



T. C.

AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL KOLON ANASTOMOZU  
MODELİNDE ADİPOZ DOKU MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRE VE SİLDENAFİL SİTRAT  
UYGULAMASININ ETKİLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. MURAT DEMİR

DANIŞMAN

Doç. Dr. Eyüp Murat YILMAZ

**AYDIN-2019**

T. C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL KOLON ANASTOMOZU  
MODELİNDE ADİPOZ DOKU MEZENKİMAL  
KÖK HÜCRE VE SİLDENAFİL SİTRAT  
UYGULAMASININ ETKİLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ  
DR. MURAT DEMİR

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Eyüp Murat YILMAZ

**AYDIN-2019**

Bu araştırma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-18022 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her türlü cerrahi bilgi ve deneyime sahip olmamı sağlayan, büyük katkı ve emekleri olan başta tez danışmanı hocam Doç. Dr. Eyüp Murat YILMAZ'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Ender DEMİRKİRAN'a, Prof. Dr. Mehmet Hakan ÇEVİKEL'e, Prof. Dr. Hedef ÖZGÜN'e, Prof. Dr. Pars TUNÇYÜREK'e, Doç. Dr. Aykut SOYDER'e, Dr. Öğr. Üy. Erdem Barış CARTI'ya, Dr. Öğr. Üy. Mustafa Gökhan ÜNSAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin tamamlanmasında desteğini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e, histopatolojik çalışmalarda emeği geçen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. İbrahim Halil ERDOĞDU'ya, Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Arş. Gör. Dr. Emrah İPEK'e teşekkür ederim. Ayrıca ihtisas eğitimi sürecinde birlikte güzel vakit geçirdiğim tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştiren, bugünlere gelmemde büyük katkıları olan anneme, babama ve kardeşim Dr. Suat DEMİR'e sevgi ve saygılarımı sunarım.

Tanıştığımız günden bugüne, özellikle bu zorlu asistanlık sürecimde bir an olsun desteğini esirgemeyen, her türlü fedakârlığı ve özveriyi gösteren sevgili eşim Gül DEMİR'e ve hayatıma anlam katan canım kızım Melisa'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımla...

Dr. Murat DEMİR

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	II
İÇİNDEKİLER .....	III
TABLO DİZİNİ .....	VII
ŞEKİL DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	X
RESİMLER DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kolon Anatomisi.....	3
2.2. Kolon Histolojisi.....	6
2.3. Anastomoz Teknikleri.....	7
2.4. Yara İyileşmesi .....	7
2.4.1. Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi .....	9
2.4.2. Anastomoz İyileşmesini Etkileyen Faktörler.....	10
2.4.2.1. Lokal Faktörler.....	10
2.4.2.2. Sistemik Faktörler.....	11
2.4.3. Anastomoz İyileşmesinin Değerlendirilmesi.....	12
2.4.3.1. Mekanik Değerlendirme Yöntemleri .....	12
2.4.3.2. Biyokimyasal Yöntemler .....	12
2.4.3.3. Histopatolojik Yöntemler.....	13
2.5. Kök Hücre .....	13
2.5.1. Mezenkimal Kök Hücreler.....	13
2.5.2. Kök Hücre Kaynağı Olarak Adipoz Doku.....	14
2.5.3. Kök Hücrelerin Dokularda Takibi .....	14

2.6. Sildenafil Sitrat .....	15
2.6.1. Tanımı ve Tarihçesi .....	15
2.6.2. Etki Mekanizması .....	15
2.6.3. Kullanım Alanları .....	15
2.6.4. Yan Etkileri .....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	17
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı .....	17
3.2. Cerrahi İşlem Öncesi Hazırlık .....	18
3.3. Cerrahi İşlem .....	18
3.4. Adipoz Doku Temini .....	22
3.5. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması .....	22
3.5.1. Kök Hücrelerde Yüzey Antijenlerinin Saptanması .....	26
3.5.2. Kök Hücrelerin İşaretlenmesi .....	26
3.6. Anastomozun Değerlendirilmesi (Fiziksel, Histopatolojik, Biyokimyasal) .....	27
3.6.1. Fiziksel Değerlendirme Yöntemleri .....	27
3.6.1.1. Anastomoz Patlama Basıncı Ölçümü .....	27
3.6.1.2. Karın İçi Yapışıklıkların Değerlendirilmesi .....	28
3.6.2. Anastomozda Biyokimyasal Parametreler .....	29
3.6.2.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması .....	29
3.6.2.2. Doku Örneklerinde Hidroksiprolin Ölçüm Yöntemi .....	29
3.6.2.3. Doku Örneklerinde Miyeloperoksidaz Ölçüm Yöntemi .....	30
3.6.2.4. Doku Örneklerinde Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemi .....	31
3.6.2.5. Doku Örneklerinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Ölçüm Yöntemi .....	32
3.6.2.6. Doku Örneklerinde Tümör Nekrosis Faktör- $\alpha$ Ölçüm Yöntemi .....	34
3.6.3. Histopatolojik Değerlendirme .....	35
3.6.3.1. Anastomoz Hattında Granülasyon Dokusu Kalınlığının Ölçülmesi .....	35

3.6.3.2. Anastomoz Hattında Makrofaj Yoğunluğunun Belirlenmesi .....	35
3.6.3.3. Anastomoz Hattında Yara Dudakları Arasındaki Mesafenin Ölçülmesi .....	36
3.7. DiI ile İşaretlenmiş Kök Hücrelerin Tespiti.....	36
3.8. İstatistiksel Yöntem .....	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Fiziksel Değerlendirme Bulguları.....	38
4.1.1. Anastomoz Patlama Basıncı Ölçüm Sonuçları .....	38
4.1.2. Karın İçi Yapışıklıklar .....	39
4.2. Biyokimyasal Parametreler .....	40
4.2.1. Dokuda Hidroksiprolin Düzeyi.....	40
4.2.2. Dokuda Nitrik Oksit Düzeyi .....	41
4.2.3. Dokuda Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Düzeyi.....	42
4.2.4. Dokuda Miyeloperoksidaz Düzeyi .....	42
4.2.5. Dokuda Tümör Nekrosis Faktör- $\alpha$ Düzeyi .....	43
4.3. DiI ile İşaretlenmiş Kök Hücrelerin Görüntülenmesi.....	44
4.4. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları.....	44
4.4.1. Reepitelizasyon .....	45
4.4.2. Nekroz Miktarı.....	46
4.4.3. Polimorfonükleer Lökosit İnfiltrasyonu .....	47
4.4.4. Makrofaj Yoğunluğu.....	47
4.4.5. Yara Dudakları Arasındaki Mesafe .....	49
4.4.6. Granülasyon Dokusu Kalınlığı .....	50
5. TARTIŞMA .....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
ÖZET .....	59
SUMMARY .....	61



## TABLO DİZİNİ

- Tablo 2.1. Anastomoz iyileşmesini olumsuz etkileyen faktörler
- Tablo 3.1. Houston ve ark'nın laparotomi sonrası yapışıklık derecelendirmesi
- Tablo 4.1. Anastomoz patlama basınçları (mmHg)
- Tablo 4.2. Anastomoz patlama basınçları ölçüm sonuçları değerlendirilmesi
- Tablo 4.3. Anastomoz kaçağı dağılımı.
- Tablo 4.4. Karın içi yapışıklık düzeyleri
- Tablo 4.5. Hidroksiprolin (HYP) düzeyleri ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  yaş doku)
- Tablo 4.6. Doku hidroksiprolin (HYP) düzeylerinin değerlendirilmesi
- Tablo 4.7. Nitrik oksit (NO) düzeyleri ( $\mu\text{M}/\text{g}$  yaş doku)
- Tablo 4.8. Doku nitrik oksit (NO) düzeylerinin değerlendirilmesi
- Tablo 4.9. Miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri (U/g yaş doku)
- Tablo 4.10. Doku mieloperoksidaz (MPO) düzeylerinin değerlendirilmesi
- Tablo 4.11. Tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) düzeyleri (pg/g yaş doku)
- Tablo 4.12. Doku tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) düzeylerinin değerlendirilmesi
- Tablo 4.13. Anastomoz hattında izlenen reepitelizasyon düzeyleri
- Tablo 4.14. Alınan örneklerde izlenen nekrotik doku düzeyleri
- Tablo 4.15. Alınan örneklerde izlenen PMNL infiltrasyon düzeyleri
- Tablo 4.16. Makrofaj sayıları
- Tablo 4.17. Makrofaj sayılarının değerlendirilmesi
- Tablo 4.18. Yara dudakları arasındaki mesafe ( $\mu\text{m}$ )
- Tablo 4.19. Yara dudakları arasındaki mesafenin değerlendirilmesi
- Tablo 4.20. Granülasyon dokusu kalınlığı ( $\mu\text{m}$ )



Tablo 4.21. Granülasyon dokusu kalınlıklarının değerlendirilmesi



## ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 2.1. Kolon anatomisi
- Şekil 2.2. Kolonun arteryel beslenmesi
- Şekil 2.3. Ratlarda intestinal sistem anatomisi
- Şekil 2.4. Kolonun histolojik katmanları



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü
BSA	: Bovine serum albumin
CFSE	: Karboksifloreseindiasetat süksinimidil ester
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
DiI	: 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DPBS	: Dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	: Ethylene daimin tetra acetic acid
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
GFP	: Yeşil flöresan proteini
H-E	: Hematoksilen-Eozin
HYP	: Hidroksiprolin
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin-6
ILAR	: Institue of Laboratory Animal Resources
İMA	: İnterior mezenterik arter
İMV	: İnterior mezenterik ven
MMP	: Matriks metallo proteinaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
NO	: Nitrik oksit
NSAİİ	: Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar

PBS	: Phosphate-buffered saline
PDE5	: Fosfodiesteraz 5
PDGF	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PE	: Phycoerythrin
PGE2	: Prostaglandin E-2
PGI2	: Prostaglandin I-2
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
PMSF	: Phenyl methane sulphonyl fluoride
SMA	: Süperior mezenterik arter
SMV	: Süperior mezenterik ven
TGF- $\beta$	: Transforme edici büyüme faktörü
TMB	: 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine
TNF- $\alpha$	: Tümör nekrosis faktör- $\alpha$
TNF- $\beta$	: Tümör nekrosis faktör- $\beta$
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VSF	: Vasküler stromal fraksiyon

## RESİMLER DİZİNİ

- Resim 3.1. Ratlara oral gavaj yöntemiyle sildenafil sitrat verilmesi
- Resim 3.2. Ameliyat edilecek ratın anestezi sonrası tıraş edilmiş ve masaya tespitlenmiş hali
- Resim 3.3. İnen kolon (penset ile gösterilen)
- Resim 3.4. Kolon anastomozunun tamamlanmış hali
- Resim 3.5. Kök hücre enjeksiyonu
- Resim 3.6. Yağ dokusuna kollajenaz I enzimi eklendikten ve 2 saat su banyosunda enkübe edildikten sonra dokuların erimiş hali
- Resim 3.7. Kollejenazda erimiş hücrelerin hücre süzgecinden süzülmesi
- Resim 3.8. Çözünmüş yağ dokusunun görüntüsü
- Resim 3.9. İlk resimde dipte yoğun eritrosit bulunmakta olup, bu fraksiyon yıkandıkça ikinci şekilde olduğu gibi eritrositlerinden ayrılmaktadır
- Resim 3.10. Ratadipoz doku kök hücresi (3. pasaj) (x4)
- Resim 3.11. Kök hücrelerin DiI ile boyanması
- Resim 3.12. Anastomoz patlama basıncı ölçümü
- Resim 3.13. Patlama basıncı ölçümü sırasında oluşan basınç-zaman grafiği
- Resim 3.14. Doku örneklerinin homojenizasyonu
- Resim 3.15. Hidroksiprolinin kolorimetrik ölçümü
- Resim 3.16. Küvetlerdeki rengin şiddeti örnekteki MPO konsantrasyonu ile ilişkilidir
- Resim 3.17. Örneklerdeki NO konsantrasyonu rengin şiddeti ile korelasyon göstermektedir
- Resim 3.18. VEGF Standart grafiği
- Resim 3.19. VEGF için örneklere substrat çözeltisi konduğunda
- Resim 3.20. VEGF ölçümü için örneklere stop solüsyon konmuş hali, okunmaya hazır halde
- Resim 3.21. ELISA Mikroplak Okuyucu

Resim 4.1. DiI ile boyanmış kök hücreler

Resim 4.2. Hematoksilen-Eozin ile boyanmış preparatlar

Resim 4.3. Iba-1 primer antikoru ile boyanmış preparatlar



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gastrointestinal cerrahide barsak anastomozları büyük önem taşımaktadır. Özellikle malignite nedeniyle yapılan operasyonlar başta olmak üzere perforasyon, iskemi, obstrüksiyon, enfektif durumlar gibi nedenlerle acil veya elektif olarak yapılan cerrahilerde barsak anastomozu yapılması gerekebilmektedir. Elektif olarak yapılan cerrahilerde acil cerrahilere göre anastomoz kaçak oranı ve diğer postoperatif komplikasyon oranı daha düşüktür. (1) Vasküler yapısı ve zengin bakteri florası nedeniyle anastomoz kaçığına en yatkın barsak bölümü kolondur. (2-3) Barsak anastomozu gastrointestinal cerrahide temel işlemlerden biri olmasına ve uzun yıllardır yapılmasına rağmen kolorektal anastomozlarda kaçak oranı %1-19'dur ve bu kaçakların önemli bir kısmı rektum kanseri nedeniyle yapılan kolorektal cerrahilerde olmaktadır. (4) Anastomozu yapan cerrahlar arasında da önemli farklılıklar mevcut olup tecrübeli cerrahlar tarafından elektif koşullarda yapılan kolorektal anastomozlarda bu oran %1-6'ya kadar düşmektedir. (5) Barsak anastomozu yapılan hastalarda postoperatif süreci yakın takip etmek, olası anastomoz kaçıklarına erken zamanda müdahale etmek, mortalite ve morbiditeyi azaltıyor olsa da anastomoz kaçığı sonrası yapılan cerrahi ve medikal müdahalelere rağmen mortalite oranı %25-50'dir. (6) Bu ciddi sonuçları nedeniyle anastomoz kaçıklarının azaltılması için birçok çalışma yapılmış ve halen yapılmaktadır. (7)

Anastomoz iyileşme sürecine etki eden çeşitli faktörler vardır. Bunlar; uygulanan cerrahi teknik, kullanılan sütür materyali, anastomoz yapılan bölgenin kanlanması ve doku oksijenizasyonu, mekanik barsak hazırlığı, radyoterapi, yandaş hastalıklar, ilaç ve antibiyotik kullanımı, beslenme, yaş, geçirilmiş major cerrahi, peritonit gibi lokal enfeksiyon varlığı şeklinde sıralanabilir. (8-9) Özellikle kolon anastomozlarında yara iyileşmesini sağlayan primer etken doku vaskülarizasyonu ve oksijenizasyonudur. (10)

Son yıllarda diğer alanlarda ve farklı dokularda yara iyileşmesine katkısı araştırılan kök hücre tedavisinin kolon anastomozu üzerinde de etkilerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. (11-12) Mezenkimal kök hücreler multipotent olup, yağ, kıkırdak, kemik, kas ve deri hücrelerine, bağ dokuya in vitro ve in vivo olarak dönüşebilme, kendini yenileyebilme ve çoklu kez bölünerek çoğalabilme yeteneklerine sahiptirler. (13) Daha çok kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen kök hücreler, buldukları dokuda anjiogenezi arttırarak, kan akımını ve oksijenizasyonu arttırmakta, kollojen ve fibroblast miktarını da arttırarak yara iyileşmesine katkı sağlamaktadır. (12)

Yara iyileşmesine katkısı araştırılan bir diğer tedavi seçeneği de sildenafil sitrattır. Fosfodiesteraz 5 inhibitörü olan sildenafil sitrat siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki göstererek nitrik oksit (NO) salınımını arttırarak düz kasların gevşemesini sağlamaktadır. Sildenafil sitrat ilk olarak pulmoner hipertansiyon tedavisi için geliştirilen bir ilaç olsa da vazodilatatör etkisi nedeniyle günümüzde daha çok erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılmaktadır. (14) Sildenafil sitratın, lipid peroksidasyonu, sitokin üretimi, sitokin salınımı ve nötrofil birikiminin önlenmesi gibi faydalı etkilerinin olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur. (15) İntestinal sistemde de NO etkisinin artışı ile ileumda lökosit infiltrasyonunu azalttığı ve oksidatif hasarı iyileştirdiği gösterilmiştir. (16)

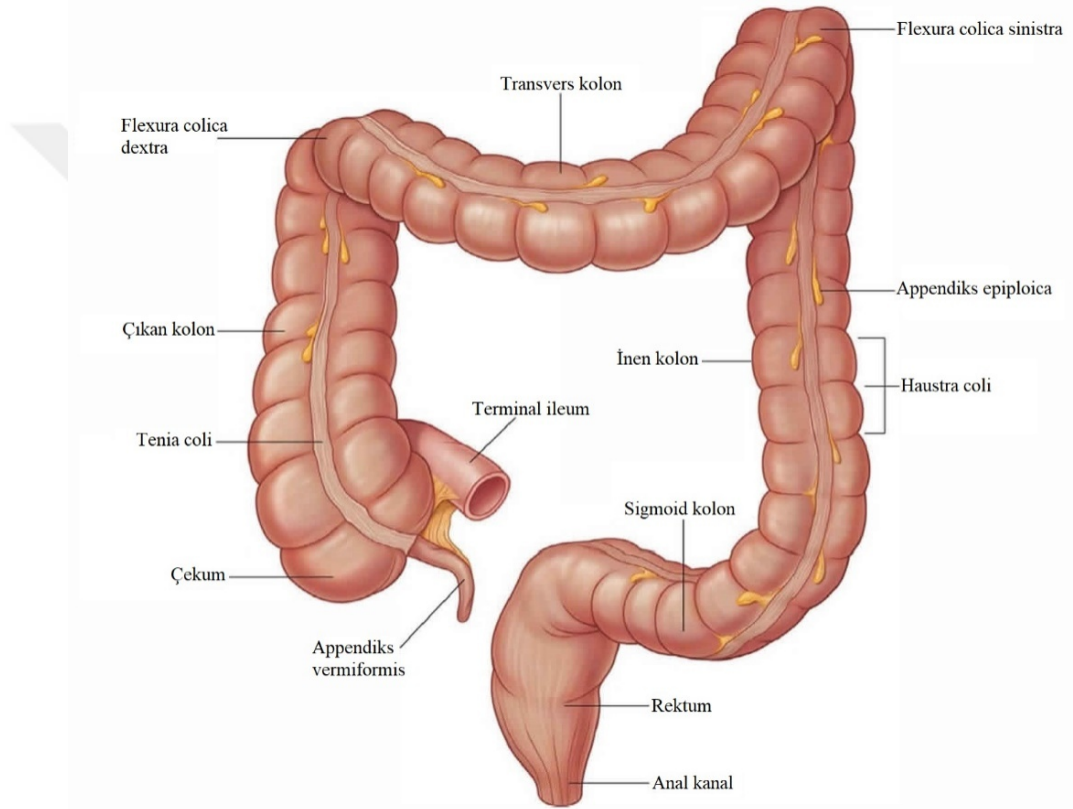
Bu çalışmanın amacı; ratlarda deneysel olarak oluşturulan kolon anastomozlarında, adipoz dokudan elde edilen kök hücrenin yara iyileştirici etkilerinin, sildenafil sitrat maddesinin etkileri ile karşılaştırılması ve her iki yöntemin de kolon anastomozlarındaki kaçak riskini azaltıp azaltmadığının araştırılmasıdır. Çalışma sonucunda kök hücre ve/veya sildenafil sitratın kolon anastomozu iyileşmesi üzerinde pozitif katkıları gözlemlenirse gastrointestinal cerrahilerde bu tedavi yöntemleri kullanılarak anastomoz kaçakları ve istenmeyen sonuçları azaltılabilecektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kolon Anatomisi

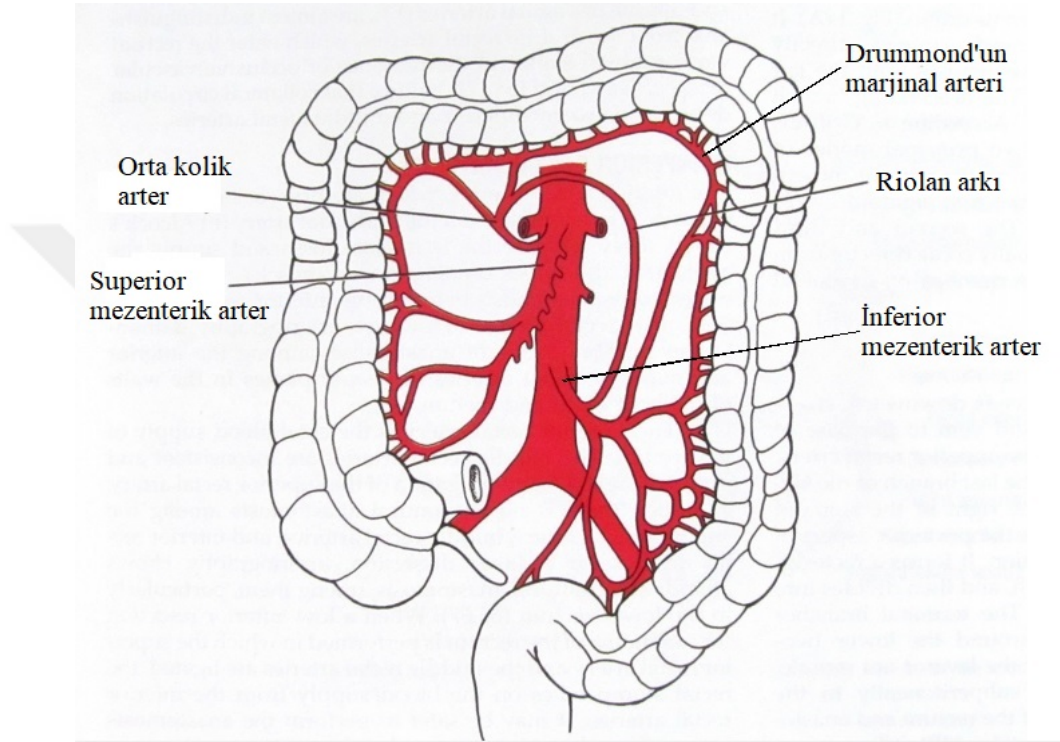
İnce barsakların bitiminden anüse kadar uzanan kısım kolondur. Yetişkin bir insanda ortalama kolon uzunluğu 120-200 cm'dir. Gastrointestinal sistemin yaklaşık %20'lik kısmını oluşturmaktadır. Makroskopik olarak ince barsaklardan haustra coli, appendiks epiploica, ve longitudinal kas liflerinin oluşturduğu tenia coli'ler ile ayrılmaktadır. Bölümleri sırasıyla; çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdur. (17) (Şekil 2.1)



