-1'e yanıt veren hücre tipleri arasında monositler ve makrofajlar, B ve T lenfositler, trombositler ve megakaryositler ve hem hematopoietik progenitörler hem de kök hücreler dahil CD34⁺ hücreler bulunur (39).

4.2.4.2. SDF-1 Reseptörleri

Trombosit kaynaklı SDF-1'in reseptörü CXCR4 ve CXCR7'dir. CXCR4 kemik iliği kaynaklı öncül hücreler (CD34⁺progenitörler), dolaşımdaki EPC'leri, olgun endotel hücreleri, düz kas öncül hücreleri, megakaryositler ve trombositlerin kendileri gibi bir çok hücrede bulunmaktadır (38).

CXCR4 reseptörü aynı zamanda primordial germ hücreleri, nöral, karaciğer ve kas kök hücreleri, retina pigment epitelyal öncül hücreleri, bağırsak epitel hücreleri, fibrositler, dolaşımdaki mezenkimal kök hücreler ve dolaşımdaki öncül epitel hücreleri üzerinde bulunmuştur. SDF-1/CXCR4 biyolojik aksının hematopoietik olmayan öncül hücrelerin göç etmesinde de önemli olduğu anlamına gelir (35).

SDF-1'nin reseptörü CXCR4'e bağlanması birkaç sinyal yolunun aktivasyonu ile sonuçlanır. CXCR4'e bağlandıktan sonra reseptörün dimerizasyonunu tetiklediği öne sürülmüştür. Ek olarak diğer yüzey reseptörleri sinyal iletim yollarının proteinleri ile daha verimli bir şekilde etkileşime girmek ve dolayısıyla kemotaksiyi indüklemek için CXCR4'ün hücre zarına dahil edilmesi gerektiğine dair kanıtlar vardır (35).

CXCR4 aktivasyonu, heterotrimerik protein kompleksinin (Gαβγ) α ve βγ alt birimlerine ayrışmasına yol açar, bu durum C-terminalinin tirozin kalıntılarının JAK2 ve JAK3 kinazlar yoluyla fosforilasyonu ile sonuçlanır. Fosforillenmiş CXCR4/SDF-1 kompleksi daha sonra G-protein-bağlı reseptör kinazları içeren bir mekanizma ve β-arrestinin bağlanması yoluyla hızla hücre içine alınır (35).

Bu işlem, CXCR4 reseptör sinyalini sonlandırır ve kalsiyum akışı ve prolin açısından zengin kinaz-2 (Pyk-2), p130Cas, kinaz, paxilin, Crk, Crk-L, protein kinaz C, fosfolipaz C-g, mitojenle aktive olan protein kinaz gibi fokal yapışma bileşenleri (MAPK) p42/44-ELK-1, PI3-kinaz, AKT ve nükleer faktör kappa B (NF-kB) gibi bir dizi sinyal yolunu aktive eder. PI3-

kinaz nihayetinde aktin polimerizasyonunda ve hücre iskeleti yeniden düzenlemelerinde yer alan efektör proteinleri artırmak için Rho/Rac/cdc42 aracılığıyla sinyal oluşturur ve bu durum kemotaksis ve adezyon molekülü artışı ile sonuçlanır (35).

SDF-1'in CXCR4'ü doyurulabilir konsantrasyonlardan daha azıyla uyardığı koşullar altında CXCR4 hücre yüzeyinde yeniden ifade edilmek üzere plazma membranına geri taşınır. Bu sırada CXCR4'ün klatrin kaplı çukurlara ve oradan endozomlara hareketi gözlenir. Bununla birlikte, CXCR4 uzun süreli yüksek SDF-1 konsantrasyonlarına maruz kalırsa ve reseptör doygunluğu sağlanırsa, endozomlardan gelen CXCR4'ün önemli bir kısmı, bozunma için lizozoma hareket eder (35).

SDF-1 ayrıca yüksek afinite ile diğer bir reseptör CXCR7'ye bağlanır. CXCR7 kalp ve merkezi sinir sisteminin gelişimi, ilkel germ hücrelerinin göçü, ayrıca tümör büyümesi ve metastazda önem taşır. Her iki reseptör de birbiriyle bağlantılı ve birbirlerinden farklı rollere sahiptir. CXCR7 ayrıca CXCR7-CXCR4 heterodimerizasyonu yoluyla CXCR4 aracılı sinyalizasyonu modüle edebilir. Ancak CXCR7'nin varlığı ve trombosit patofizyolojisine katkısı henüz araştırılmamıştır (40).

4.2.4.3. SDF-1'in Düzenlenmesi

SDF-1, sitokinler/büyüme faktörleri, kemokinler ve diğer düzenleyici faktörler arasındaki karmaşık etkileşimler yoluyla düzenlenir. Örneğin, endotel hücrelerinde SDF-1 gen ekspresyonu transkripsiyon faktörü hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1) tarafından düzenlenir ve iskemik dokularda azalmış oksijen ile doğru orantılı olarak SDF-1'in seçici in vivo ekspresyonu ile sonuçlanır (35).

HIF-1 doku hipoksisinin belirleyici bir aracısıdır ve endotelial hücrelerinde hipoksi ile doğrudan bağlantılı olarak SDF-1 ifadesini artırır. Doku yenilenmesi sırasında SDF-1 ekspresyonu düzenli oksijenizasyondan sonra normalleşir. Düşük oksijen konsantrasyonu farklı hücre tiplerinde (monositler, monosit türevli makrofajlar, tümörle ilişkili makrofajlar, endotelial hücreler ve kanser hücreleri) CXCR4'ün yüksek ekspresyonunu indükler, bu da SDF-1'e artan kemotaktik yanıtla paraleldir (38).

Aynı zamanda düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) artışı ile seyreden hiperkolesterolemide de periferik kanda artmış SDF-1 seviyeleri trombositlerde, CXCR4-pozitif B lenfositlerde, nötrofillerde ve karaciğer progenitor hücrelerde artışa neden olmuştur.

Yüksek kolesterolün kemik iliğinde SDF-1: CXCR4 aksına etki ettiği lenfositler, trombositler ve hematopoetik kök hücre mobilizasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (41).

4.2.4.4. SDF-1'in Trombosit Etkisi

SDF-1 anti-apoptotik potansiyeli ile muhtemelen dolaşımdaki trombositlerin hayatta kalmasını ve dönüşümünü düzenliyor olabilir. Bu nedenle, trombositler sadece SDF-1 kaynağı değil aynı zamanda gelişimleri (yani trombosit biyogenezi- megakaryopoez) ve hayatiyetlerinin devam etmesi SDF-1 tarafından düzenlenmektedir (40).

Trombositlerin göç ettiği ve böylece damar duvarını istila ettiği gösterilmiştir. Trombosit göçü SDF-1 tarafından uyarılır. Sonuç olarak, trombosit göçü, Ca^{2+} kanalı olan Orai1'in ve Ca^{2+} ile aktive olan K^+ kanalı SK4'ün aktivasyonuna bağlıdır, ancak Cl^- kanallarının aktivitesi ile muhtemelen ilişkili değildir. Bir çalışmada, trombositlerin SDF-1 ile uyarılan migrasyonunun, Ca^{2+} kanal inhibitörleri (2-APB ve SKF96365)'nin yanı sıra K^+ kanal inhibitörlerine duyarlı olduğu, ancak Cl^- kanal inhibitörü (NPPB)'ye karşı duyarlı olmadığı gösterilmiştir (42).

CCL22 (macrophage-derived chemokine, MDC) ve SDF-1, trombosit P-selektin ekspresyonunu indükleyebilir, kollajen ve fibrinojene trombosit yapışmasını uyarabilir ve çeşitli trombosit kemokinlerinin salınımını indükleyebilir (43).

4.2.4.5. SDF-1'in Megakaryosit Etkisi

CXCR4 daha önce akım sitometri veya ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterildiği gibi megakaryosit farklılaşması boyunca eksprese edilir. Farklılaşmamış hematopoietik progenitörlerde ekspresyonu %50'iken olgun megakaryositlerde %90'a yükselir. Aynı zamanda trombositlerde de ifade edilir (44).

Megakaryopoez çok çeşitli kemokinler, sitokinler ve adezyon moleküllerinden etkilenir. Megakaryositlerden olgun trombosit oluşması iki aşamada kategorize edilebilir. Megakaryosit gelişiminin ilk aşaması $CD34^+$ hematopoietik kök hücrelerin megakaryoblastlara dönüşmesi ve çoğalmasını içerir. İkinci aşamada megakaryositler nükleer endoreplikasyona uğrar, pro-trombosit uzantıları oluşur ve nihayetinde fonksiyonel trombositlere parçalanır. Olgunlaşmalarının sonunda, poliploid megakaryositler kemik iliği endotel hücreleri yoluyla göç eder ve trombositleri doğrudan kemik iliği-intravasküler sinüzoidal boşluğa bırakır (45).

Megakaryositlerin gelişimi, erken dönemde SDF-1, IL-3, GM-CSF ve daha sonra trombopoietin gibi çeşitli hücre sinyal yollarını ve hücre büyümesini düzenleyen faktörleri içeren karmaşık bir süreçtir. Kemotaktik bir faktör olan SDF-1 JAK1, JAK2, STAT2, STAT4 yolunu aktive ederek miyeloid öncül hücrelerin kemotaksisini uyardığı, böylece JAK2 ve PI3K arasındaki etkileşimi arttırdığı bildirilmiştir. Başka araştırmalar SDF-1'in megakaryositlerin mitojen aktive edici protein kinaz yoluyla olgunlaşmasını desteklediğini düşündürmektedir (45).

SDF-1, olgun insan megakaryositler tarafından MMP-9 ekspresyonunu ve salgılanmasını indükler. MMP-9'a karşı nötralize edici antikorlar SDF-1'in neden olduğu megakaryosit göçünü bloke edebilir. SDF-1 megakaryositlerin transendotelial göçünü destekler ve trombosit üretimini in vitro ve in vivo olarak geliştirir (44).

Kanda SDF-1'in sürekli yüksek olması, megakaryosit üzerinde VEGF reseptörü-A (VEGFR-A) aracılı CXCR4'ün artışına neden olur. Bu durum artan trombosit üretimi ile bağlantılıdır. SDF-1 sinyalinin muhtemelen megakaryosit göçünü yönlendiren SDF-1 gradyanı boyunca polarize hale gelen CXCR4 membran reseptörü aracılığıyla gerçekleştiği de bir süredir bilinmektedir. Osteoblastlar endotelial hücreler ve perivasküler mezenkimal stromal hücreler kemik iliğinde SDF-1 üreten hücrelerin başında gelmekte olup, SDF-1'in megakaryosit lokalizasyonu ve daha da önemlisi trombosit üretimi üzerindeki akut ve endojen etkileri belirsizliğini korumaktadır (46).

Hücre kültürleri ile yapılan bir çalışmada, SDF-1 verilmesi farklılaşmanın tüm aşamalarında megakaryositik öncül hücrelerde CXCR4'ün azalmasına neden olmuştur. Ayrıca, SDF-1 başlangıçta erken dönemdeki megakaryosit antijeni CD41'i artırırken, daha sonraki zaman noktalarında (12-16. günler) geç megakaryosit antijeni CD42b'nin azalmasına neden olmuştur. 16. günde SDF-1 ile desteklenmiş kültürlerde olgun megakaryositlerin sayısı önemli ölçüde azalmıştır. Bu bulgular hematopoietik dokularda öncü hücrelerin tutulmasını düzenlemedeki birincil rolünün yanı sıra SDF-1/CXCR4 sisteminin olgunlaşmamış megakaryoblastların oluşumunu uyararak ve olgun megakaryositlerin oluşumunu engelleyerek megakaryosit gelişimin düzenlenmesine katıldığını göstermektedir (47).

Trombosit SDF-1 veya CXCR4 geninin farelere özgü genetik ablasyonu ile SDF-1'in hematopoietik kök hücrelerde mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu, ATP üretimini ve mitokondriyal içeriği düzenleyerek mitokondriyal solunumu düzenlediğini gösterilmiştir. Başka bir çalışmada aktive trombositlerden salınan SDF-1/CXCR4'ün mitokondriyal solunum

rezervine bağılı trombosit enerjisi ve aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli rolü olduğı gösterilmiştir (48).

4.2.4.6. SDF-1'in Embriyogeneze Etkisi

Farelerde SDF-1 geninin hasarı perinatal ölümle sonuçlanır. Embriyonel dönemde eksikliği hem kemik iliğinde hem de karaciğerde B öncül hücre sayısını ciddi şekilde azalmasına neden olur ancak sadece kemik iliğinde miyeloid progenitörler azalır. Bu sonuç B hücresi lenfopoezinden ve kemik iliğinde miyelopoezden SDF-1'in sorumlu olduğunu gösterir (35, 36).

Benzer şekilde CXCR4 eksikliği olan fareler perinatal dönemde ölür, hematopoietik sistem ve sinir sisteminde önemli kusurlar sergiler. CXCR4 eksikliği olan farelerde ciddi şekilde azalmış B hücre lenfopoezi fetal karaciğerde azalmış miyelopoez ve kemik iliğinde miyelopoez yokluğu görülmüştür (49).

CXCR4 eksikliği olan farelerde T-hücre lenfopoezi etkilenmez. Ayrıca düzensiz dış granüler hücre tabakası, ektopik yerleşimli Purkinje hücreleri ve anormal şekilde göç eden granüler hücrelerin sayısız kromofilik hücre kümeleri ile gözlenen gelişimsel beyincik anomalileri gözlenir. SDF-1'den yoksun farelerde aynı kusurlar gözlenir, bu da CXCR4 ve SDF-1 arasında tek eşli bir ilişki olduğunu düşündürür. CXCR4 gelişen vasküler endotelial hücrelerde eksprese edilir ve CXCR4 veya SDF-1'den yoksun fareler gastrointestinal sistemi besleyen büyük damarların kusurlu oluşumuna sahiptir. Ayrıca kalp gelişimleri de kusurludur. Bu reseptör-ligand seçiciliği hematopoietik olmayan hücrelerin göçündeki işlevde olduğu gibi bir reseptöre bağlanan birkaç liganda sahip olmak yaygın olduğundan, kemokinler ve reseptörleri arasında olağan dışıdır (49).

4.2.4.7. SDF-1'in Progenitör Hücrelere Etkisi

Dolaşımda bulunan mezenkimal progenitör hücreler ve fibrositler CXCR4'ü eksprese eder ve SDF-1'e yanıt olarak akciğerlere göç eder. Bu durum bleomisin kaynaklı pulmoner fibrozis modelinde gösterilmiştir. SDF-1'e özgü nötralize edici antikorlar dolaşımdaki bu fibrositlerin akciğere yerleşmesini durdur ve akciğer fibrozunu hafifletir. Ek olarak fare trakeal transplant modelinde submukozal bezler, kanallar ve hava yolu epitelinde SDF-1 ekspresyonunun arttığı; dolaşımdaki progenitör epitel hücreleri için bir kemokin gradyanı

sağlayarak hasarlı hava yoluna hücre göçünü sağladığı ve doku onarımına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (35).

SDF-1'in ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α)'nın vitro ters hücre göçünü uyardığını, ancak dendritik hücrelerin göç hızında önemli bir artışa yalnızca SDF-1'in neden olduğu gösterilmiştir. TNF- α uyarımı ile insan fibroblastlarında ve lenfatik endotel hücrelerde SDF-1 mRNA seviyeleri geçici olarak artarken, SDF-1 protein ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde değişmemiştir (50).

Kemik iliğinde anjiyotensin 1 reseptör eksikliğinin, kemik iliği kaynaklı damar düz kası progenitor hücrelerin (EPC'ler yerine) mobilizasyonunu ve göç etmesini SDF-1'e bağımlı bir şekilde etkileyerek vasküler yaralanmadan sonra neointimal oluşumu engellediğine dair yeni kanıtlar bulunmuştur. Kemik iliğinde anjiyotensin 1 reseptörü bozulmuş farelerde trombosit kaynaklı SDF-1'in yaralanma bölgesinde ve serumda seviyesinde artış büyük ölçüde bozulmuştur, ardından hem dolaşımdaki damar düz kası progenitor hücrelerde hem de neointima'ya yerleşen damar düz kası progenitor hücrelerde azalma olmuştur. ADP reseptör blokörü ile trombosit kaynaklı SDF-1 salınması baskılandığında dolaşımdaki damar düz kası progenitor hücrelerin azalmasına ve neointima oluşumunun zayıflamasına neden olmuştur (51).

SDF-1 /CXCR4 aksının damar düz kası progenitor hücrelerinin yanı sıra endotel progenitor hücrelerin mobilizasyonu ve hedef aramasında da önemli olduğu gösterilmiştir (51, 52). Zernecke ve arkadaşlarının çalışmasında yaralanmadan sonra SDF-1'in bloke edilmesinin EPC'lerden ziyade vasküler progenitor hücreler (VPC)'in göçünün yüzdesini azalttığı gösterilmiştir. Birlikte ele alındığında SDF-1 vasküler yaralanma sonrası neointima oluşumunun patogeneğinde EPC'lerden ziyade VPC'lerin mobilizasyonunda ve hedeflenmesinde tercihli olarak yer alıyor gibi görünmektedir (52).

4.2.4.8. SDF-1'in Akciğer Dokusuna Etkisi

Submukozal bez lümenindeki mukus ve proteoglikanlar, SDF-1'i depolamak ve kemotaksis için SDF-1 gradyanı oluştururlar (37). Ayrıca SDF-1 akut ve kronik akciğer hasarı ve onarımında kritik olan neovaskülarizasyonu indükler. Örneğin astımlı hastalardan alınan bronş biyopsi örnekleri kontrol deneklerle kıyaslandığında, submukozada SDF-1-pozitif makrofajlar ve T lenfositleri ile kan damarlarının sayısında ve SDF-1-pozitif endotel hücrelerinin ko-lokalizasyonunda önemli bir artış görülmüştür. Bu bulgular astımda SDF-1'in

anjiyogenez yoluyla hava yollarının yeniden şekillenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (35, 53).

Trombosit kaynaklı SDF-1'in akciğer yenilenmesini tetiklediği de belgelenmiştir. Akciğerin bir kısmının cerrahi ile çıkarılmasından sonra aktive trombositler pulmoner kapiller endotel hücreleri (PCEC'ler) üzerindeki SDF-1 reseptörleri CXCR4 ve CXCR7'yi uyarak anjiyokrin membran tipi metalloproteinaz MMP14'ü yerleştirdiği, alveolar epitel hücresi genişlemesini ve neo-alveolarizasyonu uyardığı gösterilmiştir. Bu nedenle trombositler hemostatik katkılarının ötesine geçerek akciğer rejenerasyonunu başlatmak için PCEC'leri hazırlar. Bu hemo-vasküler nişin terapötik olarak hedeflenmesi akciğer hastalıkları için rejeneratif tedaviyi mümkün kılabilir (1).

4.2.5. Trombosit Kaynaklı VEGF

VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental büyüme faktörü (PlGF)'nden oluşmaktadır. VEGF-A anjiyogenezde baskın rol oynamaktadır. VEGF-C ve VEGF-D öncelikle lenfanjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynar. VEGF çoklu izoformları olan alternatif ekzon eklemeyle oluşturulmuştur. VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206, VEGF145 ve VEGF183 dahil olmak üzere daha az yaygın izoformlar vardır. Bu izoformları ayırt eden önemli bir özellik heparini bağlamaya yönelik farklı yetenekleridir (54).

1992'de VEGF reseptörü 1 (R1), yüksek afiniteli tirozin kinaz VEGF reseptörü olarak tanımlandı, ancak o zamandan beri düşük afiniteli, yüksek düzeyde homolog reseptör 2'nin (R2) ana sinyal reseptörü olduğu gösterildi. VEGF R1 ve R2 ağırlıklı olarak endotel hücrelerde eksprese edilir. VEGF-A hem R1 hem de R2'ye bağlanır, VEGF-B ve PlGF, VEGF-R1'e bağlanır ve VEGF-C ve -D, VEGFR3'e bağlanır (lenfanjiyogenezde yer alır), ancak proteolitik bölünmeden sonra R2'ye bağlanabilir. VEGFR2 aktivasyonu vasküler endotel hücre mitogenezi ve geçirgenliğini destekleyen ana sinyal reseptörüdür. VEGFR2'deki iki tirozin tortusunun, vasküler geçirgenliğe karşı anjiyogenezi farklı şekilde düzenlediği gösterilmiştir (54).

Hipoksi, HIF-1 yoluyla VEGF ekspresyonunun ana düzenleyicisidir. HIF-1 ve diğer hipoksi ile düzenlenen genler, EGF, PDGF ve onkogenik mutasyonlar (vhl, ras, wnt-kras sinyal yolu genleri) dahil olmak üzere çeşitli faktörler VEGF ekspresyonunu koordine eder ve VEGF ile tetiklenen sinyalizasyonu başlatır. VEGFR1/R2 yoluyla VEGF sinyali, birkaç kinazın aktivitelerini düzenler ve nihai olarak vaskülojenez ve anjiyogenez sırasında hücre çoğalmasını,

göçünü, hayatta kalmasını ve damar geçirgenliğini yönlendirir. Endotel hücreleri, vasküler proliferasyonun en başında yer alır (54).

VEGF reseptöründe azalma veya anti-anjiyogenik faktörlerin eklenmesi büyüyen sıçanlarda arter oluşumunda bir azalmaya ve alveolar septasyonun başarısız olmasına yol açar. Bu nedenle VEGF pulmoner hipertansiyon gelişimini önlemeye yardımcı olabileceği düşünülmektedir (55).

