



1993

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi**

**Anabilim Dalı**

**DİYABET VE KRONİK BÖBREK HASTALIĞI OLAN  
SIÇANLARDA ADİPOZ KÖKENLİ STROMAL VASKÜLER  
FRAKSİYONUN DERİ FLEBİ YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE  
ETKİSİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Burak Özkan**

**ANKARA, 2015**





1993

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi**

**Anabilim Dalı**

**DIYABET VE KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ OLAN  
SIÇANLARDA ADİPOZ KÖKENLİ STROMAL VASKÜLER  
FRAKSİYONUN DERİ FLEBİ YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE  
ETKİSİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Burak ÖZKAN**

**TEZ DANIŞMANI**

**Doç. Dr. Ahmet Çağrı UYSAL**

**ANKARA, 2015**



## TEŞEKKÜR

İhtisas sürem boyunca plastik cerrahi sanatını bana öğreten, algoritmik düşüncüyü, akılcılığı, yaratıcılığı, bilimselliği teşvik edici, hoşgörülü yaklaşımıyla yanında çalışma fırsatı bulduğum için kendimi her daim şanslı addedeceğim sayın hocam, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hüseyin Borman'a,

Plastik cerrahi eğitimimde birçok cerrahi tekniği öğretmenin yanında, hekimlik duruşumun, bilimsel yazı yazma ve sunma gibi akademik becerilerimin şekillenmesinde sayısız katkıları olan; özverisiyle, tecrübesiyle rehberliğini hiç esirmemiş değerli hocam Prof. Dr. Nilgün M. Ertaş'a,

İhtisas sürem boyunca plastik cerrahiye dair birçok şeyi öğrendiğim, sorumluluk bilincini bana aşılaman, bilimsel düşünmeyi ve üretmeyi teşvik eden, hekimlik ve hekimlik dışında hayata dair görüşlerinden esinlendiğim ve kendime örnek aldığım, üzerimde sonsuz emekleri olan tez danışmanı hocam Doç. Dr. A. Çağrı Uysal'a,

Deneysel çalışmamın cerrahi işlemleri safhasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Dr. Atilla Adnan Eyüboğlu, Dr. Abbas Albayati ve beş yıl süren uzmanlık eğitimim sırasında birlikte dostluk ve dayanışma içinde çalıştığım Dr. Erhan Coşkun ve Dr. Azer Zeynalov'a.

Tezimin tüm aşamalarında yanımda olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Dr. Esra Uyanık'a

Tezimin biyokimyasal incelemelerinde katkılarından dolayı Doç. Dr. Nilüfer Bayraktar'a, Eda Özturan Özer'e,

Tezimin histopatolojik incelemeler bölümüne özenli çalışmalarıyla katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Ayşen Terzi'ye,

Tüm öğrenim hayatım boyunca bütün sevgi ve destekleriyle yanımda bulunan aileme teşekkürü borç bilirim.

Saygılarımla

Dr. Burak Özkan

## ÖZET

Diyabet (DM) ve kronik böbrek hastalığı (KBH) görülme sıklığı giderek artan epidemik hastalıklardır. Mikroanjiopati ve makroanjiopati zemininde gelişen yaralar kronikleşerek ekstremiteler ampütasyonlarına varan ciddi morbiditelere neden olur. Bu yaraların rekonstrüksiyonunda kullanılan fleplerde ise yüksek nekroz oranları bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda adipoz kökenli stromal vasküler fraksiyonun (SVF) deri flebi yaşayabilirliğini artırıcı etkileri gösterilmiştir, ancak KBH ve DM ve KBH'nin birlikte görüldüğü hasta grubunda deri flebi yaşayabilirliğine etkisine yönelik bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 48 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Diyabet modeli intraperitoneal 65mg/kg streptozosin ile yapıldı. Kronik böbrek hastalığı modeli olarak 5/6 nefrektomi tercih edildi. Her grupta 12 sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu, her gruptan 2 hastalık gelişmiş sıçan inguinal bölgelerinden SVF elde etmek amaçlı kullanıldı. Grup I (kontrol grubu): Sıçanların sırt bölgesinden iki adet flep kaldırıldı, fleplere fosfat tamponlu salin (PBS) verildi. Grup II (DM), Grup III (KBH), Grup IV (DM+KBH): Hastalık oluşturulduktan sonra uygun süre beklenildi, iki adet flep kaldırılarak soldaki flebe SVF enjekte edildi diğer flebe PBS verildi. 7 gün sonra deney sonlandırılarak flepler makroskopik ve histopatolojik incelemeye alındı. Makroskopik değerlendirme canlı alan yüzdesi ölçümü ve mikroanjiografi ile yapıldı. Histopatolojik değerlendirmede; hematoxilen-eozin ve CD31 boyanmış kesitlerde kapiller dansite ölçümü yapıldı. Bütün sıçanlarda, 1. ve 7. günlerde, kanda VEGF düzeyi çalışıldı.

Hastalık gruplarına SVF, flep canlılığını anlamlı arttırdığı gözlemlendi ( $p<0,05$ ). SVF verilen fleplerde PBS grubuna göre kapiller dansite istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0,05$ ). Bu sonuç mikroanjiyografik damar sayımıyla uyumluydu. Diİ işaretli kök hücrelerin endotel hücrelerine dönüşümü gösterildi. VEGF kan seviyeleri ise kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlenirken 1. ve 7. günler arasındaki fark bir tek Grup II (DM)'de anlamlıydı ( $p<0,05$ ).

Çalışma sonucunda; DM ve KBH'nin flep yaşayabilirliğini azalttığını ve bu iki hastalığın birlikte görüldüklerinde flep yaşayabilirliğinin en az olduğu gösterildi. SVF'nin flep yaşayabilirliğini endotele dönüştürerek ve neovaskülarizasyonla arttırdığı görüldü. Flep canlı alan yüzdesinin ise kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu bulgular sonunda DM ve KBH'nin yarattığı mikroçevre değişikliklerinin üremi daha fazla olmak üzere in vivo olarak kök hücre fonksiyonlarını olumsuz etkilediğini düşünüldü.

**Anahtar kelimeler:** Diyabet, kronik böbrek hastalığı, stromal vasküler fraksiyon, flep canlılığı, adipoz kökenli kök hücre

## ABSTRACT

### **Effect of Adipose Stromal Vascular Fraction on Random Pattern Flap Viability in Rats with Diabetes and Chronic Renal Disease Rats: An experimental study**

Diabetes (DM) and chronic renal disease (CRD) are epidemic diseases with increasing prevalence.. Wounds due to microangiopathy and macroangiopathy tend to heal slowly which can lead to severe morbidities such as amputations. High flap failure rates reported in the reconstruction of these wounds. Studies have shown increased flap viability by adipose derived stromal vascular fraction (SVF). However; there is no study in the literature about the effect of adipose stromal vascular fraction on skin flap viability in chronic renal disease and diabetes with chronic renal disease

48 male Sprague Dawley rats were used. Diabetes was induced by 65mg/kg intraperitoneal streptozocin administration. Chronic renal disease was induced by 5/6 nephrectomy. Four groups consisting of 12 rats were formed. 2 rats were used for obtaining adipose tissue from the inguinal regions for stromal vascular fraction preparation in each group. Group I (Control group): Two dorsal flaps were elevated, phosphate buffered saline (PBS) were injected to the flaps. Group II (DM), Group III(CRD), Group IV(DM+CRD): After disease induction and period;, two dorsal flaps were elevated, SVF were injected to the left flap, PBS were injected to the right flap. Flaps were harvested for macroscopic and histopathological assessments at postoperative 7th day.

Percentage of flap viability measurement and microangiography were performed for macroscopic assessment. Capillary density assessment were evaluated in both hemotoxylin-eosin and CD31 stained specimens for microscopic assessment. Plasma levels of VEGF were studied in all rats at day 1 and day 7.

SVF was improved flap viability significantly ( $p < 0,05$ ). New capillary formation found significantly more in SVF groups in capillary density assessment ( $p < 0,05$ ). This result was compatible with the scarcity of the vasculature in microangiography. When blood VEGF levels were compared, increase in day 1 and day 7 were significant according to control group ( $p < 0,05$ ). When groups were compared each other there were not significant difference except Group II(diabetes)



The result of the study has shown that DM and CRD impaired flap viability. Diabetes with chronic renal disease deteriorated the flap viability much more. It has shown that SVF were increased flap viability *via* neovascularization by endothelial differentiation. Flap viability percentage was found lower in diabetic and uremic groups when compared with healthy control group. Blood VEGF levels were not elevated in uremic groups. This results were indicated that *in vivo* function of stem cells were possibly impaired by uremia dominantly and diabetes due to microenvironmental changings.

**Key words:** Diabetes, chronic renal disease, stromal vascular fraction, flap viability, adipose derived stem cell

# İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet.....	iv
İçindekiler Dizini.....	vi
Kısaltmalar.....	ix
Şekiller Dizini.....	xii
Tablolar Dizini.....	xv
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler .....	3
2.1 Flepler.....	3
2.1.1 Flep Dolaşımı .....	3
2.1.2 Flep Kan Akımının Düzenlenmesi .....	5
2.1.3 Flep Nekrozu .....	5
2.1.4 Serbest Radikaller ve İskemi Reperfüzyon Hasarı .....	6
2.1.5 İskemik Ön Koşullandırma ve Flep Yaşabilirliğinin Arttırılması .....	7
2.1.6 Sıçanda Deneysel Random Flep Modelleri .....	9
2.2.1 Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF).....	11
2.3 Diyabet .....	12
2.3.1 Tanım.....	12
2.3.2 Diyabet Sınıflandırması .....	13
2.3.3 Diyabetin Mikrovasküler Komplikasyonları .....	15
2.3.3.1 Diyabetik Nefropati .....	17
2.3.4 Diyabetik Nöropati .....	19
2.3.5 Diyabetin Makrovasküler Komplikasyonları .....	20
2.3.6 Diyabet ve Yara İyileşmesi.....	21
2.3.7 Deneysel Diyabet Modelleri.....	22
2.4 Kronik Böbrek Hastalığı .....	26
2.4.1 Tanım.....	26
2.4.2 Böbrek Fonksiyonları ve Glomerüler Filtrasyon Hızı .....	27
2.4.3 Kronik Böbrek Hastalığının Komplikasyonları.....	29

2.4.4 Kronik Böbrek Hastalığı ve Yara İyileşmesi.....	31
2.4.5 Deneysel Kronik Böbrek Hastalığı Modelleri .....	32
2.4.5.1 Cerrahi Yöntemler.....	32
2.4.5.2 Farmakolojik Yöntemler .....	33
2.5 Kök Hücreler .....	35
2.5.1 Genel Bilgiler .....	35
2.5.2 Embriyonik Kök Hücreler .....	36
2.5.3 Yetişkin Kök Hücreler.....	37
2.5.4 Yetişkin Kök Hücre Plastisitesi.....	38
2.5.5 Kök Hücrelerin Gösterilmesi.....	39
2.5.6 Kök Hücre Kaynakları.....	40
2.5.6.1 Kemik İliği .....	41
2.5.6.2 Epidermis .....	44
2.5.6.3 Amniyotik Sıvı.....	45
2.5.6.4 Umblikal Kord .....	46
2.5.6.5 Adipoz Doku .....	46
2.5.7 Mezenkimal Kök Hücreler ve Rejeneratif Tıp .....	49
2.5.8 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı.....	50
2.5.8.1 Kemik Onarımı .....	50
2.5.8.2 Yumuşak Doku Onarımı .....	51
2.5.8.3 Kıkırdak Onarımı .....	52
2.5.8.4 Sinir Onarımı .....	52
2.5.8.5 Kardiyak Onarım .....	53
2.5.8.6 Neovaskülarizasyon .....	53
2.5.8.7 Yara İyileşmesi .....	54
2.5.8.8 Flep Yaşayabilirliğinin Arttırılması.....	54
3. Gereç ve Yöntem.....	55
3.1 Deney Hayvanlarının Bakımı .....	55
3.2 Deneylerde Kullanılan Malzemeler.....	55
3.3 Cerrahi Method.....	57
3.3.1 Dorsal Deri Flebinin Hazırlanması .....	57
3.3.2 Diyabet Oluşturulması .....	59
3.3.3 Kronik Böbrek Hastalığı Oluşturulması (5/6 Nefrektomi) .....	60
3.3.4 Stromal Vasküler Fraksiyonun Hazırlanması .....	61
3.4 Deney Protokolü.....	66
3.5 Makroskopik Değerlendirme .....	67
3.5.1 Canlı Alan Yüzdesinin Ölçülmesi .....	67
3.5.2 Mikroanjiografi Çekilmesi.....	68
3.5.3 Kanda VEGF Seviyesinin Ölçülmesi.....	70

3.5.4 Kanda Böbrek Fonksiyon Testleri ve Hemoglobin Ölçülmesi .....	71
3.6 Histopatolojik İncelemeler .....	72
3.6.1 Vasküler Dansite Ölçülmesi .....	72
3.6.2 Böbrek Glomerüler Analizi.....	72
3.6.3 Immunohistokimyasal İnceleme .....	73
3.6 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI) İşaretli Kök Hücrelerin İzlenmesi ve Değerlendirme .....	73
3.7 Biyoistatistiksel Değerlendirme .....	74
4. Bulgular .....	75
4.1 Ağırlık Değerlendirilmesi.....	75
4.2 Canlı Alan Yüzdesinin Değerlendirilmesi.....	76
4.3 Kan Şekeri Sonuçları .....	81
4.4 Böbrek Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi .....	82
4.5 Kan VEGF Seviyelerinin Değerlendirilmesi .....	85
4.6 Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	86
4.6.1 Kapiller Dansitenin Değerlendirilmesi .....	86
4.6.2 DiI Boyalı Endotellerin Gösterilmesi .....	87
4.6.3 Glomerüler Analiz .....	88
4.7 Mikroanjiografinin Değerlendirilmesi.....	90
5. Tartışma.....	92
6. Sonuç.....	101
Kaynaklar .....	103

## KISALTMALAR

<i>ABD:</i>	Amerika Birleşik Devletleri
<i>AKKH:</i>	Adipoz Kökenli Kök Hücre
<i>ADP:</i>	Adenozin Difosfat
<i>ALS:</i>	Amyotrofik Lateral Skleroz
<i>AR:</i>	Aldoz Redüktaz
<i>Anti-GAD:</i>	Anti glutamik asit dekarboksilaz
<i>ATP:</i>	Adenozin Trifosfat
<i>AV:</i>	Arteriyovenöz
<i>BB:</i>	Bio-breeding
<i>bFGF:</i>	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
<i>BUN:</i>	Birleşik Üre Azotu
<i>C:</i>	Celcius
<i>Ca:</i>	Kalsiyum
<i>CC:</i>	Santimetre küp
<i>CCD:</i>	Charge Coupled Device
<i>CFU-F:</i>	Fibroblast Kolonize Edici Faktör
<i>CFU-GM:</i>	Granülomonositik Koloni Oluşturucu Ünite
<i>CFU-L:</i>	Lenfoid Koloni Oluşturucu Ünite
<i>CM:</i>	Santimetre
<i>CD:</i>	Farklanma Kümeleri (Clusters of Differentiation)
<i>CFSE:</i>	Karboksifloresein diasetat süksinimidil ester
<i>COX:</i>	Siklooksijenaz
<i>DB:</i>	Deney Başlangıcı
<i>DiI:</i>	1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin
<i>DL:</i>	Desilitre
<i>DM:</i>	Diyabetes Mellitus
<i>DMEM:</i>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>DNA:</i>	Deoksiribonükleik asit
<i>DS:</i>	Hücrelerarası Adezyon Molekülü

<i>ECM:</i>	İnsülin benzeri büyüme faktörüEkst
<i>EDTA:</i>	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<i>EGF:</i>	Endotelyal Büyüme Faktörü
<i>EH:</i>	Endotel Hücresi
<i>ELISA:</i>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>eNOS:</i>	Endotelyal NOS
<i>EPH:</i>	Endotelyal Progenitör Hücre Floresan Yardımlı Hücre Sayımı
<i>FACS:</i>	Florasana Yardımlı Hücre Sayımı
<i>FAH:</i>	Fumaril Asetoasetat
<i>FCS:</i>	Fetal Calf Serum
<i>FBS:</i>	Fetal Bovine Serum
<i>FGF:</i>	Fibroblast Büyüme Faktörü
<i>G:</i>	Gram
<i>GCSF:</i>	Granülosit Koloni Uyaran Faktör
<i>GFH:</i>	Glomerüler Filtrasyon Hızı
<i>GFP:</i>	Yeşil Floresan Protein (Green florescein protein)
<i>GVHD:</i>	Graft Versus Host Hastalığı (Graft Versus Host Disease)
<i>H&amp;E:</i>	Hematoksilen Eosin
<i>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</i>	Hidrojen Peroksit
<i>Hb:</i>	Hemoglobin
<i>HDL:</i>	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
<i>HGF:</i>	Hepatosit Büyüme Faktörü
<i>HIF-1<math>\alpha</math></i>	Hipoksi Induced Faktör-1 $\alpha$
<i>HKH:</i>	Hematopoetik Kök Hücre
<i>HS:</i>	Human serum
<i>ICAM-1:</i>	Hücrelerarası Adezyon Molekülü-1
<i>IGF:</i>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
<i>IL-1:</i>	İnterlökin-1
<i>IL-6:</i>	İnterlökin-6
<i>IL-8:</i>	İnterlökin-8
<i>ISCT:</i>	Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği

<i>iNOS:</i>	İndüklenebilir NOS
<i>IP :</i>	İntraperitoneal
<i>IV:</i>	İntravenöz
<i>KBH:</i>	Kronik Böbrek Hastalığı
<i>KBY:</i>	Kronik Böbrek Yetmezliği
<i>KDGIO:</i>	Kidney Disease Global Improving Outcomes
<i>KDR:</i>	Kinaz İnseren Domain Reseptör
<i>KG:</i>	Kilogram
<i>KGF:</i>	Keratinosit Büyüme Faktörü
<i>KH:</i>	Kök Hücre
<i>Kİ:</i>	Kemik İliği
<i>KİKH:</i>	Kemik İliği Kökenli Kök Hücre
<i>KRE:</i>	Kreatinin
<i>LDL:</i>	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
<i>LKTC4:</i>	Lökotrien C4
<i>LKTD4:</i>	Lökotrien D4
<i>MCP-1:</i>	Monosit Kemoatraktan Protein-1
<i>MG:</i>	Miligram
<i>MHC:</i>	Major Histokompatibilite Kompleks
<i>MKH:</i>	Mezenkimal Kök Hücre
<i>ML:</i>	Mililitre
<i>MMP:</i>	Matriks Metalloproteinazları
<i>NADP:</i>	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<i>NF-κB:</i>	Nükleer Faktör Kappa B
<i>NO:</i>	Nitrik Oksit
<i>NOD:</i>	Non-obez-diyabetik
<i>NOS:</i>	Nitrik Oksit Sentaz
<i>O<sub>2</sub>:</i>	Oksijen Molekülü
<i>P:</i>	P-Değeri
<i>PAG:</i>	Fosfoaçil Gliserol
<i>PAH:</i>	Periferik Arter Hastalığı

<i>PBS:</i>	Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (Phosphate Buffered Saline)
<i>PDGF:</i>	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
<i>PG:</i>	Pikogram
<i>PGD2</i>	Prostaglandin D2
<i>PGE1:</i>	Prostaglandin E1
<i>PGE2:</i>	Prostaglandin E2
<i>PGF2<math>\alpha</math>:</i>	Prostaglandin F2 $\alpha$
<i>PGH2:</i>	Prostaglandin H2
<i>PGI2:</i>	Prostaglandin I2
<i>PGF:</i>	Plasental Büyüme Faktörü
<i>PKC:</i>	Protein Kinaz C
<i>PLA:</i>	İşlenmiş Lipoaspirat (Processed lipoaspirate)
<i>PMNL:</i>	Polimorfonükleer Lökosit
<i>pO<sub>2</sub>:</i>	Kısmi Oksijen Basıncı
<i>RAS:</i>	Renin Anjiotensin Aldosteron
<i>SDH:</i>	Sorbitol dehidrogenaz
<i>SLR:</i>	Single Lens Refleks
<i>SSS:</i>	Santral Sinir Sistemi
<i>STZ:</i>	Streptozosin
<i>SVF:</i>	Stromal Vasküler Fraksiyon
<i>uM:</i>	Mikrometre
<i>TGF<math>\alpha</math>:</i>	Transforme Edici Büyüme Faktörü $\alpha$
<i>TGF<math>\beta</math>:</i>	Transforme Edici Büyüme Faktörü $\beta$
<i>TKR:</i>	Tirozin Kinaz Reseptörü
<i>TMB:</i>	Tetrametilbenzidin
<i>TNF<math>\alpha</math>:</i>	Tümör Nekroz Faktörü $\alpha$
<i>TSH:</i>	Tiroit Uyarıcı Hormon
<i>VEGF :</i>	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
<i>VEGFR-1:</i>	VEGF reseptörü-1
<i>VEGFR-2:</i>	VEGF reseptörü-2
<i>VEGFR-3:</i>	VEGF reseptörü-3



## ŞEKİLLER

- Şekil 2.1: Derinin makrosirküler ve mikrosirküler dolaşımı.
- Şekil 2.2: İskemi reperfüzyon hasarı.
- Şekil 2.3: Bazı dorsal deri flebi modelleri
- Şekil 2.4: Dünyadaki diyabet nüfusunun 2025 yılı tahmini değerleri.
- Şekil 2.5: Mikrovaskülopati etiyolojisi.
- Şekil 2.6: Polyol yolu
- Şekil 2.7: Diyabetik nefropatinin patogenezi
- Şekil 2.8: Diyabette endotel hasarı ve aterosklerozis gelişme mekanizması
- Şekil 2.9: STZ'nin pankreas hücrelerindeki hasar mekanizması.
- Şekil 2.10: KBH risk değerlendirilmesi.
- Şekil 2.11: L-arjininden NO sentezi.
- Şekil 2.12: 5/6 Nefrektomi.
- Şekil 2.13: Embriyojenik kök hücreler
- Şekil 2.14: Kemik iliği kökenli kök hücrelerin farklılaşma ürünleri
- Şekil 2.15: Hematopoetik hücrelerin değişimi.
- Şekil 2.16: Kıl folikülü çevresinde kök hücreler.
- Şekil 2.17: Umblikal kord kökenli kök hücreler
- Şekil 2.18: Nöral kök hücrelerin kültüre şekli
- Şekil 3.1: Flebin tasarlanması
- Şekil 3.2: Flebin kaldırılması.
- Şekil 3.3: Flebin cilt üzerine tespit edilmesi
- Şekil 3.4: STZ sonrası post operatif 48. Saatte glukometri cihazıyla kan şekeri ölçülmesi.
- Şekil 3.5: Sağ nefrektomi için insiyon ve cilt ekartasyonu
- Şekil 3.6: Sağ böbrek kapsülünün soyulması ve nefrektomi
- Şekil 3.7: Sol böbreğin ortaya koyulması ve kapsül diseksiyonu
- Şekil 3.8: Sol 2/3 nefrektomi ve hemostaz
- Şekil 3.9: İnguinal yağ dokusu eksizyonu ve tartılması
- Şekil 3.10: Yağ dokusunun parçalanması.

- Şekil 3.11: Kollajenaz sonrası vortekste çalkalama ve kontrol medium eklenmesi.
- Şekil 3.12: Santrifüj sonrası tıp dibinde kalan stromal vasküler fraksiyon.
- Şekil 3.13: Thoma lamında hücreler.
- Şekil 3.14: DiI çözeltisinin hazırlanması ve +4°C’de tüplere aktarılması.
- Şekil 3.15: Flep altına SVF enjeksiyonu..
- Şekil 3.16: Adobe Photoshop 7.0 programında canlı alan yüzdesi hesaplanması.
- Şekil 3.17: Sol ventriküle girilerek baryum enjekte edilmesi.
- Şekil 3.18: Enjeksiyon sonrası karaciğerde beneklenme.
- Şekil 3.19: Mikroanjiografinin Adobe Photoshop 7.0 programında sayılması
- Şekil 4.1: Gruplardaki hayvanların ağırlık değişimlerini gösteren grafik.
- Şekil 4.2: Grup I’deki iki sıçanın postoperatif 7.gün flebinin görüntüsü.
- Şekil 4.3: Grup II’deki sıçanın postoperatif 7.gün flebinin ön ve arkadan görüntüsü.
- Şekil 4.4: Grup III’deki iki sıçanın postoperatif 7.gün flebinin görüntüsü.
- Şekil 4.5: Grup IV’deki sıçanın postoperatif 7.gün flebinin ön ve arkadan görüntüsü
- Şekil 4.6: Grupların canlı alan yüzdelerinin karşılaştırılması
- Şekil 4.7: Grup III’deki hayvanların haftalara göre böbrek fonksiyonlarındaki değişim
- Şekil 4.8: Grup IV’deki hayvanların haftalara göre böbrek fonksiyonlarındaki değişim.
- Şekil 4.9: Grupların kan VEGF seviyeleri ortalamasını gösteren grafik
- Şekil 4.10: H&E ve CD31 boyalı kesitlerde kapiller dansite ölçümü
- Şekil 4.11: Grupların kapiller dansite ortalamasını gösteren grafik
- Şekil 4.12: DiI pozitif endotelin ışık ve immunflorasan mikroskopik görüntüsü
- Şekil 4.13: DiI pozitif endotelin ışık ve immunflorasan mikroskopik görüntüsü
- Şekil 4.14: Gruplardaki fleplerin mikroanjiografik görüntüsü
- Şekil 4.15: Mikroanjiografilerde sayılan damarların grafiksel karşılaştırılması
- Şekil 4.16: H&E boyalı kesitlerinde sağlıklı böbrekle KBH’li böbreğin karşılaştırılması
- Şekil 4.17: Glomerüler alan artışını gösteren grafik

## TABLULAR

Tablo 2.1: Flep Sınıflandırması

Tablo 2.2: Flep Yaşayabilirliğinin Arttırılmasına Yönelik İşlemler

Tablo 2.3: Neovaskülarizasyondan sorumlu bazı sinyal proteinleri

Tablo 2.4: VEGF salınımını etkileyen faktörler

Tablo 2.5: Hipergliseminin etiyolojik nedenleri.

Tablo 2.6: KBH etiyolojisi

Tablo 2.7: KBH için tanı kriterleri

Tablo 2.8: KBH evreleri

Tablo 2.9: Üremik sendromun multisistemik etkileri

Tablo 2.10: Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücreler

Tablo 2.11: Kök hücre kaynağı dokular.

Tablo 2.12: Mezenkimal kök hücre kaynakları.

Tablo 2. 13:Adipoz kökenli kök hücre yüzey belirteçleri.

Tablo 2.14:Kök hücre farklılaşma protokolleri.

Tablo 3.1: Deneyde kullanılan farmakolojik maddeler.

Tablo 3.2: Stromal vasküler fraksiyon elde etmede kullanılan kimyasal maddeler.

Tablo 3.3: Deneyde kullanılan cerrahi malzemeler.

Tablo 4.1: Grupların deney başlangıcı ve sonrasındaki ağırlıkları.

Tablo 4.2: Grup I'deki sıçanların canlı alan yüzdeleri.

Tablo 4.3: Grup II'deki sıçanların canlı alan yüzdeleri.

Tablo 4.4: Grup III'deki sıçanların canlı alan yüzdeleri.

Tablo 4.5: Grup IV'deki sıçanların canlı alan yüzdeleri.

Tablo 4.6: Grup II'deki sıçanların STZ öncesi ve enjeksiyon sonrası 48. saat kan şekerleri

Tablo 4.7: Grup III'deki sıçanların STZ öncesi ve enjeksiyon sonrası 48. saat kan şekerleri

Tablo 4.8: Grup III'deki sıçanların 5/6 nefrektomi öncesi ve sonrasındaki 3.hafta ve 6. Hafta kan BUN, kreatinin ve Hemoglobin seviyerleri.

Tablo 4.9: Grup III'deki sıçanların 5/6 nefrektomi öncesi ve sonrasındaki 3.hafta ve 6. Hafta kan BUN, kreatinin ve Hemoglobin seviyeleri.

Tablo 4.10: Grupların kan VEGF seviyelerinin ortalaması

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabet ve kronik böbrek yetmezliği günümüzde önemli toplumsal sağlık sorunlarıdır. Bu hastalıkların neden olduğu komplikasyonlar hastaların hayat kalitesini ciddi şekilde azaltarak, morbidite ve mortalitelere neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu iki hastalığın da yara iyileşme mekanizmalarında bozulmaya yol açarak kronikleşen ve ülserleşen yaralara zemin hazırladığı gösterilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda bu iki hastalığın birlikte görüldüğü hasta gruplarında, ekstremitte kayıplarına yol açan yara oranlarının daha fazla olduğu ve klinik seyrin daha dramatik olduğu bildirilmiştir. Plastik Cerrahi pratiğinde diyabet ve kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda gelişen kronik yaraların iyileştirilmesi ve rekonstrüksiyonu güç ve zorlayıcıdır. Yüksek flep kaybı oranları, bu yaraların kapatılması aşamasında cerrahi rekonstrüksiyon seçenekleri içerisinde daha seçici dikkatli veya konservatif olmaya zorlamaktadır. Bu hasta gruplarında cerrahi başarıyı arttıracak veya alternatif olabilecek büyüme faktör uygulamaları, hücresel tedavilerle ilgili çalışmalar devam etmektedir. Flep yaşayabilirliğinin artırılmasına yönelik çalışmalar ise plastik cerrahi alanındaki araştırmalarda ön sıralarda yer almaktadır. Son yıllarda flep yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiş ve popülerliği artan bir alan kök hücre çalışmalarıdır.

Kök hücre, bir canlının vücudunda çok uzun bir süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen ve bu sayede farklılaşmış hücreler oluşturabilen hücrelere verilen addır. Kök hücreler aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Bunu belirleyen en önemli etkenler genler ve dış uyaranlardır. Kök hücreler mezenkimal ve embriyonel olarak 2 gruba ayrılır. Mezenkimal kök hücreler (MKH), erişkin kök hücre tipidir. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde buldukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar. MKH kaynakları kemik iliği ve adipöz dokulardır. Yapılan son çalışmalarda kemik iliğinden elde edilen kök hücreler ile yağ hücrelerinden elde edilen kök hücrelerden zengin stromal vasküler fraksiyonun differansiasyon kapasitelerinde fark olmadığı gösterilmiştir.

Literatürde, kök hücrelerin neovaskülarizasyonu arttırarak flep yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir. Diyabetik farelerde flep yaşayabilirliğinin arttırıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Kök hücrelerin diyabet ve üremi ortamlarındaki etkisi üzerine deneysel çalışmalar bulunmaktadır. Fakat klinikte önemli sayıda hasta grubunu oluşturan ve yüksek flep kayıp oranlarının görüldüğü kronik böbrek yetmezlikli ve diyabet ile kronik böbrek yetmezliğinin beraber görüldüğü hastalardaki flep canlılığı üzerine bir kök hücre çalışması bulunmamaktadır.

Bu çalışmada; diyabetik, kronik böbrek hastalığı ve her iki hastalığı olan sıçanlarda adipoz dokudan hazırlanan stromal vasküler fraksiyonun deri flepleri yaşayabilirliği üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 FLEPLER

Dolaşımını sağlayan vasküler pedikülüyle birlikte alıcı sahaya transfer edilen doku segmentine flep denir. Plastik cerrahinin temel prensiplerinden olan flep cerrahisinde hedef, primer onarılamayacak vaskülaritesi yetersiz bir alandaki defekti, güvenilir bir kanlanmayla kapatmak, ekspoze nörovasküler yapıları ve alloplastik materyalleri örtmek, fonksiyonel doku aktarımı sağlamak (fonksiyonel kas transferi) ve estetik bütünlüğü korumaktır [1]. Flepler kanlanma şekillerine, içerdikleri dokulara, buldukları yere ve aktarılma hareketlerine göre sınıflandırılabilirler (Tablo 1.1). Sınıflamalar farklılık gösterse de esas hedef doğru planlamayla, rekonstrüksiyon hedeflenen alanın kapatılmasıdır. Planlamaların ise en önemli dayanaklarından bir tanesi, flebi yaşayabilir kılan flep dolaşımıdır. Bu bağlamda flep dolaşımı ve fizyolojisinin anlaşılması gerekmektedir.

Tablo 1.1 Deri Fleplerin Sınıflandırılması

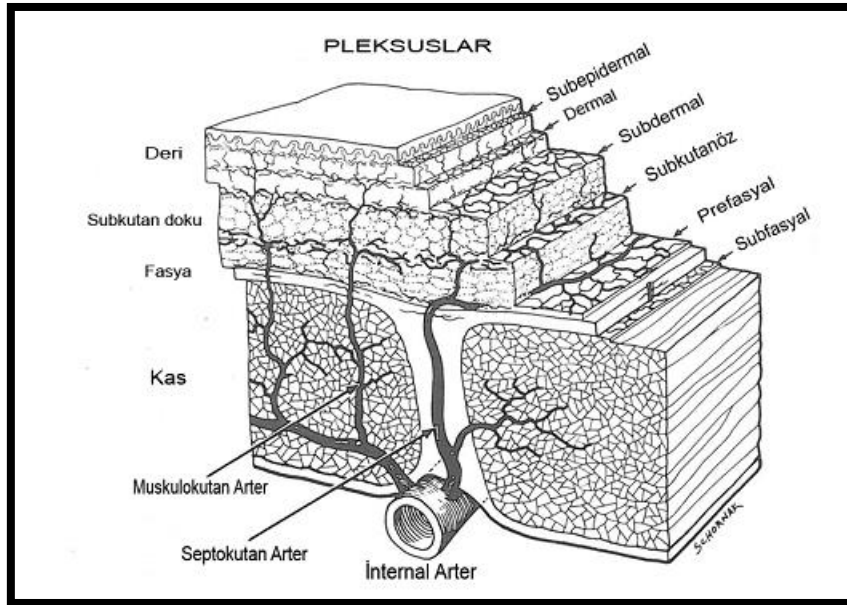
<b>Dolaşıma Göre</b>	<b>İçeriğine Göre</b>	<b>Hareketine Göre</b>	<b>Bulunduğu Yere</b>
Random	Kutanöz	İlerletme	Lokal
Aksiyel	Fasiyokutanöz	Pivot Nokta Eksenli (Rotasyon, transpozisyon)	Bölgesel
	Muskulokutanöz	İnterpolasyon	
	Osteomuskulokutanöz		Uzak-direk-indirek

#### 2.1.1 Flep Dolaşımı

Flep dolaşımı, flebe kan getiren ana arteriyel sistem (makrosirkülasyon) ve flebin intrinsik kan dolaşımı (mikrosirkülasyon) olarak iki ana başlıkta incelenebilir.

## Makrosirkülasyon

Taylor'un kadavrular üzerinde yaptığı çalışmalar neticesinde, ana kaynak arter ve bu arterden çıkan perforatörlerin beslediği cilt ve cilt altı derin dokuları içeren üç boyutlu kompozit anjiozom kavramı tanımlanmıştır [2]. Bu kavrama göre bütün cilt anjizomlardan oluşan bir damar ağıyla beslenir. Flepler tek bir anjiozomdan beslenebileceği gibi sıklıkla birkaç anjiozom alanını içerirler. Anjizomlar arasında gerçek arteriyel anastomozların yanında iskemi gibi durumlarda devreye giren daha düşük kalibreli damarlar (choke damarlar) da mevcuttur. Cilt, bu kavram çerçevesinde direk ve indirek kutanöz damarlarla beslenir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Derinin makrosirküler ve mikrosirküler dolaşımı

**Direk Kutanöz Damarlar:** Kaynak arterden çıkan veya kaynak arterin kasa uzanan dallarından kasa girmeden ayrılarak cilde direk olarak uzanan perforan septokutanöz damarlardır. Cildin esas beslenmesini sağlar. Septokutanöz perforatör flepler bu damarlar temel alınarak kaldırılır.

**İndirek Kutanöz Damarlar:** Kaynak arterin kas içerisinde bulunan ve kas fasyasını deldikten sonra cilde uzanan perforatörleridir. Sıklıkla sırt ve göğüs ön duvarı gibi geniş kası yüzey

alanı olan bölgelerde bulunurlar. Muskulakutanöz perforatör flepler bu damarlar baz alınarak planlanırlar.

### **Mikrosirkülasyon**

Direk ve indirek deri perforatörleri cilt ve cilt altında bulunan subepidermal, dermal, subdermal, subkutanöz damar ağlarında dağılırlar. Mikrodolaşımda, arteriol, kapiller, arteriovenöz anostomoz ve venüller vardır [3]. Flebin perfüzyonu ve metabolik temizlenmesi bu seviyede gerçekleşir. Arterioller kan akımının regüle edildiği seviyedir. İçerdiği düz kas dokusu sayesinde nörojenik ve vazoaaktif mediatörlere duyarlıdır. Bir flep besleyici artere ne kadar yakınsa mikrodolaşımı o kadar iyi olur. Bu nedenle bilinen bir arterle beslenen aksiyel flepler, random fleplere göre daha güvenilirdir ve daha uzun planlanabilir.

