

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**YAĞ KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN RADYASYON HASARINA  
UĞRAMIŞ ALANLARDAN KALDIRILAN RASTGELE CİLT FLEPLERİN  
YAŞAYABİLİRLİĞİNE OLAN ETKİSİ**

Dr. Mustafa HASDEMİR

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİMDALI  
UZMANLIK TEZİ

2014

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**YAĞ KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN RADYASYON HASARINA  
UĞRAMIŞ ALANLARDAN KALDIRILAN RASTGELE CİLT FLEPLERİN  
YAŞAYABİLİRLİĞİNE OLAN ETKİSİ**

Dr. Mustafa HASDEMİR

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİMDALI  
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hakan AĞIR  
Anabilim Dalı Başkanı: Doç. Dr. Hakan AĞIR

2014

Etik Kurul Onay Tarih ve No:22.10.2013, HADYEK 10/3-2013, Proje No:2013/39

## İçindekiler

ÖNSÖZ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
<b>1. AMAÇ VE KAPSAM .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1 Radyoterapi Hakkında Genel Bilgiler .....	3
2.2 Radyoterapinin Tarihçesi .....	3
2.3 Radyoterapinin Kullanımı .....	4
2.4 Radyoterapinin Etkileri .....	6
2.4.1 Radyoterapinin Sistemler Üzerine Etkileri .....	8
2.4.2 Radyoterapinin Cilt Üzerine Etkileri .....	9
2.5 Defektlerin Onarımında Cerrahi Seçenekler .....	14
2.5.1 Primer Kapama.....	14
2.5.2 Sekonder İyileşme.....	14
2.5.3 Deri Yaması (Grafti) .....	15
2.5.3.1. Kısmi Kalınlıkta Deri Yaması .....	15
2.5.3.2. Tam Kalınlıkta Deri Yaması .....	15
2.5.4 Lokal Flepler .....	16
2.5.4.1. Flep Tarihçesi.....	16
2.5.4.2. Genel Bilgiler.....	16
2.5.4.3. Flep Kan Akımının Düzenlenmesi.....	17
2.5.4.4. İskemi-Reperfüzyon Hasarı .....	19
2.5.4.5. Kanlanmasına Göre Deri Fleplerinin Sınıflandırılması .....	20
2.5.4.5.1. Aksiyal Patern Flepler .....	21
2.5.4.5.2. Random Patern Flepler .....	21
2.5.4.6. Flep Neovaskülarizasyonu .....	23
2.5.5 Serbest Flepler.....	25
2.6 Kök Hücreler .....	25
2.6.1 Kök Hücre Tarihçesi .....	26
2.6.2 Farklılaşma Kapasiteleri Bakımından Kök Hücreler .....	26
2.6.3 Kök Hücre Çeşitleri.....	27
2.6.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Kullanımı .....	28
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>
3.1 Kullanılan Denekler .....	32
3.2 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Elde Edilmesi .....	32
3.2.1 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü.....	32
3.2.2 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Karakterizasyonu .....	33
3.2.3 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Akım Sitometri Karakterizasyonu .....	33

3.2.4	Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin İn Vitro Farklılaşması .....	34
3.2.5	Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin GFP İle İşaretlenmesi.....	35
3.3	Deney Protokolü ve Deneklerin Gruplandırılması .....	36
3.4	Radyoterapi Uygulaması .....	37
3.5	Deney Hayvanlarının Bakımı .....	38
3.6	Histolojik Ön Değerlendirme .....	39
3.7	Kullanılan Alet ve Malzemeler .....	40
3.8	Cerrahi Yöntem .....	40
3.9	Değerlendirmeler.....	44
3.9.1	Klinik ve Yüzey Alanı (Topografik) Değerlendirmesi .....	44
3.9.2	Makroskobik ve Mikroskobik Değerlendirme .....	45
3.9.3	Histolojik Değerlendirmesi .....	45
3.9.3.1	Doku Kesitlerinde GFP İşaretli Hücrelerin İmmünohistokimyasal Yöntemlerle İzlenmesi .....	47
3.9.4	İstatistiksel Değerlendirme.....	47
<b>4.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>48</b>
4.1	sYD-MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü.....	48
4.2	sYD-MKH'lerin Karakterizasyonu .....	48
4.2.1	sYD-MKH'lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu.....	48
4.2.2	Farklılaştırma Çalışmaları .....	49
4.3	Gen Aktarımı (Elektroporasyon).....	51
4.4	Gen Transfeksiyon Verimi Ölçümü .....	51
4.5	Makroskobik ve Mikroskobik Değerlendirme Sonuçları .....	51
4.6	İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları.....	53
4.6.1	Flep Yaşayabilirliği ve Damar Sayımı .....	53
4.6.2	Ağırlık Değişimi .....	55
4.6.3	Hemogram değişimi .....	55
4.7	Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	57
4.8	İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları .....	59
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>ÖZET.....</b>	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>73</b>
<b>9.</b>	<b>REFERANSLAR .....</b>	<b>75</b>

## ÖNSÖZ

İyi bir plastik cerrah olabilmem için uzmanlık eğitimim sırasında bilgi, davranış ve tecrübeleri ile büyük emek veren hocalarım, Doç. Dr. Hakan Ağır, Doç. Dr. Tonguç İşken, Doç. Dr. Şahin Alagöz ve Doç. Dr. Çiğdem Ünal'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Uzmanlık tezimin aşamalarında, bilimsel çalışmaların yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında emeği geçen, danışmanım Doç. Dr. Hakan Ağır'a teşekkür ederim.

