



**T.C.**

**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN KAVERNOZAL SİNİR HASARI MODELİNDE ADİPOZ DOKU KAYNAKLI  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN EREKTİL İŞLEVLERİN İYİLEŞTİRİLMESİNDE  
ETKİNLİĞİ**

**Dr. Naşide MANGIR**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Cem AKBAL**

**İSTANBUL 2011**

## **TÜRKÇE BİLDİRİ ÖZETİ**

### **Amaç :**

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda bilateral kavernoza sinir hasarı sonrası oluşan erektil işlev bozukluğunun düzeltilmesinde adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin(AD-MKH) intrakavernoza enjeksiyonunun etkinliğini araştırmak ve kök hücre enjeksiyonunun otolog ya da allojenik olarak yapılmasının fonksiyonel sonuçları etkileyip etkilemediğini ortaya çıkarmaktır.

### **Gereç ve Yöntem :**

Çalışmanın başında tüm sıçanlara bilateral paratestiküler yağ doku eksizyonu yapıldı. Eksize edilen paratestiküler yağ dokudan MÜTF Üroloji Araştırma Laboratuvarı'nda AD-MKH izole edildi. Yağ doku eksizyonunun 15. gününde tüm sıçanlara alt abdominal insizyon ile bilateral kavernoza sinir hasarı uygulandı ve gruplara göre intrakavernoza kök hücre ve kök hücre lizat enjeksiyonu yapıldı. Enjeksiyon sonrası 1. ayda intrakavernöz basınç ölçümü yapılarak İntrakavernoza Basınç/ Ortalama Arter Basıncı (İKB/ OAB) değerleri hesaplandı. Ardından sıçanlar sakrifiye edilerek penis dokuları histolojik ve moleküler inceleme için ayrıldı.

### **Bulgular :**

Toplam 36 adet erkek Sprague- Dawley sıçan kullanılmıştır. Paratestiküler yağ dokudan elde edilen AD-MKH'ler akım sitometrisi ile tanımlanmış ve bu hücrelerin CD90 ve CD 44 pozitif; CD11b, CD 34 ve CD45 negatif hücreler oldukları gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen kök hücreler iki farklı dokuya farklılaştırılarak birden fazla dokuya farklılaşabilme kapasiteleri gösterilmiştir. Enjeksiyon sonrası 1. ayda yapılan İKB/ OAB değerleri karşılaştırıldığında Sham grubunun(Grup 1), PBS enjeksiyonu grubuna göre(Grup 2) anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir, sırasıyla 73,1 ( $\pm 10,3$ ) ve 47,1 ( $\pm 14,2$ ) (Mann Whitney U test p: 0,009). Otolog kök hücre enjeksiyonu yapılan grup(Grup 5), Grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur, sırasıyla 62,1 ( $\pm 12,3$ ) ve 47,1 ( $\pm 14,2$ ) (Mann Whitney U test, p: 0,05). Allojenik kök hücre enjeksiyonu yapılan grup(Grup 3) ile

PBS enjeksiyonu yapılan grup(Grup 2) karşılaştırıldığında bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı değildir, sırasıyla 61,0 ( $\pm 10,6$ ) ve 47,1 ( $\pm 14,2$ ) (Mann Whitney U test, p: 0,10). Kök hücrelerin otolog ya da allojenik enjeksiyonu arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir. Allojenik ya da otolog kök hücre lizatı enjeksiyonu yapılan gruplar(Grup 4 ve Grup 6), PBS enjeksiyonuna üstünlük gösterememişlerdir. Korpus kavernozum dokusunun immünohistokimyasal incelemesi sonucunda kök hücre enjeksiyonu yapılan sıçanlarda nNOS ekspresyonunun PBS grubuna göre daha fazla olduğu izlenmiştir. RT-PCR incelemesi sonucunda korpus kavernozumdaki nNOS ekspresyonunun kök hücre enjeksiyonu yapılan gruplarda PBS enjeksiyonu yapılan gruba göre daha fazla olduğu izlenmiştir.

**Sonuç :**

AD-MKH enjeksiyonu kavernoza sinir hasarı sonrasında oluşan erektil işlevlerin geri kazanılmasında etkili bir tedavi yöntemi olabilir. Kök hücrelerin otolog ya da allojenik olarak elde edilmesi fonksiyonel sonuçları değiştirmemektedir.

## İNGİLİZCE BİLDİRİ ÖZETİ

### **Aim :**

The aim of this study is to investigate the role of intracavernosal injection of adipose tissue derived mesenchymal stem cell(ADSCs) to improve erectile functions after bilateral cavernous nerve injury in rats. Functional consequences of either allogenic or autologous use of these stem cells are also evaluated.

### **Materials and Methods :**

All rats underwent bilateral paratesticular fat tissue excision at the beginning of the study. ADSCs are isolated from the excised adipose tissue in Marmara University School of Medicine Urologic Research Laboratory. After 15 days of fat excision bilateral cavernous nerve injury is performed which is followed by intracavernosal injection of stem cells or stem cell lysates accordingly to each group. One month after injection Intracavernosal Pressure/ Mean Arterial Pressure(ICP/ MAP) values are calculated after intracavernosal pressure measurement. All rats are sacrificed at the end and penile tissues are taken for immunohistochemical and molecular investigation.

### **Results :**

A total of 36 Sprague Dawley rats were used. ADSCs isolated from the excised paratesticular fat tissue are characterized with flowcytometry and these cells were demonstrated to be CD90 and CD 44 positive; CD11b, CD 34 and CD45 negative. These stem cells are also differentiated into 2 different tissues to prove their multilineage differentiation capacity. One month after injection ICP/ MAB values in the sham group(Group 1) were significantly higher compared to PBS injection(Group 2) group, 73,1 ( $\pm 10,3$ ) ve 47,1 ( $\pm 14,2$ ) (Mann Whitney U test p: 0,009), respectively. Autologous stem cell injection group(Group 5), when compared to Group 2 showed significantly better results 62,1 ( $\pm 12,3$ ) and 47,1 ( $\pm 14,2$ ) (Mann Whitney U test, p: 0,05), respectively whereas the difference was not significant in allogenic stem cell injection group(Group 3), 61,0 ( $\pm 10,6$ ) and

47,1 ( $\pm 14,2$ ) (Mann Whitney U test, p: 0,10), respectively. The comparison of allogenic and autologous stem cell injections revealed no significant difference. Autologous or allogenic stem cell lysate injections (Group 4 and 6) were not better than PBS injection. The nNOS staining in corpus cavernosum of rats treated with autologous or allogenic stem cells were stronger. Also nNOS expression was quantitatively better in stem cell injection groups.

**Conclusion :**

ADSC injection can be an effective treatment to regain erectile functions after cavernous nerve injury. The use of autologous or allogenic stem cells does not change the functional results.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                          |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>                                                                             | <b>6</b>  |
| <b>2.GENEL BİLGİLER .....</b>                                                                            | <b>7</b>  |
| 2.1. Radikal Prostatektominin Sonuçları.....                                                             | 7         |
| 2.2. RP Sonrası Görülen EİB' nun Patofizyolojisi .....                                                   | 7         |
| 2.3. RP Sonrası Görülen EİB' nin Hayat Kalitesi Üzerine Etkileri .....                                   | 8         |
| 2.4. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler(AD- MKH) .....                                         | 9         |
| 2.5. Nöropraksi Hayvan Modeli .....                                                                      | 10        |
| <b>3.GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>                                                                           | <b>11</b> |
| 3.1. AD- MKH' lerin İzolasyonu .....                                                                     | 12        |
| 3.2. Hücrelerin Akım Sitometrisi ile İncelenmesi .....                                                   | 15        |
| 3.3. Kavernozal Sinir Hasarının Deney Gruplarına Uygulanması.....                                        | 17        |
| 3.4. Deney gruplarında değerlendirilen parametreler .....                                                | 20        |
| 3.4.1. İntrakavernozal basınç ölçümü.....                                                                | 20        |
| 3.4.2. Gerçek zamanlı PCR incelemesi .....                                                               | 21        |
| 3.4.3. Kavernozal Dokunun İmmünohistokimyasal İncelenmesi.....                                           | 21        |
| <b>4.BULGULAR .....</b>                                                                                  | <b>22</b> |
| 4.1. İKB/ OAB oranları.....                                                                              | 22        |
| 4.2. Sıçan korpus kavernozum dokusundan izole edilen n- NOS gen ekspresyonu sonuçları<br>(RT- PCR) ..... | 24        |
| 4.2. Korpus kavernozum dokusunun immünohistokimyasal incelemesi sonuçları.....                           | 25        |
| <b>5.TARTIŞMA .....</b>                                                                                  | <b>27</b> |
| <b>6.SONUÇLAR.....</b>                                                                                   | <b>30</b> |
| <b>7.KAYNAKÇA .....</b>                                                                                  | <b>31</b> |

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Prostat kanseri(PK) erkeklerde görülen en sık kanserlerden biridir. SEER(Surveillance Epidemiology and End Results) verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri’ nde 2010 yılında 217 730 erkeğin PK tanısı alacağı ve 30 050 erkeği PK nedeniyle öleceği öngörülmektedir. (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>). PK tanısı alan erkeklerin %80’ inintanı anında lokalize hastalıklı ve radikal prostatektomi (RP) dahil lokal tedaviler için uygun adaylar olacaklardır.

Sağlık Bakanlığı’ nın Sağlık İstatistikleri 2008 Yıllığı’ na göre Türkiye’ de prostat kanseri insidansı 28,9/ 100 000’ dir ve akciğer kanserinden sonra erkeklerde en sık görülen 2. kanserdir. Üroonkoloji Derneği tarafından 01 Temmuz 2008 - 30 Haziran 2009 arasında 12 ilde yürütülen ‘Prostat Kanseri İnsidansı’ çalışmasının ön sonuçlarına göre Türkiye’ de prostat kanseri insidansı 36/ 100.000 olarak bildirilmiştir[1]. Türkiye’ de prostat kanserinin evrelerine göre dağılımı hakkında bir istatistik henüz yoktur ancak tarama testlerinin yaygınlaşması ile tanı anında lokalize hastalığı olanların sayısının git gide artması beklenmektedir[2, 3].

