



T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**“KOMPOZİT DOKU  
ALLOTRANSPLANTASYONU YAPILAN  
SIÇANLARDA, YAĞ DOKU KAYNAKLI  
MEZENEKİMAL KÖK HÜCRELERİN İLK  
24 SAATTE MEYDANA GELEN SİSTEMİK  
YANITA ETKİSİ”**

**Dr. Ahmet AKATEKİN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**PLASTİK, REKONSTRUKTİF VE ESTETİK CERRAHİ  
ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**“Yard. Doç. Dr. Osman AKDAĞ”**

**KONYA, 2015**

## UZMANLIK TEZİ JÜRİ TUTANAĞI

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı : Ahmet AKATEKİN

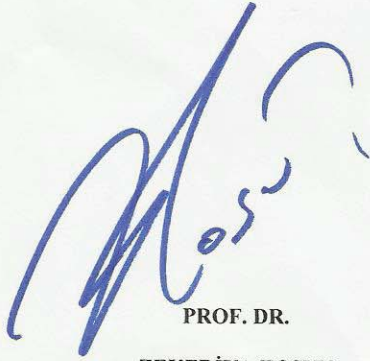
Uzmanlık Dalı : Plastik, Rek. ve Estetik Cerrahisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Osman AKDAĞ

Tezin Adı : "Kompozit Doku Allotransplantasyonu Yapılan Sıçanlarda,  
Yağ Doku Kaynaklı Mezenekimal Kök Hücrelerin İlk 24 Saatte Meydana Gelen Sistemik Yanıtı Etkisi "

Dr. Ahmet AKATEKİN'in hazırlamış olduğu tezini 19/01/2015 tarihinde aşağıda isimleri yazılı olan jüri huzurunda savunmuştur.

SONUÇ:                      TEZ BAŞARILI (X)                      TEZ BAŞARISIZ ( )



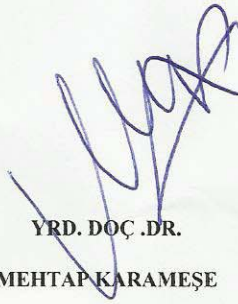
PROF. DR.

ZEKERIYA TOSUN

S.Ü. TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REK. VE ESTETİK  
CERRAHİ ANABİLİM DALI

Jüri



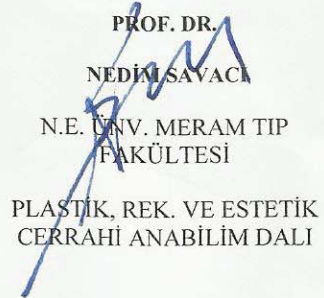
YRD. DOÇ. DR.

MEHTAP KARAMEŞE

S.Ü. TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REK. VE ESTETİK  
CERRAHİ ANABİLİM DALI

Jüri



PROF. DR.

NEDİM SAVACI

N.E. ÜNİV. MERAM TIP  
FAKÜLTESİ

PLASTİK, REK. VE ESTETİK  
CERRAHİ ANABİLİM DALI

Jüri

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**UZMANLIK TEZİ DEĞERLENDİRME FORMU**

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı : Dr.Ahmet AKATEKİN Tarih: 19/01/2015  
Uzmanlık Dalı : Plastik, Rek. ve Estetik Cerrahisi Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Osman AKDAĞ  
Tezin Adı : "Kompozit Doku Allotransplantasyonu Yapılan Sıçanlarda, Yağ Doku Kaynaklı Mezenekimal Kök Hücrelerin İlk 24 Saatte Meydana Gelen Sistemik Yanıtı Etkisi "

1. Sayfa Sayısı : 98  
2. Tablo Sayısı : 20  
3. Şekil/Grafik Sayısı: 25  
4. İstatistik Sayısı : 10  
5. Kaynaklar : 81

- a. Sayısı : Yeterli (X) Yetersiz ( )  
b. Kaynak Kullanımında Uygunluk : Yeterli (X) Yetersiz ( )  
c. Yeni Kaynaklardan Yararlanma : Yeterli (X) Yetersiz ( )

**6. YAZI DÜZENİ**

- a. Konu I. Kapsamı Retrospektif (Olgu Sunumu) ( )  
Prospektif (Klinik Çalışma) ( )  
Deneysel (X)  
II. Orijinallik Orijinal (X) Orijinal değil ( )
- b. Özet: Çalışmanın ana hatlarını kapsıyor Evet Hayır  
(X) ( )
- c. Giriş ve Amaç:  
a) Amaç ve dayandığı bilimsel düşünceler ifade edilmiş (X) ( )  
b) Kapsamı yeterli (gereğinden uzun ya da kısa ise belirtiniz) (X) ( )
- d. Genel Bilgiler: Genel bilgiler kaynaklarla desteklenmiş (X) ( )
- e. Gereç ve Yöntem:  
a) Gereçler yeterli ve çalışmanın amacına yönelik (X) ( )  
b) Yöntem ayrıntılarıyla açıklanmış ve kaynaklarla desteklenmiş (X) ( )
- f. Bulgular:  
a) Olgu, gözlem ve deney sayısı yeterli (X) ( )  
b) Bulgular ölçüm ve istatistik açıdan yeterli ve güvenilir (X) ( )
- g. Tartışma ve Sonuç: Bulguların yeterince analizi yapıp yorumlanmış (X) ( )

SONUÇ: BAŞARILI (X) BAŞARISIZ ( )

**TEZ JÜRİLERİ;**

PROF.DR.ZEKERİYA TOSUN

S.Ü. TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK, REK. VE ESTETİK  
CERRAHİ ANABİLİM DALI

YRD.DOÇ.DR.MEHTAP  
KARAMEŞE

S.Ü. TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK, REK. VE ESTETİK  
CERRAHİ ANABİLİM DALI

PROF.DR.NEDİM SAVACI

N.E.ÜN.V. MERAM TIP  
FAKÜLTESİ  
PLASTİK, REK. VE ESTETİK  
CERRAHİ ANABİLİM DALI

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**“KOMPOZİT DOKU  
ALLOTRANSPLANTASYONU YAPILAN  
SIÇANLARDA, YAĞ DOKU KAYNAKLI  
MEZENEKİMAL KÖK HÜCRELERİN İLK  
24 SAATTE MEYDANA GELEN SİSTEMİK  
YANITA ETKİSİ”**

**Dr. Ahmet AKATEKİN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ  
ANABİLİM DALI**

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Osman AKDAĞ  
Anabilim Dalı Başkanı : Prof. Dr. Zekeriya TOSUN

Etik Kurul Onayı: 12.11.2014, SÜDAM 41475755-51.99/13 sayılı karar  
Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü  
tarafından 14102045 proje numarası ile desteklenmiştir.

**KONYA-2015**

# İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	v
TABLO LİSTESİ .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Kompozit Doku Nakli .....	2
2.2. Yağ Doku ve Stromal Vasküler Fraksiyon .....	3
2.3. Kök Hücre Bilimi .....	4
2.4. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler .....	6
2.4.1. Kök Hücrelerin Doku Onarımında Etki Mekanizmaları .....	6
2.5. Apoptozis .....	8
2.5.1. Apoptozisin tanımı ve tarihçesi .....	9
2.5.2. Apoptozisin fonksiyon ve amaçları .....	10
2.5.3 Apoptozisin homeostazis içindeki yeri .....	10
2.5.4. Organizmanın şekillenmesi .....	10
2.5.5. Apoptozis ve nekroz .....	11
2.5.6. Apoptozis Morfolojisi .....	12
2.5.7. Apoptozis Mekanizmaları .....	14
2.5.8. Apoptozisi Kontrol Eden Genler .....	15
2.5.9. Apoptozis Regülasyonu .....	16
2.5.10. Apoptozisin İndüksiyonu .....	17
2.5.11. Apoptozis ile ilişkili hastalıklar .....	17
2.5.12. Tedavide Apoptozis .....	18
2.5.13. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	19
2.5.13.1. Hematoksilen-Eozin Boyama .....	19
2.5.13.2. Giemsa Boyama .....	19
2.5.13.3. Floresan Mikroskopisi .....	19
2.5.13.4. Elektron Mikroskopisi .....	20
2.5.13.5. Faz Kontrast Mikroskopisi .....	20
2.5.13.6. Anneksin-V Yöntemi .....	20
2.5.13.7. TUNEL yöntemi .....	21
2.5.13.8. M30 Yöntemi .....	21

2.5.13.9.	Kaspaz-3 Yöntemi .....	21
2.5.13.10.	Agaroz Jel Elektroforezi .....	21
2.5.13.11.	Western Blotting .....	22
2.5.13.12.	Flow Sitometri .....	22
2.5.13.13.	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	22
2.6.	Doku Nakilleri ve Böbrek.....	23
2.6.1.	Böbreğin Anatomi ve Fizyolojisi.....	23
2.6.2.	Böbrek Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi.....	25
2.6.3.	Kan Üre Nitrojeni(BUN) .....	25
2.6.4.	Serum Kreatinini .....	26
2.6.5.	Doku Nakillerinin Böbrek Üzerine Etkisi.....	27
2.7.	Doku Nakilleri ve Karaciğer .....	28
2.7.1.	Karaciğerin Yapı ve Fonksiyonları.....	28
2.7.2.	Karaciğer Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi .....	28
2.7.2.1.	Biyokimyasal Testler .....	29
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	31
3.1.	Diyet ve Barınma .....	31
3.2.	Çalışma Gruplarının Belirlenmesi.....	32
3.3.	Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreden Zengin Stromal Vasküler Fraksiyon Eldesi 33	
3.4.	Trombositten Zengin Plazma Elde Edilmesi .....	36
3.5.	Operasyon öncesi hazırlık .....	37
3.6.	Çalışma Grupları için Cerrahi İşlem.....	38
3.7.	Cerrahi sonrası bakım .....	42
3.8.	Ötenazi ve karaciğer dokusunun alınması.....	43
3.9.	Türe Ait Bazal Apoptoz Değerlerinin Saptanması.....	44
3.10.	Biyokimyasal Değerlendirme .....	44
3.11.	Akım sitometrisi değerlendirme.....	45
3.12.	İstatistiksel Analiz.....	46
4.	BULGULAR.....	47
4.1.	Gruplara ait perioperatif veriler .....	47
4.2.	Biyokimyasal veriler .....	52
4.3.	Akım Sitometrisi Analiz Bulguları.....	57
4.4.	İstatistiksel Analiz .....	63
5.	TARTIŞMA .....	71

KAYNAKLAR.....	79
ÖZET .....	84
ABSTRACT .....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	88

# SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>VKDN:</b>	Vaskülerize Kompozit Doku Nakilleri
<b>MKH:</b>	Mezenkimal Kaynaklı Kök Hücre
<b>YDKH:</b>	Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
<b>AKDN:</b>	Allojenik Kompozit Doku Nakli
<b>BYD:</b>	Beyaz Yağ Doku
<b>EYD:</b>	Esmer Yağ Doku
<b>SVF:</b>	Stromal Vasküler Fraksiyon
<b>CFU:</b>	Koloni Oluşturucu Faktör
<b>SSEA-3:</b>	Evre Spesifik Embriyonik Antijen
<b>HLA-DR:</b>	İnsan Lökosit Antijeni
<b>b-FGF:</b>	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>PDGF:</b>	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
<b>EGF:</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Dönüştürücü Büyüme Faktörü- Beta
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tümör Nekrozis Faktör-Alfa
<b>VEGF:</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>HGF:</b>	Hepatosit Büyüme Faktörü
<b>MMP-8:</b>	Matriks Metalloproteinaz-8
<b>ATP:</b>	Adenozin Tri Fosfat
<b>APAF-1:</b>	Apoptotik aktive edici faktör-1
<b>AIF:</b>	Apoptozis İnhibitör Faktör



<b>TNFR:</b>	Tümör Nekroz Faktör Resptörü
<b>TNFR-1:</b>	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
<b>TRADD:</b>	TNFR-1 Associated Death Domain
<b>FADD:</b>	Fas Associated Death Domain
<b>HIV-1:</b>	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü Tip 1
<b>PS:</b>	Fostatidil Serin
<b>TdT:</b>	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
<b>ELISA:</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>GFH:</b>	Glomeruler Fitrasyon Hızı
<b>BUN:</b>	Kan Üre Nitrojeni
<b>Üre:</b>	Kan Üre Nitrojeni
<b>KRT:</b>	Serum Kreatinini
<b>KC:</b>	Karaciğer
<b>AST:</b>	Aspartat Aminotransferaz
<b>ALT:</b>	Alanin Aminotransferaz
<b>LDH:</b>	Laktat dehidrogenaz
<b>SÜDAM:</b>	Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi
<b>WASF:</b>	Wistar Albino Serum Fizyolojik grubu
<b>WAKH:</b>	Wistar Albino Kök Hücre grubu
<b>SDSF:</b>	Sprague-Dawley Serum Fizyolojik grubu
<b>SDKH:</b>	Sprague-Dawley Kök Hücre grubu
<b>N.E.Ü.T.F:</b>	Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffer Saline

<b>FBS:</b>	Fetal Sığır Serumu
<b>DMEM:</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>TFP:</b>	Trombositten Fakir Plazma
<b>TZP:</b>	Trombositten Zengin Plazma
<b>MR:</b>	Manyetik Rezonans
<b>TB:</b>	Total Billurubin
<b>HGF:</b>	Hepatosit Growth Faktör
<b>WA:</b>	Wistar Albino
<b>SD:</b>	Sprague-Dawley
<b>BN:</b>	Brown Norway
<b>TGF-<math>\beta</math> :</b>	Transformig Growth Faktör Beta
<b>IL-10:</b>	Interlökin-10
<b>İP:</b>	İntraperitoneal
<b>SK:</b>	Sıçan Kodu
<b>MSC:</b>	Mesenchymal Stem Cell

# TABLO LİSTESİ

- Tablo 2.1** Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar
- Tablo 2.2.** Apoptozis ile ilgili genler
- Tablo 3.1.** Çalışma gruplarının belirlenmesi
- Tablo 4.1.** Grup I sıçanlara ait perioperatif bulgular
- Tablo 4.2.** Grup II sıçanlara ait perioperatif bulgular
- Tablo 4.3.** Grup III sıçanlara ait perioperatif bulgular
- Tablo 4.4.** Grup IV sıçanlara ait perioperatif bulgular
- Tablo 4.5.** Grup I'e ait operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal değerler
- Tablo 4.6.** Grup II'e ait operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal değerler
- Tablo 4.7.** Grup III e ait operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal değerler
- Tablo 4.8.** Grup IV e ait operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal değerler
- Tablo 4.9.** Grup I akım sitometrisi bulguları
- Tablo 4.10.** Grup II akım sitometrisi bulguları
- Tablo 4.11.** Grup III akım sitometrisi bulguları
- Tablo 4.12.** Grup IV akım sitometrisi bulguları
- Tablo 4.13.** Kök hücre eldesi için kullanılan Wistar Albino türü sıçanlara ait akım sitometrisi bulguları
- Tablo 4.14.** Kök hücre eldesi için kullanılan Sprague-Dawley türü sıçanlara ait akım sitometrisi bulguları
- Tablo 4.15.** Grup I için Spearman Rho Korelasyon Analizi Sonuçları
- Tablo 4.16.** Grup II için Spearman Rho Korelasyon Analizi Sonuçları
- Tablo 4.17.** Grup III için Spearman Rho Korelasyon Analizi Sonuçları
- Tablo 4.18.** Grup IV için Spearman Rho Korelasyon Analizi Sonuçları

# ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 3.1.** Kök hücre eldesi için ayrılan WA ve SD türü sıçanların inguinal yağ yastıkçıklarının alınması ve her bir tür için ayrı ayrı kaplara konulması
- Şekil 3.2.** Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre elde edilmesi,
- Şekil 3.3.** Mikroksopta x40 büyütmede SVF hücre süspansiyonu, mononükleer hücreler boyalı olarak gözlenmekte.
- Şekil 3.4.** Trombositten Zengin Plazma elde edilmesi
- Şekil 3.5.** Cerrahi işlem öncesi sıçanların tartılması, anestezi yapılması, cerrahi alanın tıraşlanması ve kuyruk veninden kan alınması
- Şekil 3.6.** Cerrahi işlemin ana basamakları
- Şekil 3.7.** Femurun kesilmesi ve kısaltılması
- Şekil 3.8.** İki cerrah tarafından eş zamanlı anastomoz yapılması
- Şekil 3.9.** MKH içeren SVF eneksiyonu için enjektörün kademeli olarak ısıtılması ve anastomozun başarılı olduğu teyit edildikten sonra intraperitoneal olarak eneksiyonu
- Şekil 3.10.** Postoperatif bakım ve takip
- Şekil 3.11.** Yirmidört saat takip sonunda dolaşımı yeterli olan sıçanlardan kan ve karaciğer doku örneği alınması

- Şekil 3.12.** Alınan serum numunelerinin numaralandırılması ve analizi
- Şekil 3.13.** Apoptotik hücre, canlı hücre ve ölü hücre oranlarının elirlenmesi için kullanılan akım sitometri cihazı
- Şekil 4.1.** Grup I-II arasında yapılan karşılıklı transferde operasyon ve iskemi sürelerinin tecrübe ile değişimi
- Şekil 4.2.** Grup III-IV arasında yapılan karşılıklı transferde operasyon ve iskemi sürelerinin tecrübe ile değişimi
- Şekil 4.3.** G1W8 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.
- Şekil 4.4.** G2S4 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.
- Şekil 4.5.** G3W3 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.
- Şekil 4.6.** G4S1 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.
- Şekil 4.7.** MKW3 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.
- Şekil 4.8.** MKS1 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.
- Şekil 4.9.** Tüm gruplarda cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası AST değerlerinin değişimi
- Şekil 4.10.** Tüm gruplarda cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası ALT değerlerinin değişimi
- Şekil 4.11.** Tüm gruplarda cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası Üre değerlerinin değişimi
- Şekil 4.12.** Tüm gruplarda cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası Kreatinin değerlerinin değişimi

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son dönemde gerek ülkemizde gerekse dünyada ses getiren işlemler içinde yer alan Vaskülerize Kompozit Doku Nakilleri (VKDN) birçok doku kombinasyonunun aynı anda nakledilmesi olayıdır. Bu nakillerden en bilinen olanları yüz, kol ve bacak nakilleridir. Bu nakiller esnasında transfer edilen dokular içerisinde kas, sinir, cilt, kemik, tendon ve kemik iliği yer almaktadır.

VKDN başta travmatik kayıplar olmak üzere, tümör rezeksiyonu ve konjenital anomalilere bağlı kayıpların giderilmesinde ideal bir seçenek olarak görülmektedir. Son dönemde başarı ile gerçekleştirilen yüz ve ekstremiteler nakilleri VKDN'nin klinik olarak uygulanabilirliğini göstermiştir. Nitekim son dönemde başarılı 78 el ve 14 parsiyel yüz nakli gerçekleştirilmiştir.

Hayat boyu immümsüpresif ilaç kullanımı nedeniyle, VKDN rutin olarak doku onarımı ve rekonstrüksiyon amacıyla kullanılmamaktadır. Cilt dokusunun ileri düzeyde antijenik özellikleri ve immümsüpresif ajanların ciddi yan etkileri VKDN'nun önündeki en büyük engeldir. Hasta uyumu mükemmel olmasına rağmen, klasik immümsüpresiflerin kronik trasnplant reddine etkisi kısıtlı olarak kalmaktadır. Bu sorun araştırmacıları immümsüpresyon konusunda alternatif yöntemler aramaya itmiştir.

Yapılan çalışmalarda Mezenkimal Kaynaklı Kök Hücre(MKH)'lerin başta Graft Versus Host olmak üzere organ reddinde meydana gelen inflamatuvar olayları modüle edebileceği gösterilmiştir. Otoimmün hastalıklar ile ilgili yapılan yüz güldürücü çalışmalar mezenkimal kök hücrelerin VKDN sonrası oluşan sistemik yanıtın mezenkimal kök hücreler ile module edilebileceği konusunda bize cesaret vermektedir (Kuo, Chen, Goto, Lin, ve ark., 2012).

Bu çalışmanın amacı vaskülerize kompozit doku nakli yapılan hastalarda erken dönemde meydana gelen (ilk 24 saat ) sistemik yanıtta böbrek ve karaciğer üzerinde oluşan olumsuz etkilerin Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre(YDKH)'ler ile module edilip edilemeyeceğinin gösterilmesidir. Bunun sonucunda bu yanıtın mezenkimal kök hücreler ile kontrol altına alınabileceğinin gösterilmesi ile bu işlemlere bağlı oluşacak komplikasyonların azaltılması ve daha fazla sayıda kişiye güvenle yapılabileceğinin deneysel olarak gösterilmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kompozit Doku Nakli

Plastik cerrahinin organ nakilleri ile ilgisi organ naklinin tarihi ile yaşıttır. Aslına bakarsanız Amerika’da ilk böbrek nakli 1955 yılında bir plastik cerrah olan Joseph E. Murray tarafından yapılmıştır. Rekonstrüktif cerrahi prosedürleri içinde birçok farklı dokuyu içeren kompozit flepler günlük rutin içinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak ek donör alan morbiditesi olması, istenilen miktarda dokunun tek seferde transfer edilmesinin zorluğu bizleri yeni bir arayış içine sokmuştur.

Allojenik veya Ksenojenik kaynaklardan dondurulmuş kemik greftlerinin başarılı bir şekilde transfer edilebilmesi bizleri allojenik transferler konusunda yönlendirici olmuştur. Plastik cerrahi içinde vazgeçilmez bir unsur olan mikrocerrahide meydana gelen gelişmeler tek aşamada birçok farklı dokunun bir arada transfer edilebilmesi hususunda cesaretimizi arttırmıştır. Başarılı hücresel çalışmalara rağmen birçok farklı dokunun aynı anda ve bir bütünlük içinde aktarılabilmesinin zorluğu bizleri kompozit doku nakilleri alanına yönlendirmiştir.

Allojenik Kompozit Doku Nakli (AKDN) aynı anda birçok farklı doku (cilt, damar, bağ dokusu, kemik, kartilaj, tendon, sinir, kas vs.) çeşidini içeren ve bunların kendi içinde oluşturduğu bütünlük bozulmadan aynı türden başka bir canlıya transfer edilmesidir. (Kuo, Chen, Shih, ve ark., 2011). Ancak bu ifade günümüzde kabaca üst ekstremitte, alt ekstremitte ve yüz nakilleri için kullanılmaktadır. Başta travmatik kayıplar olmaz üzere, tümör rezeksiyonları, konjenital bozukluklar temel endikasyonları oluşturmaktadır.

Sosyal bir varlık olan insanın başta yüz bölgesi olmak üzere, dış görünümü onun toplumla kuracağı ilişkilerde belirleyici bir unsur olmaktadır. Diğer taraftan günlük aktivitelerin başarı ile yapılabilmesi hususunda ekstremitelerin salahiyeti ciddi önem arz etmektedir. Birçok rekonstrüktif prosedürün plastik cerrahlar tarafından başarı ile uygulanıyor olmasına rağmen 3 boyutlu rekonstrüksiyonlar hala çözüm bekleyen önemli bir sorundur. İşte bu sorunun çözümü konusunda “kompozit doku nakilleri” hem hastalar hem de hekimler için iyi bir çözüm yolu olarak görülmüştür.

## 2.2. Yağ Doku ve Stromal Vasküler Fraksiyon

Vücutun bir bakıma en büyük organlarından biri olan yağ dokusu; subkutan, perivisseral doku, kemik iliği ve meme dokusunda yoğun olarak bulunur. Vücut kitlesinin %4'ünü oluşturur. Yağ dokusunun beyaz yağ doku (BYD) ve esmer yağ doku (EYD) olmak üzere iki farklı formu mevcuttur. BYD ile karşılaştırıldığında EYD kapillerlerden oluşan daha zengin damarsal yapı içerir.(Bartness ve Bamshad, 1998)

Yağ dokusunun 1/3'ünü matür adipositler, 2/3 ünü ise stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak bilinen, kan damarları (endotel hücreleri) , kök hücreler, preadipositler ve fibroblastlar oluşturur.

Yağ doku visseral ve subkutan olmak üzere ikiye ayrılır. Subkutan yağ dokuda yüzeysel ve derin olarak iki farklı tabakadan oluşur. Avuç içi ve ayak tabanında bulunan subkutan yağ doku şok emici olarak görev yapmaktadır. Visseral yağ doku ise intraperitoneal ve retroperitoneal kompartmanlara ayrılmıştır.

Yağ dokunun vücutta dağılımı oranı yaşa ve cinsiyet göre değişmektedir. EYD boyun, omuzlar, perianal ve paraaortik bölgelerde yoğun olarak bulunur. BYD'nin sarımsı rengi keratenoidlere bağlı iken, EYD'nin rengi içerdiği mitokondrionlara ve lipokroma bağlıdır.

Yağ dokusu embriyolojik olarak mezenkimal kökenli olup lipoblastlardan gelişirler. Bu hücreler fibroblastlara benzerler ancak stoplazmada yağ depolayabilme kabiliyetine sahiptirler. Hacimlerinin yaklaşık %80-95'i kadar trigliserit depo edebilirler. BYD ağırlığının yaklaşık %60-85'i lipid, bununda %90-99'u trigliserittir.

Gebeliğin 30. haftasında yağ depolanması başlar. Fetusta öncelikli yağ oluşumu EYD olup, doğum sonrası sınırlı bir süre içinde beslenme ve diğer etkenler bağlı olarak yağ hücrelerinin sayıca artışı olabilir ancak sonrasında hücre sayısında bir artış olmaz, sadece fazla kalorili beslenme ile lipid miktarını arttırmaları. (Avram ve ark., 2005)

Santrifüj edilen yağ dokusu süspansiyonunu farklı fraksiyonlara ayrılarak incelendiğinde içerisinde parçalanmış olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserid,



olgun yağ hücreleri ve kök hücre açısından zengin Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) olduğu görülmüştür. (Ailhaud ve ark., 1992)

Kapsamlı bir çalışmada yağ dokusundan elde edilen SVF'nin çok sayıda anjiyogenik ve antiapoptotik faktör salgılama potansiyeli olduğunu göstermişlerdir ve başka bir çalışmada ise SVF'nin kemik iliği gibi mezenkimal kökenli olduğu ve iyi bir multipotent kök hücre kaynağı da olduğunu göstermişlerdir.(Zuk ve ark., 2002; Rehman ve ark., 2004)

### 2.3. Kök Hücre Bilimi

Kök hücre, mitozla çoğalarak hem kendini yenileyebilen, hem de diğer özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip, özelleşmemiş ana hücre tipidir. Kemik iliğinde kök hücrelerin varlığı ilk kez Freindstein tarafından 1976'da gösterilmiştir. Kök hücre ile ilgili ilk deneysel çalışmalar, radyasyonun kemik iliği üzerindeki etkilerini hafifletmek amacıyla olmuştur. İlerleyen zaman içinde kök hücreler, kemik iliği dışında periferik kan, göbek kordonu, deri, diş pulpası, plasentada ve tüm dokularda tesbit edilmiştir. Yağ dokusu içerisindeki varlıkları ise ilk kez Zuc tarafından 2001 yılında gösterilmiştir.

