



T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANDAKİ TAM KAT DOKU KAYBI MODELİNDE, KOMPOZİT
MİYOKUTANÖZ GREFT VE VEGF GENİ TRANSFEKTE EDİLMİŞ
YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KOMBİNE
KULLANIMININ GREFT ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hüseyin GERÇEK

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Uzmanlık

Tezi

2014



T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

SIÇANDAKİ TAM KAT DOKU KAYBI MODELİNDE, KOMPOZİT
MİYOKUTANÖZ GREFT VE VEGF GENİ TRANSFEKTE EDİLMİŞ
YAĞ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KOMBİNE
KULLANIMININ GREFT ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Hüseyin GERÇEK

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Tonguç İŞKEN

Anabilim Dalı Başkanı: Doç. Dr. Hakan AĞIR

Etik Kurul Onayı: KOÜ HAYDEK 10/1-2013 22.10.2013

2014

TEŞEKKÜR

Klinik ve cerrahi deneyimi sayesinde bana mesleğim konusunda bir çok şey kazandıran Anabilim Dalı Başkanımız **Sayın Doç.Dr.Hakan Ağır'a**,

2008'de başlayıp 2014'te sona eren uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden defalarca yararlandığım, tez danışmanım olarak tezimin hazırlanmasında çok büyük emeği olan **Sayın Doç.Dr.Tonguç İşken'e**,

Tezimin tüm aşamalarında yardımlarını benden esirgemeyen **Sayın Doç.Dr.Şahin Alagöz ve Sayın Doç.Dr.Çiğdem Ünal'a**,

Tezime kök hücre uygulamaları konusunda değerli katkıları olan **Sayın Prof.Dr.Erdal Karaöz ve Bio.Büşra Öncel Duman'a**,

Tezimin histopatolojik incelemeler bölümüne özverili çalışmalarıyla katkıda bulunan Patoloji Anabilim Dalı'ndan **Sayın Prof.Dr.Bahar Müezzinoğlu'na ve Arş.Gör.Dr.Gül Özbek'e**,

Tezimin istatistik ve yazım aşamalarında yardımlarını esirgemeyen **Uzm.Dr.Erkal Erzincan'a**,

Zorlu ve yıpratıcı bir süreç olan uzmanlık eğitimini sürekli desteği ile katlanabilir kılan ve her günüme ayrı bir renk katansesvgili eşim **Zühre'ye** ,

Hayatımdaki tüm sıkıntılara karşı her zaman bana destek olan, bir işi başarabileceğimden bir an olsun şüphe etmeyen **annem, babam ve kardeşime**,

Uzmanlık eğitimim boyunca, birlikte büyük özveri ile nice zorluklar içinde çalıştığımız anabilim dalındaki değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

teşekkürü bir borç bilirim.

Saygılarımla.

Dr.Hüseyin Gerçek

1 DİZİNLER

1	DİZİNLER	II
1.1.	SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IV
1.2.	TABLolar DİZİNİ	V
1.3.	ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
2.	AMAÇ VE KAPSAM.....	1
3.	GENEL BİLGİLER	3
3.1.	DERİ ANATOMİSİ	4
3.1.1	DERİ KALINLIĞI.....	6
3.2.	YARA İYİLEŞMESİ	6
3.2.1	İNFLAMASYON SAFHASI.....	7
3.2.2.	PROLİFERASYON SAFHASI	9
3.2.2.	REMODELİNG SAFHASI.....	11
3.3.	DERİ GREFTLERİ	12
3.3.1.	GREFT TANIMI.....	12
3.3.2.	GREFT TARİHÇESİ	15
3.3.3.	YARA ZEMİNİNİN GREFTLENMEYE HAZIRLANMASI.....	17
3.3.4.	DONÖR ALANLAR	18
3.3.5.	DERİ GREFTİNİN ALICI ALANA TUTUNMASI.....	19
3.4.	KOMPOZİT GREFTLER	25
3.5.	KÖK HÜCRE.....	26
3.5.1.	KÖK HÜCRE TANIMI.....	26
3.5.2.	KÖK HÜCRENİN PLASTİK CERRAHİDE KULLANIMI	28

3.5.3. CELL SHEET TEKNOLOJİSİ	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM	33
4.1. DENEKLER	33
4.2. GRUPLAR	34
4.3. İŞLEMLER	34
4.3.1. ANESTEZİ UYGULAMASI.....	34
4.3.2. KÖK HÜCRELERİN HAZIRLANMASI	35
4.3.3. CERRAHİ İŞLEMLER.....	40
4.3.4. FOTOĞRAF ÇEKİMİ	45
4.4. DEĞERLENDİRME	46
4.4.1. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME	46
4.4.2. MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRME	47
4.4.3. İŞARETLİ KÖK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	48
4.4.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	49
5. BULGULAR.....	49
5.1. MAKROSKOPİK BULGULAR.....	49
5.2. MİKROSKOPİK BULGULAR	56
5.3. İŞARETLİ KÖK HÜCRELERE AİT BULGULAR.....	59
5.4. İSTATİSTİKSEL BULGULAR.....	61
6. TARTIŞMA	65
7. SONUÇLAR	73
8. ÖZET.....	74
9. ABSTRACT.....	75
10. KAYNAKLAR	76

1.1. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

KKDG: Kısmi kalınlıkta deri grefti

TKDG: Tam kalınlıkta deri grefti

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

YDKKH: Yağ doku kaynaklı kök hücre

VEGFTE-YDKKH: VEGF geni transfekte edilmiş yağ doku kaynaklı kök hücre

ESM: Ekstraselüler matriks

PIPAAm: Polimer poli-N-isopropylacrilamide

GAA: Genel anestezi altında

i.p.: İntraperitoneal

p.o.: Postoperatif

HBSS: Hank's balanced salt solution

L-DMEM: L-Dulbecco'smodified Eagle medium

PBS: Phosphate buffered saline

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

İFB: İmmunfloresan boyama

P: Pasaj

1.2. TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Grupların dağılımı	34
Tablo 2: Sıçanların çalışma öncesi ağırlık dağılımları.....	50
Tablo 3: Postoperatif 0.gün alan ölçümleri	55
Tablo 4: Postoperatif 14.gün alan ölçümleri	55
Tablo 5: Postoperatif 21. gün alan ölçümleri	55
Tablo 6: Postoperatif 28.gün alan ölçümleri	56
Tablo 7: Grup 1 (Kontrol) mikroskopik inceleme verileri.....	57
Tablo 8: Grup 2 (Medium) mikroskopik inceleme verileri.....	57
Tablo 9: Grup 3 (Enjeksiyon) mikroskopik inceleme verileri	58
Tablo 10: Grup 4 (Cell sheet) mikroskopik inceleme verileri	58

1.3. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: YDKKH'lerinin faz-kontrast mikroskopik görünüşleri	36
Şekil 2: YDKKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immunofenotipik özellikleri.....	37
Şekil 3: Doku kaybı ve kompozit greft oluşturulması	40
Şekil 4: Kompozit greftin 180 ⁰ döndürülerek tespitlenmesi	41
Şekil 5: Tie-over pansuman uygulaması	41
Şekil 6: Taşıyıcı medium solüsyonu enjeksiyonu	42
Şekil 7: Kök hücre enjeksiyonu uygulaması	43
Şekil 8: Cell sheet uygulaması	44
Şekil 9: Karanlıkta standart fotoğraf çekim düzeneği.....	45
Şekil 10: Image J programında birimlerin mm olarak ayarlanması	46
Şekil 11: Image J programı ile alan ölçümü.....	47
Şekil 12: Grup 1 (K) zamana göre alan değişimi	51
Şekil 13: Grup 2 (M) zamana göre alan değişimi	52
Şekil 14: Grup 3 (E) zamana göre alan değişimi	53
Şekil 15: Grup 4 (C) zamana göre alan değişimi	54
Şekil 16: YDKKH'lerin GFP ve CD31 ile gösterilmesi	59

Şekil 17: YDKKH'lerin GFP ve IL6 ile gösterilmesi.....	60
Şekil 18: YDKKH'lerin GFP ve TGFβ1 ile gösterilmesi	61
Şekil 19: 0. gün alanların gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi.....	62
Şekil 20: 14. gün alanların gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi.....	62
Şekil 21: 21. gün alanların gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi.....	63
Şekil 22: 28. gün alanların gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi.....	63
Şekil 23: Greft içerisindeki damar sayısının gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi.....	64
Şekil 24: Normal deri içerisindeki damar sayısının gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi.....	64



2. AMAÇ VE KAPSAM

Greftler ve flepler plastik cerrahide en sık tercih edilen onarım yöntemleridir. Aralarındaki temel farklılık fleplerin kendine ait bir besleyici damar ağı olması, ancak greftlerin kendine ait bir besleyici damar ağı bulunmaması ve sadece difüzyon ile beslenmesidir. Bundan dolayıdır ki greftler uygulandıkları yeni alanlarda adaptasyon için neovaskülarizasyona ihtiyaç duyarlar. Deri, sinir, tendon, yağ, kemik, kıkırdak gibi birçok doku greft olarak kullanılabilir ve içerdiği dokuya göre greftler isimlendirilir.

Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi ameliyatlarında açık yaraların, deri grefti ile onarımı, sıklıkla kullanılan cerrahi seçenekler arasında yer almaktadır. Sıkça kullanılmakta olan bu yöntem aynı zamanda yapılan araştırmalar için de popüler bir konu oluşturmaktadır. PubMed'te "deri grefti (skin graft)" anahtar sözcükleri ile tarama yaparsak (26.10.2013 tarihi itibarı ile) 51941 sonuç karşımıza çıkmaktadır.

Travma sonrası oluşan açık yaralar, yanıklar, onkolojik kitlelerin cerrahisi sonrası oluşan yaralar, kontraktür açılması sonrası; sindaktili ve vajinal agenezi gibi konjenital anomalilerin onarımı; vitiligo, memebaşı-areola rekonstrüksiyonu; saç ve kaş ekimi deri greftlerinin kullanım alanlarından bazılarıdır.

Greftler birden fazla çeşitli dokuyu aynı anda barındırabilirler ve bu greftler kompozit greftler olarak isimlendirilirler.

Deri greftleri, alınan deri kalınlığına göre kısmi kalınlıkta deri greftleri(KKDG) ve tam kalınlıkta deri greftleri (TKDG) olmak üzere ikiye ayrılır. Birçok cerrahi uygulamada kullanılan greftler, KKDG'leridir. KKDG'leri saçlı deri dahil vücudun bütün bölgelerinden kolaylıkla alınabilir. KKDG alımı sonrasında sağlıklı bireylerde donör saha zamanla spontan olarak iyileşir. Epitelizasyon sonrasında donör alandan tekrar greft alınabilir, bu da çok geniş yaraların kapatılmasına olanak tanır.

Greft kullanılarak yapılan ameliyatlarda greftin yaşamı, cerrahi müdahalenin başarısını belirler.

Greft alımı esnasında greftlerde küçülme olması primer kontraksiyon olarak isimlendirilmektedir. Greftler adapte edildikleri alanda da kontrakte olmaya devam ederler ve bu olay da sekonder kontraksiyon olarak isimlendirilir.

Cerrahi başarı sağlanmış hastalarda dahi kontraksiyonlar oluşabilmekte ve hastaların yaşam kalitesini etkileyebilmektedir.

Corps yaptığı bir çalışmada greftin nisbi kalınlığının total kalınlığına göre sekonder kontraksiyonda daha etkin olduğunu öne sürmüştü, greftin içerdiği dermis kalınlığının greftin yaşayabilirliğini ve kontraktür oranını belirlediğini savunmuştur(1).

KKDG'leri, TKDG'lerine göre daha sık kullanıldıkları ve TKDG'lerine göre daha fazla kontrakte oldukları için KKDĞ uygulaması sonrasında kontraksiyona bağlı problemler daha sık karşımıza çıkmaktadır.

Kontraksiyon ile karşılaşmamak için kullanılacak deri greftinin kalınlığı ve seçilecek donör saha dikkatli planlanmalıdır.

Kompozit greftler ise sağ kalım oranlarındaki çekinceler ve küçük alanlarda kullanılabilmeleri nedeniyle daha ziyade burun, kulak ve meme başı onarımlarında sınırlı olarak kullanım şansı bulmaktadır.

Kök hücreler, teknolojik gelişmeler ışığında bilim dünyasında popülerite kazanmış ve her yıl yüzlerce yeni çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir. Günümüzde, doku mühendisliğindeki kullanımlarına ve hücre bazlı tedavilere ek olarak farklı birçok sistemik ve lokal hastalıkların tedavisinde de kök hücreler kullanılmaktadır.

Literatürde plastik cerrahi onarımlarında kök hücre kullanımı ile ilgili farklı makaleler mevcuttur. Zheng ve arkadaşları yaptıkları çalışmada VEGF geni transfekte edilmiş mezenkimal kök hücrelerin iskemik fleplerde neovaskularizasyonu arttırdığını göstermişlerdir(2). Uysal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise adipoz doku kökenli kök hücrelerin random paternli cilt fleplerinin viabilitesini arttırdığını gösterilmiştir(3).

Çalışmamızı planlarken klinik pratikte sıkça kullandığımız bir yöntem olan deri greftleri ile onarımın, cerrahi olarak başarılı sayılabilmesinin en temel koşulu olan greft yaşayabilirliği üzerinden yola çıktık. Yaşayabilirlik oranları düşük olan ve bu yüzden sınırlı alanlarda kullanım şansı bulan kompozit greftlerin yaşayabilirliğini arttırmayı hedefleyerek çalışmamızı planladık.

Çalışmamızda VEGFTE-YDKKH'lerin, neovaskularizasyonu artırıcı etkisinden faydalanarak, kompozit greft yaşayabilirliğine olan etkilerini araştırdık. Sıçanlarda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın iki adet deney grubunda VEGFTE-YDKKH'ler farklı yöntemler ile kullanıldı. Elde edilen sonuçlar makroskopik, histopatolojik ve VEGF işaretli kök hücrelerin izlenmesini içeren parametrelerle değerlendirildi.

Kök hücre uygulaması sonrası yeni damar oluşumunun ve greft yaşayabilirliğinin artacağı, ayrıca greft dokusunun dermal kalınlığının korunarak kontraksiyonun azalacağı düşünüldü. Elde edilecek olumlu sonuçların klinik pratiğe uyarlanması ile özellikle çoklu travma ve yanık gibi geniş yaralanmalarda, çocuklar gibi fonksiyonel ve kozmetik sonuçların daha da önemli olduğu hasta gruplarında, faydalı olabileceği düşünüldü. Olası etkilerin öncelikle deneysel olarak sıçanlarda gösterilmesi, sonrasında da klinik çalışmalara geçişi planlandı.

Çalışmamızda kombine olarak uygulanan kompozit kas-deri grefti ve VEGFTE-YDKKH'lerin greft yaşayabilirliğine etkisi değerlendirilecek, postoperatif dönemdeki etkileri tartışılacaktır.

3. GENEL BİLGİLER

İnsan var olduğundan bu yana “yara” kavramı da varlığını sürdürmüştür. Eski yıllarda hastalıklar ve yaralanmalar milyonlarca insanın ölümüne yol açmış, sonrasında gelişen koruyucu hekimlik ile bu ölümler bir miktar azalmıştır. Günümüzde sanayinin gelişmesi ile beraber artan kazalar, savaşlarda oluşan yaralanmalar ve bir çok etkenin değişmesi sonrasında artan tümörler, yara ve yara tedavileri kavramlarını tekrar popüler hale getirmiştir.

Yapılan araştırmalar göstermiştir ki yaralar, epitelizasyon ve kontraksiyon mekanizmaları ile iyileşmektedir(4). Bu yzden vucudumuzu yaralanmalardan koruyan en önemli bariyer olan ve deri greftlerinin kaynağını oluşturan derinin anatomisinden bahsetmek yerinde olacaktır.

3.1. DERİ ANATOMİSİ

Vucudumuzun en geniş organı olan deri, tüm vucudumuzu bir kalkan gibi çepeçevre sarmaktadır. Vucudumuzu dış etkenlerden korumasının yanı sıra karbonhidrat ve yağ deposu olarak işlev görmekte, ısı regülasyonu da sağlamaktadır.

İnsan derisi; epidermis, dermis ve subkutan doku tabakalarından oluşmaktadır. Derinin tabakaları ektoderm, nöroektoderm ve mezodermden farklılaşmaktadır. Dıştan içe doğru değinecek olursak en dışta yer alan epidermis, piloerektör ünite(kıl ve sebese bezler), ektrin ter bezleri ve tırnaklar ektodermden köken almaktadır. Melanositler, sinir dokusu ve nöroreseptörler nöroektodermden gelişmektedir. En iç tabakada yer alan kollajen, elastin, retikülin, kas dokusu, yağ dokusu ve kan damarları ise mezodermden köken almaktadır.

Keratinositler, melanositler, Merkel ve Langerhans hücreleri epidermiste yer almaktadır.

Keratinositler farklılaşma ve yerleşimlerine göre beş grupta incelenmektedir. Bunlar:

1.Stratum bazale; tek tabaka halinde dizilmiş bazofilik, kolumnar hücreler içermektedir. Melatonin içerikleri yüksektir.

2.Stratum spinozum; desmozomlardan oluşan, mikroskop altında diken şeklinde görünüme sahip bağlantılarla hücrelerin birbirine bağlandığı tabakadır. Stratum bazale ile birlikte stratum germinativum olarak isimlendirilmektedir.

3.Stratum granulosum; keratohiyalin granülleri içeren bazofilik, düzleşmiş hücreler içermektedir.

4.Stratum lusidum; şeffaf bir görünüme sahip refraktil anükleer hücreler içermektedir.

5.Stratum korneum; filament matriks kompleksini oluşturan tonofilamentleri içeren, hücre membranlarının kalınlaştığı, nükleus ve diğer hücre elemanlarının bulunmadığı tabakadır.

Stratum bazale ve stratum spinozum tabakalarının rejenerasyon yeteneği vardır ve epidermisin yenilenmesi bu iki tabaka sayesinde olur. Yüzeye doğru çıkıldıkça hücresel organeller azalmakta, desmozom ve tonofilamentler artmakta, nükleuslar belirginliğini yitirmektedir.

Dermis, papiller tabaka ve retiküler tabakalar olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Papiller dermis az miktarda ve gevşek organize olmuş kollajen, elastik lifler, retiküler lifler ve kapiller ağlar içermektedir. Retiküler tabaka ise dallanan kaba kollajen liflerinden oluşmuş olup, deriye güç ve desteklik kazandırmaktadır. Dermiste ağırlıklı olarak bulunan fibroblastların, nöral ve vasküler yapıların yanısıra Langerhans hücreleri ve melanositler de bu tabakada bulunmaktadır.

Denditik nöral krestten kaynaklanan ve bazal tabakanın özelleşmiş hücreleri olan melanositler, keratinositleri melanin ile beslemekte böylece ultraviyole ışığa karşı bir bariyer oluşturmaktadır. Langerhans hücrelerinin fonksiyonları tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte antijen tanıma yeteneğine sahip oldukları ve allerjik kontak dermatitte oluşan yanıtta sorumlu oldukları düşünülmektedir. Langerhans hücrelerinin allogreft rejeksiyonundan da sorumlu olduğu gösterilmiştir(5).

Dermisin altında yağlı bir tabaka olan hipodermis (panniculus adiposus) yer almaktadır. Dermis ve ciltaltı yağ dokusunun birleştiği yer düzensiz sınırlara sahiptir. Kolumna adipoza olarak isimlendirilen yağ sütunları dermis içerisine doğru girintiler oluşturmaktadır.

Sıçanlarda insanlardan farklı olarak panniculus adiposus tabakasının altında panniculus carnosus olarak isimlendirilen çizgili kas tabakası bulunmaktadır. İnsanlarda panniculus carnosus tabakasının boyunda platisma kası, elde palmaris brevis kası ve skrotumda dartos kası gibi karşılıkları vardır. Sıçan vücudunda da panniculus kası farklı vücut alanlarında farklı kalınlıklarda bulunmaktadır.

Kollajen lif demetleri de hipodermis içerisine uzanımlar göstererek yağ lobüllerini birbirinden ayıran retinakulum kutisi oluşturmaktadır. Ter bezleri yağ tabakası ile dermal kollajen bantların arasında yer almaktadır. Ter bezleri genellikle kıl foliküllerinden daha derine yerleşim göstermektedir. Ancak erkeklerin yüzlerinde kıl folikülleri, dermisin hemen altında yer alarak bu anatomide farklılık görülmesine yol açmaktadır. Kutanöz tabakanın zarar gördüğü yanık, travma, dermabrazyon gibi durumlarda, epitelizasyon dermis ile ciltaltı yağ dokusu arasında yerleşmiş olan bu epidermal uzantılar sayesinde oluşmaktadır.

3.1.1 DERİ KALINLIĞI

İnsan vücudunda bölgelere göre deri kalınlığında farklılıklar mevcuttur. Gövde, avuç içi ve ayak tabanında deri çok kalındır. Göz kapakları, kulak arkası ve genital bölgelerde ise deri çok incedir. Anatomik bölgeye bakmaksızın erkeklerin derisi kadınlara göre daha kalındır. Çocuklarda deri çok ince olup yaş ilerledikçe dördüncü ve beşinci dekata kadar derinin kalınlaştığı, bundan sonra tekrar incelendiği izlenmektedir. Deri grefti alınırken bu ayrıntılar akılda tutulmalı ve greft donör sahasının konulacak bölgeye benzer özelliklerde deri kalınlığı içermesine özen gösterilmelidir.

3.2. YARA İYİLEŞMESİ

Yaralanma, farklı basamaklar içeren yara iyileşme sürecini başlatarak doku bütünlüğünün oluşmasını sağlamaktadır. Postnatal memelilerde yara iyileşmesi, kemik ve karaciğerin bazı koşullardaki iyileşmesi hariç nedbe ve fibrozis oluşması ile sonuçlanmaktadır. Ancak fetal cilt nedbe oluşmaksızın, dermis ve epidermisin yapısal bütünlüğü korunarak iyileşir.

Yara iyileşme süreci inflamasyon, proliferasyon ve remodeling safhalarından oluşmaktadır. Bu içiçe geçmiş safhalar ahenk ile cilt bütünlüğünün onarılması için çalışmaktadır. İnflamatuar safha esnasında hemostaz oluşmakta ve akut inflamatuvar süreç başlamaktadır. Proliferasyon safhası ise fibroplazi, granülasyon, kontraksiyon ve epitelizasyon ile karakterizedir. Son safha olan remodeling safhasında da nedbe dokusu olgunlaşmaktadır.

3.2.1 İNFLAMASYON SAFHASI

Yara oluşmasını takiben, çok hızlı bir şekilde yara iyileşme süreci başlamaktadır. İnflamasyon safhasında önce yaralanan damarlar vazokonstrükte olmaktadır. Hemostatik tıkaç oluşmakta, koagulasyon ve kompleman süreçleri aktive olmakta, intrensek ve ekstrensek mekanizmalar devreye girmektedir. Fibrin pıhtısı oluşması sonrasında, yara içerisinde trombüs oluşumu ile hemostaz süreci tamamlanmaktadır.

Trombositlerin degranülasyonu sonrasında, inflamatuvar hücreler, lokal fibroblastlar ve endotelial hücreler için aktivasyon faktörleri ile vazokonstrüktör ajanlar açığa çıkmaktadır. Hemostaz sonrasında koagulasyon ve kompleman süreçlerine bağlı olarak damarlarda vazodilatasyon oluşmaktadır.

Bölgeye gelen inflamatuvar hücreler çoğunlukla nötrofillerdir. Nötrofiller hücrel atıklar, yabancı materyaller ve bakterilere saldırarak katkıda bulunmaktadır. Aktif kompleman süreci opsonizasyon ile bakterilerin ölümüne yardımcı olmaktadır. Nötrofillerin sayıları temiz cerrahi yaralarda, kontamine veya enfekte yaralara göre daha azdır. İki ila üç gün içerisinde bölgedeki inflamatuvar hücrelerin popülasyonu monosit hakimiyetine doğru değişim göstermektedir. Dolaşan monositler yara bölgesine gelmekte ve makrofajlara farklılaşmaktadır. Makrofajlar ve doku makrofajları, fagositozun yanısıra çeşitli büyüme faktörleri salgılayarak yara iyileşme sürecine dahil olmaktadır. Büyüme faktörleri lokal endotelial hücreler, fibroblastlar ve keratinositlerin onarım özelliklerini ortaya çıkarmaktadır.

Büyüme faktörleri fokal olarak etkili, yara yatağındaki aktif olan farklı hücrelerden salınan polipeptidlerdir. Hedef hücrelerde, otokrin veya parakrin yollardan gen ekspresyonunu uyarmakta veya inhibe etmektedir. Genel olarak büyüme faktörleri yeni hücre oluşumunu ve yara bölgesine başka hücrelerin göçünü artırmaktadır. Büyüme faktörleri birçok farklı isoformda bulunabilir ve farklı ligandlara bağlanarak hedef hücrelerde farklı etkiler oluşturabilmektedir. Ligandlara ilaveten büyüme faktörleri farklı birçok sinyal reseptörü sayesinde hedef hücrelerde düzenleyici etkilerini göstermektedir.

Platelet derive büyüme faktörü (PDGF): Başlıca, yaralanmanın erken döneminde trombositlerdeki α granüllerinden salınmaktadır. Makrofajlar, endotelial hücreler ve fibroblastlar da PDGF salgılayabilmektedir. Yara bölgesine nötrofil, makrofaj ve fibroblast göçünü artırmasına ilaveten güçlü mitojen özellikler içermektedir. ESM sentezini kollajen harici yapıları(glikozaminoglikanlar, adezyon proteinleri vb.) artırarak yapmaktadır. Remodeling safhasında fibroblastlardan kollajenaz salınmasını sağlamaktadır. Granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırdığı için kapanmayan diyabetik yara tedavisinde kullanılmaktadır(4).

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β): Kollajen sentezini direk olarak artırmakta ve ESM yıkımını azaltmaktadır. Onarımı etkilemesi sonrasında fibrozis oluşumunu tetiklemektedir. Kollajen, elastin ve glikozaminoglikan sentezini artırmaktadır. Matriks metalloproteinazı azaltmakta ve matriks metalloproteinaz inhibitörünün etkisini artırmaktadır. Ekzojen verilmesi kalp, akciğer ve beyin gibi hayati organlarda patolojik fibrozis oluşumu ile ilişkilendirilmiştir.

Fibroblast büyüme faktörü (FGF): Farklı isoformları olan heparine bağlanan bir grup büyüme faktörünün ortak ismidir. ESM içerisinde bulunmakta ve yaralanma sonrasında aktifleşmektedir. Heparin ve glikozaminoglikan heparan sülfata bağlanabilmektedir. FGF-1 ve FGF-2 formları neovaskülarizasyonda etkilidir. FGF-7 ve FGF-10 ise epitelyal büyüme faktörü benzer etki ile epitelizasyonu artırmaktadır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF): Neovaskülarizasyon üzerine etkilidir. Parakrin olarak damar geçirgenliğinde artışa yol açmaktadır. Yara yeri gibi hipoksik koşullarda VEGF üretimi artmaktadır.