Uzmanlık tezimin bilimsel çalışmalarındaki destekleri için Prof. Dr. Erdal Karaöz ve Prof. Dr. Görkem Aksu ve Fiz. Uzm. Tülay Meydancı'ya teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca benimle beraber çalışan Dr. Eda Işıl, Dr. Hakkı İzmirli, Dr. Ergin Yücel, Dr. Jale Özdemir, Dr. Sedat Vatansever, Dr. Hüseyin Gerçek, Dr. Emrah Kaan Yaşar, Dr. Gamze Eren ve Dr. Can İlker Demir'e teşekkür ederim.

Uzmanlık tezimin en zor aşamalarında yardımını esirgemeyen arkadaşlarım, Özlem Sağlam, Dr. Yunus Şengün ve Dr. Erkan Atak'a teşekkür ederim.

Birlikte hastanede çalıştığım tüm uzman, asistan, hemşire ve personele teşekkür ederim.

Hayatım her döneminde emeği ve desteği ile yanımda olan, sevgili annem, babam, ablam ve tüm aile bireylerine teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında desteğini hissettiğim ve tez yazarken evlendiğim eşim Seçil'e teşekkür ederim.

Teşekkür ederim

## **Simgeler Ve Kısaltmalar Dizini**

### **Simgeler**

NO

DNA

VEGF

SOD

PDGF

TGF-beta

HDAC

COX-1, COX-2

bFGF

TNF

FDA

TGF- $\beta$

GM-CSF

ACE

NSAİİ

SVF

CXCR4

HGF

HIV

DETAB

DEHYUAM

G-CSF

sYD-MKH

KİS

KOÜ-KÖGEM

### **Açıklamalar**

Nitrite Oxide

Deoksiribonükleik asit

Vascular Endothelial Growth Factor

Süperoksit Dismutaz

Platelet Derived Growth Factor

Transformin Growth Factor Beta

Histon Deasetilaz

Cyclooxygenase

Basic Fibroblast Growth Factor

Tümör Nekroz Faktörü

U.S. Food and Drug Administration

Transforming Growth Factor- Beta

Granulocyte-Macrophage Colony

Stimulating Factor

Anjiotensin Dönüştürücü Enzim

Non-Steroidal Antienflematuvar İlaç

Stromal Vasküler Fraksiyonun,

Chemokine Receptor

Hepatocyte Growth Factor

Human Immunodeficiency Virus

Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama

Birimi Deneysel Hayvanları Yetiştirme

Uygulama ve Araştırma Merkezi

Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör

Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök

Hücre

Kritik İskemi Süresi Kocaeli Üniversitesi

Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma

ve Uygulama Merkezi

ATP	Adenosine Triphosphat
HBSS	Hank's Balanced Salt Solu
FBS	Fetal Bovine Serum
AMP	Adenosine Monophosphat
L- DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium- Low Glucose
PBS	Phosphate Buffered Saline
EÖH	Endotelyal Öncü Hücre
Gy	Grey



## Şekiller Dizini

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: İyonize radyasyonun etkisiyle serbest oksijen radikali oluşumu .....	9
Şekil 2: İyonize radyasyonun hücre ölümü ve doku hasarı üzerine direkt ve indirekt etkileri .....	10
Şekil 3: Radyasyonu hasarında tedavi .....	13
Şekil 4: İskemik dokularda serbest oksijen radikali üretimi .....	19
Şekil 5: Beslenme paternlerine göre flepler .....	20
Şekil 6: Yağ hücrelerinin mezenkimal hücreden farklılaşma süreci. ....	31
Şekil 7: sYD-MKH içeren solüsyon.....	36
Şekil 8: Radyoterapi cihazı. ....	38
Şekil 9: Aynı anda 3 sıçan sırtına radyoterapi uygulanması. ....	38
Şekil 10: Radyoterapi sonrası 6. haftada sıçan sırtında oluşan makroskobik değişiklikler. ....	39
Şekil 11: Kullanılan cerrahi aletler.....	40
Şekil 12: 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı olarak planlanan Mcfarlane flebi tasarlanması. ....	41
Şekil 13: 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı olarak planlanan flebin kaldırılması.....	42
Şekil 14: Flep üzerine 6 noktada enjeksiyon yapılması .....	42
Şekil 15: Flep üzerinde 6 noktaya enjeksiyon yapıldıktan sonra flep yerine iade edilmesi. ....	43
Şekil 16: Postoperatif 7. günde flepte gelişen nekroz. ....	44
Şekil 17: Sketch-up programıyla flep nekroz ve yaşayabilir alanlarının ölçümü.....	45
Şekil 18: Flepten alınacak 1.5x 1.5cm'lik biyopsinin gösterilmesi. ....	46
Şekil 19: Flepten alınan 1,5x1,5cm biyopsi materyali alınarak pediküle yakın tarafına çentik konularak işaretleme. ....	46
Şekil 20: sYD-MKH'lerin zıt-faz mikroskobik görünümleri izlenmektedir. ....	48
Şekil 21: sYD-MKH'lerinin akım sitometrik değerlendirme verileri. ....	49
Şekil 22: sYD-MKH'lerin adipojenik farklılaştırması .....	50
Şekil 23: sYD-MKH'lerin kemik yönde farklılaşması. ....	50
Şekil 24: Kontrol gruplarından postoperatif 7. gün fleplerin görünümü. ....	52
Şekil 25: Işınlanmış gruplarda postoperatif 7. gün fleplerin görünümü .....	52
Şekil 26: Dermiste perivasküler lenfositik infiltrasyonu .....	58
Şekil 27: Radyoterapi sonrası damarsal değişimler.....	58
Şekil 28: Radyoterapi sonrası histopatolojik değişiklikler. ....	59
Şekil 29: Tüm deney gruplarından hazırlanan doku kesitlerinin GFP ve VEGF antikoları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi.....	60
Şekil 30: Kök hücre verilen deney gruplarından hazırlanan doku kesitlerinin GFP ve VEGF antikoları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi.....	61
Şekil 31: Tüm deney gruplarından hazırlanan doku kesitlerinin GFP ve Vimentin antikoları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi.....	62



