



**T.C.
UFUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**MESANE DİSFONKSİYONLU DİYABETİK
RAT MODELLERİNDE KÖK HÜCRE
TEDAVİSİ**

**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

Dr. Mehmet Salih BOĞA

**ANKARA
2014**



**T.C.
UFUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**MESANE DİSFONKSİYONLU DİYABETİK
RAT MODELLERİNDE KÖK HÜCRE
TEDAVİSİ**

Dr. Mehmet Salih BOĞA

**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

TEZ DANIŞMANLARI

**Prof. Dr. Orhan GÖĞÜŞ
Doç. Dr. Ahmet Hakan HALİLOĞLU**

**ANKARA
2014**

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimleriyle yetişmemde büyük emeği geçen, bize sürekli yol gösteren, iyilik, sabır ve hoşgörüsüyle hoca katılığından ziyade baba şefkatiyle asistanlığımın her aşamasında desteğini hep yanımda hissettiğim, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, emeğini asla ödeyemeyeceğim, anabilim dalı başkanımız ve saygıdeğer tez hocam Prof. Dr. Orhan GÖĞÜŞ'e;

İhtisas sürem boyunca bilgi ve deneyimleri ile bize yol gösteren; yenilikçi yaklaşımıyla geleceğe dair bize ışık tutan, bilimsel açıdan gelişmemde emeği geçen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Sadettin KÜPELİ'ye;

Asistanlığımın ilk gününden itibaren cesaret verici ve sıcak bir çalışma ortamı sağlayan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, eğitimim boyunca bana destek olan; hem ağabeylik hem hocalık yaparak manevi desteğini sürekli yanımda hissettiğim ağabeyim ve saygıdeğer tez hocam Doç. Dr. Ahmet Hakan HALİLOĞLU'na;

İhtisas sürem boyunca gösterdikleri abilik, dostluk ve yardımlarından dolayı Yrd. Doç.Dr. Ömer GÜLPINAR'a, Yrd. Doç. Dr. Semih TANGAL'a asistan arkadaşlarım Op.Dr. Erhan DEMİRELLİ, Op. Dr. Giray SÖNMEZ ve Dr. Kutsal ÖNAL'a, diğer kliniklerdeki asistan arkadaşlarıma; klinik-poliklinik hemşire ve personeline;

Tezimin deneysel aşamalarını gerçekleştirdiğim, bana kapılarını açan Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Laboratuvarı Hocalarına ve çalışanlarına;

Hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim, fedakar anne, babama ve sevgili kardeşlerime;

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Finally, thank you very much to dear Prof. U.E. Studer, Prof. G.N Thalmann, PD Dr.P. Zehnder and their colleagues from Bern University, Switzerland for their hospitality and to share their experience with me.

Dr. Mehmet Salih BOĞA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ÖNSÖZ	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
Sayfa No:.....	viii
TABLOLAR DİZİNİ	x
Sayfa No:.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. MESANE EMBRİYOLOJİSİ	4
2.1.1 Ürogenital Sinüs Formasyonu	4
2.1.2. Mesane ve Kontinans Mekanizmasının Gelişimi.....	6
2.2. MESANE ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ	7
2.3. MESANE FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	14
2.3.1. Mesane Disfonksiyonlarının Fonksiyonel Değerlendirilmesinde Ürodinaminin Uygulanabilirliği.....	14
2.3.2. Ürodinamik Çalışmanın Komponentleri	15
2.3.2.1. Dolum (Depolama) Fazı.....	15
2.3.2.2. İşeme (Boşaltım) Fazı	16
2.3.2.3. Basınç-Akım Çalışması (PFS).....	19
2.4. Mesane Disfonksiyonu ve Sınıflandırılması	21
2.5. DİYABETİK MESANE DİSFONKSİYONU	23
2.6. MESANE DİSFONKSİYONU TEDAVİSİ	26
2.7. KÖK HÜCRE	28
2.7.1. Tarihçe	28

2.7.2. Tanımlar.....	29
2.7.3. Kök Hücre Tipleri ve Kaynakları.....	34
2.7.3.1. Embriyonik Kök Hücreler (Embryonic Stem Cells- ESCs).....	35
2.7.3.2. Amniyotik Mayi ve Plental Kaynaklı Kök Hücreler (Amniotic Fluid and Placenta Derived Stem Cells- AFPS).....	37
2.7.3.3. Erişkin Kök Hücreler (Adult Stem Cells- ASCs).....	38
2.7.3.3.1. Hematopoetik Kök Hücreler (Hemopoietic Stem Cells-HSCs).....	40
2.7.3.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler.....	41
2.8. ÜRİNER SİSTEM REJENERASYONU VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	48
2.9. KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN ÜROLOJİK HASTALIKLARDA KULLANIMI.....	49
2.9.1. Erektıl Disfonksiyon Tedavisinde Kök Hücre Uygulamaları.....	50
2.9.2. Böbrek Hastalıklarında Kök Hücre Uygulamaları.....	51
2.9.3. Üriner İnkontinans Tedavisinde Kök Hücre Uygulamaları.....	53
3. MATERYAL VE METODLAR.....	56
3.1. ÇALIŞMA DİZAYNI VE DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	56
3.2. YENİDOĞAN MESANESİNDEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLME METODU	58
3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Adiposit Farklılaşma Metodu.....	60
3.2.2. Mezenkimal Kök Hücre Osteosit Farklılaşma Metodu	60
3.2.3. Mezenkimal Kök Hücre Kondrosit Farklılaşma Metodu.....	61
3.3. SİSTOSTOMİ KATATER İMPLANTASYONU.....	62

3.4. BASINÇ-AKIM ÇALIŞMASI (ÜRODİNAMİ)'NİN UYGULANMASI.....	63
3.4. BULGULARIN DEĞERLENDİRİLME YÖNTEMLERİ	64
3.4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü.....	64
3.4.2. Histopatolojik Örneklerin Değerlendirilmesi	64
3.4.3. İşeme Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi	65
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. METABOLİK VE BİYOKİMYASAL BULGULARIN KARŞILAŞTIRILMASI.....	66
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR VE KARŞILAŞTIRILMASI.....	67
4.3. İŞEME FONKSİYONU BULGULARI VE KARŞILAŞTIRILMASI	69
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ	89
7. ÖZET	90
8. ABSTRACT.....	92
9. KAYNAKLAR	94

KISALTMALAR

DMD	: Diyabetik Mesane Disfonksiyonu
DM	: Diyabetes Mellitus
ESC	: Embriyonik Kök Hücre (Embryonic Stem Cell)
MSC	: Mezenkimal Kök Hücre (Mesenchymal Stem Cell)
AFPS	: Amniotic Fluid and Placenta Derived Stem Cells (Fetal ve Yenidoğan Amniyotik Mayi ve Plesental Kaynaklı Kök Hücreler)
MAPC	: Multipotent Erişkin Progenitör Hücre (Multipotent Adult Progenitor Cell)
OS	: Oksidatif Stres
nMSC-B	: Yenidoğan Mesane Mezenkimal Kök Hücre (Neonatal Mesenchymal Stem Cell of Bladder)
PMC	: Pontin İşeme Merkezi (Pontin Micturation Center)
PAG	: Periaquaduktal Gray
GABA	: γ -Aminobutirik Asit
CYP	: Embryonic Stem Cells- ESCs
HSC	: Hematopoetik Kök Hücreler (Hemopoietic Stem Cell)
ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri (Reactive Oxygen Species)
PBS	: Fosfatlanmış Serum Fizyolojik (Phosphate Buffered Saline)
IP	: Periton Yoluyla (Intra Peritoneal)
AAM	: Aşırı Aktif Mesane
UAB	: Underactive Bladder
ICM	: Hücre İçi Kitle (Inner Cell Mass)
IVF	: In Vitro Fertilisation
MDSC	: Kas Kaynaklı Kök Hücreleri (Muscle Derived Stem Cell)

ADSC	: Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre (Adipose Derived Stem Cell)
CFU-F	: Koloni Oluşturan Birim-Fibroblast (Colony Forming Unit Fibroblast)
SUI	: Stres Üriner İnkontinans
GluC	: Kan Glukozu
Cr	: Kreatinin
TG	: Triglyceride
BUN	: Kan Üre Azotu (Blood Urea Nitrogen) () ve
HDL	: High Density Lipoprotein
LDL/VLDL	: Low/Very Low Density Lipoprotein
MVP	: Maksimum İşeme Basıncı (Maximum Voiding Pressure)
MI	: İşeme Aralığı (Micturition Inteval)
UV	: İşenen Hacim (Urine Volüm)
RV	: Rezidü İdrar (Residuel Volum)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	(A) İnsan embriyonik gelişiminin bilaminar yapı şeklinde ki erken dönemleri ve (B) Yolksac'ın terminal kısmının genişlemesi ve kloakanın oluşumu	4
Şekil 2.2.	Ürogenital sinüsün gelişimi.....	5
Şekil 2.3.	Mesane anatomisi.....	8
Şekil 2.4.	Mesane ve üretral yapılar	9
Şekil 2.5.	Mesane ve üretranın sfinkter mekanizması	10
Şekil 2.6.	Mesanenin otonomik ve somatik innervasyonu	14
Şekil 2.7.	Değişik işeme patern örnekleri.....	18
Şekil 2.8.	Ürodinamik Çalışmanın Komponentleri ve Şematik Gösterimi.....	20
Şekil 2.9.	Normal ve Mesane Disfonksiyonlu İşeme Paternleri;.....	23
Şekil 2.10.	Değişik paternli basınç-akım çalışması.	25
Şekil 2.11.	Kök hücreye komşu çekirdek hücrelerin varlığına bağlı olarak tanımlanan niş tipleri	30
Şekil 2.12.	Kök hücrelerin gelişim hiyerarşisi ve insan Mezenkimal Kök Hücrelerinin (MKH) tedavi potansiyelleri	32
Şekil 2.13.	Embriyonik Kök Hücre Elde Edilmesi ve Farklılaşmasının Şematize Edilişi.....	36
Şekil 2.14.	Doğum Sonrası Dokulardan Elde Edilebilecek Pluropoten Kök Hücrelerin Şematik Gösterimi.....	39
Şekil 2.15.	Kemik İliği İçerisinde Hemapoetik kök hücreleri ve Niş Hücresel Komponentlerinin Şematik Gösterimi.....	41
Şekil 2.16.	Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yaş ile Ters Orantılı Olarak Azalması.....	43
Şekil 2.17.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Temel Özelliklerinin Şematik Gösterimi	45
Şekil 3.1.	(A), Mesanenin ekpoze edilişi ve (B), mesane duvarına PBS ve kök hücre tedavisinin uygulanışı	58

Şekil 3.2.	Kök hücrelerin (A), negatif (CD 11 a/b, CD 45R) markırlara göre (B), pozitif (CD49R, CD90) markırlara göre flow sitometri de okutulması	59
Şekil 3.3.	Adiposit farklılaşmanın oil red boyama ile (A),10X4 büyütmede (B) 10X40 büyütmede gösterimi	60
Şekil 3.4.	Osteosit farklılaşmanın vonn kossa boyama ile (A), 10x 4 büyütmede (B) 10X40 büyütmede gösterimi.	61
Şekil 3.5.	Kondrosit farklılaşmanın alcian blue boyama ile (A)10X4 büyütmede (B), 10x40 büyütmede gösterimi	61
Şekil 3.6.	Sistostomi kataterinin takılması ve ciltaltından ratın boynuna tünelize edilmesi.....	63
Şekil 3.7.	Rat ürodinamisinin yapılış şekli	64
Şekil 4.1.	Grupların Vücut ve Mesane Ağırlıklarının Şematik Karşılaştırılması.....	66
Şekil 4.2.	Grupların Ortalama Plazma Glukoz Sonuçlarının Karşılaştırılması	67
Şekil 4.3.	Gruplar arasında total mesane duvar, düz kas tabaka ve fibrozis ölçümlerinin karşılaştırılması	67
Şekil 4.4.	H&E le boyanmış histopatolojik inceleme görüntüleri X100 büyütmede (A) NR + PBS görüntüsü, (B), DM + PBS görüntüsü (C) DM + IP görüntüsü, (B), DM + D görüntüsü.....	68
Şekil 4.5.	Grupların Ürodinami Görüntüleri.....	71
Şekil 4.6.	Gruplar arasında ortalama MVP değerlerinin ve ortalama işenen hacim ve post miksiyon rezidü oranlarının şematik gösterimi	72

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. Mesaneyi Boşaltmayı veya İşemeyi Kolaylaştıracak Tedaviler	27
Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri.....	46
Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri (Devamı)	47
Tablo 4.1. Gruplar arası biyokimyasal değerlerin tablo halinde gösterimi	66
Tablo 4.2. Ürodinamik çalışmayla elde edilen verilerin gruplar arasında tablo halinde gösterimi.....	70

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mesane disfonksiyonları mesanenin hem dolum hemde boşaltım semptomlarının bir arada olduğu komplike bir bozukluktur. Mesane disfonksiyonları ve buna bağlı semptomlar hastanın cinsiyeti, yaşı, mesane çıkım obstrüksiyonu, nörolojik ve kronik bir takım rahatsızlıklara bağlı olarak görülebilmektedir. Kronik hastalıklardan en fazla diyabet ile birlikteliği dikkat çekicidir.

Diyabetes mellitus, insülinin kısmi veya tam yokluğuna bağlı olarak ortaya çıkan, multiple komplikasyon ve bunlara bağlı morbiditelerle seyreden büyük ölçekli harcamalara neden olan dünyada yaygın görülen kronik süreçli bir hastalık olup her geçen gün diyabetli hasta sayısı artış göstermektedir. Diyabet komplikasyonları arasında üriner sistem komplikasyonları en sık görülen ve en fazla harcamalara neden olan komplikasyondur (1).

Yapılan çalışmalarda diyabet tanısı alan hastalarda, diyabete bağlı alt üriner sistem komplikasyonları oranı, diyabet komplikasyonları arasında nisbeten daha iyi tanımlanmış olan ve diyabet hastalarının %60'ından azında görülen diyabetik nöropati ve %50'sinden azında görülen diyabetik nefropatiden çok daha yüksek oranda olduğu ve bu oranın diyabetik hastaların %80'inden fazlasında görüldüğü ve bu alt üriner sistem komplikasyonlar arasında da en sık görülenin de Diyabetik Mesane Disfonksiyonu (DMD) olduğu bildirildi (2). Sık görülmesinin yanında her nekar hayatı tehdit etmesede diyabetin üriner sistem komplikasyonları arasında en can sıkıcı ve bilineni en az olan komlikasyon diyabetik mesane disfonksiyonudur (3).

DMD tedavisiyle ilgili son zamanlarda yapılan çalışma sayısında belirgin artış izlensede yol gösterici yayın sayısı oldukça az olup, tanı ve tedavi yöntemleri konusunda henüz tam bir fikir birliği sağlanabilmiş değildir. Kan şekeri düzeyinin kontrol altında tutulması ve semptomatik tedaviler mevcut tedavi seçenekleri olup hiçbirisi yüzgüldürücü değildir. Son zamanlarda hayvan modelleri üzerinde yapılan

hücre bazlı tedaviler, sonuçları itibariyle umut verici tedaviler arasında görülmekte (4, 5) ve çalışmalar bu tedavi yöntemleri üzerine yoğunlaşmış durumdadır.

Hücre bazlı tedavilerin temelini oluşturan kök hücre çalışmalarının başlangıcını kemik iliği nakilleri oluşturur. İlk kez 1963'de başlayan kemik iliği nakillerinden sonra 1981 yılında iki farklı araştırma grubunun fare embriyosundan Embriyonik Kök Hücre (ESC) elde etmesi ve bunu takip eden çalışmalarda 1998'de ilk insan embriyo kök hücre serilerine ulaşılması kök hücre çalışmalarının kilometre taşlarıdır (6-8).

Mezenkimal Kök Hücre (Mesenchymal Stem Cell-MSC)'ler kök hücre çeşitlerinden biri olup, birçok doku ve organdan kolaylıkla elde edilebilir olmaları, mezodermal dokular dışında diğer germ tabakalarına da farklılaşma gibi yüksek diferansiyasyon potansiyelleri, hızlı çoğalma ve dayanıklılıklarıyla gen tedavisi kullanımına uygun olmaları, füzyon yeteneklerinin olması, stromal kaynaklı oldukları için tüm doku hücrelerine destek hücre olarak fonksiyon ve gelişimlerinde katkıda bulunmaları, kemokinler, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile hücre ve /veya dokuda destek hücre olarak onarım yapabilme, immunojenitelerinin düşük olması ve immunsupresif etki göstermeleri nedeniyle doku uygunluğunun aranmaması ve bu özelliklerinin yanında MSC sayısının yaşla ters orantılı olarak değiştiğinin gösterilmesi, fetal MSC'lerin sadece sayısal açıdan değil erişkin kök hücrelerden doku gelişiminde, hücre bölünmesinde ve immunolojik antijen sunumunda rol oynayan genler açısından da önemli farklılıklar taşıdığıının gösterilmesiyle (9-11) MSC'ler çalışma modelimiz ve diğer mesane patolojilerinde umut verici tedavi seçeneği olarak görülmektedir.

Yukarda sayılan özelliklerinin yanında MSC'ler bugün özellikle immunoregulator özellikleri ve rejenerasyon kapasiteleri nedeniyle klinik kullanıma girmeleriyle Avrupa Birliği (AB) tıp ajansı tarafından İlaç Hücre (Cell Drug) kapsamına alınmıştır (12).

Kök hücre çeşitleri ve bu hücrelerin ürolojik patolojilerde kullanımları incelendiğinde otolog ve ESC uygulamalarının etik kaygıların yanında immunité ve malign hastalıklardaki kullanım kaygıları ve kısıtlılıkları bulunmaktadır. Tüm bunlar

göz önüne alındığında, çalışmamızda DMD tedavisinde şimdiye kadar tanımlanmamış olan yenidoğan rat mesanesinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerini (**Neonatal Mesenchymal Stem Cell of Bladder “nMSC-B”**) kullanmayı planladık.

Bu çalışmada; toplumda çok sık görülen ve hayat kalitesini belirgin şekilde olumsuz etkileyen, tanı ve tedavisinde de bir o kadar bilineni az olan DMD’unu ve tedavisinde de henüz dünya literatürlerinde dahi çok yeni olan kök hücre tedavisinin etkinliğini araştırmayı planladık.

Çalışmada herhangi bir nedenle doğum esnasında kaybedilen neonatal ratların mesanesinden MSC eldesi ve aynı organdan elde edilecek MSC’lerin transferinin, doku spesifik proliferasyon ve diferansiasyonunun daha başarılı olması ve MSC lerin allojenik kullanılabilir olmasıyla birlikte düşük immun reaksiyon göstermesi özelliklerinden dolayı elde edilen bu MSC’leri DMD’lu ratlara farklı yöntemlerle nakledilerek, etkinliklerini kontrol gruplarıyla karşılaştırmayı planladık.

MSC’lerin farklı yollarla transfer edilip etkinliklerini biyokimyasal, histopatolojik ve ürodinamik incelemelerde fonksiyonel olarak karşılaştırmayı planladık.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada hipotezlerimiz;

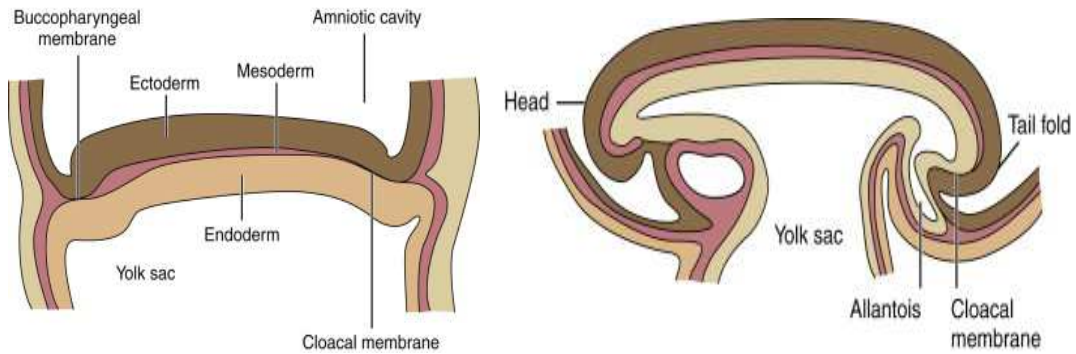
- 1- Diyabetin alt üriner sistem komplikasyonlarından olan DMD’unu oluşturulan diyabetik rat modellerinde göstermek.
- 2- Diyabetik rat modellerinde DMD geliştiğini rat ürodinamisiyle tesbit edilebilirliğini göstermek.
- 3- DMD’nda kök hücre tedavisinin etkinliğinin farklı uygulama yollarıyla gösterilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MESANE EMBRİYOLOJİSİ

2.1.1 Ürogenital Sinüs Formasyonu

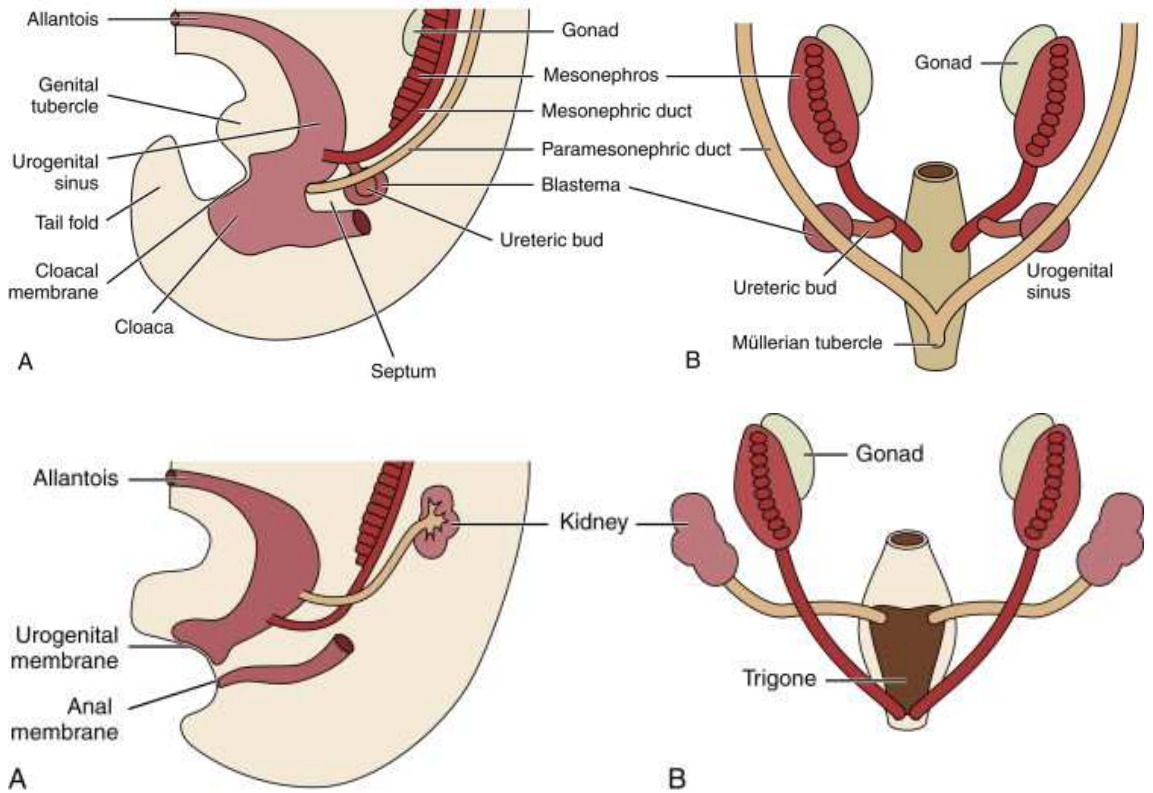
Gestasyonun 3. haftasında kloakal membran, endoderm ve ektodermi içeren bilaminar yapı şeklindedir. 4. hafta boyunca nöral tüp ve embriyonun kuyruk kısmı dorsal ve kaudal yönde büyüyerek kendini kloakal membranın üzerinde gösterir ve bunun diferensiyel büyümesi embriyonel kıvrım şeklinde sonlanır. Bilaminar şeklindeki embriyonik disk ektodermle çevrili olan amniyotik kaviteyi endodermle çevrili olan yolk sac'ı birbirinden ayırır. Primitif hücrelerin hızlı bir şekilde gelişmesiyle bu iki tabaka arasında üçüncü bir tabaka olarak mezoderm gelişir. Embriyonik yapı endodermi içine alan yolk sac tarafına doğru kıvrılmaya başlar ve ilerde burdan gastrointestinal sistem yapıları gelişir. Kloakal membran artık embriyonun ventraline doğru döner ve endoderm içerikli yolk sacın terminal kısmı genişler ve kloakaya dönüşür. Nefrik (wolfian) kanal 24. günde kloaka ile birleşir ve kloakal ayrılma süresince urogenital sinüsle birlikte kalır. Nefrik kanalın primitif ürogenital sinüse girişi kaudal urogenital sinüsten sefalik vesikouretral kanala doğru işaret görevi görür. Vesikouretral kanal mesane ve pelvik üretraya doğru büyüme gösterir, oysa kaudal ürogenital sinüs erkeklerde fallik üretra kadınlarda da distal vajinal giriş şeklinde gelişir (13) (Şekil 1. 1).



Şekil 2.1. (A) İnsan embriyonik gelişiminin bilaminar yapı şeklinde ki erken dönemleri ve (B) Yolksac'ın terminal kısmının genişlemesi ve kloakanın oluşumu

(Cuckow, Peter M. - Pediatric Urology, 1-10 © 2010 Copyright © 2010, 2001 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.).

6. haftada böbrekler gelişir ve posterior duvara bağlı şekilde mezonefrik kanalın son kısmı olarak üretrik tomurcuk, ürogenital sinüse yaklaşır. Veziköüretal kanalın genişlemesine paralel olarak anterior abdominal duvarda gelişir. 8. hafta boyunca böbrekler pelvisten mezonefrik kanal şeklinde yukarı doğru çıkar ve üreterik kısmı ürogenital sinüs ile bağlantılıdır. 8. haftada kloakanın iki lateral duvarı ve inen ürektal septumun midline füzyonuyla kloaka bölünerek anterior ürogenital sinüs ve posterior anorektal kanal ortaya çıkar. Bu aşama 6. ve 8. hafta boyunca gerçekleşir ve bu olay ürektal septumun kloakal membran ile birleşmesiyle sonuçlanır (13, 14), (Şekil 1.2).



Şekil 2.2. Ürogenital sinüsün gelişimi A, lateralden görünüm. B, posteriordan görünüm.

6. (üstteki şekil) ve 8. (alttaki şekil) haftalar arasında kloaka, anteriorda ürogenital sinüs ve posteriorda anorektal kanala bölünür. Ürogenital sinüsün superior kısmı mesane şeklinde allantois ile devam eder. Ürogenital sinüsün taban kısmı da pelvik üretra şeklinde daralır. Urogenital sinüsün genişleyen distal kısmında kadında vajinal girişi, erkekte de üretral meatusu oluşturur (Cuckow, Peter M. - Pediatric Urology, 1-10 © 2010 Copyright © 2010, 2001 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.).

Ancak yukarıda ki bilgilerin aksine bazı yayınlarda çalışmacılar ne inen septumun ne de kloakal duvarın lateral sırtının birleşmediğini belirttiler (15, 16).

Aynı şekilde ürorektal septumun kloakal membranla asla birleşmediğini savunan Nievelstein ve arkadaşları bu düşünceye dayanarak öncelerde hakim olan konjenital anorektal ve kloakal malformasyonların septum formasyonu ve kloakal membranın füzyonunda ki defekte bağlı olduğu düşüncesi yerine bu konjenital anomalilerin kloakal membranın gelişim bozukluğuna bağlı olduğunu belirttiler (17)

2.1.2. Mesane ve Kontinans Mekanizmasının Gelişimi

Gestasyonun 10. haftasında mesane silindir tüp şeklinde etrafı gevşek bağ dokularıyla sarılmış tek katlı küboidal hücrelerle kaplıdır. Apeks urakus şeklinde konik bir yapı alır, bu yapı allantois ile devam eder. 12. haftada urakus fibröz bir kord şeklini alarak median umbilikal ligamenti oluşturur. 7 ve 12. haftalarda mesane epiteli çift tabaka küboidal epitelyum içerir ve 13 ile 17. haftalarda matür ürotelyal karakteristiğini almaya başlar. 21. hafta da 4-5 hücre tabakası kalınlığında ve tam diferansiye ürotelyum özellikleriyle aynı yapısal özellikler gösterir. 7 ve 12. haftalarda çevre bağ dokuları yoğunlaşır ve düz kas lifleri görülmeye başlar, ilk başta mesane tavanında sonra mesane tabanına doğru ilerler. Kollojen lifler ilk olarak lamina propriada ve sonra derinlere kas liflerinin arasına doğru yayılır. Mesane kompliyansının gelişim boyunca değiştiği düşünülüyor. Fetal koyun mesanesi kullanılarak yapılan çalışmalarda erken gestasyonel dönemde mesane kompliyansı çok düşük iken gittikçe artar. Bu değişikliğin nedeni tam olarak bilinmesede hem düz kas tonüsü hem de bağ dokusu içeriğindeki değişikliklere bağlı olabileceği belirtilmiştir. Bu olayın insan mesanesinde de bu şekilde olduğu anlaşıldı.

Gestasyon süresince mesane duvar kalınlığı artarken rölatif olarakta kollojen bağ dokusu oranı azalmaktadır. Kalın kollojen liflerin ince kollajen liflere oranı azalırken elastik liflerin miktarı artmaktadır. Kompliyanstaki bu değişikliklerle fetal idrar üretiminin aynı zamana denk geliyor olması mekanik distansiyonla ilişkisinin olabileceğini gösteriyor. Fetal fare mesanesinin organ kültürü eksplantlarında mesane distansiyonu uygulananlarda, uygulanmayanlara oranla lamina propriadaki kollojen lif demeti gelişiminin daha fazla olduğunun gösterilmesi idrar birikmesiyle oluşan mekanik faktörlerin mesane gelişiminde rolünün olabileceğini gösterdi (13).

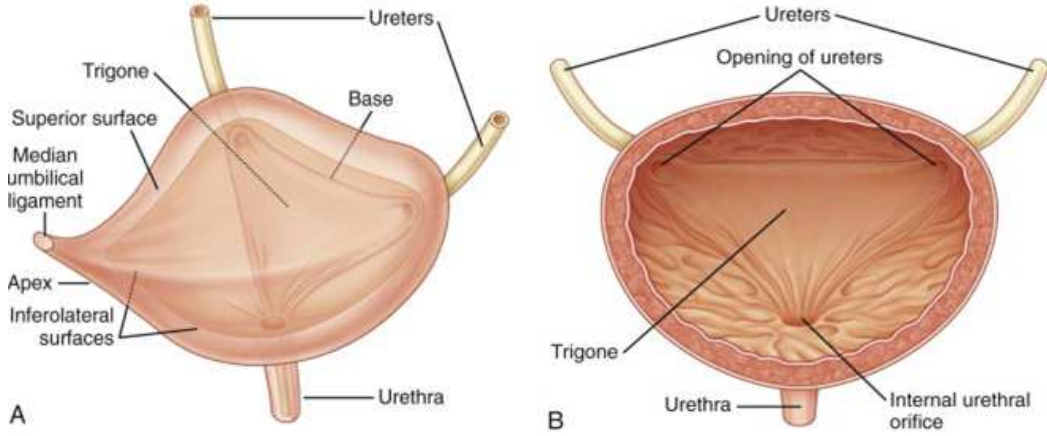
Diğer organ gelişimlerine benzer olarak mesane gelişimi içinde epitelyal-mezenkimal etkileşimin gerekli olduğu görülmektedir. Mesane düz kas diferansiyasyonu çalışmalarında undiferansiye fare mesane epitelyal ve mezenkimal kalıntıları mesane düz kas diferansiyasyonu olmadan ayrılarak atimik nude farelere nakledilmiş. Her ne kadar epitelyal hücrelerin olmayışı apoptozisin varlığı konusunda şüpheli olsada, epitelyal hücrelerin varlığında düz kas hücrelerinde mezenkimal hücrelerin diferansiye olduğu gösterilmiş (13).

Fetal kontinans mekanizmasını değerlendirmek için fonksiyonel bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla ilgili çalışmalar insan fetal örnekleri kullanılarak yapılan az miktardaki onkogenetik açıklamalardan ibarettir. Kloakanın bölünmesi ve kloakal membran yırtılmasından sonra ürogenital sinüsün kuyruk kısmının sonunda mezenkimal yoğunlaşma oluşur. Mezenkimal kas lifleri 15. hafta da açık bir şekilde görülebilir. Bu zamanda düz kas tabakası mesane boynu düzeyinde daha kalın hale gelir ve üretral kas tabakasının iç kısmını oluşturur. İçte düz kas lifleri dışta çizgili kas lifleri olacak şekilde üretra anteriorunda üretral sfinkteri oluşturur. Bu noktanın ilerisinde kadında vajina erkekte de prostatla bağlantılı olarak cinsiyet farklılıkları gelişir. Üretral sfinkterin kas lifleri üretranın posterior duvarına uzanır. Kadınlarda kas lifleri vajina yan duvarına yapışır ise de, erkekte prostat yan duvarına yansır (13, 14).

2.2. MESANE ANATOMİ VE FİZYOLOJİSİ

Normal bir istemli işeme, mesanenin dolum, depolama ve boşaltım fazlarını ilgilendiren fizyolojik bir olaydır. Böbrekler kardiyak outputun yaklaşık %25 ini alırlar ve günlük olarak 180L kanı filtre ederler ve filtrasyon sonucunda da yaklaşık 1-1,5 L/ gün idrar çıkışı meydana gelir. Bu oluşan idrar üreterlerden mesaneye doğru taşınır. Üreterler yaklaşık 25-30 cm uzunluğunda olup, üreterovezikal bileşke düzeyinde mesaneye obliq şekilde girer. Bu obliq yapı tek yönlü çalışan kapak görevi görerek, mesanenin dolum ve işeme fazında idrarın retrograd olarak böbreğe reflü olmasına engel olur. Mesane, idrarı düşük basınçta depolama ve boşaltma görevi üstlenen içi boş, pelvik yerleşimli, muskuler yapıda bir organdır. Mesane dolu iken

yaklaşık 500 ml'lik bir kapasiteye sahip ve ovoid şekilleyken, boş mesane dörtgen şeklinde olup, superior da urakus (median göbek bağı da denir; göbekten mesane kubbesine doğru uzanan fibröz bir bağıdır)'la ilişkili olan apeks, posteroinferior yüzey yada mesane boynunun bulunduğu aşağı kısmı olan base ve iki taraflı inferoateral yüzeyleri mevcuttur (Şekil 2.1).

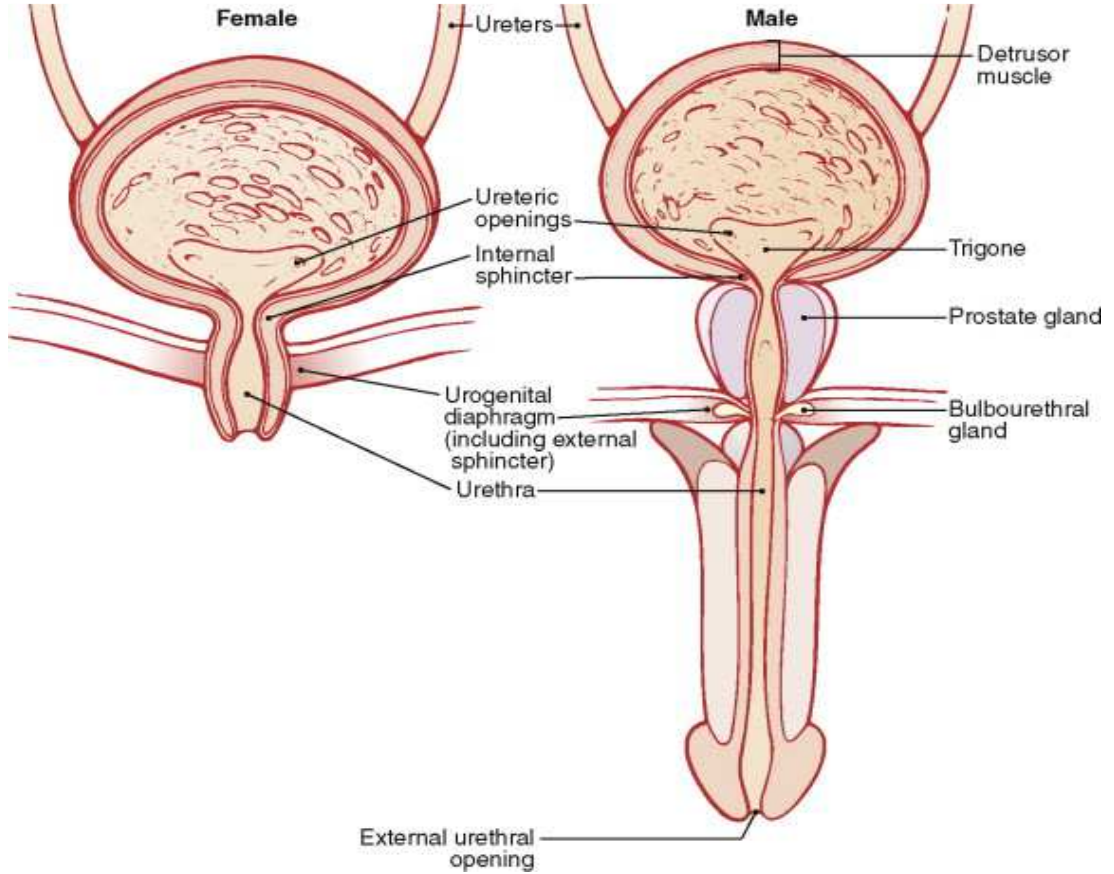


Şekil 2.3. Mesane anatomisi. A, Mesanenin superolateral görünümü. B, Mesane boynu ve trigonun anterior görünümü

(From Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. *Gray's Anatomy for Students*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.)