Monosit ve makrofajların sayısındaki azalma yara iyileşme sürecinin bozulmasına, yetersiz debridmana, gecikmiş fibroblast proliferasyonuna ve yetersiz anjiyogeneze yol açmaktadır. Yara iyileşmesindeki düzenleyici rolü göz önüne alırsak, normal yara iyileşmesi için en gerekli olan inflamatuvar hücre, makrofajdır(6).

3.2.2. PROLİFERASYON SAFHASI

Fibrin-platelet matriks oluşumuyla proliferatif safha başlamaktadır. Lokal fibroblastlar büyüme faktörlerinin etkisi ile aktiflenmekte ve protein sentezini artırarak hücre ayrışması için hazırlanmaktadır. Fibroblastlar proliferere oldukça, 3-5 gün içerisinde, temiz ve enfekte olmayan yaralarda, predominant hücre haline gelmektedir. Fibroblastlar, proliferasyon ve farklılaşma ile beraber ekstraselüler matriks (ESM) sentezlemektedir. Fibrin matriks, fibronektin ve hyaluronan içeren yeni matriks ile yer değiştirir, bunun sonucunda fibroblast göçü artmaktadır. Fibronektin, laminin ve tenascin, matrikste bulunan yapılardır; görevleri ise yapışmayı ve göçü kolaylaştırmaktır. Fibroblastlar arttıkça hiyalüronidaz salgılayıp matriks içerisindeki hiyalüronik asid sindirilip yerine glikozaminoglikanlar yerleştirilmektedir. Fibronektin ve glikozaminoglikanlardan oluşan yapının üzerine fibroblastlarca yeni kollajen yerleştirilmekte ve nedbe dokusu oluşumu başlamaktadır.

Cilt ve nedbe dokularında ESM oluşturan majör fibriler kollajenler Tip 1 ve Tip 3' tür. Cilt ve nedbe dokularında Tip 1 kollajen, Tip 3 kollajene oranla dört kat daha fazla bulunmaktadır. Yara iyileşmesi safhasında Tip 3 kollajen fazla olmasına karşın, olgun nedbe dokusunda Tip 3 kollajen oranı azalır ve yerini Tip 1 kollajene bırakmaktadır. Nedbe dokusundaki majör yapısal bileşen kollajendir.

Granülasyon dokusu yoğun damar ağları içeren, bol sayıda makrofaj ve fibroblastların bulunduğu, fibronektin, hiyalüronik asid ve kollajenden oluşan gevşek matrikse sahip bir dokudur. Açık yaralarda karşımıza çıkan, granülasyon dokusunun rengi, canlı kırmızı görünümündedir. Endotelyal hücre bölünmeleri ve göçü sonrasında yeni oluşan kapiller damar ağı (neovaskülarizasyon) bu görünüme yol açmaktadır. Genellikle granülasyon dokusunun görülmesi bir yaranın klinik olarak greftlenmeye uygun olduğunu işaret etmektedir. Greftlenmeye uygun yaralarda, greftlenme sonrası iyileşme zamanı kısalmaktadır. Çünkü zengin kapiller damar ağına sahip olan granülasyon dokusu grefti kabul eder ve destekler. Ancak uzun süreli (kronik) granülasyon dokusu bakteri kolonizasyonuna sebep olabileceği için greftleme öncesinde debride edilmelidir.

Kontraksiyon, çevre dokunun açık yaraya doğru büzüşmesi sürecidir. Kapalı cerrahi insizyonlarda bu süreç izlenmez. Travma, yanıklar, daha önceden cerrahi olarak kapatılmış ancak enfeksiyon sonrası tekrar açılan yaralarda kontraksiyon oluşmaktadır. Yeni bir doku oluşumu olmaksızın açık yarada dramatik bir küçülme meydana gelmektedir. Kontraksiyon sürecinin eklenmesi, sadece epitelizasyon ve nedbe oluşumu ile iyileşen yaralarda yara iyileşmesini hızlandırmaktadır. Hissiz olan nedbe dokusu da kontraksiyon ile küçülmektedir.

Hayvanlardaki yara kontraksiyonu insanlara göre daha fazladır. Özellikle bir çok memeli hayvanda bulunan panniculus carnosus kası(kas-kemik yapıları ve cilt altı yağ dokusu arasında yer alan çizgili kas) yara iyileşmesi sırasında kontraksiyon miktarını arttırmaktadır. İki fasya yaprağı arasında cilt hareketli olduğu ve sürtünme az olduğu için kontraksiyon daha fazla gelişmektedir. İnsanlarda ise gövde ve perinede vücudun diğer bölümlerine göre kontraksiyon daha fazla, ekstremitelerde ise daha azdır. Gövde ve perinede yara kapanmasının %80-90'ı sadece kontraksiyon süreci ile oluşmaktadır(7).

Kontraksiyon mekanizması tam anlaşılammakla beraber fibroblast benzeri hücreler olan miyofibroblastlar kontraksiyonda en aktif role sahiptir. Miyofibroblastlar düz kas α -aktini ve mikrofilamanlar içerirler ve bu sayede civar dokuyu yaraya doğru çekerler(4).

Kontraktür ve kontraksiyon birbirinden farklı durumlardır. Kontraktür, klinik olarak bir dokunun kısalması ve/veya distorsiyona uğraması sonrasında bir eklemin hareketinde ve/veya fonksiyonunda olan azalmayı ifade etmek için kullanılmaktadır. Kontraksiyon ise nedbenin yaraya göre boyunun azaldığını ifade etmek için kullanılmaktadır.

Yaralanmadan saatler sonra yara kenarındaki keratinositlerdeki morfolojik değişiklikler başlamaktadır. Epidermal hücre tabakası kalınlaşırken, marjinal bazal hücreler doku kaybı olan alana doğru göç etmeye başlar. Göç etmeye başlayan bu hücreler epidermal bütünlük sağlanana kadar bölünmeye başlamaz. Yara kapanması için yeni epidermal hücreler, yara kenarına yakın olan ve göç etmeyen epidermal hücreler tarafından oluşturulur.

3.2.2. REMODELİNG SAFHASI

ESM yaralı ve sağlam dokulardaki hücrelerin üzerinde oturduğu esas yapıdır. ESM dinamik bir yapı olup onarım, üretim, birikim ve yıkım süreçlerinden etkilenir. Lizil oksidaz, intermoleküler kollajeni çapraz bağlamada majör etkili enzimdir. Kollajenin çapraz bağlanması, kollajen yıkımını azaltır ve doku gerilme kuvvetini yüksek tutar. Kollajenaz, jelatinaz ve stromelizin ESM bileşenlerini yıkan matriks metalloproteinazlardır. Bu enzimler aynı zamanda karsinomların ESM'ye yayılımında aktif rol aldıkları için günümüzde popüler olmuştur. ESM'nin remodeling safhasındaki yıkım ve yapım dengesini sağlayan mekanizmalar halen araştırılmaktadır. Çünkü bu denge sayesinde normal iyileşme mümkün olur.

Erişkin ve çocuklarda yara iyileşmesi sonucunda nedbe dokusu oluşur. Nedbe dokusu epidermal uzantılar(kıl kökü, ter bezi vb.) içermez ve hiç yaralanmamış olan cilde göre çok farklı bir kollajen dizilimine sahiptir. Fibroblastlar tarafından sentezlenen yeni kollajen yaralanmanın üçüncü gününden itibaren görülmeye başlar. Kollajen matriks oluştuğunda, yara bölgesi lif yığınlarıyla yoğun bir şekilde dolar. Yara bölgesinde görülen bu yoğun kollajen lifi yığınları, sağlıklı dermal dokudaki retiküler kollajen dizilimden farklıdır.

Yara iyileşmesinin bu safhası, aylar ve yıllar sürebilmekte, sonrasında ise olgun nedbe dokusu oluşmaktadır. Erken nedbe dokusu içerdiği yoğun damar ağından dolayı kırmızı renkte görünür. Yara kapandıktan sonra, damar ağı geriler ve çok az sayıda damar bütünlüğünü korur. Aylar içerisinde kırmızılık solar ve nedbeye özgü olan pigmentasyon oluşur. Tam olgunlaşmasını tamamlamış nedbe dokusu genelde hipopigmente görünümündedir. Ancak koyu tenli hastalarda yada yaralanma sonrasında uzun süre güneş ışığına maruz kalan açık tenli hastalarda nedbe dokusu hiperpigmente olabilmektedir. Bu yüzden saçlı deri, boyun ve yüz gibi alanlarda yaralanması olan hastaların erken dönemde güneş ışığından korunmaları önerilir.

Remodeling safhasında yaralar zamanla daha güçlü bir hale gelir. Birinci haftadan sekizinci haftaya kadar olan dönemde, lizil oksidazın kollajen çapraz bağlanmasını artırması sonucunda, doku gerilme kuvvetinde hızlı bir artış izlenir. Sekizinci haftanın sonunda doku gerilme kuvvetindeki bu artış hızını keserek yavaş bir şekilde devam eder. Bu sürecin sonunda nedbe dokusu sağlam dokunun en fazla %80'i kadar bir gerilme kuvvetine sahip olabilir. Nedbe dokusu ayrıca sağlam dokuya göre daha serttir ve daha az elastiktir(6).

İzler, elektif ameliyatlarda estetik olarak kabul edilebilecek şekillerde gizlenebilmektedir. Ancak travma ve yanık gibi istenmeyen durumlarda oluşan izler estetik olarak kabul edilemez sonuçlara yol açabilmektedir.

3.3. DERİ GREFTLERİ

3.3.1. GREFT TANIMI

Greft, alındığı alan ile hiç bir bağlantısı kalmayacak şekilde tamamen ayrılıp, uygulandığı alandan herhangi bir besleyici damarı bulunmaksızın, sadece difüzyonla beslenen doku parçasıdır. Deri, sinir, tendon, yağ, kemik, kıkırdak gibi birçok doku greft olarak kullanılabilir ve içerdiği dokuya göre greft isimlendirilir.

Deri grefti, açık bir yaranın kusur yaratmaksızın primer onarılamadığı durumda tercih edilen (plastik cerrahideki onarım merdiveninde flepten önce başvuru) cerrahi seçenektir.

Bu yüzden özellikle baş ve boyun gibi görünür alanlarda uyguladığımız deri greftlerinin başarısının (geç dönemdeki renk uyumu, kalınlık, esneklik, kıllanma, büyüme, kontraksiyon vb.) en üst düzeyde olabilmesi için greft biyolojisi iyi bilinmelidir.

Greft uygulaması bir nevi transplantasyondur. Greftin adaptasyonu için greftin beslenmesi, drenajı ve inervasyonu yeniden sağlanmalıdır. Deri greftlerin postoperatif 5.-7.günde revaskülarize olduğu gözlenmiştir. Greft vaskülarize olduktan sonra maturasyon süreci 6 -12 ay boyunca devam etmektedir.

Deri grefti genellikle onarım uygulanacak kişiden alınır ve alınan greft otojen deri grefti olarak isimlendirilir. Alınan kaynağa göre diğer deri greftlerinde (homogreft, heterogreft ve xenogreft) immunolojik nedenlerden dolayı başarı kısıtlıdır. Otojen greftlerin dışındaki greftler özellikle geniş doku kaybı olan (yanık, travma vb.) geçici doku örtüsü görevi görmektedir.

Dermisin bir kısmını içeren greftler kısmi kalınlıkta deri grefti (KKDG), epidermis ve dermisin tamamını içeren greftler ise tam kalınlıkta deri grefti (TKDG) olarak isimlendirilmektedir. Greftlerin kalınlıklarına göre ter bezi, yağ bezi, kıl folikülü ve kapiller ağ içeriği değişmektedir. Kısmi kalınlıktaki deri greftleri de üçe ayrılmaktadır. Bunlar kalınlıklarına göre kalın, orta ve ince olarak isimlendirilmektedir. İnce KKDG, Thiersch greft olarak da isimlendirilmektedir(1, 8).

TKDG'lerde, KKDG'lerden daha az sekonder kontraksiyon görülmekte ancak greft kaybına KKDG'lere göre daha fazla rastlanmaktadır. Sekonder kontraksiyon özellikle eklem bölgeleri, elde parmak aralıkları veya göz kapağı gibi bölgelerde rekonstrüksiyon açısından ayrı bir önem arz etmektedir. Kontraksiyon ve renk uyumu olmaması kozmetik ve fonksiyonel kayıplar oluşturarak hastaların hayatını olumsuz etkilemektedir. Eklem bölgelerindeki greftlerin kontraksiyonu hastalarda hareket kısıtlılığına, alt göz kapağındaki greft kontraksiyonu ise ektropiyona yol açabilmektedir. Yüz ve göğüs bölgesindeki greftlerin kontraksiyonu ise kozmetik deformiteler oluşturabilmektedir. Hastalardaki fonksiyonel ve kozmetik kayıplar da psikolojik problemlere yol açabilmektedir.

KKDG dermatom adı verilen özel bir alet ile alınmakta ve alım işlemi esnasında donör sahada bir miktar deri ekleri sağlam bırakıldığı için donör saha reepitelize olarak iyileşmektedir. TKDG ise bistüri ile alınmaktadır ve donör saha, reepitelizasyon ile iyileşemeceği için primer olarak onarılmaktadır. TKDG tüm deri eklerini içerdiği için önceki kozmetik ve fonksiyonel özelliklerini aynen korumaktadır. Ancak KKDG bu özelliklerini kalınlık azaldıkça kaybetmektedir. KKDG kıl içermez ve terlemez. KKDG zamanla kontrakte olur ve rengi koyulaşır (hiperpigmentasyon). Fleplere ve TKDG'ne nazaran kozmetik sonuçları daha kötüdür. Ancak tutma şansının daha yüksek oluşu ve geniş yüzeyleri örtebilmesi KKDG'nin avantajlarıdır. TKDG ise tuttuktan sonra travmaya karşı daha dayanıklıdır(1, 8).

Greftlemede başarı sağlamak için greftin ciltaltı dokuyu içermemesi, ebatlarının konulacağı alana eşit olması, fazla gergin veya buruşuk olmamasına dikkat edilmesi gerekmektedir. Alıcı bölgede de greftin beslenmesini engelleyecek enfeksiyon, radyoterapiye maruziyet, yetersiz hemostaz, yoğun skar dokusu gibi problemler bulunmamalıdır. Deri grefti altındaki yatağa tam temas etmeli ve postoperatif dönemde yerinden oynatılmamalıdır. Bunun için öncelikle greft civar dokulara tespit edilmeli, sonra özellikle ekstremitelerde baskılı pansuman ve sargı ile desteklenmelidir. Riskli alanlarda (zeminin düzensiz olduğu alanlarda; pansumanın tespitlenmesinin zor olduğu burun tipi, intraoral bölge, saçlı deri gibi bölgelerde ve hematom ihtimalinin yüksek olduğu alanlarda) "tie-over" pansuman uygulaması önerilmektedir. Uygun alanlarda vakum destekli pansuman ile kapama da kullanılabilir(1, 8).

Greftlerin delinip file haline getirilmesine "mesh" ismi verilmektedir. Mesh greftler özellikle deri greftinin genişletilmesi gerektiği ve büyük yanıklarda olduğu gibi yeterli deri bulunmadığı durumlarda kullanılmaktadır.

Çok girintili çıkıntılı bir alanın greftle örtülmesi gerektiği durumlarda da mesh greftler kullanılabilir.

Mesh greftler, özellikle genişletilmiş olanlar, postoperatif dönemde önemli dezavantajlara sahiptir. Genişletilmiş greftin genişleme bölgeleri epitelizasyon ile iyileşir ve ciddi yara kontraksiyonu gelişir. Drenaja izin verdiği için mesh greftler bazı durumlarda tercih edilebilmektedir. Ancak mesh yapmayı gerektirecek kadar sekresyonu olan yaranın greftlenmek için uygun olmayabileceği ve drenajı durdurmak için tedavi sonrasında greft işleminin uygulanabileceği akıldan çıkarılmamalıdır. Greftin mesh edilmesi hematoma nedeniyle greft kaybını engellemeyebilmektedir. Özel durumlar haricinde mesh greftlerin eklem alanları veya el sırtında kullanılması önerilmemektedir(1, 8).

3.3.2. GREFT TARİHÇESİ

İlk başarılı greft 1804 yılında Baronio adında bir İtalyan tarafından bir kuzuda yapılmıştır. İlk kez otolog deri grefti kullanımı ise 1869 yılında Paris'te Jacques Reverdin isimli bir tıp öğrencisi tarafından 2-3 mm kalınlıkta bir deri grefti kullanılarak başarılmıştır. Greft kendi yaşamasa da yara iyileşmesini hızlandırmıştır. Reverdin'in bu başarısından sonra Avrupa'da deri grefti uygulaması popüler olmuştur. Bütün yaralar greft ile kapatılmaya başlanmış, farklı donör alanlar keşfedilmiştir. Ancak greft uygulamaları beklenen başarıyı sağlamayınca, zamanla deri greftleri popülerliğini yitirmiştir.

1871 yılında ilk başarılı tam kalınlıkta deri grefti George Lawson tarafından uygulanmıştır. 1872'de ilk defa, orta kalınlıkta bir deri greftiyle 8 cm²'lik açık yara Louis Ollier tarafından kapatılmıştır. Carl Thiersch ilk defa ince epidermal deri grefti uygulamasını ve donör alanın sorunsuz iyileşmesini tariflemiştir. Ayrıca Thiersch ilk defa alıcı yatakta granülasyon sağlandığı takdirde daha iyi bir iyileşmenin olacağını ifade etti ve 'greft alımı' ifadesini literatüre soktu.

Greft uygulaması 19. yüzyılda cerrahlar tarafından çok da kabul görmemiştir. Sonuçlar çok başarılı olamıyor, greft alım işlemi teknik zorluklar barındırıyor ve bir yerine iki ayrı yara yeriyle uğraşılmak zorunda kalınıyordu. Otto Lanz tarafından bu sorunları çözmek için mesh greft geliştirilmiştir, üzerinde delikler açılmış deri grefti genişlemiş, hem donör alanı hem de verici alanı kapamakta kullanılabilmiştir. İlerleyen yıllar içerisinde kimi cerrahlar Thiersch'in tekniğinden uzaklaşarak, Reverdin tarafından pinch greft olarak tariflenen ve küçük parçalar halinde greftleme tekniğini uygulamaya başlamışlardır.

1929 yılında Vilray Papin Blair ve James Barret Brown kendi tekniklerini tanımlamışlar ve başarılı bir şekilde kısmi kalınlıkta deri greftini uygulamışlardır. Vilray Papin Blair ve James Barret Brown kısmi kalınlıkta, tam kalınlıkta ve orta kalınlıkta epidermal greftleri tanımlamışlardır. Her birinin avantaj ve dezavantajlarını ortaya koyarak, alıcı yatağın hazırlanması işlemi, greftin alınması, greftin yerleştirilmesi, kontrendikasyonlar ve postoperatif bakımın nasıl olması gerektiğini tanımlamışlardır. Vilray Papin Blair ve James Barret Brown greft alımı sonrasında donör alanda iyileşme sorunlarıyla ilgili yanlış algıları gidererek deri greftleriyle ilgili bugüne kadar gelen temel prensipleri tanımlamışlardır.

Greftler genellikle ustura veya sapsız uzun bıçaklarla alındığı içingreft uygulaması özensiz yapılan ve teknik zorluklar barındıran bir işlem olmaya devam etmiştir. Bu sorunları gidermek üzere greft alımını daha kolay hale getiren uygun araçların arayışı süreci başlamıştır. İlk olarak Humby 1936'da greft alımı için özel bir cihaz geliştirdi. Humby, bıçağa usturayla beraber bir koruma eklemiş, bu koruma sayesinde greft alımı sırasında derin dokuların hasarlanması engellenmiştir. Humby'nin hızlı ve güvenilir greft alımını sağlayan cihazı yine de greft kalınlığında hassas kontrol sağlayamamıştır.

Kont Padget isimli Amerikalı bir cerrah 1939'da, Hood isimli bir mühendisle birlikte çalışarak, greft kalınlığının daha özellikli olarak ayarlanabildiği bir dermatom geliştirmiştir. Bundan 6 yıl sonra James Barrett Brown ilk motorlu dermatomu tanıtmıştır. Bu üç farklı cihaz (dermatom) da günümüzde hala kullanılmaktadır, ancak en popüler olup yaygın kullanılanı, motorlu dermatomdur. Günümüzde Reverdin, Thiersch, Lanz, Blair ve Brown'un başarılı çalışmaları sonucu artık cerrahlar daha güvenle greft alabilmektedir.

3.3.3. YARA ZEMİNİNİN GREFTLENMEYE HAZIRLANMASI

Her ne kadar deri grefti almak önemli derecede tecrübe gerektiriyor olsa da, iyi hazırlanmamış yara yatağına konulan bir greft de başarısızlık nedeni olabilir. Tüm deri greftleri sadece yara yatağından difüzyonla beslenmektedir. Bu yüzden periostsuz kemik, perikondriumu olmayan kıkırdak veya paratenonsuz tendon gibi kanlanması zayıf olan dokularda deri greftleri yaşayamaz. Benzer niteliklerdeki damarlanması olmayan alanları kapatmak zorunda olan bir cerrah, ya flep gibi kendine ait kanlanması olan bir dokuyu kullanmalı ya da yara yatağını iyi kanlanan bir hale getirmelidir. Örneğin kortikal kemik granülasyon dokusu gelişimini sağlamak için debride edilebilir ve nispeten vasküler olan membranöz kemik deri greftini kabul edebilir. Kronik granülasyon dokusu da deri greftini besleyecek kadar vaskülarize olmayabilir ve tanjansiyel eksizyonu gerekebilir(1, 8).

Yaralanmanın biçimi de yaranın greftlenerek kapatılmasında etkili olabilir. Temiz bir doku hemen greftlenebilirken, parçalı veya enfekte dokular ise greftlenmeye izin vermez. Kronik yaralar iltihaptan arınmış olmalıdır. Tüm granülasyon dokuları bakteri içermektedir, ancak hepsi enfekte değildir. Her gram dokuda, kantitatif bakteriyolojide, 10^5 'den fazla mikroorganizma bulunması hemen her zaman greft kaybına sebep olur. Böylece kantitatif bakteriyoloji, cerraha yaranın grefti kabul edip etmeyeceği konusunda yardımcı olur. Fazla bakteri saptandığı durumlarda debridman, antibiyoterapi ve lokal yara bakımı ile bakteri yükünü azaltmak mümkündür. Her ameliyatta olduğu gibi yara iyileşmesini ve greftin beslenmesini etkileyecek nedenler (hastanın diyabetik olması, radyoterapi almış yara yatağı, venöz yetmezlik vb.) preoperatif dönemde gözönünde bulundurulmalıdır(1, 8).

Yara serum fizyolojik ile temizlenmeli, yaranın kuruması engellenmelidir. Cerrahi debridmanlar sonrası kanama olabilmektedir, bundan dolayı greftleme öncesi alıcı alanın hemostazı kontrol edilmelidir. Aşırı koterizasyon, "oxycel, gel-foam" gibi hemostatik maddelerin kullanımı (greft ile alıcı yatak arasında bariyer oluşturacağı için) önerilmez. Eğer elektrokoterizasyon, baskı ve bağlama ile kanama kontrolü sağlanamadı ise greftleme işleminin ertelenmesi önerilmektedir(1, 8).

3.3.4. DONÖR ALANLAR

KKDG, skalp ve ekstremiteler de dahil olmak üzere vücudun her yerinden alınabilir. KKDG alınması sonrasında nedbe oluştuğu için donör sahanın giysilerle kolayca saklanabileceği (kalça, uyluk, sırt vb.) bölgelerden alınması önerilmektedir(1, 8).

Alt ekstremitte ve gövdeden alınan KKDG genel olarak yüzde kullanılmaz, çünkü bu greftler uygulandıkları alanda sarı-kahverengi renk değiştirme (hiperpigmentasyon) eğilimindedirler. Yüze konulacak KKDG' inin supraklavikuler alan veya skalpten alınması tercih edilmelidir. KKDG skalp gibi kıllı bir alandan yeterli kalınlıkta alınırsa, alıcı alanda kıl çıkmaz ve donör sahada alopesi oluşmaz. KKDG için uyluk ve baldırlar kadar sık kullanılan bir bölge de abdomendir. Atılacak derisi olan (onarım yapılamayacak durumda olan bölgeler, amputasyon planlanan ekstremiteler vb) hastalarda veya derisi büyük miktarda soyulmuş olan hastalarda mevcut deri KKDG olarak kullanılabilir(1, 8).

TKDG çoğu zaman derinin ince olduğu alanlardan alınır. TKDG için kaynak oluşturan alanlar; kulak önü, kulak arkası, el bileği fleksör yüzü, antekübital bölge, üst kol mediali, hipotenar bölge, supraklavikular bölge ve inguinal bölgedir. Yüzdeki yaraları onarmak için TKDG, sıklıkla üst göz kapağından, pre ve postaurikuler bölgelerden ve supraklavikuler bölgeden alınabilir.

Diğer TKDG verici alanları prepisyum (sünnet derisi), skrotum ve labia majoralardır. Bu alanlar koyu renkli olduğu için meme areolarısının rekonstrüksiyonunda bu alanlardan alınan greftler kullanılabilir. Parmak ucu yaralanmalarında el bileğinin fleksör yüzü veya üst koldan alınan greftler tercih edilir. Ampute olmuş dokulardan da greft alınabileceği unutulmamalıdır(1, 8).

TKDG donör sahası seçilirken dikkat edilmesi gereken bir husus da sonradan kıl çıkmasıdır. Vücudun çoğu yerinde kıl folikülleri dermisin içinde bulunduğundan, istenmeyen kıllar da transplante edilebilir. Çocuklarda, erişkin hayatta kılsız olacak alanların seçilmesine dikkat edilmelidir.

3.3.5. DERİ GREFTİNİN ALICI ALANA TUTUNMASI

Deri greftleri yeni yerine konulur konulmaz greftin beslenmesi, drenajı ve inervasyonu yeniden sağlanmalıdır. Greft yeni yatağına konduğu andan itibaren zeminden difüzyon ile beslenmeye başlar. Yeni damar oluşumunun olmadığı olmadığı ve serum imbibisyonu olarak isimlendirilen süreç başlar.

Hubscher ve Goldmann ilk olarak greftin serum ile beslenmesini tarif etmişlerdir. Bu bilginin ışığında yapılan çalışmalar sonrasında plazmatik imbibisyon dediğimiz sürecin greftin beslenmesinde ilk 48 saat boyunca etkili olduğu ortaya konmuştur(1, 8).

Greftin uygulanmasından hemen sonra, alıcı yatakta bir ağırlık artışı ve ödem artışı gözlenmektedir. Alıcı alandaki venüllerden sızan plazmanın buna yol açtığı, daha az olarak da kapiller ve arteriollerin de buna katkı sağladığı düşünülmektedir.

Zamanla plazma, alıcı alan ve greft arasındaki yatağı doldurur. Plazma içindeki fibrinojen greftin zemine yapışmasını sağlayan bir yapıştırıcı görevi görmektedir. Artan plazma greft tarafından emilir ve geçici süreyle greftin beslenmesini sağlar. Serumun içerisinde eritrositler ve polimorfonükleer lökositler bulunmaktadır ancak greft tarafından emilen sıvıda fibrin molekülleri yoktur ve bu sıvıya serum denir.