## **Tablolar Dizini**

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 1: Gruplar arası flep yaşayabilirliği ve mikroskobik damar sayımı .....	53
Tablo 2: Kontrol ve radyoterapi grubunda ağırlık değişimi .....	55
Tablo 3: Kontrol ve radyoterapi grubunda beyaz küre, hemoglobin ve hematokrit değişimi .....	56
Tablo 4: Kontrol grubu ve radyoterapi grubunda trombosit değişimi .....	57



## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahinin en önemli işlevi yeniden onarım ve yapılandırma yani bir çeşit doku restorasyonudur. Bu sebepten dolayı doğumsal anomaliler, travma, enfeksiyon, kronik vasküler hastalıklar ve tümör cerrahisi sonrasında ortaya çıkan, her türlü doku kayıplarının yerine konması, kayıp öncesi fonksiyon ve görünümün yeniden sağlanması Plastik Cerrahinin ana görevleri arasındadır.

Eğer bir doku kaybı varsa öncelikle greft (deri yaması) uygulaması düşünülür. Bu yöntemin de uygun olmadığı derin ve kompleks doku kayıpları durumlarında fleplerin kullanılması söz konusudur. Flep, kendi damar ağını içeren doku segmentinin, bulunduğu yerden kaldırılarak yakın veya uzak başka bir alanda eksik olan dokunun sağlanması için kullanılmasıdır.

Ayrıca flepler de doku defektinin durumuna ve yerine göre lokal basit fleplerden kompozit fleplere doğru geniş bir kullanım çeşitliliğine sahiptir. Flep ile onarım, alıcı yatak kanlanması çok ciddi olumsuz etkilendiği radyasyon hasarlarında, ek olarak kemik, sinir ve iç organlar gibi yaşamsal önemi olan bölge veya organların onarımında veya komplike defektlerin örtülmesinde öncelikli tercih edilen cerrahi bir yöntemdir. Kimi durumlarda ise bizzat radyasyon hasarı görmüş alanda veya komşuluğunda flep kaldırılarak onarım yapılmaktadır.

Başta baş boyun bölgesi, meme nedeni ile toraks bölgesi ve son olarak alt-üst ekstremitte bölgelerinde malignansilerin cerrahi tedavisi sonrası adjuvan radyoterapi uygulaması yaygındır. Radyoterapi sırasında ve sonrasında oluşan radyonekroz defekt alanları, ortaya çıkan lokal nükslerin eksizyonu sonrası oluşan defektler veya aynı alanda yapılacak rekonstrüktif işlemler için greftleme yapılmadığında ve protez gibi implantları örtmek gerektiğinde lokal ve serbest fleple onarım gerekmektedir. Serbest flepler ise, içerdiği kendi vasküler yapısıyla vücutta başka yerlere taşınabilen, ancak uzun süren maliyetli morbidite ve mortaliteleri olabilen uygulamalardır.

Yapılan çalışmalarda radyoterapiye maruz kalmış bölgelerde ciltte ülserasyon, fibrozis, anjiogenezde azalma ve nekroz gibi oluşumların gözlemlendiği belirtilmektedir. Bu da radyoterapiye maruz kalmış bölgelerden kaldırılan fleplerde yara iyileşmesi ve

dolaşım problemlerine yol açabilmekte, ameliyatın başarısını olumsuz yönde etkilemekte, ayrıca bu durum radyoterapi sonrası oluşan defektlerin kapatılmasında önemli bir sorun olmayı sürdürmektedir.

Doku kayıplarının onarımında öncelikle greftleme (deri yaması) kullanılmasına rağmen bunun uygun olmadığı; alıcı yatak kanlanması çok ciddi olumsuz etkilendiği radyasyon hasarlarına, ek olarak kemik, sinir ve iç organlar gibi yaşamsal önemi olan bölge veya organların onarımında veya komplike defektlerin kapatılmasında, kendi damar ağıyla beslenen ve kullanıldığı alanın vasküleritesine ihtiyaç duymayan fleplerin kullanılması daha uygundur.

Yapılan çalışmalarda kök hücre uygulamasının, normal dokulardan kaldırılan lokal random fleplerde angiogenezi uyararak dolaşım bozukluğunu azalttığına dair verilerin olduğu belirtilmektedir. Ancak radyoterapi sonucu hasar gören bölgelerden kaldırılan fleplerin dolaşım bozukluğuna kök hücrelerin etkilerinin araştırıldığı yeterli çalışma mevcut değildir.