Akciğer gelişim sırasında damarların olgunlaşmada VEGF yüksek oranda rol oynar. Prematürelerde akciğerlerin hiperoksi ataklarına maruz kalmasına bağlı olarak kanama ve vasküler yetmezlik gözlemlendiğine ilişkin çalışmalar vardır. VEGF yeni kan damarlarının anjiyogenik büyümesine yol açan damar proliferasyonunu, göçünü ve tüp oluşumunu uyaran güçlü bir endotelyal hücre mitojenidir. Pulmoner gelişim sırasında anjiyogenez için gereklidir; tek bir alelin silinmesi dahi anjiogenez durdurur ve pulmoner hipertansiyona ve embriyonik ölüme neden olur. VEGF ve VEGF reseptörü mRNA ekspresyonu bronkopulmoner displazide bozulmuştur. Hiperoksiye maruz kalan yenidoğan sıçanlarda dismorfik mikrovaskülatüre ve bozulmuş alveolarizasyona VEGF ve VEGF reseptör ekspresyonundaki değişiklikler katkıda bulunur (56).

4.2.6. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF fibroblastlar, düz kas hücreleri ve glia hücreleri için bir plazma büyüme faktörü olarak tanımlanmıştır. İnsan PDGF'si orijinal olarak ters faz kromatografisi kullanılarak ayrılabilen iki farklı polipeptit zinciri A ve B'nin disülfid bağlantılı bir dimeri olarak tanımlanır (57).

Toplam beş biyolojik aktif PDGF proteini vardır: PDGF'nin dört homodimerine (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C ve PDGF-D) ek olarak bir heterodimer PDGF-AB. Bu nedenle bazı hücreler salgılamadan önce proteolitik olarak işlenen bir heterodimer halinde birleşen PDGF-A ve PDGF-B'yi birlikte eksprese ederler (58).

PDGF'ler hücreler (endotelyal hücreler, makrofajlar ve epitel hücreleri gibi) tarafından salgılanmalarına ek olarak trombositlerde bulunur ve degranülasyon üzerine salgılanır (58).

Bilinen PDGF genleri ve polipeptitleri aynı zamanda yapısal ve fonksiyonel olarak ilişkili olduğu VEGF'ler dahil olmak üzere büyüme faktörleri ailesine aittir. PDGF/VEGF büyüme faktörleri, sistin bağları içeren büyük bir protein üst ailesinin bir parçasını oluşturur (57).

Seçici tirozin kinaz reseptörleri yoluyla sinyallerini ortaya çıkaran PDGF gibi peptit yapılı büyüme faktörleri pulmoner vasküler yenilenmede önemli rol oynamaktadırlar. Ateroskleroz ve restenoz modellerinden elde edilen veriler in vivo olarak PDGF'nin önemli rolünü destekler (57-59).

PDGF'lerin gelişim sırasında çok önemli rolleri vardır, ancak yetişkinlerde normal fizyolojik fonksiyonlar için sınırlı kanıt vardır. Bununla birlikte artan PDGF aktivitesi çeşitli hastalıklar ve patolojik durumlar ile bağlantılıdır. PDGF antagonistleri tedavi için kullanılmaktadır. Aynı zamanda rekombinant insan PDGF-BB'si klinikte bir yara iyileşmesinde tedavi olarak kullanılmaktadır (57).

4.2.7. Trombosit Kaynaklı PAİ-1

Hemostazda serin proteaz inhibitörü (serpin) plazminojen aktivatörü inhibitörü-1 (PAİ-1), doku plazminojen aktivatörünü ve fibrinolizi inhibe ederek pıhtının stabilize olmasını sağlar. Dokularda PAİ-1 ürokinaz plazminojen aktivatörünün inhibisyonu yoluyla hücre dışı matriksin bozulmasını durdurur. PAİ-1 seviyelerinin damar ve dokudaki artışının tromboz, kanser, fibrozis, ateroskleroz, restenoz ve gibi bir dizi patofizyolojik olay ile ilişkili bulunmuştur (60).

PAİ-1 trombosit aktivasyonu üzerine salgılandığı ve bölgesel etki ile endojen fibrinolizi inhibe ederek trombüsün stabilizasyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Trombositlerin PAİ-1 sentezi için mRNA içerdiği ve aktif olarak PAİ-1 sentezledikleri bildirilmiştir (61).

PAİ-1 eksikliği olan farelerde fibrinolizin arttığı, kollajen oluşumunun azaldığı ve hayatta kalma süresinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiş PAİ-1'in doku onarımındaki önemi doğrulanmıştır. Bu bulgular anormal PAİ-1 artışının plazminojen aktivitesini ve oluşan plazmini azalttığı ve böylece hücre dışı matriksi stabilize ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte PAİ-1'in ayrıca çeşitli hücrelerin in vitro ve in vivo adezyonunu ve göçünü düzenlediği gösterilmiştir. PAİ-1 artışı plazmini inhibe ederek değil, lökositlerin ve kollajen üreten hücrelerin hasarlı dokuya göçünü uyarak kollajen birikimini artırır. Bu değerlendirmelere dayanarak PAİ-1'in etki mekanizmasının proteaz inhibe edici aktivitesine mi yoksa hücre adezyonu ve migrasyonu üzerindeki etkilerine mi bağlı olduğu açık değildir. (62).

Trombüs oluşumunun ilk safhasında, PAİ-1'in temel kaynağı trombositlerdir. Bununla birlikte, fibroblast, adiposit, endotel, makrofaj gibi birden fazla hücre tipi çeşitli inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak PAİ-1 sentezleyebilir. Endotelyal hücrelerde PAİ-1 sentezinin hipoksi, reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ve kan akışındaki kesme gerilimi sonucunda arttığı gösterilmiştir. Endotel hücrelerinde PAİ-1 ifadesindeki artış yaşlanma ile de ilişkilendirilmiştir. Dokularda artan PAİ-1 ekspresyonu glomerüloskleroz , karaciğer fibrozisi ve pulmoner fibrozis gibi fibroz doku oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (60).

PAİ-1'in plazminojen aktivasyonunun birincil inhibitörü olarak hareket etmekle kalmayıp, aynı zamanda hücre proliferasyonunu, göçünü ve apoptozu modüle etmede de yer alan, işlevsel olarak karışık bir protein olduğu açıktır. PAİ-1 ekspresyonu sıkı bir şekilde düzenlenir ve normal koşullar altında PAİ-1 plazmada iz protein olarak bulunur. Bununla birlikte kanser, ateroskleroz, diyabet ve şiddetli obezite gibi patolojik bir durumda PAİ-1 seviyeleri önemli ölçüde yükselir. PAİ-1'in anjiyogenezdeki rolü tartışmalıdır ve tam olarak anlaşılamamıştır. PAİ-1'in vitronektine bağlanması yoluyla veya fazla plazmin aktivitesinin durdurarak damar stabilizasyonuna yol açar, plazminojen aktivatörlerinin inhibisyonu yoluyla bu süreci düzenler ve plazminin bileşenlerinin de apoptozu düzenlediği bilinmektedir. Bununla birlikte PAİ-1 hem pro-apoptotik ve hem anti-apoptotik olabilir (63).

Anjiyogenezi analiz eden bir çalışmada, PAİ-1'in endotel hücrelerinin yüzeyindeki Fas-ligandının plazmin aracılığı ile parçalanmasını inhibe ederek pro-apoptotik hücre sinyalini inhibe ettiğini öne sürülmektedir. Bu, PAİ-1'in endotel hücrelerinin apoptozunu nasıl önlediğine ve dolayısıyla anjiyogenezi nasıl desteklediğine dair yeni bir mekanizmayı temsil eder (63).

4.2.8. Trombosit Kaynaklı Endostatin

Hücre dışı matriks kolajen XVII'nin karboksil terminalinin proteaz tarafından hidrolizinin biyoaktif bir ürünü olan endostatin dikkate değer anti-anjiyojenik etkilere sahip endojen bir glikoproteindir. Endostatinin amino-terminal kısmı anti-anjiyojenik aktiviteye sahipken, karboksil-terminal kısmı anti-fibrotik fonksiyona sahiptir (64).

Hücresel düzeyde, endostatin spesifik olarak büyüme faktörünün neden olduğu endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü durdurur. İntegrin bağlanması ardından Src tirozin kinaz/Rho yolu veya mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK)/p38 yoluyla hücre-matriks etkileşiminin bozulmasına neden olur. Endostatin mikrogram dozlarında endotelyal hücre

apoptozunu indükler, VEGFR2 ile doğrudan etkileşime bağlı olarak VEGF aracılı sinyali inhibe eder (65).

Endostatinin PDGFR ve p-ERK (hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz) protein seviyelerini baskıladığı ve bir fibroblast fibroz modelinde skar oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Hasarlı dokuda fibroblastlarda yüksek oranda fosforile olan ERK PDGFR sinyalizasyonu hücre çoğalmasını ve göçünü modüle eder. Endostatinin ERK ekspresyonunu etkilemediği ancak fosforilasyonunu baskıladığı bildirilmektedir, bu da endostatinin PDGFR/ERK sinyalinizasyonunu düzenleyerek fibrozisi hafifletebileceğini düşündürmektedir (66).

Endostatin güçlü bir anjiyogenez inhibitörüdür. Anjiyogenez, insan akciğerinin gelişimi için merkezidir. Endostatinin insan akciğerinin gelişimindeki rolü ve bunun kronik akciğer hastalığıyla bağlantısı bilinmemektedir. Pulmoner endostatin proteini ekspresyonunun paterni ve erken doğan bebeklerde trakeal aspirat sıvısında tutarlı endostatin proteini varlığı akciğerin fizyolojik gelişiminde bir rolü olduğunu göstermektedir (67).

4.2.9. Trombosit Kaynaklı Trombospondin-1

Trombospondin (TSP)'ler, hücrel işlevleri düzenlemede çeşitli rollere sahip olan ve beş üyeden oluşan bir protein ailesidir. Trombospondin-1 ve trombospondin-2 ailedeki trimerik yapıda proteinleri, trombospondin-3, trombospondin-4 ve COMP (Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini) pentamerik yapıda proteinleri içerir. Trombospondin 1 ve 2 yalnızca belirli gelişim aşamalarında, doku yeniden şekillenmesi, yaralanma inflamasyon yanıtında genellikle hücre dışı matrikste bulunur. Pek çok hücre tipi, spesifik büyüme faktörlerine yanıt olarak trombospondin-1'i sentezler ve salgılar, ancak yaralanma bölgelerinde hücre dışı matrikste biriken trombospondin-1 trombosit α -granüllerinden salgılanır. Bu bağlamda trombositler tarafından doku hasarı bölgelerinde trombospondin-1'in hızla birikmesi önemlidir (68, 69).

Trombospondin ailesinin diğer üyeleri doğal kaynaklardan izole edilmiş veya memeli veya böcek hücrelerinde eksprese edilen plazmid veya viral yapılar kullanılarak rekombinant proteinler olarak hazırlanmıştır. Trombospondin-2'nin tam uzunlukta ve kesik formları rekombinant proteinler olarak ifade edilmiş ve saflaştırılmıştır. Trombospondin-3 bir rekombinant protein olarak hazırlanmıştır. Trombospondin-4'ün tam uzunluktaki ve kesik formları ekspresyon plazmitleri, bakulovirüs ve adenovirüs vektörleri kullanılarak incelenmiştir. COMP'nin kıkırdaktan izolasyonu ve saflaştırılmış rekombinant COMP'nin hazırlanması için yayınlanmış yöntemler mevcuttur (68).

Anjiyogenezin trombospondin-1 ve trombospondin -2 tarafından düzenlenmesi incelendiğinde trombospondin -1 ve trombospondin -2'nin endotel hücrelerinin içinde ve çevresinde VEGF biyoyararlanımının ve aktivitesinin baskılanması, endotel hücre apoptozunun indüklenmesi, endotel hücre göçünün inhibisyonu ve nitrik oksit sinyalinin baskılanması gibi anjiyogenezi yöneten moleküler olaylar üzerindeki etkili olduğu gösterilmiştir (70).

Trombospondinler çok çeşitli diğer proteinlerle etkileşime giren çok yönlü proteinlerdir. Bu nedenle işlevleri dinamik ve pleiotropiktir. Bazı çalışmalarda trombospondin-1'in anjiyogenezi artırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda trombospondin-1'in izole edilmiş amino-terminal bölgesinin anjiyogenezi artırdığı da gösterilmiştir. Ancak trombospondinin antianjiyenez özelliğini baskın görünmektedir (70).

Trombospondin-1 doğrudan etkileşimler yoluyla ve hücre tarafından salgılanan diğer bileşenler üzerindeki etkileri yoluyla hücre dışı matriksin yapısını ve işlevini etkiler. Kollajenlerin ve diğer matriks moleküllerinin sentezini artırır, TGFβ'yi aktive eder. Fibrinojene bağlanır ve fibrin pıhtısının oluşumunu sağlar. Fibrin trombospondin-1 varlığında daha hızlı oluşur, trombospondin-1 yokluğunda oluşana göre daha ince ve daha fazla sayıdadır. Trombospondin-1 Faktör XIIIa'nın aktivitesi ile fibrine kovalent olarak bağlanır. Çeşitli trombospondinlerin fibronektin, laminin, matrilinler, kollajenler ve diğer hücre dışı matris proteinlerine bağlandığı gösterilmiştir. Ancak trombospondin-1 trombospondin ailesinin TGFβ'yı aktive etme yeteneğine sahip tek üyesidir (68).

Trombosit trombospondin-1'nin anjiyogenezi engellediği ve altta yatan mekanizmaları kesin olmasa da çalışmalar trombospondinlerin SDF-1'in hücre içi depolardan salınmasını önlediğini ve MMP-9'u azalttığını göstermektedir. Mekanizma ne olursa olsun trombositler hem anjiyogenezi destekler hem de patolojik durumlarda anjiyogenezi sınırlandırmada önemli roller oynadığını doğrudan etkile göstermektedir (71).

4.2.10. Trombositler ve Anjiyenez

Trombositler vasküler ve doku yaralanmasından sonra yaraları kapatmak için ilk yanıt oluşturan hücreler olarak önemli bir işleve sahiptir. Trombositler hemostazın sağlanmasının yanı sıra, yeni kan damarlarının oluşumunu ve büyümesini uyaran faktörleri üretir ve salarlar. Anjiyogenezi hem başlatabilir hem de durdurabilirler. Bugüne kadar trombositlerde en az 20 anjiyenez düzenleyici faktör tanımlanmıştır. Trombosit kaynaklı anjiyenez düzenleyiciler yara iyileşmesi, tümör büyümesi ve iskemiye yanıt olarak anjiyogenezi

destekler. Trombositlerde, anjiyogenez düzenleyici moleküller öncelikle α -granüllerde depolanır, ancak sitozolde de bulunur veya membran lipidlerinden de üretilir (72) .

Kan damarı oluşumu bölgesel olarak pro- ve anti-anjiyogenik sinyallere hücrel yanıtın bütünü olan karmaşık ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir süreçtir. Trombositlerin anjiyogenez düzenleyicileri için ayrı bir rezervuar olduğunu ve aktivasyon üzerine damar oluşumunu ortaya çıkarma veya kısıtlama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Trombositler anjiyogenik düzenleyicilerin tek kaynağı olmasa da, hızlı aktivasyonları ve ardından faktörlerin salınması ile dokuda yerleşik hücreler tarafından sitokinlerin de novo sentezine kıyasla daha hızlı bir mikroçevre oluşumunu sağlar (71).

4.3. Akut Akciğer Hasarı

Akut akciğer hasarı ağırlıklı olarak sağlıklı olan genç insanlarda görülür ve dünya çapında her yıl binlerce yetişkin ve pediatrik ölümden sorumludur (73).

Akut akciğer hasarı ilk olarak 1967'de Ashbaugh ve meslektaşlarının tanımına göre ALI (Acute Lung Injury-Akut Akciğer Hasarı); "şiddetli nefes darlığı, takipne , oksijen tedavisine dirençli siyanoz , akciğer uyum kaybı ve göğüs röntgeninde görülen yaygın alveoler infiltrasyon olarak tanımlanmıştır (73, 74).

ALI ve ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome-Akut Sıkıntılı Solunum Sendromu) hızlı gelişen ve oksijen tedavisine dirençli akut solunum yetmezliği sendromlarıdır. Çeşitli patolojiler tarafından tetiklenen, inflamasyona bağlı olarak alveoler kapiller permeabilitede artış ve her iki akciğeri de içine alan non-kardiyojenik özellikteki diffüz infiltrasyondur. Kanda çözünmüş oksijen basıncı (P_{aO_2}) ile solunan oksijen fraksiyonu (F_{iO_2}) (P_{aO_2}/F_{iO_2}) arasındaki ilişki, akut solunum yetmezliği olan hastalarda hastalığın ciddiyetini sınıflandıran bir indeks olarak kullanılmaktadır. Oksijenizasyon oranının (P_{aO_2}/F_{iO_2}) ≤ 300 olan olgular ALI, $P_{aO_2}/F_{iO_2} \leq 200$ olan olgular ise ARDS olarak tanımlanmıştır (75). Azalmış akciğer kompliyansı, akciğer grafisinde diffüz alveolar infiltrasyon tipik bulgularıdır (76).

ALI/ARDS pnömoni, aspirasyon pnömonisi, pulmoner tromboemboli, duman veya toksik gaz inhalasyonu gibi direkt ya da sepsis, akciğer dışı enfeksiyonlar, travma, pankreatit, ciddi kan transfüzyonları ve ilaç toksisiteleri gibi indirekt yolla gelişebilmektedir. Direkt yolla oluşan akciğer hasarına bağlı gelişen olgular primer (pulmoner), akciğer dışı nedenlere bağlı

gelişen olgular sekonder (ekstra-pulmoner) olarak tanımlanmıştır (73, 77) . Bununla birlikte risk faktörlerine sahip hastaların yalnızca küçük bir oranı gerçekte ALI geliştirmektedir (73).

4.3.1. Patogenezi

ALI/ARDS gelişiminde asıl nedenin normal endotelial-epitelial bariyerin hasarına bağlı olduğu düşünülmektedir (78).

ALI'nin patogenezi anlamak için ödemin akciğer hava sahasına nasıl girdiğini ve çıkarılmasının önündeki engelleri belirlemek gereklidir. ALI'de alveolar-kapiller membran hasarına bağlı olarak transepitelial nötrofil göçünde ve ortamda sitotoksik ve proinflamatuvar mediatörlerin artışı görülür. Erken dönemde akciğer damar bütünlüğünün kaybı proteinden zengin sıvının hücreler arası boşluğa ve alveollere geçmesine neden olur. Nötrofil hareketten bağımsız olarak bu vasküler bütünlük kaybının sorumlusudur. Uyarılma ile nötrofiller pulmoner mikrovaskülatürde birikir ve aktive olurlar ve proteazlar, reaktif oksijen radikalleri, proinflamatuvar sitokinler ve prokoagulan moleküller dahil olmak üzere çeşitli toksik mediatörleri salarak damar geçirgenliğini artırır. Nötrofil kaynaklı elastaz epitelial bağlantı proteinlerini bozar, apoptozu artırır, epitel üzerinde doğrudan sitotoksik etkiler gösterir (79).

ARDS'nin ilk aşaması eksüdatif fazda, yaygın alveolar hasar, epitel ve endotel hücrelerinin yaralanma ve çeşitli faktörler salınması görülür. Hücre bütünlüğünün kaybı ile oluşan ödem alveollerde gaz alışverişinin bozulmasına neden olur. Pulmoner sürfaktanın seyrelmesi ve disfonksiyonu alveollerin kollapsına ve akciğer kompliyansının azalmasına neden olur (78).

Eksüdatif fazda inflamasyona bağlı olarak yaygın alveol hasarı oluşur. Hastalığın erken döneminde TNF- α , IL-1 ve geç dönemde IL-6 ve IL-8 etkisiyle alveoler alanda artan nötrofil migrasyonu oluşur. Sitokinlerin etkisi sonucu nötrofil aktivasyonu gelişir ve aktive olan lökositlerce üretilen reaktif oksijen ürünleri ve proteazların salgılanmasına bağlı kapiller endotel ve alveol epitelinde hasar gelişir. Hasarlanma sonucu alveol bütünlüğü bozulur ve alveol ödemine karşı koruyucu olan normal bariyer ortadan kalkar, sonuç olarak kapiller permeabilite artışı gözlenir. Protein vasküler alandan interstisyuma sızar ve reabsorpsiyonu sağlayan ozmotik gradyent kaybolur (76).

ARDS'nin sonraki seyri değişkendir. Bazı hastalarda alveoler ödem sıvısının emilmesi ve alveoler epitelin onarımı, ardından klinik iyileşme olur. Bazı hastalarda ise alveoler ödem

devam eder, ardından hiyalin membranların organizasyonu ve intra-alveolar fibrozis ve skar oluşumu yavaş yavaş ortaya çıkar (73).

ALI/ARDS'nin sonraki fibroproliferatif aşaması, epitelyal ve endotelyal hücrelerin proliferasyonu ve akciğer onarım süreçleri ile ilişkilidir. Eksüdatif aşamada, proteinli ortam, sonraki hücrel repopülasyon için geçici bir matris sağlar (80).

Bireysel olarak farklılık gösteren doku biyobelirteç seviyeleri, belirli tipteki akciğer hücrelerinin- epitel veya endotelyal hücreler, bronşioller ekzokrin hücreler (kulüp hücreleri olarak da adlandırılır), nötrofiller, makrofajlar, vb.- hasar, aktivasyonu ya da onarımına neden olur. Akciğer dokusunun iyileşme sürecinde gözlenen bu biyobelirteçler mortalite ve morbiditeyi etkilemektedir (80).

Artan kanıtlar, akut akciğer hasarının iyileşme döneminde trombositlerin gerekli olduğunu göstermektedir. Trombosit ADP yolunun inhibisyonu pulmoner kapiller sızıntıyı önemli ölçüde azaltarak ALI gelişimini önlediği gösterilmiştir (81).