Günümüzde Converse, Uhlschmid ve Ballantyne'in tanımladığı 'serum imbibisyon fazı' terimi bu süreci tariflemek için kullanılmamaktadır. Greft alımı sonrasında greftin tüm damarlarında spazm gelişmekte ve damar içlerindeki bütün kan ve serum boşalmaktadır. Greftin alıcı yatağına konulması sonrasında greft, kesilmiş damar uçları ve poröz dermis sayesinde alttaki serumu emer. Greft ödemlenir ve boyutu artar. Greft metabolizması anaerobik bir hal alır ve greft pH'ı düşer. Greftin metabolik ihtiyaçları azalır, ATP seviyesi ve glikoz seviyesi düşer.

Anaerobik metabolik atıklar yeni damar oluşunu tetikler. Greftin ödemli hali ve anaerobik metabolizma revaskülarizasyonun sağlandığı 48. saate kadar sürer. Bu saatten sonra artık greft atık ürünleri revaskülarizasyon sayesinde boşaltabilir(1, 8).

Serum imbibisyon fazı ile birlikte, alıcı alandan greft içine doğru endotel uzanmaya başlar. Greftin yeniden damarlanması bu sayede tamamlanır. Serum imbibisyon fazı ve revaskülarizasyon, greftin alıcı yatağa konması ile hemen başlar. Bu iki faz ayrı ayrı değil, birbirinin içine geçmiş iki faz olarak düşünülebilir.

Greftin yeniden damarlanması uzun yıllardır tartışılan bir konudur. İlk olarak Bert alıcı yatakla greft arasında mikroskobik anastomozlar olduğu fikrini ortaya atmıştır. Thiersch 1874'te Bert'in söylediklerini greftlerden yaptığı histolojik kesitler sonrasında doğrulamış ve buna inoskülyasyon fazı demiştir. Bu teoriye göre alıcı yatak ile greftin kesilmiş damar sonlanmaları arasında anastomozlar oluşmaktadır. Bu anastomozlar grefte kan giriş çıkışını sağlamaktadır. İnoskülyasyon fazı greftin konulmasıyla hemen başlar ve vasküler kaynaşmalar 22. saatten itibaren görülebilir. Yapılan birçok çalışmada, greftin postoperatif 4. günde vaskülarize olduğunu ve otogreftlerde normal akımın postoperatif 29. günde oluştuğu gösterilmiştir(1, 8).

Allogreftlerde ise durum rejeksiyon fenomeni dolayısıyla farklılık göstererek, 6. güne kadar vaskülarizasyon gelişmesi ve 9. günde vaskülarizasyonun durması ile sonuçlanır.

Garre, Hubscher, Goldmann, Jungengel ve Enderlen, Bert'ten 25 yıl sonra tarifledikleri yeni teorilerinde greftlerin orijinal damarlarının dejenere olduğunu ileri sürmüşlerdir. Endotelial hücreler ve kapiller tomurcuklar grefte invaze olup, yeni kan akımını düzenlerler. Bu teoriye göre greft konur konmaz süreç başlar ve 9. saat gibi erken bir zamanda inflamatuvar hücreler grefti işgal eder. 4. günde greftin yeni dolaşımı sağlanır. Greftin eski damarsal ağı dejenere olur ve yeni oluşan damarsal ağ bütün greft boyunca alıcı yatağa bağlanır.

Greft damarlanması ile ilgili 3. bir teori daha tanımlanmıştır. Bu teoriye göre greftin vasküler yapıları dejenere olur, ancak asellüler bazal lamina damarsal ağın oluşumunu ve alıcı yatakla yeni oluşan ağı bağlantısını sağlar. Henry bu teoriyi operasyondan 48 saat sonra greft üzerinde asellüler vasküler kanalları tespit ettiği histolojik çalışmasından sonra ortaya atmıştır. Sonra bu damarsal kanallar alıcı yatağın oluşturduğu kapiller tomurcukların bağlanmasıyla endotelize olur.

Her üç teoriyi de destekleyen güçlü kanıtlar mevcuttur. Greftin revaskülarizasyonunda her üç teori de doğru olabilir. İnaskülarizasyon fazı erken dönem greft vaskülarizasyonundan sorumludur ve serum imbibisyon fazından bu yana biriken metabolik atıkların boşaltılmasını sağlamış olur. Eşzamanlı olarak, alıcı yatağa uzanmış vasküler yapılarda vasküler endotel ve kapiller tomurcuklar gelişir. Beyaz gözükten greftler revaskülarize olarak pembeleşir.

KKDG'ler daha az hücresele sahiptirler. Kalın dermis serum imbibisyon fazında difüzyonu etkileyerek bir bariyer görevi yapar. İnce dermisli greftler serum imbibisyon fazında daha uzun süre yaşabilir. Çünkü beslenmek için daha az hücresele içerirler ve difüzyon için daha kısa mesafe vardır. İnce greftlerin tutma olasılığı bu yüzden kalın greftlere göre daha yüksektir.

Revaskülarizasyonun ardından maturasyon süreci başlar. Greft vaskülarize olduktan sonra maturasyon süreci 6-12 ay boyunca devam eder. Bu süre içerisinde nedbelerde iyileşme olabilir.

Yara ve greft kontraksiyonu greft maturasyonu sırasında karşımıza çıkan en önemli olaydır. Greftlenmemiş yara kontrakte olarak zamanla iyileşir. Bu süreçten esas sorumlu hücreler miyofibroblastlardır. Fibroblast miyofibroblast dönüşümü yara daha greftlenmeden önce başlar. Miyofibroblastlar yara greftlenmiş olmasına rağmen kontraksiyona yol açarlar. Greft zamanla kontrakte olur ve yaranın boyutları küçülür. Bu süreç sekonder kontraksiyon olarak isimlendirilir.

Greft alımı sırasında meydana gelen kontraksiyon primer kontraksiyon olarak isimlendirilmektedir. Primer kontraksiyon, alınan greftin kendine has elastikiyetiyle ilişkilidir. TKDG'lerde KKDG'lere göre daha çok primer kontraksiyon görülür. Greftin alıcı yatağa konması sonrasında greft gerilerek primer kontraksiyon kolayca aşılabılır.

Sekonder kontraksiyon zaman içerisinde oluştuğu için klinik önemi daha büyüktür. Dermis miyofibroblast farklılaşmasını inhibe etmektedir. Bundan dolayı TKDG'lerde daha az sekonder kontraksiyon görülür. Corps yaptığı çalışmada greftin nisbi kalınlığının total kalınlığına göre sekonder kontraksiyonda daha etkin olduğunu öne sürmüştür. Yaptığı çalışmada, aynı kalınlıkta göğüs duvarından ve sırttan iki farklı greft alınmış ve göğüs duvarından alınan greftin daha az kontrakte olduğu görülmüştür. Çünkü normalde göğüs duvarı cildi sırttaki cilde göre çok daha incedir(1, 8).

Sekonder kontraksiyon özellikle eklem bölgeleri, elde parmak aralıkları veya göz kapağı gibi özellikli bölgelerde rekonstrüksiyon açısından ayrı bir öneme sahiptir. Bu bölgelerin rekonstrüksiyonunda, kontraksiyonu azaltmak için TKDG veya flepler ile onarım tercih edilir. Defekt çok büyükse KKDG kullanılabilir, ama o takdirde de olabildiğince kalın bir greft tercih edilmelidir.

TKDG'lerin diğer bir özelliği de büyüme yeteneğini korumasıdır. Çocuk hastalarda rekonstrüksiyonda bu yüzden özellikle TKDG'ler tercih edilir. KKDG'lerde büyüme yeteneği daha az olduğu için zamanla kontraksiyon daha da artar. Özellikle yanık çocuklarda bu daha durum daha da önemlidir.

Maturasyon fazında epidermiste aşırı derecede hiperplazi olur. 2. haftada epidermis normal greft epidermisinin 7-8 katına ulaşır. Bu durum klinik olarak kabuklanma ve soyulma olarak görülür. Greft epidermal yayılım göstererek etraftaki greftlenmeyen alanların da iyileşmesini sağlar.

Mekanizması çok iyi anlaşılamayan diğerk bir husus da hiperpigmentasyon olayıdır. Bu durum özellikle ayak ve el bölgesine konulan greftler sonrasında oluşur. Bu bölgelere greft konulurken donör alana ve greft kalınlığına daha özen gösterilmelidir. Operasyondan sonraki ilk 1 yıl güneş minimum maruziyet önerilir. Pigmentasyon genelde kalıcı olur. Dermabrazyon ve kimyasal peeling gibi yöntemler ile hiperpigmentasyon bir miktar geriletilebilir.

Greft içerisindeki sinir uçları, greft alımından sonra 30 gün içinde dejenere olmaktadır. Yeni sinir lifleri, greftin hem periferinden, hem de zemininden gelecek şekilde 40 gün içinde grefti kuşatmaktadır. Postoperatif dönemde, 2-3 ay içerisinde greft içerisindeki sinir lifleri artarak ter bezleri, saç folikülleri ve duysal endorganlara ulaşmaktadır. Bunun sonucunda donör alandaki sinir ağı yeniden kurulmakta ve duyu sıklıkla geri dönmektedir ancak bu duyu normal duyudan farklılık göstermektedir. İlk olarak ağrı duyusu geri dönmektedir ve ilk 1 yıl özellikle greft alanında ağırlı hipersensitivite gözlenebilir. Sıcaklık, dokunma ve iki nokta ayırımı ise daha geç geri dönmektedir.

Ter bezi fonksiyonları greft alımı sonrasında sıklıkla geri dönmektedir. TKDG'lerde ter bezi fonksiyonlarının KKDG'lere göre daha üstün olduğu gözlenmiştir. Ter bezleri nöral inervasyona bağılı çalışmaktadır. Bundan dolayı greftlemeden sonraki 2-3 ayda terleme görülmez. Bu süreçte kabuklanma olmaması için, greftin kurumamasına özen gösterilmeli ve nemlendirici kremler ile bölge nemlendirilmelidir. Bu süreçte greftin davranışı donör alandan ziyade alıcı yatağına benzer. Ele konulan greftlerde donör alandan bağımsız bir şekilde, duygusal uyaranlara tepki olarak terleme olabilmektedir.

KKDG'lerde kıl foliküllerinin çoğu, greft alımı sırasında zarar gördüğü için KKDG'lerde kıllanma nadirdir. TKDG'lerde kıl kökleri alım işleminden daha az zarar gördüğü için ve kılların uzama süreci devam ederek bölge donör alanın özelliğini taşımaktadır. TKDG saç ve kaş transplantasyonu için halen kullanılan bir yöntemdir.

Greftlerin konulmasının ardından, zaman zaman greftlerin tutmadığı ve kaybedildiği gözlenmektedir. Greft tutması için en önemli etken, vaskülarize ve sağlıklı bir alıcı yataktır. Bundan dolayı greft kayıplarının en sık sebebi uygunsuz alıcı yataktır. Üzerinde herhangi bir besleyici dokusu olmayan tendon, kıkırdak ve kemik gibi dokularda greft tutmaz ve bu bölgelere greft konulması önerilmez. Yağ, paratenon, perikondrium, periost kanlanması çok iyi olmayan dokulardır ve bunların üzerine konacak greftlerin de çok ince olması önerilmektedir. Alıcı yatağı daha iyi hale getirip, granülasyonu arttırmak için konservatif pansumanlar uygulanabilmektedir(1, 8).

Alıcı yatak ile greft arasında difüzyonu bozarak bariyer etkisi yaratan şeylerin varlığında greft revaskülarize olamaz. Bariyer olarak en sık kan, serum ve pürülan materyallere rastlanmaktadır. Hematom, seroma veya enfeksiyon kısmi veya total greft kaybına neden olabilmektedir. Greft altındaki birikmiş sıvıyı boşaltmak için greft üzerinde küçük kesiler yapılabilir.

Greft kaybına neden olan diğer bir durum da greftin sıyrılmasıdır. Oluşan küçük kapillerler çok hassas oldukları için ve kolaylıkla hasarlanabilmektedir. Greft pansumanı değişimi veya operasyon sonrası erken dönemde hareketle sıyrılabilir. Özellikle ekstremitelerdeki greftler çok iyi sabitlenmeli ve pansuman değişimi sırasında greftlerin sıyrılmaması için çok dikkatli olunmalıdır.

Enfeksiyon sonrasında greft altında biriken pürülan mayi nedeniyle greft kaybına oluşabilmektedir. Gram dokuda 10^5 'ten fazla bakteri içeren dokular enfekte olarak kabul edilmektedir. Ancak psödomonas gibi bazı etmenler, pürülan bir salgı olmadan çok az bir sayıda dahi greft kaybına neden olabilmektedirler. Enfeksiyon yara iyileşmesini de sınırlamaktadır. Bu yüzden sistemik enfeksiyon varlığı yara iyileşmesini kötü etkilemekte ve kısmi veya total greft kaybına neden olabilmektedir.

Sistemik veya lokal sorunlar da yara iyileşmesini olumsuz etkilemektedir. Malnutrisyon, vaskülitler, steroidler ve kemoterapötik ajanların yara iyileşmesine ve greftin tutmasına zarar verdiği gösterilmiştir. Aşırı basınç ve radyoterapi de alıcı yatağı etkileyerek greftin tutmasına engel olabilmektedir.

Greft kaybının bir diğere nedenini de teknik sebepler oluşturmaktadır. Greftin ters yerleştirilmesi, grefte çok kaba davranılması sonucunda ezilmesi, yırtılması veya dermatomun çok ısınması dolayısıyla greftin yanması nedeniyle greft kaybına rastlanılabilmektedir.

3.4. KOMPOZİT GREFTLER

Farklı doku içeriklerini bir arada bulduran greftlere kompozit greft denir. Bunlar cilt ve kıkırdak, cilt ve yağ, tam katlı dudak ve göz kapağı, free nipple, digital kompozit greftleri sayılabilir. Günümüzde en sık kulak konkasından alınan kondrokutanöz kompozit greftler farklı bölgelerin onarımında kullanılmakta ve bu sebepten ötürü kompozit greft denildiğinde ilk olarak kondrokutanöz greftler akla gelmektedir. Ancak farklı dokuların birarada kullanımı sonrasında da kompozit greftlerin oluşturulabileceği unutulmamalıdır.

Burunda, tümöral kitlelerin çıkarılması veya travma nedeniyle rekonstrüksiyonu zor defektler oluşabilir. Cilt ve kıkırdak dokularını içeren kondrokutanöz auriküler kompozit greftler, özellikle alar kanat defektlerinin rekonstrüksiyonunda 100 yıldan fazla zamandır kullanılmaktadır. 1887 yılında König ilk olarak auriküler kondrokutanöz kompozit grefti nazal rekonstrüksiyonda kullanmıştır. Bu dönemde popülerlik kazanan yöntem, doku kayıplarının sıkça görülmesi, kullanılan greftin deforme olması, kıvrılması sonucu kullanılmaktan vazgeçilmiştir.

Başarılı bir kompozit greft uygulaması için greft dolaşımı en erken dönemde sağlanmalıdır. Greftin alımı ve yerleştirilmesi sırasında atravmatik tekniklerle çalışılmalı, zorunlu olmadıkça kaba aletler kullanmamalıdır. Alıcı yatak çevresinde dolaşımı bozulmuş veya nedbeli alanlar varsa debridman uygulanıp, sağlıklı dokular ortamdaki uzaklaştırılmalıdır.

Kompozit greftlerin tam olarak nasıl beslendiği gösterilememiştir. Donör alandan ayrıldıktan sonra revaskülarize olana kadar, zayıf bir beslenmesi vardır. Bu süreçte, diğere greftlerde olduğu gibi; plazmatik imbibisyon, inoskölasyon ve revaskülarizasyon aşamalarını geçirerek greft dolaşımı sağlanır.

Kondrokutanöz greft uygulandıktan sonra başlangıçtaki ölü beyaz renk 6-24 saat içinde eritrositlerin invazyonuyla pembe renge doğru değişir, ortalama 24 saat sonra venöz konjesyon gelişir ve dolayısıyla greft siyanoze olur. Greft nekroza gitmeden yaşamaya devam ederse 3-7 gün sonra bu renk sağlıklı pembe bir renge dönüşür. Greft ilk konduğu günlerde damarlanma oluşana kadar, greftin kendi damarlarının açıklığı korunarak beslendiği varsayılır.

Günümüzde göz kapağı rekonstrüksiyonu, burun rekonstrüksiyonu, meme başı rekonstrüksiyonu için kompozit greftler kullanılmaktadır. Ancak 1cm² 'den büyük alanların onarımı için; greft kayıplarıyla karşılaşılabildiği veya geç dönemde greftlerin deforme olması dolayısıyla flepler tercih edilmektedir.

Kondrokutanöz greft sağkalımını arttırmak ve nakledilebilecek alanı arttırmak için literatürde steroid uygulamaları gibi medikal çözümler, soğuk uygulama ve hiperbarik oksijen tedavisi gibi ortama yönelik çözümler tariflenmektedir. 3 boyutlu yaraların ve özellikli alanların onarımı için, kompozit greftlerin sağkalımının artırılması klinik kullanımı arttıracaktır.

3.5. KÖK HÜCRE

3.5.1. KÖK HÜCRE TANIMI

Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahip, kendilerinden başka hücelere kaynaklık edebilen (farklılaşabilen) ve hasarlı dokuya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen hücreler olarak tanımlanmışlardır.

Farklı tiplerde hücre ailelerine farklılaşma potansiyeli barındırdıkları için günümüzde doku mühendisliği ve gen terapisi alanlarında kök hücre teknolojileri çok büyük önem kazanmıştır.

Kök hücreler elde edildiği kaynağa göre embriyonik ve erişkin kök hücreler olmak üzere iki farklı gruba ayrılabilir. Embriyonik kök hücreler, farklı dönüşüm potansiyelleri barındırması dolayısıyla avantaja sahipken, elde edilme yöntemi açısından etik sorunlar oluşturduğu için kullanımı kısıtlı kalmıştır. Diğer grubu oluşturan erişkin kök hücreler ise postnatal dokulardan elde edildiği için etik sorunların daha az olması ve immunolojik problemlere yol açmaması gibi olumlu yönlerinden ötürü daha geniş kullanım alanı bulmuştur.

Erişkin kök hücreler ilk olarak hematopoetik sistemden elde edilmiştir. 1961 yılında Moss ve ark. kas dokusundan elde edilmiş satelit hücreleri tanımlamışlardır. 1963 yılında ise Becker ve arkadaşları rejenere olabilen hücreleri tanımlamışlardır. Mc Culloch ve Till yaptıkları çalışmalar sonrasında kemik iliği mezenkimal kök hücrelerini tanımlamışlardır. 1978 yılında kordon kanındaki erişkin kök hücreler tanımlanmıştır. 1992 yılında ise nöral kök hücreler tanımlanmıştır(9).

2000'li yıllara kadar kök hücreler ile ilgili birçok çalışmada kemik iliği kök hücre kaynağı olarak kullanılmıştır. İnsanda kemik iliğindeki hücreler kabaca iki grupta incelenebilmektedir: hematopoetik kök hücreler ve destek mezenkimal stromal hücreler. Yıllar içerisinde hematopoetik kök hücreler ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve halen çalışma yapılmaya devam etmektedir. Ancak mezenkimal grup hücreler ile ilgili çalışmalar daha sınırlı kalmıştır. Mezenkimal grupların ile ilgili çalışmalar mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması ve bu hücrelerin adiposit, kondrosit, osteoblast ve miyoblasta dönüşebileceğinin tanımlanmasından sonra hız kazanmıştır(10).

Mezenkimal kök hücreler gelecekteki araştırmalar için farklı bir kulvar oluşturmuştur. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler genel veya lokal anestezi altında biopsi ile alınabilmektedir. Ancak işlemin ağırlı olması, sistemik enfeksiyon riski barındırması, elde edilen miktarın genelde az olması gibi dezavantajlara sahiptir.

Elde edilen hücreler için laboratuvar ortamında ekspansiyon işlemi uygulamasının gerekliliği ve laboratuvar işlemlerinin maliyetli olması araştırmacıları yeni arayışlara itmiştir. Deri, sindirim sistemi epiteli, diş pulpası, karaciğer dokusu ve kıl folikülleri kök hücre kaynağı olarak bazı çalışmalarda kullanılmıştır.

Vücutta benzer nitelikteki dokuların araştırılması sonrasında yağ dokunun da mezodermden köken alması, heterojen stromal hücreler içeriyor olması ve kolay ulaşılabilir olması üzerine yağ dokusundan da kök hücre elde edilebileceği fikrine ulaşılmıştır(10).

2001 yılında Zuk ve arkadaşları ilk olarak yağ dokusundan birden fazla dokuya farklılaşabilen kök hücreleri ilk kez izole etmişlerdir. Bu hücrelerin tek tip hücre olduğunu göstermişler ve yağ doku kaynaklı kök hücre (YDKKH) kavramını ortaya koymuşlardır. İlerki yıllarda bu hücrelerin kondrojenik, osteojenik, miyojenik ve adipojenik özellikleri de tanımlanmıştır. Mezoderm kökenli yapılar hariç de bu hücrelerin farklılaşabildiği (hepatosit, nöron, pankreas adacık hücresi vb.) gösterilmiştir. YDKKH'in embriyojenik kök hücreler kadar farklılaşma potansiyeli olduğu ve üç germ dizisine de farklılaşabileceği savunulmuştur(11).

Yara iyileşmesi ve dokuların rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda günümüzde YDKKH sıkça kullanılmaya devam etmektedir. Benzer konulu bir çalışmada yağ dokusunun keratinosit proliferasyonunu arttırıcı faktörler salgıladığı saptanmıştır(12).

3.5.2. KÖK HÜCRENİN PLASTİK CERRAHİDE KULLANIMI

Kök hücreler tarif edildikleri dönemden bu yana plastik cerrahi klinik kullanımında ve araştırmalarında geniş yer bulmuştur. Kemik iliğinden sonra yağ dokudan kök hücre elde edilme yöntemlerinin tanımlanması plastik cerrahide kök hücre kullanımına olan ilgiyi arttırmıştır.

Klinik çalışmalar flep ve greft gibi doku aktarımlarının sağkalımını arttırmaktan, açık yara kapatılması gibi doku iyileşmesi ve rejenerasyona kadar bir çok farklı konuda sürdürülmektedir(13).

Deneysel çalışmalar ise iskemi sonrası revaskülarizasyon, sinir ve kas dokularının rejenerasyonu gibi farklı konuları içermektedir(14).

YDKKH elde edilmesi plastik cerrahi uygulamalarından genelde iki şekilde elde edilmektedir. Abdominoplasti ve diğer şekillendirme ameliyatları sonrasında elde edilen dokulardan büyük parçalar şeklinde yağ dokusu elde edilebilmektedir. Ancak bu dokular daha sonra çok küçük parçalara ayrılarak kullanılmaktadır (mikrodiseksiyon). Eğer liposuction gibi emme yöntemleri ile yağ alımı gerçekleştirilmiş ise parçalama işlemine gerek kalmadan dokular kullanılabilir.

Kök hücrelerin elde edilmesi için alınmış olan yağ dokusu önce yıkanarak eritrosit sayısı azaltılır, daha sonra kollajenaz enzimi ile sindirilir, filtrasyon sonrasında santrifüj uygulanarak işlemler sonlandırılır. Elde edilen stromal vasküler fraksiyon içerisinde YDKKH bulunmaktadır. Elde edilen stromal vasküler fraksiyon direk kullanılabilir gibi hücreler kültür ortamında çoğaltılarak da kullanım mümkündür(14). Aspire edilen yağ dokusunun direk olarak kullanılması ve stromal vasküler fraksiyon kullanımını kıyaslayan bir çalışmada ise adipositlerin aspirasyon sonrası elde edilen grupta daha az nekroza uğradığı ve daha az apoptozis izlendiği bildirilmiştir(15).

Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği (The International Society for Cellular Therapy; ISCT) yakın zamanda yayımlandığı kılavuzda mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için 3 kriter önermiştir;

1-Plastik hücre kültür kabına yapışabilme özelliği,

2-İn vitro koşullarda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşabilme yeteneği

3-CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini %95'in üzerinde ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçlerini %2'den az oranda eksprese etmeleri gerekmektedir.(16).

Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması klinik olarak zor olduğu için, kök hücrelerin ayırımı yapılmaksızın stromal vasküler fraksiyon kullanımı, günlük pratikte “zenginleştirme” olarak isimlendirilmektedir. Zenginleştirilmiş yağ greftleri ile yüzde atrofilerin kozmetik onarımında başarılı sonuçlar rapor edilmiştir(17). Benzer klinik kullanımları hedefleyen bir çalışmada da kemik iliği kaynaklı kök hücreler kullanarak doku mühendisliği uygulamaları ile üç boyutlu yağ dokusu elde edilmiştir(18).

Kültür ortamında çoğaltılmış hücrelerin özellikle açık yaraların onarılmasında, neovaskülarizasyonu artırıcı etkileri ile yaraların greftlenmeye hazırlanmasına olan katkılarına dair yapılmış farklı yayınlar mevcuttur. Neovaskülarizasyonun artması iskemik dokuların iyileştirilmesi ve flep yaşayabilirliğini arttırmada katkı sağlamaktadır(19).

Günlük pratikte flep kaybı ve dolaşım problemleri çok sık karşılaşılan problemlerden değildir ancak diabetik, sigara içicisi, periferik arter hastalığı veya doku bütünlüğünü ciddi anlamda bozan parçalı yaralanmalar gibi durumların varlığında bu problemler daha sık olarak ortaya çıkmaktadır. Zografou ve arkadaşları diyabetik sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada YDKKH kullanımı ile yara iyileşmesinin ve TKDG yaşayabilirliğinin arttığını göstermişlerdir(20).

Dokularda yeni damarların gelişimi vaskülogenez ve anjiogenez olarak iki tipte görülmektedir. Vaskülogenezde embriyonal mezodermal hücreler öncelikle anjioblastlara ve ardından endotelial hücrelere farklılaşırlar. Anjiogenezde ise mevcut kapiller damarlardan uzama ve tomurcuklanma sonrasında yeni dallar oluşmaktadır(21).

1997 yılına kadar vaskülogenezin sadece embriyonal dokularda oluşabileceği düşünülmekteydi. Ancak Ashara ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada periferik kandan elde ettikleri hematopoetik öncü hücrelerin invitro bir ortamda endotelial bir fenotipe farklılaşabildiklerini göstermiştir(22).

Vaskülogenezin erişkinde de gerçekleşebileceği gösterildikten sonra terapötik olarak vaskülogenez yapılabileceği fikri ile çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Anjiyogenez ve vaskülogenezin VEGF gibi büyüme faktörleri ile arttırılabileceği gösterilmiştir(3).Kök hücrelerin fleplerdeki terapötik anjiogenez yapıcı etkisi ilk kez Ichioka ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma ile ortaya konmuştur(23).

Ancak büyüme faktörü ve sitokin benzeri yapıların yarı ömürlerinin kısa olması, farklı zamanlarda etki etmelerinin gerekliliği olması uygulamaların başarısı sınırlı tutmuştur(2, 24).

Bu sebeplerden ötürü büyüme faktörlerini ve sitokinleri tetikleyebilen, tek bir etki mekanizması yerine her basamakta ayrı etkinliği olan, farklılaşma potansiyeli barındıran, damar oluşumu basamaklarını düzenleyebilen kök hücrelerin kullanımı önem kazanmıştır(3).