Kök hücrelerin tıbbi amaçlı kullanıma girmesinden sonra, kök hücre merkezleri kurulmaya başlamıştır. Kök hücre, son zamanlarda Plastik Cerrahi'nin de uygulama alanına girmiştir. Yapılan çalışmalarda kök hücre uygulamasının, normal dokulardan kaldırılan lokal random fleplerde angiogenezi uyararak dolaşım bozukluğunu azalttığına dair verilerin olduğu belirtilmektedir. Yine aynı şekilde radyoterapinin olumsuz etkilerini azaltmak için kök hücre uygulamasına dair çalışmalar mevcuttur. Ancak radyoterapi sonucu hasar gören bölgelerden kaldırılan fleplerin dolaşım bozukluğuna kök hücrelerin etkilerinin araştırıldığı yeterli çalışma mevcut değildir.

Bu çalışmada radyoterapi almış bölgelerden kaldırılan random fleplerde oluşan dolaşım bozukluğuna kök hücrenin varsa eğer olumlu etkilerini göstermeyi amaçladık. Sonuç olarak çalışmamızın olası çıktılarının kısa dönemde literatüre katkı sağlamasının yanında, benzer çalışmaların sayısının arttırılması ile flep ve kök hücrelerin birlikte kullanımını içine alan yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ve klinikte kullanılabilmesine yönelik çalışmalara öncü olunabileceğini düşünmekteyiz.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Radyoterapi Hakkında Genel Bilgiler**

Işın veya şua tedavisi olarak da bilinen radyoterapi, yüksek enerjili parçacıkların hücre üzerinde yarattığı etkilerden yararlanmayı esas alan bir tedavi şeklidir. Radyasyon, DNA üzerinde direkt ve indirekt etkileriyle, hücre ölümüne neden olan yüksek enerjili bir X ışınıdır. İndirekt etkilerini daha çok oluşturduğu oksijen radikalleri üzerinden geliştirir. Kanser ve normal dokuların radyasyona olan toleransındaki farklılıklar, radyoterapinin kanser tedavisinde kullanımını akla getirmiştir. Normal hücreler radyasyonun zararlı etkilerini tamir edebilir. Kanser hücreleri üzerinde gelişen hasar aynı zamanda tümörün oksijen durumuna, günlük radyasyon dozuna ve toplam doza bağlıdır. Radyoterapi kanser hastalarında cerrahi ve kemoterapi gibi bir tedavi yöntemi olmakla birlikte tek başına uygulanabileceği gibi, cerrahi veya kemoterapi ile kombine de edilebilir (1).

### **2.2 Radyoterapinin Tarihçesi**

Radyasyon hayatın başladığı andan beri var olmasına rağmen tanı, tedavi ve güç kaynağı olarak etkin kullanımı teknolojik gelişmeler sonucu olmuştur.

Alman fizikçi Wilhelm Conrad Roentgen 1885'te X-Ray ışınını fotoğraf filmindeki renk değişiminde tespit ederek tanımladı. Aynı tarihte Herr Kolikler, X-Ray makinesinin önüne elini koyarak kemik yapısının radyografik görüntülenmesini başardı.

Profesör Freund 1897'de X-Ray'ı terapötik amaçlı kullandı. Radyoaktif madde olan radyum 1898'de bulundu. Aynı yıl Bequerel radyoaktivite kavramını geliştirdikten 3 yıl sonra, Bequerel sol cebinde 6 saat unuttuğu 200mg'lık radyum daha sonra cildinde eritem ve ülserasyona neden oldu. Reaksiyonlar birkaç hafta içinde geçerken radyobiyolojik etkileri de ilk defa tanımlanmış oldu.

Bergonie ve Tribondeu 1900'lü yılların başında yaptıkları çalışmalarda yüksek mitotik aktiviteye ve kötü diferansiasyona sahip dokuların radyasyona daha duyarlı olduklarını gösterdiler. Almanya ve İngiltere'de 1912-1940 yıllarında

fidanlar üzerinde yapılan deneylerde radyasyonun biyolojik sistemlere etkisi ve oksijen varlığı arasındaki ilişki gösterildi.

Daha sonra yapılan çalışmalarda radyasyon kanser tedavisinde önemli bir yöntem olarak rapor edilse de bu vakalarda rekürrens ve doku hasarı gözlemlendi. Radyasyon dozu hesaplanmıyordu ve normal dokuların tolerans dozu bilinmiyordu. Yüksek doz radyasyon kullanımı ile cerrahiye eşdeğer sonuçlar alınmıyordu. Ancak hastalar akut reaksiyonlar sonucu kaybediliyordu (2).

Curie Enstitüsü'nde Ragaud 1919'da koyun testislerine yüksek doz ve aynı dozu periyotlara bölerek X-Ray ile ışınlamıştır. Yüksek dozda sterilite ve şiddetli cilt reaksiyonları olurken, periyotlar halinde verdiği dozda sterilite gelişirken cilt reaksiyonlarının olmadığını görmüş ve fraksiyon fikrinin doğmasına neden olmuştur.