Üç farklı ALI modelini kullanarak, akciğere nötrofil sızmasının ve buna bağlı akciğer hasarının trombositler tarafından yönetildiği gösterilmiştir. Mekanik olarak, trombosit kaynaklı CCL5 ve CXCL4'ü, nötrofil akciğer infiltrasyonuna aracılık etmede çok önemli araçlar olarak tanımlanmıştır (82).

Epitel hücrelerinin yaralanması, aynı zamanda, epitelyal Na^+ kanalları ve Na^+/K^+ ATPaz pompaları yoluyla bu ödemin temizlenmesini sağlayan yolların bozulmasına da yol açar. Tip II epitel hücreleri epitel onarım sürecinde merkezi bir rol oynar; işlevlerinin kaybı düzensiz, fibrozis ile onarıma neden olur (79).

Sürfaktan yıkımı ile artan plazma sürfaktan seviyeleri alveolar epitel hasarının düzeyini ve prognozu belirlemede önemlidir, epitel geçirgenliğini yansıtır. Esas olarak tip I epitelyal hücrelerde eksprese edilen bir transmembran immünoglobulin olan RAGE, ALI ödemi hidrostatik ödemden ayırt etmeye yardımcı olabilir. Proinflamatuvar sitokinler tümör nekroz faktörü α , IL-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-18 morbidite ve mortaliteyi ile ilişkili bulunmuştur. ALI akut kardiyojenik pulmoner ödemi olan hastalardan alınan kan örnekleri karşılaştırılmış ve ALI'de protein C seviyelerinde azalma ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 seviyelerinde artış bulunmuştur (79).

ALI'nin patogenezinde ve genel olarak inflamatuvar reaksiyonda trombositlerin rolü büyük ölçüde yeterince anlaşılmamıştır. Çalışmalar, akciğer endotel hasarında trombositler ve nötrofiller arasında sinerjistik bir etkiye işaret etmektedir. Trombositler doğrudan nötrofiller ve monositlerle etkileşime girer, aynı zamanda kendileri de proinflamatuvar sitokin kaynağıdır (79).

Sistemik endotel aktivasyonunun derecesi, vWF'nin dolaşıma ve pulmoner ödem sıvısına salınmasıyla tahmin edilebilir. ALI/ARDS'li hastalarda hem alveolar epitelyal hem de endotelyal hasarın bir belirteci olan çözünür hücreler arası adezyon molekülü-1'in (sICAM-1) seviyesiyle de önemli olabilir. Zamanla artan plazma sICAM-1 seviyesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Endotel biyobelirteçlerinden anjiyopietin-1 (Ang-1) apoptozu ve inflamasyonu azaltarak endoteli stabilize eder ve anjiyopietin-2 (Ang-2) ise inflamasyonu, apoptozu ve geçirgenliği artıran zıt etkilere sahiptir. Bu nedenle Ang-2'nin Ang-1'e oranı ALI'de mortalitenin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Endotelyal hücrelerde ifade edilen diğer bir faktör E-selektindir. Bu adezyon molekülü lökosit-endotelyal adezyonda yer alır ve yükselmesi ALI'de daha yüksek mortalite ile ilişkilidir. Epitel ve vasküler yapıları destekleyen hücre dışı akciğer matrisinin yaralanması, bazal membranın bir proteini olan laminin, elastin ve desmosinin yüksek seviyeleri ile belirlenebilir (80).

Akut akciğer hasarından sonraki iyileşme sürecinde epitel hücrelerinin çoğalması, tip II hücreler için güçlü mitojenler olan keratinosit büyüme faktörü (KGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi büyüme faktörlerinin seviyesi ile gösterilebilir. Bu iki faktörün artan seviyeleri kötü sonuçla ilişkilendirilmiş bu da daha ciddi yaralanmaları düşündürmüştür. Öte yandan, endotel hücrelerinin proliferasyonu VEGF tarafından ifade edilebilir. VEGF hem vasküler geçirgenliği artırır hem de mitojen olarak görev alır. Endotel ve trombositin yanında VEGF diğer hücreler (tip II hücreler, alveolar makrofajlar veya nötrofiller) tarafından da üretilir. Bu muhtemelen ALI/ARDS hastalarında VEGF düzeylerinin saptanmasının tartışmalı sonuçlara yol açmasının nedenidir (80).

Memelilerde akciğer hasarı ya da akciğerin rezeksiyonu, rezidüel akciğer alveollerinde kütle ve gaz değişim fonksiyonunun restorasyonuna yol açar. Akciğerde büyüme / rejenerasyonu süreci, yeni fonksiyonel alveolar birimlerin oluşum sürecidir. Akciğer rezeksiyonu ile indüklenen neo-alveolarizasyon, alveolar epitel hücreleri, endotelyal hücreler ve mezenkimal hücreleri içeren birkaç hücre tipinin artışı ile oluşur. Bununla birlikte akciğer lobu kaybının, kalan akciğerlerde alveolar rejenerasyonunu nasıl tetiklediği tam olarak bilinmemektedir. Ancak trombositler ve akciğer damarları arasındaki yakın ilişkinin

araştırıldığı çalışmalarda aktive trombositlerin alveolar rejenerasyonunu tetiklediği gösterilmiştir (1).

4.4. Kök Hücre

Kök hücre bir canlıda uzun bir süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen, özelleşmiş hücrelere dönüşebilen hücrelere verilen addır. Aynı zamanda farklı hücre tiplerine dönüşebilen, kendini yenileyebilme gücüne sahip olan hücreler olarak da tanımlanmaktadır. Belirlenmiş bir fonksiyonları yoktur (83).

Temelde gerçek kök hücre tanımı;

- 1- Kendi kendini yenileyebilme yeteneği ya da başlangıçtaki hücrenin karakterlerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (self-renewal),
- 2- Tek bir hücreden birden fazla seri hücrelerine farklılaşabilme (multi-lineage differentiation),
- 3- Belli bir dokunun in-vivo fonksiyonel rekonstrüksiyonudur (83).

4.4.1. Farklılaşma Potansiyeline Göre Kök Hücre Sınıflandırması

1. Totipotent kök hücreler tüm organizmanın hücrelerine bölünebilir ve farklılaşabilir. Totipotens en yüksek farklılaşma potansiyelini gösterir. Hücrelerin hem embriyo hem de embriyo dışı yapılar oluşturmaya izin verir. Zigot bir totipotent hücredir. Zigot daha sonra germ tabakalarından herhangi birine dönüşebilir veya bir plasenta oluşturabilir. Blastokistin iç hücre kütlesi yaklaşık dört gün sonra, pluripotent hale gelir. Bu yapı pluripotent hücrelerin kaynağıdır (84, 85).

2. Pluripotent kök hücre (PSC)'ler tüm germ katmanlarının hücrelerini oluşturur, ancak plasenta gibi ekstraembriyonik yapıları oluşturmaz. Embriyonik kök hücre (ESC)'ler bu hücrelere bir örnektir. ESC'ler, preimplantasyon dönemindeki embriyoların iç hücre külesinden elde edilir. Testisteki teratom oluşumu da aktivitelerini ve spektrumlarını gösteren başka bir örnektir. Kültürleri ve tedavi seçeneği olarak kullanımları, günümüz ve gelecekteki rejeneratif tıp için çok umut vericidir (84, 85).

3. Multipotent kök hücreler (MSC), PSC'lerden daha dar bir farklılaşma spektrumuna sahiptir, ancak bunlar, belirli hücre soylarının ayrı hücrelerinde uzmanlaşabilirler. Çeşitli kan hücrelerine dönüşebilen hematopoietik kök hücreler bu gruba bir örnektir. Farklılaşmadan

sonra, bir hematopoietik kök hücre bir oligopotent hücre haline gelir. Farklılaşma yetenekleri daha sonra soyunun hücreleriyle sınırlıdır. Bununla birlikte, bazı çok potansiyelli hücreler, ilgisiz hücre tiplerine dönüşme yeteneğine sahiptir, bu nedenle bu hücrelerin pluripotent hücreler olarak adlandırılmasını önerilir (84, 85).

4. Oligopotent kök hücreler birkaç hücre tipine farklılaşabilir. Örnek olarak miyeloid kök hücre, beyaz kan hücrelerine bölünebilir ancak kırmızı kan hücrelerine bölünemez (84, 85).

5. Unipotent kök hücreler, en dar farklılaşma yetenekleri ve tekrar tekrar bölünme özel bir özelliği ile karakterize edilir. İkinci özellikleri, onları rejeneratif tıpta terapötik kullanım için umut verici bir aday yapar. Bu hücreler sadece bir hücre tipini, örneğin dermatositleri oluşturabilirler (84, 85).

Kök hücre farklılaşma sürecini etkileyen sinyalizasyon, hücreler arasındaki fiziksel temas veya çevreleyen doku tarafından salgılanan kimyasal maddeler gibi harici ve DNA'daki genler tarafından kontrol edilen sinyaller olan dahili olarak ayrılabilir (84).

4.4.2. Kökenine Göre Kök Hücre Sınıflandırması

Kök hücreler kökenlerine göre beş kategoriye ayrılabilir: embriyonik, fetal, perinatal, yetişkin (yerleşik veya dokuya özgü) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (85).

4.4.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (ESC)

ESC'ler, fertilizasyondan 5-6 gün sonra implantasyon öncesi embriyonun bir aşaması olan blastokistin iç hücre kütesinde bulunan pluripotent kök hücrelerdir. Bu hücreler, 3 birincil germ tabakasının dokusuna farklılaşabilir, kültürde uzun bir süre farklılaşmamış olarak da tutulabilir. ESC'ler, Nanog ve Oct4 gibi transkripsiyon faktörlerinin varlığı ile tanımlanır. Bu faktörler, kök hücreleri kendi kendini yenileyebilen farklılaşmamış bir durumda tutar (86).

İnsan embriyonik kök hücreleriyle ilgili etik, dini ve politik konulara dikkat edilse bile, bu hücrelerin hücre tabanlı tedavi için yaygın olarak kullanılabilmesinin önünde çözülmesi gereken bazı engeller vardır. En çok öne çıkan iki konu, genomik stabilite ve farklılaşma protokolleridir (85).

4.4.2.2. Fetal Kök Hücreler

Sonlandırılmış gebeliklerden fetal kök hücreler elde edilir. Potensi embriyonik kök hücrelerden düşüktür ve kullanımları biraz daha az tartışılabilir. Fetal kök hücreler hücre kültüründe zorlanmadan süresiz olarak bölünemezler. Böyle bir müdahalenin güvenli olup olmadığı düzenlemelere bağlıdır ve düzenlemeler ülkeden ülkeye farklılık gösterir. Bugün mevcut olan nöral kök hücre dizilerinin çoğu cenin kökenlidir ve birçoğu ABD ve Birleşik Krallık'ta klinik deneylerden geçmektedir (85).

4.4.2.3. Perinatal Kök Hücreler

Kökenlerine göre, perinatal kök hücreler üç gruba ayrılabilir: amniyotik sıvı, plasenta (amniyon, villus ve kan kök hücre kaynaklarıdır) ve göbek kordonu (kordon kanı ve Wharton jölesi) kök hücreleri. Göbek kordonundan elde edilen kök hücreler muhtemelen en çok bilinenidir. Ebeveynler, hayatlarını tehdit eden bir hastalıklardan çocuklarını korumak için kordon kanını kök hücre bankacılığı kuruluşlarında saklıyorlar (85).

4.4.2.4. Yetişkin ve Somatik Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler, yetişkin dokusundan elde edilir. Örnekler, insan amniyon epitel hücreleri gibi plasental doku kaynaklı kök hücrelerin yanı sıra MSC'leri içerir. Bu hücrelerin anti-inflamatuvar özellikte olduğu ve hasarlı dokunun onarımını artırdığı gösterilmiştir. Sınırlı farklılaşma kapasitelerine sahiptirler(86).

Vücudun farklı dokularının her birinin kendi doğal yaşam döngüsü vardır. Vücudumuzun sürekli yenilenmesi, yerleşik kök hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasıyla sağlanır; örneğin, insan epidermisi her 3-4 haftada bir, gastrointestinal epitel bir haftadan kısa sürede ve endometriyal epitel ayda bir yenilenir. Yetişkin kök hücreler, oligopotent veya çoğunlukla unipotenttir. Bu hücrelerin sayısı çok sınırlıdır, çok ilgi gören bir konudur. Kök hücreler kan, kemik iliği veya yağ dokusundan kolayca izole edebilirken, kalp veya pankreas kök hücreleri ile bunu yapmak son derece zordur (85).

Otolog hücreler ret veya etik tartışmalarına yol açmadığı için avantajlıdır. Yetişkin kök hücreler plasentanın yanı sıra 3 germ tabakasının tüm dokularından elde edilebilir. Birçok çalışma, yetişkin kök hücre transplantasyonunun, kök hücre farklılaşması ve yeni özelleşmiş hücrelerin üretilmesi yoluyla kemik dokusu onarımı ve iskemik kardiyak dokunun revaskülarizasyonu gibi in vivo hasarlı organları iyileştirdiğini göstermiştir (86).

Hematopoietik hastalıkların tedavisinde kullanılan kemik iliği nakli, muhtemelen günümüzde kullanımda olan tek güvenli ve kontrollü kök hücre temelli tedavidir. Bölgesel yağ alma işlemi (liposuction) ile elde edilmiş yağda bulunan çekirdekli hücrelerin %50'den fazlasında kök hücre belirteçleri içerir. Bu işlem ile elde edilen örnekte tedavi için yeterli sayıda hücre elde edilip edilemeyeceği sorusu henüz yanıtlanmamıştır ancak bu konuda çalışmalar devam etmektedir (85).

4.4.2.5. İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPS)

iPSC'ler, genetik olarak "ESC benzeri bir duruma" yeniden programlanan yetişkin somatik hücrelerden üretilir (86)

Farklılaşmış hücrelerin kaderini bir hücre tipinden diğerine değiştirmek, uzun süredir araştırılan bir konuydu. 2006'da bir grup Japon araştırmacı, farklılaşmış hücrelerin kararlı durumunu bozmayı ve onları embriyonik kök hücre düzeyine döndürmeyi başardı. Bu yeni pluripotent kök hücre türleri, iPS hücreleri olarak adlandırıldı. Heyecan verici bir araştırma ve ilaç geliştirme aracı olmasının yanı sıra iPS hücreleri, in vitro olarak bölünebildikleri için kişiye özel hücre tedavisi için terapötik potansiyele sahiptir. Süresiz olarak insan vücudunun herhangi bir olgun hücre tipine farklılaştırılabilir. Bu nedenle iPS hücreleri, organ nakli için eşleşen doku eksikliğini ve bağışıklık bastırıcılarla ömür boyu tedavi gereksinimini ortadan kaldırabilir (85, 86).

Yeniden programlama için kullanılan retroviral vektörler ve c-Myc gibi onkogenler, hücrelere transkripsiyon faktörlerini sokmak için kullanılan vektörler kansere neden olabileceğinden, klinik bir çalışmada iPSC'lerin kullanımı sınırlıdır. Güvenli iPSC oluşturmak için yeni yöntemler araştırılmaya devam ediyor (86).

4.4.3. Çeşitli Kökenlerden Kök Hücrelerin Fenotipleri

Kök hücre soyları, dokuya özgü lokalizasyonlarının yanı sıra, belirli işaretleyici proteinlerin ve diğer kök hücreye özgü epitopların ifadesiyle tanımlanır. Bununla birlikte, kök hücre soyları arasındaki örtüşen gen ifadeleri nedeniyle, bir kök hücre genellikle tek bir işaretleyici protein ile sınıflandırılmaz (87).

Kök hücre soyları içindeki doğal fenotipik varyasyonların dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekir. Çeşitli dokulardan elde edilen aynı kök hücre soyunda belirteç ekspresyonunun varyasyonları, pluripotenslerindeki farklılıkları gösterebilir. Kök hücre işareti ifade seviyelerinin hücre döngüsünün fazlarına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Kök

hücrelerin farklılaşmasını anlamak ve bu hücrelerin hücre tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabilmesi için bu kök hücre epitoplarının mekanizmaları ve fonksiyonları hakkında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (87).

4.4.4. Endotelyal Progenitör Hücreler (EPC)

Endotelyal progenitör hücreler (EPC'ler), endotel homeostazı ve damarların yeniden şekillenmesinde rol oynayan, damar duvarı ve kemik iliği kaynaklı dolaşımdaki hücrelerdir. (88). EPC'ler erişkinlerde damar oluşumuna katkıda bulunurlar, iskemik olaylardan sonra neovaskülarizasyona dahil olurlar (89).

EPC'ler, VEGFR (KDR), UEA-1, vWF, CD146 ve CD144 gibi çeşitli spesifik endotelyal antijenlerin gen ifadesinin varlığı ile değerlendirilir (90). EPC'ye özgü bir antijen tanımlanmamış olmasına rağmen, CD34 ile birlikte CD133'ün (ifadesi daha fazla farklılaşma sırasında kaybolan) ve VEGFR2'nin (kinaz ekleme reseptörü olarak da bilinir, KDR) eş zamanlı ifadesinin dolaşımdaki EPC'ni tanımladığı düşünülmektedir (88-92). CD133 ve VEGFR-2'yi eksprese eden, ancak CD34'ü eksprese etmeyen multipotent progenitör hücreler, dolaşımdaki EPC'nin olası kaynaklarıdır. CD34, yalnızca progenitör hücrelerde değil, aynı zamanda olgun endotel hücrelerinde de eksprese edilir, CD133 olgun endotel hücrelerde yoktur. Bu nedenle, CD133'ün, CD34'ten daha spesifik bir kök hücre belirteci olduğuna inanılmaktadır (89) .

4.4.5. Kök Hücre ve Hipoksi

Düşük oksijen konsantrasyonu gen ifadesinde değişiklikler ile hücresel farklılaşma, çoğalma ve hücre göçü gibi birçok olayı etkiler. HIF-1 ile tetiklenen yollar ile kök hücreler hipoksiye yanıt oluştururlar (93). HIF-1 iki alt birimden oluşur: HIF-1 α / -2 α ve diğeri aril-hidrokarbon-reseptör nükleer translokatorü olarak da bilinen HIF-1 β . HIF-1 α hemen hemen tüm çalışılan memeli hücre tiplerinde eksprese edilirken, HIF-2 α sadece endotelyal hücreler, böbrek interstisyel hücreler ve hepatositler gibi belirli hücre tiplerinde tespit edilebilir (94).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Sunulan tez Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 22L0230002 No'lu “Kronik İntermittant Hipoksinin Trombositlerin Anjiogenez Fonksiyonlarına ve Akciğerde Multipotent Epitelyal Kök/Progenitör Hücrelerin Yerleşimine Etkisi.” başlıklı lisansüstü tez projesi olarak desteklenmiştir.

5.1. Etik Yaklaşım

Çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan alınan 16/06/2021 tarih ve 2021-11-91 ve 13/10/2021 tarih ve 2021-17-159 karar numaralı etik kurul onayları ile gerçekleştirilmiştir (Ek 1, 2). Deney hayvanları T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hayvan barındırma ruhsatı verilen deney hayvanı bakım ünitesinde, hayvan refahını gözeterek ve uluslararası etik kurallara uygun şekilde barındırılmıştır.

5.2. Deney Hayvanları

Çalışmada, A.Ü. Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Yetiştirme ve Temini Laboratuvarı'nda üretilen 35 adet, 10 haftalık, erkek Wistar Albino türü (*Rattus norvegicus*) sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar adaptasyon için deneyler başlamadan bir hafta önce A.Ü Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki deney hayvanları barınma laboratuvarına getirildi, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, 22-24°C sıcaklık ve %50-55'lik bağıl nemli ortamda barındırıldı. Standart sıçan yemi ve musluk suyuna serbest erişimleri sağlandı. Laboratuvara adaptasyon dönemini takiben hayvanlar rastgele gruplara ayrıldı:

1. Kontrol Grubu (n=7)
2. Akciğer Hasarı Grubu (AH, n=7)
3. Kronik Aralıklı Hipoksi Grubu (KH, n=7)
4. Kronik Aralıklı Hipoksi + Akciğer Hasarı Grubu (KH+AH, n=9)

Örneklem büyüklüğü hesabı Arifin, W. N., & Zahiruddin, W. M. (2017) çalışması kullanılarak gerçekleştirilmiştir (95). İstatistiksel anlamlılık için grup sayıları en az 6 olarak belirlendi. Kronik aralıklı hipoksi uygulaması ve akciğer hasarı uygulamasına bağlı oluşabilecek komplikasyonlar ile muhtemel kan ve trombosit kayıpları göz önüne alınarak deneye dahil edilen

hayvan sayıları artırıldı. Çalışmada AH hasarı grubunda bulunan iki hayvan, KH+AH grubunda olan bulunan üç hayvan kaybedildi. Çalışma yukarıda verilen örnek sayıları ile tamamlandı.

5.3. Kronik Aralıklı Hipoksi Uygulaması

Hipoksi uygulanan gruplar (KH ve KH+AH) hipobarik hipoksik kamarada 42 gün boyunca, günde 6 saat, 3.000 metre yüksekliğe karşılık gelen atmosferik basınç (69,3 kPa, 520 mmHg, $\approx 14\% O_2$) ortamında tutuldular (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Hipoksi Uygulamasının Yapıldığı Kamara Sistemi

5.4. Akut Akciğer Hasarı Oluşturulması

Son hipoksi uygulamasından 24 saat sonra akciğer hasarı gruplarında yer alan deney hayvanlarına steril koşullarda anestezi altında (intramusküler 90 mg/kg Ketamin + 10 mg/kg Xylazine enjeksiyonu ile ağırlı uyarana yanıt vermedikleri tespit edildiğinde) trakeostomi açılarak intratrakeal yoldan lipopolisakkarit (Lipopolysaccharides from Escherichia coli 055:B5) 100µg/100g dozunda verildi. Takiben hayvanlar genel anesteziden çıkmadan önce trakeostomileri eriyen sütür ile kapatıldı.