Şekil 2.1. Kolon anatomisi

Terminal ileumun ileoçekal valv ile bağlandığı çekum kolonun ilk parçasıdır. Aynı zamanda kolonun 6-8 cm çapla en geniş kısmını oluşturmaktadır. Uzunluğu ortalama 6 cm civarındadır. İnfiriorunda kör uçla sonlanan appendiks vermiformis bulunmaktadır. İleoçekal valvin hemen superiorundan itibaren kolon çıkan kolon ismini alır ve hepatik fleksura da denilen fleksura kolika dextraya kadar devam eder. Çıkan kolonun uzunluğu 15-20 cm arasındadır. Hepatik fleksuradan splenik fleksuraya (fleksura kolika sinistra) kadar devam eden, kolonun 35-50 cm ile en uzun ve en mobil kısmı transvers kolon olarak adlandırılır. Fleksura

kolika sinistradan inferiora doğru devam eden yaklaşık 20-30 cm uzunlukta olan inen kolon pelvis girimine yakın “S” harfi şeklinde kıvrım yaparak sigmoid kolonu oluşturur. Sigmoid kolon inen kolon hemen distalinden başlayarak üçüncü sakral vertebra hizasına kadar yaklaşık 40 cm uzunluğundadır. Rektum üçüncü sakral vertebra hizasından başlayıp anal kanala kadar uzanır, ortalama uzunluğu 12-15 cm’dir. Rektumda haustralar, epiplöik çıkıntılar ve tenia bulunmamaktadır. Sadece proksimal kısmı periton ile örtülüdür.(18-19)



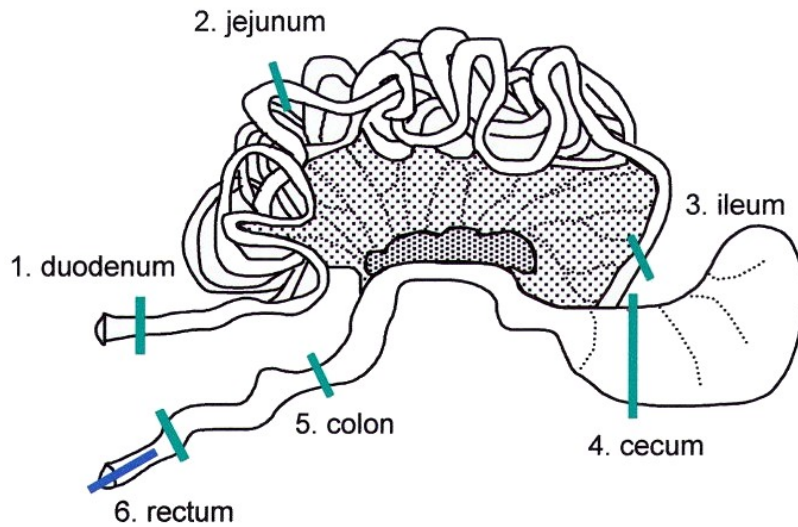
Şekil 2.2. Kolonun arteriyel beslenmesi

Kolonun arteriyel beslenmesi süperior mezenterik arter (SMA) ve inferior mezenterik arter (İMA) tarafından sağlanmaktadır. Kolonun splenik fleksuraya kadar olan proksimal kısmı SMA tarafından, splenik fleksuradan itibaren distal kısmı İMA tarafından kanlanması sağlanır. Çekum SMA'nın dalı olan ileokolik arterden, appendiks apendiküler arterden, çıkan kolon ve SMA'nın dalı olan sağ kolik arterden beslenir. Transvers kolonun kanlanması ise yine SMA'nın dalı olan orta kolik arter tarafından sağlanmaktadır. Splenik fleksuranın distalinden itibaren de inen kolon İMA'nın dalı olan sol kolik arter tarafından, sigmoid kolon, sigmoidal arter tarafından, rektum 1/3 proksimali de İMA'nın dalı olan süperior rektal arter tarafından kanlanmaktadır. Rektumun distal 2/3'ünü oluşturan kısmı ile anal kanalın arteriyel kanlanması SMA ve İMA'dan farklı olarak internal iliak arterin dalı olan orta rektal arter, pudental arterin

dalı olan inferior rektal arter ve aorta bifurkasyon düzeyinden çıkan orta sakral arter tarafından sağlanmaktadır. Sol kolik arter %14 oranında splenik fleksura düzeyinde Drummond'un marjinal arteri ile birleşmektedir. Drummond'un marjinal arteri kolonun mezenterik sınırı boyunca, kolona paralel olarak, kolondan 1-8 cm mesafede takip eden kollaterallerden oluşmaktadır. Ayrıca İMA'nın dalı sol kolik arter ile SMA'nın dalı orta kolik arter arasında mezenterik köke yakın %7 oranında Riolan arkı ile bağlantı mevcuttur. (20) (Şekil 2.2)

Kolonun venleri de yine arteriyel dallara paralel seyrederek benzer isimleri almaktadır. İnferior mezenterik ven (İMV) splenik vene boşalır, Ardından süperior mezenterik ven (SMV) ile birleşerek vena portayı oluşturur. (21) Rektum proksimal kısmı venöz dönüşü süperior rektal ven aracılığıyla İMV'ye, diğer kısımlar rektum distali ve anal kanal venöz dönüşü ise orta rektal ven ve distal rektal ven aracılığıyla internal iliak vene olmaktadır. (22)

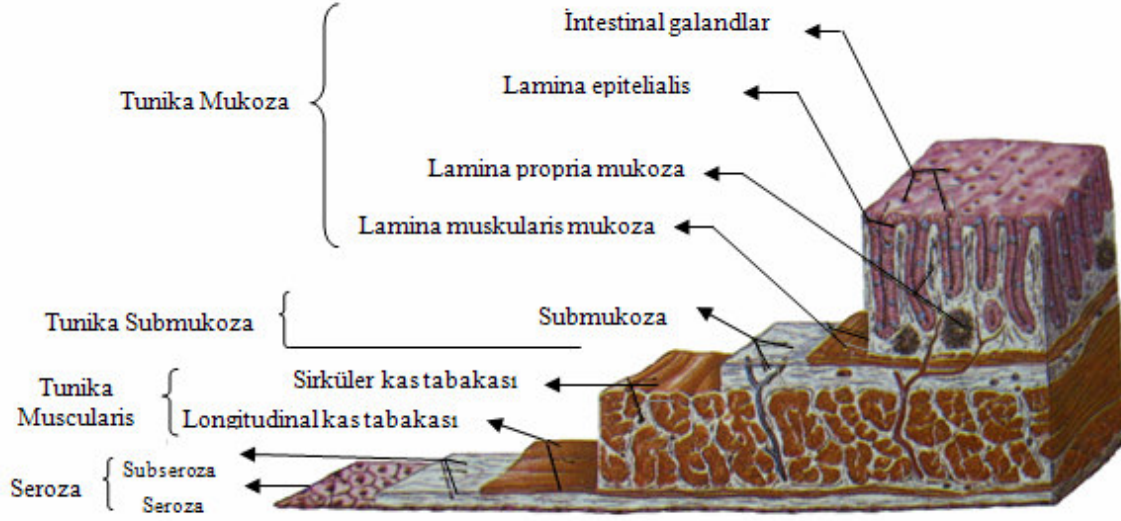
**Ratlarda kolon anatomisi:** Ratlarda ince barsaklardan sonra büyük bir çekum bulunmaktadır. Çekumun ardından kolon ve rektum gelmektedir. Kolon; çıkan kolon, transvers kolon ve inen kolon olmak üzere üç bölümden oluşur. Mukozal katlantılar çıkan kolonda oblik, transvers kolon ve inen kolonda longitudinal uzanım göstermektedir. Kolonun distalinde pelvik kanal içine yerleşmiş olan rektum bulunmaktadır. (23) (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. Ratlarda intestinal sistem anatomisi

## 2.2. Kolon Histolojisi

Histopatolojik olarak kolon içten dışa doğru tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza tabakalarından oluşmaktadır. (Şekil 2.4)



Şekil 2.4. Kolonun histolojik katmanları

Tunika mukoza intestinal glandlar, lamina epitelialis, lamina propria ve lamina muskularis'ten oluşmaktadır. Yüzey basit kolumnar ve kuboidal epitel ile örtülüdür. Epitelyal hücreler arasında T lenfositler bulunmaktadır. Lamina propria tabakasında ise fibroblastlar, damar ve sinirler, düz kas hücreleri ve inflamatuvar hücreler (lenfositler, plazma hücreleri, mast hücreleri, eozinofil ve histiyositler) bulunmaktadır.

Tunika submukozada kolonun hareketinde önemi olan Mesisner pleksusu ve derin submukozal pleksus bulunmaktadır. Ayrıca arterioller, venüller ve lenfatik kanallar da mevcuttur.

Tunika muskularis ise içte sirküler, dışta longitudinal kas lifleri ve Auerbach pleksusundan oluşmaktadır.

Tunika seroza visseral peritondur, kolonun retroperitoneal olan kısımlarında bulunmaz.

(24)

### 2.3. Anastomoz Teknikleri

Barsak yaralanmalarında, pasaj sorunu olduğunda veya rezeksiyon gerektiğinde, lümenin bütünlüğünü ve pasajın devamlılığını çeşitli materyaller kullanılarak farklı yöntemlerde yapılan anastomozlarla sağlamak mümkündür. Barsak anastomozları; uç uca, uç-yan ve yan yana; izoperistaltik, unizoperistaltik olarak yapılabilmektedir. El ile veya stappler ile anastomoz yapılması mümkündür. El ile yapılan anastomozlarda tek kat veya çift kat sütür atılarak anastomoz yapılabilir. Çift kat anastomoz tekniği tek kat anastomoz tekniğinden daha önce uygulanmaya başlanmıştır. İlk zamanlarda anastomoz güvenliği için çift kat ön planda tutulmuş olmasına rağmen, yapılan bazı çalışmalarda tek kat anastomozlara göre çift kat anastomozlarda iskemik mukozal dökülmelerin ve nekroz alanlarının daha fazla olduğu gösterilmiştir. (25) Ayrıca tek kat anastomoz tekniğinin çift kat anastomozla göre daha hızlı uygulanabilmesi, barsak lümeninde daha az daralmaya sebep olması, mukozal kanlanmayı daha az etkilemesi nedeniyle yara iyileşmesinin daha hızlı olacağı yönünde yayınlanmış çalışmalar bulunmaktadır. (26-29)

### 2.4. Yara İyileşmesi

Yara, canlı dokunun yapısal bütünlüğü ve işlevsel özelliklerinin kaybı olarak tanımlanabilir. Yara iyileşmesi ise yara oluşumunu takiben yerine yeni doku oluşana dek süren sıralı bir takım hücresel ve biyokimyasal olayların geliştiği bir süreçtir. Başlıca üç ana dönemden oluşur:

- Hemostaz ve inflamasyon
- Proliferasyon
- Matürasyon ve remodelling

Doku hasarını takiben, birkaç gün sürecek olan hemostaz ve inflamasyon dönemi başlar, bu dönemde başlıca hemostaz, vasküler permeabilitenin artması, hücrelerin kemotaksisle yara yerine migrasyonu, büyüme faktörü ve sitokinlerin salınımı, ölü dokuların ve hücrelerin, enfeksiyöz ajanların yaradan uzaklaştırılması gerçekleşmektedir. (30) Vasküler yaralanma sonucu salınan kotekolaminler sayesinde vazokonstriksiyon gerçekleşir. Trombositler endotel altı kollajen ile temas ederek pıhtılaşma mekanizmasını başlatırlar. Bu temas sonucu trombin, fibronektin, trombosit- $\alpha$  granüllerinden sitokinler ve büyüme faktörlerinin salınımı gerçekleşir.

Bu pıhtılaşma faktörleri fibrinojenden fibrin oluşumunu sağlar. Trombositler ayrıca yara iyileşmesi süresince bu olayları düzenleyen birkaç esansiyel sitokini de üreten ilk hücrelerdir.

Hemostaz sağlandıktan sonra endotel ve mast hücrelerinden prostaglandin E-2 (PGE<sub>2</sub>), prostoglandin I-2 (PGI<sub>2</sub>) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) salgılanır. Bu sayede vasküler permeabilite artar ve vazodilatasyon gerçekleşir. Vasküler permeabilitenin artışından sonra interlökin-1 (IL-1), tümör nekrosis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), tümör nekrosis faktör-  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) gibi keomotaktik meddeler lökositlerin yara yerine toplanmasını sağlar. İlk 24 saatte dokuda lökositler hâkimken daha sonra makrofajlar baskın hale gelir. Makrofajlar sayesinde fagositoz, yara debritleme, fibroblastların proliferasyonu, matriks sentezinin hızlandırılması ve anjiogenez gerçekleşir.

Yaralanma sonrası yaklaşık dördüncü günden başlayıp, üçüncü haftaya kadar süren evre proliferasyon evresidir. Bu evrede trombositler ve makrofajlardan salınan sitokinler ve başta platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ile epidermal büyüme faktörü (EGF) olmak üzere büyüme faktörleri etkisiyle çevre dokulardan fibroblastlar ve endotel hücreleri gelişmeye başlar. Fibroblastik aktivite Transformasyon edici büyüme faktörü (TGF-  $\beta$ ) ve IL-1 sayesinde olmaktadır. Epitelyal hücre çoğalması yara yerinde bariyer oluşturarak enfeksiyon gelişimine engel olmaktadır.

Yara matriksinde temel yapı molekülü kollajendir. Yara iyileşmesinden önemli olan tip 1 ve tip 3 kollajendir. Tip 1 kollajen deride ekstraselüler matriksin temel bileşenidir. Tip 3 kollajen ise esas olarak onarım sürecinde önemlidir. Kollajen hidroksiprolin ve hidroksilizin hidrosilasyonu sonucu meydana gelir ve doku sağlamlığı üzerinde doğrudan etkiye sahiptir. Deneysel çalışmalarda yara iyileşmesinin ve kollajen sentez durumunun değerlendirilmesi, hidroksiprolinin in vitro koşullarda ölçümü ile değerlendirilmektedir. (31)

Matürasyon ve remodelling fazı fibroblastik evrede başlar. Kollajen yapım ve yıkımının dengede olduğu, kollajenin reorganize olduğu bir dönemdir. Bu dengenin kurulmasında kollajen yıkımında sorumlu olan matriks metalloproteinazlar (MMP) etkilidir. Bu dönemde dokudaki kollajen miktarı hemen hemen aynı kalmasına rağmen doku sağlamlığının artması birkaç ay daha devam etmektedir. Remodelling safhası 12 ay kadar sürebilir. Bu süre boyunca dokuda avasküler, asellüler skar dokusu gelişir. Oluşan bu skar dokusu hiçbir zaman yaralanmamış doku kadar sağlam değildir. (32)

### 2.4.1. Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi

Gastrointestinal sistemde oluşan tam kat defektlerde yara iyileşmesinin olabilmesi için dokuların cerrahi olarak bir araya getirilmesi gerekmektedir. Yeterli iyileşme sağlanamadığı durumlarda intestinal kaçak ve fistüller gelişerek yüksek mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. İyileşmenin fazla olduğu durumlarda ise anastomozda darlık, striktür ve obstrüksiyon olabilmektedir. (32)

Barsak anastomozları sonrasında oluşan gerilme kuvveti cilt yaralanması sonrasında oluşan gerilme kuvvetinden daha hızlı oluşmaktadır. Bunun başlıca sebebi, kollajen sentezinde fibroblastların yanı sıra düz kas hücrelerinin de etkili olmasıdır.

Barsak anastomozlarında anastomozun sağlamlığını sağlayan, sütürleri tutan ve barsak uçlarını bir arada tutan asıl katman submukozadır. Submukoza tabakası kolajen ve elastik liflerden oluşmaktadır. Ağırlıklı olarak %68 oranında tip 1 kollajen, %20 tip 3 kollajen ve %12 oranında tip 5 kollajen bulunmaktadır. (8, 33)

Gastrointestinal sistemde doku iyileşmesi normal yara iyileşmesi safhalarıyla hemen hemen benzer olmasına karşın aşamalarda bazı farklılıklar mevcuttur. Barsak anastomozunda ilk 72 saatte inflamasyon ve ödem mevcuttur. Anastomoz sırasında invajine edilmiş barsak kısmı 24-48 saat sonra nekroze olarak lümen içine dökülür. İnvajine edilen kısım ne kadar az olursa iyileşme o kadar sağlam olmaktadır. İnvajine edilen barsak kısmının büyük olması nekroze olacak dokunun da büyük olmasına sebep olduğundan yara iyileşmesini olumsuz etkilemektedir. Anastomoz sırasında özellikle iki barsak serozalarının da bir araya getirilerek tam örtüşmesini sağlamak kaçak riskini azaltmaktadır. (34)

Anastomoz yapımından 72 saat sonra dokuda granülasyon dokusu oldukça yoğun haldedir ve 3.-5. günler arası kollajenolitik aktivite de başlar. Kollajen yapımının da artmasıyla dokuda birikmiş kollajen miktarı fazladır ve bu anastomoz üzerinde gerilim kuvveti oluşturmaktadır. Kollajen yapımı ve yıkımı arasındaki denge anastomozun sağlamlığını belirlemektedir. Anastomozda kaçak riski bu dönemde submukozanın dikişlerin oluşturduğu gerilim kuvvetine dayanabilme gücüne bağlıdır. Anastomoz sonrası beşinci günden itibaren anastomoz sağlamlığı hızla artmaya başlar. Yedinci günde normal barsak gerilim kuvvetinin %50'sine, onuncu günde yaklaşık %100'üne ulaşmaktadır. Anastomoz birinci haftasında

mukoza epitel proliferasyonu izlenir ve hücrelerin düzenli olarak dizilimi remodelling safhasıyla altıncı aya kadar sürebilir. (35-37)

#### 2.4.2. Anastomoz İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Gastrointestinal sistemde yapılan onarımların iyileşme sürecini olumlu veya olumsuz olarak etkileyen faktörler lokal ve sistemik olarak iki alt başlıkta incelenebilir.

Tablo 2.1. Anastomoz iyileşmesini olumsuz etkileyen faktörler

Lokal Faktörler	Sistemik Faktörler
Yetersiz kan dolaşımı	İleri yaş
Sağlıksız doku uçları	Alkolizm
Anastomoz doku gerginliği	Beslenme bozukluğu ve obezite
Enfeksiyon veya bakteriyel bulaş	Vitamin ve mineral eksikliği
Yabancı cisim, drenaj kateteri	Hipovolemi ve şok
Hematom	Sepsis, asidoz
Distalde obstrüksiyon	Yandaş hastalıklar
Radyasyon hasarı	Bağışıklık sistemi bozuklukları
Hipertermi/hipotermi	Karaciğer yetmezliği, hiperbilirubinemi
Mekanik travma	Anemi
Denervasyon	Kan ürünü transfüzyonları
	Malign hastalıklar
	Hormonal faktörler
	Kullanılan ilaçlar (Steroidler, NSAİİ)

##### 2.4.2.1. Lokal Faktörler

Anastomoz yapılacak barsak anslarında kullanılan klempelerin sıklığı, uzun süre klemp kullanımı, kanama kontrolü için koterizasyonun fazla kullanılması, kullanılacak sütürlerin gereğinden fazla ve aşırı sıkı olması, anastomoz sırasında oluşan damar hasarı anastomoz yapılacak dokuda iskemi meydana getirerek yara iyileşmesini bozabilir. (38) Aynı zamanda her iki barsak ansının rahat bir araya gelecek kadar serbestlenmemesi durumunda anastomoz üzerinde gerilim kuvveti oluşarak hem doku kanlanmasını olumsuz etkiler hem de mekanik olarak gerilim anastomoz kaçığına sebep olur. Yapılan anastomozlarda yara iyileşmesi için



doku oksijenizasyonunun iyi sağlanması gerekmektedir. Örnek olarak oksijen basıncının 55 mmHg altında olduğu durumlarda kaçak oranı %10 iken oksijen basıncı 25 mmHg altında olan durumlarda iyileşme gerçekleşmemektedir. (39-40)

Radyoterapi gastrointestinal sistemde striktür formasyonu, endarteritis obliterans gibi durumlar oluşturarak fibrozise sebep olur ve bu da yara iyileşmesini olumsuz etkiler. Yara iyileşmesini olumsuz etkileyecek bir diğer etken de lokal enfeksiyonlardır. Operasyon sırasında sterilizasyona dikkat edilmemesi oluşabilecek dış etken kontaminasyonu, kolon florasının çeşitliliğinin fazla oluşu, barsak lümeni dışına intestinal içeriğin kontaminasyonu lokal enfeksiyona sebep olmaktadır. Enfeksiyon sonucu kollajenaz aktivitesi artarak kollajen miktarında azalma olur. (41) Operasyon sırasında drenajı sağlamak için konulan intraperitoneal drenaj kateterleri uzun süre tutulduklarında retrograd enfeksiyon kaynağı oluşturabilirler. Bu nedenle drenaj kateterleri uzun süre kullanılmamalıdır. Ayrıca intraperitoneal sepsis durumunda kollajen sentez miktarı önemli ölçüde azalacağından anastomoz yapmaktan kaçınmak gerekir. (42)

#### **2.4.2.2. Sistemik Faktörler**

Acil cerrahi girişim uygulanan hastalarda hipovolemi, hipoksi, bakteriyel kontaminasyon kaynaklı peritonit ve sepsisin daha fazla olması nedeniyle postoperatif mortalite ve morbidite oranı elektif cerrahi uygulanan hastalara göre daha yüksektir. (43) Yaşlı hastalarda iyileşme mekanizmalarındaki yavaşlama sebebiyle anastomoz kaçacağı oranında artış mevcuttur. (32)

Beslenme yetersizliklerinde, malnutrisyon ve buna bağlı vitamin, mineral ve protein eksikliklerinde, kronik alkol kullanımında anastomoz kaçak riski artmaktadır. Bu nedenle hastaların mümkün olduğunca erken dönemde enteral beslenmeye başlaması bu süreye kadar da parenteral beslenme ile hastanın desteklenmesi, eksikliklerin yerine konarak anastomoz güvenliğinin sağlanması mümkündür. Barsak mukoza hücrelerinin ana enerji maddesi olan glutamin verilen enteral beslenmenin içinde bulunmalıdır. (44) Arginin de nitrik oksit ile vazodilatasyon yaparak anastomoz kaçak oranını azaltmaktadır. (45) Ayrıca yara iyileşmesinde A, C, E vitaminin, demir, bakır ve çinkonun da farklı mekanizmalarla olumlu etkileri vardır. (8)

Sistemik hastalık varlığı, organ yetmezlikleri, sigara kullanımı, immun sistem yetmezlikleri yara iyileşmesini olumsuz etkileyerek anastomoz kaçak oranını arttırmaktadır. (32)

### **2.4.3. Anastomoz İyileşmesinin Değerlendirilmesi**

Anastomoz iyileşmesi mekanik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilebilir. Mekanik ve biyokimyasal değerlendirme yöntemiyle daha çok kantitatif değerler elde edilirken histopatolojik değerlendirmede kalitatif sonuçlar elde edilir.