Yetişkin mesanesi boş iken simfizis pubisin arkasında, büyük ölçüde bir pelvik organ görünümündedir. Süt çocukları ve çocuklarda daha yukarıda lokalizedir. Dolu iken simfizisin çok üstüne yükselir ve kolaylıkla ele gelebilir. Akut ve kronik retansiyonda olduğu gibi aşırı gerildiğinde karnın alt bölümünü görünür şekilde bombeleştirir. Erkeklerde mesane, posteriora seminal veziküller, vas deferensler ve rektumla komşudur. Mesane boynu simfizis pubis orta noktasının 3-4 cm arkasında bulunur. Mesane boynu pelvik fasyaya sıkı bir şekilde fikse durumdadır ve prostat ile devam eder. Mesanenin superior ve posterior yüzeyi peritonla kaplıdır, o yüzden bu bölgede mesane ince bağırsak ve sigmoid kolonla yakın komşuluk içindedir. Hem erkek hem kadında distansiyon durumunda mesane gerçek pelvisin dışına doğru çıkar ve peritonu ön abdominal duvardan ayırarak burada mesane karın alt duvarıyla komşu olur. Kadınlarda erkeklerden farklı olarak mesane ile rektum arasına uterus ve vajina yerleşmiştir, böylece mesane tabanı ve üretra ön vajinal duvara yaslanır.

Kadında mesanenin superior yüzeyindeki periton vezikouterin boşluğu oluşturmak için uterusun üzerinden gelir ve uterusun üzerinden arkaya doğru devam edip rektouterin boşluğu oluşturur. Anterior vajinal duvar lateralde levator aniye sıkıca bağlı olduğundan pelvik diyaframın kontraksiyonunda (intraabdominal basınç artışı gibi) mesane boynunu yükseltir ve mesane boynunu öne doğru çeker.

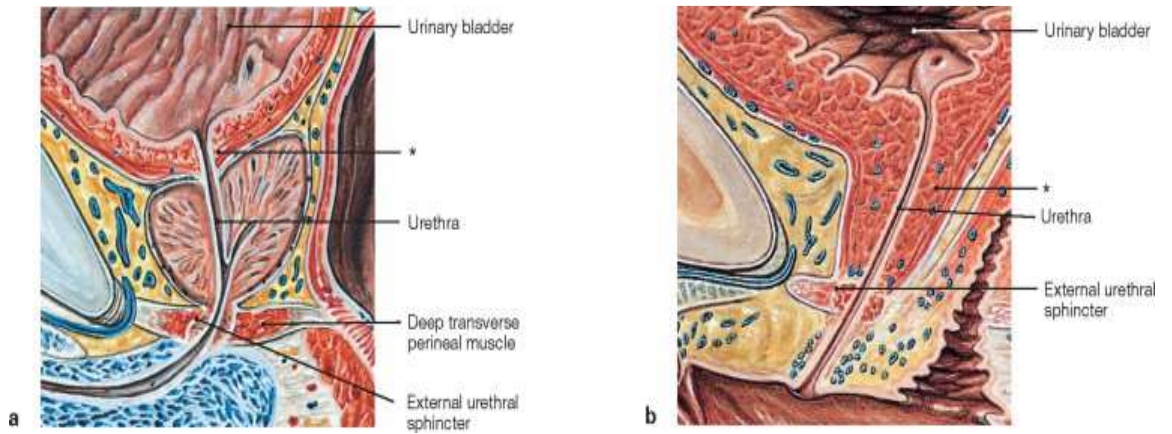


Şekil 2.4. Mesane ve üretral yapılar

(Youmans neurological surgery. New York: WB Saunders, 2004.)

Anatomik olarak mesane düz kaslarda oluşan detrüör (body veya dome olarakta adlandırılır) ve pelvik tabanla bağlantılı olan trigon ve mesane bonunu içeren base olmak üzere iki kısımdan oluşur. Mesane çıkımında iki üretral sfinkter bulunmaktadır, bunlardan birisi mesane boynu ve proksimal üretrada bulunan internal (düz kas) sfinkter ve membranoz üretrada bulunan eksternal (çizgili) sfinkterdir. Kadınlarda ise kısa üretra etrafında daha az kompleks olan bir sfinkter mevcuttur. İnternal sfinkter veya mesane boynu gerçek bir dairesel sfinkter olmayıp,

üretranın düz kas yapılanmasını teşkil etmek üzere distal yöne giden detrüsrün birbirlerine yaklaşan iç içe girmiş kas liflerinin oluşturduğu bir kalınlaşmadır. Mesane boynunun yapısı erkek ve kadınlarda farklıdır. Erkeklerde, radial olan iç longitudinal fibriller üretrada iç longitudinal düz kas tabakası ile devamlılık gösterip internal meatustan geçerler. Orta tabaka mesane boynu seviyesinde sirküler preprostatik sfinkteri oluşturur ve bu tabaka kontinanstan sorumludur. İnternal üretral meatusun arkasındaki mesane duvarı ve prostatın ön fibromüsküler stroması mesane boynunda yüzük benzeri yapı oluşturur. Erkeklerde çizgili üretral sfinkter tahrip edildiği durumda bile kontinansın mümkün olması internal sfinkterin kontinanstaki etkinliğini ortaya koyar. Bu kas adrenerjik fibrillerden zengin olup sitimüle edildiğinde mesane boynunun kapanmasını sağlar (13, 18), (Şekil 2.3).



Şekil 2.5. Mesane ve üretranın sfinkter mekanizması

(Paulsen, F. - Sobotta Atlas of Human Anatomy, Vol. 2, 157-240 © 2013 © Elsevier GmbH, Munich Urban & Fischer Verlag is an imprint of Elsevier GmbH.)

Mesane mukozası dolu iken düz bir yüzey, içi boşken de katlantılar oluşturan değişici epitelyum hücrelerinden oluşur. Üretelyum ince bir bazal membran üzerine oturmuş altı kat hücre kalınlığında bir tabakadır. Bu tabakanın hemen altında iyi gelişmiş submukoza, bağ ve elastik dokulardan oluşan lamina propria vardır. Bu tabakada çeşitli vasküler yapılar ve muskularis mukozayı oluşturan düz kas demetleri bulunur. Bu tabakanın altında da mesane duvarı düz kası mevcuttur. İnternal mea yakınında rasgele, longitudinal, dairesel ve sarmal biçimde düzenlenmiş, herhangi bir katmanlaşma veya belli bir düzen göstermeyen düz kas liflerinin karışımından ibaret

detrüsör kası bulunur. Detrüsör kası birbirinden ayrı olarak içte longitudinal, ortada dairesel ve dışta yine longitudinal üç katman içerir. Detrüsör kasın bu durumu, sferik şeklindeki mesane yapısının tamamen boşalması için ideal bir yapıyı oluşturmaktadır (18).

İşemenin regülasyonu kortikal, subkortikal, beyin sapı, spinal kord ve mesane mekanizmalarıyla sağlanır (Şekil 2. 4). Kortikal kontrol, frontal ve cingulate gyri de olup subkortikal bölgeyle birlikte işeme üzerine pons düzeyinde inhibitör, eksternal üriner sfinkter düzeyinde uyarıcı etki yapmaktadır. Bu sayede işeme istemli olarak belli bir süreye kadar ertelenebilmekte ve işemenin istemli kontrolü sağlanmaktadır.

Pontin işeme merkezi (Pontin Micturation Center-“PMC”, Barrington’s nükleus veya M-bölgesi olarakta bilinir) işemenin koordinasyonu için çok önemlidir. Bu merkez alt üriner sistemde parasempatik ve sempatik sisteminin karşılıklı koordinasyonunu sağlar.

Mesanenin boşaltım fazında; internal üretral sfinkteri gevşetmek için torakolomber korda spontan olarak inhibitör sinyaller gönderildiğinde, PMC’den detrüsör kontraksiyonu oluşturmak için sakral spinal korda da uyarıcı sinyaller yollar. PMC’nin bu etkisi sonuç olarak mesanenin boşaltılması yönünde etki sağlar.

Diğer yandan mesanenin dolum fazında; internal üretral sfinkterde kontraksiyon oluşturmak için torakolomber korda spontan olarak uyarıcı sinyaller gönderildiğinde, PMC’nin inhibisyon etkisi sakral spinal kordu baskılayarak detrüsör devşemesini sağlar. PMC’nin bu etkisi sonuç olarak mesanenin dolması / depolama yönünde etki sağlar. Mesanenin dolumu için asendan uyarı bilgileri periaquaduktal gray (PAG)’a ulaşır, ordanda hipotalamus ve thalamus aracılığıyla anterior cingulate korteks, insula ve prefrontal kortekse iletilir. Bu beyin bölgeleri, PMC’ye kendi kendine uyarıcı inputlar yollayan PAG’ı inhibe eder. Hipotalamus PAG üzerinde uyarıcı etkiye sahiptir. İstemli işemede hipotalamus kendiliğinden PAG’ı uyardığında, PAG ın prefrontal korteksi inhibe edici etkisi kesilerek işeme gerçekleşir. Burda PMC’nin uyarılması işemenin gerçekleşmesi şeklinde etki gösterir. Dorsal commissure, superficial dorsal horn ve parasempatetik nükleus

işemenin regülasyonu ile ilgili spinal sinir bölgeleridir. Glutamat spinal düzeyde uyarıcı transmitter görevi görürken, γ -aminobutyric acid (GABA) inhibitör nörotransmitterdir.

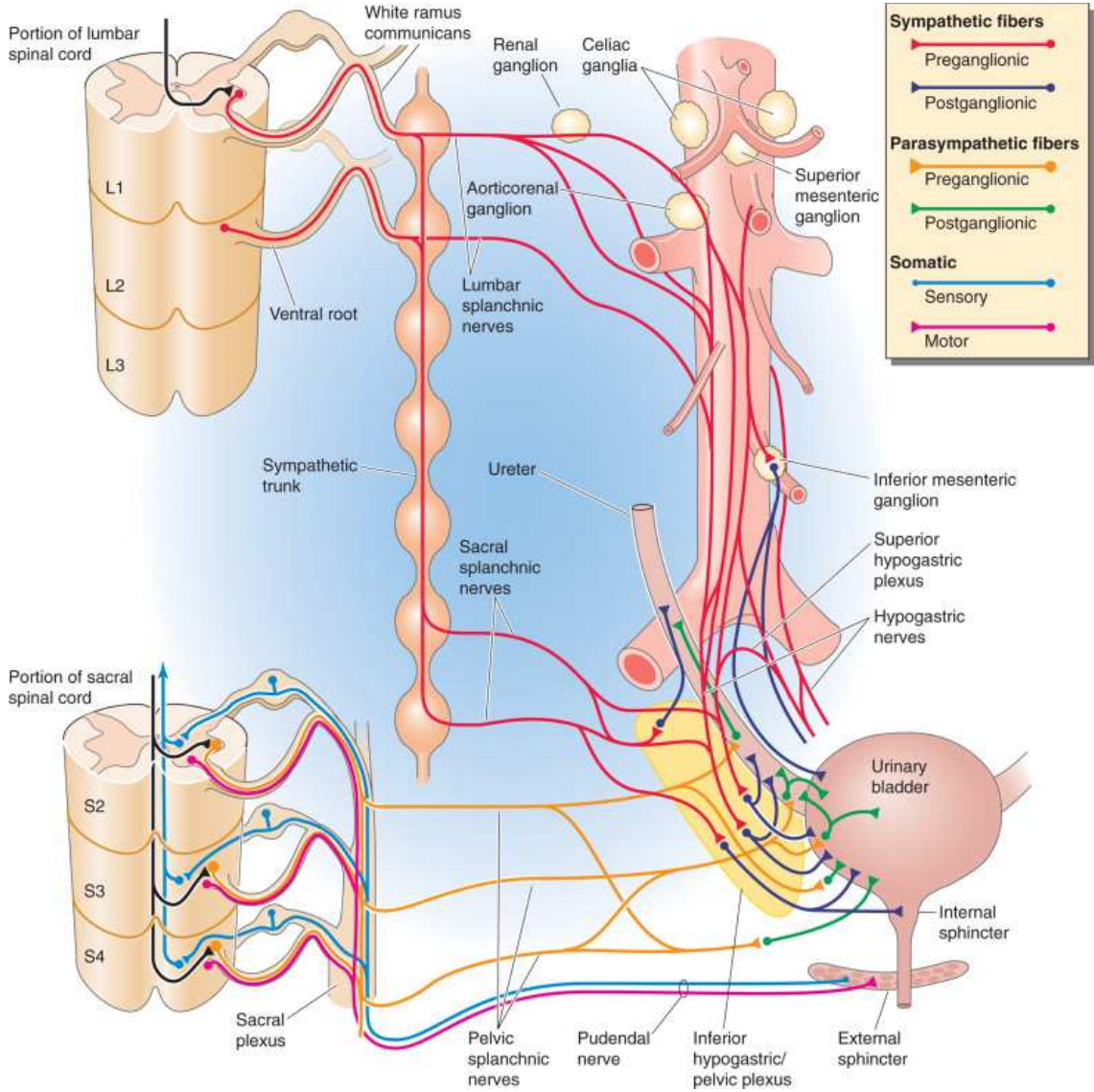
Alt üriner sistem mikst sinirler olan (duyu + motor) hipogastrik, pelvik ve pudental sinirler tarafından innerve edilir. Hipogastrik sinir otonomik sempatik sinir sistemi innervasyonu, pelvik sinir otonomik parasempatetik sinir sistemi innervasyonu ve pudental sinir somatik sinir sistemi innervasyonunu alt üriner sisteme taşır. Alt üriner sisteme sempatik sinir sistemi T11- L2 kord düzeyinden gelerek inferior mezenterik ve hipogastrik pleksusta sinaps yaparak buradan hipogastrik sinir şeklinde mesane boynu ve proksimal üretradaki α -adrenerjik reseptörleri ve mesane fundusunda ki β -adrenerjik reseptörlerine ulaşır. Sempatik sinir lifleri detrusör duvarında ki parasempatik ganglionlarında innerve eder ancak bunlara etkisi inhibisyon yönündedir. Torakolomber sempatik sistemin aktivasyonu alt üriner sistemde norepinefrin salınımını artırarak detrusör gevşemesi ve mesane boynu (internal sfinkter) kasılmasına neden olur.

Alt üriner sistemin parasempatetik innervasyonu S2-S4 kord düzeyinde ki detrusör nükleusdan alarak pelvik sinir ve detrusördeki kolinerjik parasempatetik sinir ganglionlarına ulaşır. Bu sinirlerin uyarılmasıyla M2 ve M3 reseptör aktivasyonunu sağlayan asetilkolin salınımı olur. Ayrıca M2 ve M3 den başka prejunctional nöronal uçlarda ki M1 reseptörlerde bu şekilde uyarılır. Proksimal üretrada ki parasempatetik innervasyon nitrik oksit salınımına neden olur, nitrik oksit salınımında üretral düz kas gevşemesiyle sonuçlanır. Sakral parasempatetik uyarı asetilkolin ve NO salınımına onlarda detrusör kasılması ve proksimal üretra gevşemesine neden olur. Eksternal üretral sfinkterin somatik sinir sistemi innervasyonu S2-S4 kord düzeyinde ki pudental nükleusdan (Onuf çekirdeğinden) gelir. Pudental sinirle devam ederek sfinkter çizgili kasını innerve eder.

Supraspinal merkezler, normalde istemli kontrol altındadır. Pudental nükleusun uyarıcı etkisiyle eksternal üretral sfinkter ve pelvik tabanda kontraksiyon oluşturarak mesanenin dolmuş fazında kontraksiyonun korunmasını sağlar, işleme fazında ise bu etki azalarak üretral ve pelvik taban relaksasyonu ile mesane boşalması sağlanır.

Mesane dolumu esnasında afferent bilgiler dens subüretelyal ve muskuler pleksustaki duyu lifleri tarafından algılanır. Kimi duyu lifleri mesanedeki fiziksel ve kimyasal uyarıları almak üzere mesane kavitesindeki ürotelyuma yayılmıştır. Bu duyu liflerinin büyük çoğunluğu az miyelinli A δ lifleri ve miyelinsiz C lifleridir. A δ lifleri mesane distansiyonuna yanıt olarak işemeyi tetiklerken, C lifleri ise ağrılı uyarıyı algılar. Mesanenin afferent liflerinin büyük çoğunluğu dorsal kök ganglionlarına pelvik sinir içerisinde taşınır. Burdaki sinyaller arka boyunda spinal korda aktarıldıktan sonra bu bilgiler beyin ön kısmında bulunan PAG bölgesine iletilir. Mesanenin dolum fazında supraspinal merkezler pontin işeme merkezinde inhibisyon oluştururlar bunun sonucunda alt üriner sisteme sakral parasempatik iletimin eşzamanlı olarak supresyonuyla torakolomber sempatik akışın artmasıyla sonuçlanır. Bu supraspinal merkezler ayrıca eksternal üretral sfinkterde kontraksiyon oluşturmak için pudental sinire uyarıcı etkide bulunurlar. Bu sistemin normal mesane fizyolojisi üzerine genel etkisi; detrüör düz kas gevşemesi, mesane boynu kontraksiyonu ve eksternal üriner sfinkter çizgili kas kontraksiyonuyla mesanenin idrar kaçağı olmaksızın düşük basınçlarda idrar depolanmasını sağlama yönündedir.

Mesanenin boşalma fazında; supraspinal merkezlerin pontin işeme merkezine olan inhibitör etkisi suprese edilerek alt üriner sisteme eş zamanlı olarak sakral parasempatik akışla birlikte torasik sempatik akış önlenir. Supraspinal merkezlerin eksternal üretral sfinkter relaksasyonu için pudental sinire olan uyarıcı etkisi baskılanır. Bu sistemin normal mesane fizyolojisi üzerine genel etkisi; detrüör düz kas kasılması, mesane boynu düz kas gevşemesi ve eksternal üriner sfinkter çizgili kas relaksasyonu ile mesanenin boşalmasını sağlama yönündedir (18).



Şekil 2.6. Mesanenin otonomik ve somatik innervasyonu

(Sobotta Atlas of Human Anatomy, Vol. 2, Fifteenth Edition F. Paulsen 7, 157-240).

2.3. MESANE FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

2.3.1. Mesane Disfonksiyonlarının Fonksiyonel Değerlendirilmesinde Ürodinaminin Uygulanabilirliği

Ürodinamik çalışma; işeme fazındaki, detrüör kontraktilesi, mesane çıkım relaksasyonu ve sfinkter arasındaki kritik parametrelerin koordinasyonunu değerlendirebilir. Mesane disfonksiyonu tanısı fonksiyonel olarak ve sistometrik incelemeye konulur. Mesane disfonksiyonuyla ilgili birtakım soruları cevaplamak ve

düzenli bir sınıflama imkanı ancak ürodinamik incelemeyle mümkündür. Ürodinamik değerlendirme mesane veya mesane çıkım disfonksiyonu veya ikisinin birden varlığı ve dolun veya boşaltım problemi olup olmadığını belirlemede önemli yer tutmaktadır. Bu soruların yanıtı için ürodinamik değerlendirme yapılarak doğru tanı ve tedavi seçiminde önemli veriler elde edilir.

2.3.2. Ürodinamik Çalışmanın Komponentleri

2.3.2.1. Dolun (Depolama) Fazı

Sistometrogram; Sistometri veya daha uygun deyimile “ Dolun Sistometrisi” mesanenin dolun boyunca basınç / volumn ilişkisini değerlendirme metodudur. Mesane, hasta veya işlemi yapan kişinin işeme komutuna kadar doldurulur. Sistometrogramda detrüör basıncını (P det) gösteren üretral veya suprapubik yerleştirilen katater yardımıyla sadece mesane basıncını ölçmek için tek ölçüm tercih edilebilir veya rektum yada vajene de bir katater yerleştirilerek total vesikal basınç (P ves) ve P (abd) basınç ölçülebilir. Burdan $P_{det} = P_{ves} - P_{abd}$ şeklinde hesaplanır. Bu fazda normal mesane hacmi herhangi bir detrüör kasılması olmaksızın kademeli olarak artar (19).

Mesane Hissi; Normal, yükselmiş (hipersensitif), azalmış ve/ veya mesane hissinin olmaması şeklinde olabilir.

Mesane Kapasitesi; Normal, yüksek veya düşük olabilir.

Kompliyans; Normal, yüksek veya düşük olabilir. Normal mesane dolunu esnasında basınç değişimi çok azdır veya hiç olmaz, fakat kompliyans için yine de standart bir aralık yoktur. Burada amaç mesane dolunu esnasında düşük basınçta idrar depolamaktır.

Elektromiyografi (EMG); Kas membranlarının oluşturduğu depolarizasyonla elektrik potansiyellerin oluşmasıyla yapılan bir ölçümdür. EMG perineal kas fonksiyonlarında ki anormalliklerin değerlendirilmesini mümkün kılan

perineumdaki çizgili sfinkterik kasların ölçümünde kullanılır. Bu kaslar sıklıkla alt üriner sistem semptomları ve disfonksiyonlarıyla ilişkili kaslardır.

Üretral Fonksiyon; Dolum fazı esnasında refleks olarak karın basıncı artsada normal pozitif üretral kapanma basıncı sürdürülür. Fakat işemenin hemen öncesinde üretral basınç azalarak işeme fonksiyonu sağlanır. Ancak üretral fonksiyon normal olsa dahi detrüör kontraksiyonunun olmadığı durumlarda da yetersiz idrar akışı görülebilir.

2.3.2.2. İşeme (Boşaltım) Fazı

Normal mesane boşaltımı için gerekli iki kritik parametre olan detrüör kasılması ve mesane çıkım direncini değerlendirir. Mesane boşaltım bozukluklarının nedenleri olarak çıkım direnci ve yetersiz mesane kasılması veya bunların kombinasyonu şeklinde sayılabilir. İstemli işeme esnasında eşzamanlı olarak hem mesane basıncı hem de idrar akım hızı değerlendirilir (Basınç-akım çalışması olarakta bilinir). Mesane kasılmasıyla çıkım direnci arasındaki ilişkiyi daha iyi anlayabilmek için öncelikle normal işeme fizyolojisini tanımlamak gerekir.

Normal işeme; İşeme refleksinin aktivasyonu ile başlar ve aşağıdaki basamaklarla devam eder.

- 1- Çizgili üretral sfinkterin relaksasyonu
- 2- Detrüör kasının kontraksiyonu
- 3- Mesane boynu ve üretranın açılması
- 4- İdrar akışının gerçekleşmesi

İstemli işeme refleksinin oluşması pontin ile sakral işeme merkezinin olduğu suprapontin arasındaki koordinasyon ile sağlanır.

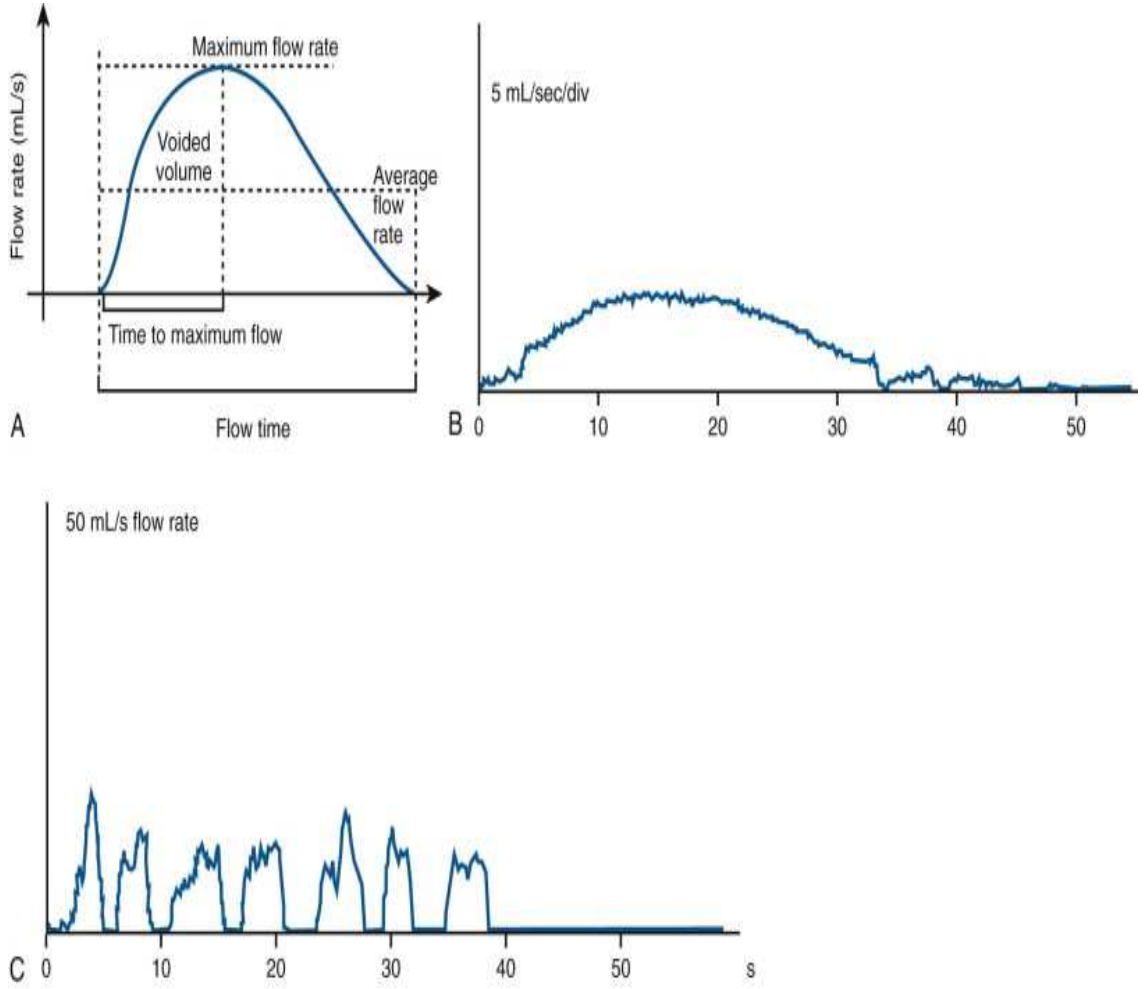
Detrüör Aktivitesi; Normal işeme istemli olarak detrüör kasılmasıyla başlatılır ve genellikle dört yaşından önce istemli olarak idrar tamamen boşalana kadar durdurulamaz. Mesane çıkım obstrüksiyonu olmadığı ve normal mesane fonksiyonu olduğu durumda idrar tamamen boşaltılır.

Underaktif Detrüsör; Normal zaman aralığında yeterli mesane boşalmasını sağlayacak düzeyde detrüsör kasılmasının olmaması olarak tanımlanır. Normal detrüsör fonksiyon ve detrüsör underaktivitesi kesin basınç değerleri çıkım direncine bağlı olarak değişeceğinden “belli belirsiz” bir şekilde tanımlanmıştır. Underaktif detrüsör cauda equina sendromu veya diyabete bağlı olarak görülebilmekle birlikte overflow inkontinans veya pelvik tabanın paralizisine ve buna bağlı stres inkontinans görülebilmektedir.

Akontraktil Detrüsör; Detrüsör underaktivitesi kasılmanın ve/ veya kasılma süresinin gerilemesi, bunun sonucunda normal zaman aralığında mesanenin tamamını boşaltmada yetersizlik ve/ veya mesaneyi boşaltma zamanının uzamasıdır. Sonuç olarak ürodinamik çalışma boyunca yeterli kontraksiyon yoksa akontraktil detrüsör ortaya çıkar (20). Mesaneyi innerve eden sinir kontrolünde anormallik ve merkezi koordinasyon kontrolünün tamamen olmamasıyla ortaya çıkar.

Üroflowmetri; Birim zamandaki idrar akış oranını gösterir. Aynı zamanda mesane boşalması hakkında fikir verir. Normal üroflowmetre çan eğrisi şeklindedir. İşeme paterni değişirse underaktif mesane veya mesane çıkım bozukluğunu (obstrüksiyonunu) gösterir (Şekil 2. 5). İdrar akışıyla birlikte postmiksyon rezidünün birlikte değerlendirilmesi boşaltımı değerlendirmek için iyi bir kombinasyondur.

Maksimum akış hızı olan Q_{max} ve işenen hacim arasında doğrusal bir ilişki vardır, özellikle işenen miktar 150 mL nin üzerindeyse bu ilişki daha da güçlenmektedir. Dolayısıyla çoğu otor akışın iyi değerlendirilmesi için işenen volumün en az 150 mL olması gerektiğini savunmaktadır. (19). Buna rağmen işeme disfonksiyonuyla kliniğimize başvuran hastalara bu limitin üzerinde işemenin sağlanmasında güçlük çekilmektedir. O yüzden Boone ve Kim Q_{max} 'ın düzeltilmiş formu olan; Q_{max} 'ın işenen volumün kareköküne bölünmesiyle elde edilen değer bu hastalarda daha sağlıklı sonuç eldelebileceğini bildirdiler (21). Testin güvenilirliğini arttırabilmek adına yıllardır belirli popülasyonlar için normal akış aralığı ve doğru işeme miktarı için birçok nomogramlar geliştirilmiştir. Şuan bu nomogramlardan en fazla kullanılan erkekler için bizimde kliniğimizde kullandığımız Siroky nomogramı (22) ve hem kadın hem erkek için kullanılan ise Liverpool nomogramları'dır (23).



Şekil 2.7. Değişik işeme patern örnekleri. A. Normal işeme paterni çan eğrisi şeklinde. B. Düşük akımlı işeme paterni (genelde obstrüksiyona sekonder). C. Kesik kesik/ Abdominal işeme paterni, genelde mesane kontraktilesinin bozulduğu durumlar veya abdominal şekilde işemelerde görülür

(Nitti, Victor W. MD - Campbell-Walsh Urology, 1847-1870.e4 © 2012 Copyright © 2012, 2007, 2002, 1998, 1992, 1986, 1978, 1970, 1963, 1954 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.).

Postmiksiyon Rezidü; mesane boşalmasını mükemmel şekilde değerlendiren testtir. USG veya kataterizasyonla değerlendirerek mesane boşalmasının yeterliliğini değerlendirir fakat bozukluğun nedeni hakkında fikir vermez, ileri incelemelerin gerekliliği konusunda fikir verir.

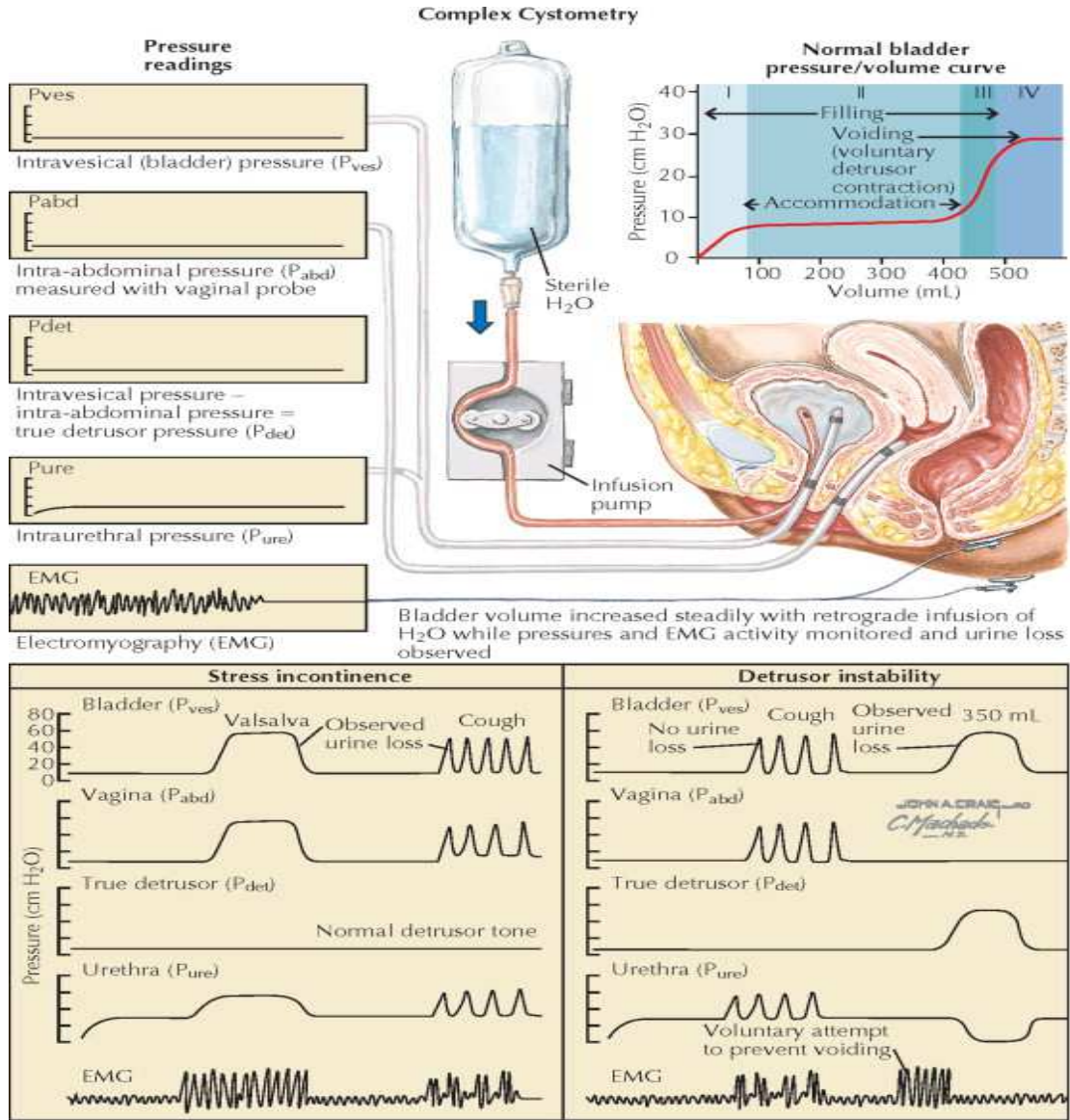
Üretral Basınç Profili (UPP); Üretranın uzunluğu boyunca intraluminal basınç grafiğini verir. Üretral basınç kapalı olan üretrayı açmak için gerekli idrar

akım basıncı olarak tanımlanır. UPP basınç sensörünün (kataterin) üretra boyunca çekilmesiyle elde edilir.

2.3.2.3. Basınç-Akım Çalışması (PFS)

Mesane içi basınçla mesane boşalması esnasında ki idrar akım hızı arasında ki ilişkiyi değerlendiren metoddur. Detrüsör basıncı öncesinde açıklandığı gibi üroflowmetreyle eşzamanlı olarak ölçülür. İşeme komutuyla birlikte veya kontrol edilemeyen işemeye başlar ve hastanın işemeyi sonlandırmasıyla biter (Şekil 2.6.).

Basınç akım ilişkisi; İşeme esnasında ki detrüsör basıncı çıkım direncinin fonksiyonel göstergesidir. Çıkım direnci yüksek olan normal bir detrüsörde işeme anında detrüsör basıncı bunun üstünde olmalıdır. Buna düşük akım oranı eşlik eder. Sağlıklı bir mesane daha güçlü kasılarak bunun üstesinden gelmelidir. Akım hızının yavaş olmasına rağmen mesane kendiliğinden boşalabilir. Zamanla detrüsör bu durumu kompanse edemeyebilir ve obstrüksiyonun üstesinden gelmek için gerekli basıncı sağlamayabilir. Bu durum görüldüğünde mesane yeterince boşaltılamaz ve idrar retansiyonu gelişir. Bu durum ürodinamide yüksek basınç ve düşük akım (mesane çıkım obstrüksiyonu) şeklinde kendini gösterir. Bunun sonucunda zamanla mesane dekompanse hale gelir ve detrüsör underaktivitesi veya kontraktilite azalmasıyla sonuçlanır.



Şekil 2.8. Ürodinamik Çalışmanın Komponentleri ve Şematik Gösterimi

(SMITH, ROGER P. MD - Netter's Obstetrics and Gynecology, 623-624 © 2008 Copyright © 2008 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.)