5.5. Doku Örneklerinin Alınması

Lipopolisakkarit uygulamasından 3 gün sonra, lipopolisakkarit uygulanmayan gruplarda son hipoksiden 4 gün sonra anestezi altında (intramusküler 90 mg/kg Ketamin + 10 mg/kg Xylazine) hayvanlar feda edildi. Literatürde genel olarak lipopolisakkarit ile akciğer hasarı oluşması için beklenmesi gereken süre 4-24 saat olarak bildirilmiştir (96, 97). Akciğerde hasar sonrası SDF-1'nin en yüksek değerine ulaştığı ve endotelial progenitör hücrelerin akciğerde yerleşmeye başladığı gün bleomisin uygulamasından sonra üçüncü gün olarak gösterilmiştir (98). Bu nedenle çalışmamızda akciğer hasarı sonrası kök hücrenin yerleşiminin değerlendirilmesi akciğer hasarından sonraki dördüncü günde yapıldı.

Abdomen ve toraks boşlukları açılmadan önce intrakardiyak kan örnekleri sitratlı enjektörler ile alındı. Kan alımından sonra toraks boşluğu açılarak akciğer dokusu çıkarıldı.

Akciğer dokuları %4 paraformaldehit (PFA) solüsyonunda 1 gece boyunca + 4 °C'de bekletilerek fikse edildi. Daha sonra dokuların, 1,2 m süroz+ %0,1 fiksatif PFA karışımı içinde +4 °C'de bir gece çökmesi beklendi. Dokular kurutma kağıdında kurutulduktan sonra kriyomatrikse gömülerek kesit alınana kadar -18 °C de saklandı.

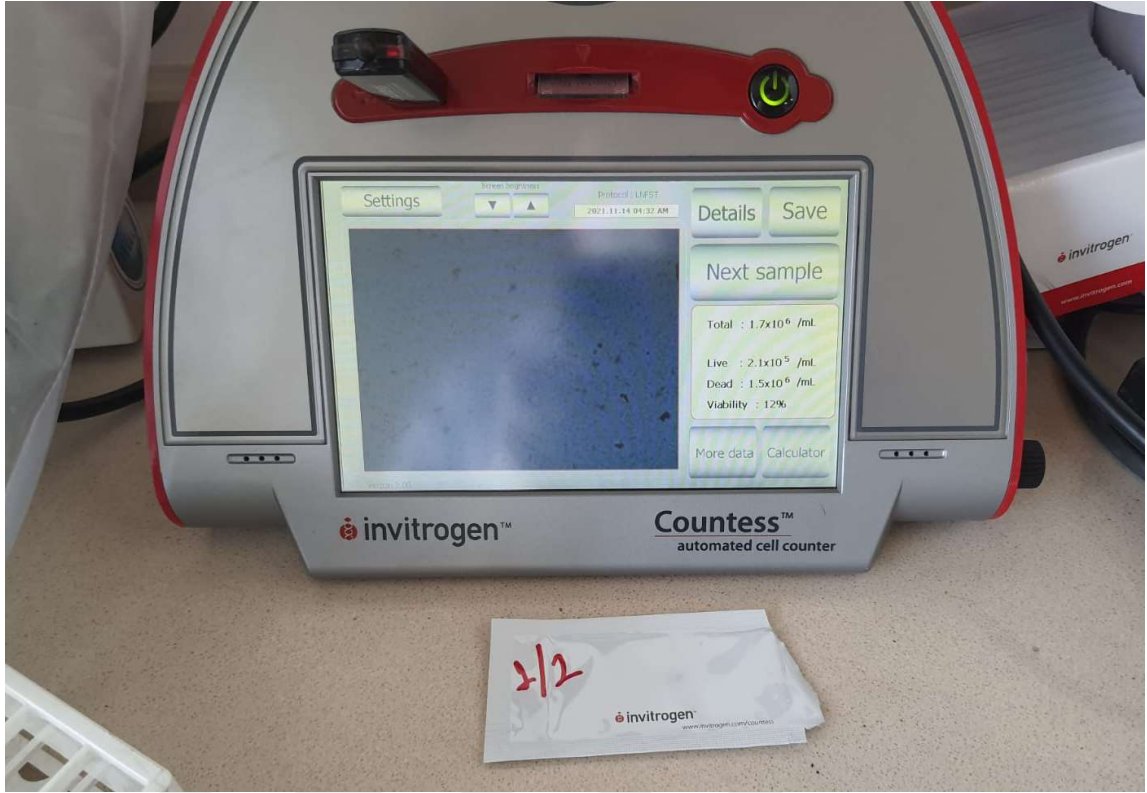
5.5.1. Trombositten Zengin Plazma Hazırlanması

Trombositten zengin plazma (TZP), üç aşamalı yıkanmış trombosit süspansiyonu hazırlama prosedürü kullanılarak hazırlandı (Cazenave, J. P., 2004) (99). Tam kan 6:1 oranında antikoagülanlı sitrat dekstroze solüsyonu (ACD-A) içeren tüplere alındı. Her bir kan örneği 10 dakika 2.300 g'de santrifüjlendi; altta kırmızı kan hücreleri, arada bir "buffy coat" olarak adlandırılan tabaka ve süpernatantta hücreden yoksun plazma olmak üzere üç katman elde edildi. Steril bir pipet kullanılarak, üst ve buffy coat katmanları başka bir tüpe aktarıldı (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Tam Kandan Elde Edilen Trombositten Zengin Plazma

Elde edilen mililitre plazmadaki trombosit sayısı İnvitrogen Countess Otomatik hücre sayım cihazı kullanılarak hesaplandı (Şekil 5.3). Mililitrede bulunan hücre sayıları ile örneklerin mililitreleri çarpılarak her deney hayvanından elde edilen trombosit sayıları hesaplandı.



Şekil 5.3. İnvitrogen Countess Otomatik Hücre Sayım Cihazı ile Trombositten Zengin Plazmada Bulunan Hücrelerin Sayılması

Daha sonra 2.200 g'de 4-6 dakika süreyle yeniden santrifüjlendi. Elde edilen hacim miktarına göre santrifüjleme süresi ayarlandı, 1 ml / 4 dakika olarak belirlendi ve artan her bir mililitre için 1 dakika süreye eklendi. Tüpün alt kısmından trombositler ayrıldı. Üst kısmında bulunan trombositten fakir plazma (TFP) uzaklaştırıldı. Albumin (0,35% , w/v), Heparin (10 U/ml) ve prostaglandin I2 (PGI2, 0,5 µM) içeren çözeltiden standart olarak 5 ml eklenerek trombositler tekrar süspanse edildi. 10 dakika 37°C'de bekletildikten sonra 1.900 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası üstte bulunan kısım uzaklaştırıldı. Albumin (0.35%, w/v) ve PGI2 (0.5 µM) içeren çözeltiden 5ml eklenerek yeniden süspanse edildi ve 1.900g'de 4 dakika santrifüjleme işlemi tekrarlandı. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım uzaklaştırıldı (Şekil 5.4). Trombosit örnekleri -80°C'de dondurularak saklandı.



Şekil 5.4. Üç Aşamalı Yıkama Prosedürü Sonucunda Elde Edilen Trombosit Örnekleri

3.5.2. Histoloji İçin Örnek Hazırlama ve İmmüno Floresan İncelemeler

Histolojik incelemeler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Feda edilen hayvanlardan elde edilen ve uygun koşullarda saklanan dokulardan elde edilen örneklerden Shandon marka kriyotom kullanılarak -15°C 'de $10\ \mu\text{m}$ kalınlığında kesitler elde edildi ve Poly-L-Lisin kaplı lamalar üzerine alındı. İmmunofloresan boyama için hazırlanan lamalar pappen ile çizilip yıkama solüsyonu (tweet 20 + PBS) ile yıkanıp bloklama tamponu (BSA+NGS+ PBS) içinde 30 dk oda sıcaklığında muamele edildi. Sonrasında $+4^{\circ}\text{C}$ de Anti- VEGFR (biossusa-bs-10412R) 1:50 oranında sulandırılarak bir gece bekletildi. Ertesi gün yıkama solüsyonu ile yıkanan kesitler 1:800 oranında dilüe edilen Cy3 (jacksonimmuno-111-165-003) sekonder antikoru ile 37°C de 2 saat inkübe edildi. İnkübatörden çıkarılan kesitler yıkama solüsyonu ile yıkanıp bloklama solüsyonu ile 30 dk beklendikten sonra ikinci boyama için CD133 Antikoru (santa cruz-365537) 1:50 dilüe edilerek 4°C de bir gece bırakıldı. Ertesi gün yıkama solüsyonu ile yıkanan kesitler 1:400 oranında dilüe edilen Cy5 (jacksonimmuno-115-175-146) sekonder antikoru ile 37°C de 2 saat inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile yıkanan kesitler hoechst ile kapatılarak Leica marka konfokal mikroskobu ile incelendi.

3.6. ELİSA Ölçümleri

Elde edilmiş olan doku süpernatant örneklerinden VEGF, SDF-1, PDGF, endostatin, trombospondin-1, PAİ-1 konsantrasyonunun tayini için üreticinin talimatları takip edilerek [Bioassay Technology Laboratory (BT Lab) Rat Vascular Endothelial cell Growth Factor BT-, VEGF ELISA Kit E0659Ra, BT Lab. Rat Stromal cell derived factor 1a, SDF-1a ELISA Kit BT-E0327Ra, BT Lab. Rat platelet-derived growth factor, PDGF ELISA Kit BT-E0691Ra, BT Lab. BT Lab. Rat Endostatin, ES ELISA Kit BT-E0467Ra, BT Lab. Rat Thrombospondin 1, TSP-1 ELISA Kit BT-E0687Ra, BT Lab. Rat Plasminogen Activator Inhibitor 1, PAI-1 ELISA Kit BT-E0636Ra] ELİSA yöntemi uygulandı. Plağa yüklenen örneklerin 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. Örneklerden ve standart çözeltiden elde edilen absorbans ölçümleri birlikte değerlendirilerek örneklerin konsantrasyon değerlerine ulaşıldı. Konsantrasyonlar ng/L protein cinsinden ifade edildi. Elde edilen konsantrasyon değerleri örneği oluşturan trombosit sayısına bölünerek normalize edildi. Faktör/hücre konsantrasyonları 10^{-5} ng/L cinsinden ifade edildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

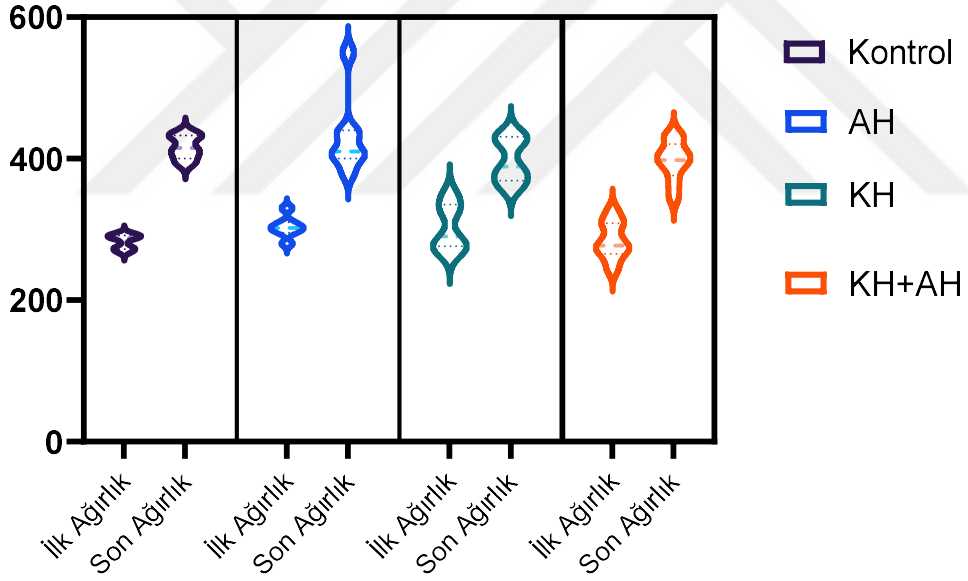
Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Shapiro-Wilk testi) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı istatistikler normal dağılan veriler için ortalama $\pm$ standart sapma, normal dağılıma uymayan veriler için ortanca ile minimum ve maksimum değerler olarak verildi. SDF-1, PAİ-1, PDGF, endostatin konsantrasyonları normal dağılım gösteriyordu. Bu parametreler gruplar arasında ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. İkili karşılaştırmalarda ise Post-Hoc test olarak Bonferroni testi kullanıldı. VEGF ve trombospondin konsantrasyonları, SDF-1/hücre, VEGF/hücre, PDGF/hücre, PAİ-1/hücre, endostatin/hücre, trombospondin/hücre verilerinin normal dağılım göstermediği belirlendiği için bu parametreler gruplar arasında Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. İkili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve Bonferroni düzeltilmesi kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilip analizlerin gerçekleştirilmesinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Versiyon 15.0, Chicago, IL.) kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 kabul edildi. Verilerin grafiklere aktarılmasında GraphPad Prism Version 8.4.3 (686) programı kullanıldı.

6. BULGULAR

6.1. Deney Hayvanlarının Vücut Ağırlığı

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları çalışma öncesinde ve hipoksi uygulamasının bitiminde ölçüldü. Deney hayvanlarının ilk ağırlık ölçümlerinde gruplar arasında farklılık yoktu ($F=1,408$, $p=0,265$). Son ağırlık değerlerinde de gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($F=1,521$, $p=0,235$). Son ağırlıktan ilk ağırlığın çıkarılması ile elde edilen vücut ağırlığı değişimi değerleri karşılaştırılmış olup, ağırlık değişiminin gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği bulundu. ($F=0,985$ $p=0,415$). Ağırlık değişimi yüzde oranı değerleri ağırlık değişiminin ilk ağırlığa bölünmesi ve sonucun 100 ile çarpılması ile hesaplanmış olup, gruplar arası karşılaştırmalarda anlamlı farklılık göstermediği bulundu ($F=0,824$ $p=0,493$, Şekil 6.1, Tablo 6.1).



Şekil 6.1. Deney hayvanlarının ilk ve son ağırlıkları

Tablo 6.1. Deney hayvanlarının ilk ve son ağırlıkları (Ort.±S.S.)

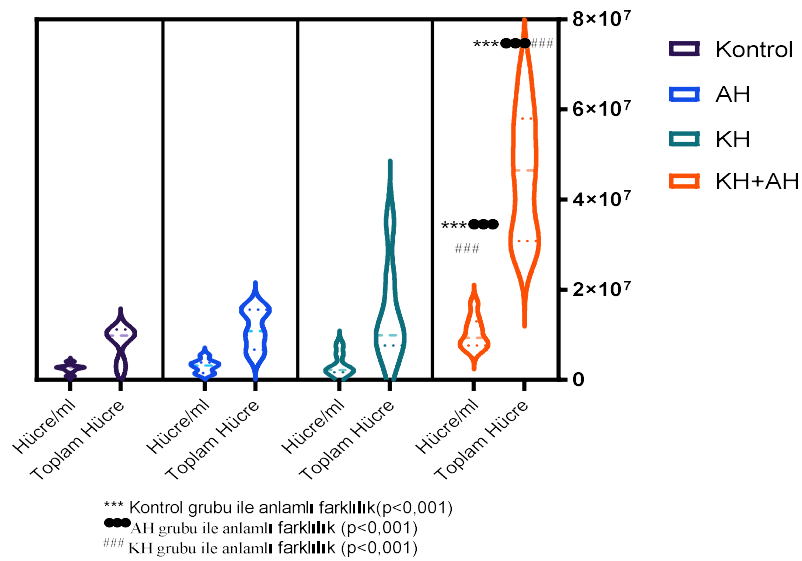
	Kontrol (n=7)	AH (n=7)	KH (n=7)	KH+AH (n=9)
İlk Ağırlık (gr)	283,00 ± 4,58	303,14 ± 5,74	302,29 ± 2,58	284,56 ± 8,76
Son Ağırlık (gr)	416,20 ± 7,65	431,57 ± 1,14	397,00 ± 11,76	397,11 ± 9,39
Ağırlık Değişimi (gr)	95,14 ± 24,77	128,42 ± 21,35	94,71 ± 2,06	112,55 ± 6,75
Ağırlık Değişimi %	33,62 ± 8,74	42,57 ± 7,10	31,72 ± 1,65	39,99 ± 2,81

Ağırlık değişimi = son ağırlık-ilk ağırlık,
Ağırlık değişimi % = (son ağırlık-ilk ağırlık) /ilk ağırlık x 100

6.2. Hücre Sayısı

Otomatik hücre sayım cihazı kullanılarak, santrifüj işleminden sonra elde edilen TZP'nin ml'sinde bulunan hücreler sayıldı. Hücre sayıları gruplar arasında farklılık gösterdi (F=19,71, p=0,00). KH+AH grubunun mililitredeki hücre sayısı diğer gruplardan anlamlı olarak fazla bulundu (Şekil 6.2, Tablo 6.2).

Elde edilen toplam TZP miktarı ile mililitrede bulunan hücre sayısı çarpılarak elde edilen toplam hücre sayısı hesaplandı. Toplam hücre sayısında gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı (F= 24,38, p=0,00). KH+AH grubunda hücre sayısı diğer gruplara göre anlamlı olarak fazla bulundu (Şekil 6.2, Tablo 6.2).



Şekil 6.2. TZP'de bulunan toplam ve mililitrede hesaplanan hücre sayıları

Tablo 6.2. TZP’de bulunan toplam ve mililitrede hesaplanan hücre sayıları [Ort±S.S., Toplam Hücre Sayısı= (Hücre sayısı x Elde Edilen TZP ml. hacmi)]

	Kontrol (n=7)	AH (n=7)	KH (n=7)	KH+AH (n=9)
Hücre Sayısı (hücre/ml)	25,60 ± 3,76x10 ⁵	31,00 ± 5,40x10 ⁵	32,54 ± 9,49x10 ⁵	103,66 ± 11,56x10 ⁵ ***###
Toplam Hücre Sayısı	105,64 ± 16,03x10 ⁵	112,78 ± 16,60x10 ⁵	146,64 ± 40,79x10 ⁵	455,50 ± 47,08x10 ⁵ ***###

*** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık (p<0,001).

*** AH grubu ile anlamlı farklılık (p<0,001).

KH grubu ile anlamlı farklılık (p<0,001).

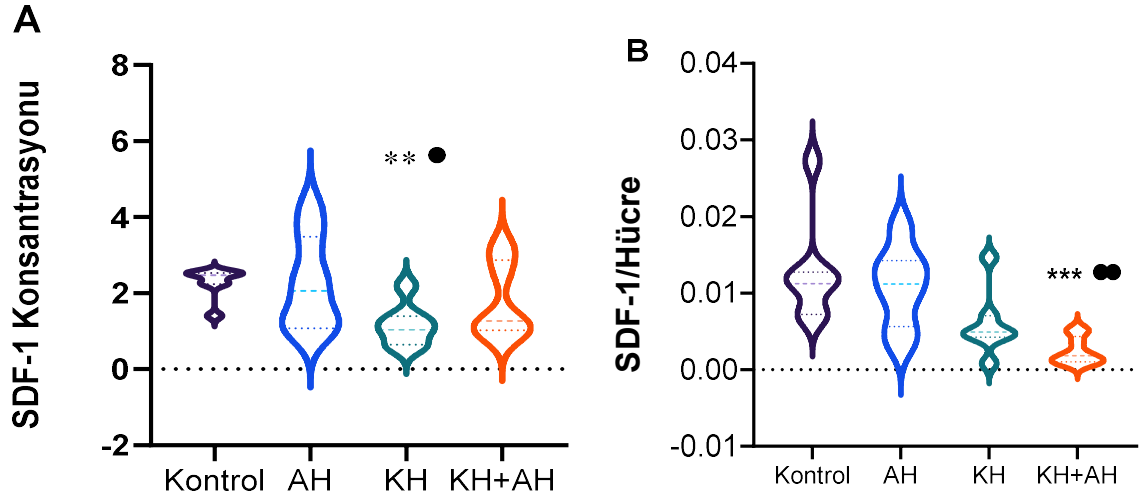
6.3. Trombositlerden Ölçülen Proanjiogenik Faktörler

Trombositlerin parçalanması sonrası elde edilen süpernatanttan proanjiogenik faktörlerin konsantrasyonları ölçüldü, sonuçlar toplam hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen miktarları hesaplandı.

6.3.1. SDF-1

Gruplar arasında SDF-1 konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık bulundu (H=8,33, p=0,04). SDF-1 konsantrasyonları kontrol ve KH grupları arasında anlamlı farklılık gösterdi (M=1,00 p=0,001). AH ve KH grupları arasında da fark anlamlı bulundu (M=8,50 p=0,038) (Şekil 6.3, Tablo 6.3).

Hücre başına düşen SDF-1 konsantrasyonlarının (SDF-1/hücre) gruplar arasında farklılık gösterdiği bulundu (H=16,30, p=0,001). SDF-1/hücre konsantrasyonu kontrol grubu ile KH+AH grupları arasında anlamlı farklılık gösterdi (M=0,00, p=0,00). Aynı zamanda AH ve KH+AH grupları arasında da anlamlı farklılık bulundu (M=3,00, p=0,001, Şekil 6.3, Tablo 6.3).



Şekil 6.3. TZP'den elde edilen süpernatantta SDF-1 konsantrasyonu (A), hücre başına düşen SDF-1 konsantrasyonu düzeyleri (B)

- *** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
- ** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
- AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
- AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,05$).