#### **2.4.3.1. Mekanik Değerlendirme Yöntemleri**

Anastomoz patlama basıncı: Anastomoz yapılan barsak segmentinde sıvı veya gaz distansiyonuyla oluşan intralüminal basınca barsak duvarının karşı koyabileceği maksimum basınç değeridir. Anastomoz sonrası 3.-5. günler arası en düşük değerde olup anastomoz kaçaklarının en sık görüldüğü dönem de bu günlerdir. Anastomoz patlama basıncı postoperatif yedinci günde normal seviyelere ulaşmaktadır. (8) Patlama basıncı; barsak bir ucundan belirli bir hızda (2-12 ml H<sub>2</sub>O/dk) sıvı verilirken diğer ucundan barsak lümeni içine yerleştirilen manometre ile ölçülür. Literatürde patlama basınçlarını değerlendiren diğer çalışmalara bakıldığında herhangi bir barsak segmenti için ortak bir değer yoktur. Her çalışmanın sonucunda farklı değerler çıkabilir ve her çalışma için aynı çalışmanın kontrol grubu esas alınarak karşılaştırma yapılmalıdır. (46)

Anastomoz kopma direnci (ayrılma kuvveti): Anastomoz yapılan segmentin longitudinal kesilerek her iki ucundan zıt yönde kuvvetle çekilmesi sonucu anastomozun kopmadan dayanabildiği maksimum değerdir. Genellikle postoperatif 14. güne kadar uygulanabilir. (8) Dokudaki kollajen miktarıyla doğru orantılı olsa da birçok araştırmacı tarafından güvenilir kabul edilmemiştir. (47)

#### **2.4.3.2. Biyokimyasal Yöntemler**

Biyokimyasal olarak anastomoz iyileşmesi doku kollajen miktarının belirlenmesi ile mümkündür. Doku kollajen miktarı hidroksiprolin (HYP) düzeyi ölçümü ile saptanır. (8) Ayrıca NO, miyeloperoksidaz (MPO), TNF- $\alpha$  ve VEGF değerleri ile de yara iyileşmesinin durumu ve yara bölgesindeki inflamasyon hakkında bilgi sahibi olunabilir.

### **2.4.3.3. Histopatolojik Yöntemler**

Anastomoz yapılan barsak segmenti ışık mikroskobu altında incelenerek vaskülarizasyon, fibrozis, inflamasyon, nekroz ve epitelizasyonun durumuna göre kalitatif olarak değerlendirilir. (8) Nekroz ve inflamatuvar hücre göçünün az olması, vaskülarizasyonun ve kollajen miktarının fazla olması, reepitelizasyonun ileri düzeyde olması anastomoz iyileşmesinin iyi olduğunu gösterir.

## **2.5. Kök Hücre**

Kök hücreler mitoz bölünmeyle çoğalabilen, hem kendini yenileyebilme, hem de farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneği olan hücrelerdir. Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre gruplandırılabilir. Embriyonik dönemde ilk günlerde oluşan 4-8 hücreli zigot tek başına tüm organizmayı oluşturabileceğinden bu hücrelere “totipotent hücre” adı verilir. Totipotent hücrelerin 2-3 defa bölünmelerinin ardından oluşan blastosist denen yapıyı oluşturan hücreler de vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme kabiliyetine sahiptir, ancak tek başlarına bütün bir organizmayı oluşturamazlar. Bu hücrelere de “pluripotent hücre” denilmektedir. Erişkin dokularda bulunan, tüm hücre çeşitlerine dönüşemeyen özelleşmiş kök hücrelere ise “multipotent hücre” adı verilmektedir.

Erişkin kök hücreler; osteosit, adiposit, miyosit hücrelerini oluşturan “mezenkimal kök hücreler”, bütün kan hücrelerini oluşturan “hematopoetik kök hücreler” ve buldukları dokuda görev alan “unipotent kök hücreler” şeklinde sınıflandırılabilir. (48)

### **2.5.1. Mezenkimal Kök Hücreler**

Mezenkimal kök hücreler, yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, sinir sistemi ve deri gibi birçok doku ve organda bulunurlar. (49) Mezenkimal kök hücrelerin yüzey antijenleri çeşitlilik gösterse de Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT)’ye göre kabul görmüş yüzey antijenleri: CD105, CD73, CD29, CD44, CD90 (+) olmalı iken; CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR (-) olmalıdır. Yüzey antijenlerinin hücrenin tanınmasına rolü olduğu gibi, bazı sitokin ve büyüme faktörlerinin reseptörü, hücre adezyon molekülü olarak da görevi vardır. Bu antijenler mezenkimal kök hücrenin bulunduğu dokuya göre görevlerinde farklılıklar olabilmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin hasarlı dokuya gitme ve yerleşme eğilimi vardır. Bu özellikleri TNF- $\alpha$  ve IL-1 gibi sitokinler tarafından düzenlenir. (50) Hasarlı dokuya yerleşen

mezenkimal kök hücreler çeşitli faktörler salgılayarak hücre proliferasyonunu ve bu sayede dokunun iyileşmesini sağlamaktadır. Bu faktörler;

- Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF)
- İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)
- Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF)
- Hepatosit büyüme faktörü
- Interlökin-6 (IL-6)
- CCL-2
- Bazı nöral trofik faktörler olarak sıralanabilir.

Mezenkimal kök hücrelerin anjiyogenezi uyararak ve apoptozisi engelleyerek de iyileşme sürecine katkısı vardır.

### **2.5.2. Kök Hücre Kaynağı Olarak Adipoz Doku**

Sağlıklı yetişkin bir insanda toplam vücut ağırlığının yaklaşık %10-15'i yağ dokusudur. Bu dokunun yaklaşık yarısı cilt altında olup, kalan yarısı da omentum, mezenter gibi vücudun diğer kısımlarındadır. Adipoz doku yetişkin bir bireyde enerji kaynağı, yağda çözünen vitamin ve diğer maddelerin depo edildiği bir destek dokudur. Adipoz doku içerisinde multipotent kök hücreler bulunmaktadır. Diğer dokularda bulunan kök hücrelerinin aksine izole edilebilmeleri, laboratuvar ortamında çoğaltılabilmelerinin kolaylığı, yüksek sayılarda ve hızlı elde edilebilmeleri adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin kullanımını avantajlı hale getirmektedir. (51) Adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerin in vitro koşullarda adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşma kabiliyeti vardır. Kadipoz doku kök hücreleri kemik iliği kök hücreleri ile kıyaslandığında elde edilme yönteminin avantajlı olmasının yanında immün yanıt oluşturma ihtimali daha az ve kültür koşullarında uzun dönemde genetik olarak daha stabildirler. (50)

### **2.5.3. Kök Hücrelerin Dokularda Takibi**

Kök hücrelerle yapılan çalışmalarda kullanılan kök hücrelerin dokuya implantasyonu, implantasyon sonrası durumu, hasarlı bölgeye hareketi, hasarlı bölgeye yerleşimi, çoğalması, farklılaşması gibi durumları takip edebilmek için hücrelerin işaretlenmesi ihtiyacı vardır. Daha çok yeşil flöresan proteininin (GFP) hücrelere transfekte edilmesi yöntemiyle kök hücrelerin takibi yapılmaktadır. Kalıcı işaretleme istendiğinde genetik işaretleme yöntemleri

kullanılmaktadır. Kısa süreli çalışmalarda işe karboksifloresein diasetat süksinimidil ester (CFSE), 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) gibi flöresan işaretleme yöntemleri kullanılmaktadır. (52)

## **2.6. Sildenafil Sitrat**

Pirazolopirimidin türevi olan sildenafil sitrat; fosfodiesteraz 5 (PDE5) inhibitörüdür ve cGMP'yi artırır. Günümüzde daha çok erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılmaktadır.

### **2.6.1. Tanımı ve Tarihçesi**

Sildenafil sitrat ilk çalışmalarda 1980'li yıllarda hipertansiyon ve angina pectoris tedavisi için denenmiş olsa da faz 1 klinik denemelerde hipertansiyon ve angina pectorise karşı belirgin bir etki göstermemiştir. Fakat bu hastalarda penil erektil disfonksiyon düzelmesi görülmüştür. Bu farmakolojik etki sonrası Pfizer şirketi 1996'da ilacın lisansını almış ve 1998'de FDA tarafından erektil disfonksiyon tedavisi için onay verilmiştir. 2005 yılında primer pulmoner hipertansiyon için de FDA onayı alınmıştır. (53-54)

### **2.6.2. Etki Mekanizması**

Nitrik oksit (NO) cGMP sentezini artırır. cGMP düz kas relaksasyonunu sağlar ve vazodilatasyona neden olur. Hücre içi cGMP, fosfodiesteraz enzimleri ile yıkılır. Sildenafil sitrat, cGMP-spesifik PDE5'in oral etkili, güçlü ve selektif bir inhibitörüdür. Sildenafil sitrat bu etkisiyle cGMP düzeyini artırarak etki göstermektedir. Bu da nitrik oksitin etkisinin güçlenmesini sağlar. Bu etki düz kaslarda gevşemeye, vazodilatasyona ve kan akımında artışa neden olmaktadır. Sildenafil sitrat diğer fosfodiesteraz izoformlarına göre PDE5 üzerinde 10-10.000 kat daha etkilidir. PDE5 düşük düzeyde farklı dokularda da bulunmaktadır. Trombositlerde trombüs oluşumunu inhibe eder. Arter ve venlerde dilatasyona neden olur.

### **2.6.3. Kullanım Alanları**

Günümüzde yaygın olarak penil erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılan sildenafil sitrat vazodilatasyon etkisi ile pulmoner hipertansiyon tedavisinde de kullanılmaktadır.

### **2.6.4. Yan Etkileri**

Sildenafil sitratın istenmeyen etkilerinin çoğu vazodilatasyona sekonder gelişmektedir. Sık görülen yan etkileri baş ağrısı, yüz kızarması, burun tıkanıklığı gibi etkilerdir.

Trombositlerde de PDE5 enzimi bulunduğundan trombosit fonksiyonunda bozulmalar görülebilir. Ayrıca peptik ülserde de neden olduğu bildirilmektedir. (55)



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Araştırma öncesinde Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu onayı alındı. Çalışmada 44 adet, ağırlığı 240-330 gr arasında değişen Wistar Albino cinsi rat kullanılmış olup 4 adet rat mezenkimal kök hücre eldesi için kullanıldı. Diğer 40 rat randomize olarak her biri 10 rattan oluşan 4 eşit gruba ayrıldı ve üçerli-dörderli olarak kafeslerde tutuldu. Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) tarafından 1996 yılında yayınlanan rehberine uygun olarak bakım ve araştırma koşulları sağlandı. Çalışmada oluşturulan dört deney grubu:

**Grup I (Kontrol):** Kolon anastomozu yapıldı. Anastomoz sonrası beşinci günde ratlar sakrifiye edildi. (n=10)

**Grup II (Sildenafil sitrat):** Kolon anastomozu yapılmadan 2 gün öncesinden anastomoz sonrası beşinci güne kadar her gün günde bir defa oral gavaj yoluyla sildenafil sitrat verildi. Anastomoz sonrası beşinci günde ratlar sakrifiye edildi. (n=10)

**Grup III (Kök Hücre):** Kolon anastomozu esnasında anastomoz yapılan distal ve proksimal kolon ansı subserozal alana eşit olacak şekilde kök hücre enjekte edildi. Anastomoz sonrası beşinci günde ratlar sakrifiye edildi. (n=10)

**Grup IV (Sildenafil sitrat + Kök Hücre):** Kolon anastomozu yapılmadan 2 gün öncesinden anastomoz sonrası beşinci güne kadar her gün günde bir defa oral gavaj yoluyla sildenafil sitrat verildi. Ayrıca kolon anastomozu esnasında anastomoz yapılan distal ve proksimal kolon ansı subserozal alana eşit olacak şekilde kök hücre enjekte edildi. Anastomoz sonrası beşinci günde ratlar sakrifiye edildi. (n=10)

#### 3.1. Deneysel Hayvanlarının Bakımı

Tüm ratlara 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olması sağlanan, sıcaklığı 18-22 °C arasında tutulan ortam sağlandı. Ratlar deneyden bir hafta önce bu ortama alınarak adapte olmaları sağlandı. Ratlar gruplara ve kafeslere ayrıldıktan sonra tüm kafeslerin üzerine Grup numaraları yazıldı. Ratlar ad libitum olarak pelet yem ve musluk suyu ile beslendi. Kafeslerinde sürekli yem ve su bulunduruldu. Sildenafil sitrat verilecek Grup II ve Grup IV'e operasyondan iki gün önce başlanarak her gün günde bir defa oral gavaj yoluyla 10 mg/kg/gün sildenafil sitrat (Viagra® Pfizer, İstanbul, Turkey) verildi. (Resim 3.1) Sildenafil sitrat kullanılan benzer

çalışmalar örnek alındı. (56) Sildenafil sitrat uygulaması bu gruplarda operasyon sonrası beşinci güne kadar devam etti.



Resim 3.1. Ratlara oral gavaj yöntemiyle sildenafil sitrat verilmesi

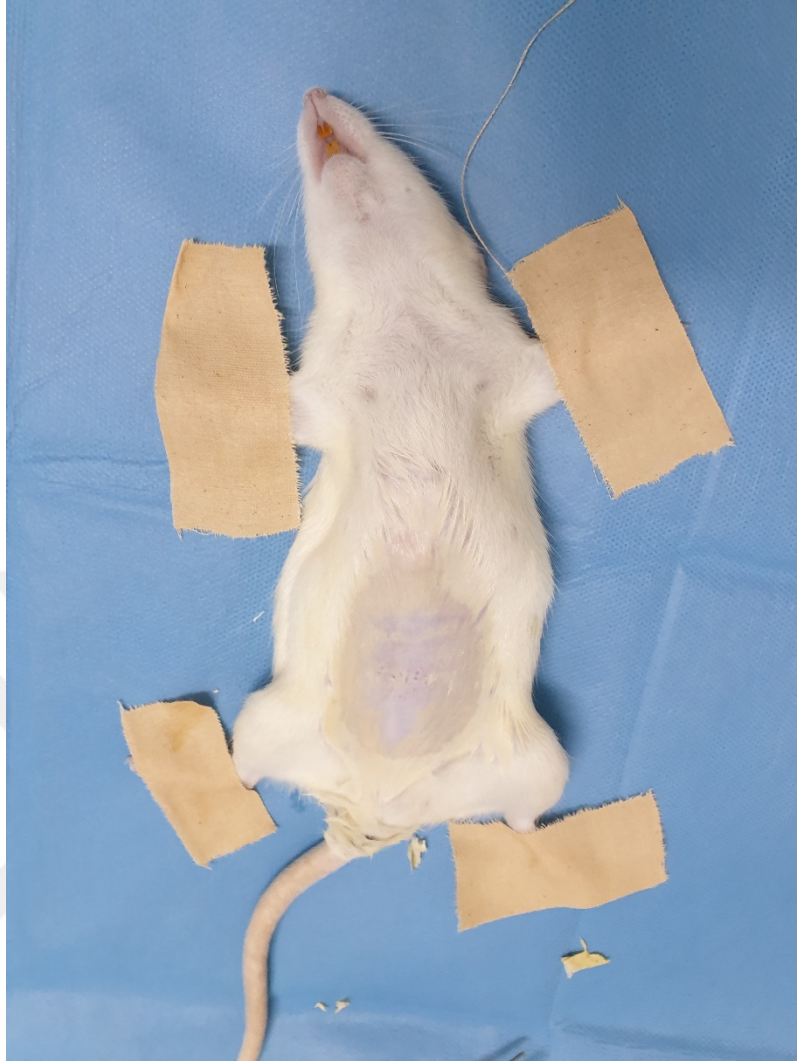
### 3.2. Cerrahi İşlem Öncesi Hazırlık

Tüm ratlara operasyondan 12 saat önce pelet diyeti uygulandı, ancak su kısıtlaması yapılmadı. Operasyon sırasında hipotermi oluşmaması için operasyon 24-25 °C oda sıcaklığında ve ışık kaynağı altında yapıldı.

### 3.3. Cerrahi İşlem

Ratlara 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer inc), 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer inc) hazırlanarak intraperitoneal alana enjekte edildi. Anestezi derinliği ekstremiter refleksi ile kontrol edildi. Yeterli anestezi derinliği sağlandıktan sonra ratların karın bölgeleri tıraş edildi. Ardından ameliyat masasına sırt üstü yatırıldı ve dört ekstremiteden masaya flaster yardımıyla tespitlendi. (Resim 3.2)





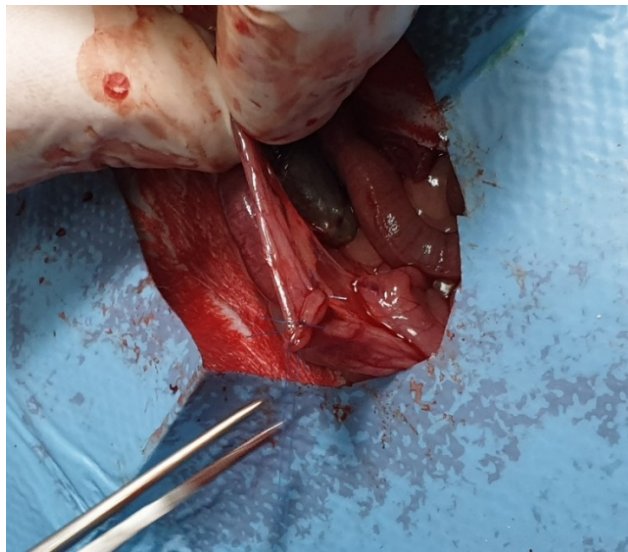
Resim 3.2. Ameliyat edilecek ratın anestezi sonrası tıraş edilmiş ve masaya tespitlenmiş hali

Karın bölgeleri %10 povidon-iyot (Batticon® antiseptik solüsyon, Adeka Ltd. Türkiye) ile temizlendi ve ortasında yeterli büyüklükte delikler olan steril cerrahi örtü ile örtüldü. Ardından ksifoid 1-2 cm altından pubis 1 cm üzerine kadar orta hat insizyonu ile laparotomi yapıldı. Batına girildikten sonra inen kolon bulundu ve dışarı alındı.



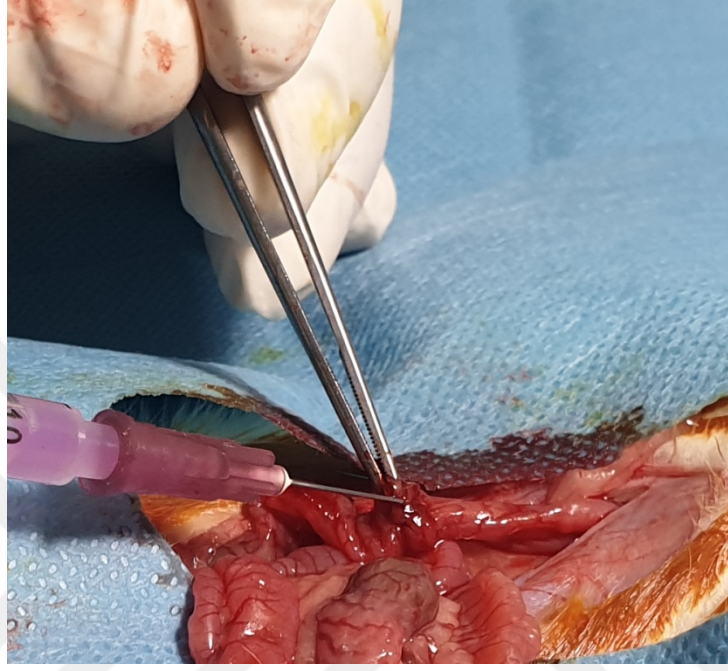
Resim 3.3. İnen kolon (penset ile gösterilen)

Batın dışına çekilen inen kolon makas yardımıyla tam kat transekte edildi. Anastomoz güvenliği açısından distal ve proksimal kolon ansı içerisinde bulunan gaita parçaları çıkarıldı. Ardından 6/0 prolon ile 5-6 adet primer sütürler ile uç uca tek kat kolon anastomozu yapıldı. (Resim 3.4) İşlem sonrası cilt ve fasya 3/0 ipek ile primer kapatıldı.



Resim 3.4. Kolon anastomozunun tamamlanmış hali

Kolon anastomozundan hemen sonra kök hücre uygulaması yapılacak olan Grup III ve Grup IV ratlarına proksimal ve distal kolon her iki uca eşit olacak şekilde subserozal 0,1 ml toplamda 0,2 ml kök hücre enjekte edildi. (Her 0,1 ml'de  $4 \times 10^5$  kök hücre mevcut) (Resim 3.5) Diğer gruplara bu işlem uygulanmadan karın kapatıldı.



Resim 3.5. Kök hücre enjeksiyonu

Tüm gruplardaki ratlar ameliyat sonrası beşinci günde intraperitoneal 150 mg/kg ketamin hidroklorür enjeksiyonu yapılarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası laparotomi yapılarak inen kolon anastomozu bulundu. Batın içi yapışıklıklar Houston ve ark.'nın kullandığı yöntem ile değerlendirildi. (57) (Tablo 3.1)

Tablo3.1. Houston ve ark.'nın laparotomi sonrası yapışıklık derecelendirmesi

1	Hafif derecede yapışıklık	Anastomoz ile omentum arasındaki yapışıklık
2	Orta derecede yapışıklık	Anastomoz ile omentum, ince barsak veya batın duvarı arasındaki yapışıklık
3	İleri derecede yapışıklık	Anastomozu birden fazla intestinal segmentin, omentumun ve/veya batın duvarının yapışıklığı

Yapışıklıklar değerlendirildikten sonra patlama basıncını ölçmek için anastomozun 3 cm distalinden ve 3 cm proksimalinden kolon kesilerek batin dışına alındı. Anastomoz patlama basıncı ölçümü yapıldıktan sonra örnekler longitudinal olarak ikiye ayrıldı ve histopatolojik çalışma ve biyokimyasal çalışma için uygun koşullarda muhafaza edildi.