#### **2.1.2 Flep Kan Akımının Düzenlenmesi**

Flep kan akımında sistemik ve lokal faktörler etkilidir. Sistemik faktörler, sempatik sinir sistemi ve vazoaaktif mediyatörlerdir. Sempatik tonus artışı olduğunda flepte kan akımı artar ve prekapiller sfinkterler kasılarak kan akımını arteriovenöz anostomozlara yönlendirerek kapilleri bypass etmesine sebep olur. Flep kaldırıldığında flep sempatik tonusunu kaybeder, damarlardan vazokonstriktif ajanlar salınır ve perfüzyon basıncı da düşerek flep iskemik hale gelir [4]. Arteriovenöz shunt sonrası gelişen kapiller dolaşım yetersizliği, flep distalindeki iskemi ve nekrozlarda etkilidir [5]. Lokal faktörleri ise flebin sıcaklığı, asidoz, hipoksi gibi nedenlerdir.

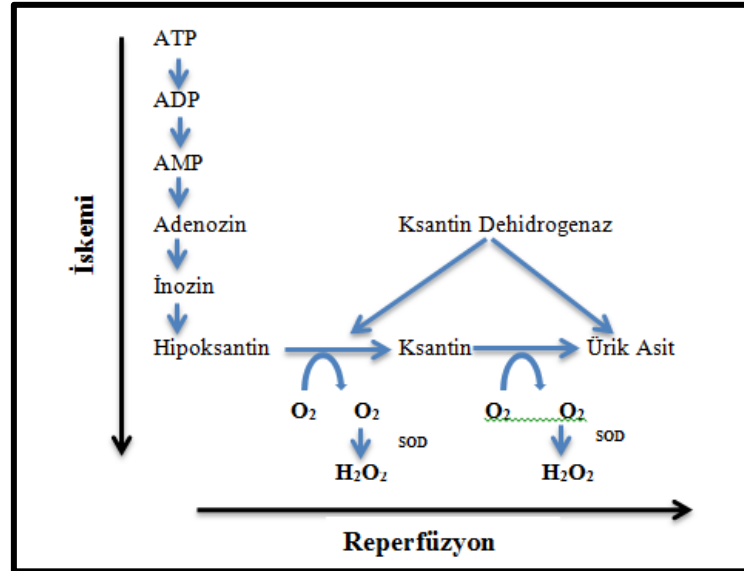
#### **2.1.3 Flep Nekrozu**

Flebin iskemiye direnci, kaybedilecek flep miktarını belirler ve bu direnç multifaktöryeldir. Örneğin kas dokusunun metabolik ihtiyacı daha fazla olduğu için iskemiye toleransı deri fleplerinden azdır. Yapılan çalışmalarda flep nekrozuna neden olan gösterilmiş faktörler; flep perfüzyon basıncında düşme [5], venöz yetmezlik [6] yavaşlamış mikrosirkülasyon sonrası intravasküler trombozlar [7], oksijen radikal hasarı ve iskemi reperfüzyon hasarı olarak özetlenebilir.



## 2.1.4 Serbest Radikaller ve İskemi Reperfüzyon Hasarı

Flepteki iskemik bölge, metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için anaerobik metabolizmaya geçiş yapacak ve bunun neticesinde, flepteki oksijen, glukoz ve ATP seviyesi düşerek laktik asit, karbon dioksit ve toksik oksijen radikalleri artacaktır [8]. Serbest oksijen radikalleri, hücre membranında lipid peroksidasyonu yaparak hücre permeabilitesini bozar. Direk etkiyle sitotoksik hasar yapabildiği gibi nötrofilleri bölgeye çeken bir kemoatraktan olarak mevcut hasarı daha da arttıran enflamatuvar bir faz başlatırlar. Bu tabloya neden olan süperoksit anyonu, reoksijenizasyon sonrasında ATP ürünü olan hipoksantin ksantin oksidazla oksidasyonu sonrasında oluşmaktadır (Şekil 2.2). Yapılan çalışmalarda iskemik fleplerde ksantin oksidaz seviyesi yüksek bulunurken, hücrenin serbest oksijen radikallerinden korunmasını sağlayan süperoksit dismutaz azalmış gösterilmiştir [9]. Ratlarda yapılmış başka bir çalışmada süperoksit dismutazın flep nekrozunu azalttığı gösterilmiştir [10] İskemi reperfüzyon hasarında etkili olan diğer bir yolak ise lipooksijenaz yoludur. Bu yolun ürünleri olan araşidonik asit türevleri kemoatraktandır ve nötrofil hasarına katkıda bulunurlar. Bu yolun inhibisyonuna yönelik çalışmalarda (Prostosiklin analogları verilmesi) , flep yaşayabilirliğinin artmış olduğu gösterilmiştir. [11]



Şekil 2.2 İskemi reperfüzyon hasarı

## 2.1.5 İskemik Ön koşullandırma ve Flep Yaşayabilirliğinin Arttırılması

İskemik ön koşullandırma, flepte nekroza neden olmayacak bir iskemi yaratarak flebin iskemiye direncini arttırma felsefesine dayanır. Bu prensibin cerrahi uygulaması ‘‘Delay Fenomeni’’dir. Flepte cerrahi öncesinde yaratılan 3 saatlik iskeminin, Taylor’un tanımladığı kalibresi düşük veya kapalı choke damarlarda vazodilatasyon yaratarak flebin beslenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Sempatik liflerin kesilmesine bağlı sempatik tonus vazodilatasyona katkıda bulunur. Flepte yaratılan iskemi aynı zamanda anjiogenezi tetikler. Sıklıkla kan dolaşımının flep alanını beslemesinden şüphe edilen durumlarda yapılan delay fenomeninde nihai operasyon için bekleme süresi klinik pratikte 2 ile 3 hafta arasında değişmektedir [12].

Bir başka hipotez ise K-ATP kanallarını fosforilasyon yapan protein kinaz C yoluyla ön koşullandırmanın gerçekleştiği yönündedir. Bu aktivasyonu gerçekleştiren Adenozin’in flepte iskemi benzeri durum yarattığı ve flep sağkalımını anlamlı ölçüde arttırdığı gösterilmiştir [13].

Flep yaşayabilirliğini arttırmayı hedefleyen çalışmalar, plastik cerrahide popülerliğini hiç kaybetmemiştir. Literatürdeki bu zengin bilgi, ön koşullandırmayı sağlayacak olan yöntemlerin mekanizmalarına göre sınıflandırılabilir. Konvansiyonel cerrahi geciktirme yöntemindeki hedef; mevcut choke damarlarda vazodilatasyon reoryantasyon ve yeni damar oluşumu sağlamaktır. Genel olarak farmakolojik ajanlar iskemi reperfüzyon hasarı önlenmesi, iskeminin taklit edilmesi için kullanılmışken, büyüme faktörü ve hücresel tedaviler ise flepte yeni damar oluşumunun sağlanması hedefli kullanılmış ve denenmiştir. Tanımlanan birçok yöntemden önemli olanları ve etki mekanizmaları Tablo 2.2’ de gösterilmiştir.

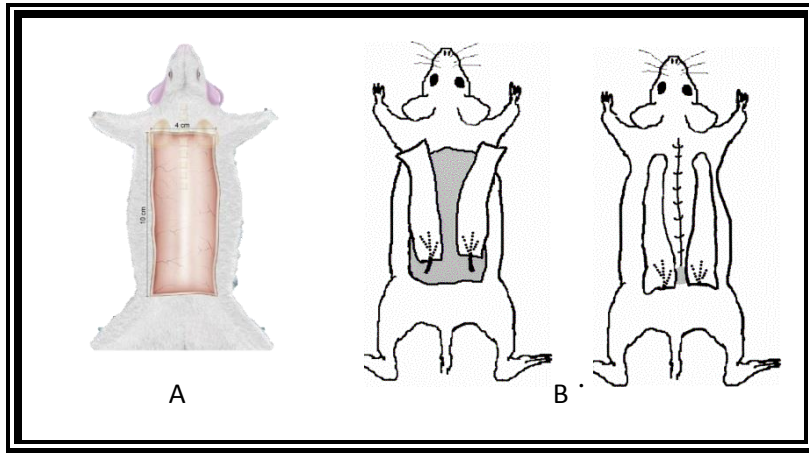
Tablo 2.2 Flep Yaşayabilirliğinin Arttırılmasına Yönelik Farmakolojik ve Cerrahi Yöntemler [14]

YÖNTEM	ETKİ MEKANİZMASI
Cerrahi Geciktirme	Mikrodolaşımın artması, yeni damar oluşumu
Dekstran Heparin	Mikrodolaşımın artması
Verapamil Isoksuprin	Vazodilatasyon
PG analogları Deksametazon Adenozin Ksantin analogları Ksantinoksidaz inhibitörleri Kalsitonin ilişkili peptid	Antienflamatuvar
Monofosforil Lipid A	Hafif enflamasyon oluşturulması
Eritropoietin	Antienflamatuvar, antiapoptotik
İndometazin, Lökotrien B4 antagonisti Tromboksan A2 sentaz inhibitörü	Antienflamatuvar
Siklosporin A Takrolimus (FK 506)	Nötrofil kemotaksisinin engellenmesi
Hipotermi	Metabolizmanın düşürülmesi
Hipertermi	Isı Şok Proteinleri
VEGF	Yeni damar oluşumu
Hücresele Tedaviler	Yeni damar oluşumu

### 2.1.6 Sıçanda Deneysel Random Flep Modelleri

Deneysel flep modelleri sıçanlarda flep fizyolojisinin daha iyi anlaşılması, flep yaşayabilirliğinin cerrahi farmakolojik ve hücresele yöntemlerle artırılabilmesine yönelik birçok çalışmaya imkân sağlamıştır. Anlamli ve tutarlı nekroz oranlarının sağlanması için birçok model tanımlanmış olsa da insan anatomisi ile arasındaki farklılıklar nedeniyle standart sonuç elde edilebilecek bir flep modeli yoktur.

Sıçanlarda ilk flep modeli 1965 yılında Mc Farlane tarafından yayınlanmıştır. Bu flep kranyal tabanlı pannikulus karnozusu içeren, derin fasya seviyesinde kaldırılan dorsal deri flebidir. Boyutları 10x4 cm olan flebin sınırları yukarıda alt skapular açı, aşağıda krista iliaka olarak belirlenmiştir. Mc Farlane'nin bu yayınından sonra birçok deneysel dorsal deri flepleri tanımlanmıştır. Bu flepler boyutları 2x7 cm ile 5x10 cm arasında değişen kranyal ya da kaudal tabanlı fleplerdir. Conoyer ve Toomey fleplerdeki öngörülemeyen nekrozları araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada nekrozun sıçan boyutuyla ilişkili olmadığını göstermişlerdir. Khouri taban genişliği 3 ve 4 cm olmak üzere, kranyal ve kaudal tabanlı flepler hazırlamıştır [15]. Ichioka ve ark. kontrol grubunu aynı hayvan üzerinde olmasına fırsat tanıyan çift dorsal flebi tanımlamışlardır [16] (Şekil 2.3). İstatiksel analizler dar kaudal bazlı fleplerde nekrozun standart sapmasının daha düşük olduğunu göstermiştir [17].



Şekil 2.3 Bazı dorsal deri flep modelleri. A. Mc Farlane Khouri modifikasyonu B. Ichioka çift dorsal deri flebi

## 2.2 YENİ DAMAR OLUŞMASI (NEOVASKÜLARİZASYON)

Neovaskülarizasyon için esas uyarıcı, dokuya taşınan besin maddesi ve oksijen miktarı ile dokunun metabolik ihtiyacı arasındaki uyumsuzluktur. Bu uyumsuzluk, anabolik aktivite artışı (ör. anabolik steroid kullanımı), katabolik aktivite artışı (ör. hipertiroidi) ve hipoksi durumlarında yeni damar oluşumuna sebep olur. Yeni damar oluşumu üzerinde mekanik gerilimin (shear forces) etkisi de vardır. Mekanik gerilim uygulamasının kapiller yatakta artışa neden olduğu gözlenmiştir. Egzersiz ile çizgili kaslarda yeni damar oluşumu, doku genişletici uygulamasından sonra görülen damarlanma artışı buna örnektir [18].

Yeni damar oluşumu sırasında endotel hücre çoğalması ve göçü, en temel rolü oynar. Endotel hücreleri, endotelyal progenitor hücrelerden (EPH) farklılaşarak, bazı büyüme faktörleri ve onların reseptörleri tarafından kontrol edilen bir mekanizmayla ihtiyaç olan alana göç ederler.[19] İntrauterin dönemde bu programlanmış bir olayken, doğum sonrası hayatta hipoksi, vaskülogenezisin en önemli uyarıcıdır. Yapılmış çalışmalarda neovaskülarizasyonla ilgili birçok faktör tanımlanmıştır (Tablo 2.3). Bu faktörlerden en iyi tariflenmiş olanı vasküler endotelyal growth faktördür (VEGF) [20].

Tablo 2.3 Neovaskülarizasyondan sorumlu bazı sinyal proteinleri

	<b>Aktive Eden</b>	<b>Etkisi</b>
<b>VEGF</b>	Hipoksi	EPH göçü, damar oluşumu, mitojenik, monosit aktivasyonu
<b>Anjiopoetin</b>	Hipoksi	EPH damar matriksine yapışması
<b>Hipoksi Induced Faktör HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hipoksi	EPH göçü, VEGF salınması
<b>Nitrik Oksit(NO)</b>	Mekanik güçler	Damar ağının şekillenmesi

### 2.2.1 Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)

Embriyolojik çalışmalarda vasküler sistemin ve organların oluşumunda, anjiyoplast göçünün VEGF tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. VEGF'nin 2 reseptörü vardır; VEGF Reseptörü 1 (VEGFR-1) ve VEGF Reseptörü 2 (VEGFR-2). Bunlardan, sinyal yolunda görev alan esas reseptör VEGFR-2'dir. Erişkin dönemde, EPH'nin göç etmesi ve tüp yapıları meydana getirmesinde, embriyoda olduğu şekilde, VEGFR-2 ve VEGFR-1 reseptörleriyle birlikte VEGF'nin temel görevi üstlendiği gösterilmiştir [21].

Tablo 2.4 VEGF sentezini etkileyen faktörler [14]

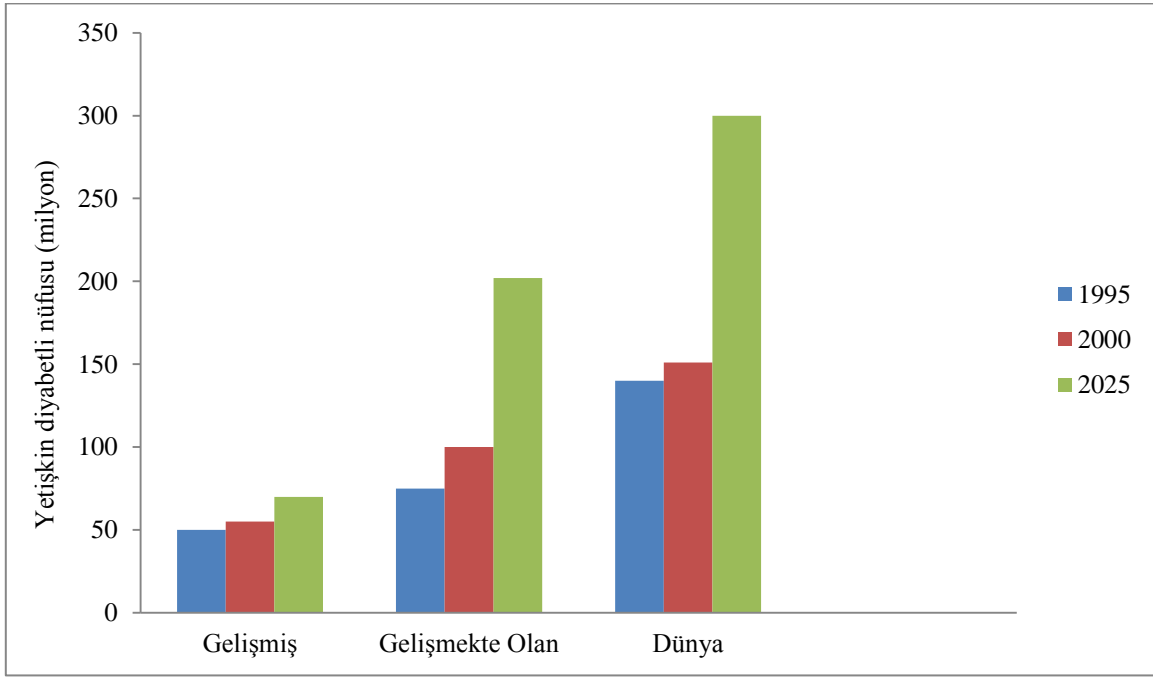
VEGF Sentezini Etkilediği Gösterilmiş Faktörler
<ul style="list-style-type: none"><li>• Hipoksi / İskemi</li><li>• Hiperbarik oksijen tedavisi</li><li>• VAC tedavisi</li><li>• Büyüme faktörleri<ul style="list-style-type: none"><li>○ EGF, TGF-<math>\alpha</math>, TGF-<math>\beta</math>, KGF, IGF-I, FGF, PDGF</li></ul></li><li>• Sitokinler</li><li>• IL-1, IL-6</li><li>• Hormonlar</li><li>• TSH, ACTH, gonadotropinler, östrojen, testosteron</li><li>• Oksidanlar<ul style="list-style-type: none"><li>○ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li></ul></li><li>• Mekanik gerilim</li></ul>

VEGF, monosit aktivasyonu yaparak immun sistemi aktive edici rol oynar [22]. Monosit ve nötrofil kemotaksisini artırır. Damarlarda vazodilatasyona neden olur. Bazı büyüme faktörleri, VEGF sentezini artırmaktadır, bunların önemli olanları: EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  keratinosit büyüme faktörü (KGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I), FGF ve PDGF'dir. IL-1 ve IL-6, VEGF gen ekspresyonunu artıran enflamatuvar sitokinlerdir. Bu durum, VEGF'nin enflamatuvar durumlarda, damar geçirgenliğindeki ve anjiyogenezdeki artıştan sorumlu olduğunu düşündürmektedir [23]. VEGF sentezini etkileyen faktörler Tablo 2.4'de gösterilmiştir.

## 2.3 DİYABET

### 2.3.1 Tanım

Diyabetes Mellitus (DM), insülin direnci, insülinin etki mekanizmasındaki bir bozukluk ya da bunların birlikteliği neticesinde görülen, hiperglisemi ve glikoz intoleransı ile seyreden bir sendromdur [24]. Hiperglisemik çevrede karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasının bozulması ve ara ürünlerin yol açtığı patolojiler, bu hastalığı ciddi bir sağlık sorunu haline getirmektedir. Tüm dünyada diyabetli yaklaşık 250 milyon hasta olduğu tahmin edilmektedir. Yanlış beslenme ve sedanter yaşamın yol açtığı artan obeziteye sekonder gelişen insülin direnci ile bu rakamın 2025 yılında 300 milyon olması beklenmektedir [25] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Dünyadaki diyabetli nüfusun 2025 yılı tahmini göstergesi [25]

### 2.3.2 Diyabet Sınıflandırması

Hastalık normoglisemik durumdan hiperglisemik duruma kadar bir çerçevede etiyojisine göre sınıflandırılabilir. Hastalarda hiperglisemik durum başlamamasına rağmen hastalık mevcut olabilir. Örneğin normoglisemik bir kişide otoantikörler bulunması otoimmün diyabet için bir tanı nedenidir. Bu bağlamda etiyojik sınıflandırma daha geniş bir yelpazeyi kapsayacaktır. (Tablo 2.5)

Tablo 2.5 Hipergliseminin etiyojik nedenleri

<b>Tip 1</b> ( <i><math>\beta</math>-hücre hasarı, insülin yetmezliği</i> ) Otoimmün İdiyopatik
<b>Tip 2</b> ( <i>insulin direnci veya sekretuar defektle seyreden insulin direnci</i> )
<b>Diğer Tipler</b> $\beta$ -hücre fonksiyonlarında genetik hasar İnsulin aktivitesinde genetik hasar Egzokrin pankreas hastalıkları Endokrinopatiler İlaçlar ve kimyasal ajanlar Enfeksiyonlar İmmuniteyle ilişkili diyabet Diyabetle seyreden genetik endokrin hastalıklar Gestasyonel diyabet



## **Tip 1 Diyabet**

Pankreas  $\beta$ -hücrelerinde yıkıma bağlı insülin yetersizliğiyle karakterize bir hastalıktır. İnsülin bağımlı bu hastalıkta, insülin yetmezliği sonucunda ketoasidoz, koma ve ölüm gibi çok ciddi komplikasyonlar görülebilir. Sıklıkla pediatrik ve adölesan yaş grubunda görülmeye başlanan Tip 1 diyabette otoimmün etiyolojiden, pankreas ada hücreleri antikoru (ICA) ve glutamat dekarboksiaz antikoru (anti-GAD) sorumludur [26].

## **Tip 2 Diyabet**

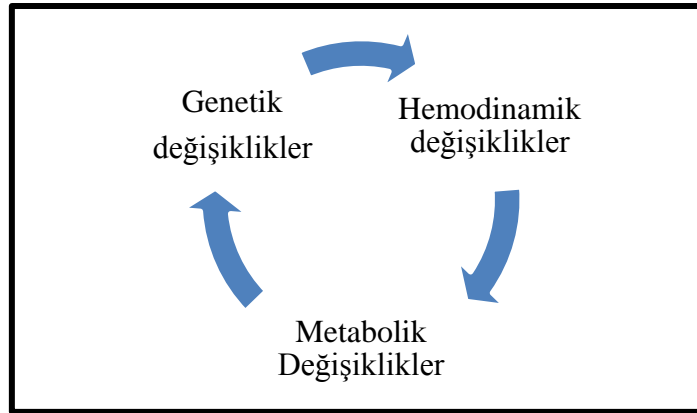
Diyabetin en sık görülen bu formunda sorumlu patoloji, periferik insülin direnci veya insülin sekresyonundaki yetersizliktir. Tip 1 diyabetin aksine hastalık insülin bağımlı değildir ve yaklaşık yüzde 50'sinde insülin tedavisi gerekmez. Tip 1 diyabetten farklı olarak hastalar sıklıkla orta veya ileri yaşta, santral obezitesi olan sedanter yaşayan hastalardır [27]. Hastalardaki mevcut insülin, normoglisemi sağlanması için yeterli olmamaktadır. Hipergliseminin farkedilebilir belirtileri ortaya çıkana kadar hastalar yıllarca tanı almayabilirler [28]. Bu hastalarda diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları görülme ihtimali yüksektir.

Tanı kan şekeri ölçümü, glukoz tolerans testi ve şeker yükleme testleriyle koyulur. Son veriler ışığında normoglisemi seviyesi (plasma açlık glukozu) 140 mg/dL 'den 110mg/dL'ye çekilmiştir [29]. Dünya Sağlık Örgütü diyabet tanısı için son yıllarda HbA1c ölçümünü önermektedir. HbA1c, glukozun bağlandığı bir hemoglobin varyantıdır. Kandaki 3-4 aylık glisemik düzeyi göstermesi açısından yükleme testlerine göre değerlidir. HbA1c seviyesi % 6.5'dan fazla olması diyabet tanısını koydurur. %5.7–6.5 artmış risk, %6.0–6.5 yüksek risk olarak değerlendirilir [30].

### 2.3.3 Diyabetin Mikrovasküler Komplikasyonları

Diyabetik hastalarda yaygın görülen böbrek hasarı, görme kayıpları, ekstremiteler ampütasyonları gibi ciddi komplikasyonların sebebi mikrovasküler hasardır. Glisemik kontrol ve mikrovasküler komplikasyonlar arasında sıkı bir bağ vardır. Bozulmuş kan şekeri regülasyonunda end organ hasarı görülme riski artar. Hipergliseminin tetiklediği metabolik yollar her end organ veya dokuda aynı değildir [31]. Bu yolların bilinmesi mikrovasküler komplikasyonları anlamak için faydalı olacaktır.

Geniş hasta gruplu klinik çalışmalarda, uzun süre bozulmuş kan şekere maruz kalmış hastaların şeker düzenlenmesi başarılı olsa da komplikasyonların gerilemesinde veya ilerlemesinde yeterli düzelme olmadığı tespit edilmiştir. Bunun sonucunda ‘‘metabolik hafıza’’ terimi gündeme gelmiştir. Metabolik hafıza, hayvan deneylerinde de gösterilmiş ve glisemik hayvanlardaki retinopati progresyonunun ada hücre transplantasyonuna rağmen düzelmediği gösterilmiştir [32]. Epigenetik düzeyde hipergliseminin histon proteinleri üzerinde değişikliklere neden olarak vasküler gen ekspresyonunu değiştirmesi, bu hafızadan sorumlu gösterilmiştir [33]. Mikrovasküler komplikasyonların sebeplerini genetik, metabolik ve hemodinamik değişiklikler olarak inceleyebiliriz (Şekil 2.5).



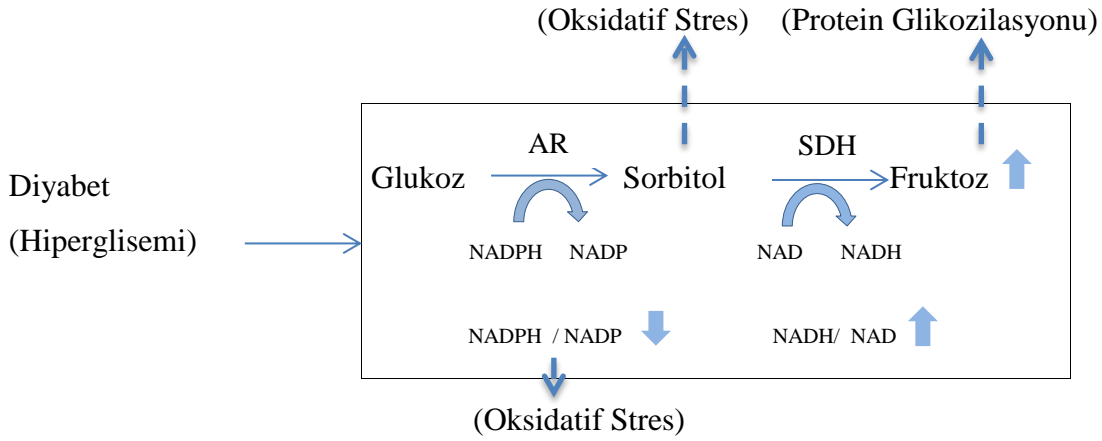
Şekil 2.5 Mikrovaskülopati etiolojisi.

**Genetik değişiklikler:** Hiperglisemik ortamda DNA ve protein katlanmasında görevli olan histon proteinlerinin metilasyonlarında bozulma olduğunu gösterilmiştir ve bu patolojinin

metabolik hafızada rolü olduğu düşünülmektedir [34]. Gen ekspresyonunda görev alan Mikro RNA'lardaki değişiklikler neticesinde artmış kollajen I ve fibronektin birikimi ve azalmış VEGF ekspresyonu diyabetik böbreklerde gösterilmiştir [35].

**Glukoz Metabolizmasındaki Değişiklikler:** Glukoz hücre içine girdiğinde glikolizle metabolize edilir. Glikolizde gerçekleşen glukoz-6-fostat, früktoz-6-fosfat dönüşümü, kan şekeri yüksek konsantrasyonda olduğunda son ürünler olan N-asetilglukozamin artmasına ve post translasyonel protein değişikliklerinde sebep olur. İleri glikolizasyon ürünleri post translasyonel protein modifikasyonları yaparak, hücre içi ve dışında proteinlerle çapraz bağlar kurabilirler, hücre reseptörlerine bağlanabilir, hücrede oksidatif hasarda görev olan enzimlerin yapısını bozabilirler, bazal membranlarda kollajen yapısına katılabilirler [36].

Aldoz redüktaz normoglisemide aldehytlerin detoksifikasyonunda görev alır. Hiperglisemide ise aldoz redüktaz; glukozu sorbitole pentoz fostat yolundan NADP-H ın katalizleği bir reaksiyonla dönüştürür (Polyol yolu). Bu işlem esnasında hücrenin anti oksidan görevi olan glutatyon peroksidaz tüketilir. Hücrede biriken sorbitol hücre ozmolaritesini değiştirir. Deneysel olarak aldoz redüktaz kullanımının diyabetik mikroanjiopatide faydalı olabileceği gösterilmiştir [37] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Polyol yolu. (AR:Aldoz redüktaz, SDH:Sorbitol Dehidrogenaz)

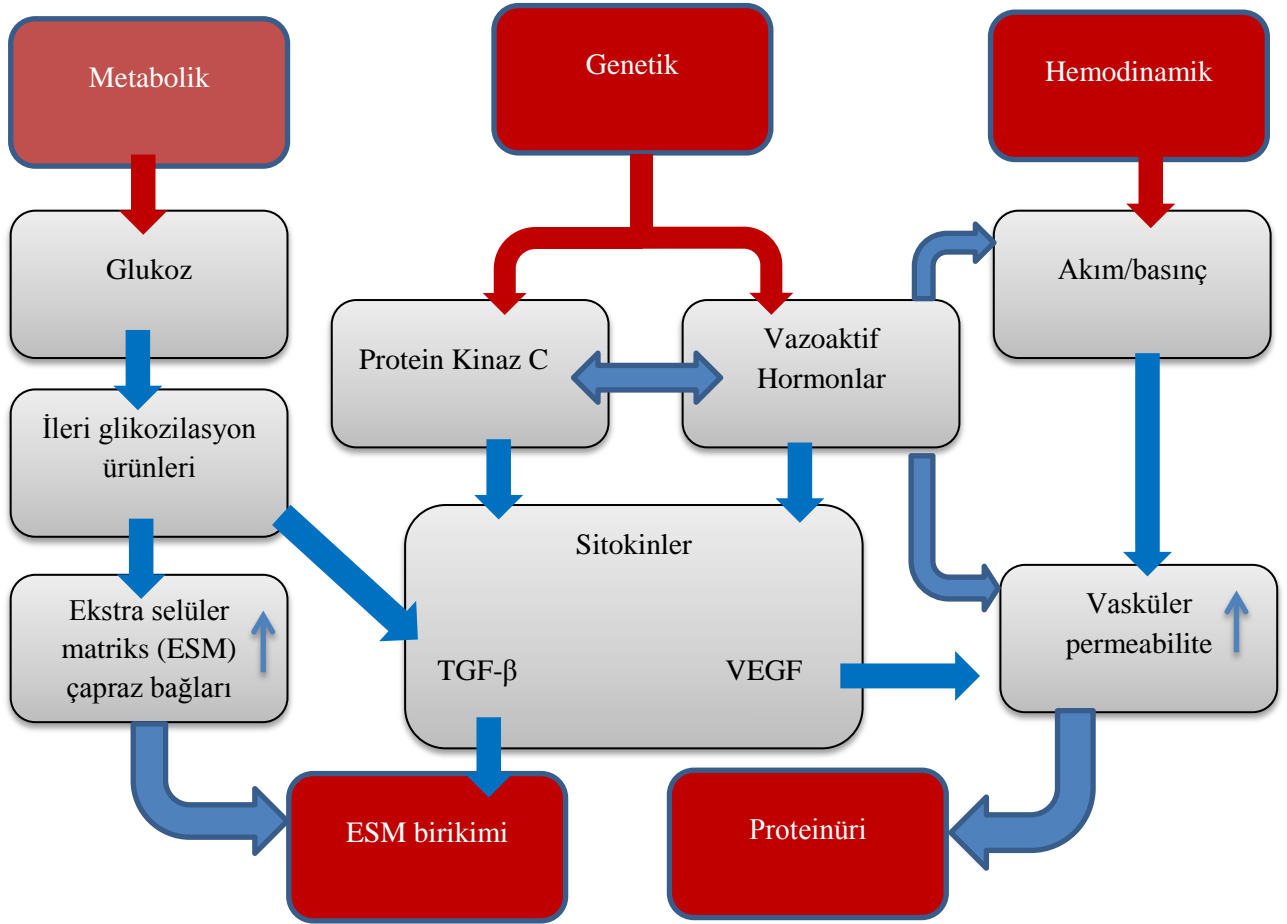
Diğer bir önemli yol Protein Kinaz C (PKC) yoludur. Hücre içi hiperglisemide glikoliz ara ürünlerinden olan gliseraldehit 3-fosfat, gliserol 3-fosfata indirgenir ve açillenir. Diaçilgliserol (DAG), PKC'nin aktivatörü olduğundan konsantrasyonunun artması enzimin aktivasyonuna yol açar. DAG primer olarak PKC'nin beta ve alfa izoformlarını aktive eder. PKC aktivasyonu sonucunda damar geçirgenliği artar, vazoaaktif hormonlar salınır, kan akımı değişiklikleri olur ve bazal membran sentezi artar.

### **2.3.3.1 Diyabetik Nefropati**

Diyabetik Nefropati; batı toplumundaki son dönem böbrek hastalığının yaklaşık yarısının nedenidir. Tip 1 ve Tip 2 diyabet olan hastaların yaklaşık 1/3'ünde karşılaşılmaktadır. Diyabet nedenli son dönem böbrek yetmezliğinin yüzde 90'ı Tip 2 diyabet nedenlidir. Bu oran artan obezite nedeniyle yükselme eğilimi göstermektedir. Glisemik kontrol, hastalığın önlenmesinde önemli olsa da son çalışmalar ilerlemiş evrelerdeki DM vakalarında pek etkisi olmadığını göstermiştir. Diyabetik böbrek hastalığı, albümin atılım hızında yükselme, glomerüler filtrasyon hızında (GFH) azalma ile tanımlanır [38].

Diyabetin süresi, yarattığı hemodinamik ve metabolik stres hastalığın başlangıç süresini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Son çalışmalar beslenmenin, genetik ve epigenetik faktörlerin diyabetik böbrek hastalığının gelişmesi ve ilerlemesinde etkili olabileceğini göstermiştir [39]. Bu hasarı sağlayan bir majör gen defekti bulunamamış olsa da Tip 1 diyabetik böbrek hastalarında matriks metalloproteinazları ve endotelial nitrik oksit sentazla (eNOS) ile ilgili, Tip 2 diyabetik böbrek hastalığında ise proenflamatuvar sitokin (IL-6) kodlayan genlerle ilgili varyantlar tespit edilmiştir. Epigenetik faktörler hastalığın ve çevre koşullarının etkisiyle değişen genetik ürünlerdir. Hiperglisemik ortamda DNA metilasyonunda ki değişimler epigenetik bir faktördür. Artmış glikolizasyon ve lipit peroksidasyon son ürünleri de renal hasara neden olmaktadır [40]. Hücre hasarından protein kinaz C, nükleer faktör kapp B, Transforming growth factor- $\beta$  gibi enflamatuvar sitokinlerin artışı sorumludur. Bu artış neticesinde sitoplazmik ve mitokondriyal süperoksit üretimiyle gelişen oksidatif stressin renal tübüler hücrelerde epitelyal-mezenkimal değişime yol açarak intertisyel fibrozis yaptığı, glomerüler matrikste proliferasyona sebep olduğu gösterilmiştir [41] (Şekil 2.7).

Diyabetik Nefropati hiperglisemi ve hipertansiyonla ilerleme gösterir ve hastalığın kontrolü böbrek koruyucu etki renin-anjiyotensin sistemini inhibe eden antihipertansif ilaçlarla sağlanır. Çoğu hastada birden fazla antihipertansif ilaç gerekebilmektedir.



Şekil 2.7 Diyabetik Nefropatinin patogenezi

## **Hemodinamik Değişiklikler**

Hemodinamik değişiklikler özellikle mikroalbüminüri ve hipertansiyon geliştirmiş diyabetik nefropati hastaları için önem arz eder. Bu mekanizmanın Renin-Anjiotensin-Aldostreon (RAS) sistemi ile kontrol edilir. RAS, hipovolemi, hiponatremi veya renal iskemide aktive olarak kan hacmi, kan basıncı, kan sodyum değerleri ve intraglomerüler basıncın yükselmesini sağlayan önemli bir homeostatik mekanizmadır.

