

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

YAĞ DOKU KÖKENLİ KÖK HÜCRE UYGULAMASININ
PERFORATÖR FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ



UZMANLIK TEZİ
Dr. Merve ÖZKAYA ÜNSAL

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yavuz KEÇECİ

Manisa, 2018

Önsöz

İyi bir Plastik Cerrahi uzmanı olabilmem için, bu sanatı öğrenirken tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan anabilim dalı başkanı hocam Prof.Dr.Levent Yoleri'ye, tez hocam Doç.Dr.Yavuz Keçeci'ye ve Doç.Dr.Hakan Kerem'e, hem hocam, hem ağabeyim olarak gördüğüm Yrd.Doç.Dr.M.Kürşat Evrenos'a, hem asistanlığında hem de uzmanlığında beraber çalışma fırsatına eriştiğim Uzm.Dr.Z.Ulaş Bali'ye,

Tezimde bilimsel desteğini esirgemeyen Prof. Dr. M. İbrahim Tuğlu ve asistanlarına, deney süresince yardımcı olan MCBÜ- DEHAM personeli Adnan Bey'e,

Asistanlığımın ilk yıllarında önce beraber çalışma sürecini sonrasında da dostluğunu paylaştığım kıdemlim Uzm. Dr. Murat Yaman'a,

Beraber çalıştığımız üç yıl boyunca, her zorluğun üstesinden keyifle gelebildiğimiz hem çalışma arkadaşım, hem çözüm ortağım olan Dr. Yavuz Tuluy'a, ihtisas sürem son yıllarında tanışma ve çalışma mutluluğuna eriştiğim Dr. Aziz Parspancı ve Dr. Gökçen Çakır Bozkurt 'a,

Klinikte yıllarımızı geçirdiğimiz, her zaman uyum ve keyifle çalışma ayrıcalığını yaşadığım ve her birini kişisel olarak çok sevdiğim Plastik Cerrahi servisi hemşireleri Sezin Temel, Yasemin İhtiyar, Gülseren Perk, Sibel Çiner, Lütfiye Kusuv, Nebahat Çelikten, Melek Çayırılı, Burhan Kaya ve diğer hemşire arkadaşlarıma, sekreterlerimiz Fatoş Yiğitler ve Özlem Sabancıoğlu'na ve personelimiz Pelin Atbiner ve tüm diğer personelimize,

Dostluklarından büyük keyif aldığım hemşire arkadaşlarım Dilek – Adil Külçeci'ye,

Asistanlığım ve kendi asistanlığı sürecinde yoldaşım olan, sonrasında hayat arkadaşım olan, desteğini ve sevgisini her zaman hissettiğim sevgili eşim Dr. Ülkün Ünlü Ünsal'a

Tüm hayatım boyunca desteklerini sınırsızca sunan, değişen çalışma saatlerime göre yaşamlarını düzenleyen çok sevgili annem, babam ve ablam Ece'ye,

Hem hekimliğiyle, hem dostluğuyla bana her daim destek olan arkadaşım Dr. Yosun Şan'a,

Projemdeki destekleri için Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| I. Giriş..... | 1 |
| II. Genel Bilgiler | 3 |
| 1. Flepler..... | 3 |
| 1.1 Flebin Tanımı | 3 |
| 1.2 Fleplerin Tarihçesi | 3 |
| 1.3 Fleplerin Sınıflandırılması..... | 5 |
| 1.3.1 Beslenmesine Göre Fleplerin Sınıflandırılması | 7 |
| 1.3.2 İçeriklerine Göre Flep Sınıflandırması | 9 |
| 1.3.2.1. Kas-Deri Flepleri | 10 |
| 1.3.2.2 Fasyakutan Flepler | 11 |
| 1.4 Perforatör Flepler | 12 |
| 1.5 Flep Fizyolojisi..... | 13 |
| 1.6 Flep Kaybı | 15 |
| 2. Kök Hücre | 16 |
| 2.1 Kök Hücre Tanımı ve Çeşitleri..... | 16 |
| 2.1.1 Umblikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre | 17 |
| 2.1.2 Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre | 17 |
| 2.1.3 Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre..... | 17 |
| 2.2 Vasküler Stromal Fraksiyon..... | 18 |
| 2.3 Kök Hücrelerin Plastik Cerrahide Kullanımı | 19 |
| 2.4 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücreler Ve Plastik Cerrahi..... | 19 |
| 2.5 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Cilt Flepleri Üzerine Etkileri..... | 20 |
| 2.6 Mezenkimal Kök Hücrelerle İlişkili Sitokinler Ve Büyüme Faktörleri | 21 |
| 3. Deneysel Perforatör Flep Modelleri | 22 |

| | |
|--|----|
| 3.1 Posterior Uyluk Perforatör Flebi | 23 |
| III. Gereç ve Yöntem | 25 |
| 1. Posterior Uyluk Perforatör Flebinin Kaldırılışı | 25 |
| 2. Kök Hücre Uygulaması | 28 |
| 2.1 Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eldesi | 28 |
| 2.2 Kök Hücre Sayımı..... | 29 |
| 2.2.Hücre Canlılık Testi | 30 |
| 2.3 Kök Hücre Karakterizasyonu | 30 |
| 3. Grupların Tanımlanması | 31 |
| 4. Biyopsi Alınması | 33 |
| 5. Histopatolojik Değerlendirme..... | 34 |
| 5.1 İndirekt immunohistokimya boyaması:..... | 35 |
| 5.2 TUNEL boyaması | 35 |
| 5.3 İstatistiksel analiz | 36 |
| IV. Bulgular | 37 |
| 1. Makroskopik Bulgular | 37 |
| 2. Mikroskopik Bulgular..... | 40 |
| V. Tartışma | 59 |
| VI. Sonuç ve Öneriler..... | 71 |
| VII. Özet..... | 72 |
| VIII.Summary | 73 |
| IX. Kaynaklar | 74 |

Tablolar Dizini

| | |
|--|----|
| Tablo 1. Fleplerin sınıflandırması..... | 7 |
| Tablo 2. Fleplerin Image J programında hesaplanan yaşayabilen flep yüzdeleri | 37 |
| Tablo 3. Ortalama yaşayabilen flep yüzdeleri | 38 |
| Tablo 4. Kök hücrenin karakterizasyonunu gösteren kontrol, STRO-1, CD44 ve CD90 pozitif ve CD45 negatif işaretleme İHK bulgularının h-skor analizi | 42 |
| Tablo 5.Hematoksilen ve eozin boyamaları reepitelizasyon (RE) ölçümleri | 44 |
| Tablo 6.Hematoksilen ve eozin boyamaları kapiller sayısı (KS) ölçümleri ... | 44 |
| Tablo 7. PAS boyamaları, Kollajen Fibril (KF) ve Fibrosis oluşumu (FO) ölçümleri. | 47 |
| Tablo 8. PAS boyamaları ile, Kıl Folikülü (KF) ve Bez oluşumu (BO) ölçümleri. | 49 |
| Tablo 9.CD44 immünboyamalarda MKH varlığı için yapılan h-skorlama ... | 50 |
| Tablo 10.CD90 immünboyamalarda MKH varlığı için yapılan h-skorlama. ... | 51 |
| Tablo 11. Hücre çoğalması için Ki67 immünboyamalarda MKH etkisi için yapılan h-skorlama..... | 52 |
| Tablo 12.Oksidatif stres için eNOS immünboyamalarda MKH etkisi için yapılan h-skorlama..... | 53 |
| Tablo 13.Oksidatif stres için iNOS immünboyamalarda MKH etkisi için yapılan h-skorlama..... | 54 |
| Tablo 14.İnflamasyon için IL-1 immünboyamalarda MKH etkisi için yapılan h-skorlama. | 55 |
| Tablo 15.İnflamasyon için IL-6 immünboyamalarda MKH etkisi için yapılan h-skorlama. | 56 |
| Tablo 16.Damarlanmada VEGF immünboyamalarda MKH etkisi için yapılan h-skorlama | 57 |
| Tablo 17.Apoptoza etkisi için TUNEL immün işaretlemesinde MKH etkisini göstermek için apoptotik indeks..... | 58 |

Resimler Dizini

| | |
|--|----|
| Resim 1. Perforatör fleplerin şematik tanımı. | 13 |
| Resim 2. Posterior uyluk perforatör flebi, anatomik çizimi..... | 23 |
| Resim 3. Flebin tasarlanması..... | 26 |
| Resim 4. Perforatörün makroskopik görüntüsü | 26 |
| Resim 5. Perforatörün mikroskopik görüntüsü | 27 |
| Resim 6. Subpanniküler planda kaldırılan flep | 27 |
| Resim 7. Flebin yerine inset edilmesi..... | 28 |
| Resim 8. Serum fizyolojik enjeksiyonu | 32 |
| Resim 9. Kök hücrenin flebe enjekte edilmesi | 33 |
| Resim 10. Biyopsi alınması..... | 34 |
| Resim 11. Kontrol grubu, postoperatif 7. gün..... | 39 |
| Resim 12. Sham grubu, postoperatif 7. Gün..... | 39 |
| Resim 13. Kök hücre grubu, postoperatif 7. Gün | 39 |
| Resim 14. Kök hücrenin kültürdeki faz kontrast görüntüleri ile karakterizasyonunu gösteren kontrol, CD44 ve CD90 pozitif ve CD45 negatif işaretleme İHK bulguları..... | 41 |
| Resim 15. H-E boyamaları reepitelizasyon (RE) ve kapiller sayısı (KS) açısından değerlendirilmesi. | 43 |
| Resim 16. Reepitelizasyon | 43 |
| Resim 17. Kapiller sayısı (KS) | 44 |
| Resim 18. MT boyamaları Kollajen üretimi (KÜ) ve Fibrosis oluşumu (FO) açısından değerlendirilmesi. | 46 |
| Resim 19. Kollajen Üretimi (KÜ) | 46 |
| Resim 20. Fibrosis oluşumu..... | 47 |
| Resim 21. PAS boyamaları Kıl folikülü (KF) ve Bez oluşumu (BO) açısından değerlendirilmesi..... | 48 |
| Resim 22. Kıl folikülü (KF) | 48 |
| Resim 23. Bez oluşumu (BO)..... | 49 |
| Resim 24. CD44 immünboyamalarda MKH varlığının değerlendirilmesi..... | 50 |
| Resim 25. CD90 immünboyamalarda MKH varlığının değerlendirilmesi..... | 50 |

| | |
|---|----|
| Resim 26. Hücre çoğalması için Ki67 immünboyamalarda MKH etkisinin değerlendirilmesi..... | 51 |
| Resim 27. Oksidatif stres için eNOS immünboyamalarda MKH etkisinin değerlendirilmesi..... | 52 |
| Resim 28. Oksidatif stres için iNOS immünboyamalarda MKH etkisinin değerlendirilmesi..... | 53 |
| Resim 29. İnflamasyon için IL-1 immünboyamalarda MKH etkisinin değerlendirilmesi..... | 54 |
| Resim 30. İnflamasyon için IL-6 immünboyamalarda MKH etkisinin değerlendirilmesi..... | 55 |
| Resim 31. Damarlanmada VEGF immünboyamalarda MKH etkisinin değerlendirilmesi..... | 56 |
| Resim 32. Apoptoza etkisi için TUNEL immün işaretlemesinde MKH etkisinin değerlendirilmesi..... | 57 |

Grafikler Dizini

| | |
|---|----|
| Grafik 1. Gruplar içinde flep yaşayabilirlik oranları | 38 |
| Grafik 2. Ortalama flep yaşam oranı | 40 |
| Grafik 3. Grupların H-E boyama ile ölçülen kapiller sayıları..... | 45 |

I. Giriş

Flep, doku eksikliklerinin onarımı için vücudun belirli bölgelerinden hazırlanan, pedikülünden geçen damar ya da damarlarla beslenen deri, derialtı, fasya, kas, kemik ya da bu dokuların bir kısmını bir arada içerebilen doku parçasıdır. Flepler, plastik ve rekonstrüktif cerrahinin temel uğraş alanlarından olan doğumsal veya edinsel defektlerin uygun şekil ve fonksiyonda onarımı amacıyla kullanılmaktadır. Bir flebin kan akımı iki şekilde olabilir. Bilinen ve ismi olan bir arter tarafından beslenmeyen fleplere rastgele (random) flepler denirken, bilinen ve ismi olan bir arter ya da arterlerden kanlanması sağlanıyorsa, buna aksiyel flep adı verilir(1,2). Tarihte ilk olarak rastgele (random) beslenme paternine göre flepler kullanılmıştır(3). Cildin vasküler yapıları ile ilgili araştırmalar arttıkça, random paternli fleplerden farklı olarak, bilinen bir vasküler yapı aracılığı ile beslenen aksiyel fleplerin alt grupları artmıştır(4). Günümüzde görüntüleme tekniklerinin artması ve anatomi çalışmaları sayesinde tanımlanan aksiyel fleplerin güvenilirliği daha fazladır.

Perforator flepler, kas-deri flebinden türetilmiş bir aksiyel deri flebi türü olarak tanımlanabilir. Perforatör fleplerde flebin besleyici damar ya da damarları, asıl kaynakları olan ana damardan çıktıktan sonra derin dokuların arasından veya içinden geçerek flebe ulaşır(5). Son yıllarda perforatör flepler donör saha morbiditesini azaltması, serbest flep ihtiyacını azaltması ve daha iyi estetik sonuçların elde edilmesini sağladığından birçok klinikte kullanımları artmıştır(6). Ancak zaman zaman, çeşitli nedenlerle flebin tamamının sirkülasyonu sağlanamamakta, parsiyel ya da total nekroz görülebilmektedir(7,8). Fleplerin genellikle bir defekti onarmada kullanılan bölümü distal kısmıdır. Defekti örten uç kısmında siyanoz ve nekroz, flep cerrahisi sırasında en sık karşılaşılan komplikasyonlardandır(6,8). Bu durum ameliyat sonrası sorunlara ve tekrar ameliyat gerekliliğine yol açabilmektedir.

Araştırmacılar bu sorunlara yönelik olarak bazı çalışmalar yapmıştır. Özellikle rastlantısal ya da uzatılmış aksiyel paternli fleplerin sağ kalımı ve perfüzyonun düzeltilmesine, böylece flep nekrozunun da azaltılmasına yönelik farklı farmakolojik ajanlar denemişlerdir. Çeşitli özellikteki fleplerde, flep yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla özellikle ratlar üzerinde adipoz kökenli kök hücre ve kemik iliği kökenli kök hücre kullanılarak deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu alışmalar sonucunda, random ve kutanöz aksiyel fleplerin her ikisinde de kök hücrenin flep yaşayabilirliğine olumlu yönde etki ettiği gösterilmiştir(9,10). Ancak literatürde perforatör bir flebin yaşayabilirliğini arttırması amacıyla kök hücre ile yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, daha önce ratlarda tanımlanmış olan perforatör flep modellerinden, posterior uyluk perforatör flebi üzerinde yağ doku kaynaklı kök hücrenin flep yaşayabilirliğine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

II. Genel Bilgiler

1. Flepler

1.1 Flebin tanımı

Medical Subject of Headings (MeSH)'in tanımlamasına göre flep, kendi başına bir dolaşım sistemi olan ve bu sayede yaşayabilen canlı doku bloğu şeklinde tanımlanabilir. Flepler yara onarımı, fonksiyon geri kazanımı ya da estetik görünümde iyileşme amacıyla kullanılabilir(11).

1.2 Fleplerin tarihçesi

Flep cerrahisi MÖ 600'lü yıllara dayanmaktadır. Bu yıllarda Hindistan'da Sustura Samhita burun rekonstruksiyonu amacıyla alın dokusunu kullanmıştır(3). 15. Yüzyılda Avrupa'da Sicilya'da Gustavo Branca tarafından yanak dokusu kullanılarak burun rekonstruksiyonu yapılmış, oğlu Antonio Branca ise üst koldan burna flep taşımıştır(12). 15. yüzyıl sonu ve 16. yüzyıllarda von Pfalzpaint ve İtalyan Tagliacozzi tarafından De Curtorum Chirurgia per Insitionem (deformitelerin transplantasyon ile cerrahi onarımı) isimli kitapta geciktirme (delay) prosedürü ile koldan kaldırılan flep kullanılarak burun rekonstruksiyonu tarif edilmiştir(13).

1. ve 2. Dünya Savaşları sırasında, savaşın kaçınılmaz olarak yol açtığı defektlerin tedavisi aşamasında flep cerrahisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Harold Gillies tarafından kullanılan "random" paternli tüp pediküllü flepler ile travmatik savaş yaraları tedavi edilirken(14), 19. yy sonlarında Tansini postmastektomi bir hastaya latissimus dorsi kas deri flebi ile meme rekonstruksiyonu yaparak aynı zamanda hem fonksiyonel, hem de estetik iyi bir sonuç elde etmiştir(15).

Cilt adasının ve fleplerin nasıl beslendiği konusundaki ilk adımlardan biri, William Harvey tarafından "kan akımı"nın tanımlanması ile 1628 yılında atılmıştır(16). Bir diğer önemli çalışma ise Carl Manchot'un 1889 yılında "Die

Hautarterien des Menschlichen Körpers, insan vücudunun cilt arterleri” kitabıdır(17). Bu kitapta Manchot, cildi besleyen damarları haritalandırmış, yaptığı çizimlerde 40 adet vasküler alan tanımlamıştır. Bundan yaklaşık yarım yüzyıl sonra Salmon, Manchot’un çalışmalarından haberdar olmadan benzer bir araştırmayı, arterlere mürekkep vererek ve X-Ray ışını kullanarak yapmış, anastomoz ağlarını da ortaya koymuştur(18). 1969 yılında Milton, domuzlar üzerinde cilt fleplerinin damarsal beslenmesini araştırırken Manchot’un Strazburg’da yaptığı çalışmasına denk gelmiş, ancak yazara ulaşmayı başaramamıştır(18). Bir flep cerrahisi planlandığında, flebin uzunluğunu arttırmak için genişliğinin de mutlaka belirli bir oranda artırılması gerekliliğine inanılırdı. Ancak Milton, yayınladığı makaleyle, Manchot’un tezinden yola çıkarak, cilt flebine kutanöz bir arterin dahil edilmesiyle, “uzunluk-genişlik” oranında artış olabildiğini tespit etmiştir(4). Böylece, flebin yaşayabilirliğinin artması için uzunluk genişlik oranından çok, flebin pedikülüne dahil edilebilen kutanöz damarların önemli olduğu fark edilmiştir.

1906 yılında, Tansini tarafından latissimus dorsi muskulokutan flebi tanımlanmıştır(16). 1917 yılında Gillies’in tüp pediküllü flebi tanımlanmış, ondan yaklaşık 50 yıl sonra Bakamjian, bu bölgeyi tekrar incelemiş, deltopektoral oluk boyunda 2, 3 ve 4. interkostal boşluktan çıkan internal mamarian arterin perforatörlerinin göğüs lateral duvarını beslediği, burada kaldırılan bir flebin torakoakromial arterden de beslenme desteği aldığını göstermiştir(18,19)

1970-1973 yıllarında McGregor ve Jackson, yayınladıkları makalelerde deltopektoral flebin perforatörü olan damarlardan bahsetmiş ve başka bir çalışmada kasık flebini tanımlamış, böylece aksiyel paternli flepleri tanımlayarak rasgele (random) beslenen fleplerden ayırmışlardır(19,20). Ger, 1966 yılında alt ekstremitte staz ülseri olan bir hastada kas flebini tanımlamıştır. Hemen arkasından, 1973 yılında Daniel ve Taylor ilk serbest flebi tanımlamıştır(3). Ponten, 1981 yılında alt ekstremitede, kutanöz dokuların ana damardan çıkan perforatör damarlardan beslenmesi prensibini

kullanmış, böylece daha güvenilir olduğunu belirttiği “süper flepleri”, yani fasyakutan flepleri tanımlamıştır(16).

Sonraki en büyük gelişmelerden biri, Taylor ve Palmer'ın bir damar kaynağından beslendiği gösterilebilen 3 boyutlu anatomik dokuyu, yani anjiozom ve venozomları tanımlamasıdır(21). 1973 yılında Daniel ve Williams, domuz ve köpekler üzerine cildin damarlanması ve fleplerin yaşayabilen genişlikleri üzerine çalışmalar yayınlamış, perforatör damarların segmental arterleri kutanöz vasküler sisteme bağladığını söylemişlerdir(22). Cildi beslediği düşünülen direkt kutanöz, fasyakutanöz veya muskulokutanöz olan bu damarların beslediği transfer edilebilen cilt adası perforatör flep adını almıştır(23). 1989 yılında Koshima ve Soeda, derin inferior epigastrik arterden kaynaklanan bir perforatör damarı kullanarak, rektus abdominis kasını feda etmeden bir cilt flebi kaldırmanın mümkün olduğunu göstermişlerdir(24). Bu gelişme ile birlikte flep cerrahisindeki ilerleme hızlanmıştır.

1.3 Fleplerin Sınıflandırılması

20.yy ortasına kadar flep sınıflandırması, bilinen tüm fleplerin random paternli beslenmeye sahip fleplerin varyasyonu olması nedeniyle daha kolaydı. Fleplerin geometrisi ya da taşınma şekli belirleyici kriterlerdi(2). Sonraki gelişmelerle fleplerin daha detaylı sınıflandırılma ihtiyacı doğmuştur. Yapılan hiçbir sınıflandırma tüm flep çeşitlerini kapsamamaktadır.

Bir flebin içeriğinde vücut dokularından herhangi birinin tamamı ya da bir kısmı bulunabilir (kas, fasya, kemik, kıkırdak, vb). Bu özellik, flepleri içeriklerine göre sınıflandırmayı sağlar. Bir flebin pedikülündeki damar özellikleri, beslenmelerine göre ayrılmalarını sağlayabilir, bu sayede beslenmesine göre gruplama yapılabilir. Flebin taşınması hedeflenen dokunun uzak ya da yakın olması da fleplerin sınıflandırmasında rol oynayabilir(2). Tüm özelliklerin bir arada olabileceği, ideal olmayan ancak en kapsamlı bilinen sınıflamalardan biri Cormack ve Lamberty'nin yaptığı sınıflandırmadır. Cormack ve Lamberty'nin 6 C sınıflandırması, flepler için en

geniş kapsamlı sınıflamayı oluşturmaktadır(25). 6 C'ler sınıflaması, fleplerin özelliklerinin İngilizce baş harflerinden oluşan akılda kalıcı bir sistemdir(2). Flepler beslenme şekli (circulation), içeriği (constituents/composition), şekli (conformation), taşınma ve hareketi (contiguity), pedikülün çeşidi (construction) ve hazırlanış şekli (conditioning) olarak gruplandırılmıştır (Tablo 1).

| |
|---|
| 1. Beslenme şekli (circulation) |
| a. Direkt damarlar |
| Aksiyel |
| Septokutanöz |
| Endosteal |
| b. İndirekt damarlar |
| Miyokutanöz |
| Periostal |
| 2. İçeriği (constituents) |
| Fasyakutan |
| Muskuler/muskulokutan |
| Viseral |
| Sinir |
| Kemik |
| Kıkırdak |
| Diğer |
| 3. Hareketi (contiguity) |
| Lokal |
| Rejyonel |
| Uzak |
| 4. Pedikülün çeşidi (construction) |

| |
|---|
| Unipediküllü |
| Bipediküllü |
| Ortograde akım |
| Retrograd akım |
| Turbocharged |
| Supercharged |
| 5. Hazırlanma şekli (conditioning) |
| Delay (geciktirme) |
| Doku genişletme |
| Prefabrikasyon |
| 6. Şekli (conformation-geometry) |
| Tüp şekilli |
| Özel şekilli |
| Kombine flepler |

Tablo 1. Fleplerin sınıflandırması

1.3.1 Beslenmesine Göre Fleplerin Sınıflandırılması

Bir flebin kan akımı iki şekilde olabilir. Bilinen ve ismi olan bir arter tarafından beslenmeyen fleplere rastgele (random) flepler denir. Bu fleplere örnek olarak birçok lokal cilt flebi verilebilir. Eğer bilinen ve ismi olan bir arter ya da arterlerden kanlanması sağlanıyorsa, buna aksiyel flep denir. Birçok kas flebi bu gruba dahildir(1,2).