### **3.4. Adipoz Doku Temini**

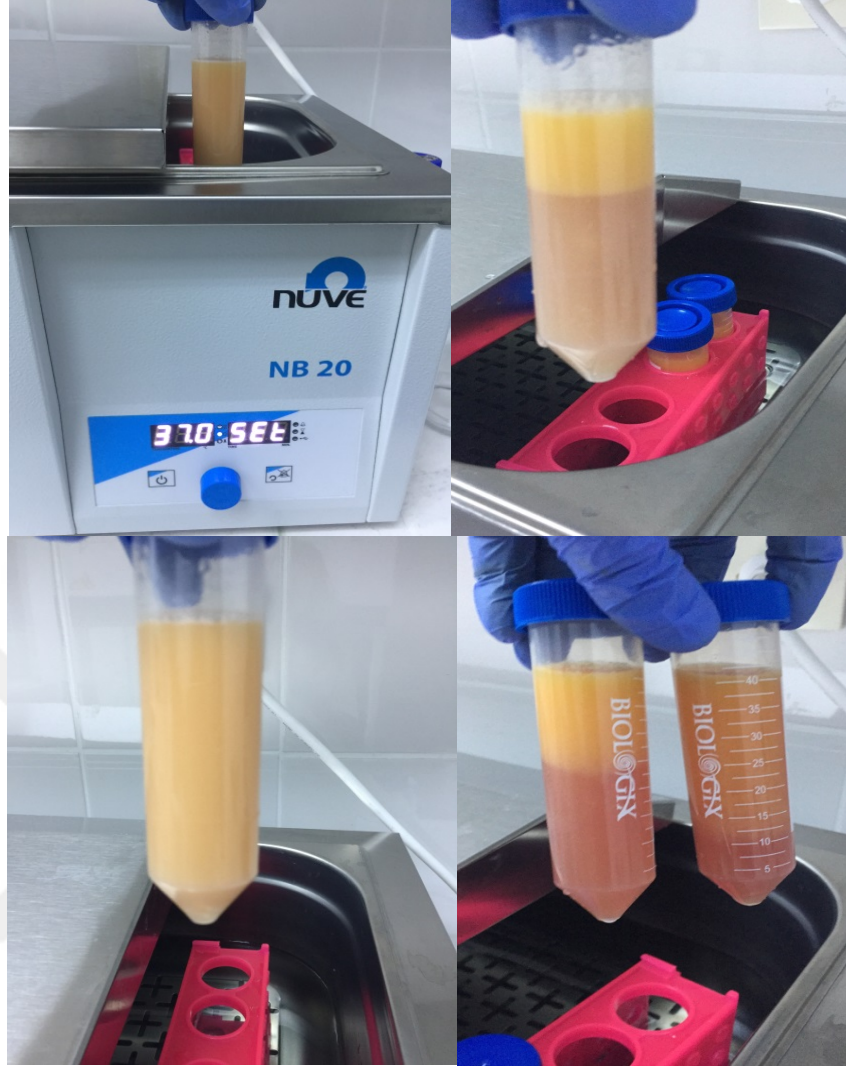
Adipoz doku temini için ayrılan dört rat verilen anestezi sonrası ameliyat masasına sırt üstü alınarak dört ekstremiteden masaya tespitlendi. Ardından cerrahi bölge tıraş edildi ve sterilizasyon sağlanarak inguinal bölge açıldı. Cilt altı disseke edilerek inguinal bölge yağ yastıklarına ulaşıldı. Yağ dokuları çıkarılarak işlem sonlandırıldı. Her bir rattan yaklaşık 5 gr adipoz doku elde edildi. Alınan dokular steril ortamlarda muhafaza edildi.

### **3.5. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması**

Rat adipoz doku kök hücresi izolasyonu ve flow cytometry yöntemi ile tanımlanması için Zhu ve ark. (2013) ve Francis ve ark. (2010) yöntemlerinden yararlanıldı. (58-59) Tüm işlemler boyunca steriliteye gerekli önem verildi.

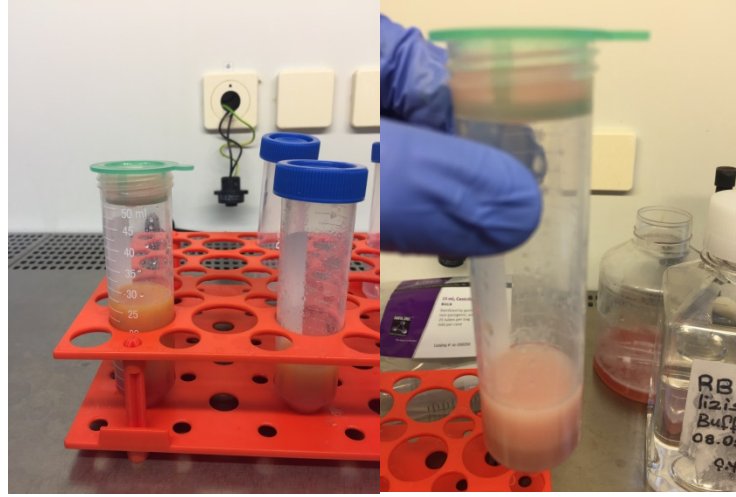
Makalelerde farklı miktarlarda doku çalışılmış ve alınmış olup, birkaç deneme yaptıktan sonra ortalama 10 gr yağ dokusu üzerine 15 ml Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) içinde çözülmüş ve 0.22 µm filtreden geçirilmiş % 0,1 konsantrasyonunda kollajenaz I enzimi koyuldu. Ayrılan yağlar önce 50 ml'lik falkon tüp içine alındı ve daha sonra kollajenaz enzimi eklenip 37 °C su banyosuna konuldu. Her 5-10 dakika arayla falkon tüpler şiddetli şekilde çalkalandı ve yağların enzim çözeltisi içinde iyice erimesi sağlandı. (Resim 3.6)





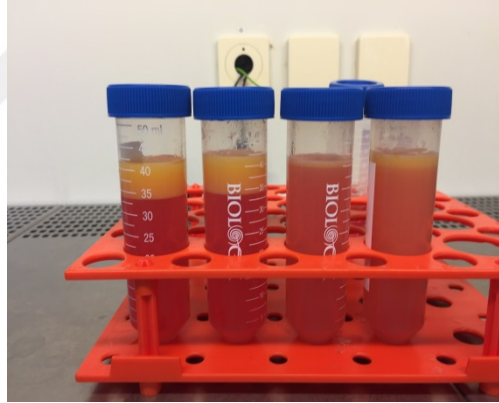
Resim 3.6. Yağ dokusuna kollajenaz I enzimi eklendikten ve 2 saat su banyosunda enkübe edildikten sonra dokuların erimiş hali.

İki saat sonunda su banyosundan çıkarılan hücreler 100  $\mu\text{m}$  gözenekleri olan hücre süzgecinden (cell strainer) 1000  $\mu\text{l}$ 'lik pipet ucu yardımıyla geçirilerek çözünmeyen hücrelerden ayrıldı. (Resim 3.7)



Resim 3.7. Kollejenazda erimiş hücrelerin hücre süzgecinden süzülmesi

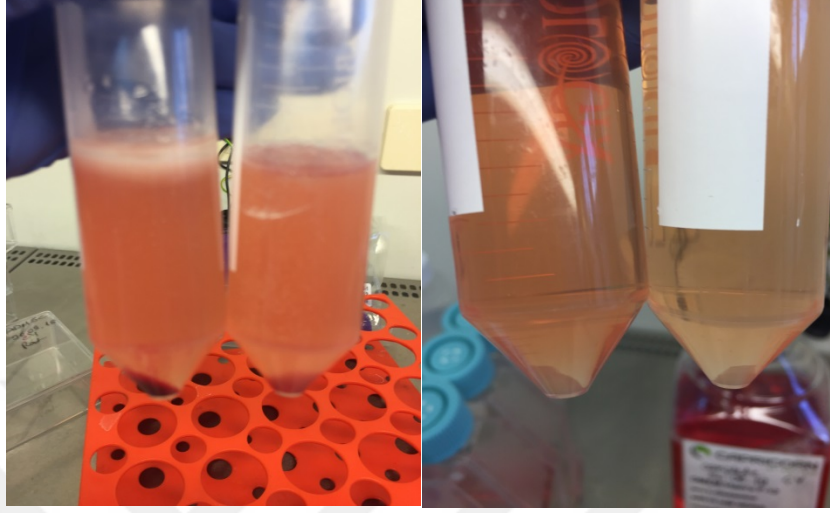
Daha sonra kollajenaz enzimini inhibe etmek eklediğimiz miktarda büyüme medyumu eklenip 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra üstteki erimiş halde bulunan yağ dokusu dikkatli bir şekilde aspire edildi. (Resim 3.8)



Resim 3.8. Çözünmüş yağ dokusunun görüntüsü

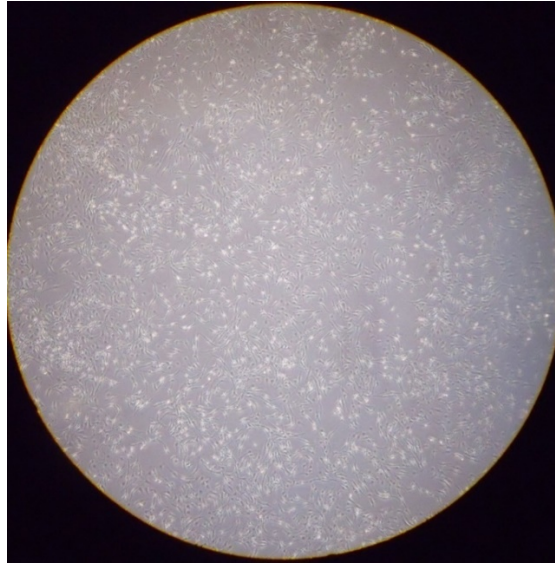
Üstteki yağ alındıktan sonra yaklaşık 5 ml supernatant kalıyaya kadar üstteki sıvı aspire edildi ve tekrar en az 15 ml büyüme medyumu eklenip tekrar 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüpün üstündeki supernatant 1-2 ml kalıyaya kadar boşaltıldı ve tüpün dibinde biriken vasküler stromal fraksiyon (VSF) ve içinde bulunan kök hücreler üzerine 5-10 ml arasında (dipteki hücre yoğunluğuna göre) RBC-lizis tamponu (8.26 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,19 g  $\text{NaHCO}_3$ , üzerine 0.5 M 200  $\mu\text{L}$  EDTA konur ve steril bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanır, pH'ı 7.3'e ayarlanır ve 0.22  $\mu\text{m}$  filtreden geçirilir, bu hazırlanan tampon 10x olup, kullanılırken steril bidistile su ile 1x'e dilüe edilir) eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek eritrositlerin

parçalanması sağlandı. Bu sürenin sonunda RBC tamponu üzerine koyduğumuz miktarda büyüme medyumunu eklendi ve tekrar 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem, dipteki hücreler tümüyle eritrositlerinden ayrılncaya kadar yapılabilir. (Resim 3.9)



Resim 3.9. İlk resimde dipte yoğun eritrosit bulunmakta olup, bu fraksiyon yıkandıkça ikinci şekilde olduğu gibi eritrositlerinden ayrılmaktadır.

Daha sonra süpernatant iyice döküldü ve dipte kalan hücreler 75 cm<sup>2</sup>'lik flask içine büyüme medyumunu ile ekildi. Yaklaşık 2 gün sonra yapışmayan hücreler ve yine stromal hücreleri temizlemek için medyum tazesini ile değiştirildi ve en az 3 kez bu tekrarlandıktan sonra hücreler pasajlandı. (Resim 3.10)



Resim 3.10. Rat adipoz doku kök hücresi (3. pasaj) (x4)

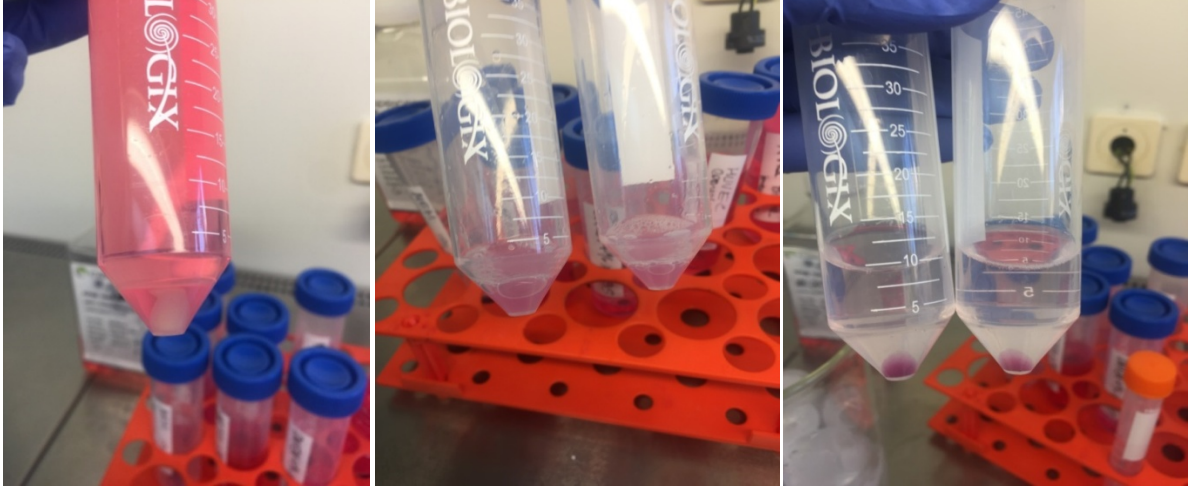
### 3.5.1. Kök Hücrelerde Yüzey Antijenlerinin Saptanması

Literatürlerde rat veya insan adipoz doku mezenkimal kök hücrelerinin en fazla beşinci pasajı kadar kullanılmasının uygun olduğu, en iyi kök hücrelerin elde edildiği ve kullanıma uygun olduğu pasajın 2-5 arasında olduğu bildirilmiştir. Beşinci pasajdan sonra hücrelerin kök hücre özelliklerini yitirdikleri ve farklılaştıkları rapor edilmiştir. Bu nedenle, çalışmamızda ortam medyumunu elde ettiğimiz hücreler üçüncü pasajda kullanıldı. Hücreler tripsin ile flasktan kaldırıldı, 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra %0,5 Bovine Serum Albumin (BSA) içeren DPBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler sayılmış olup her bir yüzey belirleyici ölçümü için 50.000 hücre kullanılacak şekilde tüplere kondu. Bu hücreler ya fluorescein isothiocyanate (FITC) ya da phycoerythrin (PE) ile konjuge edilmiş antikolar ile 30 dakika 4 °C'de enkübe edilmiş olup, Becton Dickinson FACSCalibur Flow Cytometry cihazı ile yüzey belirleyicileri saptandı. (58-59)

### 3.5.2. Kök Hücrelerin İşaretlenmesi

Kök hücrelerin işaretlenmesi için sitoplazmik boya olan 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) kullanıldı. DiI, %99'luk etanol çözeltisinde çözülerek %25'lik konsantrasyonda solüsyon hazırlandı. Kullanılmadan önce phosphate-buffered saline (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 µl DiI eklenerek beklemeye alındı. 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 tüpün üst kısmında kalan süpernatant atıldı, alttaki  $2,4 \times 10^7$  adet DiI işaretli kök hücrelerin olduğu pelletin üzerine 5 ml PBS (%1 penisilin/streptomisin içeren) eklendi, karıştırıldı ve tekrar süspansiyon haline getirildi. (Resim 3.11)





Resim 3.11. Kök hücrelerin DiI ile boyanması

### **3.6. Anastomozun Değerlendirilmesi (Fiziksel, Histopatolojik, Biyokimyasal)**

Anastomoz iyileşmesi fiziksel, biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

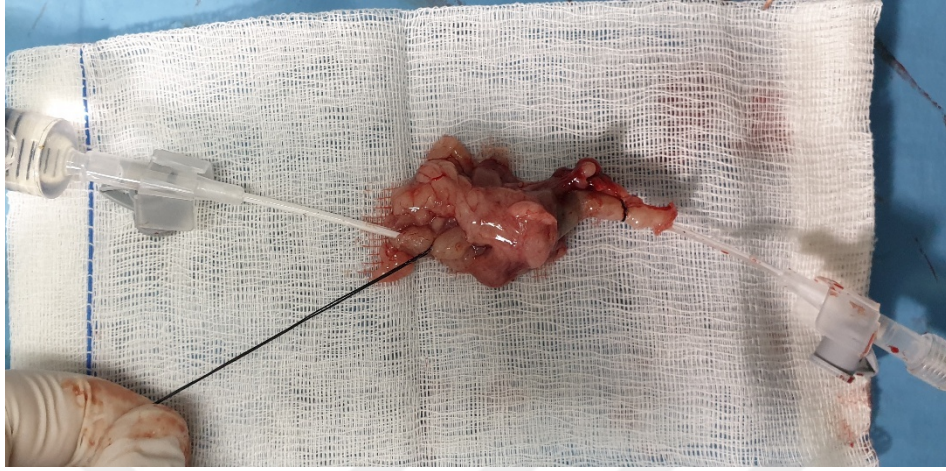
#### **3.6.1. Fiziksel Değerlendirme Yöntemleri**

##### **3.6.1.1. Anastomoz Patlama Basıncı Ölçümü**

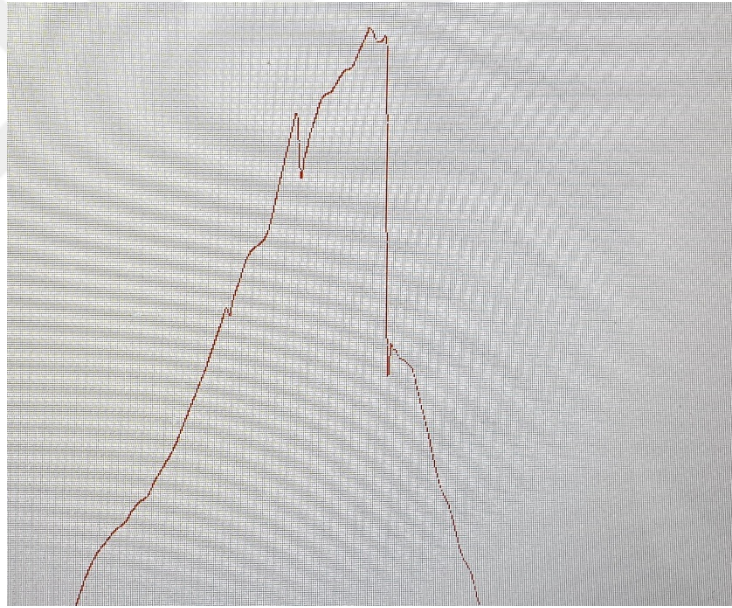
Tüm ratlar anastomoz sonrası beşinci günde sakrifiye edildikten sonra anastomoz yapılan kolon ansları çevre yapışıklıklardan keskin disseksiyonla ayrıştırıldı. Anastomoz bütünlüğünün korunmasına özen gösterildi. Anastomoz yapılan kolon ansı anastomozun 3 cm proksimalinden ve 3 cm distalinden kesilerek batın dışına alındı. Alınan kolon ansı içerisinde bulunan fekal içerik ölçüm değerlerini etkileyebileceği için kolon içerisinden çıkarıldı. Ardından kolon ansının her iki ucuna da 20G kalınlığında branül yerleştirilerek 3/0 ipek ile sıvı kaçağı olmayacak şekilde tespitlendi. (Resim 3.12) Branüllerden biri serum fizyolojik dolu enjektöre bağlanırken diğeri basınç ölçümü yapılacak olan cihaza (Biopac MP30 ultimate system, SantaBarbara, ABD), arasında bir transduser (SS13L basınç transduseri) ve basınç kablosu (Morton basınca dayanıklı pressure line code: 441-Türkiye) yardımıyla bağlandı. Basınç ölçüm cihazı da Biopac BSL Pro 3.6.7 uygulaması yüklü olan bilgisayara bağlandı. Böylece intraluminal basınç monitörize edilmiş oldu.

Enjektörle serum fizyolojik yavaşça (2-12 ml/dk) vermeye başlandı. Monitörde basınç artışı takip edildi. Anastomozun sıvı kaçırmaya başladığı andaki ani basınç düşmesinin hemen

öncesinde ölçülen en yüksek basınç değeri anastomoz patlama basıncı olarak kabul edildi. (Resim 3.13) Bu değerler mmHg birimi ile izlendi.



Resim 3.12. Anastomoz patlama basıncı ölçümü



Resim 3.13. Patlama basıncı ölçümü sırasında oluşan basınç-zaman grafiği

### 3.6.1.2. Karın İçi Yapışıklıkların Değerlendirilmesi

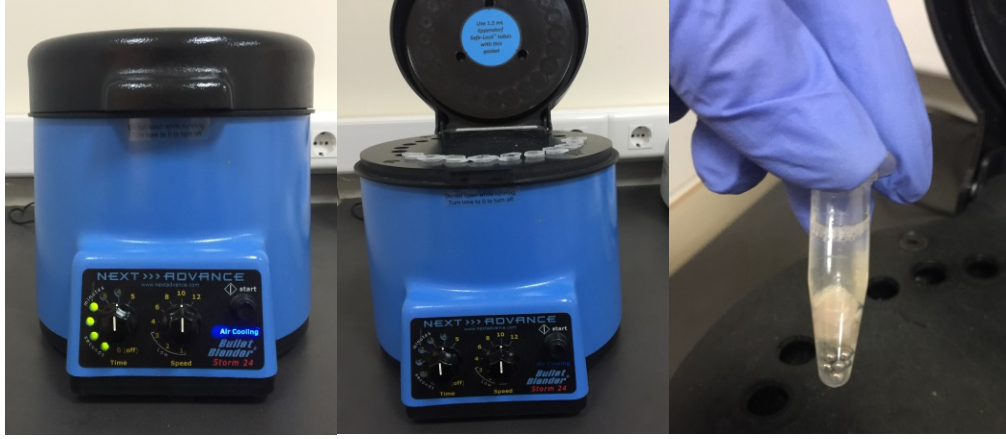
Karın içi yapışıklıkların değerlendirilmesinde Houston ve ark'nın kullandığı değerlendirme yöntemi kullanıldı. (57)

### 3.6.2. Anastomozda Biyokimyasal Parametreler

#### 3.6.2.1. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Doku örnekleri, proteaz inhibitörü olan 0,2  $\mu$ M phenyl methane sulphonyl fluoride (PMSF) ve 1  $\mu$ M Ethylenediamin tetra acetic acid (EDTA) içeren 50  $\mu$ M fosfat tamponunda (pH 7.4) (1/10 g/ml) olacak şekilde 4 °C’de homojenize edildi. Homojenatlar, MPO için örnek ayrıldıktan sonra, 10.000 rpm 5 dakika santrifüj edildi ve üstteki supernatant eşit olarak endopodlara ayrılarak diğer parametrelerin bakılabilmesi için –80 °C’de donduruldu.