1922'de Paris Uluslar arası Onkoloji Kongresi'nde klinik radyoterapinin ayrı bir tıbbi bilim olarak ele alınması kararlaştırılmıştır. Caquot ve Hautant aynı kongrede larenks kanserinde radyoterapinin sekelsiz kullanılabilceğini gösteren çalışmalarını sundular. Caquot 1934'te fraksiyon şemalarını gösterdi. Paterson X-Ray ile tedavi edilen ilk kanser vakalarının sonuçlarını yayınladı. Brakiterapi ise 20. Yüzyılın başlarında kullanılmaya başlandı.

Radyobiyojji Hiroşima ve Nagasaki'ye atılan atom bombaları sonucu hızlı bir gelişim göstermiş ve Atlantik'te kurulan iki ulusal laboratuarda konvansiyonel radyoterapinin radyobiyojjik, karsinogenez ve mutagenез etkiler araştırılmaya başlanmıştır (3,4).

### **2.3 Radyoterapinin Kullanımı**

Radyoterapide uygulamasında hedeflenen kanser dokusudur. Kanserli dokuyu tedavi ederken, çevresindeki dokulara en az zararı verme ilkesiyle yola çıkılarak değişik ışın tedavisi teknikleri üzerinde durulmuştur (5).

Radyasyonun hücre düzeyindeki en belirgin etkilerinden biri hücre büyümesini baskılayarak, hücre bölünmesi sırasında(mitoz) radyasyona maruz kalan hücrelerde etkinlik göstermesidir. Yani mitotik aktivitesi fazla olan hücrelerin radyasyona duyarlılığının da fazla olduğu düşünülmektedir. Oksijen, ısı ve basınç gibi çevresel faktörler de hücrelerin radyasyona duyarlılığını değiştirir.

Tümör hücreleri normal hücrelerden daha hızlı bölünerek çoğalırlar. Bu nedenle dirençleri düşer ve radyasyondan daha fazla etkilenirler. Tümör hücreleri hızlı bölünüp çoğaldıkları için kendilerinde meydana gelen hasarı tamir etme yoluna gitmezler. Radyasyon alanı ve komşuluğundaki normal hücreler de bu ışınlardan etkilenseler de, kendilerini onarma yetenekleri vardır. Dolayısıyla radyasyona bağlı normal doku hasarı tamir edilebilir ve çoğu kez geçicidir (5).

Radyoterapinin yan etkilerden kaçınmak amacıyla radyoterapide verilmesi planlanan toplam doz, seanslara bölünerek verilir. Genellikle haftanın beş günü günde bir seans şeklinde uygulanır ve hafta sonu ara verilir. Sağlanan bu ara ile normal hücrelerin radyoterapinin zararlı etkilerini onarma ve iyileşmesi için zaman tanınmış olur (5).

Türkiye’de 2010 yılında ulusal istatistiklerine göre yeni kanser tanısı alan hastaların tüm tedavi ve bakımları süresince yaklaşık % 60-70’i en az bir kez radyoterapi alırken, radyoterapiden sonra bu vakaların % 20-25’ine tekrar radyoterapi uygulanmaktadır. Bu hastaların bir kısmı gelişen metastazlar nedeniyle sonraki dönemlerde palyatif amaçla radyoterapi almak zorunda kalmaktadır. Toplam radyoterapiler dikkate alındığında yeni kanser tanısı alan hastaların yaklaşık olarak % 70’inin radyoterapi alacağı tahmin edilebilir (6).

### **Radyoterapinin kanser tedavisinde kullanımı;**

**Radikal radyoterapi:** Tümörü tamamen kontrol altına almak amacıyla, lokal ve bölgesel hastalıklı olgularda uygulanan tedavi şeklidir.

**Adjuvan radyoterapi:** Primer tedavinin (cerrahi veya kemoterapi) bir aşamasında primer tedaviye ek cerrahi mikroskobik kalıntı kontrolü için kullanılır.

**Palyatif radyoterapi:** Kür şansı olmayan hastalarda var olan hastalık belirtilerini azaltarak hastanın yaşam kalitesini arttırmaya yönelik radyoterapi şeklidir.

### **Başlıca Kullanım Alanları**

1. Solunum Sistemi (Larinks, akciğer kanseri)
2. Dolaşım Sistemi (Lenfoma)
3. Sindirim Sistemi (Özefagus, mide rektum kanseri)
4. Ürogenital Sistem (Mesane, prostat, uterus, meme kanseri)

5. Sinir Sistemi
6. Endokrin Sistem (Tiroid, pankreas kanseri)
7. Cilt (Deri) kanseri
8. Diğer (6)

Günümüzde radyoterapi için uygulanan çok değişik yöntemler vardır (7,8).

### **Uygulanan Yöntemler**

#### **a. Harici (Eksternal) Radyoterapi (Teleterapi)**

Cobalt- 60 Cihazı

Yüklü Parçacık Hızlandırıcılar (Akseleratörler)

#### **b. Dahili (İnternal) Radyoterapi (Brakiterapi)**

İnterstisyel (Doku içi) Radyoterapi

İntrakaviter (Vücut boşluklarına uygulanan) Radyoterapi

Kontakt (Temas) Radyoterapi

#### **c. Sistemik Selektif Radyoterapi**

## **2.4 Radyoterapinin Etkileri**

İyonize radyasyon, uygulanan radyasyonun cinsine, miktarına ve süresine göre, canlılarda moleküler ve hücresel düzeylerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik pek çok geçici veya kalıcı değişikliklere neden olmaktadır (5,9).