Dokuların kanlanması segmental, perforatör ve kutanöz arterlerden sağlanır(26). Segmental arterler, direkt olarak aorttan köken alan, gövde ve ekstremiteleri kanlandıran damarlardır. Kutanöz damarlar, cildin beslenmesini sağlayan vasküler yapılardır. Segmental ve kutanöz damarlar arasındaki bağlantıyı sağlayan damarlara perforatör damar ismi verilir(5).

Kutanöz arterler, muskulokutan ve septokutan damarlar olarak ikiye ayrılırlar. Muskulokutan arterler kası besledikten sonra üzerinde yer alan dermal pleksusa doğru ilerleyen ana damarlardır. Kas-deri flebi kas dokusunu besleyen muskuler arterlere ek olarak çok sayıda uç muskulokutan arterden de kanlanan oldukça güvenilir fleplerdir(26). Septokutan damarlar, segmental veya muskuler damarlardan kaynaklanıp kaslar arasındaki fasiyal septalardan geçerek üstteki fasya ve deriyi besleyen damarlardır(1). Fasyakutan flep, septokutan bir damar üzerinden güvenle hazırlanılabilir. Deriyi paralel olarak seyreden septokutan arterler çok sayıda yan dallar vererek geniş boyutlu arteryel fleplerin hazırlanmasına olanak verirler(1,26). Genellikle bu damarlar cildin fikse olduğu alanlardan girerek ilerler ve kutanöz damarları oluştururlar(1).

Bahsedilmiş olan bu iki arter tipi üç anatomik seviyede (fasya, derialtı, deri) altı adet pleksus oluşturarak derinin beslenmesini sağlar(22). Fasyal pleksusta; kan damarları fasyanın içinde, altında ve üzerinde seyrederek. Baskın olan prefasyal pleksustur. Kan akımı septokutan ve muskulokutan arterlerden gelir(1). Subkutan pleksus; yağ dokusunu yüzeysel (yoğun) ve derin (gevşek) olarak ikiye ayırır. Bu plan anatomik olarak platisma ve skarpa fasyasına denk düşer. Bu sistem özellikle gövdede iyi gelişmiştir. Subdermal pleksus, retiküler dermisin hemen altında subkutan yağın hemen üzerindedir. Bu bölge deri flebinin kenar kanamasının olduğu bölgedir. Buradan çıkan arteriyoller dermal pleksusu besler(1,26).

Dermal ve subepidermal pleksus, papiller dermis'ten başlar dermoepidermal bileşkeye kadar uzanır. Bu iki pleksus asıl deri kan dolaşımından sorumludur. Dermal pleksus'un asıl amacı ısı düzenlemesidir(1). Random deri flebi, deri ve derialtı dokusu içerir ve kutanöz arterlerin dermal ve subdermal pleksusa verdiği uç dallarınca beslenir(1).

Özetle, random flepler arteriyoller tarafından perfüze edilen dermal, subdermal pleksus tarafından rasgele şekilde beslenirler(1). Aksiyel ya da direkt kutanöz flepler ise segmental ya da muskuler damarların fasya ve üzerindeki deriyi

beslemek üzere kaslar arasındaki fasyayı geçmeden önce verdikleri septokutanöz arterler tarafından beslenir(1).

Muskulokutan flepler; kas, subkutan yağ ve cilt dokusu içerirler ve kas üzerindeki cilt arteriyel perforatörlerden beslenirken, kas komponenti major damarların dalları tarafından beslenir.

Fasyakutan flepler ise heterojen bir gruptur. Bu fleplerin perforatörleri intermuskular olabileceği gibi, kutanöz arterleri fasyanın yüzeyindeki arteriyel pleksustan da kaynaklanabilir(27).

1.3.2 İçeriklerine Göre Flep Sınıflandırması

Vücudun birçok yerinde farklı dokulardan flep oluşturulabilir. Flepler bir ya da birden fazla içeriğe sahip olabilir. Bunlar arasında cilt (kutanöz flepler), fasya, kas, kemik, viseral organlar (kolon, ince bağırsak, omentum, vs.) sayılabilir(2). Birden fazla doku içeren flepler de mevcuttur; fasyakutan, muskulokutan, osseokutan, sensoriyal flepler sıklıkla kullanılanlar arasındadır. Flepler içerdikleri doku komponentlerine göre başlıca beş ana grupta incelenebilir.

1. Kutanöz flepler
2. Kas flepleri
3. Fasya flepleri
4. Osseöz flepler
5. Kompozit flepler
 - a. Fasyakutan
 - b. Muskulokutan
 - c. Osseokutanöz
 - d. Tendokutanöz

e. Sensoriyal

1.3.2.1. Kas-Deri Flepleri

Mathes ve Nahai 1981 yılında kas ve kasın vasküler pedikülü arasındaki anatomik ilişkiyi baz alan bir sınıflandırma tanımlamışlardır(28). Bu sınıflama kasın pedikülünün bölgesel kaynağı, pediküllerin sayısı ve boyutu, kasın başlangıç ve yapışma yerine göre pedikülün lokalizasyonu, kas içindeki damarların angiografik paternleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır.

Tip I: Tek vasküler pediküle sahip kas flepleridir. Bu grubun içinde gastroknemiusun medial ve lateral başı, derin sirkumfleks iliak arter flebi, tensor fasya lata, vastus lateralis, abduktor pollicis brevis kasları bu gruptadır.

Tip II: Bir dominant pedikül ve minor vasküler pediküle sahiptirler. Bu kaslardan kaldırılan fleplerde minör pediküller kesildikten sonra dominant pedikül tüm kasın beslenmesini sağlayabilir. İnsan vücudundaki kaslarda en sık gözlenen beslenme şeklidir. Vastus medialis, sternokleidomastoid, trapez, rektus femoris ve biceps femoris bu gruptadır.

Tip III: Farklı kaynaklardan gelen iki dominant pediküle sahiptirler. Bu pediküller aynı kas içinde farklı bölgelerin dolaşımını sağlarlar ya da birbirlerine zıt yönlerden kasa girerler. Her dominant pedikülün beslediği alandan flep eleve edilebilir. Bu beslenme şekli, kasın bölünerek sadece bir kısmının kullanımını sağlar. Gluteus maximus, serratus anterior, rektus abdominis, pektoralis minör, temporal kaslar bu gruptadır.

Tip IV: Kas gövdesi boyunca kasa giren multipl segmental vasküler pediküle sahiptirler. Flep elevasyonu esnasında iki veya üç pedikülün kesilmesi kasın distalinde nekroza neden olabilir. Tibialis anterior, sartorius, eksternal oblik, fleksör hallucis longus, ekstensor digitorum longus ve ekstensör hallucis longus kasları bu gruptadır.

Tip V: Bir dominant vasküler pedikül ve sekonder segmental vasküler pediküle sahiptirler. Bu kas grubunda, kasın yapışma yerine yakın bir dominant vasküler pedikül ile orijinine yakın birkaç segmental pedikül bulunur. İnternal oblik, latissimus dorsi, pektoralis major kasları bu gruptadır.

1.3.2.2 Fasyakutan Flepler

Cilt, ciltaltı yağlı doku ve fasyanın dahil edilmesiyle oluşturulan fleplerdir. Bu fleplerde kan akımı flep tabanındaki muskulokutan perforatörlerden ya da major arterlerin septokutan dallarından sağlanır. Schafer, 1975 yılında fasyanın üç major vasküler ağını tanımlamış, ayrıca bu yapıların homojen olmadığını, anatomik bölgelere göre değişiklik gösterdiğini belirtmiştir(29,30).

1) Kastan çıkan perforatör arterlerin vertikal uzanan dalları fasyayı perfore ederek subkutan bölgeye ulaşır ve derin fasyanın superfisyal pleksusuyla anastomoz yaparlar. Bu arterlere o yıllarda “kutanöz arterler” adı verilirken günümüzde perforatörler olarak isimlendirilmektedir.

2) Subkutanöz arterler, perforatör arterlerin bulunmadığı yerlerde yer alır.

3) Subfasiyal arterler, intermuskuler septumdan ve gevşek areoler dokudan ilerler ve fasyanın derin yüzeyinde ağa katılır.

Muskulokutanöz perforatörlerde mevcut varyasyonların tersine, direkt kutanöz ve septokutanöz pediküllerin lokalizasyonu çoğunlukla sabittir ve bu pediküller ile spesifik fasyal ve fasyakutan flepler hazırlanabilir.

Cormack ve Lamberty ilk olarak 1984 yılında fasyakutan flepleri vaskülarizasyon paternine göre Tip A, B, C ve D olmak üzere sınıflandırmışlardır(27).

Tip A: çok sayıda fasyakutan perforatör tarafından beslenen, arteryel pleksus doğrultusunda kaldırılabilen flepler

Tip B: Bir fasyakutan perforatör tarafından beslenen flepler

Tip C: Cildin beslenmesinin altta yatan fasyaya bağlı olduğu, fasyanın birçok küçük perforatör tarafından beslendiği flepler

Tip D: Tip C'ye ek olarak fasyal septumun, altındaki kas ve kemik yapıları dahil edilmesiyle oluşturulan flepler

Mathes ve Nahai ise 1997 yılında, fasyal ve fasyakutanöz flepleri kanlanmalarına göre tip A,B ve C olarak 3'e ayırmışlardır(31).

1. Tip A: Direkt kaynak arterden çıkan vasküler pediküle sahiptir. Tip A fleplerde pedikül derin fasyanın altında seyrettikten sonra derin fasyanın üst kısmına dağılır. Bu pedikül deriye pek çok sayıda fasyakutan perforatör verir. Pedikül kaynak arterden çıktıktan sonra longitudinal şekilde cilde dağıldığından bu tipteki flepler aksiyel paternli olarak kabul edilir. Dominant pedikülün uzun ve yüzeysel yerleşimi palpasyonla ya da Doppler probu ile saptanabilmesine olanak verir.

2. Tip B: Septokutanöz pediküle sahiptir. Pedikül major kas grupları arasındaki intermuskuler septumda veya komşu kaslar arasında ilerler. En geniş septokutanöz pedikül spesifik fasyakutan fleplerin dominant pedikülü olarak kabul edilir ve sabit lokalizasyonda bulunurlar.

3. Tip C: Deriyi ve derin fasyayı besleyen muskulokutan perforatöre sahiptirler. Tip C fasyakutan flepler perforatör fleplerin anatomik modelini oluştururlar.

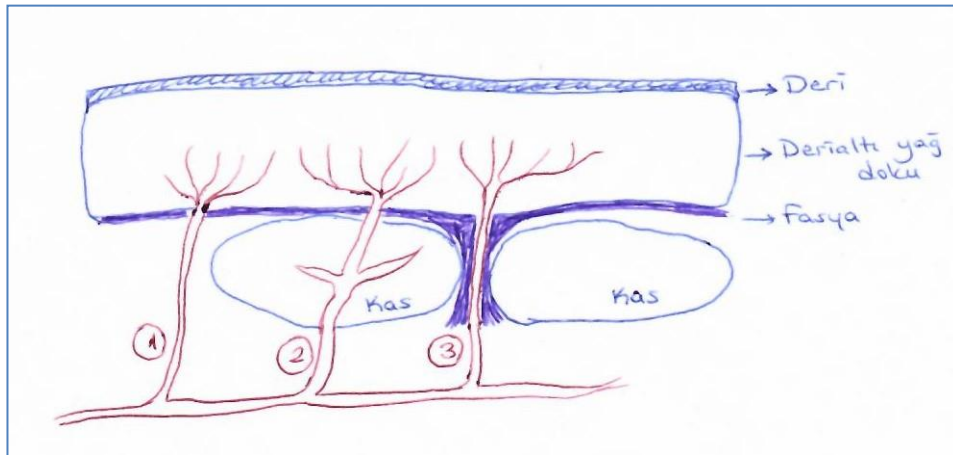
1.4 Perforatör Flepler

İlk kez 1989 yılında Koshima ve Soeda tarafından perforatör flep terimi kullanılmıştır(24). Önceki yıllarda deri defektlerinin onarımı sırasında kas-deri flepleri kullanılmaktaydı. Bu onarımlarda kas kitlesinin üzerindeki deri flebini beslemesi dışında bir işlevi yoktu(24). İki vakalarında, muskuler bir damar üzerinden kaldırdıkları bir cilt flebini kullanmışlar ve bunu fasyakutan fleplerden ayırmışlardır. Olgularında, rektus abdominis muskulokutan flebini, kas kitlesini dahil etmeden diseke ederek, inguinal bölge ve dil onarımı

yapmışlardır (24). Kasın inervasyonunu bozmaması ve kasın fonksiyonunun bozulmaması sayesinde donör saha morbiditesinin daha az olması nedeniyle sonraki yıllarda perforatör flepler popülerlik kazanmıştır.

Perforatör flep, aksiyel bir damardan çıkan ve belirli yapılardan geçerek flebe ulaşan bir perforatör damar tarafından beslenir. İsimlendirme ve sınıflandırması 2003 yılında Blondeel ve arkadaşları tarafından Gent Konsensusu'nda yapılmıştır (5).

Derin fasyayı delerek cilde ulaşan perforatörlere direkt perforatörler adı verilir. Öncesinde herhangi kas ya da fasya gibi bir yapı içerisinde geçerse, buna indirekt perforatör adı verilir. Damar, kasın içinden geçip derin fasyanın dış tabakasını delerek deriye ulaşırsa kas perforatörü olarak tanımlanır. İntermusküler septumdan geçerek derin fasyanın dış tabakasına ulaşan damarlara septal ya da septokutan perforatör adı verilir. Bir kas perforatörü tarafından beslenen deri flebine muskulokutan perforatör flebi ismi verilirken, septal bir perforatör tarafından beslenen deri flebine septokutan perforatör deri flebi adı verilir (5,24,32,33). (Resim 1)



Resim 1. Perforatör fleplerin şematik tanımı. (1=Direkt kutanöz perforatör, 2: Muskulokutan Perforatör, 3= Septokutan Perforatör)

1.5 Flep Fizyolojisi

Cildin beslenmesi subkutan yağ dokuda bulunan derin vasküler pleksus, retiküler dermis ve papiller dermiste bulunan superfisyel pleksusu içeren

mikrosirkulatuar sistemden oluşur. Flebin beslenmesi ana arteriyel akımla gelen kan ve venöz dönüşü içeren mikrosirkülasyon yatağı sayesinde olur. Arterioller, venüller, kapiller damarlar ile arteriovenöz anastomozlar perfüzyonu sağlayan yapılardır (1).

Yüzeyel pleksus, metabolik olarak aktif olan epidermisi difüzyon yoluyla besler. Dermal ve subdermal pleksuslar, deriye paralel olarak uzanır ve birçok kollateral sayesinde dolaşım sağlanır. Bu yapı, cilt düzeyine dik olarak uzanan septokutan ya da muskulokutan arterlerden beslenir (1).

Cildin inervasyonu duyuşal ve sempatik sinir sistemi sayesinde olur. Cilt insizyonu kaçınılmaz olarak bölgenin cilt perfüzyon basıncının azalmasına yol açar. Sempatik sistemin yanıtı sonucu salınan noradrenalin, arterioller sfinkterlerin kasılmasına ve dolayısıyla ilgili bölgenin kan akımının azalmasına yol açar (34).

Flebin kaldırılmasıyla kan akımına etki eden sistemik ve lokal kontrol mekanizmaları ortaya çıkar. Sistemik kontrol mekanizmaları arasında nöral ve hormonal regülasyon mekanizmaları yer alır. Nöral regülasyon en önemli mekanizmadır, ve sempatik adrenerjik reseptörlerden etkilenir. Hormonal regülasyonda ise adrenalin, noradrenalin, serotonin, prostoglandinler, tromboksanlar gibi mediatörler yer alır. Lokal kontrol mekanizmaları arasında ise metabolik faktörler ve fiziksel faktörler yer alır. İnsizyonla birlikte hiperkapni, hipoksi, asidoz ve hiperkalemi oluşur. Azalan kapiler akım fiziksel olarak yanıt oluşturur. Miyojenik refleksiyle azalan bu kan akımını korumak için vazokonstriksiyon ve buna bağılı lokal hipotermi olur (34).

Flep transferi gerçekleştirildikten sonra iskemi ve sempatik inervasyonun kaybı meydana gelir. İskemi 6-12. saatlerde platoya ulaşır, ilk günün sonunda kapiller dilatasyon ve ödem oluşmaya başlar (34).

Neovaskülarizasyon, flebin transferi sonrasında 3-7. günlerde başlar. Anjiogenik stimulanlarla en uçta yer alan vasküler yapılar dilate olur, bazal membran incilir. Endotelyal hücreler proliferer olur, öne doğru göç ederek

angiogenezi oluşturur. Alıcı kapillerlerin flepte var olan damarlara doğru büyümesi ile inoskulasyon meydana gelir. Anjiyogenez fonksiyonel olarak 5-7. günlerde zirveye ulaşır. Arteryel akım paterni ise eski düzeyine 3. haftada yaklaşır (34).

1.6 Flep Kaybı

Flebin yaşayabilirliğine etki eden birçok faktör vardır ancak en önemlileri flebin kan akımı ve flep ile alıcı yatak arasındaki yeni vasküler kanalların oluşumudur. Flebin yaşayabilen uzunluğunu belirleyen esas kriter besleyen damarlardaki perfüzyon basıncıdır(1). Geçmişte tabanı ne kadar genişse, yaşayabilen uzunluk o kadar fazladır inancı, flebe dahil edilen damarlarda artış sağlanmasıyla flebin yaşayabilen uzunluğunun arttığı gösterilerek değişmiştir(1).

Pediküllü bir flebin transferi sonrasında oluşan sempatektomi, daha önce bahsedilen adrenalin ve noradrenalin gibi mediatörlerin salınması ve oluşan yanıtlar flebe gelen kan akımını azaltır. Bununla birlikte venöz dönüşte de yetersizlik olabilir.

Kerrigan ve arkadaşları flebin herhangi bir yerinde gelişebilecek nekrozda üç teori tanımlamışlardır: Birincisi geniş flep dizayn edilmesine bağlı beslenme yetersizliği, ikincisi arteriyel tromboz, üçüncüsü venöz trombozdur. Random ve aksiyel pediküllü fleplerde vasküler sistemde tromboz; flep pedikülüne bası, sepsis, hipotansiyon, sigara kullanımı, vazokonstriktörler nedeni olur. Neticede mikrosirkulasyonda kan akım debisi düşmekte ve göllenme nedeni ile tromboz oluşmaktadır(7).

Perfüzyon basıncındaki azalmadan en çok flebin distali etkilenir(8). Flebin distali, genellikle esas olarak rekonstrüksiyon amacıyla taşınması hedeflenen kısımdır. Sıklıkla flepteki nekroz distalinde, yani transfer edilmek istenen kısmında gerçekleşir. Flebin distalindeki nekroz problemini gidermek amacıyla literatürde yapılmış birçok çalışma mevcuttur(10,35–38) Cerrahi olarak geciktirme işleminin yanı sıra, farmakolojik ajanlar, doğal bitki türevleri,

canlıdan elde edilen kemik iliği kaynaklı ya da yağ dokudan elde edilen kök hücreler bu çalışmalarda kullanılmış olan ajanlardan bazılarıdır.

Endotelyal progenitörler içinde en sık kullanılan ve çalışma yapılan ajanlardan biri VEGF'(VEGF; vascular endothelial growth factor)dür(39). VEGF'nin topikal ve intravenöz kullanımlarının ikisinde de iskemik dokularda, cilt fleplerinde de dahil olmak üzere, revaskülarizasyonu tetiklediği gösterilmiştir (37). Ancak VEGF, var olan endotel hücreler üzerine etki gösterir, bu nedenle çalışmalar endotel hücrelerin yeni kan damarları oluşturmasını sağlamak amacıyla sayısını arttırmak yönüne çevrilmiş, kök hücre araştırmaları önem kazanmıştır (40).

2. Kök Hücre

2.1 Kök Hücre Tanımı ve Çeşitleri

Kök hücreler, endotelyal progenitör hücrelerin de dahil olduğu çok geniş bir hücre grubuna farklılaşabilen farklılaşmamış öncü hücrelerdir (40). Major olarak iki çeşit totipotent kök hücre mevcuttur: embriyojenik kök hücre ve embriyojenik germ hücreler. İlk olarak 1981 yılında Evans ve Kaufman tarafından fare embriyosundan derivate embriyojenik kök hücreler rapor edilmiştir(41). Thomson ve arkadaşları ise ilk insan embriyojenik kök hücre dizilimini 1998 yılında bulmuştur(42). Bu totipotent hücrelerin tüm diğer hücrelere farklılaşma kabiliyeti vardır. Ancak bu iki hücrenin de klinik kullanımlarında kısıtlamalar mevcuttur. Bu kısıtlamaların başında etik sorunlar gelirken, immunolojik reaksiyon ve kontrol edilemeyen hücrelerin yol açabileceği tümöral oluşumlar gibi diğer sorunlar mevcuttur(43).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), erişkin dokuda bulunan, diferansiye olmamış, kendini yenileme kabiliyetine sahip ve mezodermal diferansiyasyon potansiyeli olan kaynaklardır. Belirli koşullar altında MKH'ler, fibroblastlar, osteoblastlar, osteositler, kondrositler, adipositler, adventisit retiküler hücreler, düz kas hücreleri, endotel hücreleri, miyelosupportif stroma ve sinir

dokusuna farklılaşabilmektedir (44,45). Bu kök hücrelerin bulunduğu majör kaynaklar kemik iliği, umbilikal kord kanı, yağ dokudur.

2.1.1 Umbilikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

Kök hücre kaynaklarından biri umbilikal kordan alınan kandır. Buradan, anne ve fetuse zarar vermeden, hematojenik kök hücreler elde edilerek, kardeş donörlerden alınan kök hücre ile lösemi tedavisi denenmiştir(46). Umbilikal kök hücrelerin elde edilmesi ile ilgili üç farklı sorunla karşılaşılmaktadır. İlki, etik sorundur. İkinci olarak alıcıdaki immünojenik sorunlar ortaya çıkar. Üçüncü sorun, teratom ya da teratokarsinom gibi tümör formasyonu oluşturabilecek hücrelerin dahil olma riskidir(43).

2.1.2 Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (KİMKH)

Pittenger ve arkadaşları tarafından erişkin insan kemik iliğinde mezenkimal kök hücreler olduğu gösterilmiştir(44). Postnatal kemik iliği hücrelerinde bulunan hematopoetik hücreler ve mezenkimal kök hücreler ile birlikte heterojen bir hücre popülasyonu ile kemik iliği stromasını oluşturur(47). Bu hücrelerin vaskülogeneziste rol aldığı birçok çalışmada gösterilmiştir(48,49).