KİKH sitokin ve faktör salınımı ile parakrin etki gösterir, dokuların revaskülarizasyonuna katkıda bulunur, kapiller ve kollateral düzeyinde de etkiler gösterir(25).YDKKH endotel hücrelere farklılaşma, vaskülogenezi arttırma ve VEGF salgılama özelliklerine sahiptir(26, 27).

Mizuno ve arkadaşları YDKKH kullandıkları araştırmalarında rastgele beslenme paternine sahip cilt fleplerinde damarlanmanın arttığını ve flep yaşayabilirliğinin arttığını göstermişlerdir. Verilen YDKKH'lerin yeni oluşan damarların endotelinde yer aldığı da gösterilmiştir(3).

Kök hücrelerin moleküler etki mekanizmaları; apoptozis direncinde artış, VEGF salgılanmasında artış, hücresel düzeyde kan akımında artış, mikrovasküler yapıda artış, gap junction ilişkisi ve füzyon şeklinde özetlenmektedir.

Son yıllarda, otolog olarak farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler kullanılarak kemik, kırık ve kornea gibi üç boyutlu doku parçacıklarının üretilmesi gerçekleştirilmiş ve bu üretilen doku parçacıklarının (özellikle kemik ve kırık) klinik denemeler kapsamında insanlarda uygulanmasına başlanmıştır.

3.5.3. CELL SHEET TEKNOLOJİSİ

Sıcaklık duyarlı akıllı yüzeyler biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır. Akıllı kaplar, kap yüzeyin kaplanması, yüzeyin özelliklerinin isteğe göre şekillendirilmesi esasına dayanmaktadır. Polimer poli-N-isopropylacrilamide (PIPAAm) ve deriveleri sıcaklık duyarlı özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Farklı sıcaklık derecelerinde, kap yüzeyi hidrofilik veya hidrofobik özellik göstermektedir. Biyomoleküller ve hücreler de bu özellikten dolayı kaba yapışabilmekte veya belli sıcaklıklarda kap yüzeyinden kolayca ayrılabilirlerdir.

PIPAAm yüzeyli kaplar teknolojisi sayesinde kontrollü salınımlı biyoaktif bileşenler, steroid hormonları, polipeptid ve proteinler hazırlanabilmektedir(28).

PIPAAm yüzeyli kaplar kök hücre kültürleri için kullanılmış ve bu kaplardan tek sıra halinde hücre tabakası "cell sheet" kaldırmak mümkün olmuştur. 37⁰ dereceden 20⁰ dereceye düşürülen sıcaklık sayesinde bu işlem mümkün olmaktadır. Bu sayede kök hücreleri kaptan ayırmak için şelatize edici ajanlar ve sindirici enzimler kullanımına gerek kalmamaktadır(29).

Cell sheet halinde hazırlanan kök hücre kültürleri aynı zamanda transfer işlemi sırasında da bir takım kolaylıklar sağlamaktadır. Kök hücre transferleri için konvansiyonel yöntemde, kök hücrenin cinsine göre içerik olarak farklılıklar gösterebilen bir taşıyıcı medium solüsyonuna ihtiyaç vardır. Medium içerisinde taşınan hücreler enjektörler ile enjekte edilerek uygulanmaktadır. Hücreler göz ile görülemediği için enjeksiyon sırasında kök hücrelerin homojen olarak enjeksiyonu zor olmakta ve bazı hücreler enjektörde kaldığı için hiç enjekte edilememektedir.

Hücre tabakası halinde hazırlanmış olan hücreler ise nakil işlemi esnasında taşıyıcı mediuma ihtiyaç duymazlar ve kaptan ayrılır ayrılmaz tabakayı transfer etme şansına sahiptirler. Hücreler homojen olarak kap üzerinde yayılım gösterdikleri için transfer sonrasında da homojen olarak kök hücreleri uygulama şansı tanılırlar.

Yapılan bir çalışmada faredeki açık tam kat doku kaybı modelinde cell sheet halinde kök hücre uygulaması ile olumlu sonuçlar bildirilmiştir(30).

Cell sheet halinde kök hücre uygulaması tekrar edilebilir özelliktedir, bir çalışmada Shimizu ve arkadaşları farede miyokard dokusu onarımı için aralıklı olarak cell sheet halinde kök hücre uygulaması ile iyi dolaşımı olan 1mm kalınlığında miyokard dokusu elde etmişlerdir(31).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Birimi (DETAB) bünyesinde yapıldı. Çalışma için 22.10.2013 tarihinde etik kurul ön onayı (HAYDEK 10/1-2013) alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Deneklerin postoperatif bakımı, takibi, deneklerin sakrifikasyonu aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Kök hücre ile ilgili analizler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)'de, histopatolojik analiz ve ölçümler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

4.1. DENEKLER

Çalışmaya 40 adet ağırlıkları 351–465 gr. arasında değişen Wistar albino cinsi erkek sıçanlar dahil edildi. Sıçanlar rastgele seçilerek her grupta on denek bulunan dört grup oluşturuldu. Tüm hayvanlara standart sıçan yemi (kuru mama) ve şehir suyu verildi, on iki saat ışık, on iki saat karanlıkta kalacak şekilde DETAB bünyesinde standart kafeslerde barındırıldı.

4.2. GRUPLAR

Grup 1 (Kontrol grubu/K) (n=10): Tam kat doku kaybı oluşturulan ve onarım için sadece kompozitmiyokutanöz greft uygulanan grup.

Grup 2 (Medium grubu/M) (n=10): Tam kat doku kaybı oluşturulan ve onarım için kompozit miyokutanöz greft ve taşıyıcı medium solüsyonu enjeksiyonunun kombine olarak uygulandığı grup.

Grup 3 (Kök hücre grubu/E) (n=10): Tam kat doku kaybı oluşturulan ve onarım için kompozit miyokutanöz greft ve VEGFTE-YDKKH enjeksiyonunun kombine uygulandığı grup.

Grup 4 (Kök hücre grubu/C) (n=10): Tam kat doku kaybı oluşturulan ve onarım için kompozit miyokutanöz greft ve cell sheet halinde VEGFTE-YDKKH uygulanan grup.

Tablo 1: Grupların dağılımı

GRUPLAR	YAPILAN İŞLEM
Grup1 (K-Kontrol) (n=10)	Kompozit greft uygulanan grup
Grup2 (M-Medium) (n=10)	Kompozit greft + taşıyıcı medium enjeksiyonu uygulanan grup
Grup3 (E-Enjeksiyon) (n=10)	Kompozit greft + VEGFTE-YDKKH enjeksiyonu uygulanan grup
Grup4 (C-Cell Sheet) (n=10)	Kompozit greft + cell sheet şeklinde VEGFTE-YDKKH uygulanan grup
Toplam(n=40)	

4.3. İŞLEMLER

4.3.1. ANESTEZİ UYGULAMASI

Deneklere, 20mg/kg ketamin (Ketalar[®], Pfizer) ve 5mg/kg xylazin (Rompun[®], Bayer) i.p. ile genel anestezi sağlandı. GAA ameliyat bölgesi(sırt distal kısmı) elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi, ve sıçan cerrahi masasına yüzüstü gelecek şekilde dört ekstremiteden flaster ile tespit edildi. Ameliyat bölgesi %10 povidon-iyot ile temizlendi ve steriliteye gerekli özen gösterildi. Operasyon süresince anestezi derinliği cilt kıstırma ile takip edildi.

GAA operasyonlar uygulandıktan sonra sıçanlar tekli kafeslere alınarak tamamen uyandığından emin olana kadar yakın takip edildi. Uyanan sıçanlar gözlem odasına alındı.

Fotoğraf çekimleri sıçanların hareket etmesini engellemek için GAA uygulandı. Fotoğraf çekimleri süresince anestezi derinliğı cilt kısıtırma ile takip edildi.

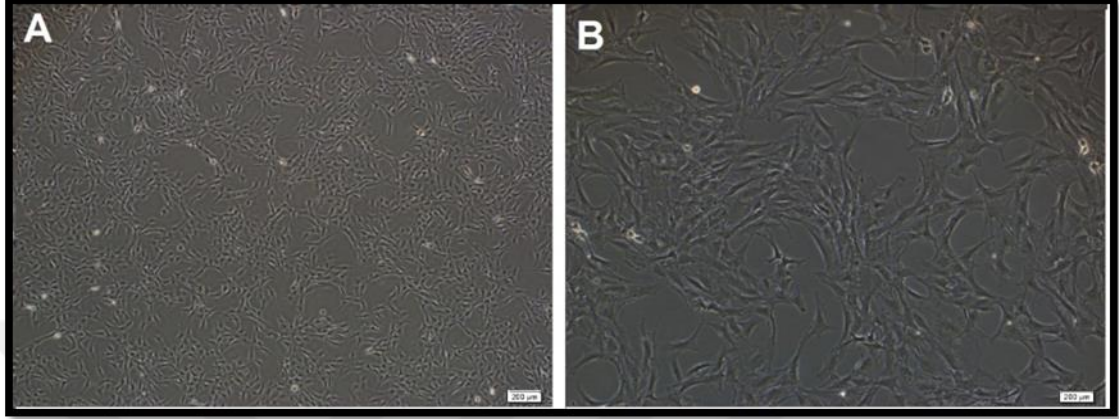
GAA fotoğraf çekimleri uygulandıktan sonra sıçanlar tekli kafeslere alınarak tamamen uyandığından emin olana kadar yakın takip edildi. Uyanan sıçanlar gözlem odasına alındı.

4.3.2. KÖK HÜCRELERİN HAZIRLANMASI

4.3.2.1. YDKKH'lerin izolasyonu ve kültüre hazırlanması

Sıçan yağ dokusundan YDKKH'lerin izolasyonu için; laboratuara gelen yağ dokusu %1 oranında penisilin-streptomisin içeren HBSS ile birkaç kez yıkama işleminden geçirilerek makasla 1cm³ lük küçük parçalara ayrıldı. Yıkama işleminden sonra dokular kuru bir petri kabına alınıp makas yardımıyla mins edildi ve üzerine Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen HBSS ile hazırlanmış %0.075'lik tip 1 kollajenaz solüsyonundan 2ml koyularak doku örnekleri 15ml'lik falkonda toplandı. Son volüm kollajenazla 5ml'ye tamamlanıp 37⁰C çalkalamalı su banyosunda 60dk bekletildi. İnkübasyon sonunda üzerine 5ml HBSS eklenerek 1800rpm'de 10dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atılıp pelet 5ml HBSS ile sulandırılarak 70µm'lik hücre süzgeci ile süzülecek ve tekrar 1300rpm'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet üzerine 5ml lysing solüsyon eklenip oda ısında 5dk bekletildi. Süre sonunda 5ml HBSS eklenerek 1800rpm'de 10dk santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlanıp süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pelet üzerine %15 oranında FBS ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren L-DMEM kültür besiyerinden 1ml eklenip pipetaj yapılarak 25cm² lik kültür kabına ekim yapıldı. Gerekli miktarda kültür besiyeri koyulduktan sonra 37⁰C, %5 CO₂ ve nemli ortamda kültüre edildi. 48 saat sonra besiyeri değıştirilerek yüzen tüm hücreler uzaklaştırıldı. Haftada iki kez besiyeri değışimi tekrarlandı.

Flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edildiler ve bu ilk pasaj (sub-kültür) olarak değerlendirildi. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlandı ve 3.pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlandı.



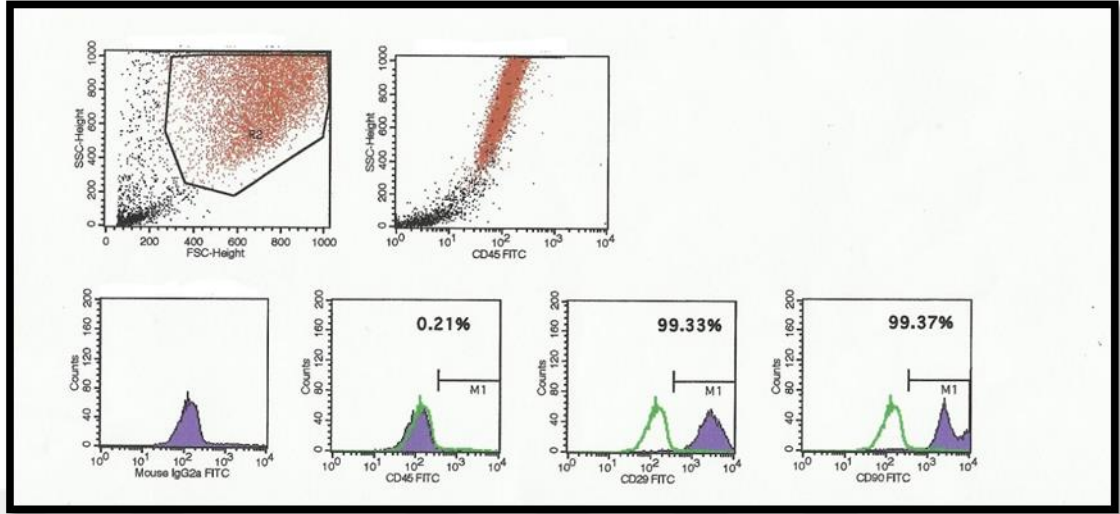
Şekil 1: Sıçan YDKKH'lerinin P0,8. gün (A); P2,4.gündeki faz-kontrast mikroskopik görünüşleri (Ölçüm çubukları: A:200µm, B:100 µm)

4.3.2.2. *YDKKH'lerin karakterizasyonu*

Sıçan adipoz dokusundan elde edilen YDKKH'ler kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edildi ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelendi. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analiz yapıldı.

4.3.2.3. *İmmunfenotipleme-akım sitometrik analiz*

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1'den P5'e kadar) ve *FACS Calibur* akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon (enzimde bekletme) işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 8×10^6 hücre) PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikolar (CD45, CD90, CD29) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek inkübe edildi (oda ısısında-karanlıkta-45dk.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edilerek (5dk. 1780rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu *FACS Calibur* akım sitometri cihazında okutuldu ve analizi *BD Cell Quest TM software* programı ile gerçekleştirildi.



Şekil 2: Sıçan adipoz dokusundan izole edilip kültür edilmiş (P3) YDKKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immunofenotipik özellikleri. YDKKH'ler; CD29, CD90, CD 45, belirteçleri yönünden pozitif olarak gözlemlendi.

4.3.2.4. YDKKH'lerin GFP-VEGF ile işaretlenmesi

Yüksek kalitede plazmid DNA izolasyonu, ayırma ve saflaştırma işlemleri sonrasında *E.coli*'den toksik lipopolisakkaritler gelmemesi için EndoFree Plazmid Maxi Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Seçici katı besi ortamından yeni çoğalmış tek bir koloni alındı ve 2-5ml uygun antibiyotik içeren LB broth (Luria Bertani) sıvı besi ortamına ekilerek 8 saat boyunca 300dak/dev ve 37°C'de çoğaltıldı. 250ml seçici LB ortamı 1ml içerisinde bakteri çoğalmış ortam ile inoküle edildi ve aynı koşullarda 12-16 saat bekletildi. Hücreler 6000xg hızda 15 dakika boyunca 4°C'de döndürülerek toplanacak ve 10ml P1 tampon çözeltisi içerisinde homojen hale getirip oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmeden önce 10ml Tampon P2 eklenip sertçe 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı. 10ml buzda soğutulmuş P3 tamponu eklenerek 4-6 kez ters çevrilip karışım QIAfilter şırıngasına aktarılacak ve 10 dakika bekletildikten sonra filtreden geçirilerek 50ml tüp içerisine aktarılıp 2, 5ml ER tamponu eklendi ve 30dk buzda bekletildi. 10ml QBT tampon çözeltisi ile önceden dengelenmiş QIAGEN-tip 500 kolonuna karışım eklenip süzülmesi beklenildi. 2 kez kolon 30ml QC tamponu ile yıkanacak ve 15ml QN tamponu içerisinde DNA çözüldü.

Plazmid DNA'sı 10, 5ml izopropanol eklenerek 4°C'de, 30 dakika boyunca asgari 15, 000xg hızla çöktürüldü, DNA 5ml endotoksin içermeyen %70 etanol içerisinde yıkanıp 10dk asgari 15, 000xg hızla çöktürüldü.

Yıkanmış plazmid DNA'sı oda sıcaklığında 5-10 dakika kurutulduktan sonra endotoksin içermeyen TE tamponu içerisinde istenilen hacimde çözüldü.

Gen aktarımı elektroporasyon yöntemini temel alan Neon Transfection Sistemi, 10µl Neon Kit ve 100µl Neon Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Yüksek kalitede (endotoksin içermeyen) plazmid DNA'sı 1–5µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlanarak, YDKKH'ler ise deneyin olacağı günde %70-90 konfluente ulaşacak şekilde (transfeksiyon başına 0,5–1×10⁶ hücre) çoğaltıldı. Deney gününde hücreler kültür kabından kaldırıldı ve Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen PBS'le yıkanıp, 1300 rpm'de 5dk santrifüj edilip "Resuspension Buffer R" tampon çözeltisi ile son hücre yoğunluğu 1ml başına 1, 0×10⁷ hücre olacak şekilde hazırlandı. 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine 2ml serum içeren, seçici antibiyotik içermeyen (penisilin içerebilir, eğer seçici değil ise) uygun besiyeri eklenip ve 37°C'de 5% CO₂ sirkülizasyonu olan nemli ortamda inkübe edildi (transfeksiyon parametreleri daha önceden optimize edildiği değerlere ayarlanacak). Steril 1, 5ml mikrosantrifüj tüpü içerisine transfeksiyon başına 2-4µg plazmid DNA'sı ve plazmid DNA'sı bulunan tüp içerisine transfeksiyon başına DNA ile birlikte 10µl olacak miktarda hücre aktarılıp Neon™ Pipeti ile yavaşça tüp içerisine 10µl DNA-hücre süspansiyonunun çekildi ve ucundaki hücre-DNA karışımı ile birlikte Neon™ Pipet İstasyonu içerisinde bulunan ve 3ml elektrolit tamponu eklenmiş tüpe yerleştirildi. Belirtilen ayarlarda sistem elektrik akımını (atımını/şokunu) uygulanıp, gen aktarılmış hücreler hemen önceden ısıtılmış serum içeren ama seçici antibiyotik içermeyen besi ortamına aktarıldı, hücreler 37°C'de nemlendirilmiş CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Transformasyon sonrası 3.günde (transient/geçici ekspresyon) ortam değiştirilerek besi ortamı tazelendi, ancak bu noktadan itibaren seçilen antibiyotik (pGFP için G418, Kat. No.11811-098) eklendi. Kalıcı olarak gen ekspresyonu isteniyorsa 2-3 ay (5-10 pasaj) boyunca hücreler antibiyotik direncine göre seçildi.

4.3.2.5. Isı değişimine duyarlı kültür kabında YDKKH kültürü

İzole edilen hücrelerin kültürü için 35mm'lik 6 kuyucuklu Upcell (UpCell, CellSeed, Inc., Tokyo, Japan) kültür kabı kullanıldı. Bu kültür kabının ısı değişimine cevap verebilen polimer olan poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) yapısında olması özelliğinden faydalanıldı.

İzole edilen sıçan kaynaklı YDKKH'ler 35mm'lik bu kültür kabına, 4×10^6 hücre/cm² konsantrasyonda olacak şekilde ekildi. Besiyeri içine LDMEM (Invitrogen), %10 FBS (Invitrogen), 2mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) konuldu. 2 gün boyunca çoğalması beklendi ve daha sonra PIPAAm kültür kabındaki bu hücreler, 37⁰C'deki inkübasyondan alınarak 20⁰C'de 30dk inkübasyona bırakıldı. Bu sayede hücreler, enzimatik reaksiyona gerek kalmadan ve tek-hücre süspansiyonu yerine tabaka halinde kaldırılabilir.

4.3.2.6. VEGFTE-YDKKH'lerin enjeksiyon olarak transplantasyona hazırlanması

- a) Hücreler T-175 kültür kabından enzim ile kaldırıldı.
- b) Bir tüpte toplanan hücreler pelet oluşturması için santrifüj edildi.
- c) Süre bitiminde oluşan pelet üzerine 120µl PBS (Phosphate buffer saline) eklendi ve homejenize edildi.
- d) Her bir hayvana 4µl enjeksiyon olmak üzere insülin enjektörlerine hücreler çekildi.

4.3.2.7. VEGFTE-YDKKH tabakalarının transplantasyona hazırlanması

- a) On iki-gözlü sı duyarlı petrideki hücreler, CO₂ inkübatörden çıkarıldı..
- b) 37⁰C'den alınan hücreler 20⁰C de 30dk bekletildi.
- c) Süre bitiminde tabaka halinde kalkan hücreler nakil yapılarına kadarmedyumu içinde bekletildi.

d) Nakil başlayacağı zaman hücre tabakası kültür kabının içinden pipet yardımı ile alındı. Kuru olan 60 mm çapındaki petri içine aktarıldı. PVDF membran, her bir tabakaya, VEGFTE-YDKKH hücre tabakasının üstüne yerleştirildi.

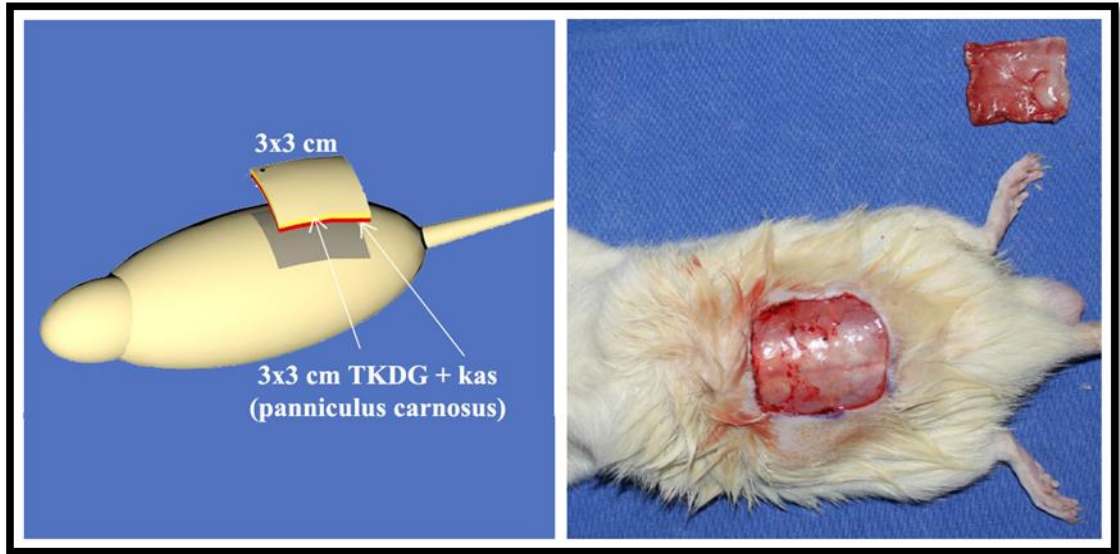
e) Dikkatli bir şekilde forceps ile hücre tabakasının etrafına iyice bastırılarak destekleyici membrana tutunması sağlandı.

f) PVDF membran tarafından kaplanmayan ve kenarda kalan hücre tabakası pens yardımı ile PVDF membran üzerine doğru katlandı.

g) PVDF membrana tutunmuş olan tüm hücre tabakası, pens ile kaldırılıp transplante edilecek bölgeye alındı.

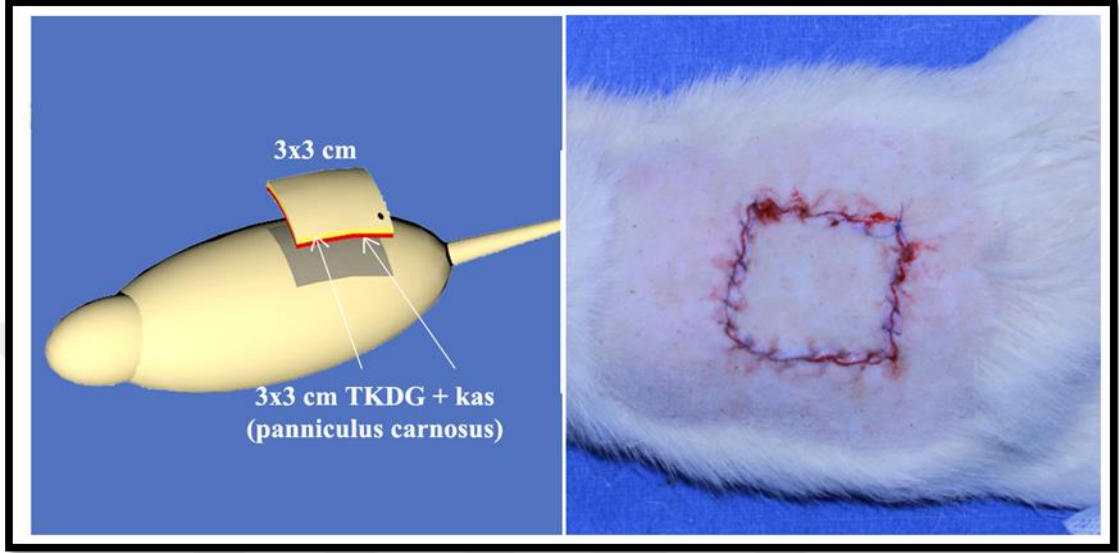
4.3.3. CERRAHİ İŞLEMLER

Cerrahi işlemlerin tamamı GAA uygulandı. Sırt orta hattında, sırtın distal 1/3'ünde olacak şekilde 3x3cm'lik alan plastik şablon ile işaretlendi. Tam kat cildi içerecek şekilde deri, derialtı doku, panniculus carnosus kası da dahil edilerek kompozit greft elde edildi ve doku kaybı oluşturuldu. Sırt kasları ve fasyalarının bütünlüğü korunacak şekilde dikkatli cerrahi uygulandı. Elektrokoter yardımı ile kanama kontrolü uygulandı.



Şekil 3: Doku kaybı ve kompozit greft oluşturulması

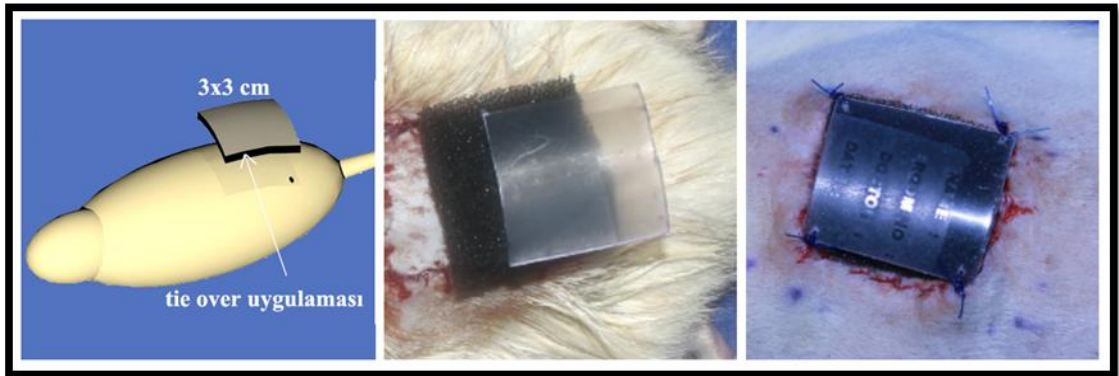
Grup 1(K): Eksize edilen doku (miyokutanöz kompozit greft) kendi etrafında 180⁰ döndürülerek 4.0 polypropylen (Propilen[®], Doğsan) ile devamlı dikişlerle, doku kaybı oluşturulmuş olan açık alandaki kas üzerine oturacak şekilde tespit edildi.