İyonize radyasyon hücrelerde bol miktarda bulunan su molekülünün ayrışmasını sağlayarak serbest radikallerin oluşumuna neden olabilmektedir. Radyasyonun reaksiyona girdiği molekül değişkendir ve karbonhidrat, lipit, protein, enzim veya DNA ya da RNA gibi bir nükleik asit olabilmektedir.

#### **a) Prekürsör Hücreler**

Mitotik olarak aktif olup, radyasyona çok duyarlı ana hücre veya immatür hücrelerdir (hematopoetik sistem hücreleri spermatogenez hücreleri, intestinal kripta hücreleri).

### ***b) Farklılaşmakta Olan Hücreler***

Ana hücrelerden farklılaşarak gelişen ve ana hücrenin genel özelliklerini kaybederek bazı başka özel nitelikler kazanmaya başlamış hücrelerdir (hematopoetik serinin prekürsör hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar). Bu hücrelerde mitotik açıdan aktif olduklarından radyasyona duyarlıdırlar.

### ***c) Olgun Hücreler***

Vücutta belirli bir fonksiyonu olan hücrelerdir. Mitotik aktiviteleri çok daha azdır ve bu nedenle radyasyona daha dirençlidirler (karaciğer hepatositleri, böbrek, tükürük bezi epiteli, nöronlar, eritrositler, kas hücreleri).

## **Radyoterapinin Olası Yan Etkilerini Oluşturan Nedenler**

**a) Tedavi Alanı:** Tedavi alanının genişliği ve lokalizasyonu genişledikçe komplikasyon riski artar. Organların radyasyona direnci birbirinden farklı olmakla birlikte, tedavi alanı içindeki kritik organ sayısı ve hacmi de riski artırır.

**b) Uygulanacak Doz:** Uygulanan toplam ve günlük radyoterapi dozu miktarı ne kadar yüksekse, yan etki riski de o kadar yüksektir.

**c) Hastanın Yaşı ve Genel Durumu:** Yaşlı ve genel durumu kötü hastalarda radyoterapiye bağlı yan etkiler çabuk gelişir ve yan etkilerin iyileşmesi daha uzun zaman alır.

**d) Tedavinin Şekli:** Uygun cihaz, doğru planlama ve tedavi süresince dikkatli takiple yan etki olasılığı azaltılabilir.

## **Radyasyondan Sonra Hücre Tamiri**

Radyasyonun hücreye verdiği hasar 3 ayrı kategoride sınıflandırılabilir.

**a) Lethal hasar:** Geriye dönüşümsüz, tamir edilemez hücre ölümünün gerçekleştiği hasardır

**b) Sublethal hasar:** Normal şartlar altında bölgeye ikinci bir doz radyoterapi eklenmezse, kısa süre içinde hücrelerin kendi kendilerini tamir edebileceği hasardır.

**c) Potansiyel olarak lethal hasar:** Normal şartlarda radyoterapi sonrası hücrelerin kendilerini tamir edebileceği halde hızlı bir şekilde mitotik aktivite gösteren ve/veya yüksek doz radyasyona maruz kalan hücrelerde, uygulama sonrası tamir edilemeyen hücre hasarıdır.



### 2.4.1 Radyoterapinin Sistemler Üzerine Etkileri

Kemik iliği, kan hücrelerinin yapımından başlıca sorumludur. Eğer radyoterapi alanı içindeki kemik dokusu (omurga, kalça kemiği gibi) hacmi fazlaysa kanla ilgili yan etki riski de artar. Lökositlerin azalma riski en yüksektir. Eritrositler azalabilir. Trombositler genellikle sabit kalır. Bu nedenle haftalık kan sayımı takibi ve buna göre destek tedavi önemlidir.

Dalak, lenf bezleri ve timus gibi lenfatik organlar radyasyona oldukça duyarlıdır. Radyasyona bağlı dalakta mitotik aktivite durur ve kütlesi azalır. Lenf bezlerinde alınan doza bağlı olarak küçülme, şişme, ödem ve/veya hemoraji görülebilir. Timusun boyutları ve aktivitesi de radyoterapi sonrası azalabilir.

Gonadlar radyasyona çok fazla duyarlıdır. Radyasyon uygulaması ovumda ve spermde mutasyon ve aberasyonlara yol açabilir. Kalıcı veya geçici sterilite gelişebilir.

Gastrointestinal sistem mukozası epiteli de radyasyona oldukça duyarlıdır. İlk önce mitoz durur, ödem, dejenerasyon ve sonrasında nekroz gelişir. Bu değişikliklerin sonrasında bulantı, kusma, ishal ve iştahsızlıkla birlikte kilo kaybına neden olur. Ayrıca intestinal sistem salgılarından mukus, pepsin ve asit salgısında azalmayla birlikte emilimde bozulma meydana gelir.

Ağız içi radyoterapi uygulamasından etkilenir. Dişlerin çürümeye eğilimi artabilir. Ağız içi hücreler radyasyona duyarlı olduğundan, tedavi süresince ağız içinde yaralar ve aftlar olabilir. Ayrıca tükürük salgısı azalır. Ağız kuruluğu, çiğneme ve yutma güçlüğü görülebilir. Bu da ortamı fırsatçı enfeksiyonlar için çok uygun bir hale getirir. Tat almadan sorumlu hücrelerin fonksiyonu bozularak iştahsızlığa neden olabilir.