ICS'e göre normal detrüör fonksiyonu; normal zaman aralığında mesanenin tamamını boşaltacak şekilde istemli olarak kontraksiyonun başlama ve devamı ile obstrüksiyon olmaması olarak tanımlanır. Normal detrüör fonksiyon ve detrüör underaktivitesi kesin basınç değerleri çıkım direncine bağlı olarak değişeceğinden "belli belirsiz" bir şekilde tanımlanmıştır. Detrüör fonksiyonu ürodinamik olarak saptansa dahi, ürodinamik çalışma klinik bulgularla korole edilmelidir. Örneğin hasta normalde rahat idrar yapabiliyordur fakat ürodinamik çalışma boyunca idrarını

yapamazsa bu kesin bir akontraktıl tanısı koydurmaz. İdrar akışıyla birlikte postmiksyon rezidünün birlikte değerlendirilmesi boşaltımı değerlendirmek için iyi bir kombinasyondur. İdrar akışı azaldığında ve PMR arttığında idrar boşaltımının yeterli olmadığı anlaşılır fakat bu bilgilerin obstrüksiyon, kontraktilite azalması gibi bunun nedenleri konusunda bilgi vermez.

2.4. Mesane Disfonksiyonu ve Sınıflandırılması

Klavuzlarda alt üriner sistem semptomları, nörojenik ve non-nörojenik alt üriner sistem patolojileri, erkek alt üriner sistem semptomları, kadın inkontinansı şeklinde mesaneyi ilgilendiren patolojiler ayrı bölümler şeklinde sunulmuşsa da mesane disfonksiyonu adı altında bir sınıflama veya alt gruplarındaki tanımlamalar konusunda net bir fikir birliği bulunmamaktadır. Mesane disfonksiyonu sınıflamasında günümüzde 1981 de Wein tarafından ürodinamik bulgulara göre yapılan “işeme fonksiyonlarının ürodinamik bulgulara göre sınıflaması” kullanılmaktadır (24). Bu sınıflamaya göre;

- 1- Depolama / Dolum disfonksiyonu;** İdrar depolanmasında bozukluk
- 2- Boşaltım / İşeme Disfonksiyonu;** Mesanenin normal bir şekilde boşaltılmasında bozukluk.
- 3- Kombine Disfonksiyon;** Hem depolama hem boşaltımda bozukluk.

Buna ek olarak fonksiyonel bozukluklar “anatomik bölgeye” göre de alt gruplara ayrılarak aşağıda ki sınıflama yapılmıştır;

- 1- Mesane disfonksiyonu;** Aşırıaktif (Depolama bozukluğuna neden olur) veya underaktif (Boşaltım bozukluğuna neden olur)
- 2- Mesane çıkım disfonksiyonu (sfinkter bozuklukları);** Sifinkter aşırıaktivitesi (mesane boşaltımında yetersizlik) veya sifinkter underaktivitesi (depolama yetersizliğine neden olur)

3- Mesane ve mesane çıkım disfonksiyonun kombinasyonu; mesane disfonksiyonu ve sfinkter bozukluklarının birlikte bulunması.

2006 yılında Neveus ve arkadaşları mesane disfonksiyonlarının fonksiyonel sınıflandırmasının; mesane detrüör aktivitesi, mesane dolum hissi, mesane kompliyansı ve kapasitesi, hem işeme hemde dolum fazında ki üretral fonksiyonların sistometrik değerlendirmesiyle mesane ve sfinkter kompleksinin fonksiyonel durumuna bağlı olduğunu bildirdi (25). Kaynaklar incelendiğinde her ne kadar tam anlamıyla bir fikir birliği bulunmasa da mesane işeme fonksiyonu olarak yukarıda anlatılan fizyolojik ve anatomik olarak değerlendirildiğinde temel olarak dört patern sergilemektedir (26), (Şekil 2.7).

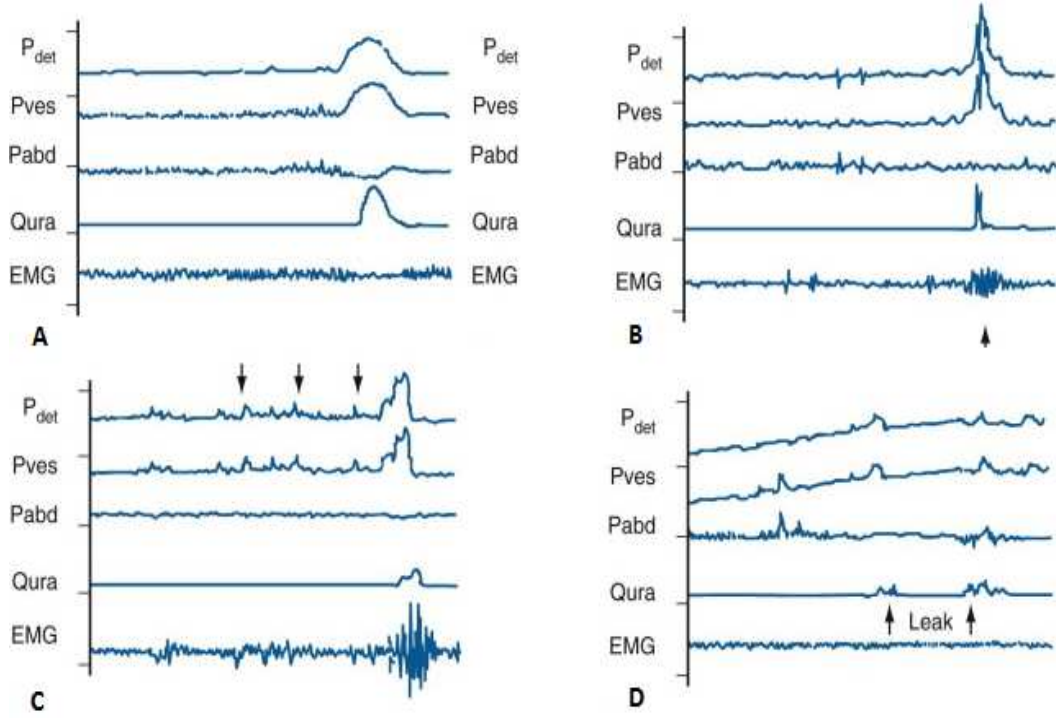
A- Normal İşeme Paterni

B- Dissinerjik İşeme Paterni

C- Aşırı Aktif Mesane Paterni

D- Underaktif Mesane Paterni şeklindedir.

Ürodinamik değerlendirme, mesane veya mesane çıkım disfonksiyonu veya ikisinin birden varlığı ve dolum veya boşaltım problemi olup olmadığını belirlemede önemli yer tutmaktadır. Hastalığın bu şekilde sınıflandırılması tedavi seçeneklerinin ortaya konulmasına yardımcı olur.



Şekil 2.9. Normal ve Mesane Disfonksiyonlu İşeme Paternleri; (A), Normal İşeme Paterni. (B), Dissinerjik İşeme Paterni. (C), Aşırı Aktif Mesane Paterni. (D), Underaktif Mesane Paterni

(Campbell-Walsh Urology 10th edition. Saunders 2012)

2.5. DİYABETİK MESANE DİSFONKSİYONU

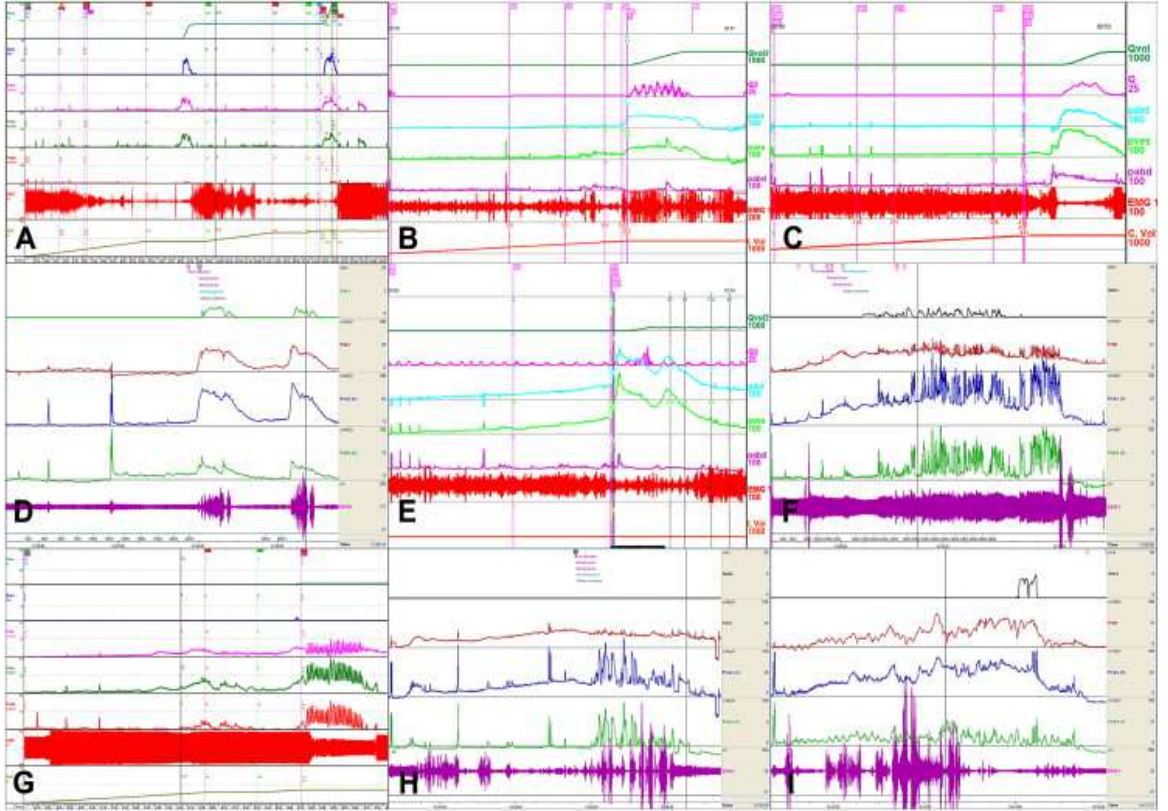
Diyabetes mellitus, insülinin kısmi veya tam yokluğuna bağlı ortaya çıkan, multiple komplikasyon ve bunlara bağlı morbiditelerle seyreden büyük ölçekli harcamalara neden olan, dünyada yaygın görülen kronik süreçli bir hastalık olup her geçen gün diyabetli hasta sayısı artış göstermektedir. Amerika Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezinin verilerine göre 2010 yılı diyabetten etkilenen tahmini hasta sayısı 25,8 milyondur, bu sayı toplam nüfusun %8,3 unu oluşturmakla birlikte, yaklaşık 7 milyon tanı konulmamış diyabetiklinin de bulunduğunu bildirmiştir. 65 yaş ve üstü diyabetik hastaların sayısının 10,9 milyon (tüm 65 ve üstü nüfusun %26,9'u) olduğu tahmin edilmektedir. Diyabet tanısı konulmuş hastaların %90-95 ini Tip 2 Diyabetli hastalar oluştururken, %5-10'luk kısmını da Tip 1 diyabetli hastalar oluşturmaktadır. ABD de diyabet ve komplikasyonlarının 2007 yılı toplam maliyeti, medikal ve indirekt olarak (iş ve fonksiyon kaybı vs.) 174 milyar dolar olup buda toplam sağlık harcamalarının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (1).

Üriner sistem komplikasyonları diyabet komplikasyonları arasında en sık görülen ve en fazla harcamalara neden olan komplikasyonudur. Diyabetik mesane disfonksiyonu, seksüel disfonksiyon, üriner sistem enfeksiyonları diyabetin alt üriner sistem komplikasyonları olup hastaların %50 sinden fazlasını etkilemektedir (27). Daneshgari ve ark. diyabet tanısı alan hastalarda, diyabete bağlı alt üriner sistem komplikasyonları oranını, nisbeten daha iyi tanımlanmış diyabet komplikasyonları olan ve diyabet hastalarının %60'ından azında görülen diyabetik nöropati ve %50'sinden azında görülen diyabetik nefropatiden çok daha yüksek oranda olduğunu ve bu oranın diyabetik hastaların %80'inden fazlasında görüldüğünü bildirdi. Bu alt üriner sistem komplikasyonlar arasında en sık görülenin de diyabetik mesane disfonksiyonu olduğunu bildirdiler (2).

Üriner sistem komplikasyonları arasında en can sıkıcı ve bilineni en az olan komplikasyonu diyabetik mesane disfonksiyonudur (28). Diyabetik mesane disfonksiyonundan önce kullanılan sistopati terimi, ilk olarak 1976 yılında Frimodt-Moller tarafından kullanılmış olup (29) idrar hissini azaldığı mesane kapasitesinin arttığı ve kötü boşaltım kapasitesi ve erken dönemlerinde mesane hiperaktivitesinin de eşlik ettiği semptomlar topluluğuyla kendini gösteren diyabetin ileri evre komplikasyonu olarak tanımlanmaktadır (30). Bu farklı DMD semptomları, mesane aşırı aktivitesi, azalmış mesane kontraktilesi ve arefleks mesanenin semptomlarını içermektedir. DMD'nun diyabetiklerde tahmini görülme oranı %43 ile %87 arasında değişmektedir (31, 32).

DMD mesanenin hem dolum hemde boşaltım semptomlarının bir arada olduğu komplike bir bozukluktur. DMD nun bu semptom çeşitliliği hastanın cinsiyeti, yaşı, mesane çıkım obstrüksiyonu ve diyabetin süresine bağlı olarak değişebilmektedir, yapılan bir çalışmada kısa süreli diyabete bağlı detrusör instabilitesinin ve periferik somatik nöropatideki düşük idrar akım oranının kadınlarda, diğer nedenlerden bağımsız olarak mesane kapasitesi artışına, erkeklerde hem mesane çıkım obstrüksiyonu hemde mesane kompliyansında azalmaya bağlı olarak, yaşlılarda ise hem idrar akışında azalma hem çıkım obstrüksiyonuna bağlı olabileceği bildirildi (33).

Diyabetik hastalarda alt üriner sistem semptomlarının normal populasyona oranla daha fazla olacağı bilinmekle birlikte, Tip 2 diyabetik kadın ve erkeklerde yapılan bir çalışmada yaş, diyabetin süresi, kötü metabolik kontrol, postmiksyon rezidü miktarı, parasempatik otonomik nöropatiler (kardiyak, özefajial ve gastrik), retinopati ve mikroalbüminüri oranlarının tamamının DMD nun ürodinamik bulgularıyla korele olduğu gösterildi (34). Diyabetik mesane disfonksiyonu tanısında kullanılan ürodinamik verilerde yukarıda belirtilen faktörlere, hastalığın evresine, eşlik eden patolojilere bağlı olarak farklı ürodinamik bulgular görülebilmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.10. Değişik paternli basınç-akım çalışması. A. Hafif veya orta düzeyli mesane çıkım obstrüksiyonu görüntüsü (İdiyopatik aşırıaktif mesane var ya da yok). B. İdiyopatik aşırı sfinkter aktiviteli hafif veya orta düzeyli mesane çıkım obstrüksiyonu görüntüsü. C. Klasik mesane çıkım obstrüksiyonlu görünüm. D. İdiyopatik aşırı sfinkter aktiviteli, mesane çıkım obstrüksiyonu görüntüsü. E. Mesane kompliyansı azalmış mesane çıkım obstrüksiyonu. F. Hem düşük kompliyanslı hemde düşük detrüör basınçlı görüntü. G. Underactive detrüör görüntüsü. H. Şekil F’de ki hastanın ürodinami tekrarı. I. F’de ki hastaya üriner drenaj uygulandıktan 4 hafta sonraki görüntü (E’de ki görüntü gibi detrüör kontraksiyonları tekrar kazanılmış).

(Xu, Danfeng,Cui, Xingang,Qu, Chuangyu,Yin, Lei,Wang, Cunzhou,Chen, Jie - Urology - Volume 83, Issue 3, 563-569 © 2014 Elsevier Inc.)

2.6. MESANE DİSFONKSİYONU TEDAVİSİ

DMD tedavisiyle ilgili yol gösterici çok az yayın bulunmaktadır. Kan şekeri düzeyinin kontrol altında tutulması ilk basamak tedavidir. Oral antidiyabetik kullananlarda DMD prevelansının %25 olduğu (31) göz önüne alındığında, her ne kadar kan şekeri düzeyinin regülasyonu DMD oluşumunu engellemesede kan şekeri regülasyonu semptomların gerimesini sağlayacak konservatif bir yaklaşım olacaktır (35). Tedavi seçenekleri daha ziyade semptoma yöneliktir, semptomlar diyabetin kompanzasyon döneminde görülen aşırı aktif mesane samptomlarıysa, yaşam tarzı değişikliği, Kegel egzersizleri, antikolinerjik tedaviler ve pelvik sling veya mesane boynu suspansiyonu gibi basamak tedavisi şeklinde aşırı aktif mesane tedavi protokolü aynen burada da geçerlidir. Mevcut tedavilerin tamamı semptomatik olup, hastaların çoğu bu tedavileri yetersiz bulmakta ve yan etkileri nedeniyle birçoğu tedaviye devam etmemektedir (36). Bu tedaviye alternatif olan sakral veya tibial sinir nöromodülasyonu, botulinum enjeksiyonu veya sistoplasti gibi yöntemlerde daha invaziv tedaviler olup sonuçlar nedeniyle gerek hasta gerek hekim tarafından çok tercih edilen yöntemler değildir. Eğer semptomlar diyabetin dekompanzasyon döneminde görülen underaktif mesane samptomlarıysa yani major semptom idrarı tam boşaltamama veya idrar retansiyonu ise, tedavi seçeneği işemeyi kolaylaştıracak tedaviler yada mesaneyi boşaltmaya yönelik tedavilerdir (Tablo 2. 1). Medikasyon olarak kolinerjik ajanlar verilebilir veya suprapubik bası yardımıyla idrar boşaltılmasına yardımcı olunabilir, retansiyon durumunda ise üretral kataterizasyon gerekmektedir. Ancak bu yöntemlerin hiç birisi tedavi edici olmayıp semptomlara yöneliktir dolayısıyla bu yöntemler çokta yüzgüldürücü değildir.

Tablo 2.1. Mesaneyi Boşaltmayı veya İşemeyi Kolaylaştıracak Tedaviler (37)

Eksternal Bası, Valsalva

Refleks Kontraksiyonları Başlatma veya Arttırma

Mesane egzersizleri

Medikal Tedaviler (Oral veya İntravezikal)

Parasempatomimetik ajanlar

Prostaglandinler

Alfa adrenerjik antagonistleri

Opioid antagonistleri

Elektrik Uyarısı

Direkt mesane yada spinal korda

Direkt sinir köklerine

İntravezikal (transüretal yolla)

Nöromodülasyon şeklinde

Mesaneyi Küçültmeye Yönelik Sistoplasti

Mesane Miyoplastisi

Doku Mühendisliği

DMD ile ilgili yeni tedavi seçenekleri bulunmasada, yeni tedaviler konusundaki öneriler az sayıda hayvan çalışmasından ibarettir. Bunlardan en yakın zamanda yayınlananlar arasında olanlar, antioksidan tedavilerin mesanede ki OS oranını azaltarak DMD tedavisinde etkin olduğunun gösterilmesi (38) ve hücre bazlı tedavilerin etkinliğiyle ilgili olanlardır. Hücre bazlı tedaviler sonuçları itibariyle (4, 5) şuan umut verici tedaviler arasında görünmekte ve çalışmalar bu tedavi yöntemleri üzerine yoğunlaşmış durumdadır.

2.7. KÖK HÜCRE

2.7.1. Tarihçe

Tarih boyunca insanoğlu transplantasyon fikri üzerine yoğunlaşmış olup bu konudaki ortaya atılmış ilk örnekler birer zenotransplantasyon örneği olarak sfenksler ve deniz kızları mitolojisidir. Mitolojide, ateşi Olimpos dağındaki tanrılardan çalarak insanlığa hediye eden ve bu yüzden Zeus tarafından cezalandırılan Prometheus'un hikayesi de buna bir örnektir. Hikayede, Zeus tarafından Kafkas (Kaf) dağında bir kayaya bağlanarak karaciğeri her gün bir kartal tarafından yenilmesi şeklinde bir cezaya çarptırılan Prometheus'un karaciğeri her gün kendisini yenilemiştir. Bu hikayede anlatılan karaciğer hücrelerinin rejenerasyon yeteneği kök hücre kavramını ortaya koyan ilk hikayedir. Asırlar sonra bu transplantasyon fikri ve teknolojisi, tıbbi bir profesyonelin eline geçerek klasik edebiyatın bir uç örneğini oluşturacak şekilde Mary Shelley'in Frankenstein romanına konu olmuştur (39)

Kök hücre çalışmalarının başlangıcını kemik iliği nakilleri oluşturur. İlk kez 1963'de başlayan kemik iliği nakillerinden sonra 1981 yılında iki farklı araştırma grubunun fare embriyosundan embriyonik kök hücre (ESC) elde etmesi ve bunu takip eden çalışmalarda 1998'de ilk insan embriyo kök hücre serilerine ulaşılması kök hücre çalışmalarının kilometre taşlarıdır (6-8).

Ülkemizde, insan ömrünü uzatmanın yolunun doğum sonrası atılan plasentalarda ve kordon hücrelerinde olduğunu söyleyen araştırmacı Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün kök hücre tedavisi üzerine dünyada belki de ilk çalışmaları yapan kişilerden biridir. Aygün hayvanlarda fetal ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisi konusunda 1950-1960'lı yıllarda çalışmalar yapmış ve bu çalışmaları uluslararası tıp dergilerinde yayımlanmıştır.

1967 yılında ise embriyonel karsinoma hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması da bu alanda ileri doğru atılmış ilk önemli adımdır. Bu hücrelerin farklılaşması; embriyoid cisimcikler olarak adlandırılan embriyo benzeri yapıların meydana gelmesiyle oluşan hücre kümelenmesi ile sonuçlanır. Söz konusu

embriyoid cisimcikler ilk olarak, embriyonal karsinomlu farelerin asit sıvılarında gözlenmiş ve bu hücreler bilim adamları için önemli birer model oluşturmuştur (39).

2.7.2. Tanımlar

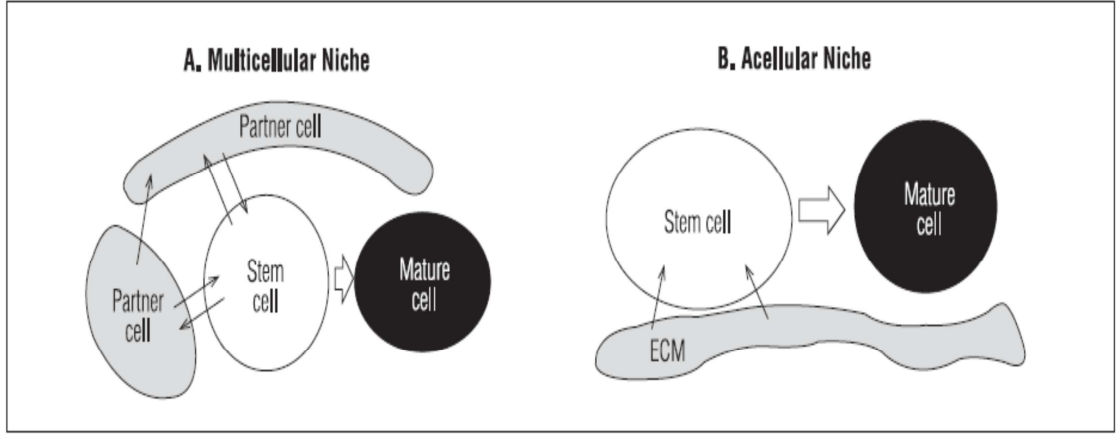
Bir canlının vücudunda farklılaşmadan, çok uzun bir süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen, gereğinde farklılaşarak başka özel hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelere **kök hücre** denir.

Embriyolojik gelişimini tamamlamış hücreler (karaciğer, cilt, kas hücreleri vb.) bölündükleri zaman yine kendileri gibi bir hücre oluştururlar. Kök hücrelerin ise belirlenmiş bir işlevi yoktur ve aldıkları uyarı ve sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilme (multipotensi) ve kendileri gibi yeni hücre oluşturabilme (yenilenebilme) yeteneğine sahip hücrelerdir (40).

Kök hücrelerin dört temel özelliği bulunmaktadır; sınırsız ve düzgün büyüme yeteneği (**kendini yenileyebilme**), özelleşmiş hücrelere dönüşebilme yeteneği (**diferansiasyon**), yeni doku alanlarına göç edebilme ve doku oluşturabilme yeteneği (**migrasyon ve doku onarımı**) ve genetik programa göre önceki üç özelliği belli bir bölünme sayısında dengede tutabilme (**hemostazatik kontrol**) dir (41).

Bunlar dışında heterojenite özelliği ise farklı alt grupları barındırma yeteneğidir. Örneğin kemik iliği mezankimal kök hücreleri CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 ve STRO-1 gibi belirteçleri taşıırken, hematopoetik kök hücreler CD11b, CD14, CD31, CD34, CD38,CD45 gibi farklı belirteçleri taşımaktadır (42). Bu belirteçler kök hücre izolasyonunda hücre ayıklama amacıyla kullanılmaktadır.

Kök hücrelerini destekleyen fizyolojik mikroçevre olan “niş kavramı” ilk kez 1970 lerde Schofield tarafından ortaya atılmıştır (43). Güncel anlayış olarak niş, yalnızca kök hücrenin yerleştiği mikroçevre olmayıp, aynı zamanda bu bölgede yer alan hücreleri ve karşılıklı iletim sinyallerini de kapsayan karmaşık bir yapı olarak tanımlanır. Kök hücrelerin yakınında çekirdek hücrelerin varlığına bağlı olarak 2 tip niş olduğu belirtilmiştir (44, 45), (Şekil 2.10).



Şekil 2.11. Kök hücreye komşu çekirdek hücrelerin varlığına bağlı olarak tanımlanan niş tipleri. A. Multisellüler Niş: Tipik olarak birbirleri ve kök hücreler ile ilişkili iki ya da daha fazla tipte çekirdek hücresinden oluşur. **B. Asellüler Niş:** Karakteristik özelliği kök hücre yüzeyinde özgül ekstrasellüler matris proteinleri ile ilişkili hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu ile karakterizedir

(Can A. Niche concept and the hematopoietic stem cell niches. Turkish J hematology. 2007;24:95-101.) (44).

Kök hücre ile doku rejenerasyonunun başlaması hasarlı dokunun stres faktörleri ve değişen mikroçevresinden gelen uyarılarla kök hücrelerin hasarlı dokuya göçü ve hareketliliğiyle gerçekleşir. Mikroçevreden salınan suda çözünebilir faktörlerden olan Stromal kökenli faktör-1 (stromal derived factor, SDF-1/ CXCR4 diye de isimlendirilir) ve C3'ün bu mekanizmada etkin olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir (46).

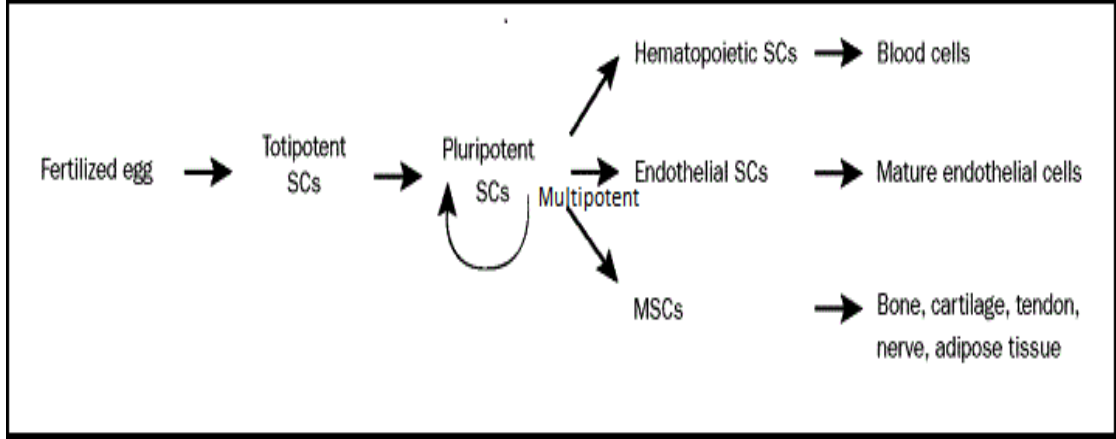
Kök hücrelerin ana işlevlerinden biri de kendini yedekleme ve çoğalmadır. Çoğalma, yedekleme işlemi gerçekleştikten sonra meydana gelir. Kök hücreler çoğalma özelliklerini durdurup sessiz hale gelebilir bunlara **potansiyel kök hücre** ya da **sessiz kök hücre** denir, bu hücreler gerektiği durumda yeniden döngüye girip tekrar çoğalabilirler de, bu hücrelere de **gerçek kök hücre** denir. Kök hücreler de sonsuz çoğalma yeteneğine sahip değildir. Hücrelerin bölünme yeteneğini ve dolayısı ile ömrünü belirleyen etkenlerden en önemlisi doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve "telomer" adı verilen kısa DNA tekrar dizileri (insanda TTTAGG) ve bunların beraberindeki protein yapılarıdır. Telomerin ana işlevi kromozom uçlarının parçalanmasını, dağılmasını ya da diğer kromozom uçları ile birleşmesini engelleyerek kromozomu genetik değişikliklere karşı korumaktır. Telomerin bir diğer görevi de mayozda ve çekirdek içerisinde kromozomların organize olmalarında

rol almaktır. Çevresel faktörler, hücre döngüsü ve oksidatif DNA hasarı gibi nedenlerden dolayı telomerik DNA her döngüde bir miktar kısalır. Bu nedenle telomer kısalması hücre bölünmesini sayan bir saat işlevi görür. Bu kısalmayı engellemek için telomer bölgesinde ters transkriptaz telomeraz proteini (hTERT) ve telomeraz RNA (hTR) bölgelerini içeren bir ribonükleoprotein olan telomeraz enzimi bulunur. Her replikasyon sonrası telomer kısalmasını engelleyebilmek için telomeraz enzimi telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3'ucuna takarak kromozom kısalmasını engellemeye çalışır. Somatik hücrelerin çoğunda (yoğun rejenerasyon yeteneği gösteren hücreler hariç) telomeraz aktif değildir. Bu nedenle birçok bölünmeden sonra telomerik bölgede meydana gelen ciddi kayıplar nedeniyle hücre bölünme kapasitesini kaybeder (47). Telomer kısalmasının uzun yaşayan memelilerde, erişkin kök hücrelerinin ve lenfositlerin sürekli çoğalmalarını denetleyen bir kontrol noktası mekanizması olduğu düşünülmektedir. Uzun yaşayan türlerde telomer kontrol noktaları tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak da çalışmaktadır. Somatik hücrelerde durum böyle iken, insan germ, tümör ve kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği çok yüksektir. Bu nedenle **telomeraz etkinliği kök hücrelerin bir belirteçidir** ve telomeraz aktivitesinin yüksekliği çoğalabilme ve kendini yenileyebilme yeteneğini sağlar (48, 49).

Kök hücre belirteçlerinden biri olan C-kit (CD117) dokuya özgü birçok kök hücre çeşidinde ekspres edilen bir reseptör tirozin kinaz olup bir onkogendir. Hematopoetik hücrelerin proliferasyon, diferansiyasyon, büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynar. Tümör ortaya çıkmasında, yayılması ve rekürrensinde anahtar rol oynar. Stem cell faktör (SCF), c-kit'in ligandı olup, hematopoetik bir stokindir (50). SCF/ c-kit sinyal yolunda oluşan bozukluklar gastrointestinal stromal tümörleri gibi bazı tip tümöral oluşumlarla ilişkilidir (51). SCF fertilizasyon, hematopoez, melanogenez gibi birçok gelişimsel dönemde gereklidir. C-kit'e bağlanan kök hücre faktörü ise Trombosit Türevli Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor-PDGF) ailesinin bir üyesidir ve fibroblast, lökosit, epitel hücresi gibi birçok dokudan salgılanmaktadır (49).

Kök hücrenin özelliklerinden biri olan farklılaşma (diferansiyasyon), özelleşmemiş hücrelerin özelleşmiş hücrelere kaynaklık etmesidir. Bu kavramın

içerisinde totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücre tanımları yer alır (Şekil 2. 11.).



Şekil 2.12. Kök hücrelerin gelişim hiyerarşisi ve insan Mezenkimal Kök Hücrelerinin (MKH) tedavi potansiyelleri

(Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ, Khosla S. Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. Mayo Clinic proceedings. 2009;84 (10):893-902'den uyarlandı)

Totipotent bir hücre tam bir bireyi oluşturabilecek kök hücre kavramıdır. Vücuttaki tüm hücelere dönüşebilme potansiyeline sahip, sınırsız farklılaşabilen bu hücreler erken embriyonik dönemin ilk 8 hücresidir (blastomerler). Erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde blastomerler blastokist denilen içi boş hücre topluluklarına dönüşürler. Blastokist, trofoblast denilen dış tabaka, blastosöl denilen iç boşluk ve embriyoblast adı verilen iç hücre külesinden (inner cell mass- (ICM)) oluşur. ICM'den oluşan hücreler vücudun her üç embriyonik germ tabakasından (endoderm, ektoderm ve mezoderm) köken alan pek çok hücre çeşidine kaynaklık edebilirler. Bu hücreler **pluripotent** hücreler olarak adlandırılır. Pluripotent hücreler gebeliği destekleyen plasenta ve benzeri hücelere de kaynaklık ederler ancak kendilerinden yeni bir birey meydana gelmez. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde biraz daha özel görevlere sahip başka kök hücre tipleri oluşur. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücre tiplerine **multipotent** kök hücre adı verilir. Bu hücreler tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Bunlara örnek olarak hematopoetik kök hücre, endotelial kök hücre ve mezenkimal kök hücreler verilebilir (52, 53).

Farklılaşma kavramının içerisinde **plastisite** (dönüşüm yeteneği) olgusu da yer alır. Plastisite, bir hücrenin köken aldığı doku dışındaki dokulara farklılaşabilme özelliği olarak tanımlanır. Herhangi bir dokudaki kök hücrelerin farklı doku veya organlardaki özelleşmiş hücrelere dönüşebilmeleri ya bu hücrelerin ihtiyaç durumunda değişik işlevler görebilecek in-vivo programlanma yetisine sahip hücreler olmaları ya da aynı özelliklere sahip farklı bölgelerdeki multipotent hücreler olmaları ve gerektiğinde kullanılacak rezerv olmaları ile açıklanabilir. Bir kök hücrenin plastisitesinden bahsedebilmek için; tek bir hücrenin birden fazla hücreye dönüşebilmesi, in vivo ve in vitro olarak dönüştüğü hücrenin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi ve nakledilen hücrede kalıcı olması gerekmektedir (54).

Yukarıda sayılan kök hücre ölçütlerinin tümüne herhangi bir zaman diliminde sahip olan hücrelere **gerçek kök hücreler**, tüm özellikleri taşıdığı halde belirli durumlarda bu özellikleri göstermeyen hücrelere ise **potansiyel kök hücreler** denir (55). Kök hücreler bu özellikleri sayesinde canlı organizmadaki sayılarını sabitleyip gerekli durumlarda farklılaşarak ihtiyaç duyulan hücrelerin çoğalmasını, gelişmesini ve olgunlaşmasını sağlarlar. Sadece tanımlanan belli bir veya iki hücre tipine dönüşebilen ve kendini yenileyemeyen hücrelere ise **bağlı-öncül (committed/progenitör/prekürsör) hücre** denir. Kök hücrelerde bölünme olduğunda en az bir hücre kaynak hücre ile aynı özellikleri taşır. Öncül hücrelerde ise bir kez bölünme olduğunda kaynak hücrenin özelliklerinin sadece bir kısmı diğer hücrelerde gözlenir (53).

Kök hücrenin kendini yenileme (self-renewal), çoğalma (proliferasyon) ve farklılaşma (diferansiyasyon) mekanizmalarını belirleyen süreçlerin anlaşılması kök hücre biyolojisinin temelini oluşturur. Herhangi bir kök hücrenin izleyeceği yolun belirlenmesini sağlayan olaylar zinciri kısaca şöyle şematize edilebilir:

- 1. İlk Sinyal (Başlangıç Sinyali):** Dışarıdan bir uyarı yada bir sinyal (kemokin, sitokin ya da adezyon reseptörleri) ile yazılım (transkripsiyon) faktörlerinin farklılaşmayı başlatması.
- 2. Kromatinin Yeniden Yapılanması:** Yazılım faktörlerinin etkisiyle çekirdekte yeniden düzenlenmelerin olması.

3. Yazılımın Uyarılması: DNA'ya daha çok sayıda yazılım faktörünün bağlanması.

4. Yeni Gen İfadelemesi: Çekirdek DNA'sının işlevsel yapısı tamamen değişir ve bunun sonucunda farklı genlerin ifadelebilen hale gelmesiyle kök hücreden farklılaşan yeni hücre tipinin oluşması.

Kök hücrenin farklılaşma-dönüşüm yolu olarak bahsedilen bu olayların tümü hücre döngüsü boyunca olmaktadır. Kök hücre farklılaşması hücre döngüsünün değişik dönemlerinde ve bu döneme özgü sitokinler, kemokinler ve adezyon reseptörleri gibi faktörlere bağlı olarak gelişmektedir (52, 56).