Tablo 6.3. TZP'den elde edilen süpernatantta SDF-1 konsantrasyonu (ng/L; ortalanca, min;maks) ve hücre başına düşen SDF-1 konsantrasyonu düzeyleri (SDF-1/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min;maks).

	Kontrol (n=7)	AH (n=7)	KH (n=7)	KH+AH (n=9)
SDF-1 Konsantrasyonu	2,47 (1,40; 2,55)	2,06 (2,05; 4,21)	1,04 **• (0,56; 2,19)	1,33 (0,88; 3,26)
SDF-1/Hücre	0,01 (0,006; 0,027)	0,01 (0,003; 0,018)	0,004 (0,000; 0,014)	0,001 ***•• (0,000; 0,005)

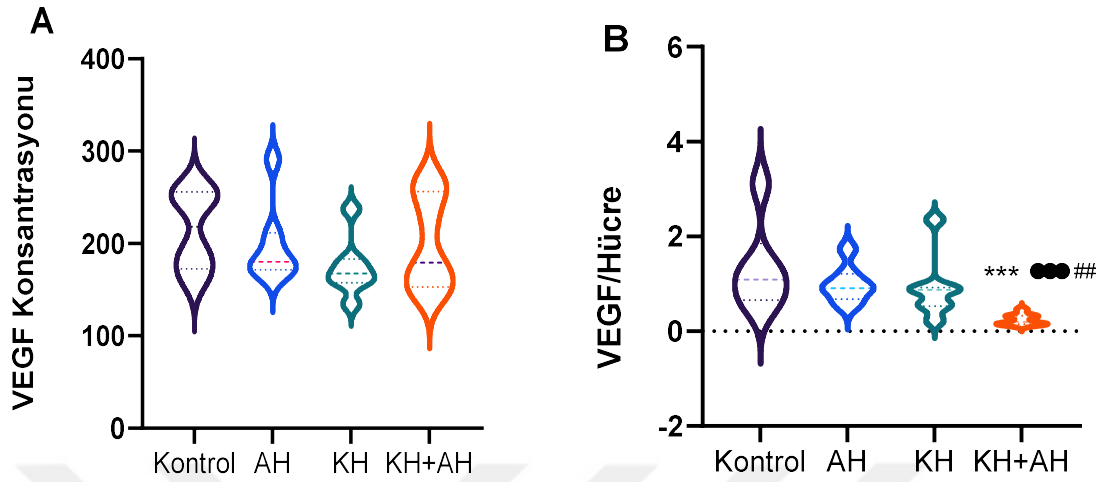
- *** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
- ** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
- AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
- AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,05$).

6.3.2. VEGF

Gruplar arasında VEGF konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($H=3,69$, $p=0,29$, Şekil 6.4, Tablo 6.4).

Hücre başına düşen VEGF konsantrasyonları gruplar arasında farklı bulundu ($H=18,431$, $p=0,00$). VEGF/hücre konsantrasyonu kontrol ve KH+AH grupları ($M=0,00$,

p=0,00), AH ve KH+AH grupları (M=0,00, p=0,00), KH ve KH+AH grupları (M=4,00, p=0,002) arasında anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 6.4, Tablo 6.4).



Şekil 6.4. TZP'den elde edilen süpernatantta VEGF konsantrasyonu (A), hücre başına düşen VEGF konsantrasyonu düzeyleri (B)

*** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık (p<0,001).
 ••• AH grubu ile anlamlı farklılık (p<0,001).
 ## KH grubu ile anlamlı farklılık (p<0,01).

Tablo 6.4. TZP'den elde edilen süpernatantta VEGF konsantrasyonu (ng/L; ortalanca, min;maks), hücre başına düşen VEGF konsantrasyonu düzeyleri (VEGF/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min;maks)

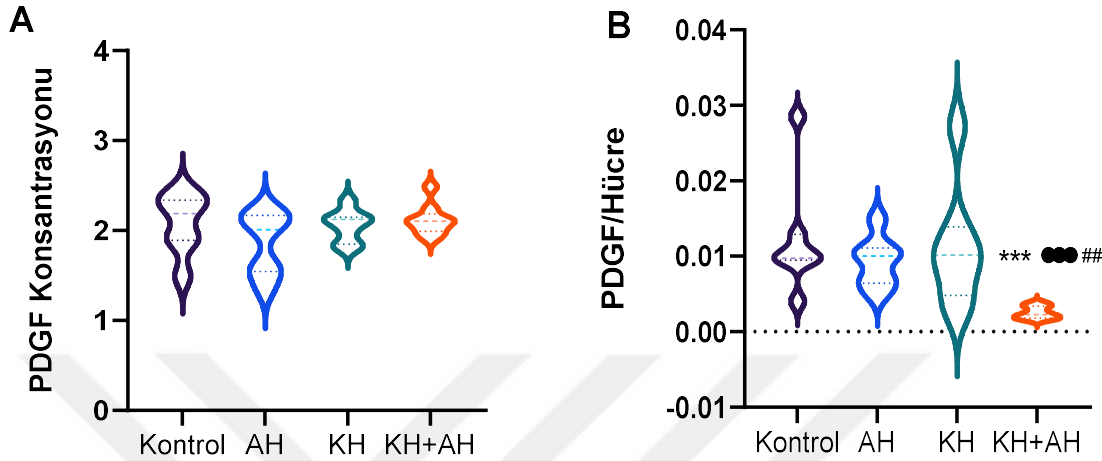
	Kontrol (n=7)	AH (n=7)	KH (n=7)	KH+AH (n=9)
VEGF Konsantrasyonu	243,60 (160,18; 258,20)	180,00 (162,90; 290,23)	167,50 (134,50; 237,20)	179,30 (146,40; 269,75)
VEGF/Hücre	1,091 (0,47; 3,10)	0,91 (0,52; 1,73)	0,87 (0,22; 2,35)	0,19 ***•••## (0,13; 0,45)

*** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık (p<0,001).
 ••• AH grubu ile anlamlı farklılık (p<0,001).
 ## KH grubu ile anlamlı farklılık (p<0,01).

6.3.3. PDGF

PDGF konsantrasyonda gruplar arasında farklılık yoktu (F=1,41, p=0,26) (Şekil 6.5, Tablo 6.5).

Hücre başına düşen PDGF konsantrasyonları arasında gruplar arasında farklılık bulundu ($H=16,894$, $p=0,001$). PDGF/hücre konsantrasyonu kontrol ve KH+AH grupları ($M=0,00$, $p=0,00$), AH ve KH+AH grupları ($M=0,00$, $p=0,00$), KH ve KH+AH grupları ($M=4,00$, $p=0,002$) arasında anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 6.5, Tablo 6.5).



Şekil 6.5. TZP'den elde edilen süpernatantta PDGF konsantrasyonu (A), hücre başına düşen PDGF konsantrasyonu düzeyleri (B)

*** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
 ... AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
 ## KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).

Tablo 6.5. TZP'den elde edilen süpernatantta PDGF konsantrasyonu (ng/L, ortalama $\pm$ SS), hücre başına düşen PDGF konsantrasyonu düzeyleri (PDGF/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortanca, min;maks)

	Kontrol (n=7)	AH (n=7)	KH (n=7)	KH+AH (n=9)
PDGF Konsantrasyonu	2,086 $\pm$ 0,126	1,858 $\pm$ 0,132	2,055 $\pm$ 0,068	2,116 $\pm$ 0,056
PDGF/Hücre	0,0097 (0,004; 0,028)	0,0100 (0,004;0,014)	0,0101 (0,002;0,027)	0,0022 ***...## (0,015; 0,038)

*** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
 ... AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
 ## KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).

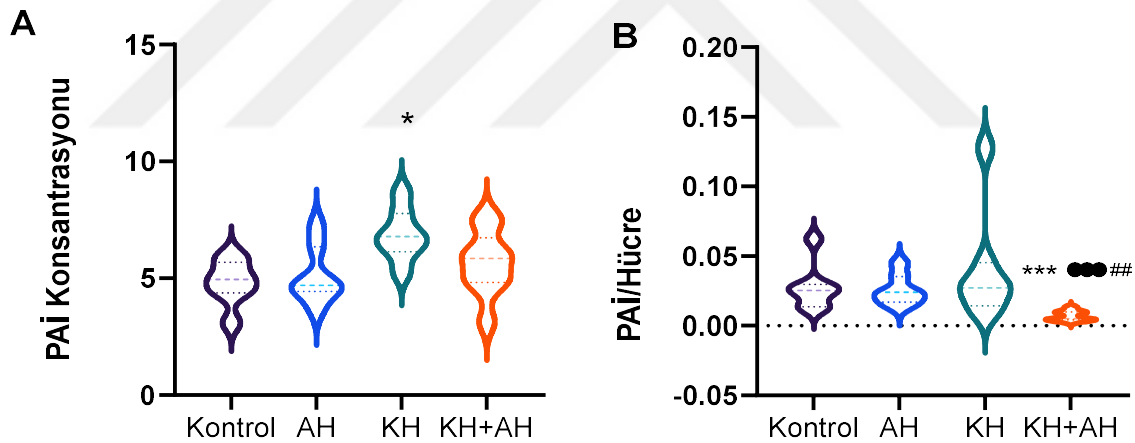
6.4. Trombositlerde Bulunan Antianjiogenik Faktörler

Trombositlerin parçalanması sonrası elde edilen süpernatanttan ölçülen antianjiogenik faktör sonuçları ve toplam hücre sayısında bölünerek hücre başına düşen faktör konsantrasyonları hesaplandı.

6.4.1. PAİ-1

Gruplar arasında PAİ-1 konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık bulundu ($F=3.92$, $p=0.02$). İkili karşılaştırmalarda KH grubunun PAİ-1 konsantrasyonu kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu (Şekil 6.6, Tablo 6.6).

Hücre başına düşen PAİ-1 konsantrasyonları arasında gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi ($H=17,380$, $p=0,001$). PAİ-1 /hücre konsantrasyonu kontrol ve KH+AH grupları ($M=1.00$, $p=0.00$), AH ve KH+AH grupları ($M=0.00$, $p=0.00$), KH ve KH+AH grupları ($M=2.00$, $p=0.001$) arasında anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 6.6, Tablo 6.6).



Şekil 6.6. TZP'den elde edilen süpernatantta PAİ-1 konsantrasyonu (A), hücre başına düşen PAİ-1 konsantrasyonu düzeyleri (B)

*** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).

* Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,05$).

... AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).

KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).

Tablo 6.6. TZP'den elde edilen süpernatantta PAİ-1 konsantrasyonu (ng/L, ortalama $\pm$ SS), hücre başına düşen PAİ-1 konsantrasyonu düzeyleri (PAİ-1/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortanca, min;maks)

	Kontrol (n=7)	AH (n=7)	KH (n=7)	KH+AH (n=9)
PAİ-1 Konsantrasyonu	4,818 $\pm$ 0,365	5,114 $\pm$ 0,465	6,851 $\pm$ 0,421*	5,644 $\pm$ 0,459
PAİ-1/Hücre	0,025 (0,122; 0,062)	0,024 (0,013; 0,045)	0,027 (0,009; 0,127)	0,005 ****## (0,002; 0,013)

*** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p < 0,001$).

* Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p < 0,05$).

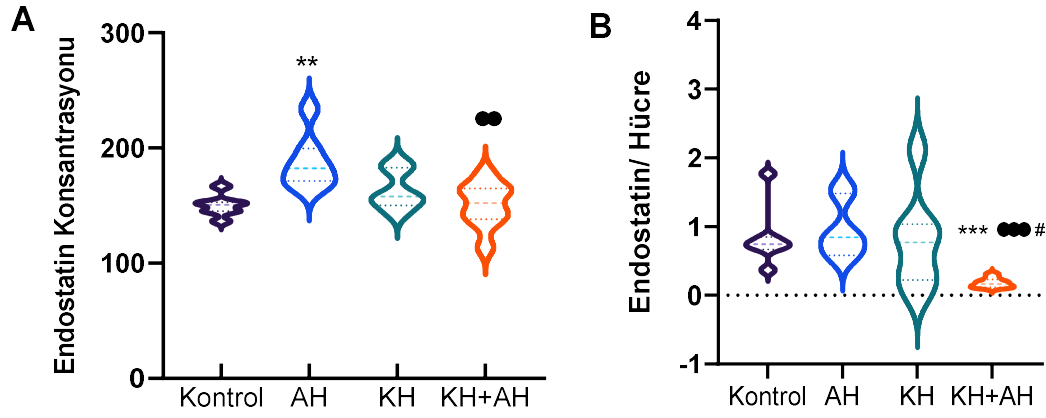
... AH grubu ile anlamlı farklılık ($p < 0,001$).

KH grubu ile anlamlı farklılık ($p < 0,01$).

6.4.2. Endostatin

Gruplar arasında endostatin konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık bulundu ($F=6,490$, $p=0,002$). AH grubunun endostatin konsantrasyonu, kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. AH grubunun endostatin konsantrasyonu KH+AH grubuna göre de anlamlı olarak yüksekti. (Şekil 6.7, Tablo 6.7).

Hücre başına düşen endostatin konsantrasyonları arasında gruplar arasında farklılık bulundu ($H=14,856$, $p=0,002$). Endostatin/hücre konsantrasyonu kontrol ve KH+AH grupları ($M=0,00$, $p=0,00$), AH ve KH+AH grupları ($M=0,00$, $p=0,00$), KH ve KH+AH grupları ($M=11,00$, $p=0,031$) arasında anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 6.7, Tablo 6.7).



Şekil 6.7. TZP'den elde edilen süpernatantta endostatin konsantrasyonu (A), hücre başına düşen endostatin konsantrasyonu düzeyleri (B).

- *** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
 ** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
 ... AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
 .. AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
 # KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,05$).

Tablo 6.7. TZP'den elde edilen süpernatantta endostatin konsantrasyonu (ng/L, ortalama $\pm$ SS), hücre başına düşen endostatin konsantrasyonu düzeyleri (Endostatin/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortalanca, min; maks)

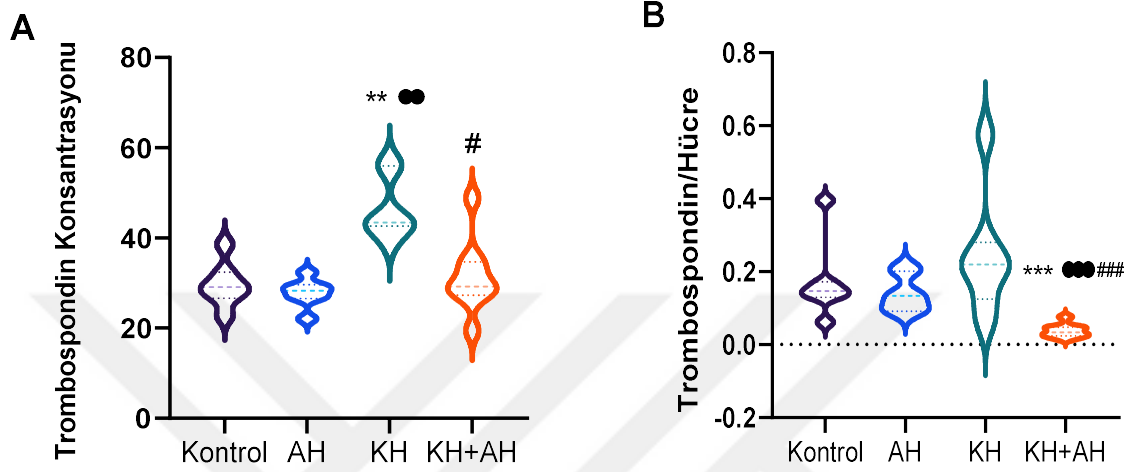
	Kontrol (n=7)	AH (n=7)	KH (n=7)	KH+AH (n=9)
Endostatin Konsantrasyonu	149,942 $\pm$ 3,551	187,085 $\pm$ 9,029**	163,300 $\pm$ 6,956	150,600 $\pm$ 6,531**
Endostatin/Hücre	0,744 (0,369; 3,10)	0,844 (0,576; 1,570)	0,856 (0,224; 2,113)	0,164 ***...# (0,111; 0,310)

- *** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
 ** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
 ... AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
 .. AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
 # KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,05$).

6.4.3. Trombospondin

Gruplar arasında trombospondin konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık bulundu ($H=14,644$, $p=0,002$). Trombospondin konsantrasyonu kontrol ve KH grupları arasında anlamlı olarak farklı bulundu ($M=0,00$, $p=0,001$). Trombospondin konsantrasyonu AH ve KH grupları arasında ($M=0,00$, $p=0,001$) ve KH ve KH+AH grupları arasında da ($M=5,00$, $p=0,003$) anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 6.8, Tablo 6.8).

Hücre başına düşen trombospodin konsantrasyonları arasında gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($H=18,620$, $p=0,00$). Trombospodin/hücre konsantrasyonu kontrol ve KH+AH grupları ($M=1,00$, $p=0,00$), AH ve KH+AH grupları ($M=0,00$, $p=0,00$), KH ve KH+AH grupları ($M=1,00$, $p=0,00$) arasında anlamlı olarak farklı bulundu (Şekil 6.8, Tablo 6.8).



Şekil 6.8. TZP'den elde edilen süpernatantta trombospodin konsantrasyonu (A), hücre başına düşen trombospodin konsantrasyonu düzeyleri (B)

- *** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
- ** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
- ... AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
- .. AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
- ### KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
- # KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,05$).

Tablo 6.8. TZP'den elde edilen süpernatantta trombospodin konsantrasyonu 1×10^{-5} (ng/L, ortanca, min;maks), hücre başına düşen trombospodin konsantrasyonu düzeyleri (Trombospodin/Hücre, 1×10^{-5} ng/L; ortanca, min;maks).

	Kontrol (n=7)	AH (n=7)	KH (n=7)	KH+AH (n=9)
Trombospodin Konsantrasyonu	29,100 (22,720; 38,570)	28,310 (22,060; 32,320)	43,400 *** (39,080; 56,340)	29,230 # (19,460; 48,840)
Trombospodin/Hücre	0,147 (0,061; 0,395)	0,134 (0,090; 0,212)	0,219 (0,060; 0,574)	0,033 ***...### (0,016; 0,075)

- *** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
- ** Kontrol grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
- ... AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
- .. AH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,01$).
- ### KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,001$).
- # KH grubu ile anlamlı farklılık ($p<0,05$).

6.5. Akciğer Dokusunda İmmüno Floresan Boyama ile Endotelial Progenitor Hücrelerin Değerlendirilmesi

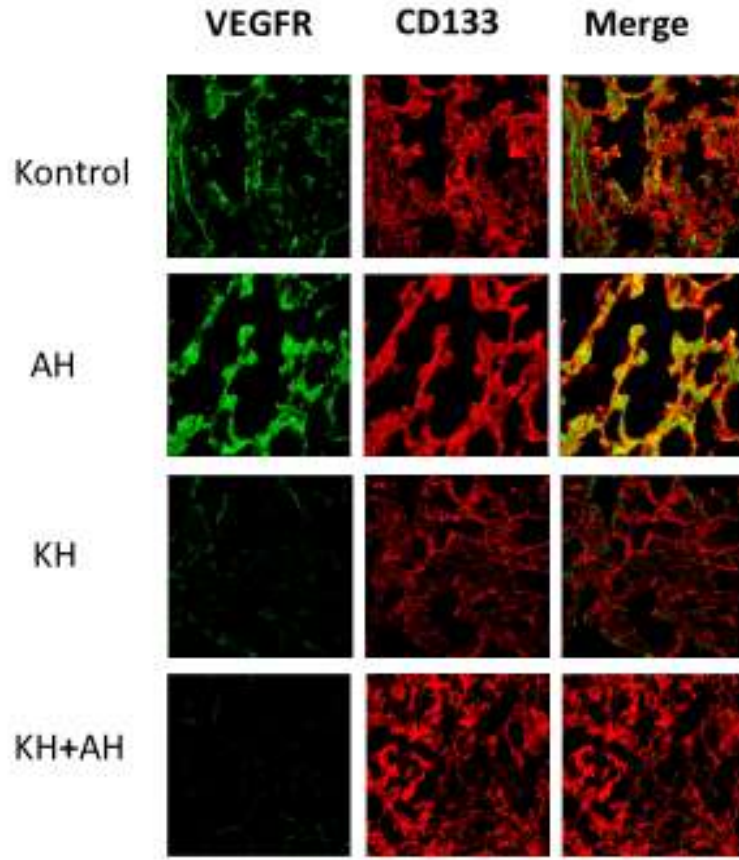
Histolojik çalışma için akciğerden alınan örnekler VEGFR2 (CD309) ve CD133 immüno floresan boyaları ile işaretlendi, konfokal mikroskobu ile akciğer dokularındaki endotelial progenitor hücrelerin varlığı gözlemlendi (Şekil 6.9).

İmmüno floresan boyama ile kontrol grubuna ait akciğer dokusu kesitlerinde VEGFR2+ ve CD133+ hücrelere ait ifadenin güçlü olarak izlenmiştir. Her iki antikorun birlikte ifa edildiği endotelial progenitor hücreler kontrol grubunda bulunmaktadır.

AH grubunda VEGFR2+ ve CD133+ hücrelere ait ifadenin kontrol grubuna göre daha belirgin olarak izlenmiştir. Her iki antikorun birlikte ifa edildiği endotelial progenitor hücrelerin varlığı AH grubunda kontrol grubuna göre daha yoğun gözlemlenmiştir.

KH grubuna ait akciğer dokusu kesitlerinde alveol duvarında VEGFR2+ ve CD133+ hücrelerin ifadenin silik düzeydedir, birleştirilmiş görüntüde her iki antikorun birlikte ifadesi bulunmamaktadır.