Şekil 4: Kompozit greftin 180⁰ döndürülerek tespitlenmesi

Greft üzerine tie-over pansuman için 3x3 cm medikal sünger (VAC[®], KCI) ve plastik patoloji kaplarından kesilen 3x3cm plastik atel kullanıldı, 2.0 polypropylen (Propilen[®], Doğsan) dikişler ile pansuman tespitlendi. Cerrahi işlem sonlandırıldı.

Denekler 2 hafta boyunca tekli kafeslerde takip edildi.



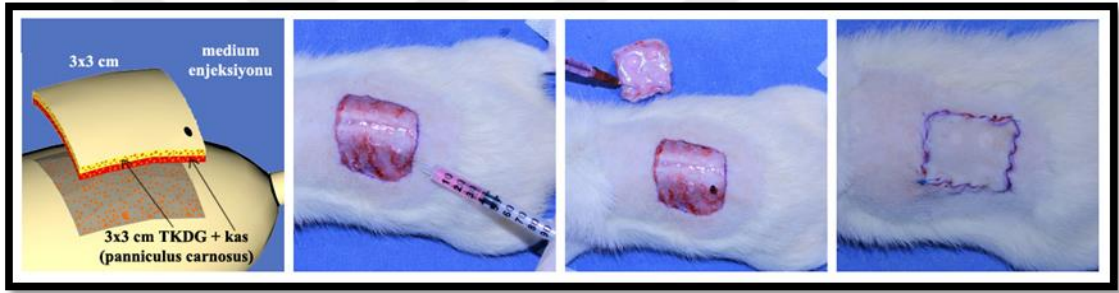
Şekil 5: Tie-over pansuman uygulaması

Grup2(M): 29G, 100IU insülin enjektörü kullanılarak 0.4cc(40IU) taşıyıcı medium solüsyonu sekiz adet alana enjekte edildi. Her alana 5IU olacak şekilde dört adet enjeksiyon greft içerisine ve dört adet enjeksiyon sırt kası fasyası altına olacak şekilde enjeksiyon yapıldı.

Eksize edilen doku (miyokutanöz kompozit greft) kendi etrafında 180⁰ döndürülerek 4.0 polypropylen (Propilen[®], Doğan) ile devamlı dikişlerle doku kaybı oluşturulmuş olan açık alandaki kas üzerine oturacak şekilde tespitlendi.

Greft üzerine tie-over pansuman için 3x3 cm medikal sünger (VAC[®], KCI) ve plastik patoloji kaplarından kesilen 3x3cm plastik atel kullanıldı, 2.0 polypropylen (Propilen[®], Doğan) dikişler ile pansuman tespitlendi. Cerrahi işlem sonlandırıldı.

Denekler 2 hafta boyunca tekli kafeslerde takip edildi.



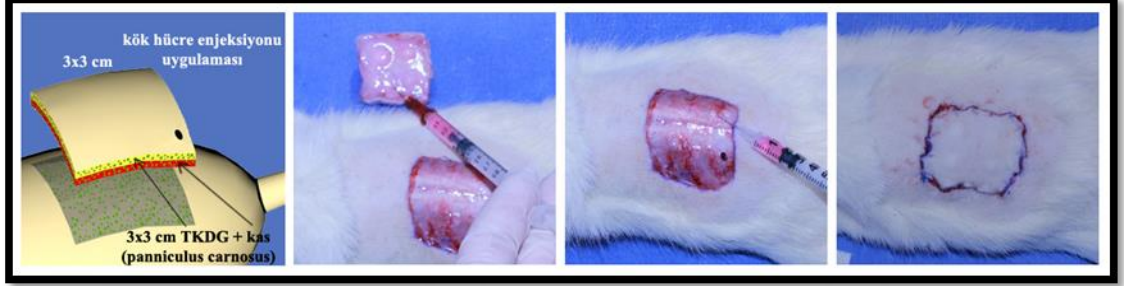
Şekil 6: Taşıyıcı medium solüsyonu enjeksiyonu

Grup3(E): 29G, 100IU insülin enjektörü kullanılarak 4×10^6 VEGFTE-YDKKH içeren 0.4cc (40IU) taşıyıcı medium solüsyonu sekiz adet alana enjekte edildi. Her alana 5IU (5×10^5 kök hücre) olacak şekilde dört adet enjeksiyon greft içerisine ve dört adet enjeksiyon sırt kası fasyası altına olacak şekilde enjeksiyon yapıldı.

Eksize edilen doku (miyokutanöz kompozit greft) kendi etrafında 180⁰ döndürülerek 4.0 polypropylen (Propilen[®], Doğan) ile devamlı dikişlerle doku kaybı oluşturulmuş olan açık alandaki kas üzerine oturacak şekilde tespitlendi.

Greft üzerine tie-over pansuman için 3x3 cm medikal sünger (VAC[®], KCI) ve plastik patoloji kaplarından kesilen 3x3cm plastik atel kullanıldı, 2.0 polypropylen (Propilen[®], Doğsan) dikişler ile pansuman tespitlendi. Cerrahi işlem sonlandırıldı.

Denekler 2 hafta boyunca tekli kafeslerde takip edildi.



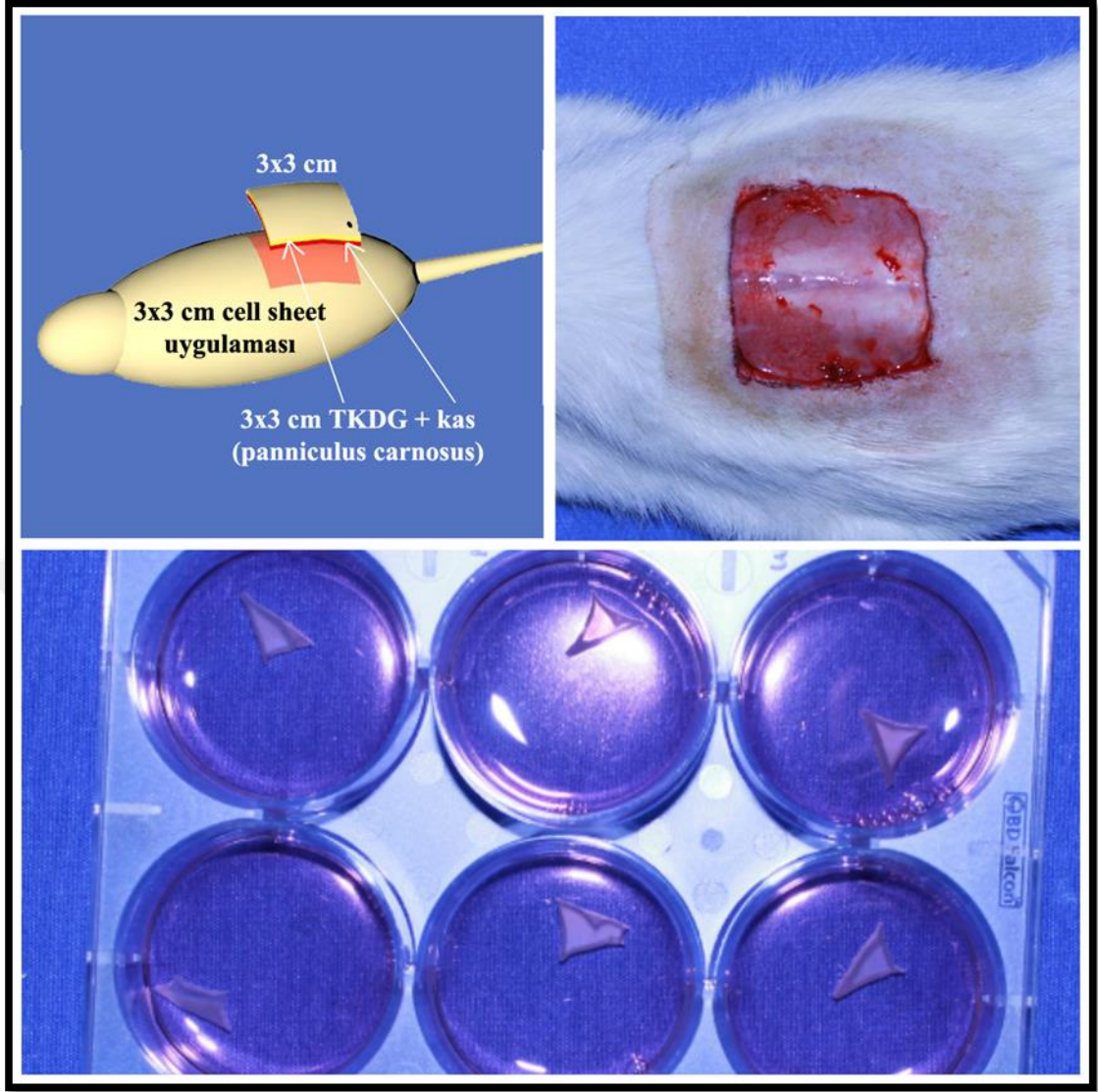
Şekil 7: Kök hücre enjeksiyonu uygulaması

Grup 4(C): Doku kaybı oluşturulmuş açık alan üzerine 3cm çaplı 4×10^6 VEGFTE-YDKKH içeren cell sheet tabakası yerleştirildi.

Eksize edilen doku (miyokutanöz kompozit greft) kendi etrafında 180⁰ döndürülerek 4.0 polypropylen (Propilen[®], Doğsan) ile devamlı dikişlerle açık alandaki kas üzerine oturacak şekilde tespitlendi.

Greft üzerine tie-over pansuman için 3x3 cm medikal sünger (VAC[®], KCI) ve plastik patoloji kaplarından kesilen 3x3cm plastik atel kullanıldı, 2.0 polypropylen (Propilen[®], Doğsan) dikişler ile pansuman tespitlendi. Cerrahi işlem sonlandırıldı.

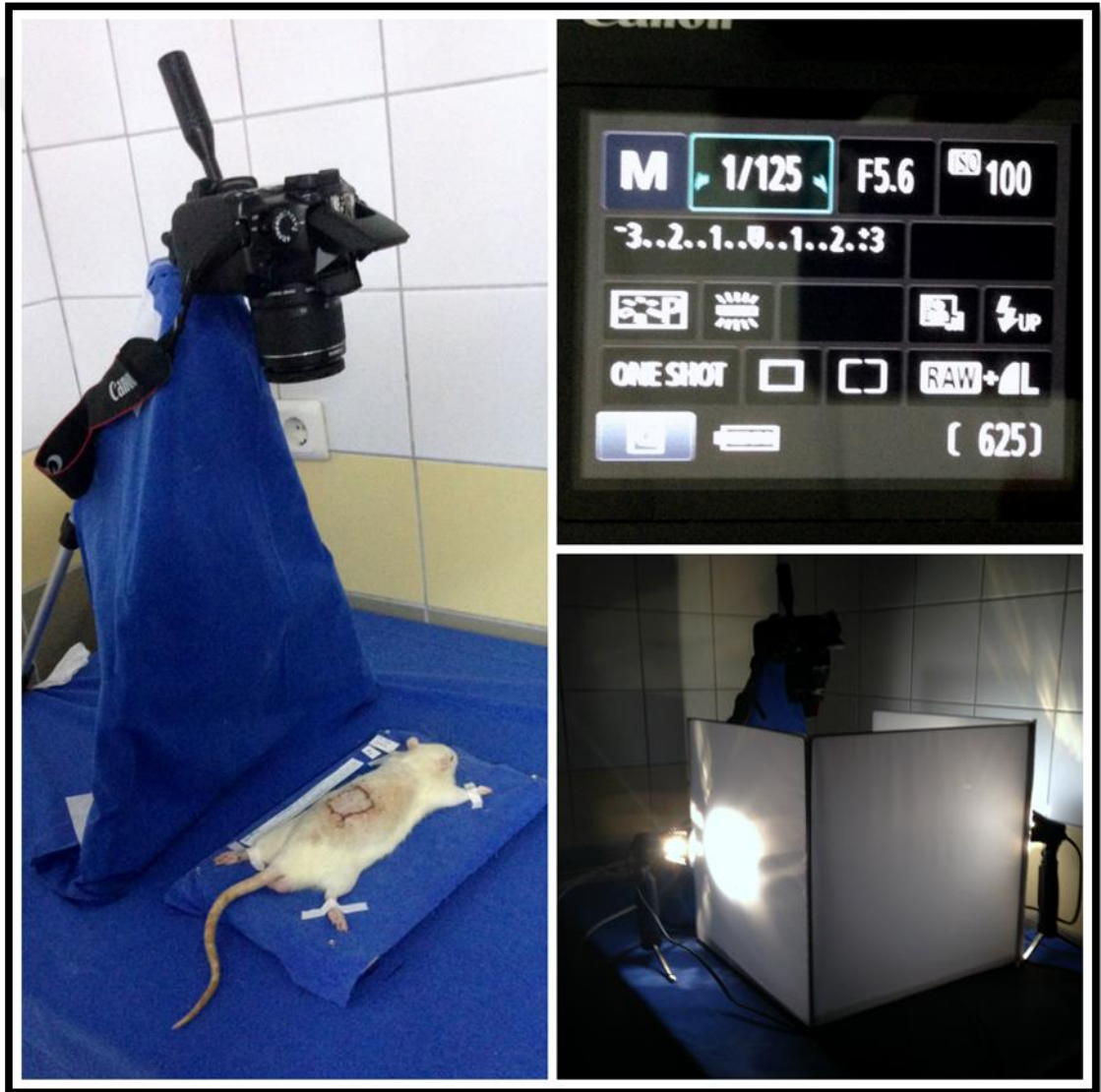
Denekler 2 hafta boyunca tekli kafeslerde takip edildi. P.o.2. haftanın sonunda tüm deneklerin pansumanları açıldı ve tüm denekler p.o.14.günde fotoğraflandı. Fotoğraf çekim işlemi p.o.21. ve 28. günlerde de tekrar edildi. Çekilen fotoğraflar Şekil 152, Şekil 13, Şekil 14 ve Şekil 15'te görülmektedir.



Şekil 8: Cell sheet uygulaması

4.3.4. FOTOĞRAF ÇEKİMİ

Standart koşullarda fotoğraf çekimi yapılabilmesi için fotoğraf çekim düzeneği hazırlandı. Denekler dört ekstremiteden flasterle tespitli halde GAA düzeneğe yerleştirildi ve fotoğraf çekimleri yapıldı. RebelT3 DSLR (Canon, Japonya) dijital fotoğraf makinesi, 18-55mm f/3.5-5.6 IS II lens ve 58mm circular polarize filtre kullanıldı. Beyaz çekim çadırı içerisinde manuel modda sabit ayarlar kullanılarak flaşlı olarak karanlık odada fotoğraf çekimleri yapıldı.



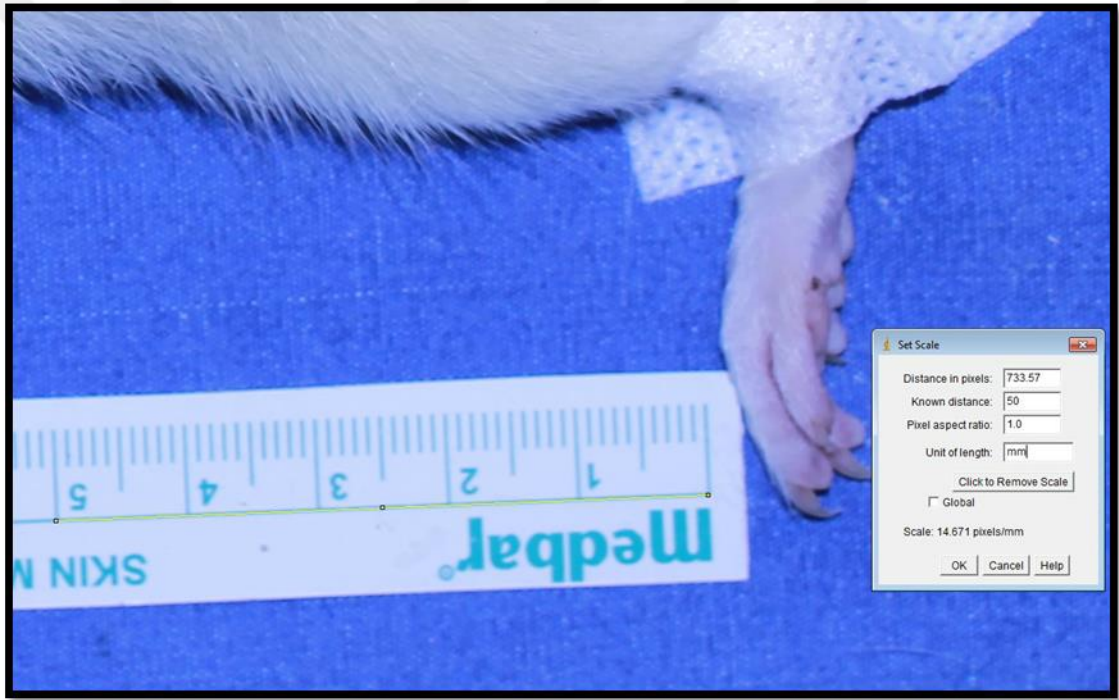
şekil 9: Karanlıkta standart fotoğraf çekim düzeneği

Fotoğraf çekimleri her sıçan için ilk cerrahi uygulama sonrasında p.o.0.gün, p.o.14.gün, p.o.21.gün ve p.o.28.gün olarak dört kez uygulandı.

4.4. DEĞERLENDİRME

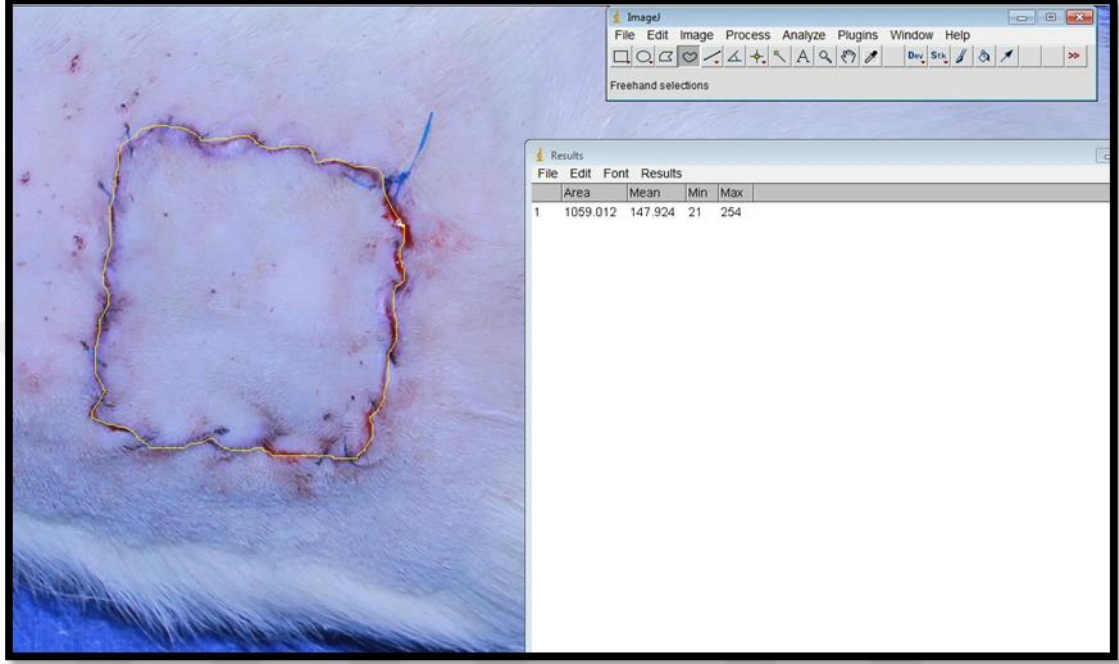
4.4.1. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME

Değerlendirme için ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) programı kullanıldı. Program sayesinde her fotoğraftaki alan mm² cinsinden ölçümlendi. Fotoğraflarda ölçüm yapabilmek için her fotoğrafa konmuş olan cetvelin üzerindeki 50mm'lik uzunluk, programdaki “set scale” özelliği ile gerçek ölçülere göre 50mm olacak şekilde ayarlandı.



Şekil 10: Image J programında birimlerin mm olarak ayarlanması

Programın “freehand selection ölçümlemesi sayesinde ölçümlenecek alanların çevresi işaretlendi. Sonrasında işaretli alanlar mm² cinsinden ölçümlenip alanlar not edildi. Her sıçana ait çekilmiş olan 4 adet fotoğraf ayrı ayrı ölçümlenip ölçülen alanlar Tablo 4, Tablo 5 ve Tablo 6’ya not edildi.



Şekil 11: Image J programı ile alan ölçümü

4.4.2. MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRME

Tüm gruplarda kompozit greft, normal deri dokusunu da içine alacak şekilde haç şeklinde kesilerek kenarlardan dört ve merkezden bir parça halinde örneklendi. Dokular %10 formalinde tespit edildikten sonra rutin patolojik takip sonrası parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5 µm kesitler alındı. Kesitler H&E ile boyandı. Kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX51) grupların özellikleri bilinmeksizin tek bir çalışmacı tarafından incelendi.

Mikroskopik incelemelerde, makroskopik olarak sağlam görülen örnekler de dahil olmak üzere tüm greft yüzeylerinde ülser görüldü.

Damar sayımı için, tüm örneklerde yüzeyde ülser bulunduğu için greftin tabanından randomize seçilen 10 alanda x400 büyütmede sayım yapıldı. Bu sayım iki farklı alanda gerçekleştirilerek iki değer ortalaması alındı. Graft komşuluğundaki normal deri dokusunda dadamar sayımı için aynı işlem gerçekleştirildi.

Greft kalınlığı okülometre ile ölçüldü. Greft içindeki çizgili kas semikantitatif olarak değerlendirildi.

Greft içinde çizgili kas dokusu yok: 0,

Greftin %25'inden azında çizgili kas dokusu mevcut: 1,

Greftin %25-50 kısmında çizgili kas dokusu mevcut: 2,

Greftin %50-75 kısmında çizgili kas dokusu mevcut: 3,

Greftin %75'inden fazlasında çizgili kas dokusu mevcut: 4.

Benzer olarak greft içindeki yağ dokusu varlığı da semi kantitatif olarak aşağıdaki şekilde değerlendirdi:

Greft içinde yağ hücresi yok: 0,

Greft içinde dağınık tek tük yağ hücresi mevcut: 1,

Greft içinde dağınık küçük gruplar halinde yağ hücreleri mevcut: 2,

Greft içinde yoğun gruplar halinde yağ hücreleri mevcut: 3.

Mikroskopik değerlendirme sonuçları; Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10'da görülmektedir.

4.4.3. İŞARETLİ KÖK HÜCRELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

28.günde dokular alındı ve % 10 formalin ile fikse edildi. Örnekler parafine gömüldü ve 5µm kalınlığında kesitler alınarak dokuların yapısal özelliklerinin incelenmesi, gelişen dokuların kaynağının tespit edilebilmesi, çeşitli sitokin ve faktörlerin tespiti amacıyla hematoksilen-eosin ve immunohistokimyasal boyamalar yapılarak histolojik ve immünhistokimyasal incelemeler yapıldı.

Immunohistokimyasal analiz için kesitler +4⁰C de gece boyu inkübasyona bırakıldı. KÖGEM’de gerçekleştirilen immunofloresan boyamalarla, nakledilen GFP+ hücrelerin alıcı dokularına entegrasyonu anti-GFP antikoruyla işaretlemeyen sonra izlendi. Bunun yanında pro-inflamatuar, anti-inflamatuar sitokin, büyüme faktörleri TGFβ1 ve IL-6 (Santacruz Biotechnology), yeni damar oluşumuyla ilişkili VEGF ve CD31 (Santacruz Biotechnology) antikorlarla inkübe edildi ve son olarak DAPI ile kapatıldı ve floresans mikroskopunda incelendi.

4.4.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmada veriler yüzdelikler ve ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Nümerik değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilmek amacıyla normal dağılım gösteren nümerik değişkenler için Tek Yönlü Varyans Analizi ve grupların farklılıklarını belirlemek için Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi, normal dağılım göstermeyen nümerik değişkenler için Kruskal-Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi ve Dunn çoklu karşılaştırma testleri yapılmıştır. Verilerin değerlendirmelerinde IBM SPSS 20.0 for Windows istatistiksel paket programı kullanılmıştır. Sıfır Hipotezinin reddi için p<0.05 değeri yeterli kabul edilmiştir.

5. BULGULAR

5.1. MAKROSKOPİK BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan Wistar-albino cinsi erkek sıçanlar çalışma başlangıcında 351-465gr (ort. 385.4gr) ağırlıkları arasındaydı. Sıçanların ağırlık dağılımlarına bakılmaksızın sıçanlar rastgele gruplandırıldı. Gruplardaki sıçanların ağırlıkları Tablo 2’de görülmektedir.

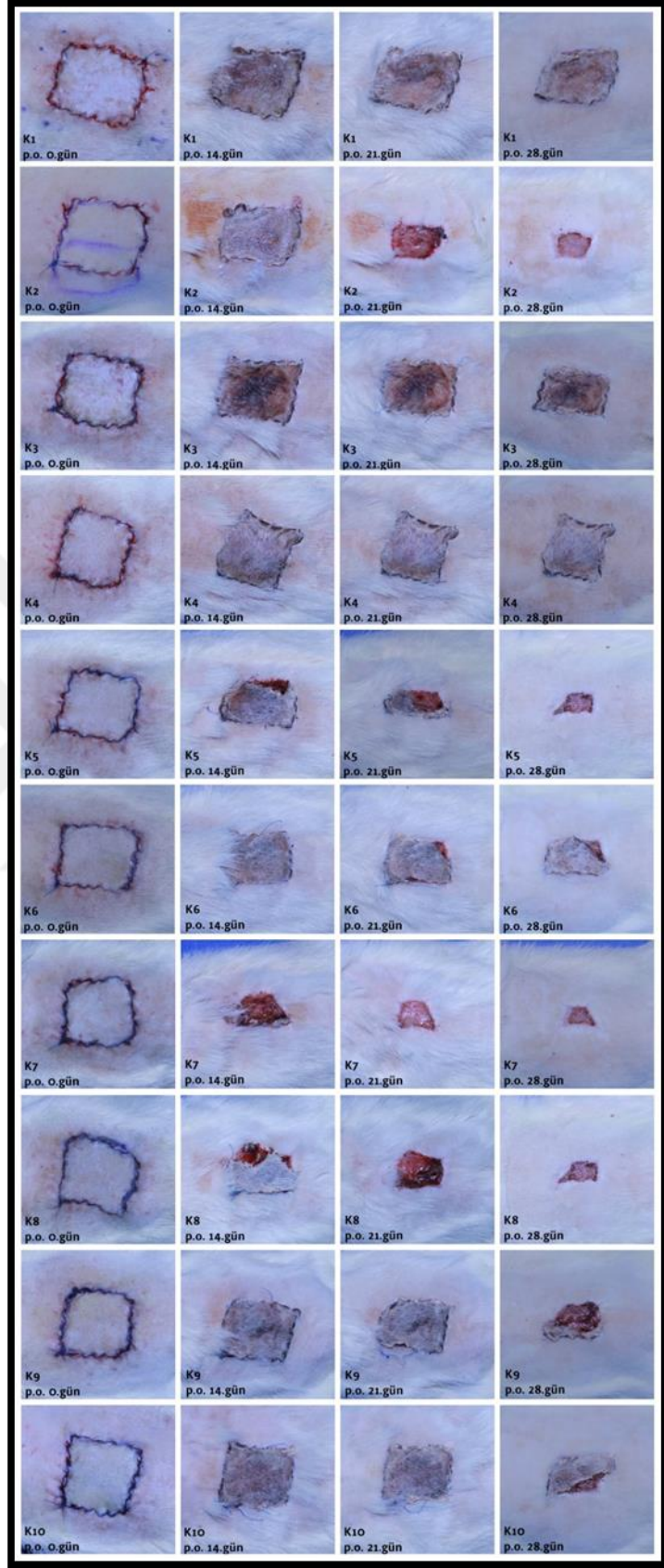
Gruplardaki alan değişimleri Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5 ve Tablo 6’da görülmektedir.