### **2.3.4 Diyabetik Nöropati**

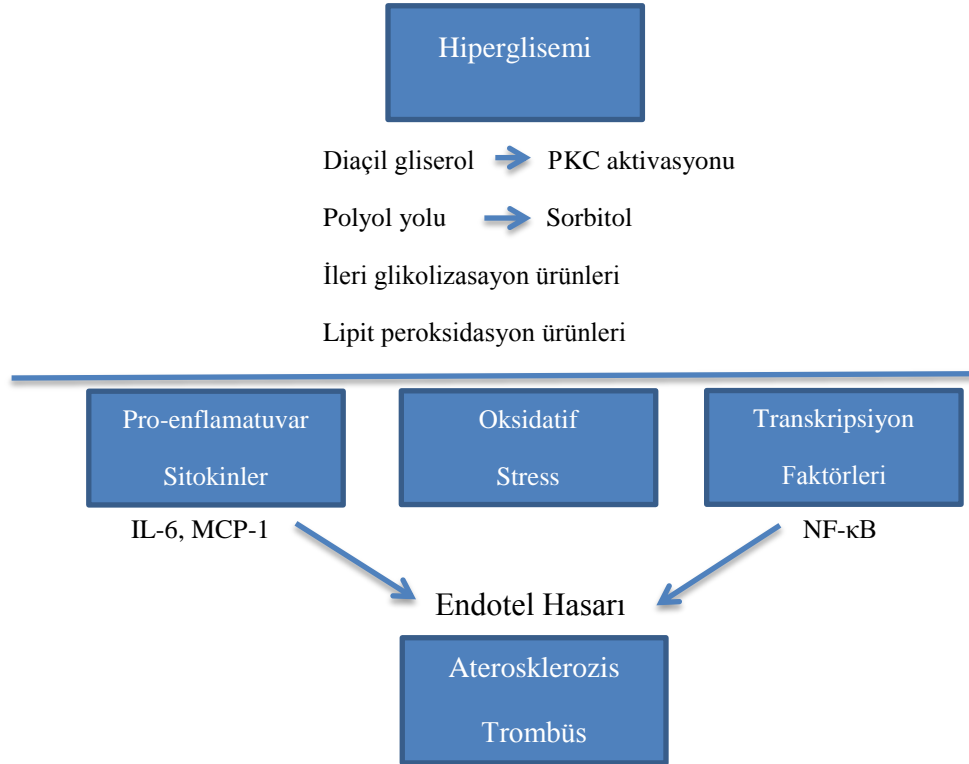
Diyabette önemli bir morbidite nedenidir. Alt ekstremitte ülserleri en ciddi ve sık komplikasyonudur ve bu yaraların açılmasındaki mekanizma; sudomotor disfonksiyon, ağrıya sekonder vazodilatasyon oluşmaması, azalmış ağrı ve ısı hissinin kaybedilmesidir [42-44]. Hissizlik, ağrı, keçelenme semptomları olan hastalarda tanı sinir biyopsisi ile konur. Son yıllardaki çalışmalarda deri biyopsileriyle de nöropati tanısının konulabildiğini gösterilmiştir [45]. Sinir biyopsilerine alt ekstremitede sural sinir sıklıkla biyopsi için kullanılan sinirdir. Patolojik görünümü aksonal dejenerasyon ve demyelinizasyonla karakterizedir. Sinir beslenmesini sağlayan epinöral, endonöral kapiller damarlarda perisit kaybı, bazal membran kalınlaşması ile seyreden mikroanjiopati mevcuttur.

Diyabet, periferik sinir sisteminde hasara yol açtığı gibi otonom sinir sisteminde de hasara neden olabilmektedir. Otonom nöropati adı verilen bu komplikasyon sıklıkla asemptomatik seyreder. Kardiyovasküler otonom nöropati, mortaliteyle en ilişkili komponentidir [46]. Vagus hasarında ilk olarak parasempatik innervasyonda azalmaya bağlı sempatik sistem aktivasyonu artar. İstirahat taşikardisi, ortostatik hipotansiyon, post prandiyal hipotansiyon, kardiyomyopati, QT uzaması gibi bulgulara rastlanabilir [47]. Gastrointestinal otonomik nöropatide motilite bozuklukları, ürogenital otonom nöropati sonrasında erektil disfonksiyon, mesane disfonksiyonu görülebilir.

### 2.3.5 Diyabetin Makrovasküler Komplikasyonları

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) koroner damar hastalığı ve serebrovasküler hastalık diyabet hastalarının %20-30'unu tehdit etmektedir [48]. Epidemiyolojik çalışmalar arterosklerozisin diyabet hastalarında mortalite ve morbiditenin en sık sebebi olduğunu göstermiştir [49]. Glisemik kontrolün derecesi periferik damar hastalığı (PAH) için bağımsız bir risk faktörüdür. Glikolize Hb'de her %1'lik artış PAH riskini %28 arttırmaktadır [50].

Endotel hasarı, diyabetik hastalarda gelişen aterosklerozisin temelini oluşturmaktadır. Hipergliseminin sebep olduğu yan glikoz metabolizma yolları (polyol yolu) neticesinde hücre içinde NO gibi antioksidanların tüketilir. NADPH oksidaz artışı sonucu oksidatif stress ve reaktif oksijen radikalleri artar. Protein Kinaz C artışı sonunda hücre permeabilitesi bozulur. Bunlara ek olarak enflamatuvar sitokinler, ileri glikolizasyon ürünleri, bozulmuş yağ metabolizması sonucu azalmış HDL ve artmış LDL'nin endotelde oksidatif hasarı, damar endotelindeki patofizyolojiyi özetler (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Diyabetteki endotel hasarı ve aterosklerozisin oluş mekanizması.

Aterosklerozis, diyabette daha distal damarları tutma eğilimindedir. Tipik diyabetik stenotik lezyonlar popliteal arter ve distalindeki anterior tibial, posterior tibial ve peroneal arterlerde görülür [51]. Bu distali tutma eğilimi neticesinde ekstremitenin kollaterallerle beslenme olasılığı düşer endovasküler revaskülarizasyon başarısının, diyabetik olmayan stenotik hastalara göre düşük olmasına sebep olur [52].

Glisemik kontrol, lipid seviyelerinin kontrolü, sigara bırakılması, egzersiz gibi hayat tarzı değişiklikleri, kardiyovasküler ve serebrovasküler komplikasyonlardan kaçınılması için önerilmektedir.

### **2.3.6 Diyabet ve Yara iyileşmesi**

Yara iyileşmesi birçok hücre tipi, matriks birleşeni ve çok sayıda hücreler arası salgı ve sinyalin kusursuz programlandığı bir kaskattır. Enflamatuvar hücreler, granülasyon dokusu ve anjiogenezin gerçekleşmesi, fibroblast proliferasyonu, keratinosit migrasyonu, anatomik ve fonksiyonel bütünlüğün yeniden sağlanması için, uyum içerisinde çalışmaktadır [53]. Bu basamak ve faktörler arasında eksiklikler, yetersizlikler ve düzensizlikler yara iyileşmesinde gecikmeye neden olacaktır. Başka bir deyişle azalmış enflamatuvar hücre migrasyonu, azalmış büyüme faktörleri salgısı, azalmış kollajen sentezi yara iyileşmesinin bozulmasında rol oynamaktadır [54].

Diyabette enflamatuvar hücrelerin kemotaksisi azalmış ve enflamatuvar yanıt zayıflamıştır [54]. Büyüme faktörlerinin salınımındaki azalma (VEGF azalır) anjiogenezi etkilerken, endotelial progenitör hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını bozar [55]. Kollajen matriks remodellinginin bozulması yaralarda nükslerin ve relapsların nedeni olmaktadır [56].

Diyabetik yara iyileşmesi alanındaki çalışmalar, eksik veya bozulmuş olan bu basamakların düzeltilmesine yöneliktir. Egzojen olarak epidermal büyüme faktörü (EGF), transforming growth faktör- $\beta$ , fibroblast büyüme faktörü (FGF) tedavilerinin yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu tedavilerin genel uygulanabilirliğinin zor ve maliyetinin yüksek oluşu, kullanımlarını sınırlandırmıştır [57, 58].

Diyabetik yaralar sıklıkla alt ekstremitte kendini göstermektedir. Etiyopatogenezinde arterioller hyalinozis ve bazal membran kalınlaşmasıyla görülen mikroanjiopatiler, femoro-popliteal,



infra-popliteal arterosklerotik tutulumlarıyla seyreden makroanjiopatilere sekonder alt ekstremite perfüzyonunun bozulması, periferik nöropatiye sekonder alt ekstremite ağrı ve proprioseptif duyunun kaybı sayılabilir.

Diyabetik bir hastanın yaşamı boyunca bir alt ekstremite yarasının olma ihtimali %85'tir. Diyabet hastalarının %2-4'ü aktif alt ekstremite kronik yarasına sahiptirler ve bunların yarısının da enfekte olması beklenir. Enfekte ülserlerin 5 yıl içerisinde %85 oranında herhangi bir seviyeden amputasyon olabileceği bildirilmiştir [59, 60].

Diyabetik nefropatinin eşlik etmesi kliniği daha dramatik hale getirmektedir. Mikroalbuminüri aşamasındaki böbrek hasarı başlangıcında bile ülser gelişme ihtimalinin artmış olduğu bildirilmiştir [61]. Game ve arkadaşları yaptıkları retrospektif bir çalışmada hemodiyaliz ve ülser gelişme riski arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu ve diyalizin güçlü bir amputasyon prediktörü olduğunu bildirmişlerdir [62].

Gelecek vadeden ve üzerinde çalışmalar yapılan diğer bir konu kök hücre tedavisidir. Diyabetik yara iyileşmesinde kemik iliği ve adipoz dokudan üretilmiş kök hücrelerle başarılı sonuçlar bildirilmiştir [63, 64].

### **2.3.7 Deneysel Diyabet Modelleri**

Çeşitli hastalıklara tanı konması, patogenezlerinin aydınlatılması, hastalıktan korunma ve tedavi olanaklarının incelenebilmesi için deneysel hayvan modellerinin kullanımı oldukça yaygındır. Günümüze kadar tanımlanmış birçok hayvan diyabet modeli bulunmaktadır. Fare, sıçan, tavşan, kobay, hamster, maymun, domuz, köpek ve kedi gibi deney hayvanları, deneysel diyabet oluşturmak amacıyla kullanılabilir [65].

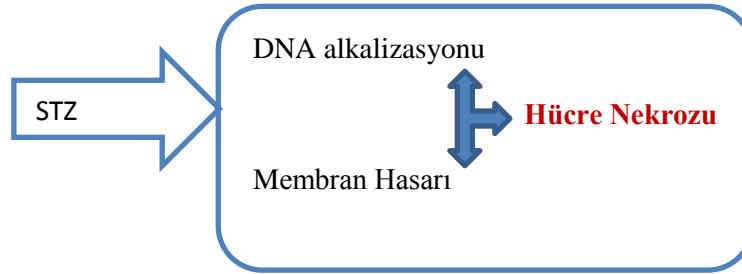
#### **Tip-1 Diyabet Modelleri**

1. **Kimyasal modeller:** Alloksan, streptozosin, çinko şelatörleri (dithizone, 8-hidroksikinolin), Rodentisid-Vacor, diet nitrozaminleri vb. maddeler ile oluşturulur.

## Streptozosin (STZ)

*Streptomyces achromogenes* kültürlerinden türetilen streptozosin antibiyotik, antitümoral, mutajenik ve diyabetojenik bir ajandır. Kimyasal yapısı 2-deoksi-2-(3-Metil-3-Nitrozürido)-D Glukopiranozdur [66]. Streptozosin pankreatik beta hücrelerinde nekroz yaratarak insülin sekresyonunu inhibe eder ve insülin bağımlı diyabet oluşturur [67]. Yapısındaki N-metil N-nitrozüre ve glikoz parçası sayesinde beta hücrelerindeki GLUT 2 reseptörlerine bağlanarak bu hücrelerde birikir, böylece toksik etkiyi meydana getirir. Aynı zamanda bu reseptörleri taşıyan renal ve karaciğer hücrelerinde de değişik derecelerde hasara neden olur. Streptozosin'in toksisitesinden hücre membranında yarattığı hasar ve büyük ölçüde DNA alkalizasyonu sorumludur [68] (Şekil 2.9).

Sıçanlarda 50- 100 mg/kg dozunda I.V ya da I.P uygulanabilir. Kan glikozunu en yüksek değere çıkaran Streptozosin dozu 65mg/kg'dır. Streptozosin verilmiş hayvanlarda genellikle 24 saatten sonra kalıcı bir diyabet meydana gelmektedir. Streptozosin verilmesinden sonra kan glukozunda üç fazlı bir yanıt oluşmaktadır. İlk iki saat sonunda hiperglisemi görülürken, 6 ile 12 saatleri arasında hipoglisemi ve 18 ile 24 saatleri arasında ise kalıcı bir hiperglisemi olduğu belirlenmiştir [67].



Şekil 2.9 STZ'nin Pankreas  $\beta$  hücrelerindeki hasar mekanizması

## Alloksan

Kimyasal yapısı 2,4,5,6 Tetraoksoheksahidropirimidin olan ürik asit türevi, antineoplastik bir ajandır. Toksik etkisi özellikle pankreas  $\beta$  hücreleri üzerinedir. Yüksek dozlarda  $\beta$  hücre nekrozu yapar. Glukoz transport mekanizması ve glukoreseptörler üzerinden etkili olduğu için etkisi bu reseptör için yarışan kan glukozuyla bloke edilebilir [67]. Toksisitesi fazladır ve

diyabet geliştirme dozları geniş bir aralıkta seyretmektedir. diyabetojenik dozu IV.40-50mg/kg'dır.

**2. Spontan tip-1 diyabet modelleri:** BB (Bio-Breeding) sıçan, NOD (non-obezy diyabetik) fare ve diğerleri (Macaca nigra maymunu, Keeshand köpeği, çin hamsteri, kobay, Yeni Zelanda beyaz tavşanı, KDP (Komodo Diabetes Prone) sıçanda oluşur.

**3. Virüsle oluşturulan modeller:** En sık kullanılan pikornovirüs ailesinden EMC virüsünün M varyantıdır. Virus enjeksiyonu sonrasında %40 hayvanda diyabet gelişimi bildirilmiştir. Sitomegalovirüs, Rubella, Reovirüs diyabete neden olduğu düşünülen diğer virüslere de [69].

**4. Transgenik tip-1 diyabet modelleri:** Transgenik fare, fertilize fare yumurtasının pronükleusuna yabancı bir DNA'nın aşılması ile oluşur. Ekzojen genin ekspresyonu için, bu genler insülin geni promotörüne bağlanır ve orayı etkiler. Otoimmün hastalıkların anlaşılması için faydalı modellerdir [70].

## **Tip-2 Diyabet Modelleri**

**1. Kimyasal Modeller:** Streptozosin ve alloxan sıklıkla kullanılmaktadır. . Rezidüel  $\beta$  hücresi kalabilmesi için Tip 1 DM geliştirmek için kullanılan dozlardan daha az verilmesi gerekmektedir. STZ doz ayarlanması daha kolay ve daha az toksik olduğu için alloxana göre daha çok tercih edilir.

**2. Cerrahi Modeller:** Parsiyel pankreatektomi ve hipotalamik lezyon yöntemleri tanımlanmıştır. Pankreas kitlesinin %90'ının en az eksizyonu sonrası sabit hiperglisemi gelişir. Parsiyel pankreatektomi cerrahi morbiditesinin fazla olması ve tekniğin zor olması nedeniyle tercih edilmemektedir.

Hipotalamik lezyonlar ise, hipotalamusun ventromedial ve paraventriküler çekirdeklerinin elektrolizisle hasarlandırılması sonucu oluşur. Verilen hasar sonunda farede, hiperfaji, hiperglisemi, obezite ve glukoz tolerans bozukluğu gelişir [70].

**3. Diyet:** Doymuş yağ ve sükroz gibi basit şekerlerden zengin diyet glukoz toleransını bozmak için verilebilir. Total enerjimi alımı arttırılırsa bu etki desteklenir. Neonatal dönemde protein malnütrisyonunun  $\beta$  hücre sayısında azalma yarattığı bildirilmiştir.

## 2.4 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI

### 2.4.1 Tanım

Böbreğin anatomik yapısı ve fonksiyonunda geri dönüşsüz ve ilerleyici bozulmayla karakterize son dönem böbrek yetmezliğine yol açan yüksek mortalite ve morbiditeye sahip bir hastalıktır. Kronik böbrek hastalığı (KBH) ciddi bir toplumsal sağlık problemidir. ABD’de 20 yaş üstü nüfusun %16,8’inin KBH olduğu bildirilmiştir [71]. Dünyada 2013 yılında yaklaşık 950.000 kişi KBH nedeniyle hayatını kaybetmiştir [72]. Diyabet ve hipertansiyon gibi görülme oranı yüksek hastalıkların etiyojide yer aldığı düşünülürse, KBH görülme sıklığının artması aşikârdır. Tüm etiyojik nedenler içerisinde diyabet ilk sırada yer almaktadır. Kronik böbrek hastalığına sebep olan hastalıklar Tablo 2.6’da verilmiştir.

Tablo 2.6 KBH etiyojisi

<b>Etiyojisi</b>	<b>İnsidans</b>
Diyabet	%39
Hipertansiyon	%28
Glomerülonefrit	%11
Polikistik Böbrek Hastalığı	%3.5
Pyelonefrit	%4.4

Altta yatan etiyojilerden bağımsız tanı kriteri böbrek hasarına ait bir bulguyla beraber 3 aydan uzun süren glomerüler filtrasyon hızındaki düşüştür (Tablo 2.7) [73].

Tablo 2.7 KBH için tanı kriterleri

<b>Böbrek hasarı bulgusu</b>	Albuminüri (>30 mg/gün) Elektrolit Bozuklukları Böbrek biyopsisinde böbrek hasarı Görüntüleme böbrek hasarı
<b>Glomerüler Filtrasyon Hızı</b>	GFH (<60 ml/dk/1.73 m <sup>2</sup> )

Böbrek hastalığı tanısı biyopsi ve objektif bulgular dışında, glomerüler filtrasyon hızı (GFH) ve albumüriye göre değerlendirilir. 2012 yılında Kidney Disease Global Improving Outcomes (KDIGO) grubun yayınladığı kılavuzda GFH ‘nın düşüşünün ve albuminüri artışının hastalığın ciddiyeti ve diyalize gidişle ilişkili olduğunu yayınlamıştır. Buna göre 3 aydan uzun süreli GFH’nin 30ml/dk altına düşüşü yüksek KBH riski arz etmektedir [73] (Şekil 2.10).

				Persistan albuminüri seviyeleri		
				A1	A2	A3
				Normal veya hafif yükselme	Orta derece yükselme	Ciddi derece yükselme
				<30mg/g <3mg/mmol	30-300mg/g 3-30mg/mmol	>300mg/g >30mg/mmol
GFH kategorileri (ml/dk/1.73 m <sup>2</sup> )	G1	Normal veya yüksek	≥90			
	G2	Hafifçe azalma	60-89			
	G3a	Hafif-orta azalma	45-59			
	G3b	Orta-ciddi azalma	30-34			
	G4	Ciddi azalma	15-29			
	G5	Böbrek yetmezliği	<15			

Şekil 2.10: Yeşil: Düşük risk Sarı:Orta Risk Turuncu:Yüksek Risk, Kırmızı :Çok yüksek risk

#### 2.4.2 Böbrek Fonksiyonları ve Glomerüler Filtrasyon Hızı

Böbrekler vücutta homeostazdan sorumludur. İki ana görevi katabolik artıkların uzaklaştırılması ve elektrolit dengesinin sağlanmasıdır. Bunların yanında eritropoetin senteziyle eritropoezde rol alır ve kemik kalsiyum-fosfor dengesinin sağlanmasıyla ilgili endokrin görev üstlenir. Proteinlerin ve bazı besinlerin reabsorbsiyonu gibi görevleri de bulunmaktadır.

Böbreğin fonksiyonu glomerüler filtrasyon hızı ile değerlendirilir. GFH, birim zamanda plazmada çözülmüş bir metabolitin böbrekler tarafından temizlenmesi demektir. Normal değerleri erişkinde 118-127mL/dk/1.73m<sup>2</sup> dir. GFH'nın 60ml/1.73m<sup>2</sup>/dk altına düşmesi kronik böbrek hastalığı olarak değerlendirilir ve 5 evrede incelenir [73] (Tablo 2.8).

Tablo 2.8 KBH evreleri

<b>Evre</b>	<b>Tanım</b>	<b>Glomerüler Filtrasyon Hızı ml/dk/1.73m<sup>2</sup></b>
1 (G1)	Normal veya Yüksek	>90
2 (G2)	Hafif azalma	60-89
3 (G3)	Orta derece azalma	30-59
4 (G4)	Ağır azalma	15-29
5 (G5)	Böbrek yetmezliği	<15

GFH egzojen veya endojen filtrasyon belirteçleriyle hesaplanabilir. Egzojen hesaplama, verilen bir maddenin idrar ve kandaki klirensi hesaplanmak suretiyle yapılır. İnülin klirensi, böbrek fonksiyonlarını en iyi gösteren belirteçleriyle biridir. Endojen hesaplama ise şimdiye kadar serum kreatinin, kan üre nitrojeni (BUN), sistatin C,  $\beta_2$  mikroglobulin kullanılmıştır. Serum kreatinin, tubuler sekrete edilebilmesi ve kas kitlesiyle ilişkili değişik sonuçlar vermesi açısından çok güvenli bir parametre değildir. Serum kreatinindeki her iki kat artışın GFH'de %50 azalma olduğu varsayılır [74]. Serum BUN değeri ise beslenmeyle, kas kitlesiyle bireysel farklılıklar göstermesi açısından objektif değerler taşımaz. Serum BUN, kreatinin oranının yükselmesi hipovolemi gibi prerenal yetmezlikler için değerlidir.

Renal dokunun %75'e varan kayıpları kompanzatuvar glomerüler hiperfiltrasyon sayesinde asemptomatik olur. GFH, 15ml/dk' nın altına düşmesi sonunda üremik semptomlar çıkmaya başlar.

### 2.4.3 Kronik Böbrek Hastalığının Komplikasyonları

#### Patofizyoloji

Böbrek fonksiyonlarındaki azalma neticesinde, böbreğin homostatik etkisinin bozulması, metabolik artıkların yarattığı toksisite üremik sendrom denilen multisistemik tutulum ve dejenerasyona neden olur (Tablo 2.9).

Tablo 2.9 Üremik Sendrom'un Multisistemik Etkileri.

Sistemik	Gastrointestinal	Nörolojik	Hematolojik ve İmmunolojik	Kardiyovasküler
Halsizlik	İştahsızlık	Bilinç değişiklikleri	Anemi	Hipertansiyon
Hipotermi	Bulantı	Periferik nöropati	Platelet disfonksiyonu	Sol ventrikül hipertrofisi
İnsülin resistansı		Huzursuz bacak	Azalmış antikor yanıtı	Sol kalp yetmezliği
İnflamasyon		Koma		Periferik arter hastalığı
		Nöbet		Perikardit

KBH vücutta yaygın kronik bir enflamasyona neden olur. Gupta ve arkadaşları pro enflamatuvar sitokinlerin ve akut faz proteinlerinin böbrek fonksiyonu daha bozulmuş hastalarda yüksek olduğunu göstermiştir [75]. Artmış enflamatuvar sitokinler, anoreksiye ve albuminüriye ek olarak azalmış protein alımı sonucu gelişen protein enerji azlığına katkıda bulunur. Hayvan çalışmalarında deneklere IL-6, TNF- $\alpha$  verilmesinin kas katabolizmasına ve kaşeksiye neden olduğu gösterilmiştir [76]. Artmış enflamatuvar sitokinler büyüme faktörleri, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü direncine neden olurlar.

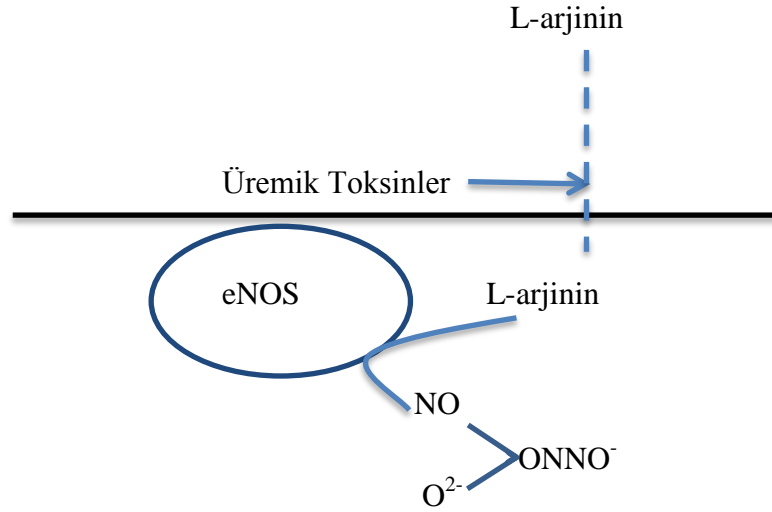


Kronik subklinik enfeksiyonlar, volüm yüklenmesi, sempatik aktivite, protein enerji kaybı kronik enflamasyonun diğer sebeplerinden olabilir [77]. Üremik toksinlerin granülosit ve monosit hücre sıralarında fonksiyon bozukluğu yaparak inflamasyonun uzamasına sebep olurlar. Kronik inflamasyon neticesinde oksidatif stres artmıştır. Benzer şekilde oksidatif stres kronik inflamasyonu tetikler ayrıca artmış lipid peroksidasyonu da oksidatif strese katkıda bulunur.

### Endotel Hasarı ve Anjiopati

KBH hastalarında özellikle hemodiyaliz hastalarında ateroskleroz gelişimi yüksektir [78]. Endotel hasarı KBH’da kardiyovasküler ve serebrovasküler komplikasyonlar için artmış risk faktörüdür [79].

Endotelden salgılanan nitrik oksit (NO) düz kaslar gevşemeye neden olarak vazodilatasyon yapar. NO’nun vasküler permeabilitenin ayarlanmasında, lökosit adezyonunda, düz kas proliferasyonunda önemli etkileri vardır [80]. KBH hastalarında yapılmış pletismografik çalışmalar, endotel hasarının erken evrelerde başlayabildiğini göstermiştir [81].



Şekil 2.10 L- arjininden NO sentezi ve üreminin etkisi

Serbest oksijen radikal hasarı endotel hasarındaki temel mekanizmalardandır. NADPH oksidaz tarafından üretilen süperoksit anyonları endotelde hasara neden olarak NO ‘dan peroksinitrit

gibi nitrojen türevlerini oluştururlar [81]. Peroksinitrit, NO'nun etkisini bozarak hücre hasarına neden olur (Şekil 2.11).

Diğer bir mekanizma NO sentezinde görev alan böbrek proksimal tübüllerinden sentezlenen amino asit L-arjininin eksikliğidir [82]. Üremik toksinler de L-Arjininle yarışarak hücre içine transportu aksatıp NO sentezini olumsuz etkilerler [83] (Şekil 2.10).

#### **2.4.4 Kronik Böbrek Hastalığı ve Yara İyileşmesi**

KBH hastalarında yaralar kronikleşme eğilimindedir. KBH hastalarında görülen kronik alt ekstremitte ülserleri, cerrahi yara alanlarındaki ayrılmalar yara iyileşme bozukluğunu klinik pratikte en sık karşılaşılan örnekleridir. KBH'de endotel hasarı neticesinde gelişen mikro ve makrovaskülopati neticesinde bozulmuş doku perfüzyonu yara iyileşmesini olumsuz etkiler. Sistemik enflamatuvar yanıt, üremik toksinler ve protein-enerji kaybı, yara iyileşme aşamalarında hücresel ve substrat düzeyinde olumsuz etkilere neden olur.

Literatürdeki KBH ve yara iyileşmesine yönelik çalışmalar, uzun yıllar önce yapılmıştır ve bu konu ilgili güncel veriler çok kısıtlıdır. 1966 yılında Nayman, üremik köpeklerde laparotomi yaralarında erken açılmalar bildirmiştir [84]. Kursh ve ark. üreminin yaranın gerilime karşı direncini düşürdüğünü ve kollajen düzenlenmesini bozduğunu göstermiştir [85]. Yue ve ark. KBH'li sıçanlarda kontrol grubundaki sağlıklı sıçanlara göre daha fazla yara yeri enfeksiyonu geliştiğini söylemişlerdir [86]. Son yıllarda yapılmış bir çalışmada, 6 haftalık deneysel KBH modelinde yara iyileşmesi incelenmiş ve üremik sıçanlarda granülasyon dokusu oluşumunun ve reepitelizasyonun azalmış olduğu, anjiogenezisin daha az gerçekleştiği, VEGF'in salınımının belirgin azaldığı ve sistemik enflamatuvar sitokinlerden IL-1 $\beta$  salınımının arttığı gösterilmiştir [87].

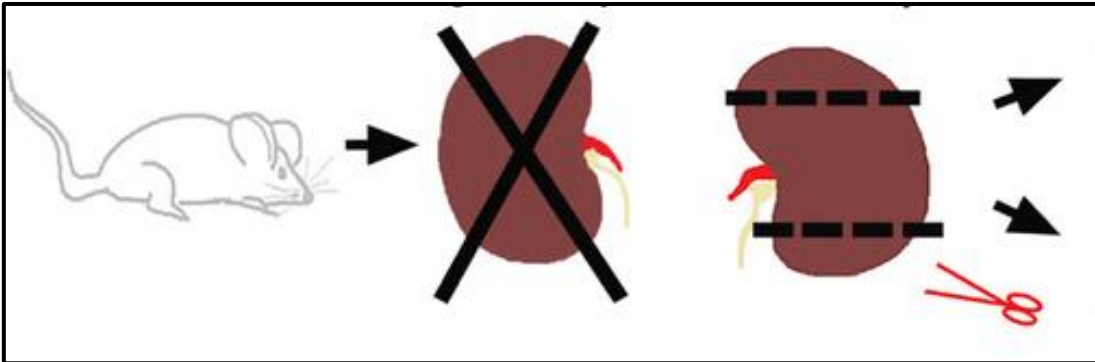
KBH' nin deride yaptığı değişiklikler hastalığın tüm evrelerinde (erken böbrek hastalığından hemodiyaliz, transplant hasta gruplarına) yapılmış deri biyopsilerinde incelenmiştir. Deride kuruluk döküntü kaşıntı koyulaşma gibi morfolojik farklılaşmaların yanında ve kalsiflaksi, mikroanjiopati gibi histopatolojik değişiklikler gösterilmiştir [88].

## 2.4.5 Deneysel Kronik Böbrek Hastalığı Modelleri

İnsan KBH patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve tedavi seçeneklerinin artırılması için deneysel modellere ihtiyaç vardır. KBH modelini seçerken hedeflenen patogenez ve etiyojinin taklit edilmesi önemlidir. Deneysel yöntemlerle KBH daha hızlı gelişirken, farmakolojik yöntemler belli bir maruziyet süresi gerektirirler fakat daha fazla etiyojiyi taklit ederler. Yüksek mortalite oranları bu hayvanlar için dezavantajlıdır. Modeller cerrahi ve farmakolojik olarak iki ana başlıkta incelenebilir.

### 2.4.5.1 Cerrahi Yöntemler

**Subtotal Nefrektomi (5/6 Nefrektomi):** 5/6 nefrektomi modeli olarak da adlandırılır. En sık kullanılan ilerleyici böbrek yetmezliği modellerinden birisidir. Teknik olarak ligasyon ya da ablasyon yöntemleri kullanılabilir. İlk kez 1932 yılında ratlar üzerinde tanımlanmış ve modern şekillenmesi Gagnon ve ark. tarafından fareler üzerinde yayımlanmıştır [89]. Bu yöntemde sol böbrek üst ve alt pollelerini ablasyon veya ligasyonla uzaklaştırdıktan 1 hafta sonra ikinci bir operasyonda sağ nefrektomi yapılmasını tariflemişlerdir [90] (Şekil 2.12). Bu yöntemin avantajı kompanzasyon mekanizmasını aktive ederek, mortalitenin önüne geçmektir. Kan üre azotu kontrol grubuna göre 1,5-4,8 kat artmış bulunurken glomerulosklerozis %80 oranında görülür. 2 seanslı bu tekniği Seth ve ark modifiye ederek tek seansa indirmişler olası komplikasyonları minimize etmek için inhale anestezi kullanmışlardır [87].



Şekil 2.12.Sağ nefrektomi ve sol 2/3 nefrektomi

Bu modelde KBH, glomerül kaybı ya da interstisyel fibrozis nedeniyle böbrek fonksiyonları sürekli ve ilerleyici olarak bozulmaktadır. Kren ve ark farelerde sağ nefrektomi ardından 1 hafta sonra renal polleri bağlamak yerine renal arterin dallarına ligasyon uygulamışlardır. Serum kreatininin ortalama 2 kattan fazla artarak 0,85ml/dl bulunmuştur.

**Tek Taraflı Üriner Obstrüksiyon:** Abdominal insizyonla girildikten sonra üreterlerden birine dikiş konarak üreter lümenin kapatılmasıdır. Ligasyonun olduğu taraftaki böbrek renal kaliksinde hidronefroz gelişir. İntertisyel fibrozis çalışmaları için uygundur [91].

#### 2.4.5.2 Farmakolojik Yöntemler

**Adenin:** Oral yolla yem içerisine karıştırılarak verilen adeninin 2 hafta uzun süreden fazla alınması durumunda böbrekte interstisyel infiltrasyon, fibrozis, tübüllerde dilatasyon ve tübül bazal membranında kalsifikasyon izlenir. 4 haftadan sonra ağır anemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi görülür [92].

**Siklosporin:** 15-25 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal olarak 28 gün boyunca ya da Takrolimus 1-6 mg/kg/gün dozunda 4-8 hafta süreyle uygulanır. Serum kreatinin seviyeleri anlamlı olarak yükselir, tübül epitel hücrelerinde vaküolizasyon ve şişme, dilatasyon, apoptozis, nekroz ve atrofi ile interstisyel alanda band şeklinde fibrozis gelişir. Damarlarda ise arteriolar hyalinoz izlenir [93].

**Sisplatin:** Letal dozda olmayan Sisplatin 2 mg/kg/hafta dozunda, 7-10 hafta süreyle uygulanması sonucu böbreklerde tübül çevresinde fibrozis gelişir.

**Puromisin:** Tek taraflı nefrektomi, ardından 100 –150 mg/kg i.p, 4-6 hafta sonra 40-45 mg/kg i.p 2-3 kez haftalık tekrarlanır. Böbrekte, lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu, glomerüloskleroz, interstisyel fibrozi ve proteinüri görülür.

**Adriamisin:** Tek taraflı nefrektomi ve ardından sıçanlarda 2 mg/kg 3 hafta aralıkla toplamda 2 kez uygulama; farelerde 10–11 mg/kg i.v yapılır. Böbrekte, lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu, glomerüloskleroz, interstisyel fibrozi ve proteinüri görülür [94].

## 2.5 KÖK HÜCRELER

### 2.5.1 Genel Bilgiler

Kök hücreler, sınırsızca kendilerini yenileyebilme ve özelleşmiş fonksiyonu olan daha olgun hücrelere dönüşebilme kapasitesi olan hücrelerdir. Kök hücre araştırmalarındaki ilginin temelinde, hasar görmüş, hastalıklı organ ve dokular için yeni sağlıklı bir kaynak arama ihtiyacı ve kök hücrelerin keşfedilmiş yetenekleri yatmaktadır. Bu bağlamda miyokart enfarktüsü, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi dejeneratif ve fonksiyon kaybıyla seyreden veya yanıklar gibi geniş doku kaybının olduğu geniş hasta grupları olan hastalıkların tedavisi için umut vadetmektedir.

Tablo 2.10 Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücrelerin sınıflandırılması.

<b>Totipotent</b>	Tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahip hücrelerdir.
<b>Pleuriopotent</b>	Blastokist aşaması akabinde çok geniş hücre gruplarını oluşturabilen hücrelerdir.
<b>Multipotent</b>	Farklı organ sistemlerinde, farklı doku tiplerine dönüşebilme yeteneği olan hücrelerdir.
<b>Oligopotent</b>	Lenfoid myeloid hücreler gibi birkaç hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir.
<b>Unipotent</b>	Tek bir doku tipinde çoğalabilen hücreler.

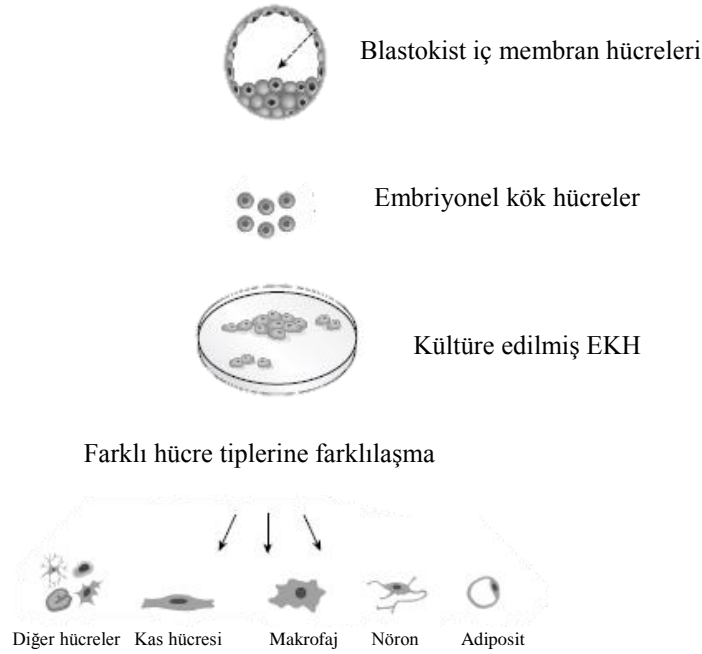
İnsanda kök hücreler, embriyonun erken dönemindeki iç hücre tabakasında (embriyonik kök hücreler), fetüsteki umbilikal kord ve plasentada (fetal kök hücreler) ve erişkin dönemde organlarda tanımlanmışlardır (yetişkin kök hücreler). Bu organlarda kök hücreler birden fazla özelleşmiş hücre tipine dönüşebilirler (örneğin nöral kök hücreler beyindeki nöronlar glial

hücrelere, astrositlere dönüşebilirler) bulunmuşlardır. Bir kök hücre farklı organ sistemlerinde, farklı doku tiplerine dönüşebilme yeteneğinde olmasına multipotentlik denir. Diferansiyasyon yeteneğine hücreler adlandırılabilirler (Tablo 2.10).