KH+AH grubunda VEGFR2+ hücreler KH grubu ile benzer ifadenin gösterirken CD133+ hücreler KH grubuna göre daha belirgin ifadenin göstermiştir. Birleştirilmiş görüntülerde her iki antikorun birlikte ifa edildiği hücreler izlenmemiştir.



Şekil 6.9. Kontrol, AH, KH ve KH+AH gruplarına ait immunofloresan işaretli mikrograflarda akciğere yerleşen CD133+, VEGFR2+ hücelere ait görüntüler izlenmektedir. Alveol duvarında CD133 (kırmızı) ile, VEGFR2 (yeşil) ile işaretli olarak gözlenmektedir. Birleştirilmiş (merge) görüntüde her iki antikorun birlikte ifade eden hücrelerin varlığı AH grubunda yüksek, kontrol grubunda düşük düzeyde izlenirken, KH ve KH+AH gruplarında birlikte ifadenme görülmemektedir.

7. TARTIŞMA

Bu çalışmada kronik aralıklı hipoksiye bağlı trombositlerin anjiogenez modülasyonları ile endotelyal progenitör hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Klinikte akciğer hasarı durumunda trombosit kaynaklı mekanizmaların endotel onarımındaki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda deney hayvanı olarak kullanılan Wistar albino sıçanlara 42 gün, günde altı saat 3.000 m yüksekliğe karşılık gelen hipobarik hipoksi uygulanan grupta kontrol grubuna göre vücut ağırlığı ortalamaları daha düşük bulundu. Ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sıçanlarda üç hafta aralıklı hipoksi uygulamasının vücut ağırlığını azalttığı gösterilmiştir (100). Başka bir çalışmada da 3 ve 10 gün hipoksi uygulaması vücut ağırlığını azaltmıştır (101). Bizim çalışmamızda değişiklik olmaması daha uzun süreli hipoksi maruziyetine bağlı aklimatizasyon kaynaklı olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda elde edilen TZP’de KH, kontrol ve AH gruplarında hem mililitrede bulunan trombosit sayısı hem de toplam trombosit sayısı benzer bulundu. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada çalışmamıza benzer şekilde kronik aralıklı hipoksinin trombosit sayısı üzerinde etkisi olmadığı gösterilmiştir (100).

Bununla birlikte KH+AH grubunun mililitredeki trombosit sayısı ve toplam trombosit sayısı diğer gruplardan anlamlı olarak fazla bulunmuştur. Literatürde farelere kronik hipoksi uygulanmasının 14. gününde megakaryosit boyutunda artış gösterilmiştir (102). Benzer şekilde başka bir çalışmada da kemik iliğindeki megakaryositlerin boyutunda hipoksiye bağlı artış gösterilmiştir. Aynı zamanda akut hipoksinin promegakaryositlerin megakaryositlere dönüşümünü hızlandırdığı ve hem akut hem de kronik hipoksinin megakaryosit ve promegakaryositlerin boyutunu artırdığı gösterilmiştir. Akut hipokside yükselen promegakaryosit sayısı hipoksi uygulaması sonrası başlangıç düzeyine geri dönerken hipoksiye maruz kalma süresinin uzamasıyla megakaryosit sayısı yüksek kalmıştır (103).

Çalışmamızda da KH’nin megakaryosit sayısını ve boyutunu artırmış olabileceği, akciğer hasarı oluşumu ile tetiklenen akut hipoksiye yanıtın da megakaryosit sayısını ve boyutunu etkilemiş olabileceği düşünülmüştür. Megakaryositlerin parçalanması sonucu oluşan trombositlerin sayısındaki artış megakaryosit çapındaki artışa bağlı olabilir.

Trombosit biyogenezinde akciğer mikrosirkülasyonu da önem taşır. Akciğer mikrosirkülasyonunu doğrudan görüntüleyerek yapılan bir çalışmada çok sayıda megakaryositin akciğerde bulunduğu ve pulmoner dolaşımda dinamik olarak trombositleri serbest bıraktıkları gösterilmiştir. Toplam trombosit üretiminin yaklaşık %50'si veya 10 milyon/saat trombosit üretimi ile akciğerlerin önemli bir trombosit kaynağı olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular akciğeri terminal trombosit üretiminin birincil bölgesi ve önemli hematopoietik potansiyele sahip bir organ olarak konumlandırmıştır (4).

Trombosit sayısı mortalite ve morbidite açısından önem taşımaktadır. Pnömoni tanılı 405 hastada yapılan bir çalışmada başvuru sırasında hastaların %14,1'inde trombositoz, %4,2'sinde trombositopeni görülmüş, trombositopeni gelişen hastalarda daha fazla yoğun bakım, invaziv-noninvaziv mekanik ventilasyon ve vazopresör tedavi ihtiyacı olurken, trombositozu olan hastalarda daha sık invaziv mekanik ventilasyon ihtiyacı olmuştur. Başvuru ve takipteki trombosit sayısı ile 30 günlük mortalite arasında fark bulunmamıştır (104).

Sıçanlara 3 hafta boyunca günde 8 saat ve her dakikada iki kez 15 sn süreyle hiperkapnik hipoksik gaz karışımı (minimum %6-8 O₂, maksimum %10-14 CO₂) uygulandığı kronik aralıklı hipoksi modelinin trombosit sayısı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (100).

%5,5-%6,5 oksijen seviyelerinde günde yaklaşık 8 saat tutulan farelerde yapılan bir çalışmada hipoksiden 1-3 gün sonra periferik trombosit sayılarının arttığı, 4. ve 5. günlerde normale yakın değerlere döndüğü, hipoksiden sonra 6. ve 7. gün normal sayıların altına düştüğü gösterilmiştir (105).

Literatürde hipoksinin trombosit sayısına etkisine dair farklı sonuçlar içeren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu farklılıkların nedeninin hipoksi süresi, canlının hipoksik ortama adaptasyonu ve hipoksi koşullarının farklılığı gibi çeşitli nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar KH'nin trombosit morfolojisini ve fonksiyonlarını değiştirdiği fikrini de desteklemektedir. Benzer şekilde çalışmamızda trombositlerin anjiogenezin modülasyonunu sağlayan faktörler düzeylerinde hipoksiye bağlı etkileri bulunmuştur.

İki aydan uzun süre hipobarik hipoksi ortamında yaşayan insanların trombosit transkriptomu ve tromboza yatkınlığı gibi fonksiyonel tepkileri karşılaştırılmış ve trombosit reaktivitesinde, hemostaz ve trombozda görevli protein ekspresyonunda artış görülmüştür

(106). 6 saat hipoksik ortamda bulundurulan trombositlerde yüzey reseptörü ekspresyonu, agonist duyarlılığı, reseptör sonrası sinyal iletimi ve trombositin çevresel ve farmakolojik uyaranlara tepkisini değiştirebilecek proteomik profillerde farklılıklar ortaya çıktığı gözlenmiştir (13).

Başka bir çalışmada kronik aralıklı hipoksinin trombositlerde ortalama trombosit çapında artış, membran fosfolipit yapısında değişiklik, trombosit P-selektin ve sCD40L ifadesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (107).

8 hafta boyunca hem %15 hem de %12 oksijen konsantrasyonu ile yapılan kronik aralıklı hipoksinin şiddetli egzersiz veya akut hipoksinin neden olduğu eozinofil-trombosit agregatlarını, proinflatuar sitokin IL-1 üretimini ve lipid peroksidasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Ancak %12 oksijen konsantrasyonu ile oluşturulan hipoksinin şiddetli egzersiz sonrası eozinofil-trombosit agregatlarının oluşumunu artırdığı, plazma anti-inflatuar sitokin IL-6 ve IL-10'un seviyelerinde artışa neden olduğu, bu etkilerin %15 oksijen konsantrasyonu ile oluşturulan kronik aralıklı hipokside oluşmadığı gösterilmiştir (108).

OSAS olan hastalarda yapılan bir çalışmada kronik aralıklı hipoksinin apne-hipopne indeksi ile trombosit hacmi ve trombosit-lenfosit birlikteliği arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (109). Başka bir çalışmada da benzer şekilde OSAS hastalarında trombosit-lenfosit birlikteliğinin artışı anlamlı bulunmuş ve bu durumun OSAS ve kardiyovasküler hastalıkların gelişimi açısından anlamlı olabileceği bildirilmiştir (34). Minimal semptomatik OSAS olan 57 kişinin kontrol grubuna göre trombosit kaynaklı mikropartikül kan seviyelerinin yüksek olduğu bulunmuştur (110). Bu sonuçlarla hipoksinin trombositlerin proanjiogenez ve antianjiogenez fonksiyonları üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmamızda KH varlığının trombosit kaynaklı SDF-1, PAİ-1, trombospondin konsantrasyonlarını değiştirdiği gözlenmiştir. Bu bulgularımız hipoksinin trombosit fonksiyonlarını değiştirdiğini gösterir niteliktedir.

Hipoksi ile koşullandırılmış serum (HPS; 4 gün boyunca yaklaşık %1 O₂ ortamında hipoksiye maruz bırakılmış insan kan örneklerinden elde edilen serum) ve TZP'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada HPS'de büyüme faktörlerinden VEGF-C, PDGF-B ve bFGF'nin daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu bulunmuştur. Dermal lenfatik endotel hücre kültüründe yapılan çalışmada bu hücrelerin çoğalması ve göçünün hem HPS hem de TZP ile önemli ölçüde desteklendiği gösterilmiştir (111). Bu çalışma hipoksiye yanıt göstermekle birlikte çalışmamıza benzer şekilde KH yanıtına dair bilgi sunmamaktadır.

Literatürde trombosit sayısı ile kanama zamanı arasındaki ilişkinin doğrusal olmadığı, muhtemelen trombosit sayısının yanı sıra trombosit fonksiyonunun yeterliliğinin de önemli olduğu gösterilmiştir (112). Çalışmamızda da benzer şekilde trombosit sayısı ile anjiogenezi etkileyen faktör düzeyleri arasında doğrusal bir ilişki olmadığı görülmüştür. KH+AH grubunda TZP’de mililitredeki ve toplam trombosit sayısı artmış olmasına karşın SDF-1, VEGF, PDGF, PAİ-1, endostatin ve trombospondin-1 faktör düzeyleri hücre sayısı ile orantılı olarak artmamıştır. Bu durum yukarıda öngördüğümüz gibi megakaryositlerde sitoplazmanın büyümesi ile protein sentezinin aynı oranda artmaması ve granüllerin içeriğinin yeterince olgunlaşmamasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu önerimizin araştırılmaya ihtiyacı bulunmaktadır.

Literatürde SDF-1’in hipoksi ile arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Bunun nedeni SDF-1 gen ekspresyonunun HİF-1 tarafından düzenlenmesi ve iskemik dokularda azalmış oksijen ile SDF-1’in ifadesinin orantılı olarak artması şeklinde ifade edilmiştir (35). Ancak çalışmamızda SDF-1 konsantrasyonları KH grubunda AH ve kontrol gruplarına göre daha düşük bulundu. Hücre başına SDF-1 konsantrasyonu ise KH+AH grubunda AH ve kontrol gruplarına göre daha düşük bulundu. Bulgularımız literatür bilgileri ile çelişkili gözükmemektedir.

SDF-1 farklı hücrelerde sentezlenmektedir. Ancak trombosit kaynaklı SDF-1’in kemik iliği kaynaklı progenitor hücrelerin dolaşıma çıkarak hasarlı dokuya yerleşmeyi sağladığı, progenitor hücrenin dokuda hayatiyetini devam ettirmesinin trombosit kaynaklı SDF-1’e bağlı olduğu gösterilmiştir (1, 6, 113). Bu nedenle trombosit kaynaklı SDF-1’in çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermesi önemlidir. SDF-1’in genel olarak hipoksi ile orantılı olarak artış gösterdiği bildirilmektedir. Buna karşın kronik aralıklı hipoksinin SDF-1 üzerine etkisi ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

Aşağıda sıraladığımız literatür verileri incelendiğinde SDF-1 kaynağının bizim bulgularımızdan farklı olarak sadece trombosit kaynaklı SDF-1 olmadığı ve hemen hemen tüm çalışmaların akut hipoksi veya iskemi, iskemi/reperfüzyon çalışmalarında gen ifadesinde gözlenenler olduğu görülecektir.

Doku hasarı ile akut hipoksi oluşturulan bir çalışmada endotel hücrelerinde SDF-1 gen ekspresyonunun HİF-1 tarafından düzenlendiği, SDF-1’in iskemik dokudaki ekspresyonunun azalan oksijen basıncı ile orantılı olduğu, HİF-1 ile indüklenen SDF-1 ekspresyonunun dolaşımdaki CXCR4+ progenitor hücrelerin iskemik dokuya göçünü ve yapışmasını arttırdığı bulunmuştur (114).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada femur kırığı sonrasında 2, 4, 8 hafta kronik aralıklı hipobarik hipoksi uygulamasının kırık çevresindeki kallus dokusunda VEGF, SDF-1/CXCR4 aksının ekspresyonunda önemli artışa neden olduğu gözlenmiştir (115).

Yenidoğan fareler iki hafta boyunca normobarik hipoksiye (%10 O₂) veya normoksiye (%20,9 O₂) maruz bırakılmış, SDF-1'in akciğer dokusunda gen ifadesinin iki kat arttığı, sağ ventrikül içinde SDF-1 gen ifadesinin de belirgin şekilde yükseldiği, sol ventrikülde ise SDF-1'in hipoksiye yanıt olarak yükselmediği gözlenmiştir (116).

Çalışmamızda da KH grubunda trombosit kaynaklı SDF-1'in konsantrasyonunun düştüğü ve muhtemelen buna bağlı olarak akciğer dokusunda kök hücrelerin azaldığı gözlenmiştir. SDF-1, EPC'lerin oluşması için kök hücrelerin güçlü bir uyarıcısıdır. EPC'ler doğrudan yeni oluşan damarlara yerleşen ve parakrin faktörler salgılayarak yeni damarların büyümesini artıran kemik iliği kaynaklı hücrelerdir. SDF-1/CXCR4 aksının aktivasyonu EPC'lerin hayatta kalmalarını ve endotelial hücrelere farklılaşmasını sağlar (5). Deri altı tümör büyümesi ve arka bacak iskemisi modeli kullanılan farelerde trombosit kaynaklı SDF-1'in kemik iliğinden kök hücrelerin angiogenez bölgesine geldiği gösterilmiştir (2). Akciğerin sol lobunun cerrahi olarak çıkarılmasından sonra kök hücreleri uyarak alveolar yeniden büyüme/yenilenmenin trombositlerden salınan SDF-1'e bağlı olduğu gösterilmiştir (1) .

Akciğer hasarı oluşturulan farelerin bronkoalveolar lavaj sıvısı ve plazmada SDF-1 artışının akciğerlere kök hücrelerin göç etmesi ve yerleşmesini artırdığı bulunmuştur (6).

İskemi/reperfüzyon hasarı sonrası yapılan bir çalışmada farelerin mikro sirkülasyonunda trombosit kaynaklı SDF-1'in kemik iliği kaynaklı CD34+ kök hücrelerinin hasarlı endotele adezyonunu ve bu hücrelerin EPC'lere farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir (7).

İskemik olmayan kalp yetmezliği modelinde plazmada ölçülen SDF-1 artışının dolaşımdaki EPC'lerin mobilizasyonunu ve neovaskülarizasyonu başlattığı gösterilmiştir (117).

Aktive trombositlerden salınan hücre dışı veziküllerin adipoz mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu, göçünü, antiapoptotik aktivitesini ve parakrin aktiviteyi artırarak kök hücrelerin anjiyogenik ve vaskülogenik performansını artırdığı gösterilmiştir (118). Bu çalışma ile çalışmamıza benzer şekilde trombosit kaynaklı faktörlerin angiogenezdeki rolünün önemi araştırılmış olmasına karşın faktörlerin kronik aralıklı hipoksi ile değişimi hakkında bilgi vermemektedir.

Trombositin anjiogeneze olan önemli katkısının yanı sıra hipoksi de kök hücrelerin mikroçevresi için önemli bir bileşendir ve kök hücrelerin özelliklerini devam ettirmeleri için önemlidir. Hipoksi, kök hücrelerin enerji metabolizmalarını, gen aktivasyonlarını etkilemektedir (119).

Periferik arterlerin ve alveollerin gelişimi, hem normoksik hem de hipoksik ortamda birbirine bağlıdır (55). Farelerde yapılan bir çalışmada iskemi öncesinde uygulanan kronik aralıklı hipoksinin endotelial CD31+ ve CD34+ hücrelerinin yoğunluğunu önemli ölçüde artırdığı, anjiyogenez ile ilgili moleküllerin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (120).

Yetişkin farelerde günde 12 saat, saatte 60 kez %5'lik hipoksi uygulandığı kronik aralıklı hipoksi modeli uygulanmış, kronik aralıklı hipoksi sonrasında akut hiperoksiye maruz kalmanın sonucu olarak akciğere göç eden hücrelerin arttığı ve bu hücrelerin alveolar onarım için önemli olduğu gösterilmiştir (121).

Literatürden farklı olarak çalışmamızda KH'nin kök hücrelerin varlığını azalttığı, AH sonrasında hasarlı dokuda kök hücrelerin yerleşimini olumsuz yönde etkilediği akciğer doku kesitlerinde gözlenmiştir. Diğer çalışmalarla olan bu farklılığın temel sebebinin hipoksinin farklı yöntem ve sürelerde uygulanmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda gruplar arasında VEGF konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Ancak çeşitli çalışmalarda hipoksinin farklı dokularda VEGF düzeyini ve/veya gen ifadesini artırdığı gösterilmiş olsa da bazı çalışmalarda KH'nin VEGF'de değişikliğe neden olmadığı görülmüştür.

Otomatik gaz kontrollü bir sistem ile kronik aralıklı hipoksi uygulanan sıçanların akciğer dokusundan yapılan gen mikrodizilerinde VEGF-A ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü B dahil olmak üzere gen ifadelerinde artış görülmüştür (121).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada kemik kırığı çevre dokusunda HIF-1 ve VEGF'nin protein ekspresyon seviyelerinin KH uygulamasının 2. ve 4. haftalarda arttığı ancak bu seviyelerin 8. haftada kontrol fareleri ile hemen hemen aynı olduğu bulunmuştur (115).

Sıçanlara KH uygulanan bir çalışmada KH'nin plazmada ve testiküler mikrodolaşımda VEGF seviyelerini artırdığı, testiküler damarlanmayı belirginleştirdiği gösterilmiştir (122).

Bir çalışmada kronik hipoksi ve aralıklı hipoksiye maruz kalmanın sıçan hipokampal dokularında VEGF mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmış, kronik hipoksinin VEGF mRNA ifadesinde önemli artışa neden olduğu, ancak aralıklı hipoksinin böyle bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur (123). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada kronik hipoksinin miyokardiyal VEGF protein düzeyine etkisi olmadığı gösterilmiştir (124).

OSAS'lı obez hastalarda yapılan bir çalışmada, PDGF ve VEGF'nin serum konsantrasyonlarının OSAS'ta arttığı, 24 hafta devamlı pozitif havayolu basıncı (CPAP) uygulaması ile azaldığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, adipoz doku mRNA seviyeleri, PDGF ve VEGF'nin sadece terapötik CPAP grubunda azaldığı gösterilmiştir. PDGF ve VEGF'nin serum seviyeleri hipoksinin derecesi ile ilişkilendirmiştir (125).

12 günlük hipoksiye bağlı olarak HIF-1 ekspresyonu ile düzenlenen VEGF ekspresyon artışının hipoksiye adaptasyonu gösterdiği düşünülmüştür (19). 6 hafta kronik hipoksi ve KH uygulanan sıçanlar kontrol grubu ile karşılaştırılmış, kronik hipoksinin ve KH'nin beyaz yağ dokusunda VEGF'yi artırdığı gösterilmiştir. (126).

Bulgularımızın literatür verilerinden farklı olmasının en önemli nedeni çalışmamızda trombosit kaynaklı VEGF değerlendirilmesi olmasıdır. Literatürde trombosit kaynaklı VEGF düzeylerini ölçen ve bunun kronik aralıklı hipoksi ile değişimini değerlendiren başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda PDGF konsantrasyonu gruplar arasında farklılık göstermemektedir. Ancak çeşitli dokularda yapılan birçok çalışmada PDGF'nin hipoksiden etkilendiği gösterilmiştir.

Aorttan alınan düz kas hücre kültürleri 24 saat hipoksi ve normoksi ortamlarında tutulmuş, hipoksinin PDGF sentezini artırdığı görülmüştür (127). Farelerde 6 saat, 3 gün ve 10 gün normobarik hipoksi uygulamasının akciğer parankiminde PDGF-B ve VEGF mRNA seviyelerine etkisi bakılmış, PDGF-B mRNA seviyesinin hipoksiye 6 saat maruz kaldıktan sonra iki kat arttığı ve 3 gün sonra kontrol değerlerine geri döndüğü, ancak hipoksiye maruz kalmayla akciğer dokusunda VEGF mRNA seviyelerinin önemli ölçüde değişmediği bulunmuştur (101).

Tavşan kök hücre kültürünün normoksi, %1, 3 ve 5'lik O₂ (%5 karbon dioksit ve kalanı nitrojen) içeren hipoksi ortamında tutulması sonucunda %3 hipoksida PDGF üretiminin en yüksek olduğu bulunmuştur (128). Kardiyomiyosit kültüründe yapılan çalışmada hipoksi ile

PDGF-B ekspresyonu artmıştır (129). PDGF-B transkriptlerinin 1 saat gibi kısa bir hipoksiden sonra arttığı ve 32 saatlik hipoksi boyunca normoksik kontrollere kıyasla yüksek kaldığı gösterilmiştir (130).