2.1.3 Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre

Son yıllarda hücre biyolojisi ve genetik bilimindeki hızlı ilerleme, kök hücrelerin laboratuvar ortamlarında incelenebilmesini sağlamıştır. Kemik iliği kökenli kök hücreleri, Zuk ve arkadaşlarının yağ dokuda mezenkimal hücre bulunduğunu göstermesine kadar major kök hücre kaynağı olarak kabul edilmiştir (50). Yapılan çalışmalarda adipöz stromal komponentin içerisinde kök hücrelerin olduğu bulunmuştur. Bu hücre popülasyonuna yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ismi (YDMKH) verilmiştir. Kemik iliğinde bulunan kök hücrelerin elde edilmesine benzer şekilde yağ dokudan elde edilirler. YDMKH'ler birçok diferansiyasyon kabiliyetine sahiptir, osteojenik, kondrojenik, adipojenik, myojenik, nörojenik ve anjiyojenik yolakları vardır(51).

Adipoz kökenli kök hücreler, diğer kaynaklardan elde edilen kök hücrelere göre daha az invaziv yöntemlerle elde edilebilir. Aynı zamanda yağ doku, kemik iliğine göre daha fazla kök hücre barındıran bir kaynaktır (52). KİMKH'ler elde edildikten sonra, oransal olarak daha az bulunmaları nedeniyle daha fazla kültüre edilmeleri gerekir. Ayrıca, ilerleyen yaşla birlikte kemik iliğinde yer alan KİMKH sayısının azalmakta olduğu kanıtlanmıştır (53). Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelere benzer hücrelerin adipöz dokuda olduğu ve liposakşın yöntemi ile elde edilen lipoaspiratta bolca bulunabildiği birçok çalışmada gösterilmiştir (51,54). Bu nedenlerle, bu kök hücre kaynakları incelenmiş, yağ doku kökenli kök hücreler üzerinde çalışma sayıları gün geçtikçe artmıştır. YDMKH'lerin büyük sayılarda elde edilmesi daha kolaydır, KİMKH'lere kıyasla donör saha morbiditeleri çok daha azdır. Ekstraksiyon, izolasyon ve kültüre edilmeleri göz önüne alındığında yağ doku kaynaklı kök hücreler araştırmalarda daha sıklıkla kullanılmaktadır (55).

Literatürde, kemik iliği, yağ doku ve umblikustan elde edilen kök hücrelerin etkinliği karşılaştırılmıştır. Morfoloji, immunojenite ve pluripotent diferansiasyonları arasında fark olmadığı görülmüştür (52). Aynı araştırmada, bu üç grup içerisinde, yağ doku kaynağından en az invaziv yöntemle ve en az donör saha morbiditesi ile en fazla hücre sayısının elde edilebildiği gösterilmiştir (51).

2.2 Vasküler Stromal Fraksiyon

Vasküler stromal fraksiyon (VSF) yağ dokudan özel tekniklerle elde edilen bir üründür. Yağ dokusu küçük parçalara bölündükten sonra kollajenazla muamele edilerek hücreler arası bağlantılar kırılır. Oluşan süspansiyon santrifüj edildiğinde üç kısma ayrılır; üstte olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserit, ortada olgun yağ hücreleri ve en altta VSF yer alır. Vasküler stromal fraksiyon içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler bulunmaktadır(54). Vasküler stromal fraksiyon içerisindeki kök hücreler uygun ortamlarda çoğalabilmekte, farklılaşabilmektedir. Bu hücreler tedavi amaçlı doku yenilenmesinde büyük bir potansiyel oluşturmaktadır. Vasküler stromal fraksiyonun, granülosit

makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), ve transforming growth faktör - β (TGF- β) gibi anjiogenik ve antiapoptotik sitokinleri üretme potansiyeli vardır(56).

2.3 Kök Hücrelerin Plastik Cerrahide Kullanımı

Kök hücre tedavisinin, birden fazla etkisinin ortaya çıkarılması üzerine plastik cerrahide kullanım alanları artmıştır. Travmatik yaraların kullanımı başta olmak üzere, rekonstruksiyon için daha büyük cerrahi operasyon gerekliliğini ortadan kaldırmak, estetik işlemlerde de sonucu iyileştirmek için kök hücre tedavilerine başvurulmaktadır (8,9,56,57). Kök hücre tedavilerinin güncel kullanımdaki endikasyonları arasında travmatik cilt defektleri, ciddi yanıklar, diyabetik ayak ülseri, radyasyon ülserleri yada bası yaraları gibi kronik ve komplike iskemik yaralar yer almaktadır. Bunun dışında allotrasplantasyon reddinin önlenmesi, cilt gençleştirme, skar görünümünde iyileşme, hatta meme büyütme gibi yumuşak doku augmentasyonu yöntemleri olarak da kullanılmaktadır (57,58).

2.4 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücreler Ve Plastik Cerrahi

Adipöz dokunun içerisinde matür adipozitler, preadipozitler, fibroblastlar, vasküler düz kas hücreleri, endotelial hücreler, monosit/makrofajlar ve lenfositler yer alır(54,56). Yağ emme işlemi sonrasında aspiratörde kalanlar preop enjekte edilen primer salin solüsyonu, periferik kan ve adipöz dokudan elde edilen hücre ve doku parçalarıdır. Bu karışımda esas olarak adipöz doku parçalarında, bunun yanı sıra sıvı aspirat kısmında da kök hücre bulunduğu kanıtlanmıştır (54). Zuk ve arkadaşları, 2001 yılında lipoaspirat materyalini salinle yıkama, kollajenaz ile sindirim, inkubasyon ve santrifuj sonrası elde edilen stromal vasküler fraksiyonu, salinle yıkama ve inkubasyon işlemlerinden geçirdikten sonra kalan kısma İşlenmiş Lipoaspirat (PLA) adını vermiştir(50). VSF'dan elde edilen ve çok yönlü (multi-lineage) farklılaşma yeteneğine sahip hücre grubuna erişkin yağ dokusu kaynaklı kök hücre (YDMKH) adını vermişlerdir(50).

Yağ emme işlemi ile birlikte multipotent YDMKH elde edilmesi işlemi başlar. YDMKH'lerin plastik cerrahide sıklıkla yapılmakta olan yağ emme yöntemiyle elde edilebilmesi, plastik cerrahların kök hücreyi alanlarında kullanmasını olumlu yönde etkilemiştir. Bu yolla elde edilen kök hücreler manipulasyon ya da kültüre edilmesi gerekmeden kullanılabilir. Bu hücrelerin plastik cerrahide birçok alanda kullanımı amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Klinik olarak 3 esas kullanım alanı mevcuttur: yumuşak doku augmentasyonu, yara iyileşmesi, doku mühendisliği. Son yıllarda özellikle meme augmentasyonunda kullanımı artmaktadır(59).

2.5 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Cilt Flepleri Üzerine Etkileri

Cilt fleplerinin yaşayabilirliğinin artması neovaskülarizasyondaki artışa bağlıdır. Neovaskülarizasyon iki yola sağlanır: anjiogenez ve vaskülogenez. Anjiogenez, dokuda var olan kapillerlerin distalinden tomurcuklanma ile ileriye doğru uzaması olarak tanımlanır. Endotel hücrelerinin proliferasyonu söz konusudur. Anjiogenez, nitrik oksit ve VEGF gibi maddelerin salınımı sonucu oluşan vasküler permeabilitede artış ile başlar (60). Ekstravazasyon, anjiopoetin 1 ve 2 gibi sitokinlerin salınımı sağlar, böylece var olan kan damarı ve ekstraselüler matriks yapısı yok edilir. Bunun sonucunda endotel hücreler bölgeye göç ederek yeni vasküler ağ ve ekstraselüler matriks yapısını sağlar. Anjiogenezin bu ve sonraki safhaları VEGF başta olmak üzere büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından düzenlenir (40).

Vaskülogenez ise anjiogenik progenitör hücrelerin vaskülarizasyonun olacağı alana ilerlemesi ve burada endotel hücrelere farklılaşması sürecidir (39,61).

Kök hücrelerin, özellikle kemik iliği kaynaklı kök hücre (KMKH) ve yağ hücresi kaynaklı kök hücrelerin (YDMKH) neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir (10,48). Çeşitli çalışmalarda kemik iliği, yağ doku ve umblikustan elde edilen kök hücrelerin etkinliği karşılaştırılmıştır. Morfoloji, immunojenisite ve pluripotent diferansiyasyonları arasında fark olmadığı görülmüştür (52). Hem yağ doku kökenli hem kemik iliği kökenli kök

hücrelerin proanjiogenik etkileri olduğu ortaya konulmuştur, ancak anjiogenezis mekanizmaları farklıdır (38).

Literatürde YDMKH ile random paternli flepler üzerine ile yapılan çalışma Lu ve arkadaşları tarafından 2008 yılında gerçekleştirilmiştir(43). Bu çalışmada, YDMKH'lerin enjeksiyon yerlerinde kapiller dansite artışı hem çıplak gözle, hem de histopatolojik olarak ortaya konmuştur. Bu dansite artışında yeni endotel hücrelerinin transfer edilen kök hücreden derive olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak, transplante edilen kök hücrelerin VEGF gibi anjiyogenik büyüme faktörlerini uyararak neovaskülarizasyonu başlattığı kanıtlanmıştır (43).

Kök hücrenin intravenöz ya da lokal uygulanmasının avantaj ve dezavantajları mevcuttur. İntravenöz uygulamalarda, yetişkin hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda iskemik dokuda neovaskülarizasyonu arttığı kanıtlanmıştır. Lokal enjeksiyon, YDMKH'lerin hedef dokuda daha yoğun dansitede olmasını sağlar. Bu kümelenmenin hücrelerin canlılığının arttırdığı düşünülmektedir. Ayrıca, lokal uygulama daha az sistemik yan etkiye neden olur. Bu nedenle lokal uygulamaların daha güvenli olduğu kabul edilmiştir (43).

2.6 Mezenkimal Kök Hücrelerle İlişkili Sitokinler Ve Büyüme Faktörleri

Yara iyileşmesinde hemostaz aşamasıyla başlayan süreç, sırasıyla inflamasyon, proliferasyon ve remodelling aşamasıyla son bulur (62). İlk olarak nötrofiller, lenfositler ve makrofajlar yara bölgesine göç eder. Makrofajların en önemli rollerinden biri fibroblastik proliferasyonu, diferansiyasyonu, anjiyogenezi ve kollajen sentezini stimüle edecek olan mitojenik ürünleri salgılamaktır. Aktif makrofajlar tarafından sentezlenen büyüme faktörleri arasında platelet derived transforming growth factor (PDGF), interlökin (IL)-1, platelet-activating factor (PAF), transforming growth factor (TGF)- β , tumor necrosis factor (TNF), fibroblast growth factor (FGF) and epidermal growth factor (EGF) yer alır (63,64).

MKH (Mezenkimal kök hücre)'ler tarafından anjiogenik, antiapoptotik ve mitojenik faktörler salgılanır (36,58). Bu kök hücrelerin, yalnızca diferansiyasyonla değil, salgıladığı faktörler aracılığıyla da anjiogeneze etki ettikleri bilinmektedir (43,65). Bu faktörler hasara uğramış dokuların rejenerasyonunu sağlar, yara iyileşmesini aktive eder ve vaskularizasyonu artırır. Bu faktörlere örnek olarak transforming growth faktör- β (TGF- β), hepatosit growth faktör, IL-1, IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, IL-11 gösterilebilir (39,66). Bu ajanların yara iyileşmesine olduğu gibi ve fleplerin sağkalımına da katkısı olduğu bilinmektedir (66,67). MKH'lerin salgıladığı büyüme faktörleri ve diğer sitokinler, iskemi- reperfüzyon stresinin azaltılmasını düzenler (65,68).

VEGF, yara iyileşmesinin erken fazında kollajen üretimini ve anjiyogenezi indükler (69). VEGF kullanılarak, yaşayabilen flep ölçülerini arttırmayı hedefleyen çalışmalar mevcuttur ve başarılı oldukları görülmüştür (43,66,67). Ancak sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin yarı ömürleri kısadır, ve iyileşme mekanizmasına farklı zamanlarda farklı yollarda etki etmektedirler(70). Bu nedenle tek başlarına verilmesinin yeterli olmayabileceği düşüncesi benimsenmiştir.

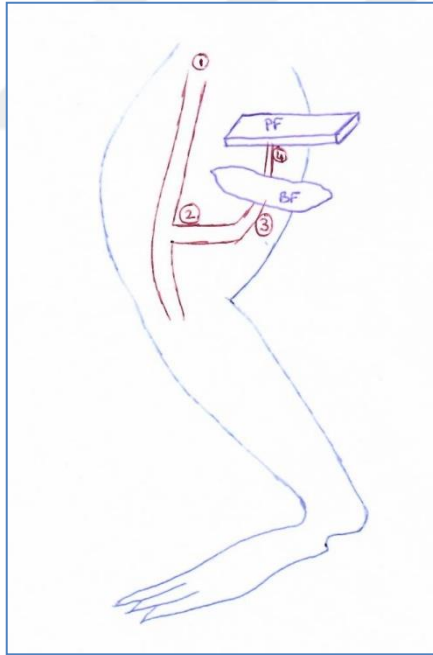
3. Deneysel Perforatör Flep Modelleri

Sıçanlarda perforatör flep modeli olarak tanımlanmış ve klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmakta olan birçok model mevcuttur (72). Sıçanlardaki ilk perforatör flep modeli 2001 yılında Okşar ve arkadaşları tarafından, rektus abdominis kası perforatöründen tanımlanmıştır(73). 2003 yılında Hallock ve Rise bu flebin pedikülünü superior epigastrik damarlara uzatarak kranial epigastrik perforatör flebi adı ile yayınlamışlardır (32,33). Coşkunfırat ve arkadaşları 2002 yılında "uyluk arkası perforatör flebi"ni tanımlamışlardır (33,74). Perforatör flepler klinikte önem kazandıkça deneysel modellerde de artış görülmüştür. 2007 yılında Rodriguez ve arkadaşları tarafından grasilis kasının perforatörü ile beslenen anteromedial uyluk flebini yayınlamıştır (75). 2010 yılında Kayano ve arkadaşları, kliniklerinde sıçanlar üzerinde iki perforatör flep daha tanımlamışlardır. Bunlardan biri superfisyal gluteal kasın perforatörü lateral sirkumfleks femoral arter bazlı gluteal arter perforatör flebi

ve diğeri kutaneus maksimus kasından lateral torasik arter bazlı torakodorsal arter perforatör flebidir (72). Bu fleplerin anatomik yapılarının insandakinden farklılık gösterse de, diseksiyon işleminde pratiklik ve tecrübe için asistan eğitiminde kullanılmasının da faydalı olduğunu savunmuşlardır (72).

3.1 Posterior Uyluk Perforatör Flebi

Bu flep biceps femoris kas-deri flebinden türetilmiştir. Yenidoğru ve arkadaşları tarafından ilk olarak 1998 yılında “kaudal femoral arter flebi” adıyla aksilyel pediküllü deri flebi gibi tanımlanmıştır (76). Coşkunfırat ve arkadaşları tarafından, tanımlanan bu flebin pedikülünün mikroanjiyografik yöntemlerle biceps femoris arterinden kaynaklandığını gösterilmiştir(74) (Resim 2). Yayınlarında flebi 3x2cm ve 3x4cm olarak kaldırdıklarında fleplerin %100 oranında yaşadığını, ancak 3x12cm kaldırdıklarında middorsal bölgeye kadar yaşayabildiğini göstermişlerdir(74).



Resim 2. Posterior uyluk perforatör flebi, anatomik çizimi. (1=popliteal arter, 2=Kaudal femoral arter, 3=Biceps femoris kası besleyen dalı, 4=Muskulokutanöz perforatör (pedikül), BF=Biceps Femoris kası, PF=Perforatör Flep)

Bu çalışmada, otokannibalizm riskini azaltmak ve nekroz alanındaki değişikliklerin gösterilebilmesi amacıyla geniş bir flep modeli elde etmek için dorsal bölgede yerleşimli muskulokutan bir perforatöre sahip olan biceps

femoris arter perforatörüne sahip posterior uyluk perforatör flebi kullanıldı. Elde edilmiş kolaylığı ve oransal olarak elde edilen dokuda daha fazla bulunması nedeniyle, yağ doku kaynaklı kök hücrelerin etkinliği araştırılmıştır. Plastik cerrahide kullanımı gittikçe artan perforatör flepler üzerindeki etkisini gözlemek amacıyla, sıçanın dorsal bölgesinde kaldırılan perforatör flep üzerine yağ doku kökenli kök hücre uygulaması yapılarak, makroskopik ve mikroskopik değerlendirmeler yapıldı. Makroskopik olarak flebin yaşayabilirliğindeki artış gözlemlendi. Histopatolojik incelemelerde mezenkimal kök hücre (MKH) varlığı, kapiller sayısı, kollajen üretimi, fibrozis oluşumu, kıl folikülü ve bez oluşumu, hücre çoğalması için etkisi, oksidatif strese etkisi, IL-1 ve IL-6'nın inflamasyona etkisi, VEGF ile damarlanmaya olan etkileri incelendi.

III. Gereç ve Yöntem

Tüm hayvan deneyleri Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (MCBÜ HADYEK) tarafından onaylanarak yapıldı. Ağırlıkları 300 ± 50 g olan 18 adet Wistar Albino dişi ve erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların tümü Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilmiş ve yine orada 22°C sıcaklık, % 30-70 nem, aydınlık/karanlık döngüsü 12/12 saat olacak şekilde takip edilmiştir. Tüm deneyler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde yapılmıştır.

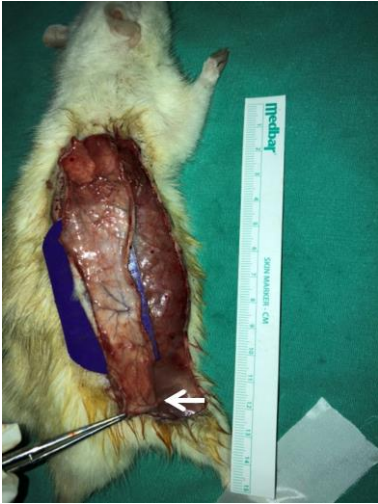
1. Posterior Uyluk Perforatör Flebinin Kaldırılışı

Tüm sıçanlar, Ketamin (75mg/kg) ve Ksilazin (10mg/kg) kombinasyonu ile elde edilen ve intramuskuler olarak uygulanan anestezi altında sırt ve uyluk bölgesi elektrikli traş aleti ile tüylerinden arındırıldı. Korneaların kurummasını önlemek için kloramfenikol göz pomadı kullanıldı. Sıçan çalışma tepsisine pron pozisyonda yapışkan bantlarla sabitlendi, sırt bölgesi alkolle silindi ve kurutuldu. Coşkunfırat ve arkadaşları tarafından tanımlandığı şekilde çizim oluşturuldu (74). Flep tasarlanırken flebin inferioru gluteal kıvrımın 1cm inferiorune yerleştirildi. Dorsuma doğru orta hattı geçmeyecek şekilde 3x12cm'lik flep çizimi yapıldı. (Resim 3)

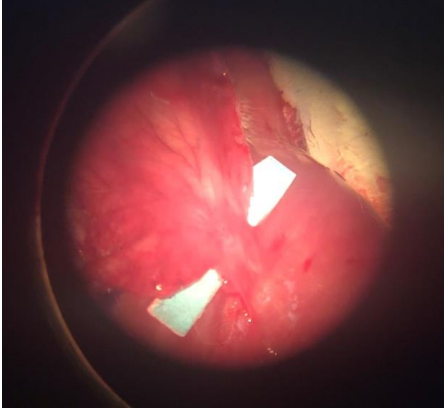


Resim 3. Flebin tasarlanması

Kaudal uçtan insizyona başlandı. Mikroskop altında diseksiyon ilerletildi. İnsizyonun birkaç milimetre superioründe biceps femoris kasından çıktığı görülen perforatör görüldü, korundu. (Resim 4 ve 5)



Resim 4. Perforatörün makroskopik görüntüsü (Beyaz ok ile işaretli)



Resim 5. Korunan perforatör damarın mikroskop altındaki görüntüsü

Diseksiyon superioire doğru subpanniküler planda ilerletildi. İnterkostal arterler kesilerek flebin sadece perforatör arter üzerinden beslenmesi sağlandı. (Resim 6)



Resim 6. Subpanniküler planda kaldırılan flep

Flep sonrasında eski yerine 4/0 emilen suturelerle tespit edildi. Povidon iyodin ile pansuman yapılarak işlem sonlandırıldı. (Resim 7)



Resim 7. Flebin yerine inset edilmesi

2. Kök Hücre Uygulaması

2.1 Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eldesi

Çalışmada Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (YDMKH) eldesi için erkek sıçanların yağ dokusundan alınan hücreleri ayırışmayı takiben 25cm²'lik kültür kabında % 15 fötal buzağı serumu (FBS) (S0113, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. Amfoterisin (A2612, Biochrom, Berlin, Germany), 50 µgr./ml. Gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. Streptomisin (A2213, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. penisilin ve 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Germany) ilave edildiği α-MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Germany) kültür vasatında 370C'de ve %5 CO₂'e ayarlanmış ortamdaki inkübatörde çoğaltıldı. Üçüncü günün sonunda kök hücreler ve yüzeye tutunmayan hücreler vasatın değiştirilmesi sonucu ortamdan uzaklaştırıldı. Sonra kültür kabına yapışan hücrelerin besiyeri konfluent olana kadar iki gün arayla değiştirildi.

Yaklaşık 16-18 gün sonra, inverted mikroskop (IX71, Olympus, Japan) altında hücrelerin çoğalmaları kontrol edildi; kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücre ile dolduğunda (%70-80 konflüente ulaşıldığında) pasajlanmaya başlandı. Birincil kültür sıfırncı pasaj (P0) olarak kabul

edilerek, birincil kültürden sonra her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 olarak belirlendi.

Laminar flow steril kabinde gerçekleştirilen pasaj işleminde; besiyeri ve tutunmayan hücreler döküldükten sonra, flask yüzeyi 3-4 ml steril PBS (Phosphate buffer saline, L1815, Biochrom, Berlin, Germany) ile yıkandı. Yaklaşık 1.5-2 ml %0.25 tripsin-EDTA (L2143, Biochrom, Berlin, Germany) solusyonu ilave edilerek, CO₂ inkübatörde 4-5 dk inkübe edildi. İverted mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldükten sonra, tripsinin etkisini ortadan kaldırmak için flaslara, 4 ml besiyeri eklendikten sonra hücreler 15 ml'lik tüplere alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifuj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pelete 1 ml besiyeri eklenip, homojenizasyon için pipetlendi. Arkasından, hücre sayımı için eppendorf tüpüne 100 µl hücre süspansiyonu eklendi. Hücre süspansiyonun üzerine 100 µl tripan mavisi solusyonu eklendi. Thoma lamında ışık mikroskobu altında hücre sayımı gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler, uygun oranlarda besi ortamıyla seyreltilerek, 1x10⁶ hücre yoğunluğunda 75 cm²'lik kültür flasklarına (T-75 kültür kaplarına) ekimi yapıldı ve iki günde bir besi ortamı değiştirilerek kültür işlemine devam edildi.

2.2 Kök Hücre Sayımı

YDMKH için her pasaj işlemi sırasında, dondurma ve çözündürme işlemleri sonrasında ve karakterizasyon işlemleri öncesinde gerçekleştirilen hücre sayımları Karaöz ve ekibinin (2009) metoduna uygun olarak gerçekleştirildi (47).

