



**ASHERMAN SENDROMU'NA UTERUS KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN VE EKSOZOMLARININ ETKİLERİ**

Gülistan Sanem SARIBAŞ

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

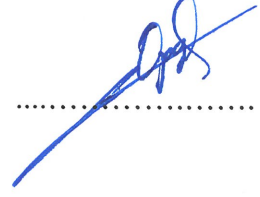
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2018

Gülistan Sanem SARIBAŞ tarafından hazırlanan “ Aserman Sendromu’na Uterus Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Eksozomlarının Etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL
Histoloji - Embriyoloji AD, Gazi Üniversitesi

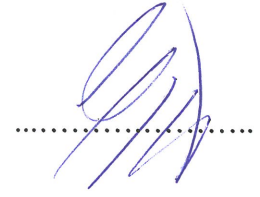
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Sevtap HAMDEMİR KILIÇ
Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Bahçeşehir Üniversitesi
Özel Ankara Medica Hastanesi- Kadın Hastalıkları ve Doğum
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU
Histoloji - Embriyoloji AD, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Sibel SERİN KILIÇOĞLU
Histoloji - Embriyoloji AD, Ufuk Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Tıbbi Biyokimya AD, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 08/03/2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gülistan Sanem SARIBAŞ

08.03.2018

ASHERMAN SENDROMU'NA UTERUS KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN VE EKSOZOMLARININ ETKİLERİ

(Doktora Tezi)

Gülistan Sanem SARIBAŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2018

ÖZET

Asherman sendromu sezaryen ve endometrial cerrahi işlemler ile görülme sıklığı artan bir sorun haline gelmiştir. Yeni tedavi olanaklarının araştırılması amacıyla biz de Asherman modeli oluşturulan ratlarda uterus kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve eksozomlarının etkilerini araştırmayı amaçladık. Endometriumun bazal tabakasına hasar verecek herhangi bir olay intrauterin adezyon olarak şekillenir ve Asherman Sendromu'na sebep olabilir. İntrauterin adezyonu olan hastalarda anjiyogenez ve revaskülarizasyon yetenekleri azalmakta; adezyon ilişkili sitokinlerin ekspresyonları ise artış göstermektedir. Sonuç olarak da adezyonlar atrofik endometriuma sebep olmaktadır. Mezenkimal kök hücreler, non-immünojenik, anjiyogenik, antifibrotik, antiapoptotik ve antiinflamatuvar özellikler gibi bazı özelliklerle karakterize edilirler ve aynı zamanda hücre terapilerinde çeşitli faktörlerin ve kemokinlerin salgılanması yoluyla doku onarımını desteklerler. Eksozomlar hasarlı doku tamirinde büyük bir potansiyele sahip, aktif parakrin bileşenlerdir. Eksozomlar rejenerasyon ve anjiyogenezden sorumlu birçok parakrin faktörleri içermektedir. Çalışmada 10 adet yeni doğan Wistar rat mezenkimal kök hücre eldesi için kullanıldı. Ayrıca toplam 24 adet yetişkin Wistar rat kullanıldı. Ratlar, kontrol grubu (Grup I; n=6); asherman grubu (Grup II; n=6); asherman + uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulanan grup (Grup III; n=6); asherman + uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomları uygulanan grup (Grup IV; n=6) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Deney sonunda uterus dokuları histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Mezenkimal kök hücre ve eksozom tedavileri sonucunda uterus dokusunda proliferasyon belirteci olan PCNA ve anjiyogenez belirteci olan VEGFR-1 ekspresyonunun arttığı; masson trikom boyaması ile fibrozisin azaldığı gösterildi. Ayrıca MMP-2 ekspresyonunun mezenkimal kök hücre ve eksozom uygulaması ile arttığı; ek olarak TIMP-2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, Asherman sendromunda ortaya çıkan fibrozis ve azalmış anjiyogenezis bulgularının uterus kökenli mezenkimal kök hücre ve eksozom tedavisi ile ortadan kalktığı gösterilmiştir. Tüm bulgular değerlendirildiğinde, eksozom tedavisi asherman sendromunun hasarını doku düzeyinde mezenkimal kök hücre grubuna kıyasla daha kısa sürede onarmıştır.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Asherman sendromu, mezenkimal kök hücre, fibrozis, eksozom
Sayfa Adedi : 110
Danışman : Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

EFFECTS OF UTERUS DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND THEIR EXOSOMES ON ASHERMAN'S SYNDROME

(Ph. D. Thesis)

Gülistan Sanem SARIBAŞ

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

March 2018

ABSTRACT

Asherman's syndrome has become a growing problem with the incidence of cesarean and endometrial surgical procedures. In order to investigate new therapies, we also aimed to investigate the effects of uterine mesenchymal stem cells and their exosomes in the rat models of the Asherman. A surgical procedure that can damage to the basal layer of the endometrium is formed as intrauterine adhesion and can cause Asherman Syndrome. In patients with intrauterine adhesion, angiogenesis and revascularization abilities decrease; the expression of adhesion-associated cytokines increases. As a result, adhesions cause atrophic endometriosis. Mesenchymal stem cells are characterized by some characteristics such as non-immunogenic, angiogenic, antifibrotic, antiapoptotic and antiinflammatory properties, also they support tissue repair by secretion of various factors and chemokines in cellular therapy. Exosomes are active paracrine components with a great potential for repairing damaged tissue. Exosomes include many paracrine factors responsible for regeneration and angiogenesis. In the study, 10 newborn Wistar rats were used to obtain mesenchymal stem cells. A total of 24 adult Wistar rats were also used. The rats were divided into 4 groups: control group (Group I, n = 6); asherman group (Group II, n = 6); asherman + uterine derived mesenchymal stem cell group (Group III; n = 6); Asherman + uterine derived mesenchymal stem cell exosomes group (Group IV, n = 6). At the end of the experiment, uterine tissues were evaluated by histochemical and immunohistochemical. As a result of mesenchymal stem cells and exosomes treatments, expression of markers such as PCNA and VEGFR-1, which are the markers responsible for proliferation and vascularization respectively in uterine tissue was increased. It was also shown to reduce fibrosis with masson's trichrome staining. MMP-2 expression was enhanced by mesenchymal stem cell and exosomal therapy; in addition, TIMP-2 expression was decreased. In conclusion, it has been shown that the findings of fibrosis and decreased angiogenesis in Asherman's syndrome are resolved by uterine-derived mesenchymal stem cell and exosomal therapy. When all the findings are evaluated, the exosomal treatment restored the damage of asherman syndrome at tissue at a shorter time than the mesenchymal stem cell group.

Science Code : 1033

Key Words : Asherman syndrome, mesenchymal stem cell, fibrosis, exosome

Page Number : 110

Advisor : Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi birikiminden faydalandığım, hayat tecrübelerinden her zaman kendime çıkarımlar yaptığım ve karşılaştığım güçlüklerin aşılmasında desteğini esirgemeyen değerli hocam, danışmanım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a,

Doktora eğitimim boyunca değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan hocalarım Sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na, Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na ve Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a,

Tez çalışmalarım sırasında destek ve fikirlerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sevtap HAMDEMİR KILIÇ'a ve Dr. Ferda PINARLI'ya,

Tezimin deneyleri sırasında fikirleriyle ve ürettiği çözümlerle bana yol gösteren Bio. Meral SABAN TIRYAKI'ye,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Özen AKARCA DİZAKAR'a ve Arş. Gör. Dr. Bahar KARTAL'a,

Tez çalışmalarımda yardım ve desteğini benden esirgemeyen Arş. Gör. Erdiç BEŞİKCİOĞLU'na, Uzm. Ecz. Zübeyir ELMAZOĞLU'na, Dr. Sait YARAYICI'ya, anabilim dalı personelimiz Recep ORHAN'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca bana destek olan ve güvenen, sevgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen annem Hatice ARIK'a ve babam Nuri ARIK'a,

Akademik hayatımın her aşamasında desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Emre SARIBAŞ'a sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışması Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 01/2017-08).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dişi Genital Sistem	3
2.2. Uterus Gelişimi, Anatomisi ve Histolojisi.....	3
2.2.1. Uterus gelişimi	3
2.2.2. Uterus anatomisi.....	5
2.2.3. Uterus histolojisi.....	6
2.3. Asherman Sendromu	12
2.3.1. Asherman sendromu etiyoloji ve risk faktörleri	13
2.3.2. Asherman sendromu tanı yöntemleri ve sınıflama	14
2.3.3. Asherman sendromunda endometrial değişiklikler.....	16
2.3.4. Asherman sendromu tedavisi ve yardımcı yöntemler.....	18
2.4. Kök Hücre	21
2.4.1. Kök hücre kaynakları.....	22
2.4.2. Mezenkimal kök hücreler	25
2.4.3. Uterus kaynaklı kök hücreler.....	30

	Sayfa
2.5. Eksozomlar	31
2.5.1. Eksozomların tanımlanması	35
2.5.2. Mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomlar	35
2.5.3. Rejeneratif tıpta eksozom kullanımının avantajları	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Kullanılan Materyaller	39
3.2. Deneysel Yöntem	40
3.2.1. Uterin travma ile Asherman sendromu moodelin oluşturulması	42
3.2.2. Uterus kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu.....	43
3.2.3. Mezenkimal kök hücrelerin parajlanması.....	44
3.2.4. Hücrelerin dondurulması ve çözülmesi	45
3.2.5. Hücrelerin sayımı	45
3.2.6. Akım (Flow) sitometri cihazında mezenkimal kök hücre tanımlaması	45
3.2.7. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırılması.....	46
3.2.8. Mezenkimal kök hücrelerin BrdU ile etiketlenmesi	47
3.2.9. Eksozom eldesi ve protein miktar analizi.....	47
3.2.10. Transmission elektron mikroskopi (TEM) yöntemi	49
3.2.11. Histokimyasal takip ve yöntem	50
3.2.12. İmmunohistokimyasal yöntem.....	51
3.3. İstatistiksel Yöntem.....	52
4. BULGULAR	55
4.1. Asherman Sendromu Modeli Oluşturulması	55
4.2. Akım Sitometri Cihazında Hücre Tanımlanması	56
4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Çalışmaları	58
4.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin BrdU ile Etiketlenmesi	58
4.5. TEM bulguları	59
4.6. Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Bulgular	60
4.6.1. H&E bulguları	60

	Sayfa
4.6.2. Masson's trikrom bulguları ve istatistiksel değeriendirmesi.....	62
4.6.3. İmmunohistokimyasal bulguları ve istatistiksel değeriendirmesi.....	66
5. TARTIŞMA	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR	93
EKLER.....	103
EK-1. Etik Kurul Onayı	104
EK-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	106
ÖZGEÇMİŞ	107

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Asherman sendromu risk faktörleri ve insidansları	14



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Uterus endometriumunun tabakaları ve arterial kan desteği	10
Şekil 2.2. İntrauterin adezyon formasyonu ile karakterize Asherman sendromu modeli	13
Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücrenin farklılaşma kapasitesi.....	27
Şekil 2.4. İnsan ve fare endometriumunda kök/progenitör hücrelerin yerleşimi (eMSC: endometrial mezenkimal kök hücreler; LRC: fare endometriumundaki etiketli kök hücreler)	31
Şekil 2.5. Mikroveziküllerin ve eksozomların salınımı	33
Şekil 3.1. Deney gruplarının şematik gösterimi.....	41
Şekil 3.2. Explant yöntemi ile mezenkimal kök hücre izolasyonu işlem basamaklar.....	44
Şekil 4.1. Akım sitometri cihazında, yenidoğan rat uterus kaynaklı hücrelerin mezenkimal kök hücrelere farklılaşmasının histogram grafiği ile gösterilmesi [PE-A ve FITC-A negatif kontroller; CD45 (-); CD11b/c (-); CD44(+); CD90(+)].....	57
Şekil 4.2. Gruplara ait Masson's trikrom boyaması sonucu fibrotik alan yüzdeleri.....	64
Şekil 4.3. Gruplara ait PCNA boyaması sonucu immunpozitif hücre sayısı	67
Şekil 4.4. Gruplara ait VEGFR-1 boyaması sonucu immunpozitif alan yüzdeleri	71
Şekil 4.5. Gruplara ait MMP-2 boyaması sonucu immunpozitif alan yüzdeleri	74
Şekil 4.6. Gruplara ait TIMP-2 boyaması sonucu immunpozitif alan yüzdeleri	78

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Uterusun histolojik katmanları	7
Resim 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin adiposit (a), kondrosit (b) ve osteosit (c) farklanması	29
Resim 2.3. Plazma zarından yeni çıkan eksozomların elektron mikroskopik görüntüsü	34
Resim 2.4. Eksozomların kriyo elektron mikroskopisi ile görüntülenmesi	34
Resim 3.1. Uterin travma ile Asherman sendrom modeli oluşturulması.....	43
Resim 3.2. Parafilm üzerine 10 µl'lik damlacıklar oluşturularak TEM takip ve boyama yönteminin gerçekleştirilmesi	50
Resim 4.1. Asherman sendrom modelinde uterus bez sayısında azalma ile birlikte uterus lümeninde darlıklar ve tıkanıklıklar (H&E, X40).....	55
Resim 4.2. Asherman sendrom modelinde uterus bez sayısında azalma ile birlikte uterus lümeninde darlıklar ve tıkanıklıklar (H&E, X100)	56
Resim 4.3. Yenidoğan rat uterus kökenli mezenkimal kök hücrelerinin adiposit dönüşümünün oil red boyası ile (lipid damlacıklarının kırmızı ile boyanması) gösterilmesi; X400 (a), kondrosit dönüşümünün alcian blue boyası ile (ekstraselüler matriksin mavi boyanması) gösterilmesi; X200 (b), osteosit dönüşümünün von kossa boyası ile (kalsiyum depositlerinin siyah boyanması) gösterilmesi; X20 (c)	58
Resim 4.4. Mezenkimal kök hücre uygulanmayan gruplarda (a) BrdU pozitif hücre izlenmezken; BrdU işaretli mezenkimal kök hücre uygulanan gruplarda (b,c,d) stromada endometrial bez çevresinde (siyah oklar) ve miyometrium tabakasında (beyaz oklar) anti-BrdU pozitif hücreler saptandı (DAB-Hematoksilen, X400)	59
Resim 4.5. Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların TEM görüntüleri...	60
Resim 4.6. Kontrol grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (H&E, X40).....	61
Resim 4.7. Asherman grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (H&E, X40).....	61
Resim 4.8. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (H&E, X40).....	62
Resim 4.9. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (H&E, X40)	62
Resim 4.10. Kontrol grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (Masson's trikrom, X40)	64
Resim 4.11. Asherman grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (Masson's trikrom, X40)	65

Resim	Sayfa
Resim 4.12. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (Masson's trikrom, X40).....	65
Resim 4.13. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (Masson's trikrom, X40).....	66
Resim 4.14. Kontrol grubuna ait uterus dokusunda PCNA immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	68
Resim 4.15. Asherman grubuna ait uterus dokusunda PCNA immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	68
Resim 4.16. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusunda PCNA immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	69
Resim 4.17. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusunda PCNA immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	69
Resim 4.18. Kontrol grubuna ait uterus dokusunda VEGFR-1 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	71
Resim 4.19. Asherman grubuna ait uterus dokusunda VEGFR-1 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	72
Resim 4.20. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusunda VEGFR-1 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	72
Resim 4.21. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusunda VEGFR-1 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40).....	73
Resim 4.22. Kontrol grubuna ait uterus dokusunda MMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	75
Resim 4.23. Asherman grubuna ait uterus dokusunda MMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	75
Resim 4.24. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusunda MMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	76
Resim 4.25. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusunda MMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40).....	76
Resim 4.26. Kontrol grubuna ait uterus dokusunda TIMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	78
Resim 4.27. Asherman grubuna ait uterus dokusunda TIMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	79
Resim 4.28. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusunda TIMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)	79
Resim 4.29. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusunda TIMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40).....	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mg	Miligram
nm	Nanometre
°C	Santigrat
rpm	Revolutions per minute

Kısaltmalar	Açıklamalar
A.	Arter
ANG	Anjiyopoietin
ASRM	Amerikan Fertilite Derneği
BCA	Bicinchoninic acid
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CTGF	Bağ doku büyüme faktörü
D&C	Dilatasyon&Küretaj
DAB	Diaminobenzedin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium

Kısaltmalar	Açıklamalar
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiaminetetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELISA	Enzime bağlı immunosorban yöntem
eMSC	Endometrial kökenli mezenkimal kök hücre
EPO	Eritropoietin
FBS	Fetal sığır serum
H&E	Hematoksilen-Eozin
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HLA-G	İnsan lökosit antijen-G
HSG	Histerosalpingografi
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
ILV	İntralüminal vezikül
İU	İntrauterin
İUA	İnrauterin adezyon
KGF	Keratinosit büyüme faktörü
Lig.	Ligament
M-CSF	Makrofaj koloni stimule edici faktör
MIP	Makrofaj enflamatuvar protein
MiRNA	Mikro RNA
MMP	Matriks metalloproteinaz
MR	Manyetik rezonans
MVC	Multiveziküler cisim
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCNA	Prolifere hücre çekirdek antijeni
RIA	Rahim içi araç
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
SCF	Kök hücre faktör

Kısaltmalar	Açıklamalar
SDF-1	Stromal kaynaklı faktör-1
SHG	Sonohisterografi
SIS	İnce bağırsak submukozası
SRY	Cinsiyet belirleyici bölge
TBF	Testis belirleyici faktör
TEM	Transmission elektron mikroskopisi
TGFβ	Transforme edici büyüme faktör β
TIMP-2	Doku matriks metalloproteinaz inhibitörü
uMKH	Uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre
uMKH-Eks	Uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomları
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR-1	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-1

1. GİRİŞ

İntrauterin adezyon (İUA), ilk olarak 1894'te Heinrich Fritsch tarafından postpartum (doğum sonrası) küretaj sonrası sekonder amenoreli hastalarda tanımlanmıştır. Takip eden 50 yıl boyunca çok sayıda vaka raporlanmış; 1948'de ise Joseph Asherman İUA ilişkili belirtileri ve sıklığını ilk defa rapor etmiştir. Daha sonra 'Asherman sendromu' terimi İUA vakalarını tanımlamak için kullanılmaya başlanmıştır [1, 2]. İntrauterin adezyon uterus kavitesi içinde skar dokunun gelişmesiyle oluşan yapışıklık, sineşidir. Bu hastalığa sahip kadınlar, sıklıkla infertilite, amenore, hipomenore ya da dismenoreyi içeren menstrüel düzensizlikler ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile mücadele etmektedir. En ciddi düzeyde Asherman Sendromu olan kadınlarda, uterin kavitenin en az üçte ikisini kaplayan yoğun adezyonlarla birlikte, amenore ya da hipomenore izlenmektedir [2-4]. İUA, çoğunlukla dilatasyon&küretaj (D&C) veya endometrial kavite ile ilişkili miyomektomi, septal rezeksiyon ve sezeryan gibi cerrahi işlemlerden sonra şekillenir. Ayrıca küretaj sayısındaki artış ile birlikte İUA sıklığının ve şiddetinin de arttığı çalışmalarda gösterilmiştir [5-7].

Asherman Sendromu olan kadınlarda, hastalığın genişliğinin teşhisi ve tedavisi için prognozun belirlenmesi amacıyla, birden fazla görüntüleme yöntemi ve adezyonların tekrarlamasını en aza indirmek için birden fazla yaklaşım gerekebilir. Asherman sendromu teşhisinde histeroskopi, transvajinal ultrasonografi, histerosalpingografi (HSG) ya da salin infüzyon sonohisterografi (SHG) gibi yöntemler kullanılmaktadır [3, 5]. Asherman sendromunun tedavisinde ise histerotomi, histeroskopik cerrahi, dilatasyon ve küretaj işlemleri kullanılmaktadır [8]. Operasyon sonrası tekrar adezyon oluşumu tedavi yöntemlerinin başarısını sınırlayan en önemli etmendir. Şiddetli intrauterin adezyon olguları için intrauterin adezyolizis sonrası bu oran %20-62'lere çıkmaktadır [9, 10]. Cerrahi adezyolizisten sonra tekrar adezyon formasyonu engelleyen birçok yayın olmasına rağmen yapılmış çalışmalar yetersizdir [11, 12]. Bu tedavilere ek olarak da tekrar adezyon oluşumunun önlenmesi için çok sayıda yardımcı yöntemler geliştirilmektedir. Rahim içi araç, balon stent, anti-adheziv bariyer ve hormonal tedaviler gibi işlemler bu yöntemlerin başında gelmektedir. Ancak bu yöntemlerden sonra, uterin perforasyon, hemoraji ve enfeksiyon; operasyon sonrasında ise erken gebelik kayıpları gibi komplikasyonlar oluşabilmektedir [6, 8, 9, 13-15].

Mezenkimal kök hücreler günümüzde kemik iliği, kas, kemik, kırık, yağ doku, diş pulpası, periodontal doku, karaciğer, akciğer, timus, ovaryum, testis, amniyon sıvısı, plasenta ve umbilikal kord kanı gibi birçok dokudan elde edilebilmektedir. Mezenkimal kaynaklı kök hücreler intravenöz yolla organizmaya verildiklerinde ilk olarak yöneltildikleri bölge kemik iliğidir. Ancak organizmada doku hasarı olduğunda kök hücrelerin hasarlı dokuya göçü gerçekleşir [16, 17]. Mezenkimal kök hücrelerin birçok farklı doku hücresine dönüşebilmesi, hasarlı dokuya migrasyonları, göç ettikleri hasarlı bölgedeki hücrelerle füzyona girmeleri gibi birçok özellik bu hücreleri ayrıcalıklı kılmaktadır. Ayrıca çok çeşitli faktör ve kemokinler salgılayarak doku tamirine destek olmaları, non-immunojenik özellikte olmaları ve anjiyojenik, antiapoptotik, antiinflamatuvar etki göstermeleri hücresel tedaviler içinde mezenkimal kök hücrelerin öne çıkmasını sağlamaktadır [18, 19].

Eksozomlar hasarlı doku tamirinde büyük bir potansiyele sahip, hücre iletişimine hücre önemli bir rol oynayan çok etkili aktif parakrin bileşenlerdir [20]. Eksozomlar, çeşitli mikroveziküller ile uyarılınca içerdikleri belirli proteinleri, lipidleri, faktörleri ve ribonükleik asit (RNA) gibi genetik materyalleri salgılayarak etki gösterirler. Eksozomların içeriğinde bulunan materyallerin çok çeşitli olması, rejeneratif tıp alanında eksozomların son derece umut verici olmasını sağlamaktadır [21-23].

Asherman sendromu her geçen gün artan sezaryen ve endometrial cerrahi işlemler ile görülme sıklığı artan bir sorun haline gelmiştir. Ratlarda deneysel Asherman modellerinde farklı kök hücrelerin etkilerini araştıran araştırmalar mevcut olmakla birlikte; literatür taramamızda Asherman modelinde uterus kaynaklı kök hücre ve eksozomlarının uygulamasını inceleyen çalışmalara rastlamadık. Bu nedenle yeni tedavi olanaklarının araştırılması amacıyla biz de Asherman modeli oluşturulan ratlarda uterus kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve eksozomlarının etkilerini araştırmayı planladık. Bu çalışmanın sonuçlanması gebe kalmak isteyen ancak rahim içi yapışıklığı olan kadınlara umut ışığı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Genital Sistem

Dişi üreme sistemi pelviste yer alan iç üreme organları olan ovaryumlar, tuba uterinalar, uterus, cervix uteri, vagina ve vulvada yer alan dış genital organlardan meydana gelir. Kadınlarda ovaryumlar primer üreme organıdır ve seks hormonlarının sentezinden sorumlu olan yapıdır. Vagina, uterus ve tuba uterinalar ise fetus ve ovaryumlar için bir kanal görevi görürler. Uterusun ise en önemli görevi, döllenmeden sonra embriyo ve fetusun gelişimini sağlamaktır.

İlk menstruasyon kanamasından başlayarak üreme sistemi yapı ve işlevsel yönlerden sıklıkla değişiklik gösterir. Bu değişimler nöral aktivite ve hormon seviyeleri ile kontrol edilir [24, 25].

2.2. Uterus Gelişimi, Anatomisi ve Histolojisi

2.2.1. Uterus gelişimi

Genetik olarak cinsiyet fertilizasyon sırasında belirlenir. Ancak 7. haftaya kadar gonadların görünümü farklı cinsiyetteki bireylerde farklılık göstermez ve bu gelişim dönemine ‘farklanmamış evre’ denir. Seksüel dimorfizm, spermiyumun taşıdığı kromozoma bağlı olarak değişir. Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan cinsiyet belirleyici bölge-Y (SRY) cinsiyet farklanmasında önemlidir. SRY geninin protein ürünü ‘testis belirleyici faktör (TBF)’dür. Bu genin varlığında fetus erkek cinsiyetli olarak gelişirken; bu genin yokluğunda ise fetus cinsiyeti kız olarak gelişir. Seksüel farklanmada etkin diğer bir gen ise Wnt-4 genidir. Dişi cinsiyet gelişimi için SRY geni yokluğuna ek olarak Wnt-4 gen varlığı önemlidir [26, 27].

Wnt-4, X kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan DAX1’i uyarak; SF1 aktivitesini düzenler. Bu yolla Sertoli ve Leydig hücrelerinin oluşması engellenmiş olur.

Gelişimde 7.haftaya kadar genital sistem farklanmamış evrededir. Her iki cinsteki embriyolar bu evrede erkek üreme sisteminin gelişmesinde rol oynayan mezonefrik kanal (Wolffian kanalı) ve dişi üreme sisteminin gelişmesinde rol oynayan paramezonefrik kanal

(Müller kanalı) olmak üzere iki çift genital kanala sahiptirler [26, 28].

Testis yönünde farklı gonadlarda bulunan Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosteron dişi embriyolarda bulunmaz. Testosteron yokluğunda ise mezonefrik kanallar geriler. Ayrıca, dişi embriyolarda Sertoli hücreleri bulunmadığı için sertoli hücreleri tarafından üretilen ‘Müller Baskılayıcı Madde’ salgılanamaz ve paramezonefrik kanallar gelişerek ileri farklılaşmaya girer. Dişi fetuslarda mezonefrik kanal dejenere olarak kaybolur ancak birkaç fonksiyonel olmayan kalıntı kalır. Paramezonefrik kanallar gonadların ve metanefrozların lateral yüzeyinde mezotelin uzunlamasına oluşan invaginasyonların kenarlarının kaynaşması ile meydana gelirler. Bu kanalların kranial uçları huni şeklindedir ve periton boşluğuna açılırlar. Bu kanallar gelecekteki embriyonun pelvik bölgesine kadar uzarlar ve burada mezonefrik kanalları ventralde çaprazlayarak orta hatta birbirleri ile kaynaşırlar. Bu şekilde tuba uterinalar paramezonefrik kanalların birleşmemiş kranial kısımlarından gelişirken; paramezonefrik kanalların kaudal birleşmiş kısımlarından ise uterovaginal primordium oluşur. Uterovaginal primordiumdan uterus kısımları ve vaginanın üst kısımları meydana gelir; endometrial stroma ve miyometrium ise komşu splanik mezeneşimden gelişir [28].

Dişilerde bazen gelişim sırasında mezonefrik kanal kalıntıları görülebilir. Bunlar ovaryum ve tuba uterina arasındaki mesovaryumda bulunan epoophoron artıkları olabildiği gibi; uterusu yakın yerleşimli rudimenter tübüller de paroophoron olarak kalırlar. Mezonefrik kanalın, duktus deferens ve ejakülatör kanala karşılık gelen bazı bölümleri uterus’un yan duvarları boyunca ligament katmanları arasında ‘Gartner kanalı’ olarak görülebilir. Bu kanal kalıntılarından da ‘Gartner kistleri’ oluşabilir. Ayrıca mezonefrik kanalın kranial ucu appendiks veziküloza denen kalıcı yapı oluşturabileceği gibi; paramezonefrik kanallar da kranial ucunda oluşan Morgagni hidatiği gibi kalıntı yapılar bırakabilir.

Paramezonefrik kanallarının herhangi bir bölgesinin kaynaşamamaları durumunda uterus duplikasyonları oluşur. Bu anomali şiddetine göre farklılık göstermektedir. Örneğin, sık görülen uterus bikorniste uterus ortak bir vaginaya iki boynuz şeklinde açılırken; uterus arkuatus durumunda, uterus korpusunun ortasından lümene doğru bir çıkıntı bulunur ve en hafif anomali tipidir. Ayrıca uterus didelfis en şiddetlisidir. Bu durumda ise iki uterus görülmektedir [26, 28].

2.2.2. Uterus anatomisi

Uterus, yaklaşık 7-8 cm uzunluğunda, 5 cm eninde ve 2,5 cm kalınlıkta oldukça kaslı bir organdır. Kaslı yapı sayesinde gebelik sırasında uterus boyutu 3-6 kat artabilmekte ve şekil değiştirebilmektedir. Uterus, pelvis boşluğunda, mesanenin arkasında ve rektumun önünde yerleşmiştir. Uterus pelvis duvarına ligamentlerle bağlanmıştır. Ligamentum (lig.) transversum cervicis, lig. pubocervicale, lig. sacrocervicalis adı verilen bağlar uterusu taşıyan güçlü yapılardır. Lig. latum uteri ve lig. teres uteri gevşek bağlardır ve bu yüzden uterusu taşımada görev almazlar ancak uterusun duruşunu sağlayan önemli ligamentlerdir [24, 29].

Anatomik olarak uterus üç kısımdan oluşur:

- Fundus uteri: Tuba uterinaların bağlandıkları kısmın üst kısmında kalan kaslı yapıdır.
- Corpus uteri: Ön tarafı düz, arka tarafı konveks olan tuba uterinaların uterusu bağlandıkları bölgenin alt kısmında yer alan en geniş bölümdür. Corpus ve cervix uteri birbirinden istmus uteri ile ayrılır. Bu bölüm yaklaşık 1 cm uzunluğundadır ve corpus uteri'nin en dar yeridir. Corpus uterinin boşluğuna cavitas uteri denir ve kaslı duvarın kalın olması nedeniyle dar, ters üçgen biçiminde bir boşluktur. Cavitas uteri iki delikle tuba uterinallara, bir açıklıkla da vaginaya açılır. Servikal kanal üst kısımda uterin kavite ile internal os vasıtasıyla, aşağı kısımda vagina ile eksternal os vasıtasıyla ilişki kurar.
- Cervix uteri: uterusun vaginaya açıldığı yerdir. Yaklaşık 2-3 cm uzunluğundadır. Cervix uteri vagina içerisine açılır. Bu açıklığın önünde ve arkasında fornix anterior ve fornix posterior olmak üzere iki çıkmaz bulunur [24, 25].

Uterusun Kan Damarları, Lenfatikleri ve Sinirleri

Uterusun arteriyel beslenmesi arteria (a.) uterina ve a. ovarica tarafından sağlanır. Lig. latum uteri'nin tabanında iç yana doğru seyreden a. uterina, üreteri üstten dik açı ile çaprazlayıp, cervix uteri'ye ulaşır. Lig. latum uteri içerisinde, uterusun yan kenarında yükselip a. ovarica' nın uçları ile anastomoz yapar ve buradan çıkan dallar uterusu besler.

Uterusun venleri, uterus arterlerini izleyerek lig. uteri'ye girerler. Daha sonra, Cervix uteri'nin her iki yanında vena iliaca interna'ya drene olan ven ağını oluştururlar. Son

olarak da, uterusun bu venöz ağırları, vagina ve ovaryumun venöz ağırlarıyla anastomoz yaparlar [29].

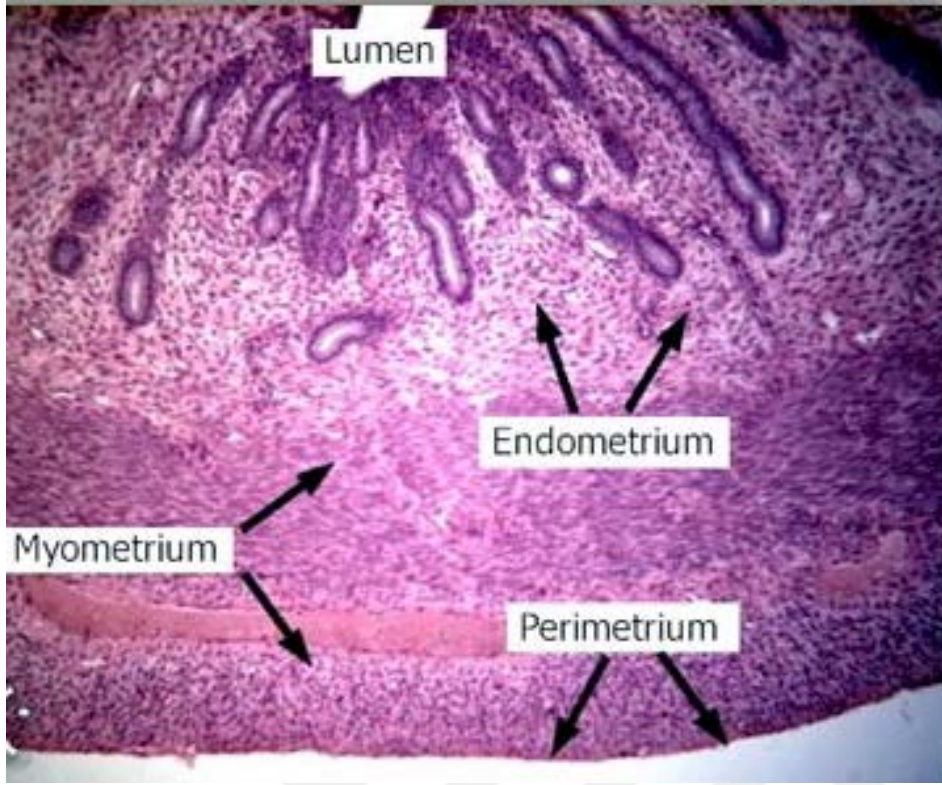
Uterusun lenf drenajı ise 3 yolla gerçekleşir: Fundus bölgesinden gelen çoğu lenf damarları nodi lymphatici lumbalase, bazıları ise nodi lymphatici iliacy externiye ya da nodi lymphatici inguinales superficialese açılır. Corpus uteri'nin lenf damarları lig. latum uteri icerisinden nodi lymphatici iliacy externiye açılır. Cervix uteri'den gelen lenf damarları ise nodi lymphatici iliacy interni ve nodi sacralese açılırlar [24, 29].

Uterusun sinirleri plexus hypogastricus inferior (plexus pelvicy)'dan ve esas olarak plexus uterovaginalis' in ön ve orta bölümlerinden kaynağını alır. Plexus uterovaginalis, plexus hypogastricus inferior' dan çıkarak pelvis içindeki organlara uzanan pleksuslardan biridir. Bu pleksus, sempatik, parasempatik ve visseral afferent lifler içerir [24, 25, 29].

2.2.3. Uterus histolojisi

İçi boşluklu bütün organlarda olduğu gibi uterus duvarı da histolojik olarak üç katmandan oluşur (Resim 2.1):

- Perimetrium (Tunika seroza)
- Miyometrium (Tunika muskularis)
- Endometrium (Tunika mukoza) [30]



Resim 2.1. Uterusun histolojik katmanları [31]

Perimetrium

Perimetrium katmanı, peritonun visseral yaprağıdır ve uterusun posterior yüzünü ve anterior yüzünün üst bölgesini örten, mezotel ve mezotelin altında elastik liflerden zengin, gevşek bağ dokusu özelliğindedir. Uterusun anterior tarafının alt yarısı ise peritonsuz bölgedir ve adventisya olarak isimlendirilir [25, 30].