### **2.5.2 Embriyonik kök hücreler**

Embriyonik kök hücreler, blastokist aşamasında iç hücre tabakasında bulunan pluripotent hücrelerdir. Endoderm, ektoderm ve mezoderm adı verilen üç ana doku katmanını oluşturmak üzere farklılaşırlar. Bu hücrelerin kültüre edilmesi başarılmıştır (Şekil 2.13) [95]. Embriyonel kök hücreler yüksek seviyede telomeraz aktivitesi içerirler. Hücre replikasyonu ile aktivasyonda azalma gözlenmez, bu nedenle sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptirler. Bu aşamada hücreler embriyon dışına çıkarıldıklarında, deneysel yolla farklılaşabildikleri ve dokulardaki hücrelere benzer hücrelere dönüşebildikleri birçok kez gösterilmiştir. Ancak hücrelerin yüksek telomeraz enzimi etkinliği sonucunda kontrolsüz çoğalmaları ile tümör hücrelerine dönüşme olasılığı da yüksektir.

Fetal kök hücreler, fetal dönemdeki primitif hücrelerdir. Fetüs üzerindeki çalışmalar şu ana kadar fetal kök hücreleri üç ana hücre grubunda gösterebilmiştir. Hematopoetik kök hücreler, nöral kök hücreleri, pankreas ada kök hücreleri. Nöral kök hücreler diferansiye olmamışken kültüre edilip farklı hücre gruplarına (glia, astrosit) farklılaşabildiği gösterilmiştir [96]. Hematopoetik kök hücreler ise fetal karaciğer ve kemil iliğinde veya umbilikal kord ile plasentada, izole edilmişlerdir. Embriyonel ve fetal kök hücrelerin kültüre edilmesi ve tedavi için kullanılmasıyla ilgili medikolegal tartışmalar devam etmektedir.



Şekil 2.13:Embriyonik kök hücreler

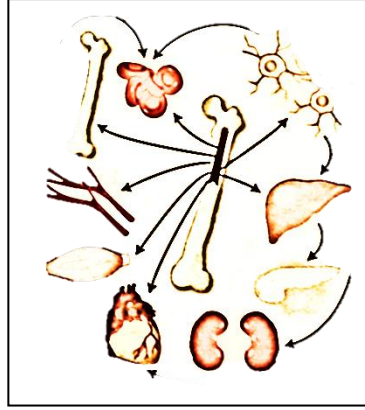
### 2.5.3 Yetişkin kök hücreler

Yetişkin kök hücreler, kemik iliği veya beyin gibi diferansiyel olmuş dokulardaki farklılaşmamış kök hücrelerdir. Organizmanın hayatı boyunca, kendilerini yenileyebilir, kopyalayabilir ve ilgili dokuya ait bir hücreye dönüşebilirler. Yetişkin kök hücre kaynakları, kemik iliği, beyin, pankreas, gastrointestinal traktus, karaciğer, iskelet kası, deri, göz ve kandır. Tüm kök hücreler için bulunması gereken iki özellik vardır. Birincisi sekansiyel kendini yenileyebilme ikincisi ise gerektiğinde başka özelleşmiş bir hücreye dönüşebilmedir. Sekansiyel kendini yenileyebilme ya da simetrik bölünme, mitoz sonucu oluşan kardeş hücrenin aynı bölünebilme ve özelleşebilme yeteneğinin olmasıdır. Kök hücre çeşitli sinyallerle özelleşen bir hücreye döndüğünde (asimetrik bölünme) bu multipotentlik özelliğini yitirir. "Plastisite" adı verilen kavram ise multipotentlik özelliğini kaybetmeyen özelleşmiş erişkin kök hücreler için kullanılmaktadır.



#### 2.5.4. Yetişkin Kök Hücre Plastisitesi

Dokuya özgün kök hücrelerin, kaynak dokudan daha farklı bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneği “yetişkin kök hücre plastisitesi” dir [97]. Çalışmalarda bazı yetişkin kök hücrelerin multipotent olabileceği gösterilmiştir. Bjornson ve arkadaşları beyin kök hücrelerinin kan hücrelerine ve iskelet kası hücrelerine dönüşebildiğini göstermiştir [98]. Plastisiteyle ilgili en çok çalışmanın yapıldığı yer hematopoetik kök hücrelerdir. Kemik iliğinden elde edilmiş hematopoetik kök hücrelerin de iskelet kası, myokart, beyin hücrelerine dönülebildiği gösterilmiştir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri.

Kök hücrelerin plastisiteni açıklayan dört adet mekanizma teorisi mevcuttur.

- 1) Transdetermination: Bazı hücre dizilerini(lineage) oluşturmaya programlanmış olan kök hücre bir diğer kök hücreye değişir ve bu prekürsör hücrelerin hücre tiplerini meydana getirir.
- 2) Transdiferansiyasyon; Bu olayda farklılaşmış hücre bir diğer farklılaşmış hücrenin fenotipini kazanır.
- 3) Dediferansiyasyon; Bir progenitör veya prekürsör hücrenin dediferansiyasyonu; bunu takiben bir diğer hücre dizine farklılaşmasıdır.
- 4) Hücre füzyonu; Kök hücre veya daha olgun hücrelerin yönlenmiş hücre dizileriyle füzyonu, yeni yönlenmiş hücre dizilerinin oluşumuna yol açar.

Bu dönüşümün gerçekleştiğini kanıtlamak için yani plastisiteden bahsedebilmek için 3 koşul gerçekleşmelidir:

- 1) Değişen hücrenin orijini hücre belirteçleri ile belirlenmelidir
- 2) Değişen hücrenin bulunduğu dokunun morfolojik parçası olduğu gösterilmelidir
- 3) Değişen hücre bulunduğu dokunun ya da organın fonksiyonlarını edinmelidir.

### 2.5.5 Kök hücrelerin gösterilmesi

Erişkin kök hücre plastisitesini bildiren çalışmaların %80'den fazlası bugüne dek kemik iliği (Kİ) ya da hematopoetik kök hücrelerle gerçekleştirilmiştir. Her hücrenin yüzeyinde o hücreye özgü yüzey reseptörleri vardır. Bu durum kök hücrelerde de aynı şekildedir. Bu yüzey reseptörlerinin floresan işaretleyicilerle işaretlenip ardından sayılması (floresan yardımcı hücre sayımı (FACS) ile mevcut kök hücre sayısı belirlenebilmektedir. Kısa süreli deneysel çalışmalarda karboksifloresin diasetat süksinimidil ester (CFSE), 1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI) gibi geçici floresan işaretlemeler de kullanılabilir. Ancak bu tip uygulamalarda hücre bölünmesi ile floresansda azalma olacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Kemik iliği iki ana kök hücre grubu yüzey belirteçleri iyi tanımlanmıştır.

**Hematopoetik Kök Hücreler** ; Kemik iliğindeki ana plueropotent kök hücre grubudur. Yüzey belirteçleri sıklıkla CD34, "Vasküler endotelial Growth Factor Receptor-2 (VEGF R-2)" veya "Kinase insent domain receptor (KDR)", CD90 (Thy-1), CD-117 (c-Kit), CD164, CxC-Chemokin receptor 4 (CXCR-4). Pglycoprotein, rhodamine 123, Hoechst 33342, Stem cell antigen (Sca-1)", AA4, CD45, Bcrp1/ATP binding cassette (ABC)G2'dir. Prekürsör hücrelerin bir kısmı DNA boyası olan Hoechsti tutmaz ve flow sitometrede uzaklaşan çoğalma gösterirler. Bunlara side population (SP) hücreleri denir. SP hücreleri kordon kanında, kemik iliğinde, iskelet kasında bulunabilir.

**Mezenkimal Kök hücreler:** Kemik iliğindeki diğer kök hücre grubudur. Yüzey belirteçleri CD 29, CD79, CD105, CD45- , CD 133 + dir [99].

## Kök Hücrelerin Fonksiyonel Gösterilmesi

Kök hücreleri izole etmek, kültüre etmek ve verildikleri alanlardaki fonksiyonlarını tespit etmek zordur. Plastisite sonrası hücre fonksiyonlarının değerlendirilebildiği sınırlı sayıda çalışma vardır. Bunlardan en başarılı olanlardan biri hayvanda fumaril asetoasetathidrolaz (FAH) enzimini kodlayan genin delesyonu sonucunda meydana gelen deneysel herediter tirozinemi modelinde gösterilmiştir [100].

Orlic ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer önemli çalışmada araştırmacılar, fare myokart iskemisi modelinde infarktüse uğramış olan alana verdikleri KH'lerin kardiyomyosite dönüşerek kardiyak fonksiyonları düzelttiğini göstermiştir [101].

### 2.5.6 Kök Hücre Kaynakları

Tablo 2.11 Kök hücre kaynağı dokular

Kök Hücre	Kaynak	Üretilen
Hematopoetik	Kemik iliği	Kan, endotel, hepatosit, kas hücreleri
Nöral	Beyin	Nöronlar, astrositler, oligodendrositler, kan hücreleri
Epitelyal	Barsak, epidermis	Epidermal katlardaki tüm hücreler
Mezenkimal	Kemik iliği, yağ, kıkırdak	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, ilik stroması, nöral hücreler, endotelyal hücreler
Embriyonik	Primordial germ hücreleri, blastokist hücreleri	Bütün hücreler

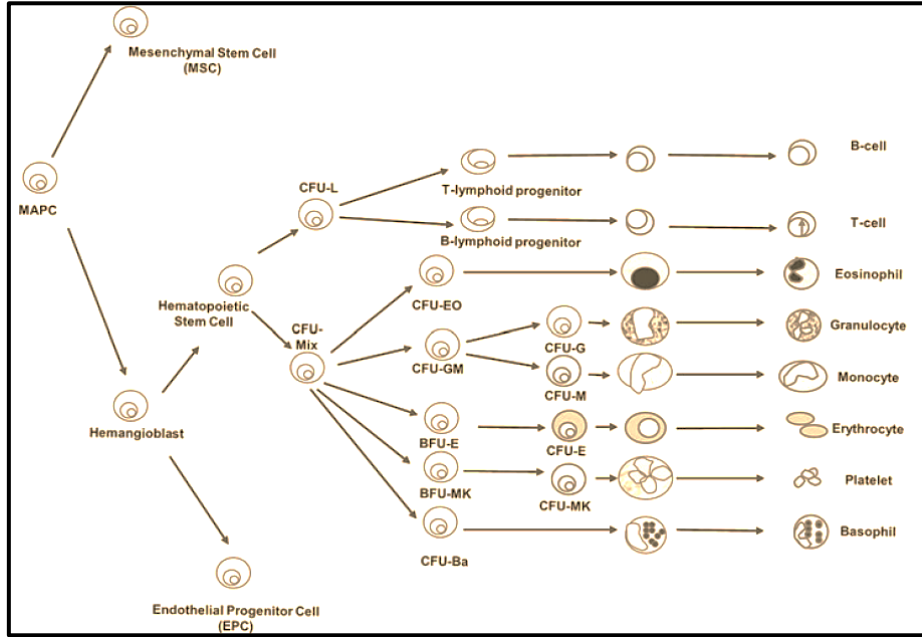
### 2.5.6.1. Kemik İliği

Kemik iliği üç ana hücre grubundan oluşur:

- 1.Hematopoetik Kök hücreler
- 2.Mezenkimal Kök Hücreler
3. Endotelyal Prekürsör Hücreler

#### Kemik İliği Kökenli Hematopoetik Hücreler

Hematopoetik kök hücrelerin keşfi Till ve McCulloch 1960'larda yaptıkları ölümcül dozda radyasyona maruz kalan farelerin dalaklarındaki nodüllerin diğer deneklere aktarıldığında da görülmesi üzerine olmuştur [102]. O dönemde bu hücreler izole edilmemişken günümüzde birçok progenitör hücre tanımlanmış durumdadır. Her progenitör farklılaştıracağı koloniye göre isimlendirilir. Lenfoid hücreler için bunlar lenfoid kolonisi oluşturuca ünite (CFU-L) , Granülosit ve monositler için granülomonositik koloni oluşturuca ünite (CFU-GM) olarak adlandırılırlar (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Kemik iliği kök hücre grupları ve Hematopoetik kök hücrelerin kan hücrelerine değişimi

## **Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök hücreler .**

Kemik iliği stromasındaki multipotent hücrelerdir. Bu stromal yapı hematopoetik kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşması için destek görevi görür [103]. İlk kez 1966 yılında Friedenstein tarafından fibroblastlara benzemelerinden dolayı fibroblast kolonize oluşturuca ünite( CFU-F) olarak tanımlanmış, mezenkimal kök hücre ismini daha sonra almışlardır [104]. MKH'ler kemik iliğinin küçük bir kısmını oluşturmaktadırlar. Çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda  $1 \times 10^6$  mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arasında değişen sayıda MKH mevcut olduğu gösterilmiştir.

MKH'nin karakteristik fenotipik ve immünolojik özellikleri vardır.

### **Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Özellikleri**

MKH'nin plastiğe afinitesi vardır. Kültür petri kaplarında tabana yapışırlar. Bu özellikleri in vitro kültürde izole edilmelerini kolaylaştırır. Düşük dansitedeki kemik iliği mononükleer hücreleri %10'luk basal media olarak adlandırılan fetal calf serum (FCS) veya fetal bovine serumda (FBS) 2-3 gün bekletildiklerinde petri kabı yüzeyinde hücreler görünmeye başlar. Petriye yapışmamış hücreler bu aşamada uzaklaştırılır ve hücreler birleşip bir tabaka oluşturana kadar fresh media eklenir. MKH tripsin verildikten ve ileri pasajlarla sayısı çoğaltıldıktan sonra toplanabilirler.

Bu hücrelerin mikroskopik bakışında hücrelerin iğ şeklinde olduğu ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları dikkati çekmektedir. Hücreler, düşük yoğunluklarda kültür edildiğinde koloni oluşturmaya meyil ederken, daha yüksek hücre yoğunluğunda ise koloni oluşturmak yerine yan yana dizilmiş hücre grupları halinde çoğaldıkları gözlenmektedir [105].

## Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünolojik Özellikleri

MKH'ler allojenik transplantasyon için ideal adaylardır. T hücre kaynaklı immün yanıt için gerekli olan ko-stimulatör mediyatörler, MHC class II ve ICAM ekspresyonunu çok az yaparlar. T hücre proliferasyonunu inhibe ederek ciddi immün düzenleyici rol oynarlar [106]. Bu özellikleriyle graft versus host hastalığını (GVHD) azalttığı ve deri allogreftinin sağ kalımını uzattıkları gösterilmiştir [107]. .

Son çalışmalarda MKH'nin dentrik hücrelerde, T hücrelerinde ve natural killer hücrelerinde sitokin salgısı profilini değiştirdiği gösterilmiştir. Proinflamatuvar sitokinler (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) salgısını azalttığı ve baskılayıcı sitokinlerin (IL-10) salgısını arttırdığı gösterilmiştir [108].

MKH'ler pek çok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip multipotent kök hücrelerdir. İmmün fenotiplendirilmesi yapılmamışken, Uluslararası Hücre Tedavileri Derneği (ISCT) çalışma grubu, MKH tanınması için gerekli minimum kıstaslarla ilgili bir bildiri yayınlamıştır [109].

1. Plastiğe afinite

2. Yüzey belirteçleri için CD105, CD703, CD35 pozitifliği; CD 34, CD 45, CD11b, CD19, CD11b, CD14, CD73 $\alpha$  negatifliği

3. İn vitro kondrosite, osteoblasta, adiposite farklılaşabilme

Kemik iliği dışında deride, amniyon sıvısı, kordon kanı, kordon stroması ve plasentada, adipoz dokuda, kemik/periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, sinovial sıvıda bulunur (Tablo 2.12).

Tablo 2.12 MKH kaynakları

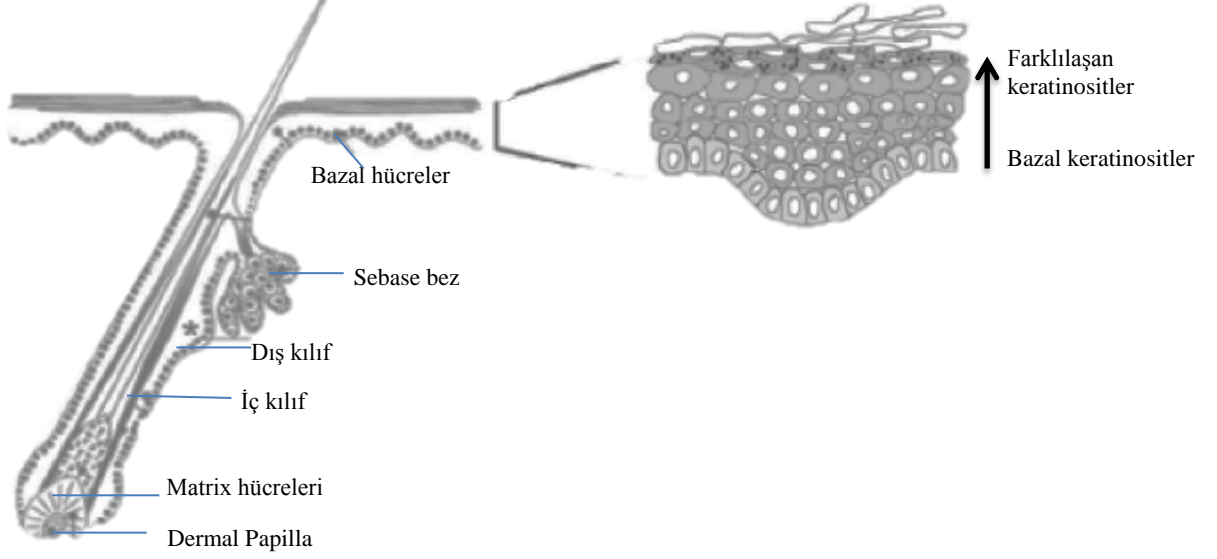
MKH Kaynağı	Farklılaşabildikleri Hücreler
Kemik iliği	Adiposit Astrosit, nöron Kardiyomiyosit Kondrosit, Osteoblast, Kas Hepatosit Endotel hücresi Stroma Hücresi (fibroblast)
Kas dokusu	Adiposit Endotel hücresi Nöron Kondrosit, Osteosit
Spongyöz kemik	Adiposit, Kondrosit, Osteoblast
Dermis	Adiposit, Kondrosit, Kas, Osteoblast
Adipoz doku	Kondrosit, Kas, Osteoblast, Stroma Hücresi (fibroblast), Endotel hücresi
Periosteum	Kondrosit, Osteoblast
Perisit	Kondrosit, Osteoblast
Periferik kan	Adiposit, Fibroblast, Osteoblast, Osteoklast

### 2.5.6.2. Epidermis

Deri vücudumuzun en büyük organıdır. Epidermis ektodermal, dermis mezodermal kökenlidir. Bu kök hücreler epiderminin bazal katmanında ve saç foliküllerinin altında bulunurlar (Şekil 2. 16)

Epidermal kök hücreleri basal tabakada ve kıl folikülünün dış kılıfında bulunarak keratinositleri meydana getirirlerken, foliküler kök hücreleri hem saç foliküllerini, sebace hücreleri hem de epidermisi meydana getirirler. Keratinositler geniş yüzey yanıklı hastaların tedavisi için 1970'li yıllarda, alınan deri greftlerinin kültüre edilebilmesi ve içerisindeki keratinositlerin seri pasajlarla çoğaltılması sonrasında kültürlerle tabakalar üzerine yayılarak

greftlemeler yapılmıştır [110]. Daha sonraları yüzey belirteci olan CD71 keşfiyle keratinositlerin izole kültürü başarılmıştır [111].



Şekil 2.16 Kıl folikülü dış ve iç kılıfı içerisindeki kök hücreler [112]

Dermisten multipotent özellikli kök hücrelerin nöronlara, glial hücrelere, düz kaslara ve yağ hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir [113].

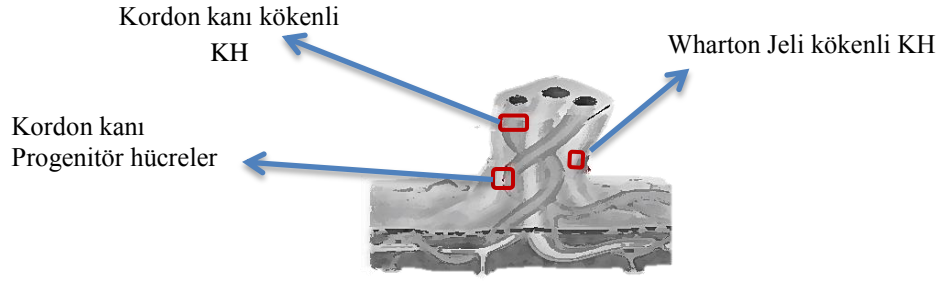
### 2.5.6.3. Amniyotik Sıvı

Tüm ekstra embriyonik kaynaklar içerisinde doğum öncesi elde edilebilen tek kaynak amniyon sıvıdır. Amniyon sıvısı içerisinde fetal deri, solunum ve gastrointestinal trakt epitel ağırlıklı hücreler vardır. Gebeliğin ilerleyen haftalarına göre sıvının ihtiva ettiği hücrelerin kompozisyonu değişir [114]. Amniyon sıvında HKH ilk tespit edilmişler, mezenkimal kök hücrelerin keşfi daha sonra olmuştur [115]. Bu hücrelerle yapılmış incelemelerde MKH'lerin farklı hücrelere değişebildiği gösterilmiştir [116].



#### 2.5.6.4 Umblikal Kord

Umblikal korddan ilk elde edilmiş kök hücreler hematopoetik kök hücrelerdir. Bu hücreler embriyonik kök hücre ile yetişkin kök hücre arasında bir nişte seyretmekte olup üretilmesi tedavi açısından embriyonik kök hücrelere göre daha az etik problemler arz etmektedir. Yapılan çalışmalarda umblikal kordun mezenkimal hücreler açısından da zengin olduğu gösterilmiştir [114]. Umblikal kordun hem kanından, hem de Wharton jelinden kök hücre elde etmek mümkündür (Şekil 2.17). Umblikal kord kanı hem pluripotent kök hücreler, hem de hematopoetik kök hücreler için kaynaktır [117, 118].



Şekil 2.17 Umblikal kord ve kök hücre elde edilebilecek alanlar[119]

#### 2.5.6.5 Adipoz Doku

Adipoz doku embriyoda mezodermden gelişir. Lokalizasyon ve fonksiyonlarına göre birkaç tip yağ doku mevcuttur. Beyaz, mekanik, kahverengi, kemik iliği ve meme yağ dokusu. Beyaz adipoz doku, enerji kaynağı olarak ve leptin, adiponektin, resistini osteopontin, lipokalin gibi adipokin faktörleri salgılayarak endokrin organ gibi görev yapar. Kahverengi yağ dokusunun görevi termoregülasyondur. Yenidoğanda aorta, kalp, böbrekler etrafında yoğun olarak bulunurken ilerleyen yaşla birlikte miktarı azalır. Mekanik adipoz doku avuç içi, retroorbital

bölge gibi özelleşmiş bölgelerdeki destek hücreleridir. Memedeki adipoz doku ise laktasyon sırasında meme glandlarına destek ve enerji kaynağıdır. Kemik iliğindeki adipoz doku ise hematopoetik kök ve progenitör hücreler için düzenleyici sinyaller sağlar.

1960 larda Rodbell adipoz dokuda, adipositler progenitör hücreler fibroblastlar, kan ve endotel hücrelerinden oluşan heterojen ‘**stromal vasküler fraksiyonu**’(SVF) tanımlamıştır [120].. Sonrasında yapılan çalışmalar SVF hücrelerinin, adipoz hücreleri in vitro üretebilecek prekürsör hücreleri barındıran fibroblast benzeri morfolojide olduğunu göstermiştir [121]. SVF sadece içerdiği kök hücre yönüyle değil çeşitli büyüme faktörü sentezleme yeteneği olan preadiposit, adipoblast ve endotelyal hücreler açısından da oldukça önemlidir. Zuk yaptığı çalışmada adipoz dokunun mezenkimal kök hücreleri için bir kaynak teşkil ettiğini ve bu hücrelerin yağ, kıkırdak, kemik dokularına diferansiyasyonunu göstermiştir. Aynı yazar adipoz kökenli kök hücrelerin kemik iliği kök hücreleri ile aynı yüzey belirteçlerine(CD29+ CD44+, CD71+, CD90+,CD105+, SH3+, CD31-, CD34-, CD45-) sahip olduğunu göstermiştir [122]. Adipoz kökenli kök hücreler SVF içinde %2-10'luk kısmı oluşturmaktadır ve bu oran alınma tekniğine göre değişiklik göstermektedir

Adipoz doku lipektomi ile elde edilir. Lipektomi cerrahi eksizyon veya liposuctionla yapılabilir. Liposuction, plastik cerrahinin temel ameliyatlarından biri olup, medikolegal sorunlara veya ek morbiditelere neden olmadan kemik iliğine kıyasla 100-1000 kat arasında kök hücre elde edilmesine imkân verir [123]. Liposuction tekniği tümesan, ıslak, ultrasound yardımlı olabilir. Cerrahi eksizyon tekniğinin ve ilk 24 saat içinde verilmesinin en verimli sonucu elde etmek için önemli olduğu laser ve ultrasound liposuction yönteminde hücre ölümünün daha fazla olduğu bazı otörlerce düşünülmektedir [124].

Toplanan dokulardan kök hücre elde edilmesi için birkaç protokol tanımlanmıştır. Bu protokollerin ortak mantığı kollajenaz veya tripsin gibi enzimlerle hücreler arası ayrışmayı sağlamak ve santrifüj yöntemiyle yoğunluklarına göre hücreleri ayırmaktır [125, 126].

Adipoz kökenli kök hücreler kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerle benzer yüzey belirteçlerine sahiptir. Her ikisinde de multipotentlik potansiyelini gösteren STRO-1, CD105,

CD166 yüzey belirteçleri mevcuttur [127, 128]. Diğer belirteçlerle ilgili tablo aşağıdadır (Tablo 2.13).

AKKH doğal olarak olgun adipositlere farklılaşma eğilimindedirler. Birçok araştırmacı bu hücrelerin multipotensini göstermeyi başarmışlardır. Osteojenik farklılaşma Ascorbat, betaglycerophosphat, dexamethazon ve vitamin D(3) kullanarak AKKH'nın *in vitro* ortamda değiştiği, ekstrasellüler matrikste kalsium fosfat toplandığı gösterilmiştir [129].

Tablo 2.13 AKKH yüzey belirteçleri ve görevleri [122]

Yüzey Belirteci	Görev
CD29 ( beta-1-integrin)	Anjiogenezis
Interselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1:CD54)	İmmunglobulin süper gen ailesi
CD44 (Hyaluronat reseptör)	Ekstraselüler Matriks gelişimi
HLDR- , MHC class 1 +	İmmün modülasyon, azalmış rejeksiyon
CD105 CD73 CD90 pozitifliği CD45, CD34ve CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 negatifliği	Mezenkimal stromal kök hücre kriterleri

Hepatosit growth faktör, fibroblast growth fakötr transferrin nikotinamid verilmesi sonrasında hepatositlere farklılaşma gösterilmiştir. Farklılaşan AKKH hepatositlere benzer şekilde albumin ve diğer fraksiyonlarda proteinler ürettiği görüldü [130].

Safford ve arkadaşları 2002 yılında yayınladıkları çalışmada AKKH leri valproik asit, butilleştirilmiş hidroksiyanzol, insulin ve hidrokortizon etkisiyle sinir dokusuna farklılaştırmış ve immunhistokimyasal yöntemlerle sinir dokusuna ait filament M, netsin ve NeuN maddeleri göstermiştir [131].

Kondrojenik farklılaşma *in vitro* ortamda aljinat makriks üzerinde kondrojenik medyum kullanılarak kıkırdak matriks sentezlediği görülmüştür [132]. Başka bir çalışmada ise TGFb1, askorbik asit, insulin ve transferin etkisiyle kondrojenik farklılaşma sağlanmıştır [133].

### 2.5.7 Mezenkimal Kök hücreler ve Rejeneratif Tıp

Rejeneratif tıp, teknolojik yeniliklerle doğru orantılı olarak hızla ilerleyen multidisipliner bir araştırma alanıdır. Kök hücre, büyüme faktörleri, biyomateryallerin kullanılarak, hasar görmüş, yaşlanmış, hastalıklı hücre, doku ve organları onarıp yerine koyarak ve rejenerere ve rejüvene ederek fonksiyonlarını işler hale getirmeyi hedefler. Yetişkin kök hücre araştırmaları hastalıklı ve hasarlı organları yenileyici etme yeteneği bakımından geleceğin rejeneratif tıbbının temelini oluşturacaktır. Kök hücreler hakkında günümüze kadar yapılmış çalışmalar bize doku ve organların oluşumu ve gelişimi hakkında önemli bilgiler vererek, onarımın ve rejenerasyonun kapısını açmıştır.

MKH'lerin başta hücresel tedaviler, doku mühendisliği, bağışıklık baskılayıcı tedaviler ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek arttırmaktadır.

Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında başta bağ doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. Çeşitli araştırmalar in vitro koşullarda uygun uyaranlar ile osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerini ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir. Mezenkimal kök hücreler, in vitro ortamda kolaylıkla farklılaşmaya yönlendirilebilmektedir. Adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşma özelliklerinin in vitro gösterilmesinin, MKH tanımlaması için şart olduğu bildirilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda benzer veya farklı uyaranlara maruz bırakılarak günler içerisinde çok sayıda hücrenin farklı tipte hücreye dönüşüm gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir.

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu; kök hücrelerin kaynaklandığı dokudan ayrıştırılması, hazırlanması ve elde edilmesini takiben, uygun şartlarda kültüre edilerek istenilen hücre çeşidine farklılaştırılması ve sadece farklılaştırdıkları tipteki hücrelerin çoğaltılması işlemidir. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri Tablo 2.14'te gösterilmiştir

Tablo 2.14 Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri.

<b>Farklılaşma Protokolü</b>	<b>Medya</b>	<b>Serum</b>	<b>İçerik</b>
Adipojenik	DMEM	FBS(%10)	0.5mM IBMX, 1 mikroM deksametazon, 10 mikroM insülin, 200 mikroM indometazin, %1 antibiyotik/antimikotik
Osteojenik	DMEM	FBS(%10)	0.1 mikroM deksametazon, 50 mikroM askorbat-2-fosfat, 10 mM B- gliserofosfat, %1 antibiyotik/antimikotik
Kondrojenik	DMEM	FBS(%10)	6.25 mikrog/ml insülin, 10 ng/ml TGFB1, 50nM askorbat-2-fosfat, %1 antibiyotik/antimikotik
Miyojenik	DMEM	FBS(%10) HS(%5)	50 mikroM hidrokortizon, %1 antibiyotik/antimikotik
Nörojenik	DMEM	Yok	5-10 mM $\beta$ -merkaptotanol

(DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, FBS: Fetal bovine serum (Fetal buzağı serumu), HS: Human serum (İnsan serumu))

## 2.5.8 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı

### 2.5.8.1 Kemik Onarımı

Osteopeni ve osteoporoz birçok insanı ilgilendiren kemik hastalıklarıdır. Devam etmekte olan çalışmalar kemik defektlerinin onarımı için farmakoloji, gen ve hücre tedavileri yoğun olmak

üzere devam etmektedir. Doku mühendisliği için uygun hücrelerin kendilerini yenileyebilmeli ve bağışıklık sistemiyle uyumlu olmalıdırlar. Osteoblast farklılaşması iskelet dokusunun oluşması ve kemik remodellinginde önemli bir aşamadır [134]. Mezenkimal hücrelerin in vitro osteojenik potansiyeli gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonrasında kemik defektlerinin in vivo olarak onarılabileceği fikri doğmuştur. Bunun üzerine birçok labaratuarda osteojenik farklılaştırılmış MKH'leri skafold ve biyomateryallere ekmişlerdir. En dikkat çekici biyomateryaller atelokollajen [135], hidroksiapatit tirikalsiyum fosfat (HA-TCP) ve PGA dır [136].

Literatürde umut verici çalışmalar mevcuttur. Klinik bir vakada AKKH ile kalvarial kemik defekt onarımı yapılmıştır. Sıçanda deneysel yarık damak modelinde poliaktik asit skafolda emdirilmiş AKKH'lerle defekt başarılı bir şekilde defekt kapatılırken, kök hücre olmayan skafoldla defekt kapatılamamıştır [137].

#### **2.5.8.2 Yumuşak Doku Onarımı**

Geniş yumuşak doku defektleri travma yanık onkolojik rezeksiyonlar sonrası yaygın görülen bir durumdur. Yaşlanmaya sekonder gelişen kırışıkların düzeltilmesi ve diğer kozmetik dolgu işlemleri ise giderek daha fazla hasta ihtiyaç duymaktadır. Yumuşak doku rejenerasyonu için kollajen, hiyalüronik asit, silikon kullanılmıştır. Bu malzemelerin maliyet, allerji, biyouyumluluk sorunları gibi dezavantajları vardır. Otojen yağ greftleri klinikte kullanıyor olsa da kısa greft sağ kalımı gibi dezavantajları vardır. Yağ greftinin sağ kalımını arttırmak için *de novo* adipoz doku skafoldu oluşturulması için çalışmalar yapılmıştır. Min ve arkadaşları fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarda kültüre edilmemiş AKKH ile 9 aya varan yağ grefti sağ kalımı bildirmişlerdir. AKKH salgıladıkları proanjiogenik faktörlerin sorumlu olduğu düşünülmüştür [138].

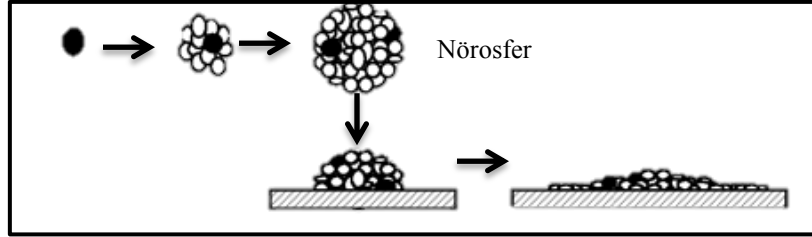
Yoshimura ve ark. yağ hücre kaynaklı stromal vasküler fraksiyonu yüzde lipoatrofide ve meme agumentasyonunda kullanmışlardır. Bu çalışmalarda yağ grefti sağ kalımı artarken lipoenjeksiyon yapılan sahalarda fibrozise rastlanmamıştır [139, 140].

### 2.5.8.3 Kıkırdak Onarımı

Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Histolojik incelemede alginata ekilmiş kök hücrelerin Tip II kollajen ve proteoglikandan zengin ekstraselüler matriks sentezleyerek nodüller şeklinde birikim göstermiştir. Kemik iliği ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşması arasında ise bir farklılık saptanmamıştır [141]. AKKH kullanılarak yapılmış *in vivo* çalışmalarda kıkırdak benzeri dokunun üretildiği gösterilmiştir. Kök hücre emdirilmiş küreler kas dokular arasına saklanmış ve 6 hafta sonra kıkırdak olduğu gözlemlenmiştir [142]. Başka bir çalışmada AKKH emdirilmiş skafoldlar üzerinde oksijen basıncı, media kompozisyonunun üzerinde etkisi olduğunu göstermiştir. Eklem üzerindeki biyomekanik stresse dayanıklı kıkırdak üretimi için *in vivo* ve *in vitro* mühendislik çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

### 2.5.8.4 Sinir Onarımı

Kök hücrelerin nöronal diferansiyasyonunun gösterilmesi uzun yıllardır rejenerasyon yeteneği olmadığı bilinen sinir dokusu onarımı için büyük bir ilgi oluşturmuştur. AKKH yüksek yoğunlukta kültüre edildiklerinde nörosfer şeklini alırlar (Şekil 2.18).