Hücre sayımı için; sayım kamarası olarak Thoma lamı kullanıldı. Lam, düz bir zemin üzerine alındı, sayım alanı çerçevesi üzerine lamel kapatıldı. Tripan mavisi ilave edilmiş süspansiyondan 50 µl alınarak, Thoma lamının iki yanında bulunan kanalların ortasında lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucu ile tam orta noktasından hücre solusyonu sayım alanına pipetlendi. Sayım, ışık mikroskobunda, x40 objektifte gerçekleştirildi. Toplam hücre sayıları aşağıdaki formüle göre hesaplandı; Canlı hücre sayısı = Boya almamış hücre sayısı/Toplam hücre sayısı x 100.

2.2.Hücre Canlılık Testi

YDMKH için canlılık ve çoğalma potansiyelini tespit etmek için “MTT canlılık testi” (M6494, İnvitrogen) uygulandı. Canlı ve apoptozisin başlangıç evresindeki hücrelerin mitokondriyonlar aracılığıyla MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solusyonuyla meydana getirdiği reaksiyonda, MTT'nin tetrazolyum halkası hücre mitokondriyonlarında bulunan dehidrojenaz enzimleri tarafından parçalanırlar ve mor renkli formazan kristalleri oluştururlar, ölü hücreler bu formazan kristallerini oluşturamazlar. Meydana gelen renk mitokondri aktivitesiyle ilişkili olup, oluşan formazan kristalleri izopropanol/HCl veya dimetilsülfoksit (DMSO) bulunduran çözücülerde çözünebilmektedir ve oluşan mavi/mor renk spektrofotometride (mikroplaka okuyucuda) 570 nm'de ölçülebilmektedir.

Pasaj 3'teki hücreler, kültür kaplarında %70-80 konflue olduklarında MTT testine alındı. Pasajlama sonrası, 96 kuyucuklu kültür kaplarına 12.500 hücre/kuyucuk şekilde ve 1., 3., 7. gün uygulamaları şeklinde ekildi. Belirlenen günlerde her kuyucuktaki hücreler PBS ile yıkandı ve 1 dk sonra PBS uzaklaştırıldı. Sonrasında, her kuyucuğa 100 µl taze kültür vasat ilave edildi ve üzerine 10 µl 12 mM MTT stok solusyonundan eklendi. Alüminyum folyoyla sarılarak 37°C'de 4 saat bekletildi. İnkubasyondan sonra solusyon çıkartıldıktan MTT içeren kültür vasatı uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 50 µl DMSO (DMSO, A3672, Darmstadt, Germany) ilave edildi, oda ısısında 10 dk bekletildi ve absorbans 570 nm'de dalga boyu seçicisi sistemli spektrofotometrede (ELx800UV, BioTek) canlılık oranı belirlendi. Bu olaylar her deney 3 kez tekrarlandı (77).

2.3 Kök Hücre Karakterizasyonu

YDMKH'leri P3' e kadar çoğaltıldıktan sonra karakterizasyonu indirekt immunohistokimyasal yöntemle anti-Stro-1 (MAB4315, Millipore) ve anti-CD44, CD90 ve CD45 (sc-168, Santa Cruz Biotechnology) antikoları kullanılarak gerçekleştirildi. Stro-1 (+) ve CD44, CD90 ile CD45 (-) ile olan P3' teki hücreler, mezenkimal kök hücre olarak kabul edildi (47).

Hücrelerin bir kısmı 8 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve konfluent olan hücreler fosfat tamponunda (PBS, Phosphate buffer saline) hazırlanmış %4'lük paraformaldehid (pH 7,4) ile 30 dk fikse edildikten sonra 3x5'er dk PBS (00-3002, Invitrogen, CA, USA) ile yıkandı. Bir sonraki aşamada %0,1'lik Triton-X100 (T8787, Sigma, St.Louis, USA) solüsyonu ile 15 dk inkübe edildi ve tekrar PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi ve %3 hidrojen peroksit (1.08600, Merck, Darmstadt, Germany) ile 30 dk bekletildi ve böylece endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi. PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra bloklama serumuyla bir saat inkübe edilen hücreler yıkanma yapılmadan sadece serumun alındıktan sonra anti-Stro-1 ve anti-c-kit primer antikoları ilave edilerek 18 saat inkübe edildi. Bu aşamadan sonra tekrar 3x5'er PBS ile yıkandı ve sonra biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikoru (85-9043, Invitrogen® -Histostain Plus Bulk Kit, CA, USA) solüsyonu ile 30 dk boyandı. Her bir sekonder antikor 3x5'er dk PBS ile yıkandı. İmmunreaktiviteyi görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB, 00-2020, Zymed, CA, USA) ile 5-8 dk boyandı. Ayrıca primer antikorun yerine PBS konarak negatif kontrolleri de yapıldı. Son olarak Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması yapıldı. Ardından distile su ile yıkandıktan sonra kapatma medyumunu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda (BX43, Olympus, Japan) incelenerek değerlendirildi.

3. Grupların Tanımlanması

Deney hayvanları cinsiyet ve ağırlık farkı gözetilmeden, her deney grubunda 6 adet hayvan içerecek şekilde 3 gruba ayrıldı. Deney grupları Kontrol, Sham ve Mezenkimal Kök Hücre (MKH) grubu olarak isimlendirildi.

Kontrol grubu (n=6): Flep daha önce tarif edildiği şekilde kaldırıldı. Herhangi bir enjeksiyon yapılmadan flep yerine 4/0 emilen süturlerle tespit edildi.

Sham grubu (n=6) (Sham grubu): B grubunda tarif edilen şekilde 0,3ml serum fizyolojik insülin enjektörü ile (26 gauge) enjekte edildikten sonra flep yerinde 4/0 emilen süturlerle tespit edildi. (Resim 8)



Resim 8. Serum fizyolojik enjeksiyonu

MKH (Mezenkimal Kök Hücre) grubu (n=6): Flebin kaldırılmasını takiben, 0,3ml içerisinde yer alan 3×10^6 ünite YDMKH, insülin enjektörü ile aralıklı olarak enjekte edildi. Enjeksiyon sırasında gözle görülebilen bir kabarıklık oluşturuldu, ana damarların hasarlanmamasına dikkat edildi. Sonrasında flep yerinde 4/0 emilen süturlerle tespit edildi. (Resim 9)



Resim 9. Kök hücrenin flebe enjekte edilmesi

Sıçanlar betadin ile pansuman yapıldıktan sonra tek hayvanlık kafeslerde, uygun ortamda tutuldu, standart yem ve çeşme suyu ile *ad libitum* beslendi. Sıçanlar günlük olarak özyamyamlık ve genel durum açısından incelendi.

4. Biyopsi Alınması

Hayvanlar postoperatif 7. günde yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi. Sağlıklı flep dokusu, nekrotik alan ve nekrozun başladığı geçiş zonlarını içerecek şekilde 3 adet biyopsi alındı. Biyopsi yerleri sağlıklı flep dokusunun orta alanı, nekrozun en belirgin olduğu flep distali ve makroskopik olarak gözle görülen sağlıklı alanın bitip siyanotik ve nekrotik alana geçiş kısmı seçildi. (Resim 10)



Resim 10. Biyopsi alınması

5. Histopatolojik Değerlendirme

Alınan biyopsi örnekleri %10' luk formalin içerisinde 24–72 saat tespit edildi. Akarsuda formalinden kurtarıldıktan sonra örnekler rutin doku takip prosedürünü takiben parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile yaklaşık 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler her bir adezivli lamda 3–4 adet olacak şekilde dizildi. Kesitler 560C derecede de etüv içinde deparafinize edildikten sonra çeşme suyunda yıkanıp histopatolojik inceleme için Hemotoksilen–Eozin boyası ve Masson Trichrome, PAS ile boyandı. Morfometrik olarak Image Pro Express (Ver.4.5.1.3, Media Cybernetics Inc., 2002) USA İle canlılık değerlendirildi. Ayrıca histokimyasal boyamalarda parametreler değerlendirildi.

Dilimler aşağıdaki üç farklı parametre kullanılarak değerlendirildi: vaskülarite, epitel kalınlığı ve fibroblast proliferasyonu. Enine kesitlerde sırasıyla beş farklı bölge rastgele seçildi ve bölgelerin her birinde, 40 × zum altında damar sayısı kaydedildi ve ayrıca Olympus Camedia ile 10 ×, 20 × ve 40 × zum altında fotoğraflar çekildi. 5.0 M dijital kamera. Dijital görüntüler bir bilgisayara aktarıldıktan sonra epitel kalınlıkları bir yazılım (Image Pro Express Ver.4.5.1.3., Media Cybernetics Inc., 2002, ABD) programı ile ölçülmüştür (78). Kollagen üretimi puanlanmıştır. aşağıdaki gibi: 0 = normal;

1 = hafif artış; 2 = hafif ila orta artış; 3 = orta artış; 4 = belirgin artış için orta; 5 = Kapsamlı veya derin dokuları içeren belirgin artış.

5.1 İndirekt immunohistokimya boyaması:

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika kadar bekletildi. Dakopen ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar eNOS, iNOS, IL-1, IL-6 ve VEGF ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikorunu ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solusyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu ile kapatıldı.

5.2 TUNEL boyaması

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) boyama yöntemi kullanıldı. Alınan 5 µm'lik kesitler deparafinizasyon işlemi takiben önce distile suda daha sonra 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. Yıkandıktan sonra 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20-µg/ml Proteinaz-K 370C'de 15 dak. uygulandı. 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkamayı takiben 5 dak. % 3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra yeniden 5'şer dakika 3 kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler 5 dak. Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 370C de 60 dak. plastik slipler kesitleri kapatacak

şekilde bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dak. bekletildikten sonra Antidioksinin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dak. muamele edilen örnekler 5'şer dakika 3 kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapıldı, birkaç kez distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksileni ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptanarak yüzde şeklinde apoptotik indeks belirlendi ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

5.3 İstatistiksel analiz

İmmunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirildi. Boyanma oranı semikantitatif olarak derecelendirildi ve 0 = hücrelerin %1'den azında boyanma; 1+ = hücrelerin %1- 10'unda boyanma; 2+ = hücrelerin %11-50'sinde boyanma; 3+ = hücrelerin %51-80'inde boyanma; 4+ = hücrelerin %80'inden fazlasında boyanma ile boyanma şiddeti de 0 = boyanma yok; 1 = soluk; 2 = orta dereceli; 3 = yoğun olarak kör yöntemle belirlendi. Daha sonra “(1+boyanma şiddeti/3) x boyanma oranı” formülü ile toplam skor hesaplandı. Elde edilen bulgular ile gruplar arasındaki farklılık Kruskal- Wallis testi ile saptandı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

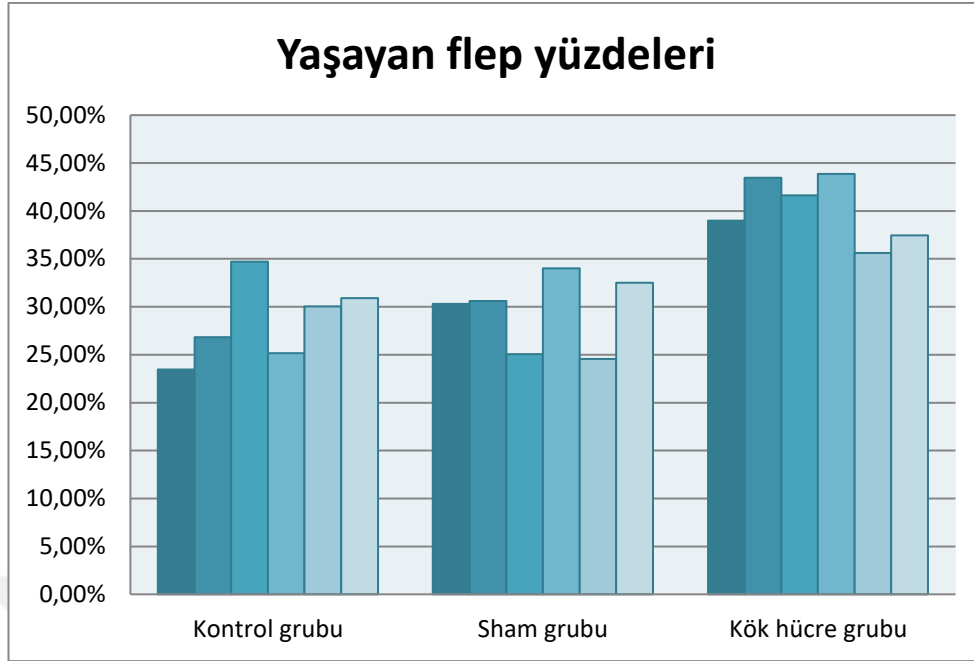
IV. Bulgular

1. Makroskopik Bulgular

Postoperatif 7. günde sakrifiye edilen deneklerin fotoğrafları alınarak makroskopik morfometri için Image J programında incelendi (Image J Computer Program, Rasband WS., U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD) (Resim 11, 12, 13). Gruplara ayrılan deneklerin flep yaşama yüzdeleri hesaplandı. (Tablo 2, Grafik 1) Değerler yüzdelik oran±standart sapma olarak elde edildi. Yapılan incelemelerde kontrol grubunun yaşayan flep yüzdeleri en çok %34,72631, en az %23,45057 (ortalama %28,5172±4,1578) olarak ölçüldü. Sham grubunda ise yaşayan flep yüzdesi en çok %34,00301, en az %24,5583 (ortalama %29,5119±3,87896) olarak belirlendi. Kök hücre grubu en çok yaşayan %43,87755, en az %35,61368 olarak (ortalama %40,1701±3,35513) olarak hesaplandı (Tablo 3, Grafik 2).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Kontrol grubu | 23,45057 | 26,8224 | 34,72631 | 25,15422 | 30,04751 | 30,90235 |
| Sham grubu | 30,30303 | 30,61798 | 25,07661 | 34,00301 | 24,5583 | 32,51232 |
| Kök hücre grubu | 38,98305 | 43,46625 | 41,62696 | 43,87755 | 35,61368 | 37,45308 |

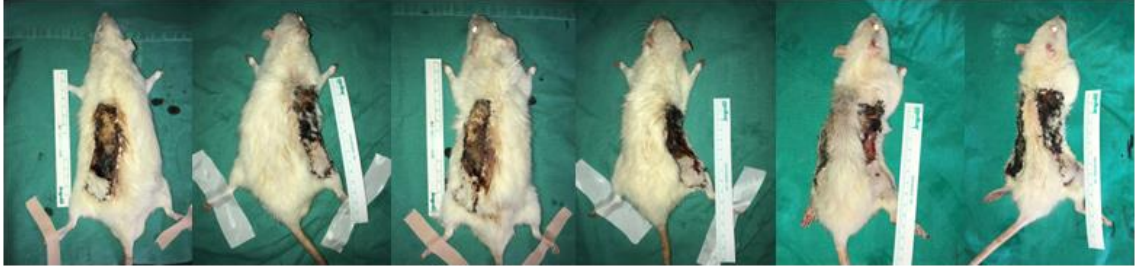
Tablo 2. Fleplerin Image J programında hesaplanan yaşayabilen flep yüzdeleri



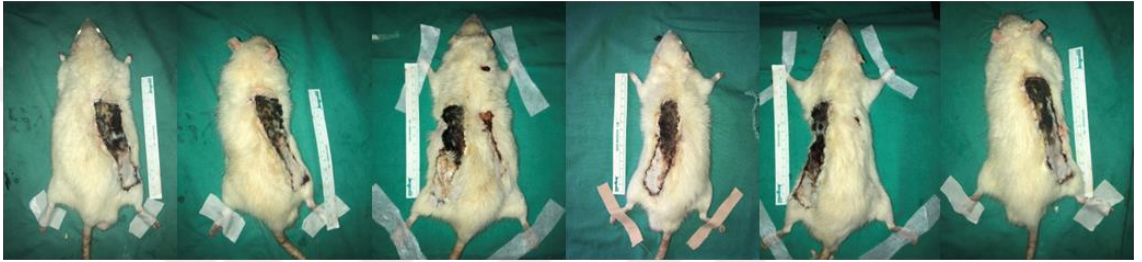
Grafik 1. Gruplar içinde flep yaşayabilirlik oranları

| | Flebin yaşayan ortalama yüzdesi | St. Sapma | N |
|-----------------|---------------------------------|-----------|---|
| Kontrol grubu | 28,5172 | 4,1578 | 6 |
| Sham grubu | 29,5119 | 3,87896 | 6 |
| Kök hücre grubu | 40,1701 | 3,35513 | 6 |

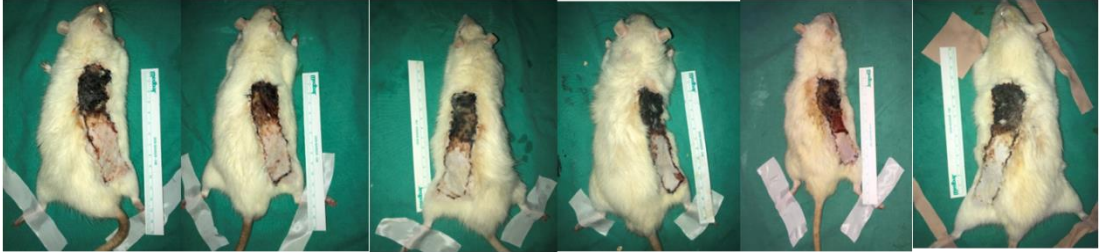
Tablo 3. Ortalama yaşayabilen flep yüzdeleri



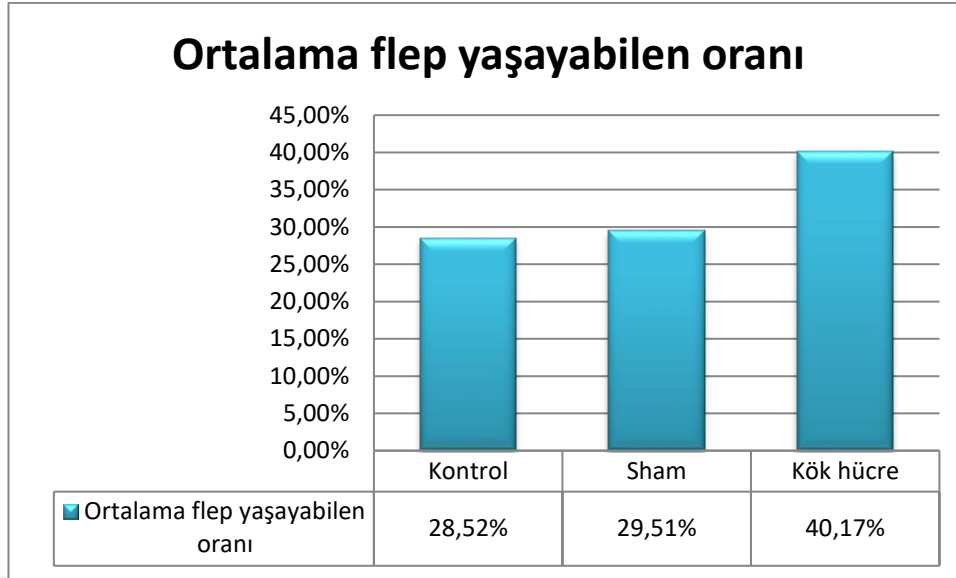
Resim 11. Kontrol grubu, postoperatif 7. gün



Resim 12. Sham grubu, postoperatif 7. Gün



Resim 13. Kök hücre uygulaması yapılan denekler, postoperatif 7. Gün



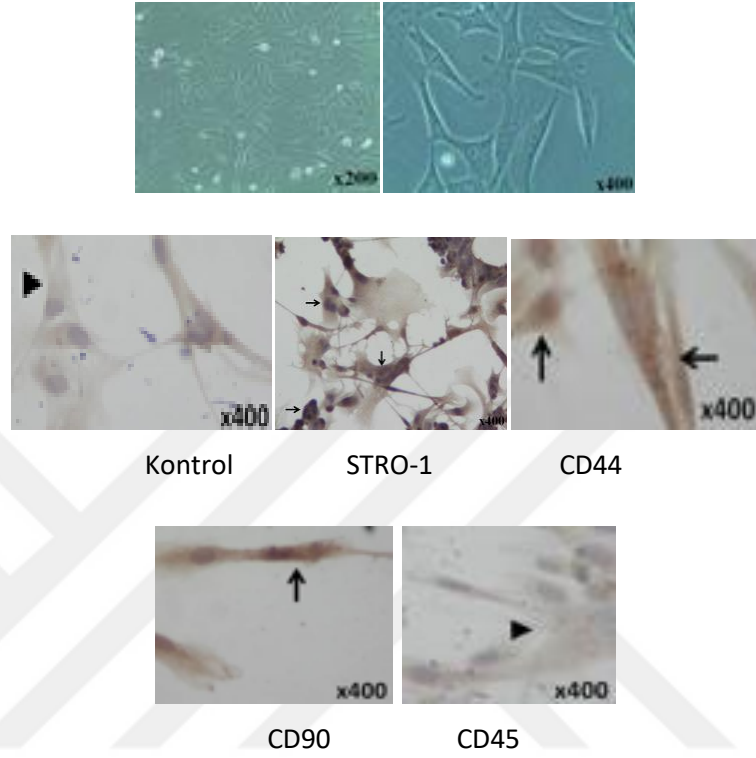
Grafik 2. Ortalama flep yaşam oranı

Dijital ortamda Image J programı kullanılarak elde edilen veriler SPSS ver.20.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. p değerinin 0,05'ten küçük bulunması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. 3 grup arasında Kruskal-Wallis testi ile kullanılarak yapılan analizde gruplar arasında anlamlı olarak fark olduğu tespit edildi ($p=0,03$). Üç grup arasındaki farkları ikili analiz etmek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Mann-Whitney U ile yapılan ikili karşılaştırmalarda, kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterildi ($p=1,000$). Kontrol grubu ve kök hücre grubu arasında yapılan karşılaştırmada ise $p=0,007$ olarak ölçüldü. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. SHAM ve kök hücre grubu verileri kendi arasında karşılaştırıldığında, kök hücre verilen grubun yaşayan flep oranının SHAM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterildi ($p=0,015$).

2. Mikroskopik Bulgular

Uygulanan MKH (Mezenkimal kök hücre) karakterizasyonu için P3 için yapılan immunohistokimyasal spesifik (primer yerine PBS) boyamalar ve h-skor ile hematopoetik hücre belirtecini (CD45) eksprese etmedikleri, MKH

belirteçleri olarak STRO-, CD44 ve CD90 eksprese ettikleri görüldü (Resim 14) (Tablo 4).