Miyometrium

Bağ dokusu bölmeleri ile birbirinden ayrılmış düz kas lifi demetlerinden oluşmuş, uterusun en kalın katmanıdır. Miyometriyum kalınlığı fundus ve corpusun orta bölümlerinde daha fazla iken; tuba uterinanın açılış yerinde daha ince bir yapıdadır. Miyometriumda düz kas lifi demetleri 3 kat oluştururlar. İç ve dış katı genellikle longitudinal yerleşmiş kas lifi demetlerinden meydana gelmişken; orta kat sirküler ve longitudinal kas lifi demetlerinden oluşmuştur [32]. Ayrıca miyometriumun dış katındaki gevşek bağ dokusunda elastik lif yoğunluğu fazladır. Dış miyometrium katı, perimetriumun hemen altında bulunur ve uterusu sabitleyen bağlardan lig. teres uteri ve lig. latum uteri ile bağlantılıdır. Miyometriumun

orta katındaki sirküler yerleşim gösteren kas lifi demetleri arasındaki bağ dokuda büyük kan damarları ve lenfatikler bulunmaktadır. Bu tabakaya özel olarak stratum vaskulare adı verilir [25].

Gebelik döneminde düz kas hücrelerinin sayısının ve boyutlarının artması ile yani hiperplazi ve hipertrofi gözlenmesi ile miyometrium kalınlığı artar. Bu süreçte lif demetleri arasındaki bağ dokuda da artış gözlenir. Gebelik döneminde, düz kas hücrelerinin çoğu protein salgılayan ve kollagen sentezleyen hücrelerin ince yapı özelliklerini sergilerler. Bu şekilde miyometriumun kollagen içeriği artar ve gebelik sürecinde uterusu sağlamlaştırır. Doğumdan sonra ise, bazı düz kas hücreleri dejenere olur ya da boyut olarak küçülürler. Kollagen, enzimatik olarak yıkılır ve böylece uterus boyutu gebelik öncesi dönemdeki boyutlarına yakın hale gelir [25, 32].

Endometrium

Endometrium, epitel ve lamina propriadan oluşan, fetusun yerleşip geliştiği uterus mukozasıdır. Endometriumda, ovaryumun salgı aktivitesi ile paralellik gösteren döngüsel değişiklikler izlenir. Bu siklik değişiklikler pubertenin başlamasından menopoza kadar devam eder [30].

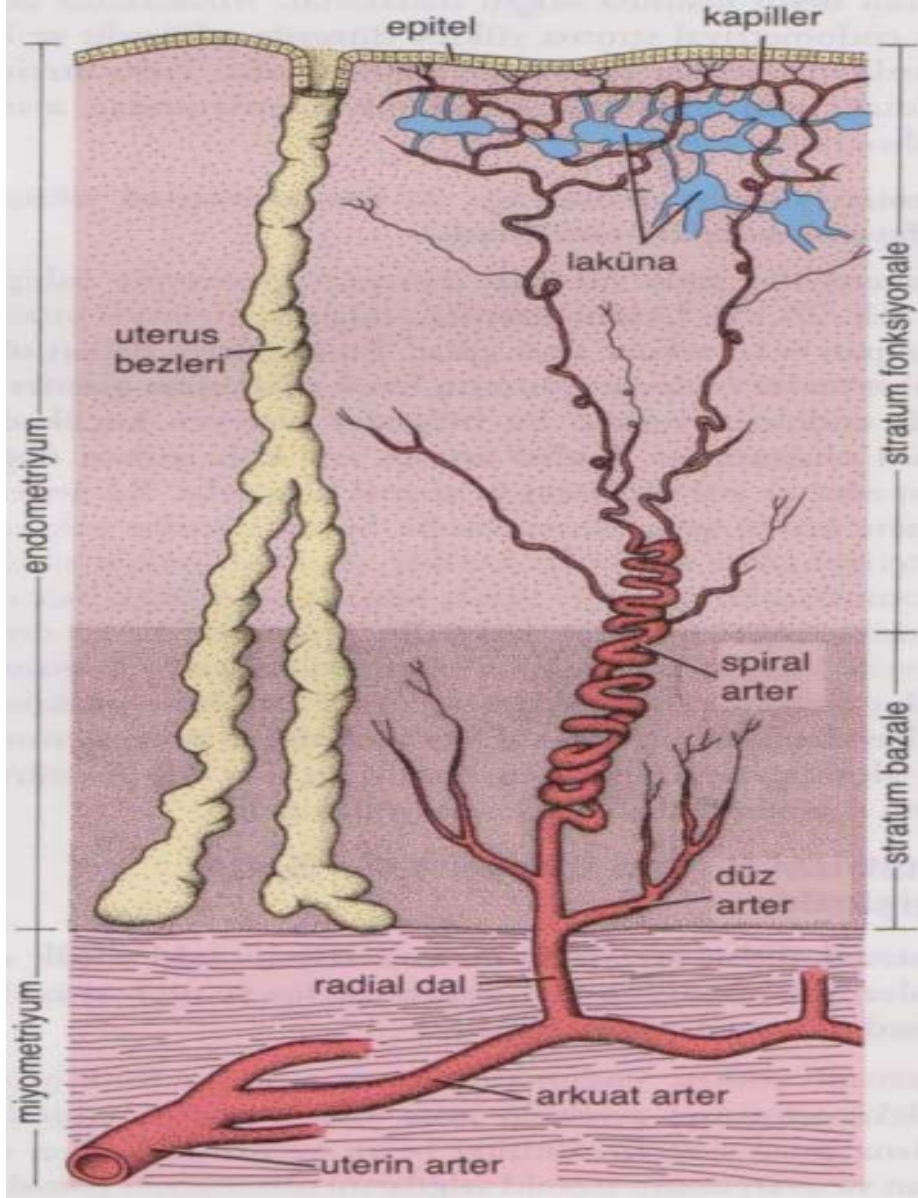
Endometrial mukoza, yüzey epiteli ve lamina propriadan oluşur. Uterus epiteli silyalı ve salgı yapan mikrovilluslu hücrelerden meydana gelen tek katlı prizmatik epiteldir. Uterus epiteli lamina propria içerisine invajinasyonlar yaparak çok sayıda basit tübüler yapıda olan uterus bezlerini oluştururlar. Uterus bezleri lamina proprianın derinlerine kadar uzanırlar. Basit tübüler bez özelliği göstermelerine rağmen uterus bezleri, miyometriuma yakın derin stroma içerisinde dallı tübüler yapı sergileyebilirler. Bezler, tek katlı prizmatik salgı hücrelerinden oluşmuştur. Ancak aralarında çok az sayıda silyalı hücreler de görülebilir [25, 30].

Lamina propria oldukça kalındır ve endometrial stroma olarak isimlendirilir. Endometrial stroma özelleşmiş bir bağ dokusudur. Stromal hücreler geniş, yıldız şekillidirler ve oval çekirdeğe sahiptirler. Bağ dokusu lenfosit, makrofaj ve granüler lökosit içeren; retiküler lif yönünden zengin özelliktedir. Retiküler lifler epitelin altında yoğunlaşarak bazal lamina oluştururlar.

Endometrium, yapısal ve fonksiyonel açıdan, fonksiyonel ve bazal tabaka olmak üzere olarak 2 bölüme ayrılır:

- Fonksiyonel tabaka (stratum fonksiyonalis): Endometriumun lümene yakın 2/3'lük kısmına karşılık gelir. Yüzey epiteli ve bezlerin boyun ile gövde kısımlarının yer aldığı lamina propriayı içerir. Menstruasyon sırasında bu tabaka dökülür. Gebelikte fonksiyonel tabaka 2 kattır. Üst 2/3'lük kısmı kompaktum endometrialis'tir. Bu kısım bezlerin daralıp kapanmış kısımlarını içeren sıkı yapıdır. Alt 1/3'lük kısmı ise genişlemiş, salgı dolu bez yapılarını içeren, gevşek yapıda olan spongiosum endometrialis tabakasıdır.
- Bazal tabaka (stratum bazale): Endometriumun 1/3'lük derin kısmını oluşturur. Uterus bezlerinin son kısımlarının yer aldığı stromayı kapsar. Menstruasyon sırasında bazal tabaka korunur ve fonksiyonel tabakanın yenilenmesi için kaynak oluşturur [25, 30, 32].

Endometriumda özelleşmiş kan-damar ağı vardır (Şekil 2.1). Uterin arter, miyometrium seviyesinde 6-10 dal arkuat artere bölünür. Arkuat arterlerin dalları endometriuma doğru ilerlerken ışınsal (radial) arterleri oluşturur. Radial arterlerin bir kolu bazal tabakaya girerek burayı besleyecek olan düz arterleri oluştururlar. Radial arterlerin diğer kolu ise kıvrılarak uzar ve spiral arter adını alır. Spiral arterler yüzeye doğru gittikçe inceliyor ve kapillere dönüşürler. Bu formda şekillenen spiral arterlerin distali ve kapiller fonksiyonel tabakayı beslerken; bazal tabaka sadece düz arterler tarafından kanlanır. Kısaca, menstrual evrede düz arterlerin tamamı ve spiral arterlerin başlangıç kısmı korunurken; östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında spiral arterin son kısmı ve kapiller menstrual siklus boyunca dejenere olur ve tekrar yenilenir. Fonksiyonel tabaka ile birlikte endometrial damar ağı da menstrual siklusa şekillenir, çoğalır ve daha sonra dejenere olur [25].



Şekil 2.1. Uterus endometriumunun tabakaları ve arterial kan desteği [25]

Menstrual döngü

Menstrual siklus pitüiter (hipofiz) bezinin pars distalisinden salınan ve ovaryum tarafından salgılanan steroid salgıları (östrojen ve progesteron) düzenleyen gonadotropinler tarafından düzenlenir. Menstrual siklus 12-15 yaşlarında başlar; 45-50 yaşlarına kadar devam eden bir süreçtir. Bu süreçte endometriumda morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelir. Menstrual siklus kanamanın başladığı gün başlar ve 28 günde bir tekrar eden 3 evreden oluşur [30, 33].

- Proliferasyon Evresi (Foliküler evre = Östrojenik evre): Foliküler maturasyon ile aynı anda gerçekleşen, kanamadan sonra 5.-14.gün arasındaki evredir. Overlerdeki gelişen foliküller tarafından salınan östrojen hormonu tarafından düzenlenir. Kanamadan sonra endometrium yaklaşık olarak 1 mm kalınlığında, uterus bezlerinin bazal kısımlarını içeren (stratum bazale) bağ dokusu yapısındadır. Menstruasyon evresinden sonra östrojen etkisi ile proliferasyon başlar; stroma hücreleri ve endotel hücreleri hızlıca proliferer olurlar. Ayrıca bezlerin bazal kısımlarında yer alan çoğalma ve farklılaşma özelliğindeki hücreler, dökülen endometrium yüzeyine doğru göç ederler ve epiteli yeniden şekillendirirler. Stromal hücreler de proliferer olarak kollagen ve ekstraselüler matriks sentezini sağlarlar. Spiral arterler hafif kıvrımlaşır ve uzarlar; ancak henüz endometriumun üst 1/3'lük kısmına ulaşamazlar. Uterus bezleri ise hafif dalgalı ve dar lümenli yapıdadırlar. Bez epiteli hücreleri sonraki evre olan sekretuar evreye hazırlık olarak granüllü endoplazmik retikulum ve golgi boyutlarını giderek artırırlar. Proliferasyon evresi sonunda endometriumun kalınlığı yaklaşık 3 mm'ye ulaşır [25, 32].

- Sekresyon Evresi (Luteal evre): Ovulasyondan hemen sonra başlayan, 14.-28. gün arasındaki evredir. Sekresyon evresi, korpus luteum oluşumu ile aynı zamana denk gelir ve korpus luteum tarafından salınan progesteron hormonu ile düzenlenir. Endometrium kalınlığı bu evrede 5-6 mm'ye kadar ulaşır. Bu evredeki kalınlaşma endometriumun fonksiyonals tabakasının ödemli hal alması, vaskülaritenin artması ve epitelyal hücrelerin hipertrofisi ile olur. Bu evrede bezler uzar, kıvrımlaşır ve lümenleri glikoprotein salgı ile dolarak genişler. Spiral arterler sarmal yapılar ve endometriumun yüzeyine ulaşana kadar uzarlar [30, 33]. Döllenme gerçekleşirse, blastokistin implantasyonu ile stromal hücreler östrojenin ve progesteronun etkisi ile desidual hücrelere dönüşür. Desidual hücreler, glikojen içeriği fazla olan ve embriyonun gelişimi için gerekli ortamı sağlayan hücresel yapıyı oluştururlar [25, 32].

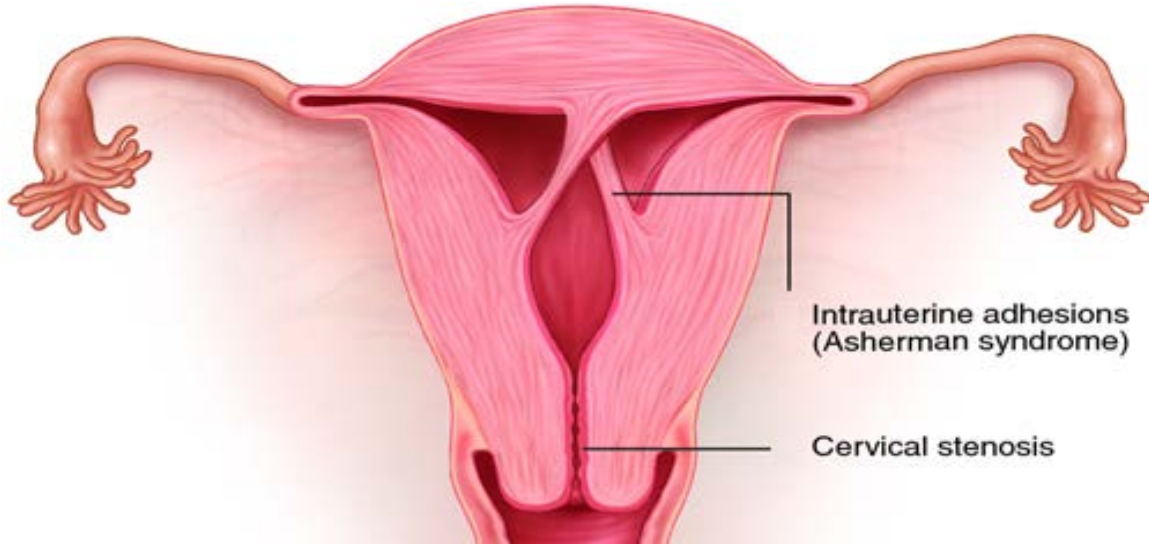
- Menstrual evre (Kanama evresi): Menstrual evre yaklaşık 5 gün sürer. Döllenme olmadığında korpus luteum yaklaşık 10 gün aktif olarak hormon ürettiikten sonra görevi azalır. Bu azalma ile progesteron ve östrojen salgısı aniden düşer ve endometriumda nekroz başlar. Spiral arterlerde düzenli kasılmalar başlar ve fonksiyonel tabaka iskemik bir hale gelir. Yerel olarak salgılanan prostoglandinler, sitokinler ve nitrik oksit ile kan damarı duvarları ve bazal membranları yırtılır. Ayrıca endometrium lamina propriasındaki kollagenler parçalanır. Endometrium stromasında ödem azalır ve endometrium büzüşür.

Spiral arterlerin yırtılması ile bezlerin lümenleri kan ile dolar ve salgılama durur. Kan akımı sebebiyle yüzey epiteli bozularak dökülür. Endometriumun fonksiyonel tabakasından doku parçaları koptukça venlerin, arterlerin ve bezlerin kopuk olan açık uçları ortaya çıkar. Bu dökülme bazal katmana kadar devam eder ve fonksiyonel tabaka tamamen kaybolur. Menstrual kanama periyodunda yaklaşık 35-50 ml kan kaybedilir ve bu evrede kanın pıhtılaşması inhibe edilir [25, 30, 32, 33].

2.3. Asherman Sendromu

Uterus içi adezyonlar uterus kavitesi içerisinde zarsı ve yoğun fibröz adheziv bantlar ile karşılıklı endometrium dokusunun yapışması olarak tanımlanır. İUA, ilk olarak 1894'te Heinrich Fritsch tarafından postpartum (doğum sonrası) küretaj sonrası sekonder amenoreli hastalarda tanımlanmıştır. Takip eden 50 yıl boyunca çok sayıda vaka raporlanmış; 1948'de ise Joseph Asherman İUA ilişkili belirtileri ve sıklığını ilk defa rapor etmiştir. Daha sonra 'Asherman Sendromu' terimi İUA vakalarını tanımlamak için kullanılmaya başlanmıştır [1, 2].

İntrauterin adezyon uterus kavitesi içinde skar dokunun gelişmesiyle oluşan yapışıklık, sineşidir (Şekil 2.2). Asherman sendromu, uterin kavitede adezyon formasyonu ile karakterize bir durumdur. Bu hastalığa sahip kadınlar, sıklıkla infertilite, amenore, hipomenore ya da dismenoreyi içeren menstrüel düzensizlikler ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile mücadele etmektedir. Adezyon formasyonunun dereceleri vardır. Minimal düzeylerde uterus kavitesinin karşılıklı yüzeyleri arasında ince bantlar şeklinde izlenirken; ciddi düzeylerde ise uterus kavitesinin tamamen oblitere olduğu, ön-arka duvarının tamamen birbirine yapışmış olduğu görülebilir. En ciddi düzeyde Asherman Sendromu olan kadınlarda, uterin kavitenin en az üçte ikisini kaplayan yoğun adezyonlarla birlikte, amenore ya da hipomenore izlenmektedir [2-4].



Şekil 2.2. İntrauterin adezyon formasyonu ile karakterize Asherman sendromu modeli [34]

Günümüz klinik uygulamalarda intrauterin adezyonlar ile Asherman sendromu eş olarak kullanılmaktadır. Ancak, Asherman sendromu için menstruel düzensizlik, pelvik ağrı ve anormal plasentasyon öyküsü gibi ek şikayetler hasta öyküsünde yer almalıdır. İntrauterin adezyon için gerçek bir prevalans belirlemek zordur çünkü, bu durum genel popülasyonda nadir ve asemptomatik görülen bir olaydır [9, 10]. Doğum sonrası uterus küretaj öyküsü olan kadınların %1.5-21.5 arasında değişen yaygınlık tahmin edilmektedir. Spontan düşük ile takip edilen 900'ün üzerinde kadında yapılan bir meta-analiz çalışmasında, işlem sonrası 12 ay içerisinde %19.1'inde intrauterin adezyon geliştiği çalışmada belirtilmiştir [10, 35].

2.3.1. Asherman sendromu etiyoloji ve risk faktörleri

Endometriumun bazal tabakasına hasar verecek herhangi bir olay intrauterin adezyon olarak şekillenip Asherman Sendromu'na sebep olabilir. İUA, çoğunlukla dilatasyon&küretaj veya endometrial kavite ile ilişkili miyomektomi, septal rezeksiyon ve sezeryan gibi cerrahi işlemlerden sonra şekillenir. Bazen yapışıklıklar ayrıca genital tüberküloz ve schistosomiasis gibi enfeksiyonlar sonucunda da meydana gelebilir. İUA prevalansı endometriumda meydana gelen hasar türüne göre değişiklik göstermektedir. Gebelik ilişkili D&C, Asherman Sendromu vakalarının %90'ını oluşturmaktadır [5]. Çok sayıda İUA olgusunun araştırıldığı bir çalışmada %67 olgunun abortus ya da erken gebelik kaybı sonucu uygulanan küretaj sonrasında şekillendiği tespit edilmiştir [6]. Sezeryanla doğum sonrası İUA oranı %2 civarında iken [6]; tekrarlayan gebelik kayıplarında bu oran

%39'lara çıkmaktadır [36]. Ayrıca postpartum kanamalar da %9 insidansında İUA oluşumuna sebep olmaktadır [37]. Postpartum küretaj olgularında ise görülme sıklığı %40-60 civarlarındadır [6]. Postpartum 2.-4. haftalar arası yapılan küretajlar daha sık ve ciddi İUA sebebi olmakta iken; ilk 48 saat içerisinde yapılan küretajlarda ise yüksek östrojen seviyesinden dolayı daha az adezyon oluşumuna sebep olmaktadır [5, 6, 38]. Ayrıca küretaj sayısındaki artış ile birlikte İUA sıklığının ve şiddetinin de arttığı çalışmalarda gösterilmiştir [7]. Yapılan bir çalışmada ise in vitro fertilizasyon sonrası erken gebelik kaybı olan kadınlarda, İUA prevalansının % 38 kadar yüksek olduğu bildirilmiştir [39]. Asherman Sendromu risk faktörleri ve insidansları çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Asherman Sendromu risk faktörleri ve insidansları

<i>Risk Faktörleri</i>	<i>İnsidans</i>	<i>Referans</i>
Düşük küretajı	%66.7 (1237/1856)	Wallach ve ark. [6] 1982
Postpartum küretaj	%21.5 (400/1856)	Wallach ve ark. [6] 1982
Enfeksiyon (Genital Tüberküloz)	%4 (74/1856)	Wallach ve ark. [6] 1982
Sezaryen	%2 (38/1856)	Wallach ve ark. [6] 1982
Diagnostik küretaj	%1.6 (30/1856)	Wallach ve ark. [6] 1982
Abdominal miyomektomi	%1.3 (24/1856)	Wallach ve ark. [6] 1982
Histeroskopik Cerrahi		
Miyomektomi (Tek miyom)	%31.3 (10/32)	Taskin ve ark. [40] 2000
Miyomektomi(çoklu miyom)	%45.5 (9/20)	Taskin ve ark. [40] 2000

2.3.2. Asherman sendromu tanı yöntemleri ve sınıflama

Hastalar amenore, hipomenore, pelvik ağrı, infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıpları gibi şikayetlerle kliniğe başvurmaktadırlar. Amenore, Asherman Sendromunda en sık görülen durumdur. Amenore ya uterin kavitenin veya servikal kanalın tamamen obliterasyonuna bağlıdır ya da obliterasyon olmadan uterin duvarlarında fibrozisin artmasıyla da olabilir.

Asherman Sendromu olan kadınlarda, hastalığın genişliğinin saptanması ve onarım için prognozun belirlenmesi amacıyla, birden fazla görüntüleme yöntemi ve adezyonların tekrarlamasını en aza indirmek için birden fazla yaklaşım gerekebilir. Asherman sendromu teşhisinde histeroskopi, transvajinal ultrasonografi, histerosalpingografi ya da salin infüzyon sonohisterografi yöntemleri kullanılmaktadır [3, 5].

Tanısal doğruluğu henüz kesin olmamakla birlikte intrauterin yapışıklıkları tespit etmek için Manyetik rezonans (MR) görüntüleme yöntemi de kullanılmaktadır. Ancak bu kullanım literatürde birkaç olgu sunumu ile sınırlıdır. Ayrıca MR yönteminin uygulanabilirliği maddi açıdan da sıkıntılıdır [41, 42].

Asherman sendromu tanısında histeroskopi yöntemi altın standart olarak kullanılmaktadır. Ofis histeroskopi intrauterin adezyonların teşhisi ve yaygınlığının değerlendirilmesinde uygun bir yöntem olarak görülmektedir [10]. HSG ve SHG'nin nispeten düşük hassasiyeti göz önüne alındığında, uterin kavitenin doğrudan histeroskopi ile incelenmesi üstün bir yöntemdir [43].

Günümüzde intrauterin adezyonların görülme sıklığı ve ciddiyeti nedeniyle adezyonların sınıflandırılması önem kazanmış olmasına rağmen tüm dünya tarafından standart olarak kullanılan bir sınıflandırma yoktur. Bu güne kadar intrauterin yapışıklıklar için validasyonu yapılmamış çeşitli sınıflandırma sistemleri öne sürülmüştür. Bu sınıflandırma sistemleri histeroskopik yöntemlere dayanmaktadır [10]. Bu sınıflandırmalardan en sık kullanılanı Amerikan Fertilite Derneği (ASRM)'nin yaptığı sınıflandırmadır. Bu sınıflamada hastaların menstrüel öyküleri (amenore, hipomenore ve normal menstrüel döngü), adezyonların uterin kavitede kapladığı alan ve adezyonun kalınlığı değerlendirilerek skorlama yapılmaktadır [44]. Ayrıca Avrupa Histeroskopi Derneği'nin sınıflamasına göre de hastaların menstrüel öyküleri, adezyon kalınlığı, adezyonun ayrılıp ayrılmayacağı, tubal ostiumların belirginliği ve adezyonların uterin kavitede neden olduğu obliterasyon miktarını değerlendirerek skorlama yapılmaktadır [10]. Valle ve Sciarra ise intrauterin adezyonu şiddetiyle yaygınlığına bağlı olarak hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3 gruba ayırmıştır: Hafif yapışıklıklar, kısmi uterin kavite tıkanıklığına neden olacak şekilde bazal endometrial dokuyu içeren zarsı yapışıklıklar olarak tanımlanmaktadır. Orta yapışıklıklar, kısmen ya da tamamen uterin kaviteyi tıkayan fibromusküler yapışıklıklar olarak tanımlanırken; şiddetli yapışıklıklarda ise uterin kavite kısmen ya da tamamen

tıkanmış durumdadır ve bu tip yapışıklıkta endometrial doku izlenmezken sadece bağ dokusu görülmektedir [45].

2.3.3. Asherman sendromunda endometrial değişiklikler

Endometrium, menstruel siklusa maruz kalan oldukça karmaşık bir dokudur. Fiziksel hasar ve onarım mekanizmasından farklı olarak menstruasyon sonrası onarımda tipik bir adezyon formasyonu izlenmez. Normal endometrial onarım skar doku oluşumu olmadan gerçekleşir ancak bazı kadınlarda, İUA oluşumu ile normal onarım mekanizmaları anormal gerçekleşmektedir. Tamir mekanizmalarındaki farklılık tam olarak anlaşılmış değildir. Ancak hipoksi, düşük neovaskülarizasyon ve adezyon ilişkili sitokinlerin ekspresyonlarındaki değişimi içeriyor olabileceği düşünülmektedir [46]. İUA hastalarda anjiyogenez ve revaskülarizasyon yetenekleri azalmakta; adezyon ilişkili sitokinlerin ekspresyonları ise artış göstermektedir [47].

Endometriumun bazal tabakası, oldukça yüksek olan rejeneratif kapasiteden sorumlu endometrial stem/progenitör hücreleri barındırmaktadır. Bu tabakada oluşan hasar sonrası postpartum dönemde düşük sirküle östrojenden dolayı endometrium işlevini yitirmektedir [48]. Normalde menstruasyonun ve doğumun ardından endometrial yüzey östrojen yokluğunda skar dokusu oluşturmadan onarılmaktadır [49, 50]. Bağırsak gibi diğer mukozal yüzeylerde hasar derin mükölaris katmanına ulaşmadığı sürece hasarlı mukozanın rejenerasyonu da skar oluşturmadan gerçekleşmektedir. Asherman sendromunda endometriumun fonksiyonel tabakasındaki işlevsel yetmezliğin nedeni olarak endometrium bazalis tabakasının ve burada yerleşik kök hücre popülasyonunun kaybı ile alttaki miyometrium tabakasını kapsayan derin travmalar olduğu düşünülmektedir [46]. Müköler adezyonlar kötü prognoz taşırlar. Çünkü endometriumun bazal tabakası adezyolizis sonrası yeni fonksiyonel endometrium oluşumu için bir başlangıç noktası olmaktadır [51].

Histolojik olarak adezyon formasyonu gösteren endometriumda bazı değişiklikler izlenmektedir. Endometrial stroma yerini fibröz dokuya bırakmıştır; epitelyal bezler kübo-kolumnar epitel şeklinde inaktif özellik sergilerler ve fonksiyonel ile bazal tabaka arasındaki ayırım kaybolmuştur. Fonksiyonel tabaka tek katman ve hormonal uyarıya cevap vermeyen bir yapıya dönüşür. Damarlanma azalmış veya kaybolmuş durumdadır [6,

9, 38, 46]. Bazı araştırmacılar, fibrozise bağlı olarak miyometrial kontraktilitede azalma ve vaskülaritede zayıflama olduğunu bu nedenle de seks steroidlerinin endometrium dokusu üzerine etki edemediklerini savunmaktadırlar. Sonuç olarak da adezyonlar atrofik endometriuma sebep olmaktadır [38, 52].

Hasarlı endometrium, iyileşme sürecinde uterus duvarının karşılıklı yapışmasına neden olur ve bu durum değişen seviyelerde uterus kavitesi obliterasyonu (tıkanma) ile sonuçlanmaktadır. Tekrarlayan gebelik kayıplarına sıklıkla fibrotik adezyonların ve zayıf vaskülarizasyonun izlendiği tubal ostiumlarda ve uterin kavitede kısmi tıkanmalar sebep olmaktadır [9].

Endometrium dökülme sonucu onarımını miktar olarak çok olduğu tahmin edilen kök hücre kaynağından sağlamaktadır. Çok sayıda çalışmalarda kendini yenileme, yüksek proliferatif potansiyel ve pluripotent farklılaşma yeteneğine sahip olası endometrial kök / progenitor hücreler tespit edilmiştir. Asherman sendromunda, kök hücre azlığının embriyo implantasyonu için yetersiz endometrium dokusu bulunmasına neden olduğu düşünülmektedir [53, 54].

Yapışıklıklar endometrium, miyometriyum veya bağ dokusu kaynaklı olabilmekle birlikte [6]; uterustaki patolojik değişiklikler uterus kavitesindeki minimal adezyonlardan tamamen obliterasyonuna kadar değişken düzeylerde olabilmektedir. Uterus kavitesi postmenapozal hastalarda olduğu gibi kısalmış ve küçülmüştür. Adezyonların yoğunluğu ve boyutu farklılık göstermektedir. Adezyonların birçoğu gross patoloji incelemesinde gözden kaçabilecek kadar ince ve hassas iken; bir kısmı da diseksiyonu zorlaştıracak kadar yoğundur [52].

Patolojik lokalizasyonuna göre sınıflandırma [52]:

1. Total atrezi: Uterin kavite ve servikal kanalın obliterasyonu ile karakterizedir. Çok nadir izlenir.
2. Bedensel yapışıklıklar: Olguların çoğunluğu zar gibi yapışıklıklardan; uterus kavitesini bozan ciddi yapışıklıklara kadar değişkenlik gösterir.
3. Servikoistmik yapışıklıklar: servikal kanalda darlık ya da kapanma ile karakterizedir. Nadir izlenir.

Tam kalınlıkta kas biyopsi örneklerini inceleyen Yaffe ve arkadaşları, kontrol gruplarında uterus duvarının %13-20 oranında fibröz doku içerdığı; uterin fibröz hastalarda ise fibröz doku belirgin bir artış göstermiş ve bu oranın %50-80 civarında olduğunu bildirmişlerdir [55].

2.3.4. Asherman sendromu tedavisi ve yardımcı yöntemler

Asherman Sendromu tedavi stratejileri şu şekilde özetlenebilir [8]:

- Tedavi
 - o Histerotomi
 - o Dilatasyon ve Küretaj
 - o Histeroskopik cerrahi
- Tekrar adezyon oluşumunun önlenmesi için yardımcı yöntemler
 - o Rahim içi araç (RİA)
 - o Balon stent
 - o Foley kateter
 - o Anti-adezive bariyer
 - o Hormonal tedavi

Tedavi

Histerotomi, açık cerrahi işlem uygulanarak uterus duvarının açılması prensibine dayalı yöntemdir. Geçmişte Asherman Sendromu tedavisinde bu yöntemin birkaç vakada kullanıldığı ve üreme fonksiyonları için endometriumda yeterli iyileşme olduğu söz edilmiştir. Ancak histeroskopik yaklaşım büyük risklerinden dolayı günümüzde tercih edilmemektedir. Bu yaklaşım çok karmaşık bir olguda uygulanabilirken; yerine histeroskopi tekniklerinin kullanılması günümüzde kabul görmektedir [6, 9].

Histeroskopi uygulaması yaygınlaşmadan önce kör dilatasyon ve küretaj tedavi yöntemi olarak uygulanıyordu. Bugüne kadar terapötik yaklaşımlardan en fazla kullanılan dilatasyon ve küretaj işlemi olmuştur. Ancak körlemesine yapılan bu işlemin doğruluk oranı çok düşüktür. Ayrıca, zayıf tanı aracı olmanın yanı sıra rahim perforasyon riskini yükselten bir tedavi seçeneğiydi [8].

Histeroskopi, intrauterin adezyon tanısını doğrulamasının yanısıra tedavi olanağı da sağlamaktadır. Histeroskopik adezyoliziste amaç, uterus hacmini ve şeklini düzenleyerek hastaya fertil potansiyel kazandırmaktır. Histeroskopik cerrahi günümüzde altın standart kabul edilmekle birlikte işlem oldukça zordur. Histeroskopi sırasında birçok komplikasyon izlenebilmektedir. Karşılaşılabilecek başlıca problem, %3-24 oranında izlenen adezyon formasyonunun tekrarlanmasıdır. Hatta şiddetli adezyon vakalarında bu oran %63'lere kadar çıkmaktadır. Ayrıca, histeroskopik adezyolizis sırasında görülen komplikasyonlar arasında uterin perforasyon, hemoraji ve enfeksiyon; operasyon sonrasında ise erken gebelik kayıpları sayılabilir [8, 13, 14]. Uzun dönemde ise, intrauterin gelişme geriliği, plasentasyon anomalileri (plasenta previa, plasenta akreata), uterin rüptür ve erken doğum gibi komplikasyonlar oluşabilmektedir [15].

Yardımcı Yöntemler

Operasyon sonrası tekrar adezyon oluşumu tedavi yöntemlerinin başarısını sınırlayan en önemli etmendir. Şiddetli intrauterin adezyon olguları için intrauterin adezyolizis sonrası bu oran %20-62'lere çıkmaktadır [9, 10].

Cerrahi adezyolizisten sonra tekrar adezyon formasyonu engelleyen birçok yayın olmasına rağmen yapılmış çalışmalar yetersizdir. Tekrar adezyon oluşumunu önlemek için günümüzde standart olarak RİA kullanımı önerilmektedir. RİA uygulaması karşılıklı uterin yüzeylerin birbiri ile temasını engelleyen fiziksel bir engel oluşturmaktadır. Bu engel oluşumu ile de endometrial rejenerasyonun sağlanabileceği bazı araştırmacılar tarafından savunulmaktadır. ancak bazı çalışmalarda ise, RİA'nın oldukça küçük yüzey alanına sahip olabileceğini ve adezyonu önlemek için mümkün olamayacağını ve aşırı inflamatuvar reaksiyona sebep olacağını savunmaktadırlar [11, 12].

Balon stent de yapışıklıkların tekrarını önlemek için uygulanan mekanik bir yöntem olarak tarif edilmiştir. Cerrahi tedaviden hemen sonra uygulanması gereken; silikon yapıda, normal rahim boşluğunun şekline uyan üçgen şeklinde, rahim içinde şişirilerek kullanılan bir yöntemdir. Yeniden İUA oluşumunu raporlayan bir veri bulunmamaktadır [8].

Foley kateter, İUA tekrarını önlemek amacıyla rahim duvarlarını ayırmak için kullanılan ilk mekanik cihazlardan biridir. Foley kateter uygulanması ile adezyon oluşumunun

azaldığını ve uterus genişliğinin arttığını gösteren çalışmalar olsa da; foley katheter uygulamasının servikal kanal yoluyla enfeksiyona ve uterin perforasyona neden olarak büyük sıkıntı yarattığı bilinmektedir [8]. Ayrıca, foley katheter balonunun etrafı amniyon zarıyla sarılarak adezyonu değerlendirdikleri 2006 yılında yapılan bir çalışmada, histeroskopi sonrasında şiddetli adezyonların derecesinin azaldığı gözlemlenmiştir [56].