Kök hücreler insan vücudunda zigotun oluşumundan itibaren mevcuttur. Henüz sekiz hücreden oluşan üç günlük embriyoda tüm hücreler **totipotent embriyonik kök hücreler** olarak adlandırılmaktadır. Totipotent kök hücreler plasenta ve tüm vücut hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Hücre bölünmesinin devam etmesiyle birlikte 5-8. günlerde blastokist iç hücre kitlesinden vücudun farklı dokularını oluşturan ektoderm, mezoderm ve endoderm hücrelerine dönüşebilen **pluripotent embriyonik kök hücreler** gelişir.

Daha sonra bu pluripotent kök hücreler oluşturacakları germinal tabakaya spesifik hale gelirler. Diğer tüm dokulara farklılaşma yeteneklerini kaybeder ve sınırlı sayıda hücre tipine dönebilen erişkin multipotent kök hücrelere dönüşürler. Ancak

bilinenin aksine Shinya Yamanaka ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada multipotent kök hücrelere uygun transkripsiyon faktörleri (OCT3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4) verilerek pluripotent kök hücrelere dönüşmesi sağlanmış (Takahashi ve Yamanaka, 2006) ve bu çalışma Yamanaka'ya "2012 Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü"nü kazandırmıştır.

Erişkin tip kök hücrelerise embriyonik yaşam sonrası dokulardan elde edilen kök hücrelerdir. Bu hücreler, özelleşmemiş ve kültürlerde uzun dönem (37 pasaj boyunca) farklılaşma göstermeksizin çoğalabilen, buna karşın özelleşme potansiyeli taşıyan hücrelerdir.

Erişkin kök hücreler temel olarak üç ana kategoride incelenir:

- I. Kan hücrelerini oluşturan hematopoetik kök hücreler
- II. Osteoblast, kondroblast, adipositlerin köken aldığı MKH'ler
- III. Organa spesifik, unipotent kök hücreler.

Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu tarafından mezenkimal kök hücrelerin aşağıdaki kriterleri sağlaması gerektiği belirtilmiştir.

- Plastik ve cam yüzeylere yapışabilme
- Hücre yüzeyinde minimum **CD73**, **CD90**, **CD105** ekspresyonunun yanı sıra hematopoetik kök hücre belirteçleri olan CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  veya CD19 ve HLA-DR yüzey moleküllerinin negatifliği
- Bu hücrelerin in-vitro adiposit, kondrosit veya osteoblast gibi mezenkimal hücrelere dönüşebilme yeteneğinin bulunmasıdır. Yakın zaman içinde bu hücrelerin mezoderm dışında, endoderm ve ektoderm kökenli hücrelere de dönüşebildikleri in-vivo ve in-vitro olarak gösterilmiştir

## 2.4. Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Yağ dokusunun 1 gramında yaklaşık 5000 koloni oluşturuu ünite (CFU) mevcut iken, 1 ml kemik iliğı kökenli materyalde 100-1000 CFU mevcuttur. Yağ dokuda kemik iliğıne nazaran ortalama 10 kat daha fazla kök hücrenin mevcut olması, elde edebilme kolaylığı, bu hücrelerin rejeneratif tıp ve doku mühendisliğı alanında kullanımını yaygınlaştırmıştır.

Yağ dokusunu oluşturan hücrelerin % 90'ı adipositlerdir. Ancak flow-sitometri ile yapılan incelemeler sonucunda yağ dokusu içerisinde; matür adiposit, pre-adiposit, post-adiposit, mezenkimal kökenli kök hücre, makrofaj, fibroblast, retikülosit, vasküler endotel hücreleri, mast hücreleri ve sinir sistemi elemanlarının da bulunduğı tesbit edilmiştir. Yoshimura ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada intakt yağ dokusunun % 16 adiposit, % 30 adipoz kökenli kök hücre, % 15 endotel, % 9 kan orjinli hücreler ve % 30 diğeri hücrelerden oluştuğunu gösterilmiştir.

Kök hücrelerin yağ dokusu içerisinde kan damarları çevresindeki perisitler olduğı veya fibroblastların bir subpopulasyonu olabileceğı şeklinde yorumlar mevcut olmakla birlikte henüz kökenleri net olarak tanımlanamamıştır. Son dönemde yağ dokusu içinde, adipositler arasında SSEA-3 (Stage specific embriyonic antigen) olarak tanımlanan ve diğeri adipoz kökenli kök hücrelerden farklı yeni multipotent master hücre türü keşfedilmiştir. Bu bilgi, biri yağ dokusu içinde lokalize ve sadece acil durumlarda aktive olan multipotent kök hücrelerin varlığını, diğeri ise kapillerler çevresinde yerleşen ve dokunun fizyolojik dönüşümünü düzenleyen progenitor hücrelerin varlığını ortaya koyması bakımından önemlidir. (Gündeşlioğlu ve ark., 2013)

### 2.4.1. Kök Hücrelerin Doku Onarımında Etki Mekanizmaları

Kök hücrelerin doku onarımına katkıları özellikle doku yaralanmasının olduğı durumlarda ortaya çıkmaktadır. Normal zamanda sağlıklı doku içerisinde sessiz halde bulunan kök hücreler, yaralanma sonrası ortaya çıkan endokrin ve parakrin iletiler (selektin, kemokin, integrin etkileşimleriyle) sayesinde çevre dokulardan ve kemik

iliğinden, yaralanmış dokuya doğru göç eder. Kök hücreler, aldıkları sinyal mekanizmalarının etkisi ile ortamdaki progenitor hücreleri çoğalma ve farklılaşma yönünde stimüle ederler. Bunun yanı sıra salgıladıkları büyüme faktörleri ve mediatörler sayesinde anti-inflamatuar ve immunmoduluar etki meydana getiriler. Bu sayede matriksin yeniden şekillenmesine katkıda bulunurlar. Kök hücrelerin, transfer edildikleri ortamlarda bulunan hücre türlerinin yüzey işaretçilerini sunabildikleri immünolojik boyama yöntemleri ve revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmiştir. Fakat temelde etkilerini ortam hücrelerine dönüşerek mi yoksa parakrin fonksiyonlarıyla mı yaptıkları konusundaki tartışma halen devam etmektedir.

Doku hasarının ilk gününde ortama, yaralanmış dokulardan ve aktive olan plateletlerden; temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor, b-FGF), trombosit kökenli büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF), epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF), dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) ve tümör nekrozis faktor  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) salınır.

Yağ dokusunda iskemi ve reperfüzyon yaralanmasıyla ilgili yapılan deneysel bir çalışmada; yaralanmanın 1. gününde ortama salınan bFGF faktöre ve iskemiye cevap olarak, YDKH'lerin, çoğalmakla kalmayıp aynı zamanda kuvvetli damarlanma stimülanı ve fibrogenesis inhibitörü olan hepatosit büyüme faktörü (hepatocyte growth factor, HGF) salgıladıkları tespit edilmiştir.(Suga ve ark., 2009)

Ortamdaki apoptotik endotel hücrelerinden salınan EGF' ün de kök hücrelerin antiapoptotik cevabını arttırdığı gösterilmiştir. YDKH'lerin ortamdaki büyüme faktörleri ve stimülanlara cevap olarak hem adipositlere hem de vasküler endotelial hücrelere dönüştüğü düşünülmektedir.(Matsumoto ve ark., 2006)

Ancak vasküler endotel hücrelerine dönüşüm deneysel çalışmalarda gösterildiği halde in vivo çalışmalarda nadiren tespit edilmiştir.(Kondo ve ark., 2009) Ayrıca, kök hücrelerin yaralanmış ortama infiltre olan lökositlerden salınan pro-inflamatuar sitokinlerin (interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  ve nitrik oksit sentetaz (nitric oxide synthase) salınımını azaltıp, anti-inflamatuar sitokinlerin (IL- 1beta, IL-10,

bFGF, TGF-  $\beta$  ve antipitotik gen Bcl-2) salınımını arttırdığı da gözlenmiştir.(Cui ve ark., 2007)

Bu mediatörlerden özellikle TGF- $\beta$  mezenkimal kök hücrelerin doku hasarı üzerindeki etkilerinin yönetilmesinde önemli rol oynar. Ayrıca etraf yağ dokuda sessiz konumda bulunan veya kemik iliğinden orijin alan diğer kök hücreleri aktive ederek ortama çağırır. Yaralanmanın 2-4. (inflamatuvar faz) günlerinde yağ dokusu içinde yerleşmiş mast hücreleri ve trombositler de diğer hücreler gibi TNF  $\alpha$  , VEGF, PDGF, TGF-B salgılayarak iyileşmeye katkıda bulunur. Yaralanmanın 5-7. günlerinde (proliferasyon fazı) ise VEGF, HGF, IL-8 ve matriks metalloproteinaz-8'in (MMP-8) yara sıvısında artar. Kompansatuvar proliferasyon olarak da adlandırılan bu dönemde yağ doku kökenli kök hücrelerin yeni yağ dokusu hücrelerini oluşturduğu gösterilmiştir. Bu şekilde bir taraftan iskemiye bağlı bir grup hücre apoptoza giderken bir taraftan da yeni nesil adipositler oluşturularak remodeling sürecine girilmiş olur. Yaklaşık 2 hafta içerisinde yaralanmış yağ dokusu iyileştirilir. Ortamda bulunan kök hücrelerin sayısı ve kök hücrelerin yerleştiği mikroçevreyi oluşturan matriks bileşenleri sürecin yeni dokunun rejenerasyonu ile mi yoksa fibrozis ve kalsifikasyonla mı sonuçlanacağını belirler.

Kök hücrelerin bir diğer özelliği de insan lökosit antijenlerini (HLA-DR) eksprese etmemeleri ve allojenik, aktive olmuş lenfositleri (T reg) suprese edebilmeleridir. YDKH immunmodulator özellikleri in-vivo ve in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir.

## 2.5. Apoptozis

Her hücre yaşam sikulusu içerisinde doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar kendi içinde doğal bir denge halinde devam eder. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde devam etmesine bağlıdır. Birçok önemli hastalığın patogeneğinde bu dengenin bozulmasının rol aldığı son çalışmalarda gösterilmiştir. Mesela; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogenezisde rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlamaktadır. Örneğin kemik iliğinden sürekli olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık  $5 \times 10^{11}$  kan hücresi apoptozis yolu ile yok

edilmektedir. Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstrasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozisin hayatımızda ne kadar önemli bir yer aldığıın kanıtıdır.

Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Mesela virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılmakta ve sebebiyet verecekleri ek durumlar önlenmektedir. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Çünkü hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Aksit ve Bildik, 2008).

### **2.5.1. Apoptozisin tanımı ve tarihçesi**

Canlının kendi otonom mekanizması tarafından ayarlanan zararlı, yaşlanmış, bakteri ve otoreaktif virüslerle enfekte veya istenmeyen kendi hücrelerinin bir düzen içerisinde enerji (ATP) kullanılarak ve zaman endekli olarak iz bırakmadan öldürülmesi süreci apoptozis olarak tanımlanır. Başka bir deyişle apoptozis, yaşam boyu devam eden programlı, bir hücrenin genetik olarak düzenlenen sistematik yok oluş fenomenidir.

Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (=ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş "Sonbaharda yaprak dökümü"nü tanımlayan bir kelimedir(Aksit ve Bildik, 2008). Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı hücre ölümü gösterilmiş ve buna, ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması manasında 'apoptozis' adı verilmiştir (Öktem ve ark., 2001).

### **2.5.2. Apoptozisin fonksiyon ve amaçları**

Apoptoziste temel amaç komşu hücrelere hasar vermeden ve onları kötü yönde etkilemeden ve iz bırakmadan hedeflenen hücrelerin yok edilmesidir (Gültekin ve ark., 2008). Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve dengenin sağlanmasında vazgeçilmez bir rolü vardır.

### **2.5.3 Apoptozisin homeostazis içindeki yeri**

- Yaşlanmış ve bu nedenle fonksiyonlarını kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması
- Hormona bağımlı involüsyon (örneğin; prostat, endometrium ve meme dokusu hücrelerinde)
- Sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılması (örneğin; gastrointestinal sistem hücreleri, deri)
- İmmün hücrelerin seçimi (örneğin; Sitokin depleksiyonundan sonra B ve T lenfositlerin ve timusta otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılması)

### **2.5.4. Organizmanın şekillenmesi**

Embriyo gelişimi, başkalaşım ve doku atrofisi sırasında olduğu gibi. İnsan embriyosunda el ve ayak ekstremitelerinin gelişimi esnasında, parmaklar arasında mevcut hücrelerin apoptozise gitmeleri sonucu yapışık parmak ( sindaktili) oluşumu engellenmektedir.

Tümör hücreleri, virüsle kontamine olmuş hücreler veya kontrolsüz çoğalan immün hücreler gibi istenmeyen ve tehlikeli hücreler ortadan kaldırılır ve bunlara karşı savunma oluşturulur.

Bir günlük yaşam döngüsü içinde yaklaşık 10 milyar hücre mitozla çoğalırken diğer tarafta 10 milyar hücre de ölmektedir. Bu miktar tüm vücudumuzda mevcut tüm hücrelerin sadece % 5'lik kısmını oluşturmaktadır.

Hücreler apoptozis ile ölümü 15-120 dakika içinde gerçekleşmektedir. Bu süre hücrenin yaşam süresi tipine göre değişmektedir. Mesela; bağırsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölümler, derinin epidermis hücreleri 20–25 günlük bir süre de ölmektedir. Diğer taraftan Kalp kası hücreleri ve nöronlar ömür boyu yaşamlarını devam ettirmektedirler. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (Öktem ve ark., 2001; Aksit ve Bildik, 2008; Gültekin ve ark., 2008)

#### **2.5.5. Apoptozis ve nekroz**

Hücre ölümü morfolojik olarak 2 şekilde sınıflandırılmaktadır.

- 1) Patolojik hücre ölümü ( nekroz)
- 2) Fizyolojik hücre ölümü (apoptozis)

Nekroz hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir.(Öktem ve ark., 2001) Bu olayda hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, sonuçta inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de bundan etkilenir. Nekroz ile Apoptozis arasındaki farklar aşağıda ki tabloda gösterilmiştir.



**Tablo 2.1.** Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar. (Öktem ve ark., 2001)

Özellik	Nekroz	Apoptozis
Dağılım	Komşu hücre grupları	Dokuda tek tek hücreler
Nedenler	Her zaman patolojik	Fizyolojik/patolojik
Eksudatif Yangı	Genellikle var	Yok, ± hücreselel immunite
Işık Mikroskopisi	Bazofili, piknoz, karyoreksis, karyolizis	Kreşentrik görünüm, eozinofilik partikül
Elektron Mikroskopisi	Hücrede şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime, kayıp	Volüm kaybı, apoptotik cisimcikler
Fagositoz	Mononükleer hücreler	Fagositik ve komşu hücreler
Mekanizma	Kimyasal ya da yapısal parçalanma	Makromolekul sentezini gerektiren aktif hücreselel yıkım

### 2.5.6. Apoptozis Morfolojisi

Apoptozis aşamaları şu şekilde özetlenebilir;

- A. Ölüm sinyali,
- B. Kromatinde sıkışma,
- C. Hücrede parçalanma,
- D. Fagositoz

Özet olarak apoptozis

A; Eksternal olarak

- Hücreler hacim kaybeder ve büzüşür.
- Hücre yüzeylerinde küresel kabarcıklar oluşur (blebbing).
- Fosfatidilserin hücreden dışarı çıkar.

B; İnternal olarak

- Sitoplazma yoğunlaşır
- Mitokondriyum, sitokrom-C gibi apoptozisi uyaran faktörleri serbestleştirerek bütünlüğünü kaybeder ve parçalanır.
- Kaspazlar aktive olur.
- Kromozomal DNA'lar kendi içinde 180-200 bp'lik intranükleozomal fragmanlara ayrılarak parçalanır.
- Hücre sağkalımı ve metabolizmasında çok önemli olduğu düşünülen ve moleküler ağırlığı 100 daltonun üzerinde olan birçok protein de benzer şekilde parçalanır. (Gültekin ve ark., 2008)

Apoptozisde ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma anılırken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz. Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, stoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfotidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır.

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır.

Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz 30–60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir. Elektron mikroskopunda apoptozis esnasında, kromatinin yoğunlaşması, stoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptozis İndükleyici Faktör salınımı, olduğu bildirilen morfolojik değişikliklerdendir.(Aksit ve Bildik, 2008)

### 2.5.7. Apoptozis Mekanizmaları

Hücresinin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır.

2 apoptotik yol tanımlanmıştır;

- **Ekstrinsik yol;** hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri ile gerçekleştirilir
- **İntrinsik yol;** büyüme faktör sinyallerinin kaybına veya hücre içindeki ölüm sitomuluslarına cevaben oluşan mitokondri aracılı yoldur. (Burz ve ark., 2009)

Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir.

Hücre dışı uyaranlar arasında; Tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, interlökin-2 gibi maddelerin ortamda azalması ve glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir.

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında; Sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral, bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler, onkojenler (cmyc gibi) yer alır. Ayrıca, sitotoksik antikanser ilaçları, hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler.

Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir.

Apoptozis süreci;

- I. DNA hasarına genlerin yanıtı,
- II. Hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı),
- III. Hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi olmak üzere 3 farklı şekilde işleyebilir.

Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar;

1. Bcl-2 ailesi proteinleri,
2. Kaspazlar
3. Apaf-1 (Apoptotik aktive edici faktör-1) proteindir.

Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur. (Aksit ve Bildik, 2008)

### **2.5.8. Apoptozisi Kontrol Eden Genler**

Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır. Bunlar Tablo 2.2. de verilmiştir.(Öktem ve ark., 2001)

**Tablo 2.2.** Apoptozis ile ilişkili genler (Öktem ve ark., 2001)

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1,A-1 c-abl geni	Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bad, Bcl-xS, bid, bik, hrk-1 Cmyc
Ras onkogeni	p53, p21
Çözünebilir fas	Fas (CD95/APO1), FADD/MORT, RIP, FAST
p53	İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)
A20	LOH (MTS1/CDK41)

### 2.5.9. Apoptozis Regülasyonu

Regülasyon; Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptozis inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozisi uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptozis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanan çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom-c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır. Apoptozom aracılığıyla prokaspaz-9'un aktifleşmesiyle oluşan aktif kaspaz-9 efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder ve aktif kaspaz-3 meydana gelir. Aktif kaspaz-3, normalde kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz ile kompleks halde bulunan, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü'nü inaktive eder ve

kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz'ı serbestleştirir. Serbestleşen kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz da DNA'yı oligonükleamaz fragmanlara ayırır. (Gültekin ve ark., 2008)

### **2.5.10. Apoptozisin İndüksiyonu**

Apoptozis hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri, hücre membranında bulunur ve tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. (Aksit ve Bildik, 2008)

### **2.5.11. Apoptozis ile ilişkili hastalıklar**

Apoptozis;

- Tümörlerde, hem büyüme hem de regresyonda hücre ölümü (kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisiyle ve spontan regresyonda),
- Hormona bağımlı dokularda patolojik atrofi,
- Parenkimatöz organlarda duktus tıkanmasına bağlı patolojik atrofi (örn. karaciğer),
- Sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan hücre ölümü,
- Bazı viral hastalıklarda hücre ölümü (örn. HIV-1, HCV, Adenovirüs infeksiyonlarında),
- Çeşitli zedeleyici etkenlerle oluşan hücre ölümü (hipertermi, radyasyon, sitotoksik kemoterapi, hipoksi gibi nekroz oluşturan etkenler) gibi patolojik süreçler. (Öktem ve ark., 2001)

Etyopatogenezinde apoptozisin rolünün gösterildiği hastalıklar;

- Otoimmün hastalıklar; Apoptozisle, yaşlı T lenfositler, timusun kontrolundan ve denetiminden kaçan otoreaktif T lenfositler öldürülür. Timustaki bu negatif seleksiyon ile organizmanın self toleransı korunur.(Baykal ve ark., 1998) Otoimmün hastalıklarda T lenfositlerinin negatif seleksiyonu olmamaktadır. Örneğin, otoimmün linfoproliferatif sendrom'da mutasyonlar nedeniyle yetersiz apoptozise uğrayan lenfosit sayısı artar ve bir çok otoimmün hastalık ortaya çıkar.(Gültekin ve ark., 2008)
- Astım,
- Amiyotrofik lateral skleroz; Spinal motor nöronlar aşırı apoptozis nedeniyle kaybolarak azalır,
- Alzheimer hastalığı,
- Huntington hastalığı,
- Miyokard iskemisi,
- Serebral iske mi (Gültekin ve ark., 2008),
- Sepsis (Pinheiro da Silva ve Nizet, 2009)

### 2.5.12. Tedavide Apoptozis

Bugün birçok hastalığın hücre ölümü ya da yaşamı ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle apoptotik sürece müdahale ederek yeniden düzenlenmesi, önemli tedavi yöntemlerini gündeme getirmektedir. Potansiyel tedavi yöntemleri üç kategoride toplanmaktadır ki bunlar; gen tedavisi (p53'ün yedeklenmesi vb.), apoptoz moleküllerinin düzenleyicilerini hedefleyen moleküllerin enjeksiyonu (Growth faktörler ve çözülebilir FasL vb.), apoptozla ilişkin genlerin ifadesini (ekspresyonunu) düzenleyen farmakolojik küçük moleküller (Bcl-2 vb.). Bugüne kadar non-steroidal antiinflamatuvarlar gibi apoptoz düzeyini değiştirdiği bilinen birçok ilaç vardır. Aslında bütün sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi programları tümör hücrelerinde apoptozu başlatır ve apoptozla olan direnç tedavideki başarısızlığı getirir. Üstelik bu tedaviler, normal hücrelerde de apoptozu başlatır ve kemik iliği üzerinde olumsuz yan etkileri vardır.

Ayrıca apoptoz inhibisyonu yapan başka proteinler ve sentetik özgül kaspaz inhibitörleri de üretilmektedir. Tedavide kaspaz ailesi üyeleri ve Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonları da önemli yer tutmaktadır. (Aksit ve Bildik, 2008)

### **2.5.13. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler**

#### **2.5.13.1. Hematoksilen-Eozin Boyama**

Hematoksilen-eozin boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi.(Güleş ve Eren, 2008)

#### **2.5.13.2. Giemsa Boyama**

Giemsa ile boyamada, hematoksilen-eozin ile boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır.(Güleş ve Eren, 2008)

#### **2.5.13.3. Floresan Mikroskopisi**

Floresan mikroskopisi, floresan maddelerin kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Canlı ve ölü hücre ayırımı yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. Propidium iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, hematoksilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılır. (Güleş ve Eren, 2008)



#### **2.5.13.4. Elektron Mikroskopi**

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir.(Güleş ve Eren, 2008)

#### **2.5.13.5. Faz Kontrast Mikroskopi**

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücrelerin yapışıkları alt tabakadan ayrılarak besiyerinde yüzmeleri, apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler, hücreler henüz alttabakaya yayılmış halde iseler stoplazmalarındaki vakuoller izlenebilir.(Güleş ve Eren, 2008)

#### **2.5.13.6. Anneksin-V Yöntemi**

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin- V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir.(Güleş ve Eren, 2008)

### **2.5.13.7. TUNEL yöntemi**

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Konvansiyonel parafin kesitleri, terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır.(Güleş ve Eren, 2008)

### **2.5.13.8. M30 Yöntemi**

M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18’in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler.(Güleş ve Eren, 2008)

### **2.5.13.9. Kaspaz-3 Yöntemi**

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir.(Güleş ve Eren, 2008)

### **2.5.13.10. Agaroz Jel Elektroforezi**

Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan ethidium bromide ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. Apoptotik hücrelerdeki endonükleaz aktivasyonu kromatinin oligonükleozomal parçacıklara ayrılmasına neden olur. Bu enzim kalsiyum ve magnezyum bağımlı olup, DNA’da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanmaya yol açar. Bu parçalanma paterni, agaroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde “ladder pattern” izlenir ve apoptoz için tipiktir. Agaroz jel elektroforez güvenilir sonuçlar veren kalitatif bir analiz yöntemidir.(Güleş ve Eren, 2008)

#### **2.5.13.11. Western Blotting**

Western blotlama ya da immunoblotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir. Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metotla belirlenebilir.(Güleş ve Eren, 2008)

#### **2.5.13.12. Flow Sitometri**

Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır. Apoptoz flow sitometri uygulamasında iki şekilde belirlenir.