Lizis tamponu eklenen (1/10) eklenen doku örnekleri soğutmalı homojenizatör yardımıyla çelik bilyeler kullanılarak otomatik olarak 600 rpm’de 4 dakika homojenize edildi. (Resim 3.14)

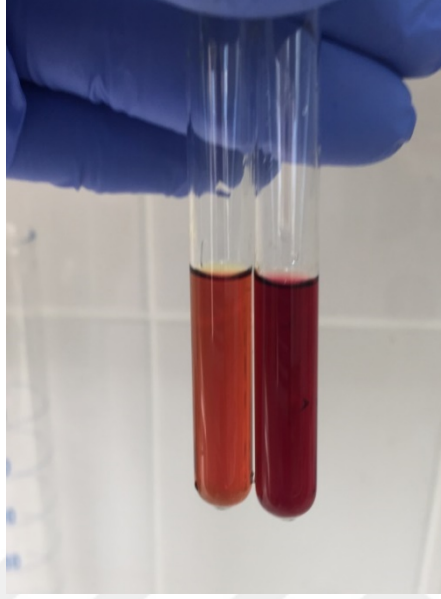


Resim 14. Doku örneklerinin homojenizasyonu

#### 3.6.2.2. Doku Örneklerinde Hidroksiprolin Ölçüm Yöntemi

Her bir numunedeki total kollajen miktarı ve hidroksiprolin konsantrasyonu Reddy ve ark’nın çalışmasında tarif edilen yöntemle saptandı. (60) 2N NaOH içerisinde homojenize edilmiş olan örnekler (20-40 mg) 20 dakika boyunca 120° C’de otoklavda bekletilerek hidrolize edildi. Karışımın içine 450  $\mu$ l kloramin-T ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı. Oksidasyonun oda sıcaklığında 25 dakika devam etmesine izin verildi. Her numuneye 500  $\mu$ l Ehrlich’in aldehit reaktifi ilave edildi, hafifçe karıştırıldı ve numuneler 65 °C’de 20 dakika boyunca inkübe edilerek kromofor geliştirildi. Her numunenin absorbansı bir spektrofotometre kullanılarak 550 nm’de okundu. (Resim 3.15) Her doku örneğindeki bilinmeyen hidroksiprolin konsantrasyonları, L-hidroksiprolin kullanan standart bir kalibrasyon eğrisinden çıkarıldı.

Toplam kolajenin içeriği, toplam kolajen aminoasitlerinin yüzde 14'ünün hidroksiprolin olduğu varsayılarak hesaplandı.

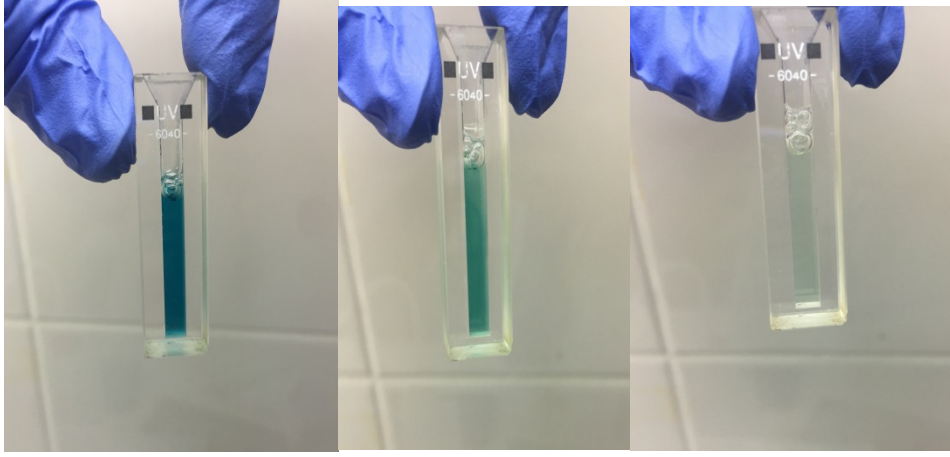


Resim 3.15. Hidroksiprolinin kolorimetrik ölçümü.

### 3.6.2.3. Doku Örneklerinde Miyeloperoksidaz Ölçüm Yöntemi

Dokuda MPO aktivitesi Suzuki ve ark.'nın yönteminine göre saptandı. (61) Yöntem sentetik bir substrat olan 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB)'in MPO yoluyla yıkılımının ölçülmesine dayanmaktadır. Belli miktardaki doku homojenatı 7.000 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki kısım atıldı ve alttaki kalan doku kısmı deterjanlı tampon ile çözüldü (160 µM potassium phosphate buffer, pH 5,4, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide, HETAP). Reaksiyon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 37 °C'de reaksiyon karışımına eklenmesi yolula başlatıldı. MPO'nun katalizlediği reaksiyonda TMB oksidasyona uğramakta olup, reaksiyon sırasında absorbans artışı 655 nm'de 15 saniye ölçülmekte ve 1 dakikadaki MPO aktivitesi hesaplanmaktadır. (Resim 3.16) Rengin koyuluğu MPO konsantrasyonu ile orantılıdır. MPO aktivitesi U/g yaş doku olarak verilmektedir.



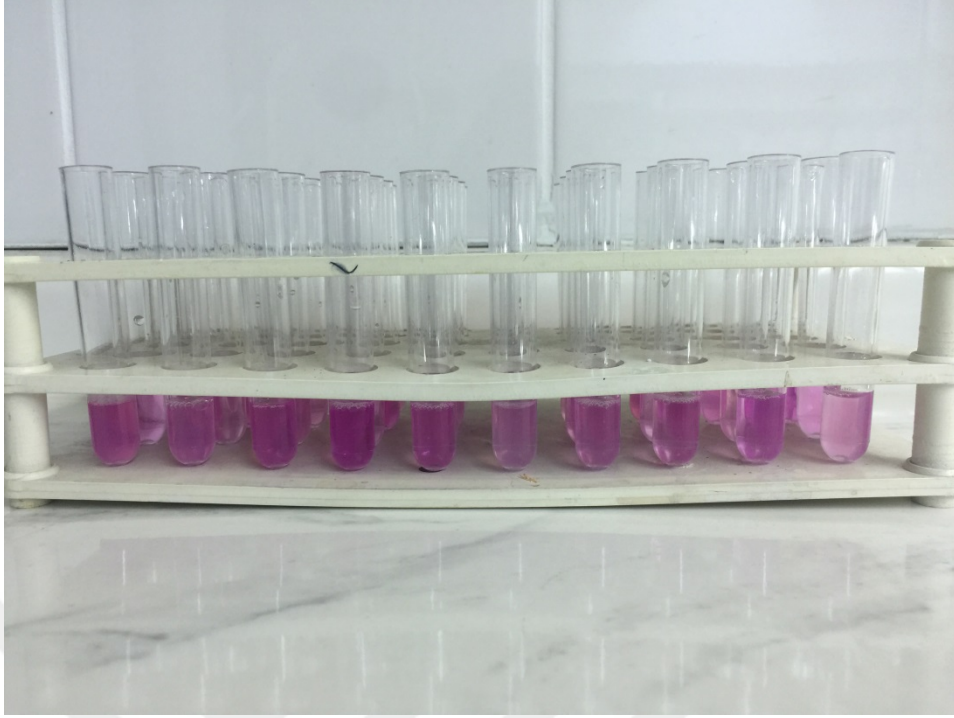


Resim 3.16. Küvetlerdeki rengin şiddeti örnekteki MPO konsantrasyonu ile ilişkilidir

#### 3.6.2.4. Doku Örneklerinde Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemi

NO, Navarro-Gonzalves'in kadmiyum (Cd) indirgeme yöntemine göre saptandı. (62) Doku süpernatantı önce % 30'luk  $ZnSO_4$  ile muamele edildi ve proteinler çöktükten sonra 10.000 g/10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki süpernatant NO saptanması için kullanıldı. Glisin-NaOH tamponu; glisin (MERCK, Kat. No. K23214990) ve sodyum hidroksit (PROLABO, Kat. No. EMB 45053) kullanılarak hazırlandı. Glisin- NaOH tamponu içindeki  $CuSO_4$  çözeltisi; glisin, NaOH ve bakır sülfat (MERCK, Kat. No. 4187427) kullanılarak hazırlandı. Sülfanilamid çözeltisi; hidroklorik asid %37 (MERCK, Kat. No. K24016914) ve sülfanilamid (Sigma, Kat. No. S-9251) ile hazırlandı. NED çözeltisi (N-(1-Naphtyl) Ethyl-Enediamine dihydrochloride, Sigma, Kat. No. N-5889) kullanılarak hazırlandı. Standartlar, sodyum nitrit (Sigma, Kat. No. S-3421) kullanılarak, 10-100 mg konsantrasyonlarda hazırlandı.

Örneklerdeki nitrit ve nitrat konsantrasyonları Griess reaksiyonu sonucunda oluşan pembe renk sonucunda kolorimetrik olarak ölçüldü. Rengin koyuluğu örnekteki NO konsantrasyonu ile orantılı idi. Örnekler ve standartlar, ELISA mikroplate okuyucuda 540 nm'de okutuldu. (Resim 3.17) Konsantrasyon hesapları otomatik olarak cihaz tarafından hesaplanmış olup, sonuçlar  $\mu M/mg$  yaş doku olarak verildi.

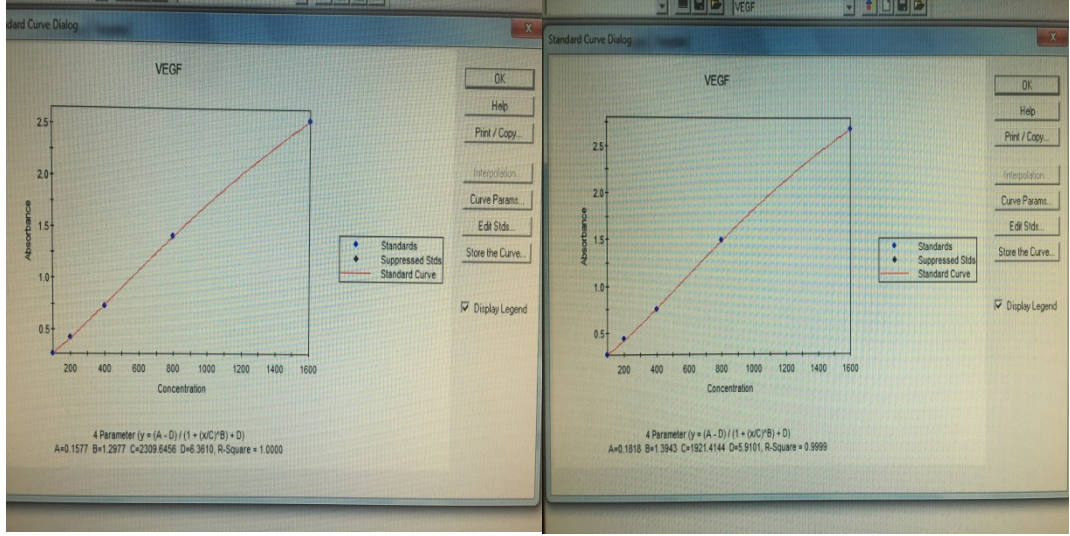


Resim 3.17. Örneklerdeki NO konsantrasyonu rengin şiddeti ile korelasyon göstermektedir

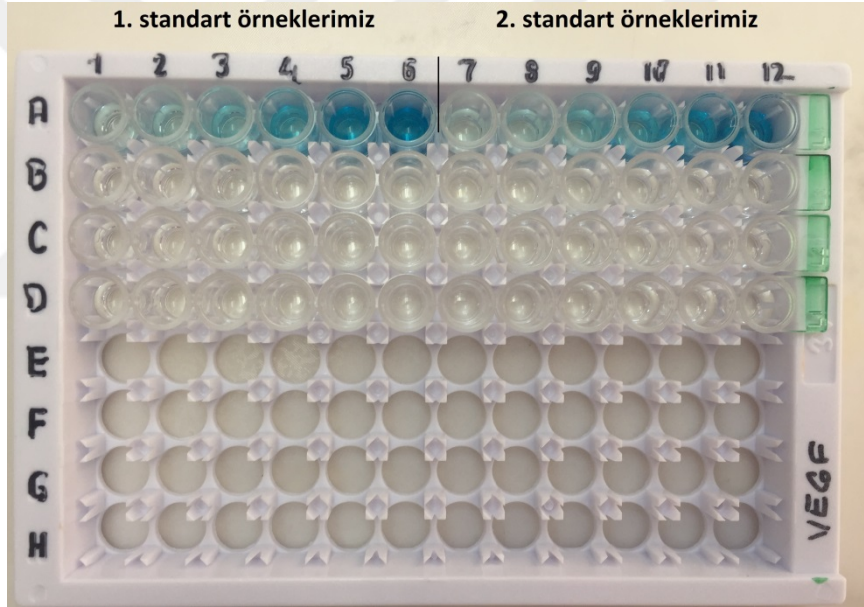
### 3.6.2.5. Doku Örneklerinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Ölçüm Yöntemi

Doku supernatantlarında VEGF düzeyleri ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle ticari kitler (VEGF BioAssay™ ELISA Kit, Rat. USBiological life Sciences, Kat. No. 144097) kullanılarak çalışıldı. Örnekler antijen kaplı plağın kuyucuklarına konarak, 37 °C’de enkübe edildi ve daha sonra antikor eklendi. Yıkama basamaklarından sonra substrat solüsyonu eklendi, mavi renkler oluştuğundan sonra reaksiyonu sonlandırıcı reaktif eklendi ve oluşan sarı renk mikropalak okuyucuda (ELx800) 450 nm’de okundu. (Resim 3.19-20-21) Örneklerdeki konsantrasyonlar kitin içinden çıkan standartlar yardımı ile cihaz tarafından çizilen grafikten otomatik olarak hesaplandı.

VEGF kitinin içinden çıkan standartlar kullanılarak, ELISA okuyucusunda otomatik olarak grafik çizdirildi ve grafiklerin R değerleri 1.000 ve 0.999 olarak saptandı. Örneklerin hiç birinde ölçülebilecek miktarda VEGF konsantrasyonu saptanmadı. (Resim 3.18)

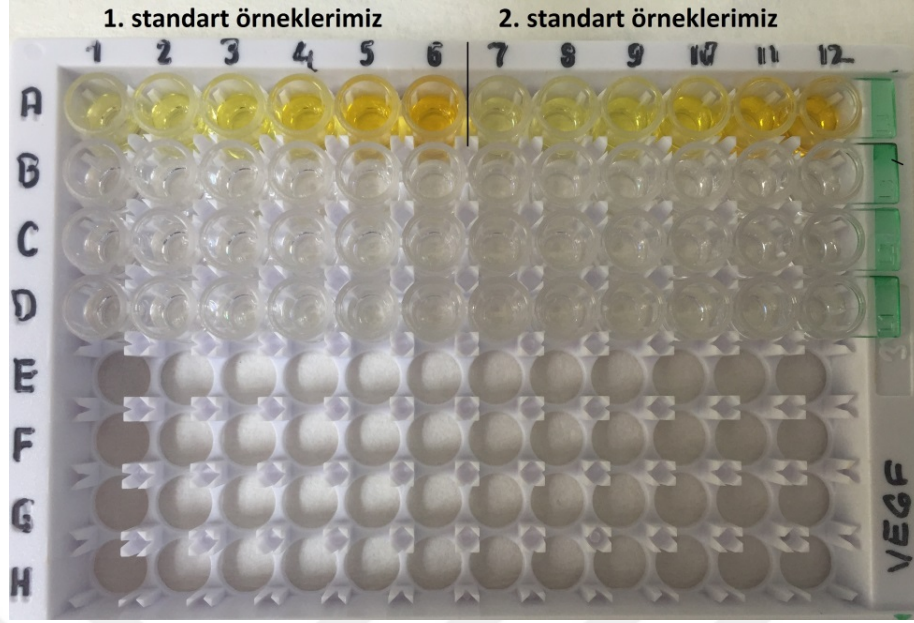


Resim 3.18. VEGF Standart grafiği

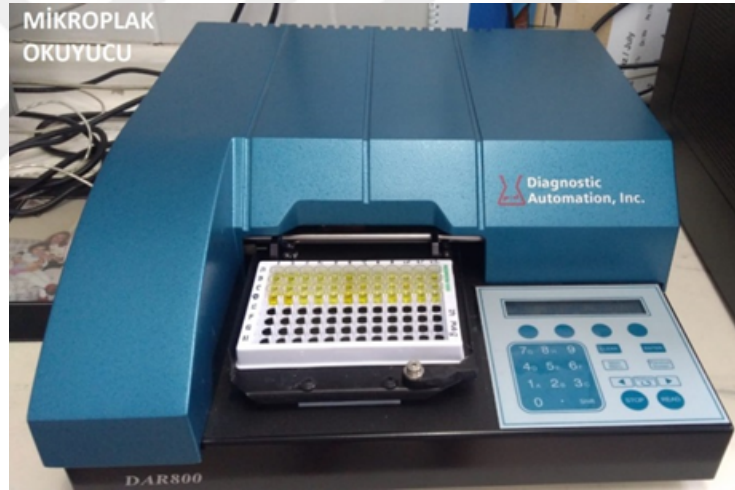


Resim 3.19. VEGF için örneklere substrat çözeltisi konduğunda





Resim 3.20. VEGF ölçümü için örneklere stop solüsyon konmuş hali, okunmaya hazır halde.



Resim 3.21. ELISA Mikroplak Okuyucu

### 3.6.2.6. Doku Örneklerinde Tümör Nekrosis Faktör- $\alpha$ Ölçüm Yöntemi

Doku supernatantlarında TNF- $\alpha$  düzeyleri ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemiyle Elabsc, ince ticari kiti (Kat No: E-EK-R0019) kullanılarak çalışıldı. Örnekler antijen kaplı plağın kuyucuklarına konarak, 37 °C'de enkübe edildi ve daha sonra antikor eklendi. Yıkama basamaklarından sonra substrat solüsyonu eklendi, mavi renkler oluştuğundan sonra reaksiyonu sonlandırıcı reaktif eklendi ve oluşan sarı renk mikroplak okuyucuda (ELx800) 450 nm'de okundu. Örneklerdeki, konsantrasyonlar kitin içinden çıkan standartlar yardımı ile cihaz tarafından çizilen grafikten otomatik olarak hesaplandı. Kitin



sensitivitesi 46.88 pg/ml, saptama aralığı 78.13-5000 pg/ml olarak verilmiş oluop % CV'si <10'dur.

### **3.6.3. Histopatolojik Değerlendirme**

Histopatolojik inceleme için kolon örnekleri %10'luk tamponlu formaldehid solüsyonunda 24-48 saat tespit edilerek doku takip cihazında bilinen yöntemlerle takip edildi ve parafine gömüldü. Parafin bloklardan normal ve adezivli lamlara kesitler alındı. Normal lamlara alınan kesitler hematoksilin-eozin (H-E) ile boyandı (Culling, Allison ve Barr, 1985). Adezivli lamlara alınanlar ise immunohistokimyasal incelemelerde kullanılmak üzere ayrıldı. Hazırlanan tüm preparatlar ışık mikroskobunda (Olympus BX51) incelendi ve mikroskobik dijital fotoğraflar (Olympus SC180) elde edildi. Anastomoz bölgesinde karşılaşılan histopatolojik değişiklikler (polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu, epitelizasyon, nekroz) lezyonun şiddetine göre semikantitatif (skor 0; lezyon yok, skor 1; hafif, skor 2; orta, skor 3; şiddetli) olarak skorlandı.

#### **3.6.3.1. Anastomoz Hattında Granülasyon Dokusu Kalınlığının Ölçülmesi**

H-E ile boyanan kesitler 40x objektif büyütmesinde incelendi. Anastomoz hattında yangısal değişikliklerin tabanından başlayıp serozaya kadar uzanan granülasyon dokusunun kalınlığı ölçüldü. Bu amaçla; her bir örnek için üç ölçüm yapıldı, ölçülen değerlerin ortalaması alınarak hesaplanan değer incelenen ratın verisi olarak kaydedildi.

#### **3.6.3.2. Anastomoz Hattında Makrofaj Yoğunluğunun Belirlenmesi**

Anastomoz bölgesindeki makrofaj yoğunluğunu değerlendirmek için kolon kesitleri makrofajlara özgü Iba1 primer antikoru ile boyandı. Bu amaçla; kesitler ksilol ve konsantrasyonu gittikçe azalan alkol serilerinden geçirilerek sırasıyla deparafinize ve rehidre edildi. Bu aşamadan sonra uygulanan tüm işlemler arasında kesitler 3'er kez beşer dakika TBS-T (pH: 7.6) solüsyonu ile yıkandı. Dokuların endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için kesitler metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. Antijenik reseptörlerin açığa çıkarılması amacıyla kesitler sitrat tamponunda (pH: 6.0) 95 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Kesitler TBS-T'de hazırlanmış %3'lük BSA solüsyonu ile 1:4000 oranında sulandırılan polikonal tavşan anti-Iba1 antikoru (Wako, 013-27691, Japonya) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Ardından HRP işaretli anti-tavşan IgG (Catalog #RC542, Biocare, USA) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Son

olarak kesitler 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Quanto chromogen and substrate, Thermo scientific, USA) solüsyonunda 10-15 dakika tutularak kromojenik reaksiyon sağlandı. Reaksiyonun varlığı ışık mikroskobu ile kontrollü bir şekilde gerçekleştirildikten sonra, karşıt boyama için Mayer hematoksilen ile boyandı. Anastomoz oluşturulan bölgede makrofaj yoğunluğunu belirlemek her bir kesit için ışık mikroskobunda 20x objektif büyütmesinde boyanma karakterini en iyi yansıtan 5 ayrı alan incelendi. Her alanda pozitif boyanan hücreler sayıldı, incelenen 5 alanın ortalaması alınarak bulunan değer o hayvanın verisi olarak kaydedildi.

### **3.6.3.3. Anastomoz Hattında Yara Dudakları Arasındaki Mesafenin Ölçülmesi**

H-E ile boyanan kesitler 40x büyütmede incelendi. Anastomoz hattında yara dudakları arasındaki mesafe ölçüldü. Her bir örnek için üç ölçüm yapıldı, ölçülen değerlerin ortalaması alınarak hesaplanan değer incelenen ratın verisi olarak kaydedildi.

### **3.7. DiI ile İşaretlenmiş Kök Hücrelerin Tespiti**

Kök hücre uygulaması yapılan gruplarda anastomoz bölgesindeki kök hücrelerin yerleşimini değerlendirmek için doku örneklerinden dondurma mikrotomu ile 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. TBS-T solüsyonu ile yıkanan kesitler DAPI solüsyonu ile muamele edilerek çekirdek boyaması gerçekleştirildi. Takiben kesitler immunmount ile kaplandı. Hazırlanan preparatlar immunfloresan mikroskopta (Olympus BX53) 565 nm dalga boyunda incelendi.

### **3.8. İstatistiksel Yöntem**

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanıldı. Değişkenler ortalama±standart sapma ve ile yüzde ve frekans değerleri kullanıldı. Değişkenler normallik, varyansların homojenliği ön şartlarının kontrolü yapıldıktan sonra (Shapiro Wilk ve Levene Testi) değerlendirildi. Veri analizi yapılırken, üç ve daha fazla grup karşılaştırması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi ile sağlanmadığında ise Kruskal Wallis ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni-Dunn testi kullanıldı. Kategorik veriler Fisher's Exact Test ve Ki Kare testi ile analiz edildi. Beklenen frekansların % 20'denküçük olduğu durumlarda bu frekansların analize dâhil

edilmesi için “Monte Carlo Simulasyon Yöntemi” ile değerlendirme yapıldı. Testlerin anlamlılık düzeyi için  $p < 0,05$  ve  $p < 0,01$  değeri kabul edildi.