Cerrahi işlemden sonra adezyon oluşumunun önlenmesi için hyaluronik asit jel gibi anti-adeziv bariyerler kullanılmaktadır. Hyaluronik asit, fibrin formasyonunu azaltarak adezyon şiddetini azaltmaktadır. Ancak, hyaluronik asit jel uygulamasının uzun dönemde fertilité ve menstrual semptomları değerlendiren çalışma bulunmamaktadır [57, 58]. Cerrahi histeroskopi sonrasında gelişebilecek adezyon oluşumunu önlemek amacıyla çeşitli ilaçlar denenmektedir. Kaya ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı bir çalışmada prostoglandin E1 analogu sentetik bir ilaç olan misoprostol kullanarak adezyon formasyonuna olan etkisi incelenmiştir. Misoprostol kullanılan gruplarda anlamlı olarak inflamasyonun ve adezyonun azaldığını göstermişlerdir [58]. Adezyon önleyici bariyerlerle ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olsa da insan amniyon grefti, spray Jel, Oxiplex / AP jel, Hyalobarrier gibi çeşitli biyolojik bariyerlerin intrauterin kullanımı ABD'de yasaklanmıştır [46].

Asherman sendromunda cerrahi işlem sonrası endometrial proliferasyonu arttırmak için sıklıkla östrojen ve progestin hormon tedavisi kullanılmaktadır. Postoperatif olarak östrojen tedavisi alan hastalarda adezyon tekrarlanma sıklığının azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Farhi ve arkadaşları ilk trimestırda dilatasyon küretaj uygulanan hastalara cerrahi sonrası östrojen ve progestin tedavisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada, hormon tedavisi gören hastaların endometrium volümü %95 oranında arttığını belirtmişlerdir [59]. Östrojen tedavisi tek başına zayıf etkinliğe sahiptir ve genellikle geniş uygulamayı sınırlayan bazı yan etkileri bulundurur. Östrojen tedavisi, dozun hasta için uygun olup olmamasına bakılmadan uygulanmaktadır. Yüksek dozda östrojen transforme edici büyüme faktörü (TGF)- β dahil olmak üzere diğer sitokinler ile etkileşerek endometrial fibrozise neden olabilir. Düşük doz östrojen koşullarında ise endometrial atrofi izlenebilir. Bu da fibroblast proliferasyonuna ve nihayetinde endometrial fibrozise sebep olabilir [60, 61].

2.4. Kök Hücre

Organizmanın en öncül hücreleri olan kök hücreler bölünebilme, kendini yenileyebilme ve çoğalabilme kapasitesine sahip hücrelerdir [62, 63].

Kök hücreler uygun sinyallerle karşılaşmadıklarından farklanmamış hücrelerdir. Bu yüzden belirli bir dokuya ait özelliklere sahip değildir. Bu hücreler aldıkları sinyallere göre farklı fonksiyondaki hücrelere dönüşebilirler. Bu sayede hasarlı dokuya transplante edildiğinde dokuyu işlevsel hale getirebilirler.

Kök hücreyi tanımlayabilen en temel ölçütler şunlardır; kendini yenileyebilme (self-renewal), tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklanabilme (multi-lineage differentiation), bir dokunun yeniden fonksiyonel yapılandırılması.

Kök hücreler simetrik ya da asimetrik olmak üzere bölünerek kendilerini yenileyebilirler. Simetrik bölünme ile oluşan eş iki hücre de kök hücre özelliklerini taşıırken; asimetrik bölünme ile oluşan hücrenin bir tanesi kök hücre özelliklerini korur; diğeri ise aldığı farklanma sinyaline göre sonraki aşama için farklanır. Kök hücreler genlerden ve dış etkenlerden aldıkları bu sinyaller ile endodermal, mezodermal ve ektodermal hücre tiplerine dönüşebilirler [64, 65].

Erişkin kök hücrelerin uygun şartlarda ve uyarılarla farklı hücrelere dönüşebilmesine transdiferansiyasyon ya da plastisite adı verilir. Kök hücrenin, başka bir dokuya ait kök hücre fenotipini kazanabilmesine "kök hücre plastisitesi" denir.

Kök hücrelerin aktifleşmeleri için öncelikle kök hücrelerin yereldikleri bölgedeki nişlerinden hasarlı olan dokuya göçleri gerçekleşmelidir. Bu göç ise hasarlı dokunun değişen mikroçevresinden kaynaklanan uyarılar ile sağlanır. Hasarlı bölgeden salınan soluble faktör olan stromal derived factor-1 (SDF-1) ve kompleman C3 fraksiyonunun rolü önemlidir. Bölgeler arası gradient farkı kök hücrelerin hasarlı bölgeye göçü için uyarı oluşturmaktadır [66, 67].

Kök hücreler farklılaşabilme yeteneklerine göre totipotent, multipotent ve pluripotent olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Totipotent hücreler sınırsız farklanabilir ve farklı dokulara yönlenebilirler. Sperm ile oositin birleşmesi sonucu oluşan zigot tek başına tüm bir

organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye sahip olduğundan totipotent hücre özelliğindedir. Fertilizasyondan sonraki 4-5 gün içinde meydana gelen blastomerlerin her biri tek başına totipotent hücre özelliği taşırlar. Pluripotent hücreler ise tek başlarına bir organizmayı meydana getiremeseler de uygun ortam sağlandığında 200 farklı hücre tipine dönüşebilirler. Pluripotent hücreler fertilizasyondan 5 gün sonrasında blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir. Bu hücreler üç germ tabakasından köken alan hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Gestasyonun ileri evrelerinde ise hücreler özelleşirler ve erişkin kök hücrelere dönüşürler. Erişkin hale gelmiş kök hücreler ise bulundukları dokunun hücre tipini üretirler. Bulundukları dokuya ait hücreleri oluşturabilen, sınırlı fonksiyonlara sahip olan bu hücrelere ise multipotent hücreler denir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla multipotent hücrelerin sadece bulundukları dokuya ait yapıları değil farklı dokulara ait hücreleri de meydana getirebildikleri gösterilmiştir. Örneğin, kemik iliği kaynaklı bir kök hücrenin kırmızı ve beyaz kan hücreleri gibi farklı kan hücrelerini oluşturabildiği gibi; osteoblastlara, kondroblastlara ve adipositlere de farklılaşabilme yetenekleri de vardır [68].

2.4.1. Kök hücre kaynakları

Kök hücreler, embriyonik dönemin başlangıcında ve fetal dokulardan elde edilebildiği gibi birçok farklı erişkin dokudan da izole edilebilir. Kök hücreler köken aldıkları yapılara göre üç başlıkta tanımlanabilirler:

- Embriyonik Kök hücreler
- Fetal kök hücreler
- Erişkin kök hücreler
 - o Hematopoetik kök hücreler (Kemik iliği, Periferik kan, Kordon kanı)
 - o Mezenkimal kök hücreler

Embriyonik kök hücreler

Embriyonik kök hücreler blastokistin iç hücre kitlesi olan embriyoblastlardan elde edilen pluripotent özellikli kök hücrelerdir. Pluripotent özelliğindeki bu hücreler üç germ tabakasına farklılaşabilme yeteneğindedirler. Embriyonik kök hücreler sınırsız olarak

kendilerini yenileyebilirler ve değişik hücre tiplerine farklılaşabilirler. Bu sebeplerden dolayı embriyonik kök hücre araştırmaları rejeneratif tıpta önem kazanmıştır.

İnsan embriyonik kök hücreleri pluripotensiye ait olan farklılaşmamış hücrelerin belirteçlerini ifade ederler. Bu belirteçlerden bazıları ise CD-9, CD-24, Oct-4, Nanog, LIN-28, Thy-1, SSEA-3 ve SSEA-4'tür [69].

Hücrelerin çoğalma yeteneğini belirleyen belirteçlerden en önemlisi telomerler ve telomeraz aktivitesidir. Telomer kromozomlarda tekrarlanan "TTAGGG" gen bölgesinden oluşur. Bu gen bölgesi kromozom kısalmasını engeller ve replikasyonu güçlendirir. Kanser hücreleri ve embriyonik kök hücreler uygun kültür ortamında uzun süre yüksek derecede telomeraz aktivitesi gösterirler. Bu sayede embriyonik kök hücreler sınırsız kendilerini yenileme kapasitesine sahiptirler ve tüm fetal dokulara, erişkin kök hücrelere ve bunların daha farklılaşmamış progenitörlerine farklılaşabilirler. Embriyonik kök hücreler in vitro ortamda kültür edildiklerinde kendiliklerinden embriyonik cisimler oluştururlar ve özel büyüme faktörlerinin veya sitokinlerin kullanılmasıyla da özel hücre dizilerine farklılaşabilirler [70].

Fetal kök hücreler

Fetal doku, spontan düşüklerden, ölü doğum veya ektopik gebelik nedeniyle ameliyattan sonra kadavra fetuslarından elde edilebilmektedir. Fetal doku, oldukça fazla sayıda kök hücre içerir. Yani, fetal doku hücreleri, yetişkin doku hücrelerinden daha kolay kültürlenir ve daha kolay çoğalırlar. Fetal doku hücrelerinin alıcılar tarafından reddedilme olasılığı daha düşüktür, çünkü bu hücreler antijeniktir ve bağışıklık toleransı için insan lökosit antijen G (HLA-G) eksprese ederler.

Araştırmacılar yeni mezenkimal kök hücre kaynağı olarak fetal doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri tanımlamışlardır. Fetal doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler erişkin kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden daha etkin olarak tanımlanmaktadır. Hipoinmünojenik özellikleri de bu hücreleri geleceğin klinik uygulamalarında güçlü birer hücre tedavi aracı olarak öne çıkarmaktadır [71].

Erişkin kök hücreler

Erişkin tip kök hücreler doku ve organlarda bulunan kök hücreler olup kendini yenileme özelliklerine sahiptirler. Organda ihtiyaç durumunda farklılaşma göstererek doku tamirini sağlamaktadırlar. Erişkin kök hücreler kemik iliği, periferik kan, iskelet kası, diş dokusu, deri, beyin gibi yapı ve organlar başta olmak üzere; son yapılan çalışmalarla birlikte birçok organda bulunmaktadır [72].

Erişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelerin aksine daha özelleşmiş hücrelerdir. Örneğin, kan kök hücreleri normal olarak yalnızca birçok kan hücresini üretebilir ve sinir kök hücreleri, yalnızca çeşitli beyin hücreleri türlerini üretebilir. Ancak son araştırmalar, bazı erişkin kök hücrelerin daha önce düşünülenlerden daha esnek olabileceğini ve daha geniş bir hücre türü çeşidi üretilabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, bazı deneyler yetişkin farelerden izole edilen kan kök hücrelerinin aynı zamanda karaciğer, kas ve deri hücreleri üretebileceğini göstermektedir [72, 73].

Erişkin kök hücreler, hematopoetik, mezenkimal (stromal) veya organlarda yerleşik kök hücreler olmak üzere 3 başlık altında incelenebilir.

Hematopoetik kök hücreler, kordon kanı, kemik iliği ve periferik kan gibi hematopoetik dokularda bulunurlar. Kemik iliği stromasındaki osteoblastlar tarafından eksprese edilen granülosit koloni uyarıcı faktör, IL-6, Notch ligand jagged 1 gibi faktörler aracılığı ile hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonları ve diferansiyonları sağlanır. Ayrıca bu birliktelikte hematopoetik kök hücreler de osteoblastların aktivitelerini düzenlerler [74].

CD34, hematopoetik kök hücrelerin en önemli belirteçidir. CD34, insan kemik iliği hücrelerinin %0.5-5'inde eksprese olurken; erken progenitör hücrelerde bulunurlar ancak daha olgun kök hücrelerde bulunmazlar [75].

Kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücreler nötrofil, monosit, bazofil, eozinofil, trombosit, eritrosit ve lenfosit gibi çeşitli hücre tiplerine farklılaşarak pluripotent özellik gösterirler.

Hematopoetik organlardan elde edilen hematopoetik kök hücreler ayrıca kemik, kıkırdak, kas, endotel, epitel ve hepatosit gibi fonksiyonel hücrelere dönüştürülebilmektedir [76].

Hematopoetik hücreler, hematopoetik kök hücrelere ek olarak hemanjioblastlar, mezenkimal kök hücreler ve multipotent erişkin progenitör hücreler tarafından da oluşturulmaktadır [72].

Hematopoetik kök hücrenin farklanmadan proliferere olabilmesi için Wnt/ β -katenin proteini varlığı şarttır. β -katenin'in aşırı ifade edilmesi, kök hücrelerin farklılaşmasını engellerken; aynı zamanda çoğalmasına katkıda bulunur. Saflaştırılmış Wnt3a proteini in vitro kültüre eklendiğinde de hematopoetik kök hücre proliferasyonu sağlanır [77].

Mezenkimal kök hücreler; kemik, kıkırdak, kas, ligament, tendon ve yağ doku gibi mezenkimal dokulara farklanan ve bu dokuların yenilenmesine katkıda bulunan hematopoetik olmayan stromal hücrelerdir. Aynı zamanda mezoderm kökenli olmayan çok çeşitli hücrelere farklılaştıkları da gösterilmiştir [78]. Mezenkimal kök hücreler 2.4.2 başlığı altında detaylı olarak anlatılmıştır.

Organlarda yerleşik kök hücreler ise hücre ölümü ya da doku hasarı sonucu yeraldıkları dokuyu tamir etmekten sorumlu hücrelerdir. Birçok organda özelleşmiş kök hücreleri bulunmaktadır. Bu organlara ya da yapılara örnek olarak spinal kord, diş kökü, damarlar, deri epiteli, sindirim sistemi epiteli, uterus endometriumu, karaciğer ve pankreas verilebilir [79].

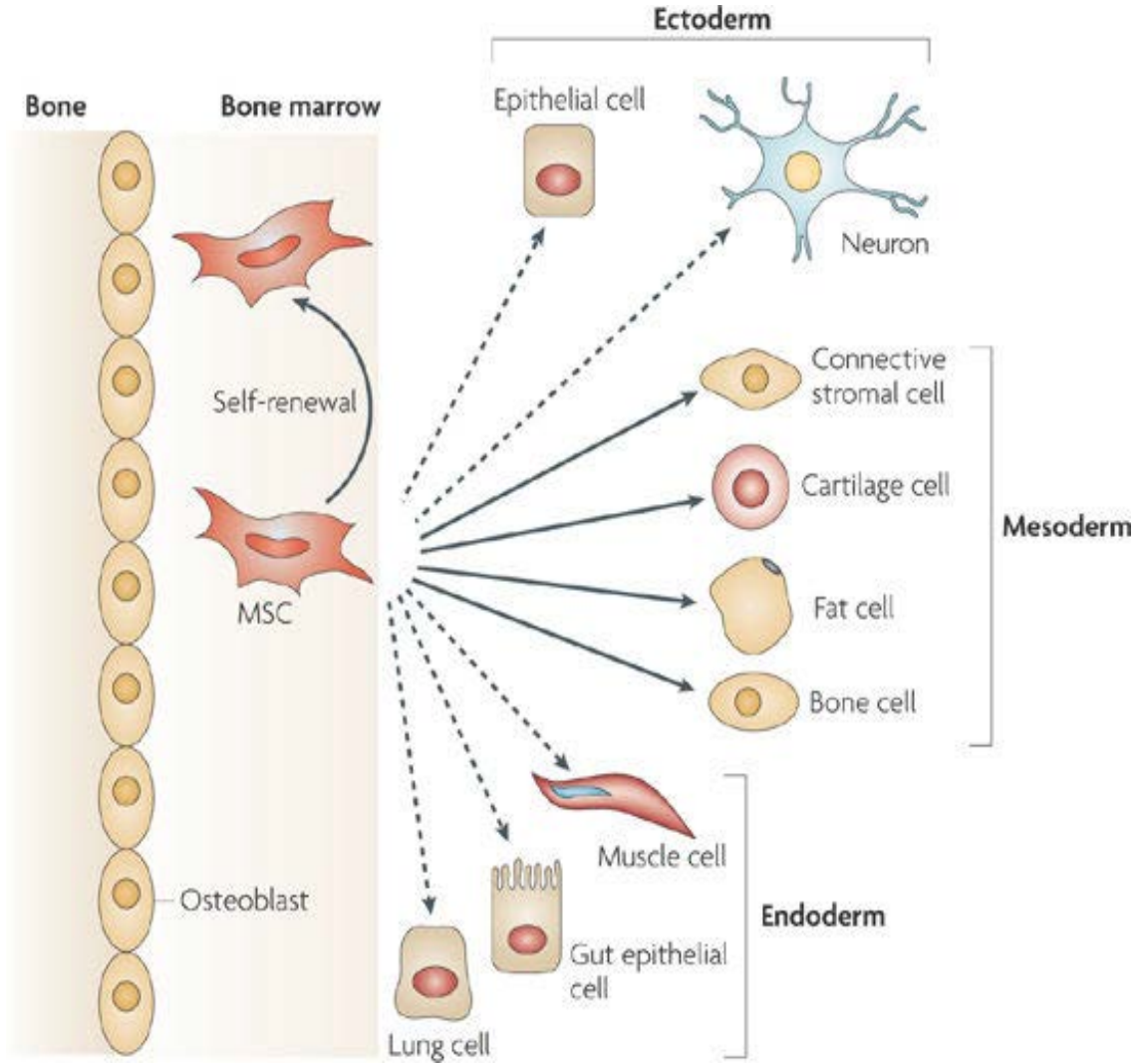
2.4.2. Mezenkimal kök hücreler

Günümüzde mezenkimal kök hücreler yetişkin, fetüs ve yenidoğana ait çeşitli doku ve organlardan elde edilebilmektedir. Önceleri sadece kemik iliğinden izole edilebilen mezenkimal kök hücreler günümüzde kas, kemik, kıkırdak, yağ doku, diş pulpası, periodontal doku, karaciğer, akciğer, timus, ovaryum, testis, amniyon sıvısı, plasenta ve umbilikal kord kanından da elde edilebilmektedir. Mezenkimal kaynaklı kök hücreler intravenöz yolla organizmaya verildiklerinde ilk olarak yöneltildikleri bölge kemik iliğidir. Ancak organizmada doku hasarı olduğunda artan integrin, selektin, kemokin gibi mediatörler mezenkimal kök hücre üzerindeki yüzey reseptörleri ile etkileşerek kök hücrelerin hasarlı dokuya yönlendirilmesini sağlarlar. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik aktiviteleri düşüktür. T ve B lenfosit, doğal öldürücü hücre aktivasyonunu baskılayıp; dendritik hücrelerin antijen sunma özelliklerini azaltırlar. Bu özellikleri ile anti-inflamatuar

ve anti-apoptotik mediatör salınımına yol açarak immün modölatör özellik gösterirler [16, 17].

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler hematopoetik hücreler için gerekli makrofaj koloni stimule edici faktör (M-CSF), Flt-ligand, kök hücre faktör (SCF) gibi büyüme faktörlerini salgırlar. Ayrıca mezenkimal kök hücreler tarafından interlökin (IL)-1, -6, -7, -8, -11, -12, -14 gibi sitokinler, stromal kaynaklı faktör (SDF)-1, monosit kemoatraktan proteinler gibi kemokinler de sentezlenmektedir [80].

Mezenkimal kök hücreler laboratuvar ortamında kök hücre özelliklerini koruyarak kolaylıkla çoğaltılabilmektedirler. Mezenkimal kök hücrelerin birçok farklı doku hücresine dönüşebilmesi (Şekil 2.3), hasarlı dokuya migrasyonları, göç ettikleri hasarlı bölgedeki hücrelerle füzyona girmeleri gibi birçok özellik bu hücreleri ayrıcalıklı kılmaktadır. Ayrıca çok çeşitli faktör ve kemokinler salgılayarak doku tamirine destek olmaları, non-immunojenik özellikte olmaları ve anjiyojenik, antiapoptotik, antiinflamatuvar etki göstermeleri hücresel tedaviler içinde mezenkimal kök hücrelerin öne çıkmasını sağlamaktadır [18, 19].



Şekil 2.3. Mezenkimal kök hücrenin farklılaşma kapasitesi [81]

Mezenkimal kök hücrelerin proliferatif, angiogenetik ve antifibrotik etkileri

Mezenkimal kök hücreler sitokinler ve kimyasal kemokinler aracılığı ile inflamatuvar bölgeye doğru hareket ederler ve o bölgede proliferatif, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik rol üstlenirler. Mezenkimal kök hücrelerin parakrin etki göstererek büyüme faktörü ve sitokin salgılaması antifibrotik özellik kazanmada ve damarlanmada rol oynaması önemlidir [16, 82-84].

Anjiyogenik yanıt bozulduğunda mezenkial kök hücreler, stromal hücre kaynaklı faktör-1 (SDF-1), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal büyüme faktörü (EGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), anjiyopietin (ANG) -1, makrofaj enflamatuvar protein (MIP) -1 α ve β , eritropietin (EPO),

matriks metalloproteinazlar ve birçok sitokin salarak anjiyogenezin ve doku rejenerasyonunun ilerletilmesini sağlarlar. Mezenkimal kök hücreler tarafından salgılanan VEGF bu hücrelerin anjiyogenik potansiyelinden sorumlu kritik bir faktördür. VEGF'den başka, TGF- β 1 ve matriks metalloproteinazlar (MMP) da dahil olmak üzere mezenkimal kök hücreler tarafından eksprese edilen diğer moleküller de mezenkimal kök hücrelerin endotelial hücreler ile etkileşimine katkıda bulunur [85].

Mezenkimal kök hücrelerin parakrin sekresyonu, 15 yıl önce bir çalışma ekibi tarafından mezenkimal kök hücrelerin yakın çevresindeki hücelere etki eden VEGF, FGF, MCP-1, hepatosit büyüme faktörü (HGF), IGF-I, SDF-1 ve trombopoietin gibi geniş spektrumlu büyüme faktörleri ve sitokin sentezleyip salgıdığını bildirmişlerdir [86]. Bu faktörlerin arteriyogenezisi teşvik ettiği; bağırsaktaki kök hücre kriptini desteklediği; iskemik böbrek ve ekstremiteler doku hasarına karşı koruduğu; hematopoezisi destekleyip sürdürdüğü ve megakaryositler ve proplateletlerin oluşumuna destek olduğu gösterilmiştir. Bu faktörlerin çoğunun, neovaskülarizasyon ve artmış anjiyogenezisi içeren faydalı etkiler ortaya koyduğu gösterilmiştir [87].

Mezenkimal kök hücreler dentritik hücre ve makrofajlar yoluyla anti-inflamatuvar özellik de göstermektedirler. Bu özelliğinde MKH'lerden salınan TGF- β , HGF, indolamin 2,3 dioksijenaz ve prostaglandin E'nin rol oynadığı bilinmektedir [88].

Mezenkimal kök hücrelerin B hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve antikör salgılamasını hem in-vitro hem de in-vivo olarak inhibe ettiği gösterilmiştir [89].

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu ve flow-sitometri kullanımı

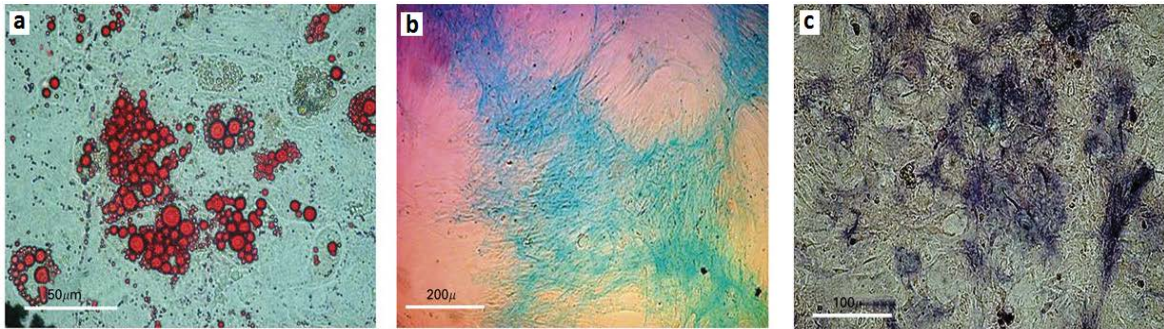
Birçok kaynaktan elde edilebilen mezenkimal kök hücreler laboratuvarlarda farklı yöntemlerle elde edilmektedir. Bu nedenle mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu yani mezenkimal kök hücre olduklarının ispatlanması oldukça önemlidir. Bu aşamada "Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği"nin belirlediği kriterler göz önüne alınmaktadır. Bu kriterlere göre, uygun kültür ortamlarında hücreler;

1. Standart kültür koşullarında plastik yüzeylere yapışabilmeli;
2. Yüzey belirteçleri olarak CD105, CD73 ve CD90 eksprese etmeli ancak CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 α veya CD19 ve HLA-DR için negatif fenotipte olmalı,
3. Adiposit, osteoblasta ve kondroblasta invitro şartlarda farklılaşabilmelidirler [18].

Flow-sitometri, süspansiyon halindeki hücrelerin yüzey veya hücre içi yerleşimli antijenik yapılarının işaretlenerek sayımının yapılmasını sağlar. Flow-sitometri immün fenotiplendirmede kullanıldığı gibi deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein analizinde de kullanılmaktadır. Flow sitometri ile monoklonal antikorlar kullanılarak süspansiyon halindeki hücrelerin mezenkimal kök hücre olup olmadığı bu yöntem ile değerlendirilir. Mezenkimal kök hücrelerin yüzey markerlarından bazıları pozitif (CD105, CD73, CD90) iken; CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α ve CD19 negatiftir [17, 90, 91].

Mezenkimal kök hücrelerin adiposit, kondrosit ve osteosit farklılaşması

Mezenkimal kök hücreler adiposit, kondrosit ve osteosit hücrelerine diferansiye olabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler farklılaşma tipine uygun besiyerinde kültüre edilerek 2-3 hafta içerisinde farklılaşabilirler. Adiposit hücreleri gösterebilmek için oil red boyası kullanılarak sitoplazma içindeki yağ damlacıkları işaretlenebilir (Resim 2.2a). Kondrojenik farklılaşmayı gösterebilmek için de alcian blue boyası kullanılır ve ekstraselüler matriksteki asidik proteoglikanlar işaretlenir (Resim 2.2b). Osteojenik farklılaşma için ise alkalen fosfataz boyaması yapılır. Osteosit farklılaşmasında bu boyama sonucunda ekstraselüler matrikste kalsiyumdan zengin mineralizasyon görülür (Resim 2.2c) [92].



Resim 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin adiposit (a), kondrosit (b) ve osteosit (c) farklılaşması [92]

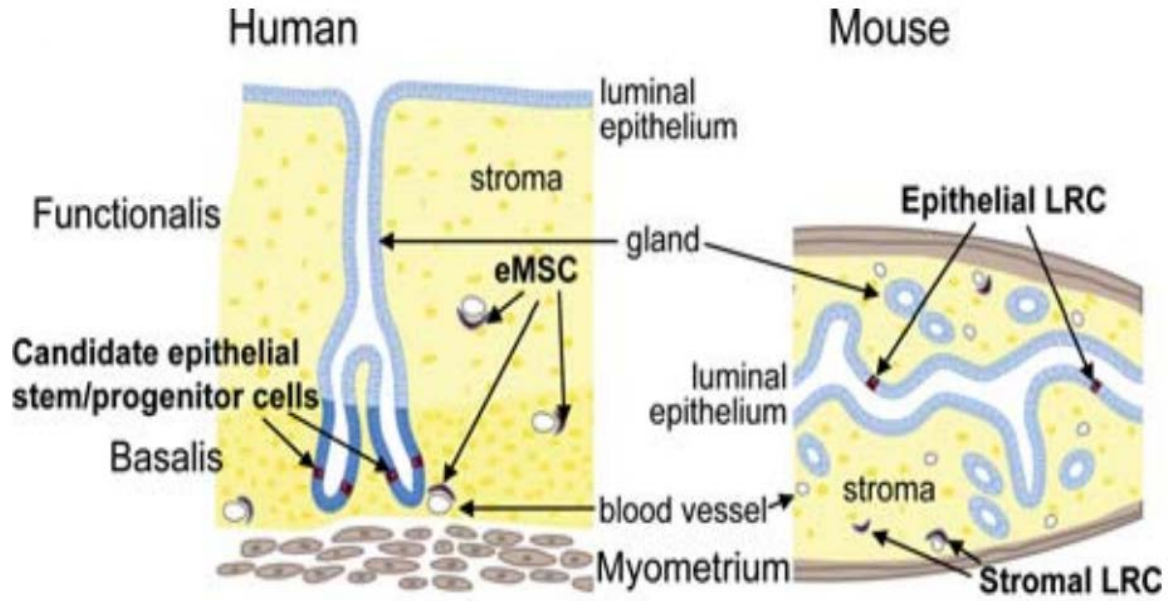
2.4.3. Uterus kaynaklı kök hücreler

Endometriyal rejenerasyon, doğumdan sonra, her menstrual siklus sonrası ve östrojen replasman tedavisi gören postmenapozal kadınlarda görülür. Bu doku rejenerasyonu seviyesi bağırsak epiteli ve epidermisdeki yenilenmeye benzer. Bu şekilde sürekli yenilenen dokularda erişkin kök hücreler hücrel üretimi devam ettirirler. Başlangıçta yetişkin kök veya progenitör hücrelerin bazalis katmanında bulunduğu, endometrial fonksiyonel tabakanın siklik rejenerasyonundan sorumlu oldukları varsayılmaktaydı. Ancak, ilerleyen çalışmalarla endometrial stem / progenitör hücreler spesifik belirteçlerle tanımlanmasıyla, bunların hem fonksiyonel hem de bazal tabakalarda yer aldığı gösterilmiştir [54, 93, 94].

Endometrial kökenli mezenkimal kök hücrelerin (eMSC) nadir bir popülasyonu insan ve fare endometriumunda tanımlanmıştır. Bu eMSC'ler, kemik iliği veya yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelere benzer özelliklere ve fenotipe sahiptir [54].

Endometrium kökenli mezenkimal kök hücrelerin gen ekspresyon profili fibroblastlara endotel hücrelerinden daha benzerdir. Ayrıca perivasküler yerleşimleri, hipoksik, enflamatuar ve proteolitik uyarılara yanıt vermedeki genetik potansiyeli ve anjiyojenik kapasiteleri ile birlikte bu özelliklerin tümü, endometriyal rejenerasyonda endometrial kök hücrelerin büyük roller üstlendiğini göstermektedir. Bu gözlem, endometrium kökenli mezenkimal kök hücrelerin endometrial rejenerasyondaki rolünü güçlendirmektedir [95].

İnsan endometriumda, epitel öncü hücreler, st. bazalis katmanında bezlerinin tabanında bulunurken; endometriyal mezenkimal kök hücreler hem bazalis hem de fonksiyonel katmandaki kan damarlarının yakınında yerleşiktirler. Fare endometriumundaki yetişkin kök hücreler ise uterus bezlerinin tabanında ve özellikle luminal epitelde yerleşik iken; ayrıca insandaki bazalis katmanına karşılık gelen endometrial-miyometral bileşkedeki bölgede perivasküler olarak yerleşmişlerdir (Şekil 2.4) [53].



Şekil 2.4. İnsan ve fare endometriumunda kök / progenitor hücrelerin yerleşimi (eMSC: endometrial mezenkimal kök hücreler; LRC: fare endometriumundaki etiketli kök hücreler) [53]

Farelerde doğum sonrası dönemde (3-5. günlerde) endometrial kök hücrelerin glandular epitelden daha çok endometrial luminal epitelde yerleşik olduğu gösterilmiştir. Endometrial luminal epitel hücrelerinin %3'ü epitelyal kök / progenitor hücreleri oluşturmaktadır. Luminal epitelyal kök / progenitor hücrelerin, gelişme ve siklus sırasında bezlerin büyümesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [53, 54].

Endometriumun bazalis tabakasına ek olarak fonksiyonel tabakası da mezenkimal kök hücreleri içerdiğinden dolayı, endometrium kaynaklı kök hücreler anestezi gerektirmeden hastalardan biyopsi yolu ile alınabilir; böylece endometrial kök hücreler kültüre edilebilir ve farklılaştırılabilir. Hatta bu durum ince disfonksiyonel endometrium veya Asherman sendromu gibi karşılaşılan endometrial hasar durumlarda hasta için otolog hücre kullanılmasına olanak tanımış olur [96].

2.5. Eksozomlar

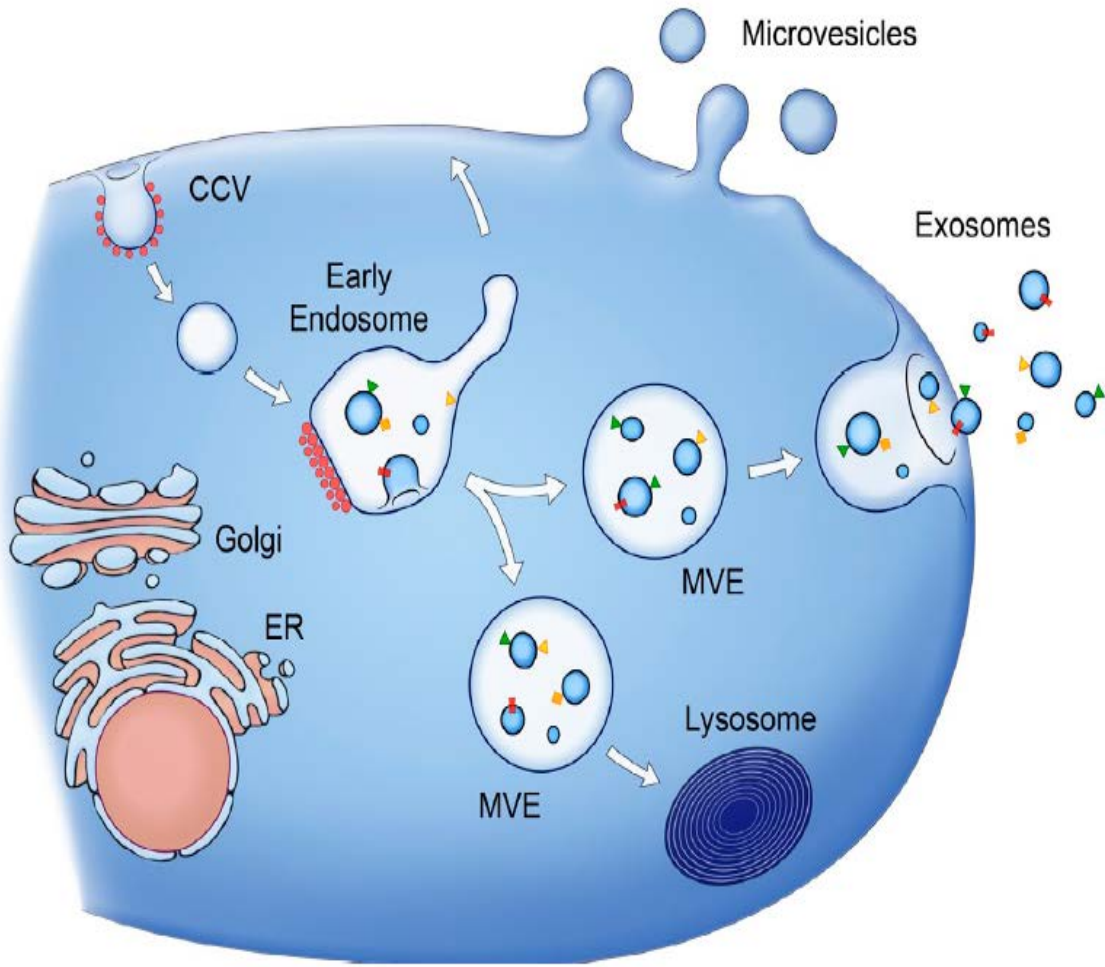
Eksozomlar hasarlı doku tamirinde büyük bir potansiyele sahip, hücre iletişimine hücre önemli bir rol oynayan çok etkili aktif parakrin bileşenlerdir. Çok sayıda çalışmada rejenerasyon ve anjiyogeneze sorumlu birçok parakrin faktörlerin kök hücrelerdeki eksozomlarla ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Eksozomlar, retikülosit farklılaşması sırasında

ilk kez tarif edilmiştir. Daha sonra, birçok hücre tipinin, B ve T hücreleri, dendritik hücreler, kanser hücreleri, kök hücreleri ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere eksozomlar salgıladığı bulunmuştur. Günümüzde mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlar iskemi/reperfüzyon ve fibrozis modelleri başta olmak üzere çok fazla modelde çalışılmaya başlanmıştır [20].