Lokalize prostat kanseri tedavisinde radikal prostatektomi(RP) yaşam beklentisi 10 yıldan fazla olan 65 yaş altı erkekler için önerilen standart tedavilerden biridir[4]. Büyük seriler radikal prostatektominin lokal ileri evre hastalarda da iyi bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir. Ancak RP’ nin erektile işlev bozukluğu ve idrar kaçırma gibi çok önemli iki komplikasyonu mevcuttur.

Bu çalışmanın amacı lokalize prostat kanserinin cerrahi tedavi yöntemi olan RP sonrası oluşan kavernoza sinir hasarına bağlı erektile işlev bozukluğunun (EİB) düzeltilmesinde kullanılabilecek yeni bir hücresel tedavi yöntemi geliştirmektir.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Radikal Prostatektominin Sonuçları

RP' nin prostat kanserinin doğal seyrini nasıl etkilediğini gösteren randomize kontrollü bir çalışma mevcuttur[5] ve RP' yi diğer tedavi seçeneği olan radyoterapiden üstün yapan böyle bir çalışmanın varlığıdır. Bu çalışmada klinik olarak lokalize hastalığa sahip 695 erkek RP ya da izlem kollarına randomize edilmiştir. 12 yıllık izlem süresinin sonunda RP olan hastalarda metastaz riskinde %35, kansere bağlı ölümden %35 ve toplam mortalitede %18' lik göreceli bir risk azalması bildirilmiştir. Böylelikle RP' nin lokalize PK' nde onkolojik sonuçlar açısından üstünlüğü kanıtlanmıştır.

RP' nin en sık görülen ve hayat kalitesini olumsuz etkileyen iki komplikasyonu idrar kaçırma ve erektil işlev bozukluğudur (EİB) dur. RP sonrası idrar kaçırma sıklığı idrar kaçırmamanın tanımına göre çok değişkenlik göstermekle birlikte literatürde %2 ile %87 arasında bildirilmiştir[6].

RP sonrası EİB, Walsh ve ark[7] tarafından tanımlanan sinir koruyucu RP'nin rutin olarak uygulandığı merkezlerde dahi %15 ile %40 arasında görülmektedir[8].

### 2.2. RP Sonrası Görülen EİB' nun Patofizyolojisi

Lokalize prostat kanserinde standart olarak uygulanan cerrahi teknik Walsh ve ark tarafından tanımlanan bilateral sinir koruyucu radikal prostatektomi(BSKRP) prensiplerine göre gerçekleştirilmektedir. BSKRP' de anatomik yakınlığı nedeniyle kavernoza sinirlerde diseksiyon sırasında travma sonucu nöropraksi olarak adlandırılan durum oluşmaktadır. *Nöropraksi*, sinirde künt travma, sıkışma ya da dolaşım bozukluğu sonucu yapısal bozukluk olmadığı halde oluşan ileti bozukluğu durumudur. RP cerrahisi sırasında sinir ezilmesi/çekilmesi, elektrokoter kullanımına bağlı termal hasar, damar hasarına bağlı sinir iskemisi ve cerrahi travmaya bağlı lokal inflamatuvar etkiler sinir hasarının nedenleri olarak sayılabilir[8]. Özetle RP sonrası EİB; cerrahinin neden olduğu sinir hasarı, operasyon sırasında arteriyel

travma ve korporal düz kasta yapısal değışiklere bağlı venooklüzif disfonksiyon mekanizmaları sonucu gelişir.

### **2.3. RP Sonrası Görülen EİB’ nin Hayat Kalitesi Üzerine Etkileri**

PK tanısı alan cinsel yönden aktif erkekler kansere bağlı mortalite/ morbidite ve erektil işlevleri arasında bir seçim yapmak durumunda kalmaktadırlar. Davison ve ark. lokalize prostat kanseri nedeniyle RP uygulanan ortalama yaşları 62 olan 130 erkek hasta ile yaptıkları araştırmalarında, RP sonrası 1. yılda ameliyat öncesi EİB olmayan ya da çok az EİB olan erkeklerin operasyon sonrası 1. yılda %77’ sinin orta derecede ya da çok ciddi EİB olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada hastaların sadece %4’ ünün ameliyat sonrası 1. yılda verdikleri karardan pişman olduklarını bildirmektedirler[9]. Bu da hastaların erektil işlevlerini kaybetme pahasına ameliyat olmayı seçtiklerini göstermektedir.

EİB’ nun yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Meyer ve ark 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada RP sonrası görülen EİB’ nun hastaların %72’ sinde yaşam kalitesi üzerinde çok ciddi ve orta derecede bozulmaya neden olduğunu bildirilmişlerdir[10]. Yine aynı çalışmada yaşam kalitesi kavramının bileşenlerini oluşturan öz güven, suçluluk duygusu, mutluluk ve kızgınlık gibi alanların en çok etkilenenler olduğu belirtilmiştir.

Sinir hasarı sonrası kavernoza dokudaki iyileşmeyi hızlandırmak amacıyla nöral embriyogenik kök hücre tedavisi[11], majör pelvik gangliyon ototransplantasyonu[12], GDF-5 (Growth differantion factor-5) tedavisi [13] ve hiperbarik oksijen tedavisi[14] hayvan modellerinde denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bizim çalışmamızda adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin korpus kavernoza dokusuna enjeksiyonu denenmiştir.

#### **2.4. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler(AD- MKH)**

AD- MKH'ler ile ilgili ilk araştırmalar 1964 yılında Rodbell' in kollajenaz kullanarak stromal vasküler fraksiyon (kapillerler, endotelyal hücreler, Mast hücreleri, makrofajlar, epitelyum hücreleri) ile matür adipositleri ayırması ile başlamıştır[15]. 1978 yılında Bjorntorp ve ark. stromal vasküler fraksiyon hücrelerinin matur adipoz doku hücrelerine dönüşebildiğini göstermiştir[16].

İnsan cilt altı yağ dokusundan elde edilen hücrelerin pluripotent kök hücre içerdikleri ve birçok dokuya farklılaştırılabilir oldukları ilk kez Zuk ve ark. tarafından 2001 yılında gösterilmiştir[17] ve bu hücreler AD- MKH olarak adlandırılmıştır. Ardından 2003 yılında Tholpady ve ark.[18] sıçan viseral adipoz dokudan elde edilen dokularda da kök hücrelerin bulunduğunu, bunların insan adipoz doku kaynaklı kök hücrelere benzer özellikler gösterdiğini ve bu yüzden hayvan deneyleri için kullanılabileceğini bildirmişlerdir. AD- MKH' ler diğer kök hücreler gibi bölünme, kendi kendini yenileme, birden fazla dokuya farklılaşabilme özelliklerine sahiptir[17]. AD- MKH' ler kemik iliğinden elde edilen kök hücreler ile hemen hemen aynı fenotipik özelliklere sahiptir ve AD- MKH' ler kemik iliği kaynaklı kök hücrelere göre daha az invaziv tekniklerle daha kolay ve daha çok miktarda elde edilebilmektedir[19].

Farklılaşmamış insan embriyonik kök hücreleri MHC Klas 2 moleküllerini eksprese etmez ve MHC klas 1 moleküllerini de çok az eksprese eder bu yüzden immün yanıt oluşturmaları beklenmemektedir[20] . Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerdeki durumun ne olduğu ile ilgili bir yayın henüz yapılmamıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin potansiyel klinik uygulama alanları giderek artmaktadır ve daha önceden çoğaltılmış allojenik mezenkimal kök hücreler pratik ve ticari olarak kolay ulaşılabilir bir kaynak gibi gözükmektedir[21].

Mezenkimal kök hücrelerin kullanımı ve bunların biyolojik etkileri ile ilgili görüşler son yıllarda önemli değişimlere uğramıştır[22-24].

Mezenkimal kök hücreler başlangıçta “multilineage” farklılaşma kapasiteleri nedeniyle tedavide kullanılsa da bunların antiapoptotik, proanjiojenik ve skarlaşma ve inflamasyonu azaltıcı sitokin ve büyüme faktörleri salgılama özellikleri daha geniş bir klinik uygulama alanı oluşturmuştur[25].

AD- MKH’ lerin EİB tedavisinde kullanımı ile ilgili ilk yayınlar 2010 yılında yapılmıştır. AD- MKH’ lerin diyabetik sıçan modelinde korpus kavernoza enjeksiyonunun erektile işlevlerde iyileşme ile birlikte olduğu [26], hiperlipidemik sıçan modelinde AD- MKH’ lerin korpus kavernoza (KK) enjeksiyonunun erektile fonksiyonlarda düzelme ile sonuçlandığı [27] gösterilmiştir. Ayrıca çok yeni bir çalışma nörojenik EİB olan sıçanlarda AD- MKH’ lerin KK ‘a enjeksiyonunun erektile fonksiyonlarda düzelme ile birlikte olduğunu göstermiştir[28].

## **2.5. Nöropraksi Hayvan Modeli**

Mullerad ve arkadaşları kavernoza sinir nöropraksi hasarı çalışmaları için uluslararası kabul edilebilir bir model oluşturmuşlardır [29]. Bu modele göre hasar oluşturulacak kavernoza sinir en ince boy bulldog klemple ile ana ganliyonun 5 mm distalinden tutularak 30 saniye sıkıştırılmış, 30 saniye beklenildikten sonra sinir tekrar 30 saniye daha sıkıştırılarak bilateral veya tek taraflı kavernoza sinir hasarı oluşturulmuştur. Bizim çalışmamızda da bu sinir hasarı modeli kullanılmıştır.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

1. **Paratestiküler yağ doku eksizyonu:** Çalışmanın başında (planlanan enjeksiyon tarihinden 15- 21 gün önce) kök hücre ve kök hücre lizat enjeksiyonu için kullanılacak olan hücrelerin elde edilmesi için bilateral paratestiküler yağ doku eksizyonu yapıldı.
2. **Kök hücre izolasyonu:** Eksize edilen paratestiküler yağ dokusudan MÜTF Üroloji Araştırma Laboratuvarı' nda kök hücreler izole edildi.
3. **Flowsitometrik İnceleme:** Elde edilen hücrelere Flowsitometrik inceleme yapıldı ve bu hücreler kültür ortamında iki farklı dokuya farklılaştırılarak çoklu farklılaşabilme kapasiteleri (multilineage differentiation capacity) incelendi. Bu incelemelerin sonunda elde edilen hücrelerin adipoz doku kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler oldukları kanıtlandı.
4. **Kavernozal sinir hasarı uygulanması:** Toplam 36 adet 350- 500 gr ağırlığında 12- 24 aylık Sprague Dawley sıçana laparotomi yapıldı ve deney gruplarındaki 30 adet sıçana bilateral kavernozal sinir hasarı uygulandı. Sinir hasarı sonrası allojenik ya da otolog AD- MKH veya AD- MKH lizatları gruplara göre intrakavernozal olarak uygulandı.
5. **Sonuçların değerlendirilmesi:** İlk operasyondan 1 ay sonra tüm sıçanlara anestezi altında laparotomi insizyonu ile İntrakavernozal Basınç/ Ortalama Arter Basıncı (İKB/OAB) ölçümü yapıldı. Bu ölçümden sonra hayvanlar kurban edilerek penis dokuları sonuçların değerlendirilmesi için çıkartıldı.