Başka çalışmalarda da bizim çalışmamıza benzer şekilde hipoksinin PDGF'ye etkisi olmadığı gösterilmiştir. 4 hafta boyunca kronik normobarik hipoksiye (%10 O₂, %90 N₂) maruz bırakılan sıçanlarda 2 ve 4 haftalık kronik hipoksi sırasında renal PDGF gen ekspresyonunun artmadığı gösterilmiştir (131).

Diğer proanjiogenik faktörlerdeki bulgularımız gibi, PDGF'de de literatürde trombosit kaynaklı ölçüm ve bunun hipoksi ile değerlendirilmesi çalışması yoktur.

Trombositlerden salgılanan anitanjiogenik faktörlerle ilgili bulgularımıza baktığımızda, PAİ-1 konsantrasyonunun KH grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Literatürde hipoksiye bağlı PAİ-1 artışı birçok çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde hipoksiye bağlı PAİ-1 artışı görülmüştür.

Hipoksik (%1 O₂, %5 CO₂ ve %94 N₂) ortamda belli sürelerde tutulan insan trombositlerinde yapılan bir çalışmada, trombositlerin hipoksiye maruz kalması HIF-2α'nın sentezi ile eş zamanlı olarak PAİ-1 ekspresyonunu artırmıştır (132).

Akut miyokard enfarktüsü geçirenlerde hem plazma hem de trombosit PAİ-1 konsantrasyonları 1. günde yüksek bulunmuş, 5. günde hızla azalmış ve 28. günde 1. güne kıyasla düşük bulunmuştur (133).

Kültür ortamında endotel hücreleri 24 saat 40 mmHg O₂ basınca maruz bırakılmış. Bu durum PAİ-1 mRNA seviyelerini artırmış, sonra 24 saat daha 150 mmHg O₂ basıncına tabi tutulduğunda PAİ-1 mRNA seviyeleri normal seviyeye dönmüştür (134).

Vasküler düz kas hücrelerinde artan PAİ-1 gen ifadesinin bu hücrelerin çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir. PAİ-1'in artan ifadesinin düz kas hücrelerinde apoptoza direnç geliştirmede önemli olduğu gösterilmiştir (135).

OSAS'lı hastalarda kontrol grubuna göre yüksek seviyede trombosit kaynaklı mikropartikül ve yüksek plazma PAİ-1 konsantrasyonları bulunmuştur. CPAP uygulaması ile plazma PAİ-1 düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır (136).

Farelerde yapılan pulmoner fibrozis modelinde alveolar makrofajlarda PAİ-1 ve HİF-1'in baskın ekspresyonu gösterilmiştir. Normoksi ile HİF-1 susturulması PAİ-1 ekspresyonunu azaltmıştır (137). Kondrosit kültüründe hipoksi ile sağlanan HİF-1 artışı PAİ-1 ekspresyonunu uyarmıştır (138). Fibroblast kültüründe da benzer şekilde PAİ-1'in hipoksiye bağlı artışı gösterilmiştir (139). Bası yaralarının taklit edildiği, cildin sıkıştırılarak hipoksi oluşturulduğu bir çalışmada HİF-1 artışı ile birlikte bölgesel PAİ-1 artışı gözlenmiştir (140).

Çalışmamızda PAİ-1 bulgularımız literatür verileri ile uyumlu olmakla birlikte, genel olarak PAİ-1 anjiogenezin inhibisyonu ile ilişkilendirilmişti. Ancak PAİ-1'in bu etkisi hakkında, anjiogenez modülasyonu ile ilgili farklı görüşler de bulunmaktadır. Geniş klinik ve deneysel veriler plazmin sistemi üyelerinin patolojik anjiyogenezde rol oynadığını desteklemektedir. PAİ-1 düzeylerindeki artış kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, kanser, inflamatuvar ve metabolik bozukluklar gibi çeşitli patolojik durumlarla ilişkilidir, ancak PAİ-1'in proteazlarla etkileşime girerek anjiyogenezi teşvik ettiği de söylenmektedir. Bazı çalışmalarda görülen tutarsızlıklar, sistemin karmaşıklığı ile açıklanabilir, çünkü bu proteazlar çoklu substratlar üzerinde hareket eder ve etkilerini birçok molekül üzerinde gösterir (141).

Literatür verileri ve bulgularımız birlikte değerlendirildiğinde KH'de artan trombosit kaynaklı PAİ-1'in anjiogenez modülasyonundaki rolünün araştırmaya açık olduğu ortaya çıkmaktadır.

Antianjiogenik faktör olarak değerlendirilen trombosit kaynaklı endostatin konsantrasyonu AH grubunda, kontrol ve KH+AH gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda değerlendirdiğimiz diğer faktörler gibi trombosit kaynaklı endostatin ile ilgili de çalışma bulunmamıştır, ancak akciğer hasarında muhtelif dokularda endostatin artışı ve trombosit fonksiyonları arasında muhtemel bir ilişkinin olduğuna dair yayınlar mevcuttur.

ARDS'li hastaların plazmasında yüksek endostatin seviyeleri endostatinin endotel hücre bariyeri bozulması, nötrofil göçü ve trombosit agregasyonu gibi merkezi patolojik süreçleri geliştirme potansiyeli olduğu; erken ARDS patolojisinde yüksek endostatin seviyeleri ile nötrofil, endotel ve trombosit fonksiyonu arasında potansiyel bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (142).

Endostatin güçlü bir anjiyogenez inhibitörüdür ve anjiyogenez de akciğerlerin gelişimi için önemlidir. Yenidoğanlarda yapılan bir çalışmada endostatinin trakeal aspirasyon sıvısında

eksprese edildiği ve doğum sonrası ilk gün en yüksek seviyede olduğu bulunmuştur. Yüksek endostatin konsantrasyonlarının daha düşük akciğer olgunluğunu yansıtan parametrelerle ilişkili olduğu ve intrauterin dönemde akciğerlerin fizyolojik gelişiminde önemli bir rolü olduğu düşünülmüştür (67). Benzer şekilde bronkopulmoner displazi gelişen erken doğmuş bebeklerin kord plazmasında da endostatin düzeylerin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (143).

Bir çalışmada endostatinin ALI'li hastaların plazmasında ve bronkoalveolar lavaj sıvılarında yüksek olduğu gösterilmiştir. ALI hastalarında hastalığın erken seyri sırasında alveoler endostatin düzeylerinin sürekli olarak yükseldiği düşünülmektedir (65).

Sıçanlarda 1 saatlik sol akciğer iskemisi ardından 30 dakika veya 4 saat reperfüzyon sonrasında akciğer dokusunda MMP-9 ve endostatin seviyelerinde paralel bir artış gösterilmiştir (144).

Endostatinin akciğer hasarına bağlı olarak artış gösterdiği bilinmektedir, ancak bu mekanizmanın hangi patofizyolojik süreçlerden sorumlu olduğu net değildir. Çalışmamız akciğer hasarı ile artan trombosit kaynaklı endostatin içeriğinin bu patofizyolojik süreçlerde etkili olabileceğine dair bilgi sunmaktadır.

KH grubunda trombospondin konsantrasyonu kontrol, AH ve KH+AH grubuna göre yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda hipoksinin trombospondin-1 konsantrasyonlarını artırdığı gösterilmiştir. Hipoksiye bağlı farklı dokularda trombospondin artışını gösteren başka çalışmalar da mevcuttur.

İnsan umbilikal kord venöz endotel hücresi kültürü 20 ve 70 mmHg O₂ basıncına maruz bırakılmış, düşük oksijen basıncının trombospondin-1 transkript seviyelerini 6 kata kadar artırdığı, bu artışın hipoksi derecesine bağlı olan ve geri dönüşümlü fizyolojik bir düzenleme olduğu gösterilmiştir (145).

Trombosit kaynaklı trombospondin-1'in tümör anjiyojenezini inhibe ederek tümör büyümesini ve gerilemesinin bir göstergesi olabileceği gösterilmiştir (146).

Hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada diğer literatür verilerine aykırı olarak akut hipoksiye maruz kalmanın trombospondin-1'i baskıladığı ve VEGF ekspresyonunu artırdığı

görülmüştür. Hipoksinin trombospodin-1 ekspresyonunu inhibe etme yeteneğinin hücre tipine ve/veya transformasyon derecesine bağlı olduğu ileri sürülmüştür (147).

Endotel hücre kültürünün 24 saat hipoksiye maruz bırakılmasından sonra hipoksi tarafından indüklenen HIF-1, VEGF ve miR-21'in artışının trombospodin-1 ekspresyonu ile ters ilişkili olduğu bulunmuştur (148).

Endotel hücre kültürünün 24 saat hipoksiye maruz bırakılması ile yapılan başka bir çalışmada ise hem trombospodin-1 hem de VEGF hipoksik ortamda yüksek konsantrasyonlarda ifade edilmiştir ve hipoksiye bağlı olarak endotel hücre proliferasyonu baskılanmıştır. Trombospodin-1'in ortamda immünpresipitasyon yoluyla tüketilmesi ile antiproliferatif etkisinin azaldığı gösterilmiştir (149).

Endotel hücre kültürünün 72 saate kadar farklı hipoksi koşullarında tutularak yapıldığı çalışmada trombospodin-1 genetik ifadesinin arttığı, bu artışın 1-6 saatlerde görünür düzeydeyken, 24-48 saatte maksimum ($6,5 \pm 1,2$ kat) seviyede olduğu, 72 saatlik hipoksi maruziyeti ile yüksek seviyelerde kaldığı gösterilmiştir. Hipoksiye bağlı olarak trombospodin-1 artışının kademeli ve geri dönüşümlü bir fizyolojik tepki olduğu, hipoksinin hem trombospodin-1'in transkriptinin stabilizasyonu hem de trombospodin-1 protein üretiminin uyarılması üzerindeki etkileri gösterilmiştir (145).

Monosit hücrelerinin 5 saat hipoksiye maruz bırakılması sonucu trombospodin ekspresyonu artmış, p38 grubu mitojenle aktive olan protein kinaz (p38-MAPK) inhibitörünün eklenmesi ile trombospodin-1 artışı azalmıştır (150).

Trombospodin-1 düzenlemesine bağlanan çoklu sinyal yollarının hesaplandığı ve verilerle karşılaştırıldığı bir çalışmada hipoksi ile indüklenen trombospodin-1 artışının anjiyogenez ihtiyacıyla çelişkili görünmektedir, ancak bu fenomenin pro-anjiyojenik faktörler tarafından yönlendirilen anjiyogenezin kontrolü için endojen bir geri bildirim olabileceği düşünülmüştür. Hipoksi ve TGF β tarafından uyarılan trombospodin-1 üretiminin, HIF ve p53 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinden güçlü bir şekilde etkilendiği gösterilmiştir (151).

Çalışmamızda da KH'nin trombosit içeriğindeki trombospodin-1 konsantrasyonunu değiştirdiği görülmüştür. Literatürden farklı olarak çalışmamızda KH'nin trombosit kaynaklı trombospodin-1 düzeylerine etkisi değerlendirilmiştir. Bu antianjiyogenik faktörün hipoksi ve akciğer hasarı üzerindeki etkileri de araştırmaya açık gözükmektedir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın hipotezi altı haftalık KH uygulaması ile trombositlerde bulunan proanjiogenik faktörlerin artması ve antianjiogenik faktörlerin azalması, akciğer hasarı sonrasında trombosit kaynaklı proanjiogenik faktörlerden SDF-1'in etkisi ile endotelial progenitor hücrelerin doku hasarı olan bölgelere yerleşiminin artırması idi. Ancak çalışmamızın sonucunda beklenenin aksine proanjiogenik faktörlerden olan SDF-1'in azaldığı ve buna bağlı olarak akciğer hasarı sonrasında hasarlı dokuya EPC'lerin yerleşiminin azaldığı görülmüştür. VEGF ve PDGF konsantrasyonlarında ise hipoksiye bağlı anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır. Antianjiogenik faktörlerden olan PAİ-1 ve trombospondin-1 konsantrasyonu ise KH'ye bağlı olarak artarken, endostatin konsantrasyonu AH'na bağlı olarak artmıştır.

Bu sonuçlarla birlikte KH+AH grubunda hücre başına düşen tüm faktör konsantrasyonları diğer gruplara göre oldukça düşük bulundu. Bu durumun sebebinin AH öncesinde uygulanan KH'nin megakaryosit boyutunda artışa bağlı olabileceği düşünüldü. Bununla birlikte megakaryosit boyutlarındaki artışın proanjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin düzeyleri ile orantılı olmaması trombosit başına düşen proanjiogenik ve antianjiogenik faktör konsantrasyonlarında azalmaya neden olmuş olabilir. Ancak çalışmamızda megakaryositler ile ilgili bu değişiklikleri açıklayacak testler yapılmamıştır.

Çalışmamız planlandığında KH uygulaması sonrası deney hayvanlarından elde edilen TZP'de trombositlerin uyarılarak granüler içeriğini süpernatanta boşaltması, uyarılmış trombositlerin yüzeyinde SDF-1 işaretlenerek akım sitometri ile değerlendirilip trombosit yüzey antijen değişiminin KH'ye bağlı değişiminin gösterilmesi, akciğerde immünfloresan işaretlemenin en az üç belirteç için antikor ile yapılması, sol akciğerlerin hücrelerinin ayrılarak EPC'lerin işaretlenmesi ve akım sitometri ile EPC değişiminin yüzdesel olarak ifade edilmesi planlanmıştı. Ancak kısıtlı lisansüstü BAP desteği ile elde edilebilen laboratuvar malzemeleri çalışmamızı oldukça kısıtlamıştır. Bununla birlikte sonuçlarımız megakaryosit ve trombositlerin gen ifadeleri ile bunların protein sentezindeki değişimlerinin ayrıntılı olarak çalışılabileceği çalışmalara öncülük edebilecek niteliktedir.

Trombositlerin çoklu hücrel olaylarda aktif olarak yer alıyor olması önemlidir. İmmünolojik olarak açıklanamayan birçok durumun trombosit fonksiyon ve bozuklarına bağlı olma ihtimalinin yanı sıra diyabetik anjiyopati, koroner arter hastalığı, vaskülitler, tümöral dokunun anjiogenezi gibi birçok aydınlatılamamış anjiyogenik durumlarda trombositlerin rolü

bilim insanlarının dikkatini çekmektedir. Trombositlerin ve megakaryositlerin fizyopatolojik süreçlerdeki önemini aydınlatacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



9. KAYNAKLAR

1. Rafii S, Cao Z, Lis R, Siempos, II, Chavez D, Shido K, et al. Platelet-derived SDF-1 primes the pulmonary capillary vascular niche to drive lung alveolar regeneration. *Nature cell biology*. 2015;17(2):123-36.
2. Feng W, Madajka M, Kerr BA, Mahabeleshwar GH, Whiteheart SW, Byzova TV. A novel role for platelet secretion in angiogenesis: mediating bone marrow-derived cell mobilization and homing. *Blood*. 2011;117(14):3893-902.
3. Feng K, Guo Y, Dai H, Wang Y, Li X, Jia H, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer. *Sci China Life Sci*. 2016;59(5):468-79.
4. Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544(7648):105-9.
5. Sengupta N, Afzal A, Caballero S, Chang K-H, Shaw LC, Pang J-J, et al. Paracrine modulation of CXCR4 by IGF-1 and VEGF: implications for choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(5):2697-704.
6. Xu J, Mora A, Shim H, Stecenko A, Brigham KL, Rojas M. Role of the SDF-1/CXCR4 axis in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007;37(3):291-9.
7. Stellos K, Langer H, Daub K, Schoenberger T, Gauss A, Geisler T, et al. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2008;117(2):206-15.
8. Italiano Jr JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro-and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2008;111(3):1227-33.
9. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2011;117(14):3907-11.
10. Zhou B, Ren J, Ding C, Wu Y, Hu D, Gu G, et al. Rapidly in situ forming platelet-rich plasma gel enhances angiogenic responses and augments early wound healing after open abdomen. *Gastroenterology research and practice*. 2013;2013.
11. Dahal BK, Heuchel R, Pullamsetti SS, Wilhelm J, Ghofrani HA, Weissmann N, et al. Hypoxic pulmonary hypertension in mice with constitutively active platelet-derived growth factor receptor- β . *Pulmonary Circulation*. 2011;1(2):259-68.
12. Serebrovskaya TV, Nikolsky IS, Nikolska VV, Mallet RT, Ishchuk VA. Intermittent hypoxia mobilizes hematopoietic progenitors and augments cellular and humoral elements of innate immunity in adult men. *High altitude medicine & biology*. 2011;12(3):243-52.

13. Cameron SJ, Mix DS, Ture SK, Schmidt RA, Mohan A, Pariser D, et al. Hypoxia and Ischemia Promote a Maladaptive Platelet Phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38(7):1594-606.
14. MacIntyre NR. Tissue hypoxia: implications for the respiratory clinician. *Respir Care*. 2014;59(10):1590-6.
15. Peters J, Van Slyke D. Quantitative clinical chemistry. II. Methods Williams and Wilkins Co, Baltimore. 1932;585.
16. Malda J, Klein TJ, Upton Z. The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue engineering*. 2007;13(9):2153-62.
17. Kim HS, Ha HS, Kim DH, Son DH, Baek S, Park J, et al. O(2) variant chip to simulate site-specific skeletogenesis from hypoxic bone marrow. *Science advances*. 2023;9(12):eadd4210.
18. Neubauer JA. Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2001;90(4):1593-9.
19. Di Giulio C, Bianchi G, Cacchio M, Artese L, Rapino C, Macrì MA, et al. Oxygen and life span: chronic hypoxia as a model for studying HIF-1 α , VEGF and NOS during aging. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005;147(1):31-8.
20. Navarrete-Opazo A, Mitchell GS. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;307(10):R1181-97.
21. Yelmen N, Ozdemir S, Guner I, Toplan S, Sahin G, Yaman OM, et al. The effects of chronic long-term intermittent hypobaric hypoxia on blood rheology parameters. *General physiology and biophysics*. 2011;30(4):389-95.
22. Garvey C, Tiep B, Carter R, Barnett M, Hart M, Casaburi R. Severe exercise-induced hypoxemia. *Respiratory care*. 2012;57(7):1154-60.
23. Yanamandra U, Singh SP, Yanamandra S, Mulajkar D, Grewal RS, Singh S, et al. Endothelial markers in high altitude induced systemic hypertension (HASH) at moderate high altitude. *Medical journal, Armed Forces India*. 2017;73(4):363-9.
24. Patzelt J, Langer HF. Platelets in angiogenesis. *Current vascular pharmacology*. 2012;10(5):570-7.
25. Schwertz H, Köster S, Kahr WH, Michetti N, Kraemer BF, Weitz DA, et al. Anucleate platelets generate progeny. *Blood*. 2010;115(18):3801-9.
26. Yu Z, Shibasaki M, Otsuka H, Takada H, Nakamura M, Endo Y. Dynamics of Platelet Behaviors as Defenders and Guardians: Accumulations in Liver, Lung, and Spleen in Mice. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2019;42(8):1253-67.
27. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-73.
28. Joseph E, Italiano JHH. Hematology: Basic Principles and Practice. Seventh Edition ed: Elsevier; 2018. p. 1857-69.

29. Garcia-Souza LF, Oliveira MF. Mitochondria: biological roles in platelet physiology and pathology. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;50:156-60.
30. Zharikov S, Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochemical Society transactions*. 2013;41(1):118-23.
31. Rivera FJ, Kazanis I, Ghevaert C, Aigner L. Beyond Clotting: A Role of Platelets in CNS Repair? *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016;9(511).
32. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-89.
33. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(2):162-77.
34. Koseoglu HI, Altunkas F, Kanbay A, Doruk S, Etikan I, Demir O. Platelet-lymphocyte ratio is an independent predictor for cardiovascular disease in obstructive sleep apnea syndrome. *J Thromb Thrombolysis*. 2015;39(2):179-85.
35. Strieter R, Gomperts B. CHEMOKINES, CXC| CXCL12 (SDF-1). 2006.
36. Ratajczak M, Zuba-Surma E, Kucia M, Reca R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1–CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. 2006;20(11):1915-24.
37. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(11):2927-31.
38. Karimabad MN, Hassanshahi G. Significance of CXCL12 in Type 2 Diabetes Mellitus and Its Associated Complications. *Inflammation*. 2015;38(2):710-7.
39. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, et al. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;938:36-45; discussion -7.
40. Chatterjee M, Gawaz M. Platelet-derived CXCL12 (SDF-1 α): basic mechanisms and clinical implications. *J Thromb Haemost*. 2013;11(11):1954-67.
41. Gomes AL, Carvalho T, Serpa J, Torre C, Dias S. Hypercholesterolemia promotes bone marrow cell mobilization by perturbing the SDF-1: CXCR4 axis. *Blood*. 2010;115(19):3886-94.
42. Schmidt EM, Münzer P, Borst O, Kraemer BF, Schmid E, Urban B, et al. Ion channels in the regulation of platelet migration. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;415(1):54-60.
43. Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(11):1920-7.
44. Perez LE, Alpdogan O, Shieh JH, Wong D, Merzouk A, Salari H, et al. Increased plasma levels of stromal-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) enhance human thrombopoiesis and mobilize human colony-forming cells (CFC) in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. 2004;32(3):300-7.