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak .(Güleş ve Eren, 2008)

#### **2.5.13.13. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Apoptozda görülen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonudur. ELISA ile gerek

kültürü yapılmış hücre populasyonlarında, gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür. ELISA analizinde, ELISA pleytlerindeki sitoplazmik nükleozomları belirlemek ve yakalamak için iki nükleozomal epitopa spesifik bir çift monoklonal antikor kullanılır. Bu analiz yöntemi agaroz jel elektroforez ile apoptotik DNA merdiveninin belirlenmesinden yaklaşık 500 kat daha fazla duyarlı ve çok sayıda örneğin test edilmesi için daha uygundur. (Güleş ve Eren, 2008)

## **2.6. Doku Nakilleri ve Böbrek**

### **2.6.1. Böbreğin Anatomi ve Fizyolojisi**

Böbrekler insan vücudunda retroperitoneal kavitede, karın arka duvarının en üst kısmında ve columna vertebralisin her iki yanında bulunurlar. Üst uçları 12. torakal vertebranın üst kenarı, alt uçları ise 3. lomber vertebra seviyesinde bulunur. Sağ böbrek, karaciğerin sağ lobunun büyük olması ve basısı nedeni ile sola göre 1-2 cm daha aşağıda bulunur. Yetişkin bir insan böbreği yaklaşık 12 cm uzunluğundandır ve erkeklerde yaklaşık 150 g, kadınlarda ise 135 g ağırlığındadır. Böbrekler en dışta fibröz bir kapsül ile sarılmıştır. Sagittal olarak kesildiğinde dışta korteks, içte medulla olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Medulla, medullar piramit adı verilen 10-18 adet piramidal yapıdan oluşur. Piramitlerin tabanları kortikomedüller bölgede bulunurken, tepe kısımları kaliks içine kadar uzanır. Kaliks içine açılan bu kısımlara papilla ismi verilir. (Junqueira ve ark., 1993)

Renal arter hilustan böbreğe girer, önce interlober daha sonra arkuat arterlere ayrılır. İnterlobuler arterler arkuat arterlerden dik olarak çıkar. İnterlobuler arterlerden glomerüle giden afferent arterioller köken alır. Glomerülü oluşturan kapillerler birleşerek efferent arteriollerini oluşturur. Efferent arterioller dallanarak tübülüsleri saran, böbrekteki ikinci kapiller ağ sistemi olan peritübüler kapiller ağı oluşturur. Peritübüler kapillerden gelen kan venöz sisteme dökülür. Oradan sırasıyla arteriyal sistemle paralel olarak interlobuler ven, arkuat ven, interlober ven ve renal veni takip eder. Renal venler ise inferior vena kavaya drene olur. (Tisher, 2000)

İnsanda her bir böbrek idrar oluşturma yeteneğine sahip yaklaşık bir milyon nefrondan oluşur. Nefron, afferent ve efferent arteriollerden meydana gelen bir kapiller yumağı olan glomerül ile başlamaktadır. Glomerüller özelleşmiş bir kılcal damar ağından oluşmuştur. Glomerül, renal tübülün genişlemiş ucu tarafından oluşturulan Bowman kapsülü ile sarılmıştır. Bowman kapsülü proksimal kıvrımlı tübülün başlangıcını oluşturur. Proksimal tübül nefronun metabolik olarak en aktif bölümü olup, glomerüler filtrat hacminin %60- 80'inin; filtre edilmiş sodyum ve klorun %70'inin; böbrekten atılan hidrojenin %90'ının; sülfat, fosfat, bikarbonat, glukoz ve potasyumun büyük bir bölümünün geri emilimini sağlar.

Proksimal tübül önce Henle kulbunun aşağı doğru inen ince kulbuna boşalır ve yukarı doğru uzanan ilk ince dal, sonra da yukarı doğru çıkan kalın ilmeği oluşturur. Henle kulbunun ana görevi hipotonik ve konsantre idrar üretimini sağlamaktır. Distal tübül yukarı doğru çıkan Henle kulbunu toplayıcı tübülle birleştirir.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$  atılımında ve geri emiliminde görev alır. (İşlekel, 2002; Burtis ve ark., 2005)

Glomerülden filtre edilen sıvı sırasıyla proksimal tübül, henle kulbu, distal tübül ve toplayıcı kanallardan geçer, renal papillaların içinden renal kalikse oradan renal pelvis ve üretere geçer. (Junqueira ve ark., 1993; Guyton ve Hall, 1996)

Distal tübülün başlangıcı her nefronda, afferent ve efferent arterioller ile temas halindedir ve bu üç yapı jukstaklomerüler aparatı oluşturur. Jukstaklomerüler aparatın görevi renin salgılamak, glomerüler filtrasyon ve renal kan akımının regülasyonunu idare etmektir. Jukstaklomerüler aparatın distal tübüldeki değişiklik gösteren hücrelerine makula densa denir ve distal tübüldeki sıvının bileşimine göre jukstaklomerüler aparatın aktivitesini ayarlar. (Tisher, 2000)

Nefronların temel işlevi istenmeyen maddeleri plazmadan temizlemektir. Bunun için kullanılan mekanizmalar;

- **Glomerüler filtrasyon:** Glomerüldeki kan plazmasının bir bölümü (yaklaşık 1/5'i) glomerüler membrandan filtre edilir.
- **Tübüler reabsorbsiyon:** Filtre edilen sıvı, tübüllerde ilerlerken su ve diğer gerekli maddeler reabsorbe edilir. İstenmeyen maddeler idrar oluşumuna

katkıda bulunur.

- **Tübüler sekresyon:** Plazmadaki bazı maddeler tübüleri döşeyen epitel hücrelerince doğrudan tübüler sıvı içine sekrete edilir.

Endotelden kaynaklanan nitrik oksit, böbrek damar direncini azaltır ve glomerüler filtrasyonu artırır. PgE2, PgI2 ve bradikinin de damarları genişleten ve glomerüler filtrasyonu artıran diğer otakoidlerdir.(Navar ve ark., 1995)

Böbreğin temel fonksiyonları (Akpolat ve ark., 1996)

- Vücut sıvı ve elektrolit dengesinin korunması ve sürdürülmesi
- Metabolik atık ürünlerin (üre, ürik asit, kreatinin) atılımı
- İlaçlar, toksinler ve bunların metabolitlerinin detoksifikasyonu ve atılımı
- Ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi, Hormon sentezi ve metabolizmasına katkı (eritropoetin, D vitamini)
- Peptid hormonlarının (insülin, glukagon) yıkımı
- Küçük molekül ağırlıklı proteinlerin ( $\beta$ 2 - mikroglobulin) yıkımı
- Metabolik etki (Glukoneogenez, lipid metabolizması)

### **2.6.2. Böbrek Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi**

Böbrek fonksiyonları laboratuvar incelemelerine dayanılarak değerlendirilir. Böbrek bozukluğu nedeni idrar yollarında tıkanıklık, glomerüler disfonksiyon veya tübüler disfonksiyon olabilir. Glomerüler fonksiyonlardaki anormallikler böbrek fonksiyonu bozukluğunun en fazla nedenidir. Bunların kolayca fark edilebilmesinden dolayı, GFH ile ilişkili testler en yararlı laboratuvar testleridir.

### **2.6.3. Kan Üre Nitrojeni(BUN)**

Amonyak protein katabolizması sırasında aminoasitlerin deaminasyonu ile meydana gelir. Karaciğer oluşan amonyağı üreye dönüştürerek kandaki amonyak

seviyesinin toksik düzeylere ulaşmasını engeller. Bundan dolayı karaciğer vücuttaki ürenin en önemli kaynağıdır. BUN protein katabolizması ile doğru, glomerüler filtrasyon hızı ile ters orantılıdır. BUN, protein katabolizması normal ve sabit olmadıkça, GFH'nin güvenilir bir göstergesi değildir.

BUN'nin normal değeri 10-20 mg/dL'dir. Daha düşük değerler karaciğer hastalığında ve açlıkta görülebilir. Protein katabolizmasındaki artışlar veya GFH'deki azalmalar BUN'de yükselmelere neden olur. Yüksek protein içerikli diyet, travma veya sepsis, gastrointestinal sistemdeki veya büyük bir hematomdaki kanın parçalanması protein katabolizmasının arttığı durumlara örnek verilebilir. BUN değeri 50 mg/dL'in üzerinde ise bu böbrek bozukluğu ile ilişkilendirilir.(Morgan ve ark., 2008)

#### **2.6.4. Serum Kreatinini**

Kas metabolizma ürünü olup kreatin enzimatik olmayan yollarla kreatinine dönüşür. Kreatinin yapımı kas kütlesi ile orantılı olup göreceli olarak sabittir. Günde ortalama olarak erkeklerde 20-25 mg/kg, kadınlarda 15-20 mg/kg düzeyinde oluşur. Meydana gelen kreatinin daha sonra glomerüllerden filtre edilir fakat böbreklerde reabsorbe olmaz. Bundan dolayı serum kreatinin düzeyi, vücut ağırlığı ile doğru fakat GFH ile ters orantılıdır. Serum kreatinin değeri genellikle GFH'nin güvenilir bir göstergesidir, çünkü vücut kas kütlesi genellikle sabittir. Serum kreatinin normal değerleri erkeklerde 0,8-1,3 mg/dL, kadınlarda ise 0,6-1 mg/dL'dir. (Miller ve ark., 2010)

Kreatinin klerensi ölçümü böbrek fonksiyonlarının klinik olarak değerlendirilmesinde mevcut en doğru metottur. Kreatinin klerensi 40-60 mL/dk olması hafif derecede böbrek bozukluğuna işaret eder. 25-40 mL/dk arasındaki kreatinin klerensi orta derecede böbrek disfonksiyonunu gösterir ve bu durum her zaman semptom oluşmasına neden olur. Ciddi böbrek yetersizliğinde ise kreatinin klerensi 25mL/dk'nın altındadır. Kreatinin klirensi kabaca aşağıda ki formüle göre hesaplanabilir.

$$\text{Kreatinin klerensi} = (140\text{-yaş}) \times \text{Yağsız Vücut Kütlesi} / 72 \times (\text{plazma kreatinin})$$

### 2.6.5. Doku Nakillerinin Böbrek Üzerine Etkisi

Böbrek vücutta en iyi perfüze olan organ olması nedeniyle hipoperfüzyona da en duyarlı organlardan biridir. Karın bölgesine yapılan vasküler cerrahi işlemlerde erken dönemde mortalite ve morbiditenin en sık nedeni hipoperfüzyona bağlı böbrek yetmezliğidir. (Bonventre, 1993) Gerek solid organ nakilleri gerekse kompozit doku nakillerinde böbrek hem hipoperfüzyon hemde iskemi sonrası oluşan reperfüzyonun olumsuz etkilerine maruz kalır.

İskemiden sonra gelişen akut böbrek yetmezliği; glomerüler filtrasyon hızında azalma, tubuler nekroz, böbrek damarlarında direnç artışı ile karakterizedir. (Conesa ve ark., 2001) Böbrek iskemi reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikalleri önemli rolü vardır. (Paller ve ark., 1984)

İskemi reperfüzyon hasarı öncelikli olarak böbreğin hipoksiye duyarlı kısmından başlar. Böbreğe gelen kan akımının büyük kısmı renal korteksten geçer ve renal medullanın kanlanmasını sağlayan vasa rectaya çok az kan gider, bu da renal medullayı hipoksiye daha duyarlı hale getirir. Medüller hipoksi ayrıca hücresel enerji depolarının azalmasına, endotel ve düz kas hücrelerindeki aktin hücre iskeletinin bozulmasına neden olur. Sonuçta hücresel deformite ve çevre dokulardaki hipoksi artmaktadır. (Friedewald ve Rabb, 2004) Renal hasar öncelikle tubuluslarda oluşur. Nedeni iskemiye bağlı gelişen tubuler nekrozdur. Genellikle geriye dönüşümlüdür, reperfüzyonla birlikte 1-2 hafta içinde tubul fonksiyonları normale dönmektedir. (Brady ve Singer, 1995)



## **2.7. Doku Nakilleri ve Karaciğer**

### **2.7.1. Karaciğerin Yapı ve Fonksiyonları**

KC, vücudumuzun en büyük iç organıdır. Karın boşluğunun üst sağ kısmında, diyafragmanın hemen altında, mide ve bağırsakların hemen üzerinde yerleşmiştir. KC, sağ 7. kostadan 11. kostaya kadar uzanır.

Karaciğer birbirinden fonksiyonel olarak tamamen bağımsız 8 segmentten meydana gelmektedir. Vücuttaki toplam kanın % 10-15'i KC'de bulunmaktadır. Toplam KC kan akımı kardiyak debinin yaklaşık % 25'ine denk gelmektedir. (Greenway ve Lutt, 1989)

KC enerji devamlılığını sağlayan, yaşamsal fonksiyonlardan sorumlu bir organdır. KC'nin başlıca fonksiyonları şunlardır.

- Karbonhidrat, lipit ve protein metabolizması
- Safra Metabolizması
- Kuagülasyon faktörlerinin üretimi ve salınımı
- Eritropoez: Hem ve Biluribin Metabolizması
- Endokrin Fonksiyon
- İmmün Fonksiyon
- İlaç ve Toksinlerin Metabolizması

### **2.7.2. Karaciğer Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi**

Stres durumunda bu fonksiyonların çoğu etkilenmektedir. Vücudun bir manada metabolik beyni olan karaciğerde bu değişiklikler çeşitli testlerle takip edilebilmektedir.

## **2.7.2.1. Biyokimyasal Testler**

### **2.7.2.1.1. Aminotransferazlar**

Aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) serum aminotransferazları olarak bilinirler ve hepatoselüler hasarda yükselirler. Bu enzimler glukoneogeneizde rol oynamaktadırlar. ALT relatif olarak KC'e özgü iken AST KC dışında kalp, iskelet kası, beyin, böbrek, pankreas, yağ dokusu ve kan gibi dokulardada bulunur. ALT sitoplazmik bir enzim iken AST hem sitoplazmik hem de mitokondriyal bir enzimdir. ALT' nin ömrü  $47 \pm 10$  saat, AST' nin yarı ömrü  $17 \pm 5$  saattir.

Normal AST ve ALT değerleri 35-45 U/L' dir. Aminotransferazlarda hafif bir artış (< 5 kat) hepatosteatoz, hemokromatoz, kolestaz, kronik hepatit ve sirozu, orta düzeyde bir artış (5-10 kat) hepatoselüler nekroza bağlı olarak akut viral hepatitler, ilaca bağlı hepatitler ve kronik hepatitlerin ağırlaşması gibi durumlarda, çok yüksek değerler (> 10 kat) ise genellikle ilaçlar (parasetamol, halotan hepatiti), toksinler, iskemik hepatit gibi nedenlere bağlı olabilir. Ancak kronik hepatitlerde ve sirozda hafif artışın yanında tamamen normal değerlerle karşılaşılabilir. (Sonsuz, 2007)

### **2.7.2.1.2. Laktat Dehidrogenaz**

Laktat dehidrogenaz (LDH)'in artmış seviyeleri akut ya da kronik karaciğer hasarını gösterebilir. Masif fakat geçici bir yükseliş iskemik hepatiti veya KC hasarıyla birlikte olan hemolizi gösterir. Hemoliz, renal infarkt, akut inme, myokart hasarı ve iskelet kası hasarında da LDH yükselebilir.(Miller, 2010)

### **2.7.2.1.3. Glutasyon S-Transferaz**

Yarı ömrü çok kısa olan bu enzim ilaçlarla indüklenen KC hasarının tespitinde kullanılır. (Miller, 2010)

### **2.7.2.1.4. Serum Albumin Düzeyi**

Albümin KC' de sentezlenen bir proteindir ve yarı ömrü 20 gündür. Bu nedenle hipoalbuminemi oluştuğunda KC' de ki sentez günlerce önce durmuş olabilir. Uzun dönemde KC sentez kapasitesi hakkında bilgi verir. Serumdaki normal değeri 3.5-5.5 g/dl'dir.(Hoekstra ve ark., 2013)

### **2.7.2.1.5. Protrombin Zamanı**

Serum albüminin tersine, KC'den sentez edilen koagülasyon faktörleri kısa yarı ömre sahiptir ve kısa dönemde KC yetmezliğini gösterirler. (Cuhruk; Miller, 2010) Bu nedenle protrombin zamanı (PT) ya da INR (ulusal normalize edilmiş oran) değerlerinin yükselmesi akut karaciğer hastalığını gösterir.(Rabie ve ark., 2006; Miller, 2010; Hoekstra ve ark., 2013) PT'nin normal değeri 11-14 sn'dir.(Cuhruk)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın 12.11.2014 tarih ve 41475755-51.99/13 sayılı izni ile Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi.

#### 3.1.Diyet ve Barınma

Çalışmada ağırlıkları 143-310 gr olan 4-6 aylık 29 adet Wistar Albino tipi ve 29 adet Sprague-Dawley türü erişkin dişi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilerek Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne (SÜDAM) uygun koşullarda transfer edildi. 7 gün boyunca karantina uygulaması sonrası hayvanlar gruplandırıldı. Deney öncesi hayvanlar oda ısısında 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda tel kafeslerde uzman veteriner kontrolünde yaşatıldı. Deney öncesinde tüm hayvanlar standart rat yemi ve su ile beslendi. Cerrahi işlemden 2 saat önce katı besin alımı kısıtlandı, su alımı kısıtlanmadı.



Şekil 1. Deney hayvanlarının ortam koşulları ve gruplar şeklinde takibi

### 3.2.Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

24 adet Wistar Albino ve 24 adet Sprague-Dawley grubu sıçanlar her grupta 12 adet rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Sprague-Dawley sıçanlar karışıklığı önlemek amacıyla kuyruklarından silinmeyen kalem ile işaretlendi.

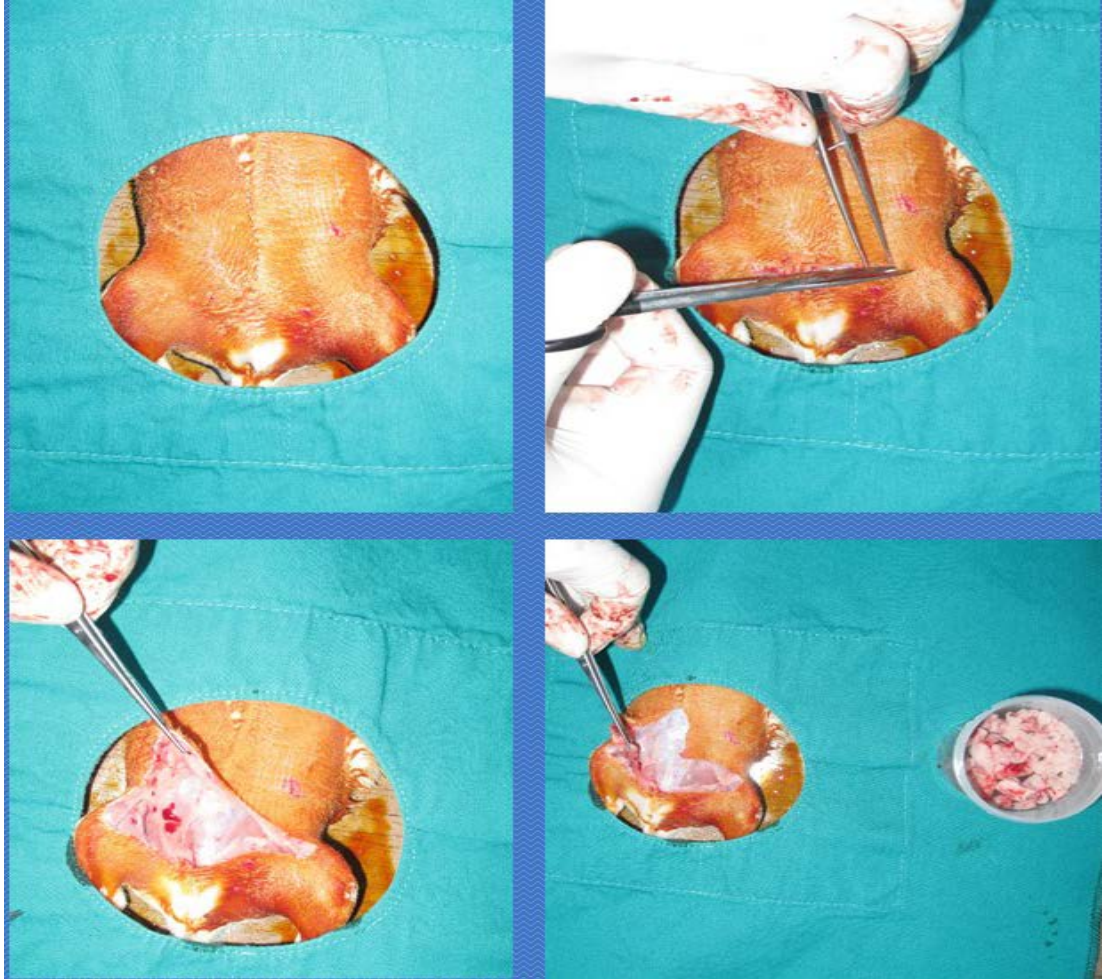
**Tablo 3.1.** Çalışma gruplarının belirlenmesi

<b>Gruplar</b>	<b>Sayı (n)</b>	<b>Protokol</b>
<b>Grup 1 (WASF)</b>	12	Wistar Albino türü sıçanlardan oluşmuş olup grup 2 (Sprague-Dawley Serum fizyolojik grubu) ile çapraz bacak transferi yapılarak sadece intraperitoneal serum fizyolojik verilen grup
<b>Grup 2 (SDSF)</b>	12	Sprague-Dawley türü sıçanlardan oluşmuş olup grup 1 (Wistar Albino serum fizyolojik grubu) ile çapraz bacak transferi yapılarak sadece intraperitoneal serum fizyolojik verilen grup
<b>Grup 3 (WAKH)</b>	12	Wistar Albino türü sıçanlardan oluşmuş olup grup 4 (Sprague-Dawley kök hücre grubu) ile çapraz bacak transferi yapılarak intraperitoneal mezenkimal kök hücre süspansiyonu verilen grup
<b>Grup4 (SDKH)</b>	12	Sprague - Dawley türü sıçanlardan oluşmuş olup grup 3 (Wistar Albino kök hücre grubu) ile çapraz bacak transferi yapılarak yapılarak intraperitoneal mezenkimal kök hücre süspansiyonu verilen grup

Gruplandırma sonrası kalan 5 adet Sprague-Dawley ve 5 adet Wistar Albino türü sıçanlar mezenkimal kök hücresi elde edilmek üzere ayrıca gruplandırıldı. Aynı şekilde Sprague-Dawley türü sıçanlar karışıklığı önlemek amacıyla kuyruklarından silinmeyen kalem ile işaretlendi.

### 3.3.Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreden Zengin Stromal Vasküler Fraksiyon Eldesi

Adipoz doku kaynaklı kök hücre eldesi için gruplandırılan 5 adet Wistar Albino ve 5 adet Sprague - Dawley türü sıçanlara İP (intraperitoneal) olarak 90 mg/kg ketamine-HCl (Ketalar©- İM) ve 10 mg/kg Ksilazin HCL(Xylazinbio %2 © -İM) karışımı anestetize edildi. Her iki inguinal bölgeye cerrahi alanın traşlanması ve iyotlu solusyonla temizlenmesini takiben yapılan insizyonlarla inguinal yağ dokusu eksize edildi. 5 adet Wistar türü , 5 adet Sprague-Dawley türü sıçandan elde edilen yağ dokular ayrı ayrı serum fizyolojik içeren kaplara alınarak biriktirildi.

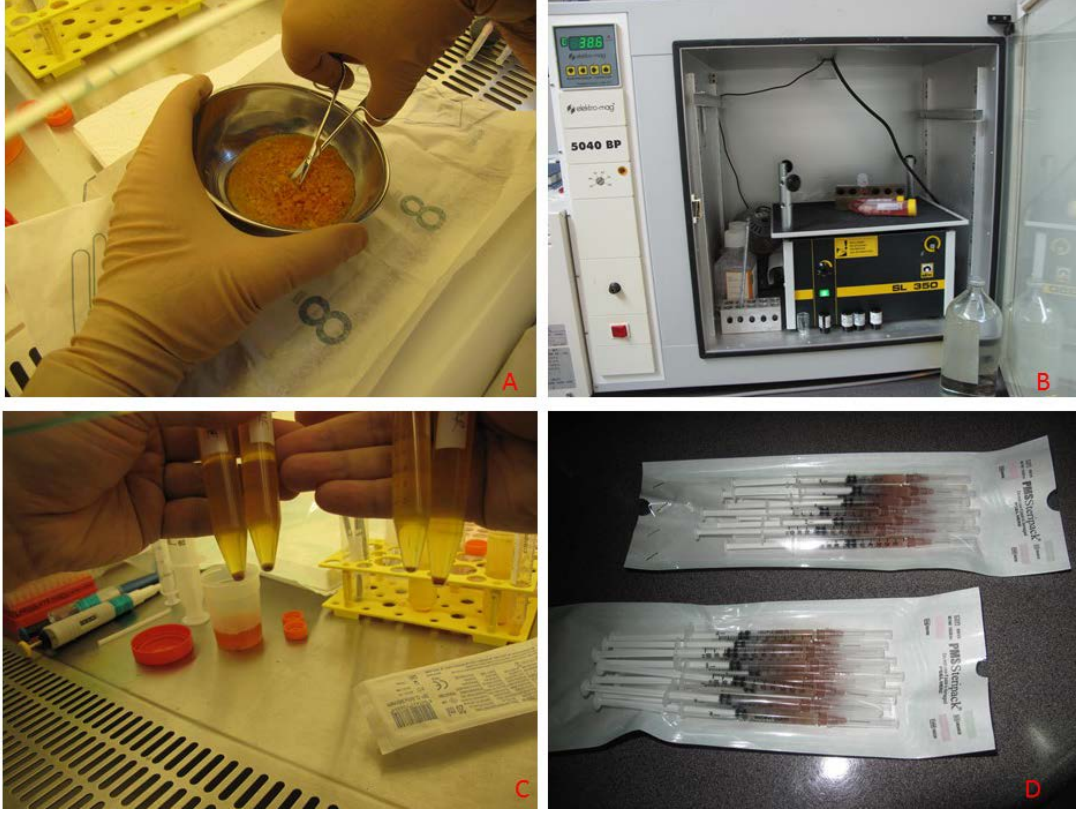


**Şekil 3.1.** Kök hücre eldesi için ayrılan WA ve SD türü sıçanların inguinal yağ yastıkçıklarının alınması ve her bir tür için ayrı ayrı kaplara konulması

Alınan yağ greftleri 30 dakika içerisinde N.E.Ü.T.F Histoloji-Embriyoloji laboratuvarına götürüldü. Her iki ayrı tür için ayrı ayrı olacak şekilde dokuların karışmamasına özen gösterildi. Steril şartlar gözetilerek laminar akım kabini içerisinde yağ dokular petri kabında 20 bistüri yordamıyla yaklaşık 1 mm<sup>3</sup> olacak şekilde küçük parçalara ayrıldı. Yağ parçacıkları amfoterisin B, penisilin ve streptomisin içeren Phosphate Buffer Saline (PBS) solüsyonu ile yıkandı.

Yağ dokusunun sıvının üst fazında askıda kalacak şekilde, alttaki tüm sıvılar uzaklaştırıldı. İşlem eritrositler makroskopik olarak azalana kadar 4 kez tekrar edildi. Yağ dokusu üzerine enzimatik sindirim amacıyla %0,05 Tip II kollajenaz solüsyonu eklendi. Enzimatik sindirimi hızlandırmak için kollajenaz eklenen materyal, sallamalı inkübatöre yerleştirilerek düşük hızda 37<sup>0</sup> C de 1 saat manyetik karıştırıcıda bekletildi. İnkübasyon sonrasında kollajenaz enzimini inaktive etmek için son konsantrasyon %10 olacak şekilde ortama fetal sığır serumu (FBS) eklendi. Materyalin 4600 rpm hızında 10 dakika santrifüjünün ardından üstte kalan sıvı atılarak altta kalan hücre süspansiyonu ayrıldı.