Tablo 2: Sıçanların çalışma öncesi ağırlık dağılımları

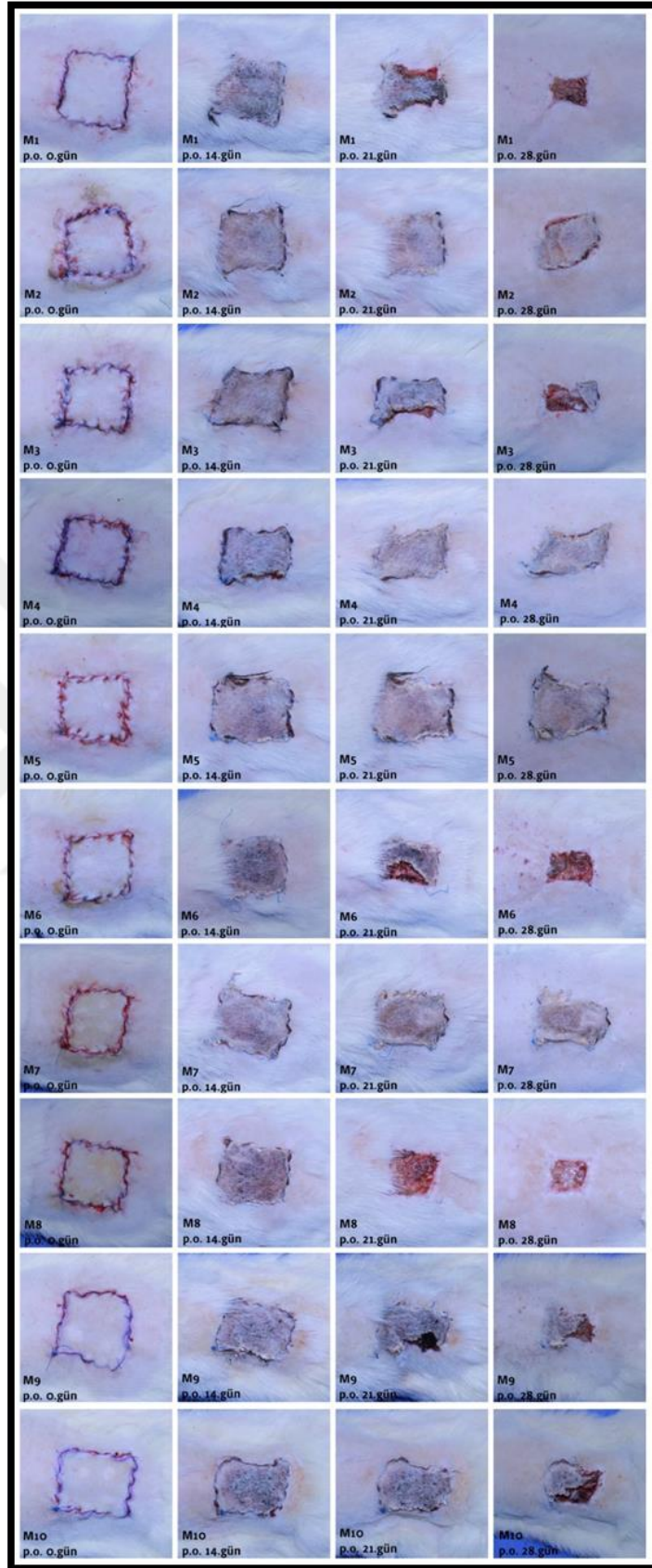
	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Medium)	Grup 3 (Enjeksiyon)	Grup 4 (Cell sheet)
Denek 1	423	360	364	357
Denek 2	363	424	393	408
Denek 3	373	373	352	421
Denek 4	465	365	351	358
Denek 5	410	394	380	383
Denek 6	411	380	352	435
Denek 7	358	393	398	387
Denek 8	352	381	426	359
Denek 9	361	382	397	404
Denek 10	390	385	395	354
Ortalama	390.6	383.7	380.8	386.6

Takiplerde birçok greft üzerinde ülserasyon, kabuklanma ve nekroz alanları izlendiği için ölçümler tüm alanların toplamını içerecek şekilde yapıldı. Greftlerde beyazdan kahverengiye giden renk değişimleri olduğu için yaşayan alan yüzdesi makroskopik olarak hesaplanmadı.

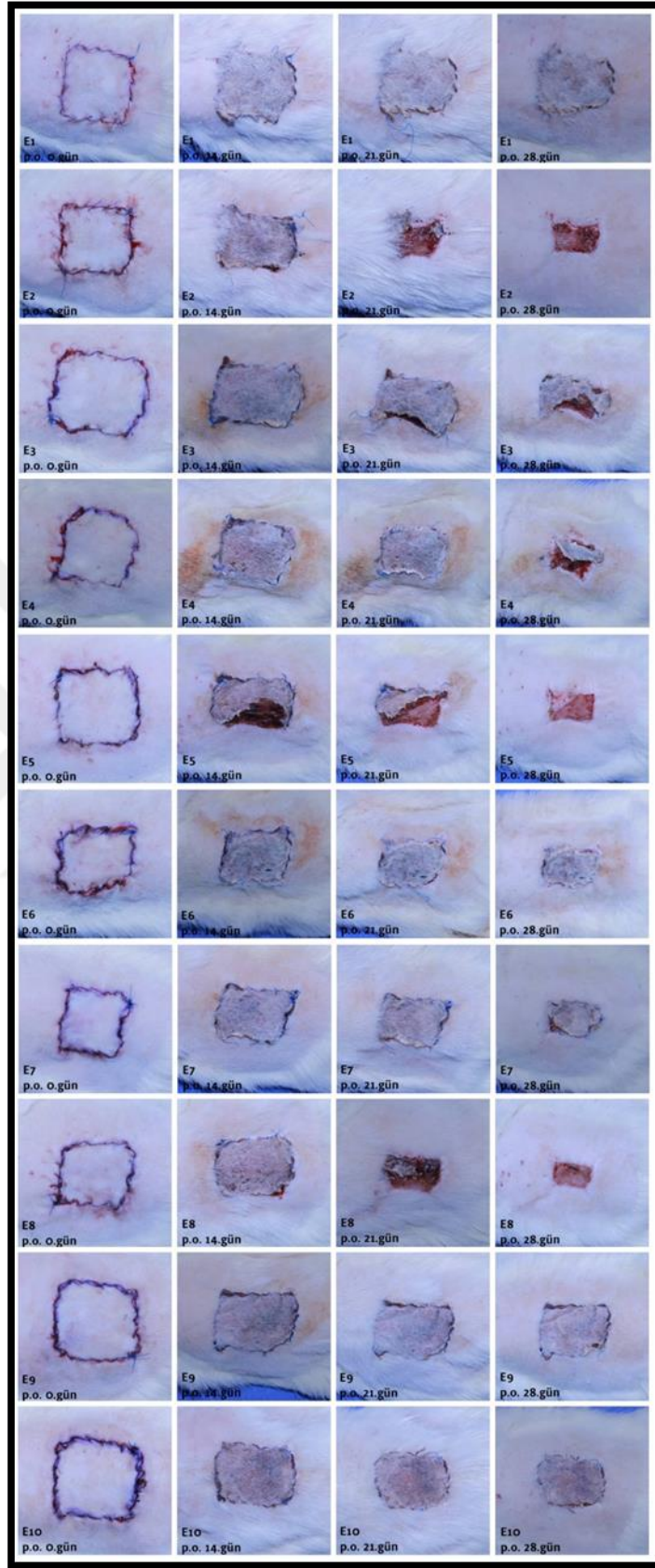
Makroskopik takiplerde Grup 1(K)'de 4 (n:10) adet sıçanda greftlerin tamamında ülserasyon ve 3 (n:10) adet sıçanda greftlerin bir kısmında ülserasyon geliştiği izlendi. Grup 2(M)'de 3 (n:10) adet sıçanda greftlerin tamamında ülserasyon ve 3 (n:10) adet sıçanda greftlerin bir kısmında ülserasyon geliştiği izlendi. Grup 3(E)'de 3 (n:10) adet sıçanda greftlerin tamamında ülserasyon ve 2 (n:10) adet sıçanda greftlerin bir kısmında ülserasyon geliştiği izlendi. Grup 4(C)'de 2 (n:10) adet sıçanda greftlerin tamamında ülserasyon ve 2 (n:10) adet sıçanda greftlerin bir kısmında ülserasyon geliştiği izlendi. Grupların toplu şekilde fotoğrafları Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14 ve Şekil 15'de görülmektedir. Gruplardaki alan ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$).



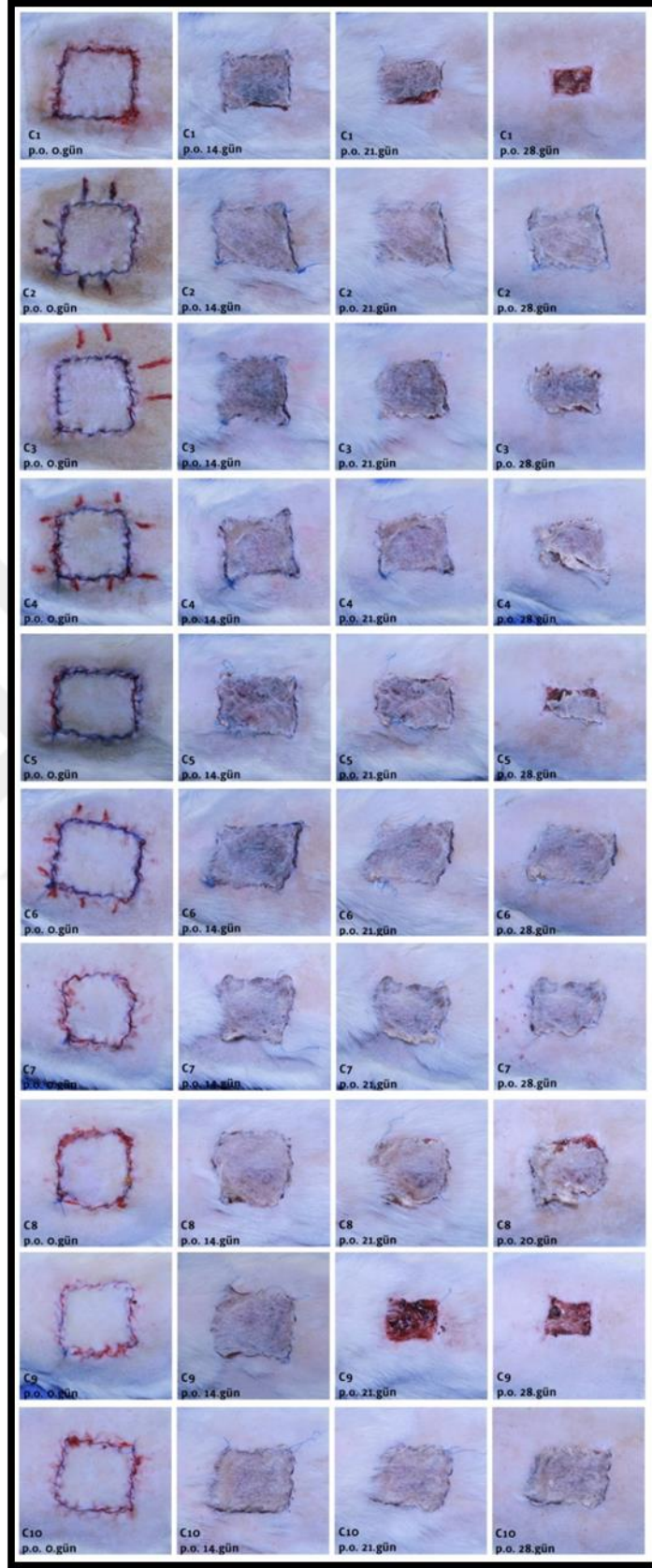
Şekil 12: Grup 1(K)zamana göre alan değişimi



Şekil 13: Grup 2(M) zamana göre alan değişimi



Şekil 14: Grup 3(E) zamana göre alan değişimi



Şekil 15: Grup 4 (C)zamana göre alan değişimi

Tablo 3: Postoperatif 0.gün alan ölçümleri

	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Medium)	Grup 3 (Enjeksiyon)	Grup 4 (Cell sheet)
Denek 1	1183.151	1148.066	1067.229	1089.969
Denek 2	1071.326	1111.722	1050.438	1129.454
Denek 3	1015.986	1090.977	1296.411	1203.209
Denek 4	1032.079	1064.944	927.757	1016.859
Denek 5	1051.019	1152.399	1118.777	1114.556
Denek 6	1082.895	1115.081	856.500	1274.791
Denek 7	1023.963	999.426	852.536	1016.206
Denek 8	1089.726	1056.266	967.590	1065.207
Denek 9	980.985	1025.713	1162.306	1085.938
Denek 10	990.819	985.535	1229.032	1135.514

Tablo 4: Postoperatif 14.gün alan ölçümleri

	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Medium)	Grup 3 (Enjeksiyon)	Grup 4 (Cell sheet)
Denek 1	1052.856	915.247	972.017	804.204
Denek 2	924.576	895.077	830.061	1030.390
Denek 3	879.392	900.777	1167.382	975.499
Denek 4	1019.144	774.237	883.613	909.626
Denek 5	725.501	1081.462	875.715	912.861
Denek 6	807.408	824.828	777.124	1071.199
Denek 7	407.995	961.939	845.984	870.746
Denek 8	697.558	911.737	944.538	1028.720
Denek 9	970.639	963.623	1039.326	1017.125
Denek 10	849.445	966.909	1044.860	1008.165

Tablo 5: Postoperatif 21. gün alan ölçümleri

	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Medium)	Grup 3 (Enjeksiyon)	Grup 4 (Cell sheet)
Denek 1	1016.751	578.603	839.836	580.833
Denek 2	391.034	848.183	383.582	910.632
Denek 3	827.463	580.865	980.255	828.133
Denek 4	875.725	722.770	757.996	858.162
Denek 5	355.227	983.478	612.430	803.732
Denek 6	681.940	541.147	694.087	1012.538
Denek 7	216.384	840.665	791.250	772.928
Denek 8	383.437	435.556	497.937	959.897
Denek 9	795.210	706.952	1008.756	403.072
Denek 10	830.665	772.058	981.233	901.519

Tablo 6: Postoperatif 28.gün alan ölçümleri

	Grup 1 (Kontrol)	Grup 2 (Medium)	Grup 3 (Enjeksiyon)	Grup 4 (Cell sheet)
Denek 1	864.226	201.999	789.186	233.531
Denek 2	248.197	586.214	246.379	893.429
Denek 3	771.687	280.596	747.849	669.696
Denek 4	864.462	640.273	489.198	624.904
Denek 5	154.799	919.952	396.635	383.084
Denek 6	527.955	294.878	649.182	922.586
Denek 7	94.757	710.451	531.392	703.902
Denek 8	157.733	242.460	292.049	823.103
Denek 9	437.282	508.349	965.760	286.832
Denek 10	478.655	646.150	897.360	843.809

5.2. MİKROSKOPİK BULGULAR

Postoperatif olarak 28.günde alınan kesitlerden yapılan mikroskopik değerlendirmeler sonrasında öncelikli olarak göze çarpan bulgu tüm greftlerde %100'e yakın ülserasyon olmasıydı. Ayrıca makroskopik olarak sağlıklı gibi görünen alanlarda dahi krutların varlığı ve mevcut krutların altındaki alanlarda epidermal uzantıların (ter bezleri, kıl kökleri vb.) kaybolduğu gözlemlendi.

Greftler ve normal deride yapılan damar sayımları arasında gruplar arasında farklar olduğu gözlemlendi. Ancak istatistiksel olarak grupların arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Greftlerin kalınlıkları arasında yapılan ölçümlerde birkaç denek hariç belirgin fark olmadığı gözlemlendi. Ancak greft kalınlığının incelendiği deneklerde daha belirgin olmak üzere normal deri hizasından epitelizasyonun geliştiği gözlemlendi.

Kompozit greft içerisine dahil edilen panniculus carnosus kasına yönelik yapılan değerlendirmelerde de gruplar arasında farklar olduğu izlendi. Ancak istatistiksel olarak grupların arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Normal deride çok fazla rastlanmayan yağ dokusunun da greft içerisinde rastlanması sonrasında yağ dokusunun dağılımı da değerlendirildi. Greft içerisindeki yağ dokusu miktarı Grup 1(K), Grup 2(M) ve Grup 3(E)'de çok az olarak değerlendirilmesine karşın Grup 4(C)' de yağ miktarının daha fazla ve yaygın olduğu gözlemlendi.

Tablo 7: Grup 1(Kontrol) mikroskopik inceleme verileri

	Damar sayımı greft	Damar sayımı normal deri	Kas miktarı*	Yağ miktarı*	Greft kalınlığı**	Ülserasyon
Denek 1	108	20	4	2	2-5 grid	100
Denek 2	90	57	1	1	0.5-1.5 grid	100
Denek 3	78	38	3	1	1.5-4 grid	100
Denek 4	62	30	3	3	1-2.5 grid	100
Denek 5	145	44	1	0	2-3 grid	100
Denek 6	76	32	4	2	2- 4 grid	100
Denek 7	57	40	1	0	2-4 grid	100
Denek 8	138	30	2	0	2-4 grid	100
Denek 9	72	39	4	1	2-4 grid	100
Denek 10	130	28	4	1	2-4 grid	100

Tablo 8: Grup 2(Medium) mikroskopik inceleme verileri

	Damar sayımı greft	Damar sayımı normal deri	Kas miktarı*	Yağ miktarı*	Greft kalınlığı**	Ülserasyon
Denek 1	106	53	2	0	2-4 grid	100
Denek 2	155	56	4	1	2-4 grid	100
Denek 3	147	31	2	1	2-4 grid	100
Denek 4	70	32	3	1	2-4 grid	100
Denek 5	32	35	4	2	2-4 grid	100
Denek 6	108	28	3	1	2-4 grid	100
Denek 7	98	28	4	1	2-4 grid	100
Denek 8	88	35	4	1	2-4 grid	100
Denek 9	124	42	1	0	2-4.5 grid	100
Denek 10	78	45	4	0	2-4 grid	100

Tablo 9: Grup 3 (Enjeksiyon) mikroskopik inceleme verileri

	Damar sayımı greft	Damar sayımı normal deri	Kas miktarı*	Yağ miktarı*	Greft kalınlığı**	Ülserasyon
Denek 1	87	49	4	0	4-6 grid	100
Denek 2	116	41	2	1	2-5 grid	100
Denek 3	134	26	2	0	2-3 grid	100
Denek 4	77	37	3	0	2-6 grid	100
Denek 5	103	32	1	1	3-5 grid	100
Denek 6	147	44	2	2	2-4 grid	100
Denek 7	85	28	2	2	2-3 grid	100
Denek 8	94	43	1	0	2-6 grid	100
Denek 9	138	42	4	3	2-4 grid	100
Denek 10	122	41	4	2	2-4 grid	100

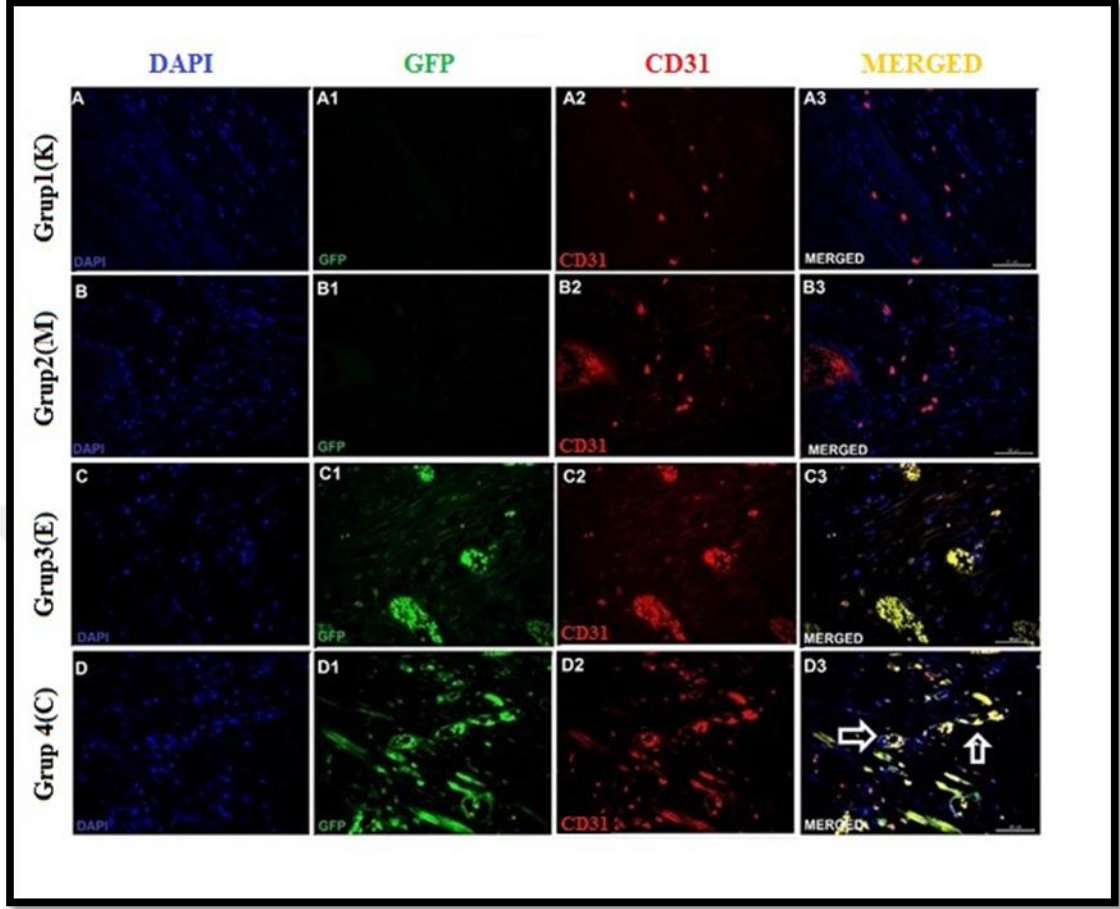
Tablo 10: Grup 4 (Cell sheet) mikroskopik inceleme verileri

	Damar sayımı greft	Damar sayımı normal deri	Kas miktarı*	Yağ miktarı*	Greft kalınlığı**	Ülserasyon
Denek 1	98	44	4	1	4-6 grid	100
Denek 2	157	32	4	2	2-5 grid	100
Denek 3	72	25	4	3	2-3 grid	100
Denek 4	104	43	4	2	2-6 grid	100
Denek 5	162	55	3	2	3-5 grid	100
Denek 6	99	40	2	2	2-4 grid	100
Denek 7	98	36	4	2	2-3 grid	100
Denek 8	110	43	4	2	2-6 grid	100
Denek 9	126	31	4	2	2-4 grid	100
Denek 10	138	39	4	2	2-4 grid	100

*Kas ve yağ miktarı puanlama şeklinde değerlendirilmiştir. Puanlama detayları mikroskopik değerlendirme (4.4.2) bölümünde belirtilmiştir.