2.7.3. Kök Hücre Tipleri ve Kaynakları

Rejeneratif tıpta hücreler otolog veya heterolog şeklinde elde edilip normal doku veya kök hücre kaynağı şeklinde kullanılabilir. Hücre tedavisinde kullanılan kök hücreler farklı kaynaklarda farklı sınıflandırılmış olsada üroloji kaynaklarında genel olarak üç ana kategoride incelenmiştir (57). Bunlar;

- a.** Embriyonik Kök Hücreler
- b.** Fetal ve Yenidoğan Amniyotik Mayi ve Plental Kaynaklı Kök Hücreler
- c.** Erişkin Kök Hücreleri

şeklinde üç ana başlıkta kategorize edilmiştir. Fetal ve yenidoğan amniyotik mayi ve plenta multipotent hücreler içerdiğinden kök hücre tedavisinde kullanımı gündeme gelmiştir. Erişkin kök hücreleri organ veya kemik iliği biyopsilerinden elde edilmektedir. Kök hücrelerin temel olarak üç önemli özelliği tanımlanmıştır. Kendi kendini yenileyebilme (**self-renew**), değişik hücre tiplerine farklılaşabilme (**differentiation**) ve kolayca çoğalabilme (**reproductible**) dir. Yakın geçmişte birçok kök hücre elde etme teknikleri tanımlanmış ve bu konuda çalışmalar hala çok hızlı şekilde devam etmektedir.

2.7.3.1. Embriyonik Kök Hücreler (Embryonic Stem Cells- ESCs)

Embriyonik kök hücreler blastokist içinden veya son zamanlarda bu blastokistlerden tek hücre şeklinde elde edilir. Embriyonik kök hücre embriyonun blastokist aşamasında ICM'den ayrıştırılan ve in vitro şartlarda pluripotent özelliğini yitirmeden sınırsız sayıda bölünebilen hücredir. Embriyonik kök hücreler ilk; 1981 yılında fare blastokistlerinin ICM'den farklılaşmadan sürekli çoğalan hücreleri elde etmesi ile ilk kez tanımlanmış (6) ve insan embriyo hücrelerinde pluripotent hücrelerin bulunmasıyla “ insan embriyonik kök hücre” terimi ortaya çıkmıştır (58). 1998 yılında Thomson ve arkadaşları (7) in vitro fertilizasyon (IVF) yöntemiyle elde edilen embriyolardan ilk insan embriyonik kök hücre serilerini elde etmişlerdir.

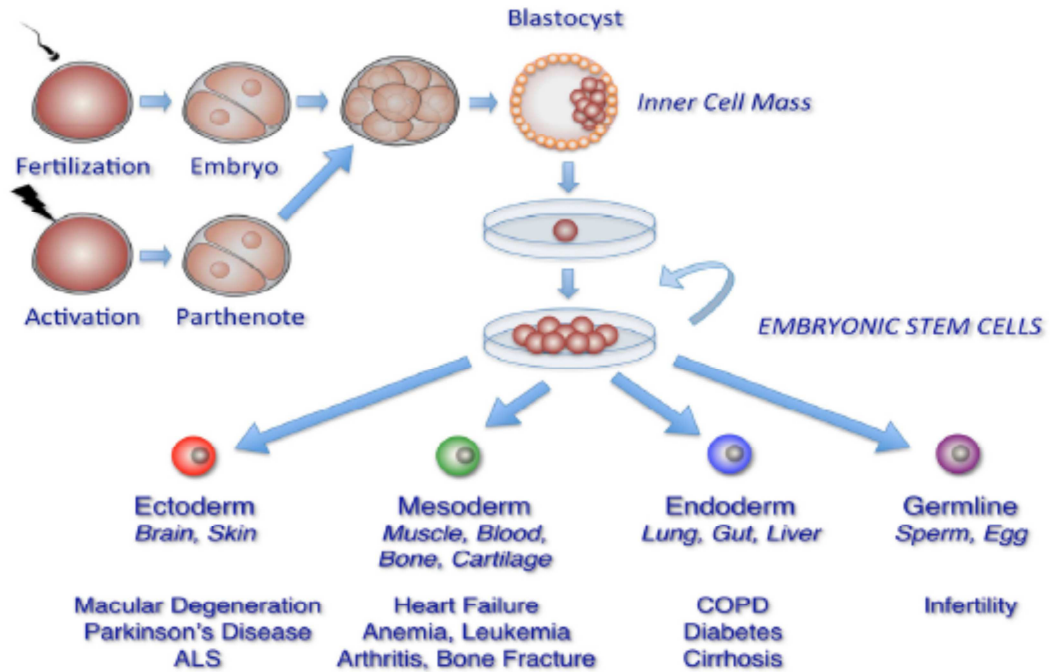
Thomson ve arkadaşları ECS'lerin üç önemli özelliğini tanımladılar, bunlar; bu hücreler preimplantasyon evresindeki embriyodan elde edilmeleri, farklılaşmadan çoğalabilme özelliklerini uzunca bir dönem sürdürebilmeleri, çok uzun süreler kültüre edilmelerine rağmen üç germ tabakasının türevlerini de oluşturabilme potansiyellerini devam ettirebilmeleridir. ECS'lerin elde edilmesinde kullandıkları yöntem ise özetle; Kompleman aracılı immuno aracılı yöntemle 6 günlük blastokist evresindeki embriyonun dış trofoektoderminin uzaklaştırılması ve hasarsız bir ICM'in oluşturulması, bunu takiben ICM gama ışınlarına maruz bırakılıp ormitomicin-C ile muamele edildikten sonra fare embriyonik fibroblastlarına ekildi. Ekilen hücreler yüksek serum konsantrasyonlu besi yerlerinde kültüre edilerek günler sonra ECS kolonileri oluşturulmuştur (Şekil 2.11).

Her ne kadar 1981 de Martin tarafından insan ESC terimi tanımlanmış olsada ESC'in tüm hücre tiplerine (pluripotensi) dönüşebildiği ve işlevsel olduğu yalnızca farelerde kesin olarak gösterilmiştir. İnsan ESC çalışmalarında birçok hücre tipinin olduğu gözlenmiş ancak bunların işlevselliği gösterilemediği gibi halen oluşturulamayan birçok hücre tipleri de mevcuttur (57).

İnsan ESC'in etik kaygılar nedeniyle in vivo olarak insan embriyosunda çeşitli dokulara farklılaşmasını gözlemlemek mümkün değildir. Bu nedenle insan ESC'in bağışıklık yetmezliği olan bir hayvana verilerek farklılaşma örgülerinin gözlemlendiği bir çalışma yapılmış ve bu çalışmada iyi huylu teratomların olduğu

gözenmiştir (7). Teratomlar üç germ tabakasından da hücreler içeren (59) ancak organize olmamış, eksen ve vücut planı oluşturamamış, içerisinde embriyonik karsinom özelliklerini barındırmayan hücreler topluluğudur. Bu çalışmadan sonra farklı araştırma modelleri de denenmiş ve yukardaki çalışmanın aksine insan ESC'yi belli bir yere kadar farklılaştırılarak hayvanlara uygulandığı durumlarda organizmada teratomların oluşmadan işlevsel hücreleri oluşturabildikleri gösterilmiştir (60).

ESC'ler ile ilgili bilgilerimizin birçoğu fare embriyo kültürlerinin çalışılması ile elde edilmiştir. İnsan embriyo kültürü çalışmaları durdurulmadan önce elde edilen 19 adet normal hücre serisi ile preimplantasyon genetik incelemesinde mutant olduğu belirlenmiş embriyolardan elde edilen genetik bozukluğa sahip (Fankoni anemisi, Frajil15X vb.) 18 adet ESC serilerinin çalışılması ile insan kaynaklı veriler de elde edilmiştir (61).



Şekil 2.13. Embriyonik Kök Hücre Elde Edilmesi ve Farklılaşmasının Şematize Edilişi

(Yabut O, Bernstein HS. The promise of human embryonic stem cells in aging-associated diseases. Aging. 2011;3 (5):494-508'dan, 2011)

ESC'ler özetle; sürekli yenilenebilir ve üç embriyonik germ tabakasının hepsine değişim gösterebilme özelliğine sahiptir (59). Cilt ve nöron teşekkülü;

ektodermal diferansiasyonu (62), kan, kalp hücreleri, kartilaj, endotelial hücreler ve kas teşekkülüne sahip olması; mezodermal diferansiasyonu (63), pankreatik hücre oluşumu; endodermal diferansiasyonu (64) gösterdi. Kültürde uzun ömürlü oldukları ve yayınlanan protokollere göre 80 pasajda dahi bu durumlarını koruyabildikleri gösterildi (7, 65).

Bu özelliklerinden dolayı kök hücre tedavisi için her ne kadar ideal bir kaynak gibi görülsede etik sıkıntılarının yanında embriyonik kök hücrelerin allojenik olarak kullanılabilirdiğinden immün reaksiyon oluşturmaları, nakledilen dokuda potansiyel olarak kanser hücrelerine dönüşebilme ihtimalleri kullanımını kısıtlayan önemli etmenler olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.7.3.2. Amniyotik Mayi ve Plesental Kaynaklı Kök Hücreler (Amniotic Fluid and Placenta Derived Stem Cells- AFPS)

Gelişen fetüs kaynaklı amniyotik mayi ve plesental membran farklı popülasyonlara sahip hücre tiplerini içerir. Bu farklı popülasyonlar mezenkimal kök hücreleri içerir. AFPS hücreleri kendini yenileyebilme ve her üç germ tabakasından oluşabilme özelliklerine sahiptirler (66). AFPS hücreleri amniyotik sıvı ve plesentanın yaklaşık %1'ini oluştururlar. Diferansiye olmayan hücreler herhangi bir besleyici tabaka olmadan (asellüler niş) gelişebilir ve 36 saatte bir ikiye katlanırlar. hESC'den farklı olarak in vivo ortamda kitle şeklinde bulunmazlar. Bu hücrelerin kullanımı gündeme geldikten sonra bu dokuların kıkırdak, böbrek ve akciğer diferansiasyonu gösterdiğine dair çalışmalar yayınlandı (57). 2007 yılında da De Coppi ve ark. AFPS lerden elde ettikleri kas hücrelerinin kompensatuar mesane hipertrofisini engellemede etkili olduğunu gösterdi (67).

Bu hücreler adipojenik, osteojenik, miyojenik, endotelial, nöron benzeri ve hepatik hücre tiplerine dönüşmek üzere tüm embriyonik germ tabakalarına değişim gösterebilirler. Bu hücreler, değişim gösterdikleri hücelere spesifik olan markırları ekspresse ederler. Bu özelliklerine bakıldığında bu hücreler multipotent kök hücreler olarak kabul edilirler. Bu özelliklerinden dolayı bu hücreler embriyonik ve erişkin hücreler arasında bir hücre grubu olarak kabul edilebilir. Embriyonik hücreler gibi

teratom formasyonu göstermezler. Bu hücreler fetustan amniyosentez veya koryonik villus örnekleme şeklinde yada doğum sonrası placentadan elde edilebilir ve kök hücre bankalarında saklanabilirler (57).

2.7.3.3. Erişkin Kök Hücreler (Adult Stem Cells- ASCs)

Bir doku ya da organda bulunan farklılaşmamış, kendisini yenileyebilen, içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen hücrelere erişkin kök hücreler (ASC) adı verilir. Bu hücrelerin gerçekte görevleri dokunun devamlılığını sağlamak ve hasarlanma durumunda dokuyu tamir etmektir. ASC, somatik kök hücreler veya doku spesifik kök hücreler şeklinde de isimlendirilirler. Organizmada kök ve öncül hücrelerin sayısı yaş ile ters orantılıdır (11). Bu nedenle vücudun yenilenme yeteneği yaş ilerledikçe erişkin kök hücrelerin sayısı ile orantılı olarak azalır (Şekil 2. 14.).

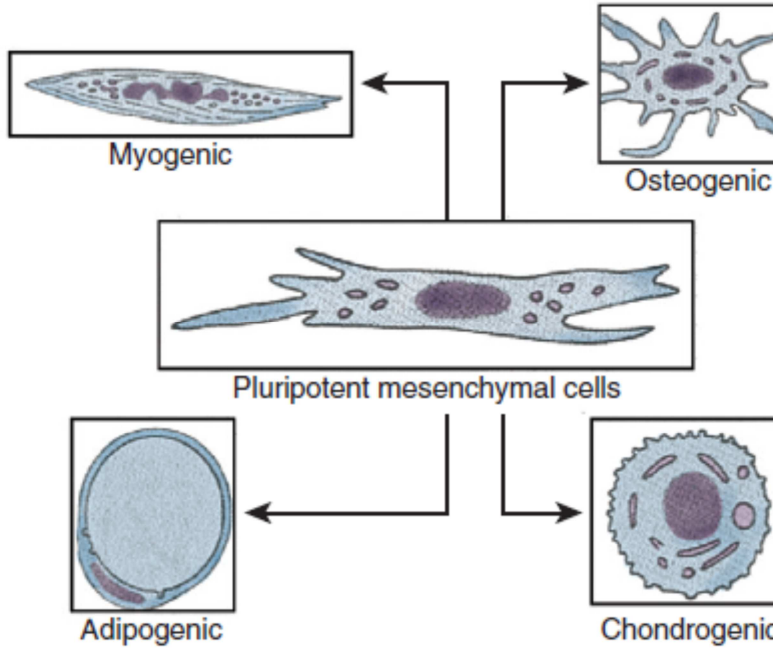
Vücutta dokuların yerine konulması ve yenilenmesinde iki temel mekanizma vardır. Birincisi farklılaşmış hücrenin çoğalma kapasitesinin artmasıdır. Buna örnek olarak karaciğer, iskelet kası, damar endotelial hücreleri verilebilir. Diğer mekanizma ise farklılaşmamış hücrelerin bir sinyal ya da uyarıyla bir sistem dâhilinde farklılaşarak yenilenmeyi sağlamasıdır. Bunun da en iyi örneklerinden biri kök hücrelerdir. ASCs farklılaşmadan önce bağlı-öncül hücreler (committed progenitor cell) olarak kaldıkları dönemde sınırlı çoğalma ve sınırlı fenotipik özelliklerinin imkân verdiği ölçüde bir işleme aşamasından geçerler. Olgun dokulardaki hücrelerin bir kısmı da buldukları çevreye uyum sağlamış, bölünmeden sessiz bekleyen, çeşitli fenotipik ifade özellikleri gösteren bağlı öncül hücrelerdir (68).

ASCs'ler birçok doku ve organdan elde edilmiş olsada özellikle hematopoetik kök hücreleri, kök hücre biyolojisinde en fazla çalışılmış ve en fazla anlaşılmış olanlardır (69). Kemik iliği dışında gastrointestinal sistem, beyin, cilt ve kas dokularından erişkin kök hücreleri elde edilmişse de, dejeneratif hastalıklarda kullanılabilir olma potansiyeli çok yüksek olduğundan erişkin kök hücrelerin diğer erişkin dokulardan elde edilmesiyle ilgili çalışmalar hızı bir şekilde devam etmektedir (57). Allojenik organlardan elde edilen ASC tipleri yine aynı organda

oluşan hasarlar için kullanıldığında daha faydalı olacağı düşünülmektedir (70) (Şekil 2. 12.).

ASCs'den farklı olarak onun özelliklerini taşımayan ancak ASC nin özel bir alt grubu olan hücreler Mezenkimal Kök Hücreler (**Mesenchymal Stem Cell- MSC**)'dir. MSC ler Multipotent Erişkin Progenitör Hücreler (multipotent adult progenitor cell) olarak adlandırılır. Bu hücre tipleri ilk olarak kemik iliği stromasından elde edildi (71-73).

MSC'ler ilk olarak osteoblast, adiposit ve kondrosit hücrelerine farklılaşabilme özellikleri keşfedilmiş ve bu şekilde kök hücre tedavisi için kullanılacak önemli bir kaynak olabileceği belirtildi (72). MSC'ler bu hücreler dışında özellikle kemik iliği ve gonadlar hariç nöronal, adipoz, kas, karaciğer, akciğer, dalak ve barsak dokularına dönüşebilmektedir (57, 71, 72).



Şekil 2.14. Doğum Sonrası Dokulardan Elde Edilebilecek Pluropoten Kök Hücrelerin Şematik Gösterimi

(Atala, Anthony, MD - Campbell-Walsh Urology, 568-588.e8 © 2012 Copyright © 2012, 2007, 2002, 1998, 1992, 1986, 1978, 1970, 1963, 1954 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc).

Mezenkimal olmayan ASCs i kültüre etmek çok zor olduğundan erişkin kök hücreleriyle ilgili çalışmalar yavaş ilerlemektedir. Ayrıca karaciğer, pankreas, sinir

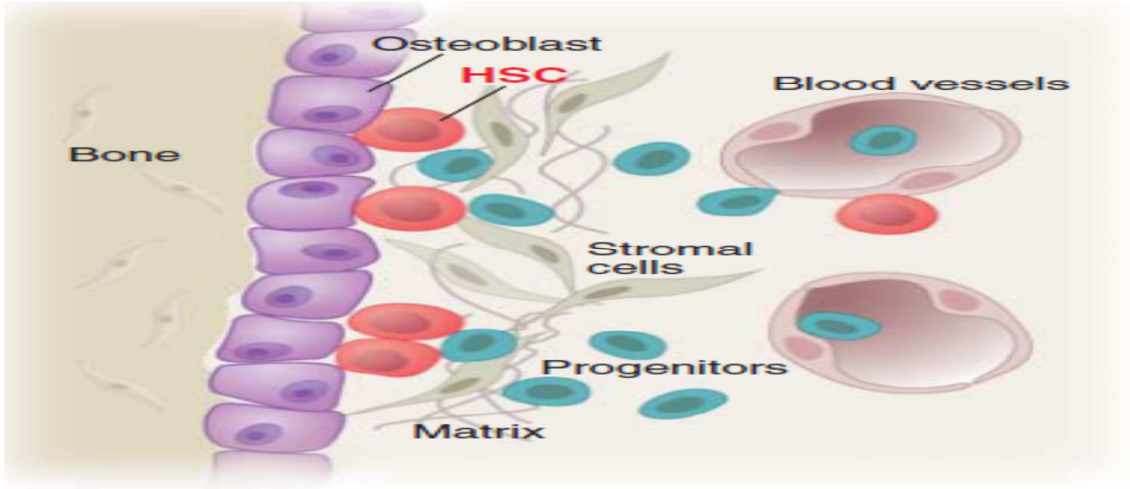
hücreleri gibi hücrelerin in vitro ortamda proliferasyon kapasitesinin çok düşük olması ve kültüre edilen hücrelerin düşük düzeyde fonksiyon göstermesi ve erişkin hücrelerde kök hücre oranlarının düşük olması gibi nedenlerle ASCs le ilgili çalışmalar yavaş ilerlemektedir (57). Fakat ASCs'in immün reaksiyon gibi komplikasyonların olmaması gibi avantajları nedeniyle doku spesifik rejeneratif tedavilerde otolog olarak kullanımları önemli olduğundan bunla ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yukarda bahsedildiği üzere birçok erişkin kök hücre tariflensede bunlardan klinik kullanıma giren ve ilk kullanılan olması nedeniyle bilineni en fazla olan ve kök hücre çalışmalarının temelini oluşturan **Hematopoetik Kök Hücreler** ve bir çok doku ve organdan elde edilmesi mümkün olan ve yapmış olduğumuz çalışmada temel oluşturan **Mezenkimal Kaynaklı Kök Hücrelerin** özelliklerine aşağıda değinilecektir.

2.7.3.3.1. Hematopoetik Kök Hücreler (Hemopoietic Stem Cells-HSCs)

Kemik iliği hematopoetik ve mezenkimal kökenli kök hücreleri içerir. Hematopoez kan kök hücrelerinin üretimi, çoğalması ve periferik kan hücrelerine farklılaşmasıdır. HSC erken embriyogenez sırasında mezodermden türer ve embriyoda kemik iliği, karaciğer ve yolk sak gibi çok özgül hematopoetik bölgelerde bulunur. Erişkinde kemik iliğinden, periferik kandan, kordan kanından izole edilebilir ve monoklonal antikolar kullanılarak saflaştırılabilir. Son zamanlarda ortak lenfoid öncül ve myeloid-eritroid öncül hücreler de izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Kemik iliği kök hücreleri beklenenden daha esnek (plastisite) ve çok yönlü olabilirler çünkü multipotentdirler ve in vitro/in vivo birçok hücre tiplerine farklılaşabilirler (53). İnsan kemik iliği, parankim ve stroma bileşenlerine ayrılmıştır. Parankim ve stromayı oluşturan bu hücreler yapısal ve işlevsel olarak birbirine bağlıdır. Bu bileşenlerin arasındaki, temel olarak endosteal (kemik trabekülüne bitişik) ve vasküler (kapillerlere bitişik) niş kompartmanları olarak değerlendirilen mikroçevre ortamına **HSC Nişi** adı verilir. HSC'nin tüm

hematopoetik hücelere oranı 1:2000 iken, mezenkimal kök hücelerin (MSC) stromal hücelere oranı 1:10.000 ile 1:100.000 arasındadır (11, 44).



Şekil 2.15. Kemik İliği İçerisinde Hemapoetik kök hüceleri ve Niş Hücresel Komponentlerinin Şematik Gösterimi

(Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. Science. 2006;311 (5769):1880-5.) (45)

2.7.3.3.2. Mezenkimal Kök Hüceler

Mezenkimal kök hüceler bağ dokunun temel hüceleridir. MSC, ilk kez 1976 yılında fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Friedenstejn tarafından tanımlandı (73). MSC'leri tanımlamak için koloni oluşturan birim-fibroblast (CFU-F), kemik iliği stromal hücre, multipotent stromal hücre, mezenkimal stromal hücre, kemik iliği stromal kök hücre, stromal öncül hücre, iskelet kök hücre ve multipotent erişkin progenitör hücre (MAPC) isimleri kullanılmıştır.

MAPC tanımını Jiang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MSC kavramı içerisinde tanımlamıştır. Bu hüceler 80 defadan fazla bölünebilen ve mezenkimal öncüllerin dışında endotel, endoderm ve ektodermden oluşan üç germ tabakasında dönüşebilen multipotent hücelerdir. Araştırmacılar MAPC'yi bir blastokistin içine enjekte ettiklerinde tüm somatik dokulara işlevsel olarak katkıda bulduklarını, hasar görmemiş dokuda erken ve güçlü bir yerleşme gösterdiklerini ve in-vitro şarlarda üç germ tabakasına da farklılaştıklarını göstermişlerdir. Bu özellikleri ile

ESC gibi görünen bu hücrelerin bir kısım ESC belirteçlerini de taşıdıkları ancak ESC'den farklı olarak damar içi verildiklerinde tümör oluşturmadıkları gösterilmiştir (71). Dolayısıyla bu verilere dayanarak MAPC'ler tam olarak MSC olmasada MSC'lerin öncül hücreleri olabileceği kanaatine varıldı (74). Diğer tanımlamalara da bakıldığında hiçbirisi MSC'in gelişimsel orijinini ve farklılaşma kapasitesini tam yansıtamadığı için Mezenkimal Kök Hücre (**Mesenchymal Stem Cell- MSC**) ismi halen geçerli olan kullanımdır (75).

MSC'ler bugün özellikle immunoregulator özellikleri ve rejenerasyon kapasiteleri nedeniyle klinik kullanıma girmeleriyle Avrupa birliği (AB) tıp ajansı tarafından İlac Hücre - Cell Drug kapsamına almıştır (12).

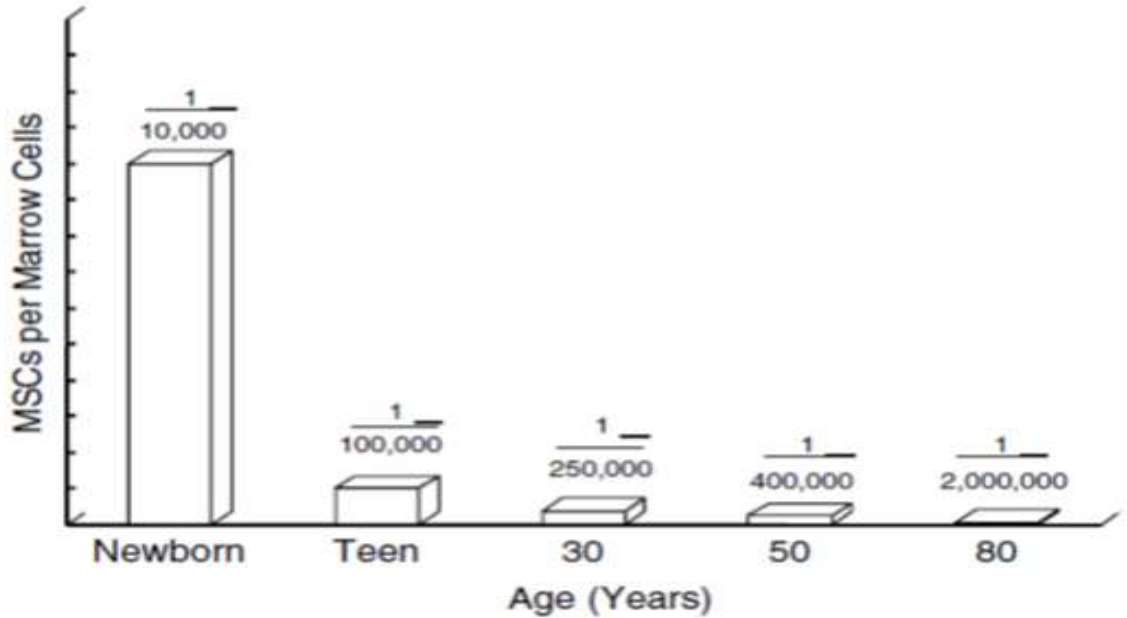
Kemik iliği ve diğer stromal dokulardan köken alan, çeşitli uyarılarla osteoblastik, adipositik ve kondrositik seriyeye dönüşebilen fibroblastoid hücrelere Mezenkimal Kök Hücre (Mesenchymal Stem Cell- MSC) denir (72). Kemik iliği, organizmanın en önemli ve en iyi tanımlanmış mezenkimal kök hücre kaynaklarından biridir ve mezodermden köken alan hematopoietik, endotel ve MSC'leri içerir. Kemik iliği mikroçevresinin bileşenlerinden olan MSC'ler hematopoezin gerçekleştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Stromal kökenli MSC'lerin, MSC'lerin stromaya tutunması, salgıladıkları çeşitli sekretuar faktörler ile hematopoietik progenitör hücrenin olgun hücreye farklılaşması, yine bu salınan faktörlerin inhibisyonu ile kök hücrenin G0 fazında kalarak kendi rezervini oluşturması, kendini yenilemesi, diğer dokulara mobilizasyonu ve migrasyonu gibi farklı biyolojik işlevleri vardır (76, 77).

Memeli kemik iliği mikro çevresi kemik homeostazisi ve hematopoezini destekleyen birçok farklı elementten oluşur. Bu elementlerden biride mezenkimal hücreler olup kas, kan, vasküler ve **ürogenital sistemi oluşturan mezodermal orijinli primordial** hücrelerdir. Bugün mezenkimal hücrelerin hematopoetik karakterli olmayan bir grubunun, mezenkimal ve mezenkimal dışı hücreleri oluşturan kök hücreler olduğu saptanmış olup bu hücrelere Mezenkimal Kök Hücre adı verilmektedir.

Kemik iliğinde her 10.000-100.000 tek çekirdekli hücreden birinin MSC olduğu hesaplanmaktadır (Bu oran kordon kanında 1/108'e kadar düşebilmektedir). Çocuklarda 29 CFU /1 milyon tek çekirdekli hücre oranı varken ileri yaşlarda bu oran 3,2 CFU/ 1 milyon tek çekirdekli hücre oranına kadar inmektedir (78). Bu hücrelerin basit bir kemik iliği aspiratından 10 hafta içinde yaklaşık 50 kez ikiye katlanarak çoğaltılması mümkündür (79).

MSC'ler homojen bir topluluk olmayıp içerisinde değişik kök hücreleri barındırmaktadır. Bu hücrelerin klasik MSC ve hemapoetik kök hücrelerin öncülleri olduğu düşünülmektedir.

Önemli olan bir diğer bulgu da MSC sayısının yaşla ters orantılı olarak değiştiğidir. Yapılan araştırmalar fetal MSC'lerin sadece sayısal açıdan değil erişkin kök hücrelerden doku gelişiminde, hücre bölünmesinde ve immunolojik antijen sunumunda rol oynayan genler açısından da önemli farklılıklar taşıdığını göstermektedir (9-11), (Şekil 2.14).

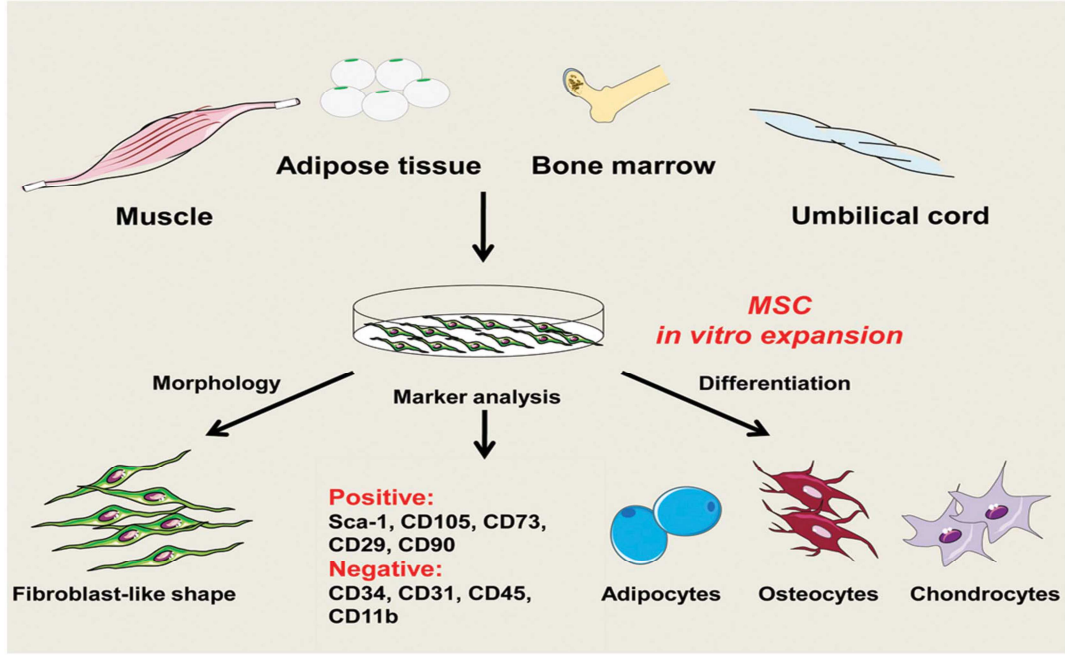


Şekil 2.16. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yaş ile Ters Orantılı Olarak Azalması. İnsan kemik iliği hücresi başına düşen MSC'in, CFU-F (Colony Forming Unit Fibroblast-Koloni oluşturan birim fibroblast) cinsinden yaşlanmayla birlikte azaldığı görülüyor

(Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J Pathol. 2009;217 (2):318-24) (11).

Kemik iliği stroması, retiküler hücreler, adipositler, osteojenik hücreler, düz kas hücreleri, endotelial hücreler ve makrofajları da içeren heterojen bir hücre topluluğundan oluşmuştur. Kararlı durumda ya da doku hasarına yanıt olarak, stromal dokunun yıkım ve yapımı ya da onarımı stromal dokuda bulunan kök hücre topluluklarının katılımı ile gerçekleşir (52). Kemik iliği stroması dışında, MSC'ler birçok organ ve dokuda bulunur. Bu hücreler konnektif doku hücrelerine dönüşerek stromayı oluşturmakta, organ işlevlerinin yürütülmesinde önemli roller üstlenmektedirler. Diş pulpası, kas, kemik, kordon kanı, lipoaspirasyon materyalleri, kordon stroması, deri, amnion sıvısı, periferik kan, sinoviyal sıvı gibi çok çeşitli alanlardan izole edilebilirler. Bu dokulardan elde edilen MSC'lerin kökenleri ne olursa olsun biyolojik ve fonksiyonel özellikleri çok benzerdir (80).

MSC'ler multipotenttir, kıkırdak, kemik, kas, tendon, ligament, adipöz doku, sinir hücreleri, pankreas B hücreleri ve endotele farklılaşabilir. MSC'nin in-vitro ve in-vivo çalışmalarda yalnızca mezodermal değil, endodermal dokulara da kaynaklık edebilen nadir pluripotent hücreler (MAPC) olduğunu gösteren kanıtlar vardır (71). Mezenkimal kök hücreler dokularda az sayıda buldukları için araştırma amaçlı bile olsa in-vitro ortamda çoğaltılmaları gerekir (53, 80). Kemik iliği aspirasyonunda MSC/ mononükleer hücre oranı $2-5 / 10^6$ kadardır (81). Kemik iliğinin toplanmasında kullanılan yöntem, vericinin yaşı, içinde bulunduğu şartlar ve alınan numunedeki öncül hücrelerin sayısı MSC'lerin alt kültürleme (pasajlama) sonrasında farklı çoğalma kapasiteleri göstermelerine neden olur. İn-vitro ortamda çoğalan MSC'ler koloni oluşturan birim fibroblast (colony forming unit fibroblast-CFU-F) adlı homojen fibroblast benzeri hücre toplulukları içerirler (11, 80), (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Mezenkimal Kök Hücrelerin Temel Özelliklerinin Şematik Gösterimi.

Mezenkimal kök hücreleri kemik iliği, adipoz, diş pulpası, kas ve umbilikal kord gibi farklı dokulardan elde edilebilmektedir. İn vitro ortamda çoğaltıldıktan sonra farklı özellikleriyle tanımlamaları yapılabiliyor. Morfolojik olarak fibroblastlara benzerler. MSC'ler ayrıca bir takım yüzey markırları eksprese ederek tanımlanırlar. Bunlardan Sca-1, CD105, CD73, CD29 ve CD90 pozitif, CD31, CD34, CD45 ve CD11b negatif markırlarıdır. Ayrıca şekilde MSC'lerin kondrosit, adiposit ve osteoblast hücrelerine dönüşebildiği şematize ediliyor (Ma, S'den, 2014), (82).

MSC'ler ile yapılan hücre döngüsü çalışmaları hücrelerin büyük çoğunluğunun G0/G1 fazında beklediğini, %10'luk bir kısmının da S+G2+M fazında olduğunu göstermiştir. G0/G1 fazında bekleyen hücrelerin çoğunlukta olması bu hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir. İn-vitro olarak çoğaltılan MSC'lerin özgün yüzey belirteçleri olmamakla birlikte CD34, CD45, CD11b/c vb HSC belirteçleri negatif, CD105 (SH2-Endoglin), CD73 (SH3/SH4), CD44 (HCAM-1), CD90 (Thy-1), STRO-1 (fibroblast yüzey belirteçi), CD106 (VCAM-1) gibi belirteçler de pozitifdir. Mezenkimal kök hücreler birçok büyüme faktörünü (GM-CSF, G-CSF, M-CSF gibi), reseptörlerini, çeşitli interlökinleri (IL-6, IL-7, IL-8, v.b.), reseptörleri, hücre dışı matriks proteinleri (kollegen, fibronektin, laminin gibi) ve adezyon moleküllerini sentezleme yeteneğine sahiptirler (80). Mezenkimal hücreleri diğer hücrelerden ayırmaya yarayan bu belirteç, büyüme faktörleri, reseptör, hücre matriks proteinleri ve adezyon molekülleri mezenkimal kök hücrelerin immunfenotipik özelliklerini oluşturur

(Tablo 2.2). Tüm bu üretim profili birlikte değerlendirildiğinde kemik iliği kökenli MSC'in kendi çoğalmaları ve farklılaşmalarının dışında kendi mikroçevresindeki diğer hücreler için de düzenleyici bir rol oynadığı görülmektedir (11, 76, 77).

Mezenkimal kök hücrelerde immunojeniteyi sağlayan HLA-DR ve ko-stimülatör molekül ifadesi olmadığı için immunojenite düşüktür. İmmünsüpresif etki ise; T lenfosit aktivasyonu, alloreaktif reaksiyonların önlenmesi, B lenfositlerin inhibisyonu, düzenleyici T hücrelerinin uyarılması ve çözünebilen faktörlerin varlığıyla gerçekleşir (11, 83).

Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri ((49, 80, 82, 84, 85)'den derlendi)

Antijen	CD numarası	Ekspresyon
LFA-1	CD11a	Negatif
E-selektin	CD62E	Negatif
P-selektin	CD62P	Negatif
LFA-1 β	CD18	Negatif
Cadherin 5	CD144	Negatif
PECAM-1	CD31	Negatif
VLA- α 4	CD49d	Negatif
Hematopoyetik kök hücre belirteci	CD34	Negatif
Leukocyte common antigen	CD45	Negatif
LPS reseptör	CD14	Negatif
T lenfosit belirteci	CD3	Negatif
B lenfosit belirteci	CD19	Negatif
Lewis X	CD15	Negatif
T6	CD1a	Negatif
Interleukin-2 reseptör	CD25	Negatif
LFA-3	CD58	Negatif veya pozitif
L-selektin	CD62L	Negatif veya pozitif
ICAM-2	CD102	Negatif veya pozitif
ICAM-3	CD50	Negatif veya pozitif
VCAM-1	CD106	Negatif veya pozitif
HLA ABC		Negatif veya pozitif
Transferrin reseptör	CD71	Negatif veya pozitif

Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin immunofenotipik özellikleri (Devamı)

Antijen	CD numarası	Ekspresyon
ICAM-1	CD54	Pozitif
VLA-5	CD49e	Pozitif
ALCAM	CD166	Pozitif
L-Selektin	CD62L	Pozitif
VCAM	CD106	Pozitif
NCAM	CD56	Pozitif
LFA-3	CD58	Pozitif
VLA- α 1	CD49a	Pozitif
VLA- α 2	CD49b	Pozitif
VLA- α 3	CD49c	Pozitif
VLA- β	CD29	Pozitif
Beta 4 integrin	CD104	Pozitif
HCAM-1	CD44	Pozitif
	CD13	Pozitif
Tümör nekroz faktör alfa reseptör	CD120	Pozitif
Fibroblast büyüme faktör reseptör		Pozitif
PDGFR	CD140a	Pozitif
Transferrin reseptörü	CD71	Pozitif
HLA DR		Negatif
Thy-1	CD90	Pozitif
Endoglin, SH2	CD105	Pozitif
5'terminal nükleotidaz (SH3)	CD73	Pozitif
SH4	CD73	Pozitif
Thy-1	CD90	Pozitif
Interleukin-1 reseptör	CD121	Pozitif
Interleukin-3 reseptör	CD123	Pozitif
Interleukin-4 reseptör	CD124	Pozitif
Interleukin-6 reseptör	CD126	Pozitif
Interleukin-7 reseptör	CD127	Pozitif
Interferon γ reseptör	CDw119	Pozitif

Mezenkimal kök hücrelerin in vivo olarak değişik uyaranlarla çeşitli hücre tiplerine farklılaştığı ve bu hücrelerin işlev gördüğü birçok çalışma ile gösterilmiştir (11, 55, 72, 80, 82). Mezenkimal kök hücreler farklılaşma potansiyelleri ve immunsupresif etkileri nedeniyle hücre tedavilerde diğer kök hücre türlerine göre daha çok tercih edilirler. MSC'in hayvan çalışmalarında kullanıldığı çok çeşitli doku/organ hasarı ve hastalık modelleri bulunmaktadır. İmmunsupresif etkisi ve özellikle HSC nakillerinde stromal destek sağlaması nedeniyle organ ve doku nakillerinde sıkça kullanılmaya başlanmış, en çok da allojenik transplantasyonlarda Graft Versus Host Hastalığı (GVHH)'ında iyi sonuçlar alınmıştır (86). İmmunsupresif etkisi nedeniyle otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabilceği düşünülmektedir (87). Çeşitli tümörlerin, özellikle enzim bozuklukları gibi kalıtsal hastalıkların ve deneysel lökodistrofi tedavisinde başarılı sonuçlar elde edildiği bildirildi (88).

Mezodermal dokuların dışında diğer germ tabakalarına da farklılaşma gibi yüksek diferansiyasyon potansiyelleri, hasarlı dokuya ulaşmada migrasyon yeteneklerini kullanmaları, transfer kolaylığı, hızlı çoğalma ve dayanıklılıklarıyla gen tedavisi kullanımına uygun olmaları, füzyon yeteneklerinin olması, stromal kaynaklı oldukları için tüm doku hücrelerine destek hücre olarak, fonksiyon ve gelişimlerinde katkıda bulunmaları, enzim defekti olan hastalıklarda enzim üreten hücre olma özellikleri, kemokinler, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile hücre ve /veya dokuda destek hücre olarak onarım yapabilme, immunsupresif ve immunojenitesinin düşük olması nedeniyle doku uygunluğunun aranmaması MSC'lerin hücre bazlı tedaviler arasında umut verici tedaviler arasında ön sıraya çıkmasını sağlamıştır (11, 46, 83, 88-90).

2.8. ÜRİNER SİSTEM REJENERASYONU VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Üriner sistem rekonstrüksiyonu çok eski tarihlere uzanmaktadır. 1888 de Tizzoni ve Poggi üriner sistem rekonstrüksiyonu ile ilgili deneysel çalışmaları başlatmış, 1917'de Neuhof fasyadan mesane augmentasyonunu geliştirmiştir (91). Bu ilk çalışmalardan sonra kırk yıl kadar bir ilerleme kaydedilmezken 1950'lerde Bricker, Kock gibi diğer bilim adamları farklı üriner diversiyon tekniklerini

tanımladılar. Studer ve arkadaşları 1985'de ileumdan ortotopik üriner mesane rekonstrüksiyonunu tanımladı. Bu buluş o zamana kadar tanımlananlar arasında en popüler olanıydı (92, 93). Ortotopik mesane ve ileal kondivit en popüler iki diversiyon tekniği olup, kullanılan barsak segmentine göre farklı komplikasyonlar görülebilmektedir (94).

Doku mühendisliğini ilk olarak 1991'de Narem ve Vacanti greft ve kontrakte yapıların hücre kültürlerinde hazırlanarak doku rejenerasyon ve replasmanı için kullanılabilceğini tanımladılar (95). Aslında doku mühendisliği tarihçesi yüzyılı aşkın zaman öncesine dayanmaktadır. Harrison, Carrel ve Rous 1900'lerin başlarında deneysel çalışmalarda, hücre kültürlerinin vücut dışında da oluşturulabileceğini gösterdiler (96-98). Doku mühendisliği tekniğinin gelişimi ve klinik kullanıma girmesi Gallico, Ricordi, Brittberg ve bir çok tanınmış bilim adamları tarafından sağlandı (99-101). 1999'da Oberpenning ve ark. köpek modellerinde mesane augmentasyonunda hücre bazlı scaffold kullanımını bildirdiler (102).

2006'da Atala ve arkadaşları köpek modelleri üzerinde yapılan bu çalışmayı insan modellerinde uyguladı. Atala ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada nörojenik mesaneli 7 hastada, otolog üretelyal ve kas hücre kaynaklı PGLA/ kollojen scaffoldları mesane augmentasyonunda kullanıldı (103).

2.9. KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN ÜROLOJİK HASTALIKLARDA KULLANIMI

Üriner yollarda rejenerasyon ve rekonstrüksiyona en fazla uyumlu organ mesane olarak görülmektedir. Ancak mesane tümörü gibi en fazla sistektomi endikasyonuna neden malign hastalıklar ve immunityle ilişkili interstisyel sistit, aşırı aktif mesane gibi hastalıklarda otolog rekonstrüksiyon ve rejenerasyonu mümkün olamamaktadır. Bundan dolayı mesane kök hücre teknolojisinde mezenkimal ve allojenik kök hücre deneysel çalışmaları ön plana çıkmaktadır.

2.9.1. Erektile Disfonksiyon Tedavisinde Kök Hücre Uygulamaları

Cinsel ilişki için gerekli olan ereksiyona ulaşmada ve ereksiyonu sürdürmede, en az 6 ay süre ile gözlenen yetersizlik erektil disfonksiyon (ED) olarak tanımlanır. ED prevalansı: 18-29 yaş için %7, 30-39 yaş için %9, 40-49 yaş için %11 ve 50-59 yaş için %18 olarak bildirilmiştir. 40-70 yaş arası erkeklerde birleŐik ED prevalansı %52 olarak bildirilmiştir (104). Ülkemizde 2002 yılında yapılan geniş kapsamlı ED prevalans çalıŐmasında ise toplam ED oranı %69.2 olarak bulunmuştur (105).

ED santral, hormonal ve periferik etki mekanizmaları altında gerçekleşir, burda temel olay cinsel uyarı sonrası korpus kavernozumdaki düz kas elemanlarının relaksasyonu sonrası sin zoitlerin kan ile dolmaya baŐlamasıdır. Bu mekanizmanın oluşumunda nörojenik nitrik oksit sentaz (nNOS), endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), nitrik oksit (NO), siklik guanozin monofosfat (cGMP), Ca⁺² ve tunika albugineanın kendisi rol oynamaktadır.

ED tedavisinde pek çok yöntem kullanılmakla birlikte, fosfodiesteraz inhibitörleri suan birinci basamak tedavi olarak kullanılmaktadır. Ancak PDEİ nitrat tedavisi alan hastalar ve diğer bir takım yan etkileri nedeniyle çoğu hasta için kullanımı kontrendikasyon oluŐurmaktadır. Ayrıca diyabet, hiperlipidemi ve pelvik cerrahiye sekonder gelişen ED de bu tedaviler yetersiz kalmaktadır. Son zamanlarda erektil disfonksiyon ile ilgili olarak biyokimyasal, genetik, fizyolojik, farmakolojik ve histolojik araŐtırmaların moleküler ve doku düzeyinde giderek yođunlaŐması ereksiyon işlev mekanizmasının daha iyi anlaŐılmasını sağlamış ve kök hücre tedavisi gibi yeni tedavi seçeneklerinin gündeme gelmesini sağlamıştır.

Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar bu hastalıklarda kök hücre tedavisinin umut verici olduğunu gösterdi. 2003'de Deng ve ark. yaptıkları çalışmada yaşlı ratlarda BMSCs'nin endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) artışı sağladığını ve erektil fonksiyonlarda artışa neden olduğunu gösterdi (106). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda embriyonel kök hücrelerden beyin kaynaklı nörotropik faktör artışı sağlayarak postprostatektomili ED'li rat modellerinde, BMSCs in tek başına veya eNOS'a dönüşerek yaŐa bağlı ED de, insan BMSCs'leri rat korpus kavernozumlarına naklederek endotelial hücrelere ve SMC lere dönüşerek canlı hücre Şeklinde

kaldığını, postprostatektomi sonrası ED li rat modellerinde BMSCs lerin intrakavernöz enjeksiyonunun ereksiyon fonksiyonlarını arttırdığını, yaşlı ratlarda iskelet kas hücrelerinden (SkMSCs) kavernöz düz kas hücrelerinde ve ereksiyon fonksiyonlarında iyileşme sağladığı gösterildi (107-109). Yine ADSC nin ED de endotel yapısında düzelme yaparak ereksiyona katkı sağladığı, diyabet ve hiperlipidemiye sekonder ED'li deneysel çalışmalarda da gösterildi (110, 111). Bu iki çalışmada hem fonksiyonel hemde nöronal komponentlerde iyileşme izlendi ve ED'nin küratif tedavisi için kök hücre uygulamalarının umut verici olduğu vurgulandı (109).

2.9.2. Böbrek Hastalıklarında Kök Hücre Uygulamaları

Böbrek embriyolojik gelişim ve yapısı itibariyle diğer ürolojik doku tiplerinden daha farklı bir yapıya sahip olup, kök hücre konusunda diğer ürolojik patolojilere nazaran bilineni daha azdır. Her alanda olduğu gibi böbrekle ilgili hücrel ve rejeneratif tıp çalışmaları özellikle son yıllarda hız kazanmış olup, yetişkin ve embriyonik böbrekteki kök hücre alanları, tanımlamaları hala aktif bir araştırma konusudur.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kök hücre özelliği taşıyan hücreler tübüller, interstisyum ve normal böbrek glomerüllerinde bulunmuştur. Şuana kadar kemik iliğinden elde edilen hematopoietik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, endotelial progenitor hücreler, amniyotik sıvıdan elde edilen kök hücreler, akut ve kronik böbrek yetmezliği olan rat modellerinin tedavisi için kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edildiği bir çok çalışmada bildirilmiştir. Embriyonik kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücreler yapay böbrek veya renal bileşenlerinin yapımı için de kullanıldı (112).

Son yıllarda yapılan çalışmalar böbrek hasarı sonrası böbrek kök hücreleri veya progenitor hücrelerin tübüller, interstisyum ve glomerüllerde yer aldığını ve aktif rejeneratif fonksiyonlarını sürdürdüğünü gösterdi. Bu progenitor hücrelerin farklılaşma ve büyümelerinin anlaşılması tedavinin ana basamağını oluşturmaktadır. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalar zaman içerisinde progresyon göstermekte,

geri kalan yaşamlarını diyalize bağılı olarak geçirmek durumunda kalmakta veya böbrek nakli adayı olmaktadır.

Birçok deneysel çalışmalarda hücresele tedavilerin sonuçları başarılı görünsede, bu uygulamalar henüz klinik uygulamalara geçirilebilmiş değıildir. Kök hücre biyolojisi, gelişimsel biyoloji ve doku mühendisliğinde gelişmeler başladıktan sonra böbreğin rejeneratif tedavileriyle ilgili yeni tedavi seçenekleri de gündeme gelmiş ve bununla ilgili çalışmalar başlatılmıştır. Özellikle kemik iliğı kaynaklı kök hücrelerin vücuttaki ki birçok organ hücre türlerine dönüşebildiğı gösterildikten sonra bu çalışmalar hız kazandı.

Kök hücre ve rejeneratif tedavi de ilk kullanılan kemik iliğı kaynaklı hücreler olduğundan, çoğı organ da ilk denemeler kemik iliğinden alınan kök hücreler ile yapıldı. Donör kemik iliğinden alınan hücreler alıcıya transfer edildikten sonra, nakledilen kök hücreler transfer öncesi işaretlenip alıcı dokusunda gösterilerek tedavinin etkinliğı ispatlandı. Bu hücreler ilk çalışmalarda alıcıya karşı cinsten kök hücreler elde edilerek nakledilmiş ve hücrelerdeki kromozom farklılıkları izlenerek, beta-galactosidase, luciferase, and enhanced GFP gibi haberci moleküller veya fonksiyonel değıerlendirmedeki değışiklikler izlenerek alıcı dokusunda ki kök hücrelerin etkinliğı gösterildi (112).

Kemik iliğı kökenli kök hücreler uzak organlara göç edebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Çoğı organda olduğu gibi kemik iliğı kökenli kök hücrelerin böbrek hasarı oluşturulan modellerde renal tübül epitelyum hücrelerine, mezenkimal hücrelere, glomerüler endotelial hücrelere ve podositlere diferansiye olduğu gösterildi.

Kemik iliğı kökenli kök hücrelerden başka MSC lerin etkinliğide yine deneysel olarak sisplatin, gentamicin, iskemi oluşturularak, adriamisin uygulanıp nefrotik sendrom, Alport sendromunun hayvan modeli, glomeruler hasarlı athymic farelerde ve transplante böbrekli rat modellerinde kronik allograft nefropati oluşturularak yapılan deneysel çalışmalarında MSC lerin etkinliğı gösterildi.

MSC lerin tedavi edici etkisini primer olarak VEGF, HGF, IGF-I (113) ve erythropoietin gibi parakrin faktörlerle gösterdiği bildirildi. Heme oxygenase-1 (HO-

1) the SDF- 1-CXCR4/CXCR7 axis ve CD44/hyaluronic asit etkileşimlerinde MSC lerin etkinliğinde ki önemli rol oynadığı gösterildi. Ayrıca glomerüler skleroz da adipositler içerisine intraglomerüler MSC lerin maldiferensiasyonu da gösterildi ADSC lerde BMDSC lere benzer şekilde böbrek hücre rejenerasyonunda kök hücre kaynağı olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edildiği bildirildi. İskemik hasarlanma fare üzerindeki ilerleyici renal fibrozis modeli, cisplatin veya folik asit uygulanarak oluşturulan akut böbrek yetmezliği, farklı domuz tiplerinde aterosklerotik renal arter stenozu ve ratlarda antiglomerular basal membran hastalığıyla oluşturulan akut böbrek yetmezliğinde ADSC lerin hasarı sınırlamada ve renal fonksiyonların düzelmesinde etkili olduğu gösterildi.

MSC ler mezodermal orjinli diferansiye olmamış fakat kıkırdak, kemik, stromal doku, yağ dokusu, tendon ve diğer bağ dokuları gibi mezenkimal doku tiplerine diferansiye olabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. MSC ler kemik iliği hücrelerinin küçük bir kısmını da ihtiva ederler ancak bu hücreler klasik kültürlerden ziyade plastiğe yapışan hücreler şeklinde kültürde izole edilip çoğaltılırlar.

Böbrek kaynaklı MSC lerin allojenik fetal membran kaynaklı MSC lerin ve insan embriyonik MSC lerin de böbrek hasarı sonrası tedavide etkili oldukları gösterildi.

İnsan Amniyotik Kök Hücreleri hem erişkin hemde embriyonik kök hücreler ihtiva eden kök hücre tedavisinde gelecek vaad eden yeni bir kök hücre kaynağı olarak tanımlandı (66). İnsan Amniyotik Kök Hücrelerinin böbreklerdeki tedavi edici etkisi gliserol veya Cisplatin ile oluşturulan akut böbrek yetmezlikli deneysel çalışmalarda, Alport sendromlu fare modellerinde ve tek taraf üreteral obstrüksiyonlu fare modelleriyle oluşturulan akut böbrek yetmezlikleri üzerinde gösterildi (112).

2.9.3. Üriner İnkontinans Tedavisinde Kök Hücre Uygulamaları

Kök hücre uygulamalarının diğer önemli kullanım alanı stres üriner inkontinans tedavisidir. Son birkaç yıla kadar ürolojik patolojilerde kök hücre tedavi uygulamaları, en fazla üretral patolojiler üzerinde çalışılmıştır. Bunun nedeni stres

üriner inkontinans (SUI) ın nedeninin üretraya lokalize fokal bir kas grubu oluşu ve bunun tedavi edilmesi durumunda, hayatı tehdit etmesede yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen stres inkontinansın tamamen düzeleceği hususunda bir fikir oluşmasıdır. Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda SUI tedavisinde sling ve enjeksiyon tedavilerinin yanında, kök hücre uygulamaları umut verici tedaviler arasına girmiştir.

SUI kadınların %20, erkeklerin %18'ini etkileyen, yaş ilerledikçe görülme sıklığı artış gösteren yaşlı kadın populasyonunun yaklaşık %50'sini etkileyen, egzersiz, aksırma ve öksürmeyle idrar kaçırmaya neden olan, yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen hastalıktır (114). SUI etyolojisi multifaktöriyel olup pelvik kasların, bağ dokunun ve ilişkili sinirlerin yaş, hormonal durum ve çocuk doğurma, erkeklerde de en sık prostat cerrahilerine bağlı pelvik taban yapıları ve üretral sfinkterlerin hasarlanması sonucunda ortaya çıkar.

SUI tedavisinde yeni gelişimler sağlayacak metod olarak doku mühendisliği tedavileri gösterilmektedir. SUI için hücre bazlı ilk deneysel çalışmalarda otolog iskelet myoblastları, üretral sfinkter civarına enjekte edildi (115). Daha sonra myoblastlar yerine iskelet kas kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanıldı (116).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda stress inkontinans tedavisinde kök hücre kaynağı olarak kemik iliği stromal kök hücreleri, kas kaynaklı kök hücreler ve adipoz kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır. Carr ve ark. lateral uyluk bölgesinden alınan biyopsilerle kas kaynaklı kök hücreleri (MDSCs) klinik uygulamada kullandılar. İlk çalışmada 8 hastada midüretraya ve eksternal üretral sfinktere, periüretral ve transüretral yolla MDSC enjeksiyonu uyguladılar. İki hastada belirgin düzelme izlendi. Düzelme izlenmeyen iki hastada 8mm'lik iğneler kullanılırken, düzelme izlenen hastalarda 10mm'lik iğnelerin kullanıldığına dikkat çekildi. O yüzden bu çalışmada kök hücre transferinin uygun şekilde yapılmasının önemi vurgulandı (117).

Yağ doku kaynaklı kök hücre (ADSC)'lerin, SUI'daki etkinliğini Lin ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları hayvan modeli çalışmalarında gösterdiler. Bu çalışmada ADSC'nin intraüretral enjeksiyonu ve tail ven enjeksiyonu şeklindeki kök

hücre nakil şekilleri karşılaştırıldı ve benzer sonuçlar verdiği gözlemlendi. Yine aynı çalışma da kök hücrelerin hasarlı rat üretralarında, sadece sellüler düzeyde değil aynı zamanda ekstrasellüler (elastin) olarakta düzelme sağladığını gösterdiler (118). SUI lı hayvan modelleri üzerinde yapılan bu çalışmalarda, kök hücre tedavisi sonrası idrar tepe akım basıncı ve üretral sfinkter kas liflerinde kontraktilite artışı olduğu izlendi. Orta üretraya transfer edilen bu kök hücreler sellüler ve ekstrasellüler düzeyde etki yaparak, düz kas ve rabdosfinkter kontraktilitesini arttırdığı gösterildi. Bu çalışmalar ve benzer sonuçlu çalışmalar neticesinde SUI tedavinde kök hücre tedavisinin kür amacıyla kullanılabileceği belirtilmektedir (109).

3. MATERİYAL VE METODLAR

3.1. ÇALIŞMA DİZAYNI VE DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışma için Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Denev Çalışmaları Etik Kurulundan 02.12.2013 tarih ve 2013/64 sayılı Etik Kurul Onayı alındı.

24 adet 12 haftalık Sprague-Dawley tipi ratlar Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hayvan Laboratuvarından temin edildi. Tüm ratların beslenme, bakım, tedavi uygulamaları ve izlemleri yine aynı laboratuvar tarafından sağlandı. Tüm ratlara istediği kadar kullanabilecekleri su kaynağı, gıda ve gerekli ısı, nem ayarlarının sağlandığı 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde düzenlenmiş odalarda tutuldu.

6 rat kontrol grubu olarak diyabet oluşturulmaksızın, geriye kalan 18 rata ise 45 mg/kg Streptozosin-STZ (Sigma-Aldrich) uygulanarak diyabet grubu ratlar oluşturuldu.

Diyabetik rat oluşturma prensibi pankreatik beta hücrelerinin harap edilerek hiperglisemi oluşturulması prensibine dayanır. Bunun için STZ veya alloxan en sık kullanılan ajanlardır. Çalışmamızda kullandığımız STZ antineoplastik aktiviteyle alkalizasyon özelliğine sahip bir ajan olup, bu özelliğiyle glukoz taşınmasını engeller ve yüksek doz uygulandığında DNA zincirinde kırılmalara yol açar. STZ uygulaması, pankreas beta hücre harabiyeti ve hipoinsülinemi sonrası, normal genetik yapıya sahip Tip1 DM modelleri oluşturmada kabul görmüş ve yaygın kullanılan bir yöntemdir. Hem tekrarlanabilir hemde hipergliseminin sürdürülebilir olması nedeniyle diyabet komplikasyonlarının ortaya çıkarılması ve değerlendirilmesinde iyi bir yöntemdir. Yapılan çalışmalarda STZ ile oluşturulan Tip 1 diyabetik rat modellerinde ki mesane disfonksiyonunun, insanlardakine benzer klinik özellikler sergilediği yapılan deneysel çalışmalarda gösterildi (119-121).

Haftalık kan şekeri takibi yapılarak ratların diyabetik kaldıkları kontrol edildi. Vücut ağırlıkları ve kan şekeri takipleri haftalık düzenli şekilde yapıldı. Herhangi bir

zamanda ölçülen kan şekeri değeri 240 mg/dL'nin altında olanlar çalışma dışı bırakıldı.

Diyabet oluşturulduktan 12 hafta sonra ratların işeme davranışları (miksiyon süreleri arasındaki zaman ve işenen volüm) değerlendirildi. Normal ratların tamamı ve 18 adet diyabetik ratlardan rasgele seçilen 6 adet ratın işeme davranışları izlendi. Normal ratların tamamının işeme aralığı 6 dk'dan az iken, seçilen diyabetik ratların tamamının işeme aralığı 10 dk'dan uzun olarak ölçüldü. İzlem sonuçları 12 haftalık diyabetik ratlarda underaktif mesane geliştiği yönündeydi.

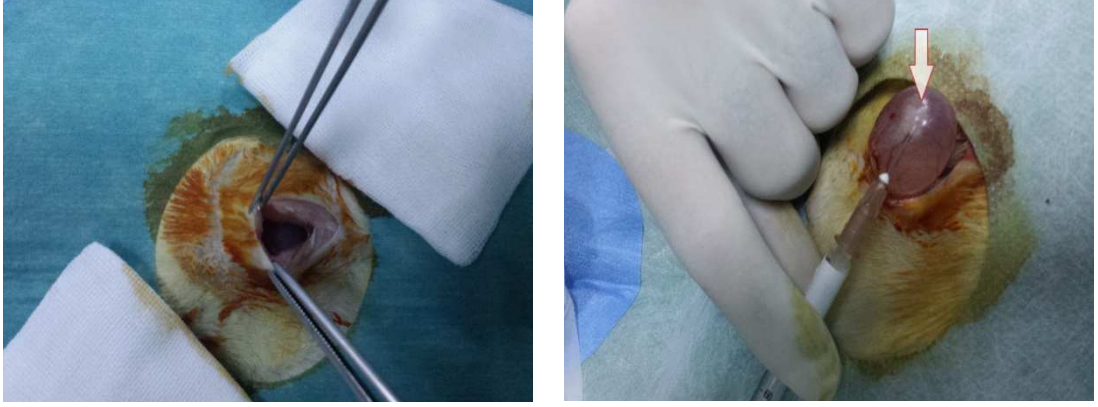
İşeme davranışları değerlendirildikten sonra ratlar 6'lı gruplar şeklinde 4 gruba ayrıldı. Ratlardan 1. grup diyabetik olmayan sağlıklı normal rat (NR) diğer 18 DM'li ratlarda 6'lı gruplar şeklinde 3 diyabetik gruba (DM) ayrıldı.

İşeme davranışı sonrası (STZ sonrası 12. haftada) gruplara ayrılan ratlardan diyabetik olanlar underaktif mesaneli olarak kabul edildi ve tedavi protokolünün uygulanması için kontrol grubu dahil tüm ratlar laparotomiyle açılarak mesaneleri ekpoze edildi, mesane duvarlarına daha öncesinde tariflendiği şekilde (122) PBS ve kök hücre enjeksiyonları uygulandı (Şekil 3.1).

Ratlardan 1. NR grubu mesane duvarına PBS enjeksiyonu, 2. DM grubu mesane duvarına PBS enjeksiyonu (Sham), 3. DM grubuna intra peritoneal olarak kök hücre enjeksiyonu, 4. DM grubu mesane duvarına kök hücre enjeksiyonları uygulandı ve gruplar aşağıda ki şekilde adlandırıldı;

1. Grup NR + PBS (PhosphateBuffered Saline)
2. Grup DM + PBS
3. Grup DM + IP (Intra Peritoneal)
4. Grup DM + D (Detrusor)

1. Grup kontrol grubu kabul edilirken, 3. Gruba IP enjeksiyonu öncesi diğer ratlara uygulandığı gibi laparotomi ve mesanenin ekspoze edilmesi işlemi de uygulandı.



Şekil 3.1. (A), Mesanenin ekspoze edilişi ve (B), mesane duvarına PBS ve kök hücre tedavisinin uygulanışı

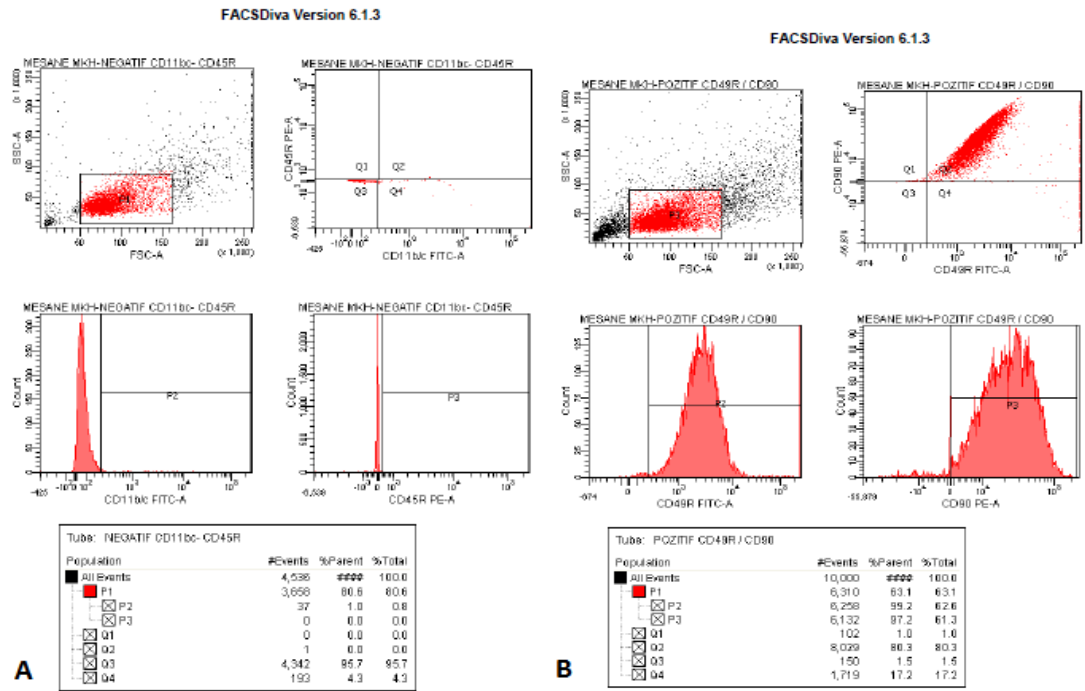
Kök hücreler güneş ışığına maruz kalmayacak şekilde muhafaza edildi. Mesane duvarına enjeksiyon uygulandıktan sonra, mesane duvarında oluşan halo görünümü ok işaretiyle gösteriliyor.

Cerrahi işlemden sonra tüm ratlar ayrı kafeslere alındı, normal bakımlarına devam edildi. PBS ve kök hücre enjeksiyonlarından 4 hafta sonra (STZ uygulanmasından toplam 16 hafta sonra), ürodinamik değerlendirme amacıyla tüm ratlara daha önceki çalışmalarda tariflendiği şekliyle (123) cerrahi olarak sistostomi katateri yerleştirildi, katater yerleştirildikten en erken 72 saat sonra ürodinamik ölçüm yapıldı. Tüm ürodinamik değerlendirmeler iki gün içerisinde tamamlandı, veriler kaydedildi. Ardından ratlara ötanazi uygulanarak mesaneleri histolojik inceleme amacıyla çıkartıldı.

3.2. YENİDOĞAN MESANESİNDEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLME METODU

Yenidoğan Sprague-Dawley erkek rat derin ketamin ve ksilasın anestezisi altında mesane bölgesi çıkarılıp Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Lonza, Belçika) besiyerine alındı. Explant yöntemi ile T25 flasklara materyal yerleştirildi. 15-20 dakika %5 CO2 inkübatörde bekletildi. Üzerine %20 Fetal bovine

serum (Lonza, Belçika), %2 L-Glutamine (Lonza, Belçika), %1 Penicilin, Streptomycin, Amphotericin (Biological Industries, İsrail) ve %77 (DMEM) eklendi. Üç günde bir besiyeri değişimi yapıldı. Hücrelerin gelişimi Leica invert mikroskobu (Leica, Almanya) ile gözlemlendi. 15 gün sonra hücrelerin gelişimi de göz önünde bulundurularak pasaj işlemi yapıldı. İkinci pasaj sonunda hücreler CD11b/c (BD, USA), CD45 (BD, USA), CD49 (BD, USA), CD90 (BD, USA,) yüzey markerlarına göre flow sitometri cihazında (FACSAria III,USA) tanımlandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kök hücrelerin (A), negatif (CD 11 a/b, CD 45R) markırlara göre (B), pozitif (CD49R, CD90) markırlara göre flow sitometri de okutulması

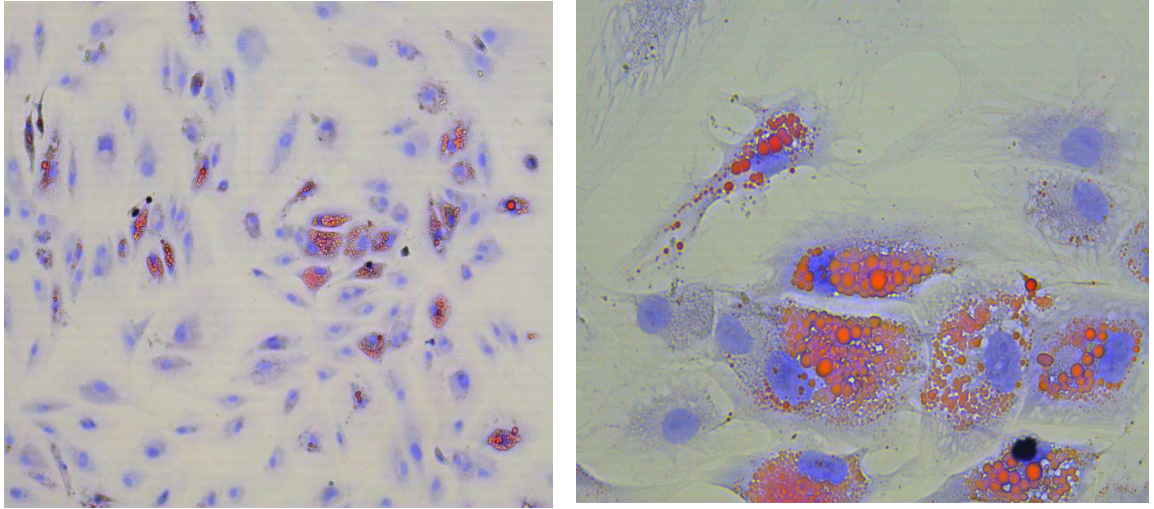
Hücrelere kültürden çıktıktan sonra 24 C derecede 1200 RPMR de 5 dk yıkama işlemi uygulandı. Supernatan kısmı atılarak pellet kısmının kalması sağlandı. 10 bin hücreye 1 mikrolitre antikor konuldu. Karanlık ortamda +4 derecede 40 dk inkubasyon uygulandıktan sonra 2 kez 1200 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 300 mikrolitre PBS konuldu ve flow sitometri cihazında okutuldu.

İkinci pasaj sonrasındaki hücreler farklılaşma yöntemleriyle adiposit, osteosit, kondrosit hücrelerine farklılaştırıldı. Countess® Automated Cell Counter (İnvitrogen,USA) cihazında hücrelerin hem sayısına hem de canlılığına bakıldı.

İkinci pasaj sonrasındaki hücreler bromo-deoksiüridin (BrDU) ile boyandı, BrDU ile boyanan hücreler 2.10^6 olacak şekilde 300 mikrolitre içinde PBS ile mesane duvarına enjekte edildi (Şekil 3. 1).

3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Adiposit Farklılaşma Metodu

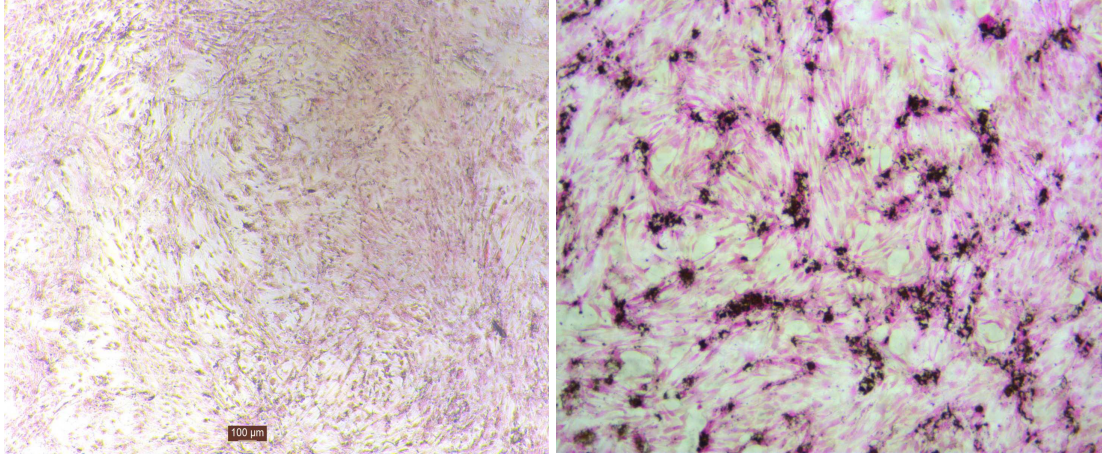
Adiposit farklılaşma için Adiposit Diferansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA) kullanılacak. İkinci pasaja gelen hücreler adiposit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılarak üçüncü hafta sonunda Oil Red (Diagnostic BioSystem, USA) ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Yağ hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülendi ve yağ hücreleri belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Adiposit farklılaşmanın oil red boyama ile (A),10X4 büyütmede (B) 10X40 büyütmede gösterimi

3.2.2. Mezenkimal Kök Hücre Osteosit Farklılaşma Metodu

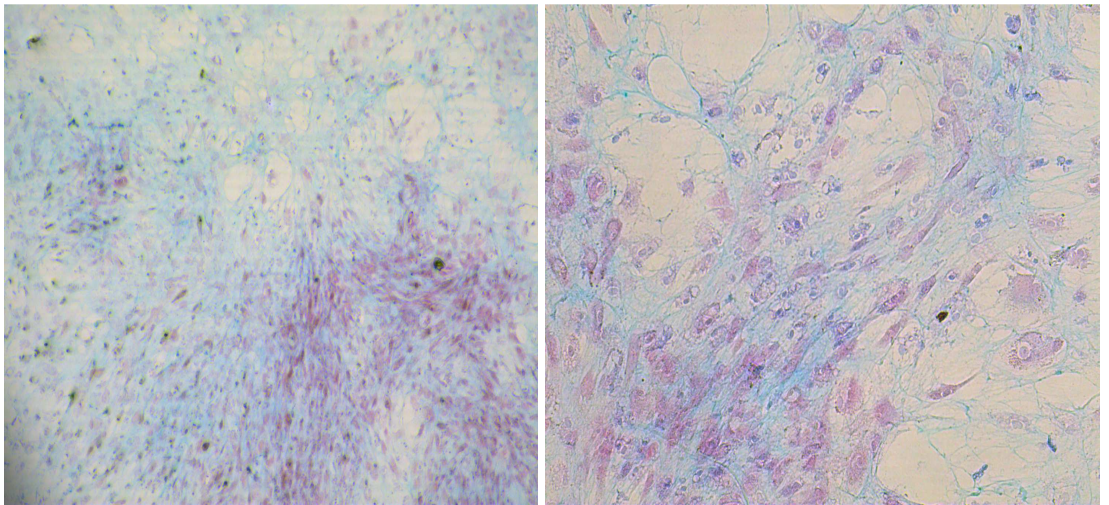
Osteosit farklılaşma için Osteosit Diferansiyasyon Basal Mediumu ve supplement mediumu (Gibco, USA) kullanılacak. İkinci pasaja gelen hücreler osteosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapıldı. Üçüncü hafta sonunda Von Kossa (Diagnostic BioSystem, USA) ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Osteosit hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülendi ve osteosit hücreleri belirlendi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Osteosit farklılaşmanın vonn kossa boyama ile (A), 10x 4 büyütmede (B) 10X40 büyütmede gösterimi.