## 4. BULGULAR

Yedi gün süren deney sürecinde deney hayvanlarından ölen ya da deney dışı bırakılan olmadı.

### 4.1. Fiziksel Değerlendirme Bulguları

#### 4.1.1. Anastomoz Patlama Basıncı Ölçüm Sonuçları

Tablo 4.1. Anastomoz patlama basınçları (mmHg) (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

	Grup 1 Anastomoz patlama basıncı (mmHg)	Grup 2 Anastomoz patlama basıncı (mmHg)	Grup 3 Anastomoz patlama basıncı (mmHg)	Grup 4 Anastomoz patlama basıncı (mmHg)
1	0*	82	149	114
2	26	123	110	195
3	0*	163	85	119
4	169	82	185	107
5	189	147	102	225
6	129	130	128	187
7	150	0*	144	135
8	160	163	211	126
9	174	85	123	174
10	157	156	161	157

Tablo 4.1'de “\*” ile gösterilen değerler anastomozda kaçak olduğu için ölçüm yapılamayan sonuçlardır.

Tablo 4.2. Anastomoz patlama basınçları ölçüm sonuçları değerlendirilmesi (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

Anastomoz	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
Patlama Basınçları	144,25±50,9 3	125,67±34,7 4	139,8±38,59	153,9±40	0,52

Tablo 4.3. Anastomoz kaçağı dağılımı. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

			Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Toplam	p
Anastomoz Kaçağı	Yok	n (%)	8 (21,6)	9 (24,3)	10 (27)	10 (27)	37 (100)	0,598
	Var	n (%)	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	

Anastomoz patlama basınçları karşılaştırıldığında hiçbir grupta ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (p:0,52). Anastomoz kaçağı açısından bakıldığında ise Grup 3 ve Grup 4'te anastomoz kaçağı gözlenmezken, Grup 1'de iki adet, Grup 2'de 1 adet anastomoz kaçağı izlendi. İstatistiksel olarak anastomoz kaçağı dağılımında anlamlı farklılık saptanmadı (p:0,598). (Tablo 4.3)

#### 4.1.2. Karın İçi Yapışıklıklar

Tablo 4.4. Karın içi yapışıklık düzeyleri (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

			Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Toplam	p
Karın İçi Yapışıklık Düzeyleri	Hafif	n (%)	0 (0)	4 (28,6)	6 (42,9)	4 (28,6)	14 (100)	0,043
	Orta	n (%)	4 (30,8)	2 (15,4)	2 (15,4)	5 (38,5)	13 (100)	
	İleri	n (%)	6 (46,2)	4 (30,8)	2 (15,4)	1 (7,7)	13 (100)	

Sakrifiye edilen ratlarda post-operatif beşinci günde izlenen karın içi yapışıklık düzeyleri kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p:0,043). (Tablo 4.4) Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 1 ile 3 arasında, Grup 1 ile 4 arasında anlamlı farklılık saptanmış (sırasıyla p: 0,007, 0,007). Grup 1 ile 2, Grup 2 ile 3, Grup 2 ile 4, Grup 3 ile 4 arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (sırasıyla p: 0,074, 0,222, 0,292, 0,497). Grup 1'de izlenen yapışıklık düzeyleri diğer gruplara göre daha ileri düzeydedir.

## 4.2. Biyokimyasal Parametreler

### 4.2.1. Dokuda Hidroksiprolin Düzeyi

Tablo 4.5. Hidroksiprolin (HYP) düzeyleri ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  yaş doku) (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

	Grup 1 HYP	Grup 2 HYP	Grup 3 HYP	Grup 4 HYP
1	0,54281	0,87983	1,51477	0,75503
2	0,47027	0,56174	0,62666	0,53826
3	0,27336	0,57641	0,58089	1,31328
4	0,54476	0,55074	0,62792	0,64384
5	0,57844	0,46907	1,04050	0,65461
6	0,47813	0,55037	0,71559	0,67771
7	0,66777	0,52322	0,65973	0,71546
8	0,53478	0,51054	0,53642	0,75769
9	0,27137	0,49216	1,26868	0,62225
10	0,56046	0,51938	0,73037	0,76929

Tablo 4.6. Doku hidroksiprolin (HYP) düzeylerinin değerlendirilmesi (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

HYP düzeyleri	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	0,54 (0,42- 0,46)	0,54 (0,50- 0,56)	0,69 (0,61- 1,10)	0,69 (0,63- 0,76)	0,001

Doku hidroksiprolin düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p:0.001$ ). (Tablo4.6) Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 1 ile 2 arasında, Grup 3 ile 4 arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Grup 1 ile 3, Grup 1 ile 4, Grup 2 ile 3 ve Grup 2 ile 4 arasında anlamlı fark mevcuttur. Grup 3 ve Grup 4'te saptanan hidroksiprolin düzeyi Grup 1 ve Grup 2'ye göre daha yüksek ölçülmüştür.

#### 4.2.2. Dokuda Nitrik Oksit Düzeyi

Tablo 4.7. Nitrik oksit (NO) düzeyleri ( $\mu\text{M/g}$  yaş doku) (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

	Grup 1 NO	Grup 2 NO	Grup 3 NO	Grup 4 NO
1	0,2295	0,2373	0,3367	0,3857
2	0,1718	0,1713	0,4677	0,4004
3	0,1833	0,2181	0,1214	0,2552
4	0,1672	0,1755	0,1718	0,4187
5	0,2199	0,2126	0,0930	0,2639
6	0,1718	0,1297	0,2863	0,2167
7	0,2451	0,2217	0,2139	0,1649
8	0,1965	0,1933	0,3083	0,3825
9	0,2199	0,1819	0,1993	0,3074
10	0,1681	0,2405	0,2222	0,2639

Tablo 4.8. Doku nitrik oksit (NO) düzeylerinin değerlendirilmesi (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

NO düzeyleri	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	0,19(0,17-0,22)	0,20(0,17-0,22)	0,21(0,15-0,31)	0,28(0,24-0,38)	0,01

Nitrik oksit düzeylerine bakıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu( $p:0,01$ ). (Tablo 4.8) Gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı farklılık bulunmazken Grup 4 ile diğer üç grup arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Grup 4'te ölçülen nitrik oksit düzeyi diğer üç grupta ölçülen değerden daha yüksek bulunmuştur.

#### 4.2.3. Dokuda Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Düzeyi

Çalışmamızda alınan doku örneklerinden VEGF düzeyleri değerlendirilmiş olup, alınan hiçbir doku örneğinde ölçüm yapılabilecek kadar VEGF saptanmamıştır. Bu nedenle VEGF düzeyleri ile değerlendirilme yapılamamaktadır.

#### 4.2.4. Dokuda Miyeloperoksidaz Düzeyi

Tablo 4.9. Miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri (U/g yaş doku) (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

	Grup 1 MPO	Grup 2 MPO	Grup 3 MPO	Grup 4 MPO
1	678,87	98,88	1711,11	3551,13
2	231,32	182,89	1405,95	3001,77
3	735,12	23,42	116,96	916,30
4	888,07	15,40	893,17	2899,79
5	75,82	22,56	209,52	2807,03
6	292,83	200,35	912,96	530,31
7	962,33	32,77	546,17	103,25
8	499,77	590,88	1742,65	1793,54
9	556,09	24,48	195,450	785,40
10	339,22	768,46	389,170	1447,79

Tablo 4.10. Doku miyeloperoksidaz (MPO) düzeylerinin değerlendirilmesi (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

MPO düzeyleri	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	527,9(277,4-773,4)	65,8(23,2-298,0)	719,7(206,0-1478,2)	1620,7(721,6-2925,3)	0,001

Miyeloperoksidaz düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmıştır. (p:0,001) (Tablo 4.10) Gruplar arası değerlendirmede Grup 1 ile 2, Grup 1 ile 4, Grup 2 ile 3, Grup 2 ile 4 ve Grup 3 ile 4 arasında anlamlı farklılık mevcuttur. Grup 1 ile Grup 3 arasında



anlamli fark bulunmamıştır. Ölçülen MPO değerleri Grup 1 ve Grup 3'e göre; Grup 2'de daha düşük, Grup 4'te daha yüksek bulunmuştur.

#### 4.2.5. Dokuda Tümör Nekrosis Faktör- $\alpha$ Düzeyi

Tablo 4.11. Tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) düzeyleri (pg/g yaş doku) (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

	Grup 1 TNF- $\alpha$	Grup 2 TNF- $\alpha$	Grup 3 TNF- $\alpha$	Grup 4 TNF- $\alpha$
1	371,67	333,33	408,33	448,33
2	385,00	343,33	531,67	585,00
3	321,67	261,67	545,00	475,00
4	265,00	271,67	408,33	331,67
5	345,00	385,00	478,33	438,33
6	375,00	341,67	521,67	495,00
7	355,00	431,67	568,33	518,33
8	235,00	485,00	478,33	498,33
9	313,33	395,00	445,00	458,33
10	240,00	328,33	485,00	545,00

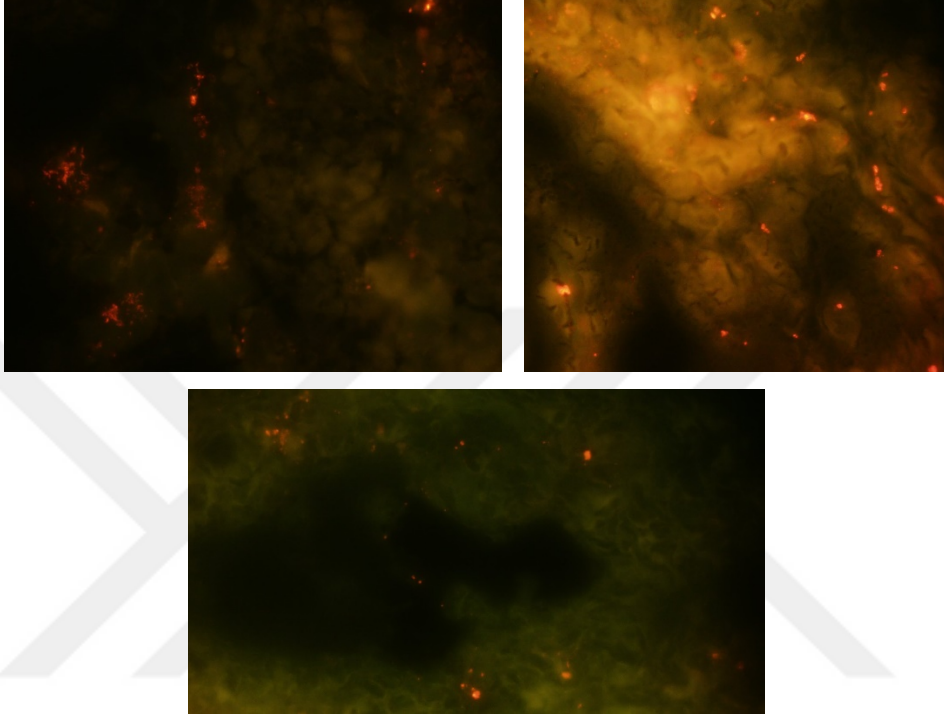
Tablo 4.12. Doku tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) düzeylerinin değerlendirilmesi. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

TNF- $\alpha$ düzeyleri	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	320,67 $\pm$ 56,24	357,67 $\pm$ 68,6	487 $\pm$ 55,25	479,33 $\pm$ 68,73	0,001

TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark vardır (p:0,001). (Tablo 4.12) Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 1 ile 2 arasında, Grup 3 ile 4 arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Grup 1 ile 3, Grup 1 ile 4, Grup 2 ile 3 ve Grup 2 ile 4 arasında anlamlı fark mevcuttur. Grup 3 ve Grup 4'te saptanan TNF- $\alpha$  düzeyi Grup 1 ve Grup 2'ye göre daha yüksek ölçülmüştür.

### 4.3. DiI ile İşaretlenmiş Kök Hücrelerin Görüntülenmesi

İmmunfloresan mikroskopta (Olympus BX53) incelenen preparatlarda anastomoz bölgesinde kök hücrelerin varlığı görüldü. Dijital görüntüleme cihazıyla (Olympus DP74) görüntüler kayıt altına alındı (Resim 4.1).

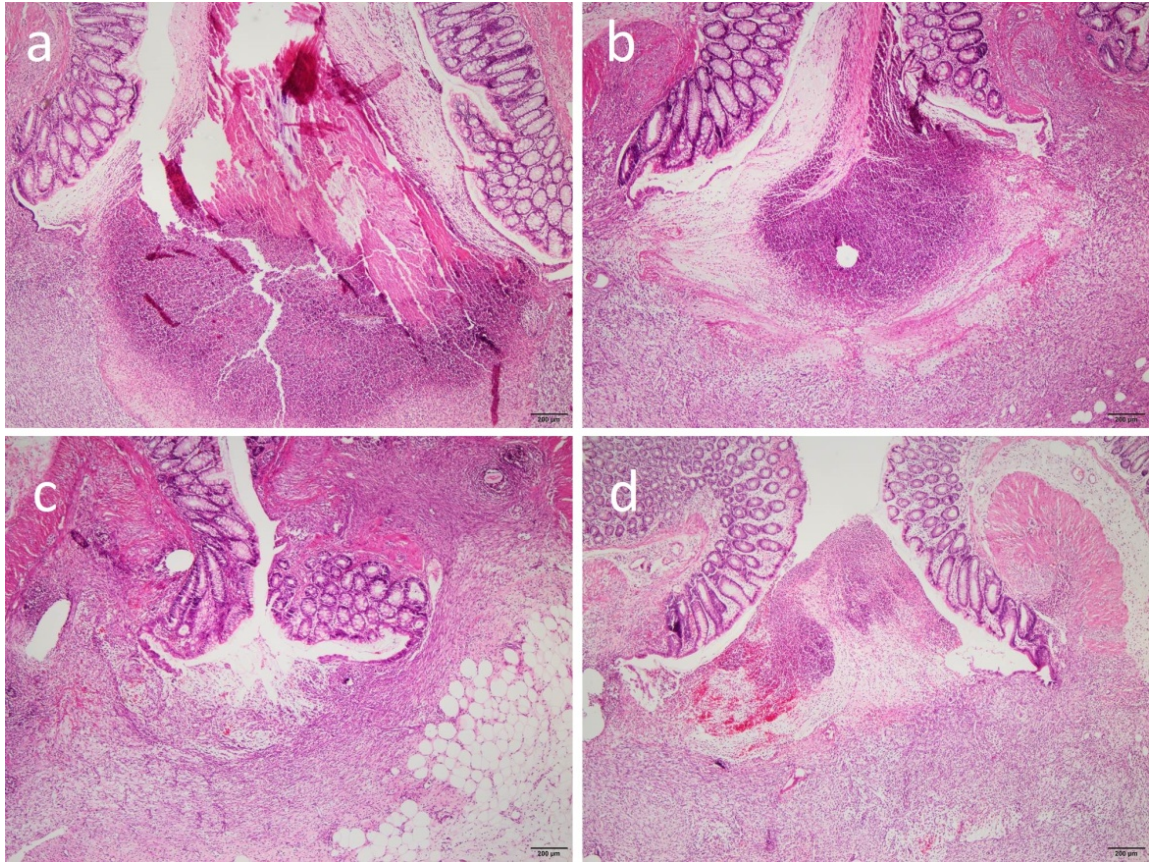


Resim 4.1. DiI ile boyanmış kök hücreler.

### 4.4. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Kontrol grubundaki ratların kolon kesitleri incelendiğinde; anastomoz bölgesinde doku bütünlüğünün bozulduğu dikkati çekti. Mukoza tamamen yıkımlanarak eozinofilik nekrotik bir kitle halini almıştı. Nekrotik kitlenin tabanı yoğun karyorektik hücreler, fibrinden zengin ödem sıvısı, nötrofil lökositler ve makrofajlardan oluşan yoğun yangısal hücre infiltrasyonları ile çevrelenmişti. Nekrotik doku artıkları içerisinde ve yara dudaklarında dikiş materyalleri görülmekteydi. Yangısal değişikliklerin hemen tabanından başlayan ve serozaya kadar uzanan bağ doku proliferasyonları göze çarptı. Bu rejeneratif kuşak yeni damar oluşumlarını içeren ve yangısal hücre infiltrasyonlarını da barındıran genç granülasyon dokusu şeklindeydi. Mukoza yüzeyinde, ülser alanının hemen kenarındaki bütünlüğünü koruyan epitelden başlayan ve ülser alanına doğru uzanan yeni epitel oluşumları (reepitelizasyon) dikkati çekti.

Sildenafil ve kök hücre uygulamalarının histopatolojik değişiklikler üzerindeki etkileri başlıklar halinde verildi. Deney gruplarına ait temsili mikrograflar Resim 4.2’de sunuldu.



Resim 4.2. Hematoksilen-Eozin ile boyanmış preparatlar (a: Kontrol grubu, b: Sildenafil grubu, c: Kök hücre grubu, d: Kök hücre+Sildenafil grubu)

#### 4.4.1. Reepitelizasyon

Deney sonunda alınan örneklerin hiçbirinde tam epitelizasyonun sağlanmadığı görülmüştür. O nedenle hiçbir grupta ileri düzey (tam) reepitelizasyon yoktur.

Tablo 4.13 Anastomoz hattında izlenen reepitelizasyon düzeyleri (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

			Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Toplam	p
Reepitelizasyon Düzeyleri	Yok	n (%)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	0,001
	Hafif	n (%)	7 (22,6)	10 (32,3)	4 (12,9)	10 (32,3)	31 (100)	
	Orta	n (%)	0 (0)	0 (0)	6 (100)	0 (0)	6 (100)	

Reepitelizasyon düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p:0,001). (Tablo 4.13) Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 1, Grup 2 ve Grup 4 arasında anlamlı farklılık saptanmamış olup Grup 3 ile diğer üç grup arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p<sub>1-3</sub>: 0,002, p<sub>2-3</sub>: 0,011, p<sub>3-4</sub>: 0,011). Örneklerde izlenen en iyi reepitelizasyon düzeyi olan orta düzeyde epitelizasyon sadece Grup 3'te izlenmiştir.

#### 4.4.2. Nekroz Miktarı

Tablo 4.14. Alınan örneklerde izlenen nekrotik doku düzeyleri (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

			Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Toplam	p
Nekrotik Doku Düzeyleri	Hafif	n (%)	0 (0)	0 (0)	6 (75)	2 (25)	8 (100)	0,001
	Orta	n (%)	0 (0)	6 (33,3)	4 (22,2)	8 (44,4)	18 (100)	
	Yoğun	n (%)	10(71,4)	4 (28,6)	0 (0)	0 (0)	14 (100)	

Alınan örneklerde nekroz yoğunluğu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur(p:0,001). (Tablo 4.14) Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 1 ile 2, Grup 1 ile 3, Grup 1 ile 4, Grup 2 ile 3 ve Grup 2 ile 4 arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (sırasıyla p: 0,011, <0,001, <0,001, 0,001, 0,015). Grup 3 ile 4 arasında istatistiksel olarak

anlamli bir fark saptanmamıştır (p: 0,170). En yoğun nekrotik doku miktarı Grup 1’de izlenmiş olup, bunu Grup 2 takip etmektedir. Grup 3 ve 4’te izlenen nekrotik doku miktarı ise diğer gruplara göre daha azdır.

#### 4.4.3. Polimorfonükleer Lökosit İnfiltrasyonu

Tablo 4.15. Alınan örneklerde izlenen PMNL infiltrasyon düzeyleri (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

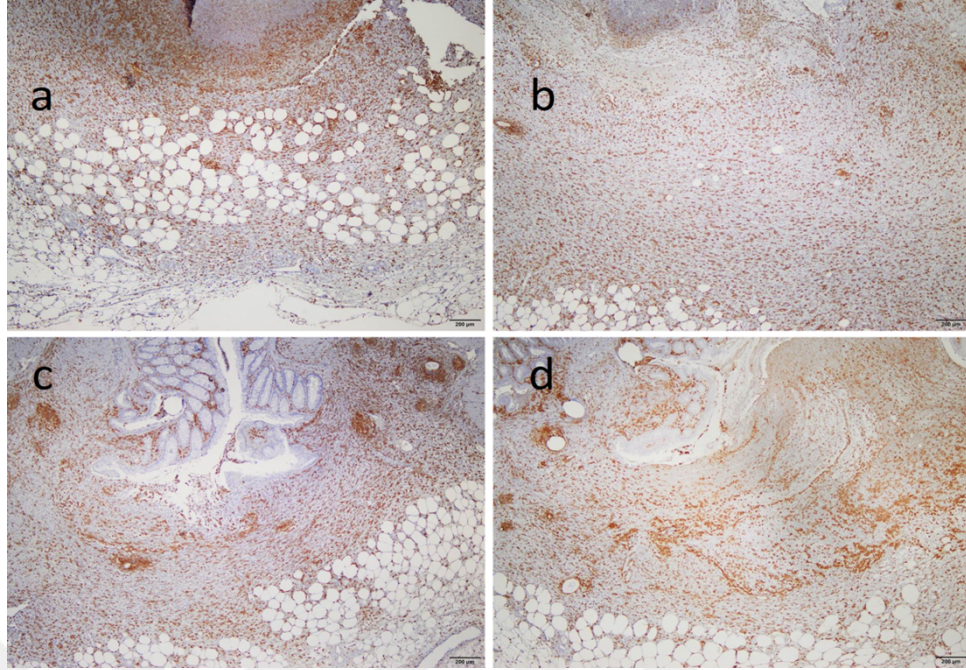
		Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Toplam	p	
PMNL İnfiltrasyonu Düzeyleri	Hafif	n (%)	0 (0)	0 (0)	6 (66,7)	3 (33,3)	9 (100)	0,001
	Orta	n (%)	0 (0)	4 (26,7)	4 (26,7)	7 (46,7)	15 (100)	
	Yoğun	n (%)	10(62,5)	6 (37,5)	0 (0)	0 (0)	16 (100)	

Örneklerde yapılan incelemede PMNL infiltrasyonu açısından gruplar arasında anlamlı farklılık vardır (p:0,001). (Tablo 4.15)Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 1 ile 3, Grup 1 ile 4, Grup 2 ile 3 ve Grup 2 ile 4 arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (sırasıyla p:<0,001, <0,001, <0,001, 0,002). Grup 1 ile 2 ve Grup 3 ile 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (sırasıyla p: 0,087, 0,370). PMNL infiltrasyonu en yoğun Grup 1’de, ardından Grup 2’de izlenmiştir. Grup 3 ve Grup 4’te diğer gruplara göre daha hafif PMNL infiltrasyonu vardır.

#### 4.4.4. Makrofaj Yoğunluğu

Anastomoz bölgesindeki makrofaj yoğunluğunu değerlendirmek için kolon kesitleri makrofajlara özgü Iba-1 immun belirteci ile boyandı. Deney gruplarına ait temsili mikrograflar Resim 4.3’de sunuldu.