45. Feng Y, Chen X, Gao L. Hypothesis: human umbilical cord blood-derived stromal cells promote megakaryocytopoiesis through the influence of SDF-1 and PECAM-1. *Cell biochemistry and biophysics*. 2010;58(1):25-30.
46. Thon JN. SDF-1 directs megakaryocyte relocation. *Blood*. 2014;124(2):161-3.
47. Secchiero P, Celeghini C, Cutroneo G, Di Baldassarre A, Rana R, Zauli G. Differential effects of stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) on early and late stages of human megakaryocytic development. *The Anatomical record*. 2000;260(2):141-7.
48. Li Y, Feng Z, Zhu L, Chen N, Wan Q, Wu J. Deletion of SDF-1 or CXCR4 regulates platelet activation linked to glucose metabolism and mitochondrial respiratory reserve. *Platelets*. 2022;33(4):536-42.
49. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(16):9448-53.
50. Torzicky M, Viznerova P, Richter S, Strobl H, Scheinecker C, Foedinger D, et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(4):1149-57.
51. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, et al. Bone marrow AT1 augments neointima formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1 {alpha}. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(1):60-7.
52. Zerneck A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Möpps B, et al. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circulation research*. 2005;96(7):784-91.
53. Laurent GJ, Shapiro SD. *Encyclopedia of respiratory medicine*: Academic Press Elsevier; 2006.
54. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248-64.
55. Haworth SG, Hislop AA. Lung development-the effects of chronic hypoxia. *Seminars in neonatology* : SN. 2003;8(1):1-8.
56. Duggan TJ, Cai CL, Aranda JV, Beharry KD. Acute and chronic effects of intravitreal bevacizumab on lung biomarkers of angiogenesis in the rat exposed to neonatal intermittent hypoxia. *Experimental Lung Research*. 2021;47(3):121-35.
57. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & development*. 2008;22(10):1276-312.
58. Kazlauskas A. PDGFs and their receptors. *Gene*. 2017;614:1-7.
59. Liang S, Yu H, Chen X, Shen T, Cui Z, Si G, et al. PDGF-BB/KLF4/VEGF Signaling Axis in Pulmonary Artery Endothelial Cell Angiogenesis. *Cellular physiology and*

biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2017;41(6):2333-49.

60. Gramling MW, Church FC. Plasminogen activator inhibitor-1 is an aggregate response factor with pleiotropic effects on cell signaling in vascular disease and the tumor microenvironment. *Thromb Res.* 2010;125(5):377-81.
61. Brogren H, Wallmark K, Jern S, Karlsson L. Plasminogen activator inhibitor 1 expression in platelets is not influenced by the 4G/5G promoter polymorphism. *Thromb Res.* 2008;121(6):793-7.
62. Loskutoff DJ, Quigley JP. PAI-1, fibrosis, and the elusive provisional fibrin matrix. *The Journal of clinical investigation.* 2000;106(12):1441-3.
63. Balsara RD, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. *Thrombosis and haemostasis.* 2008;100(12):1029-36.
64. Zhang Z, Liu X, Shen Z, Quan J, Lin C, Li X, et al. Endostatin in fibrosis and as a potential candidate of anti-fibrotic therapy. *Drug delivery.* 2021;28(1):2051-61.
65. Perkins GD, Nathani N, Richter AG, Park D, Shyamsundar M, Heljasvaara R, et al. Type XVIII collagen degradation products in acute lung injury. *Critical care (London, England).* 2009;13(2):R52.
66. Li Y, Ren HT. Endostatin inhibits fibrosis by modulating the PDGFR/ERK signal pathway: an in vitro study. *Journal of Zhejiang University Science B.* 2017;18(11):994-1001.
67. Janér J, Andersson S, Haglund C, Lassus P. Pulmonary endostatin perinatally and in lung injury of the newborn infant. *Pediatrics.* 2007;119(1):e241-6.
68. Sipes JM, Murphy-Ullrich JE, Roberts DD. Thrombospondins: Purification of human platelet thrombospondin-1. *Methods in cell biology.* 2018;143:347-69.
69. Tan K, Lawler J. The interaction of Thrombospondins with extracellular matrix proteins. *Journal of cell communication and signaling.* 2009;3(3-4):177-87.
70. Lawler PR, Lawler J. Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012;2(5):a006627.
71. Roweth HG, Battinelli EM. Platelets and (Lymph)angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2023;13(1).
72. Radziwon-Balicka A, Moncada de la Rosa C, Jurasz P. Platelet-associated angiogenesis regulating factors: a pharmacological perspective. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 2012;90(6):679-88.
73. Parekh D, Dancer RC, Thickett DR. Acute lung injury. *Clinical Medicine.* 2011;11(6):615-8.
74. Mowery NT, Terzian WTH, Nelson AC. Acute lung injury. *Current Problems in Surgery.* 2020;57(5):100777.

75. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994;149(3 Pt 1):818-24.
76. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* (London, England). 1967;2(7511):319-23.
77. Goodman LR, Fumagalli R, Tagliabue P, Tagliabue M, Ferrario M, Gattinoni L, et al. Adult respiratory distress syndrome due to pulmonary and extrapulmonary causes: CT, clinical, and functional correlations. *Radiology*. 1999;213(2):545-52.
78. Cross LJ, Matthay MA. Biomarkers in acute lung injury: insights into the pathogenesis of acute lung injury. *Critical care clinics*. 2011;27(2):355-77.
79. Mowery NT, Terzian WTH, Nelson AC. Acute lung injury. *Current problems in surgery*. 2020;57(5):100777.
80. Mokra D, Kosutova P. Biomarkers in acute lung injury. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2015;209:52-8.
81. Harr JN, Moore EE, Stringham J, Wohlaue MV, Fragoso M, Jones WL, et al. Isoflurane prevents acute lung injury through ADP-mediated platelet inhibition. *Surgery*. 2012;152(2):270-6.
82. Grommes J, Alard JE, Drechsler M, Wantha S, Mörgelin M, Kuebler WM, et al. Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(6):628-36.
83. Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök hücre plasitesisi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2005;1(15):48-56.
84. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):68.
85. Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *British Medical Bulletin*. 2011;98(1):117-26.
86. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10.
87. Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Advancement of Cytometry*. 2010;77(1):6-10.
88. Luppi P, Powers RW, Verma V, Edmunds L, Plymire D, Hubel CA. Maternal circulating CD34+VEGFR-2+ and CD133+VEGFR-2+ progenitor cells increase during normal pregnancy but are reduced in women with preeclampsia. *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif). 2010;17(7):643-52.
89. Suuronen EJ, Wong S, Kapila V, Waghay G, Whitman SC, Mesana TG, et al. Generation of CD133+ cells from CD133- peripheral blood mononuclear cells and their properties. *Cardiovascular research*. 2006;70(1):126-35.

90. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(3):454-71.
91. Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowienczyk PJ, Zbinden R, Saha M, et al. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(4):936-42.
92. Morishita T, Uzui H, Ikeda H, Amaya N, Kaseno K, Ishida K, et al. Association of CD34/CD133/VEGFR2-Positive Cell Numbers with Eicosapentaenoic Acid and Postprandial Hyperglycemia in Patients with Coronary Artery Disease. *International Journal of Cardiology*. 2016;221:1039-42.
93. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 2007;129(3):465-72.
94. Silván U, Díez-Torre A, Arluzea J, Andrade R, Silió M, Aréchaga J. Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation*. 2009;78(2):159-68.
95. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*. 2017;24(5):101-5.
96. Alba-Loureiro T, Martins E, Miyasaka C, Lopes LR, Landgraf R, Jancar S, et al. Evidence that arachidonic acid derived from neutrophils and prostaglandin E 2 are associated with the induction of acute lung inflammation by lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Inflammation Research*. 2004;53:658-63.
97. Liu Y-L, Liu Y-J, Liu Y, Li X-S, Liu S-H, Pan Y-G, et al. Hydroxysafflor yellow A ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via modulating toll-like receptor 4 signaling pathways. *International immunopharmacology*. 2014;23(2):649-57.
98. Xu J, Woods CR, Mora AL, Joodi R, Brigham KL, Iyer S, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007;293(1):L131-L41.
99. Cazenave J-P, Ohlmann P, Cassel D, Eckly A, Hechler B, Gachet C. Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood. *Platelets and Megakaryocytes: Volume 1: Functional Assays*. 2004:13-28.
100. Dunleavy M, Dooley M, Cox D, Bradford A. Chronic intermittent asphyxia increases platelet reactivity in rats. *Exp Physiol*. 2005;90(3):411-6.
101. Berg JT, Breen EC, Fu Z, Mathieu-Costello O, West JB. Alveolar hypoxia increases gene expression of extracellular matrix proteins and platelet-derived growth factor-B in lung parenchyma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(6):1920-8.
102. McDonald TP, Cottrell MB, Steward SA, Clift RE, Swearingen CJ, Jackson CW. Comparison of platelet production in two strains of mice with different modal megakaryocyte DNA ploidies after exposure to hypoxia. *Exp Hematol*. 1992;20(1):51-6.

103. Lebedeva EV, Yushkov BG, Chereshev VA. Megakaryocytopoiesis under Hypoxic Conditions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2003;136(6):554-6.
104. Mısıroğlu RS, Aksay E, Şancı E, Tertemiz KC. Can thrombocytosis or thrombocytopenia predict complicated clinical course and 30-days mortality in patients with pneumonia? *Turk J Med Sci*. 2021;51(6):2903-7.
105. McDonald TP, Cottrell M, Clift R. Effects of short-term hypoxia on platelet counts of mice. *Blood*. 1978;51(1):165-75.
106. Shang C, Wuren T, Ga Q, Bai Z, Guo L, Eustes AS, et al. The human platelet transcriptome and proteome is altered and pro-thrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude. *Platelets*. 2020;31(1):33-42.
107. Gabryelska A, Łukasik ZM, Makowska JS, Białasiewicz P. Obstructive Sleep Apnea: From Intermittent Hypoxia to Cardiovascular Complications via Blood Platelets. *Frontiers in Neurology*. 2018;9(635).
108. Wang JS, Lin HY, Cheng ML, Wong MK. Chronic intermittent hypoxia modulates eosinophil- and neutrophil-platelet aggregation and inflammatory cytokine secretion caused by strenuous exercise in men. *J Appl Physiol* (1985). 2007;103(1):305-14.
109. Song YJ, Kwon JH, Kim JY, Kim BY, Cho KI. The platelet-to-lymphocyte ratio reflects the severity of obstructive sleep apnea syndrome and concurrent hypertension. *Clinical hypertension*. 2015;22:1.
110. Ayers L, Ferry B, Craig S, Nicoll D, Stradling JR, Kohler M. Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *European Respiratory Journal*. 2009;33(3):574-80.
111. Jiang J, Cong X, Alageel S, Dornseifer U, Schilling AF, Hadjipanayi E, et al. In Vitro Comparison of Lymphangiogenic Potential of Hypoxia Preconditioned Serum (HPS) and Platelet-Rich Plasma (PRP). *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
112. Buyukasik Y, Goker H, Buyukasik NS, Sayinalp N, Haznedaroglu IC, Ozcebe OI. Effect of platelet count on secretion capacity: formulization and use of the formulae for evaluation of platelet secretion in thrombocytopenic patients. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2008;19(7):633-7.
113. Stellos K, Gawaz M. Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. *Semin Thromb Hemost*. 2007;33(2):159-64.
114. Kleinman ME, Greives MR, Churgin SS, Blechman KM, Chang EI, Ceradini DJ, et al. Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27(12):2664-70.
115. Zhang L, Jin L, Guo J, Bao K, Hu J, Zhang Y, et al. Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia Enhances Bone Fracture Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:582670.
116. Young KC, Torres E, Hatzistergos KE, Hehre D, Suguihara C, Hare JM. Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation research*. 2009;104(11):1293-301.

117. Mai J, Wang F, Qiu Q, Tang B, Lin Y, Luo N, et al. Tachycardia pacing induces myocardial neovascularization and mobilizes circulating endothelial progenitor cells partly via SDF-1 pathway in canines. *Heart Vessels*. 2016;31(2):230-40.
118. Tang X, Wang B, Huang P, Guo Z, Tang Q, Li S, et al. Effects of chronic intermittent hypoxia on blood pressure and vascular remodeling. *Zhonghua er bi yan hou tou Jing wai ke za zhi= Chinese Journal of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery*. 2019;54(8):601-5.
119. Mas-Bargues C, Sanz-Ros J, Román-Domínguez A, Inglés M, Gimeno-Mallench L, El Alami M, et al. Relevance of Oxygen Concentration in Stem Cell Culture for Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5).
120. Tian Y, Zhang L, Guo X, Gao Z, Zhang Y, Zhang L, et al. Chronic intermittent hypobaric hypoxia attenuates ischemic limb injury by promoting angiogenesis in mice. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2021;99(11):1191-8.
121. Reinke C, Bevans-Fonti S, Grigoryev DN, Drager LF, Myers AC, Wise RA, et al. Chronic intermittent hypoxia induces lung growth in adult mice. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2011;300(2):L266-73.
122. Cho YM, Chou JC, Fang CM, Hu S, Wang KL, Wang SW, et al. Chronic intermittent hypoxia stimulates testosterone production in rat Leydig cells. *Life Sci*. 2019;233:116694.
123. Li RC, Guo SZ, Raccurt M, Moudilou E, Morel G, Brittian KR, et al. Exogenous growth hormone attenuates cognitive deficits induced by intermittent hypoxia in rats. *Neuroscience*. 2011;196:237-50.
124. Rakusan K, Chvojková Z, Oliviero P, Ostadalova I, Kolar F, Chassagne C, et al. ANG II type 1 receptor antagonist irbesartan inhibits coronary angiogenesis stimulated by chronic intermittent hypoxia in neonatal rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007;292(3):H1237-44.
125. Perrini S, Cignarelli A, Quaranta VN, Falcone VA, Kounaki S, Porro S, et al. Correction of intermittent hypoxia reduces inflammation in obese subjects with obstructive sleep apnea. *JCI insight*. 2017;2(17).
126. Gozal D, Gileles-Hillel A, Cortese R, Li Y, Almendros I, Qiao Z, et al. Visceral White Adipose Tissue after Chronic Intermittent and Sustained Hypoxia in Mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2017;56(4):477-87.
127. Humar R, Kiefer FN, Berns H, Resink TJ, Battegay EJ. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR)-dependent signaling. *Faseb j*. 2002;16(8):771-80.
128. Romaniyanto, Mahyudin F, Prakoeswa CRS, Notobroto HB, Tinduh D, Ausrin R, et al. Hypoxia Effects in Intervertebral Disc-Derived Stem Cells and Discus Secretomes: An in vitro Study. *Stem cells and cloning : advances and applications*. 2022;15:21-8.
129. Rong R, Wang YC, Hu LQ, He QQ, Zhou XF, Wang TH, et al. Role of endogenous PDGF-BB in cultured cardiomyocytes exposed to hypoxia. *Neuropeptides*. 2015;50:43-9.

130. Eng E, Holgren C, Hubchak S, Naaz P, Schnaper HW. Hypoxia regulates PDGF-B interactions between glomerular capillary endothelial and mesangial cells. *Kidney international*. 2005;68(2):695-703.
131. Schweda F, Blumberg FC, Schweda A, Nabel C, Holmer SR, Riegger GA, et al. Effects of chronic hypoxia on renal PDGF-A, PDGF-B, and VEGF gene expression in rats. *Nephron*. 2000;86(2):161-6.
132. Chaurasia SN, Kushwaha G, Kulkarni PP, Mallick RL, Latheef NA, Mishra JK, et al. Platelet HIF-2 α promotes thrombogenicity through PAI-1 synthesis and extracellular vesicle release. *Haematologica*. 2019;104(12):2482-92.
133. Soeki T, Tamura Y, Fukuda N, Ito S. Plasma and platelet plasminogen activator inhibitor-1 in patients with acute myocardial infarction. *Japanese circulation journal*. 2000;64(8):547-53.
134. Gertler JP, Perry L, L'Italien G, Chung-Welch N, Cambria RP, Orkin R, et al. Ambient oxygen tension modulates endothelial fibrinolysis. *Journal of vascular surgery*. 1993;18(6):939-46.
135. Chen Y, Budd RC, Kelm Jr RJ, Sobel BE, Schneider DJ. Augmentation of proliferation of vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26(8):1777-83.
136. Maruyama K, Morishita E, Sekiya A, Omote M, Kadono T, Asakura H, et al. Plasma levels of platelet-derived microparticles in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(1):98-104.
137. Ueno M, Maeno T, Nomura M, Aoyagi-Ikeda K, Matsui H, Hara K, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α mediates TGF- β -induced PAI-1 production in alveolar macrophages in pulmonary fibrosis. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2011;300(5):L740-52.
138. Zhu G, Tang Y, Liang X, Zheng M, Yang J, Zhou H, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in the regulation of plasminogen activator activity in rat knee joint chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage*. 2009;17(11):1494-502.
139. Muth M, Theophile K, Hussein K, Jacobi C, Kreipe H, Bock O. "Hypoxia-induced down-regulation of microRNA-449a/b impairs control over targeted SERPINE1 (PAI-1) mRNA - a mechanism involved in SERPINE1 (PAI-1) overexpression". *J Transl Med*. 2010;8:33.
140. Kaneko M, Minematsu T, Yoshida M, Nishijima Y, Noguchi H, Ohta Y, et al. Compression-induced HIF-1 enhances thrombosis and PAI-1 expression in mouse skin. *Wound repair and regeneration official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2015;23(5):657-63.
141. Ismail AA, Shaker BT, Bajou K. The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1).
142. Jandl K, Berg JL, Birnhuber A, Fliesser E, Borek I, Seeliger B, et al. Basement membrane product, endostatin, as a link between inflammation, coagulation and vascular permeability in COVID-19 and non-COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Front Immunol*. 2023;14:1188079.

143. Mohamed WA, Niyazy WH, Mahfouz AA. Angiopoietin-1 and endostatin levels in cord plasma predict the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Journal of tropical pediatrics*. 2011;57(5):385-8.
144. Waldow T, Witt W, Buzin A, Ulmer A, Matschke K. Prevention of ischemia/reperfusion-induced accumulation of matrix metalloproteinases in rat lung by preconditioning with nitric oxide. *The Journal of surgical research*. 2009;152(2):198-208.
145. Phelan MW, Forman LW, Perrine SP, Faller DV. Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1998;132(6):519-29.
146. Zaslavsky A, Baek KH, Lynch RC, Short S, Grillo J, Folkman J, et al. Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis. *Blood*. 2010;115(22):4605-13.
147. Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD, Calaoagan JM, Chen EY, Knapp AM, et al. Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(7):2941-50.
148. Xu X, Song N, Zhang X, Jiao X, Hu J, Liang M, et al. Renal Protection Mediated by Hypoxia Inducible Factor-1 α Depends on Proangiogenesis Function of miR-21 by Targeting Thrombospondin 1. *Transplantation*. 2017;101(8):1811-9.
149. Morgan-Rowe L, Nikitorowicz J, Shiwen X, Leask A, Tsui J, Abraham D, et al. Thrombospondin 1 in hypoxia-conditioned media blocks the growth of human microvascular endothelial cells and is increased in systemic sclerosis tissues. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2011;4:13.
150. Ortiz-Masià D, Díez I, Calatayud S, Hernández C, Cosín-Roger J, Hinojosa J, et al. Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *PLoS One*. 2012;7(10):e48535.
151. Zhao C, Isenberg JS, Popel AS. Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Thrombospondin-1 Expression: A Computational Model. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(1):e1005272.

10. EKLER

Ek-1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 16/06/2021
TOPLANTI NO : 2021-11
DOSYA NO : 2021-67
KARAR NO : 2021-11-91

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Metin BAŞTUĞ'un yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Hakan GÜRDAL, Doç. Dr. Deniz BİLLUR, Öğr. Gör. Dr. Göktaş ÖMERÇİOĞLU, Arş. Gör. Dr. Ayşe DEMİRCİ ŞAHİN, Arş. Gör. Dr. Ayşe Hande YOZGAT ve Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN'in katıldığı "Kronik İntermittant Hipoksinin Trombositlerin Anjiogenez Fonksiyonlarına ve Akciğerde Multipotent Epitelyal Kök/ Progenitör Hücrelerin Yerleşimine Etkisi" başlıklı çalışma Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre değerlendirilmiş ve çalışmanın aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 34
Geçerlilik Süresi : 01/08/2021 - 01/02/2023

Ek-2: Etik Kurul Onayı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 13/10/2021
TOPLANTI NO : 2021-17
DOSYA NO : 2021-67
KARAR NO : 2021-17-159

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Metin BAŞTUĞ'un yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Hakan GÜRDAL, Doç. Dr. Deniz BILLUR, Öğr. Gör. Dr. Göktuğ ÖMERCİOĞLU, Arş. Gör. Dr. Ayşe DEMİRCİ ŞAHİN, Arş. Gör. Dr. Ayşe Hande YOZGAT ve Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN'in katıldığı "Kronik İntermittant Hipoksinin Trombositlerin Anjiogenez Fonksiyonlarına ve Akciğerde Multipotent Epitelyal Kök/ Progenitör Hücrelerin Yerleşimine Etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzun 16.06.2021 tarihli toplantısında alınan 2021-11-91 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Proje Yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 15.09.2021 tarih ve 58482 sayılı dilekçe ile proje yürütücülüğünün Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ'e devredilmesi ve Prof. Dr. Metin BAŞTUĞ'un araştırmacı olarak proje ekibinde yer alması talep edilmiştir. Kurulumuz 29.09.2021 tarihli toplantısında alınan 2021-16-149 sayılı karar ile proje yürütücüsü değişikliğinin projeye destek veren kuruluşlarca uygun görülmesini müteakip yeniden değerlendirilmesi yönünde karar verilmiştir.

Proje yürütücüsü tarafından verilen 13.10.2021 tarih ve 68749 sayılı dilekçe ile söz konusu çalışmanın yürütücü değişikliğinin akademik kurul tarafından onaylandığı ve projenin desteklenmek üzere henüz herhangi bir kuruluşa önerilmediği bildirilerek yeniden değerlendirme talep edilmiştir.

Söz konusu dilekçe, Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11 (5) maddesi kapsamında değerlendirilmiş, söz konusu proje yürütücüsü değişikliğinin akademik kurul kararı ile onaylanmış olması dolayısıyla proje yürütücülüğünün Dr. Öğr. Üyesi Emel GÜNEŞ'e devredilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 01/08/2021 - 01/02/2023