3.2.3. Mezenkimal Kök Hücre Kondrosit Farklılaşma Metodu

Kondrosit farklılaşma için Kondrosit Differansiyasyon Basal Mediumu ve supplement mediumu (Gibco, USA) kullanıldı. İkinci pasaja gelen hücreler kondrosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapıldı. Üçüncü hafta sonunda Alcian Blue (Diagnostic BioSystem, USA) ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Kondrosit hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülenecek ve kondrosit hücreleri belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kondrosit farklılaşmanın alcian blue boyama ile (A)10X4 büyütmede (B), 10x40 büyütmede gösterimi

Hücreler farklılaşma yöntemleriyle adiposit, osteosit, kondrosit hücrelerine farklılaştırıldıktan sonra Countess® Automated Cell Counter (İnvitrogen,USA) cihazında hücrelerin hem sayısına hem de canlılığına bakıldı. İkinci pasaj sonrasındaki hücreler bromo-deoksiüridin (BrDU) ile boyandı, boyama için **Mezenkimal Kök Hücre BrDU Boyama Metodu**; Bir cc'de 10 μ M BrDU solüsyonu hazırlandı. Bir cc'de 2.10⁶ hücre olacak şekilde her bir cc'ye 10 μ L BrDU solüsyonu eklendi. İki saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası BrDU ile boyanan hücreler 2.10⁶ olacak şekilde 300 mikrolitre içinde PBS ile mesane duvarına enjekte edildi.

3.3. SİSTOSTOMİ KATATER İMPLANTASYONU

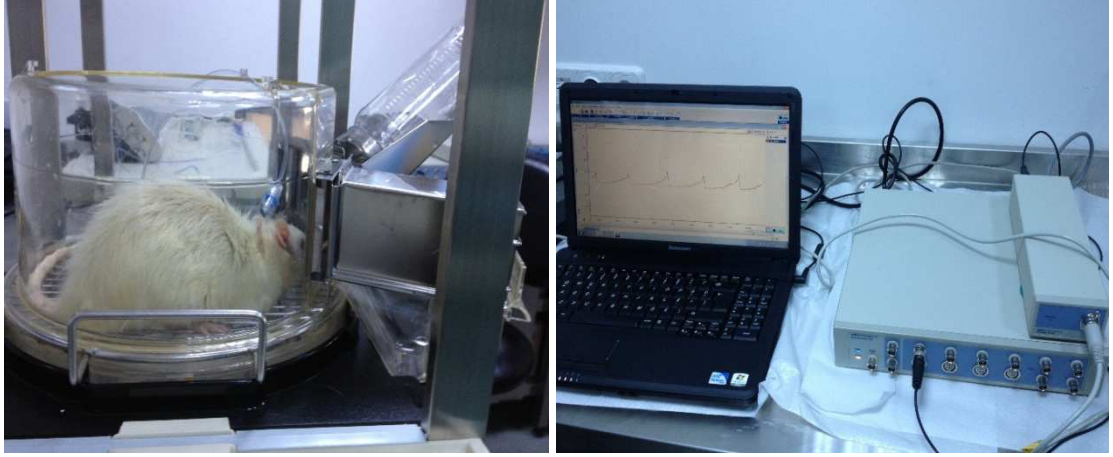
Kök hücre tedavisi verildikten 4 hafta sonra tüm ratlara sistostomi katateri yerleştirildi. Ratlara anestezi ajan olarak ketamine (100 mg/ kg) ve xylazine (10 mg/ kg) kombinasyonu verildi. Üretral meatusun yaklaşık 1 cm üzerinden superiora doğru 1 cm lik orta hat insizyonu uygulandı, cilt ve kas tabakaları geçilerek karın boşluğuna ulaşıldı ve mesane bulundu. Atravmatik pensetle mesane tutularak dışarı alındı, mesanenin dome kısmından tek noktadan 1mm çaplı iğneyle mesaneye girildi. Mesaneye yerleştirilecek katater olarak yaklaşık 1mm çapındaki epidural katateri seçildi. Kataterin mesaneye yerleştirilecek uç kısmına çakmak yardımıyla huni şekli verildi bu şekilde mesaneden çıkması engellendi. İğneyle girilen yerden epidural katateri mesaneye yerleştirildi, katater mesaneye sabitlenip, mesaneden kaçak olmadığı kontrol edildi. Katater subkutan olarak tünelize edilerek daha öncesinde yapılan yaklaşık 0,5 cm insizyon yerinden, ratın arka boyun kısmından dışarı alındı. Kataterin uç kısmına ürodinami işlemi esnasında SF infuzyonunu sağlaması için enjektör ucu ve ven kanülü yerleştirilerek 2/0 ipek ile cilde sabitlendi. Kesi yerleri ciltaltı ve cilt olacak şekilde 2 tabaka 3/ 0 Rapid vicryl ile tek tek kapatıldı (Şekil 3. 6).



Şekil 3.6. Sistostomi kataterinin takılması ve ciltaltından ratın boynuna tünelize edilmesi, (A), karın ve (B), boyun insizyon hatlarının görünümü.

3.4. BASINÇ-AKIM ÇALIŞMASI (ÜRODİNAMİ)'NİN UYGULANMASI

Sistostomi kataterleri yerleştirdikten 3.-5. gün aralığında, tüm ratlara sırasıyla sistometri işlemi uygulandı. Sistometri işlemi için ratlar kayıt işleminden yaklaşık 30 dk önce metabolik kafese alınarak işlem için adaptasyonları sağlandı. Ürodinami işlemi tüm ratlara uyanık haldeyken uygulandı. İşlem için sistostomi katateri ile infüzyon pompası ve fizyolojik transducer bağlantıları yapıldı. Aynı şekilde verilerin kaydedilmesi amacıyla PowerLab (ADInstruments, Australia), Bridge Amplifier (ADInstruments, Australia) ve Fizyolojik Transducer (ADInstruments, Australia) bağlantıları sağlandı. Bağlantılar tamamlandıktan sonra kalibrasyon ayarları yapıldı. Boyun kısmındaki katater uç kısmından negatif basınç uygulanarak mesanenin tamamen boş olduğundan emin olunduktan sonra 10cc /saat hızla SF infüzyonu ve eş zamanlı basınç ölçümü yapıldı. Ratın metabolik kafes ve yapılan işleme adaptasyonu için her rat için ortalama 30 dk harcandı, sonrasında 1 saat boyunca elde edilen görüntüler LabChart programıyla kayıt altına alındı. İşlenen volum metabolik kafes altına yerleştirilen hassas terazi ile sağlandı. İşlem sonuçlarını etkileyecek ortam gürültüsüne ve kataterlerin bükülmesine karşı tedbirler alındı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Rat ürodinamisinin yapılış şekli (A), Ratın metabolik kafes içerisinde görünümü (B), Rat basınç-akım çalışması (ürodinamisi)'nin kaydedilmesi

3.4. BULGULARIN DEĞERLENDİRİLME YÖNTEMLERİ

3.4.1. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Sistometrik incelemelerden sonra ratlara aşırı doz eter ile ötanazi uygulandı ve vena cavalardan alınan kan örnekleri biyokimyasal inceleme amacıyla santrüfuj edilerek serum ve plazması ayrıldı. Alınan kan örneklerinden Kan Glukozu (GluC), Blood Urea Nitrogen (BUN), Kreatinin (Cr), Triglyceride (TG), High Density Lipoprotein (HDL) ve Low/Very Low Density Lipoprotein (LDL/VLDL) çalışıldı.

3.4.2. Histopatolojik Örneklerin Değerlendirilmesi

Sistometrik incelemelerden sonra ratlara aşırı doz eter ile ötanazi uygulandı ve cerrahi olarak mesaneleri dışarı alındı. Diseke edilen mesane doku örnekleri 24 saat tamponlanmış formalinde tespit edilmiş ve takip aşamalarına alınmıştır. Takip sırasında sırasıyla 1-2 saatlik süreyle %70 -%80-%90-% 96 ve absolu alkoller de bekletilmiştir. 1 saatlik sürelerde 2 aşamada şeffaflaştırma amacıyla ksilene, en son aşama olarak da dokuların sertleştirilmesi amacıyla 2 saatlik süre ile 56°C de parafine tabi tutulmuştur.

Takip aşamaları sonrası mesane doku örnekleri parafin bloklara gömülmüş mikrotom cihazı ile 3-4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler 37 °C de

sıcak su banyosunda açılarak lamlara alınmıştır. Daha sonra 60°C lik etüvde 1 saat, 10 ar dakikalık 2 aşama ksilen uygulanımında oluşan deparafinizasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Sırasıyla absolu alkol, %96 lık alkol, %90 lık alkol, %70 lik alkoller olmak üzere her biri 1 dakika süren hidrasyon işlemime tabi tutulmuştur. Lamlardaki mesane doku örnekleri H&E ile histokimyasal boyama uygulanmış, doku üzerine 2 damla entellandamlatılarak lamel ile kapatılmıştır. Elde edilen preparatlar Olympus BX51 ışık mikroskobunda incelenmiştir. Bu değerlendirmede mesane total duvar kalınlığı, kas tabakası kalınlığı ve fibrozis değerlendirildi.

3.4.3. İşeme Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi

Grupların işeme fonksiyonları ürodinamik bulgularla değerlendirildi. İşlem ratlara uyanık haldeyken uygulandı. Sağlıklı ürodinamik kayıt elde edebilmek için, ratlar kayıt işleminden yaklaşık 30 dk önce metabolik kafese alınarak işlem için adaptasyonları sağlandı ve her rat için ortalama 60 dk sağlıklı görüntüler elde edildi. Ürodinamik işlemde maksimum işeme basınç (maximum voiding pressure-MVP), işeme aralığı (micturition inteval-MI), işenen hacim (urine volum-UV) ve rezidü idrar (RV) miktarları değerlendirildi.

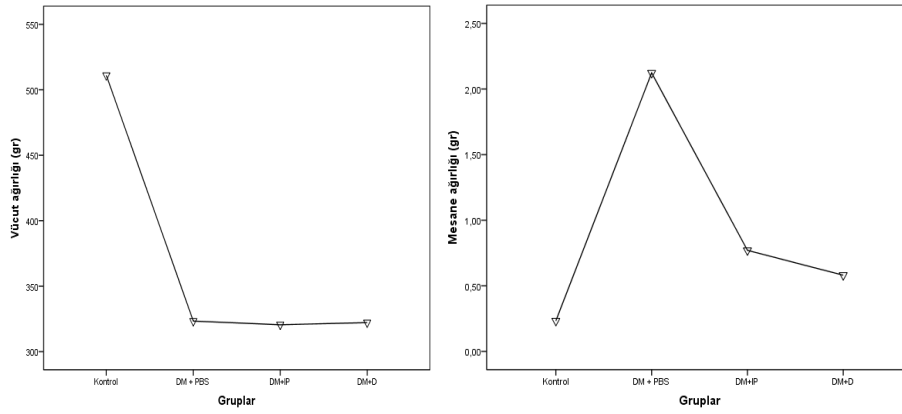
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Öncelikle değişkenlerin normal dağılımlı olup olmadığını test etmek için Shapiro-Wilk's testi kullanıldı. $p>0.05$ normal dağılımlı olarak değerlendirildi. Normal dağılımlı değişkenlerde gruplar arası farklılık için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. İkili karşılaştırma için (Post Hoc) Tukey analizi kullanıldı ve Tukey analizine göre $p<0.05$ için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. METABOLİK VE BİYOKİMYASAL BULGULARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Elde edilen verilerde ratların ortalama vücut ağırlıkları değerleri bakımından diyabetik gruplar arasında istatistiksel farklılık izlenmezken, ortalama vücut ağırlıkları diyabetik grupların tamamında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü. Mesane ağırlıkları bakımından ise hem diyabetik grupların mesane ağırlıkları kontrol grubuna oranla daha yüksekti, hemde diyabetik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar mevcuttu (Şekil 4.1).¹



Şekil 4.1. Grupların Vücut ve Mesane Ağırlıklarının Şematik Karşılaştırılması

Kontrol ile diğer gruplar arasında ve diyabetik gruplar arasında anlamlı farklılık var ($p<0.001$)

Elde edilen verilerde kan şekeri değerleri bakımından diyabetik gruplar arasında istatistiksel farklılık izlenmezken, diyabetik grupların tamamında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti. Çalışılan diğer parametreler için tüm gruplar arasında istatistiksel farklılık izlenmedi (Tablo 4.1.) (Şekil 4.2).

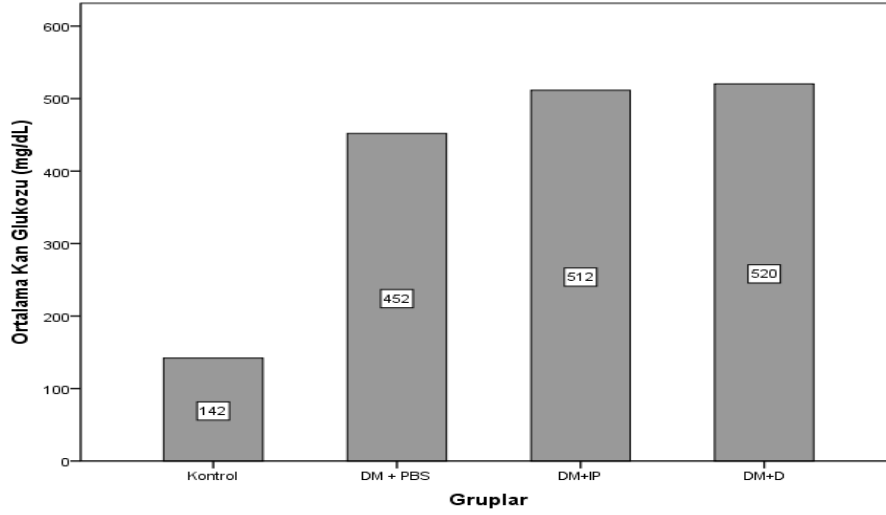
Tablo 4.1. Gruplar arası biyokimyasal değerlerin tablo halinde gösterimi

Gruplar	NR+PBS	DM+PBS	DM+IP	DM+D	p değeri
Plazma GluC	142 ± 29,3	452 ± 74,5	511,5 ± 82,6	520,3 ± 44,8	<0.001*
LDL	11,3 ± 4,9	11,6 ± 2,3	13,6 ± 2,4	10,2 ± 1,5	0,288
HDL	30,2 ± 4,3	28,8 ± 3,5	27,7 ± 2,9	31,6 ± 3,0	0,249
TG	95,3 ± 17,0	109,0 ± 17,5	106,8 ± 25,2	91,7 ± 13,8	0,674

* Kontrol ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık var ($p<0.001$).

Diğer parametreler arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$).

¹ Diyabetik gruplardan DM+IP ile DM+D arasında anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$).

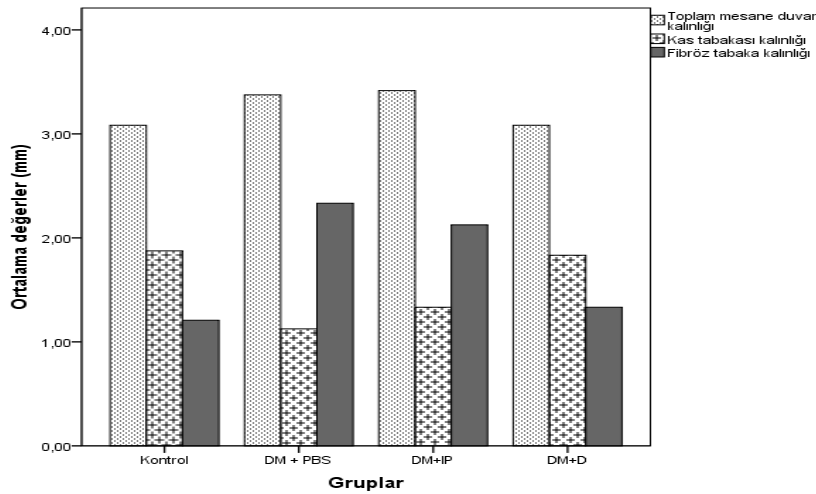


Şekil 4.2. Grupların Ortalama Plazma Glukoz Sonuçlarının Karşılaştırılması

Diyabetik gruplar arasında istatistiksel farklılık izlenmezken ($p>0.05$). Diyabetik grupların tamamında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.001$).

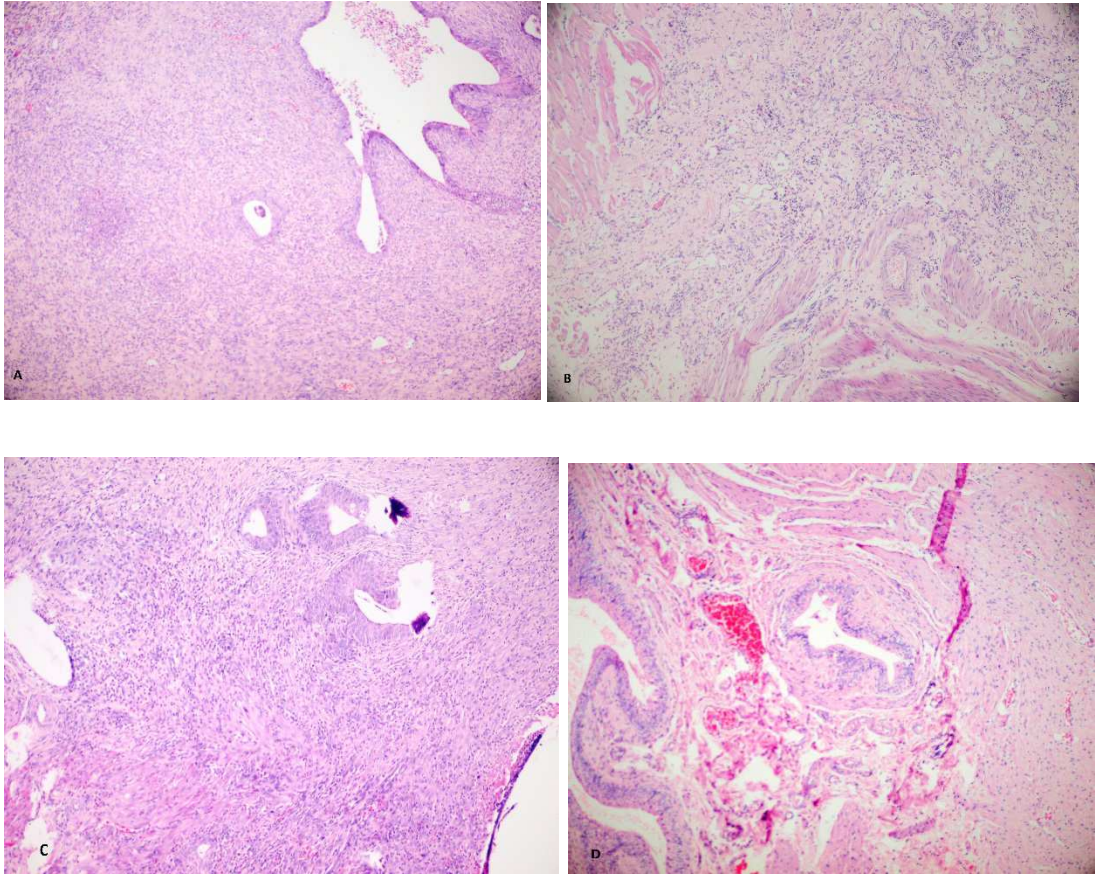
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR VE KARŞILAŞTIRILMASI

Çalışmada gruplar arasında total mesane duvar kalınlığı, düz kas tabaka kalınlığı ve fibrozis ölçümleri karşılaştırıldı. Elde edilen verilerde total mesane duvar kalınlık değerleri bakımından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık izlenmezken, düz kas tabaka kalınlık değerleri bakımından diyabetik gruplardan DM+PBS ve DM+IP de kontrol grubuna ve DM+D'ye oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.001$). Diyabetik gruptan DM+D ile kontrol grubu arasında düz kas tabaka kalınlığı bakımından istatistiksel farklılık izlenmedi ($p= 0, 992$).



Şekil 4.3. Gruplar arasında total mesane duvar, düz kas tabaka ve fibrozis ölçümlerinin karşılaştırılması

Total mesane duvar kalınlık değerleri bakımından tüm gruplar arasında istatistiksel farklılık izlenmedi ($p>0.05$). Düz kas tabaka kalınlık değerleri bakımından diyabetik gruplardan DM+PBS ve DM+IP de kontrol grubuna ve DM+D'ye oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.001$). DM+PBS ve DM+IP de kontrol grubuna ve DM+D'ye oranla fibröz doku oranları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.001$) iken, diyabetik gruptan DM+D ile kontrol grubu arasındaki fibröz doku kalınlık ölçüm sonuçları bakımından istatistiksel farklılık izlenmedi ($p= 0,906$).



şekil 4.4. H&E le boyanmış histopatolojik inceleme görüntüleri X100 büyütmede (A) NR + PBS görüntüsü, (B), DM + PBS görüntüsü (C) DM + IP görüntüsü, (B), DM + D görüntüsü

Fibröz doku kalınlıklarının ölçüm sonuçları karşılaştırıldığında düz kas kalınlık ölçüm oranlarının tersine, diyabetik gruplardan DM+PBS ve DM+IP de kontrol grubuna ve DM+D'ye oranla fibröz doku oranları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.001$). Diyabetik gruptan DM+D ile kontrol grubu arasındaki fibröz doku kalınlık ölçüm sonuçları bakımından istatistiksel farklılık izlenmedi ($p=0,906$), (Şekil 4.3).

4.3. İŞEME FONKSİYONU BULGULARI VE KARŞILAŞTIRILMASI

Elde edilen ürodinamik verilerden maksimum işeme basınç (maximum voiding pressure-MVP) değerleri, işeme aralığı (micturition interval-MI), işenen hacim (urine volüm-UV) ve rezidü idrar (RV) miktarları gruplar arasında karşılaştırıldı.

Normal gruptaki ratlarda 60 dk zaman aralığında 16-18 adet düzenli kontraksiyon sonrası işeme izlenirken, diyabetik PBS enjeksiyonu uygulanan grupta (DM+PBS) 60 dk zaman aralığında 3-4 düşük amplitüdümlü kontraksiyon sonrası yüksek volümlü işeme gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 4.5). Normal ratlarda maksimum işeme basınç değerleri diyabetik ratlara oranla DM+D hariç daha yüksekti. Rezidüel volüm diyabetik ratlarda daha fazlaydı. Kök hücre tedavisi alan gruplarda PBS uygulanan diyabetik gruba oranla işeme fonksiyonları normal gruba daha yakın değerlerdeydi (Şekil 4.6).

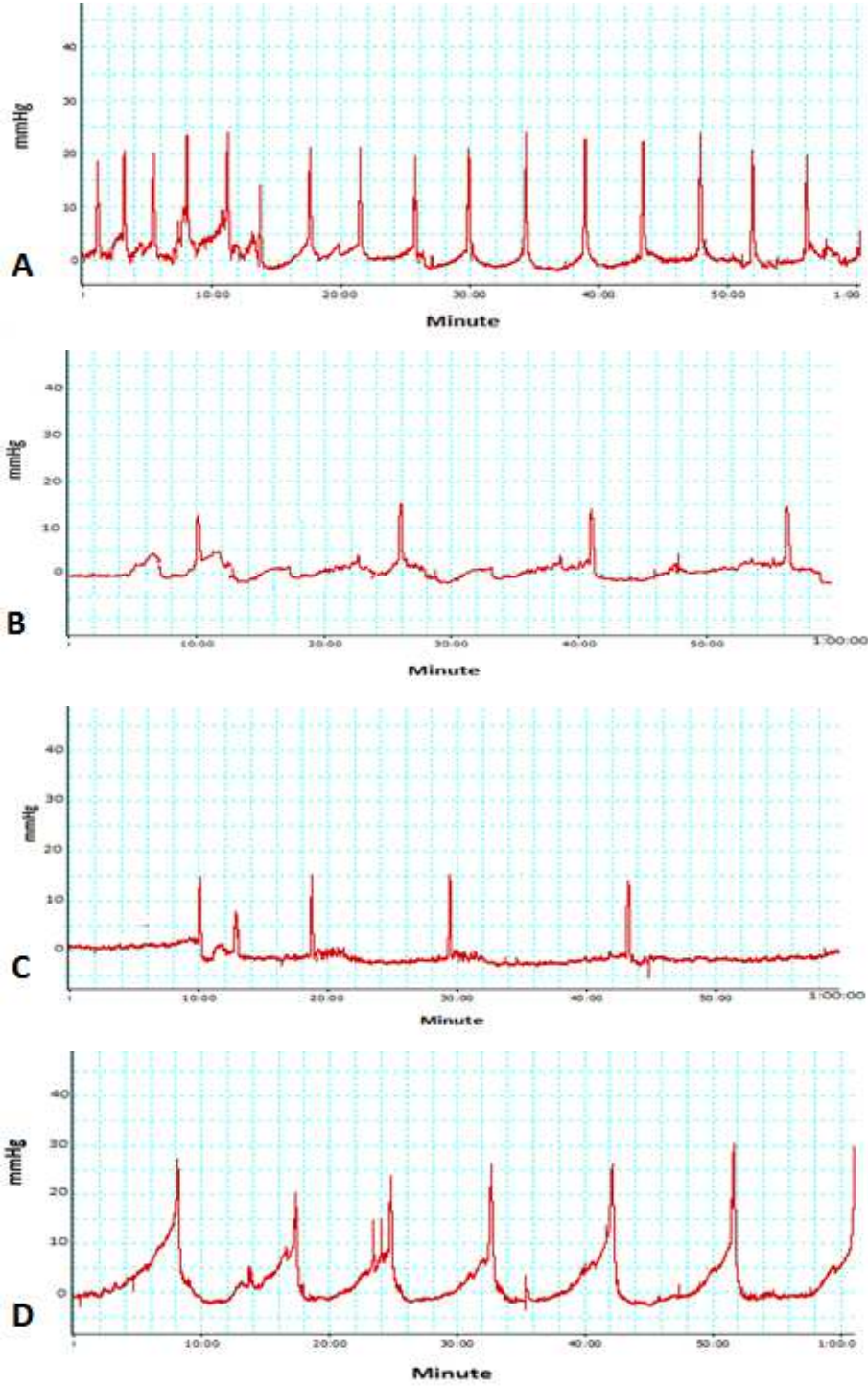
Kök hücre tedavisi verilenlerden detrüüre enjeksiyon uygulanan grubun işeme fonksiyonu intraperitoneal olarak kök hücre uygulanan gruba oranla normal rat grubuna daha yakındı (Şekil 4.5). Böylece diyabetik gruplar içerisinde detrüüre kök hücre enjeksiyonu uygulanan, intraperitoneal kök hücre transferi yapılanlara oranla, toplamda ise kök hücre tedavisi uygulanan her iki grup PBS uygulanan diyabetik gruba oranla mesane fonksiyonları normal rat mesane fonksiyonuna daha yakın özellikte olduğu görüldü. Yaptığımız bu çalışma sonucunda kök hücre uygulaması mesane fonksiyonlarında belirgin düzelme sağladı.

Tablo 4.2. Ürodinamik çalışmayla elde edilen verilerin gruplar arasında tablo halinde gösterimi

Gruplar	NR+PBS	DM+PBS	DM+IP	DM+D	p değeri
MVP (mmHg)	21,54 ± 1,00	13,27 ± 0,78	16,27 ± 0,61	28,59 ± 2,09	<0.001
MI (dakika)	4,22 ± 0,71	16,8 ± 4,56	13,2 ± 1,85	9,01 ± 1,52	<0,001
UV (mL)	0,40 ± 0,07	1,49 ± 0,43	1,13 ± 0,11	0,82 ± 0,10	<0,001
RV (mL)	0,02 ± 0,01	0,18 ± 0,08	0,15 ± 0,10	0,08 ± 10,07	0,006

Grupların ortalama MVP değerleri (mmHg) NR+PBS, DM+PBS, DM+IP, DM+D; sırasıyla 21,54 ± 1,00, 13,27 ± 0,78, 16,27 ± 0,61, 28,59 ± 2,09 şeklindeydi (p<0.001). (DM+PBS) ortalama MVP değerleri, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (sırasıyla 13,27 ± 0,78 vs 21,54 ± 1,00).

Kök hücre tedavisi uygulanan her iki gruptadaki (DM+IP ve DM+D) ortalama MVP değerleri, kök hücre tedavisi uygulanmayan diyabetik grubuna (DM+PBS) oranla (sırasıyla 16,27 ± 0,61 ve 28,59 ± 2,09 vs 13,27 ± 0,78), DM+D grubu ortalama MVP değerleri diğer tüm diyabetik gruplara (DM+PBS ve DM+IP) oranla ve beklenen değerlerin çok üzerinde olacak şekilde normal gruplara oranla (sırasıyla 28,59 ± 2,09 vs 13,27 ± 0,78, 16,27 ± 0,61 ve 21,54 ± 1,00) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0.001), (Tablo 4.2).

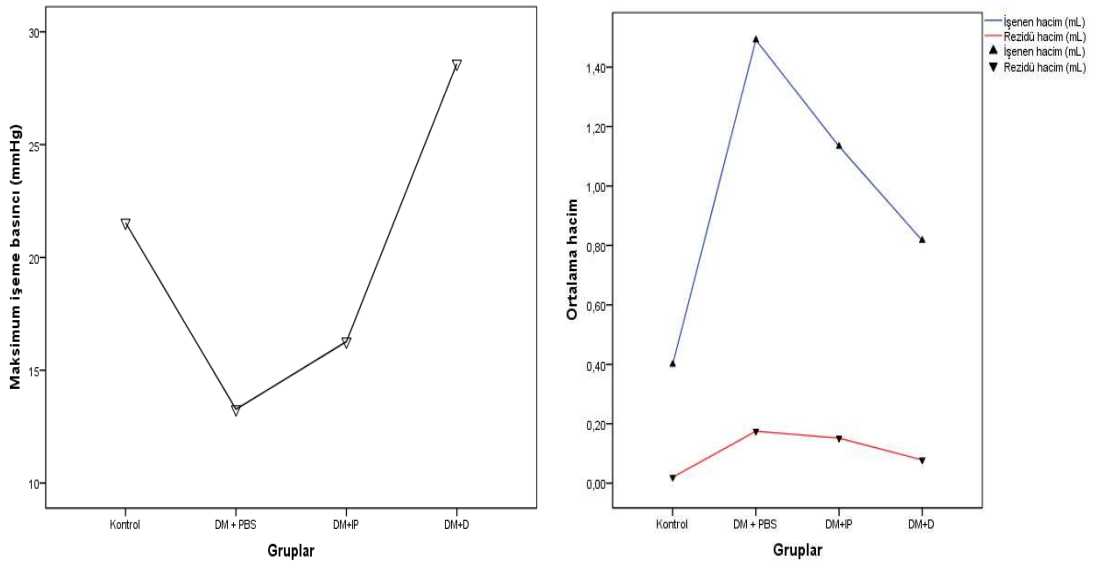


Şekil 4.5. Grupların Ürodinami Görüntüleri

(A), NR+PBS (B), DM+PBS, (C) DM+IP, (D) DM+D. MVP için elde edilen değerlerde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar izlendi ($p<0.001$). Kök hücre tedavisi uygulanmayan diyabetik grup (DM+PBS) ortalama MVP değerleri, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0.001$). Kök hücre tedavisi uygulanan diyabetik gruplarda kök hücre tedavisi uygulanmayan diyabetik gruba göre mesane fonksiyonlarda düzelme anlamlıydı ($p<0.001$). Kök hücre tedavisi uygulanan gruplardan DM+D deki MVP oranları hem diğer diyabetik gruplara oranla hemde diyabetik olmayan kontrol grubu verilerine oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti ($p<0.001$).

İşeme aralığıyla ilgili veriler değerlendirildiğinde diyabetik gruplar arasında DM+PBS ile DM+IP arasında istatistiksel farklılık izlenmezken ($p=0,110$), bu iki gruptaki işeme aralığı değerleri DM+D grubuna oranla ve diyabetik grupların tamamında kontrol grubuna oranla işeme aralığı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0.001$), (Tablo 42).

İşenen volüm ve post miksiyon rezidü verileri değerlendirildiğinde; diyabetik grupların tamamında işenen volüm miktarları kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.001$). Postmiksiyon rezidü verilerinde ise işenen volümdeki verilerden farklı olarak DM+D dışında ($p=0,526$) yine diğer diyabetik gruplardaki rezidü volüm oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti. Rezidü volüm yönünden diyabetik gruplardaki oranlar arasında kendi içerisinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$). Diğer diyabetik gruplardan farklı olarak DM+D rezidü oranlarıyla kontrol grubu rezidü oranları arasında da istatistiksel fark yoktu ($p=0,526$), (Tablo 42), (Şekil 46).



Şekil 4.6. Gruplar arasında ortalama MVP değerlerinin ve ortalama işenen hacim ve post miksiyon rezidü oranlarının şematik gösterimi

5. TARTIŞMA

DMD hayatı tehdit eden bir hastalık olmasada yaşam kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Mesanenin hem dolum hemde boşaltım semptomlarının bir arada olduğu komplike bir bozukluktur. DMD nun bu semptom çeşitliliği hastanın cinsiyeti, yaşı, mesane çıkım obstrüksiyonu ve diyabetin süresine bağlı olarak değişebilmektedir, kadınlarda bu semptomlar bağımsız bir şekilde diyabet patogenezinine bağlı olabilirken, erkeklerde hem mesane çıkım obstrüksiyonu hemde mesane kompliyansında azalmaya bağlı olarak, yaşlılarda ise hem idrar akışında azalma hem çıkım obstrüksiyonuna bağlı olarak kompleks bir bozukluk şeklinde görülebilmektedir.

Diyabetik hastalarda en sık karşılaşılan ürodinamik bulgular; azalmış mesane dolum hissi, artmış post miksiyon rezidü oranı ve azalmış detrüör kasılması şeklindedir. Alves C ve ark non-obeş 10 yıldır Tip 1 DM li adolesan kızlar üzerinde yaptığı çalışmada normal görünümlü renal USG bulgularına rağmen, artmış mesane kapasitesi, azalmış mesane hissi, artmış mesane kapasitesi ve azalmış detrüör kasılması şeklinde ürodinamik bulgular elde ettiler (124). Bu çalışma DMD un diyabetin nisbeten erken dönemlerinde dahi görülebileceğini göstermekteydi.

Ancak diyabetik hastalarda bu klasik semptomlar dışında farklı bulgularda görülebilmektedir. Ueda ve ark asemptomatik diyabetik hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada DMD nun ileri dönem klasik bulgularına ek olarak, hastalarda %25 oranında detrüör aşırı aktivitesi olduğunu gösterdiler (125). Kaplan ve ark. 181 diyabetik hasta üzerinde yaptıkları ürodinamik çalışmada %55 hastada artmış detrüör aktivitesi saptarken sadece %23'ünde detrüör aktivitesinin azaldığını ve %10 unda da arefleksif mesane olduğunu gösterdi, %11 hastanında detrüör bulguları değerlendirilemedi (126). Karışık klinik semptomlar içeren DMD lu hastalarda yapılan geniş kapsamlı inkontinans değerlendirmesinde ise, bu hastalarda ki herhangi bir şekilde olan inkontinans riskinin normal popülasyona oranla %30- %70 oranında arttığı gösterildi (127).