**Greft kalınlığı x4 büyütmede ökülometre ile ölçülmüştür (1grid=0.25mm)

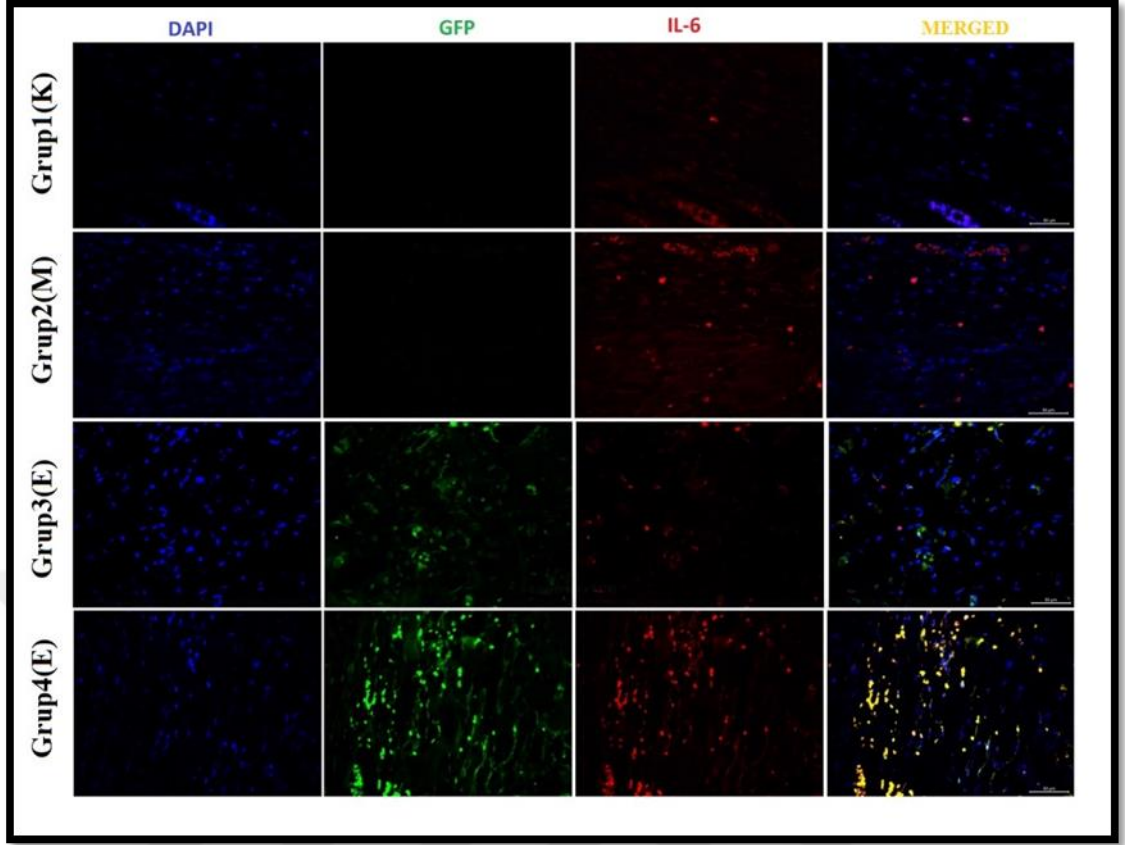
5.3. İŞARETLİ KÖK HÜCRELERE AİT BULGULAR



Şekil 16: Kompozit greftlerde damar oluşumu (CD31) ve YDKKH'lerin GFP immünfloresan boyama ile gösterilmesi. Beyaz oklar pozitif boyanmayı göstermektedir. (Ölçüm çubukları, 50 μ m)

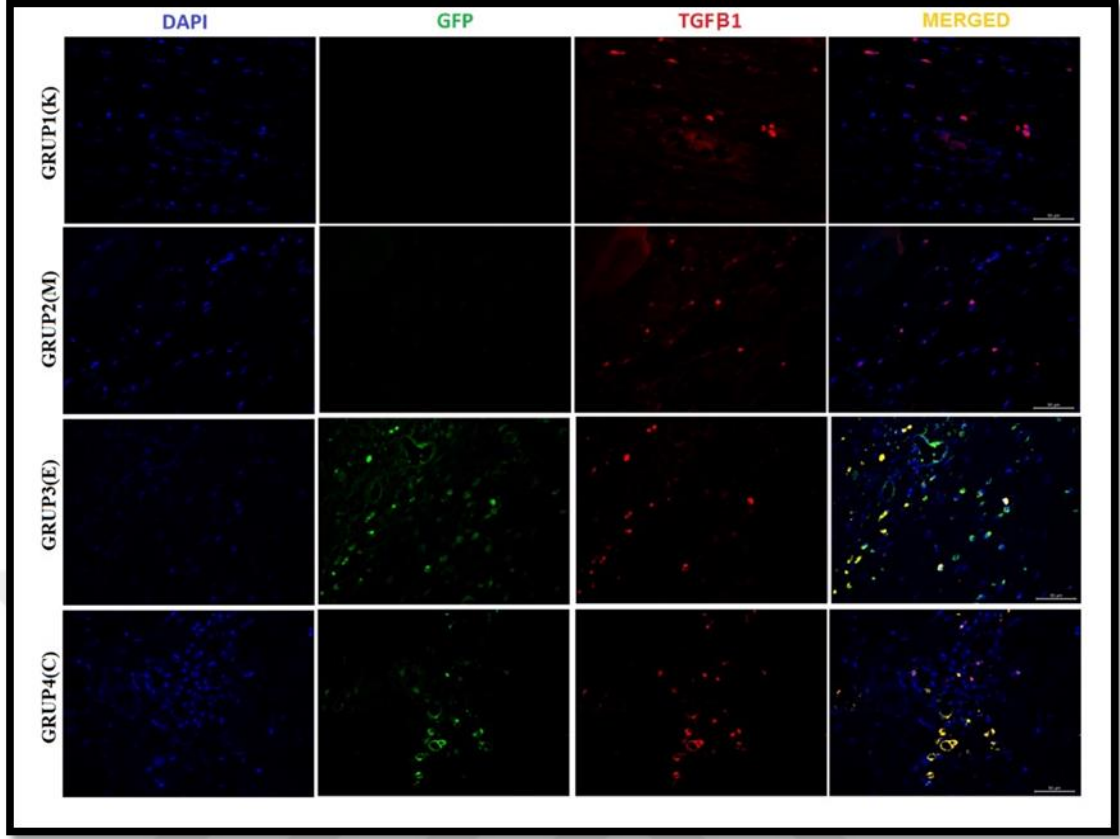
Yapılan immunfloresan boyamalar ile kök hücrelerin greft üzerindeki olası etkileri gösterilmeye çalışılmıştır. GFP ile işaretlenmiş kök hücreler Şekil 16, Şekil 17 ve Şekil 18'de görülmektedir. GFP ile boyanmanın Grup 4(C)'de boyama yapılan deneklerde Grup 3(E)'de boyama yapılan deneklere göre fazla olduğu gözlenmiştir.

VEGF ile yapılan işaretlemeler sonrasında boyanan alanlar damar oluşumları lehine değerlendirilmiştir. Transplante edilen kök hücrelerin damar oluşumuna katkısının değerlendirilmesi için CD31 ve GFP boyamaları uygulanmıştır. Grup 3(E) ve Grup 4(C)'de boyama yapılan deneklerde diğer gruplara göre daha fazla damar oluşumu gözlenmiştir.



Şekil 17: Kompozit greftlerde YDKKH'lerin GFP ve IL6 işaretli hücrelerin immünfloresan boyama ile gösterilmesi. (Ölçüm çubukları, 50 μ m)

IL6 ve TGF β 1 ile yapılan işaretlemeler sonrasında fibrotik dokuların izlendiği alanlarda ve inflamatuvar sürece ait bulguların olduğu alanlarda yaygın boyama olduğu gözlenmiştir. GFP boyaması ile bu bölgelerde kök hücrelerin de olduğu gözlenmiştir.



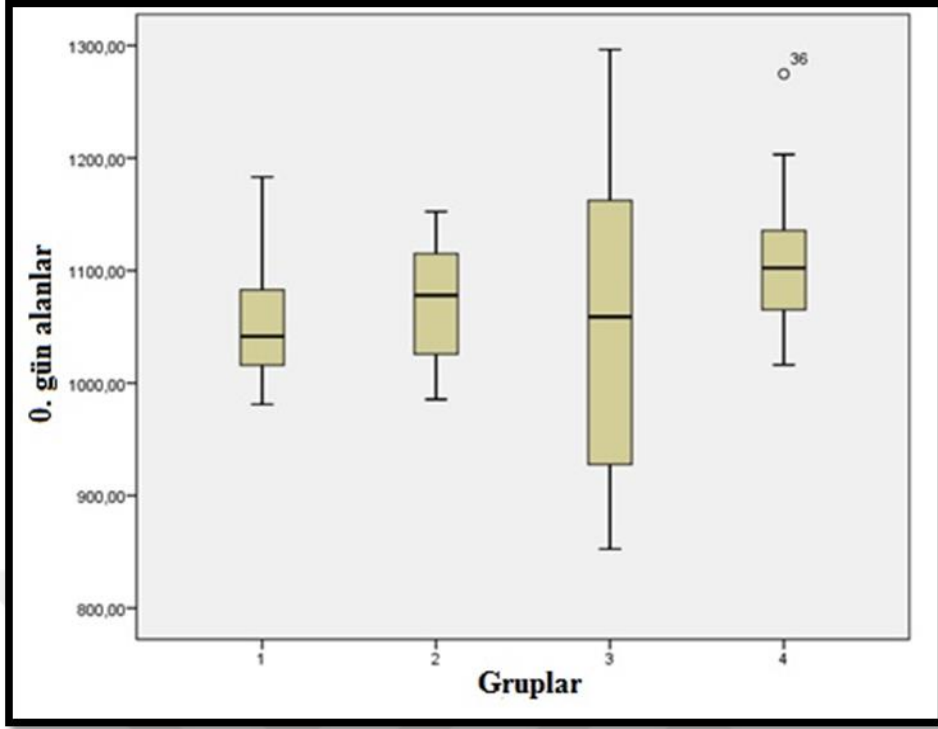
Şekil 18:Kompozit greftlerde YDKKH'lerin GFP ve TGFβ1 işaretli hücrelerin immünfloresan boyama ile gösterilmesi. (Ölçüm çubukları, 50 μm)

5.4. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

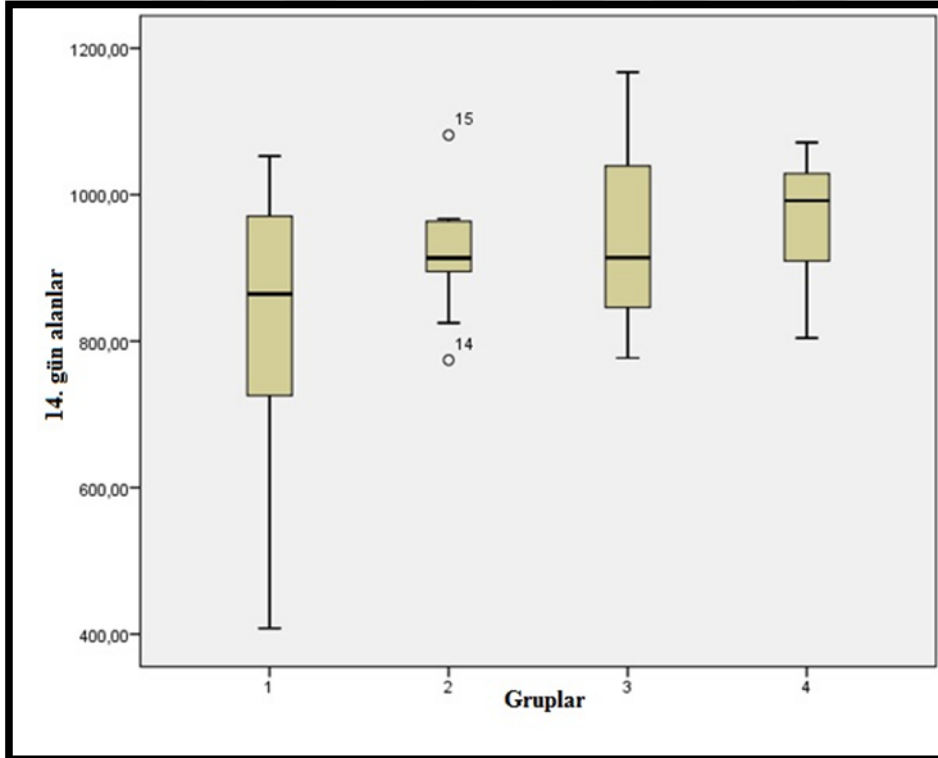
Yapılan istatiksiksel değerlendirmeler sonrasında deneklere ait çalışma öncesi ağırlıkdağılımının Kolmogorov-Smirnov testine göre normal dağılıma uygunluk gösterdiği ve grupların ağırlıkları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

Gruplara ait makroskopik görüntülemeler sonrasında elde edilmiş olan 0.gün, 14.gün, 21.gün ve 28.gün alan ölçümlerinin Kolmogorov-Smirnov testine göre normal dağılıma uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Grupların alan ölçümleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

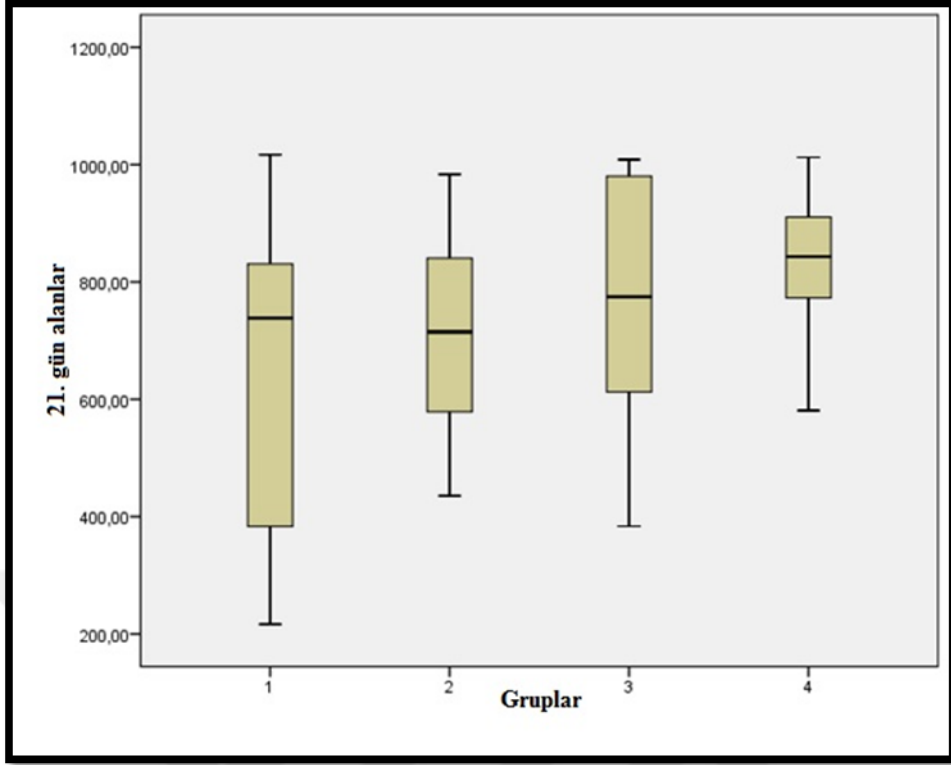
Gruplara ait mikroskopik görüntülemeler sonrasında elde edilmiş olan kas ve yağ ölçümlerinin Kolmogorov-Smirnov testine göre normal dağılıma uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Grupların kas ve yağ miktarları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).



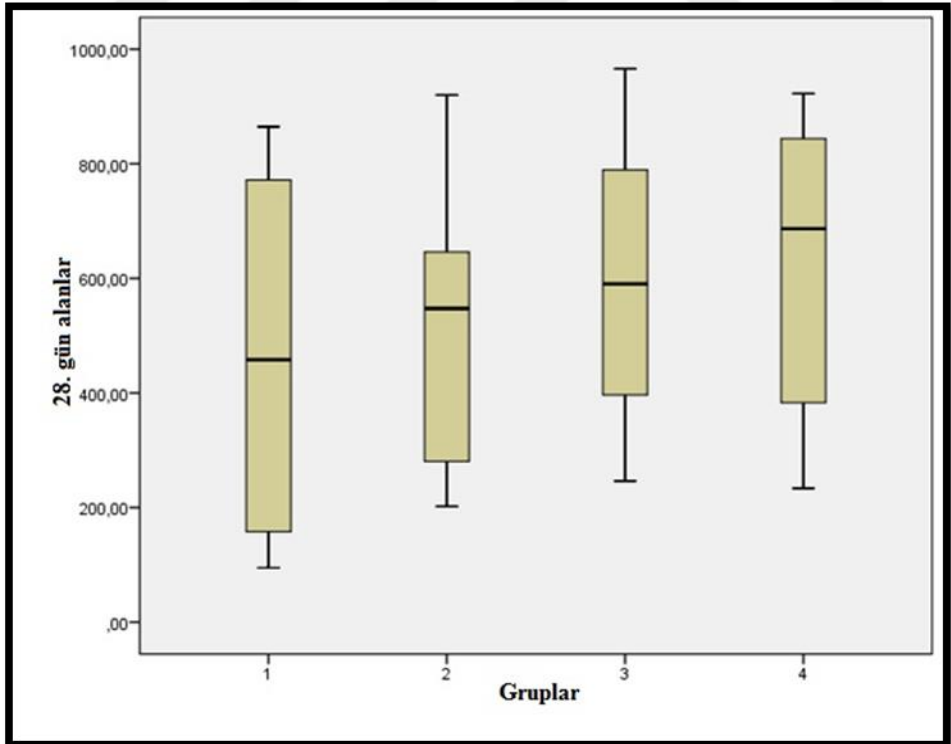
Şekil 19: 0. gün alanların gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi



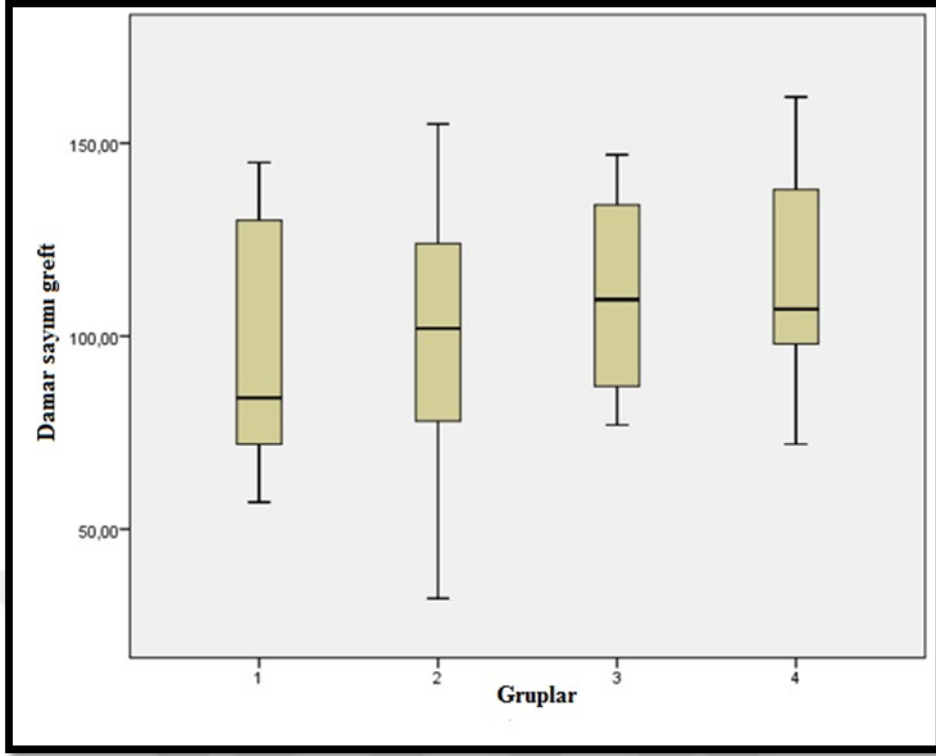
Şekil 20: 14. gün alanların gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi



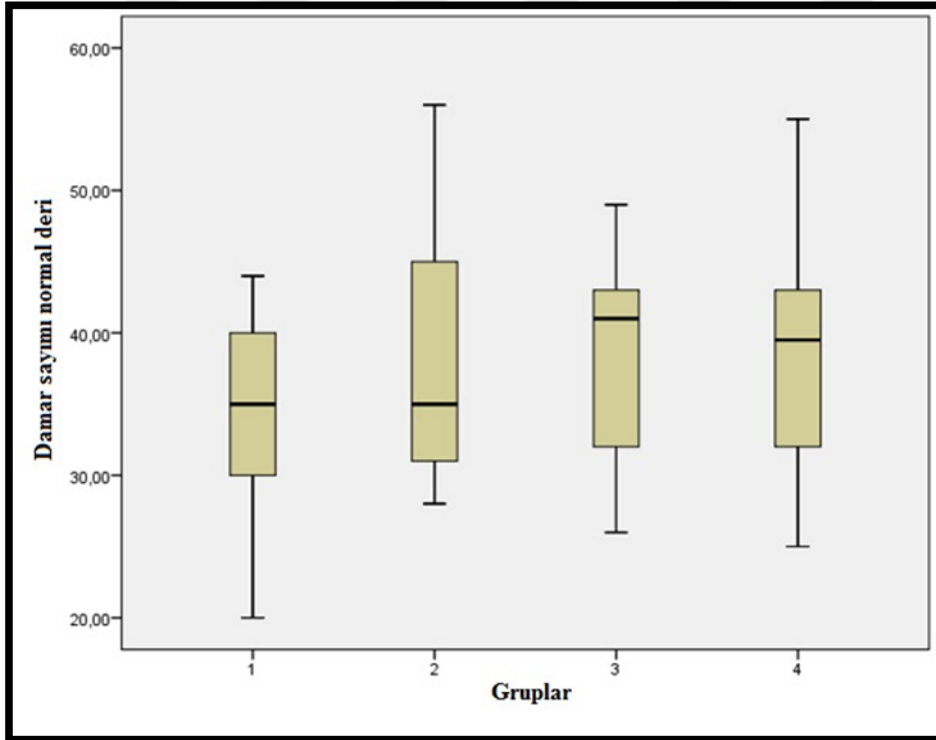
Şekil 21: 21. gün alanların gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi



Şekil 22: 28. gün alanların gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi



Şekil 23: Greft içerisindeki damar sayısının gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi



Şekil 24: Normal deri içerisindeki damar sayısının gruplara göre dağılımının grafik ile gösterimi

6. TARTIŞMA

Yaralanmalar ve tümör eksizyonları sonrasında doku kayıpları ülkemizde ve dünyada gelişen tıbbi tedavi seçeneklerine rağmen önemli bir sağlık sorunu oluşturmaya devam etmektedir. Deri greftleri bu yaraların kapatılması için en sık tercih edilen yöntemdir. Oluşması istenmeyen ancak uzun dönemde oluşabilen özellikle ekstremiteler gibi hareketli alanlarda oluşan kontraktürler, sürekli temasa mağruz kalan bölgelerde açılan yaralar, gizlenmesi güç olan bölgelerdeki kötü görünüm, hastaları psiko-sosyal olarak olumsuz yönde etkilemektedir. Greftin tutmaması sonrası uzun süre devam eden açık yaralar hastalarda sosyal izolasyon, duygusal stres ve depresyona yol açabilmektedir.

Greft sağ kalımını arttırmak, alıcı sahanın iyileştirilmesi, greftlere ait sekonder kontraksiyonun azaltılması gibi konularda literatürde greftler ile ilgili farklı birçok çalışmayı bulmak mümkündür. Örneğin, bir çalışmada Hamuy ve arkadaşları farelerdeki açık yaraları onarmak için tek seansta; yapay dermis, KKDG ve fibroblast büyüme faktörünü kombine ederek kullanmışlardır. İki ayrı seansta yapılan onarıma göre; üç aylık takip süresi sonrasında, tek seanslı onarımlarda derinin daha elastik olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca çalışmacılar KKDG ve yapay dermiskombine kullanımı ile KKDG, yapay dermis ve fibroblast büyüme faktörü kombine kullanımı arasında ilk haftalarda belirgin farklar olmasına karşın, üçüncü ay sonuçlarına göre greft tutabilirliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuşlardır(32). Domuzlarda yapılan başka bir çalışmada tam kat doku kaybı oluşturulmuş ve YDKKH uygulanmıştır. Çalışmada kök hücrelerin nedbe oluşumu ve yaranın yeniden şekillenmesine olan etkileri araştırılmıştır. YDKKH uygulanan grupta, YDKKH uygulanmayan gruba göre daha küçük nedbe olduğu ve oluşan nedbe dokusunun özelliklerinin normal dokuya daha yakın olduğu izlenmiştir(33).

Kliniğimizde yapılmış kompozit greft sağkalımını arttırmaya yönelik yapılmış bir çalışmada da mezenkimal doku kaynaklı kök hücrelerin kondrokutanöz kompozit greftlerin üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada mezenkimal kök hücrelerin greft yatağına önceden uygulandığı takdirde kompozit greft sağkalımının arttığı ve kontraksiyonun azaldığı gözlenmiştir(34).

Farklı çalışmalarda da YDKKH'ler dermis iskelesi ("dermal scaffold" yerine kullanıldı) içerisinde bekletilerek uygulanmış; damarlanma, kollajen sentezi, cilt rejenerasyonu ve dokuya bütünleşmenin arttığı bildirilmiştir(35, 36).Farklı zamanlarda uygulamalar gibi eşzamanlı kombine uygulamaların etkinlikleri de araştırılmıştır. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada TKDG ve fibroblast hücre kültürü kombine kullanılmış, fibroblast kültürünün canlı bir dokuya dermal destek ile verildiği zaman gerileme göstermediği izlenmiştir. Fibroblast kültürünün yara iyileşmesine katkıda bulunduğu, kontraksiyonu azalttığı, neovaskülarizasyona ve kollajen sentezine katkı sağladığı gösterilmiştir(37).

TKDG sağkalımını arttırmayı amaçlayan bir çalışmada da YDKKH'ler kullanılmış ve uygulanmayan gruba göre anlamlı olarak sağkalımın arttığı izlenmiştir. VEGF ve TGF β 3' ün yeni damar oluşumu üzerinde pozitif etkileri olduğu vurgulanmış ayrıca hızlı damarlanmaya ihtiyaç duyabilecek diğer organ nakillerinde de bu parametrelerin önemli olacağına değinilmiştir(38). Bir çalışmada iskemi reperfüzyon hasarına karşı YDKKH'ler kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Hasarı azaltan mekanizmalar arasında kök hücrelerin büyüme faktörleri salgılamasına değinilmiş ve VEGF'in en büyük etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır(26).

Kök hücre uygulamaları günümüzde araştırılmaya devam eden, farklı alanlarda olumlu sonuçları tespit edilmiş ve plastik cerrahi de dahil olmak üzere birçok tıbbi alanda popülerlik kazanmış yöntemlerdir(25, 39, 40).Erişkin kaynaklı kök hücreler, embriyojenik kök hücrelere nazaran daha az dönüşüm göstermeleri ancak daha güvenilir olmaları nedeniyle çalışmalarda tercih edilmektedir(41).Kök hücre etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır ancak kök hücrelerin ortama konulduktan sonra diferansiyon ve transdiferasyon ile dokuya özel hücreler dönüşmeleri ile olmaktadır. Ayrıca parakrin etki ile faktörler salgılayan kök hücreler ortamdaki hücrelerin işlevini de şekillendirmektedir. Bu mekanizmaların tümü yara iyileşme sürecine katkıda bulunmaktadır(42).Kök hücre etki mekanizmalarının araştırılması ve sonrasında kök hücrelerin istenilen özelliklere göre şekillendirilmesi kök hücre uygulamalarının olumlu sonuçlarını arttıracaktır(14, 43).

Günümüzde en sık kök hücre temini kemik iliği ve yağ dokudan yapılmaktadır. Ancak kök hücreler deri, karaciğer dokusu, sindirim sistemi epiteli, dental pulpa, kıl folikülleri gibi alanlardan da temin edilebilmektedir. Bu dokulara zor ulaşılması ve yetersiz kök hücre temin edilmesi bu dokulara ait en büyük eksikliklerdir(9). Kemik iliği kaynaklı kök hücre alımının teknik olarak zor olması, ilerleyen yaş ile birlikte kök hücre sayısında azalma olması sonrasında yağ dokudan temin popülerlik kazanmıştır. Yağ doku kolay ulaşılabilir olması, yeterli miktarda hücre alım şansı tanınması ve harcanabilir olması gibi avantajlar sağlamaktadır(13, 44).

Yaş ile YDKKH arasındaki ilişkiyi inceleyen bir çalışmada yaştan bağımsız olarak YDKKH temin edilebileceği, ancak infantlardan elde edilen kök hücrelerin morfolojik olarak çubuk şeklinde görüldüğü, daha uzun telomeraz içerdikleri, anjiyogenik ve osteogenik etkilerinin yaşlılardan temin edilen hücrelere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir(45).

Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin anjiyogenez ve vaskülogenez özellikleri mevcuttur, ancak yağ dokudan alınan kök hücreler alındıkları anatomik alana göre proliferasyon ve apoptotik özellikleri anlamında farklılıklar gösterebilmektedir(13). Yağ dokudan alınan kök hücreler içerisinde CD31-/CD34+ olan altgrupun proliferasyon yeteneği yüksek, CD146+ olan altgrupun ise proliferasyon yeteneği düşüktür. CD31-/CD34+ altgrupun adipojenik özelliği ise diğer gruplara göre daha yüksektir(46). YDKKH kullanım yöntemlerini değerlendiren bir başka çalışmada ise lipoaspirat şeklinde kullanılan kök hücrelerde, kültür edilmiş kök hücrelere göre apoptozisin ve nekrozun daha az olduğu ve alt gruplara göre kök hücre özelliklerinde farklılıklar olabileceği belirtilmiştir(15). Farklı bir deneysel çalışmada da FTSG'ler YDKKH'ler kullanılarak prefabrike edilmiş, dokuların iyi beslendiğinin izlenmesi sonrasında greft olarak uygulanmış cilt flep haline getirilebilmiştir(27). Bir çalışmada da sıçanların karın bölgesinden fasyokutan greftler alınarak sıçanların sırt bölgesine uygulanmış ve kandan elde edilen CD133+ hücreler enjekte edilmiştir. Deney grubunda dermis kalitesinin ve damarlanmanın arttığı gözlenmiştir(47).