Hücre süspansiyonu önce 40 µm, sonra 100 µm çapa sahip hücre süzgeçlerinden geçirilerek büyük partiküllerin uzaklaştırılması sağlandı. Kalan kısım 4600 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı kısım atıldıktan sonra tüpün dibinde kalan pellet FBS içermeyen DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ortamında dilüe edildi. Böylece mezenkimal kök hücreden zengin SVF süspansiyonu elde edildi. **Şekil. 3.2.** de Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre elde edilmesinin basamakları aşamalı olarak görülmektedir.

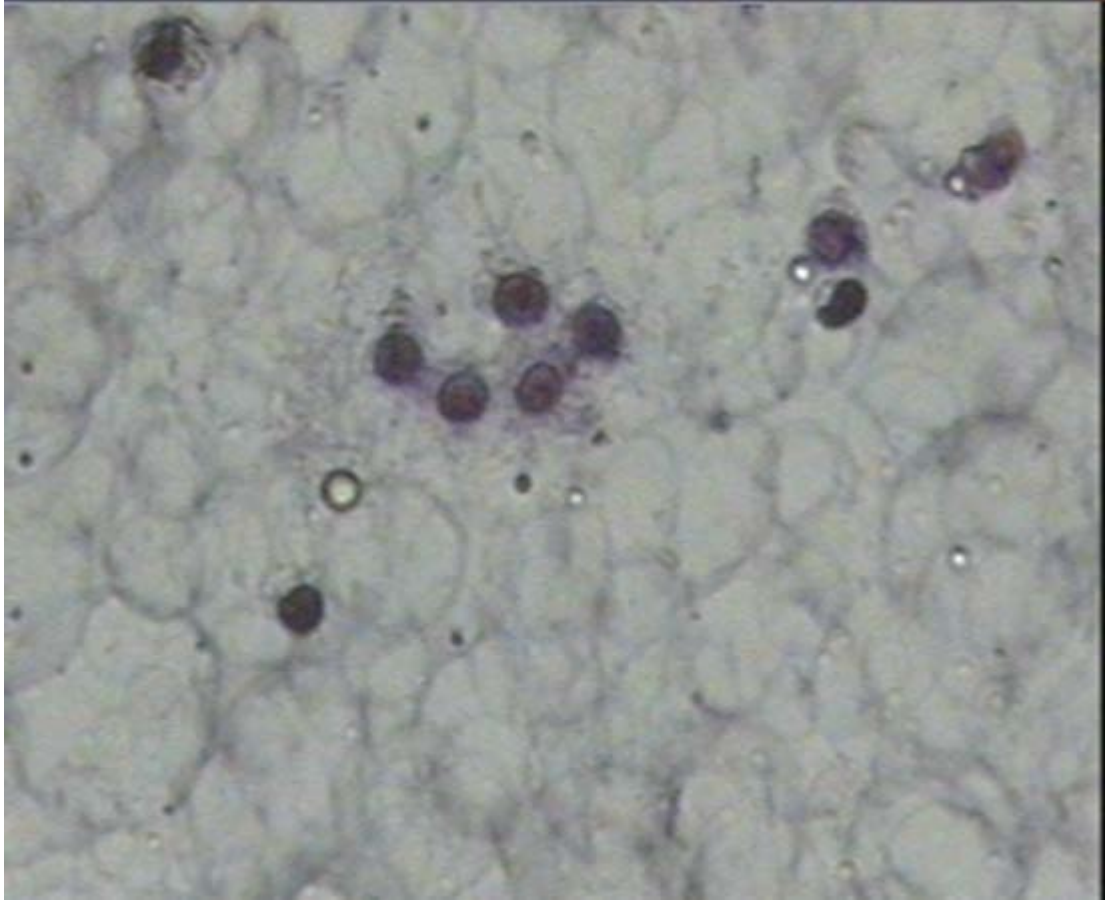


**Şekil 3.2.** Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre elde edilmesi,

- A. Makas ve bistüri yardımı ile yağ dokusunun hacimce küçültülmesi;
- B. Enzimle sallamalı inkübatör üzerinde inkübasyon;
- C. Son santrifüj sonrası pellet olarak elde edilen SVF;
- D. Enjeksiyona hazır iki ayrı grubun enjektöre yüklenmiş SVF hücre süspansiyonu.

Toluidin Blue Testi ile grup viabiliteleri incelendi. Wistar Albino grubu ratlar için viabilite % 81, Sprague-Dawley grubu için viabilite % 86 olarak kaydedildi. Wistar Albino ve Sprague-Dawley türü sıçanlardan elde edilen toplam 24 adet 1 ml'lik viable  $10^5 (\pm 2 \times 10^3)$  hücre olacak şekilde hücre süspansiyonları içeren enjektörler hazırlandı. Wistar Albino ve Sprague-Dawley türü sıçanlardan elde edilen toplam 24 adet 1 ml'lik kök hücre süspansiyonları aynı türden elde edilen trombosit zengin plazma ile karıştırıldı ve ayrı enjektörlerde  $-80^\circ$  'de ( 12 adet Wistar Albino kaynaklı, 12 adet Sprague-Dawley kaynaklı) donduruldu. Karbondioksit karı ( kurubuz) içeren özel taşıma sistemi ile enjektörler NEÜTF Histoloji biriminden SÜDAM'a ivedilikle transfer edildi ve burada  $-80^\circ$  'de saklandı.

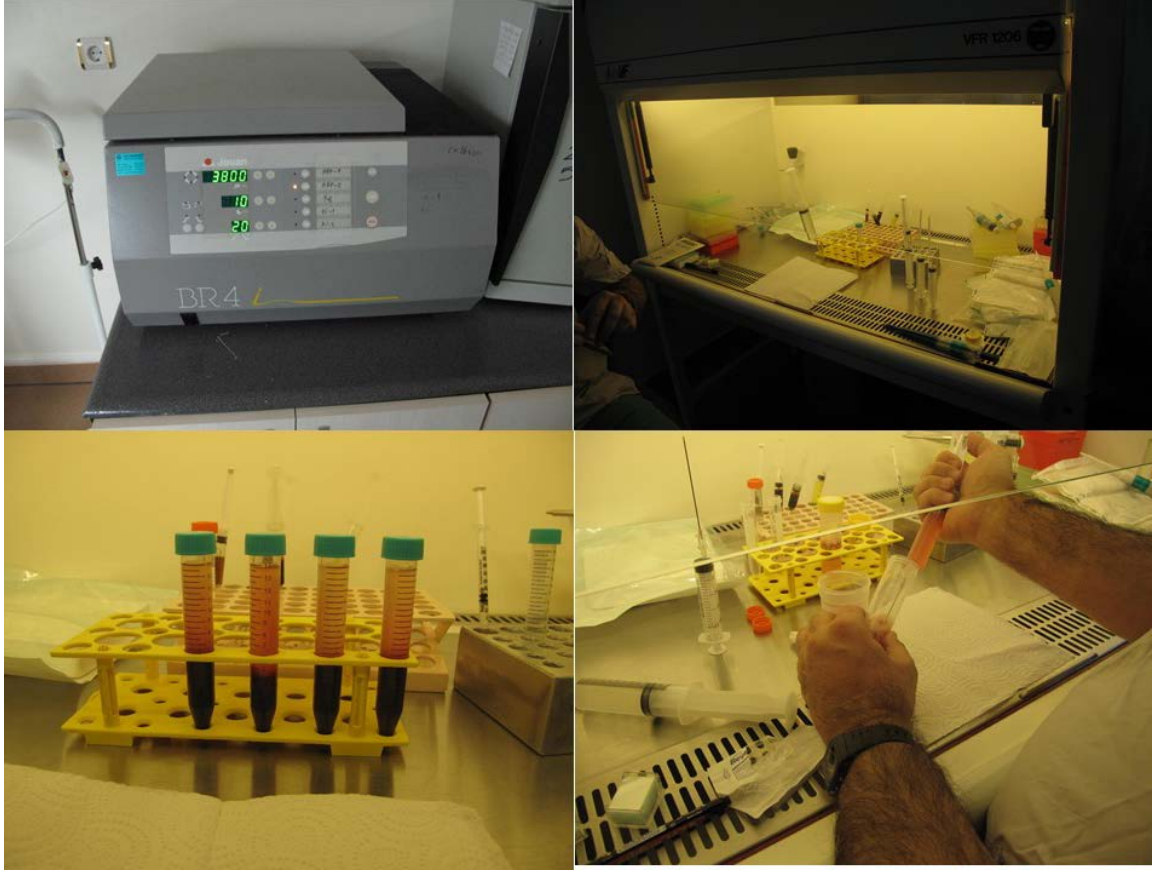




**Şekil 3.3.** Mikrosapta x40 büyütmede SVF hücre süspansiyonu, mononükleer hücreler boyalı olarak gözlenmekte.

### **3.4.Trombositten Zengin Plazma Elde Edilmesi**

Kök hücre eldesi için kullanılan sıçanların her birinden 1 m kan alınarak biyokimyasal parametrelerin tespiti için ayrıldı. Aynı türe ait toplam 15 ml kan 10 ml antikoagulan sitrat dekstroz içeren enjektörlere alındı ve Trombositten Zengin Plazma eldesi için ivedilikle N.E.Ü.T.F Histoloji-Embriyoloji laboratuvarına taşındı. Kan 20°C de 1000 rpm de 20 dakikada santrifüje edilerek plazma, eritrosit ve bir kısım lökositler arındırıldı. En üstteki 4.5 mL'lik plazma bir başka tüpe aktarıldı ve 5 dakika 3800 rpm de santrifüje edilerek üstteki 2,5 mL lik trombositten fakir plazma (TFP) atıldı ve alttaki pellet homojenize edilerek 2 mL lik trombositten zengin plazma elde edildi. Üstteki TFP aspire edilerek TZP ile karışması önlenildi ve TZP bir başka steril tüpe aktarıldı. Elde edilen TZP mezenkimal kök hücrelerin -80° 'de viabilitesini koruyacak şekilde saklanabilmesi için kullanıldı.



**Şekil 3.4.** Trombositten Zengin Plazma elde edilmesi

### 3.5. Operasyon öncesi hazırlık

Grup I ve II içindeki sıçanlar arasında karşılıklı transfer, Grup III ve IV arasında karşılıklı transfer planlandığı için eş zamanlı olarak 1 adet Sprague-Dawley ve 1 adet Wistar Albino sıçan tartıldıktan sonra İP (intraperitoneal) olarak 90 mg/kg ketamine-HCl (Ketalar©- İM) ve 10 mg/kg Ksilazin HCL(Xylazinbio %2 © –İM) karışımı anestezize edildi. Çalışma süresince, gerektiğinde deneklerin hareketsizliğini sağlamak için aynı anestezik doz tekrarlandı. Sıçan çalışma masasına supin pozisyonunda yerleştirildi. Alttan kademeli ısıtma yapan sistem entegre edilerek hipotermi engellenmeye çalışıldı. Sol arka bacak ve karın bölgesi tıraşlandıktan sonra 3 ekstremite tespitli, transfer edilecek ekstremite manüplasyona uygun olacak şekilde serbest olarak bırakıldı.. Kuyruk veninden 1 ml lik insülin enjektörü ile 0,6 ml kan alınarak serum ayrıldı.



**Şekil 3.5.** Cerrahi işlem öncesi sıçanların tartılması, anestezi yapılması, cerrahi alanın traşlanması ve kuyruk veninden kan alınması

### 3.6.Çalışma Grupları için Cerrahi İşlem

Cilt insizyonu için groin hattının 0,6 cm distaline, krize paralel olacak şekilde çizim yapıldı. Cerrahi alan povidon iyot solüsyonu ile temizlendikten sonra 2 cerrah karşılıklı olarak cerrahi işleme başladı.

Çizim yapılan alandan sirküler cilt insizyonu yapıldı. Cilt flepleri kaldırılarak gövdeye doğru yığıldı. İnguinal yağ yastıkçığı groin krizinin yukarisına doğru disseke edildi. Epigastrik arter-ven paketi yağ dokudan edilerek ortaya kondu ve hassas koter ile koterize edildi. Femoral arter-ven-sinir paketi ortaya kondu. Bacağın arka yüzüne dönüldü ve femur üzerinde intermusküler septum görüldü. Septumdan ilerlenerek femura ulaşıldı. Arka yüzde biceps femoris kası distal yapışma yerinden kesilerek proksimale doğru disseke edildi. Siyatik sinirin peroneal, tibial ve sural dalları korunarak addüktör kaslar kesildi. Bacak medialinde grasilis, semitendinosus ve semimembranosus kasları orta bölümden kesildi. Femoral arter-ven-sinir paketi mikroskop yardımıyla alttaki kas dokudan disseke edildi ve araya vasküler tape konularak güvenli bir plan oluşturuldu. Kuadriseps kas grubu pedikül korunacak

şekilde kesildi. Mikroskop altında femoral sinir proksimal ve distalde tam disseke edildi ve kesilerek çıkarıldı. Arter ve ven septum açılarak birbirinden tamamen ayrıldı.



Şekil 3.6. Cerrahi işlemin ana basamakları

Periost elevatörü yardımıyla femura yapışan kaslar ayrıldı. Çepeçevre kas yapılardan temizlenen femurun proksimal segmenti motorlu hassas testere yardımıyla tek korteks ayrılacak şekilde kesildi. Femoral pedikülü korumak için kalan korteks hafif manipülasyon ile kırılarak daha güvenli bir kemik ayrılması sağlandı. Anastomozu kolaylaştırmak ve gerginliği azaltmak için femur kanalına penset sokularak distal segmentten 0,4 cm kemik segmenti motorlu testere ile kesilerek çıkarıldı. İki cerrah aynı anda femoral pedikülün proksimal ve distaline aproksimatör koydu. Pediküller kesilerek bacaklar ayrıldı.



**Şekil 3.7.** Femurun kesilmesi ve kısaltılması

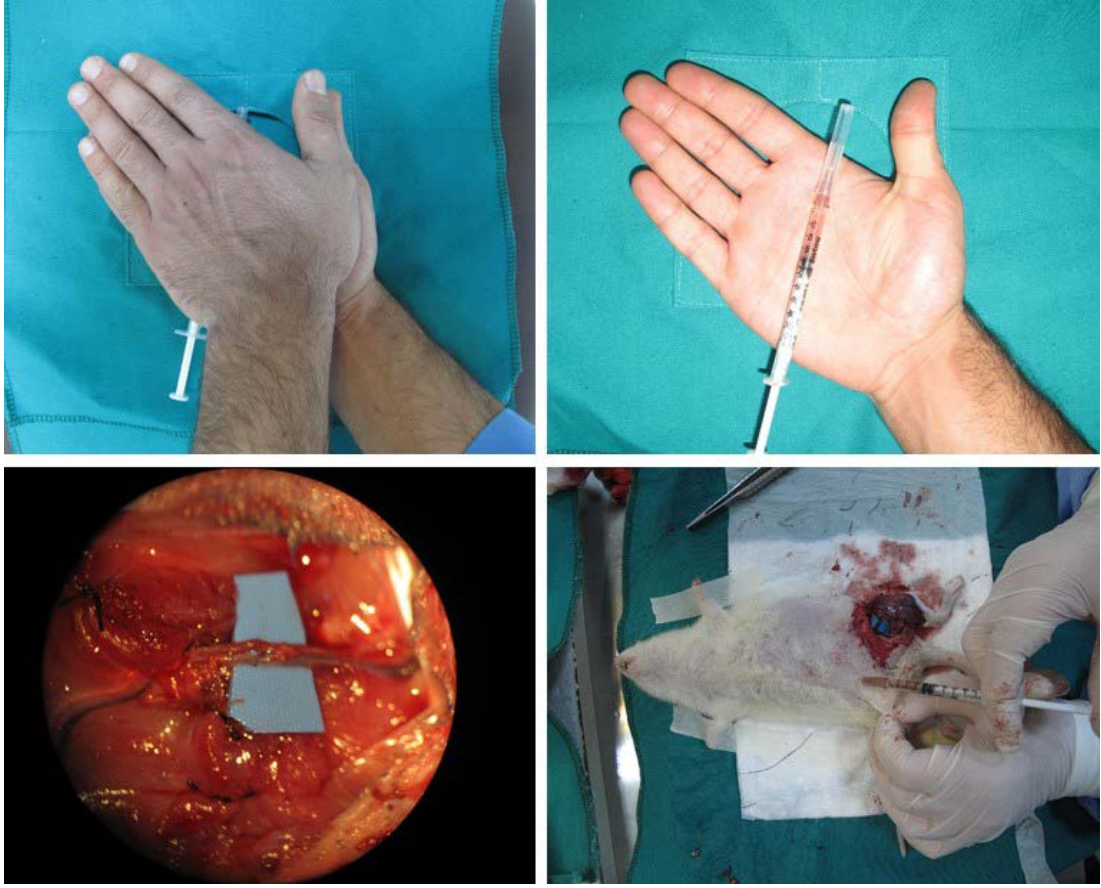
- Femura yapışan kasların temizlenmesi
- Kemiğin kesilmesi
- Kemik kesimi için kullanılan motorlu testere
- Kemiğin kısaltılması

Sprague-Dawley türü sıçana ait sol alt ekstremitte Wistar Albino türü sıçana, Wistar Albino türü sıçana ait sol alt ekstremitte Sprague-Dawley türü sıçana transfer edilmek üzere değiştirildi. Femur lümenine tepmek üzere uygun boyutta kişner teli kesilerek femur kemik tespiti yapıldı. Medial, ventral ve dorsal kaslar tek tek suture edilerek ekstremitte stabilizasyonu sağlandı. Bacak tarafında kalan femoral arter 0,4 mm çaplı branül yardımıyla kateterize edildi. 300 ünite heparin 1 ml serum fizyolojik ile sulandırılarak hassas bir şekilde ekstremitte yıkandı. Femoral venden heparinli mayinin geldiği görülünce yıkama işlemi sonlandırıldı. Femoral arter ve venler proksimal ve distalde aproksimatör yardımıyla yaklaştırıldı. Leica© marka Stereo Mikroskop altında önce femoral ven sonra femoral arter 10,0 Ethilon™ Nylon Sütür( Ethicon © ) ile anastomoz edildi.



**Şekil 3.8.** İki cerrah tarafından eş zamanlı anastomoz yapılması

Anastomoz kontrolü ve distalde kapiller dolum takibi ile ekstremitte dolaşımı teyit edildi. İnguinal yağ yastıkçığı pedikül üzerine yayılarak hem kanama kontrolü hem de anastomoz hattı için koruma sağlanmış oldu. Cerrahi işlem sonrası hayvanlar 24 saat sonra sakrifiye edileceği için siyatik sinir onarımı yapılmadı. Cilt insizyonu 4,0 ipek ile sütürasyon yapıldıktan sonra pansuman yapıldı. Grup I ve Grup II grubundaki sıçanlara anastomoz açılıp distalde kapiller dolum izlendikten sonra intraperitoneal 1 ml serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Mezenkimal Kök Hücre süspansiyonu uygulanacak Grup III ve Grup IV de bulunan sıçanlara uygulanmak üzere kendi türlerinden elde edilen ve  $-80^{\circ}\text{C}$  de saklanan enjeksiyona hazır insülin enjektörleri dış ortama alındı. Buz aküsü üzerinde 20 dakika süre ile bekletilen enjektörler 15 dakika süre ile oda ısısında, enjeksiyondan hemen önce 5 dakika süre ile avuç içinde vücut sıcaklığına yakın değerlere ulaşmak için tutuldu. Anastomoz açılıp distalde kapiller dolum izlendikten sonra 1 cc kök hücre içeren süspansiyon intraperitoneal olarak enjekte edildi.



**Şekil 3.9.** MKH içeren SVF eneksiyonu için enjektörün kademeli olarak ısıtılması ve anastomozun başarılı olduğu teyit edildikten sonra intraperitoneal olarak eneksiyonu

### **3.7.Cerrahi sonrası bakım**

Sıçanlar işlem sonrası tekli kafeslere alınarak özel olarak hazırlanmış kafa koruması takıldı ve hayvanın transplante edilen bacağı yemesi engellendi. Sıçanlar işlem sonrası operasyon odasında yakın takibe alındı. . Özel lamba sistemi ile kafesi ısıtılan sıçanın kafes içinde tam hareketi gözlemlendikten sonra fizyolojik yaşam koşullarının hazırlandığı bakım odasına alındı ve 24 saat süre ile takip edildi. Takip süresince sıçanlara heparin ve antibiyotik tedavisi uygulanmadı.



**Şekil 3.10.** Postoperatif bakım ve takip a. İşlem sonrası sıçanın nakledilen bacağı yemesinin engellenmesi için takılan koruma ve sıçanın numaralandırılması b. Tekli kafeslerde takip

### 3.8.Ötenazi ve karaciğer dokusunun alınması

24 saatlik takip sonrası sıçanlara İP (intraperitoneal) olarak 90 mg/kg ketamine-HCl (Ketalar©- İM) ve 10 mg/kg Ksilazin HCL(Xylazinbio %2 © –İM) karışımı ile anestetize edildi. Pansuman açılarak kapiller dolum takibi yapıldı. Ekstremitte dolaşımı yeterli olan sıçanlar supin pozisyonunda yatırıldı. Dört ekstremitte tespiti yapıldıktan sonra intrakardiyak 2,5 ml kan alındı. Karına median cilt insizyonu yapıldı. Rektus kasları ve periton açılarak karın boşluğuna ulaşıldı. Barsaklar lateralize edilerek karaciğer açığa çıkarıldı. Karaciğerden 1x0,5 cm segment alınarak ivedilikle fetal bovine serum ve Na azide içeren FBS (Stain Buffer- BD Biosciences Cat No: 554656) içine konuldu. İnsizyon uzatılarak toraks açıldı. Akciğerler lateralize edilerek kalp dokusundan yaklaşık 4 cc kan alındı. Servikal dislokasyon marifetiyle ötenazi uygulandı.





**Şekil 3.11.** Yirmidört saat takip sonunda dolaşımı yeterli olan sıçanlardan kan ve karaciğer doku örneği alınması

### **3.9. Türe Ait Bazal Apoptoz Değerlerinin Saptanması**

Mezenkimal kök hücre eldesi için yağ dokuları alınan 5 adet Wistar Albino, 5 adet Sprague-Dawley türü sıçanlara median karın kesisi yapılarak karaciğer doku örnekleri alındı ve Stain Buffer (FBS) solüsyonu içeren kaplara konularak ivedilikle SÜTF Allerji-İmmünoloji laboratuvarına taşındı.

### **3.10. Biyokimyasal Değerlendirme**

Alınan tüm kan örnekleri Sarı kapaklı 13x100'lük 5 mL. BD<sup>®</sup> Vacutainer plastik SST jelli tüplere konuldu. 4000 devir/dakika hız ile 5 dakika santrifüj edildi. Örneklerin plazmaları ayrılarak Eppendorf tüplere konuldu ve -80°C'de dondurularak saklandı. Biriktirilen serum örnekleri toplu analizin yapılacağı günden 1 gün önce

-20<sup>0</sup> C buzdolabına alındı. Analiz günü sistematığe uygun olarak etiketlendi. Mesela grup 1 de Wistar Albino türü sıçanın işlem sonrası 0. saatte alınan kan örneğinden elde edilen serum G1W1-0 şeklinde numaralandırıldı. Analiz gününde elde edilen serumlarda AST ( Aspartat Aminotransferaz) , ALT ( Alanin aminotransferaz) , Kan Üre Azotu ve Kreatinin düzeyleri ölçüldü.



**Şekil 3.12.** Alınan serum numunelerinin numaralandırılması ve analizi

### 3.11. Akım sitometrisi değerlendirmesi

Alınan karaciğer örnekleri Stain Buffer (FBS) solüsyonu içine konulup numaralandırıldı. Örnekler +4 derecede soğuk zincire uygun olarak ivedilikle SÜTF Allerji -immünoloji laboratuvarına taşındı. Laboratuvara ulaşan karaciğer dokusu bistüri ile parçalanarak hepatositler süspansiyon haline getirilip 70 µm'lik filtreden (BD Biosciences Cat No: 340607) geçirildi. Dokuya karışan eritrositler tam kan lizis metodu ile uzaklaştırıldı. Lizis işlemi FACS lysing solution (BD Biosciences Cat No: 349202) ile yapıldı. Apoptoz oranını belirlemek için Annexin V: PE Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences Cat No: 559763) kullanıldı. 2 kere soğuk PBS'de yıkanan hücrelere, 5 µl Annexin V PE ve 5 µl 7-AAD ilave edilerek ve karanlıkta, oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Kontrol grubu olarak boyanmamış hücreler kullanıldı. İnkübasyondan sonra her tüpe 400 µl 1X Binding Buffer ilave edilip, 1 saat içinde 3 lazerli akım sitometri cihazı (BD FACS ARIA III) ile değerlendirildi. Veriler "BD FACS DivaR" (Becton Dickinson, CA, USA) paket programında "dot plots" ve "histogram plots" ile analiz edildi. Canlı hücreler, Annexin V - /7-AAD - ; apoptotik hücreler, Annexin V + /7-AAD - ; nekrotik hücreler, Annexin V + /7-AAD + olarak değerlendirildi.