Diyabetik mesane disfonksiyonunda hem depolama hem boşaltım semptomlarının bir arada bulunması, bu iki farklı antitenin bir arada bulunduğunu mu yoksa diyabetin doğal sürecinde zamana bağlı olarak mesane yapısının değişip değişmediği sorusunu gündeme getirdi. Klinik çalışmalarda bağımsız faktörlerin birlikteliği ve çalışmanın ürodinamik inceleme gibi yapılması hem klinisyen açısından hemde hasta yönünden sıkıntılı olması ve patolojik veri elde edilememesi gibi nedenlerden dolayı diyabetik mesane disfonksiyonu ve underactive mesaneyle ilgili çalışmalar daha ziyade hayvan çalışmaları üzerinde yoğunlaşmış durumdadır. Yapılan çalışmalarda diyabetin doğal süreci içerisinde kompresyon fazından dekompresyon fazına ilerledikçe zamana bağlı olarak değişiklik gösteren semptomlar verebileceği yapılan hayvan çalışmalarında gösterildi (128). Daneshgari ve ark. yaptıkları zamana bağlı olarak diyabetik sistopatideki değişiklikleri gösteren çalışmada Tip 1 diyabetik ratlarda 12 haftaya kadar Peak Voiding Pressure (PVP) yani işeme anındaki en yüksek basıncın artış gösterdiğini, ancak 12. haftayla birlikte düştüğünü ve zamanla atonik mesane geliştiğini gösterdiler (128).

Bizde yaptığımız bu çalışmada 12 haftalık diyabetik olan ratlarda mesane fonksiyonlarının kontrol grubuna göre azaldığını gözlemledik. Tedavi uygulamalarının ardından yani diyabetik oluşlarının üzerinden 16 hafta geçtikten sonra yapılan histopatolojik ve fonksiyonel değerlendirmelerimizde kök hücre tedavisi uygulanmayan diyabetik grupta, diyabetin geç komplikasyonu olarak bilinen underactive mesanenin belirgin bir şekilde geliştiğini mesane preparatların incelenmesiyle patolojik ve ürodinamik incelemeyle fizyolojik olarak gösterdik.

Underactive mesane yapılan ilk yayınlarda mesane dolmuş hissi ve idrar hissini azalması, mesane kapasitesinin artması, mesane kontraktilesinin azalması ve rezidu idrar volumünün artması şeklinde klinik bir bozukluk olarak tanımlandıysada (29, 30, 129), uzun yıllar tanımla ilgili tam bir konsensus sağlanabilmiş değildir.

International Continence Society (ICS) (Uluslararası Kontinans Birliği) tarafından detrusör underactivity veya underactive bladder (UAB); mesane kasılma gücünün azaldığı ve/veya mesane boşalmasının uzadığı veya normal zaman aralığında mesanenin tam olarak boşaltılamadığı, ancak buna rağmen minimal uyarı

veren bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Ürodinamik çalışma süresince yeterli kontraksiyon yoksa da sonuç olarak akontraktıl detrüsör ortaya çıkar (20).

Yapılan bu tanımlamaya rağmen underactive mesanenin gerek tanım, tanı yöntemleri, fizyopatoloji ve gerekse tedavileri konusunda tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bizde yaptığımız bu çalışmayla elde ettiğimiz verilerde daha öncesinde Moller'in, Ueda'nın ve ICS'in bu tanımlamalarında yer alan idrar hissi azalması, mesane kapasite artışı, mesane kontraktilite azalması, mesane boşaltım süresinin uzaması ve artmış rezidü idrar bulgularıyla uyumlu bulgular saptadık.

Çok yakın zamanda yayınlanan bir derlemede underaktive mesane için bir objektif değerlendirme gündeme gelmişse de henüz kabul görmüş bir tanımlama değildir. UAB bir semptomlar sendromu olarak tanımlansada, PVR miktarının tüm mesane kapasitesi (işenen volüm + PVR)'nin %40'ına ulaşacak şekilde mesane detrüsör fonksiyonlarının belirgin biçimde bozulması olarak tariflenmiştir. Ancak yine bu çalışmada UAB'ın tanısının ürodinamik verilerle konuluyor olması nedeniyle epidemiyolojik verilerin elde edilmesinin çok zor olduğuna ve bu hastalıkla ilgili insidans, risk faktörleri ve doğal gidişatı hakkında bilgilerin ve bunlara bağlı olarak tanımlama konusunda tam bir konsensus olmadığına atıfta bulunulmuştur (130).

UAB da mesane tam dolu olduğunda dahi yeterli idrar hissi oluşmaz, mesane düz kasları yeterince kasılamaz ve bunun sonucunda mesane tam olarak boşaltılamaz. UAB urgency, sık idrar, nokturi, inkontinans gibi aşırı aktif mesane semptomları gibi semptomlarda verebilmektedir, inkontinans urge, stress şeklinde olabildiği gibi overflow şeklinde de olabilmektedir. Fakat bunların yanında UAB'nin asıl en sık görülen semptomları azalmış idrar hissi, tam boşaltamama hissi, işeme güclüğü ve tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonlarıdır. Aşırı aktif mesaneli hastalar zaman içerisinde UAB a dönüşmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar mesane duvar kalınlığının ve idrarda nerve growth faktor (NGF) miktarının aşırı aktif mesaneli hastalarda daha yüksek olduğunun gösterilmesi, aşırı aktif mesanede kas ve bağ dokusunda bir takım yapısal ve fonksiyonel değişiklikler yaparak zaman içerisinde kontraktilitede bozulmaya neden olabileceği görüşünü destekler nitelikteydi (131). Bunun sonucunda uzun süreli asiri aktif mesane durumunda kontraktilitede bozulmayla birlikte AAM, UAB sekline ilerleyebilir mi sorusunu akla

getirmiştir (132). Bu nedenle asiri aktif mesaneli hastalar erken zamanda tedavi edilebilirse UAB oluşumunun engellenebileceği görüşü gündeme gelmiştir.

Bizde yaptığımız bu çalışmayla Daneshgari ve ark. yapmış oldukları diyabetik rat mesanelerinde diyabet zamanına bağlı olarak meydana gelen AAM'den UAB şekline değişimin olduğunu gösterdik.

Diyabetes Mellitus hastalığının erken evrelerinde dahi çok fazla bulgu vermeden, UAB gelişmesine neden olan en önemli hastalıktır. Bunun dışında UAB birçok nörolojik ve miyojenik durumlarda da görülebilmektedir. Diyabetik sistopati yaş ve cinsiyetle ilişkili olmayıp doğrudan diyabet süresiyle ilişkilidir (31).

Yaptığımız çalışmada oluşturan UAB fizyopatolojisiyle ilgili olarak çok net veriler bulunmasa da yapılan hayvan çalışmalarından elde edilen bir takım bulgular bizim yaptığımız çalışma bulgularını ve birbirlerini destekler niteliktedir. Chancellor ve ark. yıllar öncesinde yaptıkları yaptıkları çalışmada aşağıdaki yollardan herhangi birinde bir bozulma meydana geldiğinde UAB gelişiminin söz konusu olabileceğini bildirdiler (133).

- Mesane periferel afferent yollarında hasar
- Mesane periferel efferent yollarında hasar
- Lumbosakral spinal kord hasarında (spinal iseme merkezi)
- Myojenik hasar

Moller ve Caplan yaptıkları çalışmalarda DMD'nin patofizyolojisinde genel olarak otonomik nöropatinin sorumlu olduğunu bildirdi (29, 30, 134). Burada mesanede ki idrar hissi azalır, hastalar idrarının geldiğini hissedemez dolayısıyla boşaltma hissi de oluşmaz ve bunun sonucunda ilk olarak artmış postmiksiyon rezidü, ilerleyen zamanda da overflow inkontinansla karşımıza gelir, işte bunların hepsinden otonomik nöropati sorumlu tutulur. Ancak mesane de idrar hissini azalması veya kaybolmasının DMD'nde farklı klinik tablolara nasıl yol açtığı henüz tam olarak bilinmiyor.

Bu düşünce zamanla gelişerek şuan Golbidi ve Daneshgari gibi mesane disfonksiyonu konusunda önemli çalışmalarda bulunan birçok araştırmacı tarafından

inanılan görüş DMD nun otonomik sinirler, mesane detrusörü ve belki üreterde meydana gelen bozuklukları içeren multifaktöriyel bir patofizyolojiye sahip olduğu yönündedir (3, 35). Bunun yanında mesanenin kompleks otonomik ve somatik afferent ve efferent yollarıyla ilintili olarak yapılan çoğu çalışma da DMD ile periferik nöropati arasında rastgele bir ilişki olduğunu gösterdi (135). Liu ve ark yaptıkları çalışmada STZ-diyabetik rat mesanelerinden elde ettikleri mesane kesitlerini sinir hücrelerine spesifik bir marker olan neurofilament 200 ile immunofluorescence incelemelerinde 9-20 hafta arasında kas tabakasındaki nöron oranının, 20. hafta da mukoza ve submukoza daki nöron dansitesinde kontrol gruplarına oranla belirgin azalma tesbit ettiler (136).

Yine Liu ve Daneshgari'nin diyabetik mesane disfonksiyonuyla ilgili 2014 de yayınladıkları derlemede bu konuyla ilgili birçok çalışmaya atıfta bulunarak diyabetik mesane disfonksiyonu oluşumunda nöronal değişikliklerde periferik nöronların büyüme ve varlığını devam ettirmeleri hedef dokulardaki norotropik faktörler tarafından desteklenebileceğini bildirdiler. Ratlarda yapılan çalışmada STZ uygulandıktan 12 hafta sonra mesane ve mesanenin afferent nöronlarını taşıyan L6-S1 dorsal kök ganglionlarındaki nerve growth faktörlerinde belirgin düşüş olduğu gözlemlendi. Bu çalışma diyabete bağlı mesanedeki nörodejenerasyona bağlı olarak periferik sinirlerin norotropik desteklenmenin kaybolabileceğini desteklemektedir. Yapılan başka bir çalışmada STZ-diyabetik ratlarda mesaneyi innerve eden afferent yollarda belirgin bozukluklar olduğu gösterildi. Tip 2 diyabetik rat modellerinde mesane hissinde azalmanın mesaneye gelen afferent yollarda bozulma, mesane kapasitesinde artış ve bunların sonucunda hipokontraktilite ile sonuçlandığı bildirildi. Normal ratlar, afferent C-lif nörotoksini olan kapsaisin ile muamele edildiğinde diyabetik ratlarda oluşan tabloya benzer durum görüldü. Kapsaisinin az miyelinli veya miyelinsiz afferent nöronları etkilediği bilindikten sonra, bu çalışmaya dayanılarak diyabetinde aynı sinir liflerini etkilediği öne sürüldü (137).

Hayvan çalışmalarının yanında klinik olarak nörolojik bulgu ve ürodinamik verilerin korelasyonu yapılarak DMD ile nöropati arasında ki ilişkiyi destekler nitelikte birçok klinik çalışmada bildirildi.

Lee ve ark nın DMD nedeniyle daha önce tedavi almamış Tip2 Diyabetik 86 hasta üzerinde ürodinamik özellik ve mesane duyarlılık fonksiyonlarını değerlendirdiği çalışmada; ürodinamik bulgu olarak hastaların % 34,9'unda mesane underaktivitesi, % 14'ünde mesane hiperaktivitesi, %12,8'inde mesane çıkım obstrüksiyonu ve %38,4'ünde normal detrüör fonksiyonu şeklinde veriler elde etti. Detrüör underaktivitesi olan grupta sistometrik çalışmada bozulmuş mesane boşaltım fonksiyonu ve idrar hissini azaldığını saptadı. Hiperaktif mesane grubunda ise depolama ve boşaltım fonksiyonunun bozulduğunu ancak idrar hissini normal grupla benzer olduğunu saptadı. Bu veriler underaktif mesaneli hasta grubunda mesanenin boşaltım fonksiyonu yerine getirememesinin nedeninin diyabete bağlı mesane afferent sinir yollarının fonksiyonunun bozulmasıyla ilişkili olduğu sonucuna vardı. Hiperaktif mesanenin de yine periferal nöropatinin detrüörün kasılma yeteneğini bozmasıyla bağlantılı olabileceği sonucuna vardılar (138).

Ho ve ark Tip2 DM li 98 kadın hasta üzerinde yaptığı ürodinamik çalışmada 34 hasta da aşırı aktif mesane saptadı ve bunların ürodinami bulgularında artmış mesane hissi ve detrüör aşırı aktivitesi saptadı ve bu çalışma AAM li diyabetik kadınlarda detrüör aktivitesiyle birlikte idrar hissini arttığını gösterdi (139). Yapılan başka bir çalışmada diyabetik ve alt üriner sistem semptomlu erkeklerin ürodinamik ve nörolojik değerlendirmesinde, ilk idrar hissindeki idrar volumu ve motor defisit değerlendirilmiş, yüksek miktarda ki postmiksyon rezidüel volum ile hem motor hem sensory sinir harabiyetiyle korele olduğu ayrıca artmış mesane kapasitesinde cilt sempatik yanıtında ki bozulmayla korele olduğunu tesbit etmişler (140). Ueda ve ark yaptıkları çalışmada da yukardaki çalışma gibi DMD ile sempatik cilt yanıtında ki bozulmanın korele olduğu gösterdi (129).

Diyabetik mesane disfonksiyonu fizyopatolojisinde ağır basan teorilerden biriside miyojenik teoridir. Diyabetik hayvan modellerinde detrüör düz kaslar üzerinde yapılan in vitro çalışmalarda farklı fonksiyonel değişiklikler bildirildi. Yapılan ilk çalışmalarda diyabetik hayvan mesanelerinde detrüör kasılmasının kontrol gruplarına göre, düştüğü, değişmediği veya arttığı bildirildi. Daneshgari ve ark nın diyabet ratlarda zamana bağlı olarak detrüör düz kaslarda kasılmanın değerlendirildiği çalışmada carbachol chloride, potassium chloride (KCl), adenosine

5'-triphosphate (ATP), ve elektrik uyarısına 6–9 hafta arası yanıt artışı olurken, 12-20 haftalarda azalma olduğunu saptadılar (128). Başka bir çalışmada KCl- ve carbachol-stimulated contractility of DSM strips from alloxan-induced diabetic rabbits zaman ve şeker düzeyi yüksekliğine bağlı olarak detrusör düz kaslarda kasılmasının azaldığını gösterdiler (141). Diğer bir çalışmada STZ-induced diabetes 2-8 hafta arasında muscarinic receptor density nin arttığını saptadılar (142). Kubota ve ark da STZ ile oluşturulan diyabetik ratlarda 8-10 hafta da β_1 -receptor-mediated relaxation yanıtının arttığını gösterdi (143). Diğer bir çalışmada STZ ile oluşturulan 8. haftalık diyabetik ratlarda detrusör düz kas stripleri elektrik uyarısından önce α -1a- veya α -1d-adrenergic reseptör antagonistleri ile inkube edilmiş ve α -1a- ve α -1d-adrenergic reseptör mRNA ların diyabetik ratlarda daha az olmasına rağmen kasılma yanıtının azaldığı gösterilmiş, aynı çalışmada yukarıda bahsedilen diğer çalışmalarda olduğu gibi presnaptik ve otonomik reseptör sensitivitesinin değişiklik gösterebileceğini belirtmiş (144). STZ ile oluşturulan diyabetik ratlarda detrusör düz kaslarda (DDK) kasılmanın artmasının nörotransmitter salınımının artmasına ve kalsiyom kanal aktivitesinin veya duyarlılığının artmasına bağlı olabileceği bildirildi. Başka bir çalışma STZ ile oluşturulan diyabetik ratlarda mesane düz kas tonusunun düzenlenmesinde Na^+/K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase pompaları gibi iyon pompalarının aktivitesinin önemli rol oynadığını gösterdi (145).

Morfolojik olarak, STZ-diyabetik ratlarda 1-2 hafta gibi erken dönemlerde detrusör düz kaslarda belirgin hipertrofiye neden olur. Liu ve ark yaptıkları iki ayrı çalışma da meydana gelen bu hipertrofinin diyabetle birlikte görülen aşırı diürece bağlı olduğunu gösterdiler (146, 147). Bu hipertrofinin nedenini de içme sularına % 5 sukroz konulan diüretik grup ve diyabetik grubun ikisinde birden kontrol grubuna oranla kalsinorin metabolitlerinin yükselmesinin eşlik ettiğini ve hipertrofinde buna bağlı olabileceğini belirttiler (147).

Diyabete bağlı üretelyumda da değişiklikler meydana gelmekte başta bariyer ve sensör görevi olmak üzere birçok fonksiyonu etkilenmektedir. Mesane ürotelyumu permeabilite, transport ve mesane duvarında endositozun düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptir. Üretelyumun üre ve iyon geçişlerine karşı sadece pasif bir bariyer görevinden ziyade mesane fonksiyonlarında da bir

sensör görevi gördüğü görüşü artmaktadır (27). STZ-diyabetik ratlarda norotransmitter gibi sinyal molekülleri ve üretelyal hücre reseptör ekspresyonu artışıyla birlikte üretelyal doku oranında da artış olduğu gösterildi. Bu değişiklikler üretelyum ile detrüsör düz kası ve sinir uçları arasında bağlantıyı sağlamak için DMD oluşumuna neden olabilir (28) yani bir kompanzasyon mekanizması olarak değerlendiriliyor (137). Yakın zamanda dişi ratlarda üretelyum morfoloji ve gen ekspresyonunun değerlendirildiği çalışmada STZ-diyabeti oluşturulduktan 3, 9 ve 20 hafta sonra üretelyum değerlendirilmiş ve 9. hafta da üretelyumda deskuamasyon olduğu ve bariyer fonksiyonunu yitirdiği gözlenmiş ve 20. haftada da superfisyal üretelyum tabakasının repopularize olduğu gözlenmiş (148). Aynı çalışma da her 3 zaman diliminde de polyol pathway enzimi aldoz redüktaz, nerve growth faktör, ve sonic hedgehog mRNA ların diyabetik üretelyumda upregülasyon gösterdiği görüldü, anlamlı reseptör upregülasyonu ise urothelium mechanosensation (transient receptor potential vanilloid subfamily member 1) ve üretelyum otokrin / parakrin sinyali (asetilkolin reseptörleri M2 ve M3, purinergic reseptörler P2X2 ve P2X3)'de görüldü. Bu sonuçlar diyabete bağlı üretelyum mekanosensitivitesi ve hücre sinyallerinde değişikliklere ve bariyer fonksiyonunun bozulmasına neden olarak mesane instabilitesi, aşırı aktivitesi ve üretelyumda sonlanan afferent sinir uçlarında değişiklikler yaparak mesane hissini etkilemektedir (148).

Tip 1 ve Tip 2 DM de glukozun kandan bu dokulara transportu yetersiz kalır ve bunun sonucunda hiperglisemi oluşur, hiperglisemiye bağlı da bir çok metabolik değişiklikler meydana gelir. Oksidatif stres metabolitlerin artışı bu metabolik değişikliklerden en önemlilerinden birisidir. Aşırı miktardaki glukozun siklik asit döngüsünde oksidasyonu sonucunda OS in hücre içerisinde artışına neden olur. Aşırı miktarda oluşan moleküler oksijenler reaktif oksijen molekülleri olan süperoksiti meydana getirirler. Brownlee ve ark superoksit ve diğer ROS lerin oluşum mekanizmasını, diyabete bağlı dört hasar mekanizmasının oluşmasıyla açıkladı. Bunlar; aşırı glutasyon sonucu fazla miktarda son ürün ortaya çıkması, protein kinaz C aktivasyonu, heksozamin ve polyol yollarına akışın fazla olması. ROS lerin artışı DNA larda kırılmalara neden olur, ADP-riboz'la poly polimeraz aktivasyonu ve glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase inhibisyonları dört hasarlanma yolunu aktive etmektedir ve sonuçta OS etkisini ve gen ekspresyon oranını arttırarak hasar

verici etkisini göstermektedir (149). Birçok çalışmada OS in diğer diyabetik komplikasyonlarda da etkili olduğunu gösterdi ve birçok araştırmacı OS lerin diyabetik mesane dokusunda da arttığı gösterdi (38, 137, 141, 150)

Yakın zamanda yapılan bir çalışma da OS artışı diyabete mi yoksa diürezemi bağlı olup olmadığını göstermek için ratlara üriner diversiyon uygulanmış, idrarın mesane yerine diversiyon uygulanarak vajinaya akması sağlanmış ve sonuçta diversiyon uygulanan diyabetik ratlarda nitrotyrosine and manganes superoxide dismutase oranının arttığı gösterilmiş, bu değerler sadece diversiyon uygulanan veya diversiyon uygulanmadan %5 sukroz ile diürez sağlanan ratlarda kontrol grubuyla aynıydı, yani diürez olmaksızın, sadece diyabete bağlı olarak mesanede OS artışı olduğu gösterildi (151) Yapılan başka bir çalışmada da alloxan ile oluşturulan diyabetik tavşanlarda mesane düz kas kontraktilitesinde azalma olduğunu ve bunun da lipid peroksidasyon ürünleri artışı ve polyol yolunun ana enzimi olan aldose reduktaz enziminin overexpresyonuyla ilişkili olduğunu gösterdi (141). Oksidatif hasar apoptozu indükleyerek mesane düz kas hasarına yol açmakta ve diyabetik sistopatiye katkı sağlamaktadır (150). İdrarın depolama ve işeme fazında mesane ve eksternal üretral sfinkterin koordineli çalışması gerekmektedir. Dolum fazında mesane relaksasyon fazındayken üretral sfinkter aktif durumdadır, işeme fazında ise sfinkter relaksasyon fazındayken mesane aktif durumdadır (152). Diyabetle birlikte üretrada meydana gelen en belirgin değişiklik çıkım direncinde artıştır (153). Diyabet eksternal üretral sfinkter disfonksiyonuna neden olabilir, üretral düz kas relaksasyonunda ve nitrik oksid yanıtında bozulmaya neden olabilir ve alfa-1 adrenerjik agonistlere üretral düz kas relaksasyon yanıtında artışa neden olabilir. Bu değişiklikler çıkım direncinde artışa neden olarak, mesane remodelinginde, postvoiding rezidü artışını ve sonuçta mesane kontraktilitesinin bozulmasını hızlandırabilir (153).

Diğer organlarda farklı olarak mesanede glukoz yüksekliğinin yanında artmış idrar miktarına bağlı olarakta birtakım değişiklikler meydana gelmektedir. O yüzden biz, hipergliseminin yanında artmış idrar volümünde DMD a katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz. Bu katkı diyabetin erken dönemlerinde mesane düz kas hipertrofisi ve aşırı aktif mesane semptomları şeklindeyken (kompanse dönemi), diyabetin

ilerleyen döneminde bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla uyumlu olarak mesane düz kas oranının azalması, fibrozis oranının artması ve buna bağlı mesane kompliyansının azalması, mesane kapasite ve işenen volüm artışı ve artmış post miksiyon rezidü şeklindedir.

Hayvan çalışmalarında içme sularına %5 sukroz ilave edildiğinde, vücut ağırlıkları ve kan glukoz düzeyleri değişmeden idrar çıkışının arttığı gözlenmiş (154). Hem rat hemde tavşanlarada sukroz ilavesiyle oluşturulan diürezde aynen diyabetik ratların erken dönemlerinde olduğu gibi mesanede hızlı birşekilde ve önemli oranda mesane hipertrofisi ve mesane kontraktilite, kapasite ve kompliansında artış gözlendi. Bu benzerlik diyabetik hayvanlarda idrar miktarı artışına karşılık mesanenin erken dönemde hipertrofiye uğramasını fizyolojik bir adaptasyonu olarak değerlendirilebilir. Liu ve ark ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada %5 sukroz diürez oluşturulan ve Tip 1 STZ diyabetik rat grubunun her ikisinde de mesane duvarında hipertrofi ve lümen dilatasyonuyla, detrüsör kası, üretelyum ve kollojen yapısında yapısal değişiklikler şeklinde reorganizasyon olduğu gözlendi (154). Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada Tip 1 diyabetik fareler ve %5 sukrozla diürez oluşturulan farelerde yine erken dönemde yukardaki çalışmayla benzer bulgular elde edilirken, çalışmanın geç dönemlerinde diyabetik grupta rezidüel volum artarken, işeme basıncının düştüğü gözlenirken, diüretik fare grubunda rezidüel volum artarken işeme basıncı değişmedi (154). Bu çalışmalarda görüldüğü üzere poliüri yani artmış idrar miktarı tek başına mesane yapı ve fonksiyonunu değiştirebilmektedir.

DMD unun dekompanzasyon döneminde yani UAB durumunda uygulanacak tedavi seçenekleri konusunda çok az miktarda yol gösterici yayın bulunmaktadır. Burda amaç mesanenin tamamen boşalmasını sağlayarak aşırı rezidüel volumü azaltmak, hidronefrozu ve ürosepsisi önlemeye yöneliktir. İlk basamak 1 aylık ya da 7-14 gün kalıcı veya intermittant kataterizasyondur. Bu süreçte detrüsör fonksiyonunu düzeltici (konstipasyonun giderilmesi, alfa bloker gibi) medikal tedaviler uygulanır (37). Özellikle son zamanlarda yapılan çalışmalarda 65 yaş üstü ve akut idrar retansiyonu sonrası sonda takılan hastalarda alfa bloker tedavisinin etkin tedavi olduğu gösterilmiş (155) ve uzun süreli alfa bloker ile 5 alfa redüktaz

kombinasyonu önerilmektedir. Yaşam beklentisi bir yıldan fazla olanlarda daha ileri incelemeler gerekmektedir. Kalıcı katater yerleştirilenlerde sonda alındıktan sonra mesane kontraksiyonu yeterli düzeye gelmiyorsa sonda alındıktan sonra ikili işeme, işeme esnasında suprapubik bası uygulaması veya valsalva gibi manevraların mesane kontraksiyonunu sağlamada faydalı olabileceği belirtiliyor. Hastalarda antikolinergik tedaviye bağlı olarak mesane kontraksiyonu azalacağından Bethanechol (40-200 mg/gün) önerilebilir. Bethanechol ayrıca sfinkter fonksiyonu ve lokal innervasyonu normal olanlarda postmiksiyon rezidüyü düşürmede etkin olabilmekle beraber bu konu hala tartışmalıdır (156). Ancak bu yöntemlerin hiç birisi tedavi edici olmayıp daha ziyade semptomları azaltmaya yönelik tedavilerdir dolayısıyla bu yöntemler çokta yüzgüldürücü değildir.

DMD ile ilgili yeni tedavi seçenekleri bulunmasada, yeni tedaviler konusundaki öneriler az sayıda hayvan çalışmasından ibarettir. Bunlardan en yakın zamanda yayınlananlar arasında olanlar, antioksidan tedavilerin mesanede ki OS oranını azaltarak DMD tedavisinde etkin olduğunun gösterilmesi (38, 157) ve hücre bazlı tedavilerin etkinliğiyle ilgili olanlardır. Hücre bazlı tedaviler sonuçları itibariyle (4, 5) şuan umut verici tedaviler arasında görünmekte ve çalışmalarda en ön sırayı almış durumdadır.

Ancak klinik DMD yada UAB'da klinik çalışmanın zorluklarından dolayı deneysel çalışmalar üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Şimdiye kadar Atala ve ark 2006 da yaptıkları trigon koruyucu subtotal sistektomi çalışmasını klinik çalışmalarda tekrarlamak çok zordu (103). O yüzden bu çalışma insanlarda büyük gruplar üzerinde tekrarlanamadı, ancak domuz örnekleri üzerinde tekrarlanarak başarılı sonuçlar bildirildi (158). O yüzden büyük greftlerin gerek insan gerekse hayvan mesane rejenerasyonu için kullanıp kullanılamayacağı konusunda hala tam olarak bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bundan ziyade diğer önemli sorular kültürde oluşturulan bu hücrelerin transplante edildikten sonrada stabil şekilde durup durmayacağı ve kanser riski taşıyıp taşımayacağıdır. Bu soruların yanıtı hala bilinmiyor (57). Kanserojenез riskiyle ilgili Czajkowski ve arkadaşlarının uzun süre bekletilmiş melanosit hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada normal hücrelerde

herhangi bir karsinogenez lehine değişim gözlemlenmediler ve bu kültürlerin güvenli bir şekilde nakledilebileceğini bildirdiler (159).

Şimdiye kadar mesane rekonstruksiyonu için ileum ve diğer intestinal organlar kullanılsada, laboratuvar ortamlarında mesane rekonstruksiyonu için asellüler matriksin kullanılabileceği gösterildi. Asellüler matriks growth faktör yönünden zengin bir nevi doğal scaffold idi ve nakledilen dokuya boyut, yapısal ve genetik farklılıklar gösterecek şekilde iyi uyum sağlamaktaydı (160). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda bu asellüler matriks yapıları scaffold ların fibrozise neden olduğunun ve remodelingi engellediğinin gösterilmesi (158) üzerine mesane rejenerasyon ve doku mühendisliğinde yeni hücresel yapılara ihtiyaç olduğunu anlaşıldı ve mesane patolojilerinde kök hücre kullanımının önemi gündeme geldi.

Her ne kadar kök hücre kullanımında birçok soru işaretleri bulunsada da umut verici tedaviler arasında ön sırayı almış durumdadır. Kök hücre transferiyle ilgili akla gelen ilk sorulardan birisi transplante edilen hücrelerin viabilitesiyle ilgilidir. Ancak düşükte olsa nakledilen otolog hücrelerin viabilitesi gösterildi (161, 162). Viabilite nakledilen hücrelerin growth faktör ve anjiogenezisi sağlaması nedeniyle önem arz etmektedir (163).

Mesaneyle ilgili kök hücre çalışmaları şimdiye kadar daha ziyade urge inkontinans ve mesane restorasyon ve augmentasyonu üzerine yoğunlaşmış durumdadır. Bununla ilgili yakın zaman da Huang ve arkadaşları hiperlipidemik rat modelleriyle oluşturdukları aşırıaktif mesaneli ratlarda ADSC kök hücrelerinin detrusör enjeksiyonu ve tail ven enjeksiyonu şeklinde uyguladılar ve detrusör enjeksiyonuyla yapılanda daha belirgin olmak üzere her iki şekilde yapılan kök hücre transferinde mesane fonksiyonlarında belirgin düzelme olduğunu bildirdiler (164). Bizim yapmış olduğumuz çalışma verileri bu çalışma sonucuyla uyumluydu. Bizde yapmış olduğumuz çalışma da farklı bir kök hücre türünü (yenidoğan mesane mezenkimal kök hücresi) bu çalışmaya benzer şekilde IP olarak ve direkt detrusöre enjekte ederek DMD lu ratlara transfer ettik. Elde ettiğimiz verilerde bu çalışmada olduğu gibi direkt mesaneye nakledilen gruptaki düzelmenin daha belirgin olduğunu saptadık.

Bizim çalışmamızın bu çalışmadan kök hücre çeşidi dışında diğer bir farkıda bizim çalışmadaki mesane disfonksiyonunun bu çalışmadakinin aksine aşırı aktif mesane yerine UAB modellerinin oluşmuş olmasıydı. Bu farklılıklar göz önüne alındığında akla değişkenlerin farklı olması nedeniyle kök hücrelerin etkilerinin farklı olabileceği sorusuydu ancak literatürler incelendiğinde yakın zamanda Zhang ve ark. ADSC lerin bizim çalışmaya benzer şekilde diyabetik rat modellerinde yararlı etkisini bildirdikleri görüldü (165).

Mesane kök hücre çalışmalarıyla ilgili Yokoyama ve ark. iskelet kası kök hücrelerinin nakledildikleri mesane düz kası hücrelerine dönüştüğünü gösterdiler (166). Lu SH ve ark da nakledilen bu iskelet kaynaklı kök hücrelerin mesane kasılmasına katkı sağladığını gösterdiler (167).

Mesane disfonksiyonlarındaki kök hücre tedavilerinin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda değişik görüşler bildirilmiştir. Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin mesane disfonksiyonunda kullanılmasıyla ilgili yapılan çalışmalarda kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin mesane düz kas hücrelerine dönüştüğü gösterildi (67, 168, 169).

Rodriguez ve ark. başka bir kök hücre kaynağı olarak ADSC lerin mesane düz kas hücrelerine dönüşerek mesane disfonksiyonu tedavisinde etkili olduğunu gösterdiler, bu çalışmayı destekler nitelikte benzer bir çalışma Jack ve ark. tarafından da bildirildi (170, 171).

Huang YC ve ark. kök hücrelerin mesane disfonksiyonu tedavisindeki etki mekanizmasıyla ilgili olarak yukardaki çalışmaların aksine transfer edilen kök hücre-mesane düz kası dönüşümünün düşük oranda olduğunu ve ADSC nin asıl etkisinin parakrin yönde olduğunu bildirdiler (164). Bu çalışma herne kadar hiperlipidemik aşırıaktif mesaneli rat modelleri üzerinde yapılmış olsada Zhang H ve ark. nin ADSC i diyabetik rat modelleri üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada yine bu çalışmaya benzer bulgu ve görüş bildirdiler (165).

Mesaneye nakledilen kök hücrelerin mesane düz kas hücrelerine dönüştüğü gösterilmiş olsada, bu kök hücrelerin çok özelleşmiş yapı ve fonksiyonlarından dolayı üretelyal diferansiyasyonunun çok daha zor olacağı düşünülüyordu. Ancak

Liu J ve ark. yaptıkları çalışmada üretelyal hücrelerle birlikte kültüre edilen ADSC lerin üretelyal markırları ekspresse ettiklerini gösterdi (172). Bu üretelyal diferansiyasyonun ADSC hücrelerinin birlikte kültüre edilen mevcut üretelyal hücrelerle direkt hücre sel kontakt sağlayarak (parakrin etki) gerçekleştirdiği bildirildi. Ancak sadece hücre sel kontak tla bu hücre sel diferansiyasyonun gerçekleşmesinin tam olarak mümkün olamayacağı, öyle olduğu takdirde growth faktörlerin ve gen transferlerinin göz ardı edilmiş olacağı ve bununda diğer teorilerle ters düşeceği bildirildi (109). Bu çalışmalardan başka kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin mesane düz kas ve üretelyal hücrelere dönüştüğünü gösteren yayınlar bildirildi (168, 173).

Rejenerasyon ve rekostrüksiyon tedavilerinin ürolojik patolojilerde kullanımıyla ilgili kaynaklar incelendiğinde rejenerasyon ve rekonstrüksiyona en fazla uyumlu organ mesane olarak görülmektedir. Rejenerasyon ve rekostrüksiyonda fibrozis ve rejenerasyon kapasitesinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı kök hücre kullanımı mesane patolojilerinde ön plana çıkmıştır. Tüm doku ve organlarda olduğu gibi üriner sistem patolojilerinin tedavisinde birçok kök hücre çeşidi tanımlanmış ve kullanılmıştır. Kök hücre kaynağı olarak embriyonik kök hücreleri ve bunların otolog kullanımı yaygın olarak denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu hücrelerin kullanımında etik kaygıların yanında, mesane tümörü gibi en fazla sistektomi endikasyonuna neden olan malign hastalıklar ve immunityle ilişkili interstisyel sistit, aşırı aktif mesane gibi veya bir çok sistemik hastalıklarda otolog rekonstrüksiyon ve rejenerasyonu mümkün olamamaktadır. Bundan dolayı mesane kök hücre teknolojisinde mezenkimal ve allojenik kök hücre deneysel çalışma gereklilikleri görülmektedir.

Tüm doku ve organlarda olduğu gibi mesane patolojilerinde ilk kullanılan kök hücre kaynağı kemik iliğidir. Yapılan çalışmalarda kemik iliği stroması dışında, MSC'lerin birçok organ ve dokuda bulunduğu gösterildi. Bu hücreler konnektif doku hücrelerine dönüşerek stromayı oluşturmakta, organ işlevlerinin yürütülmesinde önemli roller üstlenmektedirler. Diş pulpası, kas, kemik, kordon kanı, lipoaspirasyon materyalleri, kordon stoması, deri, amnion sıvısı, periferik kan, siynoviyal sıvı gibi

çok çeşitli alanlardan izole edilebilirler. Bu dokulardan elde edilen MSC'lerin kökenleri ne olursa olsun biyolojik ve fonksiyonel özellikleri çok benzerdir (80).

MSC'lerin birçok doku ve organdan kolaylıkla elde edilebilir olmaları, mezodermal dokuların dışında diğer germ tabakalarına da farklılaşma gibi yüksek diferansiyasyon potansiyelleri, hasarlı dokuya ulaşmada migrasyon yeteneklerini kullanmaları, transfer kolaylığı, hızlı çoğalma ve dayanıklılıklarıyla gen tedavisi kullanımına uygun olmaları, füzyon yeteneklerinin olması, stromal kaynaklı oldukları için tüm doku hücrelerine destek hücre olarak, fonksiyon ve gelişimlerinde katkıda bulunmaları, enzim defekti olan hastalıklarda enzim üreten hücre olma özellikleri, kemokinler, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile hücre ve /veya dokuda destek hücre olarak onarım yapabilme, immunojeniteyi sağlayan HLA-DR ve ko-stimülör molekül ifadesi olmadığı için immunojenitelerinin düşük olması, T lenfosit aktivasyonu, alloreaktif reaksiyonların önlenmesi, B lenfositlerin inhibisyonu, düzenleyici T hücrelerinin uyarılması ve çözünebilen faktörlerin varlığıyla immunsupresif etki göstermeleri nedeniyle doku uygunluğunun aranmaması MSC'lerin hücre bazlı tedaviler arasında gelecek vaad eden tedaviler arasında ön sıraya çıkmasını sağlamıştır (11, 46, 83, 88-90, 174, 175).