### 3.1. AD- MKH' lerin İzolasyonu

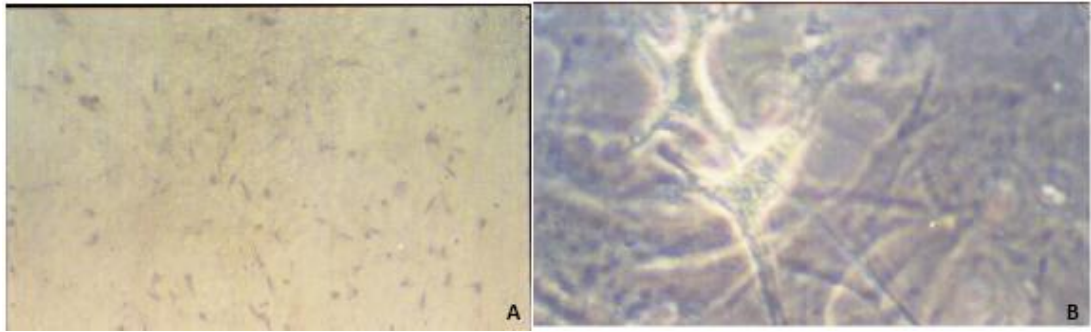
Sıçan yağ dokusundan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre elde edilmesinde kullandığımız protokol Şekil 1 ' de gösterilmiştir. Bu protokol literatürde tanımlanan diğer yöntemler incelenerek Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Üroloji Araştırma Laboratuvarı' nda en iyi çalışan yöntem belirlenerek oluşturuldu [30-32].

#### **SIÇAN ADİPOZ DOKUDAN MEZENKİMAL KÖK İZOLASYON PROTOKOLÜ (MÜTF Üroloji ABD Üroloji Araştırma Laboratuvarı 14.03.2011)**

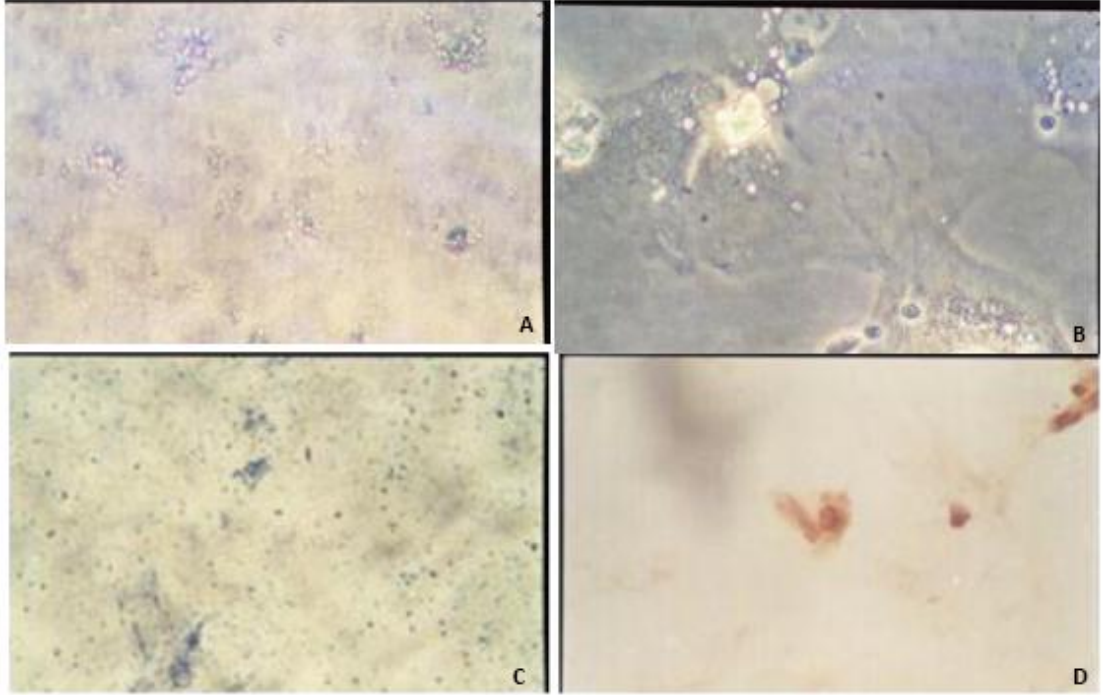
1. Sıçan yağ dokusunu steril idrar kabına PBS içerisine atılır.
2. Birkaç kez PBS ile yıkanır.
3. Yağ dokusunu petri kabına al ve laminar flow içinde steril makas ile küçük parçalara ayrılır.
4. Hazırlanan yağ dokusunun üzerine 2- 5 ml %0,075' lik Kollajenaz tip 1 ekle ve 37 derecede sıcak su banyosunda 20 dakikada bir 15 sn çalkalayarak 1 saat bekletilir.
5. Kollajenaza eşit hacimde DMEM/F12+ %10 FBS ekleyerek nötralize edilir.
6. 70 µm filtreden geçirilir.
7. Santrifüj kabına aktararak 100- 500 g de 5-10 dk çevrilir.
8. Süpernatant ı ayrılır.
9. Presipitat üzerine 160 mM NH<sub>4</sub>Cl ekle, 10 dk oda sıcaklığında bekletilir
10. 200 g de 10 dk santrifüj et, süpernatant ı ayır ve PBS ile yıkadıktan sonra tekrar santrifüj edilir.
11. Hücre kültür ortamına (DMEM/F12+ %10 FBS+ %1 Penicillin 100 U/mL+ streptomycin 100 µg/mL ),  $1 \times 10^4$  hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde 25 lik flasklara ekilir.

**Şekil 1. Sıçan yağ dokusundan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonunda kullanılan protokol**

Bu protokole göre izole edilen kök hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 72 saat bekletildikten sonra flasklara yapışmayan hücreler PBS ile yıkanarak ayrıldı. Bundan sonra kültür ortamı 2-4 günde bir yenilendi ve hücreler kültür kabının tabanı %80 oranda kapladıklarında pasaj yapıldı. Elde edilen hücrelerin faz kontrast mikroskop altındaki görüntüleri Şekil 2' de gösterilmiştir. Tüm hücreler 2. veya 3. pasajlarda subkültür ve akım sitometrisi ile inceleme için ayrıldı. Osteojenik ve adipojenik farklılaştırma için 2. veya 3. pasajlarda 100.000 hücre ayrılarak ilgili farklılaştırma ortamlarına ekildi. Osteojenik farklılaşma için Invitrogen, StemPro Osteogenesis Differentiation Medium ve Adipojenik farklılaşma için Invitrogen, StemPro Adipogenesis Differentiation Medium kullanıldı. Bu kültür ortamında 3 hafta bekletildikten sonra yağ dokusuna farklılaşan hücreler "Sudan Black" ile kemik dokusuna farklılaşanlar Alizarin red ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Boyama sonucunda yağ dokusuna farklılaşan hücrelerde yağ depozitleri, kemik dokusuna farklılaşan hücrelerde kalsiyum depozitleri mikroskop altında izlendi (Şekil 3).



**Şekil 2. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, 2. pasajda faz contrast mikroskop altındaki görünüşleri. (A) 10 luk büyütme (B) 40 lık büyütme**