Kök hücreler etki gösterecekleri bölgeye parakrin olarak ürünlerini salarlar. Bu ürünler, büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstraselüler veziküller olabilir. Bu hücrelerden salınan ekstraselüler veziküller ise mikroveziküller, mikropartiküller ve eksozom olarak adlandırılırlar. Ekstraselüler veziküller köken aldıkları yere ya da biyolojik işlevlerine göre sınıflandırılırlar (eksozomlar, mikroveziküller, membran fragmanları, apoptotik cisimcikler gibi) [21, 22, 97, 98].

Eksozomlar endozomal orijinli ekstraselüler veziküllerdir. Taşıma ve ilgili proteinler için gerekli olan endozomal ayırma kompleksi, multiveziküler cisimlerin (MVC) ve intralüminal veziküllerin (ILV) oluşumunda rol alır. Eksozom membranları, ILV'lerin MVC'lere tomurcuklanmasında rol alan kolesterol, seramid ve sfingolipidler gibi lipidler açısından zenginleştirilmiştir. ILV'ler, plazma membranı ile MVC füzyonunun bir sonucu olarak hücrelerden salınırlar ve serbest bırakıldıktan sonra eksozomlar olarak adlandırılırlar. Eksozomlar direkt membran füzyonu, endositoz veya hücre tipi spesifik fagositoz yoluyla diğer hücreler tarafından alınabilirler [99].

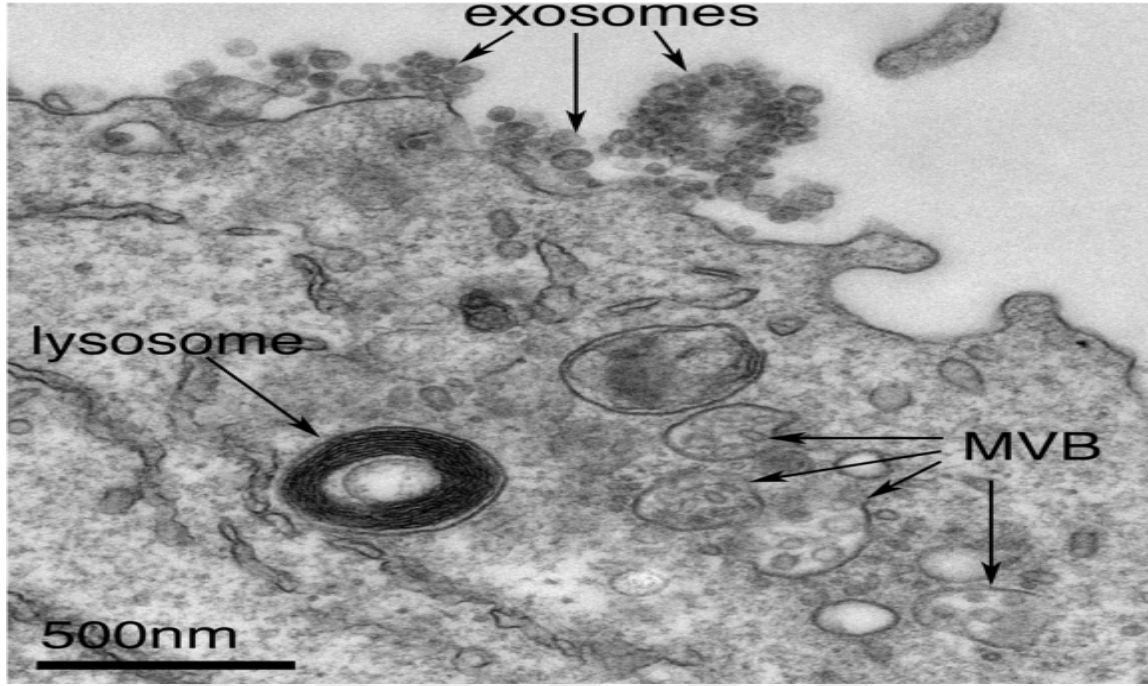
Mikroveziküller, direkt olarak plazma membranından tomurcuklanırken; eksozomlar, erken endozomlara ve multiveziküler endozomlara tomurcuk koyarak; multiveziküler endozomların plazma membranı ile füzyonu sonucu salınan farklı ebatlarda küçük veziküllerle temsil edilir (Şekil 2.5) [23].



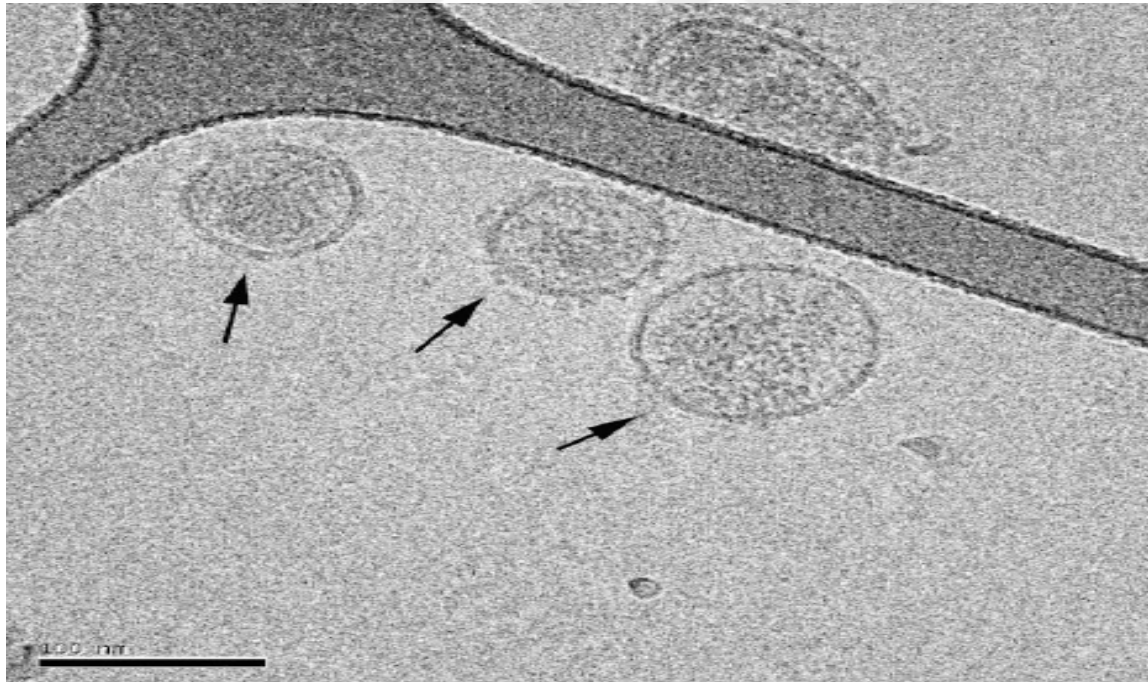
Şekil 2.5. Mikroveziküllerin ve eksozomların salınımı [23]

Eksozomlar 40-100 nm çapında paketli keseciklerdir (Resim 2.3 ve 2.4). Eksozomlar, çeşitli mikroveziküller ile uyarılınca içerdikleri belirli proteinleri, lipidleri, faktörleri ve RNA gibi genetik materyalleri salgılayarak etki gösterirler. Eksozomların içeriğinde bulunan materyallerin çok çeşitli olması, rejeneratif tıp alanında eksozomların son derece umut verici olmasını sağlamaktadır [21-23].

Eksozomlar, proteinler ve RNA'lara ek olarak; kolesterol, seramid, fosfogliseritler gibi lipidlerle zenginleştirilmiştir. Eksozomların hedef hücrelere prostaglandinler sağlayabileceğine dair düşünceler de vardır [100].



Resim 2.3. Plazma zarından yeni çıkan eksozomların elektron mikroskopik görüntüsü [101]



Resim 2.4. Eksozomların kriyo elektron mikroskopisi ile görüntülenmesi [23]

2.5.1. Eksozomların tanımlanması

Eksozomların belirlenmesinde kullanılan yöntemler, taramalı elektron mikroskobu, nanopartikül izleme analizi, transmission elektron mikroskopisi (TEM), akış sitometrik analizi (Flow sitometri), western blotting ve enzime bağlı immunosorban yöntem (ELISA)'dır. Eksozomlar, endosomal kökenleri nedeniyle membran transport ve füzyon proteinlerini (GTPazlar, anneksinler ve flotilin), tetraspaninleri (CD9, CD63, CD81 ve CD82), multiveziküler cisim biyogenezisinde yer alan proteinleri (Alix ve TSG101); ayrıca lipid ile ilgili proteinleri ve fosfolipazları içerirler. Bu proteinler flow sitometrik analizle, ELISA ve western blotting yöntemleriyle tespit edilebilirler [20, 102].

2.5.2. Mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomlar

Mezenkimal kök hücrelerden türetilen eksozomlar ilk kez 2010 yılında miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuş fare modelinde araştırılmış ve daha sonra çeşitli hastalık modellerinde test edilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin miyoblast, insan akut monositik lösemi hücre hattı ve insan embriyonik böbrek hücre hattı gibi diğer hücelere kıyasla daha fazla miktarda eksozom üretebildiği gösterilmiştir. Tanımlama ile ilgili olarak da mezenkimal kök hücre türevli eksozomlar sadece CD9 ve CD81 gibi eksozomların ortak yüzey işaretleyicilerini değil; aynı zamanda mezenkimal kök hücrelerin membranında eksprese edilen CD29, CD44 ve CD73 gibi bazı adhezyon moleküllerini de ifade eder [20].

Mezenkimal kök hücre türevli eksozomların üç bağımsız kümesindeki benzersiz proteinler sıvı kromatografi-kütle spektrometresi ile tespit edildi ve bunların arasında sadece 154 tanesi diğer kaynaklardan elde edilen eksozom proteinleri ile ortak olduğu belirlendi. Bu proteinlerin fonksiyonlarına göre kümeleşmesi, eksozomların birçok biyolojik süreci sürdürebileceğini düşündürmektedir. Bu düşünce, birçok hastalığın tedavisinde mezenkimal kök hücrelerin bildirilen etkinliği ile tutarlıdır. Ayrıca, proteazom alt-birimlerinin mezenkimal kök hücre türevi eksozomlarda mevcut olduğu bildirilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlarla tedavi edilen miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuş bir fare modelinde, yanlış katlanmış proteinlerin veya oligomerlerin birikimini azalttığı gösterilmiştir [20, 103].

Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomlarda bulunan mikroRNA'lar (miRNA) da araştırılmıştır. Mezenkimal kök hücre kaynaklı mikropartiküllerde kapsüllenmiş miRNA'ların çoğunlukla prekürsör formda oldukları bulunmuştur. Bu mikro parçacıklar, 55-65 nm'lik bir hidrodinamik yarıçapı göstermektedir. Mezenkimal kök hücreler, eksozomlardaki miRNA'ların salgılanması yoluyla diğer hücelere bazı biyolojik etkiler gösterebilir. Örneğin, Mezenkimal kök hücre kültür mediasının ribonükleaz (RNaz) ile hazırlanması eksozomların renal koruyucu etkisini tamamen ortadan kaldırmaktadır [104]. Nöronların ve astrositlerin mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomlarla tedavisi, bu hücrelerde Parkinson hastalığında ve omurilik hasarında fonksiyonel iyileşmeyi artıran miR-133b'nin artmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu bulgu ile, mezenkimal kök hücrelerin, eksozomların salınması yoluyla nörit ve astrositlere miR-133b aktararak en azından kısmen nörit büyümesini düzenlediğini gösterilmiştir [105]. Güncel yapılan birçok çalışmada akut miyokard infarktüs modellerinde mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların transplantasyonu ile miyokardiyal hücrelerin apoptozdan korunduğu, hücre proliferasyonunun ve anjiogenezin sağlandığı gösterilmiştir [87, 106-108]. Ayrıca, mezenkimal kök hücre eksozomları kronik karaciğer hasarında kullanılmış ve eksozomların fibrotik karaciğerde TGFβ1 inaktivasyonunu sağlayarak fibrozisi önlediği ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir [109].

2.5.3. Rejeneratif tıpta eksozom kullanımının avantajları

Rejeneratif tıpta mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomlar gibi hücresiz terapilerin kullanımı kök hücre temelli uygulamalar üzerinde önemli avantajlar sağlamaktadır:

- Bağışıklık uyumu, tümör oluşumu, emboli oluşumu ve enfeksiyonların bulaşması dahil olmak üzere canlı ve proliferatif hücre popülasyonlarının transplantasyonu ile potansiyel olarak ilişkili çeşitli güvenlik önlemlerini düzenler;
- Güvenlik, dozaj ve etki açısından geleneksel farmasötik ajanlara benzer bir şekilde değerlendirilebilir;
- Saklanması toksik kriyopreservatif ajanlar uygulanmadan ve uzun süre ürün potansi kaybı olmadan sağlanabilir;
- Hücrelerin besiyerleri kullanarak, invaziv hücre toplama prosedürlerinden kaçınan klinik uygulama için daha ekonomik ve pratiktir;
- Biyoaktif faktörlerin uygun bir kaynağı olan, kontrollü laboratuvar koşulları altında özel üretilmiş hücre hatları yoluyla seri üretim mümkündür;

- Kültüre edilmiş kök hücrelerin genişletilmesi, bakımının maliyeti ve zamanı önemli ölçüde azaltılabilir ve serebral iskemi, miyokard enfarktüsü veya travma gibi akut durumların tedavisi için derhal kullanılabilir;
- Terapötik uygulamalar için elde edilen biyolojik ürün istenen hücreye spesifik etkilere göre modifiye edilebilir [110].





3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyaller

- Fosfat tamponlu salin (PBS) (Biosera, XC-S2066/500; 014BS911)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)-low glucose (Biological Industries, 01-050-1A; 1649995)
- Fetal sığır serum (FBS) (Biological Industries, 04-007-1A; 1624433)
- Penicilin, Streptomycin, Amphotericin çözeltisi (Biological Industries, 03-033-1B; 1531286)
- L-Glutamin çözeltisi-200mM (Biological Industries, 03-020-1B; 1604068)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Millipore, 3127275-500M; 2757243)
- Adiposit diferansiyasyon suplementi (Gibco, A10065-01; 1759771)
- Kondrosit diferansiyasyon suplementi (Gibco, A10064-01; 1782242)
- Osteosit diferansiyasyon suplementi (Gibco, A10066-01; 1772645)
- Adiposit diferansiyasyon basal medium (Gibco, A10410-01; 1773692)
- Osteosit/Kondrosit diferansiyasyon basal mediumu (Gibco, A10069-01; 1799147)
- Tripsin- Etilendiaminetetra asetik asit (EDTA) (%0.05) solüsyonu (Biological Industries, 03-054-1B; 1714369)
- Oil Red (Diagnostic BioSystem, KT025)
- Von Kossa (Diagnostic BioSystem, KT028)
- Alcian Blue (Diagnostic BioSystem, KT003)
- CD 45R (BD Pharmingen)
- CD 90 (BD Pharmingen)
- CD 11b/c (BD Pharmingen)
- CD 44(BD Pharmingen)
- Bromodeoxyuridine (BrdU) (SAFC, B5002-100MG; HMBC8233V)
- BrdU In-Situ Detection Kit (BD Pharmingen, 550803; 7073649)
- Total Eksozom İzolasyon Kiti (kültür medyasından) (Invitrogen, 4478359; 00312976)
- Bicinchoninic acid (BCA) protein miktar analiz kiti (Thermo, 23227; MC155208)
- Bovine Serum Albumin (BSA) Standardı (Thermo, 23209; MB154855)
- Masson Trikróm boyama kiti (GBL, 5022; A0302)
- Sitrat tampon pH: 6.0 (Bio-Optica, 15-M103; 3915)

- Hidrojen Peroksit (H₂O₂) %3'lük (Thermo Sci, TA-125-HP; HP39948)
- Rat uyumlu Rabbit Polyclonal- Prolifere hücre çekirdek antijeni (PCNA) primer antikoru (Invitrogen, PA5-16797; SI2441491I)
- Rat uyumlu Rabbit Polyclonal- Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR)-1 primer antikoru (Abcam, ab2350; GR298076-5)
- Rat uyumlu Rabbit Polyclonal- Matriks metalloproteinaz (MMP)-2 primer antikoru (Bioss, bs-0412R; 9E29M21)
- Rat uyumlu Rabbit Polyclonal- Doku matriks metalloproteinaz inhibitörü (TIMP)-2 primer antikoru (Bioss, bs-0416R; 980709W)
- Anti-Rabbit HRP Sekonder kit (Thermo Sci, TP-125-HL; PHL170627)
- Diaminobenzedin (DAB) Substratı (Thermo Sci, TA-125-HD; HD31722)

3.2. Deneysel Yöntem

Çalışmamızda eş siklustaki (diöstrus) 8-10 haftalık, gebe olmayan, 200-250g ağırlığında 26 adet Wistar Albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ön çalışma ile 2 denekte Asherman modeli intrauterin yapışıklık histomorfolojik olarak görüntülenerek kanıtlandı; 24 denek ise deney gruplarına dahil edildi. Ayrıca kök hücre ve eksozom eldesi için 10 adet yenidoğan dişi Wistar Albino cinsi rat kullanıldı.

Deneklerin temini ve bakımı Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM) tarafından sağlandı. Yenidoğanlardan uterus eksizyonu GÜDAM'da gerçekleştirildi, uterus dokuları kök hücre ve eksozom izolasyonu için Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Genetik Laboratuvarı'na transfer edildi ve analizleri bu merkezde yapıldı. Kök hücre ve eksozomlarının izolasyonundan sonra deneysel model oluşturulması, kök hücrelerin ve eksozomların deneklere transplantasyonu da yine GÜDAM'da yapıldı.

Gruplandırma: Öncelikle denekler her bir grupta 6 rat olmak üzere 4 gruba ayrıldı; ilk gruptaki deneklerin uterus boynuzları hiçbir uygulama yapılmadan alındı ve "Kontrol Grubu" (Grup I) oluşturuldu; ikinci gruptaki deneklerin uterus boynuzlarında Asherman modeli için uygulama yapıldı ve "Asherman (Ash) Grubu" (Grup II) oluşturuldu; üçüncü gruptaki deneklerin uterus boynuzlarına Asherman modeli uygulandı ve uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre (uMKH) intrauterine (İU) yolla verilerek "Asherman + uMKH

grubu” (Grup III) oluşturuldu; dördüncü gruptaki deneklerin uterus boynuzlarına Asherman modeli uygulandı ve uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomları (uMKH-Eks) utero-tubal bileşke hizasından İU olarak verilerek Ash+uMKH-Eks grubu (Grup IV) oluşturuldu (Şekil 3.1). Utero-tubal bileşke hizasından İU olarak verilen kök hücre ve eksozom transplantasyonu işleminden sonra abdomen sutur ile tekrar kapatıldı. Transplantasyondan 8 hafta sonra denekler sakrifiye edilip uterus dokuları alındı.

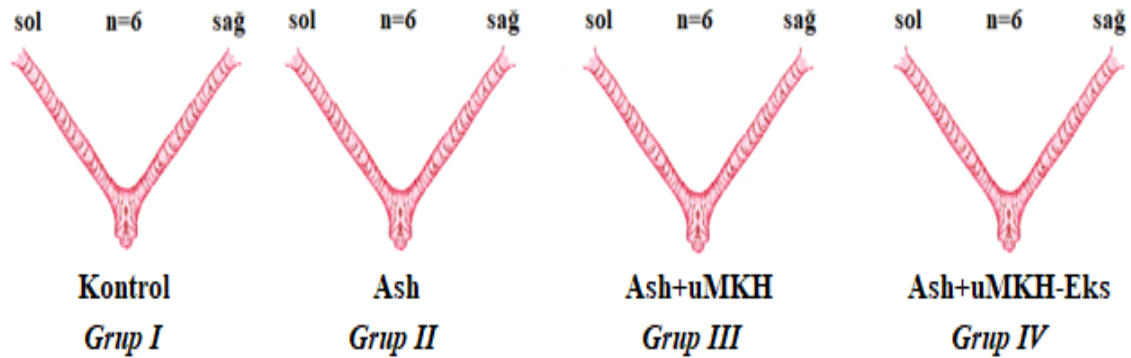
Deney Grupları:

Grup I (n=6) (Kontrol): Kontrol grubu

Grup II (n=6) (Ash): Asherman grubu

Grup III (n=6) (Ash+uMKH): Asherman + uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulanan grup

Grup IV (n=6) (Ash+uMKH-Eks): Asherman + uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomları uygulanan grup



Şekil 3.1. Deney gruplarının şematik gösterimi

Deney Gruplarının Oluşturulması:

Grup 1 (n=6): Kontrol Grubu; sağlıklı ratlara insüzyon işlemi uygulanarak stres yaratıldı. Gruba ait ratlar 8 hafta sonra sakrifiye edildi.

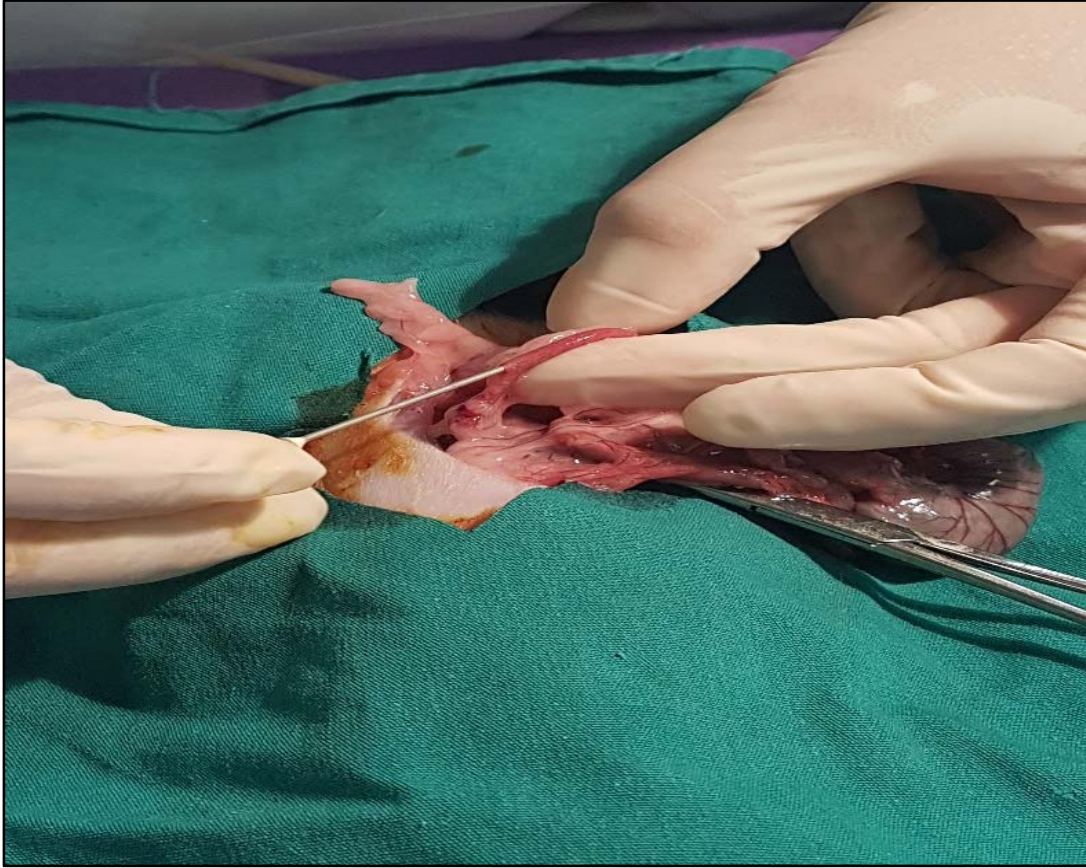
Grup 2 (n=6): Ash Grubu; Model oluşturma uygulandıktan 8 hafta sonra gruba ait ratlar sakrifiye edildi.

Grup 3 (n=6): Ash+uMKH Grubu; Asherman modeli uygulamasından sonra ratların her bir uterus boynuzuna 0.1 ml 1X PBS içerisinde BrdU işaretli 2×10^6 uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre utero-tubal bileşkeden intrauterin yolla verildi ve gruba ait ratlar transplantasyondan 8 hafta sonra sakrifiye edildi.

Grup 4 (n=6): Ash+uMKH-Eks Grubu; Asherman modeli uygulamasından sonra ratların her bir uterus boynuzuna 2×10^6 uterus kaynaklı mezenkimal kök hücreden elde edilen eksozomlar (25µg) 0.1 ml 1X PBS içerisinde utero-tubal bileşkeden intrauterin yolla verildi ve gruba ait ratlar transplantasyondan 8 hafta sonra sakrifiye edildi.

3.2.1. Uterin travma ile Asherman sendromu modelin oluşturulması

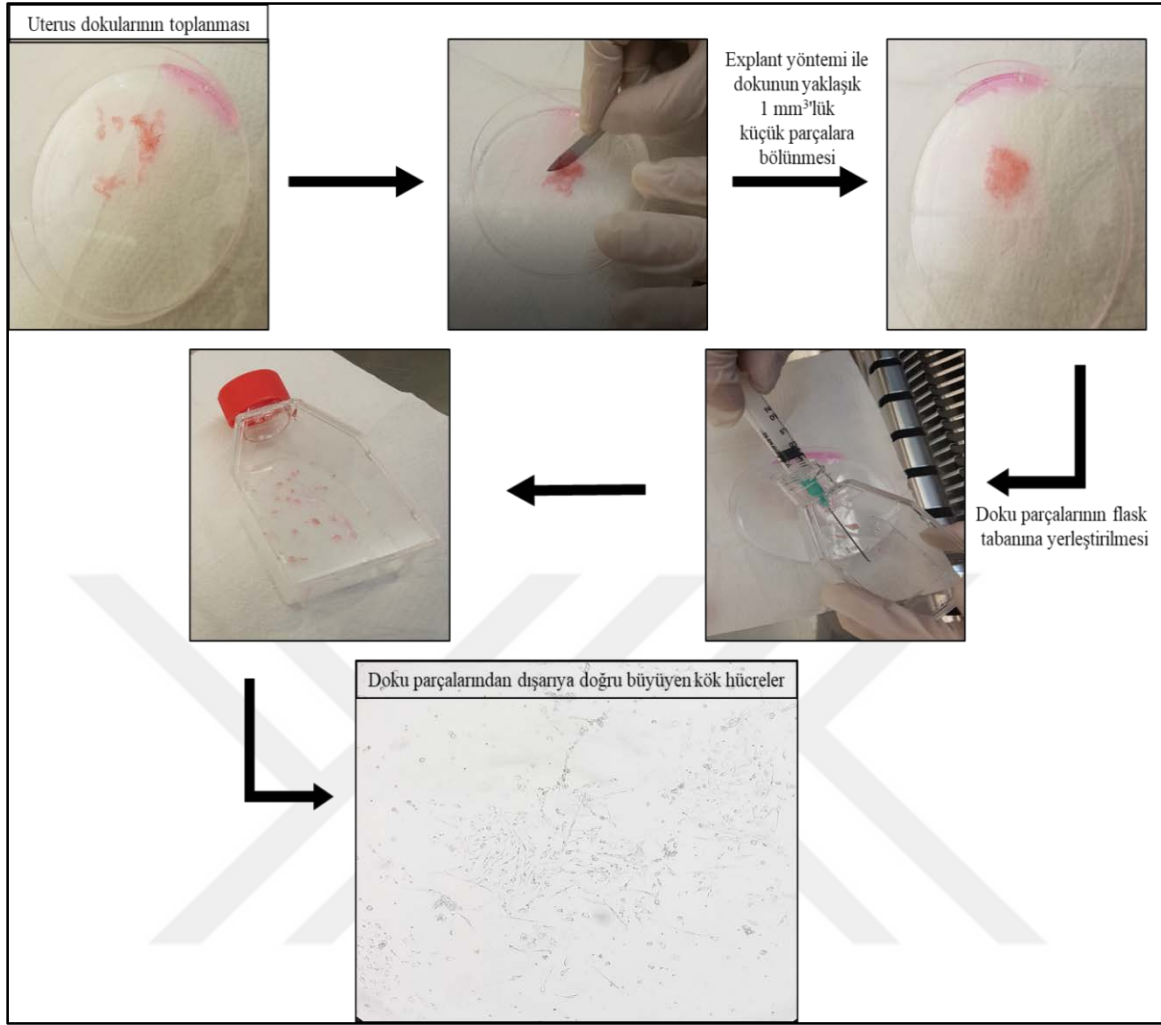
Deneklere ketamin (45mg/kg) ve xylazine (5mg/kg) intramüsküler yolla enjekte edilip anestezileri sağlandıktan sonra ratların median hattından laparotomi yapılarak uterus boynuzları açığa çıkarıldı. Uterus boynuzlarını travmatize etmek için utero-tubal bileşkeden inszyon yapıldı. 18G standart iğne ucu utero-tubal bileşkeden girilerek uterus lümeninin 2/3 ne kadar ilerletildi ve 4 kez rotasyon ve çekme işlemi ard arda 4'er defa uygulandı (Resim 3.1). Travma işleminden sonra uterus abdomene yerleştirilerek, Maxon Sentetik 4.0 sutur materyali ile abdomen kapatıldı. Asherman modeli uygulamasından 2 hafta (3 östrus siklusu) sonra denekler sakrifiye edilip uterus dokuları çıkartıldı ve histokimyasal yöntemler uygulanarak model kanıtlandı (Model oluşumu travmatize işleminden 2 hafta sonrasına denk gelmektedir).



Resim 3.1. Uterin travma ile Asherman sendrom modeli oluşturulması

3.2.2. Uterus kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

Wistar Albino cinsi yeni doğmuş dişi ratların (10 adet) batin bölgesi anestezi altında açıldı. Uteruslar belirlenip çıkarıldı. Doku örnekleri Dulbecco's Modified Eagle Medium (Low-DMEM) solüsyonu içine alınıp explant yöntemi ile küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalar T25 flasklara yerleştirilip, %5CO₂'li inkübatörde 15 dakika bekletildi. Daha sonra T25 flaskların üzerine %20 Fetal Sığır Serum, %2 L-Glutamin çözeltisi, %1 Penicilin, Streptomycin, Amphotericin çözeltisi ve %77 Low-DMEM içeren besiyeri eklendi. Üç günde bir besiyeri değişimi yapılarak hücrelerin gelişimi Leica D1000 inverted mikroskop ile gözlemlendi. 15 gün sonra hücrelerin gelişimi de göz önünde bulundurularak pasaj işlemi yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Explant yöntemi ile mezenkimal kök hücre izolasyonu işlem basamakları

3.2.3. Mezenkimal kök hücrelerin pasajlanması

Hücreler, flask yüzeyinin %70-80'inini kaplayınca, bölünme hızlarının azalmaması için pasajlama işlemleri yapıldı. Hücreler 1X PBS ile iki kez yıkandıktan sonra flaska %0.05'lik tripsin solüsyonu eklenerek 3-4 dakika 37°C'de inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. Inverted mikroskop altında hücrelerin flask zemininden kalkıp kalkmadığı kontrol edildi. Flaska tripsin miktarı ile eş hacimde besiyeri eklenerek hafifçe karıştırıldı. Çözelti falkon tüpe alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp tekrar besiyeri eklendi ve ikinci kez santifüj işlemi yapıldı. Hücre sayımından sonra T25 flasklara ekim yapıldı. İkinci pasaj sonunda hücrelerin bir kısmı akım sitometride tanımlama (CD45, CD11b/c, CD44, CD90, yüzey belirteçleri) için kullanılmak üzere ayrılırken; bir kısmı da farklılaşma yöntemleriyle adipojenik, osteojenik, kondrojenik

farklılaştırma için ayrıldı. Kalan hücrelerin de yarısı eksozom eldesi için ayrılırken; diğer kalan hücreler dondurularak enjeksiyon işlemine kadar -80°C’de saklandı.

3.2.4. Hücrelerin dondurulması ve çözülmesi:

Dondurma: Low-DMEM içerisinde, %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve %40 FBS içeren çözelti hazırlandı. Hücreler çözelti ile karıştırıldı ve kriyo tüplere aktarılıp 1 saat boyunca -20 °C’de bekletildikten sonra -80 °C’ye kaldırıldı.

Çözme: Hücreler -80 °C’den çıkarılıp 37 °C’lik su banyosuna konuldu. Falkon tüpünün içerisine kültür medyumunu konulup hücreler içine aktarıldı. 5 dakika süresince 1200 rpm’de santrifüj edildi ve canlılıkları ile sayıları kontrol edilerek T25 flasklardaki kültür medyumuna ekildi.

3.2.5. Hücrelerin sayımı

Tripan mavisi gibi bazı boyalar zarar görmüş hücre zarından sitoplazmaya geçer ve hücreyi boyar [111]. Bu amaçla bizim çalışmamızda da hücrelerin canlılık kontrolü ve sayımı için %0.1’lik tripan mavisi solüsyonu kontrol amaçlı kullanıldı.

Besiyerinden kaldırılan hücreler falkon tüpe alındı 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp; 1ml hücre medyumunu eklenerek hücreler süspanse edildi ve ependorf içinde 1:1 oranda tripan mavisi eklendi. Tripan mavisi ile boyanan hücreler Thoma lamı aracılığı ile ışık mikroskopunda sayıldı. Thoma lamındaki 16 büyük kare alanındaki tüm hücreler sayıldı ve belirli dilüsyon oranında ml’deki hücre sayısı belirlendi.

3.2.6. Akım (Flow) sitometri cihazında mezenkimal kök hücre tanımlaması

Kullanılan Cihazlar:

- FACS ARIA III (Becton Dickinson and Company)
- Cell Quest Software (Becton Dickinson and Company, immunsitometri sistemi, Mac OS X10.3.6/7R28)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)

Kullanılan Yüzey Belirteçleri:

- CD11b/c [İntegrin α M- α X chains/OX-42, R-Phycoerythrin (R-PE)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD45 [Leukocyte Common Antigen/Ly-5, (PE)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD90 [Thy-1, Flurescein Isothiocyanate (FITC)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD44 [Hyaluronate Receptör Cell Adhesion Molecule/H-CAM, (FITC)] (BD Pharmingen, San Diego)

Yıkama Solüsyonu:

- 100 ml için;
- 0.1 ml Na azid
- 99.9 ml PBS

Her hücre dizini için 6 tüp kullanıldı. Tüplerin üzerine sırayla yüzey belirteçleri ve kontrol (otofloresan kontrol/hücrelere hiçbir yüzey belirteci eklenmeden hazırlanan tüp) yazılarak etiketlendi. Daha sonra tüplere hücre konsantrasyonu 1×10^6 olacak şekilde 100'er μ l hücre süspansiyonu konulup 10'ar μ l yüzey belirteçleri (CD45, CD11b/c, CD44, CD90) eklenerek vortekslendi. 15 dakika 4°C'de karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 1 ml yıkama solüsyonu eklenerek 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre çökeltisine tekrar 0.5 ml yıkama solüsyonu eklenerek akım sitometri cihazında tanımlandı.

3.2.7. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırılması

Mezenkimal kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma için “Adiposit Diferansiyasyon Basal Medyumu ve supplementi” kullanıldı. İkinci pasaja gelen hücreler adiposit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılp; üçüncü hafta sonunda Oil Red ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Yağ hücreleri Leica D1000 inverted mikroskobu ile görüntülenip belirlendi.

Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması

Kondrojenik farklılaşma için “Kondrosit Differansiyasyon Basal Medyumu ve supplementi” kullanıldı. İkinci pasaja gelen hücreler kondrosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapıldı; üçüncü hafta sonunda Alcian Blue ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Kondrosit hücreleri Leica D1000 inverted mikroskobu ile görüntülenip belirlendi.

Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması

Osteojenik farklılaşma için “Osteosit Differansiyasyon Basal Medyumu ve supplementi” kullanıldı. İkinci pasaja gelen hücreler osteosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapıldı. Üçüncü hafta sonunda Von Kossa ile boyama işlemi gerçekleştirildi ve Leica D1000 inverted mikroskobu ile osteosit hücreleri sitoplazmasındaki kalsiyum depositlerinin siyaha boyanması ile belirlendi.

3.2.8. Kök hücrelerin BrdU ile etiketlenmesi

BrdU, S fazı boyunca bölünen hücrelerin DNA'sında yer alır ve izole edilmiş mezenkimal kök hücrelerin in-vitro etiketlenmesini takiben; alıcı konakçı içerisinde takip edilebilen ve in-vivo çalışmalar için metodolojik bir araç olarak kullanılabilen bir timin analogudur. BrdU işaretli DNA, anti BrdU antikoru ile bağlanmaktadır. Sonrasında ise işaretli DNA'yı görüntülemek için uygun sekonder antibody kullanılır [112].

Ratlara mezenkimal kök hücre enjeksiyonunun öncesinde hücre sayımı yapılarak 1ml'de 2 milyon hücreyi geçmemek üzere 1 ml için 10 µl Bromodeoxyuridine (1X PBS içinde 1mM BrdU) solüsyonu falkon tüpün içerisinde eklendi. 2 saat süresince 37°C'de ve %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildikten sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellet üzerine PBS eklendi. 0,1 ml içinde 2x10⁶ hücre olacak şekilde sıçanlara intrauterin olarak uygulanacak halde hazırlandı.

3.2.9. Eksozom eldesi ve protein miktar analizi

Uterus kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin eksozomları hücre kültür mediası için uygun olan ‘Total Exosome Isolation Kit’ protokolüne göre elde edildi.

- Hücreler, flask yüzeyinin %70-80'inini kaplayınca FBS'li besiyeri çekilip yerine FBS'siz besiyeri eklendi ve 12 saat 37°C'de %5 CO₂ li inkübatörde inkübe edildi. FBS'siz besiyeri kullanımı bu aşamada özellikle gereklidir. Bu aşama, FBS yüksek miktarda eksozom içerdiğinden dolayı yalnızca hücre kaynaklı eksozomları izole etmek için gerekli bir basamaktır.
- İnkübasyonun ardından hücre kültür medyumunu falkon tüplere alınıp 2000 xg hızda 30 dakika santrifüj edilerek hücre ve debrislerden uzaklaştırıldı.
- Santrifüj sonrası supernatant kısmı yeni bir falkon tüpe aktarıldı.
- Hücresiz kültür medyasının üzerine medya hacminin (her bir falkonda 10 ml olmak üzere) yarısı oranında Total Exosome Isolation Reagent (her bir falkona 5 ml olmak üzere) eklendi. Pipetaj yapılarak karışımın homojen solüsyon haline gelmesi sağlandı.
- Homojen karışım 2-8°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra karışım 10000 xg hızda 2-8°C'de 1 saat santrifüj edildi.
- Süpernatant kısmı atıldı.
- Her bir falkondaki eksozomları içeren ve net bir şekilde ayırt edilemeyen pellet kısmı üzerine 1 ml 1X PBS eklenerek resuspanse edildi.
- Elde edilen eksozom süspansiyonunun bir kısmı protein miktar analizi için ayrılırken; bir kısmı da elektron mikroskopide incelenmek üzere ayrıldı. Kalan kısmı ise enjeksiyon sırasında kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

Bicinchoninic acid (BCA) Protein Miktar Analizi

Eksozom izolasyonu işleminden sonra örneklerdeki protein miktarı kolorimetrik ölçüm esasına dayanan BCA yöntemi kullanılarak yapıldı. 2×10^6 hücreden elde edilen eksozomlar 0.1ml hacimde 1X PBS ile resuspanse edilerek protein miktar analizine sokuldu. Kısaca, BSA standart örnekleri ve eksozom içeren örneklerden 5 µL alınarak düz tabanlı 96'lık kültür kaplarına aktarıldı. Ardından herbir kuyucuğa bakır içeren çalışma çözeltisinden (1:50) 100 µL konularak karanlık ortamda 5-10 saniye çalkalayıcıda karıştırılıp, karanlık ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda kültür kuyucuklarında meydana gelen renk değişim absorbansı 562 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda ölçüldü. Her bir örnekteki protein miktarı BSA standartları ile oluşturulan standart eğrileri kullanılarak belirlendi. Tüm örnekler 3 tekrarlı olarak çalışıldı.

BCA protein miktar analizi sonucunda 25µg/0.1ml değerinde eksozom içeriği tespit edildi. Bu şekilde mezenkimal kök hücre uygulanan gruptaki hayvanlara verilecek olan hücre sayısına (2×10^6 hücre) eş değer şekilde eksozom miktarı da belirlendi. Kısaca, eksozom transplantasyonu yapılacak ratların her bir uterus boynuzuna 100µl içerisinde 25µg eksozom olacak şekilde uygulaması yapılmak üzere hazırlandı.

3.2.10. Transmission elektron mikroskopi (TEM) yöntemi

TEM yöntemi, mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların morfolojik olarak tanımlanmasında kullanıldı. Parafilm üzerinde 10 µl'lik damlacıklar oluşturularak (Resim 3.2) elektron mikroskop takip-boyama işlemi gerçekleştirildi; sırası ile aşağıdaki işlemler yapıldı:

- Parafilm üzerine 1:1 oranda %2'lik paraformaldehit ile 1X PBS ile resuspanse edilmiş eksozomal damla yerleştirildi.
- Nikel gridlerin kaplı kısım eksozomları içeren damlaya bakacak şekilde yerleştirildi ve 30 dk bekletildi.
- Parafilm üzerine 30µl lik 3 damla PBS yerleştirildi ve gridler sırası ile PBS damlaları üzerine yerleştirilerek yıkandı.
- Parafilm üzerine damlatılan %1'lik gluteraldehit ile gridler 5 dk inkübe edildi. Ardından 5 damla distile su ile gridler parafilm üzerinde yıkandı.
- Kontrast boyama için parafilm üzerine yerleştirilen %2'lik Uranil Asetat ile 10 dk muamele edildi.
- Grid yan çevrilerek kurutma kağıdında emdirildi ve ardından gridin kaplamalı yüzeyi yukarı bakacak şekilde emici kağıdın üzerinde 5 dk kurumaya bırakıldı.
- ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda TEM mikroskopu (Fei Tecnai G2 spirit BioTwin; @120kV; LaB6) ile eksozomların görüntüleri elde edildi.



Resim 3.2. Parafilm üzerine 10 μ l'lik damlacıklar oluşturularak TEM takip ve boyama yönteminin gerçekleştirilmesi

3.2.11. Histokimyasal takip ve yöntem

- Tüm deneklerden elde edilen uterus dokusu örnekleri ışık mikroskopik inceleme için 72 saat süresince % 10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.
- Doku örnekleri kasetlere konularak akarsu altında 24 saat süresince yıkandı.
- Suyun uzaklaştırılması için dokular artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100) geçirildi ve sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilole etkin bırakıldı. Ardından erimiş parafine gömüldüler.
- Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4-5 μ m kalınlığındaki kesitlere tüm gruplardaki her deneğe ait örnekler için Hematoksilen-Eozin (H&E), Masson Trikrom boyamaları yapıldı. Kesitler, Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica LAS V4.9 programında değerlendirilerek resimleri çekildi. H&E boyama ile; genel doku yapısı değerlendirildi. Masson trikrom boyama ile; fibrozis şiddeti ve yaygınlığı değerlendirildi.

Masson's trikrom üçlü boyama yöntemi

- Parafin bloklarından alınan 4-5 μ m kalınlığındaki kesitlerde 62°C'lik etüvde deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından 2 kez 5' er dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları tamamlandı.
- 2 kez 3'er dakika %100'lük etil alkolden; daha sonra sırasıyla %90, %80, %70 ve %50 azalan etil alkol serilerinden geçirildi.
- Kesitler akan musluk suyunda 10 dakika yıkama işlemi yapıldı.

- Kesitlere GBL Masson Trikrom Boyama Kiti protokolü uygulandı.

Kısaca;

- Haematoxylin Weigert's A ve Haematoxylin Weigert's B solüsyonları eşit miktarda karıştırılarak Weigert Hematoksilen karışımı hazırlandı. Kesitler sudan geçirildikten sonra Weigert' s Demirli Hematoksilen ile 15 dk çekirdek boyaması yapıldı.
- Lamlar üzerindeki ayraç uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dk kurumaya bırakıldı.
- Doku kesitlerinin üzerine Pikrik asit çözeltisi damlatıldı ve 4 dk sonra distile suyla yıkandı.
- Doku kesitlerinin üzeri Gelincik kızılı fuksin çözeltisi damlatıldı ve 4 dk sonra distile suyla yıkandı.
- Doku kesitlerinin üzeri Fosfomolibdik asit çözeltisi damlatıldı ve 10 dk bekletildi.
- Yıkama aşaması yapılmadan Masson anilin mavisi çözeltisi doku kesitlerinin üzerine damlatıldı ve 7 dk sonra distile suyla yıkandı.
- Yıkanan kesitler alkol serilerinden geçirilerek ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.
- Sonuç olarak nukleuslar mavi-siyah; hücre sitoplazması kırmızı; kollajenler ise mavi renge boyandı.

Deneklere ait uterus kesitlerinde Masson's trikrom boyamasıyla elde edilen X100'lük büyültmedeki görüntülerde piksel sayımı prensibine dayalı "Image J" programı ile mavi pikseller sayıldı ve bu değerlere göre fibrozis alanları yüzde olarak belirlendi.

3.2.12. İmmunohistokimyasal yöntem

- İmmunohistokimyasal boyamalar için oluşturulan parafin bloklardan polilizinli lamlara 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Parafin bloklarından alınan 4-5 µm kalınlığındaki kesitlerde 62°C'lik etüvde deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından 2 kez 5' er dakika ksilole alınarak deparafinizasyonları tamamlandı.
- 2 kez 3'er dakika %100'lük etil alkolden; daha sonra sırasıyla %90, %80 ve %70 azalan etil alkol serilerinden geçirildi.
- Dehidrate edilen kesitleri alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi.
- Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarmak için, dokulara sitrat tamponu (pH 6.0) ile mikrodalga fırında retriver işlemi uygulandı. Ardından 20 dk soğumaya bırakıldı.

- Dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi.
- Dokuların etrafı PAP-pen ile çevrilenip; dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Ph:7.4) ile yıkandı.
- Dokudaki endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler 15 dakika süresince nemli ortamda %3'lük hidrojen peroksit'e etkin bırakıldı.
- Yıkamanın ardından kesitlere 5 dakika UltraV block uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı.
- Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, uygun dilusyonda BrdU, PCNA, VEGFR-1, MMP-2 ve TIMP-2 primer antikörlerine belirli sürelerde etkin bırakılarak inkübasyonları sağlandı.
- Yıkamanın ardından kesitlere primer antikordan sonra 10 dakika biotinli sekonder antikör uygulandı.
- Yıkamanın ardından kesitler 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakıldı.
- Yıkamanın ardından kesit üzerine diaminobenzedin içeren (DAB) substratı eklenerek yaklaşık 5-10 dakika bekletilip mikroskop altında gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı.
- Mayer'in hematoksilin'i kullanılarak zemin boyası yapıldı.
- Immünişaretli lamalar azalan alkol serilerinden ve ksilolden geçirildi.
- Kesitlerin üzeri lamel ile entellan medyumunu kullanılarak kapatıldı.
- Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica LAS V4.9 programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildi ve her primer antikör için immünohistokimyasal tutulum yoğunlukları incelenerek istatistiksel veriler oluşturuldu.

3.3. İstatistiksel Yöntem

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım şartını sağlayan değişkenleri tanımlamak için ortalama $\pm$ standart sapma; normal dağılım şartını sağlamayan diğer değişkenler için ise ortanca (çeyreklikler arası genişlik) değeri kullanıldı.

Parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenleri karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. ANOVA sonucunda fark bulunduğunda farkın kaynağı Bonferroni post-hoc testi ile araştırıldı.

Çarpık verileri (nonparametrik) değişkenleri karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Fark bulunduğunda farklı grubu belirleyebilmek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldı.

İstatistiksel analiz ve hesaplamalar IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp, NA, USA) ile yapıldı. İstatistiksel kararlarda $p \leq 0.05$ değeri anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

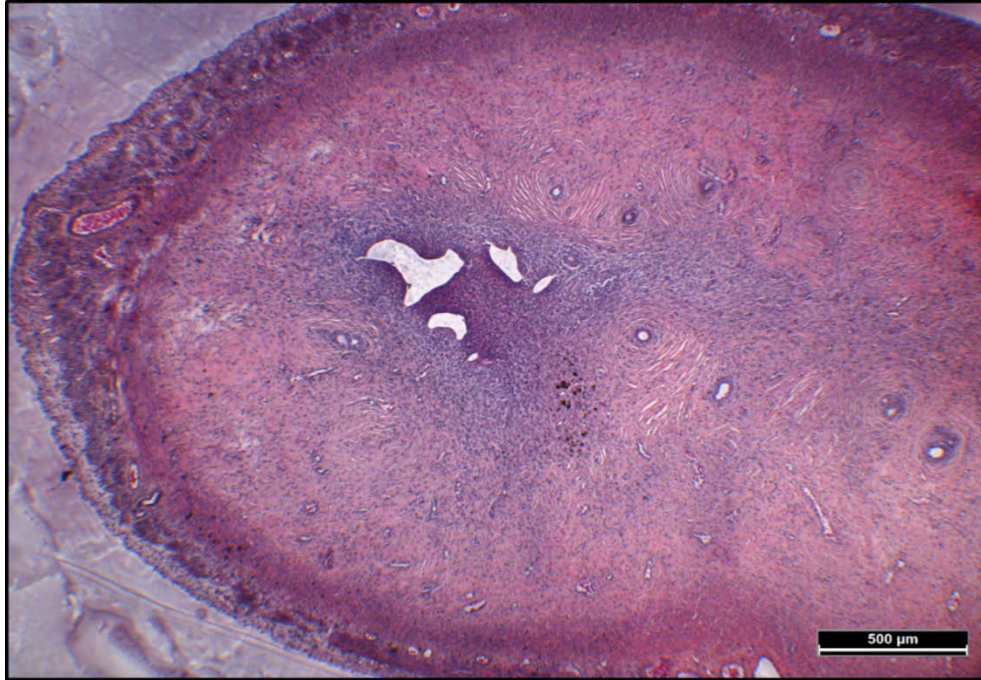




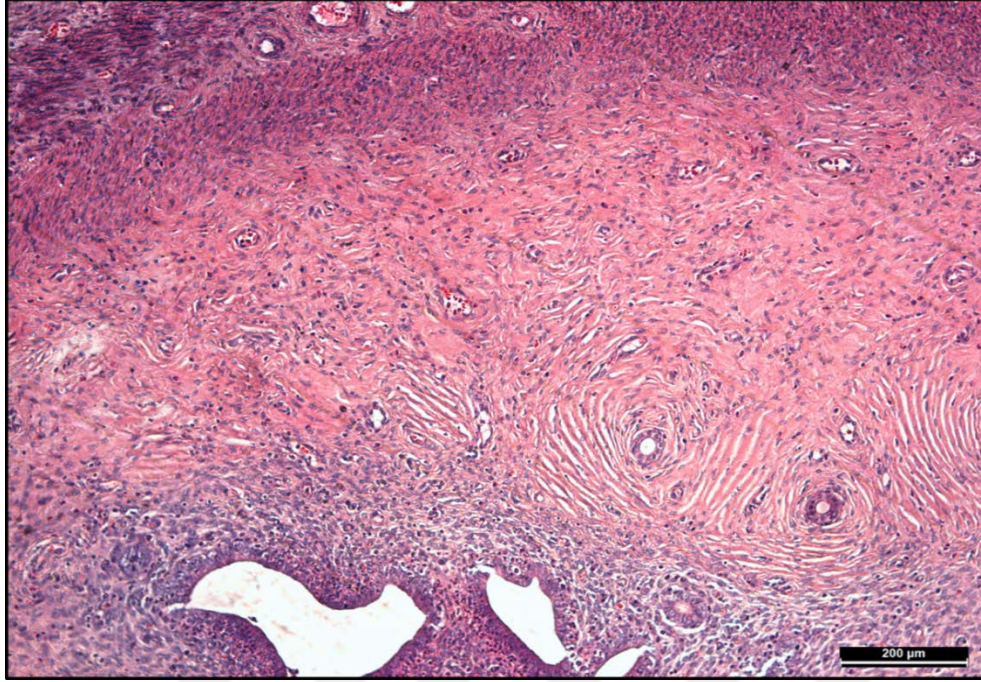
4. BULGULAR

4.1. Asherman Sendromu Modeli Oluşturulması

Asherman sendromu modeli uterin travma uygulaması ile oluşturulmuştur. Model oluşumu travmatize işleminden 2 hafta sonrasına (3 östrus siklusu) denk geldiği için bu süre sonunda 2 rat sakrifiye edilmiş ve uterus dokuları incelenmek üzere çıkarılmıştır. Bu dokuların rutin histolojik takipleri yapıldıktan sonra H&E boyaması yapılmıştır. Bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde fotoğraflanarak model oluşumu kanıtlanmıştır. Asherman sendromu modeli oluşturulan uterus dokularında artan fibrosis, uterus bez sayısında azalma ile birlikte uterus lümeninde darlıklar ve tıkanıklıklar gözlemlendi (Resim 4.1 ve 4.2).



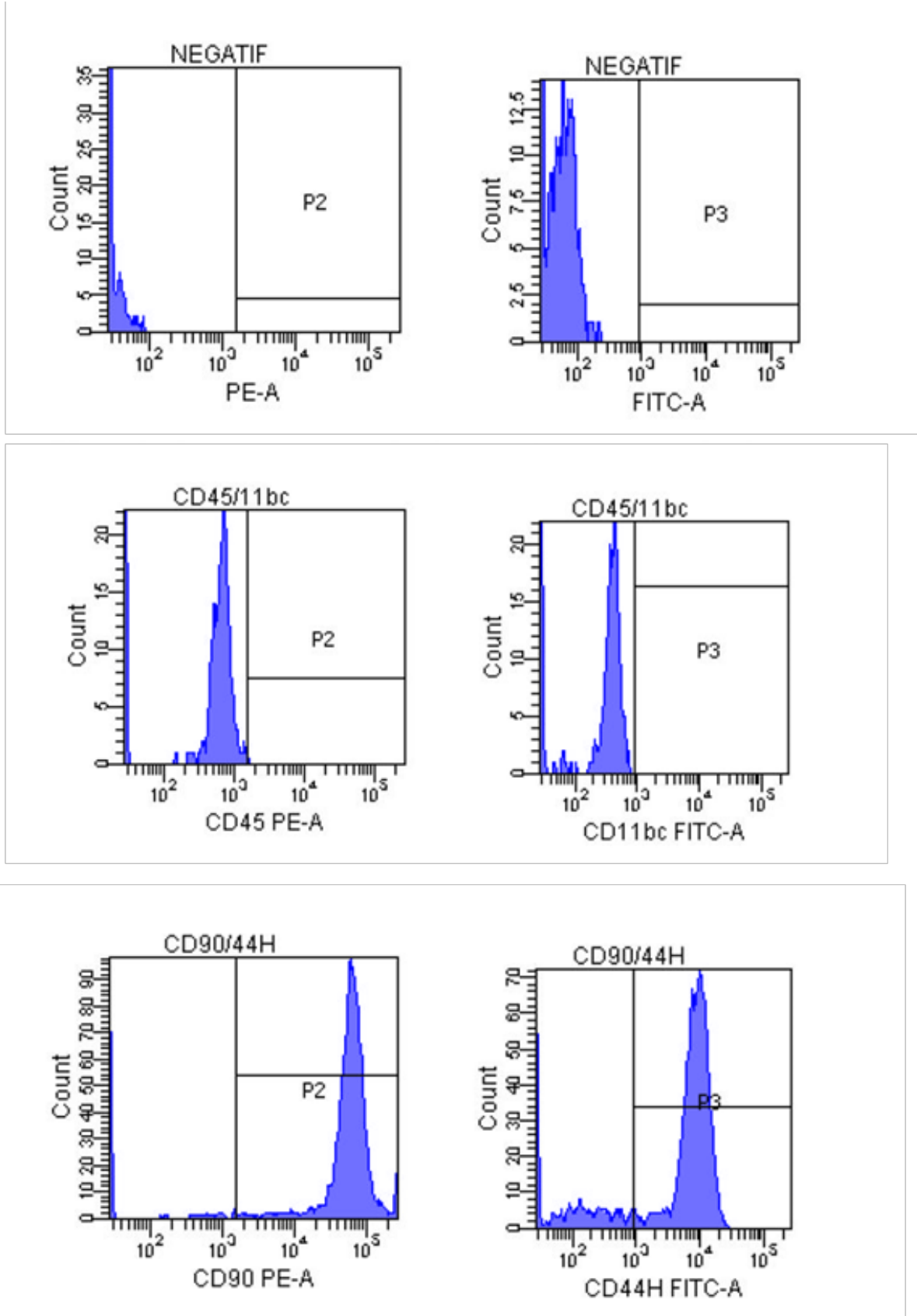
Resim 4.1. Asherman sendrom modelinde uterus bez sayısında azalma ile birlikte uterus lümeninde darlıklar ve tıkanıklıklar (H&E, X40)



Resim 4.2. Asherman sendrom modelinde uterus bez sayısında azalma ile birlikte uterus lümeninde darlıklar ve tıkanıklıklar (H&E, X100)

4.2. Akım Sitometri Cihazında Hücre Tanımlanması

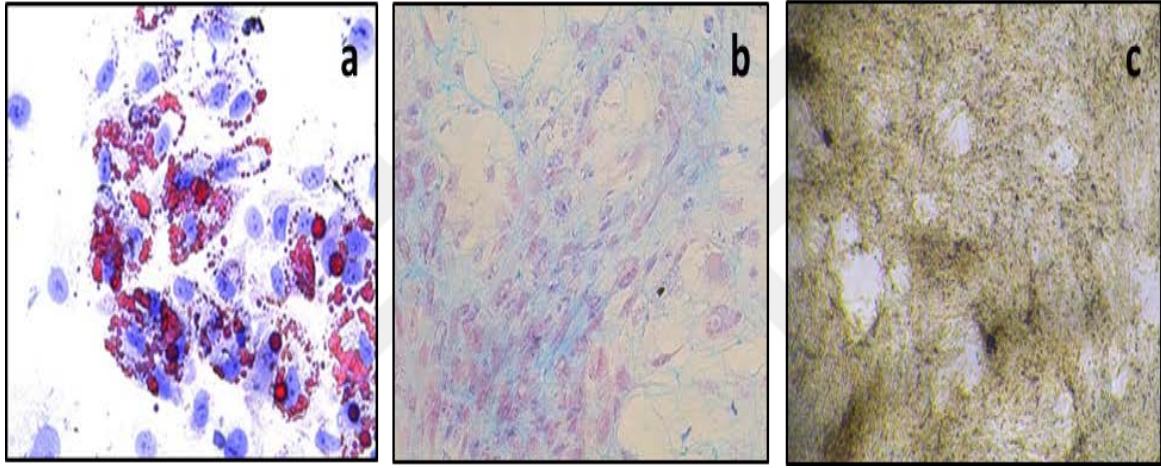
Akım sitometri cihazında kök hücre tanımlama işlemi için belirlenen yüzey belirteçleri (CD45, CD11b/c, CD44, CD90) kullanıldı. Bu yüzey belirteçlerinden CD45 ve CD11b/c negatif olarak belirlenirken; CD44 ve CD90 pozitif olarak belirlendi (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Akım sitometri cihazında, yenidoğan rat uterus kaynaklı hücrelerin mezenkimal kök hücelere farklılaşmasının histogram grafiği ile gösterilmesi [PE-A ve FITC-A negatif kontroller; CD45 (-); CD11b/c (-); CD44(+); CD90(+)].

4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Çalışmaları

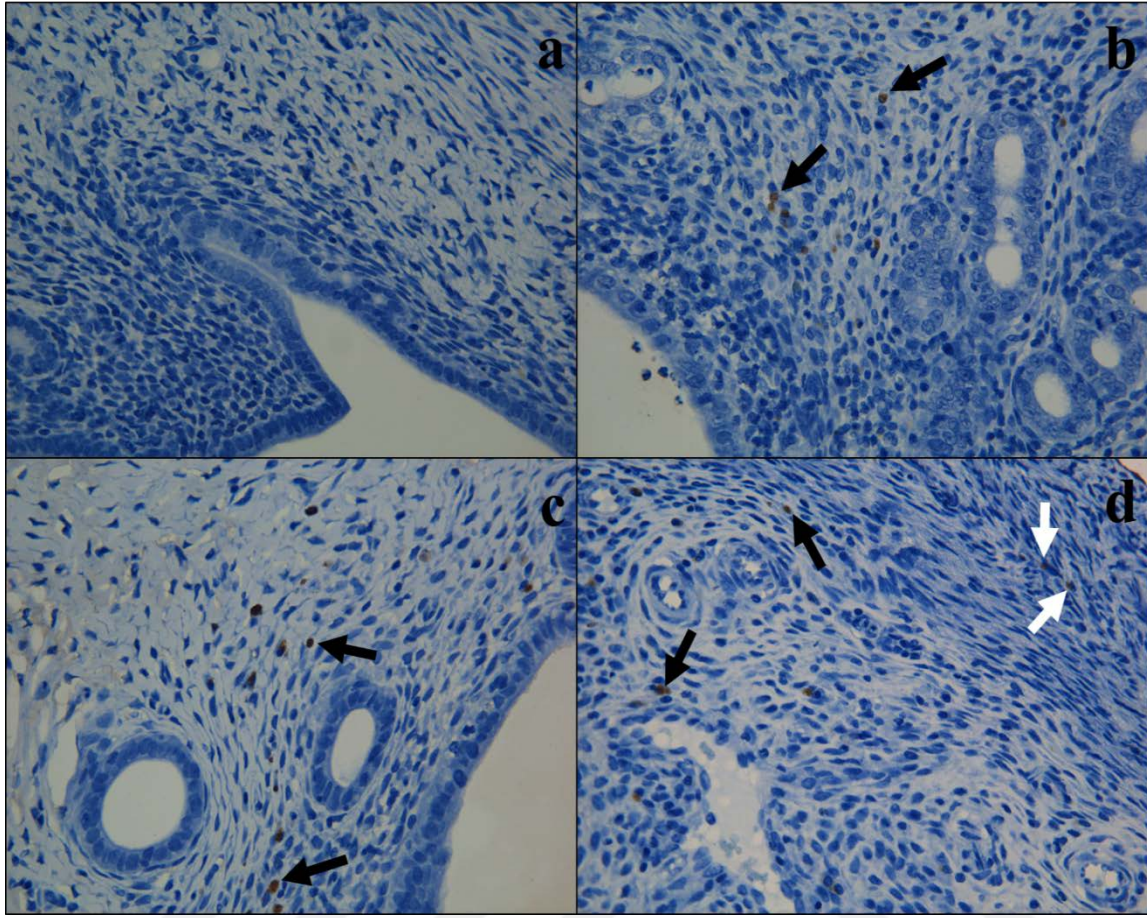
İkinci pasaja gelen hücreler farklılaşma medyumları ile 3 hafta boyunca geliştirildi. Üçüncü hafta sonunda adiposit, kondrosit ve osteosit farklılaşmalarını gösterebilmek için sırasıyla oil red, alcian blue ve von kossa ile boyama işlemi yapıldı. Adiposit dönüşümü sitoplazma içerisindeki lipid damlacıklarının kırmızı renge boyanması ile belirlenirken; kondrosit dönüşümü de hyaluronic asit içeren ekstraselüler matriksin mavi renge boyanması ile belirlendi. Osteosit dönüşümü ise kalsiyum depositlerinin siyah boyanması ile gösterildi (Resim 4.3).



Resim 4.3. Yenidoğan rat uterus kökenli mezenkimal kök hücrelerinin adiposit dönüşümünün oil red boyası ile (lipid damlacıklarının kırmızı ile boyanması) gösterilmesi; X400 (a), kondrosit dönüşümünün alcian blue boyası ile (ekstraselüler matriksin mavi boyanması) gösterilmesi; X200 (b), osteosit dönüşümünün von kossa boyası ile (kalsiyum depositlerinin siyah boyanması) gösterilmesi; X20 (c)

4.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin BrdU ile Etiketlenmesi

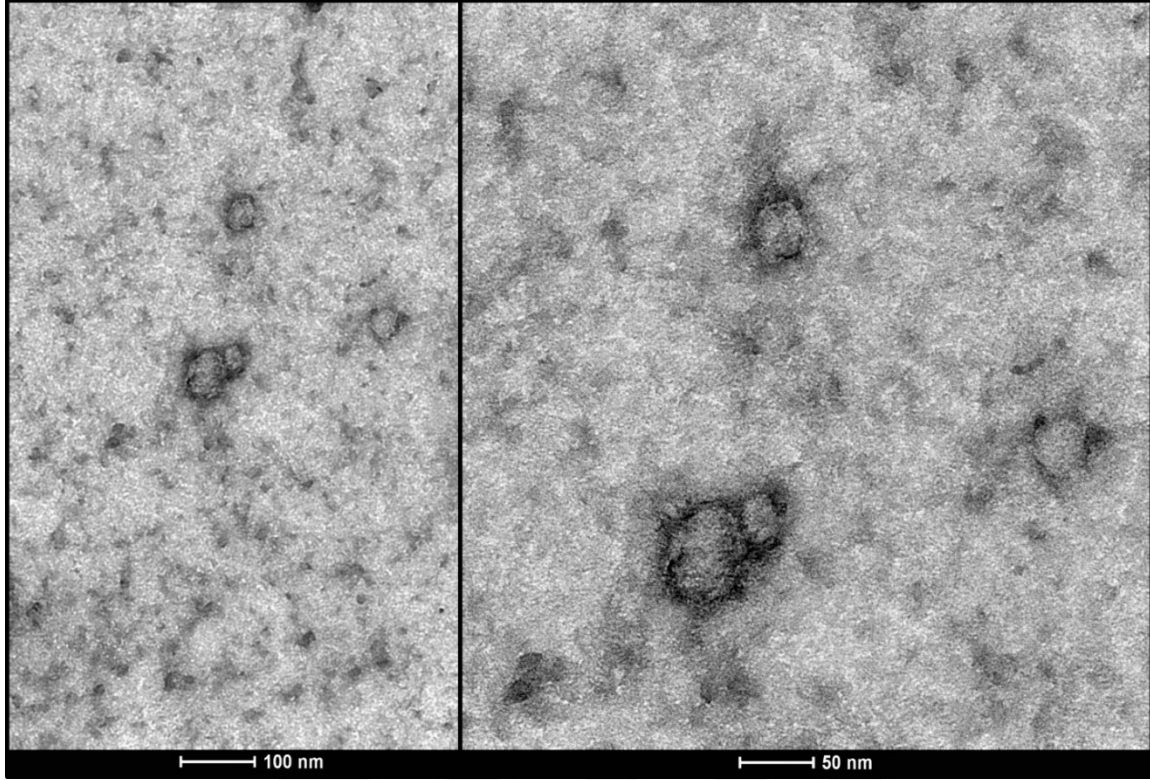
BrdU ile işaretli mezenkimal kök hücreler belirlenen gruplara intrauterin yolla verilmiştir. Elde edilen doku kesitlerinin anti-BrdU ile boyanması ile işaretli bu hücrelerin hasarlı doku bölgesine yerleştikleri gösterilmiştir. Ayrıca mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılmayan gruplarda boyanma gözlenmemiştir (Resim 4.4).



Resim 4.4. Mezenkimal kök hücre uygulanmayan gruplarda (a) BrdU pozitif hücre izlenmezken; BrdU işaretli mezenkimal kök hücre uygulanan gruplarda (b,c,d) stromada endometrial bez çevresinde (siyah oklar) ve miyometrium tabakasında (beyaz oklar) anti-BrdU pozitif hücreler saptandı (DAB-Hematoksilen, X400)

4.5. TEM Bulguları

Geçirimli elektron mikroskopi yöntemi, mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların varlığını ve morfolojilerini tanımlamak için kullanıldı. Eksozomların izolasyonu kültür medyası protokolüne göre yapıldı. Elde edilen süspanse haldeki 40-100nm çapındaki eksozomlar TEM mikroskopi (Fei Tecnai G2 spirit BioTwin; @120kV) ile görüntülendi (Resim 4.5).



Resim 4.5. Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen eksozomların TEM görüntüleri

4.6. Histokimyasal ve İmmunohistokimyasal Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirmeleri

4.6.1. H&E bulguları

“Kontrol” grubuna ait uterus dokularının tüm katmanları diöstrus evresine uygun olarak normal histomorfolojik yapı sergiledi (Resim 4.6).

“Ash” grubu endometriumları değerlendirildiğinde endometrial epitelin çok alçak kübik şekilli olduğu; endometrium fonksiyonaliste yok denecek kadar az endometrial bez varlığı; endometrial bazaliste ise ise bezlerin derin kısımlarının yer aldığı gözlemlendi (Resim 4.7).

“Ash+uMKH” grubunda endometrial epitelin daha yüksek boylu olduğu; Asherman görünümünün tamamen ortadan kalktığı; endometrium fonksiyonalis tabakasının “Ash” grubuna göre daha fazla sayıda bez içerdiği; endometrium bazaliste ise endometrial bezlerin derin kısımlarının normal yapı ve sayıda yer aldığı gözlemlendi (Resim 4.8).

“Ash+uMKH-Eks” grubunda ise “Ash+uMKH” grubundaki gibi Asherman görünümünün ortadan kalktığı; endometrial epitelin “Kontrol” grubundaki şekline benzer olarak yüksek prizmatik şekilli olduğu; endometrium fonksiyonalisteki ve endometrium bazalisteki bezlerin yapısının ise diöstrus evresindeki yapıya benzer olduğu gözlemlendi (Resim 4.9).