**Şekil 3.13.** Apoptotik hücre, canlı hücre ve ölü hücre oranlarının belirlenmesi için kullanılan akım sitometri cihazı

### **3.12. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen tüm veriler IBM® SPSS® 17 paket programında değerlendirildi. Tüm veriler histogram analizinde değerlendirilerek verilerin tamamının nonparametrik olduğu gözlemlendi. Grupların kendi içinde operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal parametreler “Wilcoxon Signed Ranks Test” ile analiz edildi. İskemi süresi, 24 saat sonunda alınan kan örneklerinden elde edilen plazamada AST, ALT, Üre, Kreatinin değerleri ve karaciğer örneğinin akım sitometrik incelemesi sonrası elde edilen Ölü hücre (Q1), geç apoptotik hücre (Q2), canlı hücre (Q3) ve erken apoptotik hücre (Q4) oranlarının kendi içinde korelasyonu “Spearman Korelasyon Analizi” ile değerlendirildi. Cerrahi işlemin ve mezenkimal kök hücre enjeksiyonunun etkilerinin değerlendirilmesi için gruplar arası değerler “Mann-Whitney U test” ile analiz edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Gruplara ait perioperatif veriler

Grup I' de 12 Wistar Albino türü sıçan mevcuttu. Bu grubun ortalama ağırlığı 312±91 gr olarak tespit edildi. Bu sıçanlardan 1 tanesi cerrahi işlem esnasında yaşamını yitirmiştir. Cerrahi işlemden 24 saat sonra sıçanlardan 1 tanesinde bacak dolaşımının yeterli olmadığı görülerek çalışma dışı bırakılmıştır. Sonuç olarak 24 saat takip sonunda bu grup sıçanlardan 10 tanesi değerlendirmeye alınmıştır. Bu grupta ortalama cerrahi süresi 122±25 dakika, ortalama iskemi süresi 74±17 dakika olarak kaydedilmiştir. Bu gruba ait perioperatif bulgular Tablo 4.1 'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Grup I sıçanlara ait perioperatif bulgular. ( SK: Sıçan kodu , W: Ağırlık , OS: Operasyon süresi, İS: İskemi süresi)

S.K.	W	OS	İS	SONUÇ
G1W1	434	X	X	İntraoperatif Kayıp
G1W2	408	162	102	Başarılı
G1W3	403	155	95	Başarılı
G1W4	431	140	90	Başarılı
G1W5	329	134	84	Başarılı
G1W6	366	130	80	Başarılı
G1W7	217	126	76	Başarılı
G1W8	220	110	70	Başarılı
G1W9	254	108	68	Başarılı
G1W10	217	100	60	Başarılı
G1W11	228	92	52	Başarılı
G1W12	240	85	45	Dolaşım Yetmezliği

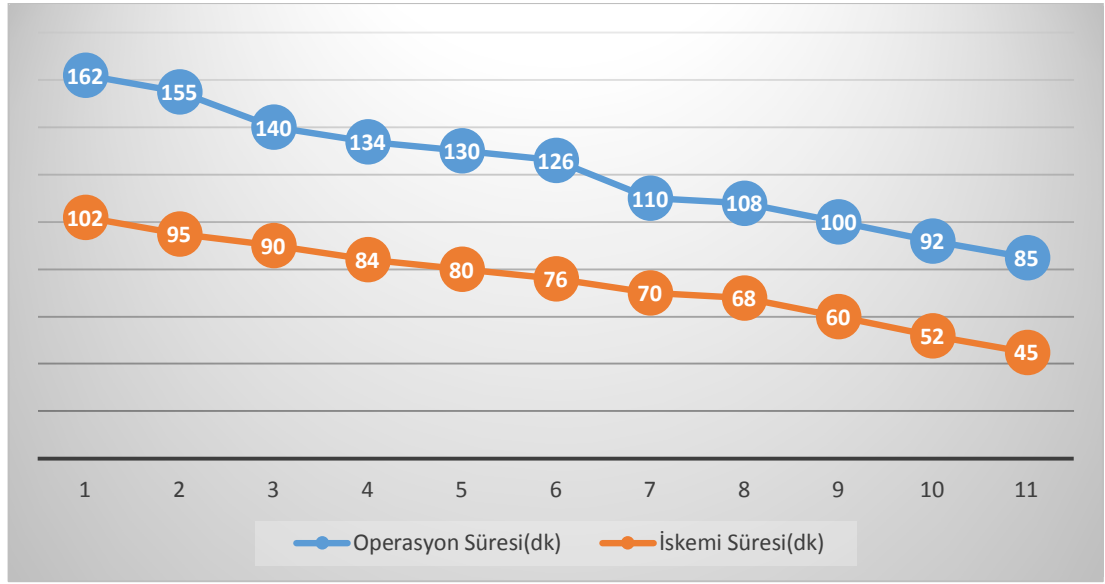
Grup II' de 12 adet Sprague-Dawley türü sıçan mevcuttu. Bu grubun ortalama ağırlığı 364±96 gr olarak tespit edildi. Bu sıçanlardan 1 tanesi operasyon esnasında yaşamını yitirmiştir. Cerrahi işlemden 24 saat sonra sıçanlardan 1 tanesinin kafeste ölmüş olduğu görüldü. Sıçanların 2 tanesinde 24 saat sonunda bacak dolaşımının yeterli olmadığı görülerek çalışma dışı bırakılmıştır. Sonuç olarak bu grup sıçanlardan 8 tanesi değerlendirmeye alınmıştır.

Bu gruptaki sıçanlara Grup I ile eş zamanlı olarak cerrahi yapıldığı için ortalama cerrahi süresi aynı şekilde 122±25 dakika, ortalama iskemi süresi 74±17 dakika olarak kaydedilmiştir. Bu gruba ait perioperatif bulgular Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.** Grup II sıçanlara ait perioperatif bulgular. ( SK: Sıçan kodu , W: Ağırlık , OS: Operasyon süresi, İS: İskemi süresi)

S.K.	W	OS	İS	SONUÇ
G2S1	419	X	X	İntraoperatif Kayıp
G2S2	409	162	102	İşlem sonrası Kayıp
G2S3	476	155	95	Başarılı
G2S4	501	140	90	Başarılı
G2S5	409	134	84	Başarılı
G2S6	403	130	80	Başarılı
G2S7	453	126	76	Başarılı
G2S8	276	110	70	Başarılı
G2S9	236	108	68	Dolaşım Yetmezliği
G2S10	253	100	60	Dolaşım Yetmezliği
G2S11	257	92	52	Başarılı
G2S12	281	85	45	Başarılı

Öğrenme eğrisinin operasyon süresi, dolayısıyla iskemi süresine etkisi karşılıklı transfer yapılan Grup I ve II de dikkati çekmektedir. Bu 2 grupta cerrahi işleme ve anastomoza eş zamanlı olarak başlanıp, eş zamanlı olarak bitirilmiştir. Cerrahi işlemin ilk olarak yapıldığı Wistar Albino ve Sprague Dawley türü sıçanlar operasyon esnasında kanama nedeniyle kaybedilmiştir. Tecrübe arttıkça hem disseksiyon süresi hem de anastomoz süresi kısalmıştır. Öğrenme eğrisinin iskemi süresi ve operasyon süresine etkisi Şekil 4.1 'de ayrıntılı şekilde görülmektedir.



**Şekil 4.1.** Grup I-II arasında yapılan karşılıklı transferde operasyon ve iskemi sürelerinin tecrübe ile değişimi

Grup III' de 12 adet Wistar Albino türü sıçan mevcuttu. Bu grubun ortalama ağırlığı  $254 \pm 27$  gr olarak tespit edildi. Cerrahi işlemden 24 saat sonra sıçanlardan 2 tanesinde bacak dolaşımının yeterli olmadığı görülerek çalışma dışı bırakılmıştır. Sonuç olarak bu grup sıçanlardan 10 tanesi değerlendirmeye alınmıştır. Bu grupta ortalama cerrahi süresi  $85 \pm 4$  dakika, ortalama iskemi süresi  $45 \pm 4$  dakika olarak kaydedilmiştir. Bu gruba ait perioperatif bulgular Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Grup III sıçanlara ait perioperatif bulgular. ( SK: Sıçan kodu , W: Ağırlık , OS: Operasyon süresi, İS: İskemi süresi)

S.K.	W	OS	İS	SONUÇ
G3W1	310	85	45	Başarılı
G3W2	279	80	40	Başarılı
G3W3	228	90	50	Başarılı
G3W4	233	88	48	Başarılı
G3W5	253	85	45	Başarılı
G3W6	284	80	40	Başarılı
G3W7	259	82	42	Başarılı
G3W8	240	88	48	Dolaşım Yetmezliği
G3W9	248	93	53	Dolaşım Yetmezliği
G3W10	208	90	50	Başarılı
G3W11	259	85	45	Başarılı
G3W12	248	80	40	Başarılı

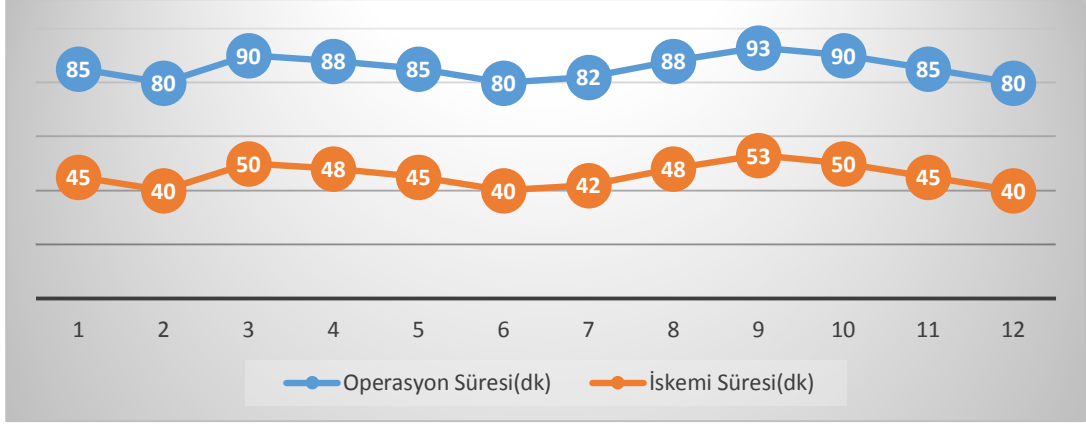
Grup IV' de 12 adet Spraque-Dawley türü sıçan mevcuttu. Bu grubun ortalama ağırlığı  $256\pm 27$  gr olarak tespit edildi. Bu sıçanlardan 1 tanesi ertesi gün kafeste ölü olarak bulunmuştur. Cerrahi işlemden 24 saat sonra sıçanlardan 2 tanesinde bacak dolaşımının yeterli olmadığı görülerek değerlendirme dışı bırakılmıştır. Sıçanlardan 1 tanesi bacağı korumak için konulan metal aksamın tespit sütürlerini açarak tranplante edilen bacağa zarar vermiştir. Sonuç olarak bu grup sıçanlardan 8 tanesi değerlendirmeye alınmıştır. Bu grupta ortalama cerrahi süresi  $85\pm 4$  dakika, ortalama iskemi süresi  $45\pm 4$  dakika olarak kaydedilmiştir. Bu gruba ait perioperatif bulgular Tablo 4.4 'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** Grup IV sıçanlara ait perioperatif bulgular. ( SK: Sıçan kodu , W: Ağırlık , OS: Operasyon süresi, İS: İskemi süresi)

S.K.	W	OS	İS	SONUÇ
G4S1	222	85	45	Başarılı
G4S2	242	80	40	Başarılı
G4S3	287	90	50	İşlem Sonrası Kayıp
G4S4	273	88	48	Başarılı
G4S5	267	85	45	Başarılı
G4S6	259	80	40	Başarılı
G4S7	242	82	42	Başarılı
G4S8	287	88	48	Başarılı
G4S9	192	93	53	Dolaşım Yetmezliği
G4S10	262	90	50	Dolaşım Yetmezliği
G4S11	279	85	45	Başarılı
G4S12	264	80	40	Kannibalizm

Grup III ve Grup IV için cerrahi işlem-öğrenme eğrisinin en ideal zamanında gerçekleştiği için operasyon ve iskemi sürelerinin Grup I ve Grup II'ye nazaran ortalamanın daha düşük olduğu, ancak transfer sayısı arttıkça operasyon ve anastomoz sürelerinde belirgin bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Grup III-IV' ait operasyon sürelerinin öğrenme eğrisi ile değişimi Şekil 4.2' de özetlenmiştir.





**Şekil 4.2.** Grup III-IV arasında yapılan karşılıklı transferde operasyon ve iskemi sürelerinin tecrübe ile değişimi

#### 4.2.Biyokimyasal veriler

Tüm gruplardan toplanan serum örnekleri analizden 24 saat önce -80 °C buzdolabından -20°C bozdolabına alındı. Analiz günü oda ısısında 1 saat süre ile bekletilen serum örnekleri tam çözünme sonrası toplu olarak çalışıldı. Tüm serum örneklerinden elde edilen AST, ALT, Serum Üre Nitrojen (Üre) ve Kreatinin (KRT) düzeyleri ölçüldü.

Grup I ' de cerrahi işlem öncesi AST değeri ortalama  $140 \pm 88$ , ALT değeri  $68 \pm 30$ , Üre değeri  $49 \pm 8$  ve Kreatinin değeri  $0.48 \pm 0.04$  olarak bulunmuştur. Cerrahi işlemden 24 saat sonra alınan kanda AST değeri ortalama  $232 \pm 208$ , ALT değeri  $37.3 \pm 26$ , Üre değeri  $33 \pm 21$  ve Kreatinin değeri  $0.29 \pm 0.10$  olarak kaydedilmiştir. Grup I'e ait operasyon öncesi ve sonrası elde edilen biyokimyasal parametreler Tablo 4.5' de özetlenmiştir.

**Tablo 4.5.** Grup I'e ait operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal değerler. ( X ile işaretli alanlar cerrahi esnasında /cerrahiden sonra ölen veya takip sonrası dolaşım bozukluğu olan sıçanlara ait değerlendirme dışında bırakılan parametrelerdir.)

SK	AST-0	ALT-0	ÜRE-0	KRT-0	AST-24	ALT-24	ÜRE-24	KRT-24
G1W1	60	29	47	0,50	X	X	X	X
G1W2	98	62	51,1	0,52	204	37	48,6	0,37
G1W3	127	57	63,9	0,51	53	9	19,3	0,20
G1W4	66	59	38	0,44	71	10	16	0,20
G1W5	66	49	52,9	0,51	696	82	82,9	0,43
G1W6	115	64	56,1	0,49	158	40	46,2	0,26
G1W7	95	71	43,8	0,53	203	36	21,8	0,29
G1W8	239	139	61,7	0,46	61	14	15,2	0,20
G1W9	169	74	42,7	0,54	198	35	24,7	0,34
G1W10	219	114	49,3	0,46	172	29	20	0,20
G1W11	80	49	41,4	0,50	507	81	38,2	0,46
G1W12	349	51	47,1	0,40	X	X	X	X

Grup II ' de cerrahi işlem öncesi AST değeri ortalama  $139\pm 94$ , ALT değeri  $82\pm 27$ , Üre değeri  $53\pm 12$  ve Kreatinin değeri  $0.49\pm 0.07$  olarak bulunmuştur. Cerrahi işlemden 24 saat sonra alınan kanda AST değeri ortalama  $252\pm 157$ , ALT değeri  $49\pm 19$ , Üre değeri  $44\pm 18$  ve Kreatinin değeri  $0.46\pm 0.08$  olarak kaydedilmiştir. Grup II'e ait operasyon öncesi ve sonrası elde edilen biyokimyasal parametreler Tablo 4.6' da özetlenmiştir.

**Tablo 4.6.** Grup II'e ait operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal değerler. ( X ile işaretli alanlar cerrahi esnasında /cerrahiden sonra ölen veya takip sonrası dolaşım bozukluğu olan sıçanlara ait değerlendirme dışında bırakılan parametrelerdir.)

S.K.	AST-0	ALT-0	ÜRE-0	KRT-0	AST-24	ALT-24	ÜRE-24	KRT-24
G2S1	130	83	49,5	0,69	X	X	X	X
G2S1	117	60	79,9	0,48	X	X	X	X
G2S1	87	86	48,9	0,47	147	38	34,7	0,37
G2S1	94	69	69,3	0,35	132	35	76,5	0,33
G2S1	108	76	42,3	0,5	569	80	45,5	0,42
G2S1	68	65	59,8	0,49	320	77	57,4	0,43
G2S1	222	92	55	0,47	374	46	56,6	0,4
G2S1	83	82	42,2	0,49	188	44	19,7	0,23
G2S1	62	35	36,8	0,51	X	X	X	X
G2S1	368	140	53,8	0,5	X	X	X	X
G2S1	262	123	54,3	0,43	120	28	31,6	0,2
G2S1	75	73	44	0,51	168	47	34,7	0,39

Grup III ' de cerrahi işlem öncesi AST değeri ortalama  $216 \pm 189$ , ALT değeri  $69 \pm 22$ , Üre değeri  $49 \pm 9$  ve Kreatinin değeri  $0.53 \pm 0.05$  olarak bulunmuştur. Cerrahi işlemden 24 saat sonra alınan kanda AST değeri ortalama  $316 \pm 161$ , ALT değeri  $53 \pm 18$ , Üre değeri  $56 \pm 22$  ve Kreatinin değeri  $0.45 \pm 0.08$  olarak kaydedilmiştir. Grup III'e ait operasyon öncesi ve sonrası elde edilen biyokimyasal parametreler Tablo 4.7' de özetlenmiştir.

**Tablo 4.7.** Grup III e ait operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal değerler. ( X ile işaretli alanlar cerrahi esnasında /cerrahiden sonra ölen veya takip sonrası dolaşım bozukluğu olan sıçanlara ait olup değerlendirme dışında bırakılan parametrelerdir.)

S.K.	AST-0	ALT-0	ÜRE-0	KRT-0	AST-24	ALT-24	ÜRE-24	KRT-24
G3W1	77	57	57,1	0,46	350	44	54,4	0,52
G3W2	68	58	40,4	0,53	377	56	56,6	0,43
G3W3	220	64	67,8	0,56	468	73	49,2	0,57
G3W4	88	43	58,2	0,47	113	23	80,5	0,45
G3W5	65	42	38,1	0,49	493	61	30,5	0,49
G3W6	78	68	48,2	0,51	512	80	104,8	0,43
G3W7	701	106	42,7	0,59	166	30	44,7	0,42
G3W8	269	61	57,7	0,44	X	X	X	X
G3W9	150	65	43,2	0,58	X	X	X	X
G3W10	443	90	51,4	0,59	224	44	53,6	0,47
G3W11	225	113	43,2	0,63	391	69	28,9	0,25
G3W12	217	71	42,9	0,52	71	55,6	62	0,5

Grup IV' de cerrahi işlem öncesi AST değeri ortalama  $141 \pm 80$ , ALT değeri  $81 \pm 34$ , Üre değeri  $53 \pm 12$  ve Kreatinin değeri  $0.52 \pm 0.14$  olarak bulunmuştur. Cerrahi işlemden 24 saat sonra alınan kanda AST değeri ortalama  $387 \pm 209$ , ALT değeri  $77 \pm 34$ , Üre değeri  $88 \pm 66$  ve Kreatinin değeri  $0.47 \pm 0.06$  olarak kaydedilmiştir. Grup IV'e ait operasyon öncesi ve sonrası elde edilen biyokimyasal parametreler Tablo 4.8' de özetlenmiştir.

**Tablo 4.8.** Grup IV e ait operasyon öncesi ve sonrası biyokimyasal değerler. ( X ile işaretli alanlar cerrahi esnasında /cerrahiden sonra ölen veya takip sonrası dolaşım bozukluğu olan sıçanlara ait değerlendirme dışında bırakılan parametrelerdir.)

SIÇAN KODU	AST-0	ALT-0	ÜRE-0	KRT-0	AST-24	ALT-24	ÜRE-24	KRT-24
G4S1	62	26	61,4	0,54	537	80	196,2	0,56
G4S2	60	61	47,1	0,41	239	44	47,6	0,45
G4S3	111	85	47,3	0,41	X	X	X	X
G4S4	62	36	37,2	0,52	366	67	63,6	0,44
G4S5	46	67	55,5	0,49	422	69	35,4	0,45
G4S6	103	50	58,6	0,56	84	69	52,4	0,49
G4S7	249	79	42,9	0,45	495	83	42,2	0,41
G4S8	202	113	42,7	0,54	744	156	190,6	0,57
G4S9	248	128	76,4	0,48	X	X	X	X
G4S10	121	96	70,2	0,43	X	X	X	X
G4S11	240	110	60,5	0,95	213	51	77,9	0,39
G4S12	196	124	44,5	0,47	X	X	X	X

MKH eldesi için kullanılan Wistar Albino türü 5 adet sıçandan yağ alma işlemi esnasında alınan kan serum örneklerinin biyokimyasal analizi sonucu AST değeri ortalama  $186 \pm 133$ , ALT değeri ortalama  $66 \pm 13$ , Üre değeri ortalama  $50 \pm 8.6$  ve Kreatinin değeri  $0.46 \pm 0.08$  olarak kaydedilmiştir.

MKH eldesi için kullanılan Sprague-Dawley türü 5 adet sıçandan yağ alma işlemi esnasında alınan kan serum örneklerinin biyokimyasal analizi sonucu AST değeri ortalama  $119 \pm 137$ , ALT değeri ortalama  $60 \pm 37$ , Üre değeri ortalama  $43 \pm 13.7$  ve Kreatinin değeri  $0.44 \pm 0.09$  olarak kaydedilmiştir.

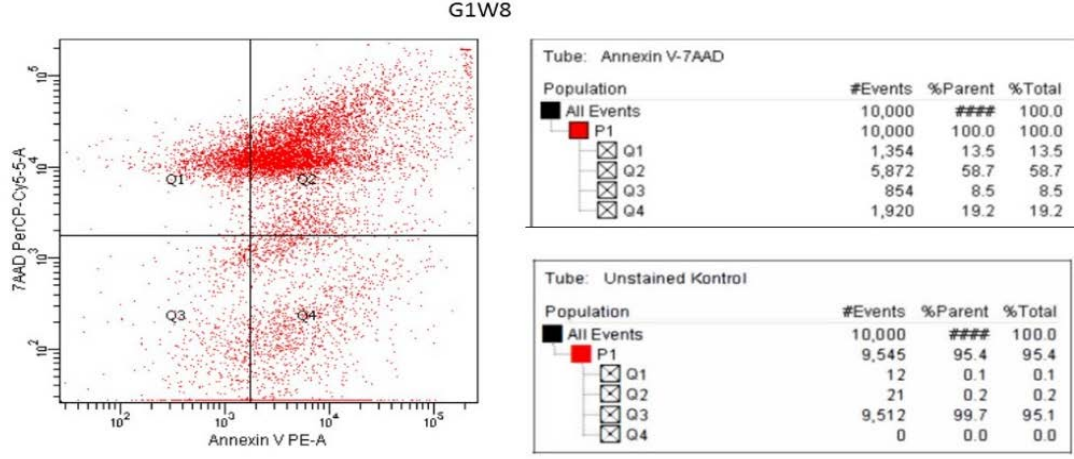
### 4.3.Akım Sitometrisi Analiz Bulguları

Her bir sıçandan alınan karaciğer örneklerinden elde edilen süspansiyonlar süzme, eritrositten arındırma ve boyama işlemlerinin ardından akım sitometrisi cihazında analiz edildi. Tüm örneklerin eş zamanlı boyasız bir örneği akım sitometrisi cihazında analiz edilerek kontrol sağlandı. Akım sitometri cihazında sayılan 10,000 adet hücre histogram analizinde değerlendirildi. Q1 ölü hücreler ( Annexin V + / 7-AAD + ) , Q2 geç apoptoz ( Annexin V - , 7-AAD + ), Q3 canlı hücreler ( Annexin V - / 7- AAD - ) , Q4 erken apoptoz (Annexin V + / 7-AAD -) simgesi olacak şekilde ayrıldı. Sonuçlar her bir simge için % değer olarak belirlendi.

Grup I de ölü hücre (Q1) oranı ortalama % 4,56±4,16, geç apoptotik hücre (Q2) oranı ortalama % 43,95±15,59, canlı hücre (Q3) oranı ortalama % 7,03±2,37 ve erken apoptotik hücre (Q4) oranı ortalama %44,45±18,56 olarak tespit edildi. Bu gruba ait akım sitometrisi bulguları Tablo 4.9 ‘ da gösterilmiştir. Bu gruptan G1W8 kodlu sıçana ait histogram analizi Şekil 4.3’ de verilmiştir.

**Tablo 4.9.** Grup I akım sitometrisi bulguları

S.K.	Q1	Q2	Q3	Q4
G1W1	X	X	X	X
G1W2	0,70	59,60	3,60	36,20
G1W3	1,30	27,60	4,40	66,70
G1W4	2,90	35,00	10,30	51,90
G1W5	0,20	18,20	5,70	75,90
G1W6	8,60	56,50	6,00	28,80
G1W7	6,80	48,10	10,00	35,10
G1W8	13,50	58,70	8,50	19,20
G1W9	2,40	60,10	5,60	31,90
G1W10	5,80	48,00	9,40	36,80
G1W11	3,40	27,70	6,80	62,00
G1W12	X	X	X	X



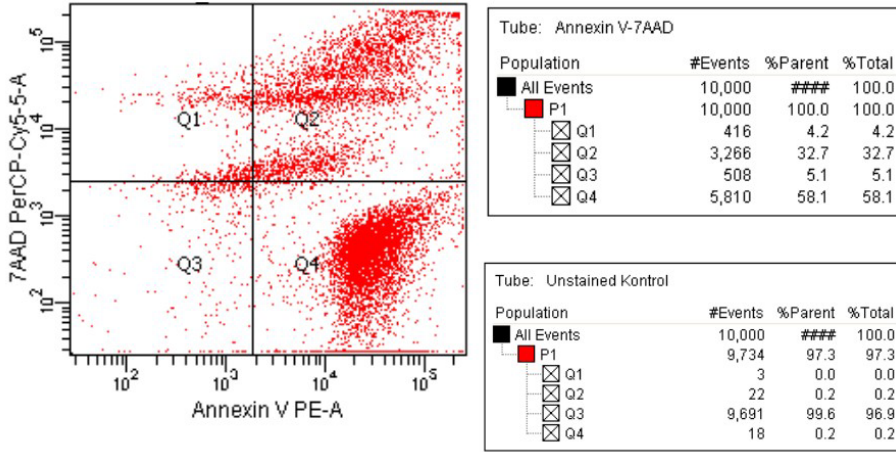
**Şekil 4.3.** G1W8 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.

Grup II de ölü hücre (Q1) oranı ortalama %  $7.58 \pm 5.53$ , geç apoptotik hücre (Q2) oranı ortalama %  $38.77 \pm 14.50$ , canlı hücre (Q3) oranı ortalama %  $11.41 \pm 7.12$  ve erken apoptotik hücre (Q4) oranı ortalama %  $42.18 \pm 16.37$  olarak tespit edildi. Bu gruba ait akım sitometrisi bulguları Tablo 4.10 ' da gösterilmiştir. Bu gruptan G2S4 kodlu sıçana ait histogram analizi Şekil 4.4' de verilmiştir.