Resim 14. Kök hücrenin kültürdeki faz kontrast görüntüleri ile karakterizasyonunu gösteren kontrol, CD44 ve CD90 pozitif ve CD45 negatif işaretleme İHK bulguları.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|-------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| PBS | 3 | 17.000 | 5.568 | 3.215 | 18.000 |
| STRO1 | 3 | 214.00 | 10.14 | 5.859 | 212.00 |
| CD44 | 3 | 245.00 | 8.544 | 4.933 | 244.00 |
| CD90 | 3 | 264.00 | 10.536 | 6.083 | 265.00 |
| CD45 | 3 | 32.667 | 7.572 | 4.372 | 36.000 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|---------------|------------|--------|-------------|
| PBS vs STRO1 | -197.00 | 39.383 | *** P<0.001 |
| PBS vs CD44 | -228.00 | 45.580 | *** P<0.001 |
| PBS vs CD90 | -247.00 | 49.378 | *** P<0.001 |
| PBS vs CD45 | -15.667 | 3.132 | ns P>0.05 |
| STRO1 vs CD44 | -31.000 | 6.197 | ** P<0.01 |
| STRO1 vs CD90 | -50.000 | 9.996 | *** P<0.001 |
| STRO1 vs CD45 | 181.33 | 36.251 | *** P<0.001 |
| CD44 vs CD90 | -19.000 | 3.798 | ns P>0.05 |
| CD44 vs CD45 | 212.33 | 42.448 | *** P<0.001 |
| CD90 vs CD45 | 231.33 | 46.246 | *** P<0.001 |

Tablo 4. Kök hücrenin karakterizasyonunu gösteren kontrol, STRO-1, CD44 ve CD90 pozitif ve CD45 negatif işaretleme İHK bulgularının h-skor analizi

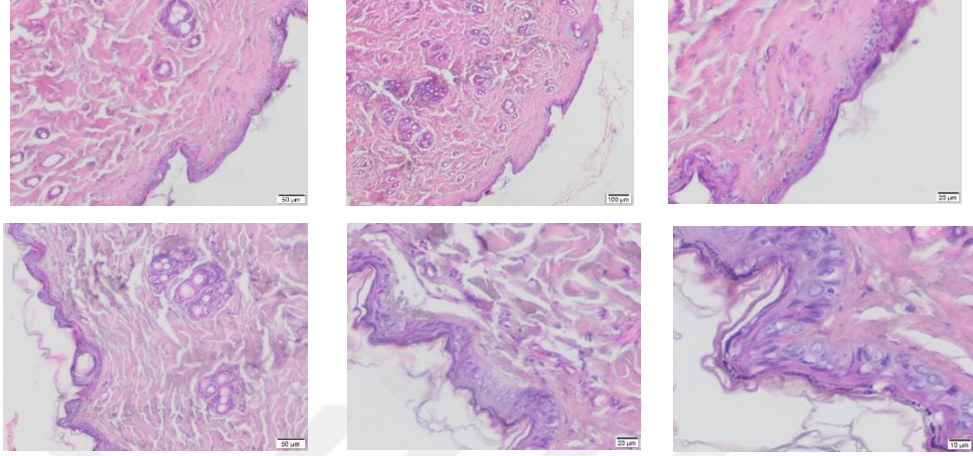
H-E boyamaları ile reepitelizasyon (RE) ve kapiller sayısı (KS) açısından değerlendirildi. MKH uygulaması sonrası, flebin daha iyi bir şekilde epitelizasyon ve damarlanma ile iyileştiği H-E boyamalarla ortaya kondu (Resim 15, 16, 17). Epitelizasyon açısından yapılan ölçümlerde MKH uygulamasının kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir kalınlaşma sağladığı saptandı. (Tablo 5 ve 6) (Grafik 3)

HEMATOKSİLEN-EOZİN (H-E)

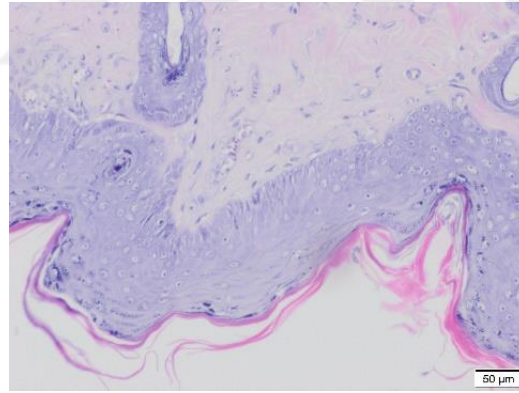
KONTROL

SHAM

MKH



Resim 15.H-E boyamaları reepitelizasyon (RE) ve kapiller sayısı (KS) açısından değerlendirildi.

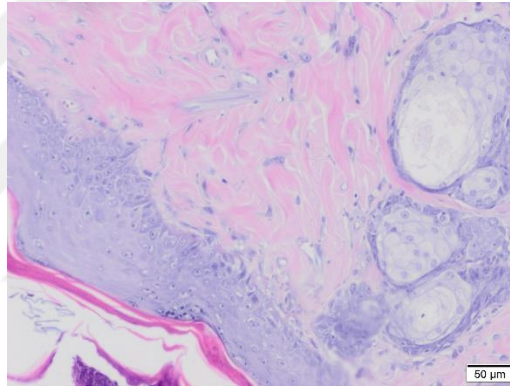


Resim 16. Reepitelizasyon

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|--------|--------|
| KONTROL | 6 | 61.433 | 3.103 | 1.267 | 61.750 |
| SHAM | 6 | 66.658 | 3.724 | 1.520 | 66.500 |
| MKH | 6 | 79.958 | 2.434 | 0.9938 | 79.800 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|------------|---------|
| KONTROL vs SHAM | -5.225 | 4.087 * | P<0.05 |
| KONTROL vs MKH | -18.525 | 14.490 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | -13.300 | 10.403 *** | P<0.001 |

Tablo 5.Hematoksilen ve eozin boyamaları reepitelizasyon (RE) ölçümlerinde MKH ile anlamlı ($p<0,001$) bir artış sağlandı

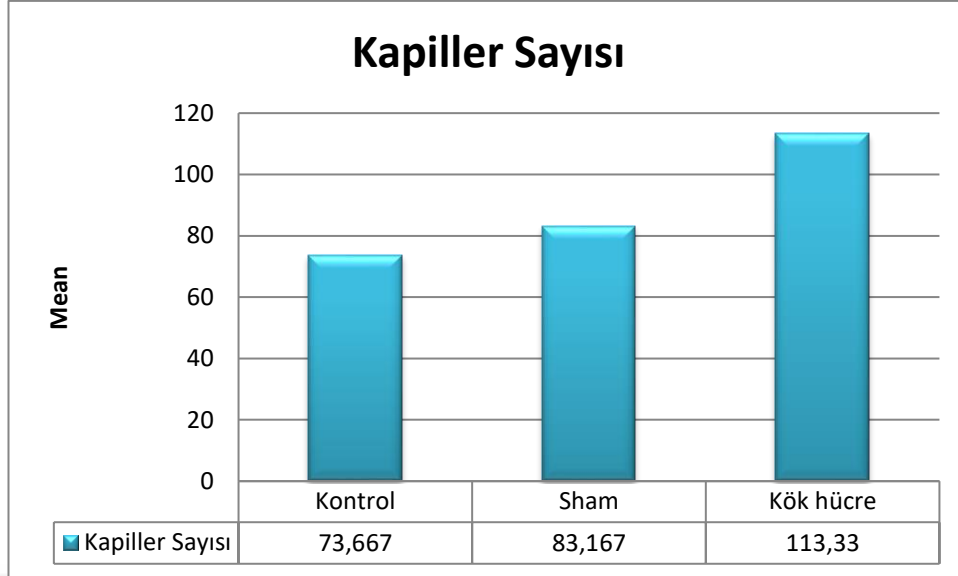


Resim 17. Kapiller sayısı (KS)

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 73.667 | 6.377 | 2.603 | 71.500 |
| SHAM | 6 | 83.167 | 3.817 | 1.558 | 83.500 |
| MKH | 6 | 113.33 | 5.922 | 2.418 | 113.50 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|------------|---------|
| KONTROL vs SHAM | -9.500 | 4.241 * | P<0.05 |
| KONTROL vs MKH | -39.667 | 17.710 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | -30.167 | 13.469 *** | P<0.001 |

Tablo 6.Hematoksilen ve eozin boyamaları kapiller sayısı (KS) ölçümlerinde MKH ile anlamlı ($p<0,001$) bir artış sağlandı



Grafik 3. Grupların H-E boyama ile ölçülen kapiller sayıları

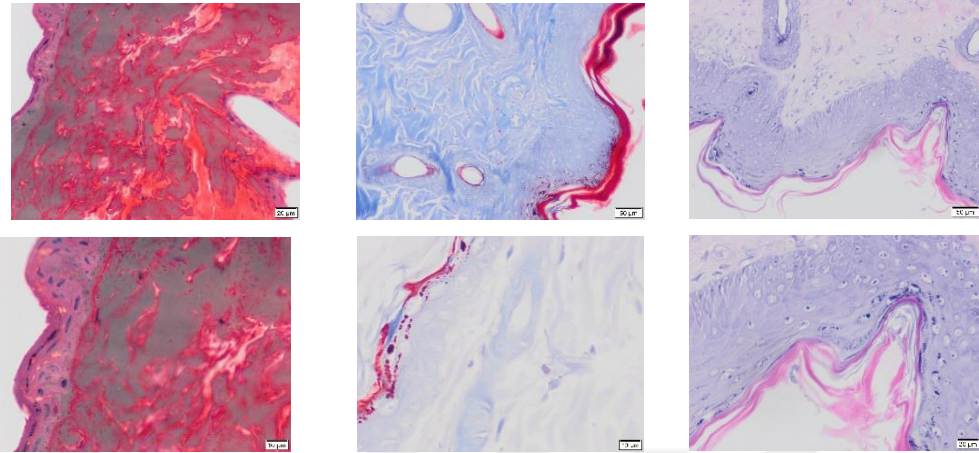
MKH uygulaması sonrası, flebin daha iyi bir şekilde kollajen üretimi (KÜ) ve daha az fibrosis oluşumu (FO) ile iyileştiği MT boyamalarla ortaya kondu (Resim 18, 19, 20). Kollajen üretimi ve fibrosis oluşumu açısından yapılan ölçümlerde, MKH uygulamasının kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında kollajen üretiminde anlamlı bir artış ve fibrosis ile iyileşmede anlamlı bir azalma sağladığı saptandı ($p < 0,001$). (Tablo 7)

MASON TRİKROM

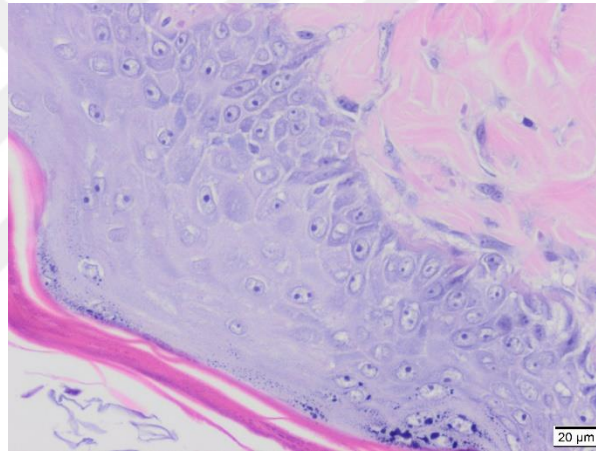
KONTROL

SHAM

MKH



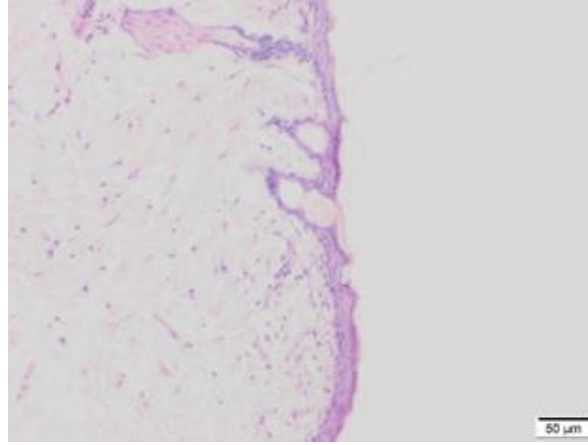
Resim 18.MT boyamaları Kollajen üretimi (KÜ) ve Fibrosis oluşumu (FO) açısından değerlendirildi.



Resim 19. Kollajen Üretimi (KÜ)

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|-------|-----------|--------|--------|
| KONTROL | 6 | 2.000 | 0.6325 | 0.2582 | 2.000 |
| SHAM | 6 | 2.333 | 0.5164 | 0.2108 | 2.000 |
| MKH | 6 | 3.333 | 0.8165 | 0.3333 | 3.500 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|-------|-----------|
| KONTROL vs SHAM | -0.3333 | 1.225 | ns P>0.05 |
| KONTROL vs MKH | -1.333 | 4.899 | ** P<0.01 |
| SHAM vs MKH | -1.000 | 3.674 | * P<0.05 |



Resim 20. Fibrozis oluşumu

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|-------|-----------|--------|--------|
| KONTROL | 6 | 3.500 | 0.5477 | 0.2236 | 3.500 |
| SHAM | 6 | 2.500 | 0.5477 | 0.2236 | 2.500 |
| MKH | 6 | 1.667 | 0.8165 | 0.3333 | 1.500 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|-----------|---------|
| KONTROL vs SHAM | 1.000 | 3.770 * | P<0.05 |
| KONTROL vs MKH | 1.833 | 6.911 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | 0.8333 | 3.141 ns | P>0.05 |

Tablo 7. PAS boyamaları, Kollajen Fibril (KF) ve Fibrosis oluşumu (FO) ölçümlerinde MKH ile anlamlı ($p<0,001$) değişiklikler saptandı.

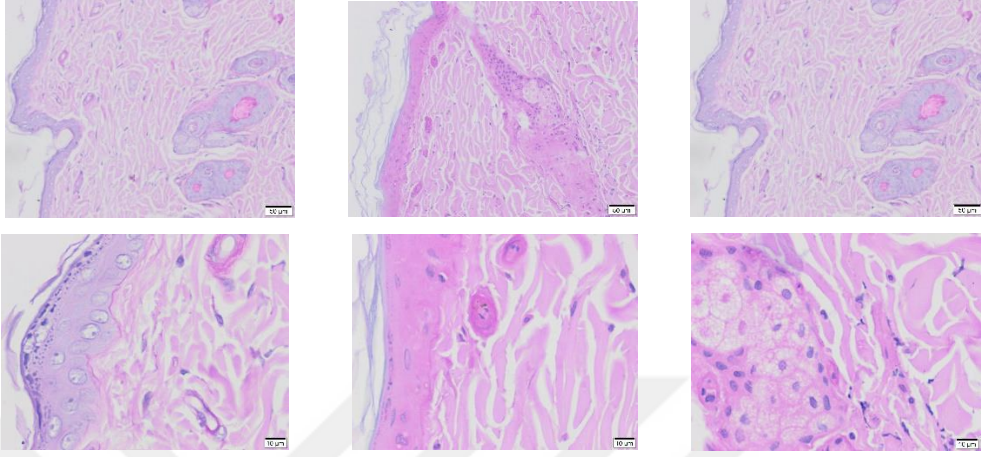
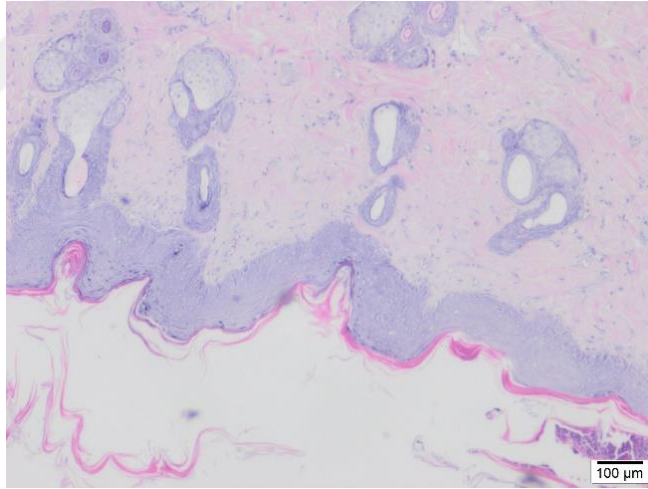
MKH uygulaması yapılan deneklerde, flebin daha iyi bir şekilde Kıl folikülü (KF) ve Bez oluşumu (BO) ile iyileştiği PAS boyamalarla ortaya kondu (Resim 21, 22, 23). KF ve BO açısından yapılan ölçümlerde MKH uygulamasının kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir artış ve kalınlaşma gösterdiği saptandı. (Tablo 8)

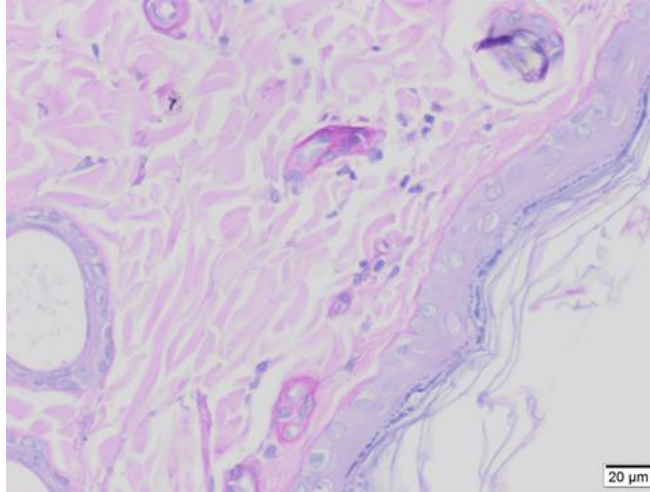
PERİYODİK ASİD SCHIFF

KONTROL

SHAM

MKH

**Resim 21. PAS boyamaları Kıl folikülü (KF) ve Bez oluşumu (BO) açısından değerlendirildi.****Resim 22. Kıl folikülü (KF)**



Resim 23. Bez oluşumu (BO)

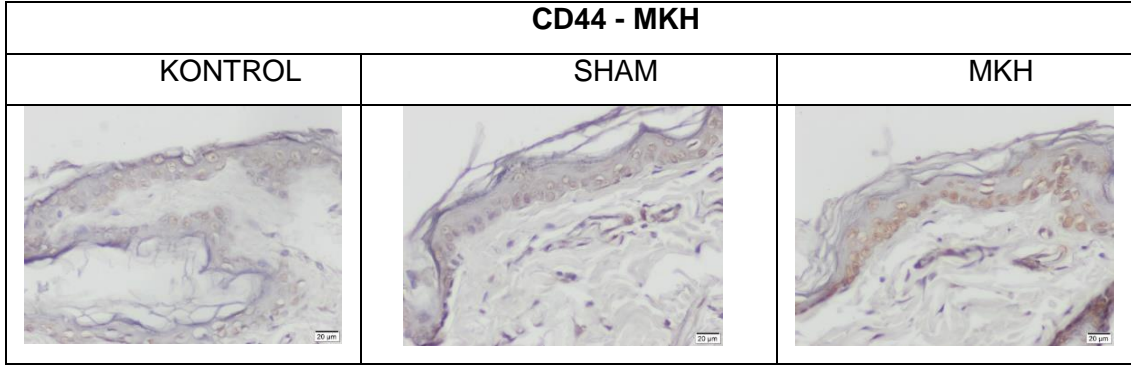
| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|-------|-----------|--------|--------|
| KONTROL | 6 | 2.000 | 0.8944 | 0.3651 | 2.000 |
| SHAM | 6 | 3.000 | 0.8944 | 0.3651 | 3.000 |
| MKH | 6 | 4.500 | 1.049 | 0.4282 | 4.500 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|-------|-----------|
| KONTROL vs SHAM | -1.000 | 2.582 | ns P>0.05 |
| KONTROL vs MKH | -2.500 | 6.455 | ** P<0.01 |
| SHAM vs MKH | -1.500 | 3.873 | * P<0.05 |

Tablo 8. PAS boyamaları, Kıl Folikülü (KF) ve Bez oluşumu (BO) ölçümlerinde MKH ile anlamlı ($p<0,001$) bir artış sağlandı.

Alınan biyopsi örneklerinde CD44, CD90, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), eNOS, iNOS, IL-1, IL-6 ve VEGF İmmünohistokimyasal boyanmalar ışık mikroskop altında incelendi. Kök hücre CD44 ve CD90, çoğalma PCNA, oksidatif stres eNOS ve iNOS ile, inflamasyon IL-1 ve IL-6 ile, damarlanma VEGF ve apoptoz ise TUNEL belirteçleri ile değerlendirildi.

MKH uygulamasının flepteki varlığı CD44 immünboyamalarda ortaya kondu (Resim 24). MKH uygulamasının kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir artış gösterdiği saptandı (Tablo 9).



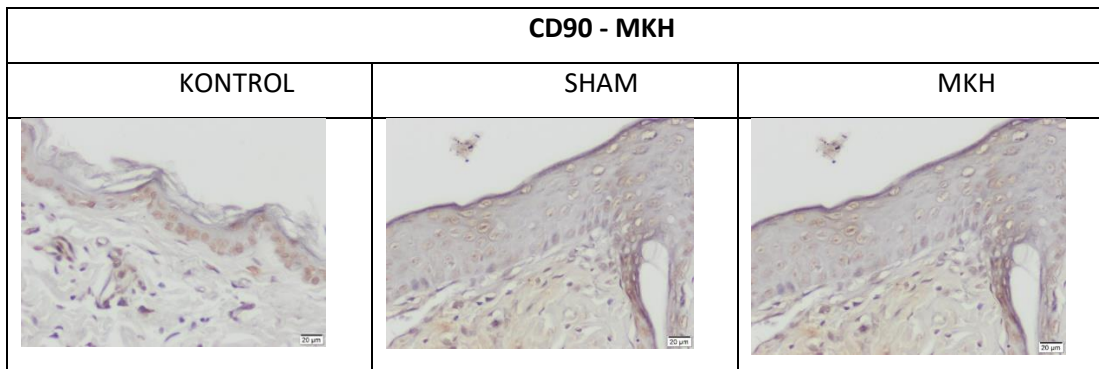
Resim 24.CD44 immünboyamalarda MKH varlığı değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 126.67 | 12.291 | 5.018 | 124.00 |
| SHAM | 6 | 159.50 | 19.685 | 8.036 | 160.50 |
| MKH | 6 | 187.50 | 10.483 | 4.280 | 190.50 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|------------|---------|
| KONTROL vs SHAM | -32.833 | 5.470 ** | P<0.01 |
| KONTROL vs MKH | -60.833 | 10.135 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | -28.000 | 4.665 * | P<0.05 |

Tablo 9.CD44 immünboyamalarda MKH varlığı yapılan h-skorlama ile saptandı.

MKH uygulamasının flepteki varlığı CD90 immünboyamalarda ortaya kondu (Resim 25). MKH uygulamasının, kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir artış gösterdiği saptandı (Tablo 10).



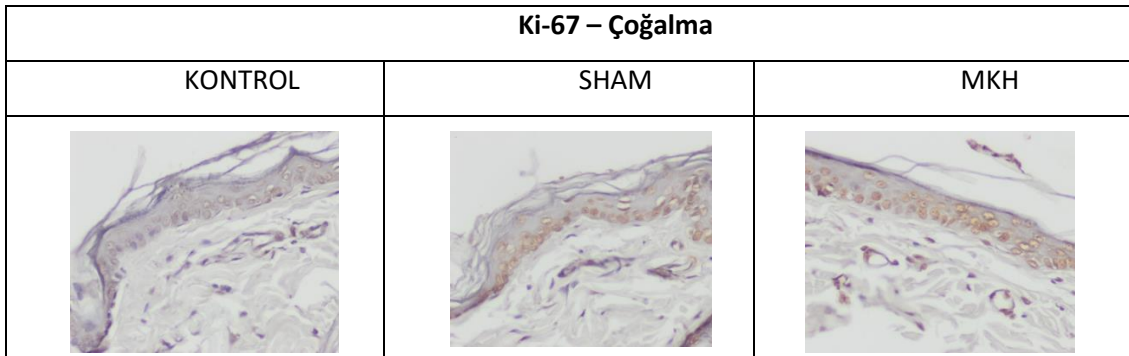
Resim 25.CD90 immünboyamalarda MKH varlığı değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 179.17 | 9.663 | 3.945 | 178.50 |
| SHAM | 6 | 190.67 | 8.524 | 3.480 | 190.00 |
| MKH | 6 | 210.67 | 13.155 | 5.371 | 211.50 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|-------|-------------|
| KONTROL vs SHAM | -11.500 | 2.650 | ns P>0.05 |
| KONTROL vs MKH | -31.500 | 7.257 | *** P<0.001 |
| SHAM vs MKH | -20.000 | 4.608 | * P<0.05 |

Tablo 10. CD90 immünboyamalarda MKH varlığı yapılan h-skorlama ile saptandı.