İyonize radyasyona gözün en hassas bölümü lenstir. Bu nedenle katarakta neden olabilir. Merkezi sinir sistemi ise radyasyona dirençlidir. Yüksek dozlarda etkilenme olur.

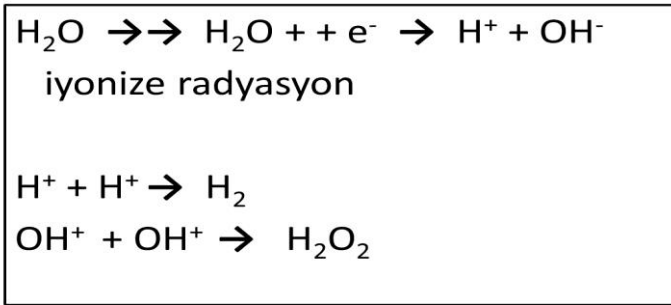
Kalp, böbrek, karaciğer, pankreas gibi organlar da tıpkı merkezi sinir sistemi gibi radyasyona dirençlidirler. Bununla birlikte yüksek dozlarda kanama, ödem enfarkt ve nekroz ve meydana gelebilir.

## 2.4.2 Radyoterapinin Cilt Üzerine Etkileri

Cilt radyasyon radyoterapi tedavisinde doz kısıtlayıcı bir doku değildir. Klasik olarak, mikrovasküler endotel hasarı gelişir. Endotel hasarı sonucu doku hipoksisi doku hasarına yol açar. Akut radyasyon ciltte erken eritem ve kuru veya nemli deskuamasyon ile kendini gösterir (10-13). Akut değişikliklerden eritem, saatler içinde başlar ve 1-2 gün sonra azalır. Yoğun eritemli olguda, 3-6 hafta içinde kuru ve nemli deskuamasyon oluşabilir. İkincil ülser 6 haftadan sonra, dermal iskemi ve dermal nekroz 8. haftada görülebilir (14). Cilt yaralanmaları derin yumuşak doku içine, hatta altta yatan kas ve kemiğe ulaşabilir. Sonuç olarak bölünmüş 70 Grey (Gy) veya tek doz 20-25 Gy dozlarında kronik histopatolojik bulgular başlayıp ay ve yıllar içinde telenjiektazi, ülserler, yoğun dermal fibrosis, yağ ve ter bezi atrofisi saç dökülmesi, artmış melanin birikimi ya da depigmentasyon görülür (10,12,15).

Bazal ve dermal katmanlarda progenitör hücre kaybına neden olup, inflamatuvar süreci başlatıp fibrozise yol açmaktadır. Kök hücre çoğalma ve hayatta kalma süreci hızla bozulur. Apoptozisde artış gelişir, bur durum devam ederse kalıcı DNA hasarı ile birlikte nemli deskuamasyondan sonra dermal mikrovasküler hasarı sonucu dermal papilla kaybı cilt nekrozu ve tümör gelişimi görülür (12,13,15).

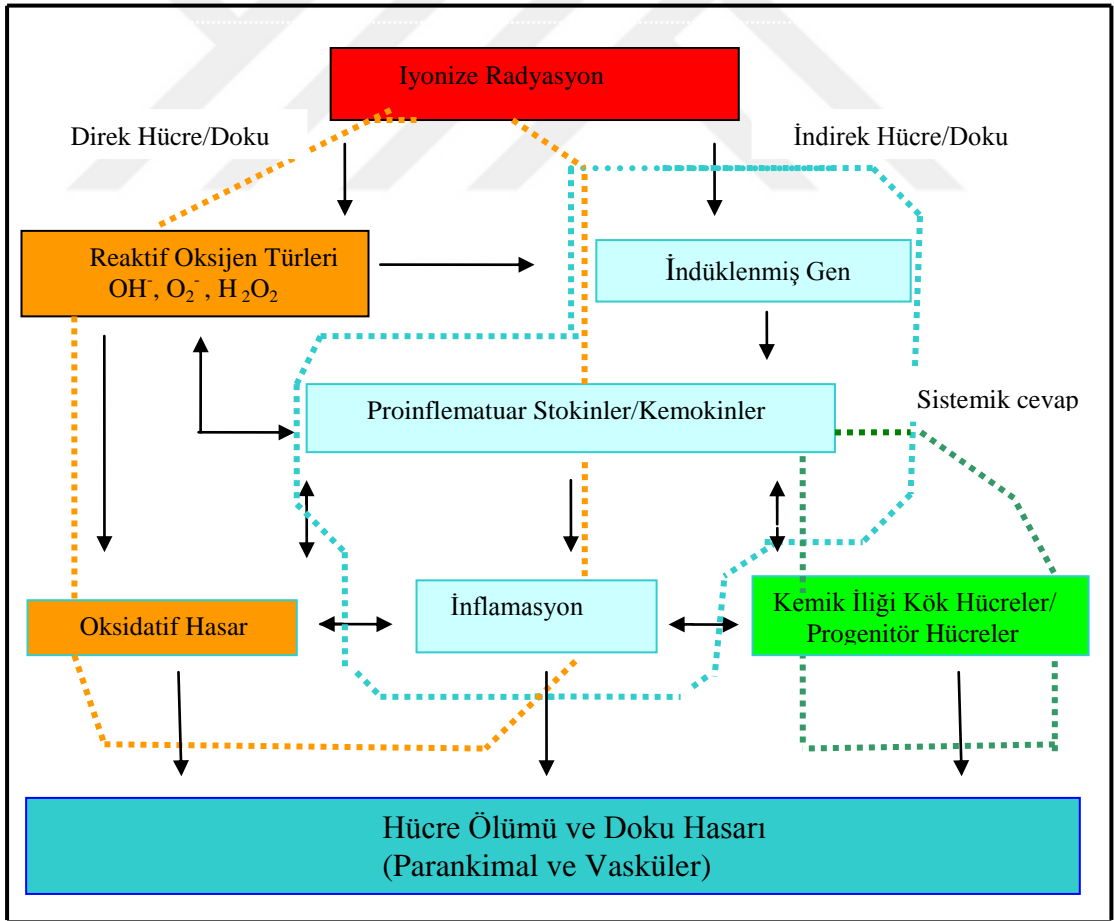
Radyoterapinin dokularda etkileri sonucu serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Normal şartlar altında süperoksit katalaz dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz gibi çok sayıda antioksidan oluşan hasarı azaltır. Ancak, radyoterapi etkilenme miktarı artarsa serbest oksijen radikalleri önemli derecede artarak hücre hasarına neden olur (Şekil 1-2). Hasarlanma, içinde lökosit, makrofaj, fibroblast ve çeşitli sitokinlerin olduğu inflamatuvar süreci başlatır. İnflamatuvar süreç fibrozisi ve mikrovasküler hasar da hipoksi sonucu nekrozu tetikler (16).