**Tablo 4.10.** Grup II akım sitometrisi bulguları

S.K.	Q1	Q2	Q3	Q4
G2S1	X	X	X	X
G2S2	X	X	X	X
G2S3	16,5	52,2	9,2	22
G2S4	4,2	32,7	5,1	58,1
G2S5	11,2	25,3	23,8	39,7
G2S6	0,8	22	10,6	66,5
G2S7	7,5	38	5,3	49,1
G2S8	13,1	30,1	19,2	37,5
G2S9	X	X	X	X
G2S10	X	X	X	X
G2S11	5,1	45,1	4,2	45,6
G2S12	2,3	64,8	13,9	19

G2S4



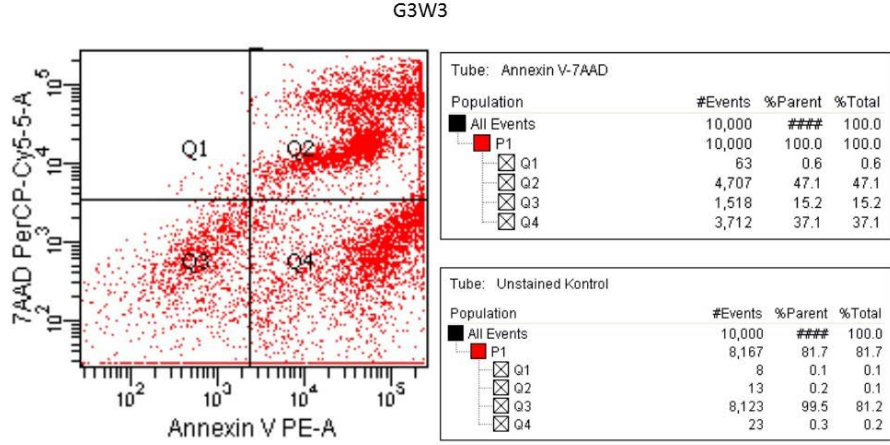
**Şekil 4.4.** G2S4 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.

Grup III de ölü hücre (Q1) oranı ortalama % 1,87±1,23, geç apoptotik hücre (Q2) oranı ortalama % 51,11±18,34, canlı hücre (Q3) oranı ortalama % 12,71±9,00 ve erken apoptotik hücre (Q4) oranı ortalama % 34,30±14,54 olarak tespit edildi. Bu gruba ait akım sitometrisi bulguları Tablo 4.11 ' de gösterilmiştir. Bu gruptan G3W3 kodlu sıçana ait histogram analizi Şekil 4.5' de verilmiştir.

**Tablo 4.11.** Grup III akım sitometrisi bulguları

S. K.	Q1	Q2	Q3	Q4
G3W1	1,6	15,7	36	46,7
G3W2	3,9	49,7	8,3	38
G3W3	0,60	47,10	15,20	37,10
G3W4	2,5	59	14,7	23,8
G3W5	1,1	40,8	5	53,1
G3W6	0,6	67,6	11,6	20,2
G3W7	1,4	35,9	8,8	53,9
G3W8	X	X	X	X
G3W9	X	X	X	X
G3W10	4	72,4	10,2	13,4
G3W11	1,9	47	13,3	37,8
G3W12	1,1	75,9	4	19





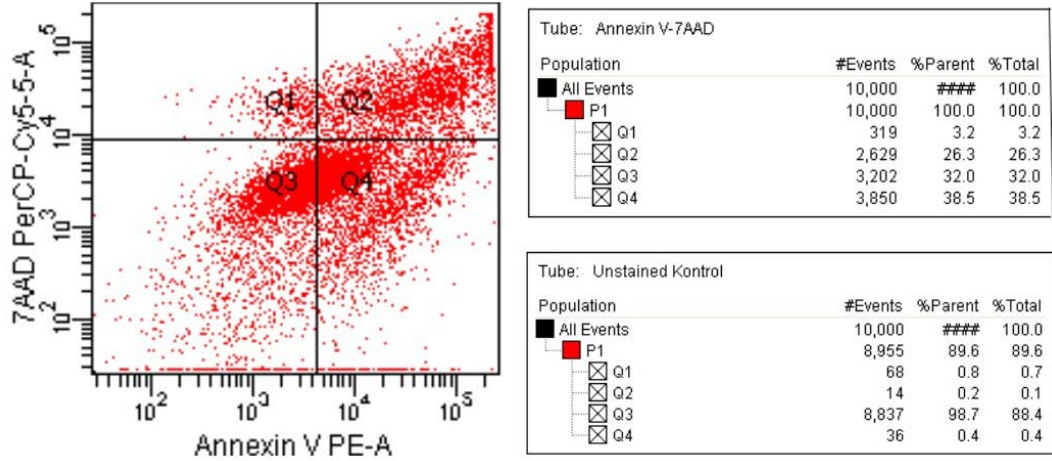
**Şekil 4.5.** G3W3 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.

Grup IV' te ölü hücre (Q1) oranı ortalama %  $2,62 \pm 2,41$ , geç apoptotik hücre (Q2) oranı ortalama %  $46,25 \pm 11,47$ , canlı hücre (Q3) oranı ortalama %  $16,33 \pm 8,66$  ve erken apoptotik hücre (Q4) oranı ortalama %  $34,52 \pm 5,96$  olarak tespit edildi. Bu gruba ait akım sitometrisi bulguları Tablo 4.12 ' de gösterilmiştir. Bu gruptan G4S1 kodlu sıçana ait histogram analizi Şekil 4.6' da verilmiştir.

**Tablo 4.12.** Grup IV akım sitometrisi bulguları

S. Kodu	Q1	Q2	Q3	Q4
G4S1	3,2	26,3	32	38,5
G4S2	0,1	37	20,8	42,1
G4S3	X	X	X	X
G4S4	4,4	56,2	16,2	23,2
G4S5	2,6	52,6	5,2	39,6
G4S6	7,4	36,9	23,2	32,6
G4S7	0,9	52	10,5	36,5
G4S8	0,5	54,2	13,2	32,1
G4S9	X		X	X
G4S10	X		X	X
G4S11	1,9	57	9,6	31,6
G4S12	X		X	X

G4S1

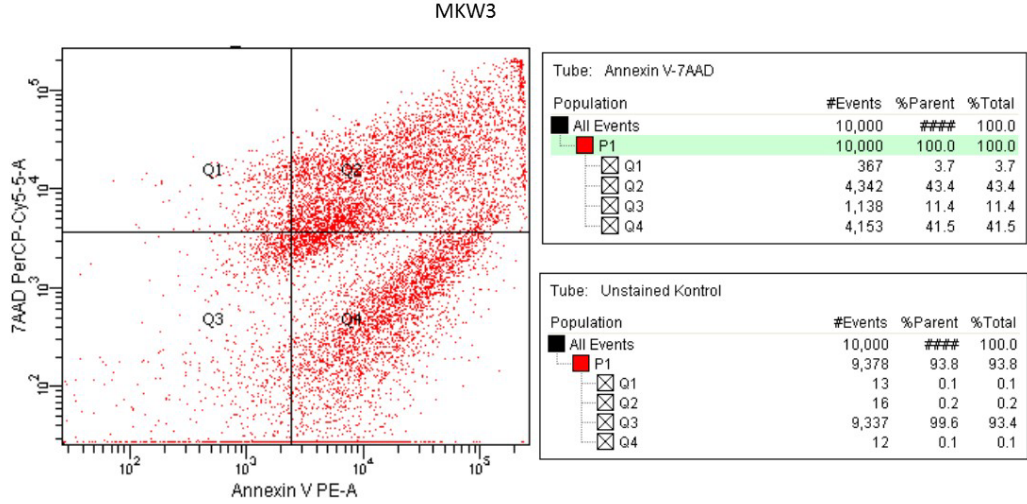


**Şekil 4.6.** G4S1 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.

MKH eldesi için kullanılan Wistar Albino türü 5 adet sıçandan yağ alma işlemi esnasında alınan karaciğer doku örneğinin Annexin V/7-AAD boyalı akım sitometrisi incelemesinde ölü hücre (Q1) oranı ortalama % 4,74±1,99, geç apoptotik hücre (Q2) oranı ortalama % 45,86±11,44, canlı hücre (Q3) oranı ortalama % 9,02±5,37 ve erken apoptotik hücre (Q4) oranı ortalama % 40,4±6,60 olarak tespit edildi. Bu gruba ait akım sitometrisi bulguları Tablo 4.13 ' te gösterilmiştir. Bu gruptan MKW3 kodlu sıçana ait histogram analizi Şekil 4.7' de verilmiştir.

**Tablo 4.13.** Kök hücre eldesi için kullanılan Wistar Albino türü sıçanlara ait akım sitometrisi bulguları

S.K.	Q1	Q2	Q3	Q4
MKW1	5,50	41,60	4,50	48,40
MKW2	7,10	32,10	17,00	43,80
MKW3	3,70	43,40	11,40	41,50
MKW4	5,50	49,00	8,20	37,30
MKW5	1,90	63,20	4,00	31,00



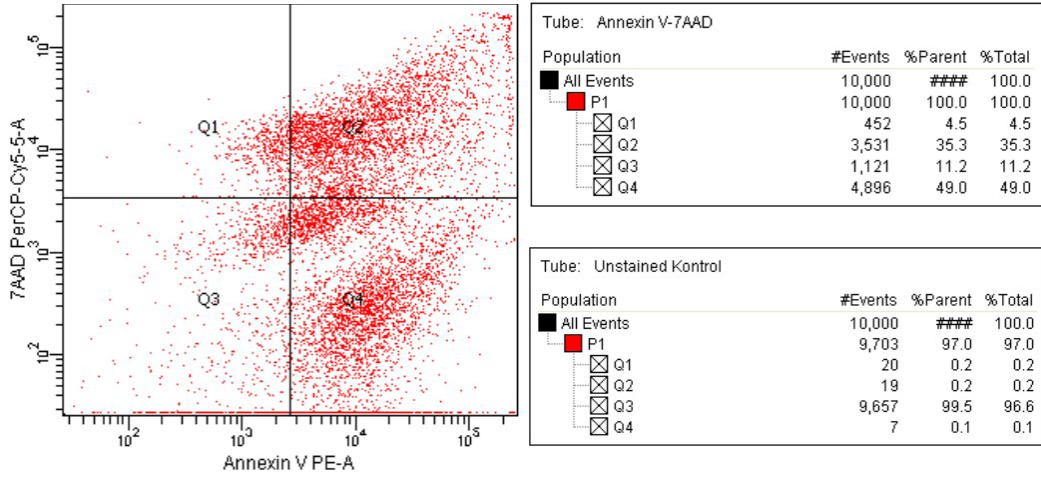
**Şekil 4.7.** MKW3 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.

MKH eldesi için kullanılan Sprague-Dawley türü 5 adet sıçandan yağ alma işlemi esnasında alınan karaciğer doku örneğinin Annexin V/7-AAD boyalı akım sitometrisi incelemesinde ölü hücre (Q1) oranı ortalama %  $4,04 \pm 2,44$ , geç apoptotik hücre (Q2) oranı ortalama %  $43,92 \pm 11,02$ , canlı hücre (Q3) oranı ortalama %  $8,50 \pm 2,79$  ve erken apoptotik hücre (Q4) oranı ortalama %  $43,5 \pm 7,02$  olarak tespit edildi. Bu gruba ait akım sitometrisi bulguları Tablo xx ' te gösterilmiştir. Bu gruptan MKS1 kodlu sıçana ait histogram analizi Şekil XX' de verilmiştir.

**Tablo 4.14.** Kök hücre eldesi için kullanılan Sprague-Dawley türü sıçanlara ait akım sitometrisi bulguları

S. Kodu	Q1	Q2	Q3	Q4
MKS1	4,50	35,30	11,20	49,00
MKS2	3,20	53,70	7,30	35,80
MKS3	6,60	42,00	9,80	41,50
MKS4	5,60	31,80	10,00	52,50
MKS5	0,30	56,80	4,20	38,70

MKS1



**Şekil 4.8.** MKS1 kodlu sıçandan alınan karaciğer örneğinin Annexin V / 7-AAD boyalı incelemesi ve boyasız kontrolü.

#### 4.4. İstatistiksel Analiz

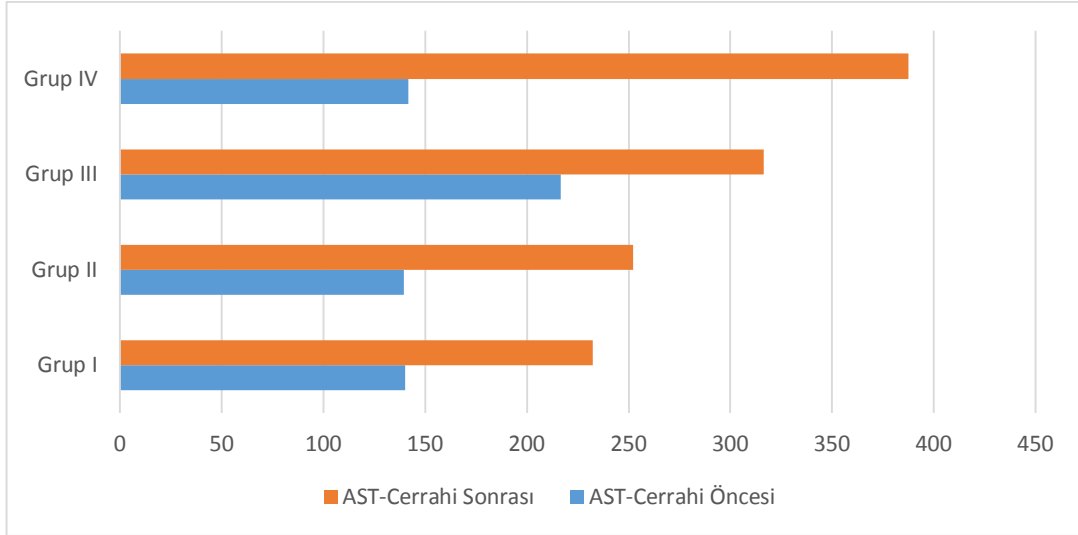
Tüm gruplarda operasyon öncesi ve sonrası elde edilen AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri her bir grup kendi içinde değerlendirilecek şekilde “Wilcoxon Signed Ranks Test” ile analiz edildi.

Grup I de AST değerlerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Aynı grupta ALT, Üre ve Kreatinin değerleri operasyon öncesi döneme göre anlamlı olarak azalmıştır. ( $p < 0,05$ )

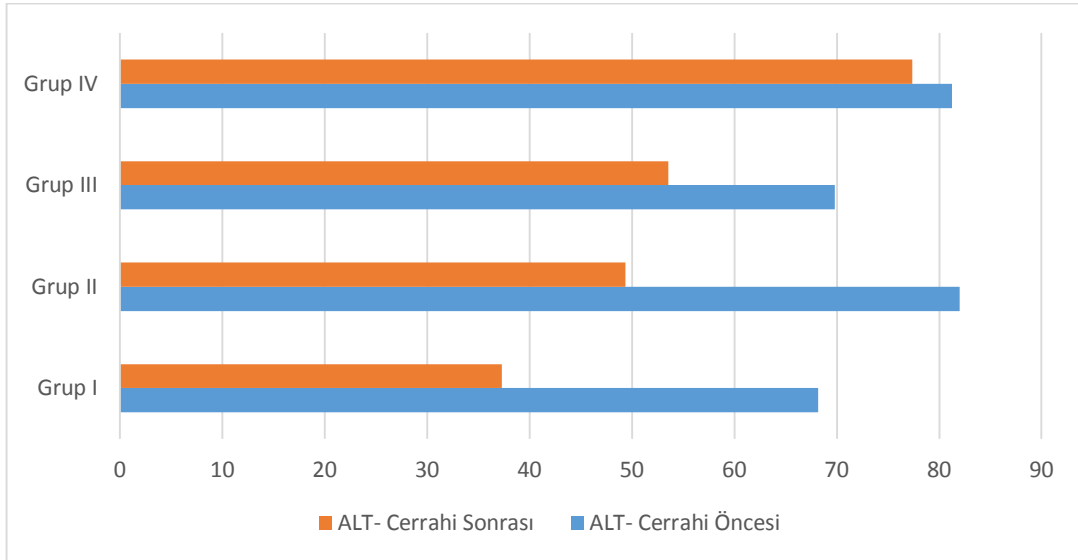
Grup II de AST değerlerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Aynı grupta ALT ve Kreatinin değerleri anlamlı olarak azalmıştır. ( $p < 0,05$ ) Bu grupta Üre değerleri operasyon öncesi döneme göre azalmış olsa da bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Grup III de AST değerlerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Aynı grupta ALT değerleri operasyon öncesi döneme göre anlamlı olarak azalmıştır. ( $p < 0,05$ ) Bu grupta Üre değerleri operasyon öncesi döneme göre artmış ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Kreatinin değerleri bu grupta anlamlı düzeyde azalmıştır. ( $p < 0,05$ )

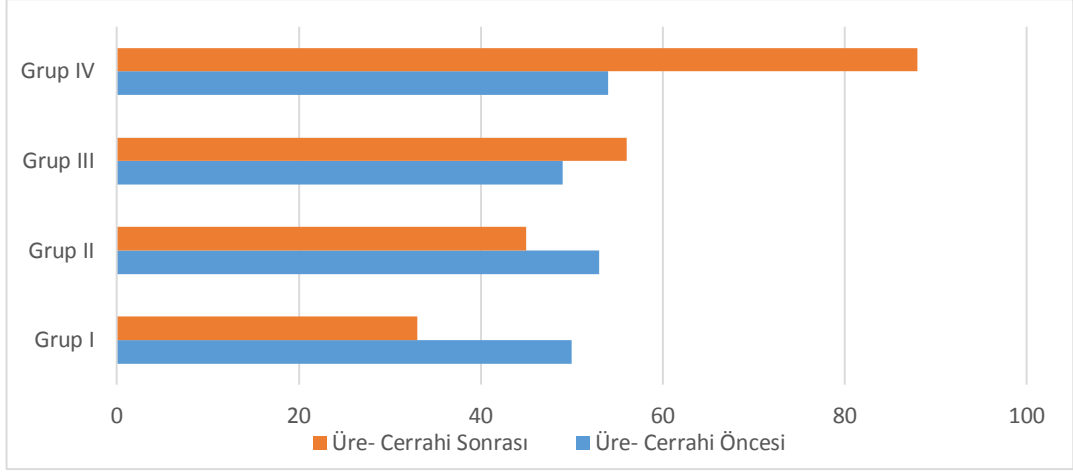
Grup IV de AST değerlerindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. ( $p < 0,05$ ). Aynı grupta ALT ve Kreatinin değerlerinin operasyon öncesi döneme göre azaldığı ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı grlmştir. ( $p > 0,05$ ) Bu grupta üre değerleri operasyon öncesi döneme göre artmış ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.



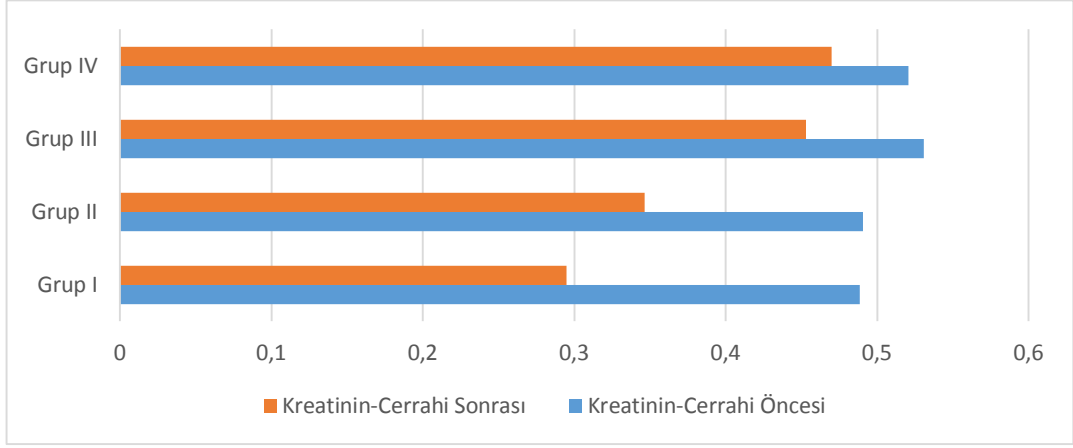
**şekil 4.9.** Tüm gruplarda cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası AST değerlerinin değişimi



**şekil 4.10.** Tüm gruplarda cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası ALT değerlerinin değişimi



**Şekil 4.11.** Tüm gruplarda cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası Üre değerlerinin değişimi



**Şekil 4.12.** Tüm gruplarda cerrahi öncesi ve cerrahi sonrası Kreatinin değerlerinin değişimi

Grup I'de iskemi süresinin AST, ALT, Üre, Kreatinin, Q1, Q2, Q3 ve Q4 değerleri ile korelasyonu değerlendirilmiştir. Bu grupta iskemi süresi ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon izlenmemiştir. Bu grupta AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri arasında pozitif korelasyon olduğu ve bu korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. ( $p < 0,01$ ) Karaciğer dokusu akım sitometrik incelemesinde ölçülen ölü hücre (Q1) oranı ile AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri arasında negatif korelasyon izlenmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Canlı hücre (Q3) oranı ile AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri arasında negatif korelasyon izlenmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

**Tablo 4.15.** Grup I için Spearman Rho Korelasyon Analizi Sonuçları. (İS: İskemi Süresi KRT: Kreatinin Q1: Ölü Hücre, Q2: Geç apoptoz, Q3: Canlı hücre, Q4: Erken apoptoz, KK(r) : Korelasyon katsayısı)

		İS	AST-	ALT	ÜRE	KRT	Q1	Q2	Q3	Q4
İS	KK (r)	1,000	-,188	-,188	,127	-,138	-,515	-,103	-,394	,236
	p	.	,603	,603	,726	,705	,128	,777	,260	,511
	N	11	10	10	10	10	10	10	10	10
AST	KK (r)	-,188	1,000	,867**	,806**	,913**	-,406	-,103	-,164	,309
	p	,603	.	,001	,005	,000	,244	,777	,651	,385
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ALT	KK (r)	-,188	,867**	1,000	,891**	,869**	-,164	-,079	-,212	,115
	p	,603	,001	.	,001	,001	,651	,829	,556	,751
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ÜRE	KK (r)	,127	,806**	,891**	1,000	,832**	-,479	-,030	-,527	,224
	p	,726	,005	,001	.	,003	,162	,934	,117	,533
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
KRT	KK (r)	-,138	,913**	,869**	,832**	1,000	-,425	-,038	-,388	,250
	p	,705	,000	,001	,003	.	,221	,918	,268	,486
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Q1	KK (r)	-,515	-,406	-,164	-,479	-,425	1,000	,321	,612	-,709*
	p	,128	,244	,651	,162	,221	.	,365	,060	,022
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Q2	KK (r)	-,103	-,103	-,079	-,030	-,038	,321	1,000	-,152	-,867**
	p	,777	,777	,829	,934	,918	,365	.	,676	,001
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Q3	KK (r)	-,394	-,164	-,212	-,527	-,388	,612	-,152	1,000	-,139
	p	,260	,651	,556	,117	,268	,060	,676	.	,701
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Q4	KK (r)	,236	,309	,115	,224	,250	-,709*	-,867**	-,139	1,000
	p	,511	,385	,751	,533	,486	,022	,001	,701	.
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Grup II’de iskemi süresinin AST, ALT, Üre, Kreatinin, Q1, Q2, Q3 ve Q4 değerleri ile korelasyonu değerlendirilmiştir. İskemi süresi ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon izlenmemiştir. Bu grupta AST değerinin ALT ve Kreatinin değerleri ile karşılıklı pozitif korelasyonu olduğu ve bu korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. ( sırasıyla  $p<0,01$  ve  $p<0,05$ ) Üre değerleri arasında karşılıklı pozitif korelasyon olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Karaciğer dokusu akım sitometrik incelemesinde ölçülen ölü hücre (Q1) oranı ile AST arasında pozitif ALT, Üre ve Kreatinin değerleri arasında negatif korelasyon izlenmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Canlı hücre (Q3) oranı ile AST ve Kreatinin değerleri arasında pozitif, Üre değerleri arasında negatif korelasyon izlenmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Canlı hücre (Q1) oranı ile üre değerleri arasında pozitif korelasyon saptanmış olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ( $p<0,05$ )

**Tablo 4.16.** Grup II için Spearman Rho Korelasyon Analizi Sonuçları. (İS: İskemi Süresi KRT: Kreatinin Q1: Ölü Hücre, Q2: Geç apoptoz, Q3: Canlı hücre, Q4: Erken apoptoz, KK(r) : Korelasyon katsayısı)

		İS	AST	ALT	ÜRE	KRT	Q1	Q2	Q3	Q4
İS	KK (r)	1,000	,071	-,024	,515	,238	,357	-,286	-,048	,262
	p	.	,867	,955	,192	,570	,385	,493	,911	,531
	N	11	8	8	8	8	8	8	8	8
AST	KK (r)	,071	1,000	,881**	,228	,786*	,095	-,548	,690	,095
	p	,867	.	,004	,588	,021	,823	,160	,058	,823
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
ALT	KK (r)	-,024	,881**	1,000	,252	,881**	-,190	-,452	,786*	-,024
	p	,955	,004	.	,548	,004	,651	,260	,021	,955
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
ÜRE	KK (r)	,515	,228	,252	1,000	,587	-,503	-,371	-,216	,707
	p	,192	,588	,548	.	,126	,204	,365	,608	,050
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
KRT	KK (r)	,238	,786*	,881**	,587	1,000	-,310	-,429	,452	,262
	p	,570	,021	,004	,126	.	,456	,289	,260	,531
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q1	KK (r)	,357	,095	-,190	-,503	-,310	1,000	,119	,214	-,476
	p	,385	,823	,651	,204	,456	.	,779	,610	,233
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q2	KK (r)	-,286	-,548	-,452	-,371	-,429	,119	1,000	-,357	-,643
	p	,493	,160	,260	,365	,289	,779	.	,385	,086
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q3	KK (r)	-,048	,690	,786*	-,216	,452	,214	-,357	1,000	-,429
	p	,911	,058	,021	,608	,260	,610	,385	.	,289
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q4	KK (r)	,262	,095	-,024	,707	,262	-,476	-,643	-,429	1,000
	p	,531	,823	,955	,050	,531	,233	,086	,289	.
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Grup III’de iskemi süresinin AST, ALT, Üre, Kreatinin, Q1, Q2, Q3 ve Q4 değerleri ile korelasyonu değerlendirilmiştir. İskemi süresi ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon izlenmemiştir. Bu grupta AST değerinin ALT değeri ile karşılıklı pozitif korelasyonu olduğu ve bu korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. ( $p < 0,01$ ) Üre ve Kreatinin değerleri arasında karşılıklı negatif korelasyon olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Karaciğer dokusu akım sitometrik incelemesinde ölçülen ölü hücre (Q1) oranı ile AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri arasında negatif korelasyon izlenmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Canlı hücre (Q3) oranı ile AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri arasında pozitif korelasyon izlenmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.