MKH uygulamasının, flepteki hücre çoğalmasına etkisi Ki67 immünboyamalarla ortaya kondu (Resim 26). MKH uygulamasının, kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p < 0,001$) bir artış gösterdiği saptandı (Tablo 11).



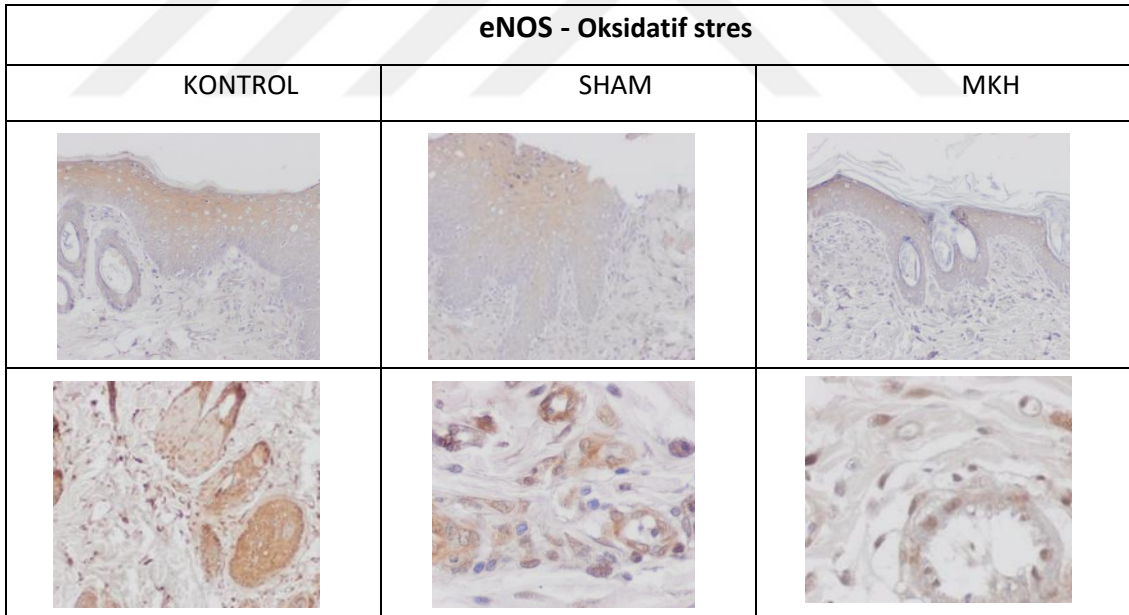
Resim 26. Hücre çoğalması için Ki67 immünboyamalarda MKH etkisi değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 206.33 | 10.347 | 4.224 | 208.00 |
| SHAM | 6 | 218.83 | 6.524 | 2.664 | 218.50 |
| MKH | 6 | 233.00 | 6.542 | 2.671 | 233.00 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|-----------|---------|
| KONTROL vs SHAM | -12.500 | 3.823 * | P<0.05 |
| KONTROL vs MKH | -26.667 | 8.156 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | -14.167 | 4.333 * | P<0.05 |

Tablo 11. Hücre çoğalması için Ki67 immünboyamalarda MKH etkisi yapılan h-skorlama ile saptandı

MKH uygulamasının flepteki Oksidatif strese etkisi eNOS immünboyamalarda ortaya kondu (Resim 27). MKH uygulamasının kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir gerileme gösterdiği saptandı (Tablo 12).



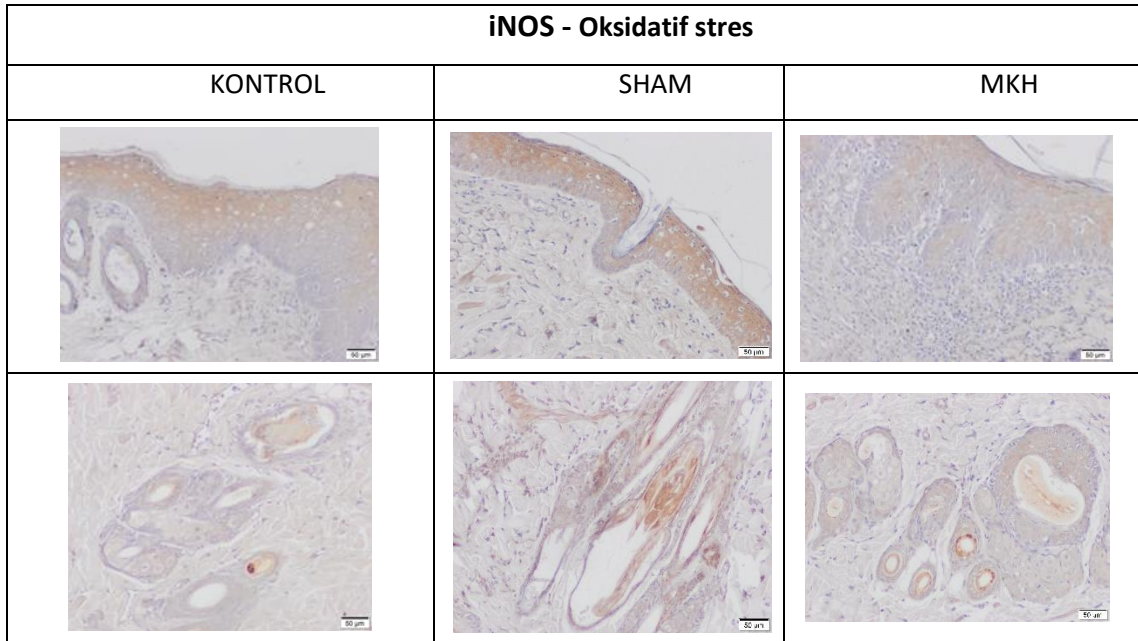
Resim 27. Oksidatif stres için eNOS immünboyamalarda MKH etkisi değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 244.83 | 15.459 | 6.311 | 244.50 |
| SHAM | 6 | 214.17 | 8.976 | 3.664 | 218.00 |
| MKH | 6 | 194.33 | 9.564 | 3.904 | 194.00 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|--------|-------------|
| KONTROL vs SHAM | 30.667 | 6.418 | ** P<0.01 |
| KONTROL vs MKH | 50.500 | 10.568 | *** P<0.001 |
| SHAM vs MKH | 19.833 | 4.151 | * P<0.05 |

Tablo 12. Oksidatif stres için eNOS immünboyamalarda MKH etkisi yapılan h-skorlama ile saptandı.

MKH uygulamasının flepteki Oksidatif strese etkisi iNOS immünboyamalarda ortaya kondu (Resim 28). MKH uygulamasının, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p < 0,001$) bir gerileme gösterdiği saptandı (Tablo 13).



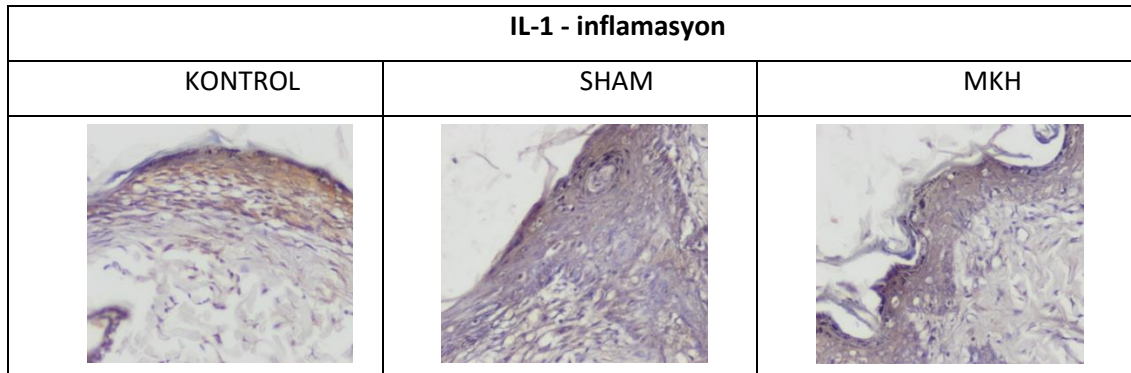
Resim 28. Oksidatif stres için iNOS immünboyamalarda MKH etkisi değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 191.17 | 6.242 | 2.548 | 192.50 |
| SHAM | 6 | 172.17 | 7.521 | 3.070 | 173.50 |
| MKH | 6 | 159.17 | 7.834 | 3.198 | 159.50 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|--------|-------------|
| KONTROL vs SHAM | 19.000 | 6.435 | ** P<0.01 |
| KONTROL vs MKH | 32.000 | 10.839 | *** P<0.001 |
| SHAM vs MKH | 13.000 | 4.403 | * P<0.05 |

Tablo 13.Oksidatif stres için iNOS immünboyamalarda MKH etkisi yapılan h-skorlama ile saptandı.

MKH uygulamasının flepteki inflamasyona etkisi IL-1 immünboyamalarda ortaya kondu (Resim 29). IL-1, epidermiste, yağ bezleri, dermal bağ doku hücreleri ve liflerinde hem sitoplazmik hem de nükleer boyama olarak izlendi. MKH uygulamasının, kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir gerileme gösterdiği saptandı (Tablo 14).



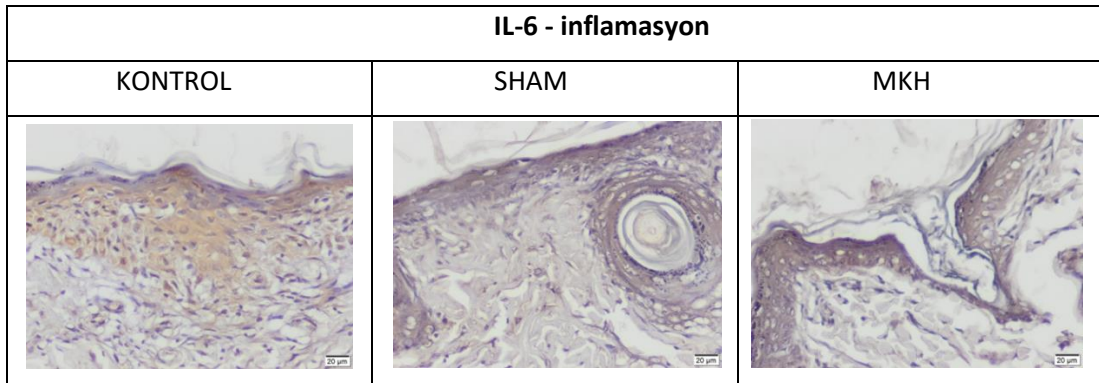
Resim 29.İnflamasyon için IL-1 immünboyamalarda MKH etkisi değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 68.500 | 4.889 | 1.996 | 69.500 |
| SHAM | 6 | 57.833 | 5.115 | 2.088 | 58.000 |
| MKH | 6 | 47.833 | 4.997 | 2.040 | 48.000 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|------------|---------|
| KONTROL vs SHAM | 10.667 | 5.224 ** | P<0.01 |
| KONTROL vs MKH | 20.667 | 10.122 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | 10.000 | 4.898 ** | P<0.01 |

Tablo 14.İnflamasyon için IL-1 immünboyamalarda MKH etkisi yapılan h-skorlama ile saptandı.

MKH uygulamasının flepteki inflamasyona etkisi IL-6 immünboyamalarda ortaya kondu (Resim 30). MKH uygulamasının kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir gerileme gösterdiği saptandı (Tablo 15).



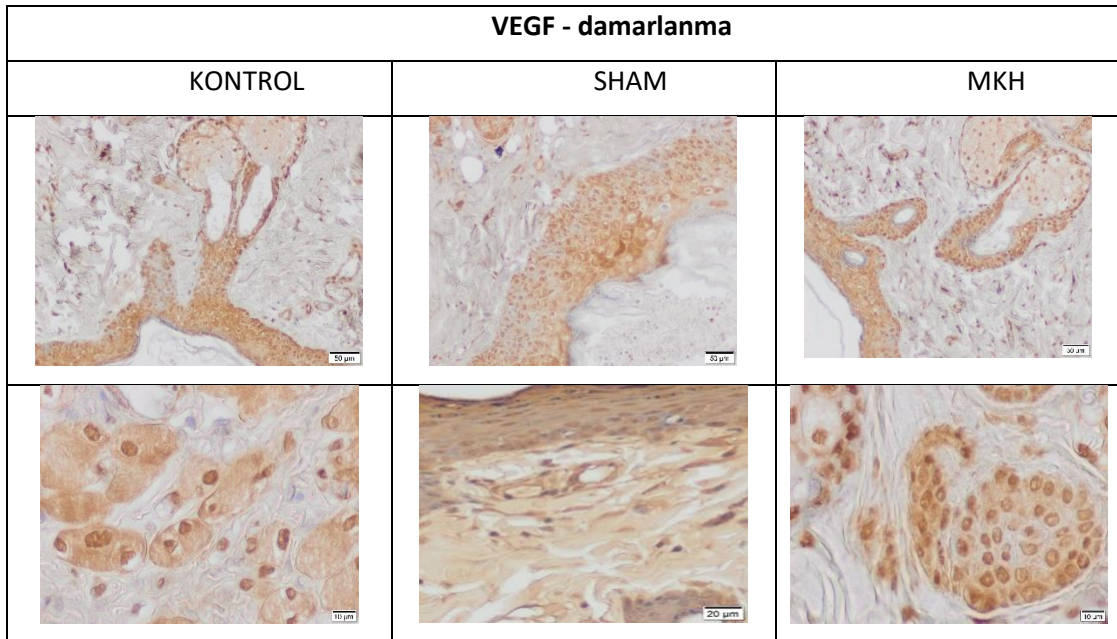
Resim 30.İnflamasyon için IL-6 immünboyamalarda MKH etkisi değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 86.667 | 5.354 | 2.186 | 86.500 |
| SHAM | 6 | 77.000 | 6.066 | 2.477 | 77.000 |
| MKH | 6 | 62.667 | 6.022 | 2.459 | 62.500 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|------------|---------|
| KONTROL vs SHAM | 9.667 | 4.066 * | P<0.05 |
| KONTROL vs MKH | 24.000 | 10.095 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | 14.333 | 6.029 ** | P<0.01 |

Tablo 15.İnflamasyon için IL-6 immünboyamalarda MKH etkisi yapılan h-skorlama ile saptandı.

MKH uygulamasının flepteki damarlanmaya etkisi VEGF immünboyamalarda ortaya kondu (Resim 31). Epidermis, yağ ve ter bezlerinin plazmik ve nükleer boyamaları izlendi. MKH uygulamasının kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,001$) bir artış gösterdiği saptandı (Tablo 16).



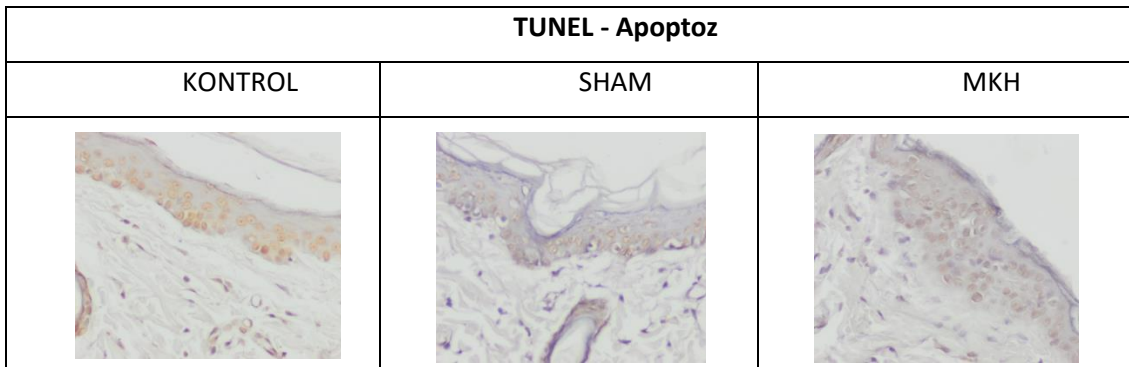
Resim 31.Damarlanmada VEGF immünboyamalarda MKH etkisi değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 235.00 | 7.642 | 3.120 | 234.50 |
| SHAM | 6 | 253.83 | 9.065 | 3.701 | 253.50 |
| MKH | 6 | 274.00 | 9.121 | 3.724 | 273.00 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|------------|---------|
| KONTROL vs SHAM | -18.833 | 5.342 ** | P<0.01 |
| KONTROL vs MKH | -39.000 | 11.061 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | -20.167 | 5.720 ** | P<0.01 |

Tablo 16.Damarlanmada VEGF immünboyamalarda MKH etkisi yapılan h-skorlama ile saptandı.

MKH uygulamasının flepteki apoptoza etkisi TUNEL immün işaretlemesi ile ortaya kondu (Resim 32). Epiderminin iki ila üç katman tabakalanma halinde nükleer boyama, yağ ve ter bezleri ile bağ dokunun boyandığı görüldü. MKH uygulamasının kontrol ve sham ile karşılaştırıldığında apoptozda anlamlı ($p<0,001$) bir gerileme gösterdiği saptandı. (Tablo 17)



Resim 32.Apoptoza etkisi için TUNEL immün işaretlemesinde MKH etkisi değerlendirildi.

| Group | Points | Mean | Deviation | Mean | Median |
|---------|--------|--------|-----------|-------|--------|
| KONTROL | 6 | 67.000 | 5.797 | 2.366 | 66.500 |
| SHAM | 6 | 54.333 | 5.391 | 2.201 | 53.500 |
| MKH | 6 | 41.167 | 6.824 | 2.786 | 41.000 |

| Comparison | Difference | q | P value |
|-----------------|------------|------------|---------|
| KONTROL vs SHAM | 12.667 | 5.142 ** | P<0.01 |
| KONTROL vs MKH | 25.833 | 10.487 *** | P<0.001 |
| SHAM vs MKH | 13.167 | 5.345 ** | P<0.01 |

Tablo 17. Apoptoza etkisi için TUNEL immün işaretlemede MKH etkisi apoptotik indeks ile saptandı.

V. Tartışma

Flepler, plastik ve rekonstrüktif cerrahinin temel uğraş alanlarından olan doğumsal veya edinsel defektlerin uygun şekil ve fonksiyonda onarımı amacıyla kullanılmaktadır. Flepler rekonstruksiyon işlemleri kadar, estetik amaçlı işlemlerde de kullanılabilir. Flep cerrahisinde en sık görülen problemlerden birisi flep nekrozudur. Yetersiz kan akımı nedeniyle sıklıkla flep distalinde siyanoz, nekroz ve geç iyileşme görülebilmektedir(8,79). Bu fleplerin bir kısmı spontan iyileşebilirken, komorbiditesi olan, ileri yaştaki hastalarda ve özellikle yüz gibi estetik olarak problem yaratabilecek olan bölgelerde oluşan nekrozlar problemlere yol açmaktadır. Flepler tasarlanırken, genellikle distal kısımları onarım ve rekonstruksiyon yapılacak olan bölgeye yerleştirilir. Bu nedenle flebin çoğu yaşasa dahi, distalinde yaşanan problemler cerrahinin başarısız olarak nitelendirilmesine yol açar. Yara yeri iyileşme problemi yaşanan hastaların bir kısmı daha önce yara yerinin kapatılması için çeşitli operasyonlar geçirmiş olan, uzun süren operasyon ve hastanede yatış öyküsü olan hastalardır(80). Sağlıklı bir flep elde edilmesi için flebin tasarlandığı bölgenin skarlı olmaması ve pedikülün güvenilir olması önemlidir. Özellikle alt ekstremitte defektlerinde birçok rekonstruksiyon seçeneği tanımlansa da, travmatik hastalar çoğu zaman tüm flep seçeneklerine uygun donör sahaya sahip değildir (81). Serbest flepler, bu tarz hastalarda kullanılabilecek bir seçenektir, ancak mikrocerrahi tecrübesi, ekipman ve iyi bakım gerektirir (82,83). Bu nedenle eldeki donör sahaların en verimli şekilde kullanılması ve tek bir cerrahi müdahale ile başarı sağlanması önem arz etmektedir. Yara yeri iyileşme problemi yaşayan hastaların büyük bir kısmı da komorbiditeleri olan hastalardır. Bu hasta gruplarında, ameliyat ve hospitalizasyon süresindeki artış ve immobil geçirdiği süre, hem maliyeti arttırmakta, hem de olası hastane enfeksiyonları ve komplikasyonlar için zemin oluşturmaktadır (80,82). Bu gerekçelerle tek bir cerrahi müdahale ile düzelmeleri ve erken dönemde taburculukları önemlidir.

Estetik amaçlı tasarlanmış olan bir flep ise, hastanın ameliyat öncesi haline göre çeşitli kriterlere göre “daha iyi” sonuç almak için yapılır. Bu kriterlerin en başında skarın görüntüsü, rengi, düzenli olup olmaması ve çevre dokulara göre seviyesi gelir (83). Distalinde iyileşme problemi yaşanmış ve epitelizasyon süresi uzamış olan bir dikiş hattı, elde edilmek istenen ince bir çizgi şeklindeki iz ile sonuçlanamaz. Bu hasta grubunda, operasyonun amacı göz önüne alınırsa parsiyel flep nekrozları cerrahinin başarısız olarak adlandırılmasına neden olur. Bu nedenler, flebin yaşayabilirliğini arttırmak ve iskemi ve nekroz risklerini azaltmak için kullanılabilecek yöntemlerin araştırılması gerekliliğini doğurmuştur(36,43,70,84).

1989 yılında Koshima ve Soeda ilk kez perforatör flep terimi kullanmıştır(24). Perforatör flep, aksiyel bir damardan çıkan ve belirli yapılardan geçen bir perforatör damar tarafından beslenir. İsimlendirme ve sınıflandırması 2003 yılında Gent Konsensusu’nda yapılmıştır(5). Perforatör fleplerin en büyük avantajlarından biri, benzer lokal doku ile onarım yapılabilmesi sayesinde, onarım sonrası renk farklılığı, düzensizlik ve kabarıklık oluşma riskini ve donör saha morbiditesini azaltmasıdır(8,79). 2012 yılında Gir ve arkadaşlarının yayınladığı 186 olguluk perforatör flep serilerinin sistematik incelemede parsiyel nekroz oranının %11,3 olduğu, flep başarısızlık oranının %1,1 olduğu bildirilmiştir(6). Benzer şekilde Nelson ve arkadaşlarının 310 olguluk serisinde ve Innocenti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada parsiyel flep başarısızlık oranı benzer bulunurken, Nelson, total kayıp oranını %5,5 olarak bildirilmiştir (6,8,79). Flep nekroz oranların azaltılması için literatürde yapılmış olan birçok hayvan deneyi çalışması mevcuttur (36,43,70,84). Ancak perforatör fleplerin üzerinde yağ doku hücrelerinden elde edilen kök hücre ile yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Cerrahi geciktirme işlemi ve farmakolojik ajanlar bu komplikasyonlara karşı sıklıkla denenmiş olup literatürde farklı başarılarla olumlu sonuçlar görülmektedir. Ancak bu işlemler hastaya ya ikinci bir cerrahi gerektirmekte, ya da çoğunlukla sentetik olan bir farmakolojik ajan yüklemektedir. Rohrich ve arkadaşları flep yaşayabilirliğini artırmaya yönelik kullanılacak ilaç veya

uygulama için; kolay uygulanabilir olmalı, güvenilir olmalı, postoperatif olarak kullanılabilir olmalı, ucuz olmalı, etki mekanizması tam olarak bilinmeli, elde edilebilir olmalı ve flep nekrozunda koruyucu olmalı şeklinde özetlemiştir (35).