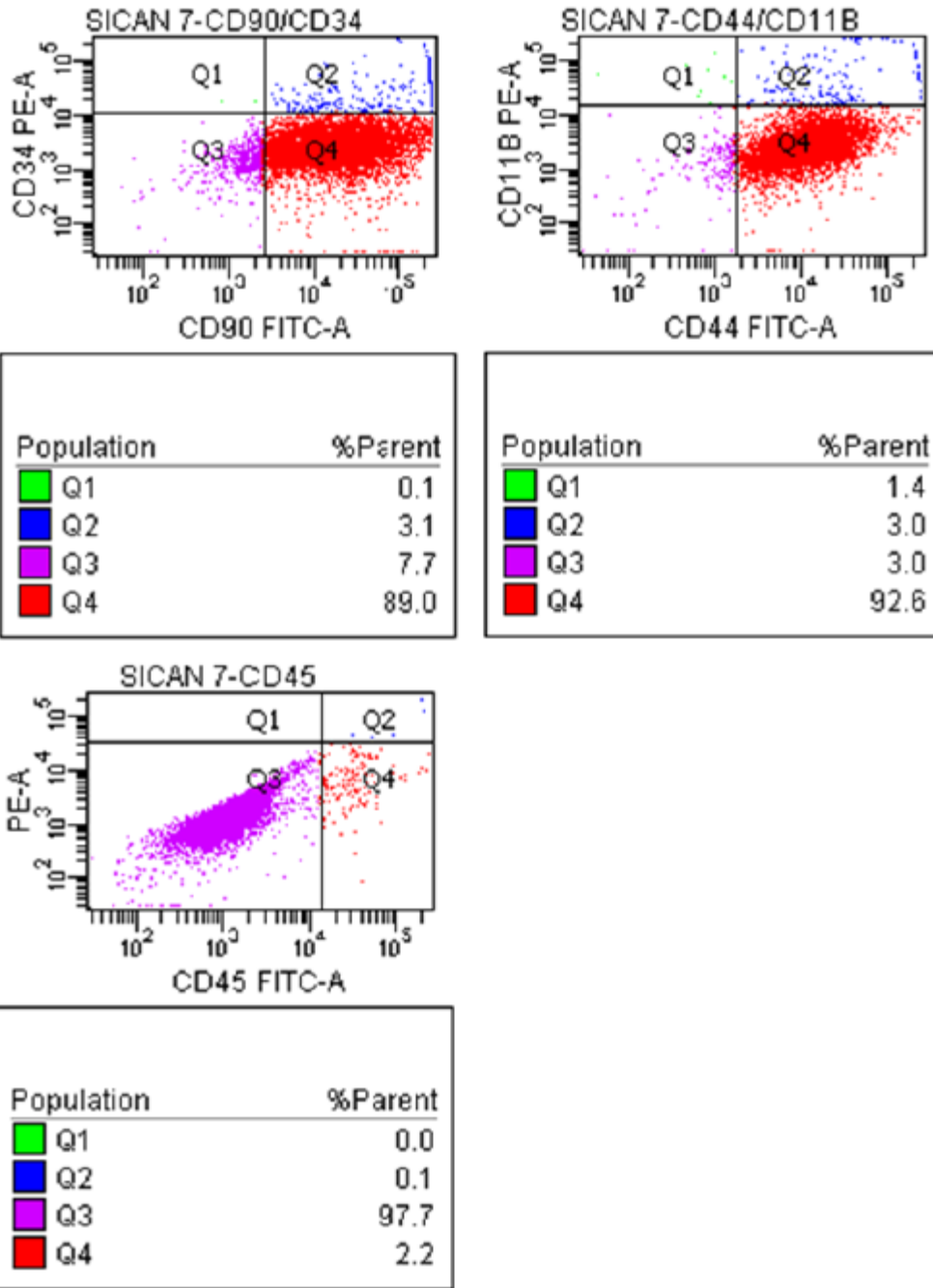


**Şekil 3. Hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma sonrası 3. haftadaki görünümleri (A) Adipojenik farklılaşma sonrası faz kontrast mikroskop altındaki görünüm, yağ vakuelleri görünümü (B) Osteojenik farklılaşma sonrasında faz kontrast mikroskop altındaki görünüm, (C) Adipojenik farklılaşma sonrasında Sudan Black boyama ile yağ vakuollerinin görünümü, (D) Osteojenik farklılaşma sonrasında Alizarin Red boyama ile kalsiyum depozitlerinin görünümü**

### 3.2. Hücrelerin Akım Sitometrisi ile İncelenmesi

Mezenkimal kök hücreyi tanımlayan minimal özellikler ISCT (International Society for Cellular Therapy) tarafından 'kültür kabına yapışan ve osteojenik, adipojenik ve kondrojenik dokulara farklılaşabilen, CD73, CD90 ve CD105 pozitif; CD11b, CD14, CD34, CD45, CD79a ve HLA DR negatif hücreler' olarak tanımlanmıştır[33].

Bizim çalışmamızda elde edilen kök hücre süspansiyonlarının her biri 2. veya 3. pasajlarda Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji ve İmmunoloji Laboratuvarında FITC anti-rat CD44 (Biolegend), PE anti-rat CD11b (Biolegend), FITC anti-rat CD45 (Biolegend), FITC anti-rat CD90 (Biolegend) ve PE anti-rat CD34 (SANTACRUZ) antikorları kullanılarak akım sitometrisi ile incelendi. Akım sitometri incelemesinin sonunda elde edilen hücrelerin CD90 ve CD 44 pozitif; CD11b, CD 34 ve CD45 negatif hücreler oldukları gösterildi.

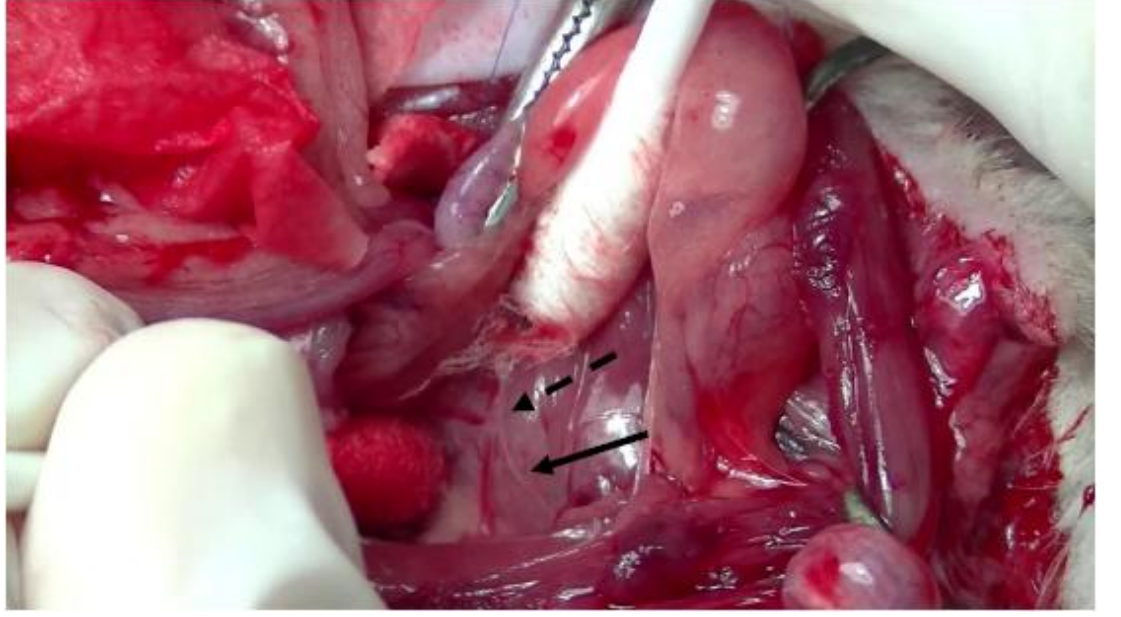


Şekil 4. Kök hücre süspansiyonlarından birinin(Sıçan 7) akım sitometrisi ile incelemesinin sonuçları (Elde edilen hücrelerin %89' unun CD90 pozitif, %0,1' inin CD34 pozitif, %92,6' sının CD44 pozitif, %1,4' ünün CD11B pozitif ve %97,7' sinin CD45 negatif olduklarını görülmektedir).

### 3.3. Kavernoza Sinir Hasarının Deney Gruplarına Uygulanması

Deney gruplardaki sıçanlara 100 mg/kg ketamin ve 50 mg/kg klorpromazin yardımıyla anestezi uygulandı ve karın tüylerinden arındırıldıktan sonra orta hat laparotomi insizyonu ile mesaneye ulaşıldı. Mesane laterale yatırıldıktan sonra mesaneye yakın olan vas deferens ve ventral prostat arasındaki bölgeye künt disseksiyon ile ulaşıldı. Testisler yukarı retrakte edildi ve gubernakulumdan ayrılarak karına taşındı. Ana pelvik ganglionun lateralindeki satelit gangliyonlardan kavernoza sinir saptandı (Şekil 5). Hasar oluşturulacak kavernoza sinir en ince boy buldog klemp ile ana ganglionun 5 mm distalinden tutularak 30 saniye sıkıştırılıp, 30 saniye beklendi ve sinir tekrar 30 saniye daha sıkıştırılarak sinir hasarı daha önce Mullerad ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde uygulanmış oldu.

Deney gruplarındaki sıçanlara kavernoza sinir hasarı uygulandıktan hemen sonra gruplara göre allojenik ya da otolog AD- MKH' ler ve AD- MKH lizatları intrakavernoza dokuya enjekte edildi. Enjekte edilecek kök hücre süspansiyonları 200 µl PBS içinde 1 milyon otolog ya da allojenik kök hücre veya 200 µl PBS içinde 1 milyon otolog ya da allojenik hücre lizatı insülin enjektörüne konularak hazırlandı. Kök hücre lizatı, ozmotik rüptür ve 3 ısıt- soğut döngüsünden sonra süspansiyonda canlı hücre kalmadığı tripan mavisi ile mikroskop altında incelenerek oluşturuldu. Enjeksiyon öncesinde sıçanın penis köküne bir turnike uygulandı. Ardından her iki korpus kavernozauma ayrı ayrı 100' er µl olacak şekilde hücre veya hücre lizatı enjeksiyonu 26 Gauge iğne ile yapıldı. Enjeksiyon sonrası 1 dk enjeksiyon yerine kompresyon uygulandı ve enjeksiyondan 2 dakika sonra turnike açıldı. Cerrahi işlem tamamlandıktan sonra sıçanların abdominal insizyonları kapatılarak anesteziye son verildi.



Şekil 5. Sıçan sağ kavernoza sinir (ok), sağ major pelvik gangliyon(kesik çizgili ok)

#### Deney grupları;

1. Grup 1 : Sham grubu. Bu gruptaki sıçanlarda alt abdominal insizyon ile bilateral kavernöz sinir ortaya çıkarıldıktan sonra operasyona son verildi.
2. Grup 2 : PBS enjeksiyonu grubu. Bu gruptaki sıçanlarda alt abdominal insizyon ile bilateral kavernöz sinir hasarı oluşturuldu ve aynı seansta 200 µl PBS intrakavernozaal olarak enjekte edildi.
3. Grup 3 : Allojenik kök hücre enjeksiyonu grubu. Bu gruptaki sıçanlarda alt abdominal insizyon ile bilateral kavernöz sinir hasarı oluşturuldu ve aynı seansta 200 µl PBS içinde süspanse edilmiş olan allojenik kök hücreler intrakavernozaal olarak enjekte edildi. Bu gruptaki sıçanlara enjeksiyondan 15 gün önce paratestiküler yağ doku eksizyonu uygulandı.
4. Grup 4 : Allojenik kök hücre lizat enjeksiyonu grubu. Bu gruptaki sıçanlarda alt abdominal insizyon ile bilateral kavernöz sinir hasarı oluşturuldu ve aynı seansta 200 µl PBS içinde süspanse edilmiş olan allojenik kök hücre lizatları intrakavernozaal olarak enjekte edildi. Bu gruptaki sıçanlara enjeksiyondan 15 gün önce paratestiküler yağ doku eksizyonu uygulandı.
5. Grup 5 : Otolog kök hücre enjeksiyonu grubu. Bu gruptaki sıçanlarda alt abdominal insizyon ile bilateral kavernöz sinir hasarı oluşturuldu ve aynı seansta 200 µl PBS içinde süspanse edilmiş olan otolog kök hücreler intrakavernozaal olarak enjekte edildi. Bu gruptaki sıçanlara enjeksiyondan 15 gün önce paratestiküler yağ doku eksizyonu uygulandı.
6. Grup 6 : Otolog kök hücre lizat enjeksiyonu grubu. Bu gruptaki sıçanlarda alt abdominal insizyon ile bilateral kavernöz sinir hasarı oluşturuldu ve aynı seansta 200 µl PBS içinde süspanse edilmiş olan otolog kök hücre lizatları intrakavernozaal olarak enjekte edildi. Bu gruptaki sıçanlara enjeksiyondan 15 gün önce paratestiküler yağ doku eksizyonu uygulandı.