MSC ler açısından bir diğer önemli bilgi, MSC sayısının yaşla ters orantılı olarak değiştiğidir. Yapılan araştırmalar fetal MSC'lerin sadece sayısal açıdan değil erişkin kök hücrelerden doku gelişiminde, hücre bölünmesinde ve immunolojik antijen sunumunda rol oynayan genler açısından da önemli farklılıklar taşıdığını göstermektedir (9-11).

Bizde yapmış olduğumuz bu çalışmada öncelikle diyabetik ratlarda mesane disfonksiyonu geliştiğini gösterdik, ardından DMD'unun diyabet zamanına bağlı olarak UAB şekline dönüştüğünü ürodinamik çalışmayla gösterdik ve histopatolojik incelemelerde bu bulgularımızı destekledik. UAB tedavisinde kür veya belirgin fayda sağlayan tedavi seçenekleri olmaması ve yeni tedavi tekniği olarak kök hücre çalışmalarının ön plana çıkmış olmasından ötürü, oluşturmuş olduğumuz UAB'lı diyabetik rat modellerine kök hücre tedavisi uyguladık.

Kök hücre kaynağı ve çeşidi olarakta, otolog ve ESC uygulamalarının handikapları ve kısıtlılıkları göz önüne alındığında DMD tedavisinde şimdiye kadar tanımlanmamış olan yenidoğan rat mesanesinden elde edilen mezenkimal kök hücreleri kullandık.

Elde ettiğimiz verilere bakıldığında, yenidoğan rat mesanesinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin DMD tedavisinde etkili bir tedavi yöntemi olduğunu gösterdik. Bu tedavi yönteminin tedavi bekleyen ve sayıları her geçen gün artan DMD'lu ve diğer mesane patolojili hastalar için umut verici bir tedavi yöntemi olduğunu öneriyoruz. Ancak bu yöntemin klinik uygulamaları için, daha fazla sayıda benzer deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ

- DMD diyabetin erken dönemlerinde dahi ortaya çıkabilmekte ve mesane yapı ve fonksiyonlarını diyabet süresine bağlı olarak etkilemektedir.
- DMD'nun ilerleyen aşamalarında mesanenin detrüör kontraktilesi azalmakta ve hipokontraktıl mesane (Underactive Bladder-UAB) sendromu ortaya çıkmaktadır.
- Yaptığımız bu çalışmada UAB sendromunun komponentleri; azalmış idrar hissi, artmış mesane kapasitesi, azalmış detrüör kontraktilesi, mesane boşaltma zamanında uzama ve artmış postmiksiyon rezidü şeklindeydi. Bu sonuçlar, mesane disfonksiyonuyla ilgili daha öncesinde yapılan çalışmaları destekler nitelikteydi.
- DMD ve UAB sendromunun tanısında ürodinamik inceleme etkin bir tanı yöntemidir.
- DMD ve UAB tedavisinde kök hücre tedavisi etkin bir tedavi yöntemidir.
- Kök hücre tedavileri arasında, doğum esnasında herhangi bir nedenle kaybedilen yenidoğan rat mesanelerinden elde edilen MSC'ler, UAB tedavisinde uygulanabilecek yeni bir mezenkimal kök hücre çeşididir.
- Kök hücre tedavisinin direkt mesane duvarına uygulanması, IP/ IV uygulamaya göre daha etkilidir.
- DMD tanı ve tedavisindeki araştırmalar için diyabetik rat modellerinin kullanılması; biyokimyasal, histopatolojik ve rat ürodinamisiyle fizyolojik verilerin eldesine imkan sağlamakta olup hastalığın fizyopatolojisinin anlaşılması açısından etkin bir deneysel çalışma yöntemidir.
- DMD'de, nMSC tedavisinin klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için daha fazla benzer deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. ÖZET

MESANE DİSFONKSİYONLU DİYABETİK RAT MODELLERİNDE KÖK HÜCRE TEDAVİSİ

Amaç: Diyabetik mesane disfonksiyonu, genelde diyabetin geç dönem bulguları olarak bilinen azalmış mesane hissi ve azalmış detrüör kontraksiyonların eşlik ettiği artmış mesane kapasitesi ve rezidü idrarla karakterize bir hastalıktır. Diyabetik mesane disfonksiyonu diyabet komplikasyonları arasında en sık görülen ve en can sıkıcı olanıdır. Bu çalışmanın amacı yenidoğan rat mesanesinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin diabetik mesane disfonksiyonu üzerine olan etkisini araştırmak.

Materyal ve Metodlar: Kontrol grubunu da içine alacak şekilde toplam 24 adet Sprague- Dawley tipi ratlar 4 gruba ayrıldı. Deneysel diyabetes mellitus, diyabetik rat gruplarına tek doz 45mg/kg streptozosin (STZ)'in intraperitoneal olarak uygulanmasıyla elde edildi. Diyabet oluşturulduktan 12 hafta sonra 24 ratın tamamı gruplara ayrıldı. 1. Grup (n:6): Mesane duvarına PBS enjeksiyonu uygulanan diyabetik olmayan sağlıklı kontrol grubu (NR + PBS olarak adlandırıldı), 2. Grup (n:6): Mesane duvarına PBS uygulanan diyabetik grup (DM + PBS olarak adlandırıldı), 3. Grup (n:6): Mesane duvarına nMSC uygulanan grup (DM + D olarak adlandırıldı), 4. Grup (n:6): nMSC intraperitoneal olarak uygulanan diyabetik grup (DM + IP olarak adlandırıldı). Kök hücre tedavisi veya PBS uygulandıktan 4 hafta sonra 24 ratın tamamı değerlendirildi. Değerlendirmeler biyokimyasal, histopatolojik ve urodinamik çalışmalarla yapıldı.

Bulgular: Diyabet vücut ağırlığında düşüşe neden olurken, mesane ağırlığı ve kapasitesini arttırdı. İşenen idrar hacmi ve rezidü idrar miktarının kontrol grubuna göre arttığı saptandı. İşeme anındaki maksimum detrüör basıncı DM + PBS ve DM + IP gruplarında kontrol grubuna göre daha düşüktü (13,3 +/- 0,78 and 16,3 +/- 0,6 vs. 21,54 +/- 1,00 mmHg, respectively) ancak DM + D grubunda kontrole göre daha yüksekti (28,58 +/- 2,08 vs 21,54 +/- 1,00). Toplam doku oranlarında, düz kas oranı tüm diyabetik gruplarda azalmıştı ancak DM +D grubunda daha az oranda azalmıştı.

Düz kas kalınlıkları DM +PBS, DM+IP, DM+D'ler NR+PBS (kontrol) e kıyasla (sırasıyla 1,12 +/- 0,13, 1,33 +/- 0,30, 1,83 +/- 0,25 vs 1,87 +/-0,30) şeklindeydi ve fibroz kalınlıkları ise kas kalınlıklarının tersine tüm diyabetik gruplarda artmıştı. Fibröz kalınlık oranları DM +PBS, DM+IP, DM+D'ler NR +PBS (kontrol)'e kıyasla (sırasıyla 2,33 +/- 0,34, 2,12+/- 0,30, 1,33 +/-0,20 vs 1,20+/- 0,40) şeklindeydi.

Sonuç: Biz bu çalışmayla yenidoğan mesanesinden elde edilen mezenkimal kök hücreler (nMSCs)'in diyabetik mesane disfonksiyonunda iyileşme sağladığını gösterdik. nMSCs diyabetik mesane disfonksiyonu tedavisinde etkin bir tedavi metodudur. Ayrıca bu çalışmayla kök hücrelerin direkt mesane duvarına uygulanmasının daha etkili olacağını öneriyoruz.

Anahtar kelimeler: Diyabetik mesane disfonksiyonu, underaktif mesane, yenidoğan mesenkimal kök hücresi, rat ürodinamisi

8. ABSTRACT

STEM CELL THERAPY ON BLADDER DYSFUNCTION IN DIABETIC RAT MODELS

Purpose: Diabetic bladder dysfunction is a characteristic disease with increased bladder capacity and post voiding residual volume in diabetic patients, accompanied by decreased bladder sensation and contractions of detrusor which are generally symptoms of late stage bladder dysfunction in diabetes. Diabetic bladder dysfunction is among the most common and bothersome complications of diabetes mellitus. The aim of this study is to evaluate effect of mesenchymal stem cell therapy derived neonatal bladder for diabetic bladder dysfunction.

Materials and Methods: A total of 24 male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups, including age matched controls. Experimental diabetes was induced by administration of 45 mg/kg streptozotocin (STZ) with a single intraperitoneal injection. A total of 24 rats divided to the groups 12 weeks later than induced of diabetes. 1. Group (n:6): Healthy nondiabetic control group received PBS to the bladder wall (designated as NR + PBS), 2. Group (n:6): Diabetic groups which received PBS to the bladder Wall (designated as DM + PBS), 3. Group: Diabetic groups which received nMSC to the bladder wall (designated as DM+D), 4. Group Diabetic groups which received nMSC by Intraperitoneally (Designated as DM + IP). A total of 24 rats assessed 4 weeks later after administration of stem cell therapy or PBS. Biochemistry, histopathologic and urodynamic study performed for the evaluation.

Results: Diabetes decreased average body weight and increased bladder weight, capacity. Voided and residual volumes increased in diabetes groups vs controls. Peak detrusor leak pressure decreasing in DM + PBS and DM + IP groups vs controls (13,3 +/- 0,78 and 16,3 +/- 0,6 vs. 21,54 +/- 1,00 mmHg, respectively). But it was higher in DM + D groups than controls (28,58 +/- 2,08 vs 21,54 +/- 1,00). As a percent of total tissue area, smooth muscle decreased in the all diabetes groups but it was relatively less decrease in DM+ D groups. Smooth muscles thickness rates

DM + PBS, DM + IP, DM + D vs NR + PBS (control) (1,12 +/- 0,13, 1,33 +/- 0,30, 1,83 +/- 0,25 vs 1,87 +/-0,30 mm, respectively) and fibroz area increased in the all diabetes groups, conversely to smooth muscle areas. Fibros thickness rates DM + PBS, DM + IP, DM + D vs NR + PBS (control) (2,33 +/- 0,34, 2,12+/- 0,30, 1,33 +/- 0,20 vs 1,20+/- 0,40 mm, respectively).

Conclusions: We demonstrated in this study that cell therapy with mesanchimal stem cells of neonatal bladder (nMSC) is ameliorated diabetic bladder dysfunction. nMSC is a usefull therapy technique for diabetic bladder dysfunction. Also we suggest that direct injection of stem cells to the bladder wall is more effective than IP or IV administration.

Keywords: Diabetic bladder dysfuntion, neonatal mesenchimal stem cell, underactive bladder, urodynamic study of rat

9. KAYNAKLAR

1. Control CfD, Prevention, Control CfD, Prevention. National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. 2011;201.
2. Daneshgari F, Moore C. Diabetic uropathy. *Seminars in nephrology*. 2006;26 (2):182-5.
3. Daneshgari F, Liu G, Birder L, Hanna-Mitchell AT, Chacko S. Diabetic bladder dysfunction: current translational knowledge. *J Urol*. 2009;182 (6 Suppl):S18-26.
4. Gopinath C, Ponsaerts P, Franssen E, Boeykens N, Pauwels P, Wyndaele JJ. Smooth muscle cell transplantation improves bladder contractile function in streptozocin-induced diabetic rats. *Cytotherapy*. 2013;15 (7):869-78.
5. Vaegler M, Lenis AT, Daum L, Amend B, Stenzl A, Damaser MS, et al. Stem cell therapy for voiding and erectile dysfunction. *Nature reviews Urology*. 2012.
6. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292 (5819):154-6.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282 (5391):1145-7.
8. Çetiner M. Hücresel Tedaviler Tarihi ve Süreyya Tahsin Aygün. 2. Ulusal Kök Hücre Kongresi Program ve Özet Kitabı, Trabzon. 2006:29-34.
9. Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica*. 2005;90 (8):1017-26.
10. Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*. 2006;44 (4):215-30.
11. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009;217 (2):318-24.

12. Sensebe L. Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Bio-medical materials and engineering*. 2008;18 (1 Suppl):S3-10.
13. John M. Park M. Normal Development
of the Genitourinary Tract. *Campbell-Walsh Urology 10th Edition*, Saunders. 2012;111:2975-3001.
14. Gearhart JP, Rink RC, Mouriquand PD. *Pediatric urology*: Springer; 2009.
15. van der Putte SC. Normal and abnormal development of the anorectum. *Journal of pediatric surgery*. 1986;21 (5):434-40.
16. Kluth D, Hillen M, Lambrecht W. The principles of normal and abnormal hindgut development. *Journal of pediatric surgery*. 1995;30 (8):1143-7.
17. Nievelstein RA, van der Werff JF, Verbeek FJ, Valk J, Vermeij-Keers C. Normal and abnormal embryonic development of the anorectum in human embryos. *Teratology*. 1998;57 (2):70-8.
18. Dorsher PT, McIntosh PM. Neurogenic bladder. *Advances in urology*. 2012;2012:816274.
19. Victor W, Nitti M. Urodynamic and Video-Urodynamic Evaluation of the Lower Urinary Tract. *Campbell-walsh urology*, Saunders. 2012;Chapter 62:1847-70.
20. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. Standardisation Subcommittee of the International Continence Society. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Subcommittee of the International Continence Society. *Neurourology and urodynamics*. 2002;21 (2):167-78.
21. Boone TB KY. Uroflowmetry. *Neurourology and urodynamics*. 2002:28-51.
22. Siroky MB, Olsson CA, Krane RJ. The flow rate nomogram: I. Development. *J Urol*. 1979;122 (5):665-8.

23. Haylen BT, Ashby D, Sutherst JR, Frazer MI, West CR. Maximum and average urine flow rates in normal male and female populations--the Liverpool nomograms. *British journal of urology*. 1989;64 (1):30-8.
24. Wein AJ. Classification of neurogenic voiding dysfunction. *J Urol*. 1981;125 (5):605-9.
25. Neveus T, von Gontard A, Hoebeke P, Hjalmas K, Bauer S, Bower W, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function in children and adolescents: report from the Standardisation Committee of the International Children's Continence Society. *J Urol*. 2006;176 (1):314-24.
26. Alan J. Wein M, PhD (Hon), Louis R. Kavoussi, MD, Andrew C. Novick, MD, Alan W. Partin, MD, PhD and Craig A. Peters, MD, FACS, FAAP. *Campbell-Walsh Urology* 10th edition. Saunders 2012 (ISBN: 978-1-4160-6911-9).
27. Brown JS, Wessells H, Chancellor MB, Howards SS, Stamm WE, Stapleton AE, et al. Urologic complications of diabetes. *Diabetes care*. 2005;28 (1):177-85.
28. Daneshgari F, Liu G, Birder L, Hanna-Mitchell AT, Chacko S. Diabetic bladder dysfunction: current translational knowledge. *The Journal of urology*. 2009;182 (6):S18-S26.
29. Moller CF. Diabetic cystopathy.I: A clinical study of the frequency of bladder dysfunction in diabetics. *Danish medical bulletin*. 1976;23 (6):267-78.
30. Frimodt-Moller C. Diabetic cystopathy. A review of the urodynamic and clinical features of neurogenic bladder dysfunction in diabetes mellitus. *Danish medical bulletin*. 1978;25 (2):49-60.
31. Frimodt-Moller C. Diabetic cystopathy: epidemiology and related disorders. *Annals of internal medicine*. 1980;92 (2 Pt 2):318-21.
32. Lee WC, Wu HP, Tai TY, Liu SP, Chen J, Yu HJ. Effects of diabetes on female voiding behavior. *J Urol*. 2004;172 (3):989-92.
33. Esteghamati A, Rashidi A, Nikfallah A, Yousefzadeh A. The association between urodynamic findings and microvascular complications in patients with long-term type 2 diabetes but without voiding symptoms. *Diabetes research and clinical practice*. 2007;78 (1):42-50.

34. Kebapci N, Yenilmez A, Efe B, Entok E, Demirustu C. Bladder dysfunction in type 2 diabetic patients. *Neurourology and urodynamics*. 2007;26 (6):814-9.
35. Golbidi S, Laher I. Bladder dysfunction in diabetes mellitus. *Frontiers in pharmacology*. 2010;1:136.
36. Sexton CC, Notte SM, Maroulis C, Dmochowski RR, Cardozo L, Subramanian D, et al. Persistence and adherence in the treatment of overactive bladder syndrome with anticholinergic therapy: a systematic review of the literature. *International journal of clinical practice*. 2011;65 (5):567-85.
37. Alan J. Wein M, PhD (Hon), FACS. Pathophysiology and Classification of Lower Urinary Tract Dysfunction: Overview. *Campbell-walsh urology 10th Edition, Saunders*. 2012:1834-46.
38. Ha U, Bae WJ, Kim SJ, Yoon BI, Jang H, Hong SH, et al. Protective effect of cyanidin-3-O- β -D-glucopyranoside fraction from mulberry fruit pigment against oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rat bladder. *Neurourology and urodynamics*. 2013;32 (5):493-9.
39. Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*. 2005;15 (1):48-56.
40. Polin RA, Fox WW, Abman SH. *Fetal and Neonatal Physiology Forth Edition: Elsevier Health Sciences*; 2011.
41. Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE. *Abeloff's clinical oncology: Elsevier Health Sciences*; 2013.
42. Uchida N, Fleming WH, Alpern EJ, Weissman IL. Heterogeneity of hematopoietic stem cells. *Current opinion in immunology*. 1993;5 (2):177-84.
43. Schofield R. A comparative study of the repopulating potential of grafts from various haemopoietic sources: CFU repopulation. *Cell and tissue kinetics*. 1970;3 (2):119-30.
44. Can A. Niche concept and the hematopoietic stem cell niches. *Turkish J hematology*. 2007;24:95-101.
45. Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006;311 (5769):1880-5.

46. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004;104 (9):2643-5.
47. Nussbaum R, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson genetics in medicine*: Elsevier Health Sciences; 2007.
48. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential cell biology*: Garland Science; 2013.
49. Karaöz E, Ovalı E. *Kök hücreler*. Derya Kitabevi, Trabzon. 2004.
50. Chen SQ XA. The progress and implication of stem cell factor.. *BASIC MEDICAL SCIENCES AND CLINICS*. 2002;22 (5):385-90.
51. Antonescu CR. The GIST paradigm: lessons for other kinase-driven cancers. *The Journal of pathology*. 2011;223 (2):252-62.
52. Bongso A, Lee EH. *Stem cells: from bench to bedside*: World Scientific; 2011.
53. Lanza R, Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas ED, et al. *Essentials of stem cell biology*: Academic Press; 2005.
54. Slayton WB, Spangrude GJ. *Adult stem cell plasticity*. *Adult Stem Cells*: Springer; 2004. p. 1-18.
55. Loeffler M, Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models—a conceptual approach. *Cells Tissues Organs*. 2002;171 (1):8-26.
56. Güneş A. Kök hücre plastisitesi ve tıptaki kullanım alanları. *Güncel Pediatri*. 2005:36-42.
57. Anthony Atala M. *Regenerative Medicine in Urology: Stem Cells, Tissue Engineering, and Cloning* WB Saunders Company; 2012.
58. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78 (12):7634-8.

59. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular medicine*. 2000;6 (2):88-95.
60. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2001;19 (12):1134-40.
61. Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukharensko V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V, et al. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reproductive biomedicine online*. 2005;10 (1):105-10.
62. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 2001;19 (12):1129-33.
63. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98 (19):10716-21.
64. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. 2001;50 (8):1691-7.
65. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*. 2000;18 (4):399-404.
66. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature biotechnology*. 2007;25 (1):100-6.
67. De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A, Gasparotto L, Piccoli M, Taiani J, et al. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *J Urol*. 2007;177 (1):369-76.
68. Gage FH. Cell therapy. *Nature*. 1998;392 (6679 Suppl):18-24.

69. Ballas CB, Zielske SP, Gerson SL. Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *Journal of cellular biochemistry Supplement*. 2002;38:20-8.
70. Weiner LP. Definitions and criteria for stem cells. *Methods in molecular biology*. 2008;438:3-8.
71. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418 (6893):41-9.
72. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284 (5411):143-7.
73. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *International review of cytology*. 1976;47:327-59.
74. Caplan AI. The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery*. 1994;21 (3):429-35.
75. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8 (4):315-7.
76. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine*. 2004;10 (1):64-71.
77. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews Immunology*. 2006;6 (2):93-106.
78. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem cells*. 2004;22 (5):675-82.
79. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*. 2007;211 (1):27-35.

80. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental biology and medicine*. 2001;226 (6):507-20.
81. Koc O, Lazarus H. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone marrow transplantation*. 2001;27 (3):235-9.
82. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell death and differentiation*. 2014;21 (2):216-25.
83. Muller I, Kustermann-Kuhn B, Holzwarth C, Isensee G, Vaegler M, Harzer K, et al. In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Experimental hematology*. 2006;34 (10):1413-9.
84. Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2004;190 (1):239-45.
85. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008;371 (9624):1579-86.
86. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363 (9419):1439-41.
87. Ishida T, Inaba M, Hisha H, Sugiura K, Adachi Y, Nagata N, et al. Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. Complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-Ipr/Ipr mice by transplantation of bone marrow plus bones (stromal cells) from the same donor. *Journal of immunology*. 1994;152 (6):3119-27.
88. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*. 2002;30 (4):215-22.
89. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36 (4):568-84.

90. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2004;95 (5):209-14.
91. Neuhof H. Some Observations in Spinal Cord Surgery. *Annals of surgery*. 1917;65 (4):410-37.
92. Bricker EM. Substitution for the urinary bladder by the use of isolated ileal segments. *The Surgical clinics of North America*. 1956:1117-30.
93. Studer UE, deKernion JB, Zimmern PE. A model for a bladder replacement plasty by an ileal reservoir--an experimental study in dogs. *Urological research*. 1985;13 (5):243-7.
94. Carrion R, Arap S, Corcione G, Ferreyra U, Neyra Argote G, Cantor A, et al. A multi-institutional study of orthotopic neobladders: functional results in men and women. *BJU international*. 2004;93 (6):803-6.
95. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber D, Mooney D, Langer R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *Journal of biomechanical engineering*. 1991;113 (2):143-51.
96. Carrel A. On the Permanent Life of Tissues Outside of the Organism. *The Journal of experimental medicine*. 1912;15 (5):516-28.
97. Rous P, Jones FS. A Method for Obtaining Suspensions of Living Cells from the Fixed Tissues, and for the Plating out of Individual Cells. *The Journal of experimental medicine*. 1916;23 (4):549-55.
98. Harrison RG. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *The Journal of experimental zoology*. 1959;142:5-73.
99. Gallico GG, 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *The New England journal of medicine*. 1984;311 (7):448-51.
100. Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y, Tzakis A, Casavilla A, Jaffe R, et al. Human islet isolation and purification from pediatric-age donors. *Transplantation proceedings*. 1991;23 (1 Pt 1):783-4.

101. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine*. 1994;331 (14):889-95.
102. Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature biotechnology*. 1999;17 (2):149-55.
103. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006;367 (9518):1241-6.
104. Feldman HA, Goldstein I, Hatzichristou DG, Krane RJ, McKinlay JB. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Urol*. 1994;151 (1):54-61.
105. Akkus E, Kadioglu A, Esen A, Doran S, Ergen A, Anafarta K, et al. Prevalence and correlates of erectile dysfunction in Turkey: a population-based study. *European urology*. 2002;41 (3):298-304.
106. Deng W, Bivalacqua TJ, Chattergoon NN, Hyman AL, Jeter JR, Jr., Kadowitz PJ. Adenoviral gene transfer of eNOS: high-level expression in ex vivo expanded marrow stromal cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2003;285 (5):C1322-9.
107. Bochinski D, Lin GT, Nunes L, Carrion R, Rahman N, Lin CS, et al. The effect of neural embryonic stem cell therapy in a rat model of cavernosal nerve injury. *BJU international*. 2004;94 (6):904-9.
108. Song YS, Lee HJ, Park IH, Kim WK, Ku JH, Kim SU. Potential differentiation of human mesenchymal stem cell transplanted in rat corpus cavernosum toward endothelial or smooth muscle cells. *International journal of impotence research*. 2007;19 (4):378-85.
109. Lin CS. Advances in stem cell therapy for the lower urinary tract. *World journal of stem cells*. 2010;2 (1):1-4.
110. Garcia MM, Fandel TM, Lin G, Shindel AW, Banie L, Lin CS, et al. Treatment of erectile dysfunction in the obese type 2 diabetic ZDF rat with adipose tissue-derived stem cells. *The journal of sexual medicine*. 2010;7 (1 Pt 1):89-98.

111. Huang YC, Ning H, Shindel AW, Fandel TM, Lin G, Harraz AM, et al. The effect of intracavernous injection of adipose tissue-derived stem cells on hyperlipidemia-associated erectile dysfunction in a rat model. *The journal of sexual medicine*. 2010;7 (4 Pt 1):1391-400.
112. Maeshima A, Nakasatomi M, Nojima Y. Regenerative medicine for the kidney: renotropic factors, renal stem/progenitor cells, and stem cell therapy. *BioMed research international*. 2014;2014:595493.
113. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, Longaretti L, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2007;18 (11):2921-8.
114. Meyer S, Schreyer A, De Grandi P, Hohlfeld P. The effects of birth on urinary continence mechanisms and other pelvic-floor characteristics. *Obstetrics and gynecology*. 1998;92 (4 Pt 1):613-8.
115. Yokoyama T, Huard J, Chancellor MB. Myoblast therapy for stress urinary incontinence and bladder dysfunction. *World journal of urology*. 2000;18 (1):56-61.
116. Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Colleselli D, Frauscher F, et al. Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: a 1-year follow-up in 123 patients. *BJU international*. 2007;100 (5):1081-5.
117. Blau HM, Brazelton T, Weimann J. The Evolving Concept of a Stem Cell-Entity or Function? *Cell*. 2001;105 (7):829-41.
118. Lin G, Wang G, Banie L, Ning H, Shindel AW, Fandel TM, et al. Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. *Cytherapy*. 2010;12 (1):88-95.
119. Christ GJ, Hsieh Y, Zhao W, Schenk G, Venkateswarlu K, Wang HZ, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on bladder and erectile (dys)function in the same rat in vivo. *BJU international*. 2006;97 (5):1076-82.
120. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association*. 2005;22 (4):359-70.
121. Daneshgari F, Leiter EH, Liu G, Reeder J. Animal models of diabetic uropathy. *J Urol*. 2009;182 (6 Suppl):S8-13.

122. Fu CL, Apelo CA, Torres B, Thai KH, Hsieh MH. Mouse bladder wall injection. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2011 (53):e2523.
123. Tu DD, Seth A, Gil ES, Kaplan DL, Mauney JR, Estrada CR, Jr. Evaluation of biomaterials for bladder augmentation using cystometric analyses in various rodent models. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2012 (66).
124. Alves C, Sobral MM. Autonomic bladder dysfunction in an adolescent with type 1 diabetes. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*. 2010;23 (4):401-2.
125. Ueda T, Tamaki M, Kageyama S, Yoshimura N, Yoshida O. Urinary incontinence among community-dwelling people aged 40 years or older in Japan: prevalence, risk factors, knowledge and self-perception. *International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association*. 2000;7 (3):95-103.
126. Kaplan SA, Te AE, Blaivas JG. Urodynamic findings in patients with diabetic cystopathy. *J Urol*. 1995;153 (2):342-4.
127. Brown JS, Seeley DG, Fong J, Black DM, Ensrud KE, Grady D. Urinary incontinence in older women: who is at risk? Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Obstetrics and gynecology*. 1996;87 (5 Pt 1):715-21.
128. Daneshgari F, Liu G, Imrey PB. Time dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function. *J Urol*. 2006;176 (1):380-6.
129. Ueda T, Yoshimura N, Yoshida O. Diabetic cystopathy: relationship to autonomic neuropathy detected by sympathetic skin response. *J Urol*. 1997;157 (2):580-4.
130. Osman NI, Chapple CR, Abrams P, Dmochowski R, Haab F, Nitti V, et al. Detrusor underactivity and the underactive bladder: a new clinical entity? A review of current terminology, definitions, epidemiology, aetiology, and diagnosis. *European urology*. 2014;65 (2):389-98.
131. Kim JC, Park EY, Seo SI, Park YH, Hwang TK. Nerve growth factor and prostaglandins in the urine of female patients with overactive bladder. *J Urol*. 2006;175 (5):1773-6; discussion 6.
132. Miyazato M, Yoshimura N, Chancellor MB. The other bladder syndrome: underactive bladder. *Reviews in urology*. 2013;15 (1):11-22.

133. Chancellor MB, Blaivas JG. Spinal cord injury. Practical neuro-urology: genitourinary complications in neurologic disease. 1995;99-118.
134. Kaplan SA, Blaivas JG. Diabetic cystopathy. The Journal of diabetic complications. 1988;2 (3):133-9.
135. Aizawa N, Homma Y, Igawa Y. Characteristics of lower urinary tract dysfunction and bladder afferent nerve properties in type 2 diabetic goto-kakizaki rats. J Urol. 2013;189 (4):1580-7.
136. Liu G, Li M, VasANJI A, Daneshgari F. Temporal diabetes and diuresis-induced alteration of nerves and vasculature of the urinary bladder in the rat. BJU international. 2011;107 (12):1988-93.
137. Liu G, Daneshgari F. Diabetic bladder dysfunction. Chinese medical journal. 2014;127 (7):1357-64.
138. Lee WC, Wu HP, Tai TY, Yu HJ, Chiang PH. Investigation of urodynamic characteristics and bladder sensory function in the early stages of diabetic bladder dysfunction in women with type 2 diabetes. J Urol. 2009;181 (1):198-203.
139. Ho CH, Tai HC, Yu HJ. Urodynamic findings in female diabetic patients with and without overactive bladder symptoms. Neurourology and urodynamics. 2010;29 (3):424-7.
140. Bansal R, Agarwal MM, Modi M, Mandal AK, Singh SK. Urodynamic profile of diabetic patients with lower urinary tract symptoms: association of diabetic cystopathy with autonomic and peripheral neuropathy. Urology. 2011;77 (3):699-705.
141. Changolkar AK, Hypolite JA, Disanto M, Oates PJ, Wein AJ, Chacko S. Diabetes induced decrease in detrusor smooth muscle force is associated with oxidative stress and overactivity of aldose reductase. J Urol. 2005;173 (1):309-13.
142. Tong YC, Cheng JT. Alteration of M (3) subtype muscarinic receptors in the diabetic rat urinary bladder. Pharmacology. 2002;64 (3):148-51.
143. Kubota Y, Nakahara T, Mitani A, Maruko T, Sakamoto K, Ishii K. Augmentation of rat urinary bladder relaxation mediated by beta1-adrenoceptors in experimental diabetes. European journal of pharmacology. 2003;467 (1-3):191-5.

144. Gonulalan U, Kosan M, Hafez G, Arioglu E, Akdemir O, Ozturk B, et al. The effect of diabetes mellitus on alpha1-adrenergic receptor subtypes in the bladder of rats. *Urology*. 2012;80 (4):951 e9-16.
145. Mustafa S. Effect of diabetes on the ion pumps of the bladder. *Urology*. 2013;81 (1):211 e17-21.
146. Longhurst PA, Belis JA. Abnormalities of rat bladder contractility in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1986;238 (3):773-7.
147. Liu G, Li M, Daneshgari F. Calcineurin and Akt expression in hypertrophied bladder in STZ-induced diabetic rat. *Experimental and molecular pathology*. 2012;92 (2):210-6.
148. Hanna-Mitchell AT, Ruiz GW, Daneshgari F, Liu G, Apodaca G, Birder LA. Impact of diabetes mellitus on bladder uroepithelial cells. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2013;304 (2):R84-93.
149. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54 (6):1615-25.
150. Beshay E, Carrier S. Oxidative stress plays a role in diabetes-induced bladder dysfunction in a rat model. *Urology*. 2004;64 (5):1062-7.
151. Xiao N, Wang Z, Huang Y, Daneshgari F, Liu G. Roles of polyuria and hyperglycemia in bladder dysfunction in diabetes. *J Urol*. 2013;189 (3):1130-6.
152. Andersson KE, Wein AJ. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. *Pharmacological reviews*. 2004;56 (4):581-631.
153. Yang Z, Dolber PC, Fraser MO. Diabetic urethropathy compounds the effects of diabetic cystopathy. *J Urol*. 2007;178 (5):2213-9.
154. Daneshgari F, Huang X, Liu G, Bena J, Saffore L, Powell CT. Temporal differences in bladder dysfunction caused by diabetes, diuresis, and treated diabetes in mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006;290 (6):R1728-35.

155. Lucas MG, Stephenson TP, Nargund V. Tamsulosin in the management of patients in acute urinary retention from benign prostatic hyperplasia. *BJU international*. 2005;95 (3):354-7.
156. Andersson KE, Chapple CR, Cardozo L, Cruz F, Hashim H, Michel MC, et al. Pharmacological treatment of overactive bladder: report from the International Consultation on Incontinence. *Current opinion in urology*. 2009;19 (4):380-94.
157. Ustuner MC, Kabay S, Ozden H, Guven G, Yucel M, Olgun EG, et al. The protective effects of vitamin E on urinary bladder apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Urology*. 2010;75 (4):902-6.
158. Merguerian PA, Reddy PP, Barrieras DJ, Wilson GJ, Woodhouse K, Bagli DJ, et al. Acellular bladder matrix allografts in the regeneration of functional bladders: evaluation of large-segment (> 24 cm) substitution in a porcine model. *BJU international*. 2000;85 (7):894-8.
159. Badylak SF, Lantz GC, Coffey A, Geddes LA. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *The Journal of surgical research*. 1989;47 (1):74-80.
160. Borowka A. [Filling of extensive defects of the bladder with collagen membrane]. *Polski tygodnik lekarski*. 1981;36 (39):1525-7.
161. Huard J, Yokoyama T, Pruchnic R, Qu Z, Li Y, Lee JY, et al. Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction. *Gene therapy*. 2002;9 (23):1617-26.
162. Drewa T, Sir J, Czajkowski R, Wozniak A. Scaffold seeded with cells is essential in urothelium regeneration and tissue remodeling in vivo after bladder augmentation using in vitro engineered graft. *Transplantation proceedings*. 2006;38 (1):133-5.
163. Yannas IV. *Regeneration templates*. CRC press LLC, Fla, USA; 2000. p. 1619.
164. Huang YC, Shindel AW, Ning H, Lin G, Harraz AM, Wang G, et al. Adipose derived stem cells ameliorate hyperlipidemia associated detrusor overactivity in a rat model. *J Urol*. 2010;183 (3):1232-40.
165. Zhang H, Qiu X, Shindel AW, Ning H, Ferretti L, Jin X, et al. Adipose tissue-derived stem cells ameliorate diabetic bladder dysfunction in a type II diabetic rat model. *Stem cells and development*. 2012;21 (9):1391-400.

166. Yokoyama T, Huard J, Pruchnic R, Yoshimura N, Qu Z, Cao B, et al. Muscle-derived cell transplantation and differentiation into lower urinary tract smooth muscle. *Urology*. 2001;57 (4):826-31.
167. Lu SH, Cannon TW, Chermanski C, Pruchnic R, Somogyi G, Sacks M, et al. Muscle-derived stem cells seeded into acellular scaffolds develop calcium-dependent contractile activity that is modulated by nicotinic receptors. *Urology*. 2003;61 (6):1285-91.
168. Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma PX, Atala A, Zhang Y. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into bladder cells: potential for urological tissue engineering. *Tissue engineering Part A*. 2010;16 (5):1769-79.
169. Zhang Y, Lin HK, Frimberger D, Epstein RB, Kropp BP. Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue engineered bladder. *BJU international*. 2005;96 (7):1120-5.
170. Rodriguez LV, Alfonso Z, Zhang R, Leung J, Wu B, Ignarro LJ. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103 (32):12167-72.
171. Jack GS, Zhang R, Lee M, Xu Y, Wu BM, Rodriguez LV. Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite. *Biomaterials*. 2009;30 (19):3259-70.
172. Liu J, Huang J, Lin T, Zhang C, Yin X. Cell-to-cell contact induces human adipose tissue-derived stromal cells to differentiate into urothelium-like cells in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;390 (3):931-6.
173. Ning J, Li C, Li H, Chang J. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into urothelial cells and the implications for reconstructing urinary bladder mucosa. *Cytotechnology*. 2011;63 (5):531-9.
174. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81 (10):1390-7.
175. Ball LM, Bernardo ME, Locatelli F, Egeler RM. Potential role of mesenchymal stromal cells in pediatric hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 2008;42 Suppl 2:S60-6.