Sıçanlarda perforatör flep modeli olarak tanımlanmış ve klinik çalışmalarda sıklıkla kullanılmakta olan 4 model mevcuttur (72). Bu çalışmada, otokannibalizm riskini azaltmak ve geniş bir flep modeli elde etmek için muskulokutan bir perforatör ile beslenen biceps femoris arter perforatörüne sahip posterior uyluk perforatör flebi kullanıldı. Bu flebin, 3x12cm olarak kaldırıldığında middorsal bölgeye kadar yaşadığı, distalinde nekroz olduğu daha önceki yayınlarda gösterilmiştir (74). Bu çalışmada da middorsal bölgeye kadar fleplerin yaşadığı görülmüş olup, kontrol grubunda yaşayabilen flep yüzdesinin ortalaması $28,5172 \pm 4,1578$ olarak ölçüldü.

Kök hücre, kendini sınırsız olarak yenileyebilen ve birçok hücre çeşidine farklılaşma kabiliyeti olan hücrelere verilen isimdir. Mezenkimal kök hücreler, erişkin dokuda bulunur, andiferansiyedir, kendini yenileme kabiliyetine ve mezodermal diferansiyasyon potansiyeline sahiptir. Ayrıca kolaylıkla elde edilip uygulanabilen ve son zamanlarda faz çalışmalarını geçip klinik kullanım bulmuş değerli bir kaynaktır. Bu kök hücrelerin bulunduğu majör kaynaklar kemik iliği, umbilikal kord kanı, yağ dokudur.

Literatürde, kemik iliği, yağ doku ve umblikustan elde edilen kök hücrelerin etkinliği karşılaştırılmıştır. Morfoloji, immunojenisite ve pluripotent diferansiyasyonları arasında fark olmadığı görülmüştür(52). Aynı araştırmada, bu üç grup içerisinde, yağ doku kaynağından en az invaziv yöntemle ve en az donör saha morbiditesi ile en fazla hücre sayısının elde edilebildiği gösterilmiştir(51). Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelere benzer hücrelerin adipöz dokuda olduğu, liposakşın yöntemi ile elde edilen lipoaspiratta bolca bulunabildiği birçok çalışmada gösterilmiştir(51,54).

YDMKH'ler, lipoaspire edilmiş yağ doku ya da yağ dokunun tamamından izole edildikten sonra filtrasyon, kollajenaz sindirimi ve santrifüj işlemleri yapılarak elde edilen hücresel fraksiyonlardır. Rodrich'in önerdiği ölçütler

çerçevesinde, insanda kullanılan kök hücreler, otolog olarak elde edildiğinden, istenmeyen yan etki görülme oranı azdır ve teknik olarak ikinci bir operasyon gerekliliği ortaya çıkmaz. Flep operasyonu sırasında eşzamanlı olarak yağ dokudan liposakşın ile kök hücre elde edilebilir. Kültüre edilmesi gerekmeden kullanılabilmesi maliyetin az olmasını sağlar. YDMKH'lerin kolaylıkla mezenkimal hücre çeşitlerine (örn. Kemik, yağ, kıkırdak, kas) de diferansiyasyon gösterebildiği ispatlanmıştır(62).

Adipoz kökenli kök hücreler kemik iliği kaynaklı kök hücrelere göre daha basit yöntemlerle elde edilebilir ve adipoz doku kemik iliğine göre daha fazla kök hücre barındıran bir kaynak olduğu gösterilmiştir(52). KİMKH'ler elde edildikten sonra, oransal olarak daha az bulunmaları nedeniyle daha fazla kültüre edilmeleri gerekir. Ayrıca, ilerleyen yaşla birlikte kemik iliğinde yer alan KİMKH sayısının azalmakta olduğu kanıtlanmıştır(53). Bu nedenlerle, yağ doku kökenli kök hücreler üzerinde çalışma sayıları gün geçtikçe artmıştır. Kore ve Japonya'da bulunan plastik cerrahlar, hükümetlerin bu konularda yapılan çalışmalarda Batı hükümetlerine göre daha esnek davranmaları nedeniyle YDMKH ile ilgili daha yoğun klinik araştırma yapma imkanı bulmaktadır(57).

Doku başına düşen MKH sayısının fazla olması da kök hücre tedavilerinde kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre YDMKH'leri avantajlı kılmaktadır. Taze yağ dokusundaki nükleuslu hücrelerin %10-27'si kök hücredir. İnsan MKH'lerin 105 kemik iliği hücresinde 1 sıklıkta olduğu tahmin edilmektedir(56,85,86). Bu çalışmada da amaçlardan biri klinik kullanımda pratik olması ve kantitatif olarak daha fazla hücre sayısı elde edilebilmesi nedeniyle yağ doku kaynaklı kök hücrelerin etkinliğini ortaya koymaktır. Bu sebeplerle, bu çalışmada da sıçanlardan elde edilen yağ doku kökenli kök hücreler tercih edilmiştir.

Yara iyileşmesi ve flep yaşayabilirliğinde YDMKH'lerin rolü ile ilgili birçok çalışma mevcuttur(10,87,88). Bu çalışmada da allogenik yolla elde edilmiş olan YDMKH'lerin perforatör flep üzerindeki olumlu etkileri hem histopatolojik, hem makroskopik olarak gösterilmiştir. Literatürde farklı flep türleri üzerinde

YDMKH uygulamasının etkileri gösterilmiştir, ancak bu çalışma perforatör flepler üzerinde etkileri göstermek için yapılan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda, flep yerine inset edildikten sonraki 7. günde nekrozun oturduğu görüldüğünden, sakrifikasyon işlemi 7. günde yapıldı. Makroskopik görüntülerde Image J programı ile flep için nekroz alanının oldukça ve anlamlı bir şekilde azaldığı ve daha iyi iyileşmenin gerçekleştiği saptandı. Kontrol grubunda yer alan deneklerde perforatör flebin yaşayabilirlik oranı % $28,5172 \pm 4,1578$ olarak ölçüldü. Kök hücrenin diffüz olarak flebe uygulanmasının ardından ise yaşayabilen flep oranının % $40,1701 \pm 3,35513$ olarak arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Daha önce perforatör bir flep üzerinde yapılmış böyle bir çalışma olmadığından, random ve aksiyel paternli diğer flep çeşitleri üzerinde yapılan araştırmalar ile yapılan kıyaslamalarda yaşayabilen flep oranlarında artışın benzer olduğu görülmüştür. YDMKH ile fareler üzerinde random paternli flepler üzerine yapılan ilk çalışmalardan biri olan Lu ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada, YDMKH'lerin flep yaşayabilirliğini artırdığı görülmüş, ayrıca neovaskülarizasyona hangi aşamada, ne şekilde etki ettiği incelenmiştir(43). Enjeksiyon yerlerinde kapiller dansite artışı hem çıplak gözle, hem de histopatolojik olarak ortaya konmuştur. Kök hücrenin, random paternli cilt fleplerinin yaşayabilirliğinde artışa yol açtığı bulunmuştur(43). Sheng ve arkadaşları ise random paternli flepler üzerinde, Lu'nun çalışmasından farklı olarak operasyondan 2 gün önce heterojenik hücre grubu içeren stromal vasküler fraksiyon uygulaması yapmış, makroskopik olarak kontrol grubu %56 yaşayabilirliğe sahipken, uygulama yapılmış olan flep yaşayabilirliğinin %72 oranında olduğunu göstermiş ve anlamlı olarak artış saptamışlardır. Sheng, bu artışa sebep olabilecek VEGF protein düzeylerinde belirgin artış olduğunu bildirmiştir(89). İzmirli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, YDMKH'ler sıçan sırtında oluşturulan interpolasyon fleplerine 3×10^6 ünite diffüz şekilde verilmiş, flebin yaşayabilirliği ve interpolasyon flebinin ayırma süresinde kısalma sağlanıp sağlanamayacağı değerlendirilmiştir. Denekler 5, 8, 11 ve 14. günlerde pedikülleri ayrılarak 7 gün beklenilmiştir. 7.günün sonunda yaşayabilirlikleri incelendiğinde kontrol

grubunun ortalama flep yaşam alanının $39,7 \pm 12,37$, kök hücre uygulanan grupta ise $55,6 \pm 19,87$ olarak ölçülmüştür. Ayrıca flebin pedikül ayrılma süresinde kısılma sağladıklarını bildirmişlerdir(88).

Kök hücrenin intravenöz ya da lokal uygulanmasının avantaj ve dezavantajları mevcuttur. İntravenöz uygulamalarda, yetişkin hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda iskemik dokuda neovaskülarizasyonu arttığı kanıtlanmıştır(90). Ancak lokal enjeksiyon, YDMKH'lerin hedef dokuda daha yoğun dansitede olmasını sağlamaktadır. Bu kümelenmenin hücrelerin canlılığını arttırdığı düşünülmektedir. Ayrıca, lokal uygulama daha az sistemik yan etkiye neden olmaktadır. Sistemik infüzyonun, kanser, romatoid artrit, diyabetik retinopati gibi anjiogenez bozukluklarını tetikleme tehlikesi mevcuttur(90). Bu nedenlerle lokal uygulamaların daha güvenli ve pratik olduğu kabul edilmiştir(43). Bu çalışmada da elde edilen kök hücrelerin, flebe lokal uygulaması yapılarak etkileri gözlenmiştir. Suartz tarafından 2014 yılında yapılan çalışmada, çalışmamızda kullanılan daha fazla miktar YDMKH (5×10^6 ünite) farklı bir yolla, intravenöz olarak verilmiş ve dorsal bölgeden random paternli cilt flebi kaldırılmıştır. 7. günün sonunda yaşayabilen flep alanlarının ölçümünü yapmışlardır. Bu çalışmada kontrol grubunda yaşayan flep oranını $38,86 \pm 5,021$, kök hücre uygulaması yapılan grubun oranını ise $58,14 \pm 4,460$ olarak bildirmişlerdir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit etmişlerdir(9). Ancak histokimyasal markırlara yönelik çalışma yapılmadığından lokal vaskülarizasyon artışı olup olmadığını gösterememişlerdir.

Bazı araştırmacılar kök hücrelerin çeşitli kronik yaralar ve iskemik süreç üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Diyabetin kronik yara ve iyileşmeyi geciktirme üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Diyabetik hastalarda hipergliseminin yol açtığı iskemik zeminde neovaskülarizasyon yetersizliği, buna bağlı yara yeri iyileşme güçlüğü ve ciltte nekroz meydana gelmektedir(91,92). Gao ve arkadaşları yayınladıkları yazıda diyabetik sıçanlarda random paternli flep üzerine uyguladıkları YDMKH'nin yaşayabilen flep alanını arttırdığını bildirmişlerdir. Yaptıkları deneyde bu oranları kontrol

grubunda $43,7 \pm 4,5\%$, kök hücre uyguladıkları grupta $83,2 \pm 5,3$ olarak bildirmişlerdir. Nambu ve arkadaşları diyabetik fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, makrofaj sayısının iyileşme için tek başına yeterli olmadığı durumda YDMKH'lerin destek olduğu ve buna ek olarak sekretuar aktivitelerinin yara iyileşmesini tetiklediğini belirtmişlerdir(87). Rekonstrüksiyon işlemleri sırasında en zorlayıcı kronik yara sebeplerinden biri de radyasyon hasarıdır. Hasdemir ve arkadaşları yaptıkları çalışmada random paternli cilt flebi kaldırarak radyasyon hasarı oluşturmuşlardır. Çalışmamızda uygulanandan daha az miktar YDMKH uygulamasını (2×10^6) subkutan olarak yapmışlardır. Radyasyon hasarı ile oluşturulan kontrol grubunda flebin ortalama yaşayabilen yüzdesinin $40,90 \pm 3,91$ olduğunu, kök hücre uygulandığında bu oranın ortalama $56,13 \pm 7,10$ olduğunu bildirmişler, istatistiksel analizde de anlamlı derece artış görmüşlerdir(36). Uysal ve arkadaşları sıçanların sırtından kaldırdıkları random paternli fleplerde yaptıkları iskemik modelde YDMKH uygulaması yapmışlardır(65). Sonuçta, kök hücre uygulaması yapılan sıçanların fleplerinin yaşayabilen alanlarında anlamlı derecede artış tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla örtüşmektedir.

Random paternli ve aksiyel beslenen flep modellerinde flep kaldırılması ile aynı anda kök hücre uygulayan ve flep canlılığında artışı gözlemleyen birçok deney bulunmaktadır. Bazı yayınlarda fleplere uygulanan kök hücre miktarının 1×10^7 olduğu görülmüştür(65,89). Bunun dışında birçok çalışmada flep dokusuna enjekte etmek için kullanılan kök hücre miktarı çalışmamızdaki ile benzer olduğu görüldü(43,88)

Kök hücrelerin neovaskülarizasyon üzerindeki etkileri birçok çalışmayla ortaya konmuştur. Neovaskülarizasyon iki yolla sağlanır: anjiogenez ve vaskülogenez. Anjiogenez, dokuda var olan kapillerlerin distalinden tomurcuklanma ile ileriye doğru uzaması olarak tanımlanır. Endotel hücrelerinin proliferasyonu söz konusudur. Vaskülogenez ise anjiogenik progenitör hücrelerin vaskülarizasyonun olacağı alana ilerlemesi ve burada endotelyal hücrelere farklılaşması sürecidir(39,40,61). Literatürde postnatal

vaskülogenezde kemik iliği kökenli kök hücrelerin rolü araştırılmıştır. Çalışmalarda KİMKH'lerin endotelial progenitör hücrelerine dönüşerek anjiyogenez ve vaskülogenezin her ikisine de katkıda bulunarak neovaskülarizasyonu sağladığı gösterilmiştir.(49) Bunun yanı sıra mezenkimal kök hücrelerin oluşturduğu skafold ile kırıldak produksiyonu için gereken ekstraselüler matriks yapımı, diferansiyasyon, hücre adezyonunu sağlama ve implante hücrelerin yeniden göç etmesini engellemede rol alabildiği gösterilmiştir(93).

YDMKH'lerin de anjiyojenik karakterde olduğu kanıtlanmıştır. İskemi sırasında büyüme faktörü salınımını arttırdıkları ve vasküler endotelial hücrelere farklılaştıkları deneysel olarak gösterilmiştir(94,95). Yara iyileşmesi ve iskemik dokular üzerinde yapılan çalışmalarda, YDMKH'lerinde salgıladığı sayısız sitokinler makrofaj artışı, fibroblast kemotaksisi, kollajen üretimi, granülasyon dokusu formasyonu ve vaskülarizasyonda artışa yol açar(62). Yalnızca KİMKH'lerin değil, yağ doku hücrelerinin de bu etkilerinin gösterilmesi ile bu hücrelerin yeni deneysel çalışmalarda kullanılması sağlanmıştır.

Çalışmamızda histokimyasal boyamalarda mikroskopik olarak artan hücre sayısı, kollajen miktarı, damarlanma, bez ve kıl folikülü ile azalan inflamasyon ve fibrozis görüldü. Kök hücrelerin karakterizasyonu için CD markırları literatürde de bulunan standart yöntem olarak kullanıldı (64,65,96). CD 44 ve CD 90 varlığı daha önce de benzer çalışmalarda kullanılmıştır(43,64,65). İmmunohistokimyasal sonuçlarımızda CD44 ve CD 90 boyamaları ile endojen kök hücre sayısı ile karşılaştırıldığında MKH sayısının arttığı, PCNA ile hücre çoğalmasının arttığı görülmüştür. Yara iyileşmesi sırasında oluşan serbest radikalleri, iskemi reperfüzyon hasarını ve inflamasyonu azaltmak ve bu sayede flep distalinde nekroz oluşumunu engellemek için yapılan çalışmalar da mevcuttur(97). Bizim çalışmamızda da eNOS ve iNOS ile oksidatif stresin azaldığı, IL-1 ve IL-6 ile inflamasyonun azaldığı, VEGF ile damarlanmanın arttığı ve TUNEL yöntemi ile apoptotik indeksin azaldığı belirlendi.

Literatürde bu konu ile ilgili histokimyasal incelemelerin de olduğu ilk yapılan çalışmalardan biri, daha önce de bahsedilen 2008 yılında yapılmış olan Lu ve arkadaşlarının çalışmasıdır (43). İlk kez YDMKH'lerin hayvan deneylerinde random paternli flepler üzerinde kullanıldığı bu çalışmada, fareler üzerinde kaldırdıkları random paternli fleplere, işaretlenmiş olan YDMKH'leri intrakutan yolla uygulamışlardır. Sonuçta mikroskopik olarak yapılan histopatolojik incelemede, çalışmamızdaki benzer şekilde kapiller dansitede artış görmüşlerdir. İmmunohistokimyasal yöntemlerle bu hücrelerin in vivo olarak endotel hücrelere diferansiye olduğunu belirtmişlerdir. Bu etkinin aynı zamanda kök hücrelerden salgılanması indüklenen anjiogenik büyüme faktörleri, özellikle de VEGF sayesinde olduğunu öne sürmüşlerdir. Ancak çalışmalarında VEGF ya da diğer faktörler için ek immünohistokimyasal analiz yapmamışlardır. Ayrıca Uysal ve arkadaşları da benzer şekilde farelerde oluşturdukları iskemi-reperfüzyon modeli üzerine flebe uyguladıkları YDMKH'lerin etkilerini incelemiş, sonuçta bazı büyüme faktörlerinin regülasyonunu etkileyerek hasarı azalttığını, bu faktörlerin başında VEGF, FGF ve TGF- β geldiğini bildirmişlerdir(65). Kontrol ve deney grubunda mikroskop altında damar sayısı ve dansitesini incelemişler, her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada, Vishnubalaji ve arkadaşları, YDMKH'nin, damarlanma üzerinde anlamlı bir artışa neden olduğunu, bu artışı CD31, CD34, vWF, CD146 ve SMA belirteçleri ile tespit ettiklerini bildirmişlerdir(98). Li ve arkadaşları 2010 yılında sıçanlarda abdominal bölgeden prefabrikasyon yaparak kaldırdıkları aksiyel fleplerde kök hücre uygulaması yapılan grupta kapiller dansitenin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir(70). Ayrıca bu çalışmada kök hücre uygulanan grubun VEGF düzeyinin operasyonun 7. gününde belirgin ölçüde arttığı gösterilmiştir. 2011 yılında ise Gao, diyabetik farelerde iskemik deri fleplerinde hipoxia-inducible factor-1 α ve VEGF artışı yoluyla flep yaşayabilirliğini arttığını kanıtlamışlardır(91). Aynı çalışmada, flebin perfüzyonunun kök hücre uygulanmayan gruba göre anlamlı olarak arttığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kapiller damar sayısı ölçümleri ve VEGF, kök hücre

uygulanan grupta kontrol ve sham gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştır. Başka bir çalışmada, umbilikal kord kaynaklı kök hücre etkisi ile epidermiste bulunan VEGF'nin yanı sıra sebace bez sayısında artış olduğu gösterilmiştir(64). Ersel ve arkadaşları da, biyomühendislik yolu ile doku iskeleleri üzerinde yapılan kök hücre uygulamalarının reepitelizasyonu arttırdığı, kollajen birikimini azalttığı, yeniden damarlanmayı çoğalttığı, kıl folikülü ve yağ bezlerini daha çok ürettiği ayrıca parakrin faktörler yolu ile yara iyileşmesini hızlandırarak istenilen iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir(63). Sonuçlarımızda da aynı şekilde bez sayısı, kök hücre uygulanan grupta kontrol ve sham gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur.

İnflamasyonda rolü olan IL-1 ve IL-6 düzeyleri, kök hücre enjeksiyonu yapılan grupta, kontrol ve sham gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştır. Yara iyileşmesi ve iskemik hasarlanma modelleri üzerinde iyileşme sağlamak için literatürde yapılan çalışmalarda, iyileşmeyi tetikleyici maddenin uygulanması sonrasında dokuda inflamasyonun azaldığı ve IL-1 ve IL-6 düzeylerinde benzer şekilde azalma olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur(97,99). Aynı mekanizma ile, sıçanlarda kaldırılan kutanöz fleplerde iskemi hasarı ve inflamasyonun iyileştirilmesi amacıyla flebe ajan uygulanmasıyla yapılan araştırmalarda benzer şekilde inflamasyonun baskılandığı ve bunun IL-1 ve IL-6 düzeylerinin azalması ile olduğu da gösterilmiştir(97,99,100).

Reichenberger ve arkadaşları da çalışmalarında YDMKH'lerin aksiyel cilt flepleri üzerinde iskemi reperfüzyon hasarını azalttığını göstermiştir(68). Mekanizmasında, gene MKH'lerin salgıladığı faktörlerin olduğunu savunmuşlardır. MKH salgısı ile oluşturduğu söz konusu olan bu ortama niş denmektedir(68).

2015 yılında Xu tarafından tavşan kulağında venöz konjesyon olan random paternli flepler üzerinde YDMKH etkinliğini göstermek üzere çalışma yapılmıştır. Sonuçta kapiller artış olduğunu ve neovaskülarizasyonu tetiklemiş olduğunu öne sürmüşlerdir(84).

Yara iyileşmesi ve kapanmasının, kök hücre ile birlikte piliç amniyotik membran ekstraktı uygulanması sonrası daha fazla olduğu, damarlanmanın artmış olduğu Chehelcheraghi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kanıtlanmıştır(71). Bunlara paralel olarak oksidatif stres belirteçlerinden de eNOS ve iNOS'ta azalma görülmüştür. Bu sonuçların çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olduğu görüldü. Aynı çalışmada kök hücrenin in vivo çalışmasında iyileşmeyi etkin bir şekilde sağlamanın, kronik yaralarda klinik kullanımına olanak sağlması açısından bulguların ümit verici olduğu öne sürülmüştür(71). Bulgular mezenkimal kök hücrelerin (MKH) yara iyileşmesinde ve inflamasyon halinde dokunun yeniden biçimlendirilmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu mekanizmaların flep üzerine yapılan uygulamalarda da benzer şekilde var olduğu literatürdeki birçok diğer çalışmada gösterilmiştir(71,101).

İstatistiksel analizlerimizde, standart sapma oranlarının kontrol, sham ve kök hücre grupları için sırasıyla 4,1578, 3,87896, 3,35513 olmak üzere oldukça düşük olduğu görüldü. Standart sapmanın düşük çıkması bize herhangi bir değişkenin sonuçlarda gözlenebilen fark yaratabileceğini ve bu nedenle seçilen modelin böyle bir çalışma için ideale yakın olduğunu göstermiştir. Coşkunfirat tarafından yayınlanan makalede 16 sıçan üzerinde yapılan aynı boydaki fleplerde standart sapma 7,2 olarak bulunmuştur(74).