Resim 4.3. Iba-1 primer antikorunu ile boyanmış preparatlar (a: Kontrol grubu, b: Sildenafil grubu, c: Kök hücre grubu, d: Kök hücre+Sildenafil grubu)

Deney gruplarında anastomoz bölgesindeki Iba-1 pozitif hücre sayıları ve gruplar arası istatistiksel farklılıklar sırasıyla Tablo 4.16 ve Tablo 4.17’de sunulmuştur.

Tablo 4.16. Makrofaj sayıları (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

	Grup 1 Makrofaj	Grup 2 Makrofaj	Grup 3 Makrofaj	Grup 4 Makrofaj
1	416	389	345	416
2	425	399	340	421
3	421	376	335	437
4	427	394	350	433
5	416	392	347	435
6	403	374	342	423
7	407	379	356	412
8	402	384	341	415
9	414	386	336	424
10	418	382	343	434

Tablo 4.17. Makrofaj sayılarının değerlendirilmesi (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

Makrofaj sayıları	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	414,9±8,62	385,5±8,09	343,5±6,35	425±9,19	0,001

Makrofaj sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık mevcuttur (p:0,001). (Tablo 4.17) Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 1 ile 2, Grup 1 ile 3, Grup 2 ile 4 ve Grup 3 ile 4 arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark mevcuttur. Grup 1 ile 4 ve Grup 2 ile 3 arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır.

#### 4.4.5. Yara Dudakları Arasındaki Mesafe

Örneklerde ışık mikroskobu altında yapılan, anastomozu oluşturan iki kolon ucu arasındaki mesafe ölçüm değerleri tabloda verilmiştir. (Tablo 4.18)

Tablo 4.18. Yara dudakları arasındaki mesafe ( $\mu\text{m}$ ) (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

	Grup 1 Mesafe	Grup 2 Mesafe	Grup 3 Mesafe	Grup 4 Mesafe
1	1024	482	160	368
2	1173	380	124	397
3	1043	420	185	382
4	1253	484	89	415
5	1100	465	158	402
6	950	434	164	381
7	1149	420	160	361
8	1024	397	236	375
9	1168	380	179	387
10	1045	468	142	357

Tablo 4.19. Yara dudakları arasındaki mesafenin değerlendirilmesi (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

Yara dudakları arasında ki mesafe	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	1092,9±91,64	433±40,14	159,7±38,65	382,5±18,4	0,001

Anastomoz yapılan iki kolon ucu arasındaki mesafe ölçümleri açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmıştır (p:0,001). (Tablo 4.19) Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; Grup 1 ile 2, Grup 1 ile 3, Grup 1 ile 4, Grup 2 ile 3 ve Grup 3 ile 4 arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark mevcuttur. Grup 2 ile 4 arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Yapılan ölçümlerde iki yara dudağı arasındaki mesafe en çok Grup 1’de izlenmiştir. Grup 3’te ise diğer gruplara göre mesafenin daha yakın olduğu izlenmektedir.

#### 4.4.6. Granülasyon Dokusu Kalınlığı

Örneklere ışık mikroskobu altında yapılan, anastomoz hattında izlenen granülasyon dokusu kalınlık ölçüm değerleri tabloda verilmiştir. (Tablo 4.20)

Tablo 4.20. Granülasyon dokusu kalınlığı (µm) (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

	Grup 1 Granülasyon dokusu	Grup 2 Granülasyon dokusu	Grup 3 Granülasyon dokusu	Grup 4 Granülasyon dokusu
<b>1</b>	1317	1522	956	1314
<b>2</b>	1672	1688	874	1194
<b>3</b>	1225	1500	870	797
<b>4</b>	1138	1677	883	1109
<b>5</b>	1321	1545	934	1321
<b>6</b>	1247	1621	920	1056
<b>7</b>	1400	1640	875	1015
<b>8</b>	1375	1600	869	1181
<b>9</b>	1514	1626	1020	954
<b>10</b>	1484	1520	857	1045



Tablo 4.21. Granülasyon dokusu kalınlıklarının değerlendirilmesi (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Sildenafil, Grup 3: Kök hücre, Grup 4: Kök hücre+Sildenafil)

Granülasyon dokusu kalınlığı	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	1369,3±156,7	1593,9±67,93	905,8±51,7	1098,6±161,73	0,001
	2				

Anastomoz hattında oluşan granülasyon dokusu kalınlıkları kıyaslandığında gruplar arası anlamlı farklılık mevcuttur (p:0,001). (Tablo 4.21) Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında; Grup 1 ile 2 arasında, Grup 3 ile 4 arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Grup 1 ile 3, Grup 1 ile 4, Grup 2 ile 3 ve Grup 2 ile 4 arasında anlamlı fark mevcuttur. Grup 3 ve Grup 4'te ölçülen granülasyon dokusu kalınlığı, Grup 1 ve Grup 2'ye göre daha düşüktür.

## 5. TARTIŞMA

Genel cerrahi ameliyatlarının önemli bir bölümünü gastrointestinal sistem cerrahileri oluşturmaktadır. Bu ameliyatların yine önemli bir kısmında anastomoz yapılması gerekmektedir. Anastomoz kaçakları ciddi morbidite ve mortaliteye sebep olmaktadır. (64) Son yapılan çalışmalarda anastomoz kaçak oranı %1-19 olarak bildirilmiştir. (4) Bu oranı azaltmak için araştırmalar yapılmakta ve gastrointestinal sistemde yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkileyecek yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmaların bir bölümünü kök hücre tedavisi oluşturmaktadır. (12) Özellikle adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin kolay elde edilebilmesi, kolay çoğaltılabilmeleri ve birçok dokuya farklılaşabilmesi, kök hücrelerin vücudun farklı dokularında yara iyileşmesine sağladığı olumlu katkı, gastrointestinal sistem cerrahilerinde de araştırmaların artmasına sebep olmuş ve anastomoz iyileşmesine olumlu katkı sağladığı gösterilmiştir. (12) Adipoz doku kaynaklı kök hücreler, kemik iliği kaynaklı kök hücreler ile kıyaslandığında mm<sup>3</sup> başına 100-1000 kat daha fazla pluripotent hücre içermesi, elde edilmesinin kolaylığı ve en az kemik iliği kaynaklı kök hücreler kadar birçok dokuya farklılaşabilmesi adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin kullanımını yaygınlaştırmıştır. (65-67) Daha önce yapılan çalışmaların değerlendirilmesi neticesinde, bu çalışmada kemik iliği kaynaklı kök hücreler yerine adipoz doku kaynaklı kök hücre kullanılması tercih edilmiştir.

Yara iyileşmesine oksidatif stresi ve enflamasyonu azaltarak katkıda bulunduğu gösterilen sildenafil sitratın kolon anastomoz iyileşmesi üzerine etkileri hakkındaki çalışmalar henüz kısıtlı sayıdadır. Sildenafil sitrat potent ve yüksek selektif bir PDE5 inhibitörüdür. Vasküler yapılarda bulunan düz kas hücreleri üzerindeki PDE5 reseptörleri üzerinden etki göstererek vazodilatasyonu sağlamaktadır. (55) Farklı dokulardaki PDE5 dağılımı ve aktivitesi araştırılmış ve en yüksek değer corpus cavernosum'da, en düşük değer de corpus cavernosum'dan %50 az olmak üzere mezenterik arterde bulunmuştur. (68) Çeşitli çalışmalarda sildenafil sitratın farklı dokularda ve kolon anastomozlarında yara iyileşmesine olumlu katkı sağladığı gösterilmiştir.(55, 69-72)

Çalışmamızda ratlarda kolon anastomozu üzerine sildenafil sitratın ve kök hücre tedavisinin etkileri birlikte ve ayrı ayrı olacak şekilde incelendi. Bu inceleme yapılırken karın içi yapışıklıklar, anastomoz patlama basıncı, perianastomotik dokuda hidroksprolin, nitrik oksit, miyeloperoksidaz, TNF- $\alpha$ , VEGF düzeyleri, histopatolojik olarak da anastomoz bölgesinde reepitelizasyon, polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu, nekrotik doku yoğunluğu,

makrofaj yoğunluğu, granülasyon dokusu kalınlığı ve yara dudakları arasındaki mesafe incelendi. Deney boyunca hiçbir grupta deney hayvanlarından ölen ve deney dışı bırakılan olmadı. Deney yapılan tüm ratlarda VEGF düzeyinin ölçüm yapılabilecek düzeye ulaşmadığı saptandı ve ölçüm yapılamadı. Bu nedenle VEGF düzeyleri çalışmaya dâhil edilemedi. Grup 1’de 2 adet, Grup 2’de 1 adet anastomoz kaçağı izlenmiş olup diğer gruplarda anastomoz kaçağı izlenmemiştir. Anastomoz kaçağı olan ratlarda anastomoz patlama basıncı ölçümü yapılamamıştır.

Anastomoz patlama basıncı anastomoz iyileşmesinin ve anastomoz sağlamlığının en önemli parametrelerindedir. Anastomoz hattının en zayıf bölgesinin tespitini sağlar. Temel olarak kollajen yoğunluğu ile ilişkilidir. Jong Han Yoo ve ark’nın çalışmasında iskemik kolon anastomozunun iyileşmesinde kök hücrenin etkisi araştırılmış ve bu araştırma sonucunda anastomoz patlama basıncı ile kollajen miktarının doğru orantılı arttığı gösterilmiştir. (73) Ayrıca Cronin ve ark’nın yaptığı anastomoz patlama basıncı ölçümlerinde post-operatif üçüncü günden itibaren patlama basıncının giderek arttığı, 7-10. Günlerde maksimum düzeye ulaştığı, aynı zamanda hidrokspirolin düzeylerinin de ilk üç günde %40 azaldığı, yaklaşık beşinci günden itibaren normale yaklaştığı, 10-14. günlerde normal değerinin üzerine çıktığı bildirilmiştir. (74) Hasanoglu ve ark’nın sildenafil sitratın kolon anastomozu üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada sildenafil sitrat verilen grubun anastomoz patlama basıncı kontrol grubuna göre yüksek ölçülmüştür. (71) Karakaya ve ark’nın çalışmasında dördüncü günde sakrifiye edilen ratlarda kök hücre verilen grubun anastomoz patlama basıncı ortalaması diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuşken, yedinci günde sakrifiye edilen ratlarda anastomoz patlama basıncı açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. (75) Bizim çalışmamızda ratlar beşinci günde sakrifiye edilmiş olup patlama basınçları karşılaştırıldığında dört grup arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Diğer çalışmalar da göz önüne alındığında kök hücre uygulamasının, anastomoz patlama basıncına, anastomozun ilk günlerinde daha etkili olabileceğini, ilerleyen günlerde bu farkın azalabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle anastomozun daha erken ve daha geç dönemlerinde anastomoz patlama basıncı ölçümlerinin değerlendirilebileceği daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda anastomozun en ciddi komplikasyonu olan anastomoz kaçağı Grup 1’de iki, Grup 1’de bir olmak üzere toplam üç (%7,5) ratta görüldü. Tzu-Chi Hsu acil ya da zorunlu, barsak temizliği sağlanamayan hastalarda barsağın gaita ile dolu olması nedeniyle yapılan barsak anastomozlarının kaçak riskinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. (76) Anastomoz

kaçığı riskini arttıran birçok sistemik ve lokal faktörler mevcut olup bunlar arasında cerrahın kontrolünde olan anastomoz hattının vaskülaritesi, gerginliği ve uygulanan cerrahi tekniktir. Çalışmamızda preoperatif barsak temizliği yapılmamış olup operasyon sırasında anastomoz bölgesine yakın distal ve proksimaldeki fekal içerik boşaltılmıştı. Operasyon yapılan ratlarda maksimum standardizasyon sağlanmış olup tüm ratlarda kolonun vasküler yapısı korunarak, uçlar arasında gerginlik oluşmayacak şekilde anastomozlar yapılmıştır. Anastomoz kaçak oranı açısından gruplar arası anlamlı farklılık saptanmamasına rağmen kök hücre uygulanan Grup 3 ve Grup 4'te kaçak izlenmemiştir.

Karın içi yapışıklıklar barsak obstrüksiyonlarına, iskemisine ve bunların sonucunda tekrarlayan operasyonlara neden olmaktadır. (77) Çalışmamızda karın içi yapışıklıklar değerlendirildiğinde deney grupları arasında anlamlı farklılıklar saptandı (p:0,043) Grup 1'de izlenen yapışıklık düzeyleri tüm ratlarda ileri düzeydeydi. Grup 2 ile arasında anlamlı fark izlenmese de Grup 3 ve Grup 4 ile kıyaslandığında yapışıklık düzeyi anlamlı olarak daha fazlaydı. Grup 1'de izlenen karın içi yapışıklık düzeyinin fazla olmasında gelişen anastomoz kaçaklarının da etkisinin olduğunu düşünmekteyiz. Fakat Grup 1'de hiç hafif düzeyli yapışıklık izlenmemiş olması anastomoz kaçakları dışında farklı sebeplerinde bu duruma etkisinin olduğunu göstermektedir. Pascual ve ark'nın yaptığı ve Jong Han Yoo ve ark'nın yapmış olduğu çalışmalarda kök hücre uygulamasının bizim çalışmamızdaki gibi karın içi yapışıklık oluşumunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. (73, 78)

Biyokimyasal olarak anastomoz değerlendirilmesinde doku hidrokspirolin düzeyi, anastomoz bölgesindeki kollajen miktarı ile doğru orantılı olup, yara iyileşmesinin en önemli göstergelerinden biridir. Kolon anastomozu iyileşmesi ile ilgili çalışmalarda en sık kullanılan parametrelerdendir. Çalışmamızda hidrokspirolin düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p:0,001).Gruplar arası karşılaştırmada; Grup 1 ile 2 arasında ve 3 ile 4 arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Grup 1 ile Grup 3 arasında, Grup 1 ile Grup 4 arasında, Grup 2 ile Grup 3 arasında ve Grup 2 ile Grup 4 arasında anlamlı farklılık olduğu ve Grup 3 ile 4'te hidrokspirolin düzeyinin diğer gruplardan yüksek olduğu görülmüştür. Bu farkların temel olarak kök hücre tedavisi uygulanmasından kaynaklandığı, sildenafil sitrat tedavisinin hidrokspirolin düzeyine anlamlı etki göstermediği görülmüştür. Hasanoglu ve ark'nın sildenafil sitratın kolon anastomozu üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada da sildenafil sitrat grubu ve kontrol grubu arasında hidrokspirolin düzeyi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. (71) Bu da bizim sildenafil sitratın anastomoz bölgesindeki kollajen miktarını ve dağılımını etkilemediği

düşüncemizi doğrular niteliktedir. Ayrıca Caziuc ve ark'nın yapmış olduğu çalışmada kök hücre verilen gruplarda hidrokspirolin düzeyinin diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek olduğu belirtilmiştir. (12)

Enflamasyon fazının ana moleküllerinden biri nitrik oksittir. NO aktivitesi yara iyileşmesinin her aşamasında önemli rol oynamaktadır. (79) Özellikle dokuda hipoksi geliştiğinde NO miktarı artarak vazodilatasyonu sağlar ve endotele nötrofil adezyonunu sınırlayarak hipoksinin etkilerinden korumayı sağlar. (80) Sildenafil sitrat cGMP yıkımını azaltarak NO'nun etkisini güçlendirmektedir. Çalışmamızda doku NO miktarı karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p:0,01). Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı farklılık saptanmamış olup, Sildenafil sitrat ve kök hücre uygulaması yapılan Grup 4'te diğer üç gruba göre NO miktarı daha yüksek bulunmuştur. Uzun ve ark'nın ratlar üzerinde yapmış olduğu normal kolon anastomozu ve iskemik kolon anastomozunun NO düzeylerinin karşılaştırıldığı çalışmada; NO düzeyi iskemik kolon anastomozunda, normal kolon anastomozuna göre daha yüksek bulunmuştur. (81)

Miyeloperoksidaz, PNML'lerde azurofilik granüllerde bulunmaktadır., antibakteriyel özelliği vardır ve nötrofil fagolizozomlarında bu faaliyetten sorumludur. MPO nötrofillerin infiltrasyon ve aktivasyon parametresidir. Çalışmalarda inflamasyon düzeyinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. (82) Çalışmamızda doku miyeloperoksidaz düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arası anlamlı farklılık mevcuttur (p:0,001). Grup 1 ve Grup 3 MPO düzeyi Grup 2'ye göre daha yüksek, Grup 4'e göre daha düşük ölçüldü. MPO düzeyi anastomoz sağlamlığı ile direkt bağlantılı olmaktan çok, dokuda gelişen inflamasyon hakkında bilgi vermektedir. Månsson ve ark'nın yapmış olduğu çalışmada MPO düzeyinin anastomoz sağlamlığı ile doğru orantılı olmadığı, anastomoz bölgesindeki inflamasyon düzeyini gösterdiğini belirtmişlerdir. (83) MPO ölçüm sonucumuza göre Grup 4'te izlenen inflamasyon oranının en yüksek, Grup 2'de izlenen inflamasyonun en düşük olduğunu söyleyebiliriz.

TNF- $\alpha$ , makrofajlar, mast hücreleri ve T-lenfositlerde bulunurlar ve makrofajları aktive ederler. Fibroblastlar için mitojeniktir. Anjiyogenezi stimüle eder, diğer sitokinleri düzenler. TNF- $\alpha$  inflamatuvar bir marker olup tüm inflamasyon olaylarında yükseldiği gibi anastomoz kaçaklarında da erken uyarıcı bir markır olarak kabul edilmektedir. Spareboom ve ark 'nın yaptıkları bir çalışmada erken anastomoz kaçakları için TNF- $\alpha$ 'nın uyarıcı bir markır olduğu

bildirilmiştir. (84) Bizim çalışmamızda doku TNF- $\alpha$  düzeylerine bakıldığında Grup 3'ün düzeyi kontrol grubundan yüksek bulunurken, aynı şekilde sildenafil sitrat+kök hücre verilen Grup 4'ün düzeyi yine kontrol düzeyinden yüksek bulunmuştur. Kök hücre tedavisi ve sildenafil sitrat verilmesinin immün sistemi uyardığını ve TNF- $\alpha$  düzeyini yükselttiğini düşünmekteyiz. Buna ek olarak patlaşma basıncı sonucunda oluşan anastomoz kaçağı ile inflamatuvar bir marker olan TNF- $\alpha$ 'nın tamamen Grup 3 ve 4'te pik yapması bu hipotezimizi desteklemektedir.

Anastomoz bölgesinin yara iyileşmesini değerlendirmek için çalışmamızda birçok parametreyi değerlendirdik. Yara iyileşmesi için histopatolojik inceleme, nötrofil infiltrasyonu, nekroz yoğunluğu, makrofaj miktarı, granülasyon dokusu kalınlığı, anastomoz yapılan iki kolon dokusu arası mesafe gibi birçok parametre ile kullandık. Waddell ve ark 'nın inflamatuvar barsak hastalığı olan fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, yedi gün kök hücre verilmesi sonucu yara iyileşmesini kontrol etmeleri sonucunda eozinofilve monosit seviyelerinin arttığını saptarken nötrofil infiltrasyonu üzerine anlamlı farklılık saptamamışlardır. (85) Gürsoy ve ark'nın yara iyileşmesi üzerine yaptıkları çalışmada ise sildenafil sitratın yaklaşık 10 günlük sürede granülasyon dokusunda şiddetli artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. (86) Bizim çalışmamıza bakıldığında reepitelizasyon en iyi Grup 3'te bulunmuş olup kök hücrenin tek başına anastomoz iyileşme sürecine olumlu katkısı olduğunu gözlerken ek olarak sildenafil sitrat verdiğimiz Grup 4'te ise reepitelizasyonun iyi olmadığını görmekteyiz. Nekroza baktığımızda; en fazla nekrozun kontrol grubunda olduğunu görürken kök hücre ve kök hücre+sildenafil sitrat tedavisi verdiğimiz gruplarda nekrozun en az olduğunu görmekteyiz. PMNL infiltrasyonu Grup 3 ve 4'te en az iken Grup 1 ve 2'de en fazla idi. Bunun TNF- $\alpha$ 'da olduğu gibi inflamatuvar sürecin kök hücre ve sildenafil sitrat+ kök hücre gruplarında daha fazla olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Makrofaj yoğunluğu Grup 2 ve 3'te az bulunurken Grup 1 ve 4'te daha yoğun bulunmuştur. Çalışmamızda makrofaj yoğunluğu anlamsız çıkmıştır. Bu anlamsızlığın çalışmadaki süreler ya da çalışma gruplarındaki sayılardan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Yara dudakları arasındaki mesafeye baktığımızda ise en yakın mesafe Grup 3'te bulunurken en uzak mesafe Grup 1'de bulunmuştur. Reepitelizasyon grubundaki gibi en iyi yara iyileşme grubunun izole kök hücre grubu olduğunu gösteren bir bulgu olduğunu görmekteyiz.

Bu çalışmada kolon anastomozu yapılan durumlarda anastomoz hattına kök hücre uygulanmasının anastomoz iyileşmesine olumlu katkı sağladığı ve anastomoz kaçak riskini azalttığı görülmüştür.

Gastrointestinal sistem cerrahilerinde anastomoz yapılması gerektiğinde kök hücre uygulamasının anastomoz sağlamlığına katkısı olduğu düşüncesindeyiz. Anastomoz yapılan durumlarda sildenafil sitrat verilmesinin anastomoz iyileşmesine olumlu veya olumsuz etkisinin gösterilebilmesi için yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genel cerrahi ameliyatlarının önemli bir bölümünü oluşturan kolorektal cerrahide anastomoz kaçakları oldukça korkulan bir komplikasyondur. Ciddi morbidite ve mortaliteye sebep olan anastomoz kaçaklarını önlemek için birçok çalışma mevcuttur. Özellikle adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin kolay elde edilebilmesi, kolay çoğaltılabilmeleri ve birçok dokuya farklılaşabilmesi, kök hücrelerin vücudun farklı dokularında yara iyileşmesine sağladığı olumlu katkı, gastrointestinal sistem cerrahilerinde de araştırmaların artmasına sebep olmuştur.

Çalışmamızın sonucunda, anastomoz hattına kök hücre uygulanmasının anastomoz iyileşmesine olumlu katkı sağladığını ve anastomoz kaçak riskini azalttığını, sildenafil sitrat verilmesinin ise anastomoz iyileşmesine olumlu veya olumsuz etkisinin gösterilebilmesi için yeni deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.