Şekil 2.18 Nöral kök hücrenin nörosfer şeklinde kültüre olması [143]

Laminin üzerindeki sferoid gövdelerin sıralı kültürleri sonucuda nöral farklılaşma gerçekleşir [144]. Bu hücreler nöral prekürsörler şeklinde mikroskopik görüntüsü veya yüzey belirteçlerini göstermesiyle tanınırlar. Elektriksel aktivitesi ve fonksiyonu olgun merkezi sinir sistemi karakteristiğinde hücrelerin oluşması hala müphemdir. Bunun yanında serebral iskemi, spinal kord hasarı ve nörolojik hastalıklarla ilgili umut verici çalışmalar mevcuttur. AKKH'lerin inme sonrasına serebral hasarlı alanlara göç ettiği ve motor fonksiyonlar düzelleme

gösterilmiştir. Düzelmelerin kök hücrelerin hasarlı hücrelerin yerine geçerek mi yoksa hali hazırdaki kök hücrelere destek rolü sağlayarak mı olduğu açıklanamamıştır. Kang ve arkadaşlarının çalışması destek hipotezi lehinedir. AKKH ile kaplı hücre kültürlerinin 14 günden fazla canlı kalabildiğini göstermişlerdir [145].

#### **2.5.8.5 Kardiyak Onarım**

Akut iskemik olaylar sonucu gelişen miyokardiyal kas kaybının neden olduğu konjestif kalp yetmezliği sık karşılaşılan bir klinik durumdur. Farmakolojik tedaviler kalan miyokardiyal kas dokusunun yükünü azaltsada nihai hasarlanmış dokunun tamiri mümkün olmamaktadır. Kök hücrelerin in vitro kardiyojenik farklılaşması gösterilmesi sonrasında miyokardiyal rejenerasyonun teminine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Deneysel miyokardial hasar modelinde infarkt çevresine verilmiş AKKH'lerin kardiyak fonksiyonlarda düzelmeye sağladığı gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada intramiyokardiyal implante edilen AKKH'lerin düz kas hücrelerine dönüştüğü fakat miyokardiyositlere farklılaşmadığı bulunmuştur [146]. Bu çalışmalarda kök hücrelerin neovaskülarizasyonu artırarak kardiyoprotektif faktörlerle bunu başardığı ve miyokardiyal fonksiyonlar üzerinde ilk 72 saat bir düzelmeye sağlamadığı bulunmuştur [147].

#### **2.5.8.6 Neovaskülarizasyon**

Mezenkimal kök hücrelerin önemli bir terapötik potansiyeli de neovaskülarizasyon üzerindeki etkisidir. Kültürdeki AKKH'lerin VEGF, hepatosit growth faktör ve transforming growth faktör- $\beta$  salgıladıkları bilinmektedir [148]. Hipoksik koşullarda VEGF salgısı artmakta ve endotelial değişime uğramaktadırlar. Diferansiye olmuş AKKH'lerin CD31, Flk-1 + ve Von Willebrand faktör sunmaya başladığı gösterilmiştir [149]. In vivo ekstremitte iske mi modeli çalışmaları nda artmış kapiller dansite ve perfüzyon AKKH'lerin anjiogenik potansiyelini destekler niteliktedir [150]. AKKH'lerin bu nitelikleri miyokardiyal hasarın düzeltilmesi, yara iyileşmesi ve flep yaşayabilirliği gibi diğer disiplinler içinde önem arz etmektedir.



### **2.5.8.7 Yara İyileşmesi**

Birçok çalışma mezenkimal kök hücrelerin yara iyileşmesi konusunda terapötik etkileri olduğunu göstermiştir. AKKH'lerin lokal implantasyonunun epidermisdeki tam kat yaralarda iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir [151]. Rigotti ve arkadaşları mastektomi sonrası post radyasyon nekrozu ve yarası görülen yerlere AKKH içeren lipoaspirat vermiş ve iyileşen yaralarda yaptığı doku analizinde 3 boyutlu bütünlüğün sağlıklı cilt altı yağ dokusu görüntüsüyle sağlanmış olduğunu göstermiştir. Bunu sağlayan mekanizma olarak da AKKH lerin salgıladıkları anjiyogenik faktörler olduğunu belirtmişlerdir [152]. Klinik uygulama olarak Crohn hastalığı kronik fistüllerine AKKH verilmesi sonrasında anlamlı olarak fistüllerin iyileştiği bulunmuştur [153].

### **2.5.8.8 Flep Yaşayabilirliğinin Arttırılması**

Kök hücrelerin daha önce terapötik anjiyogenez yapıcı etkileri birçok çalışmada gösterilmiş olup flep cerrahisinde kullanımına ait ilk çalışma ise Ichioka ve ark. tarafından yapılmıştır. Sıçanlarda yaptıkları bu çalışmada, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin dorsal cilt fleplerindeki revaskülarizasyon üzerine etkisi araştırılmış ve kapiller dansitede iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı yönde belirgin artış tespit etmişlerdir [16].

Mezenkimal hücrelerin vasküler endotelyal hücrelere farklılaşma yetenekleri olduğu bilinmektedir. Zheng ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, VEGF ve mezenkimal kök hücrelerin birlikte iskemik fleplerde neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir [154].

Lu ve ark.'nın sıçanlarda yaptığı başka bir çalışmada adipoz doku kökenli kök hücrelerin random kalıplı cilt fleplerinin yaşayabilirliğini arttırdığını göstermişlerdir [155]. Kemik iliği kökenli kök hücrelerin de sıçan cilt fleplerinde neovaskülarizasyonu arttırıp flep dolaşımına olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. Uysal Ç. ve ark. yaptığı çalışmada ise sıçan dorsal cilt fleplerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarının ADKKH uygulanması ve bir takım büyüme faktörlerinin regüle edilmesi sonucu iskemi reperfüzyon hasarının önlenebileceği gösterilmiştir [155].

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu'nun araştırma projemizi (DA14/17) onaylaması ardından deney başlatıldı. Deney için, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ağırlıkları 400 ile 450 gram arasında değişen sayısı biyoistatistik ön değerlendirme ile tespit edilmiş 46 adet Sprague Dawley cinsi sağlıklı erkek sıçan kullanıldı. Deneyler Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Ünitesi Laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### **3.1 Deneysel Hayvanlarının Bakımı**

Tüm deneysel hayvanlarına 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde standart oda şartları sağlandı. Oda sıcaklığı 18-20<sup>0</sup> C arasında tutuldu. Sıçanlar yem ve musluk suyu ile beslendi. Operasyon öncesi 24 saat hayvanlara açlık uygulandı. Hipotermi oluşmasını engellemek amacıyla sıçanlar ışık kaynağı altında ameliyat edildi ve uyanma esnasında da bu uygulama sürdürüldü.

Tüm sıçanların kuyrukları gruplarını ve hangi hayvan olduğunu belirtecek şekilde numaralandırıldı. Kafeslere hayvanlar dörder dağıtıldılar Tüm hayvanlara cerrahi sonrası dönemlerde cilt altı 0,02 mg/kg fentanil (Sufenta 5 mcg, Janssen Cilag inc.) ile analjezi uygulandı. Çalışma sonunda tüm sıçanlar, periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür enjekte edilerek kurban edildi.

#### **3.2 Deneylerde Kullanılan Malzemeler**

Kullanılan malzeme ve farmakolojik ajanlar Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3'de gösterilmiştir.

## Anestezi, Cerrahi ve Sakrifikasyonda Kullanılan Farmakolojik Maddeler

Tablo 3.1. Anestezi, cerrahi ve sakrifikasyonda kullanılan farmakolojik maddeler.

Farmakolojik ajanlar	Uygulama Yolu	Uygulama Dozu-Amacı
Ketamin hidroklorür	Periton içi	40mg/kg-anestezi 150mg/kg-sakrifikasyon
Ksilazin hidroklorür	Periton içi	5mg/kg-anestezi
Fentanil	Cilt altı	0,02mg/kg-ağrı kesici
Hipokloröz	Haricen	Antisepsi
Streptozosin	Periton içi	70mg/kg-diyabet
Pyedif NG deri spreyi	Haricen	1 kez püskürtme-antisepsi

Tablo 3.2 SVF elde edilmesinde kullanılan kimyasal maddeler.( \*Gibco-invitrogen, \*\*Santa Crus, inc. )

Stromal Vasküler Fraksiyon Elde Etmek için Gerekli Kimyasal Maddeler	Uygulama Amacı
Fetal bovine serumu (FBS)*	Kök hücre eldesi
Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik (PBS)*	Yıkama, PH ayarı
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*	Kök hücre eldesi
Kollajenaz, tip 1*	Hücrelerin birbirinden ayrılması
1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI)**	Kök hücrelerin işaretlenmesi amaçlı

### 3.3 Cerrahi Method

#### 3.3.1 Dorsal Deri Flebinin Hazırlanması

Flep modeli olarak Ichioka ve ark. tariflediği, kontrol grubunun kendi içinde olması avantajına sahip “çift dorsal deri flebi” tercih edildi [16]. Ichioka modelinden farklı olarak ada flep

yerine kaudal bazlı random flep olarak kaldırıldı. Anlamalı nekroz oranları bildirilmiş olması nedeniyle dar tabanlı kaudal bazlı flep tasarımı tercih edildi [156]. Denekler arasında farklılık olmaması için her iki posterior superior iliak çıkıntı arasında ve kolumna vertebralisin her iki yanında olacak şekilde tabanı 1 cm ve uzunluğu 5 cm şekilde tasarlandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 İki flebin her iki posterior iliak spine arasında 1x5 cm lik tasarımı.

Flep, pannikulus karnozus tabakası dahil edilerek derin fasya üzerinden keskin diseksiyon ile kaldırıldı (Şekil 3.2). Soldaki 1x5 cm olarak hazırlanmış flebe stromal vasküler fraksiyon verilmesi planlandı, sağdaki flep kontrol grubu olarak belirlendi ve bu flebe fosfat tamponlu salin (PBS) enjeksiyonu yapılması planlandı.



Şekil 3.2 Fleplerin pannikülüs karnozus dahil edilecek şekilde kaldırılması

Flep, tabandan beslenmeleri engellenmesi için donör alanın primer kapatılmasını takiben flep cildin üzerine 3/0 ipek dikiş (Doğsan Ltd) ile tespit edildi (Şekil 3.3). Fleplerin üzerine antiseptik ve kannibalizasyonu engelleyici özelliği olan sprej yara pansuman tatbik edildi.



Şekil 3.3 Cilt kapatıldıktan sonra fleplerin ayrılarak deri üstüne tespit edilmesi

### 3.3.2 Diyabet Oluşturulması

+4°C'de serum fizyolojik içinde çözülmüş streptozosin (Sigma Chemical Co. St. Louis Missouri, ABD), 65 mg/kg periton içine (intraperitoneal) olarak verildi. Bu işlemden 48 saat sonra sıçanların kuyruk venlerinden kan örnekleri alınarak, kan glikoz değerleri glukometre cihazı (Wellion, Austria) ile ölçüldü (Şekil 3.4). Ölçüm sonucu kan şekeri 200mg/dl ve üzeri olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi.

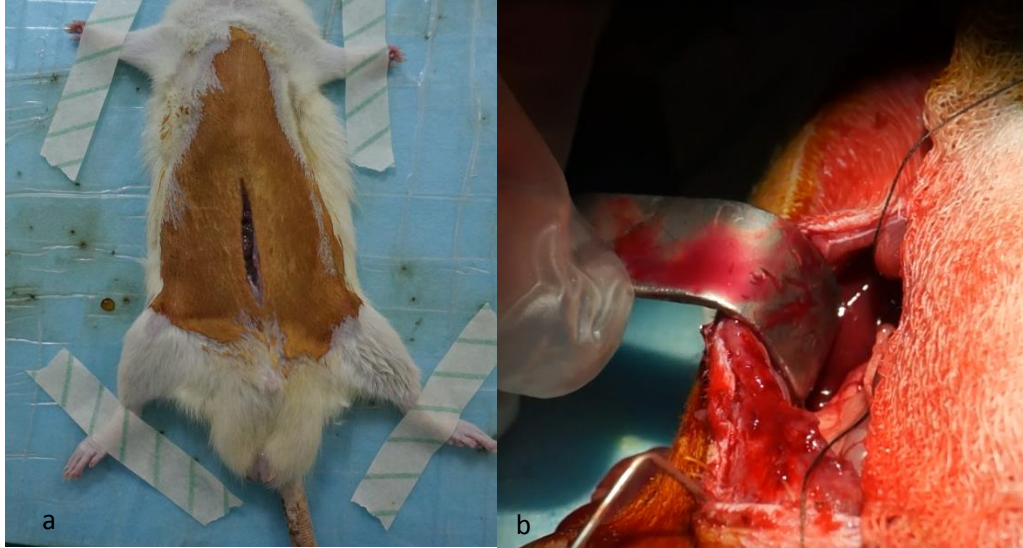


Şekil 3.4 STZ sonrası 48. Saat glukometriyle kuyruk kanından kan şekeri ölçümü

### 3.3.3 Kronik Böbrek Hastalığı Oluşturulması ( 5/6 Nefrektomi)

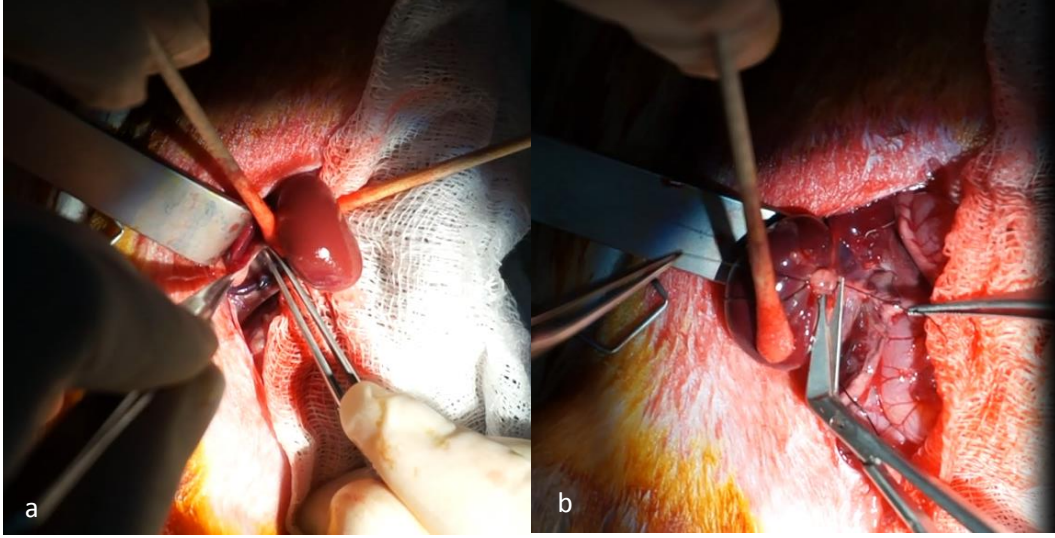
Seth ve ark. tanımladıkları tek seanslı yöntemle 5/6 nefrektomi yapıldı [87]. Cerrahiye başlamadan önce sıçanların periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer inc.) enjekte edilerek anestezi sağlandı. Anestezi derinliği ekstremitte çekme yanıtı ile değerlendirildi. İdame anestezi başlangıç dozunun %50'si ile sağlandı. KBH modeli için karın ön duvarı, flep cerrahisi için sırt derisi tüyleri elektrikli traş makinesi yardımı ile kesildi. Sıçanlar ameliyat masasına sırt üstü yatırılarak dört ekstremiteden ve kuyruklarından flasterlenerek tespitlendi. Ameliyat sahası %10 Polividon iyotla temizlendi.

Dorsal flepleri etkilememesi için her iki lomber insizyon yerine vertikal abdominal insizyon tercih edildi. Ksifoid çıkıntı ve suprapubik bölge arasındaki vertikal planda 4 cm uzunluğunda insizyon yapıldı. Cilt geçildikten sonra takiben her iki rektus abdominis kası arasından girilerek, rektus kılıfı ve periton geçildi sağ nefrektomi için cilt, barsak ansları ve karaciğer ekarte edildi (Şekil 3.5).



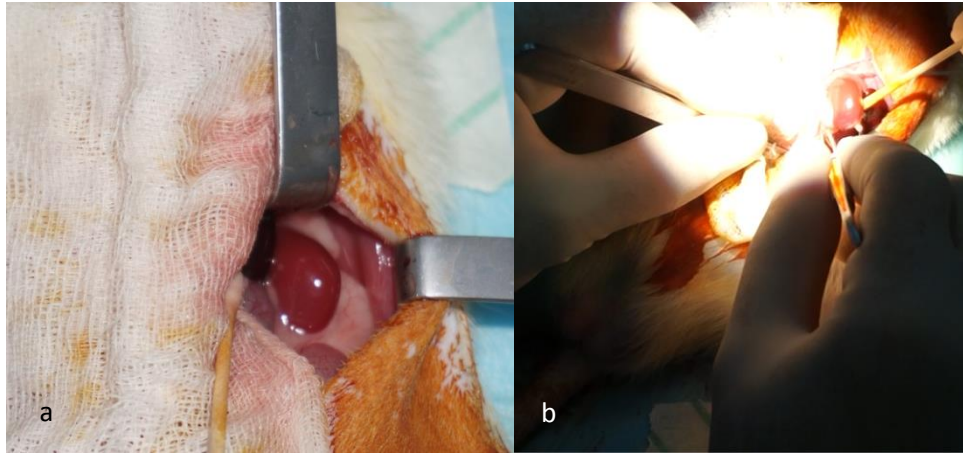
Şekil 3.5 a) 4 cm lik orta hat insizyonu b) Sağ böbrek için cilt, barsak ansları ve karaciğerin ekarte edilmesi

Mikroskop altında böbrek kapsülü soyuldu, sürrenal bez korundu ve renal hilus ortaya koyulduktan sonra renal hilüs (renal arter + ven + üreter) 0,5 cm proksimalinden 6.0 Vikrille (Ethicon Inc) bağlanarak sağ böbrek eksize edildi (Şekil 3.6). Eksize edilen böbrek tartıldı.



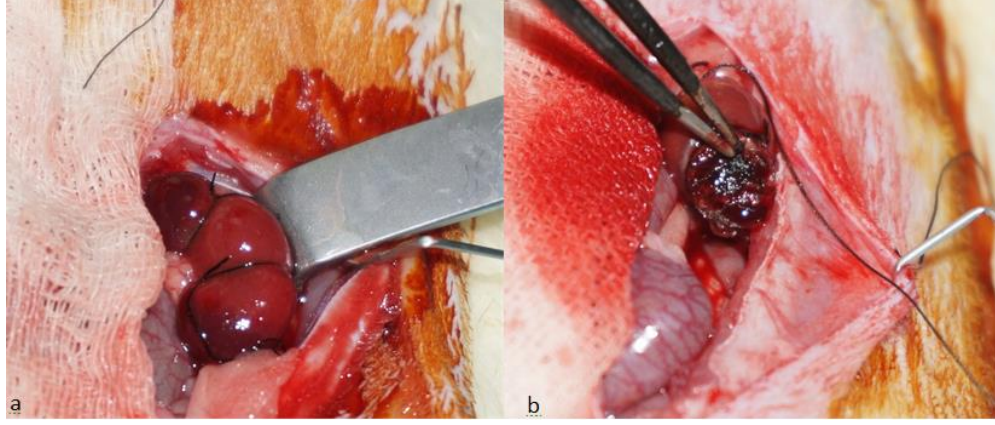
Şekil 3.6 a) Sağ böbrek kapsülünün mikrodiseksiyonla soyulması b) Nefrektomi

Sol 2/3 nefrektomi için, cilt, barsak ansları ve dalak ekarte edildi. Mikroskop altında böbrek kapsülü eksize edildi, sürrenal bez korundu. Böbreğin renal hilusu (renal arter, ven ve üreter) mikrodiseksiyonlarla ortaya konuldu ve hasarlanmamasına özen gösterildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 a) Sol böbrek için barsak ansları, cilt ve dalağın ekartasyonu b) Böbrek kapsülünün mikrodiseksiyonla soyulması

Sol böbreğin üst ve alt polü 4.0 ipek dikişle renal korteksi rengi solacak ama renal korteksi kesmeyecek sıklıkta bağlama yapıldı. Bağlamalar esnasında renal pedikülün hasar görmemesine özen gösterildi. Bağlamaların distalleri 11 numara bisturiyle kesilip, çıkan parçalar tartıldı ve sağ böbrek ağırlığının 2/3 ü olacak şekilde kontrol edildi. Tartı eksikliği varsa az alınan polden reeksiyon yapıldı. Ekspoze olan renal medülla bipolar yardımıyla hemostaz sağlandı (Şekil 3.8).



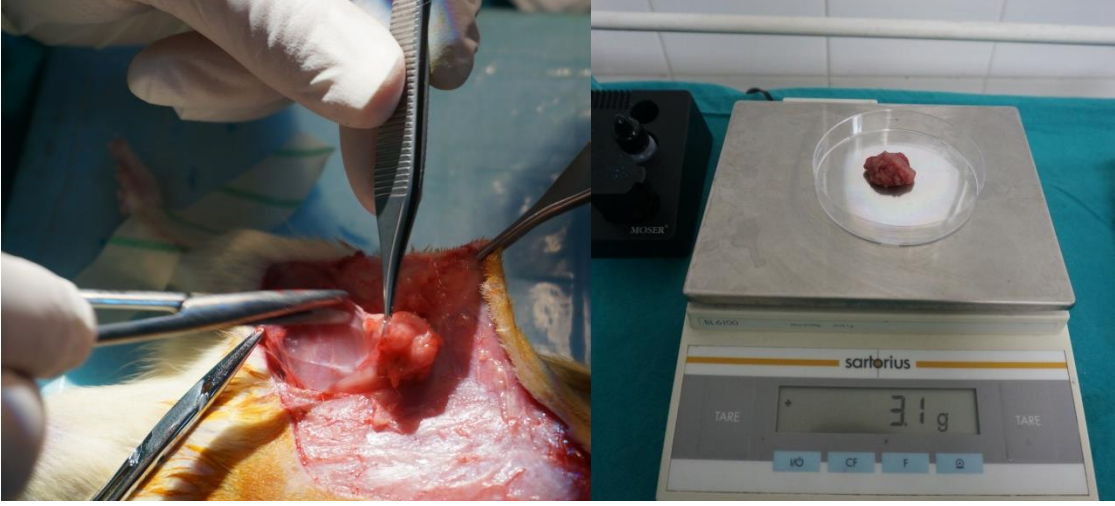
Şekil 3.8 a) Sol böbreğin üst ve alt pollerinin böbrek korteksini kesmeyecek sıklıkta bağlanması b) Alt ve üst pollerinin uzaklaştırılması ve bipolarlarla hemostaz yapılması

kanama kontrolü tekrar yapıldıktan sonra barsak ansları doğal pozisyonlarına alındı, kapama öncesinde sıvı kayıplarının replasmanı için 2 cc intraperitoneal serum fizyolojik verildi. Periton, rektus abdominis kası 4.0 yuvarlak vikrille kilitli devamlı dikişle onarıldıktan sonra cilt, 3.0 ipekle kilitli devamlı teknik kullanılarak onarıldı.

### 3.3.4 Stromal Vasküler Fraksiyonun Hazırlanması

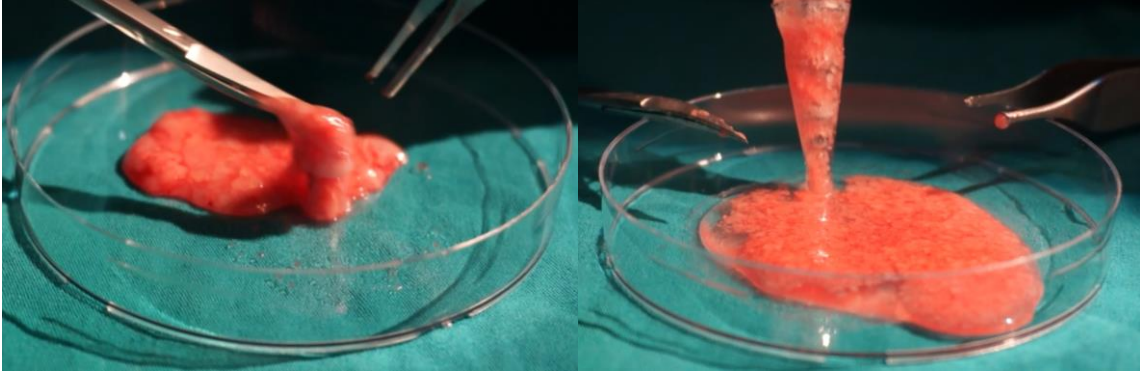
Sıçanların kasık bölgeleri tıraş edildi ve cilt temizliği ardından kasık bölgesindeki yağ dokusu eksize edildi. Eksize edildikten sonra tartıldı. Gruptaki tüm hayvanlardan 3 gr yağ alındı (Şekil 3.9).





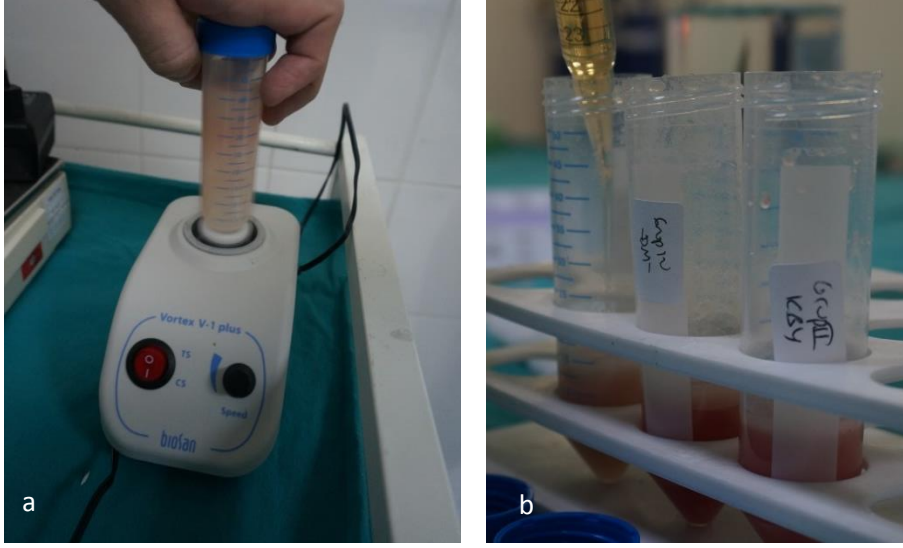
Şekil 3.9 İnguinal bölgeden fibroadipoz doku alınarak petri kabında tartılması

Alınan adipoz doku PBS ile yıkandı. Yıkama ardından yağ dokusu içindeki vasküler yapılar mikropenset ve mikromakas yardımıyla temizlendi. Tüm yağ dokusu küçük parçalara ayrılacak şekilde kesildi (Şekil 3.10).



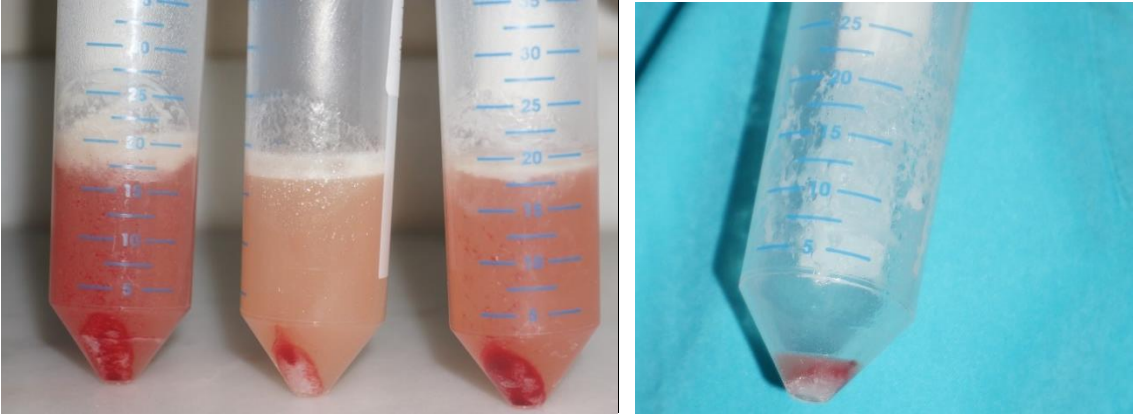
Şekil 3.10 Petri kabında doku makasıyla parçalama işlemi ve pipetle transferi

Yıkama işlemini takiben dokular 50 cc'lik konik santrifüj tüplerine alındı. %0,15 oranında kollajenaz tip I eklendi ve yaklaşık 30 dk vortekste (Biyosan vorteks V-1 Plus) karıştırıldı. Kollajenazın nötralizasyonu için %10 PBS ve DMEM' den oluşan kontrol medium eklendi ve tekrar vortekste karıştırıldı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 a) Kollajenaz sonrası vortekste çalkalama b) Kontrol medium eklenmesi

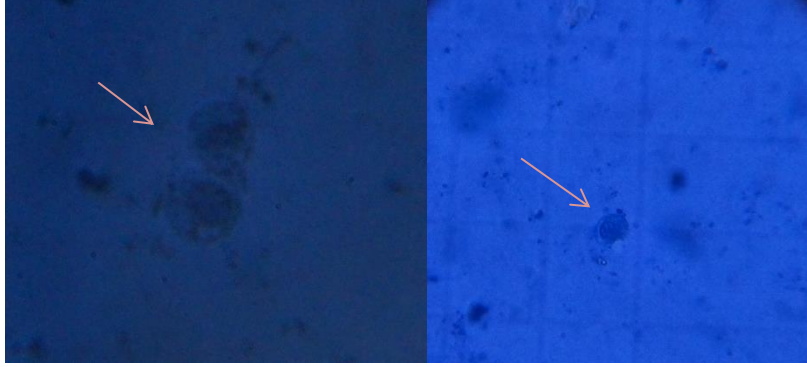
Takiben hücre süspansiyonlarını içeren tüpler 260 G'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüm tüplerin üst kısmında kalan yağ ve dokular sıvılar ile birlikte uzaklaştırıldı. Santrifüj sonunda tüp dibinde toplanmış hücreden zengin stromal vasküler fraksiyon mikropipetle toplandı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Santrifüj sonrasında tüp üzerindeki serumun uzaklaştırılarak tüp dibinde SVF'nin bırakılması

Toplanan SVF'ye PBS eklenerek 10cc'ye tamamlandı. Hücre sayımı için mikropipet kullanılarak 0.1 ml alındı metilen mavisiyle boyandı ve Thoma lamı üzerinde yaklaşık 5 hücre

sayıldı ve sayılan hücreler  $10^7$  ile çarpılarak hazırlanan kök hücre sayısı hesaplandı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Thoma lamında görülmekte olan büyük nükleuslu büyük sitoplazmalı kök hücreler

Hücre sayımını takiben 10 cc'lik hücre süspansiyonu 260 G'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmında birikmiş olan kök hücrelerden zengin kısım tüplere alındı.

Kök hücre işaretlemesi için sitoplazmik boya olan 1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI) kullanıldı. DiI %99'luk etanol çözeltisinde çözülerek %25'lik konsantrasyonda solüsyon hazırlandı. Kullanılmadan önce PBS ile 1/100 oranında dilüe edildi. DiI soğuk ortamda sitoplazmaya bağlandığı ve in vivo koşullarda bırakmadığı bilindiği için hazırlanan tüpler buzlu suda bekletildi ve 20 dakika bekleme ardından  $200 \mu$  Di eklenerek beklemeye alındı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 DiI sitoplazmik boya çözeltisinin hazırlandıktan sonra +4°C'de tüplere aktarılması

İnkübasyon periyodunun sonrasında, DiI sitoplazma bağlantısının fiksasyonu için 7 ml PBS konuldu ve karıştırıldı. Hücre DiI fiksasyonu sağlandıktan sonra bu süspansiyon 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüp dibindeki stromal vasküler fraksiyon üzerine 5 cc PBS eklendikten sonra 1 cc'lik enjektörlere çekildi.

Kaldırılan fleplerde soldaki flebin altına intradermal flep distali ve proksimali arasındaki 5 noktaya sıçan basına 0.5 cc SVF (  $5 \times 10^7$  kök hücre ) (Şekil 3.15), sağdaki kontrol flebine ise flep altından intradermal 5 ayrı noktaya 0.5 cc PBS verildi.



Şekil 3.15 Stromal vasküler fraksiyonun sol flep altından intradermal yapılması.

### 3.4 Deney Protokolü

**Grup I (Kontrol grubu):** 10 adet sıçanda iki adet cilt flebi kaldırıldı. Sağ ve sol flepler arasında fark olup olmadığını göstermek için her iki flebe fosfat tamponlu salin (PBS) enjekte edilip, flepler yerine iade edildi. 1 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edildiler ve flepler makroskopik, biyokimyasal ve histopatolojik incelendi.

**Grup II (Diyabet grubu):** 12 sıçan hayvanlara intaperitoneal 65 mg/kg dozunda Streptozosin yapıldı. 2 gün sonrasında glukometreyle kan şekeri ölçüldü. Kan şekeri seviyesi 200mg/dl olan hayvanlar diyabetik kabul edildiler. 3 hafta sonunda hayatta kalan 10 hayvanın 2 si kök hücre eldesinde kullanılırken, 8 hayvanın sırttan iki adet cilt flebi kaldırıldı. Hazırlanmış SVF soldaki flebe verildi. Sağdaki flebe PBS verildi. 1 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edildiler ve flepler makroskopik, biyokimyasal ve histopatolojik incelendi.

**Grup III (Kronik böbrek hastalığı grubu):** 12 adet sıçanda 5/6 nefrektomi yapılmasını takiben 6 hafta hayvanlar takip edildi. 6. hafta sonunda hayatta kalan 10 hayvanın 2 si kök hücre eldesinde kullanılırken, 8 hayvanın sırttan iki adet cilt flebi kaldırıldı. Soldaki flebe hazırlanan stromal vasküler fraksiyon enjekte edilirken, sağdaki flebe PBS verildi. 1 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edildiler ve flepler makroskopik, biyokimyasal ve histopatolojik incelendi.

**Grup IV (Kronik böbrek hastalığı ve Diyabet Grubu):** 12 adet sıçanda 5/6 nefrektomi yapıldı. 3 hafta beklendikten sonra hayvanlara intaperitoneal 65 mg/kg dozunda Streptozosin yapıldı. 2 gün sonrasında glukometreyle kan şekeri ölçüldü. Kan şekeri seviyesi 200mg/dl olan hayvanlar diyabetik kabul edildiler. 3 hafta sonra hayatta kalan 10 hayvanın 2 si kök hücre eldesinde kullanılırken, 8 hayvanın sırttan iki adet cilt flebi kaldırıldı. Soldaki flebe hazırlanan stromal vasküler fraksiyon enjekte edilirken, sağdaki flebe PBS verildi. 1 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edildiler ve flepler makroskopik, biyokimyasal ve histopatolojik incelendi.

### **3.5 Makroskopik Değerlendirme**

#### **3.5.1 Canlı Alan Yüzdesinin Ölçülmesi**

Tüm sıçanlarda, flep kaldırılmasından sonraki 7. günde canlı/nekrotik alan ölçümleri yapıldı . Bu işlem için sıçanlar, periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc) ile sakrifiye edildi Sıçanlar yüzüstü yerleştirildi. Sıçanların yanına kalibrasyon için bir adet cetvel konuldu. Fotoğraflar yaklaşık 50 cm mesafeden Sony- $\alpha$  Nex-6 SLR fotoğraf makinasıyla 3.5-5.6/16-50 lensle çekildi.

Alan ölçümü için Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Inc) programı kullanıldı. Sıçan yanına yerleştirilmiş cetvel yardımıyla 1 cm<sup>2</sup>'lik alandaki piksel sayısı “measurement log” aracı ile bulundu ve canlı alan oranı flep alanına oranlanarak canlı alan yüzdesi hesaplandı (Şekil 3.16). Canlı alan yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır: Canlı Alan Yüzdesi: (Canlı Alan/ Flep Alanı) x 100



Şekil 3.16 Adobe Photoshop 7.0 programında canlı alan yüzdesi hesaplanması

### 3.5.2 Mikroanjiografi Çekilmesi

Tüm deney aşamalarını bitirmiş her gruptan bir hayvana flep damarlanmasını tespit etmek için mikroanjiografi yapılması planlandı. Mikroanjiografi için baryum enjeksiyonu deneyin sonlandırıldığı hayvanların sakrifiye edilerek fleplerin alındığı post operatif 7. Günde yapıldı. 15 cc baryum (R-X baryum solüsyon %100, 240ml, Yenişehir Lab Ltd) ve 45 cc serum fizyolojik bir kaba boşaltıldı ve %25'lik 60 cc baryum çözeltisi elde edildi. Bu çözeltiye yaklaşık 5 cc kursun oksit eklendi. Çözelti, 20cc'lik enjektörlere çekildi. Çözeltinin hazırlanması ardından baryumun enjekte edileceği sol ventriküle ulaşmak için. sol subkostal bölgeden yapılan dik bir kesi ile karın içi boşluğa girildi. Diseksiyona sefalik yönde devam edildi. Kalbin sol ventrikülü, 22 gauge kelebek set ile kanülize edildi (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Sol ventrikülün kanalize edilerek Baryum enjeksiyonuna başlanması

Baryumun vücutta dağılımından emin olmak için sıçanın kuyruğu kesildi ve ardından baryum çözeltisi düşük basınçta verilmeye başlandı. Baryum çözeltisi sol karıncığa verildikçe önce koroner damarların çözelti ile dolduğu, sonra karaciğerin şişerek beyaz beneklenme gösterdiği izlendi Kesilen kuyruk bölgesinden baryumlu çözeltinin geldiği gözlemlendi (Şekil 3.18 ).