Bu araştırmalar neticesinde elde edilen bilgiler insanlar üzerindeki çalışmalarda da kullanılmıştır. İnsan yağ dokusunda multipotent kök hücrelerin bulunduğu daha önce Zuk ve arkadaşlarının yaptığı 2001 yılındaki çalışmada gösterilmiştir(50). Günümüzde YDMKH ile insanlar üzerinde yapılan ilk klinik çalışmalardan biri Garcia-Olmo ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır(102). Bu çalışmada, Crohn hastalığına bağlı fistülü olan hastalarda otolog olarak liposakşın ile elde edilen YDMKH tedavisi uygulanmış ve iyi sonuçlar aldığını bildirmişlerdir(102). Aynı araştırmacıların yaptığı faz 2 klinik çalışmada, Crohn hastalığı olan ve kompleks perianal fistül olan bireylerde otolog YDMKH ve fibrin yapıştırıcı ile yapılan tedavinin, tek başına fibrin yapıştırıcı uygulanan bireylere göre iyileşme oranlarının daha iyi olduğu

gözlemlenmiştir(103). Ayrıca YDMKH'lerin gene insan üzerinde yapılan çalışmalarda yağ grefti yaşayabilirliğini arttırdığı da gösterilmiştir(57).

Farklı flep teknikleri, farklı dozlar ve bekleme süreleri ile olsa da, literatürdeki diğer birçok çalışma ile bulgularımızın büyük bir kısmı örtüşmektedir. Hem makroskopik, hem mikroskopik olarak histokimyasal ve immunohistokimyasal analizlerle, YDMKH'lerin perforatör flep üzerine olumlu etkileri bu çalışma ile ortaya konulmuştur. YDMKH'lerin diferansiyasyon etkisinin yanı sıra, büyüme faktörlerini ve sitokinleri regüle etme ve inflamasyonu baskılama etkisinin, günümüzde herhangi farmakolojik bir ajanla sağlanabildiği gösterilememiştir(65). İnsanda otolog olarak elde edilebilen bu kök hücrelerin, ileride doku mühendisliğinde ve hücre bazlı terapilerde kullanılabileceğini de öne sürülmektedir(103).

VI. Sonuç ve Öneriler

Doku defektleri her zaman plastik cerrahinin mücadele etmekte olduğu ana konulardan biridir. Hasta grubu içinde yaşlı, komorbiditeleri olan hastalar ağırlıktadır. Bu tarz hastaların hospitalizasyon süresinin kısa olması, hem postop dönemde yaşanabilecek enfeksiyon riskini azaltırken, hem de eşzamanlı olarak maliyeti azaltmaktadır. Flep cerrahisindeki güncel gelişmelerle bu sorunların aşılması sağlanırken, MKH tedavisinin eklenmesi ile sonuçların daha etkili olduğu anlaşılmaktadır. Kök hücrelerin, literatürde farklı iskemik yolaklara maruz bırakılmış, ya da farklı tekniklerle elde edilmiş fleplerde iskemi hasarını azalttığı, doku perfüzyonunu arttırdığı birçok kez kanıtlanmıştır. Hasta için en az ağrı ve morbidite ile en fazla sayıda kök hücre elde edilebilen kök hücreler yağ doku kökenli kök hücrelerdir, bu nedenler yağ doku kökenli kök hücreleri daha sık araştırılır hale getirmiştir. Günümüzde hospitalizasyon süresinin kısılması ve hastanın en kısa sürede günlük yaşantısına döndürülmesi önem kazanmıştır. Bu amaçla, serbest flep ihtiyacını belirgin ölçüde azaltmış olan perforatör fleplerin yaşayabilirliğini arttıran yöntemlere yönelik araştırmalar artmıştır. Yağ doku kökenli kök hücrelerin literatürde diğer flep çeşitlerinde elde edilen başarılarla benzer şekilde, perforatör fleplere subkutan yolla uygulanmasıyla flep yaşayabilirliği üzerinde olumlu etkisi olduğu görülmüştür. MKH uygulaması ile tedavide etkili fonksiyonel hücre sayısının arttığı, kollajen olgulaşmasının arttığı ve fibrozisin azaldığı, yaraya bağlı oluşan oksidatif stresin ve apoptozun azalmasına ek olarak dokunun damarlanmasının arttığı bir mikroçevre üretilmektedir.

Yağ doku kökenli kök hücrelerin kullanımının yaygınlaşması ve tedavi seçenekleri arasında ön sıralarda yer alması için, daha büyük hasta sayıları ile yapılmış çalışmaların olduğu klinik serilerin yayınlanması gerekmektedir. Uzun dönem sonuçların incelenmesi ile henüz yeterli veri olmamasına rağmen, immunojenik reaksiyon ve malignite gibi istenmeyen etkilerin insidansı ve alınabilecek önlemlerin araştırılması mümkün olacaktır.

VII. Özet

Flep cerrahisi sırasında, defekt bölgesini örten flep dokusu çoğunlukla transfer edilen dokunun en distalidir. Beslenmesinde bozukluk olmaması, yeterli dolaşımının sağlanması yapılan cerrahi girişimin başarılı olması için en önemli kriterdir. Bu amaçla literatürde pek çok farmakolojik ajanın yanı sıra, son yıllarda popülerlik kazanmış olan kök hücreler de kullanılmaktadır. Adipoz kökenli kök hücrelerin neovaskülarizasyonu arttırdığı önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu çalışmada plastik cerrahide günümüzde sıklıkla kullanılmakta olan perforatör fleplerin, yağ doku kökenli kök hücre verilerek yaşayabilirliğinde artışın gözlemlenmesi hedeflendi. Deney için, 18 adet dişi erkek ayrımcı gözetilmeksizin Wistar Albino sıçan kullanılarak 3 grup oluşturuldu. Sıçanların dorsal bölgelerinden 3x12cm'lik literatürde daha önce tanımlanmış olan posterior uyluk perforatör flebi kaldırıldı. İlk grup kontrol grubu olarak seçildi. Flep, herhangi bir işlem yapılmadan yerine iade edildi. 2. Grupta flebe 0,3ml subkutan serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. 3. gruba 3×10^6 ünite kök hücre subkutan olarak enjekte edilerek fleplerin yerlerine iadesi yapıldı. Hayvanların tümü 7. günün sonunda sakrifiye edildi. Sağlıklı zon, geçiş zonu ve nekrozdan olmak üzere 3 adet biyopsi alınarak histopatolojik olarak incelendi. Makroskopik görüntüleri fotoğraflanarak dijital ortamda incelendi. Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Sonuç olarak yağ doku kökenli kök hücre uygulaması yapılan fleplerin, kontrol ve sham gruplarına göre yaşayabilen kısmında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü. Ayrıca histokimyasal ve immunokimyasal olarak, enjeksiyon bölgesinde kök hücrenin varlığı, kapiller yoğunluğun arttığı, eNOS, iNOS, IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar belirteçlerin, bez ve kıl folikülü sayısında artış olduğu görüldü. Bu olumlu etkilerin, klinik kullanımda perforatör flep nekroz oranlarını azaltmada ve iyileşmeyi hızlandırarak hastane yatış süresinin kısalmasında kullanılabileceği düşünülmektedir. İnsanda perforatör flepler üzerinde uygulanabilecek yağ doku kökenli kök hücrelerin terapötik dozu, olası yan etkileri ve prognoza katkıları için ileri klinik çalışmalar gerekmektedir.

VIII. Summary

During flap surgery, the main part of the flap which is aimed to cover the defect region, is commonly the most distal of the transferred tissue. The circulation of the flap is the most important point in achieving a successful surgical result. For this purpose, in addition to many pharmacological agents in the literature, stem cells which have gained popularity in recent years are also used. The effectiveness of using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in increasing the neovascularisation has been proven. In this study, it was aimed to observe the increase in viability of perforator flaps, which are frequently used in plastic surgery, by injecting adipose derived stem cells. The study included 18 male and female Wistar Albino rats which were divided into 3 groups. A 3x12cm posterior thigh perforator flap, which was previously published in literature, was elevated from the dorsal regions of the rats. The first group was named as control group. The flaps were set back to its place without any injection. The second group, sham group, was injected 0,3cc saline solution. The third group was injected 3×10^6 units (0,3cc) of adipose derived stem cell. All flaps were sutured back to the donor site. All subjects were sacrificed on 7th day of procedure. Three biopsies were taken from healthy zone, transition zone and necrosis and examined histopathologically. Macroscopic images were photographed and examined using digital software. The results were statistically analyzed. Consequently, a statistically significant improvement in viability of adipose-derived stem cell injected flaps compared to sham and control groups. In addition, histochemical and immunochemically, there was an increase in the number of gland and hair follicles in the injection site, presence of stem cells, increased capillary density and decrease in inflammatory markers such as eNOS, iNOS, IL-1 and IL-6. It is believed that these positive effects can be used to reduce the rate of perforator flap necrosis in clinical use and shorten the length of hospital stay by accelerating recovery. Further clinical studies are required to detect the therapeutic doses, possible side effects and prognosis of adipose derived stem cells on perforating flaps in humans.

IX. Kaynaklar

1. Taylor GI. The Blood Supply Of Skin. In: Thorne, CH, editor Grabb and Smith's Plastic Surgery, 6th Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.; 2007. p. 33–41.
2. Hallock GG. The complete classification of flaps. *Microsurgery*. 2004;24(3):157–61.
3. Fang F, Chung K. An Evolutionary Perspective on the History of Flap Reconstruction in the Upper Extremity. *Hand Clin*. 2014;30(2):109–v.
4. Milton SH. Pedicled skin flaps: The fallacy of the length: Width ratio. *Br J Surg*. 1970;57(7):502–8.
5. Blondeel PN, Van Landuyt KHI, Monstrey SJM, et al. The “Gent” consensus on perforator flap terminology: Preliminary definitions. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112(5):1378–82.
6. Gir P, Cheng A, Oni G, et al. Pedicled-perforator (propeller) flaps in lower extremity defects: A systematic review. *J Reconstr Microsurg*. 2012;28(9):595–601.
7. Kerrigan C. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg*. 1983;72(6):766–77.
8. Innocenti M, Menichini G, Baldrighi C, et al. Are there risk factors for complications of perforator-based propeller flaps for lower-extremity reconstruction? *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(7):2276–86.
9. Suartz CV, Gaiba S, França JP de, et al. Adipose-derived stem cells (ADSC) in the viability of a random pattern dorsal skin flap in rats. *Acta Cir Bras* [Internet]. 2014;29(suppl 3):02–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502014001500002&lng=en&tlng=en
10. Foroglou P, Karathanasis V, Demiri E, et al. Role of adipose-derived stromal cells in pedicle skin flap survival in experimental animal models. *World J Stem Cells* [Internet]. 2016;8(3):101. Available from: <http://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v8/i3/101.htm>
11. Chang S-M. *Surgical atlas of perforator flaps*. 2015.
12. Greig A, Gohritz A, Geishauser M, et al. *Heinrich von Pfalzpaint*,

- Pioneer of Arm Flap Nasal Reconstruction in 1460, More Than a Century Before Tagliacozzi. *J Craniofac Surg.* 2015;26(4):1165–8.
13. Gaspare Tagliacozzi--Plastic Surgeon. *JAMA.* 1969;207(7):1343–4.
 14. Pierce GW, O'Connor GB. The Tubed Pedicle Flap in Reconstructive Surgery. *Cal West Med.* 1930;XXXV(2):94–7.
 15. Wolff, KD. Hölzle F. Latissimus Dorsi Flap. In: *Raising of Microvascular Flaps.* Berlin: Springer; 2011. p. 63–79.
 16. Timmons MJ. Landmarks in the anatomical study of the blood supply of the skin. *Br J Plast Surg.* 1985;38(2):197–207.
 17. Taylor GI. Foreword in Manchot, C. ed *The Cutaneous Arteries of the Human Body.* In Springer-Verlag New York; 1983. Available from: https://books.google.com.my/books?id=4QJIAAAACAAJ&dq=Encyclopedia+of+the+Human+Body&hl=en&sa=X&redir_esc=y
 18. Santoni P, Sykes PJ. *A History Of Plastic Surgery.* Springer; 2007.
 19. McGregor, A., Jackson T. The extended role of delto-pectoral flap. *Br J Plast Surg.* 1970;25(1):3–16.
 20. Mcgregor IA, Jackson IT. The groin flap. *Plast Reconstr Surg.* 1972;25:3–16.
 21. Taylor GI, Corlett RJ, Ashton MW. The Functional Angiosome: Clinical Implications of the Anatomical Concept. *Plast Reconstr Surg.* 2017;140(4):721–33.
 22. Pavletic MM. Vascular Supply to the Skin of the Dog: A Review. *Vet Surg.* 1980;9(2):77–80.
 23. Khan F, Spiegel A. The Evolution of Perforator Flaps. *Semin Plast Surg* [Internet]. 2006;20(2):053–5. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2006-941710>
 24. Koshima I, Soeda S. Inferior epigastric artery skin flaps without rectus abdominis muscle. *Br J Plast Surg* [Internet]. 1989;42(6):645–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2605399>
 25. Cormack G, Lamberty B. *The arterial anatomy of skin flaps.* 2nd Ed. Edinburg: Churchill Livingstone; 1994. 514-522 p.
 26. Lamberty BG., Healy C. *Flaps : Physiology , principles of design and*

- pitfalls. In: *Mastery of Plastic Reconstructive Surgery Vol1* Ed: Cohen M. Boston: Little ,Brown and Company; 1994. p. 56–70.
27. Cormack G, Lamberty B. A classification of fascio-cutaneous flaps according to their patterns of vascularisation. *Br J Plast Surg.* 1984;37(1):80–7.
 28. Mathes S, Nahai F. Classification of the Vasculer Anatomy of Muscles: Experimental and Clinical Correlation. *Plast Reconstr Surg.* 1981;67(2):177–87.
 29. Tolhurst E, Haeseker B. Flaps in the axillary region. *Br J Plast Surg.* 1982;35:430–5.
 30. Schafer K. Das subcutane gefabetasystem (untere extremitant): Mikropaparatorische untersuchungen. *Gegenbaurs Morphol Jahrb (Leipzig).* 1975;121:492.
 31. Mathes S, Nahai F. *Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy and Technique.* New York: Churchill, Livingstone; 1997. 37-160 p.
 32. Hallock GG, Rice DC. Cranial epigastric perforator flap: A rat model of a true perforator flap. *Ann Plast Surg.* 2003;50(4):393–7.
 33. Bayramiçli M. Deneysel Flep Modelleri. In: *Deneysel Mikrocerrahi.* 2005. p. 661–2.
 34. Daniel R, Kerrigan C. Principles and physiology of skin flap surgery. McCarthy JG. *Plastic Su.* Philadelphia, WB Saunders; 1990. 275-328 p.
 35. Rohrich RJ, Cherry G, Spira M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. *Plast Reconstr Surg.* 1984;73(6):943–8.
 36. Hasdemir M, Agir H, Eren GG, et al. Adipose-derived stem cells improve survival of random pattern cutaneous flaps in radiation damaged skin. *J Craniofac Surg.* 2015;26(5):1450–5.
 37. Li Q, Reis E, WX Z, et al. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. *J Reconstr Microsurg.* 2000;16(1):45–9.
 38. Zhang F, Tang X. New advances in the mesenchymal stem cells therapy against skin flaps necrosis. *World J Stem Cells.* 2016;6(4):491–6.

39. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653–60.
40. Tepper OM, Galiano RD, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cells: The promise of vascular stem cells for plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111:846.
41. Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154.
42. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-). 1998;282(5391):1145–7.
43. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, et al. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(1):50–8.
44. Pittenger MF, Mackay A, Beck S, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* (80-) [Internet]. 1999;284(5411):143–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5411.143>
45. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):313–9.
46. Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, et al. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*. 1993;81:1679–90.
47. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, et al. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: Ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 2009;132(5):533–46.
48. Crosby J, Kaminski W, Schatteman G, et al. Endothelial Cells of Hematopoietic Origin Make a Significant Contribution to Adult Blood Vessel Formation. *Circ Res*. 2000;87:728–31.
49. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells and Pathological Neovascularization. *Circ*

- Res. 1999;85:221–8.
50. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* [Internet]. 2001;7(2):211–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456>
 51. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279–95.
 52. Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* [Internet]. 2006;24(5):1294–301. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2005-0342>
 53. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: Expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(7):713–34.
 54. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of Freshly Isolated and Cultured Cells Derived From the Fatty and Fluid Portions of Liposuction Aspirates. *J Cell Physiol*. 2006;208:64–76.
 55. Gir P, Oni G, Brown SA, et al. Human adipose stem cells: Current clinical applications. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(6):1277–90.
 56. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: Roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*. 2009;4(2):265–73.
 57. Kim Y-J, Jeong J-H. Clinical Application of Adipose Stem Cells in Plastic Surgery. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2014;29(4):462–6. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.3346/jkms.2014.29.4.462>
 58. Eun S-C. Stem Cell and Research in Plastic Surgery. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2014;29(6):167–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2014.29.S3.S167>
 59. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, et al. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2008;32(1):48–55.

60. Murohara T, Horowitz J, Silver M, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*. 1998;97(1):99–107.
61. Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: Mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem*. 2007;102(4):840–7.
62. Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, et al. Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Ann Plast Surg*. 2011;66(2):210–5.
63. Ersel M, Uyanikgil Y, Karbek Akarca F, et al. Effects of Silk Sericin on Incision Wound Healing in a Dorsal Skin Flap Wound Healing Rat Model. *Med Sci Monit [Internet]*. 2016;22:1064–78. Available from: <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/897981>
64. Çil N, Oğuz EO, Mete E, et al. Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries. *Biotech Histochem [Internet]*. 2017;92(1):15–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10520295.2016.1243728>
65. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, et al. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: Immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(3):804–15.
66. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*. 2003;89(6):1235–49.
67. Mustoe T, Pierce G, Thomason A, et al. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science (80-)*. 1987;237(4820):1333–6.
68. Reichenberger MA, Heimer S, Schaefer A, et al. Adipose Derived Stem Cells Protect Skin Flaps Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Stem Cell Rev Reports*. 2012;8(3):854–62.
69. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153:347–58.
70. Li H, Zan T, Li Y, et al. Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells

- Promotes Formation of Prefabricated Flap in a Rat Model. *Tohoku J Exp Med* [Internet]. 2010;222(2):131–40. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/tjem/222.131?from=CrossRef>
71. Chehelcheraghi F, Eimani H, Sadraie SH, et al. Improved viability of random pattern skin flaps with the use of bone marrow mesenchymal-derived stem cells and chicken embryo extract. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(8):764–72.
 72. Kayano S, Nakagawa M, Nagamatsu S, et al. Why not perforator flap training models in rats? *J Plast Reconstr Aesthetic Surg* [Internet]. 2010;63(2):e134–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2009.02.087>
 73. Okşar H, Coşkunfırat O, Özgentaş H. Perforator-based flap in rats: a new experimental model. *Plast Reconstr Surg.* 2001;108(1):125–31.
 74. Coşkunfırat OK, İslamoğlu K, Ozgentaş HE. Posterior Thigh Perforator-Based Flap: A New Experimental Model in Rats. *Ann Plast Surg.* 2002;48(3):286–91.
 75. Rodríguez Lorenzo A, Álvarez Á, Aguirrezabalaga J, et al. The anteromedial thigh flap as a training model of a perforator flap in rat. *J Reconstr Microsurg.* 2007;23(5):251–5.
 76. Yenidunya M, Tsukagoshi T, Morioka D, et al. An axial-pattern skin flap in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 1998;14(06):383–6.
 77. Deliloglu-Gurhan I, Tuglu I, Vatansever H, et al. The effect of osteogenic medium on the adhesion of rat bone marrow stromal cell to the hydroxyapatite. *Saudi Med J.* 2006;27(3):305–11.
 78. Kerem H, Akdemir O, Ates U, et al. The effect of melatonin on a dorsal skin flap model. *J Investig Surg.* 2014;27(2):57–64.
 79. Nelson J, Fischer J, Brazio P, et al. A review of propeller flaps for distal lower extremity soft tissue reconstruction: is flap loss too high? *Microsurgery.* 2013;33:578–86.
 80. Hicks CW, Selvarajah S, Mathioudakis N, et al. Burden of Infected Diabetic Foot Ulcers on Hospital Admissions and Costs. *Ann Vasc Surg.* 2016;33:149–58.

81. Schaverien M V., Hamilton SA, Fairburn N, et al. Lower Limb Reconstruction Using the Islanded Posterior Tibial Artery Perforator Flap. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2010;125(6):1735–43. Available from:
<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00006534-201006000-00022>
82. Georgescu A V. Propeller perforator flaps in distal lower leg: Evolution and clinical applications. *Arch Plast Surg*. 2012;39(2):94–105.
83. Rad A, Singh N, Rosson G. Peroneal Artery Perforator-Based Propeller Flap Reconstruction Of The Lateral Distal Lower Extremity After Tumor Extirpation: Case Report And Literature Review. *Microsurgery*. 2008;28(8):663–70.
84. Xu N, Guo S, Wang Y, et al. Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Promotes the Survival of Venous-Congested Skin Flaps in Rabbit Ear. *Cell Biochem Biophys*. 2014;71(2):557–63.
85. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry* [Internet]. 2010;77(1):22–30. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20813>
86. Karadağ A, Altınok B, Özkan T, et al. Kemik İliği Stroması : Hücreleri ve Mikroçevresi. *Ankara Sağlık Hizmetleri Derg*. 2017;16(2):51–62.
87. Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann Plast Surg*. 2009;62(3):317–21.
88. Izmirli HH, Alagoz MS, Gercek H, et al. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells to accelerate neovascularization in interpolation flaps. *J Craniofac Surg*. 2016;27(1):264–71.
89. Sheng L, Yang M, Li H, et al. Transplantation of Adipose Stromal Cells Promotes Neovascularization of Random Skin Flaps. *Tohoku J Exp Med* [Internet]. 2011;224(3):229–34. Available from:
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/tjem/224.229?from=CrossRef>

90. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* (80-). 1997;275(5302):964–7.
91. Gao W, Qiao X, Ma S, et al. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Cell Mol Med*. 2011;15(12):2575–85.
92. Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ, et al. Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(1):59–70.
93. Lim E-H, Sardinha JP, Myers S. Nanotechnology biomimetic cartilage regenerative scaffolds. *Arch Plast Surg* [Internet]. 2014;41(3):231–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24883273> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4037768>
94. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292–8.
95. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110(3):349–55.
96. Mildmay-White A, Khan W. Cell Surface Markers on Adipose-Derived Stem Cells: A Systematic Review. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2017;12(6):484–92.
97. de Lima Silva JJ, Pompeu DG, Ximenes NC, et al. Effects of Kaurenoic Acid and Arginine on Random Skin Flap Oxidative Stress, Inflammation, and Cytokines in Rats. *Aesthetic Plast Surg*. 2015;39(6):971–7.
98. Vishnubalaji R, Manikandan M, Al-Nbaheen M, et al. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells. *BMC Dev Biol* [Internet]. 2012;12(1):7. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/12/7>
99. Peng L, Pan X, Yin G. Natural Hirudin Increases Rat Flap Viability by

- Anti-Inflammation via PARs/p38/NF- B Pathway. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
100. Qi Z, Gao C, Wang Y, et al. Effects of hyperbaric oxygen preconditioning on ischemia-reperfusion inflammation and skin flap survival. *Chin Med J (Engl)*. 126(20):3904–9.
 101. Lu Z, Yuan Y, Gao J, et al. Adipose tissue extract promotes adipose tissue regeneration in an adipose tissue engineering chamber model. *Cell Tissue Res.* 2016;364(2):289–98.
 102. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, et al. A phase I clinical trial of the treatment of crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(7):1416–23.
 103. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: A phase ii clinical trial. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(1):79–86.