**Tablo 4.17.** Grup III için Spearman Rho Korelasyon Analizi Sonuçları. (İS: İskemi Süresi KRT: Kreatinin Q1: Ölü Hücre, Q2: Geç apoptoz, Q3: Canlı hücre, Q4: Erken apoptoz, KK(r) : Korelasyon katsayısı)

		İS	AST	ALT	ÜRE	KRT	Q1	Q2	Q3	Q4
İS	KK (r)	1,000	-,006	-,184	-,362	,369	,223	-,118	,555	-,143
	p	.	,986	,610	,305	,294	,536	,745	,096	,693
	N	12	10	10	10	10	10	10	10	10
AST	KK (r)	-,006	1,000	,839**	-,224	-,043	-,445	-,248	,164	,200
	p	,986	.	,002	,533	,907	,197	,489	,651	,580
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ALT	KK (r)	-,184	,839**	1,000	-,109	,024	-,587	,091	,000	-,109
	p	,610	,002	.	,763	,947	,074	,802	1,000	,763
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ÜRE	KK (r)	-,362	-,224	-,109	1,000	,134	-,043	,600	,030	-,539
	p	,305	,533	,763	.	,713	,907	,067	,934	,108
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
KRT	KK (r)	,369	-,043	,024	,134	1,000	-,333	,043	,195	-,176
	p	,294	,907	,947	,713	.	,347	,907	,590	,626
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Q1	KK (r)	,223	-,445	-,587	-,043	-,333	1,000	,079	,006	-,085
	p	,536	,197	,074	,907	,347	.	,828	,987	,815
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Q2	KK (r)	-,118	-,248	,091	,600	,043	,079	1,000	-,345	-,915**
	p	,745	,489	,802	,067	,907	,828	.	,328	,000
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Q3	KK (r)	,555	,164	,000	,030	,195	,006	-,345	1,000	,006
	p	,096	,651	1,000	,934	,590	,987	,328	.	,987
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Q4	KK (r)	-,143	,200	-,109	-,539	-,176	-,085	-,915**	,006	1,000
	p	,693	,580	,763	,108	,626	,815	,000	,987	.
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Grup IV’de iskemi süresinin AST, ALT, Üre, Kreatinin, Q1, Q2, Q3 ve Q4 değerleri ile korelasyonu değerlendirilmiştir. İskemi süresi ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon izlenmemiştir. Bu grupta AST değerinin ALT değeri ile karşılıklı pozitif korelasyonu olduğu ve bu korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. ( $p < 0,05$ ) Üre ve Kreatinin değerleri arasında karşılıklı pozitif korelasyon olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Karaciğer dokusu akım sitometrik incelemesinde ölçülen ölü hücre (Q1) oranı ile AST ve ALT arasında negatif, Üre ve Kreatinin değerleri arasında pozitif korelasyon izlenmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Canlı hücre (Q3) oranı ile AST arasında negatif, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri arasında pozitif, korelasyon izlenmiş olup bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

**Tablo 4.18.** Grup IV için Spearman Rho Korelasyon Analizi Sonuçları. (İS: İskemi Süresi KRT: Kreatinin Q1: Ölü Hücre, Q2: Geç apoptoz, Q3: Canlı hücre, Q4: Erken apoptoz, KK(r) : Korelasyon katsayısı)

		İS	AST	ALT	ÜRE	KRT	Q1	Q2	Q3	Q4
İS	KK (r)	1,000	,544	,304	,482	,118	,074	,618	-,272	-,593
	p	.	,164	,463	,227	,781	,862	,103	,515	,121
	N	12	8	8	8	8	8	8	8	8
AST	KK (r)	,544	1,000	,766	,286	,455	-,333	-,071	-,048	,119
	p	,164	.	,027	,493	,257	,420	,867	,911	,779
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
ALT	KK (r)	,304	,766	1,000	,204	,500	-,012	-,204	,000	-,060
	p	,463	,027	.	,629	,207	,978	,629	1,000	,888
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
ÜRE	KK (r)	,482	,286	,204	1,000	,407	,119	,024	,476	-,452
	p	,227	,493	,629	.	,317	,779	,955	,233	,260
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
KRT	KK (r)	,118	,455	,500	,407	1,000	,048	-,527	,539	,252
	p	,781	,257	,207	,317	.	,910	,180	,168	,548
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q1	KK (r)	,074	-,333	-,012	,119	,048	1,000	-,167	,310	-,357
	p	,862	,420	,978	,779	,910	.	,693	,456	,385
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q2	KK (r)	,618	-,071	-,204	,024	-,527	-,167	1,000	-,714	-,667
	p	,103	,867	,629	,955	,180	,693	.	,047	,071
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q3	KK (r)	-,272	-,048	,000	,476	,539	,310	-,714	1,000	,119
	p	,515	,911	1,000	,233	,168	,456	,047	.	,779
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Q4	KK (r)	-,593	,119	-,060	-,452	,252	-,357	-,667	,119	1,000
	p	,121	,779	,888	,260	,548	,385	,071	,779	.
	N	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Cerrahi işlem esnasında intraperitoneal MKH içeren SVF enjeksiyonu yapılan Grup III 'deki Wistar Albino türü sıçanlar ile kök hücre enjeksiyonu yapılmayan Grup I Wistar Albino türü sıçanlardan cerrahi işlemden 24 saat sonra elde edilen AST, ALT, Üre, Kreatinin, Q1, Q2, Q3, Q4 değerleri açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında AST değerleri açısından anlamlı fark gözlenmezken, MKH enjeksiyonu yapılan grupta ALT, Üre ve Kreatinin değerlerinde anlamlı oranda artış olmuştur. ( p değerleri sırasıyla  $p<0,01$ ,  $p<0,05$ ,  $p<0,05$ ). Ancak bu iki grup arasında Q1, Q2 ,Q3 ve Q4 oranları açısından anlamlı fark gözlenmemiştir.

Mezenkimal kök hücre eldesi için kullanılan 5 adet Wistar Albino türü sıçan grubundan (MKW) yağ alma işlemi esnasında alınan karaciğer doku örneklerinin akım sitometrik analiz sonuçları değerlendirildiğinde bacak transferi yapıp MKH enjeksiyonu yapılmayan Grup I ile kıyaslandığında Q1, Q2, Q3 ve Q4 oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Ancak bu grup MKH enjeksiyonu yapılan Grup III ile kıyaslandığında ölü hücre (Q1) oranının, kök hücre enjeksiyonu yapılan grupta anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. (  $p<0,05$ )

Cerrahi işlem esnasında intraperitoneal MKH içeren SVF enjeksiyonu yapılan Grup IV 'deki Sprague-Dawley türü sıçanlar ile kök hücre enjeksiyonu yapılmayan Grup II Sprague-Dawley türü sıçanlardan cerrahi işlemden 24 saat sonra elde edilen AST, ALT, Üre, Kreatinin, Q1, Q2, Q3, Q4 değerleri açısından karşılaştırıldığında AST, Üre, geç apoptotik hücre (Q2), canlı hücre (Q3) ve erken apoptotik hücre (Q4) oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Ancak ölü hücre (Q1) oranı kök hücre verilen Grup III' de anlamlı olarak azalmıştır. ( $p<0,01$ ) . ALT ve Kreatinin değerleri kök hücre enjeksiyonu yapılan grupta anlamlı oranda artmıştır. ( $p<0,05$ )

Mezenkimal kök hücre eldesi için kullanılan 5 adet Sprague-Dawley türü sıçan grubundan (MKS) yağ alma işlemi esnasında alınan karaciğer doku örneklerinin akım sitometrik analiz sonuçları değerlendirildiğinde bacak transferi yapıp MKH enjeksiyonu yapılmayan Grup II ile kıyaslandığında Q1, Q2, Q3 ve Q4 oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Benzer şekilde MKH enjeksiyonu yapılan Grup IV ile kıyaslandığında Q1, Q2, Q3 ve Q4 oranları açısından anlamlı fark gözlenmemiştir.

## 5. TARTIŞMA

Vaskülerize kompozit doku nakilleri; aynı anda bir çok farklı doku çeşidinin (cilt, kas, kemik, sinir, tendon, bağ doku vs.) aktarılması ile gerçekleşen, fonksiyonel ve estetik bir rekonstrüksiyon seçeneğidir. Aynı anda birden fazla doku çeşidinin transferi rekonstrüktif olarak avantajlı olsa da bu işlemin önündeki en büyük engel her bir doku için farklı şekilde meydana gelen immün reaksiyondur. Bu immün reaksiyonu engellemek için hastaya erken dönemden itibaren immünsüpressif tedaviler başlanır. Bu sayede hem hasta hem de greft sağ kalımı sağlanmış olur. İmmünsüpressif tedavilerde meydana gelen gelişmelere rağmen özellikle kronik rejeksiyon ve ömür boyu ilaç kullanım ihtiyacı, bu işlemlerin hayat kurtarıcı özelliği olan solid organ transferlerine nazaran daha az uygulanmasına neden olmuştur. Diğer taraftan uygulanan immün süpressif tedavilerin başta karaciğer ve böbrek olmak üzere bir çok organ üzerinde olan olumsuz etkileri bu işlemlerin gündelik pratikte az uygulanan rekonstrüktif prosedürler kategorisine girmesine neden olmuştur. (Kuo, Chen, Shih, ve ark., 2011)

Rekonstrüktif açıdan avantajları tartışılmaz olan VKDN'nin olumsuz etkilerinin giderilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda temel amaç öncelikle hasta sağ kalımı arttırmaktır. Bunun yanında akut ve kronik rejeksiyonların önlenmesi, greft sağ kalımının da artırılması ve sonuçta bu işlemlerin uygulanabilirliğinin artırılmasıdır. Bu çalışmaların temel dayanak noktası, greft sağ kalımının artırılması amacıyla hastaya verilecek olan immünsüpressif ilaçların dozlarının azaltılması veya bu ilaçların tamamen kesilmesi fikridir. Son yıllarda kök hücreler ile yapılan olumlu çalışmalar, kök hücre tedavilerinin kompozit doku dahil organ ve doku nakillerinde olumlu etkiler oluşturabileceği yönünde kanaat oluşturmuştur.

Jeong ve ark. tarafından yapılan deneysel bir çalışmada Sprague-Dawley ve Wistar Albino grubu ratlar arasında çapraz bacak transferi yapılmış. Çalışma grubuna erken dönemde ve işlem sonrası 1,2 ve 3. günlerde adipoz doku kaynaklı mezenkimal

kök hücre enjeksiyonu yapılmıştır. Kök hücre verilmeyen grupta ortalama rejeksiyon süresi 6,8 gün iken kök hücre verilen grupta bu süre ortalama 12,8 gün olarak kaydedilmiştir. Yine aynı çalışmada mevcut immünsüpressif etkinin T hücre proliferasyonunun baskılanmasına bağlı olarak geliştiği gösterilmiştir. (Jeong ve ark., 2014)

Barth ve ark. tarafından primatlar üzerinde yapılan kompozit yüz nakli modelinde, kemik iliği ile kombine olarak verilen takrolimus+ mikofenolat mofetil tedavisi verilen grup tek başına takrolimus+ mikofenolat mofetil verilen gruba nazaran kompozit doku yaşayabilirliğinin özellikle erken dönemde belirgin bir şekilde fazla olduğu gözlenmiştir. (Barth ve ark., 2011)

Mezenkimal kök hücrelerin immünmodülatör etkileri yanında normal yara iyileşmesi üzerine olumlu etkiler yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Yaralanma sonrası damar çevresinde yer alan kök hücrelerin ve dolaşımdaki Kİ kaynaklı kök hücrelerin, yaralanma bölgesine yönlenerak fibroblast ve myofibroblast yönünde diferansiye oldukları ve yara iyileşmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir.(Mori ve ark., 2005; Crisan ve ark., 2008; Verstappen ve ark., 2011)

Kök hücreler, embriyonik ve non-embriyonik kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Embriyonik kök hücrelerin 1980'li yıllarda bulunmasına rağmen etik ve yasal kısıtlamalar nedeniyle rejeneratif tıpta kullanıma girememiştir.(Bajada ve ark., 2008)

Bu hücrelerin her tür dokuyu oluşturabilecek hücrelere yönelme kapasitesi vardır. Embriyonik kök hücre çalışmaları ulusal yönetimler seviyesinde izin alınması sonucu yapılabilmektedir. Tıbbi açıdan bu hücrelerden tümör gelişme riski yüksektir. (Herberts ve ark., 2011)

Embriyonik kök hücrelerin yan etkileri tam olarak ortaya koyulmaması araştırmacılar da non-embryonik kök hücrelerin kullanımının daha güvenli ve etkin olacağı düşüncesini uyandırmıştır.(Aznar ve Sanchez, 2011)

Yetişkin kök hücreler, non-embryonik kök hücre grubunda yer alır. Bu hücreler morfolojilerine, yüzeyel işaretleyicilerine diferansiyasyon potansiyellerine göre mezenkimal kök hücre, hematopoetik kök hücre ve endotelial progenitör hücre gibi alt gruplara ayrılırlar. MKH'lerin temel görevi buldukları ortamda oluşacak hasarlardan sonra dokuyu tamir etmek ve doku bütünlüğünün devamını sağlamaktır. Bu hücrelerin farklı hücrelere diferansiye olabilme ve sonsuz bölünebilme özellikleri vücudumuzda bulunan somatik hücrelerden temel farklarıdır. MKH'ler, birçok dokuda bulunurlar ve uygun sinyal oluşuncaya kadar farklılaşma göstermezler.(Bianco ve ark., 2008; Si ve ark., 2011)

Özellikle acil durumlarda hem rejenerasyon hem de akut durumun düzeltilmesinde önemli rol oynarlar. Yapılan deneysel bir çalışmada hepatoduodenal ligamana 15 dakika boyunca klempe uygulanarak iskemi oluşturulmuş. Akabinde klempe açılarak karaciğerin %70'lik kısmı çıkarıldıktan sonra  $2 \times 10^6$  adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre penil venden enjekte edilmiştir. Kontrol grubuna fosfat buffered saline enjekte edilip 1.günde yapılan incelemede karaciğerde mitoz indeksi , anti-proliferating hücre çekirdek antijen düzeyleri ve rejenerasyon ile ilgili protein seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiş. Karaciğer rejenerasyon ile ilişkili gen düzeyleri işlem den 2 gün sonra ölçülmüş ve aynı şekilde anlamlı düzeyde farklı olduğu gözlenmiş.(Seki ve ark., 2012)

Sağ böbreği çıkarılıp sol böbreğine yaklaşık 45 dakika iskemi oluşturularak transfer edilen deneysel bir çalışmada, çalışma grubuna renal arterden her gruba farklı hücre sayılarında olacak şekilde (  $5 \times 10^4$  ,  $1 \times 10^5$  ,  $5 \times 10^5$ ) adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre , çalışma grubuna fostaf buffered saline enjekte edilmiş. İşlem den 2 gün sonra sıçanlar sakrifiye edilerek kan ve doku örnekleri alınmış. Kan

üre azotu ve kreatinin düzeyleri, tübüler hasar skoru ve apoptozis indeksi  $5 \times 10^5$  hücre verilen grupta belirgin olarak azalmış olduğu gözlenmiştir. (Shih ve ark., 2013)

Kuo ve ark. 2008 yılında yaptıkları deneysel bir çalışmada Brown-Norway ve Lewis grubu sıçanlar arasında karşılıklı arka bacak allotransplantasyonu yapılmış ve sıçanlarda greft yaşayabilirliğinin Dentritik hücre ile kombine siklosporin ve antilenfosit serum uygulanan grupta belirgin olarak artmış olduğu gözlenmiştir.(Kuo ve ark., 2009)

Kuo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Brown Norway (BN) türü sıçanlardan Lewis türü sıçanlara bacak transferi planlanmış. Donör BN sıçanlardan inguinal yağ doku alınarak CD3+ T hücreler ile birlikte kültüre edilmiş. Transfer sonrası Grup I'e hiçbir tedavi uygulanmamış. Grup II için Siklosporin A ( 0-20 gün) , Grup III için Antilenfosit Serum (-4 ve 1. gün) ve Siklosporin A ( 0-20 gün) , Grup IV için Antilenfosit serum ( -4 ve 1. Gün) + Siklosporin A ( 0-20 . gün) + YDKH (  $2 \times 10^6$  hücre 7,14 ve 21. Gün) verilmiş. Çalışmanın in-vitro bölümünde kültür ortamında T hücre proliferasyonunun baskılandığı ve CD4 + / CD25 + / Foxp3+ regülatör T hücrelerin arttığı gözlenmiş. Çalışmanın in-vivo kısmında Grup IV de kompozit doku yaşayabilirliğinin belirgin bir şekilde arttığı, rejeksiyonun belirgin bir şekilde azaldığı ve donör hücre kimerizminin yükseldiği gözlenmiş. Bunun yanında periferik kanda CD4 + / CD25 + / Foxp3+ regülatör hücrelerinin arttığı, kompozit doku cildinde TGF- $\beta$  ve IL-10 düzeylerinin arttığı gözlenmiştir.(Kuo, Chen, Goto, ve ark., 2011)

Kuo ve ark. tarafından yapılan bir deneysel çalışmada kısmi yüz nakli yapılan domuzlarda Siklosporin A ile kombine olarak verilen kemik iliği kökenli MKH'lerin greft yaşayabilirliğini belirgin bir şekilde arttırdığı, CD 45 ve IL-6 düzeyini azalttığı, CD 4 + / CD25 + regülatör T hücrelerini ve IL-10 düzeyini arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca transplante edilen dokudan günlük alınan biyopsi örneklerinde Foxp3 + T hücrelerinin ve TGF- $\beta$ 1 + hücrelerin MKH+ Siklosporin A grubunda belirgin bir şekilde artmış olduğu gözlenmiştir. (Kuo, Chen, Goto, Huang, ve ark., 2012)

Guangxin ve ark. tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada karaciğerde 60 dakika iskemi oluşturulan sıçanların bir kısmına reperfüzyon sonrası kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler portal venden enjekte edilmiş. İşlem sonrası 12 ve 24. saatte alınmış kan örneklerine göre mezenkimal kök hücre uygulanan grupta ALT ,AST parametrelerinde belirgin azalma gözlenmiş. Oksidatif stres belirteçlerinden Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) düzeylerinde belirgin artış gözlenmiş. Ayrıca 24 saat sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan karaciğer örnekleri alınarak histopatolojik inceleme yapılmış. Konjesyon , vokuolizasyon ve nekroz gibi hücre hasar parametrelerinde belirgin bir azalma gözlenmiş. Benzer şekilde mezenkimal kök hücre verilen sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinde antiapoptotik etkinin belirgin olduğu gözlenmiş. (Jin ve ark., 2013)

Chun ve ark. tarafından 2012 yılında yapılan bir deneysel tavşan çalışmasında perkutan iğne ile hasarlanmış L2-3 , L3-4 ve L4-5 hasar alanına, hasarlanmadan 19 hafta sonra YDKH enjeksiyonu yapılmış. Yapılan MR ve histolojik incelemelerinde YDKH enjekte edilen grupta ekstrasellüler matriks sekresyonunda belirgin artış, hasarlanmış kartilajda minimal kemikleşme gözlenmiştir. (Chun ve ark., 2012)

Hu ve ark. tarafından yapılan çalışmada vaskülerize kompozit doku allotransplantasyon yapılan sıçanların immünsüpresif ajan (Siklosporin A + Mikofenolat Mofetil) ile kombine mezenkimal kök hücre enjeksiyonu yapılmış. Kompozit doku nakli yapılan sıçanlarda idrarda atılımı artmış olan 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-7,8-dihydro-2- deoxyguanosine, ve malondialdehit düzeyleri ve greft yaşayabilirliği kıyılanmış. Malondialdehitin idrarla atılımı kök hücre ilave edilen grupta tek başına immünsüpresif uygulanan gruba göre % 50 azalmış, diğer taraftan 8-oxo-7,8-dihydro-2- deoxyguanosine atılımının 2,7 kat arttığı gözlenmiş. Greft yaşayabilirliği ortalama 80 gün ile yine bu grupta en yüksek olarak gözlenmiş. (Hu ve ark., 2013)



Saito ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada iskemi ile birlikte %70 hepatektomili sıçan modelinde mezenkimal kök hücrenin etkinliği araştırılmış. Bu çalışmada 6. saatte alınan kan örneğinde AST, ALT ve Total Billurubin (TB) düzeyleri belirgin şekilde düşük olduğu gözlenmiş. 24 saat sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan karaciğer ve kan örnekleri alınmış. Kan örneklerinde AST, ALT ve Total bilirubin düzeyleri 6. saat ile benzer şekilde düşük olarak saptanmış. Karaciğer rejenerasyonu mezenkimal kök hücre grubunda belirgin olarak artmıştır. Alınan karaciğer dokuları invitro ortamda kültüre edilmiştir. MKH ile kokültüre edilen grupta tek başına kültürü edilen gruba nazaran kültür ortamında Vasküler Endotelyal Growth Faktör(VEGF) , Hepatosit Growth Faktör (HGF) düzeylerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Kültür ortamına VEGF salınımını azaltan Bevasizumab ilavesi sonrası VEGF salınımı azalmıştır. Buna rağmen hepatosit viabilitesinde azalma gözlenmemiş. Bu durum YDKH'lerin hücre koruyucu etkisinin VEGF salınımı dışında başka bir sinyal sistemi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. (Saito ve ark., 2013)

Bizim çalışmamızda tüm gruplarda cerrahi işlemden 24 saat sonra AST değerlerinde artış gözlenmiş ancak bu artış sadece 1 grupta ( Grup IV) anlamlı düzeyde bulunmuştur. Kompozit doku nakli sonrası karaciğer ve böbreğe net etkinin gözlenebilmesi için gruplardan hiç birine immünsüpressif ilaç verilmedi. Kök hücre verilmeyen Grup I ve Grup II ' de beklenen aksine ALT ve Kreatinin değerlerinde anlamlı oranda azalma olmuştur. Bu iki grupta Üre değerleri de azalmış olmasına rağmen sadece Grup I' de anlamlı olarak bulunmuştur. MKH enjeksiyonu yapılmayan bu 2 grupta kompozit doku iskemi süreleri kök hücre verilen gruplara nazaran daha uzun olmasına rağmen ALT, Üre ve Kreatinin değerlerinde ilk 24 saatte beklenen artış gözlenmemiştir. Beklenen aksine bu değerlerde azalma gözlenmiştir. Bu gruplarda ilk 24 saatte AST değerinde artış olmasına rağmen cerrahi öncesi değerlerde göz önünde bulundurularak bu artışın anlamlı olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde nakil yapılmayan, sadece kök hücre eldesi için yağ greftleri alınan sıçanlardan alınan karaciğer doku örneklerinin akım sitometrik incelemesinde elde edilen sonuçların, nakil yapıp kök hücre enjeksiyonu yapılmayan gruplar ile benzer olduğu gözlemlendi. Hem biyokimyasal, hem de akım sitometrik analizler birlikte değerlendirildiğinde transplante edilen kompozit dokuya bağlı ilk 24 saatte karaciğer ve böbrek dokusu üzerinde belirgin bir etkinin henüz oluşmadığı kanaatine varılmıştır.

Tüm gruplarda iskemi süreleri farklı olmasına rağmen bu sürenin AST, ALT, Üre, Kreatinin, ölü hücre, canlı hücre, erken ve geç apoptotik hücre oranları ile anlamlı korelasyonu gözlenmemiştir. Buna dayanarak kompozit doku nakillerinde en az 102 dakikalık bir iskeminin karaciğer ve böbrek parametreleri üzerine anlamlı etkisi olmadığı fikri oluşmuştur.

Tüm gruplarda AST ve ALT değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır. Karaciğer fonksiyon testlerindeki artışın grupların çoğunda böbrek parametreleri ile benzer biçimde olduğu gözlenmiştir. Bu bilgiye dayanarak kompozit doku nakillerinde karaciğer parametrelerindeki yükselmeye böbrek parametrelerinin sıklıkla eşlik ettiği kanaati oluşmuştur.

Tüm gruplarda kompozit doku nakli sonrası 24 saatte sonunda elde edilen karaciğer dokusunun akım sitometrik incelemesine dayanarak, canlı hücre, ölü hücre, erken ve geç apoptotik hücre oranlarının aynı dönemde kandan ölçülen AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri ile korelasyonu gözlenememiştir. Bu bilgiden yola çıkılarak kompozit doku nakiller sonrası ilk 24 saatte kandan ölçülen AST ve ALT değerlerinin karaciğer viabilitesi hakkında net fikir vermediği kanaatine varılmıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin yara iyileşmesi, karaciğer fonksiyonları, böbrek fonksiyonları ve immünmodülasyon üzerine birçok olumlu etkisi gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda intraperitoneal MKH enjeksiyonu yapılan her iki grupta ilk 24 saatte AST değerleri açısından anlamlı fark gözlenmemiştir. Yapılan çalışmaların aksine MKH enjeksiyonu yapılan her iki gruptaki sıçanlarda ilk 24 saatte ALT ve Kreatinin değerlerinin belirgin bir biçimde arttığı görülmüştür. Üre değerleri MKH enjeksiyonu yapılan her iki grupta da artmış olmasına rağmen bu artış sadece 1 grupta anlamlı olarak bulunmuştur. Karaciğer ve böbrek fonksiyonlarındaki bu artış anlamlandırılmamıştır. Ancak bu bilgiden yola çıkılarak MKH'lerin karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerine sürekli olumlu etkisinin olamayacağı, bazen olumsuz etkilerinin de olabileceği konusunda fikir oluşturmuştur. MKH enjeksiyonu yapılan

gruplardan birinde 24 saat sonunda karaciğerde akım sitometrik inceleme ile elde edilen ölü hücre (Q1) oranında anlamlı azalma gözlenmiştir. Ancak kök hücrelerin her iki grupta da ilk 24 saatte oluşan apoptoz üzerine belirgin etkisinin olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde MKH'lerin ilk 24 saatte karaciğerdeki canlı hücre oranları üzerine net olumlu etkisi gösterilememiştir.