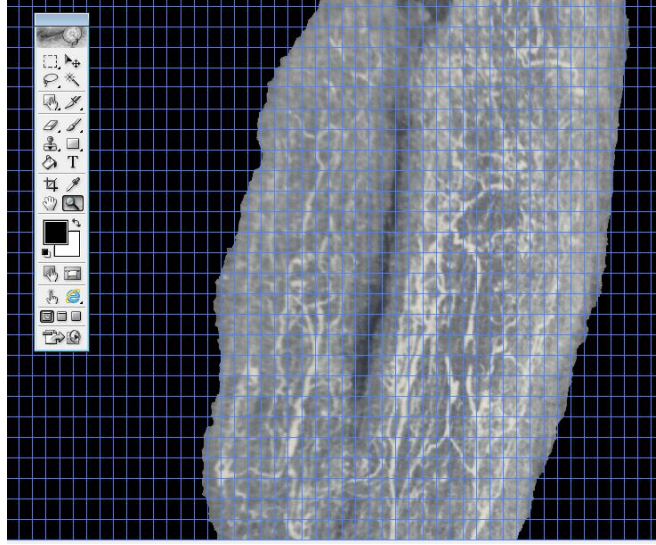


Şekil 3.18 Enjeksiyon sonunda karaciğerdeki beneklenme

Sıçanın dolaşım sisteminde kanın yerini baryum çözeltisi alması sebebi ile işlem başlangıcından 60-90 saniye sonra deney hayvanı sakrifiye oldu. Sıvının geri gelmemesi için birkaç dakika daha kalbe bası uygulandı, ardından eksizyon hattı dikildi. Sıçan, plastik torba içine konuldu ve düz bir zemin üzerine yatırılarak -20°Cdeki dondurucuda bir gün bekletildi.



Mikroanjiyografi öncesinde  $-20^{\circ}\text{C}$  'den çıkartılarak  $+4^{\circ}\text{C}$  ye alındı. Sıçandan flepler eksize edildi ve flepler petri kabına sarılarak mikroanjiyografinin çekileceği mamografi ünitesine getirildi. Damar sayımı, Adobe Photoshop programında Uysal ve ark. tanımladığı 1mm'lik dikey ve yatay çizgileri kesen damarların sayımı yöntemiyle değerlendirildi (Şekil 3.19)[155] [157].



Şekil 3.19 Adobe Photoshop programında 1mm'lik karelere bölünen flepte kareleri kesen damarların sayılması

### 3.5.3 Kanda VEGF Seviyesinin Ölçülmesi

Tüm gruplardaki sıçanlarda, VEGF seviyelerine fleplerin kaldırılmasından önce flep cerrahisi geçirdikten 7 gün sonra post operatif 7. günde bakıldı. Ölçüm için sıçanlar 12-16 saat aç bırakıldı. Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc), 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer inc) uygulanarak anestezi verildi. Sıçanın, kuyruk proksimalinin ventral yüzü, Crystalin antiseptic solüsyonla temizlendi.. Kuyruk venine, 22 gauge (G) damaryolu ile girilerek, 1 ml kan biyokimya tüpüne alındı. Kan örnekleri, 4000 devir/dk hızında, 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Serum örnekleri analiz gününe kadar (yaklaşık 10-90 gün arası)  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Kanda VEGF düzeyinin belirlenmesi için, katı sandviç metoduyla ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) yöntemi kullanıldı. Ticari olarak temin edilen Human VEGF Immunoassay kiti (BIOSOURCE, California A.B.D.) VEGF konsantrasyon analizi için kullanıldı ve VEGF165 izoformunun analizi yapıldı.

*Katı faz sandviç ELISA:* ELISA kiti tabakasının (ELISA kit plate) üzerindeki kuyucuklar, VEGF'ye spesifik antikorlarla kaplıdır. Sıçan kanından elde edilen serum, kuyucuklara eklenir, böylece ortamda bulunan VEGF molekülleri, kuyucuk duvarlarına yapışık antikorlarca tutulur. Ortama, VEGF'ye karşı bir antikor olan biyotinle işaretlenmiş konjugat eklenir ve 1 saat inkübasyona bırakılır. Biyotin, dolayısıyla konjugat, VEGF moleküllerine bağlanır ve sandviç yapısını oluşturur. Avidinle işaretli peroksidaz enzimi ortama eklenir ve 45 dakika inkübasyona bırakılır. Peroksidaz, konjugata yani VEGF sandviğine bağlanır.

Peroksidazın substratı olan 3,3',5,5' Tetrametilbenzidin'in (TMB) eklenmesiyle reaksiyon oluşur ve kuyucuklarda, örnek içindeki VEGF konsantrasyonu ile doğru orantılı yoğunlukta mavi renk meydana getirir. 30 dakikalık bekleme süresinin ardından son basamakta kuyucuklara eklenen stop çözeltisi ortam pH'sını düşürerek peroksidazın katalizlediği reaksiyonu durdurur. Aynı zamanda kuyucuk içindeki çözeltinin rengini de maviden sarıya dönüştürür. Oluşan bu rengin yoğunluğu, tabaka okuyucu (plate reader) ile 450 nm'de ölçülür. Mevcut olan VEGF'nin düzeyi pg/ml cinsinden belirlenir

### **3.5.4 Kanda Böbrek Fonksiyon Testleri ve Hemoglobin Ölçülmesi**

Kronik böbrek hastalığının biyokimyasal takibi değerlendirilmesi için 0, 3 ve 6. haftalarda Grup III (KBH) ve Grup IV (KBH+DM)'deki sıçanlarda kanda BUN, kreatinin ve hemoglobin bakıldı. Kuyruk veninden periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc), 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer inc) uygulanarak anestezi verilmesi ardından, yaklaşık 300 mikrolitresi kan EDTA'lı hemogram tüplerine alındı. Başkent Üniversitesi Klinik Biyokimya Laboratuvarında serum BUN düzeyleri Architect c8000 (Abbott Diagnostics) üreaz metoduyla kinetik olarak ölçüldü. Serum kreatinin düzeyleri Architect c8000 (Abbott Diagnostics) cihazında kinetik alkalın pikrat metoduyla kolorimetrik olarak ölçüldü. Kan hemoglobin seviyesi EDTA'lı kandan fotometrik-kinetik yöntemle otomatize sedim cihazı olan TEST-1(Alifax) cihazında ölçüldü.. Bu gruplardaki hayvanlarda mevcut hastalık hali nedeniyle (KBH ve DM) anestezinin oluşturacağı yan etkiler düşünülerek kan alma işlemleri

yüksek hacimlerde ve sık aralıklarda tekrarlanamadı. Kan alınması ardından 1 cc serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi.

### **3.6 Histopatolojik İncelemeler**

#### **3.6.1 Vasküler Dansite Ölçülmesi**

Vasküler dansite immunhistokimyasal CD31 ve hemotoksilen eozin boyamada değerlendirildi. Biyopsi örnekleri %10'luk nötral formaldehid solüsyonu içersine konularak fikse edildi ve 4°C'de 24 saat bekletildi. Materyallerin tamamına flep ortasından enine kesit uygulandı ve doku takibine alındı. Parafin bloğa gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında seri kesitler hazırlanarak hematoksil-eozin (H&E) ile boyandı. Bu biyopsilerin histopatolojik incelemeleri Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.'da aynı patolog tarafından, örneklerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin ışık mikroskopta incelendi. H&E ile boyalı kesitlerde, 40x büyütme altında 20 farklı alandaki kapillerler sayılarak vasküler dansite değerlendirildi.

#### **3.6.2 Böbrek Glomerüler Analizi**

KBH gelişiminin histopatolojik dokümantasyonu ve gösterilmesi için Grup III ve Grup IV'deki hayvanların kalan 1/6 böbrekleri, kontrol grubundan sakrifikasyon sonrası eksize edilen sağlıklı böbreklerle H&E boyalı 5 µm kalınlıktaki kesitlerde, glomerüler alana 40x büyütmede digital fotoğraflama yapıldı. 20 alanda Adobe Photoshop programında glomerüllerde alan ölçümü yapıldı ve mesengial ekspansiyon, glomerüler hipertrofi gibi değişiklikler açısından değerlendirildi.

### 3.6.3 Immunohistokimyasal İnceleme

Immunohistokimyasal boyama için lizinli lamlara 5 µm kalınlıkta uygun kesitler hazırlanmıştır. Endotel yapısını gösteren CD31 (1:100, DAKO, Denmark) proteinine karşı geliştirilmiş primer antikor kullanılarak streptavidin-biotin-immunperoksidaz yöntemiyle boyama yapılmıştır.

Kesitler ksilolde deparafinize edildi ve inen alkol serilerlerinden geçirilerek (%96, %90, %80, %70) rehidrate edildi. Daha sonra %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 dakika uygulanarak, endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. CD31 antikorunu uygulanacak kesitler mikrodalga fırında 15 dakika EDTA Buffer solüsyonda 3 kez 5'er dakika kaynatıldı. Kesitler soğumaya bırakıldı. Daha sonra kesitler üzerine CD31 antikorları damlatılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi. Tris solüsyonunda (pH=7.2) 5 dakika yıkandı. Biotinize antikordan damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. 5 dakika Tris solüsyonda yıkandı. Streptavidin peroksidaz solüsyonu kesitler üzerine damlatılarak 10 dakika beklendi. 5 dakika Tris solüsyonunda yıkandı. DAKO solüsyonundan üzerine damlatıldı, kahverengi renklenme gözlemlendikten sonra zıt boyama sağlamak için Mayer'in hematoksilen boyasında 2 dakika bekletildi. Çeşme suyunda yıkandı, yükselen alkolden serisinden geçirilerek ksilolde 20 dk bekletildi ve lamelle kapatıldı. 20X, 40X büyütmelemlerde endotel 20 alanda sayılarak kapiller dansite ölçüldü.

### 1,1'-Diocadecyl-3,3,3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI) İşaretli Kök Hücrelerin İzlenmesi ve Değerlendirme

Bu değerlendirme sadece DiI işaretli kök hücre çalışma grubu için yapıldı. Parafine gömülü dokulardan 5 µm kalınlıkta uygun kesitler hazırlanarak sadece hematoksilen ile boyandı. Bunun sebebi floresan mikroskopta, eosin boyasındaki kırmızı renk ile DiI işaretli hücrelerdeki kırmızı, mor rengin görüntü açısından karışıklık yaratmasıdır. Takip eden kesitlerde H&E boyamaları da yapıldı. Dolayısıyla immünfloresan mikroskopta hematoksilen boyalı kesitlerde bakılan endotelyal hücreler, takip eden H&E boyalı kesitlerde teyit edildi. Bu endotelyal hücrelerden mezenkimal kök hücre kaynaklı olanların (DiI ile işaretli olanlar) 565 nm dalga boyundaki floresan mikroskopta kırmızı-mor renkte gözükmesi beklenir. Preperatlar

tarafımızca Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal incelemeler için Nikon Eclipse E600 floresan mikroskop kullanıldı. Preperatlar 20x, 40x, 60x ve 100x büyütmelemlerde incelendi. Görüntüler, renkli dijital video kamera (Nikon CCD) ile bilgisayar ortamına aktarıldı ve bilgisayar programı olarak Cytovision Genus Software kullanıldı.

### 3.7 Biyoistatistiksel Değerlendirme

Canlı flep alanı ortalamaları (yüzde olarak), kapiller damar sayıları (kapiller dansite), günlere göre kan VEGF düzeyleri, ağırlık değişimleri, kan böbrek fonksiyon testleri değişimleri açısından gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak değerlendirildi. Öncelikle sürekli değerlerin tanıtıcı istatistikleri verildi. Değerler, ortalama  $\pm$  standart sapma ve medyan (min.-max.) olarak ifade edildi. Varyans analizi ön şartlarının sağlanıp sağlanmadığına bakıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk Testi ile kontrol edildi. Grup varyanslarının homojen olup olmadığı Levene Testi ile değerlendirildi. Daha sonra üç grup olan değişkenler varyans analizi ön şartları sağlanıyorsa Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA) ile analiz edildi. Varyans analizi ön şartları sağlanmıyorsa Kruskal-Wallis Testi kullanıldı. Takibinde hangi gruplar arasında fark olduğunun belirlenmesi için çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni Dunn testi yapıldı. Günler ile gruplar arasında değerlendirme yapılırken İki Faktörlü Faktörlerden Biri Tekrarlayan Varyans Analizi (Mixed Design (Repeated Measures)) kullanıldı. Tekrarlı ölçüm varyans analizi için gerekli olan önşartlardan Mauchly's küresellik testi sonucu Grup\*Gün etkileşimi küresellik varsayımının sağlandığı belirlendi. Dolayısıyla kan VEGF seviyelerinin değerlendirilmesinde grupların kendi içinde olan günlere bağlı değişimlerinden çıkan sonuçların grupların karşılaştırılması açısından yeterli olduğu, ek olarak aynı gün içindeki gruplar arasındaki değerlerin karşılaştırılmasına gerek olmadığı belirlendi. Canlı alan yüzdesi ve kapiller dansite, glomerüler alan değerlendirilmesi için One Way ANOVA, ağırlık değişimleri ve böbrek fonksiyon değişimleri için student t-test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  olarak kabul edildi. Veriler SPSS paket programında (SPSS Ver. 17.0, SSPS Inc, Chicago IL, USA) değerlendirildi.

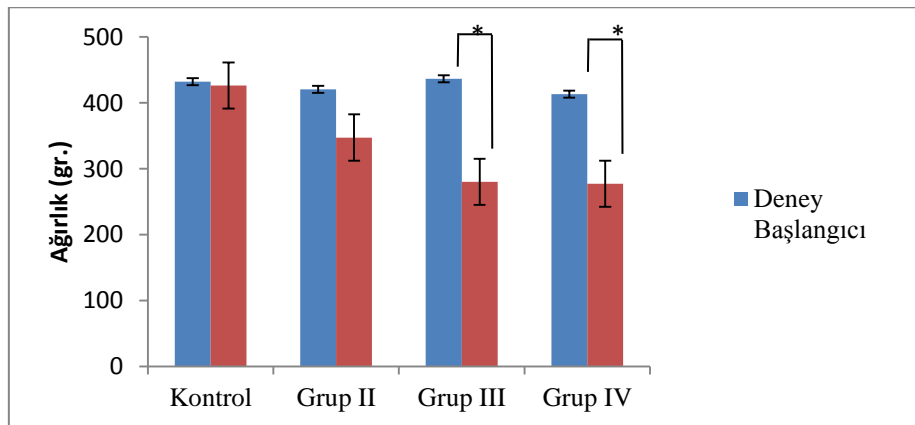
## 4. BULGULAR

### 4.1 Ağırlık Değerlendirilmesi

Deney başlangıcı ve sonundaki ağırlıkları değerlendirilen Grup II, III ve IV'deki ağırlık değişimi anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ) (Tablo 4.1) (Şekil 4.1). En fazla ağırlık kaybı KBH'nin olduğu Grup III ve Grup IV'de gözlemlendi.

Tablo 4.1 Gruplardaki hayvanların deney başlangıcındaki (D.B) ve Deney sonundaki (D.S) ağırlıkları

Denek Numaraları	Kontrol Grubu		Grup II (DM)		Grup III(KBH)		GrupIV(KBH+DM)	
	D.B	D.S	D.B	D.S	D.B	D.S	D.B	D.S
1	450	440	420	386	425	252	420	238
2	443	432	412	337	404	272	412	300
3	456	450	434	344	434	283	386	277
4	423	432	446	321	446	261	390	304
5	452	440	423	302	437	314	423	278
6	430	430	452	383	452	267	452	285
7	405	400	380	355	454	314	421	250
8	400	385	400	350	436	241	405	287
<b>Ortalama</b>	432.3±21	426.2±22	420.8±75	347.2±28	436±16	280.4±26	413.6±20	277.3±22



Şekil 4.1 Gruplardaki hayvanların deney başlangıcındaki ve deney sonundaki ağırlık değişimleri (\*  $p<0.05$ )

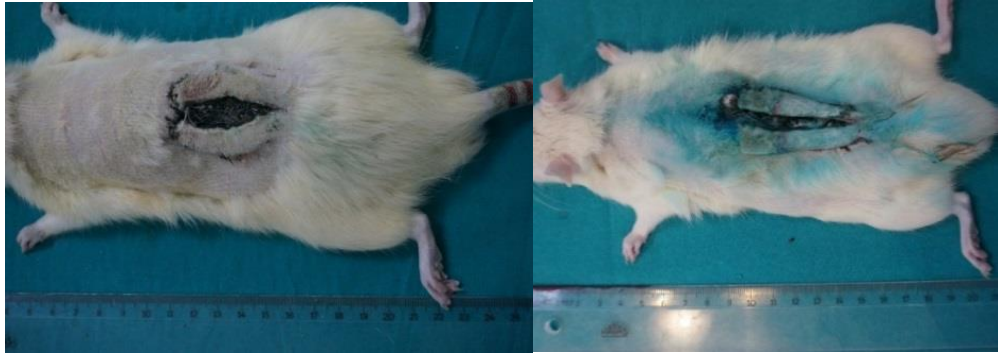
## 4.2 Canlı Alan Yüzdesinin Değerlendirilmesi

### Grup I (Kontrol Grubu)

Bu grupta her iki flebe fosfat tamponlu salin (PBS) verilmiş ve sağ ve sol flepler arasında anatomik farklılığın flep yaşayabilirliğinde etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ortalama canlı alan yüzdesi %69 bulunmuştur.

Tablo 4.2 Kontrol grubundaki sıçanların fleplerindeki canlı alan yüzdesi

Denek Numaraları	1. Flep (PBS)	2. Flep (PBS)
1	%74	%72
2	%70	%75
3	%70	%68
4	%71	%69
5	%70	%70
6	%69	%68
7	%65	%65
8	%69	%67
9	%73	%68
10	%65	%69
Ortalama	%69,5±2.4	%69,1±2,3



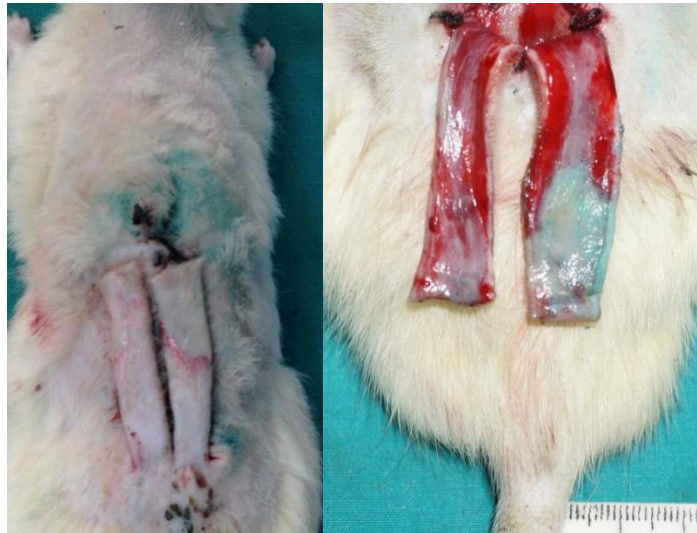
Şekil 4.2 Grup I deki iki sıçanın fleplerinin post operatif 7. gün görüntüsü

## Grup II (Diyabet Grubu)

Bu gruptaki sıçanların flep canlı alan ölçümleri Tablo 4.3’de gösterilmiştir. (1 hayvanda diyabet gelişmediği için çalışmadan çıkartılmıştır)

Tablo 4.3 Grup II (DM) olan hayvanların fleplerindeki canlı alan yüzdesi

Denek Numaraları	Flep(SVF)	Flep (PBS)
1	%71	%60
2	%60	%42
3	%70	%59
4	%71	%62
5	%67	%50
6	%64	%50
7	%60	%40
8	%62	%43
9	%71	%60
<b>Ortalama</b>	<b>%65±7</b>	<b>%50,7±8.7</b>



Şekil 4.3 Grup II’ deki sıçanın post operatif 7. günde flebin önden ve arkadan görünüşü( Sol SVF, Sağ PBS)

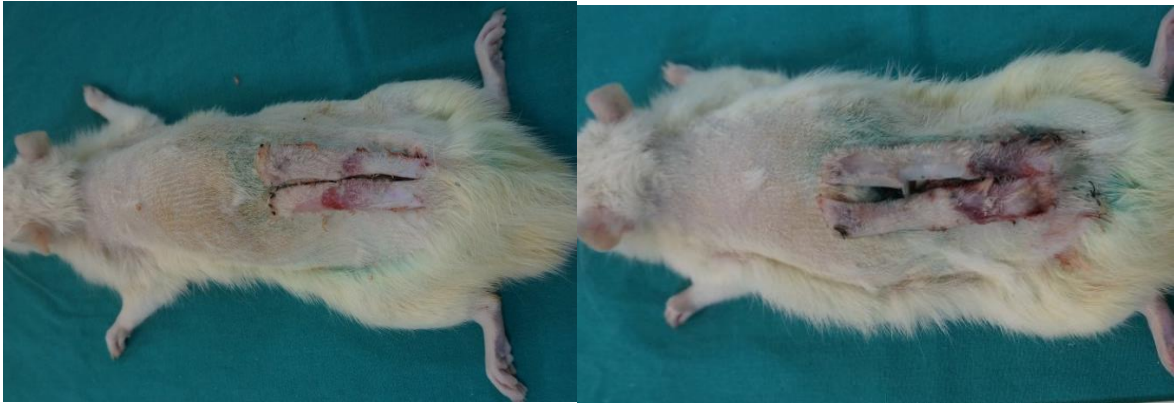


### Grup III (Kronik böbrek hastalığı)

Bu gruptaki sıçanları flep canlı alan ölçümleri Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4 Grup III (KBH)’deki sıçanların fleplerindeki canlı alan yüzdesi

Denek Numaraları	Flep(SVF)	Flep (PBS)
1	%55	%50
2	%53	%48
3	%57	%41
4	%55	%36
5	%59	%39
6	%50	%40
7	%54	%44
8	%52	%43
<b>Ortalama</b>	<b>%54.3±2.8</b>	<b>%42±4.6</b>



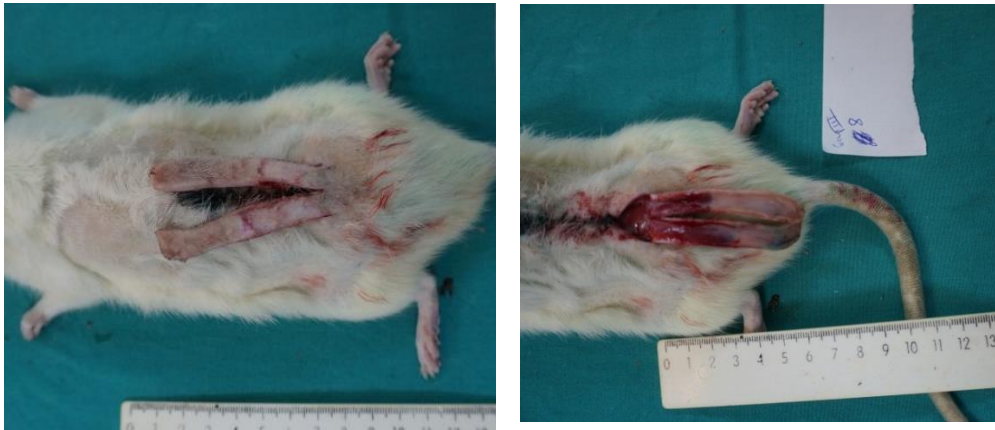
Şekil 4.4 Grup III’deki iki sıçanın fleplerinin post operatf 7. gün görüntüsü (Sol SVF, Sağ PBS)

#### Grup IV (Kronik Böbrek Hastalığı ve Diyabet Grubu)

Bu gruptaki sıçanları flep canlı alan ölçümleri Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

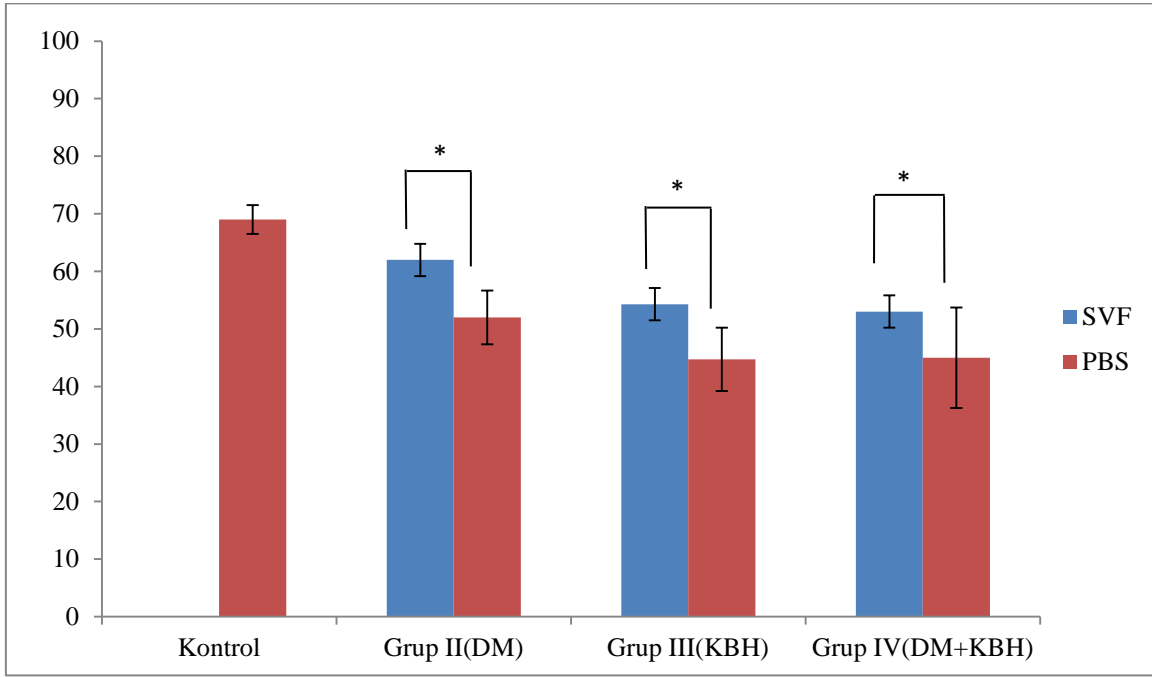
Tablo 4.5. Grup IV (KBH+DM) deki sıçanların fleplerindeki canlı alan yüzdesi

Denek Numaraları	Flep(SVF)	Flep (PBS)
1	%66	%49
2	%54	%47
3	%46	%35
4	%57	%53
5	%53	%43
6	%50	%44
7	%50	%44
8	%51	%40
<b>Ortalama</b>	<b>%53±5.8</b>	<b>%44.3±5.5</b>



Şekil 4.5 Grup IV’deki bir sıçanın flebinin post op 7. günde önden ve arkadan görünüşü (Sol SVF, sağ PBS)

Canlı alanların aritmetik ortalaması, grup I'de %69.5, Grup II'de PBS verilen fleplerde canlılık %50.7, SVF verilen fleplerde %65'tir. Grup III'de PBS verilen fleplerde %44 ve SVF verilen grupta %54, grup IV'de PBS verilen fleplerde %45, SVF verilen fleplerde canlılık oranı %54 bulunmuştur (Şekil 4.6) ( $p<0,05$ ). Grup II, III ve IV'de SVF verilen fleplerle PBS verilen flepler arasındaki fark anlamlıydı ( $p<0,05$ ). Gruplarda PBS verilen flepler arasındaki fark anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ). Gruplar arasında SVF verilen flepler arasındaki fark anlamlıydı ( $p<0,05$ ).



Şekil 4.6 Grupların canlı alan yüzdelерinin karşılaştırmalı grafiği. (\*  $p<0,05$ )

### 4.3 Kan Şekeri Sonuçları

Grup II ve Grup IV'deki hayvanların STZ öncesi ve sonrası 48. saat kuyruk kanı kan şekeri Tablo 4.6 ve Tablo 4.7'de gösterilmiştir. Grup II'de 1 sıçanda diyabet gelişmedi ve çalışmadan çıkartıldı. (Tablo 4.6'da koyu işaretlenmiştir)

#### Grup II (Diyabet Grubu)

Tablo 4.6 Grup II'deki sıçanların STZ önce ve 48. Saat kuyruk kanı kan şekerleri.

Denek Numaraları	STZ öncesi	STZ sonrası 48 saat
1	100	210
2	81	251
3	80	272
4	83	276
5	112	266
6	100	276
7	<b>87</b>	<b>180</b>
8	93	172
9	125	320
10	91	315

## Grup IV (Kronik Böbrek Hastalığı ve Diyabet Grubu)

Tablo 4.7 Grup IV'deki sıçanların STZ önce ve 48. Saat kuyruk kanı kan şekerleri.

Denek Numaraları	STZ öncesi	STZ sonrası 48 saat
1	110	207
2	150	220
3	89	210
4	92	321
5	95	274
6	120	289
7	98	251
8	130	256

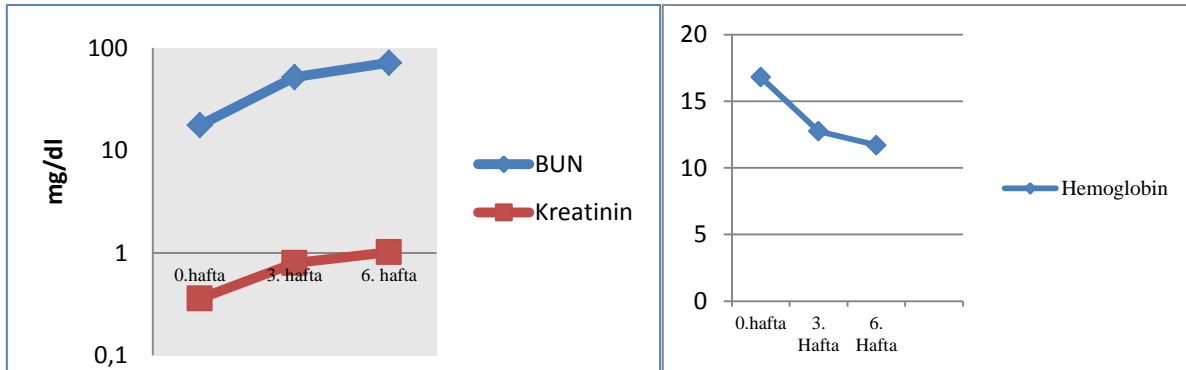
### 4.4 Böbrek Fonksiyon Testlerinin Değerlendirilmesi

Grup III ve Grup IV'deki sıçanların 0. 3.ve 6. hafta serum BUN, kreatinin, hemoglobin değerlerini gösteren değerler Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'de gösterilmiştir. Grup III ve Grup IV de deney başlangıç günüyle karşılaştırıldığında, 3. ve 6. haftalardaki kan BUN, kreatinin seviyesindeki yükselme ve hemoglobin seviyesindeki düşüş, anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ) (Şekil 4.7). Değişim başlangıç ve üçüncü hafta arasında belirgin olmuşken üçüncü ve altıncı hafta arasındaki değişim daha az belirgin olmuştur. Bu bulgular ile Grup III ve Grup IV'deki hayvanlarda kronik böbrek hastalığı geliştiği biyokimyasal olarak gösterilmiştir.

### Grup III (Kronik Böbrek Hastalığı)

Tablo 4.8 Grup III'ün 5/6 nefrektomi öncesi, 3. Hafta ve 6. Hafta BUN, Kreatinin ve Hb Değerleri.

Denek Numaraları	Başlangıç			3. hafta			6.hafta		
	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hb g/dl
1	19	0.4	17	42	0.6	15	62	1	12.1
2	19	0.4	17	54	0.8	10	60	0,9	9.9
3	15	0,3	16	30	0.6	15	65	0,9	13
4	18	0.3	18	34	0.6	14	73	0,9	13.2
5	18	0.4	16	48	0.7	14.3	56	1	12.7
6	18	0.3	16	70	0.9	11.1	90	1	10
7	17	0.4	17	46	0.8	11.5	75	1,1	11.2
8	17	0.4	18	91	1,02	12	92	1,3	12
<b>Ortalama</b>	17.6±1.3	0.36±0.05	16.8±0.8	51,8±20	0,8±0.1	12,75±0.8	71,6±13.5	1,02±0.1	11,7±1.2

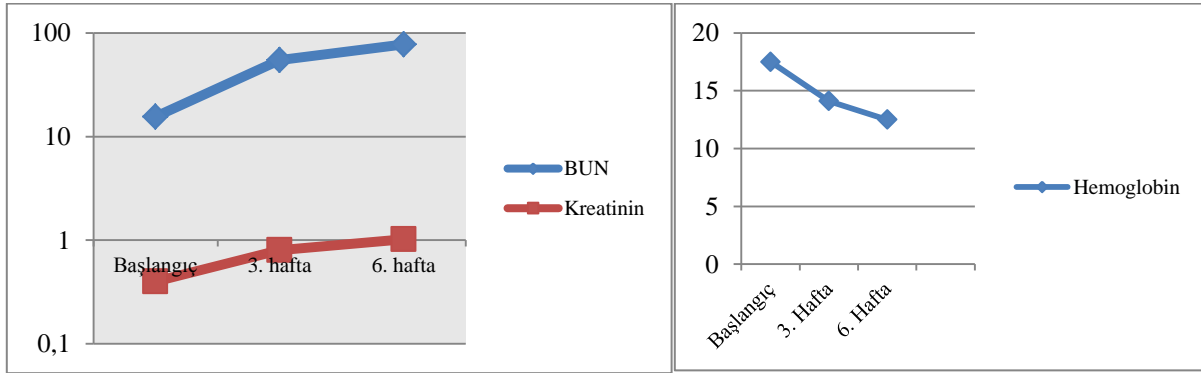


Şekil 4.7 Grup III'deki sıçanların kanlarındaki BUN, Kreatinin ve Hb değişimini gösteren grafik. Başlangıç, 3 ve 6. hafta arasındaki değişimler anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

## Grup IV (Kronik böbrek hastalığı ve Diyabet Grubu)

Tablo 4.9 Grup IV'ün 5/6 nefrektomi öncesi, 3. hafta ve 6. hafta BUN, Kreatinin ve Hb değerleri

Denek Numarası	Başlangıç			3. hafta			6.hafta		
	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hb g/dl
1	19	0,5	17,6	50	0,6	14,6	95	1,2	13,4
2	18	0,4	17	39	0,8	15,4	80	1,5	13,2
3	18	0,4	17	56	0,9	15,1	62	1,2	12,5
4	14	0,5	18,6	39	0,6	14,9	72	1	14
5	14	0,4	17,1	51	0,8	13,4	70	1	12,8
6	13	0,4	18,2	96	1,45	12	102	1,6	11,1
7	14	0,4	17	51	0,7	12,9	70	1,01	11
8	14	0,4	18	55	0,9	15,2	70	1,2	12,4
Ortalama	15,5±2.3	0,4±0.03	17,5±0.6	54,6±17.9	0,8±0.2	14,1±1.2	77,6±13.8	1,2±0.2	12,5±1.05



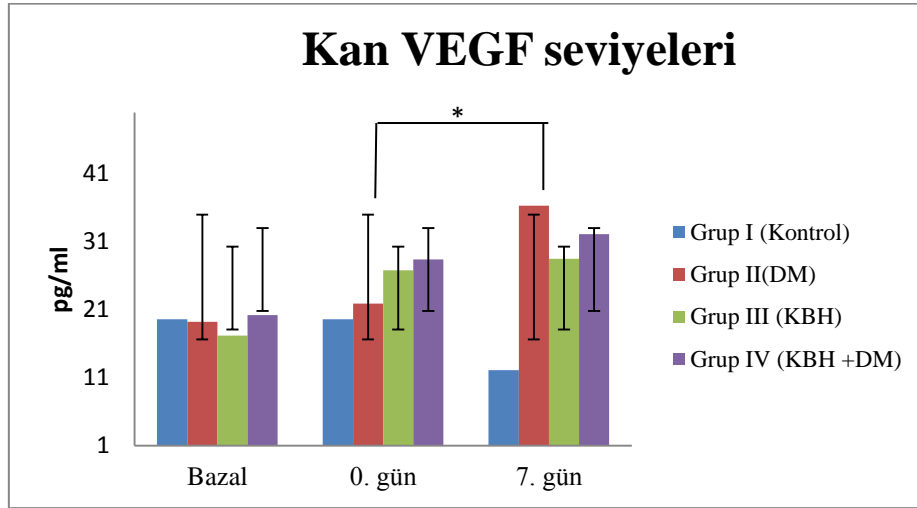
Şekil 4.8 Grup IV'deki sıçanların kanlarındaki BUN, Kreatinin ve Hb seviyelerinin değişimini gösteren grafik. Başlangıç, 3ve 6. hafta arasındaki değişimler anlamlıdır ( $p<0.05$ ).