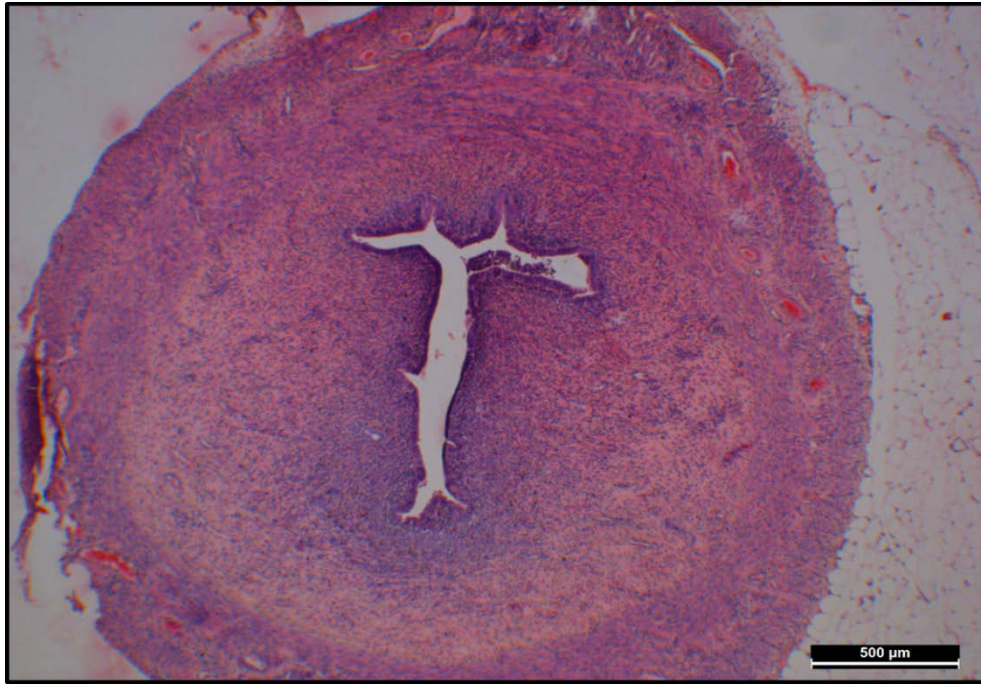
Resim 4.6. Kontrol grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (H&E, X40)



Resim 4.7. Asherman grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (H&E, X40)



Resim 4.8. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (H&E, X40)



Resim 4.9. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (H&E, X40)

4.6.2. Masson's trikrom bulguları ve istatistiksel değerlendirmeleri

Tüm gruplara ait uterus kesitlerinden Masson's trikrom boyaması ile elde edilen X100'lük büyültmedeki görüntüler kullanıldı. "Image J" programı ile mavi piksellerin oluşturduğu

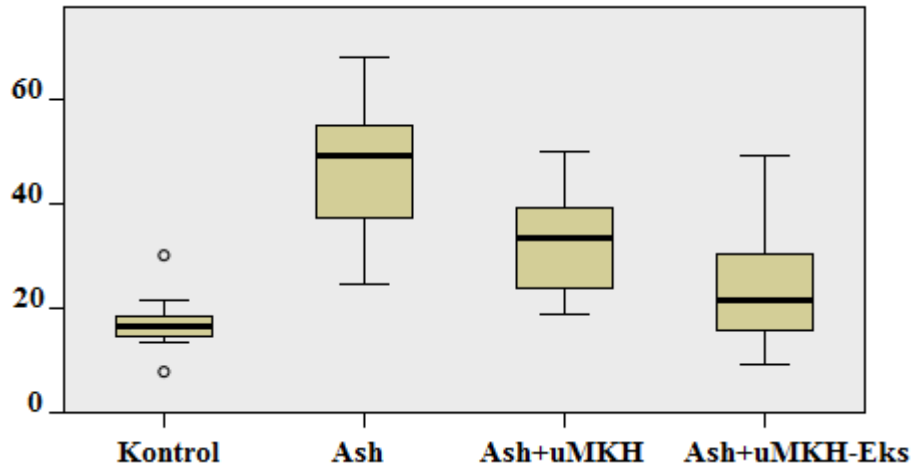
alanların, tüm alana göre oranı yüzde olarak belirlendi. Bu değerlere göre fibrozis oranları belirlendi.

Uterusta fibrozis alan ortalamaları, “Kontrol” grubunda (Resim 4.10) 16,61 (4,57); “Ash” grubunda (Resim 4.11) 49,25 (19,05); “Ash+uMKH” grubunda (Resim 4.12) 33,47 (16,89) ve “Ash+uMKH-Eks” grubunda (Resim 4.13) ise 21,62 (16,83) olarak saptandı (Şekil 4.2). Kruskal-Wallis testi sonucu tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p<0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile grupların post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldı.

“Kontrol” grubu ile “Ash” grubu kıyaslandığında, “Ash” grubu uterus fibrozis alanları “Kontrol” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$). “Kontrol” grubu ile “Ash+uMKH” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH” grubu uterus fibrozis alanları “Kontrol” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken ($p=0,011$); “Kontrol” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH-Eks” grubu değerleri yüksek olmasına rağmen, uterustaki fibrozis alanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$).

“Ash” grubu ile “Ash+uMKH” grubu kıyaslandığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız iken ($p=0,437$); “Ash+uMKH” grubunda fibrotik alan oranı daha düşük bulundu. “Ash” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında ise, “Ash+uMKH-Eks” grubunda fibrotik alanlar istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,002$).

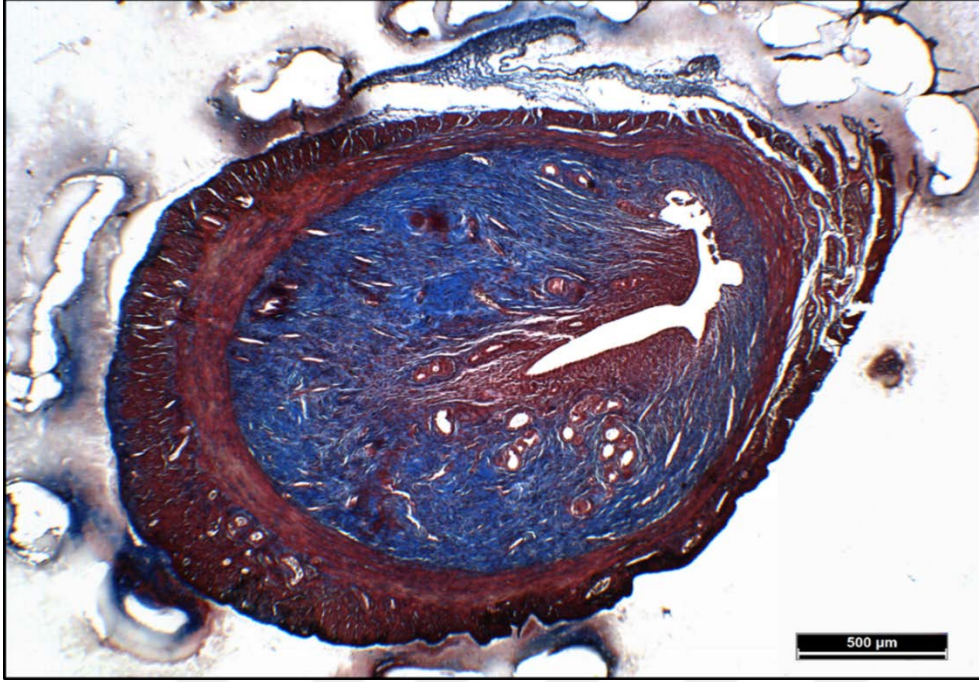
“Ash+uMKH” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında “Ash+uMKH-Eks” grubu değerleri daha düşük olmasına rağmen, uterustaki fibrozis alanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,452$).



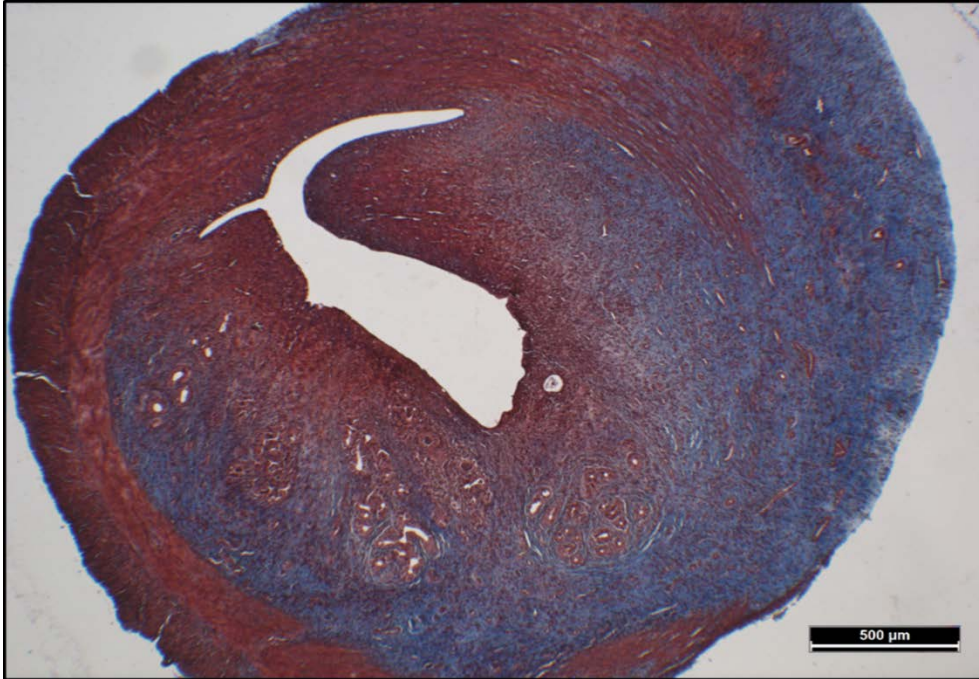
Şekil 4.2. Gruplara ait Masson's trikrom boyaması sonucu fibrotik alan yüzdeleri



Resim 4.10. Kontrol grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (Masson's trikrom, X40)



Resim 4.11. Asherman grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (Masson's trikrom, X40)



Resim 4.12. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (Masson's trikrom, X40)



Resim 4.13. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusu genel görüntüsü (Masson's trikrom, X40)

4.6.3. İmmunohistokimyasal bulgular ve istatistiksel değerlendirmeleri

PCNA bulguları

Her deneğe ait PCNA antikoruna ait X400'lük büyültmede toplan 100 hücreden pozitif tutulum gösteren hücrelerin sayısı ImageJ programı ile belirlendi.

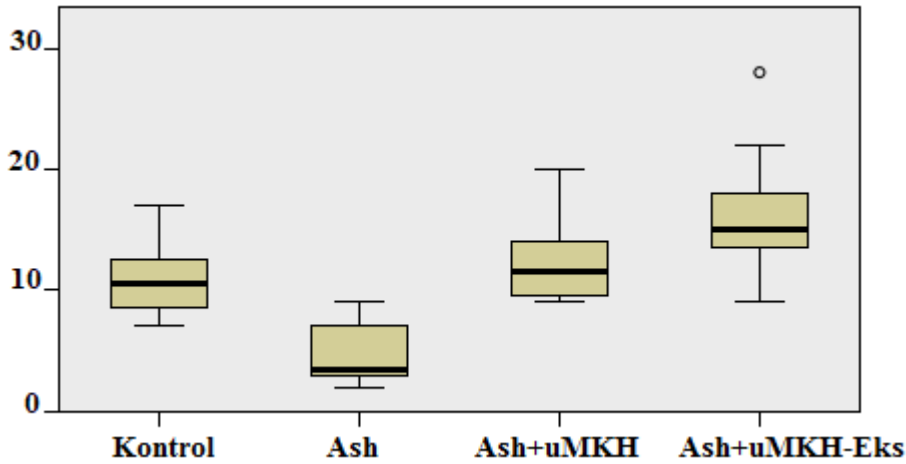
PCNA immüntutulumuna ait değerler "Kontrol" grubunda (Resim 4.14) $10,83 \pm 3,13$; "Ash" grubunda (Resim 4.15) $4,67 \pm 2,46$; "Ash+uMKH" grubunda (Resim 4.16) $12,25 \pm 3,33$ ve "Ash+uMKH-Eks" grubunda (Resim 4.17) ise $16,33 \pm 4,96$ olarak saptandı (Şekil 4.3). ANOVA testi sonucu tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p < 0,001$). Farkın kaynağı Bonferroni post-hoc testi ile araştırıldı.

"Kontrol" grubu ile "Ash" grubu kıyaslandığında, "Ash" grubunda immuntutulum oranı "Kontrol" grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p = 0,001$). "Kontrol" grubu ile "Ash+uMKH" grubu kıyaslandığında, "Ash+uMKH" grubu immuntutulum değerleri daha yüksek olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p = 1,000$). "Kontrol" grubu ile "Ash+uMKH-Eks" grubu kıyaslandığında,

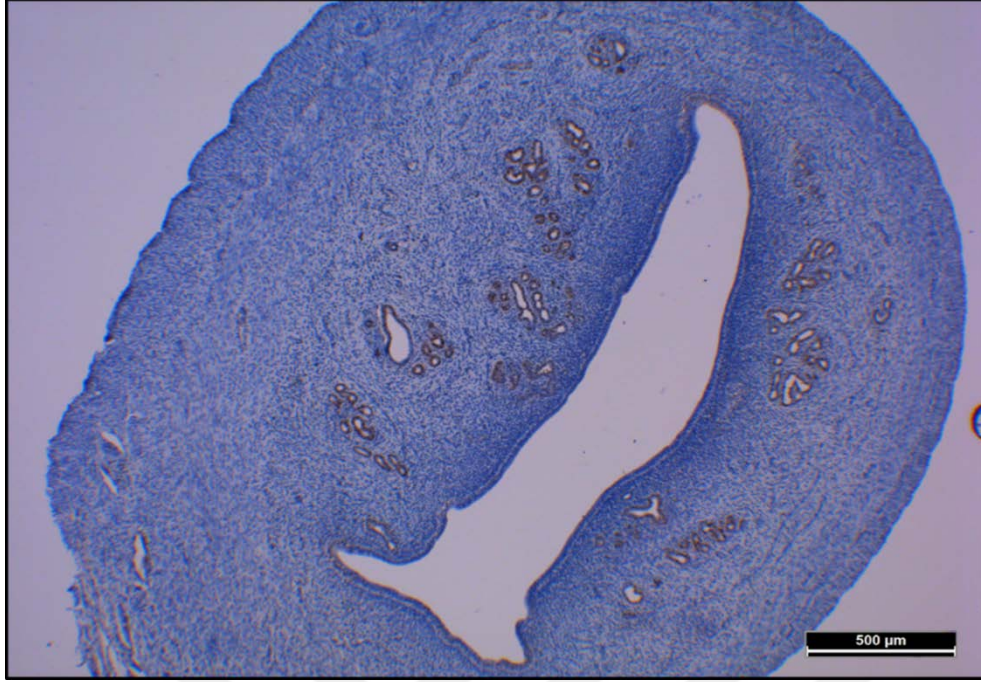
“Ash+uMKH-Eks” grubunda immuntutulum oranı “Kontrol” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p=0,003$).

“Ash” grubu ile “Ash+uMKH” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH” grubunda immuntutulum oranı “Ash” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$). Aynı şekilde “Ash” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH-Eks” grubunda immuntutulum oranı “Ash” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$).

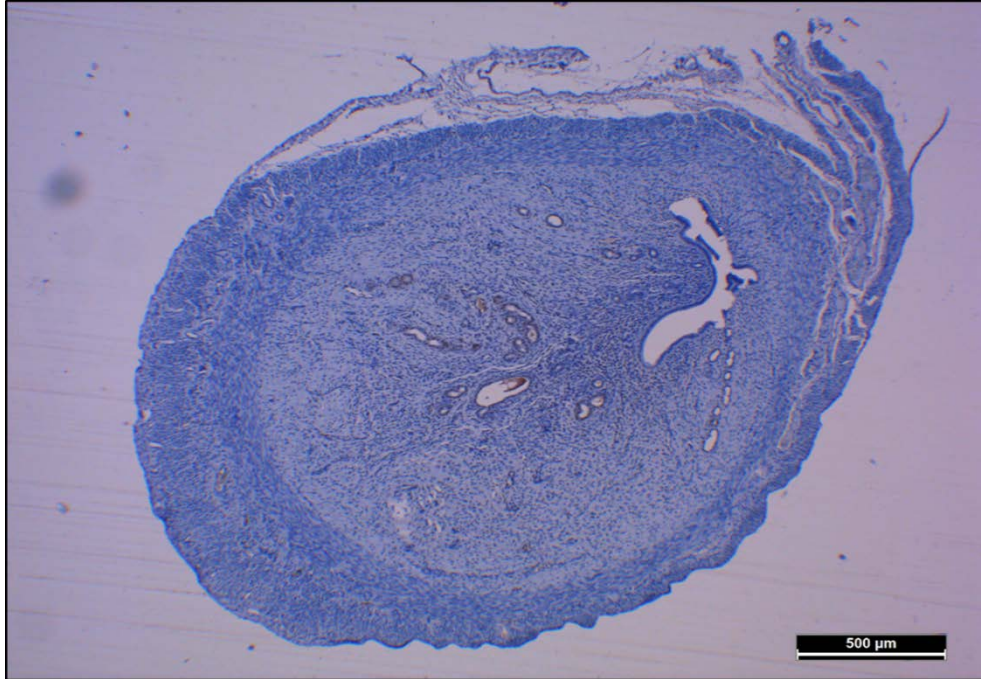
“Ash+uMKH” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında “Ash+uMKH-Eks” grubunda immuntutulum oranı “Ash+uMKH” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p=0,047$).



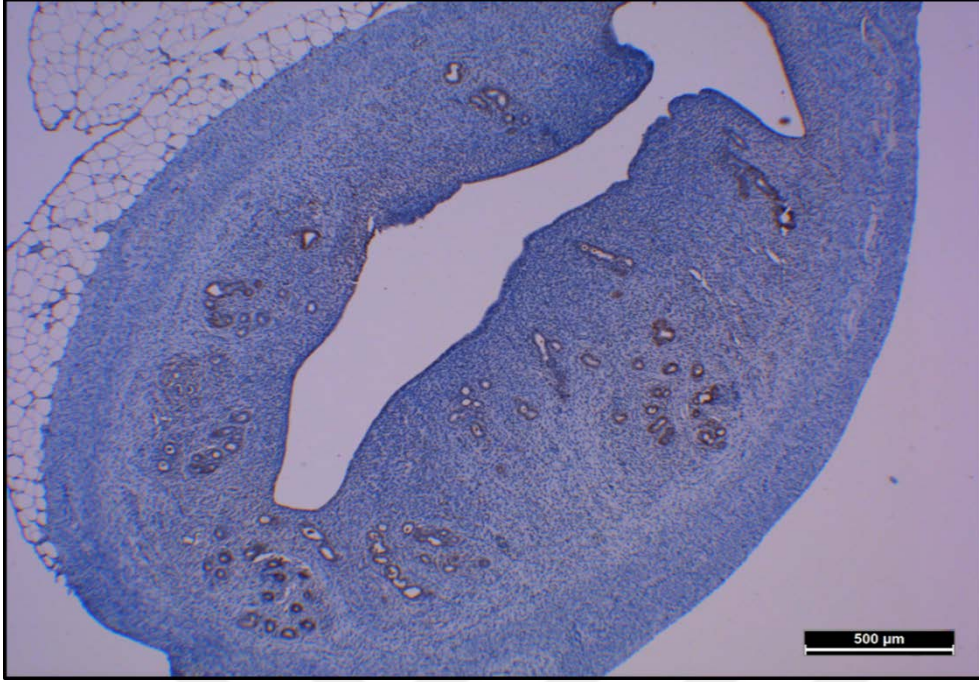
Şekil 4.3. Gruplara ait PCNA boyaması sonucu immunpozitif hücre sayısı



Resim 4.14. Kontrol grubuna ait uterus dokusunda PCNA immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.15. Asherman grubuna ait uterus dokusunda PCNA immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.16. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusunda PCNA immünişaretleme (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.17. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusunda PCNA immünişaretleme (DAB-Hematoksilen, X40)

VEGFR-1 bulguları

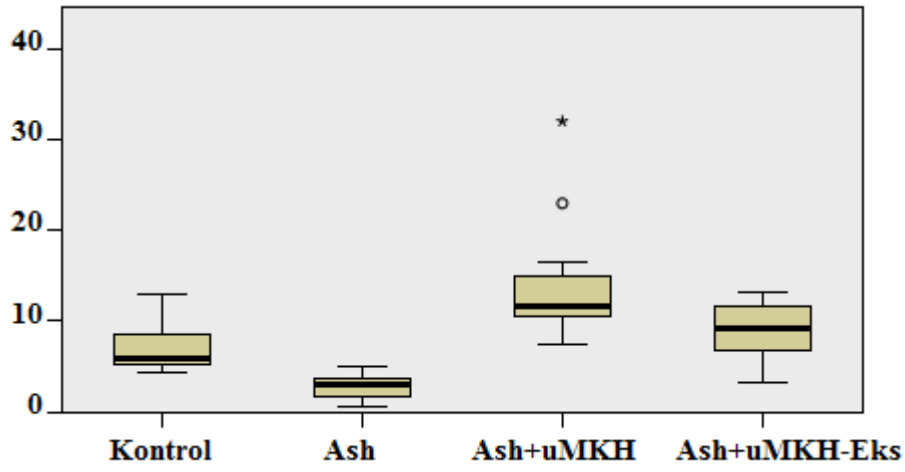
Her deneğe ait VEGFR-1 antikoruna ait pozitif tutulum/total alan oranı yüzde olarak ImageJ programı ile hesaplandı. Programda X400'lük büyültmeden elde edilen görüntüler kullanıldı.

VEGFR-1 immuntutulumuna ait değerler "Kontrol" grubunda (Resim 4.18) 5,78 (3,77); "Ash" grubunda (Resim 4.19) 2,92 (2,14); "Ash+uMKH" grubunda (Resim 4.20) 11,71 (5,37) ve "Ash+uMKH-Eks" grubunda (Resim 4.21) ise 9,29 (5,21) olarak saptandı (Şekil 4.4). Kruskal-Wallis testi sonucu tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p<0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile grupların post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldı.

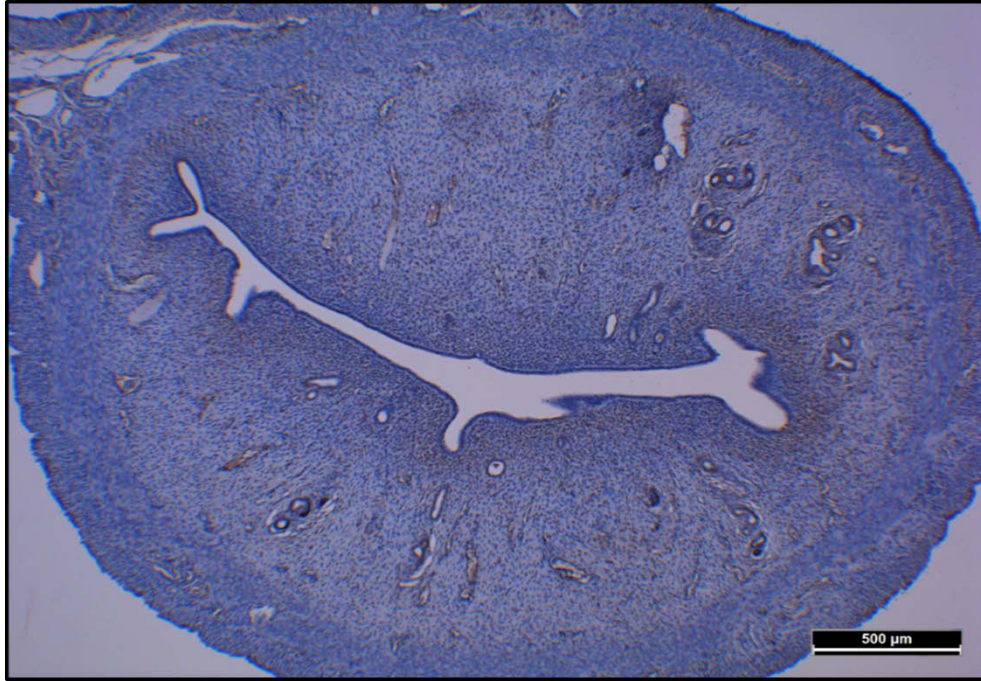
"Kontrol" grubu ile "Ash" grubu kıyaslandığında, "Ash" grubunda immuntutulum oranı "Kontrol" grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,023$). "Kontrol" grubu ile "Ash+uMKH" grubu kıyaslandığında, "Ash+uMKH" grubu immuntutulum değerleri yüksek olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,079$). "Kontrol" grubu ile "Ash+uMKH-Eks" grubu kıyaslandığında da, "Ash+uMKH-Eks" grubu immuntutulum değerleri yüksek olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$).

"Ash" grubu ile "Ash+uMKH" grubu kıyaslandığında, "Ash+uMKH" grubunda immuntutulum oranı "Ash" grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$). Aynı şekilde "Ash" grubu ile "Ash+uMKH-Eks" grubu kıyaslandığında, "Ash+uMKH-Eks" grubunda immuntutulum oranı "Ash" grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$).

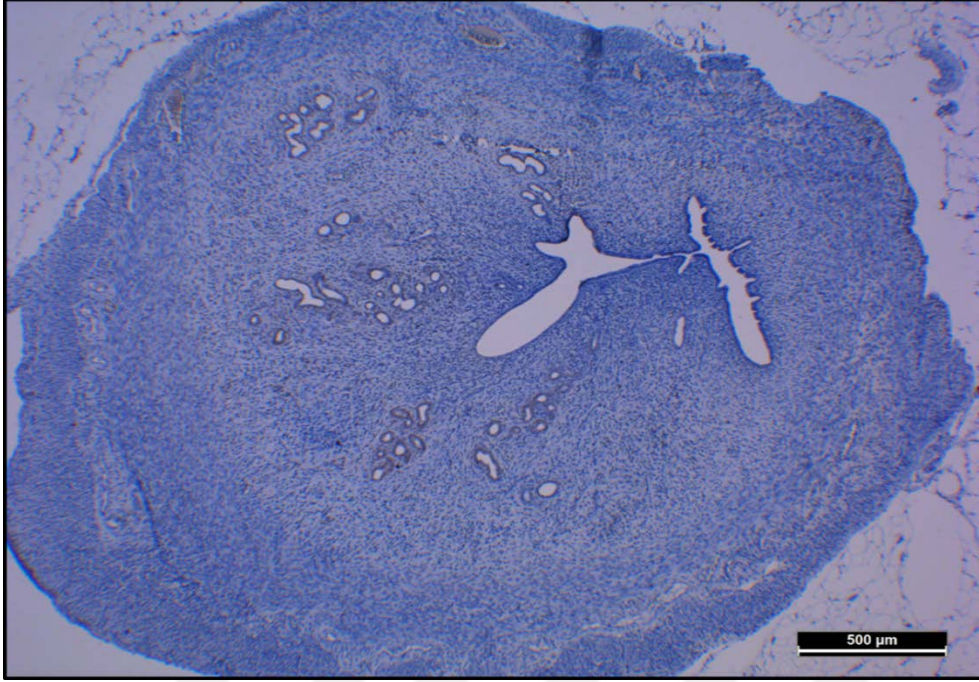
"Ash+uMKH" grubu ile "Ash+uMKH-Eks" grubu kıyaslandığında "Ash+uMKH" grubu değerleri daha yüksek olmasına rağmen, immuntutulum oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,918$).



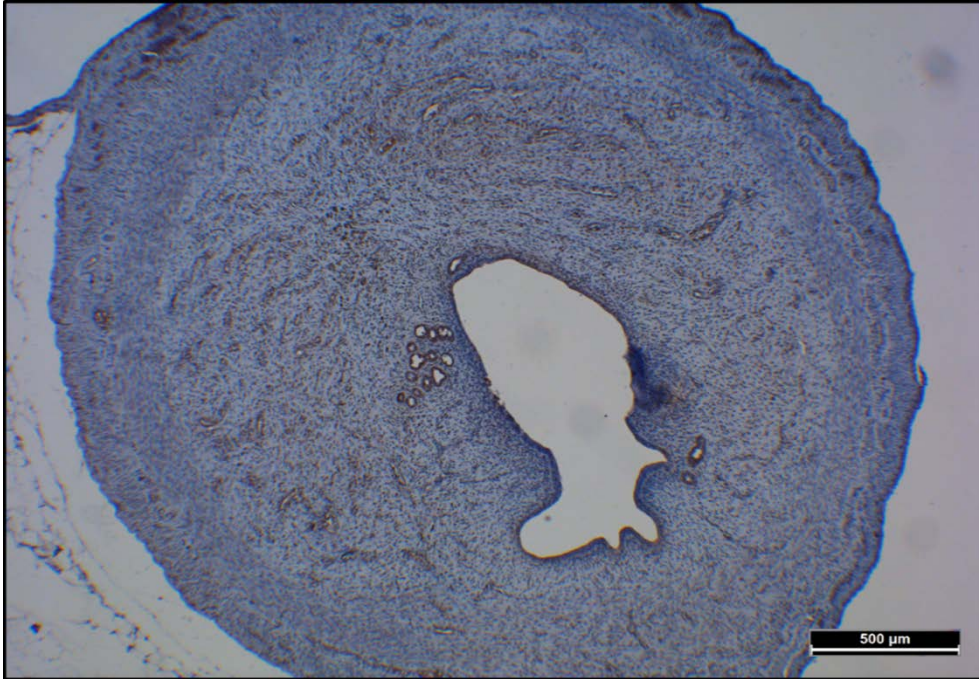
Şekil 4.4. Gruplara ait VEGFR-1 boyaması sonucu immunpozitif alan yüzdeleri



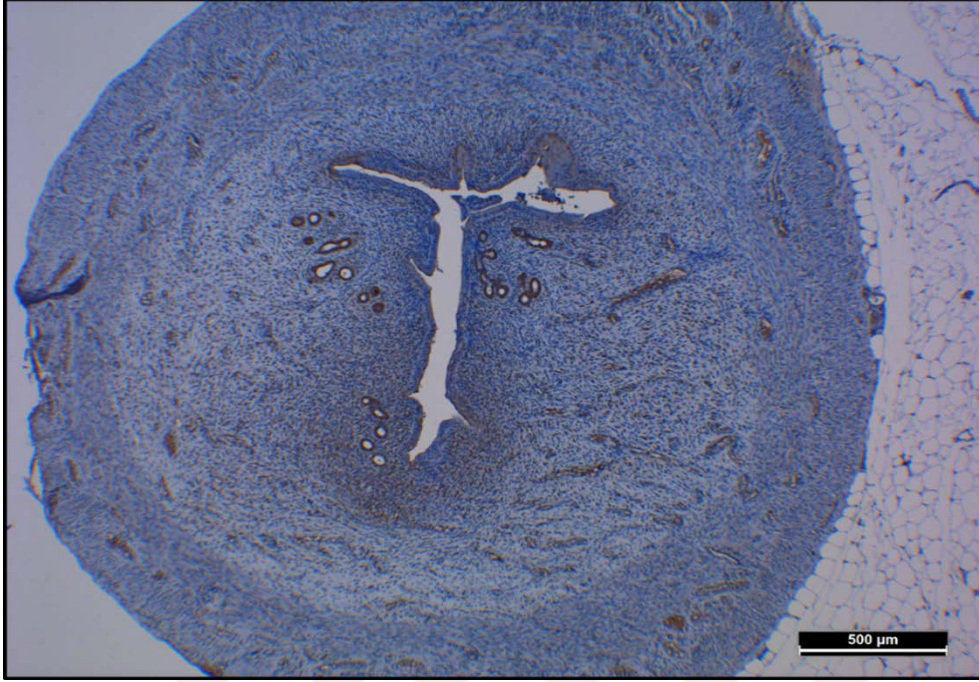
Resim 4.18. Kontrol grubuna ait uterus dokusunda VEGFR-1 immünişaretleme (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.19. Asherman grubuna ait uterus dokusunda VEGFR-1 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.20. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusunda VEGFR-1 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.21. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusunda VEGFR-1 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)

MMP-2 bulguları

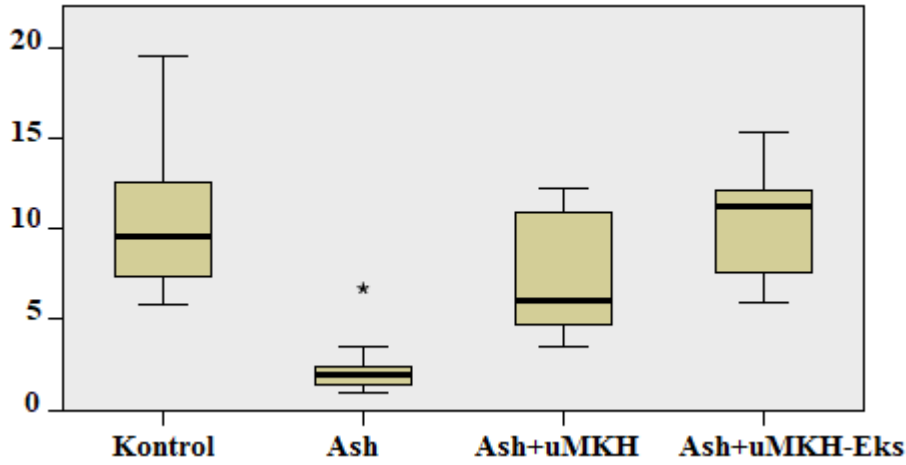
Her deneğe ait MMP-2 antikoruna ait pozitif tutulum/total alan oranı yüzde olarak ImageJ programı ile hesaplandı. Programda X400’lük büyültmeden elde edilen görüntüler kullanıldı.

TIMP-2 immüntutulumuna ait değerler “Kontrol” grubunda (Resim 4.22) $10,41 \pm 4,03$; “Ash” grubunda (Resim 4.23) $2,26 \pm 1,56$; “Ash+uMKH” grubunda (Resim 4.24) $7,27 \pm 3,33$ ve “Ash+uMKH-Eks” grubunda (Resim 4.25) ise $10,49 \pm 3,12$ olarak saptandı (Şekil 4.5). ANOVA testi sonucu tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p < 0,001$). Farkın kaynağı Bonferroni post-hoc testi ile araştırıldı.

“Kontrol” grubu ile “Ash” grubu kıyaslandığında, “Ash” grubunda immuntutulum oranı “Kontrol” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p < 0,001$). “Kontrol” grubu ile “Ash+uMKH” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH” grubu immuntutulum değerleri daha düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p = 0,112$). “Kontrol” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında da, “Ash+uMKH-Eks” grubu immuntutulum değerleri yüksek olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p = 1,000$).

“Ash” grubu ile “Ash+uMKH” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH” grubunda immuntutulum oranı “Ash” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p=0,002$). Aynı şekilde “Ash” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH-Eks” grubunda immuntutulum oranı “Ash” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$).

“Ash+uMKH” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında “Ash+uMKH” grubu değerleri daha düşük olmasına rağmen, immuntutulum oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,096$).