### 3.4. Deney gruplarında değerdendirilen parametreler

Deney gruplarında aşağıdaki parametreler değerdendirildi:

1. İntrakavernozal basınç ölçümü (ICP/ MAP oranı)
2. Kavernozal dokuda nNOS immünhistokimyasal incelemesi
3. Kavernozal dokuda nNOS ekspresyonunun RT PCR ile saptanması

#### 3.4.1. İntrakavernozal basınç ölçümü

Bilateral kavernöz sinir hasarından 1 ay sonra tüm sıçanlara kavernozal dokunun elektrofizyolojik değerdendirmesi için ikinci bir operasyon uygulandı. Aynı anestetik maddeler kullanılarak işleme başlandı ve öncelikle transvers boyun insizyonu ile trakeanın hemen yanındaki sol internal karotis arter etrafındaki vagus sinirini de içerecek şekilde ayrılarak ortaya çıkarıldı. Arter distalde bağlandı, kardiyak tarafından buldog klemp ile tutularak ince bir kesi sonrası PE50 tüp ile kanüle edildi. PE50 tüpü bir basınç transdüsrüne ve güçlendirici ünitesine (COMMAT Pharmacology&Physiology Instruments. Ankara, Türkiye) bağlandı. Bu güçlendirici ünite de bilgi dönüştürme modülüne bağlandı(MP 35 data acquisition system. Ankara, Türkiye). Böylelikle sistemik Ortalama Arter Basıncı (OAB) kayıt edilerek bilgisayardan ölçümü sağlandı (Biopac Systems Inc. CA, USA). Ardından penis dairesel insizyonla ile tamamen tanımlandı, penis krurası tunika albugineası, iskiyokavernoz kastan ayrılarak ortaya çıkarıldı. Tek hamlede penis sağ krurasına 24 G iğne ucu yerleştirildi, heparinize PE50 tüpü ile devamlılığı sağlanan 24 G iğne de basınç algılayıcıya bağlandı. Böylelikle İntra Kavernozal Basınç (İKB) ölçümü sağlandı. Ardından laparotomi insizyonu aşağı doğru genişletildikten sonra daha önce tarif edildiğı gibi kavernozal sinirler ortaya çıkarıldı. Sinir bipolar paslanmaz çelik birbirine paralel iki elektrot (1 mm aralıklı) ile ana gangliyonun hemen distali ile sinir hasarı uygulanan bölgenin proksimalinden tutuldu. Elektrod kablosu STPT02 stimülatörüne (COMMAT Pharmacology&Physiology) bağlandı ve stimülasyon parametreleri; 1.5 mili Amper, 20 Hz, 5 milisaniye puls aralığı, 35 milisaniye

gecikmeli, 7.5 volt 60 saniye boyunca olacak şekilde ayarlandı. Sinir uyarımı sırasında maksimum İKB/ OAB hesaplandı.

Intrakavernozal basınç ölçümü yapıldıktan sonra sıçanlar sakrifiye edilerek penis iskiyopubik ligamanlarından diseke edildi ve bu seviyeden kesilerek derisinden ayrılan penis gövdesi histolojik inceleme için ayrıldı. Dokunun yarısı 1 gece %10 formalin içinde yıkandı ve 4°C de %70 alkol içinde parafin blok yapılacağı zamana kadar bekletildi. Diğer yarısı sıvı nitrojen içeren termos ile -80°C dondurucuya konulmak üzere n-NOS m-RNA ekspresyon çalışmaları için saklandı.

#### **3.4.2. Gerçek zamanlı PCR incelemesi**

Dondurulmuş örnekler Gerçek zamanlı PCR(RT- PCR) çalışmalarında kullanıldı. Sıvı nitrojen içinde dondurulduktan sonra -80 °C derin dondurucuda saklanan taze KK dokularında n-NOS' un m-RNA ekspresyonuna kantitatif analiz amacıyla RT-PCR yöntemi ile bakıldı. Tüm RNA' lar high pure izolasyon kiti kullanılarak elde edildi ve reverse transkripsiyon uygulandı. c-DNA %2 Agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi ve ethidiumbromide boyama ile görüntülendi. Floresans SYBR Green sistemi, Lightcycler ve sitokin kontrol kiti kullanılarak miktar tayini yapıldı ve ölçüm için çoğaltma uygulandı. Kantitatif RT-PCR amacıyla n-NOS için aşağıdaki primer dizinleri kullanıldı;

(sense) 5'-ACCTGAAGAGCAGACTGGAAAC-3'

(antisense) 5'- ATGGCCGACCTGAGATTC-3'

#### **3.4.3. Kavernozal Dokunun İmmünohistokimyasal İncelenmesi**

Sıçanlar sakrifiye edilip penis gövdeleri çıkartıldıktan sonra paraformaldehit içinde fiske edildi. Dokular dehidrate edilerek parafin blok içine gömüldü ve penis dokusunun longitudinal ve transverse kesitleri hazırlandı. İmmünohistokimyasal incelemede nNOS primer antikoru(NovusBiologicals NBP1-39681) ve sekonder antikor olarak Histostain plus kit broad spectrum (Invitrogen 859043) kullanıldı. Karşı boyama Hematoksilen ile gerçekleştirildi.

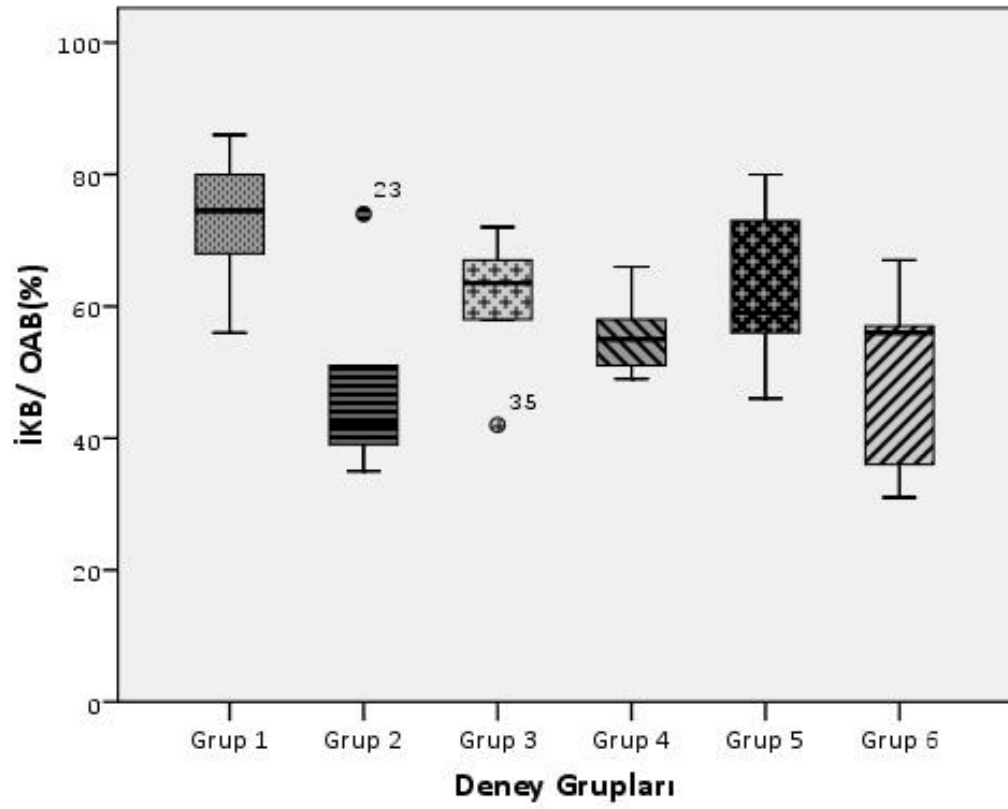
## 4.BULGULAR

### 4.1. İKB/ OAB oranları

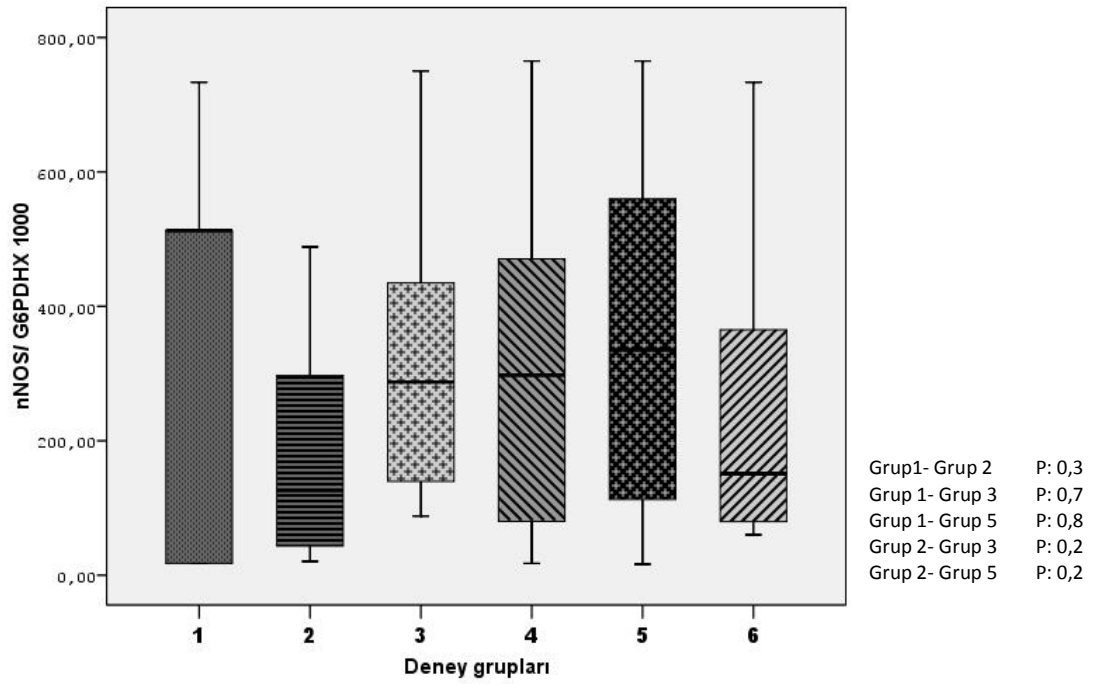
Tüm gruplardaki sıçanlar için maksimum İKB/ OAB oranları Tablo 1’ de gösterildi. İKB/ OAB değerleri karşılaştırıldığında Sham grubunun(Grup 1), PBS enjeksiyonu grubuna göre(Grup 2) anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü, sırasıyla 73,1 ( $\pm 10,3$ ) ve 47,1 ( $\pm 14,2$ ), Mann Whitney U test p: 0,009. Allojenik kök hücre enjeksiyonu yapılan grup(Grup 3) ile PBS enjeksiyonu yapılan grup(Grup 2) karşılaştırıldığında bulunan fark istatistiksel olarak anlamlı değildi, sırasıyla 61,0 ( $\pm 10,6$ ) ve 47,1 ( $\pm 14,2$ ), Mann Whitney U test p: 0,10. Otolog kök hücre enjeksiyonu yapılan grup(Grup 5), Grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu, sırasıyla 62,1 ( $\pm 12,3$ ) ve 47,1 ( $\pm 14,2$ ), Mann Whitney U test p: 0,05. Allojenik ya da otolog kök hücre lizatı enjeksiyonu yapılan gruplar(Grup 4 ve Grup 6), PBS enjeksiyonuna üstünlük göstermediler.