#### 4.5 Kan VEGF Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Günlere ve gruplara göre VEGF kan seviyelerinin tanıtıcı istatistikleri Tablo 4.10 ve şekil 4.9’da gösterilmiştir. Diyabet gelişimi ve nefrektomi işlemlerinden önce alınan kandaki VEGF seviyesi ile deney başlangıcındaki VEGF seviyeleri arasında artış gözlenmiştir. Diyabet grubunda 0 ve 7. gün arasındaki değişim anlamlıdır ( $p<0.05$ ). KBH gruplarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Tablo 4.10 Grupların kan VEGF seviyeleri ortalaması

Kan VEGF Seviyeleri (pg/ml)			
Gruplar/Günler	(5/6 nefrektomi ve STZ öncesi)	0. gün	7.gün
Grup I (Kontrol grubu)	-	19,6± 11	12, 1 ± 8
Grup II (DM grubu)	19,2±0,45	21,9±8	36,3±14
Grup III (KBH grubu)	17,2± 0,337	26,8 ±9,8	28,5 ± 6,9
Grup IV (KBH+ DM grubu)	20,2 ± 0,527	41,4 ± 36	44,1 ± 7,6



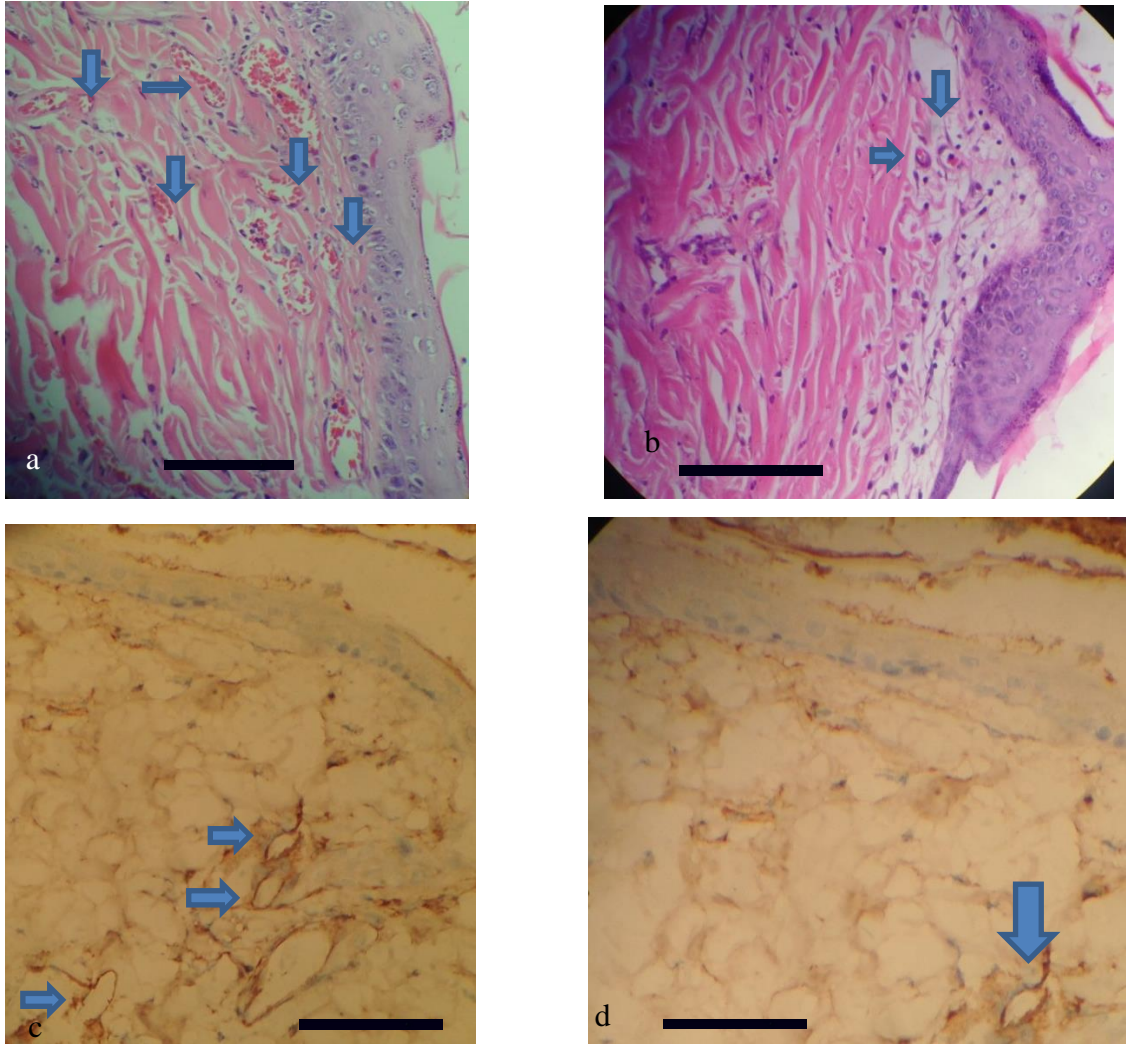
Şekil 4.9 Kan VEGF seviyelerinin 0. ve 7. Gün değerleri (\* $p<0,05$ ).



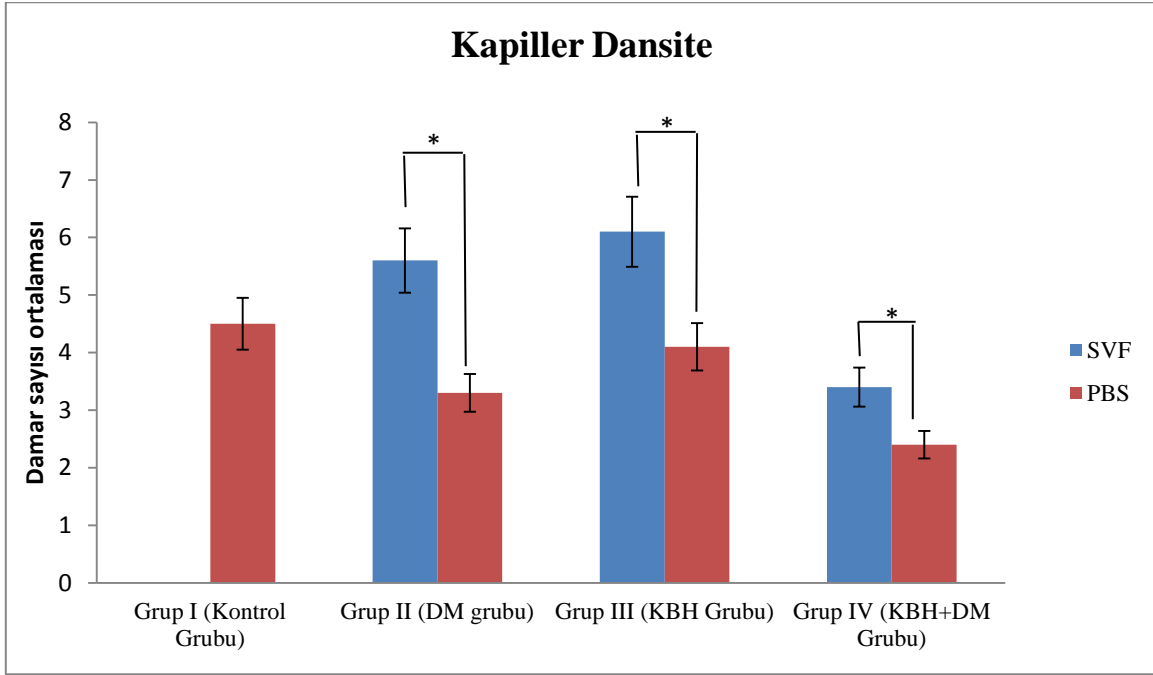
## 4.6 Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme

### 4.6.1 Kapiller Dansitenin Değerlendirilmesi

H&E ve CD31 boyalı kesitlerde endotel alanları sayıldı (Şekil 4.10). Grup I'de kapiller dansite ortalaması  $4,5 \pm 0,7$ , Grup II'de SVF verilen fleplerde ortalama kapiller sayısı  $5,6 \pm 1,1$ , PBS verilen fleplerde ise  $3,3 \pm 0,6$  Grup III'de SVF verilen fleplerde ortalama kapiller sayısı  $6,1 \pm 1,2$ , PBS verilen fleplerde ortalama  $4,1 \pm 0,8$ 'dir. Grup IV'de SVF verilen fleplerde ortalama kapiller sayısı  $3,4 \pm 0,5$ , PBS verilen fleplerde  $2,4 \pm 0,2$  olarak bulundu. SVF verilen fleplerdeki kapiller dansite PBS verilen gruplara göre anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.11).



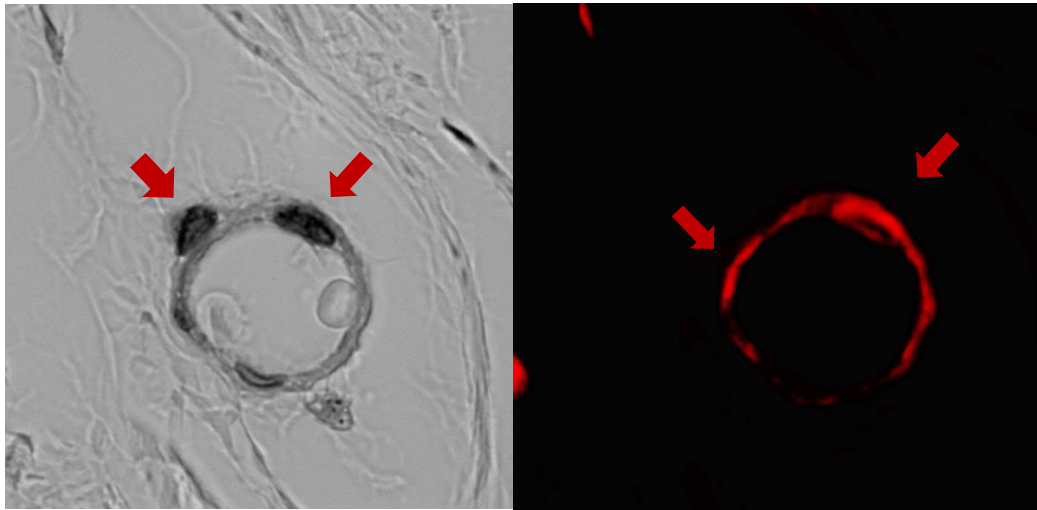
Şekil.4.10 a) Grup III'te SVF verilen flepte kapillerler b) Grup III'te PBS verilen flepte kapillerler c) Grup IV SVF verilen flepte CD31 boyanan kapillerler d) Grup IV'de PBS verilen grupta CD31 boyanan kapillerler (Bar 50  $\mu\text{m}$ )



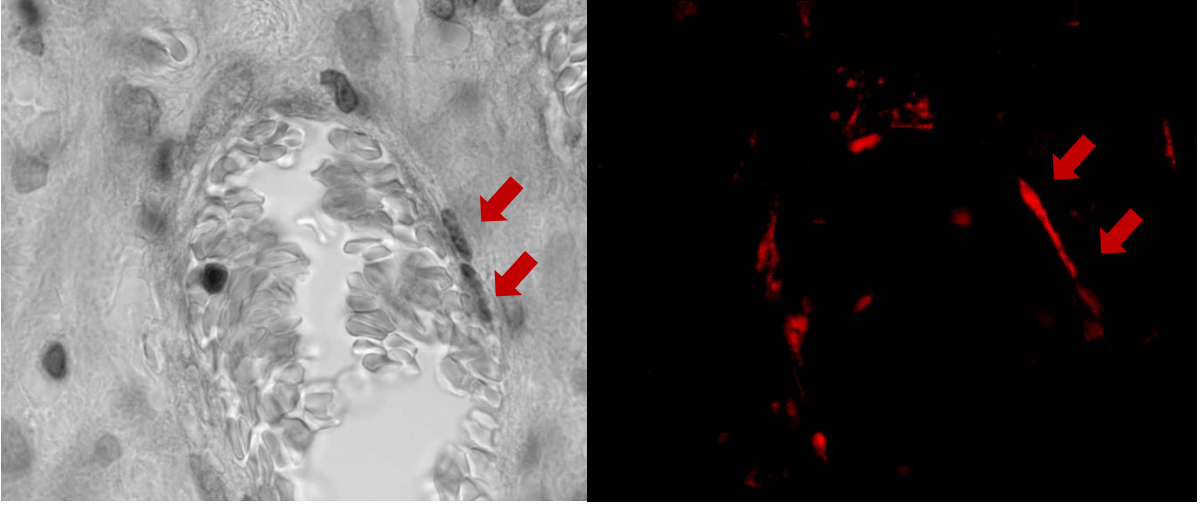
Şekil 4.11 Grupların ortalama kapiller dansitelerini gösteren grafik. (\*p<0.05)

#### 4.6.2 DiI boyalı endotellerin gösterilmesi

Adipoz kaynaklı kök hücrelerden endotel hücresi dönüşümü gösterildi (Şekil 4.12, 4.13).



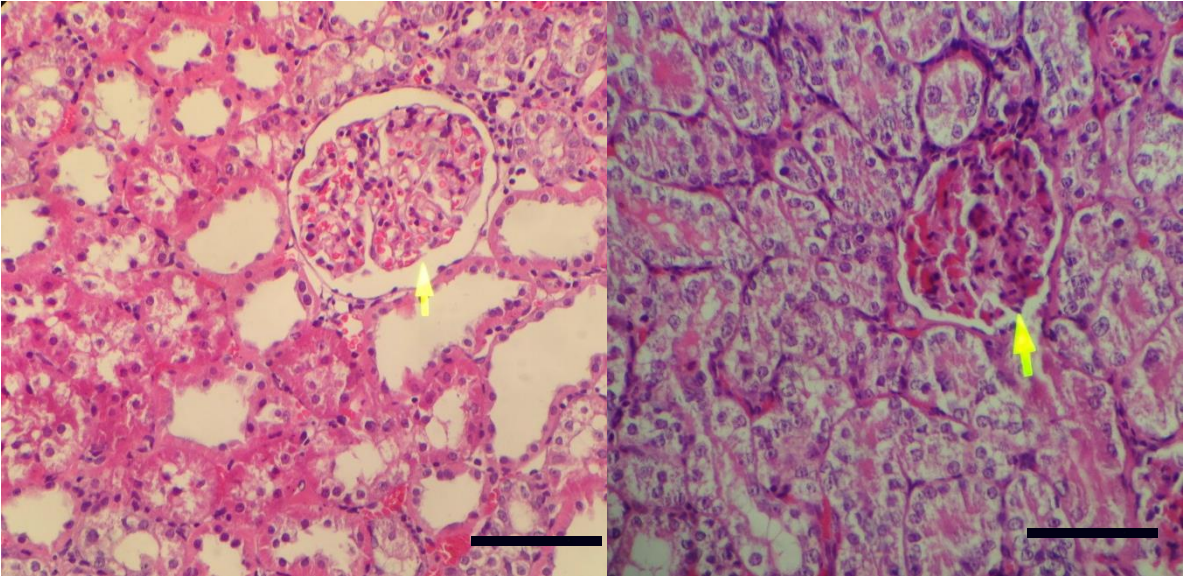
Şekil 4.12 Grup II 'de ve DiI + endotel hücrelerinin (ok) ışık mikroskopisi ve immunflorasan görüntüsü (100X)



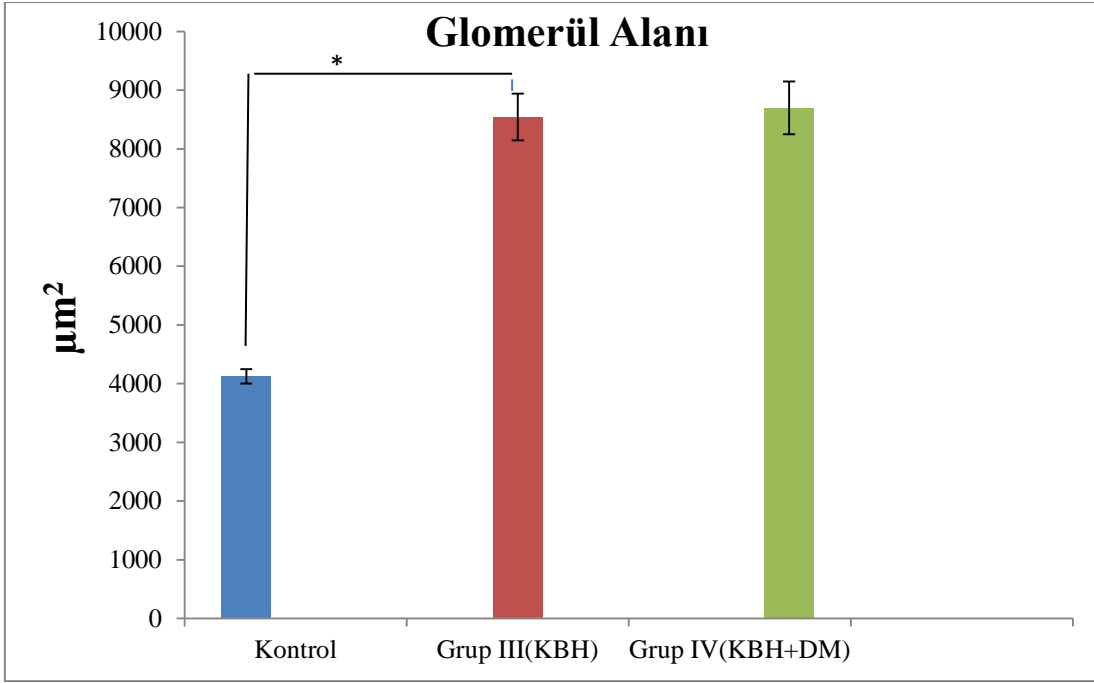
Şekil 4.13 Grup II 'de ve DiI + endotel hücresinin (ok) ışık mikroskopisi ve immunflorasan görüntüsü (100X)

#### 4.6.3 Glomerüler Analiz

Grup III ve Grup IV'deki böbreklerin glomerüler alanı, kontrol grubuna göre artmış gözlendi. Mezengiumda ekspansiyon gelişmişti (Şekil 4.16). Kontrol grubunda  $3264 \pm 122 \mu\text{m}^2$  Grup III'de glomerul alanı  $8746 \pm 250 \mu\text{m}^2$ , Grup IV'de  $8234 \pm 456 \mu\text{m}^2$  bulundu (Şekil 4.17).



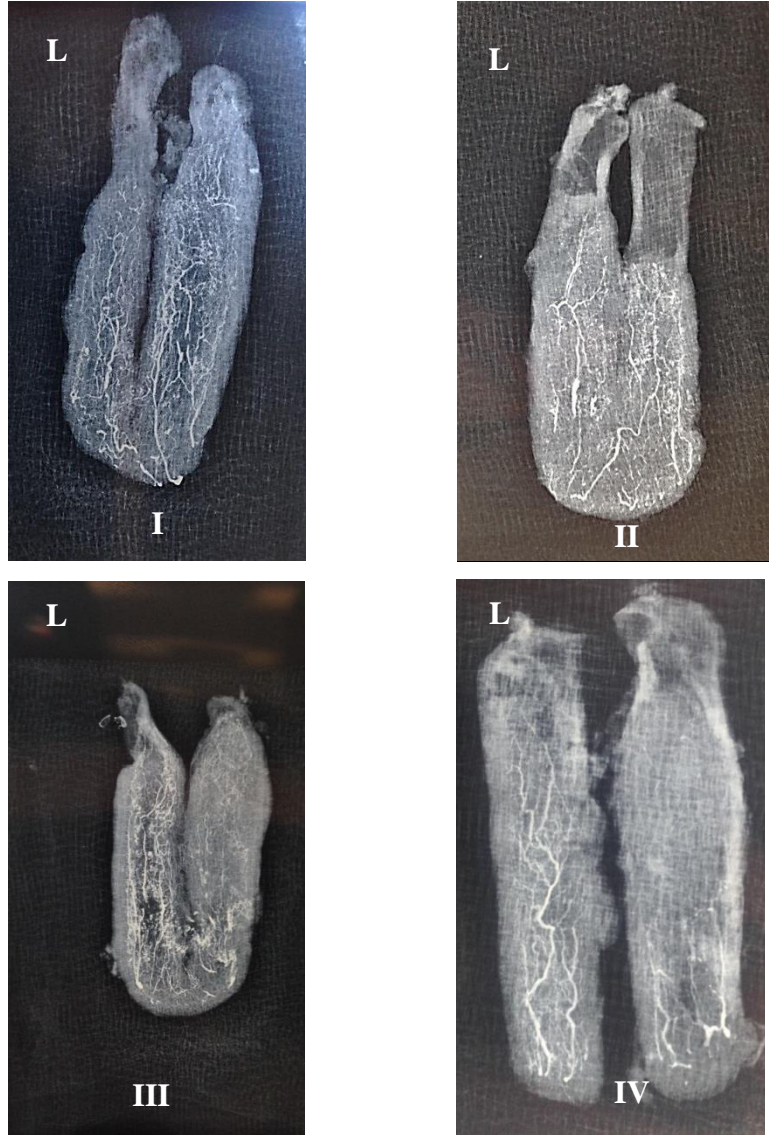
Şekil 4.16 Grup I (Kontrol) ve Grup II (KBH) deki siçanların H&E boyamada karşılaştırılması. KBH grubundaki böbrekte glomerüler hipertrofi ve intraglomerüler fibrozis görülmekte (bar  $50\mu\text{m}$ )



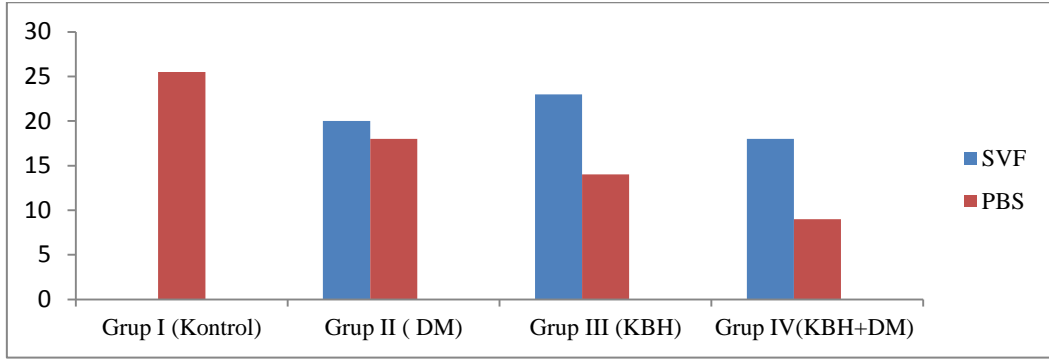
Şekil 4.17 KBH lı gruplarda glomerül alan artışı (\*p<0.05)

#### 4.7 Mikroanjiografinin Değerlendirilmesi

Tüm gruplardan birer sıçana damarlanmanın radyolojik gösterilmesi için mikroanjiografi çekildi. Damar sayımı, Adobe Photoshop programında Uysal ve ark. tanımladığı 1mm'lik dikey ve yatay çizgileri kesen damarların sayımı yöntemiyle değerlendirildi [155]. Anjiografi sonuçları Şekil 4.14'de ve damar sayımı sonuçları Şekil 4.15' de gösterilmiştir, istatistiksel analiz yapılmamıştır.



Şekil 4.14 Her gruptan bir sıçanın fleplerindeki damarlanmanın mikroanjiografik görüntüsü(L:sol SVF, sağ PBS)



Şekil 4.15 Mikroanjiografide sayılan damarların gruplara göre dağılımı

## 5.TARTIŞMA

Diyabet ve kronik böbrek hastalığı dünya çapında yükselen sayıda hasta sayısı ile epidemik boyuta ulaşmış sistemik hastalıklardır. 2030 yılında dünyada 300 milyon kişinin diyabet hastası olması beklenmektedir. Kronik böbrek hastalığının ABD’de erişkin nüfusun %11’ini etkilediği tahmin edilmektedir [25, 158]. Kronik böbrek hastalığının en sık nedenlerinden biri olan diyabetik nefropati göz önüne alındığında bu iki hastalığın birlikte ve ayrı ayrı olarak yükselme eğilimi devam edecektir. Bu iki hastalık yarattığı mikrovasküler ve makrovasküler temelli komplikasyonlarla ciddi morbidite ve mortalitelere neden olurken, iyileşmeyen yaralar ve hemodiyaliz gibi kronikleşen tedaviler, hasta ve ülke ekonomisi üzerinde ciddi bir yük oluşturmaktadır.

Diyabet ve böbrek hastalığının vücutta yarattığı multisistemik mikroçevresel değişiklikler ve inflamasyon halinin en önemli patolojik sonuçlarından biri mikroanjiopati ve bozulmuş yara iyileşmesidir. Bu iki patoloji en çok kendini perfüzyonun bozulduğu alt ekstremitede gösterir. Periferik nöropatinin de etiyolojide yer aldığı bir süreçte deri bütünlüğünün bozulması neticesinde iyileşme süresi 6 haftayı geçen kronik yaralar oluşur. Diyabetik hasta nüfusunun yaklaşık %12’sini oluşturan bu durum alt ekstremitte ampütasyonlarının ise en önemli sebebi olarak gösterilmektedir. Kemik veya tendonların ekspoze olduğu hasta gruplarında ampütasyon oranı yaklaşık %55 olarak bulunmuştur [159]. Böbrek hastalığının eklenmesinin prognozu dramatikleştirdiği ve böbrek yetmezliği olan hasta gruplarında ampütasyon oranlarının yüksek seyrettiği çalışmalarda gösterilmiştir [160]. Attinger ve ark. revaskülarizasyona rağmen diyabetik renal yetmezlik hastalarında ampütasyon oranlarını yaklaşık %37 olarak bildirmiştir. Böbrek hastalığının evresi hastada yara gelişimi ve olası ampütasyon için prognostik değer taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda diyabetik hemodiyaliz hastalarında daha sık alt ekstremitte ülseri geliştiği gösterilmiştir. [56] Bununla uyumlu olarak diyaliz tedavisinin alt ekstremitte ülser gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir [161]. Nynberg ve arkadaşları diyabetik renal transplant hastalarındaki ampütasyon gelişimi oranını %22 olarak bildirmiştir. [162] Bu yüksek komplikasyon oranlarında ekstremitte kurtarıcı cerrahi prensipleri içerisinde yarayı en kısa sürede

rekonstrükte etmek gerekmektedir. Flep cerrahisi, plastik cerrahinin yara ve defekt kapatılması için en temel ilgi alanlarından biridir.

Diyabet ve böbrek hastalığı olanlarda flep yaşayabilirliği bir sorun teşkil etmektedir. Flep nekroz oranlarının yüksek olmasında diyabet için öne sürülmüş teoriler vardır. Bunlar ileri glikolizasyon ürünleri, oksidatif stres ve lipid peroksidasyon ürünlerinin yarattığı lokal ve sistemik inflamasyon sonucu gelişen endotel hasarı, artmış plazma vizkozitesi sonucu mikrotrombüsler gibi nedenlerdir [163]. Literatürde KBH ve flep yaşayabilirliği hakkında yapılmış bir deneysel çalışma yoktur. KBH'nin yara iyileşmesini üzerinde etkisi hakkında çalışmalar mevcutken flep yaşayabilirliği üzerinde etkisi klinik tecrübelerle bilinmekte olup deneysel çalışmalar literatürde bulunmamaktadır. Böbrek hastalığında ise üremi ve üremik toksinlerin yarattığı oksidan peroksinitrite bağlı hücre hasarına ek olarak protein enerji malnutrisyonu ve metabolik asidoza sekonder birçok hücre ve hücreler arası yolların bozulması neden gösterilmektedir [164]. Bunun neticesinde azalmış immün yanıt, sistemik inflamasyon ve enfeksiyona yatkınlık bozulmuş yara iyileşmesinden ve flep nekrozundan sorumlu gösterilmektedir [165]. Bu hasta grubunda flep nekrozundan son yıllarda en çok suçlanan faktör iskeminin tetiklediği neovaskülarizasyon mekanizmasının hiperglisemik ortamda bozulmasıdır [166].

Yan ve ark. diyabete sekonder gelişen (çalışma içindeki ek morbiditeler grubunda KBH da vardır) kronik alt ekstremitte yaralarının rekonstrüksiyonunda kullanılan fleplerle ilgili yayınladığı literatür derlemesinde en fazla komplikasyon oranlarının lokal deri fleplerinde (%36 parsiyel ve/veya tam kayıp) görüldüğünü en az ise serbest flep tekniğiyle aktarılan deri, fasyokutanöz ve perforatör fleplerinde görüldüğünü bildirmişlerdir. Son dönem böbrek yetmezliği olan diyaliz hastalarının ekstremitte kurtarıcı cerrahisi için lokal random ve aksiyel deri fleplerine alternatif olarak serbest fleple rekonstrüksiyonla ilgili başarılı bir seri Chien ve ark. tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada bu hasta gruplarında sıkça karşılaşılan makronjiopatiler nedeniyle operasyon öncesi revaskülarizasyon gereksiniminin değerlendirilmesi gerekliliğine vurgu yapılmıştır. Bunun yanında, Stokes ve ark. distal anjiopatinin yaygın görüldüğü diyabet ve diyaliz hastalarında revaskülarizasyonun çoğu zaman mümkün olmadığını bildirmişlerdir [52]. Uzun süreli iskemik çevredeki ekstremitede



revaskularizasyon sonrası gelişebilecek iskemi reperfüzyon hasarı da göz önünde bulundurulması gereken bir durumdur [155]. Uzun ameliyat süresi ise sistemik komorbiditesi olan bu hastalar için önemli bir dezavantaj arz etmektedir. Bu gibi dezavantajlardan dolayı lokal deri ve fasyokutanöz fleplerle rekonstrüksiyona her zaman ihtiyaç vardır. Bu fleplerin başarısının artırılması hedeflenmelidir.

Flep yaşayabilirliğinin artırılmasına yönelik çalışmalar plastik cerrahinin temel araştırma alanlarından biridir. Flep kaybına neden olan etiyolojilerin anlaşılması ve nedenlerin ortadan kaldırılması ve uzaklaştırılması problemin çözüm için izlenmesi gereken yoldur. Diyabetik ve renal yetmezlik hastalarında yüksek nekroz oranlarının temelinde azalmış pro-angiogenik faktörler sonucu azalmış neovaskularizasyon yatmaktadır. Azalmış unsurların düzeltilmesine yönelik çalışmalar angiogenezin mekanizmasının anlaşılmasıyla mümkün olmuştur.

Anjiogenezin en önemli tetikleyicisi iskemidir. İskemi neticesinde hipoksi inducible factor-1 $\alpha$  gibi transkripsiyon faktörleri ve VEGF, PDGF, bFGF gibi stimulan faktörlerin salınmasını arttırarak ve endotelial öncü hücreleri harekete geçirerek angiogenezis mekanizmasını başlatırlar. Diyabette, damar oluşumu mekanizmasında önemli rol oynayan HIF-1 $\alpha$  fonksiyonu bozulmuş olduğu, VEGF seviyesinin azaldığı ve endotelial öncül hücrelerin fonksiyonlarının bozulduğunu gösteren çalışmalar vardır [167, 168]. Literatürde bFGF, PDGF, VEGF gibi angiogenik faktörlerin flep yaşayabilirliğinin arttırıldığı gösterilmiştir [169, 170]. Son yıllarda üzerinde çalışmaların arttığı ve literatürde flep yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiş diğer bir tedavisi ise kök hücre tedavisidir [171]. Bu çalışmada; flep kayıplarının sık olarak karşılaştığı KBH ve diyabetli hasta gruplarında, kök hücrelerden zengin stromal vasküler fraksiyonun flep yaşayabilirliğine etkisini araştırıldı.

Kök hücreler, değişik hücre gruplarına farklılaşma potansiyeli olan ve sınırsız çoğalabilen hücrelerdir. Etik sorunlardan dolayı klinik araştırma ve tedaviler mezenkimal dokulardan elde edilen kök hücreler üzerinde yoğunlaşmıştır. Mezenkimal kök hücreler birçok dokuda bulunurlar fakat üzerinde en çok araştırma yapılmış dokular kemik iliği ve adipoz dokudur. Adipoz dokunun kemik iliğine göre daha zengin kök hücre kaynağı olduğu ve buradan elde edilen kök hücrelerin kemik iliği kökenli kök hücreler gibi farklılaşma yetenekleri olduğu

gösterilmiştir. Uysal ve ark. kemik iliği kökenli ve adipoz doku kökenli kök hücrelerin etkilerini karşılaştırdığı bir çalışmada; kapiller dansite artışının adipoz kökenli kök hücrelerde daha fazla olduğunu bildirmiştir [157]. Anjiogenetik faktörler sayesinde flep yaşayabilirliğini arttırdıkları gösterilmiştir. Adipoz kökenli kök hücrelerin kültürü edilerek ya da kültüre edilmeden stromal vasküler fraksiyon halinde dokuya verilmesi arasında bir fark gösterilmemiştir. Bu çalışmada bu avantajlarından dolayı ve daha az sayıda donör hayvan kullanarak daha fazla kök hücre elde edebilmek için adipoz doku tercih edildi. Stromal vasküler fraksiyonu her gruba özel, o gruptaki hasta hayvanlardan elde ederek, hastalık zemininde SVF etkisinin araştırılması hedeflendi. Tanımlanmış modellerle iyatrojenik olarak hayvanlar diyabet, kronik böbrek hastalığı ve diyabetik kronik böbrek hastalığı oluşturuldu.

SVF inbred hayvanlardan elde edildi. Literatürde inbred hayvanlardan elde edilen adipoz kökenli kök hücrelerin immünolojik redde uğramadan farklılaşabildiğini ve doku rejenerasyonu yapabildiği gösterilmiştir [172].

İyatrojenik diyabet için tanımlanmış yöntemlerden en yaygın olarak kullanılan, dozu ve mekanizması en iyi tarif edilmiş yöntemlerden intraperitoneal 60mg/kg STZ enjeksiyon yöntemini tercih edildi. Diğer yöntemlerden pankreatektomi uygulanabilirliği zor ve morbiditesi yüksek bir metod olduğu için, genetik hayvan modelleri ve virüsle indüklenmiş diyabet modellerini maliyetinin yüksekliği ve otomimmunitéyle ilgili diyabet gelişimini taklit eden çalışmalarda anlamlı olması açısından tercih edilmedi. En sık kullanılan kimyasal ajanlardan Alloxan'ı ise yan etkilerinin fazla olması, hastalık geliştirici dozlar arasında farklılıklar nedeniyle tercih edilmedi. Literatürde STZ sıklıkla 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH: 4,5) içerisinde hazırlandığı bildirilmiştir. Sodyum sitratın nefrotoksik etkileri nedeniyle Grup IV teki KBH'li hayvanlarda sorun teşkil edebileceğinden STZ'yi %0.9 NaCl çözeltisi içerisinde hazırlandı. Diyabetle ilgili patolojik değişikliklerin gözlemlenebilmesi, flep çalışmasında anlamlı sonuçlar elde edilebilmesi için diyabetik sürenin ne kadar olması gerektiği ile ilgili literatürde farklı görüşler mevcuttur. Rendell ve ark. 3. Hafta itibariyle fleplerde %40'a varan nekroz gelişimi tariflemiştir [173]. İşken ve ark. ideal diyabetik sürenin ne kadar olması gerektiği ile ilgili yaptığı flep çalışmasında 4 haftanın yeterli olduğunu, 8 haftanın ise en ciddi bulguları görmek için anlamlı olduğunu belirtmişlerdir [174]. Bu

çalışmada diyabetik sıçanlarda 3 hafta diyabetik beklendikten sonra 4. hafta başında flep cerrahisini gerçekleştirildi. Grup IV'deki KBH ve diyabetik hayvanlarda, kayıp sayısını artabileceğinden dolayı daha uzun süreli bekleme tercih edilmedi.

İyatrojenik KBH modeli olarak, progresif renal kitle ve fonksiyon kaybını ve KBH semptomlarını gösterebilecek yöntem olan 5/6 nefrektomi modeli tercih edildi [175]. Kimyasal modeller nefrotoksik ilaçların hayvanların diyetine katılarak ilaçla belli bir süre maruziyet gerektirdiği için, cerrahi modellerden üreter obstrüksiyon modeli hidronefroz temelli KBH çalışmalarına uygun olduğu için tercih edilmedi. Gagnon ve ark. cerrahi modeli iki ayrı seansta olacak şekilde tariflemiştir [90]. Seth ve ark. tek seans olarak modifiye etmiştir [87]. Bu çalışmada, deney sürecinin uzun olması ve ek cerrahi komplikasyonlardan kaçınmak için tek seanslı 5/6 nefrektomi modeli tercih edildi. Seth ve ark. flank bölgeden iki ayrı insizyonla nefrektomileri gerçekleştirmişlerdir. Sırt fleplerinde herhangi bir tesirinin olmaması için abdominal orta hat vertikal insizyonu, flank insizyonuna tercih edildi. Bu cerrahi yaklaşımın dezavantajı, barsakların ekartasyonu sırasında yapılacak manüplasyonlara sekonder brid ileus gibi komplikasyonlardır. Nitekim KBH cerrahisi geçiren ve kaybedilmiş 2 sıçanda yapılan otopside 1 sıçanda barsak anslarında ödem, distansiyon ve nekroz görülmüştür.