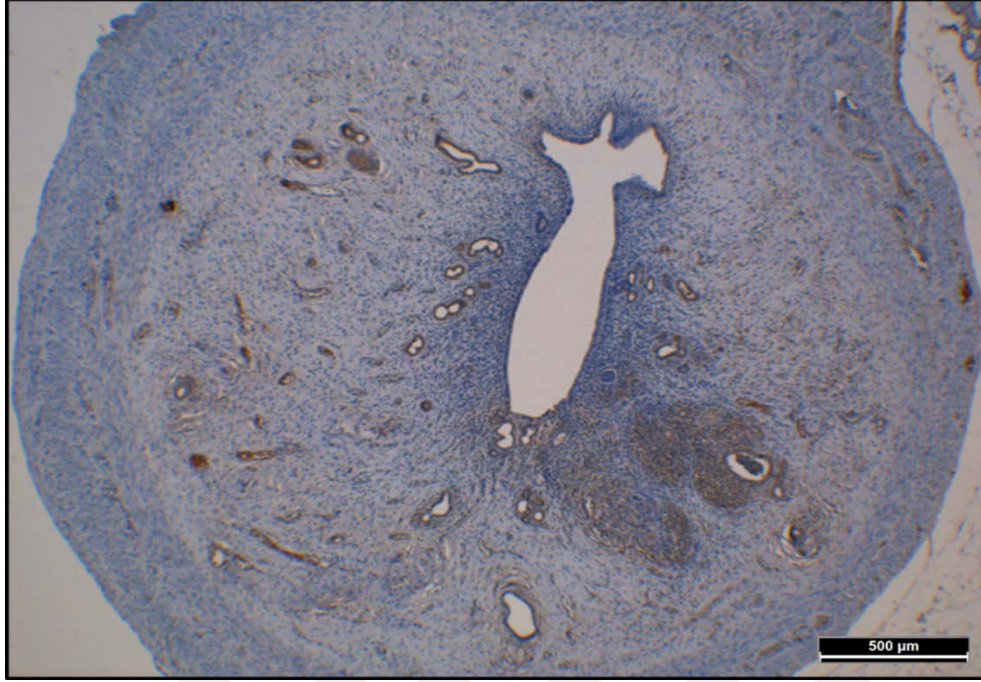
Şekil 4.5. Gruplara ait MMP-2 boyaması sonucu immunpozitif alan yüzdeleri



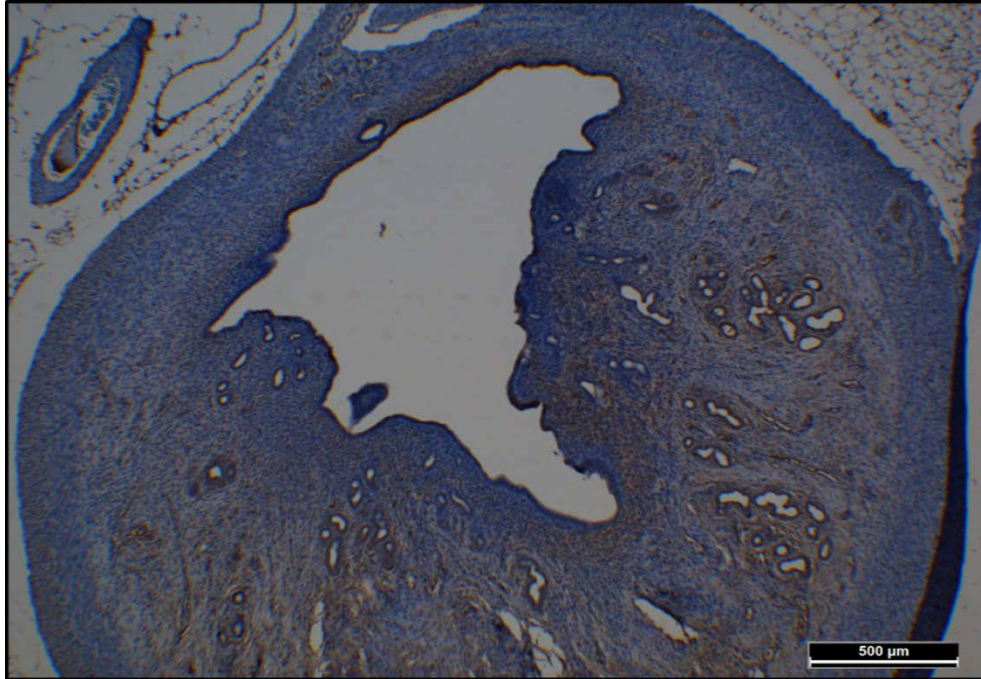
Resim 4.22. Kontrol grubuna ait uterus dokusunda MMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.23. Asherman grubuna ait uterus dokusunda MMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.24. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusunda MMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.25. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusunda MMP-2 immünişaretlemesi (DAB-Hematoksilen, X40)

TIMP-2 bulguları

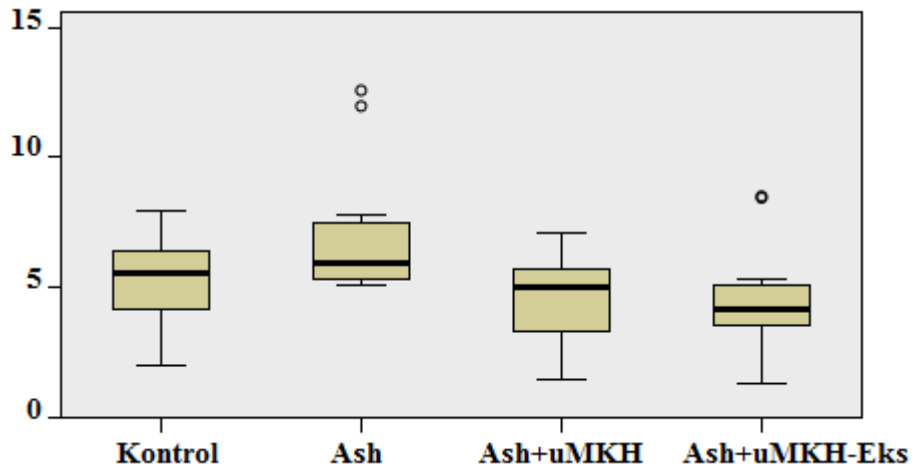
Her deneğe ait TIMP-2 antikoruna ait pozitif tutulum/total alan oranı yüzde olarak ImageJ programı ile hesaplandı. Programda X400'lük büyültmeden elde edilen görüntüler kullanıldı.

TIMP-2 immuntutulumuna ait değerler “Kontrol” grubunda (Resim 4.26) 5,55 (2,75); “Ash” grubunda (Resim 4.27) 5,89 (2,39); “Ash+uMKH” grubunda (Resim 4.28) 5,02 (2,79) ve “Ash+uMKH-Eks” grubunda (Resim 4.29) ise 4,12 (1,80) olarak saptandı (Şekil 4.6). Kruskal-Wallis testi sonucu tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p<0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile grupların post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldı.

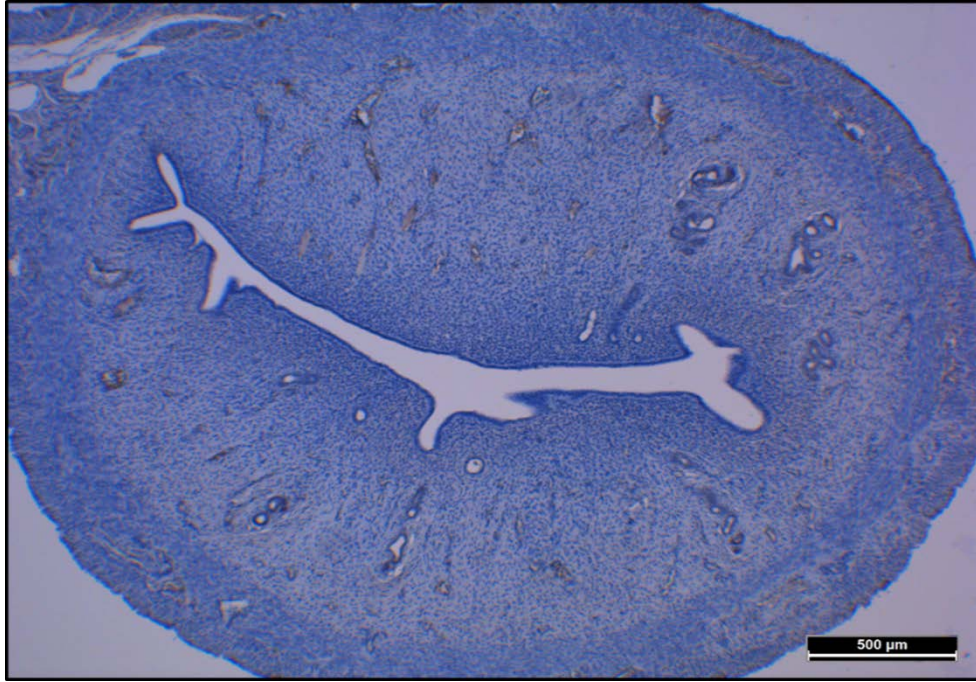
“Kontrol” grubu ile “Ash” grubu kıyaslandığında, “Ash” grubu immuntutulum değerleri yüksek olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Kontrol” grubu ile Ash+uMKH” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH” grubu immuntutulum değerleri daha düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Kontrol” grubu ile Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında da, “Ash+uMKH-Eks” grubu immuntutulum değerleri daha düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,702$).

“Ash” grubu ile Ash+uMKH” grubu kıyaslandığında da, “Ash+uMKH” grubu immuntutulum değerleri daha düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,099$). “Ash” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında, “Ash+uMKH-Eks” grubunda immuntutulum oranı “Ash” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,030$).

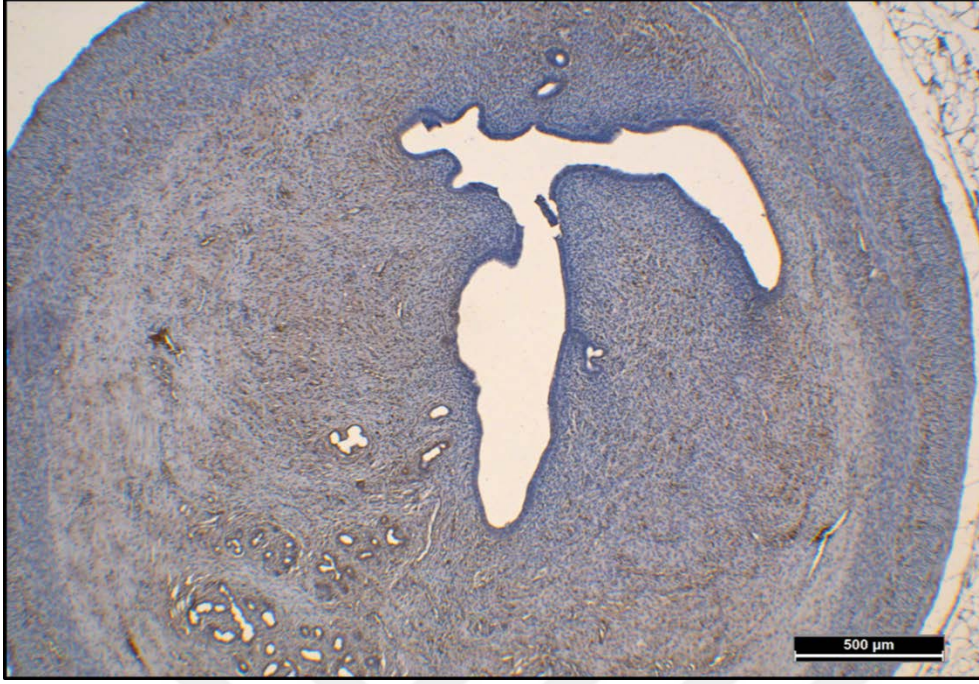
“Ash+uMKH” grubu ile “Ash+uMKH-Eks” grubu kıyaslandığında “Ash+uMKH-Eks” grubu değerleri daha düşük olmasına rağmen, immuntutulum oranları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$).



Şekil 4.6. Gruplara ait TIMP-2 boyaması sonucu immunpozitif alan yüzdeleri



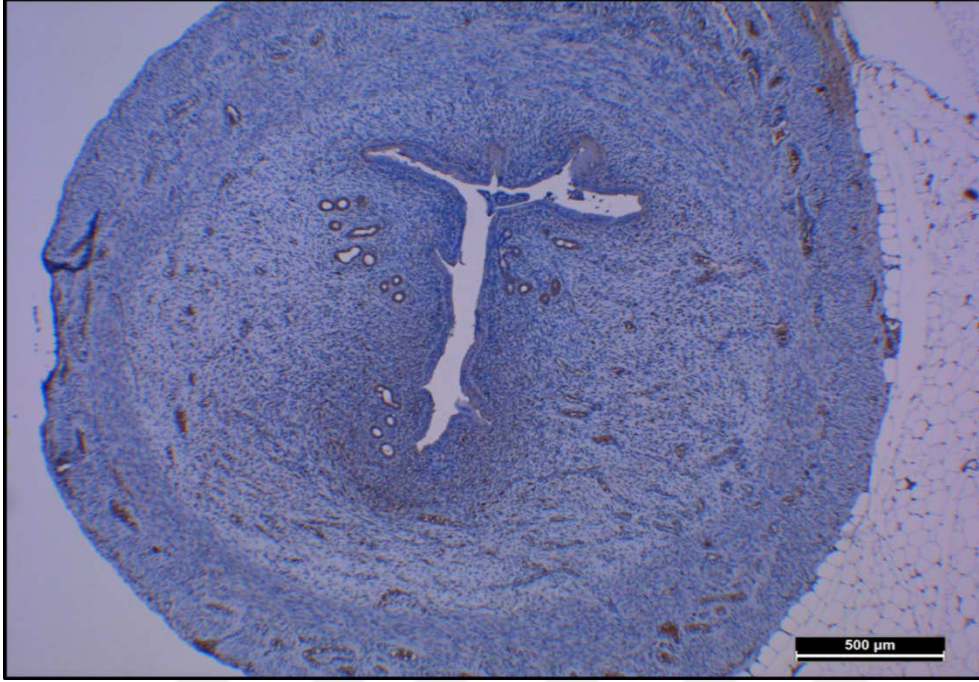
Resim 4.26. Kontrol grubuna ait uterus dokusunda TIMP-2 immünişaretleme (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.27. Asherman grubuna ait uterus dokusunda TIMP-2 immünişaretleme (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.28. Ash+uMKH grubuna ait uterus dokusunda TIMP-2 immünişaretleme (DAB-Hematoksilen, X40)



Resim 4.29. Ash+uMKH-Eks grubuna ait uterus dokusunda TIMP-2 immünişaretleme (DAB-Hematoksilen, X40)

Bu bulgularla “Ash” grubunda fibrozisin arttığı hem histokimyasal hem de immünohistokimyasal olarak belirlendi. MMP-2 immüntutulumu “Ash+uMKH-Eks” grubunda en yüksek olmakla birlikte; tedavi gruplarında “Ash” grubuna kıyasla yüksek olarak belirlendi. Antifibrotik belirteçlerden olan TIMP-2 bulguları ise MMP-2 bulgularının tam tersiydi.

Asherman sendromu nedeniyle uterinal dokuda hücresel düzeyde proliferasyon değerlendirildiğinde “Ash” grubundaki PCNA pozitif hücre sayısı “Kontrol” grubuna kıyasla oldukça azdı. Ancak “Kontrol” ile “Ash+uMKH” grubunun PCNA tutlumu karşılaştırıldığında fark gözlenmezken; “Ash+uMKH-Eks” grubu “Kontrol” grubuna göre anlamlı olarak artış göstermekteydi.

Asherman sendromu nedeniyle uterinal dokuda vaskülarizasyon değerlendirildiğinde ise “Kontrol” grubu ile karşılaştırıldığında “Ash” grubunda VEGFR-1 pozitif tutulum oldukça azdı. Ancak tedavi grupları “Ash” grubuyla karşılaştırıldığında VEGFR-1 immüntutulumu “Ash+uMKH” grubunda daha fazla olmak üzere onu eksozom grubu izlemekteydi.

Sonuç olarak oluşturduğumuz Asherman modelinde tipik Asherman sendromunun histomorfolojik bulgularının tümünün gözlemlendiği; tedavi gruplarında ise hasarın onarıldığı

saptandı. “Ash+uMKH” grubunda VEGFR-1 ifadenmesinin “Ash+uMKH-Eks” grubuna göre yüksek olması vaskülarizasyon sürecinin; yani doku onarımı sürecinin henüz tamamlanmamış olduğu şeklinde yorumlandı. Süreç tamamlanmamakla birlikte sonuç morfolojik bulguya yansımaktaydı. “Ash+uMKH-Eks” grubunda VEGFR-1 ifadenmesinin “Ash+uMKH” grubuna göre daha az olması da vaskülarizasyon sürecinin tümüyle tamamlandığını göstermekteydi. Bu bulgular ışığında eksozom uygulaması doku düzeyinde Asherman sendromunun hasarını daha kısa sürede onarmıştır.





5. TARTIŞMA

İntrauterin adezyon tanımı ilk olarak 1894'te Heinrich Fritsch tarafından postpartum küretaj sonrası sekonder amenoreli hastalarda yapılmıştır. 50 yıl boyunca çok sayıda vaka raporlanmıştır; 1948'de ise Joseph Asherman İUA ilişkili belirtileri ve sıklığını ilk defa rapor etmiştir. Daha sonra 'Asherman Sendromu' terimi İUA vakalarını tanımlamak için kullanılmaya başlanmıştır. Asherman sendromu, uterin kavitede adezyon formasyonu ile karakterize bir durumdur. Bu hastalığa sahip kadınlar, sıklıkla infertilite, menstrüel düzensizlikler ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile mücadele etmektedir [1-4]. Asherman sendromu teşhisinde histeroskopi yöntemi altın standart olarak kullanılmakla birlikte; transvajinal ultrasonografi, histerosalpingografi ya da salin infüzyon sonohisterografi yöntemleri gibi metodlar da kullanılmaktadır [3, 5]. Tanısal doğruluğu henüz kesin olmamakla birlikte intrauterin yapışıklıkları tespit etmek için ayrıca manyetik rezonans (MR) görüntüleme yöntemi de kullanılabilmektedir [10].

Asherman sendromu tedavisi ve yardımcı yöntemleri günümüzde çeşitlilik kazanmıştır. Histerotomi, açık cerrahi işlem uygulanarak uterus duvarının açılması prensibine dayalı yöntemdir. Ancak günümüzde histeroskopik yaklaşım büyük risklerinden dolayı tercih edilmemektedir. Bu yaklaşım ayrıca çok karmaşık bir olguda uygulanabilmektedir [6, 9]. Bugüne kadar terapotik yaklaşımlardan en fazla kullanılan diğer bir yöntem de dilatasyon ve küretaj işlemi olmuştur. Ancak körlemesine yapılan bu işlemin doğruluk oranı çok düşüktür ve rahim perforasyon riskini yükselten bir tedavi seçeneğidir [8]. Bu yöntemlerin yerine histeroskopi tekniklerinin kullanılması günümüzde kabul görmektedir. Histeroskopi, intrauterin adezyon tanısını doğrulamasının yanısıra tedavi olanağı da sağlamaktadır. Histeroskopi sırasında adezyon formasyonun tekrarlanması, uterin perforasyon, hemoraji ve enfeksiyon gibi birçok komplikasyon izlenebilmektedir [8, 13, 14]. Asherman sendromu her geçen gün artan sezaryen ve endometrial cerrahi işlemler ile görülme sıklığı artan bir sorun haline gelmiştir. Bu nedenlerle yeni tedavi olanakları araştırılmaktadır.

Asherman sendrom modelini sıvı fenol musilaj uygulaması ile oluşturan bir grup araştırmacı, histomorfolojik olarak dokuyu incelediklerinde, H&E boyama ile uterus lümeninin oldukça dar olduğunu ve abnormal morfolojik yapı sergilediğini göstermişlerdir. Ayrıca masson boyaması yaparak endometriumda yüksek seviyelerde mavi boyanmanın olduğunu; dolayısıyla fibrozisin geliştiği göstermişlerdir [113].

Bizim çalışmamızda da, uterin travma uygulaması ile oluşturulan Asherman sendromu modelindeki rat uterus dokularında H&E boyama ile artan fibrosis, uterus bez sayısında azalma ile birlikte uterus lümeninde darlıklar ve yer yer tıkanıklıklar gözlemlendi.

Kong ve arkadaşları 2017 yılında diöstrus evresindeki endometriumu kazıma yöntemi ile intauterin adezyon modeli oluşturdukları bir rat çalışmasında tedavi için ince bağırsak submukozası (SIS) hücrelerinin uzaklaştırılması ile elde edilen bir çok biyolojik faktör içeren ekstraselüler matriksini kullanmışlardır. Çalışma sonunda histomorfolojik değerlendirmeler ile İUA ve SIS grubu kıyaslandığında endometrium kalınlığının SIS tedavi grubunda arttığı; ancak endometrial bez sayısı iki grupta da benzer olduğu gözlemlenmiştir. Masson boyaması ile fibrotik alanlar değerlendirildiğinde ise tedavi grubunda bu değerin İUA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca gebelik çıktıları değerlendirildiğinde de tedavi grubunda implantasyon %100 oranında sağlanmasına ek olarak fetüs sayıları kıyaslandığında anlamlı olarak artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak bu çalışmada SIS uygulamasının epitelyal hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu sağladığı, fibrozisi de inhibe ederek İUA bulgularını geri çevirdiği vurgulanmıştır [114].

Kuramoto ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, rat oral mukozal dokudan elde ederek oluşturdukları oral mukozal epitelyal hücre tabakasını uterus endometriumunu kazımak suretiyle oluşturdukları İUA modelli rat uteruslarını transplante etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, transplantasyondan sonra İUA modelinde görünen uterus lümeni darlığının ve tıkanıklığının olmadığı tomografi görüntülenmesi ile gösterilmiştir. Histomorfolojik olarak da proliferasyon ile endometrial epitelin ve fonksiyonel tabakanın tekrar oluştuğu, transplantasyonun 1. ve 2. Günlerinde nötrofilik infiltrasyonun tedavi grubunda anlamlı şekilde azaldığı belirtilmiştir [115].

Araştırmacıların Asherman sendromunu uterus dokusunda mekanik hasar yaratarak fare modelinde oluşturduklarını endometrial fibrozisi göstererek kanıtladıkları 2016 yılında yayınladıkları bir çalışmada, yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asit uygulaması ile tedaviye yanıt verdiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, fibrotik bulgular masson trikrom boyaması ile gösterilmiş; fibrotik belirteçlerden TGFβ1, bağ doku büyüme faktörü (CTGF), kollagen I ve III immunohistokimyasal ve western blot yöntemi ile de

desteklemişlerdir. Sonuçlarında her bir parametre için yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asit uygulanan grupta fibrozisin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir [116].

Cervello ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışma ile farelerde oluşturdukları Asherman sendrom modelinde fibrozis değerlendirilmiş. Çalışmada masson trikrom boyama ile Asherman grubunda kollagen ve glikozaminoglikan birikiminin belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir [117].

Kilic ve arkadaşları 2014 yılında çalışmalarında uterus boynuzlarına trikloroasetik asit enjeksiyonu ile deneysel olarak Asherman rat modeli oluşturdukları çalışmalarında, ajan enjeksiyonundan 2 hafta sonra uteruslarda ışık mikroskopik yöntemler ile intrauterin sineşiyi gözlemlemişlerdir. Asherman grubunda fibrozis değerlerinin çok yüksek olduğu; vasküler proliferasyonun ve VEGF ekspresyonunun çok düşük olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Asherman grubunda uterus dokusundaki proliferasyondan sorumlu belirteçleri olan PCNA ve Ki-67 ifadelenmesinin de düşük seviyelerde olduğu immunohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir [118].

Çalışmamızda Asherman grubu uterusları masson trikrom boyaması ile değerlendirildiğinde fibrozis alanları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi ($p<0,001$). Asherman gruplarında fibrozis immunohistokimyasal yöntemle incelendiğinde de, MMP-2 tutulumu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterirken; TIMP-2 tutulumu kontrol grubuna göre yüksekti. Bu bulgular ile oluşturduğumuz Asherman rat modelinin fibrotik bir yapı sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca literatürdeki diğer çalışmalarla da uyumlu olarak, proliferatif belirteç olan PCNA ve angiogenez belirteci olan VEGFR-1 ekspresyonları Asherman gruplarına ait uterus dokularında önemli derecede azalma gösterdi.

Kök hücreler farklanmadıkları için belirli bir dokuya ait özelliklere sahip değildir. Bu hücreler aldıkları sinyallere göre farklı fonksiyonlardaki hücrelere dönüşebilirler. Bu sayede hasarlı dokuya transplante edildiğinde dokuyu işlevsel hale getirebilirler [64, 65]. Mezenkimal kök hücreler yetişkin, fetus ve yenidoğana ait çeşitli doku ve organlardan elde edilebilmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin antijenik aktiviteleri düşüktür. T ve B lenfosit, doğal öldürücü hücre aktivasyonunu baskılayıp; dendritik hücrelerin antijen sunma özelliklerini azaltırlar. Bu özellikleri ile anti-inflamatuar ve anti-apoptotik mediatör

salınımına yol açarak immun modölatör özellik gösterirler [16, 17]. Mezenkimal kök hücrelerin birçok farklı doku hücresine dönüşebilmesi, hasarlı dokuya migrasyonları, göç ettikleri hasarlı bölgedeki hücrelerle füzyona girmeleri gibi birçok özellik bu hücreleri ayrıcalıklı kılmaktadır. Ayrıca çok çeşitli faktör ve kemokinler salgılayarak doku tamirine destek olmaları, non-immunojenik özellikte olmaları ve anjiyojenik, antiapoptotik, antiinflamatuvar etki göstermeleri hücresel tedaviler içinde mezenkimal kök hücrelerin öne çıkmasını sağlamaktadır [18, 19].

Fetal ya da yenidoğan doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler erişkin kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden daha etkin olarak tanımlanmaktadır. Hiposimmünojenik özellikleri de bu hücreleri geleceğin klinik uygulamalarında güçlü birer hücre tedavi aracı olarak öne çıkarmaktadır [71].

Endometrial mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için endometrial rejenerasyon çalışmalarıyla endometrial stem / progenitor hücreler endometriumun hem fonksiyonel hem de bazal tabakalarında yer aldığı gösterilmiştir [54, 93, 94].

Tan ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, ciddi Asherman bulguları olan 7 infertil kadına otolog olarak menstrual kan kaynaklı stromal hücreleri (2×10^6 hücre/ml) transplante ederek tedaviyi planlamışlardır. Transplantasyondan önce çok ince olan endometrium kalınlıkları; transplantasyondan sonra 5 hastada 7-8mm'ye kadar artan endometrium kalınlıklarını belirlemişlerdir. Bu artışın da embriyo implantasyonu için gerekli seviye olduğunu bildirmişler. Bu hastaların 1 tanesi transplantasyondan 3,5 ay sonra kendiliğinden gebe kalmıştır. Diğer hastaların 2 tanesinde de embriyo transferi sonrasında başarılı gebelik gözlenmiştir [119].

Alawadhi ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada uterin travma ile oluşturdukları Asherman sendromlu fare modelinde kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre uygulamasının etkinliğini incelemişlerdir. Çalışmada 1×10^7 kök hücreyi intravenöz yolla uygulamışlar ve transplantasyondan 3 ay sonra uterus dokuları incenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, Asherman grubunda %40-80 gibi çok yüksek seviyelerde olan fibrozis gösterilmiş ve kök hücre uygulaması ile fibrozisin azaldığını histomorfolojik olarak belirtmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca gebelik çıktıları da değerlendirilmiştir.

Asherman grubunda gebelik oranı %30 seviyelerinde iken; kök hücre transplante edilen grupta %90'a ulaşan gebelik oranı saptanmıştır [120].

Bir grup çalışmacı tarafından 2016 yılında yapılan pilot kohort çalışması ile Asherman sendromlu hastalara otolog CD133+ kemik iliği kaynaklı kök hücre uygulaması değerlendirilmiştir. 16 hasta ile çalışma sonuçlandırılmıştır. Bu hastalara yaklaşık 124 milyon hücre transplante etmişler ve transplantasyondan sonra 2. ve 6. aylarda endometrial kalınlıkları değerlendirildiğinde başlangıçta 4.2 mm civarında olan kalınlıklar 6.7 mm ye kadar arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca CD31 belirteci ile neoanjiogenik etki immunohistokimyasal yolla değerlendirildiğinde, özellikle transplantasyondan 3 ay sonra kan damarı sayısının arttığını ve anjiyogenezin sağlandığını vurgulamışlardır [121].

Singh ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları Asherman sendromlu hasta içeren prospektif vaka seri çalışmalarında, otolog olarak kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin uterin kaviteye transplante edilmesi sonucu endometrial rejenerasyon değerlendirilmiş ve eksojen oral östrojen tedavisi ile birlikte 3., 6. ve 9. aylarda endometrial kalınlık ölçümü yapılmıştır. Başlangıçta 1.38 mm civarı kalınlığı olan endometrium; 3., 6. ve 9. aylarda sırası ile 4.05; 5.46 ve 5.48 mm kalınlığına ulaştığı belirtilmiştir. Otolog kök hücre uygulaması implantasyon için gerekli olan endometrial rejenerasyonu sağladığı 6 hastadan 5 tanesinde gösterilmiştir [122].

Kilic ve arkadaşları 2014 yılında deneysel olarak Asherman rat modeli oluşturdukları çalışmalarında adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulaması ile tedaviyi amaçlamışlardır. Çalışmada 2×10^6 mezenkimal kök hücre intrauterin ve intraperitoneal yolla transplante edilmiş ve 8 hafta sonra dokular inceleme için alınmıştır. Yalın mezenkimal kök hücre tedavisi uygulanan grupta ve mezenkimal kök hücre ile östrojenin birlikte kullanıldığı tedavi grubunda Asherman grubuna göre fibrozisin önemli derecede azaldığı; VEGF, PCNA ve Ki-67 ekspresyonunun artış gösterdiği belirtilmiştir. Ek olarak tedavi grupları arasında mezenkimal kök hücre ile östrojenin birlikte kullanıldığı tedavi grubundaki olumlu etkilerin daha fazla olduğunu vurgulamışlardır [118].

Cervello ve arkadaşları Asherman sendromlu fare modeline intrauterin ve intravenöz yolla insan CD133+ kemik iliği kökenli kök hücre uygulaması ile dokuda proliferasyonu değerlendirmişlerdir. Değerlendirmeler ile, intrauterin transplantasyon sonrası dokudaki

Ki-67 ekspresyonu tedavi öncesindeki %14 seviyesinin %23 seviyelerine kadar çıktığı; intravenöz transplantasyondan sonra ise %7 seviyelerinden %20 seviyelerinde kadar ulaştığı gösterilmiştir [117].

Çalışmamızda uterus kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulaması yapılan Asherman sendromlu grupta endometrial epitelin daha yüksek boylu olduğu ve Asherman görünümünün ortadan kalktığı; endometrium fonksiyonals tabakasının Asherman grubuna göre daha fazla sayıda bez içerdiği gözlemlendi. Ayrıca uMKH uygulanan grupta fibrozis alanları Asherman grubuna göre azalma gösterdi. Fibrozis ayrıca fibrotik ve antifibrotik belirteçler ile immunohistokimyasal yolla değerlendirildiğinde de, uMKH uygulanan grupta MMP-2 ekspresyonunun Asherman grubuna göre artış gösterdiği ve TIMP-2 ekspresyonunun ise azaldığı bulundu. uMKH uygulaması ile angiyojenez VEGFR-1 ekspresyonu ile analiz edildiğinde bu belirtecin ifadenmesinin Asherman grubuna göre artış gösterdiği; proliferasyon ise PCNA ekspresyonu ile gösterildiğinde bu belirtecin ifadenmesinin de Asherman grubuna göre arttığı bulunmuştur.

Kök hücre tedavisi günümüzde başarı ile sonuçlanan tedavi yöntemi olarak öne çıkmaktadır. Bu başarının büyük bir kısmı kök hücrelerin parakrin etkileri ile gerçekleştiğini gösteren birçok çalışmada bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin parakrin etkilerinin aslında hücreden dışına salınan ekstraselüler veziküller tarafından sağlandığı anlaşılmıştır. Ekstraselüler veziküller hücreler arası iletişimde oldukça önemlidir. Ekstraselüler veziküllerin çoğu aslında 40-100 nm çapındaki eksozomlardır. Eksozomların içerikleri olan mRNA, miRNA ve diğer proteinler ile hedef hücreler etkilenir. Eksozomlar kan, amniyotik sıvı, idrar gibi birçok vücut sıvılarından elde edilebildikleri gibi; hücre kültürü mediumlarından da elde edilmektedir [20-23, 97-99].

Mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların terapötik etkileri üzerine odaklanan çok fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle karaciğer, böbrek ve kalp gibi organlarda hasar oluşturularak sonuçta fibrotik yapı sergileyen modellerde gerçekleştirilmiştir [99, 123].

Li ve arkadaşları 2012 yılında yayınladıkları ve karbon tetraklorid uygulaması ile karaciğer fibrozu oluşturdıkları fare modeli çalışmalarında umbilikal kord kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde ettikleri 250 µg miktardaki eksozomları direkt olarak karaciğere

transplante etmişlerdir. Transplantasyondan 3 hafta sonra tedavisiz gruplara göre kök hücre eksozomları uygulanan grupta fibrozisin anlamlı derecede azaldığını serum TGF β 1 seviyesini ölçerek göstermişlerdir. Aynı şekilde kollagen I ve III seviyelerinin de anlamlı şekilde azaldığını göstererek eksozomların antifibrotik etkilerini ortaya koymuşlardır [109].

Kronik böbrek hastalığı üzerine çalışan bir grup araştırmacı 2011 yılındaki çalışmalarında ratlarda oluşturdukları iskemi-reperfüzyon hasarından sonra mezenkimal kök hücrelerden elde edilen mikrovezikül uygulaması yapmışlardır. Akut böbrek hasarlı ratlara intravenöz yolla 30 μ g ekstraselüler vezikül transplante edilmiştir. Sonuçlarında apoptotik tübüler hücrelerinin sayısının azaldığını ve tübüler hücre proliferasyonunun arttığını göstermişlerdir [124].

Ratlarda akut miyokardiyal enfarktüs modeli çalışan Bian ve arkadaşları 2014 yılındaki çalışmalarında 2×10^6 mezenkimal kök hücrelerden elde ettikleri ekstraselüler vezikülleri (80 μ g) intramiyokardiyal yolla transplante etmişlerdir. Bu çalışma ile dokudaki enfarktüs alanlarının azaldığını ve proliferasyonun arttığını belirtmişlerdir [125]. Ayrıca birçok çalışma ile eksozom transplantasyonu sonucu kardiyovasküler hastalıklarda angiyojenezin artış gösterdiği belirtilmiştir [126, 127].

Biz de çalışmamızda geniş çaplı literature araştırmamızdan sonra 25 μ g/100 μ l doz olarak belirlediğimiz eksozomları intrauterin olarak transplante ettik.

Timmers ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı kardiyak iskemi-reperfüzyon domuz modelini içeren çalışmada mezenkimal kök hücre medium uygulamasının miyokardiyal infarktüs boyutunun oldukça yüksek oranda azaldığı gösterilmiştir [107]. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada mezenkimal kök hücre medium uygulamasının miyokardiyal infarktüs boyutunu %40 oranda azalttığını gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır [108].

Kök hücrelerin parakrin etkilerini göstermek adına, mezenkimal kök hücre kültürlerinden elde edilen kültür mediumlarının kardiyomiyositlere uygulandığı çalışmada Bcl-2/Bax oranının arttığı; caspase-3 aktivasyonunun ve sitokrom c salınımının azaldığı; dolayısıyla apoptozun inhibe olduğu gösterilmiştir [128].

İnsan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin etkilerini akut böbrek hasarı olan hayvan modelinde inceleyen bir çalışmada, tübüler hücrelerdeki proliferasyonun arttığını ve hem morfolojik hem de fonksiyonel açıdan iyileşmelerin gözlemlendiği belirtilmektedir [129].

Farelerde kronik böbrek hasar modelleri ile yapılan çalışmalarda, mezenkimal kök hücrelerin ve bu hücrelerin ekstraselüler veziküllerinin etkileri karşılaştırılmıştır. He ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı bu çalışmada her iki tedavi grubunda da fibrozisin ve tübüler atrofinin azaldığı gösterilmiştir [130].

Ankersmit ve arkadaşları kan mononükleer hücrelerini apoptoza uğratarak ekstraselüler veziküllerin açığa çıkmasını sağlayarak elde ettikleri mediumları akut miyokardial infarktüsli fareler üzerinde denedikleri çalışmada MMP-9, VEGF ve interlökin (IL)-8 ekspresyonlarında artış olduğunu göstermişlerdir [131].

Mezenkimal kök hücre mediumlarının angiogenezi tetiklediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bian ve arkadaşları 2014 yılındaki çalışmalarında mezenkimal kök hücrelerden elde ettikleri ekstraselüler veziküllerin hem invivoda hem de invitroda neoangiogenezi arttırdığını, insan umbilikal veni endotel hücre göçünü ve tüp formasyonunu teşvik ettiğini göstermişlerdir [125].