YDKKH'in işaretlenerek uygulandığı ve etki mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada; işaretli kök hücrelerin 28 gün içerisinde sayıca azaldığı ve iskemik dokularda kök hücre birikiminin daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada kök hücrelerin ortama konduktan sonra parakrin bir etki göstererek anjiogenez üzerinde etkileri olduğu bildirilmiştir(48). Başka bir çalışmada da YDKKH'lerin, kraniofasiyal onarımlardaki kullanımları, derlenmiş ve zedelenmiş yüzeylerde bile yağ greftleri ile kombine kullanımlarında, damarlanmayı arttırdıkları ve bu sayede greft emilimini azalttıkları bildirilmiştir(49). Farklı bir çalışmada ise VEGF transfekte edilen kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin, VEGF transfekte edilmemiş olan kemik iliği kaynaklı kök hücrelere göre yağ grefti sağkalımını arttırdığı, yağ nekrozu ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir(50). Benzer şekilde yağ grefti sağkalımını arttırmayı amaçlayan çalışmalarda da kök hücre uygulaması ile yağ grefti sağkalımının arttığı gözlenmiştir. Vasküler büyüme faktörlerinin ve yeni damarlanmanın arttığı bildirilmiştir(51-53).

Kök hücreler çoğunlukla üretilmelerinin ardından kullanılırlar ancak uygun soğutma koşullarında saklanarak, kök hücrelerin bölünme ve farklılaşma özelliklerini koruyabilecekleri gösterilmiştir(54). Çalışmamızda kök hücreler saklanmadan kullanılmıştır ancak benzer şekilde araştırmalar yapılarak kök hücrelerin saklanması sonrasında da akut yaralanmalardaki tedaviler için de kök hücre ve greft kombine kullanımı araştırılabilecektir.

Radyoterapi uygulanmış zeminlerde, kök hücre uygulaması sonrasında dokularda olumsuz etkilerin gerilediği bildirilmiştir(13).YDKKH kullanımı ile uygunsuz yara yatağında greft sağkalımının artabileceği öngörüsüyle yapılan bir çalışmada diyabetik sıçanlarda YDKKH uygulamasının TKDG sağkalımını arttırdığı tespit edilmiştir(20).Diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada endotelial progenitor hücreler verilen grupta yağ grefti sağkalımının verilmeyen gruba göre daha yüksek olduğu, dokuda damarlanmanın arttığı ve yağ greftlerin apoptozisin azaldığı görülmüştür(55).

Kontraksiyonu azaltmak için YDKKH kullanımı literatürde mevcuttur. Bir çalışmada Dupuytren kontraktüründe YDKKH denenmiş ve miyofibroblastlarda a-SMA protein ekspresyonunu azaltarak kontraksiyonu azalttığı bildirilmiştir. Peyroni hastalığı, akciğer fibrozisi, karaciğer fibrozisi gibi benzer özellikler gösteren durumlarda da YDKKH uygulamasının olumlu etkileri olabileceğinden bahsedilmiştir(56).

Cell sheet şeklinde kök hücre tabakalarının uygulaması yeni ve pahalı bir yöntemdir. Henüz yaygın kullanım şansı bulamamış olmasına rağmen bu yöntem homojen hücre dağılımı sağlaması, kolay uygulanabilir olması gibi diğer kök hücre çoğaltılması yöntemlerine göre artılara sahiptir. Çalışmamızda iki adet kök hücre uygulanma yöntemi kıyaslanmış, ısıya duyarlı kaplarda ve polisteren doku kaplarında çoğaltılan kök hücre tabakalarının etkileri enjeksiyon şeklinde uygulanan kök hücreler ile kıyaslanmıştır. Cell sheet şeklinde kök hücrelerin uygulandığı grupta makroskopik olarak diğer gruplara göre daha fazla sağkalım izlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. Uygulama kolaylığı sağlaması, açık yaranın tüm yüzeyine homojen olarak kök hücrelerin dağılmış olması gibi artılar içermesi ile cell sheet uygulaması, enjeksiyon şeklindeki uygulamaya göre farkları ile öne çıkmıştır. Mikroskopik olarak yapılan değerlendirmeler de benzer şekilde damar sayısı daha fazla bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Isıya duyarlı kaplar kullanılan grupta daha stabil neovaskülarizasyon, daha üstün epidermal morfogenez ve daha kısa zamanda üretim gözlenmiştir(30). Kök hücrelerin doku mühendisliği ile şekillendirilmesi sonrasında da hücre tabakaları farklı amaçlar için cilt altına uygulanarak deneylerde kullanılmaktadır(57). Tabaka şeklinde kullanım, tabakanın üzerindeki alanlarda dolaşım problemlerine yol açabilmektedir, literatürde 80µm'ye (üç tabaka) kadar sorunsuz kullanımlar bildirilmiştir. Daha kalın uygulamalar için aşamalı onarım önerilmiştir(31). Çalışmamızda tek tabaka şeklinde YDKKH kullanımı, greft dolaşımını bozmaması açısından tercih edilmiştir.

Greft uygulaması için uygun zemin olmasına rağmen, uzun dönemde oluşabilecek problemleri engellemek için bazı durumlarda flepler ile onarım tercih edilmektedir. Kısıtlı hallerde ve küçük alanlarda kompozit greftler de onarımda kullanılabilir.

Çalışmamızda, fleplere göre teknik olarak daha kolay ve kısa sürede uygulanan, görüntü olarak fleplere yakın sonuçları olabilecek ve donör saha tercihleri açısından daha zengin seçenekler sunan kompozit greft kullanımı yara onarımı için tercih edildi. Bu yöntemin en önemli dezavantajı sağkalım oranlarının düşük olması ve bu yüzden çok küçük alanlarda klinik olarak tercih edilmesidir.

Çalışma literatürde greft ve flep ile onarımlar için sıkça kullanılan Wistar-albino cinsi sıçanlarda planlandı.

Yaş, yara iyileşmesinde gecikme ve bozulmaya yol açmaktadır. Sıçanlarda ağırlık ve yaş arasında doğru bir oran mevcuttur, bu bilgiler ışığında 300gr üzerinde sıçanlar seçildi. Östrojen değişiklikleri olabilmesi ve östrojenin yara iyileşmesine olan etkilerinin dışlanabilmesi için erkek sıçanlar çalışmada kullanıldı(58).

Deri greftleri geç dönemde, uygulama esnasındaki dermis kalınlığı ile ters orantılı olarak kontraksiyon oluşturmakta ve daha güzel kozmetik sonuçlar oluşturmaktadır(8).Erkek sıçanların daha kalın derisinin olması çalışmada kalın greftlerin elde edilmesine olanak sağladı(58).

Sıçanların sırtının hareketli olması ve rahat uygulama yapılabilmesi göz önünde bulundurularak sırtta yara modeli kullanıldı. Sıçanlarda yaralar reepitelizasyon ve kontraksiyon ile iyileşmektedir. Kontraksiyon ile iyileşme için çalışmalarda dişi sıçanlar tercih edilmektedir. Kontraksiyon ile iyileşme için en az 4cm² genişlikte kare şeklinde yara modeli önerilmektedir(58).

Çalışmamızda kontraksiyon ile iyileşmeyi azaltabilmek ve greft tutabilirliğini rahat değerlendirebilmek için 3x3cm (9cm²) yara modeli oluşturuldu.

Literatürde KKDG, TKDG ve kondrokutanöz kompozit greftlerde yaşayabilirlik üzerine çokça çalışma mevcuttur. Greft uygulaması esnasındaki greft kalınlığının artması, greft yaşayabilirliği olumsuz etkilemektedir. Çalışmamızda panniculus carnosus kasını da içerecek şekilde derin sırt kasları ve fasyaları korunarak tam kat doku kaybı modeli cerrahi olarak oluşturuldu. Panniculus carnosus kasının TKDG'ne eklenmesi ile greft kalınlaştırılması hedeflendi. Eksize edilen doku kendi etrafında 180⁰ döndürülerek, Eckhaus ve arkadaşlarının çalışmasında tariflediği gibi muskulokutanöz kompozit greft olarak kullanıldı(59).

Hematom oluşumunu engellemek için dikkatli diseksiyon yapıldı ve elektrokoter ile kanama kontrolü uygulandı. Postoperatif takiplerde hematom oluşumu izlenmedi.

Çalışmamızda fotoğraf ile alan ölçümü ve renk analizi ile greft sağkalımının ölçülmesi planlandı. Fotoğraf çekimlerinde, dış ışıktan ve gölgelerden olabildiğince az etkilenme olması için tüm fotoğraf çekimleri ışık almayan karanlık bir odada yapıldı. Çekimlerde yansıyan ışığa ait parlamaları azaltmak için sirküler polarize filtre kullanıldı ve çekimler genellikle fotoğrafçılıkta kullanılan ışıklı kutu (light box) düzeneği içerisinde gerçekleştirildi. Takipler sırasında birçok greftte epiderminin soyulması üzerine miyokutanöz kompozit doku greftlerinde sadece histopatolojik olarak nekroz ve ülserasyon değerlendirilmesi yapılmasına karar verildi. Literatürde demiyokutanöz kompozit greft kullanımında epidermiste soyulma olabileceği bildirilmiştir(59).

Çalışmamızda iki adet kontrol ve iki adet deney grubu kullanılmıştır. Kontrol gruplarından birine sadece yara oluşturulması ve kompozit greft ile yaranın onarımı basamakları uygulanmıştır [Grup1(K)-kontrol]. İkinci kontrol grubunda kontrol grubundaki işlemlere ilaveten kompozit greft uygulaması öncesinde 0.4cc(40IU) taşıyıcı medium solüsyonu greft ve yara içerisine sekiz adet alana, her alana 5IU gelecek şekilde enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işlemi ve taşıyıcı mediuma ait olan etkilerin araştırılması hedeflenmiştir [Grup2(M)-medium].

Deney gruplarından birine kontrol grubundaki işlemlere ilaveten kompozit greft uygulaması öncesinde 0.4cc(40IU) taşıyıcı medium solüsyonu içerisinde 4×10^6 VEGFTE-YDKKH greft ve yara içerisine sekiz adet alana, her alana 5IU gelecek şekilde enjekte edilmiştir [Grup3(E)-enjeksiyon]. Benzer şekilde enjeksiyon ile kök hücre uygulamaları literatürde mevcuttur, ancak kök hücrelerin uygulanması gereken miktar konusunda ortak bir görüş yoktur.

Farklı çalışmalarda çok değişik miktarlarda uygulamalar tarif edilmiştir(60). İkinci deney grubunda kontrol grubundaki işlemlere ilaveten kompozit greft uygulaması öncesinde alıcı alan üzerine hücre tabakası şeklinde 4×10^6 VEGFTE-YDKKH uygulanmıştır. Bu grupta enjeksiyon işlemi uygulanmadığı için dokuların daha az travmatize olacağı ve ödem oluşumunun daha az olacağı düşünülmüştür. Aynı zamanda her bölgeye kök hücrelerin homojen olarak dağılacağı ve daha etkin bir tedavi olabileceği öngörülmüştür [Grup 4(C)-cell sheet].

Makroskopik takipleri sırasında zaman ile tüm gruplardaki greftli alanların küçüldüğü izlenmiştir. Deney grupları olan Grup 3(E) ve Grup 4(C)'de daha fazla makroskopik sağkalım izlenmiştir. Ancak istatistiksel olarak gruplar arasında bir fark saptanamamıştır. Grupların mikroskopik olarak saptanan değerleri Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10'da görülmektedir.

Mikroskopik olarak ölçüleme yapılan değerlerde de benzer sonuçları gördüğümüz çalışmamızda Grup3(E) ve Grup4(C)'de diğer gruplara göre daha fazla kas dokusu izlenmiş ve daha fazla damar sayısı saptanmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Grupların arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamasının olası nedenlerini araştırdığımızda, sıçanların yaşlı olması sonrasında yara iyileşmesinin gecikmesi ve bireysel farklılıkların daha belirgin hale gelmesi sonrasında standart sapmaların büyümesi olası bir etken olarak kaşımıza çıkmaktadır.

Diğer olası bir etken takip süresidir. Çalışmamızda takip süresi bir ay olarak sınırlandırılmıştır. Ancak daha uzun takip süresi ile kök hücrelerin sağkalıma olan etkisinin daha belirgin hale gelebileceği ve makroskopik olarak kontraksiyonun daha belirgin olabileceği düşünülmüştür. Gruplardaki alan değişimleri; Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5 ve Tablo 6' da gösterilmiştir.

Ayrıca sayısal ve görsel olarak makroskopik farklar olmasına karşın grupların arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmaması gruplardaki denek sayısının az olması ve istatistiksel olarak gruplardaki standart sapmaların büyük olması ile ilişkilendirilebilir(çalışmanın gücü). Bu olası etkeni ortadan kaldırmak için daha fazla denek ile benzer çalışmanın yapılması, iki uygulama yönteminin sağkalıma olan etkilerini daha uygun şekilde yansıtmaya yardımcı olabilecektir. Literatürde ilk kez iki farklı kök hücre uygulamasının kıyaslandığı çalışmamızın istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar alınamamış olmasına rağmen, gelecekte yapılabilecek benzer çalışmalar için yol gösterici olmasını ümid ediyoruz.

7. SONUÇLAR

Çalışmamızda miyokutanöz kompozit greftlerde yaşayabilirliği arttırmak ve güvenilir bir şekilde daha geniş ölçülerde kompozit greft kullanımına olanak sağlamak amacıyla YDKKH kombine uygulamasının etkinliği araştırıldı. Literatürde kompozit greft yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik anjiogenik potansiyeli olan ve antiinflamatuvar etkinliği olan ajanlar denenmiş olup bunların olumlu etkileri bildirilmiştir. Ancak bu ajanlar klinik olarak uygulama alanı bulamamıştır. Bu yüzden kompozit greft uygulamalarında, kök hücrelerin kombine olarak uygulanmasının sağkalıma katkı sağlayan yeni bir tedavi olabileceği inancındayız.

Takip süresi boyunca VEGFTE-YDKKH uygulanmış olan gruplarda greft sağkalımının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu ve greftlerin daha az sekonder kontraksiyona uğradığı makroskopik olarak gözlemlendi. Mikroskopik olarak da kök hücre uygulanmış olan gruplarda damar sayısında artış ve kas miktarında diğer gruplara göre daha yüksek sağ kalım gözlemlendi. Ancak çalışmamızda planlandığı gibi kök hücrelerin kombine uygulanmasının sağkalıma olan etkilerinin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

8. ÖZET

Yanıklar, kazalar, kitle eksizyonları gibi birçok durum sonrasında geniş ve kompleks açık yaralar oluşabilmektedir. Bu yaraların onarımında en sık kullanılan yöntemlerden bir tanesi greft ile onarımlardır.

Etki mekanizmaları aydınlatıldıkça daha da popüler bir tedavi haline gelen kök hücre uygulamaları günümüzde farklı tıp branşları tarafından kullanılmaktadır.

Çalışmamızın amacı kök hücrelerin dokuda yeni damar oluşumunu artırıcı ve yara iyileşmesini hızlandırıcı etkilerinden faydalanarak büyük alanlarda kompozit greftlerin tek seansta uygulanabilmesini sağlayabilmektir.

Çalışmaya 40 adet ağırlıkları 351–465 gr. arasında değişen Wistar albino cinsi erkek sıçanlar dahil edildi. Sıçanlar rastgele dört gruba bölündü. Sıçanların sırtında 3x3cm tam kat doku kaybı oluşturuldu. Oluşturulan doku kaybı onarımı için cerrahi olarak çıkarılan doku panniculus carnosus kasını da içerecek şekilde kompozit greft olarak kullanıldı. Çalışmamızda VEGF geni trasfekte edilmiş yağ doku kaynaklı kök hücreler iki farklı uygulama yöntemi ile kullanıldı. Deney gruplarından birinde deneklere 4×10^6 kök hücre enjekte edilerek, diğerinde tek tabaka olacak şekilde 4×10^6 kök hücre “cell sheet” olarak uygulandı.

Sıçanlar 4 hafta boyunca takip edildi. 2. hafta sonunda tie-over pansumanları açılan sıçanlar haftalık olarak standart olarak fotoğraflandı ve sağlam greft alanı ölçümleri yapıldı. 4. hafta sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek greftlerden alınan örnekler mikroskopik olarak ve immunfloresan boyama ile değerlendirildi. Greftlerdeki damar sayımları, kas miktarları ve yağ miktarları değerlendirildi. VEGF, IL6, CD31, TGF β 1 ve GFP boyamaları uygulandı.

İstatistiksel olarak makroskopik ve mikroskopik olarak gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Anahtar kelimeler: Cell sheet, kök hücre, kompozit greft

9. ABSTRACT

Large and complex defects can occur after burns, accidents and tumor resections. Skin grafts are frequently used for treatment of these defects.

Stem cell therapies which have increasing popularity due to discovered new effect mechanisms, are used in some medical departments.

Aim of our study is to use neovascularisation and healing effects of stem cell therapy to increase the survival rate of large composit grafts in single stage application.

The study was planned in 40 male Wistar albino rats, weights between 351-465gr. Rats were randomly divided into four groups. 3x3cm full thickness skin including panniculus carnosus muscle was surgically removed from the back of the rats and a complex skin defect was made.

Adipose derivated VEGF gene transfected stem cells were used with two different methods. In the first experiment group 4×10^6 stem cells were used with injection, in the second experiment group 4×10^6 stem cells were used as a cell sheet.

Rats were followed four weeks. After the second week tie-over dressings were removed and standart photographs were taken in weekly basis to evaluate macroscopic area. After four weeks rats were sacrificed and samples were evaluated with immunfluorescent and microscopic methods.

Vascular count, fat and muscle mass was evaluated. VEGF, IL6, CD31, TGF β 1 and GFP dyes were used.

Statistically no significant difference were found between the groups.

Key words: Cell sheet, stem cell, composit graft

10. KAYNAKLAR

1. PalettaE, PokornyJ, RumboloP. Skin Grafts. In: MathesS, editor. Plastic Surgery. 1. 2 ed: Saunders; 2006. p. 293-316.
2. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, et al. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. Plastic and reconstructive surgery. 2008;121(1):59-69.
3. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. Plastic and reconstructive surgery. 2008;121(1):50-8.
4. LorenzP, LongakerM. Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment. In: MathesS, editor. Plastic Surgery. 1. 2 ed: Saunders; 2006. p. 209-35.
5. Fang R, Mustoe T. Structure and Function of the Skin. In: Eriksson E, Persing J, Chung K, Disa J, Gosain A, Kinney B, et al., editors. Plastic Surgery: Indications and Practice. 1: Saunders/Elsevier; 2009. p. 105-12.
6. Buchanan P, Lorenz H. Wound Healing, Including Fetal Skin Healing. In: ErikssonE, PersinJ, ChungK, DisaJ, GosainA, KinneyB, et al., editors. Plastic Surgery: Indications and Practice. 1: Elsevier/Saunders; 2009. p. 9-26.
7. Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. Plastic and reconstructive surgery. 1998;102(1):124-31; discussion 32-4.
8. Senchenkov A, Valerio I, Manders K. Grafts. In: ErikssonE, PersinJ, ChungK, DisaJ, GosainA, KinneyB, et al., editors. Plastic Surgery Indications and Practice. 1: Saunders Elsevier; 2009. p. 95-105.
9. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. Molecular biology of the cell. 2010;21(11):1783-7.
10. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue engineering. 2001;7(2):211-28.
11. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular biology of the cell. 2002;13(12):4279-95.
12. Campbell CA, Cairns BA, Meyer AA, Hultman CS. Adipocytes constitutively release factors that accelerate keratinocyte proliferation in vitro. Annals of plastic surgery. 2010;64(3):327-32.

13. Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-Doko A, Marra KG. Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Annals of plastic surgery*. 2011;66(2):210-5.
14. Brown SA, Levi B, Lequeux C, Wong VW, Mojallal A, Longaker MT. Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010;126(6):1936-46.
15. Wang WZ, Fang XH, Williams SJ, Stephenson LL, Baynosa RC, Wong N, et al. Analysis for apoptosis and necrosis on adipocytes, stromal vascular fraction, and adipose-derived stem cells in human lipoaspirates after liposuction. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013;131(1):77e-85e.
16. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology*. 2009;132(5):533-46.
17. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2008;34(9):1178-85.
18. Stosich MS, Mao JJ. Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery. *Plastic and reconstructive surgery*. 2007;119(1):71-83; discussion 4-5.
19. Gao W, Qiao X, Ma S, Cui L. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011;15(12):2575-85.
20. Zografou A, Papadopoulos O, Tsigris C, Kavantzias N, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, et al. Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rats. *Annals of plastic surgery*. 2013;71(2):225-32.
21. Semenza GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;102(4):840-7.
22. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, NY)*. 1997;275(5302):964-7.
23. ShigeruI, SatoshiK, MasahiroS, JojiA, NaomiS, TakashiN. Bone Marrow Cell Implantation Improves Flap Viability After Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Plast Surg* 2004;52(April):414-8.

24. Li H, Zan T, Li Y, Weng R, Yang M, Du Z, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells promotes formation of prefabricated flap in a rat model. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2010;222(2):131-40.
25. Pelacho B, Mazo M, Gavira JJ, Prosper F. Adult stem cells: from new cell sources to changes in methodology. *Journal of cardiovascular translational research*. 2011;4(2):154-60.
26. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2009;124(3):804-15.
27. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Annals of plastic surgery*. 2010;65(2):237-44.
28. Nagase K, Kobayashi J, Okano T. Temperature-responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. 2009;6 Suppl 3:S293-309.
29. Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Sakurai Y, Umezu M, Okano T. Control of cell adhesion and detachment using temperature and thermoresponsive copolymer grafted culture surfaces. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2004;69(1):70-8.
30. Cerqueira MT, Pirraco RP, Santos TC, Rodrigues DB, Frias AM, Martins AR, et al. Human Adipose Stem Cells Cell Sheet Constructs impact epidermal morphogenesis in full-thickness excisional wounds. *Biomacromolecules*. 2013.
31. Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, et al. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(6):708-10.
32. Hamuy R, Kinoshita N, Yoshimoto H, Hayashida K, Houbara S, Nakashima M, et al. One-stage, simultaneous skin grafting with artificial dermis and basic fibroblast growth factor successfully improves elasticity with maturation of scar formation. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 2013;21(1):141-54.
33. Yun IS, Jeon YR, Lee WJ, Lee JW, Rah DK, Tark KC, et al. Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2012;38(10):1678-88.
34. Yücel E. Kompozit greftlerde yaşayabilirliği arttırmak için yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kullanılması [Uzmanlık tezi]: Kocaeli Üniversitesi; 2012.

35. Meruane MA, Rojas M, Marcelain K. The use of adipose tissue-derived stem cells within a dermal substitute improves skin regeneration by increasing neoangiogenesis and collagen synthesis. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;130(1):53-63.
36. Huang SP, Hsu CC, Chang SC, Wang CH, Deng SC, Dai NT, et al. Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect. *Annals of plastic surgery*. 2012;69(6):656-62.
37. Sakrak T, Kose AA, Kivanc O, Ozer MC, Cosan DT, Soyocak A, et al. The effects of combined application of autogenous fibroblast cell culture and full-tissue skin graft (FTSG) on wound healing and contraction in full-thickness tissue defects. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2012;38(2):225-31.
38. Zografou A, Tsigris C, Papadopoulos O, Kavantzias N, Patsouris E, Donta I, et al. Improvement of skin-graft survival after autologous transplantation of adipose-derived stem cells in rats. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2011;64(12):1647-56.
39. Eryilmaz T, Oktem F, Durgun M, Ozakpinar R, Tellioglu AT. Stem cell studies in plastic surgery: are plastic surgery journals really interested in stem cells? *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;129(3):604e-6e.
40. Ko SH, Nauta A, Wong V, Glotzbach J, Gurtner GC, Longaker MT. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plastic and reconstructive surgery*. 2011;127 Suppl 1:10S-20S.
41. Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010;126(4):1163-71.
42. Li H, Fu X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell and tissue research*. 2012;348(3):371-7.
43. Hyun JS, Montoro DT, Lo DD, Flynn RA, Wong V, Chung MT, et al. The seed and the soil: optimizing stem cells and their environment for tissue regeneration. *Annals of plastic surgery*. 2013;70(2):235-9.
44. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem cells*. 2012;30(5):804-10.
45. Wu W, Niklason L, Steinbacher DM. The effect of age on human adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013;131(1):27-37.
46. Li H, Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plastic and reconstructive surgery*. 2011;128(3):663-72.

47. Nakanishi M, Ishikawa M, Sunagawa T, Yokota K, Asahara T, Ochi M. The effects of CD133-positive cells to a nonvascularized fasciocutaneous free graft in the rat model. *Annals of plastic surgery*. 2009;63(3):331-5.
48. Suga H, Glotzbach JP, Sorkin M, Longaker MT, Gurtner GC. Paracrine Mechanism of Angiogenesis in Adipose-Derived Stem Cell Transplantation. *Annals of plastic surgery*. 2013.
49. Marra KG, Rubin JP. The potential of adipose-derived stem cells in craniofacial repair and regeneration. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2012;96(1):95-7.
50. Chang L, Wang J, Zheng D, Zhang B, Fan Q, Zhu C, et al. Improvement of the Survival of Autologous Free-Fat Transplants in Rats Using Vascular Endothelial Growth Factor 165-Transfected Bone Mesenchymal Stem Cells. *Annals of plastic surgery*. 2013.
51. Butala P, Hazen A, Szpalski C, Sultan SM, Coleman SR, Warren SM. Endogenous stem cell therapy enhances fat graft survival. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;130(2):293-306.
52. Zhu M, Zhou Z, Chen Y, Schreiber R, Ransom JT, Fraser JK, et al. Supplementation of fat grafts with adipose-derived regenerative cells improves long-term graft retention. *Annals of plastic surgery*. 2010;64(2):222-8.
53. Lu F, Li J, Gao J, Ogawa R, Ou C, Yang B, et al. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by using VEGF-transfected adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2009;124(5):1437-46.
54. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;121(2):401-10.
55. Hamed S, Ben-Nun O, Egozi D, Keren A, Malyarova N, Kruchevsky D, et al. Treating fat grafts with human endothelial progenitor cells promotes their vascularization and improves their survival in diabetes mellitus. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;130(4):801-11.
56. Verhoekx JS, Mudera V, Walbeehm ET, Hovius SE. Adipose-derived stem cells inhibit the contractile myofibroblast in Dupuytren's disease. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013.
57. Obokata H, Yamato M, Tsuneda S, Okano T. Reproducible subcutaneous transplantation of cell sheets into recipient mice. *Nature protocols*. 2011;6(7):1053-9.

58. Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound repair and regeneration* : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2004;12(6):591-9.
59. Eckhaus AA, Fish JS, Skarja G, Semple JL, Sefton MV. A preliminary study of the effect of poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) beads on angiogenesis in rodent skin grafts and the quality of the panniculus carnosus. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;122(5):1361-70.
60. Gir P, Oni G, Brown SA, Mojallal A, Rohrich RJ. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;129(6):1277-90.