Elde edilen tüm bilgiler toplu olarak değerlendirildiğinde, MKH'lerin intraperitoneal uygulama ile ilk 24 saatte meydana gelen sistemik yanıtta net olumlu etkisi gösterilememiştir. Ancak daha önce yapılan çalışmalar ışığında değerlendirme yapılırsa bu etkinin 24 saatten sonra başlayabileceği, anlamlı etkinin görülebilmesi için kompozit doku nakli yapılan sıçanların immünsüpressif tedavi verilmeden daha uzun yaşatılması, MKH uygulamasının intravenöz yolla yapılması sonuçta hem sistemik etkinin hem de MKH'lerin olumlu etkileri gözlenebilmesi mümkün olacaktır. Bu bağlamda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

# KAYNAKLAR

- Aznar, J., & Sanchez, J. L. (2011). Embryonic stem cells: are useful in clinic treatments? *J Physiol Biochem*, 67(1), 141-144. doi: 10.1007/s13105-010-0064-0
- Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B., & Ashammakhi, N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(4), 169-183. doi: 10.1002/term.83
- Barth, R. N., Rodriguez, E. D., Mundinger, G. S., Nam, A. J., Ha, J. S., Hui-Chou, H., . . . Bartlett, S. T. (2011). Vascularized bone marrow-based immunosuppression inhibits rejection of vascularized composite allografts in nonhuman primates. *Am J Transplant*, 11(7), 1407-1416. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03551.x
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2(4), 313-319. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.002
- Chun, H. J., Kim, Y. S., Kim, B. K., Kim, E. H., Kim, J. H., Do, B. R., . . . Lee, Y. K. (2012). Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs. *World Neurosurg*, 78(3-4), 364-371. doi: 10.1016/j.wneu.2011.12.084
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., . . . Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301-313. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003
- Herberts, C. A., Kwa, M. S., & Hermsen, H. P. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med*, 9, 29. doi: 10.1186/1479-5876-9-29
- Hu, C. H., Lin, C. H., Chang, N. J., Hu, C. W., & Lin, C. H. (2013). Urinary excretion of oxidative damage markers in a rat model of vascularized composite allotransplantation. *Plast Reconstr Surg*, 132(4), 530e-541e. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182a0141f
- Jeong, S. H., Ji, Y. H., & Yoon, E. S. (2014). Immunosuppressive activity of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in a rat model of hind limb allotransplantation. *Transplant Proc*, 46(5), 1606-1614. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.069
- Jin, G., Qiu, G., Wu, D., Hu, Y., Qiao, P., Fan, C., & Gao, F. (2013). Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats. *Int J Mol Med*, 31(6), 1395-1401. doi: 10.3892/ijmm.2013.1340
- Kuo, Y. R., Chen, C. C., Goto, S., Huang, Y. T., Wang, C. T., Tsai, C. C., & Chen, C. L. (2012). Immunomodulatory effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a swine hemi-facial allotransplantation model. *PLoS One*, 7(4), e35459. doi: 10.1371/journal.pone.0035459
- Kuo, Y. R., Chen, C. C., Goto, S., Lee, I. T., Huang, C. W., Tsai, C. C., . . . Chen, C. L. (2011). Modulation of immune response and T-cell regulation by donor adipose-derived stem cells in a rodent hind-limb allotransplant model. *Plast Reconstr Surg*, 128(6), 661e-672e. doi: 10.1097/PRS.0b013e318230c60b
- Kuo, Y. R., Chen, C. C., Shih, H. S., Goto, S., Huang, C. W., Wang, C. T., . . . Wei, F. C. (2011). Prolongation of composite tissue allotransplant survival by treatment with bone marrow mesenchymal stem cells is correlated with T-cell regulation in a swine hind-limb model. *Plast Reconstr Surg*, 127(2), 569-579. doi: 10.1097/PRS.0b013e318200a92c
- Kuo, Y. R., Huang, C. W., Goto, S., Wang, C. T., Hsu, L. W., Lin, Y. C., . . . Lee, W. P. (2009). Alloantigen-pulsed host dendritic cells induce T-cell regulation and prolong allograft survival in a rat model of hindlimb allotransplantation. *J Surg Res*, 153(2), 317-325. doi: 10.1016/j.jss.2008.05.034

- Mori, L., Bellini, A., Stacey, M. A., Schmidt, M., & Mattoli, S. (2005). Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res*, *304*(1), 81-90. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.11.011
- Saito, Y., Shimada, M., Utsunomiya, T., Ikemoto, T., Yamada, S., Morine, Y., . . . Asanoma, M. (2013). The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. *J Surg Res*, *180*(1), 162-168. doi: 10.1016/j.jss.2012.10.009
- Seki, T., Yokoyama, Y., Nagasaki, H., Kokuryo, T., & Nagino, M. (2012). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes hepatic regeneration after hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy in rats. *J Surg Res*, *178*(1), 63-70. doi: 10.1016/j.jss.2012.02.014
- Shih, Y. C., Lee, P. Y., Cheng, H., Tsai, C. H., Ma, H., & Tarng, D. C. (2013). Adipose-derived stem cells exhibit antioxidative and antiapoptotic properties to rescue ischemic acute kidney injury in rats. *Plast Reconstr Surg*, *132*(6), 940e-951e. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182a806ce
- Si, Y. L., Zhao, Y. L., Hao, H. J., Fu, X. B., & Han, W. D. (2011). MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev*, *10*(1), 93-103. doi: 10.1016/j.arr.2010.08.005
- Verstappen, J., Katsaros, C., Kuijpers-Jagtman, A. M., Torensma, R., & Von den Hoff, J. W. (2011). The recruitment of bone marrow-derived cells to skin wounds is independent of wound size. *Wound Repair Regen*, *19*(2), 260-267. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00671.x
- Ailhaud, G., Grimaldi, P., & Negrel, R. (1992). Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*, *12*, 207-233. doi: 10.1146/annurev.nu.12.070192.001231
- Akpolat, T., Utaş, C., & Süleymanlar, G. (1996). *Nefroloji El Kitabı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Aksit, H., & Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncüyıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, *19*, 55-63.
- Avram, A. S., Avram, M. M., & James, W. D. (2005). Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol*, *53*(4), 671-683. doi: 10.1016/j.jaad.2005.05.015
- Aznar, J., & Sanchez, J. L. (2011). Embryonic stem cells: are useful in clinic treatments? *J Physiol Biochem*, *67*(1), 141-144. doi: 10.1007/s13105-010-0064-0
- Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B., & Ashammakhi, N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, *2*(4), 169-183. doi: 10.1002/term.83
- Barth, R. N., Rodriguez, E. D., Munding, G. S., Nam, A. J., Ha, J. S., Hui-Chou, H., . . . Bartlett, S. T. (2011). Vascularized bone marrow-based immunosuppression inhibits rejection of vascularized composite allografts in nonhuman primates. *Am J Transplant*, *11*(7), 1407-1416. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03551.x
- Bartness, T. J., & Bamshad, M. (1998). Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol*, *275*(5 Pt 2), R1399-1411.
- Baykal, Y., Özet, G., & Kocabalkan, F. (1998). Apoptozis ve İmmün Sistem. *T Klin J Med Sci*, *18*, 11-14.
- Bianco, P., Robey, P. G., & Simmons, P. J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, *2*(4), 313-319. doi: 10.1016/j.stem.2008.03.002
- Bonventre, J. V. (1993). Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, *43*(5), 1160-1178.

- Brady, H. R., & Singer, G. G. (1995). Acute renal failure. *Lancet*, 346(8989), 1533-1540.
- Burtis, C., Ashwood, E., & Tietz, N. (2005). *Basic principles in clinical chemistry* (D. Aslan, Trans.).
- Burz, C., Berindan-Neagoe, I., Balacescu, O., & Irimie, A. (2009). Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol*, 48(6), 811-821. doi: 10.1080/02841860902974175
- Chun, H. J., Kim, Y. S., Kim, B. K., Kim, E. H., Kim, J. H., Do, B. R., . . . Lee, Y. K. (2012). Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs. *World Neurosurg*, 78(3-4), 364-371. doi: 10.1016/j.wneu.2011.12.084
- Conesa, E. L., Valero, F., Nadal, J. C., Fenoy, F. J., Lopez, B., Arregui, B., & Salom, M. G. (2001). N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281(3), R730-737.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., . . . Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301-313. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003
- Cuhruk, H. *Lange Klinik Anesteziyoloji* (M. Tulunay, Trans.).
- Cui, L., Yin, S., Liu, W., Li, N., Zhang, W., & Cao, Y. (2007). Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*, 13(6), 1185-1195. doi: 10.1089/ten.2006.0315
- Friedewald, J. J., & Rabb, H. (2004). Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 66(2), 486-491. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.761\_3.x
- Greenway, C., & Lutt, W. (1989). *Handbook of Physiology-The*
- Gastrointestinal System, Motility and Circulation.*
- Guyton, A., & Hall, J. (1996). *Textbook of Medical Physiology*. Pennsylvania: WB Saunders Company.
- Güleş, Ö., & Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Vet Fak Dergisi*, 2, 73-78.
- Gültekin, N., Karaoğlu, K., & Küçükates, E. (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk KardiyolDern-ArchTurkSocCardiol*, 36, 120-130.
- Gündeşlioğlu, A. Ö., Altuntaş, Z., İnce, B., Dadacı, M., Aktan, M., & Duman, S. (2013). Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler Ve Plastik Cerrahide Uygulama Alanları. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi*, Cilt 21 / Sayı 3.
- Herberts, C. A., Kwa, M. S., & Hermsen, H. P. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med*, 9, 29. doi: 10.1186/1479-5876-9-29
- Hoekstra, L. T., de Graaf, W., Nibourg, G. A., Heger, M., Bennink, R. J., Stieger, B., & van Gulik, T. M. (2013). Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: a review. *Ann Surg*, 257(1), 27-36. doi: 10.1097/SLA.0b013e31825d5d47
- Hu, C. H., Lin, C. H., Chang, N. J., Hu, C. W., & Lin, C. H. (2013). Urinary excretion of oxidative damage markers in a rat model of vascularized composite allotransplantation. *Plast Reconstr Surg*, 132(4), 530e-541e. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182a0141f
- İşlekel, H. (2002). *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Jeong, S. H., Ji, Y. H., & Yoon, E. S. (2014). Immunosuppressive activity of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in a rat model of hind limb allotransplantation. *Transplant Proc*, 46(5), 1606-1614. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.12.069
- Jin, G., Qiu, G., Wu, D., Hu, Y., Qiao, P., Fan, C., & Gao, F. (2013). Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inhibiting apoptosis in rats. *Int J Mol Med*, 31(6), 1395-1401. doi: 10.3892/ijmm.2013.1340
- Junqueira, L., Carneiro, J., & Kelley, R. (1993). *Temel Histoloji*.

- Kondo, K., Shintani, S., Shibata, R., Murakami, H., Murakami, R., Imaizumi, M., . . . Murohara, T. (2009). Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(1), 61-66. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.166496
- Kuo, Y. R., Chen, C. C., Goto, S., Huang, Y. T., Wang, C. T., Tsai, C. C., & Chen, C. L. (2012). Immunomodulatory effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a swine hemi-facial allotransplantation model. *PLoS One*, *7*(4), e35459. doi: 10.1371/journal.pone.0035459
- Kuo, Y. R., Chen, C. C., Goto, S., Lee, I. T., Huang, C. W., Tsai, C. C., . . . Chen, C. L. (2011). Modulation of immune response and T-cell regulation by donor adipose-derived stem cells in a rodent hind-limb allotransplant model. *Plast Reconstr Surg*, *128*(6), 661e-672e. doi: 10.1097/PRS.0b013e318230c60b
- Kuo, Y. R., Chen, C. C., Goto, S., Lin, P. Y., Wei, F. C., & Chen, C. L. (2012). Mesenchymal stem cells as immunomodulators in a vascularized composite allotransplantation. *Clin Dev Immunol*, *2012*, 854846. doi: 10.1155/2012/854846
- Kuo, Y. R., Chen, C. C., Shih, H. S., Goto, S., Huang, C. W., Wang, C. T., . . . Wei, F. C. (2011). Prolongation of composite tissue allotransplant survival by treatment with bone marrow mesenchymal stem cells is correlated with T-cell regulation in a swine hind-limb model. *Plast Reconstr Surg*, *127*(2), 569-579. doi: 10.1097/PRS.0b013e318200a92c
- Kuo, Y. R., Huang, C. W., Goto, S., Wang, C. T., Hsu, L. W., Lin, Y. C., . . . Lee, W. P. (2009). Alloantigen-pulsed host dendritic cells induce T-cell regulation and prolong allograft survival in a rat model of hindlimb allotransplantation. *J Surg Res*, *153*(2), 317-325. doi: 10.1016/j.jss.2008.05.034
- Matsumoto, D., Sato, K., Gonda, K., Takaki, Y., Shigeura, T., Sato, T., . . . Yoshimura, K. (2006). Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng*, *12*(12), 3375-3382. doi: 10.1089/ten.2006.12.3375
- Miller, R. (2010). *Organ Transplantasyonu* (D. Aydın, Trans.). İzmir: İzmir Güven Kitabevi.
- Miller, R., Fleisher, L., Stoelting, R., Johna, R., & Savarese, J. (2010). Miller Anesthesiology.
- Morgan, G., Mikhail, M., & Murray, M. (2008). Clinical Anesthesiology.
- Mori, L., Bellini, A., Stacey, M. A., Schmidt, M., & Mattoli, S. (2005). Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res*, *304*(1), 81-90. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.11.011
- Navar, L., Carmine, P., & Mitchell, K. (1995). *Text book of Nephrology*. Baltimore: Williams&Wilkins.
- Öktem, S., Özhan, M., & Özol, D. (2001). Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 91-95.
- Paller, M. S., Hoidal, J. R., & Ferris, T. F. (1984). Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest*, *74*(4), 1156-1164. doi: 10.1172/JCI111524
- Pinheiro da Silva, F., & Nizet, V. (2009). Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis*, *14*(4), 509-521. doi: 10.1007/s10495-009-0320-3
- Rabie, M., Negmi, H., Hammad, Y., Al Oufi, H., & Khalaf, H. (2006). Living donor hepatectomy (LDH)--comparative study between two different anesthetic techniques. *Middle East J Anaesthesiol*, *18*(4), 743-756.
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., . . . March, K. L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, *109*(10), 1292-1298. doi: 10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1
- Saito, Y., Shimada, M., Utsunomiya, T., Ikemoto, T., Yamada, S., Morine, Y., . . . Asanoma, M. (2013). The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. *J Surg Res*, *180*(1), 162-168. doi: 10.1016/j.jss.2012.10.009

- Seki, T., Yokoyama, Y., Nagasaki, H., Kokuryo, T., & Nagino, M. (2012). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes hepatic regeneration after hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy in rats. *J Surg Res*, *178*(1), 63-70. doi: 10.1016/j.jss.2012.02.014
- Shih, Y. C., Lee, P. Y., Cheng, H., Tsai, C. H., Ma, H., & Tarng, D. C. (2013). Adipose-derived stem cells exhibit antioxidative and antiapoptotic properties to rescue ischemic acute kidney injury in rats. *Plast Reconstr Surg*, *132*(6), 940e-951e. doi: 10.1097/PRS.0b013e3182a806ce
- Si, Y. L., Zhao, Y. L., Hao, H. J., Fu, X. B., & Han, W. D. (2011). MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev*, *10*(1), 93-103. doi: 10.1016/j.arr.2010.08.005
- Sonsuz, A. (2007). *Karaciğer Fonksiyon Bozukluklarına Klinik Yaklaşım Sempozyum Dizisi* (Vol. 58).
- Suga, H., Eto, H., Shigeura, T., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., . . . Yoshimura, K. (2009). IFATS collection: Fibroblast growth factor-2-induced hepatocyte growth factor secretion by adipose-derived stromal cells inhibits postinjury fibrogenesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *STEM CELLS*, *27*(1), 238-249. doi: 10.1634/stemcells.2008-0261
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tisher, C. (2000). *Cecil Textbook of Medicine* (7 ed.). Pennsylvania: WB Saunders Company.
- Verstappen, J., Katsaros, C., Kuijpers-Jagtman, A. M., Torensma, R., & Von den Hoff, J. W. (2011). The recruitment of bone marrow-derived cells to skin wounds is independent of wound size. *Wound Repair Regen*, *19*(2), 260-267. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00671.x
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., . . . Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, *13*(12), 4279-4295. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105



# ÖZET

## KOMPOZİT DOKU ALLOTRANSPLANTASYONU YAPILAN SIÇANLARDA, YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İLK 24 SAATTE MEYDANA GELEN SİSTEMİK YANITA ETKİSİ

AHMET AKATEKİN, UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2015

**AMAÇ:** Kompozit doku nakilleri eş zamanlı birçok farklı doku türünün rekonstrüksiyonu açısından avantajlıdır. Ancak bu işlemin önündeki en büyük sorun tüm doku çeşitlerine karşı ayrı ayrı oluşan sistemik ve immün yanıttır. Biz bu çalışmamızda kompozit doku nakillerine bağlı ilk 24 saatte meydana gelen sistemik yanıtı ve oluşan sistemik yanıtı yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrenin (MKH) etkisini gözlemlemeyi amaçladık.

**YÖNTEM:** Çalışmada 29 adet Wistar Albino (WA) , 29 adet Sprague Dawley (SD) türü sıçan kullanılmıştır. 24 adet WA sıçan 12'şerli 2 ayrı gruba ayrılmıştır. ( Grup I, Grup III), 24 adet SD sıçan 12'şerli 2 ayrı gruba ayrılmıştır. ( Grup II, Grup IV) . Kalan 5 adet WA ve 5 adet SD türü sıçan MKH eldesi ve bazal karaciğer apoptoz değerlerinin ölçülmesinde kullanılmıştır. Bu gruplardan elde edilen MKH süspansiyonları kendi türlerinden sıçanlara enjekte edilmek üzere -80 °C de saklanmış ve enjeksiyondan 40 dakika önce uygun koşullarda eritilmiştir. Grup I ile Grup II arasında, Grup III ile Grup IV arasında çapraz sol arka ekstremitte transferi planlanmıştır. Transfer öncesi tüm sıçanlardan kuyruk kanı alınarak bazal AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerleri ölçülmüştür. Transfer esnasında anastomoz açılıp ekstremitte dolaşımı gözlenen Grup III ve Grup IV sıçanlara kendi türlerinden elde edilen adipoz kaynaklı MKH içeren süspansiyon intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Grup I ve Grup II sıçanlara aynı miktar serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Transfer işleminden 24 saat sonra bacak dolaşımı yeterli olan sıçanlar sakrifiye edilerek hem kan hemde karaciğer doku örneği alınmıştır. Elde edilen veriler hem grup içinde hemde gruplar arasında istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

**BULGULAR:** İskemi süreleri ile 24 saat sonunda kandan ölçülen AST, ALT, Üre, Kreatinin değerleri ve karaciğer dokusundan akım sitometrisi ile elde edilen ölü hücre, canlı hücre, erken ve geç apoptotik hücre oranları arasında korelasyon olmadığı görülmüştür. Kompozit doku nakli sonrası tüm gruplarda AST değerlerinde artış olmasına rağmen bu artış sadece 1 grupta anlamlı bulunmuştur. Kreatinin ve ALT değerlerinde tüm gruplarda anlamlı oranda azalma gözlenmiştir. Üre değerleri MKH enjeksiyonu yapılmayan gruplarda azaldığı halde enjeksiyon yapılan gruplarda artmış olarak gözlemlendi. Akım sitometrisi incelemesinde MKH enjeksiyonu yapılan gruplarda canlı hücre, erken ve geç apoptotik hücre oranları arasında fark gözlenmedi. Sadece 1 grupta MKH enjeksiyonu sonrası ölü hücre oranında azalma olduğu gözlemlendi. MKH eldesi için kullanılan sıçanlardan alınan karaciğer örneklerinin akım sitometrik incelemesi sonuçları, cerrahi işlem yapıp MKH enjeksiyonu yapılmayan ve 24 saat sonunda sakrifiye edilerek karaciğer örnekleri alınan sıçanlar ile karşılaştırıldığında ölü hücre, canlı hücre, erken ve geç apoptotik hücre oranları açısından anlamlı fark gözlenmemiştir.

**SONUÇ:** Kompozit doku nakilleri sonrası ilk 24 saatte meydana gelen sistemik yanıtın izlenmesinde AST, ALT, Üre ve Kreatinin değerlerinin anlamlı bulgu vermediği, iskemi süresinin karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ile korelasyon göstermediği, AST ve ALT değerlerinin karaciğerde mevcut apoptoz ve ölü hücre miktarı ile korelasyon göstermediği bu nedenle takip açısından yeterli olmadığı, MKH'lerin kompozit doku nakli yapılan sıçanlarda ilk 24 saatte meydana gelen sistemik yanıtta belirgin olumlu etkisinin olmadığı hatta bazı parametrelerde olumsuz etki oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Yağ doku, kök hücre, kompozit doku nakli, sistemik yanıt

# ABSTRACT

## FIRST 24 HOUR SYSTEMIC EFFECT OF ADIPOSE DERIVED STEM CELLS IN RATS WHICH MADE COMPOSITE TISSUE ALLOTRANSPLANTATION

**OBJECTIVE:** Composite tissue transplantations are advantageous for reconstructions of many tissues. However, the biggest problem of this process is the systemic and immune response against all tissue types separately. In our study, we aimed to observe the systemic response in the first 24 hours due to vascularized composite tissue allotransplantations (VCA) and the effect of adipose-derived mesenchymal stem cells to the systemic response.

**METHOD:** 29 Wistar Albino and 29 Sprague Dawley rats were used in the study. Twenty-four WA rats were separated into 2 groups with 12 rats each (group 1,3). 24 SD rats were separated into 2 groups with 12 rats each (group 2,4). Remaining 5 WA and 5 SD rats were used for obtaining Mesenchymal Stem Cells (MSC) and for measuring the basal liver apoptosis values. These MSC suspensions were preserved at -80 degrees in order to inject the same species and melted 40 minutes before the injection in favorable conditions. Between group 1 and 2 and between group 3 and 4, the cross left hind extremity transfer was planned. Before transfer, all rats' basal AST, ALT, BUN, and Creatinine values were measured by taking the tail blood. The suspension including the adipose-derived MSC, which is obtained from the same species, was injected intraperitoneally to group 3 and 4 rats that had been observed the extremity circulation by opening the anastomosis during the transfer. The same amount of serum physiologic was injected intraperitoneally to the group 1 and 2. Twenty-four hours after the transfer, the rats which had the enough leg circulation were sacrificed and both blood and liver tissue samples were obtained. The obtained results were statistically analyzed both in the group and between the groups.

**RESULTS:** We didn't find any correlation between ischemia time and AST, ALT, BUN, and Creatinine values which were measured 24 hours after VCA. Alike any correlation with flow cytometry results. Despite the increase in AST values after composite tissue transplantation, this increase was significant in only one group. Creatinine and ALT values were significantly decreased in all groups. BUN values were

decreased in the groups which wasn't injected MSC, however it is observed as increased in the groups which was injected MSC. Significant difference wasn't observed between the dead cell, live cell, early and late apoptotic cell in the groups that was injected MSC in the flow cytometry. Only in one group, it is observed that the dead cell quantity was decreased after the MSC injection. The flow cytometric results of liver samples of the rats which was utilized for obtaining the MSC weren't differs from the rats which were operated but not get the MSC injection and sacrificed after 24 hours from the point of dead cell, live cell, early and late apoptotic cell.

**CONCLUSION:** It is concluded that AST, ALT, BUN and Creatinin values aren't give significant result for monitoring the systemic response in the first 24 hours after the composite tissue transplantations. Ischemia time doesn't corelate with liver and kidney function tests; AST and ALT values don't corelate with the amount of liver apoptosis and dead cell and so not enough for monitoring; MSC has no significantly positive effect on the systemic response in the first 24 hours of the composite tissue transplantation, even has negative effects on some parameters.

**Key words:** Adipose tissue, stem cell, composite tissue allotransplantation, systemic response

# ÖZGEÇMİŞ

**Özgeçmiş** : Araş. Gör. Dr. Ahmet AKATEKİN  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Adana, 12.01.1983  
**Ev Adresi** : Yazır mah. Öztekinler sokak Defne Sitesi D Blok  
Kat: 13 Daire no: 46/53  
**Tel** : 0332 265 13 54  
**Gsm** : 0555 363 61 73  
**İş Adresi** : Selçuk Ün. Selçuklu Tıp Fak. Plastik ve Rek. Cerrahi  
A.D. / KONYA  
**İş Telefonu:** 0 332 224 52 55  
**Medeni Hali** : Evli, 2 Çocuk, (4 yaşında ve 1 yaşında)

**Eğitim** :

**İlkokul:** Kiremithane İlkokulu (Adana)

**Ortaokul:** Ömer Refika Halıcılar İlköğretim Okulu (Adana)

**Lise:** Sunar Nuri Çomu Lisesi /Y.D.A (Adana)

**Üniversite:** Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi

<b>Derece</b>	<b>Alan</b>	<b>Üniversite</b>	<b>Yıl</b>
<b>Y. Lisans</b>	<b>Tıp</b>	<b>Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi</b>	<b>2007</b>
<b>Tıpta Uzmanlık</b>	<b>Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi</b>	<b>Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi</b>	<b>2015</b>

**Tıpta Uzmanlık Tezi Başlığı:** “Kompozit Doku Allograftasyonu Yapılan Sıçanlarda, Yağ Doku Kaynaklı Mezenekimal Kök Hücrelerin İlk 24 Saatte Meydana Gelen Sistemik Yanıtı Etkisi”

**Tez Danışmanı:** Yard. Doç. Dr. Osman Akdağ

**Görevler:**

<b>Görev Ünvanı</b>	<b>Görev Yeri</b>	<b>Yıl</b>
Pratisyen Hekim	Adana Tufanbeyli Devlet Hastanesi	2007
Dr.Arş.Gör.	Ege Üniversitesi Tıp Fak. Enfeksiyon Hastalıkları	2007-2009
Pratisyen Hekim	Van Bahçesaray Devlet Hastanesi	2009
Dr.Arş.Gör.	Selçuklu Tıp Fakültesi Selçuk Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi	2009-2015
Doctor in Training	China Medical University Hospital International Medical Service Center Taichung City/ Taiwan	Şub-Mart 2015