Bizim çalışmamızda uterus kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden elde edildikten eksozomların uygulandığı Asherman grubunda Asherman görünümünün ortadan kalktığı; endometrial epitelin kontrol grubundaki şekline benzer olarak yüksek prizmatik şekilli olduğu; endometrium fonksiyonalisteki ve endometrium bazalisteki bezlerin yapısının ise diöstrus evresindeki yapıya benzer olduğu gözlemlendi. Dokudaki fibrozis değerlendirildiğinde ise, eksozom uygulanan grupta fibrotik alan oranı Asherman grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi. Fibrotik belirteçler olan MMP-2 ve TIMP-2 ekspresyonu değerlendirildiğinde ise, eksozom uygulanan grupta MMP-2 değerlerinin Asherman grubuna göre anlamlı olarak arttığı; TIMP-2 değerlerinin ise Asherman grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulundu. Angiogenetik bir belirteç olan VEGFR-1 ekspresyonunun ve proliferasyon belirteci olan PCNA ekspresyonunun eksozom uygulaması ile dokuda artışı saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asherman sendromu ülkemizde sezaryen doğum ve endometrial cerrahi işlemler ile görülme sıklığı artan bir sorun haline gelmiştir. Bu nedenle çalışmanın literatüre sağlayacağı katkı önemlidir. Çünkü Asherman sendromunda kök hücre transplantasyonu ile ilgili çalışmalar yakın zamanda literatürde yer almış olsa da oluşan fibrozis ile ilgili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle Asherman sendromunun neden olduğu fibrozis sonucu oluşan infertilitede fibrozisin önlenmesini sağlayacak yeni yaklaşımlar Asherman kaynaklı infertilitede gebelik oranlarının arttırılmasında önemli bir bakış açısı sağlayacaktır.





KAYNAKLAR

1. Fritsch, H. (1894). Ein fall von volligem schwund der gebormutterhohle nach auskratzung. *Zentralbl Gynaekol*, 18, 1337-1342.
2. Asherman, J.G. (1948). Amenorrhoea traumatica (atretica). *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 55, 23-30.
3. Myers, E.M., and Hurst, B.S. (2012). Comprehensive management of severe Asherman syndrome and amenorrhea. *Fertility and Sterility*, 97, 160-164.
4. Asherman, J.G. (1950). Traumatic intra-uterine adhesions. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 57, 892-896.
5. İnternet: International Asherman's Association. What is Asherman's Syndrome. IAA URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.ashermans.org&date=2018-01-17>, Son Erişim Tarihi: 17.01.2018.
6. Wallach, E.E., Schenker, J.G., and Margalioth, E.J. (1982). Intrauterine adhesions: an updated appraisal. *Fertility and Sterility*, 37, 593-610.
7. Friedler, S., Margalioth, E.J., Kafka, I., and Yaffe, H. (1993). Incidence of post-abortion intra-uterine adhesions evaluated by hysteroscopy-a prospective study. *Human Reproduction*, 8, 442-444.
8. Conforti, A., Alviggi, C., Mollo, A., De Placido, G., and Magos, A. (2013). The management of Asherman syndrome: a review of literature. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 118.
9. Yu, D., Wong, Y.M., Cheong, Y., Xia, E., and Li, T.C. (2008). Asherman syndrome-one century later. *Fertility and Sterility*, 89, 759-779.
10. Deans, R. and Abbott, J. (2010). Review of intrauterine adhesions. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*, 17, 555-569.
11. Salma, U., Xue, M., Sayed, A.S., and Xu, D. (2014). Efficacy of intrauterine device in the treatment of intrauterine adhesions. *BioMed Research International*, 2014:589296.
12. Homer, H.A., Li, T.C., and Cooke, I.D. (2000). The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertility and Sterility*, 73, 1-14.
13. İnternet: Gordon, A. G. Complications of hysteroscopy. *GFMER*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.gfmer.ch%2FBooks%2FEndoscopy%2Fbook%2FCh24%2FComplications%2Fhyster.html&date=2018-01-17>, Son Erişim Tarihi: 17.01.2018.
14. Yang, J.H., Chen, C.D., Chen, S.U., Yang, Y.S., and Chen, M.J. (2016). The influence of the location and extent of intrauterine adhesions on recurrence after hysteroscopic adhesiolysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 123, 618-623.

15. Yasmin, H. and Adeghe, J. (2004). Severe early-onset intrauterine growth restriction (IUGR) in a woman with Asherman's syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 24, 312-314.
16. Can, A. (2014). *Kök Hücre Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları*. Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevi, 363-410.
17. Uçkan Çetinkaya, D. (2009). Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları*, Ankara, 53-62.
18. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317.
19. Kim, N. and Cho, S.G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 28, 387.
20. Yu, B., Zhang, X., and Li, X. (2014). Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 4142-4157.
21. Yeo, R.W.Y., Lai, R.C., Tan, K.H., and Lim, S.K. (2013). Exosome: a novel and safer therapeutic refinement of mesenchymal stem cell. *Exosomes and Microvesicles*, 1, 7.
22. Bang, C. and hum, T. (2012). Exosomes: new players in cell-cell communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44, 2060-2064.
23. Raposo, G. and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200, 373-383.
24. Peate, I. and Nair, M. (2014). *Hemşirelik öğrencileri için anatomi ve fizyolojinin temelleri*. (Çev. T.V. Peker ve D. Erbaş. Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2016'da yayımlandı), 494-495.
25. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2011). *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* (Sixth edition). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 848-852.
26. Sadler, T. (2011). *Medikal Embriyoloji*. (Çev. A. Başaklar). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2009'da yayımlandı), 246-254.
27. Deutscher, E. and Yao, H.H.C. (2007). Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Müllerian duct morphogenesis. *Developmental biology*, 307, 227-236.
28. Moore, K. ve Persaud, T. (2002). *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. (Çev. M. Yıldırım, İ OKAR ve H. Dalçık). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. (Eserin orijinali 1998'de yayımlandı), 323-331.
29. Hatipoğlu, T. ve Hatipoğlu, G. (2006). *Yüksekokullar anatomi ders kitabı*. Ankara: Selvi Yayınevi, 211-215.
30. Eşrefoğlu, M. (2016). *Özel Histoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 313-317.

31. İnternet: Charlotte, L. Female reproductive system: Uterus. *OSU College of Veterinary Medicine*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Finstruction.cvhs.okstate.edu%2FHistology%2FHistologyReference%2FHRFemaleRSframe.htm&date=2018-01-18>, Son Erişim Tarihi: 18.01.2018.
32. Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*. (Çev. R. Demir). Ankara: Palme Yayıncılık. (Eserin orijinali 2002’de yayımlandı), 578-580.
33. Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2009). *Temel Histoloji Text & Atlas*. (Çev. S. Solakoğlu ve Y. Aytekin). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. (Eserin orijinali 2005’te yayımlandı), 435-451.
34. İnternet: Singhal, R. Adhesiolysis-ashermans syndrome. *Singhal Urology and Gynaecology Centre*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.drSinghals.com%2FAdhesiolysis-ashermans-syndrome%2F&date=2018-01-17>, Son Erişim Tarihi: 17.01.2018.
35. Hooker, A.B., Lemmers, M., Thurkow, A.L., Heymans, M.W., Opmeer, B.C., Brölmann, H.A., Mol, B.W., and Huirne, J.A. (2013). Systematic review and meta-analysis of intrauterine adhesions after miscarriage: prevalence, risk factors and long-term reproductive outcome. *Human Reproduction Update*, 20, 262-278.
36. Ventolini, G., Zhang, M., and Gruber, J. (2004). Hysteroscopy in the evaluation of patients with recurrent pregnancy loss: a cohort study in a primary care population. *Surgical endoscopy*, 18, 1782-1784.
37. Jones, W.E. (1964). Traumatic intrauterine adhesions: a report of 8 cases with emphasis on therapy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 89, 304-313.
38. Schenker, J.G. (1996). Etiology of and therapeutic approach to synechia uteri. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 65, 109-113.
39. Wang, X., Li, Z., A. Y., and Zou, S. (2011). Hysteroscopy for early abortion after IVF-ET: clinical analysis of 84 cases. *National journal of andrology*, 17, 52-54.
40. Taskin, O., Sadik, S., Onoglu, A., Gokdeniz, R., Erturan, E., Burak, F., and Wheeler, J.M. (2000). Role of endometrial suppression on the frequency of intrauterine adhesions after resectoscopic surgery. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*, 7, 351-354.
41. Letterie, G.S. and Haggerty, M.F. (1994). Magnetic resonance imaging of intrauterine synechiae. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 37, 66-68.
42. Confino, E., Friberg, J., Giglia, R.V., and Gleicher, N. (1985). Sonographic imaging of intrauterine adhesions. *Obstetrics & Gynecology*, 66, 596-598.
43. Soares, S.R., Barbosa dos Reis, M.M., and Camargos, A.F. (2000). Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases. *Fertility and Sterility*, 73, 406-411.

44. Adhesions, A. (1988). The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, Mullerian anomalies and intrauterine adhesions. *Fertility and Sterility*, 49, 944-55.
45. Valle, R.F. and Sciarra, J.J. (1988). Intrauterine adhesions: hysteroscopic diagnosis, classification, treatment, and reproductive outcome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 158, 1459-1470.
46. Evans-Hoeker, E.A. and Young, S.L. (2014). Endometrial receptivity and intrauterine adhesive disease. *Seminars in Reproductive Medicine*, 32:392-401.
47. Tao, Z. and Duan, H. (2012). Expression of adhesion-related cytokines in the uterine fluid after transcervical resection of adhesion. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 47, 734-737.
48. Gargett, C. (2006). Uterine stem cells: what is the evidence? *Human Reproduction Update*, 13, 87-101.
49. Kaitu'u-Lino, T.U.J., Morison, N.B., and Salamonsen, L.A. (2007). Estrogen is not essential for full endometrial restoration after breakdown: lessons from a mouse model. *Endocrinology*, 148, 5105-5111.
50. Salamonsen, L.A. (2003). Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction*, 125, 301-311.
51. March, C.M. (1995). Intrauterine adhesions. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 22, 491-505.
52. Al-Inany, H. (2001). Intrauterine adhesions. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 80, 986-993.
53. Gargett, C.E. and Masuda, H. (2010). Adult stem cells in the endometrium. *Molecular Human Reproduction*, 16, 818-834.
54. Gargett, C.E. and Ye, L. (2012). Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertility and Sterility*, 98, 11-20.
55. Yaffe, H., Ron, M., and Polishuk, W. (1978). Amenorrhea, hypomenorrhea, and uterine fibrosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 130, 599-601.
56. Amer, M.I., and Abd-El- Maeboud, K.H. (2006). Amnion graft following hysteroscopic lysis of intrauterine adhesions. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 32, 559-566.
57. Acunzo, G., Guida, M., Pellicano, M., Tommaselli, G.A., Di Spiezio Sardo, A., Bifulco, G., Cirillo, D., Taylor, A., and Nappi, C. (2003). Effectiveness of auto-cross-linked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic adhesiolysis: a prospective, randomized, controlled study. *Human Reproduction*, 18, 1918-1921.

58. Kaya, C., Sever, N., Cengiz, H., Yıldız, S., Ekin, M., and Yasar, L. (2014). A randomized controlled study of the efficacy of misoprostol and hyaluronic acid in preventing adhesion formation after gynecological surgery: a rat uterine horn model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 176, 44-49.
59. Farhi, J., Bar-Hava, I., Homburg, R., Dicker, D., and Ben-Rafael, Z. (1993). Induced regeneration of endometrium following curettage for abortion: a comparative study. *Human Reproduction*, 8, 1143-1144.
60. Tu, C.H., Yang, X.L., Qin, X.Y., Cai, L.P., and Zhang, P. (2013). Management of intrauterine adhesions: a novel intrauterine device. *Medical Hypotheses*, 81, 394-396.
61. Chen, Y., Chang, Y., and Yao, S. (2013). Role of angiogenesis in endometrial repair of patients with severe intrauterine adhesion. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6, 1343.
62. Katsumoto, K., Shiraki, N., Miki, R., and Kume, S. (2010). Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation. *Development, Growth & Differentiation*, 52, 115-129.
63. Nandoe Tewarie, R.S., Hurtado, A., Bartels, R.H., Grotenhuis, A., and Oudega, M. (2009). Stem cell-based therapies for spinal cord injury. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 32, 105-114.
64. Hipp, J. and Atala, A. (2008). Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Reviews*, 4, 3-11.
65. Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C.M., and Hu, W.S. (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 12-27.
66. Wilson, A. and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6, 93-106.
67. Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., and Hartman, T.E. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine*, 10, 64-71.
68. Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M., Venter, D., Pain, S., and Gilshenan, K. (2008). Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17, 1095-1108.
69. Trounson, A. (2006). The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocrine Reviews*, 27, 208-219.
70. Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A., and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 11307-11312.
71. Ishii, T. and Eto, K. (2014). Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future. *World Journal of Stem Cells*, 6, 404.

72. Ural, A. (2006). Kök hücreler. *TOTBİD Dergisi*, 5, 140-145.
73. İnternet: Bethesda, MD. In Stem Cell Information. *National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fstemcells.nih.gov%2Finfo%2Fbasics%2F4.htm&date=2017-11-19>, Son erişim tarihi: 19.11.2017.
74. Murphy, M.J., Wilson, A., and Trumpp, A. (2005). More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends in Cell Biology*, 15, 128-137.
75. Civin, C.I., Strauss, L.C., Fackler, M.J., Trischmann, T.M., Wiley, J.M., and Loken, M.R. (1990). Positive stem cell selection-basic science. *Progress in Clinical and Biological Research*, 333, 387-402.
76. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., and Blackstad, M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418, 41-49.
77. Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nüsse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423, 409-414.
78. Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S.J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105, 369-377.
79. Ateş, U. (2016). Kök hücreyi tanıyalım. *FNG&Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 1, 19-28.
80. Ünal, Ş. ve Uçkan Çetinkaya, D. (2008). Mezenkimal Kök Hücrelerin Pediatrik Klinik Uygulama Alanları. *Türkiye Klinikleri Journal of Hematology Special Topics*, 1, 57-61.
81. Uccelli, A. Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8, 726-736.
82. Ghannam, S., Bouffi, C., Djouad, F., Jorgensen, C., and Noël, D. (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research & Therapy*, 1, 2.
83. Okay, E., Simsek, T., Subasi, C., Gunes, A., Duruksu, G., Gurbuz, Y., Gacar, G., and Karaoz, E. (2015). Cross effects of resveratrol and mesenchymal stem cells on liver regeneration and homing in partially hepatectomized rats. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11, 322-331.
84. Weil, B.R., Markel, T.A., Herrmann, J.L., Abarbanell, A.M., and Meldrum, D.R. (2009). Mesenchymal stem cells enhance the viability and proliferation of human fetal intestinal epithelial cells following hypoxic injury via paracrine mechanisms. *Surgery*, 146, 190-197.

85. Gu, C., Huang, S., Gao, D., Wu, Y., Li, J., Ma, K., Wu, X., and Fu, X. (2014). Angiogenic effect of mesenchymal stem cells as a therapeutic target for enhancing diabetic wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 13, 88-93.
86. Haynesworth, S.E., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 α . *Journal of Cellular Physiology*, 166, 585-592.
87. Lai, R.C., Chen, T.S., and Lim, S.K. (2011). Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regenerative Medicine*, 6, 481-492.
88. Yalvaç, M. (2011). *İnsan üçüncü molar diş jerm kök hücrelerinin yara iyileştirici, anjiyogenik ve nöroprotektif etkilerinin araştırılması*, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 24.
89. Liu, Y., Wang, S., and Shi, S. (2012). The role of recipient T cells in mesenchymal stem cell-based tissue regeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44, 2044-2050.
90. Mafi, P., Hindocha, S., Mafi, R., Griffin, M., and Khan, W. (2011). Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization-a systematic review of the literature. *The Open Orthopaedics Journal*, 5, 253-260.
91. Davis, N.E., Hamilton, D., and Fontaine, M.J. (2012). Harnessing the immunomodulatory and tissue repair properties of mesenchymal stem cells to restore β cell function. *Current Diabetes Reports*, 12, 612-622.
92. Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levinsky, L., Samuel, S., Marx, G., and Gorodetsky, R. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, 37, 967-976.
93. Schwab, K. and Gargett, C. (2007). Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction*, 22, 2903-2911.
94. Masuda, H., Matsuzaki, Y., Hiratsu, E., Ono, M., Nagashima, T., Kajitani, T., Arase, T., Oda, H., Uchida, H., and Asada, H. (2010). Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PloS One*, 5, e10387.
95. Deane, J.A., Gualano, R.C., and Gargett, C.E. (2013). Regenerating endometrium from stem/progenitor cells: is it abnormal in endometriosis, Asherman's syndrome and infertility? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 25, 193-200.
96. Rajaraman, G., White, J., Tan, K.S., Ulrich, D., Rosamilia, A., Werkmeister, J., and Gargett, C.E. (2012). Optimization and scale-up culture of human endometrial multipotent mesenchymal stromal cells: potential for clinical application. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19, 80-92.
97. Thery, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biology Reports*, 3, 15.

98. De Jong, O.G., Van Balkom, B.W., Schiffelers, R.M., Bouten, C.V., and Verhaar, M.C. (2014). Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine. *Frontiers in Immunology*, 5,608.
99. Rani, S., Ryan, A.E., Griffin, M.D., and Ritter, T. (2015). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Molecular Therapy*, 23, 812-823.
100. Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., and Silvente-Poirot, S. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, 51, 2105-2120.
101. Edgar, J.R. (2016). Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biology*, 14, 46.
102. Sokolova, V., Ludwig, A.K., Hornung, S., Rotan, O., Horn, P.A., Epple, M., and Giebel, B. (2011). Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87, 146-150.
103. Lai, R.C., Tan, S.S., Teh, B.J., Sze, S.K., Arslan, F., De Kleijn, D.P., Choo, A., and Lim, S.K. (2012). Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *International Journal of Proteomics*, 2012:971907.
104. Reis, L.A., Borges, F.T., Simões, M.J., Borges, A.A., Sinigaglia-Coimbra, R., and Schor, N. (2012). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats. *PloS One*, 7, e44092.
105. Xin, H., Li, Y., Buller, B., Katakowski, M., Zhang, Y., Wang, X., Shang, X., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2012). Exosome-mediated transfer of miR- 133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells*, 30, 1556-1564.
106. Zhao, Y., Sun, X., Cao, W., Ma, J., Sun, L., Qian, H., Zhu, W., and Xu, W. (2015). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells relieve acute myocardial ischemic injury. *Stem Cells International*, 2015,761643.
107. Timmers, L., Lim, S.K., Arslan, F., Armstrong, J.S., Hoefer, I.E., Doevendans, P.A., Piek, J.J., El Oakley, R.M., Choo, A., and Lee, C.N. (2008). Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research*, 1, 129-137.
108. Lai, R.C., Arslan, F., Lee, M.M., Sze, N.S.K., Choo, A., Chen, T.S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C.N., and El Oakley, R.M. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4, 214-222.
109. Li, T., Yan, Y., Wang, B., Qian, H., Zhang, X., Shen, L., Wang, M., Zhou, Y., Zhu, W., and Li, W. (2012). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate liver fibrosis. *Stem Cells and Development*, 22, 845-854.

110. Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., and Perez-Fernandez, R. (2017). Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1852.
111. Tennant, J.R. (1964). Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation*, 2, 685-694.
112. Lin, C.S., Xin, Z.C., Wang, Z., Deng, C., Huang, Y.C., Lin, G., and Lue, T.F. (2012). Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction: A Critical Review. *Stem Cells and Development*, 21, 343-351.
113. Wang, X., Ma, N., Sun, Q., Huang, C., Liu, Y., and Luo, X. (2017). Elevated NF- κ B signaling in Asherman syndrome patients and animal models. *Oncotarget*, 8, 15399.
114. Kong, D., Zhang, L., Xu, X., Zhang, J., Li, Y. and Huang, X. (Baskida). Small Intestine Submucosa Is a Potential Material for Intrauterine Adhesions Treatment in a Rat Model. *Gynecologic and Obstetric Investigation*.
115. Kuramoto, G., Takagi, S., Ishitani, K., Shimizu, T., Okano, T., and Matsui, H. (2014). Preventive effect of oral mucosal epithelial cell sheets on intrauterine adhesions. *Human Reproduction*, 30, 406-416.
116. Zhu, Y., Hu, J., Yu, T., Ren, Y., and Hu, L. (2016). High molecular weight hyaluronic acid inhibits fibrosis of endometrium. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 3438.
117. Cervelló, I., Gil-Sanchis, C., Santamaría, X., Cabanillas, S., Díaz, A., Faus, A., Pellicer, A., and Simón, C. (2015). Human CD133+ bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertility and Sterility*, 104, 1552-1560.
118. Kilic, S., Yuksel, B., Pinarli, F., Albayrak, A., Boztok, B., and Delibasi, T. (2014). Effect of stem cell application on Asherman syndrome, an experimental rat model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31, 975-982.
119. Tan, J., Li, P., Wang, Q., Li, Y., Li, X., Zhao, D., Xu, X., and Kong, L. (2016). Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome. *Human Reproduction*, 31, 2723-2729.
120. Alawadhi, F., Du, H., Cakmak, H., and Taylor, H.S. (2014). Bone Marrow-Derived Stem Cell (BMDSC) transplantation improves fertility in a murine model of Asherman's syndrome. *PloS One*, 9, e96662.
121. Santamaria, X., Cabanillas, S., Cervello, I., Arbona, C., Raga, F., Ferro, J., Palmero, J., Remohí, J. Pellicer, A., and Simón, C. (2016). Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Human Reproduction*, 31, 1087-1096.
122. Singh, N., Mohanty, S., Seth, T., Shankar, M., Bhaskaran, S., and Dharmendra, S. (2014). Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: A novel cell based therapy. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7, 93.

123. Lou, G., Chen, Z., Zheng, M., and Liu, Y. (2017). Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, 49, e346.
124. Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., and Camussi, G. (2011). Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia–reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26, 1474-1483.
125. Bian, S., Zhang, L., Duan, L., Wang, X., Min, Y., and Yu, H. (2014). Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *Journal of Molecular Medicine*, 92, 387-397.
126. Salomon, C., Ryan, J., Sobrevia, L., Kobayashi, M., Ashman, K., Mitchell, M., and Rice, G.E. (2013). Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. *PloS One*, 8, e68451.
127. Sluijter, J.P., Verhage, V., Deddens, J.C., Van Den Akker, F., and Doevendans, P.A. (2014). Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovascular Research*, 102, 302-311.
128. Xiang, M.X., He, A.N., Wang, J.A., and Gui, C. (2009). Protective paracrine effect of mesenchymal stem cells on cardiomyocytes. *Journal of Zhejiang University Science B*, 10, 619-624.
129. Bruno, S., Grange, C., Collino, F., Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Biancone, L., Tetta, C., and Camussi, G. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PloS One*, 7, e33115.
130. He, J., Wang, Y., Sun, S., Yu, M., Wang, C., Pei, X., Zhu, B., Wu, J., and Zhao, W. (2012). Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model. *Nephrology*, 17, 493-500.
131. Ankersmit, H., Hoetzenecker, K., Dietl, W., Soleiman, A., Horvat, R., Wolfsberger, M., Gerner, C., Hacker, S., Mildner, M. and Moser, B. (2009). Irradiated cultured apoptotic peripheral blood mononuclear cells regenerate infarcted myocardium. *European Journal of Clinical Investigation*, 39, 445-456.



EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 17/11/2016-E.138627



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Candan ÖZOĞUL, Gülistan Sanem SARIBAŞ, Sevtap HAMDEMİR KILIÇ, Ferda ALPASLAN PINARLI ve Hüseyin Erdinç BEŞİKÇİOĞLU'ndan oluşan, G.Ü.ET-16.069 kod numaralı ve "*Asherman Sendromu'na Uterus Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Eksozomlarının Etkileri*" adlı" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-16.069 and entitled "*Effects of Uterus Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Exosomes on Asherman's Syndrome*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 09/05/2017-E.67721



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 17.11.2016 tarih ve E.138627 sayılı yazımız ile onay alan, araştırmacı grubu Candan ÖZOĞUL, Gülistan Sanem SARIBAŞ, Sevtap HAMDEMİR KILIÇ, Ferda ALPARSLAN PINARLI ve Hüseyin Erdinç BEŞİKCİOĞLU'ndan oluşan G.Ü.ET-16.069 kod numaralı ve "*Asherman Sendromu'na Uterus Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin ve Eksozomlarının Etkileri*" başlıklı araştırma önerisi ile ilgili alınan 08.03.2017 tarihli dilekçe konusu Başkanlığımız tarafından incelenmiş olup,

Araştırmacı grubundan Sevtap HAMDEMİR KILIÇ ve Hüseyin Erdinç BEŞİKCİOĞLU'nun ayrılması ile ilgili talebin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası


 18-28 Nisan 2011
IX. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Sanem ARIK

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi
 Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve
 Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından,
 18-28 Nisan 2011 tarihleri arasında düzenlenen
"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu IX"a katılarak,
 Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve
 bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.


Prof. Dr. Rıza AYHAN
 Rektör


Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
 Etik Kurul Başkanı


Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
 Merkez Müdürü

Sertifika No. 2011/09-29

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SARIBAŞ, Gülistan Sanem
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 23.09.1986 / ANKARA
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05058187332
 e-mail : sanemarik@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üni. Tıp Fakültesi/Histoloji ve Emb.	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üni. Tıp Fakültesi/Histoloji ve Emb.	2012
Lisans	Ankara Üni. Fen Fakültesi/Biyoloji	2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017- devam ediyor	Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fak.	Araş. Gör.
2013- 2017	Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens.	Araş. Gör. (35. Madde)

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- T. A. Özkan, N. Karakoyunlu, R. Polat, G. S. Saribas, N. C. Sener, S. Özdemir, K. Peker, D. Ünal & C. Tuygun, An Evaluation Of The Protective Effect Of Esomeprazole In An Experimental Model Of Renal Ischemia-Reperfusion, International Urology And Nephrology, 2018, 0301-1623, 50, 2, 217-223.
- T. Ugurlu, C. Özogul, G. S. Saribas, S. G. Gürgen, S. N. Akyol & B. Kartal, The Effect Of Antioxidants On Angiogenesis In Uterine Transplantation, Journal Of Obstetrics And Gynaecology, 2018, 1364-6893, 1, 1, 1-6.

- G. S. Saribas, D. Erdogan, G. Goktas, S. N. Akyol, I. M. Hirfanoglu, S. G. Gorgen, N. Coskun & C. Ozogul, Examining The Protective Effects Of Acetyl Lcarnitine On Cisplatin-Induced Uterine Tube Toxicity, Journal Of Obstetrics And Gynaecology, 2016, 0144-3615, 36, 8, 1086-1092.
- B. Uslu, M. Özekinci, M. Sakinci, S. Tunik, G. Özdoğan, N. Coskun, G. S. Saribas, N. E. Ordueri, M. A. Osalu, N. Turan & Y. Senol, Knowledge And Perception About Oocyte Donation In A Semirural Region Of Turkey, Clinical And Experimental Health Sciences, 2015, 2459-1459, 6, 3, 102-106.
- Kelle, I. Kelle, H. Akkoc, H. Akkoc, E. Uyar, E. Uyar, M. Erdinc, M. Erdinc, O. Evliyaoglu, O. Evliyaoglu, S. Saribas, S. Saribas, S. Tunik, S. Tunik, C. Ozogul & C. Ozogul, The Combined Effect Of Rosuvastatin And Ischemic Pre- Or Post-Conditioning On Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury In Rat Heart, European Review For Medical And Pharmacological Sciences, 2015, 1128-3602, 19, 13, 2468-2476.
- N. Coskun, N. Coskun, M. T. Hatipoglu, M. T. Hatipoglu, C. Ozogul, C. Ozogul, C. Korkmaz, C. Korkmaz, S. N. Akyol, S. N. Akyol, S. C. Micili, S. C. Micili, G. S. Arik, G. S. Arik, D. Erdogan & D. Erdogan, The Protective Effects Of Acetyl L-Carnitine On Testis Gonadotoxicity Induced By Cisplatin In Rats, Balkan Medical Journal, 2013, 2146-3123, 30, 2, 235-241.

Bildiriler

- S. Berk Ergun, G. S. Saribas, S. Yarayici, Z. Elmazoglu, A. Çardak, C. Özogul, Ç. Karasu & Ö. E. Kemer, Kronik Blefaritli Hastalarda Blefar-Ex Plus Jelinin Etkinlik Ve Güvenirliginin Degerlendirilmesi, Sözlü Sunum, Tod 55. Ulusal Kongresi, 24 Ekim 2017, 29 Ekim 2017.
- M. Öktem, G. Isik, N. Bozkurt, I. Güler, E. Ö. Öktem, C. Özogul, G. S. Saribas, A. Erdem & M. Erdem, The Impact Of Granulocyte Colony Stimulating Factor On Thin Endometrium Of An Animal Model With Rats, Sözlü Sunum, European Society Of Human Reproduction And Embryology, 02 Temmuz 2017, 05 Temmuz 2017.
- C. Özogul, I. B. Demircan, S. Barun, M. Kavutçu, M. N. Ilhan, S. N. Akyol, I. M. Hirfanoglu, M. Bilge, G. S. Saribas, P. Kaçamak & A. A. Emniyet, Immunohistochemical Study Of Osteopontin And Bcl-2 Gene Expression In Kidney Tissue In Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (Htk) Solution Prepared With Nacetyl- L-Carnitine, Poster Sunumu, Proceedings Of The 15th International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry, 18 Mayıs 2017, 21 Mayıs 2017.
- T. Ugurlu, C. Özogul, G. S. Saribas, S. G. Gürgen, S. N. Akyol & B. Kartal, The Effect Of Antioxidants To Angiogenesis On Uterine Transplantation, Sözlü Sunum, Proceedings Of The 15th International Congress Of Histochemistry And Cytochemistry, 18 Mayıs 2017, 21 Mayıs 2017.
- N. Karakoyunlu, R. Polat, G. S. Saribas, N. C. Sener, S. Özdemir, K. Peker, D. Ünal & C. Tuygun, Deneyisel Renal Iskemi Reperfüzyon Modelinde Esomeprasol Un Koruyucu Etkinliginin Degerlendirilmesi, Sözlü Sunum, 3. Ulusal Ürolojik Cerrahi Kongresi, 02 Kasım 2016, 06 Kasım 2016.

- H. E. Besikcioglu, G. S. Saribas, C. Özogul, M. Tiryaki, S. H. Kiliç, F. Alpaslan Pinarli, Ö. Gülbahar & T. Delibasi, Determination Of The Effects On Follicular Maturation Of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells And Ovarian Stromal Stem Cells On Cyclophosphamide Induced Ovarian Failure, Poster Sunumu, 2nd International Congress On Stem Cell And Cellular Therapies, 15 Ekim 2015, 15 Ekim 2015, 151 - 151.
- S. Seyhan, C. Özogul, D. Erdogan, G. Göktas, S. N. Akyol, S. G. Gürgen, I. M. Hirfanoglu, G. S. Saribas & N. Coskun, Cisplatinin Uterusta Olusturdugu Gonadotoksik Etkiye Acetyl L-Carnitininkoruyucu Etkisi, Poster Sunumu, 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28 Mayıs 2013, 28 Mayıs 2013, 138 - 138.
- Baser, C. Özogul, S. N. Akyol, M. N. Ilhan, M. Kavutçu, S. Barun, M. Bilge, N. Coskun, G. S. Saribas & I. M. Hirfanoglu, Histidin-Triptofan-Ketoglutarat (Htk) Çözeltilisine Eklenen N-Asetil-Lkarnitin'in Donör Uterustaki Koruyucu Etkilerinin Arastırılması, Poster Sunumu, 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28 Mayıs 2013, 28 Mayıs 2013, 139 - 139.
- G. S. Saribas, C. Özogul, D. Erdogan, G. Göktas, S. N. Akyol, I. M. Hirfanoglu & S. G. Gürgen, Cisplatin Gonadotoksitesinde Acetyl L-Carnitin'in Tuba Uterinadaki Koruyucu Etkilerinin Incelenmesi, Poster Sunumu, XI. National Histology And Embryology Congress, 16 Mayıs 2012, 16 Mayıs 2012, 3, 119 - 120.
- S. N. Akyol, C. Özogul, G. S. Saribas, N. Coskun, I. Baser, M. Kavutçu & M. Bilge, Organ Transplantasyon Solüsyonu Histidin-Triptofan-Ketoglutarat (Htk)'A Eklenen Acetyl L-Carnitin'in Böbrek Dokusundaki Koruyucu Etkileri, Poster Sunumu, XI. National Histology And Embryology Congress, 16 Mayıs 2012, 16 Mayıs 2012, 3, 267 - 267.
- N. Coskun, T. Hatipoglu, C. Özogul, C. Korkmaz, S. N. Akyol, S. C. Micili, G. S. Saribas & D. Erdogan, Deneysel Cisplatin Gonadotoksitesinde Acetyl Lcarnitin'in Sperm Morfolojisi Üzerine Etkilerinin Incelenmesi, Sözlü Sunum, 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 25 Ekim 2011, 25 Ekim 2011, 98 - 99.

Projeler

- Kurumsal (Bap V.B.), Arastirmaci, Ace Inhibitörlerinin Radyoterapi Sonrası Implant Çevresindeki Kapsüler Degisiklikler Üzerine Etkisi, Yürütülen Kurulus: Gazi Üniversitesi, Destek Alınan Kurulus: Gazi Bap (Yurt İçi) (Devam Ediyor)
- Kurumsal (Bap V.B.), Arastirmaci, Asherman Sendromu'na Uterus Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Ve Eksozomlarının Etkileri, Yürütülen Kurulus: Gazi Üniversitesi, Destek Alınan Kurulus: Gazi Bap (Yurt İçi) (Devam Ediyor)
- Kurumsal (Bap V.B.), Arastirmaci, Ince Endometrium Tedavisinde Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör Kullanımının Deney Hayvanları Üzerindeki Etkileri, Yürütülen Kurulus: Gazi Üniversitesi, Destek Alınan Kurulus: Gazi Bap (Yurt İçi), 01 Subat 2016 - 01 Mart 2017.
- Bap, Arastirmaci, Antioksidanların Uterus Transplantasyonunda Anjiyogenezde Etkileri, Yürütülen Kurulus: Gazi Üniversitesi, Destek Alınan Kurulus: Gazi Bap (Yurt İçi), 01 Mart 2014 - 01 Aralık 2016.

- Bap, Arastirmaci, Cyclophosphamide Ile Indüklenmis Ovaryum Hasarında Kemik İligi Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Ve Ovaryan Stromal Kök Hücrelerin Folikül Maturasyonundaki Etkilerinin Belirlenmesi, Yürütülen Kurulus: Gazi Üniversitesi, Destek Alınan Kurulus: Gazi Bap (Yurt İçi), 01 Mart 2015 - 01 Ağustos 2015.
- Bap, Arastirmaci, Deneysel Cisplatin Gonadotoksitesinde Asetil L-Carnitin'in Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi, Yürütülen Kurulus: Gazi Üniversitesi, Destek Alınan Kurulus: Gazi Bap (Yurt İçi), 01 Haziran 2010 - 01 Ağustos 2012.

Ödüller

- Üniversite, Kurum Veya Kurulusların Verdigi Ödüller, Ulusal, Yayın Ödülü, Yayın Ödülü, Ödül Alınan Kurum: Gazi Üniversitesi, Türkiye, 2017.
- Üniversite, Kurum Veya Kurulusların Verdigi Ödüller, Ulusal, Yayın Ödülü, Yayın Ödülü, Ödül Alınan Kurum: Gazi Üniversitesi, Türkiye, 2016.
- Üniversite, Kurum Veya Kurulusların Verdigi Ödüller, Uluslararası, Special Jury Award, Determination Of The Effects On Follicular Maturation Of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells And Ovarian Stromal Stem Cells On Cyclophosphamide Induced Ovarian Failure, Ödül Alınan Kurum: Stem Cell And Cellular Therapies Society, Türkiye, Ekim 2015.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..