**Tablo 1. Deney gruplarının maksimum İKB, OAB ve İKB/ OAB oranları(a: p< 0,05, b: p> 0,05, c: p> 0,05)**

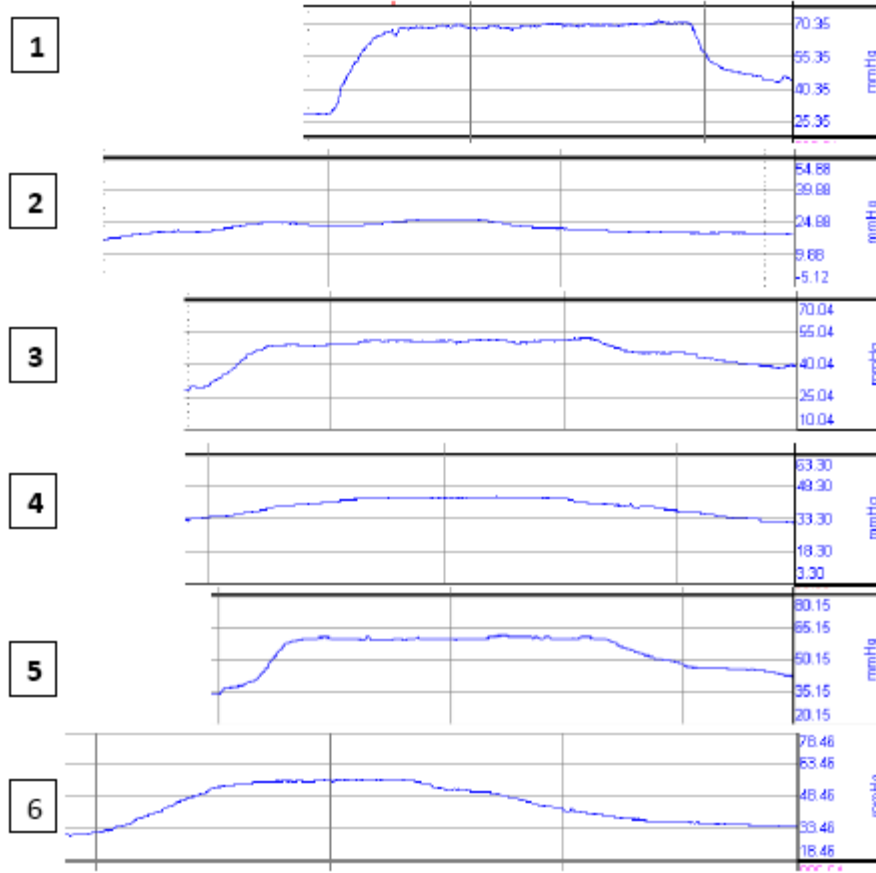
|               | Maksimum İKB(mmHg)  | OAB(mmHg)           | İKB/ OAB(%)                            |
|---------------|---------------------|---------------------|----------------------------------------|
| <b>Grup 1</b> | 56,6 ( $\pm 13,1$ ) | 80,1 ( $\pm 14,9$ ) | 73,1 ( $\pm 10,3$ ) <sup>a</sup>       |
| <b>Grup 2</b> | 40,5 ( $\pm 15,5$ ) | 85,3 ( $\pm 8,9$ )  | 47,1 ( $\pm 14,2$ ) <sup>a, b, c</sup> |
| <b>Grup 3</b> | 52,6 ( $\pm 8,0$ )  | 87,3 ( $\pm 11,5$ ) | 61,0 ( $\pm 10,6$ ) <sup>b</sup>       |
| <b>Grup 4</b> | 48,5 ( $\pm 7,6$ )  | 87,1 ( $\pm 13,0$ ) | 55,6 ( $\pm 6,1$ )                     |
| <b>Grup 5</b> | 49,0 ( $\pm 9,4$ )  | 79,1 ( $\pm 9,6$ )  | 62,1 ( $\pm 12,3$ ) <sup>c</sup>       |
| <b>Grup 6</b> | 43,4 ( $\pm 14,7$ ) | 87,0 ( $\pm 7,1$ )  | 49,4 ( $\pm 15,2$ )                    |



Şekil 6. Deney gruplarının iKB/OAB oranları



Şekil 7. Deney gruplarının RT- PCR sonrası nNOS/ G6PDH oranları



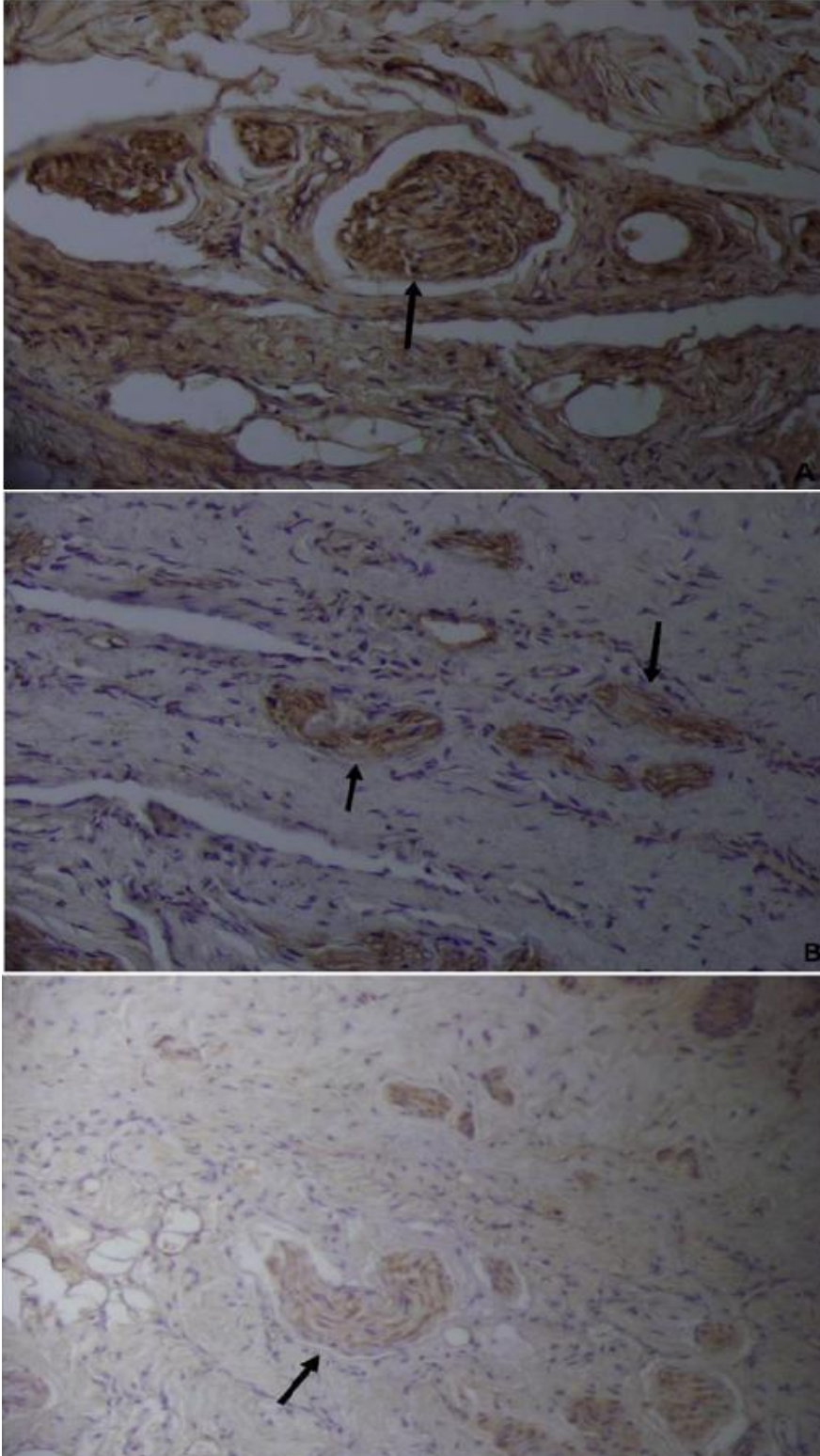
**Şekil 8. Her grubu temsil eden örnek İKB ölçümleri**

#### **4.2. Sıçan korpus kavernozum dokusundan izole edilen n- NOS gen ekspresyonu sonuçları (RT- PCR)**

Sıçan korpus kavernozumlarından eksprese edilen n-NOS m-RNA' larının RT-PCR ile kantitatif analizinin sonuçları Şekil 6' da görülmektedir. Allojenik ya da otolog kök hücre enjeksiyonu yapılan gruplardaki nNOS/ G6PDH oranları PBS enjeksiyonu grubuna göre daha fazla olduğu izlendi. Ancak bu farklardan hiçbiri istatistiksel anlamlı değildi.