## ÖZET

**Giriş ve Amaç:** Gastrointestinal sistem cerrahilerde intestinal anastomozlar önemli bir yer tutmaktadır. Sıkça karşılaşılan komplikasyon olan anastomoz kaçakları ciddi mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. Anastomoz kaçak oranını minimum seviyeye indirmek; mortalite ve morbidite oranını ve bunların sağlık sistemine getirmiş olduğu yükü azaltacaktır. Literatürde bu amaçla yapılan, intestinal sistemde yara iyileşmesine katkı sağlayabileceği düşünülen çeşitli yöntemleri araştıran birçok çalışma vardır. Özellikle son yıllarda kök hücrenin yara iyileşmesine katkıları üzerinde çalışmalar yoğunlaşmış olup, kolon anastomozu iyileşmesine etkisi ile ilgili kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Sildenafil sitratın da kolon anastomozu iyileşmesine etkisi ile ilgili çok az çalışma yapılmasının yanında kök hücre ve sildenafil sitratın birlikte uygulandığı çalışma bulunmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda kolon anastomozu iyileşmesine kök hücre ve sildenafil sitrat uygulamalarının etkilerini inceledik.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda Wistar-Albino cinsi 44 adet rat kullanıldı. Bu ratlardan dördü mezenkimal kök hücre elde edilmesi amacıyla kullanıldı. Diğer 40 rat randomize olarak her biri 10'ar rattan oluşan 4 eşit gruba ayrıldı: Grup 1; Kontrol, Grup 2; Sildenafil Sitrat, Grup 3; Kök Hücre, Grup 4; Kök Hücre+Sildenafil Sitrat. Tüm ratlar uygun koşullar sağlanarak planlanan günde aynı cerrah tarafından opere edildi. Operasyonda tüm ratlarda inen kolon kesilerek her iki ucu arasında tek kat anastomoz yapıldı. Sildenafil Sitrat uygulaması yapılacak gruplara operasyon iki gün öncesinden beş gün sonrasına kadar her gün, günde bir defa 10 mg/kg/gün sildenafil sitrat oral yoldan verildi. Kök hücre uygulanacak gruplarda ise operasyon esnasında anastomoz hattında her iki kolon ucuna eşit olacak şekilde subserozal 0,1 ml, toplamda 0,2 ml kök hücre enjekte edildi. (Her 0,1 ml'de  $4 \times 10^5$  kök hücre mevcut). Tüm ratlar post-operatif beşinci günde sakrifiye edilerek ratların karın içi yapışıklıkları, anastomoz patlama basınçları, anastomoz kaçağı durumu, anastomoz bölgesindeki reepitelizasyon, nötrofil lökosit infiltrasyonu, nekroz yoğunluğu, makrofaj yoğunluğu, yara dudakları arasındaki mesafe, granülasyon dokusu kalınlığı histopatolojik olarak, anastomoz yapılan dokudaki hidroksiprolin, miyeloperoksidaz, nitrik oksit, tümör nekroz faktör- $\alpha$ , vasküler endotelial büyüme faktörü miktarı biyokimyasal olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Anastomoz patlama basınçları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p:0,52). Kök hücre uygulanan gruplarda anastomoz kaçağı gözlenmezken diğer gruplarda anastomoz kaçakları görüldü. Karın içi yapışıklık açısından anlamlı fark izlendi

(p:0,043). Kontrol grubunda, kök hücre uygulaması yapılan iki gruptan (Grup 3 ve 4) da daha ileri düzeyde yapışıklık izlendi. Hidroksiprolin ve TNF- $\alpha$  düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında kök hücre uygulaması yapılan iki grupta (Grup 3 ve 4) da diğer iki gruptan (Grup 1 ve 2) daha yüksek oranda hidroksiprolin ve TNF- $\alpha$  düzeyi saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0,001) Sildenafil sitrat uygulamasının anlamlı bir etkisi saptanmamıştır. Nitrik oksit düzeyi gruplar arasında anlamlı olarak farklı bulunmuş olup (p:0,01) hem kök hücre hem de sildenafil sitrat uygulanan Grup 4'te ölçülen miktar diğer üç gruptaki değerden fazla izlenmiştir. VEGF düzeyi hiçbir grupta ölçülebilecek düzeyde saptanmamıştır. Miyeloperoksidaz düzeyi gruplar arasında anlamlı farklı bulundu (p:0,001), Grup 4'te en yüksek, Grup 2'de en düşük düzeyde ölçüldü. Histopatolojik değerlendirmede reepitelizasyon en iyi sadece sildenafil sitrat uygulanan Grup 3'te izlendi (p:0,001). Nekroz miktarı, PMNL infiltrasyonu ve granülasyon dokusu kalınlığı en düşük Grup 3 ve Grup 4'te izlenmiştir (her biri için p:0,001). Makrofaj yoğunluğu en düşük Grup 2 ve Grup 3'te izlendi (p:0,001). Yara dudakları arasındaki mesafe en az Grup 3'te, en fazla Grup 1'de ölçüldü (p:0,001).

**Sonuç:** Çalışma sonucunda kolon anastomozlarında mezenkimal kök hücre uygulamasının yara iyileşmesine olumlu katkı sağladığını düşünmekteyiz. Sildenafil sitrat uygulamasının ise kolon anastomozunda yara iyileşmesine olumlu veya olumsuz etkisinin aydınlatılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kök hücre, Sildenafil sitrat, Kolon anastomozu, Yara iyileşmesi.

## SUMMARY

**Introduction and Purpose:** Colon anastomoses play an important role in gastrointestinal system surgery. Anastomotic leakage, which is a common complication, causes serious mortality and morbidity. Minimizing the rate of anastomotic leakage will reduce the mortality and morbidity rate and their burden on the health system. There are many studies in the literature investigating various methods that may contribute to wound healing in the intestinal tract. There are many studies about the effects of stem cells to wound healing while there are only a limited number of studies on the effects of colonic anastomosis. In addition to the few studies on the effect of sildenafil citrate on colon anastomosis healing, no studies have been performed in which stem cell and sildenafil citrate are applied together. For this reason, we investigated the effects of stem cell and sildenafil citrate applications on colon anastomosis healing.

**Materials and Methods:** In this study, 44 Wistar-Albino rats were used. Four of these rats were used to obtain mesenchymal stem cells. The other 40 rats were randomly divided into 4 equal groups, each consisting of 10 rats: Group 1; Control, Group 2; Sildenafil Citrate, Group 3; Stem Cell, Group 4; Stem Cell + Sildenafil Citrate. All rats were operated by the same surgeon on the scheduled day with appropriate conditions. Descending colon was cut in all rats and single-layer anastomosis was performed between both ends. Oral sildenafil citrate treatment was applied once daily to 10 mg/kg/day for two days before the operation and five days after the operation. In the stem cell groups, 0,1 ml of subserosal and 0,2 ml of total stem cells were injected during operation. ( $4 \times 10^5$  stem cells per 0,1 ml). All rats were sacrificed on postoperative fifth day, intraabdominal adhesions of rats, anastomosis bursting pressures, anastomosis leakage, reepithelization, neutrophil leukocyte infiltration, necrosis density, macrophage density, distance between wound lips, granulation tissue thickness, hydroxyproline, myeloperoxidase, nitric oxide, tumor necrosis factor- $\alpha$  and vascular endothelial growth factor were evaluated.

**Results:** There was no significant difference between the groups in terms of anastomosis burst pressures ( $p:0,52$ ). Anastomotic leakage was not observed in the stem cell groups whereas anastomotic leakage was observed in the other groups. Significant difference was observed in terms of intraabdominal adhesion ( $p:0,043$ ). In the control group, a better adhesion was observed in the two groups treated with stem cells (Group 3 and 4). When

hydroxyproline and TNF- $\alpha$  levels were compared, hydroxyproline and TNF- $\alpha$  levels were found to be higher in two groups treated with stem cells (Group 3 and 4) than in the other two groups (Groups 1 and 2) and the difference was statistically significant (p:0,001). There was no significant effect of sildenafil citrate administration. Nitric oxide levels were found to be significantly different between the groups (p:0,01). The amount measured in Group 4 treated with both stem cell and sildenafil citrate was higher than that of the other three groups. VEGF levels were not studied in any group. Myeloperoxidase levels were significantly different between the groups (p:0,001), the highest in Group 4 and the lowest in Group 2. The best reepithelialization was observed in Group 3 (p:0,001). The amount of necrosis, PMNL infiltration and granulation tissue thickness were lowest in Group 3 and Group 4 (p:0,001 for each). Macrophage density was lowest in Group 2 and Group 3 (p:0,001). The distance between the wound ends was minimum in Group 3 and at maximum in Group 1 (p:0,001).

**Conclusion:** As a result of this study, we think that mesenchymal stem cell application in colon anastomoses contributes to wound healing positively. Further studies are necessary to clarify the positive or negative effects of sildenafil citrate administration on wound healing in colon anastomosis.

**Keywords:** Stem cell, Sildenafil citrate, Colonic anastomosis, Wound healing.

## KAYNAKLAR

1. Kjungqvist O, Nygren J, Soop M, Thorell A. Metabolic perioperative management: novel concepts. *Curr Opin Crit Care*. 2005; 11: 295-9.
2. Uluocak K. Kolon anastomoz yetmezliklerinin sebepleri ve önlenmesi. *Dirim* 1992; 67: 34-42.
3. Hongstrom H, Hanglund U, Zederfeldt B. Tension leads increased neutrophil accumulation and decreased laparotomy wound strength. *Surgery*, 1990; 107: 215-9.
4. McDermott FD, Heeney A, Kelly ME, Steele RJ, Carlson GL, Winter DC. Systematic review of preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for colorectal anastomotic leaks. *Br J Surg*. 2015; 102(5): 462–79.
5. García-granero E, Navarro F, Cerdásantacruz C, et al. Individual surgeon is an independent risk factor for leak after double-stapled colorectal anastomosis: An institutional analysis of 800 patients. *Surgery*. 2017; 162(5): 1006-16.
6. Rudinskaite G, Tamelis A, Saladzinskas Z, Pavalkis D. Risk factors for clinical anastomotic leakage following there section of sigmoid and rectal cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2005; 41(9): 741-6.
7. Blumetti J, Chaudhry V, Cintron JR, Park JJ, Marecik S, Harrison JL, et al. Management of anastomotic leak: lessons learned from a large colon and rectal surgery training program. *World journal of surgery*, 2014; 38(4): 985-91.
8. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am*. 1997; 77(3): 549-73.
9. Karahasanoglu T, Altinli E, Hamzaoglu I, Paksoy M, Yesildere T, Alemdaroglu K. Effect of growth hormone treatment on the healing of left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. *Br J Surg*. 1998; 85(7): 931-3.
10. Shandall A, Lowndes R, Young HL. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. *Br J Surg* 1985; 72: 606-9.
11. Gong W, Guo M, Han Z, Wang Y, Yang P, Xu C, et al. Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cell store pair radiation-induced intestinal injury. *Cell death&disease*, 2016; 7(9): 2387.
12. Caziuc A, Calin Dindelegan G, Pall E, Mironiuc A. Stem cells improve the quality of colonic anastomoses - A systematic review. *Journal of BUON: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 2015; 20(6): 1624-9.

13. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG: Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 2001; 19 (3): 180-92.
14. Uthayathas S, Karuppagounder S.S, Thrash B.M. Parameshwaran K. Suppiramaniam V. & Dhanasekaran M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications, *Pharmacological Reports*. 2007; 59(2): 150-63.
15. Yildirim A, Ersoy Y, Ercan F, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010; 23: 215-21.
16. Soydan G, Sökmensüer C, Kilinc K, Tuncer M. The effects of sildenafil on the functional and structural changes of ileum induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Eur J Pharmacol*. 2009; 610: 87-92.
17. Bugra D. Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. *Türkiye Klinikleri. J Surgery*. 2004; 9: 1-11.
18. Skandalakis EJ. Colon and rectum. *Surgical Anatomy and Technique*. Ed: Skandalakis, 1995; 13: 401-70.
19. Sayek I. *Temel Cerrahi 3*. Baskı Ankara Güneş Kitabevi, 2004; 1243-51.
20. Sakorafas GH, Zouros E, Peros G. Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surgical Oncology*, 2006; 15(4): 243-55.
21. J.L. R. Embryology and anatomy of the colon, Shackelford's *Surgery of the Alimentary Tract*, 1996.
22. Skandalakis JE. *Skandalakis Cerrahi Anatomi Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri*. A. B, editor 2008.
23. Patrick E. Sharp, Marie C. La Regina, "The Laboratory Rat", CRC Press 1998: 6.
24. J. R. Rosai and Ackerman's *Surgical Pathology*. 8 ed. J. R., St. Louis. editors 1996.
25. Weilbaecher DA, Stirling CT, Mathieu FJ. Non-suture intestinal anastomosis. *Bulletin de la Societe internationale de chirurgie*, 1966; 25(2): 125-36.
26. Orr NW. A single-layer intestinal anastomosis. *The British journal of surgery*, 1969; 56(10): 771-4.
27. Khoury GA, Waxman BP. Large bowel anastomoses. I. The healing process and sutured anastomoses. A review. *The British journal of surgery*, 1983; 70(2): 61-3.

28. Templeton JL, McKelvey ST. Low colorectal anastomoses. An experimental assessment of two sutured and two stapled techniques. *Diseases of the colon and rectum*, 1985;28(1):38-41.
29. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. *American journal of surgery*, 1980;139(3):406-13.
30. Thorne CH, Beasley RW, Aston SJ, Bartlett SP, Gurtner GC, Spear SL, Wound Healing: Normal and Abnormal. *Grabb and Smith's Plastic Surgery* 2007;1(2):15-22.
31. Henry G, Garner WL: Inflammatory mediators in wound healing, *Surg Clin North Am*, 2003; 83(3): 483-507.
32. F. Charles Brunicaudi DA, Timothy Billiar, David Dunn, John G. Hunter, Jeffrey Matthews, Raphael E. Pollock. *Schwartz's Principles of Surgery*. 10 ed. F. Charles Brunicaudi M, FACS, editor. 10. United States: McGraw Hill, 2014: 241-71.
33. Ellison GW. Wound healing in the gastrointestinal tract. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*, 1989; 4(4): 287-93.
34. Lunstedt B, Debus S, Thiede A. [Healing of the anastomosis in various suture techniques in the gastrointestinal tract. Physiology, experimental and clinical results]. *Zentralblatt für Chirurgie*, 1993; 118(1): 1-7.
35. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. *American journal of surgery*, 1980;139(3):406-13.
36. Mast BA. Healing in other tissues. *The Surgical clinics of North America*, 1997; 77(3): 529-47.
37. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK, Dunphy JE. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. *The British journal of surgery*, 1970; 57(12): 896-900.
38. Chung RS. Blood flow in colonic anastomoses. Effect of stapling and suturing. *Annals of surgery*, 1987; 206(3): 335-9.
39. Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Tissue oxygen tension as a predictor of colonic anastomotic healing. *Diseases of the colon and rectum*, 1987; 30(11): 867-71.
40. Testini M, Margari A, Amoruso M, Lissidini G, Bonomo GM. [The dehiscence of colorectal anastomoses: the risk factors]. *Annali italiani di chirurgia*, 2000; 71(4): 433-40.

41. Irvin TT. Collagen metabolism in infected colonic anastomoses. *Surgery, gynecology&obstetrics*, 1976; 143(2): 220-4.
42. Ahrendt GM, Tantry US, Barbul A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. *American journal of surgery*, 1996; 171(1): 102-7.
43. Göksoy E, Sarıbeyoğlu K. Genel bilgiler. Çev. Ed: E Göksoy. *Acil Karın Cerrahisi*. Ed: Jones PF, Krukowski ZH, Youngson GG. *Emergency Abdominal Surgery*, 3. edition. Yüce Yayım, İstanbul, 2002; 1-35.
44. Gökpinar İ, Gürleyik E, Pehlivan M, et al. Erken enteral ve glutaminli enteral beslenmenin kolon anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi: Deneysel çalışma. *Ulus Travma Derg* 2006; 12:17-21.
45. Witte MB, Barbul A. Repair of full-thickness bowel injury. *Crit Care Med* 2003; 31: 538-46.
46. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses: parameters for repair. *Dis Colon Rectum*, 1990; 33(10): 891-901.
47. Stoop MJ, Dirksen R, Wobbles T. Effect of early postoperative 5-fluorouracil and ageing on the healing capacity of experimental intestinal anastomoses. *Br J Surg*, 1998; 85: 1535-8.
48. Barrilleaux, B.,Phinney, DG., Prockop, DJ. andO'Connor, KC. Exvivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Engineering*, 2006; 12: 3007-19.
49. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, et al: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; 98: 2396-402.
50. Lindroos, B.,Suuronen, R., Miettinen, S., The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine, *Stem Cell Reviews and Reports*, 2011; 7: 269–91.
51. Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, Matsushita T et al. Stimulation of Bone Formation by Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 in Callotaxis Bone Lengthening of Rabbits. *Calcic Tissue Int*, 1999; 64: 542-6
52. Baran Y, Ural AU, Avcu F, Sarper M, Elci P, Pekel A. Optimization of transfection of green fluorescent protein in pursuing mesenchymal stem cells in vivo. *Turkish journal of haematology: official journal of Turkish Society of Haematology*, 2008;25(4):172-5.



53. Uthayathas S, Karuppagounder S.S, Thrash B.M., Parameshwaran K., Suppiramaniam V. & Dhanasekaran M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological applications, *Pharmacological Reports*. 2007; 59(2): 150-63.
54. Ravipati G, McClung J.A, Aronow W.S. , Peterson S.J. & Frishman W.H. Type 5 Phosphodiesterase Inhibitors in the Treatment of Erectile Dysfunction and Cardiovascular Disease. *Cardiology in Review*. 2007; 15(2): 76-86.
55. Sarifakioglu, N., Gokrem, S., Ates, L., Akbuga, U. B., Aslan, G., The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study, *The British Association of Plastic Surgeons*, 2004; 57: 769-72.
56. Cakir T, Ozer I, Bostanci EB. et al. Increased collagen maturity with sildenafil citrate: experimental high risk colonic anastomosis model, *Int J Surg*, 2015 Jan; 13: 152-6.
57. Houston KA, Rotstein OD. Fibrin sealant in high-risk colonic anastomoses. *Archives of surgery*, 1988; 123(2): 230-4.
58. Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipo-aspirates. *J VisExp*. 2013 Sep 26; (79): e50585.
59. Francis MP, Sachs PC, Elmore LW, Holt SE. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipo-aspirate blood and saline fraction. *Organogenesis*. 2010 Jan-Mar; 6(1): 11-4.
60. G. Kesava Reddy and Chukuka S Enwemeka. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in Biological tissues. *Clinical Biochemistry* 1996; 29(3): 225-229.
61. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*. 1983 Jul 15; 132(2): 345-52.
62. Navarro-Gonzalves, J. A., C. Garcia-Benayas, and J. Arenas, 1998: Semi automated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem*. 44, 679-81.
63. Ogawa R. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Current stem cell research & therapy*, 2006; 1(1): 13-20.
64. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factor contributing to leakage of colonic anastomoses. *Annals of surgery*. 1973; 177(5): 513-8.

65. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio journal of medicine*. 2005; 54(3): 132-41.
66. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004; 6(1): 7-14.
67. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *s.l.: Tissue Eng*. 2001; 7: 211-28.
68. Dishy V, Harris PA, Pierce R, Prasad HC, Sofowora G, Bonar HL, Wood AJ, Stein CM. Sildenafil does not improve nitric oxide-mediated endothelium-dependent vascular responses in smokers. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57: 209-12.
69. Li J, Fu P, Deleon M, French BA, French SW. The effect of Viagra (sildenafil citrate) on liver injury caused by chronic ethanol intragastric feeding in rats. *Exp Mol Pathol* 2005; 78: 101-8
70. Ayyıldız A, Nuhoglu B, Huri E. The efficacy and dosage of sildenafil citrate on flap viability. *Türk Üroloji Dergisi* 2005; 31: 163-9,
71. Hasanoğlu A, Erkan S, Temel S, Urhan MK, Güler O, Effect Of Sildenafil Citrate On Healing Of Colonic Anastomoses, *Turk Med J*, 2007; 1(2): 66-75.
72. Derici H, Kamer E, Unalp HR, Diniz G, Bozdog AD, Tansug T, Ortac R, Erbil Y, "Effect of sildenafil on wound healing: an experimental study", *Langenbecks Arch Surg*, 2010; 395:713-718.
73. Yoo JH, Shin JH, An MS, Ha TK, Kim KH, Bae KB, et al. Adipose-tissue-derived Stem Cells Enhance the Healing of Ischemic Colonic Anastomoses: An Experimental Study in Rats. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*. 2012; 28(3): 132-9.
74. Cronin K, Jackson D S, Dunphy J. E. Specific activity of hydroxyproline tritium in the healing colon. *Surg Gyn Obst*, 1968; 1260: 1061-65.
75. Karakaya E, Everolimus ile immunsuprese edilen sıçanlarda yapılan kolon anastomozlarında kök hücrenin anastomoz üzerine etkileri: deneysel çalışma, *Uzmanlık Tezi*, Ankara, 2017.
76. Aguilar-Nascimento JE, Mathie RT, Man WK, Williamson RC. Enhanced intra-anastomotic healing by operative lavage with nutrient solutions in experimental left-sided colonic obstruction, *s.l. : Br J Surg* 1995; 82: 461-4.

77. Stommel MW, Ten Broek RP, Strik C, Slooter GD, Verhoef C, Grunhagen DJ, et al. Multicenter Observational Study of Adhesion Formation after Open-and Laparoscopic Surgery for Colorectal Cancer. *Annals of surgery*. 2017.
78. Pascual I, de Miguel GF, Gomez-Pinedo UA, de Miguel F, Arranz MG, Garcia-Olmo D. Adipose-derived mesenchymal stem cells in biosutures do not improve healing of experimental colonic anastomoses. *The British journal of surgery*. 2008; 95(9): 1180-4.
79. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin*. 2005; 26: 259-64.
80. Mori E, Haramaki N, Ikeda H et al. Intra-coronary administration of L-arginine aggravates myocardial stunning through production of peroxynitrite in dogs. *Cardiovasc Res*. 1998; 34: 113-23.
81. Uzun H, Konukoglu D, Nuri MK, Ersoy EY, Ozçevik S, Yavuz N. The effects of sildenafil citrate on ischemic colonic anastomotic healing in rats: its relationship between nitric oxide and oxidative stress. *World J Surg*. 2008 Sep; 32(9): 2107-13.
82. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005; 77: 598–625.
83. Månsson, P, Zhang, X, Jeppsson, B. et al. Anastomotic healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. *Int J Colorectal Dis*. 2002; 17: 420.
84. Sparreboom CL, Wu Z, Dereci A et al. Cytokines as Early Markers of Colorectal Anastomotic Leakage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol Res Pract*. 2016; 2016: 3786418.
85. Waddell A, Ahrens R, Steinbrecher K. et al. Colonic eosinophilic inflammation in experimental colitis is mediated by Ly6C<sup>high</sup> CCR2<sup>+</sup> inflammatory monocyte/macrophage-derived CCL11. *J Immunol*. 2011 May 15; 186(10): 5993-6003.
86. Gürsoy K, Oruç M, Kankaya Y, Ulusoy G, Koçer U et al. Effect of topically applied sildenafil citrate on wound healing: experimental study. *Bosn J Basic Med Sci*. 2014 Aug; 14(3): 125–131.