Literatürde KBH'nin flep yaşayabilirliği üzerinde etkisi ile ilgili bir çalışma mevcut değildir. KBH ve yara iyileşmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda deneysel modelin en az 6 hafta beklenmesi önerilmiştir [87]. Literatürle uyumlu olarak bu çalışmadaki KBH süresi 6 hafta olarak belirlenmiştir. KBH tanısı, birçok yayında ağırlık, kan üre kreatinin hemoglobin ve elektrolit değerlerinin takibiyle konmuştur. İnsan KBH takibinde 24 saatlik idrarda glomerüler filtrasyon hesabı altın standart olarak değerlendirilse de hayvan modellerinde 24 saatlik idrarda takip yapmak metabolik kafeslerde mümkün olabilmektedir. Deney laboratuvarında metabolik kafes olmaması nedeniyle KBH takibi kanda üre kreatinin hemoglobin ve ağırlık takibi ve patolojik glomerüler analiz olarak yapılmıştır. Shobeiri ve ark. yaptıkları literatür derlemesinde 5/6 nefrektomi sonrası serum kreatinin yaklaşık 2.2 katına ulaştığını göstermişlerdir [176]. Gagnon ve ark. 5/6 nefrektomi sonrasında serum BUN seviyesinin 1.5-4.8 katına çıktığını bildirmiş. Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak serum kreatinin seviyeleri yaklaşık olarak 3 katına, BUN seviyesi ise 4 katına yükselmiştir. KBH'da

eritropoetin sentezinin azalmasına sekonder anemi görülmektedir. Bu çalışmada kan Hb seviyesi Grup II ve Grup III'de anlamlı düşüş göstermiştir ( $p<0.05$ ). Kalan böbrekte kompanzatuvar hipertrofi ve sonrasında gelişen progresif kayıp kendini patolojik olarak mezengial ekspansiyon ve glomerüler hiperfroti ile gösterir. H&E kesitlerde artmış mezengial alanın hesaplanması ile böbrekteki bu değişim kantitatif olarak değerlendirilebilir. Bu çalışmada KBH'li Grup III ve Grup IV'de glomerüler alan ölçümünde anlamlı artış bulunmuştur.

Flep modeli olarak Ichioka'nın tanımladığı çift dorsal flep, daha az sayıda hayvan kullanılmasına izin vererek, flep üzerinde tek değişkenin çalışılmasına olanak sağlaması nedeniyle tercih edildi [16]. Sağ ve sol flepler arasındaki anatomik farklılığın, flep canlılığına etkisini göstermek için kontrol grubunda her iki flebe fosfat tamponlu salin (PBS) enjeksiyonu yapıldı ve sağ ve sol flepler arasında fark bulunamadı. Kontrol grubunda diğer gruplarda olduğu gibi sol flebe SVF enjeksiyonu yapılmamış olmasının diğer bir sebebi ise, SVF'nin literatürde sağlıklı hayvanlarda flep yaşayabilirliğinin arttırıldığına gösterilmiş olmasıdır [171]. Kontrol grubunda flep yaşayabilirliği %69'dur. Grup II 'de (DM) PBS verilen fleplerde canlı alan %45, SVF verilen fleplerde ise canlı alan yüzdesi ise %62'dir. SVF Grup II'de flep canlılığını anlamlı arttırmışken, Grup I ile karşılaştırıldığında flep canlılığı anlamlı derecede azalmıştır. Grup III' de (kronik böbrek hastalığı) flep yaşayabilirliği PBS verilen grupta %44,7 olmuştur. SVF verilen fleplerde yaşayabilirlik %54,3 olarak bulunmuştur. KBH'li hayvanlarda SVF, flep yaşayabilirliğini anlamlı derecede arttırmıştır. Grup I'le karşılaştırıldığında KBH, flep yaşayabilirliğini SVF ve PBS gruplarında anlamlı derece azalttığı görülmektedir. Grup IV'de ( KBH ve DM) PBS verilen fleplerde canlı alanı %43'dür. SVF verilen grupta canlı alan %53 bulunmuştur ve PBS verilen fleplere göre artış anlamlıdır. Grup I ile karşılaştırıldığında KBH ve DM flep canlı alanı PBS ve SVF verilen fleplerde anlamlı azalmıştır. Özetle SVF tüm gruplarda PBS verilen fleplere göre flep canlılığını arttırmışken, KBH, DM ve KBH ile DM flep yaşayabilirliğini anlamlı ölçüde azaltırlar. Bu hasta gruplardaki SVF verilen fleplerde canlılık, hastalığı olmayan Grup I 'e göre azalmış bulundu.

Literatürde mezenkimal kök hücrelerin flep yaşayabilirliğini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Simman ve ark. kemik iliği kökenli kök hücrelerle flep canlılığını arttırmışlardır

[177]. Lu ve ark. ilk kez random paternli bir sırt flebinde adipoz kökenli kök hücrelerde flep nekroz oranını azalmıştır [171.] Yapılmış yayınlarda diyabetik sıçanlarda ortalama random flep canlılığı %45 olarak bildirilmiştir. Grup IV 'de PBS grubunun flep canlılığı oranı %45'dir ve literatürle uyumludur [178]. Gao ve ark. diyabetik farelerde kaldırdıkları random dorsal deri flebinde adipoz kökenli kök hücrelerle flep canlılığının %45'ten %80'e ulaştığını bildirmişlerdir [179]. Bu çalışmada kök hücreler sağlıklı insanlardan elde edilmiştir ve flep modeli ise 3 cm uzunluğunda 1 cm genişliğinde random patern dorsal deri flebidir. Bu çalışmada ise uzunluk en porsiyonu 5:1 olan flep modelinde hasta hayvanlardan elde edilen SVF ile flep canlılığında anlamlı artış bulunmuştur. Bu açıdan klinik uygulanabilirliğini gösterilmiştir. Hasta hayvanların olduğu Grup II, Grup III ve Grup IV'de ise SVF flep canlılığını sağlıklı flep seviyelerine getirememiştir. Buna sebep olan nedeni açıklayabilmek için diyabet ve kronik böbrek hastalığının kök hücreler üzerinde etkisini incelemek gerekmektedir.

Hipergliseminin VEGF üretimini azalttığı, diyabetik insan ve hayvan yara iyileşmesi modellerinde gösterilmiştir [168]. Lerman ve ark. AKKH'lerin diyabetin yara iyileşmesi üzerine yaptığı çalışmada, damar oluşumu için çok önemli bir aşama olan kök hücrelerin kapiller göçünün hiperglisemik ortamda azaldığını göstermişlerdir. Başka bir çalışmada diyabetin AKKH nişini *in situ* etkilediğini ve *in vitro* ,*in vivo* vasküler ağ yapabilme yeteneklerini azaltarak yara iyileşmedeki etkisini kaybettiği gösterilmiştir. Gao ve ark. hipoksik hücre kültür koşullarında azalmış vaskülogenik yeteneklerin hipoksi neticesinde arttırılabileceğini göstermiştir. Literatürdeki bilginin aksine diyabetik farelerde VEGF sentezini artmış olarak buldukları ve DiI ile işaretli AKKH'leri endotel yapısında göremedikleri çalışmada, hiperglisemik ortamda artmış neoanjiogenezin kök hücre göçüyle ve direk endotele dönüşmeyle değil hipoksiyle indüklenmiş olabileceğini bildirmişlerdir. Bunu destekler başka bir çalışmada azaltılmış oksijen seviyesinin olduğu kök hücre kültürlerinde hipoksi indüklemesiyle VEGF, IGF, kemokin ligand 12 salınımında artışı bildirmişlerdir [180].

Kronik böbrek hastalığının kök hücreler üzerindeki etkisi literatürde renal iskemik hasarın önlenmesine yönelik araştırmalarda incelenmiştir. Kemik iliğinin non mezenkimal kök hücre

kısımındaki hematopoetik ve endotelyal öncü hücreler üzerinde yapılmış bir çalışmada, kronik böbrek yetmezliğinin bu hücrelerin proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir [181]. Fonksiyon kaybı kemik iliği transplantı yapılan sıçanlar üzerinde de gösterilmiş, KBH olan donör sıçanlardan alınan iliğin daha az faydalı olduğu gösterilmiştir [182]. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada farelerdeki 6 haftalık KBH'nin mezenkimal kök hücre fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir [183]. KBH'nin kemik iliği MKH farklılaşması ve çoğalma fonksiyonlarının gösterildiği bir çalışmada, üremik toksinlerin, proenflamatuvar moleküllerin, reaktif oksijen radikallerinin kök hücre fonksiyonlarını bozmakta etken olabileceği bildirilmiştir. Aynı çalışmada diyalizin önemine vurgu yaparak, Indoksik sülfat ve p-kresol gibi MKH proliferasyonunu azaltan toksinlerin etkili diyalizle uzaklaştırılmasının faydalı olabileceğini bildirilmiştir [184]. İnsan MKH'lerin üzerinde yapılmış başka bir çalışmada ise sağlıklı insanlarda, BH olan insanların adipoz dokularından alınan AKKH'lerin arasındaki farklılaşma, çoğalabilme ve immomodülasyon kapasiteleri *in vitro* ortamda karşılaştırılmıştır. Bu çalışma neticesinde kronik böbrek hastalarından elde edilen AKKH'lerin farklılaşma, immun modülasyon ve farklılaşma açısından sağlıklı insanlardaki AKKH'lere göre farklı olmadığı ve AKKH'lerin yüksek üremik seviyelere dirençli olduğunu bildirilmiştir [185].

Yeni kapiller oluşumu, H&E boyamaya ek olarak CD31 immünohistokimyasal boyama yöntemi ile tespit edildi. Böylece lümeni açılmamış yeni oluşan kapillerleri, endotelleri CD31 ile boyandığı için tespit edebildi. Kapiller dansite SVF verilen fleplerde PBS verilenlere göre anlamlı yüksekti. Bu yükseklik, SVF verilen fleplerdeki artmış yaşayabilirlikle uyumludur. SVF verilen fleplerdeki damarlanma artışı, mikroanjiografilerde de artmış bulundu. Kontrol grubuna göre ise damar sayısının daha düşük çıkmasını üremi ile diyabetin neovaskülarizasyonu olumsuz yönünde etkilediği şeklinde yorumlanabilir.

Damarlanmanın direk endotelyal dönüşümle mi yoksa proanjiogenik sitokinlerle mi olduğunu anlamak için DiI ile işaretlenen SVF içindeki kök hücreler immünflorasan mikroskopta incelendi. CD31 boyalı preparatlarda damar endoteline dönüşen kök hücreler gösterildi. Böylece bu endotelyal hücrelerin eksojen olarak transplante edilen adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerden geliştiği sonucuna varıldı. Bu hücrelerin dokuda gösterilmesi, uygulama

sırasında hücrelerde herhangi bir canlılık kaybı olmadığını göstermesinin yanı sıra, adipoz kökenli MKH'lerin endotel hücrelerine farklılaşarak vaskülogeneze direkt etkisini kanıtlamaktadır. Birçok çalışmada benzer şekilde kök hücrelerin dokuda damar yapısına katıldığı gösterilmişken, bazı araştırmacılar, damar yapısına katılmış kök hücre gösterememişlerdir.

Kan VEGF seviyeleri incelendiğinde üremik olan Grup III ve Grup IV'de 0. ve 7. günler arasında anlamlı artış gözlenememiştir. Diyabetik Grup II'de ise artış anlamlıdır. Üreminin VEGF salınımını etkilemesinde, üreminin kök hücre fonksiyonlarını diyabete göre in vivo olarak daha fazla etkilediğini destekler niteliktedir. Diyabetteki anlamlı VEGF artışı, kapiller dansite ve diyabetik hayvan fleplerinin diğer üremik gruplara göre fazla olmasıyla uyumludur. Kapiller dansitedeki artış, anjiyografide SVF verilen fleplerdeki damarlanma artışıyla uyumlu gözlemlendi.

## 6. SONUÇ

Çalışmamızda; diyabet ve kronik böbrek hastalığının flep yaşayabilirliğini azalttığını ve bu iki hastalığın birlikte görüldüklerinde flep yaşayabilirliğinin en az olduğu gösterildi.

Stromal vasküler fraksiyonun, flep yaşayabilirliğini arttırdığını bulundu. Bu etkiyi endotele farklılaşan kök hücreler aracılığıyla gerçekleşen neovaskülarizasyonla sağladığı sonucuna varıldı.

Flep canlı alan yüzdesi ve kapiller dansite değerleri, kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Benzer şekilde kan VEGF seviyeleri diyabet grubu dışındaki gruplarda anlamlı değişim göstermezken, kontrol grubuna göre anlamlı artış göstermiştir. Bu farklılık sonucunda; in vivo hiperglisemik ve üremik ortamın, SVF fonksiyonlarında bozulma yaratabileceği sonucuna vardık. İn vivo ortamda stromal vasküler fraksiyonun diyabet ve üremik ortamda fonksiyonel değişiklikleri ileri çalışmalarda gösterilebilir. Diyabet süresi ve kronik böbrek hastalığı süresi uzatılmış hayvanlarda yapılacak çalışmalarda, stromal vasküler fraksiyonun ve flep yaşayabilirliğinin etkisi araştırılabilir.

Sonuç olarak stromal vasküler fraksiyon; elde edilmesi, hazırlanması ve uygulaması kolay, maliyetinin düşük ve etkinliklerinin yüksek olması gibi ciddi avantajları göz önünde bulundurulduğunda, flep yaşayabilirliğinin azalmış olarak görüldüğü diyabet, kronik böbrek hastalığı ve diyabet ile kronik böbrek hastalığının beraber görüldüğü hasta grubunda, flep canlılığını arttırmak için kullanılabilir.



## KAYNAKLAR

1. Thorne, C.H. Techniques and Principles in Plastic Surgery. Grabb and Smith's Plastic Surgery. (C.H. Thorne, ed). Seventh edition. Lippincott Williams & Wilkins. 1-12, 2014.
2. Taylor GI, Palmer J. The Vascular Territories( angiosomes ) of the body: experimental study and clinical applications. Br J Plast Surg 40:113-141, 1987.
3. Vedder NB. Flap Physiology. Plastic Surgery (Mathes SJ, ed.) Elsevier 483-506, 2006.
4. Daniel RK, Kerrigan CL, Principles and physiology of skin flap surgery. Plastic Surgery. (McCarthy JG, ed.). WB Saunders 275-328, 1990.
5. Kerrigan CL, Skin Flap failure: pathophysiology. Plast Reconstr Surg 72: 766-777, 1983.
6. Kerrigan CL, Hjortdal VE, Sampalis J. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. Plast Reconstr Surg 93: 366-374, 1994.
7. Hjortdal VE, Sinclair T., Kerrigan CL. Venous ischemia in skin flaps:microcirculatory intravascular thrombosis. Plast Reconstr Surg 93: 366-374, 1994.
8. Im MJ, Su CT, Hoopes JE, Anthenelli RM. Skin flap metabolism in rats: oxygen consumption and lactate production. Plast Reconstr Surg 71: 685-688, 1983.
9. Wilkins EG, Rees R, Smith D. Identification of xanthine oxidase activity following reperfusion in human tissue. Ann Plast Surg 31: 60-65, 1993.
10. Angel MF, Narayanan K, Swarts WM. Improved survival in free skin flap transfers in rats. Br J Plast Surg 39: 469-472, 1986.
11. Sasaki GH, Pang C. Experimental evidence for involvement of prostoglandins in viability and acute skin flaps: effects of viability and mode of action. Plast Reconstr Surg 67: 335-340, 1981.
12. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG. An anatomic review of the delay phenomenon. II. Clinical applications. Plast Reconstr Surg 89: 408-416, 1992.
13. Matsumara H, Yoshizawa N, Vedder NB, Watanabe K. Preconditioning of the distal portion of a rat random-pattern skin flap. Br J Plast Surg 58-61, 2001.

14. Çağlar B. Lokal Hipoterminin Random Paternli Deri Fleplerinde Yeni Damar Oluşumu ve Flep Canliliği Üzerine Etkisi. Uzmanlık tezi. Baskent Üniversitesi:Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı. sayfa 3-11. Ankara, 2012.
15. Khouri RK, Edstrom L, Angel MF. The dorsal rat flap: An appraisal of the model. *Surg* 38: 598, 1987.
16. Ichioka S, Kudo S, Shibata M, Ando J, Sekiya N, Nakatsuka T. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg*. 52 (4): 414-418, 2004.
17. Angel, MF.The dorsal skin-flap model in the rat. *Plast Reconstr Surg* 92: 1203, 1993.
18. Lloyd PG, Prior B, Yang HT, Terjung RL. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284(5):. 1668-1678, 2003.
19. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997.
20. Tam BY, Wei K, Rudge JS, Hoffman J, Holash J, Park SK, Yuan J, Hefner C, Chartier C, Lee JS, Jiang S, Niyak NR, Kuypers FA, Ma L, Sundram U, Wu G, Garcia JA, Schrier SL, Maher JJ, Johnson RS, Yancopoulos GD, Mulligan RC, Kuo CJ. VEGF modulates erythropoiesis through regulation of adult hepatic erythropoietin synthesis. *Nat Med* 12: 793-800, 2006.
21. Li B, Sharpe E, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J* 20: 1495-1497, 2006.
22. Broxmeyer HE, CooperS, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, Warren RE, Donner DB. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hemato*. 62: 203-215, 1995.
23. Ben-Av P, Crofford L, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts. *FEBS Lett* 372: 83-87, 1995.
24. Dianna JM, Zimmet P. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. (DeFronzo RA, ed.), Wiley Blackwell. Vol. 1, 3-16, 2015
25. King H, Aubert R, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431, 1998.
26. Tuomi T, Groop L, Zimmet P. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin dependent onset of disease. *Diabetes* 42: 359-362, 1993.

27. Kissebah A, Vydellingum N, Murray R. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 54: 254-260, 1982.
28. Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 year before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 15: 815-819, 1992.
29. American Diabetes Association (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 34: 62-69, 2011.
30. World Health Organisation (WHO). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF consultation. WHO:Geneva,, 2006.
31. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews* 93(1): 137-188, 2003.
32. Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 52(3): 818-823, 2003.
33. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *Journal of Experimental Medicine* 205(10): 2409-2417, 2008
34. Cooper ME, E.-O.A., Epigenetics: mechanisms and implications for diabetic complications. *Circulation Research* 107(12): 1403-1413, 2010
35. Long J, Wang Y, Wang W. Identification of microRNA-93 as a novel regulator of vascular endothelial growth factor in hyperglycemic conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(30): 23457-23465, 2010.
36. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57(6): 1446-1454, 2008
37. Suzen S, Buyukbingöl E. Recent studies of aldose reductase enzyme inhibition for diabetic complications. *Current Medicinal Chemistry* 10(15): 1329-1352, 2003.
38. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* 379 (9811): 165-180, 2012.
39. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *New England Journal of Medicine* 320(18): 1161-1165, 1989.
40. Vlassara H, Uribarri J. Glycoxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning? *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 5(3):181-188, 2004.

41. Coughlan MT, Thorburn D, Penfold SA. RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (4): 742-752, 2009.
42. Gibbons CH. Quantification of sudomotor innervation: a comparison of three methods. *Muscle & Nerve* 42 (1): 112-119, 2010.
43. Koitka A. Impaired pressure-induced vasodilation at the foot in young adults with type 1 diabetes. *Diabetes* 53(3): 721-725, 2004
44. Kultz-Buschbeck JP. Thermoreception and nociception of the skin: a classic paper of Bessou and Perl and analyses of thermal sensitivity during a student laboratory exercise. *Advances in Physiology Education* 34(2): 25-34, 2010.
45. Lauria G, Lombardi R. Small fiber neuropathy: is skin biopsy the holy grail? *Current Diabetes Reports* 124:384-392, 2012.
46. Kuehl M, Stevens MJ. Cardiovascular autonomic neuropathies as complications of diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 8(7): 405-416, 2012.
47. Low PA, Walsch JC, Huang CY, McLeod JG. The sympathetic nervous system in diabetic neuropathy. A clinical and pathological study. *Brain* 98(3):341-356, 1975.
48. Marso SP, Hiatt WR. Peripheral arterial disease in patients with diabetes. *Journal of the American College of Cardiology* 475: 921-929, 2006.
49. Beckman JA, Creager M, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 287(19): 2570-2581, 2002.
50. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine* 141(6): 421-431, 2004.
51. Mozes G, Keresztury G, Kadar A. Atherosclerosis in amputated legs of patients with and without diabetes mellitus. *International Angiology* 17(4): 282-286, 1998.
52. Stokes KR, Strunk HM, Campbell DR. Five-year results of iliac and femoropopliteal angioplasty in diabetic patients. *Radiology* 174:977-982, 1990.
53. Bullard KM, Longaker M, Lorenz HP. Fetal wound healing: current biology. *World J Surg* 27: 54-61, 2003.
54. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. *J Burn Care Rehabil* 26: 306-19, 2005.
55. Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery *J Surg Res* 124:201-208, 2005.

56. Spanheimer RG, Umpierrez G, Stumpf V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes*. 37: 371-6, 1988.
57. Robson MC, Phillips T, Falanga V, Odenheimer DJ, Parish LC, Jensen JL, Steed DL. Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound Repair Regen*. 9: 347-52, 2001.
58. Tsang MW, Wong WK, Hung CS, Lai KM, Tang W, Cheung EY, Kam G, Leung L, Chan CW, Chu CM, Lam EK. Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 26: 1856-1861, 2003.
59. Bhara M, Milles JL, Suresh K. Diabetes and landmine related amputation: a call to arms to save limbs. *International Wound Journal* 6;(1): 2- 3, 2009.
60. Singh N, Armstrong D, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA* 293: 217-228, 2005.
61. Fernando DJS, Hutchinson A, Veves A. Risk factors for non-ischæmic foot ulceration in diabetic nephropathy. *Diabetic Medicine* 8:223-225, 1991.
62. Game FL, Chipchase S, Hubbard R. Temporal association between the incidence of foot ulceration and the start of dialysis in diabetes mellitus. *Nephrology Dialysis Transplantation* 21: 3207-3210, 2006.
63. Kwon DS, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Danyluk AL, Bansal M, Chopp M, McIntosh K, Arbab AS, Dulchavsky SA, Gautam SC. Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. *Int Wound J* 5: 453-463, 2008.
64. Maharlooei, MK, Bagheri M, Solhjoui Z, Jahromi B, Akrami M, Rohani L, Monabati A, Noorafshan A, Omrani G. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 93(2): 228-34, 2011.
65. Aygören BH. Diyabetik Sıçanlarda Kaptopril ve Anjiotensin II Kombine Tedavisinin Random Patern Deri Flepleri Yaşayabilirliği Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi AD. Bursa, 2012.
66. Herr RR, Jahnke HK, Argoudelis AD. The structure of streptozotocin. *J Amer Chem Soc* 89:4808, 1967.
67. Bell RH, Hye RJ. Animal Models of Diabetes Mellitus: Physiology and Pathology. *Journal of surgical Research*, 35: 433-460; 1983.

68. Hosokawa, M, Dolci W, Thorens B. Differential sensitivity of GLUT1 and GLUT2-expressing beta cells to streptozotocin. *Biochem Biophys Res Commun* 1114-1117, 2001
69. Jun HS, Yoon JW. The role of viruses in type I diabetes:two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus induced diabetes in animals. *Diabetologia* 44(3):271-85, 2001.
70. İrer VS, Alper G. Deneysel Diyabet Modelleri. *Türk Klinik Biokimya Derg.* 2(3):127-136, 2004
71. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of chronic kidney disease and associated risk factors-United States 1999-2004 *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 56(8):161-16, 2006.
72. Global Burden of Disease 2013, Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the. *Lancet* 385(9963): 117-171, 2014.
73. KDIGO 2012, KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int* 3: 1-150, 2013.
74. Delanaye P, Cohen EP. Formula-based estimates of the GFR: equations variable and uncertain. *Nephron Clin Pract* 110(1):48-53, 2008.
75. Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M. Association between albuminuria, kidney function and inflammatory biomarker profile. *Clin J Am Soc Nephrol* 7: 1938-46, 2012.
76. Cheung WW, Paik K, Mak RH, Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 25(4): 711-24, 2010.
77. Goncalves S, Pecoits-Filho R, Perreto S, Barberato SH, Stinghen AE, Lima EG. Associations between renal function, volume status and endotoxaemia in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 21: 2788-94, 2006.
78. Wheeler DC. Cardiovascular disease in patients with chronic renal failure. *Lancet* 348: 1673-1674, 1996.
79. Fischer D, Rossa S, Landmesser U. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *European Heart Journal*26(1):65-69, 2005.
80. P. Kubes, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(1):4651-4655, 1991.

81. M. Annuk, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 12: 2747-2752, 2001,
82. Reyes AA, Karl AA, Klahr S. Role of arginine in health and in renal disease. *American Journal of Physiology* 267(3):331-346, 1994.
83. Xiao S, Wagner L, Mahaney J, Baylis C., Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultured endothelial cells. *American Journal of Physiology* 280(6): 989-995, 2001..
84. Nayman J. Effect of renal failure on wound healing in dogs. Response to hemodialysis following uremia induced by uranium nitrate. *Ann Surg* 164: 227-235, 1966.
85. Kursh ED, Klein L, Schmitt J, Kayal S, Persky L, The effect of uremia on wound tensile strength and collagen formation. *J Surg Res* 23: 37-42, 1977.
86. Yue DK, McLennan S, Marsh M, Mai YW, Spaliviero J. Effects of experimental diabetes, uremia and malnutrition on wound healing. *Diabetes* 36: 295-299, 1987.
87. Seth AK, De La Garza M, Fang RC, Hong SJ, Galiano RD Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease. *PLoS One*. 8(3):e59979 , 2013
88. Gilchrist BA, Rowe JW, Mihm MC. Clinical and histological skin changings in chronic renal failure: evidence for a dialysis-resistant, transplant-responsive microangiopathy. *Lancet* 2(8207):1271-1275, 1980.
89. Chauntin A, Ferris EB. Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy. *Arch Intern Med* 49:767-787, 1932.
90. Gagnon RF, Gallimore B, Characterization of a mouse model of chronic uremia. *Urol Res*16:119-126, 1988.
91. Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Gröne HJ, Schlöndorff D. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 12(6):1173-1187, 2001.
92. Hamada Y, Kono TN, Moriguchi Y, Higuchi M, Fukagawa M. Alteration of mRNA expression of molecules related to iron metabolism in adenine-induced renal failure rats: a possible mechanism of iron deficiency in chronic kidney disease patients on treatment. *Nephrol Dial Transplant* 23(6):1886-1891, 2008.
93. Capasso G, Di Gennaro CI, Della Ragione F, Manna C, Ciarcia R, Florio S, Perna A, Pollastro RM, Damiano S, Mazzoni O, Galletti P, Zappia V. In vivo effect of the natural antioxidant hydroxytyrosol on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 23: 1186-1195, 2008.

94. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC, Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 58(4): 1797-1804, 2000.
95. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19(3):193-204, 2001.
96. Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*285(5428): 754-756, 1999.
97. Howell JC, Yoder CM. Adult Stem Cell Plasticity Defined. *NeoReviews* 4(5):181-186, 2003.
98. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283(5401): 534-537, 1999.
99. Jones E, English A, Kinsey SE. Optimization of a flow cytometry- based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 70: 391-399, 2006.
100. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6: 1229-1234, 2000.
101. Orlic D, Kajstura J, Chimenti ., Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705, 2001.
102. McCulloch EA, Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat Med* 11: 1026-1028, 2005
103. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*1: 87, 1982.
104. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morph* (16):381-390, 1966.
105. Bianco P, Riminucci M. Marrow stromal cell culture:The bone marrow stroma in vivo: ontogeny,structure, cellular composition and changes in disease. *Handbooks in practical animal cell biology*, (Beresford JN, ed.) Cambridge University Press Cambridge, UK, 1998
106. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 11(5): 389-398, 2005.
107. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 30(1): 42-48, 2002.



108. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4): 1815-1822, 2005.
109. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317, 2006.
110. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6(3): 331-43, 1975.
111. Jeschke MG, Richter W, Ruf SG. Cultured autologous outer root sheath cells: a new therapeutic alternative for chronic decubitus ulcers. *Plast Reconstr Surg* 107(7): 1803-1806, 2001.
112. Gat U, Das Gupta R, Degenstein L, Fuchs E. De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated B-catenin in skin. *Cell* 95(5): 605-614, 1998.
113. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 23(6): 727-737, 2005.
114. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109(1): 235-242, 2000.
115. In 't Anker PS. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102(4): 1548-1549, 2003.
116. Bossolasco P. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res* 16(4): 329-36, 2006.
117. Kogler G. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200: 123-135, 2004.
118. McGuckin CP. Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp Cell Res* 295(2): 350-359, 2004.
119. Habibollah S, Forraz N, McGuckin CP. Application of Umbilical Cord and Cord Blood as Alternative Modes for Liver Therapy in Regenerative Medicine Using Non-Fetal Sources of Stem Cells (Bhattacharya N, ed.). London, Springer-Verlag, 223-242, 2015.
120. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J Biol Chem* 24(1): 3909-3917, 1966.
121. Hollenberg CH, Vost A. Regulation of DNA synthesis in fat cells and stromal elements from rat adipose tissue. *J Clin Invest* 47:2485-2498, 1969.

122. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295, 2002.
123. De Ugarte DA, Morizona K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Drago JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174: 101-119, 2003.
124. Pojda Z. Adipose-Derived Stem Cells for Therapeutic Applications, in *Regenerative Medicine: Using Non-Fetal Sources of Stem Cells*, (Bhattacharya N, ed). London, Springer-Verlag, 77-91, 2015:
125. Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, Togashi K, Ohno T, Tamura T, Toyoshima Y, Sugimachi K, Toyoda M, Marc H, Douglas A. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution™ system. *Cytotherapy* 10: 417-426, 2008.
126. Katz AJ, Hedrick M, Lull R, Futrell JW. A novel device for the simple and efficient refinement of liposuctioned tissue. *Plast Reconstr Surg* 107: 595-597, 2001.
127. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan A, Charbord P. The STRO-1 $\beta$  marrow cell population is multipotential *Cells Tissues Organs* 170: 73-82, 2002.
128. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol Suppl* 89: 54-63, 2001.
129. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7(6): 729-741, 2001.
130. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro* 21: 324-329, 2007.
131. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294(2): 371-379, 2002.
132. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290(2): 763-769, 2002.
133. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M et al., Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 113(2): 585-594, 2004.
134. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 228: 79-102, 2004.

135. Hattori H, Sato M, Masuoka K. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 178(1): 2-12, 2004.
136. Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 10(3-4): 371-380, 2004.
137. Conejero J, Lee J, Parrett B. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 117(3): 857-863, 2006.
138. Minn KW, Min KH, Chang H. Effects of fat preparation methods on the viabilities of autologous fat grafts. *Aesthetic Plast Surg* 34(5): 626-631, 2010.
139. Yoshimura K, Sato K, Aoi N. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of Stem Cell. *Rev Rep* 32: 48-55, 2008.
140. Yoshimura K, Sato K, Aoi N. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg* 34: 1178-1185, 2008.
141. Drago JL, Samimi B, Zhu M. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 85(5): 740-747, 2003.
142. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25(16): 3211-3222, 2004.
143. Grandbarbe L, Bouissac J, Rand M, Hrabé de Angelis M, Artavanis-Tsakonas S, Mohier E. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* 130(7): 1391-1402, 2003.
144. Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. *Nat Biotechnol* 23: 862-871, 2005.
145. Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J. Neurogenesis of rhesus adipose stromal cells. *J Cell Sci.* 117: 4289-4299, 2004.
146. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen P-S, March KL. IFATS collection: human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells* 27(1): 230-237, 2009.
147. Bai X, Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 401(3): 321-326, 2010.
148. Rehman J, Traktuev D, Li J. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109(10): 1292-1298, 2004.

149. Planat-Benard V, Jis S, Cousin B. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation Research* 109(5): 656-663, 2004.
150. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation Research* 10(3): 349-55, 2004.
151. Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for non-healing cutaneous wounds. *Plast Reconstr Surg*. 125(2): 510-516, 2010.
152. Rigotti G, Marchi A, Galie N. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 119(5): 1409-1422, 2007.
153. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual J, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 52(1): 79-86, 2009.
154. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 121(1): 59-69, 2008.
155. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of Adipose-Derived Stem Cells on Ischemia-Reperfusion Injury: Immunohistochemical and Ultrastructural Evaluation. *Plast Reconstr Surg* 124: 804-815, 2009.
156. Khouri RK, Angel MF, Edstrom LE. Standardizing the dorsal rat flap. *Surg Forum* 37: 510, 1986.
157. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Ann Plast Surg* 65(2): 237-244, 2010.
158. El Nahas AM, Bella K. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 365: 331-340, 2005.
159. Malmstedt J, Leander K, Wahlberg E. Outcome after leg bypass surgery for critical limb ischemia is poor in patients with diabetes: a population-based cohort study. *Diabetes Care* 31: 887- 892, 2008.
160. Wolf G, Muller N, Busch M. Diabetic foot syndrome and renal function in type 1 and 2 diabetes mellitus show close association. *Nephrology Dialysis Transplantation* 6: 1896-1901, 2009.
161. Ndip A, Rutter MK, Vileikyte L. Dialysis treatment is an independent risk factor for foot ulceration in patients with diabetes and stage 4 or 5 chronic kidney disease. *Diabetes Care* 33(b): 1811-1816, 2010.

162. Nyberg G, Hartso M, Mjornstedt L. Type 2 diabetic patients with nephropathy in a Scandinavian kidney-transplant population. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 30: 317-322, 1996.
163. Shore AC, Tooke JE. Microvascular function and hemodynamic disturbances in diabetes mellitus and its complications. *Textbook of diabetes* ( W.G. Pickup JC, ed) Cambridge, Blackwell Science, 1997.
164. Haag-Weber M, Dumann H. Effect of malnutrition and uremia on impaired cellular host defence. *Miner Electrolyte Metab* 18: 174-185, 1992.
165. Vanholder R, Van Loo A, Dhondt AM, De Smet R, Ringoir S. Influence of uremia and haemodialysis on host defense and infection. *Nephrol Dial Transplant* 11: 593-598, 1996.
166. Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ. Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plast Reconstr Surg* 119: 59-70, 2007.
167. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 19426-19431, 2008.
168. Thangarajah H. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(32): 13505-13510, 2009.
169. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, Senderoff D, Nhat PD, Phelps R. Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 102: 2033-2039, 1998.
170. Khouri RK, Brown DM, Leal-Khouri SM, Tark KC, Shaw WW. The effect of basic fibroblast growth factor on the neovascularisation process: skin flap survival and staged flap transfers. *Br J Plast Surg* 44(8): 585-588, 1991
171. Lu F, Mizuno H, Uysal CA. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 121:50-58, 2008.
172. Tobita M, Uysal CA, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal Tissue Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 6:945-953, 2008.
173. Rendell MS, Kelly ST, Finney D. Decreased skin blood flow early in the course of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *Diabetologia* 36: 907-911, 1993.
174. Isken T, Özgentaş E, Gulkesen KH, Ciftcioğlu A. A random-pattern skin-flap model in streptozotocin diabetic rats. *Ann Plast Surg* 57: 323-329, 2006.
175. Yang HC, Zuo Y, Fogo BA. Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models* 7(1-2): 13-19, 2010.

176. Shobeiri N, Adams M, Holden RM. Vascular Calcification in Animal Models of CKD: A Review. *Am J Nephrol* 31(6): 471-481, 2010.
177. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved Survival of Ischemic Random Skin Flaps Through the Use of Bone Marrow Nonhematopoietic Stem Cells and Angiogenic Growth Factors. *Annals of Plastic Surgery* 54(5): 546-552, 2005.
178. Emekli, U. The effect of short- versus long-term administration of alpha tocopherol on the survival of random flaps in experimental diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 18(5): 249-257, 2004.
179. Gao W. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Cell Mol Med* 15(12): 2575-2585, 2011.
180. Rasmussen JG, Frobert O, Pilgaard L. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the proangiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy* 13: 318-328, 2010.
181. de Groot K, Bahlmann F, Sowa J, Koenig J, Menne J. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int* 66: 641-646, 2004.
182. Van Koppen A, Joles JA, Bongartz LG, Van Den Brandt J, Reichardt HM. Healthy Bone Marrow Cells Reduce Progression Of Kidney Failure Better Than Ckd Bone Marrow Cells In Rats With Established Chronic Kidney Disease. *Cell Transplant* 21(10): 2299-2312, 2012.
183. Noh H, Yu MR, Kim HJ, Jeon JS, Kwon SH. Uremia induces functional incompetence of bone marrow-derived stromal cells. *Nephrol Dial Transplant* 27(1): 218-225, 2012.
184. Klinkhammer BM. Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential. *PLoS One* 9(3): p. e92115, 2014.
185. Roemeling-van Rhijn M. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue are not affected by renal disease. *Kidney Int* 82(7): 748-758, 2012.