#### **4.2. Korpus kavernozum dokusunun immünhistokimyasal incelemesi sonuçları**

Korpus kavernozum dokusundaki kavernoza sinir liflerinde nNOS ile koyu kahverengi boyanma otolog ve allojenik kök hücre enjeksiyonu yapılan gruplarda PBS enjeksiyonu yapılan gruba göre daha fazla olduğu görüldü ( ekil 8).



Şekil 9. İmmünohistokimyasal incelemede nNOS boyanma özellikleri, (A) nNOS ile +++(güçlü) boyanma, otolog kök hücre enjeksiyonu yapılan grup, (B) nNOS ile orta(++) boyanma, allojenik kök hücre lizat enjeksiyonu grubu, (C) nNOS ile +(zayıf) boyanma, PBS enjeksiyonu grubu

## 5.TARTIŞMA

Bu çalışma Türkiye’ de klinik öncesi Ürolojik araştırmalarda adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin kullanıldığı ilk çalışmadır. Dünyada da Ürolojik araştırmalar kök hücre araştırmalarında önemli bir yer tutmaktadır[34, 35]. Örneğin 2003- 2011 yılları arasında sadece erektil işlev bozukluğunda kök hücre tedavisinin araştırıldığı 16 yayın mevcuttur[36]. Bunun dışında kök hücrelerin akut [37, 38] ve kronik[39] böbrek yetmezliği, böbrek dokusu konstrüksiyonu[40], mesane augmentasyonu[41-43], üriner inkontinans[44-46] ve erektil işlev bozukluğu[47, 48] tedavilerinde kullanımları araştırılmaktadır.

Kök hücreler totipotent, pluripotent ve multipotent olabilirler. Totipotent kök hücreler embriyonun 3 germ tabakasına ve ekstraembriyonik tabakalara (örneğin zigot), pluripotent kök hücreler 3 germinal tabakaya farklılaşabilirler (örneğin blastocyst inner cell mass). Multipotent kök hücreler ise yakından ilişkili oldukları dokulara farklılaşabilen hücrelerdir (örneğin kemik iliğinin karaciğer, yağ doku, kemik dokuya farklılaşması gibi). Bu çalışmada kullanılan kök hücreler yağ dokudan elde edilen multipotent kök hücrelerdir ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılmıştır(AD- MKH).

AD- MKH’ ler tıpkı kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler gibi, tüm mezenkimal dokulara (adipoz doku, kemik doku, kıkırdak dokusu, kas dokusu) ve endoteliyal progenitörlere (anjogenik[49, 50], epitelyal[51], hepatik[52] ve nörojenik[53, 54]) dönüşebilmektedirler. AD- MKH’ ler diğer kök hücre kaynaklarına göre kolay, noninvaziv yöntemlerle bol miktarda elde edilebilmeleri, kültür ortamında daha hızlı çoğaltılabilmeleri nedeniyle rejeneratif tedaviler için son yıllardaki en çekici kaynağı oluşturmaktadır[55].

Literatürde adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin korpus kavernoza enjeksiyonu hiperlipidemik rat modelinde[27], diyabetik rat modelinde[26] ve bilateral kavernoöz sinir hasarı sonrası nörojenik ED modelinde [28] denenmiştir. Hem diyabetik ve hiperlipidemik erektil disfonksiyonda hem de bilateral kavernoöz sinir hasarı sonrası erektil disfonksiyonda korpus kavernoza enjekte edilen AD-

MKH' lerin ve kök hücre lizatlarının erektile işlevleri iyileştirdiği gösterilmiştir[28]. Ancak bu çalışmalarda otolog AD- MKH' ler kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda otolog ya da allojenik kök hücrelerin sinir hasarı sonrası korpus kavernoza enjeksiyonunun istatistiksel olarak anlamlı olmasa da erektile işlevleri belirgin olarak iyileştirdiği ve kök hücre lizatlarının belirgin bir iyileştirici etkisi olmadığı görülmektedir. Bu iyileşme otolog ya da allojenik gruplarda farklı değildir. Otolog ve allojenik enjeksiyonun karşılaştırıldığı başka bir çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmış ve benzer sonuçlara ulaşılmıştır[56, 57].

Nörojenik ED modelinde kök hücre tedavileri ile ilgili araştırmalardan bazıları da hasarlanan kavernoza sinirinin bir taşıyıcı iskelele tutunan AD- MKH' ler ile onarılması üzerinde yoğunlaşmaktadır[58]. Bizim çalışmamızda kök hücrelerin etki mekanizması, hedef organlarda istenilen dokuya farklılaşmak yerine parakrin yollarla enjekte edildikleri dokudaki rejenerasyon sürecini hızlandırmaları olarak açıklanabilir[59].

Kök hücre enjeksiyonu çalışmalarında enjekte edilen hücrelerin organizma içindeki geleceklerinin belirlenebilmesi için hücre işaretlemesi (tracking) önerilmektedir[60], [19]. İşaretleme için GFAP, EdU ve BrdU en çok kullanılan moleküllerdir. Korpus kavernoza enjekte edilen hücrelerin enjeksiyon sonrasında sistemik dolaşıma katıldığı ve hasarlanan bölgede biriktiği gösterilmiştir[61]. Örneğin major pelvik gangliyon hasarında korpus kavernoza enjekte edilen hücreler burada birikmekte[62], intravenöz yolla enjekte edilen kök hücreler kardiyak iskemi modelinde kalp kasında birikmektedir[23]. Bu etkiyi en iyi gösteren çalışmalardan birinde AD- MKH' ler aşırı aktif mesane rat modelinde hem mesaneye hem kuyruk venine enjekte edilmiş ve hücrelerin mesanede biriktiği, kuyruk venine enjekte edilenler ile mesaneye enjekte edilenler arasında bir fark izlenmediği gösterilmiştir[63]. Bizim çalışmamızda AD- MKH' ler hasarın oluştuğu dokuya enjekte edilmiştir ve buradan sistemik dolaşıma katıldıktan sonra yine korpus kavernoza birikmesi ve etkilerini burada gösterdiği varsayılmış, bu yüzden kök hücrelerin işaretlenmesine gerek görülmemiştir.

Bu çalışmada sıçan paratestiküler yağ doku eksizyonu yaparken kullandığımız yöntem daha önce tanımlanmamış bir yöntemdir. Daha önceki çalışmalarda paratestiküler yağ doku eksizyonu alt abdominal insizyon ile yapılmıştır veya başka bir yağ doku kaynağı kullanılmıştır ( inguinal, peritoneal ya da nuchal yağ doku). Bizim yaptığımız ön çalışmalarda diğer yağ doku kaynaklarından istenilen miktarda yağ doku eksize edilememiştir. Kavernöz sinir hasarı ve hasar sonrası 1. ayda İKB ölçümü yapılırken alt abdominal insizyon kullanılacağı için yağ doku eksizyonunda yine aynı insizyonun kullanması hem olası yapışıklıklar nedeni ile tüm bu işlemleri zorlaştırabileceği hem de sıçan mortalitesini arttırabileceği düşüncesi ile tercih edilmemiştir. Bilateral yüksek skrotal insizyon ile paratestiküler yağ doku eksizyonu kolay, minimal invaziv ve etkili bir yöntem olarak geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bu yöntem ile yağ doku eksizyonu ile kavernöz sinir hasarını farklı insizyonlardan yapmak mümkün olmuştur. Ayrıca bu yöntemin tüm kök hücre araştırmalarında yağ dokusu elde etmek için kullanılabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada kullanılan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı bünyesindeki Üroloji Araştırma Laboratuvarı' nda izole edilmiştir. Bunun belki de en önemli faydası çok yakın bir gelecekte tek başlarına ya da doku mühendisliği ürünlerinin hücresel bileşeni olarak Üroloji pratiğine girmeye hazırlanan kök hücrelerin Türk Ürologları tarafından tanınmasını sağlaması ve bu tedavilerin uygulayıcıları olacak Ürologların bilgi düzeyinin arttırılmasına öncülük etmesidir. Bundan sonra yapılacak çalışmaların en büyük katkısı sağlayacağını düşünmekteyiz.

## **6.SONUÇLAR**

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre enjeksiyonu, sinir hasarı sonrası erektil işlevlerin düzeltilmesinde etkili bir yöntemdir. Bu hücrelerin otolog ya da allojenik olmaları işlevsel açıdan bir fark oluşturmamaktadır. Allojenik kök hücre kullanımının immünolojik sonuçları üzerine yapılacak araştırmalar sonucunda kök hücrelerin allojenik kullanımı, klinik pratikte daha geniş kitlelere daha hızlı kullanım olanağı sağlayacağı için önemlidir.

## 7.KAYNAKÇA

1. [www.uroonkoloji.org.tr](http://www.uroonkoloji.org.tr): Üroonkoloji derneği web sitesi.
2. Moore AL, Dimitropoulou P, Lane A, Powell PH, Greenberg DC, Brown CH, Donovan JL, Hamdy FC, Martin RM, Neal DE: **Population-based prostate-specific antigen testing in the UK leads to a stage migration of prostate cancer.** *BJU Int* 2009, **104**(11):1592-1598.
3. Tenke P, Horti J, Balint P, Kovacs B: **Prostate cancer screening.** *Recent Results Cancer Res* 2007, **175**:65-81.
4. Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F: **EAU guidelines on prostate cancer.** *Eur Urol* 2008, **53**(1):68-80.
5. Bill-Axelson A, Holmberg L, Ruutu M, Haggman M, Andersson SO, Bratell S, Spangberg A, Busch C, Nordling S, Garmo H *et al*: **Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer.** *N Engl J Med* 2005, **352**(19):1977-1984.
6. Galvin DJ, Eastham JA: **Critical appraisal of outcomes following open radical prostatectomy.** *Curr Opin Urol* 2009, **19**(3):297-302.
7. Walsh PC, Lepor H, Eggleston JC: **Radical prostatectomy with preservation of sexual function: anatomical and pathological considerations.** *Prostate* 1983, **4**(5):473-485.
8. Burnett AL: **Rationale for cavernous nerve restorative therapy to preserve erectile function after radical prostatectomy.** *Urology* 2003, **61**(3):491-497.
9. Davison BJ, So AI, Goldenberg SL: **Quality of life, sexual function and decisional regret at 1 year after surgical treatment for localized prostate cancer.** *BJU Int* 2007, **100**(4):780-785.
10. Meyer JP, Gillatt DA, Lockyer R, Macdonagh R: **The effect of erectile dysfunction on the quality of life of men after radical prostatectomy.** *BJU Int* 2003, **92**(9):929-931.
11. Bochinski D, Lin GT, Nunes L, Carrion R, Rahman N, Lin CS, Lue TF: **The effect of neural embryonic stem cell therapy in a rat model of cavernosal nerve injury.** *BJU Int* 2004, **94**(6):904-909.

12. Graziottin TM, Resplande J, Nunes L, Rogers R, Gholami S, Lue T: **Long-term survival of autotransplanted major pelvic ganglion in the corpus cavernosum of adult rats.** *J Urol* 2002, **168**(1):362-366.
13. Fandel TM, Bella AJ, Tantiwongse K, Garcia M, Nunes L, Thuroff JW, Tanagho EA, Pohl J, Lue TF: **The effect of intracavernosal growth differentiation factor-5 therapy in a rat model of cavernosal nerve injury.** *BJU Int* 2006, **98**(3):632-636.
14. Muller A, Tal R, Donohue JF, Akin-Olugbade Y, Kobylarz K, Paduch D, Cutter SC, Mehrara BJ, Scardino PT, Mulhall JP: **The effect of hyperbaric oxygen therapy on erectile function recovery in a rat cavernous nerve injury model.** *J Sex Med* 2008, **5**(3):562-570.
15. Rodbell M: **Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis.** *J Biol Chem* 1964, **239**:375-380.
16. Bjorntorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson P, Sjostrom L, Smith U: **Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes.** *J Lipid Res* 1978, **19**(3):316-324.
17. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** *Tissue Eng* 2001, **7**(2):211-228.
18. Tholpady SS, Katz AJ, Ogle RC: **Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro.** *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003, **272**(1):398-402.
19. Lin G, Banie L, Ning H, Bella AJ, Lin CS, Lue TF: **Potential of adipose-derived stem cells for treatment of erectile dysfunction.** *J Sex Med* 2009, **6 Suppl 3**:320-327.
20. Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, Ferber I, Lebkowski J, Martin T, Madrenas J *et al*: **Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties.** *Stem Cells* 2004, **22**(4):448-456.
21. Griffin MD, Ritter T, Mahon BP: **Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies.** *Hum Gene Ther* 2010, **21**(12):1641-1655.

22. Ankrum J, Karp JM: **Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back.** *Trends Mol Med* 2010, **16**(5):203-209.
23. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ: **Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6.** *Cell Stem Cell* 2009, **5**(1):54-63.
24. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG: **Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(26):11002-11007.
25. Pinzani M: **Welcome to fibrogenesis & tissue repair.** *Fibrogenesis Tissue Repair* 2008, **1**(1):1.
26. Garcia MM, Fandel TM, Lin G, Shindel AW, Banie L, Lin CS, Lue TF: **Treatment of erectile dysfunction in the obese type 2 diabetic ZDF rat with adipose tissue-derived stem cells.** *J Sex Med* 2010, **7**(1 Pt 1):89-98.
27. Huang YC, Ning H, Shindel AW, Fandel TM, Lin G, Harraz AM, Lue TF, Lin CS: **The effect of intracavernous injection of adipose tissue-derived stem cells on hyperlipidemia-associated erectile dysfunction in a rat model.** *J Sex Med* 2010, **7**(4 Pt 1):1391-1400.
28. Albersen M, Fandel TM, Lin G, Wang G, Banie L, Lin CS, Lue TF: **Injections of Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Stem Cell Lysate Improve Recovery of Erectile Function in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury.** *J Sex Med* 2010.
29. Mullerad M, Donohue JF, Li PS, Scardino PT, Mulhall JP: **Functional sequelae of cavernous nerve injury in the rat: is there model dependency.** *J Sex Med* 2006, **3**(1):77-83.
30. Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, Stanco D, Brini AT: **Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models.** *Cell Tissue Res* 2009, **338**(3):401-411.

31. Hausman DB, Park HJ, Hausman GJ: **Isolation and Culture of Preadipocytes from Rodent White Adipose Tissue.** In: *Adipose Tissue Protocols*. Edited by Yang K, vol. 456: Humana Press; 2008: 201-219.
32. Gimble J, Guilak F: **Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential.** *Cytotherapy* 2003, **5**(5):362-369.
33. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E: **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** *Cytotherapy* 2006, **8**(4):315-317.
34. Pastor-Navarro T, Beamud-Cortes M, Fornas-Buil E, Moratalla-Charcos LM, Osca-Garcia JM, Gil-Salom M: **[Stem cells and regenerative medicine in urology, part 2: urothelium, urinary bladder, urethra and prostate].** *Actas Urol Esp* 2010, **34**(7):592-597.
35. Shokeir AA, Harraz AM, El-Din AB: **Tissue engineering and stem cells: basic principles and applications in urology.** *Int J Urol* 2010, **17**(12):964-973.
36. Lin CS, Xin ZC, Wang Z, Deng C, Huang YC, Lin G, Lue TF: **Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction: A Critical Review.** *Stem Cells Dev* 2011.
37. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N *et al*: **Mesenchymal stem cells are renoprotic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure.** *J Am Soc Nephrol* 2004, **15**(7):1794-1804.
38. Duffield JS, Bonventre JV: **Kidney tubular epithelium is restored without replacement with bone marrow-derived cells during repair after ischemic injury.** *Kidney Int* 2005, **68**(5):1956-1961.
39. Ninichuk V, Gross O, Segerer S, Hoffmann R, Radomska E, Buchstaller A, Huss R, Akis N, Schlondorff D, Anders HJ: **Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice.** *Kidney Int* 2006, **70**(1):121-129.

40. Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, Adin C, Ellison GW, Jorgensen M, Batich CD: **Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(11):2338-2347.
41. Kanematsu A, Yamamoto S, Noguchi T, Ozeki M, Tabata Y, Ogawa O: **Bladder regeneration by bladder acellular matrix combined with sustained release of exogenous growth factor.** *J Urol* 2003, **170**(4 Pt 2):1633-1638.
42. Drewa T, Adamowicz J, Lysik J, Polaczek J, Pielichowski J: **Chitosan scaffold enhances nerve regeneration within the in vitro reconstructed bladder wall: an animal study.** *Urol Int* 2008, **81**(3):330-334.
43. Frimberger D, Morales N, Gearhart JD, Gearhart JP, Lakshmanan Y: **Human embryoid body-derived stem cells in tissue engineering-enhanced migration in co-culture with bladder smooth muscle and urothelium.** *Urology* 2006, **67**(6):1298-1303.
44. Cannon TW, Sweeney DD, Conway DA, Kamo I, Yoshimura N, Sacks M, Chancellor MB: **A tissue-engineered suburethral sling in an animal model of stress urinary incontinence.** *BJU Int* 2005, **96**(4):664-669.
45. Mitterberger M, Marksteiner R, Margreiter E, Pinggera GM, Colleselli D, Frauscher F, Ulmer H, Fussenegger M, Bartsch G, Strasser H: **Autologous myoblasts and fibroblasts for female stress incontinence: a 1-year follow-up in 123 patients.** *BJU Int* 2007, **100**(5):1081-1085.
46. Carr LK, Steele D, Steele S, Wagner D, Pruchnic R, Jankowski R, Erickson J, Huard J, Chancellor MB: **1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence.** *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2008, **19**(6):881-883.
47. Bochinski DJ, Dean RC, Lue TF: **Erectile dysfunction and priapism.** *Nat Clin Pract Urol* 2004, **1**(1):49-53; quiz 41 p following 53.
48. Bivalacqua TJ, Deng W, Kendirci M, Usta MF, Robinson C, Taylor BK, Murthy SN, Champion HC, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ: **Mesenchymal stem cells alone or ex vivo gene modified with endothelial nitric oxide synthase**

- reverse age-associated erectile dysfunction.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, **292**(3):H1278-1290.
49. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A: **Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells.** *Circulation* 2004, **110**(3):349-355.
  50. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M *et al*: **Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives.** *Circulation* 2004, **109**(5):656-663.
  51. Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P: **Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **330**(1):142-150.
  52. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS: **Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **328**(1):258-264.
  53. 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* 2002, **13**(12):4279-4295.
  54. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE: **Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **294**(2):371-379.
  55. Zimmerlin L, Donnerberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Peault B, Rubin JP, Donnerberg AD: **Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue.** *Cytometry A* 2010, **77**(1):22-30.
  56. Qiu X, Lin H, Wang Y, Yu W, Chen Y, Wang R, Dai Y: **Intracavernous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells restores erectile function of streptozocin-induced diabetic rats.** *J Sex Med* 2011, **8**(2):427-436.
  57. Kendirci M, Trost L, Bakondi B, Whitney MJ, Hellstrom WJ, Spees JL: **Transplantation of nonhematopoietic adult bone marrow stem/progenitor**

- cells isolated by p75 nerve growth factor receptor into the penis rescues erectile function in a rat model of cavernous nerve injury. *J Urol* 2010, **184**(4):1560-1566.
58. Lin G, Albersen M, Harraz AM, Fandel TM, Garcia M, McGrath MH, Konety BR, Lue TF, Lin CS: **Cavernous nerve repair with allogenic adipose matrix and autologous adipose-derived stem cells.** *Urology* 2011, **77**(6):1509 e1501-1508.
  59. Lin CS: **Advances in stem cell therapy for the lower urinary tract.** *World J Stem Cells* 2010, **2**(1):1-4.
  60. Walsh S, Midha R: **Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair.** *Neurosurg Focus* 2009, **26**(2):E2.
  61. Lin G, Qiu X, Fandel T, Banie L, Wang G, Lue TF, Lin CS: **Tracking intracavernously injected adipose-derived stem cells to bone marrow.** *Int J Impot Res* 2011.
  62. Fandel TM, Albersen M, Lin G, Qiu X, Ning H, Banie L, Lue TF, Lin CS: **Recruitment of Intracavernously Injected Adipose-Derived Stem Cells to the Major Pelvic Ganglion Improves Erectile Function in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury.** *Eur Urol* 2011.
  63. Huang Y-C, Shindel AW, Ning H, Lin G, Harraz AM, Wang G, Garcia M, Lue TF, Lin C-S: **Adipose Derived Stem Cells Ameliorate Hyperlipidemia Associated Detrusor Overactivity in a Rat Model.** *The Journal of Urology* 2010, **183**(3):1232-1240.