Şekil 1: İyonize radyasyonun etkisiyle serbest oksijen radikali oluşumu

Reaktif ve sitotoksik olan bu serbest oksijen radikalleri, kapiller geçirgenliği artırarak doku ödemeine, trombositlerin damar duvarına yapışma özelliğini artırarak mikrodolaşımın bozulmasına neden olurlar (16). Bu durum, flep kaldırılmasını takiben doku hasarına dolayısıyla nekroz ve doku kaybına neden olur. Serbest oksijen radikallerinin ve nötrofil birikiminin neden olduğu toksisiteyi önlemek için bu güne kadar birçok çalışma yapılmıştır.

Günümüze kadar yapılan çeşitli deneysel modellerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, allopurinol, vitamin-C, deksametazon, heparin, deferroksamin ve hiperbarik oksijen kullanımının iskemi reperfüzyon hasarı olan fleplerde flep yaşayabilirliği üzerine etkileri araştırılmıştır (17,18). Öte yandan flep kan dolaşımını artırmaya yönelik, bazı direkt neovaskülarizasyon yapıcı ajanların da denendiği birçok çalışma yapılmıştır (12).



Şekil 2: İyonize radyasyonun hücre ölümü ve doku hasarı üzerine direkt ve indirekt etkileri (12).

Radyasyona maruz kaldıktan kısa süre sonra doku, sitokinler ve kemokinlerin içinde olduğu bir kaska başlatır içinde ışınlanmış dokularda maruziyet süresi artarsa etkileri azaltmak için kronik inflamatuvar cevap ve doku hasarına yol açan süreç başlar. Çok sayıda pro-inflamatuvar arasında interlökin-1, interlökin-6, tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$  ve büyüme faktörü (TGF)- $\beta$  vardır. TGF- $\beta$  çok fonksiyonlu ve pleiotropik sitokindir. Birçok hücrel süreçleri etkileyen, mezenkimal hücre çoğalması ve hücre-dışı matriks üretimi neden olabilir. Bu da genel olarak epitelizasyon ve fibrozisi etkilemektedir (12).

Vasküler endotel hasarıyla birlikte doku perfüzyonu azalabilir. Vasküler etkilenme aylar içinde gelişir, anjiyogenez ve vaskülogenez mekanizmaları tarafından tamir edilebilir.

Anjiyogenez, yerleşik endotel hücrelerinin sitokinler ve büyüme faktörleri ile uyarılarak, çoğalması ve yer değiştirmesidir. Vaskülogenez kan damarlarının ve hücrelerin toplanması ile karakterize edilir.

Meme, baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılan radyoterapi sonrası, radyoterapiye maruz kalmış bölgelerdeki deri hasarlanması önemli sorundur (12). Radyasyon alan bölgelerde ve komşuluğundaki alanlarda fibrosiz, mikrovasküler obstrüksiyon ve sonrası gelişen iskemi iskemi doku iyileşmesinin önündeki engellerdir. Işınlanmış alanlarda hipovaskülarite, nedeniyle oksijen basıncındaki önemli derecede düşüklük, daha fazla kollajen birikimi için bir uyarıcı olarak hizmet edebilir (12,13). Bu durumda gerek vasküler bütünlükteki değişimler gerekse etkilenen etraf dokular angiogenezi uyarmada yetersiz kalır.

### **Rayoterapinin Cilt Üzerine Olan Etkilerinin Tedavisi**

Akut ve subakut dönemde radyasyonun deri hasarı semptomatik olur. Akut dönemde nemli deskuamasyon oluşumunda deri enfeksiyonu kontrolü önemlidir. Çeşitli farmakolojik siklooksijenaz (COX-1, COX-2) inhibitörleri semptomları hafifletmek ve tedavi etmek için kullanılmaktadır. Deneysel olarak topikal uygulandığında histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, sodyum butirat ve valproik asit kullanımının yararları gösterilmiştir. Ayrıca, HDAC inhibitörlerinin kronik zedelenme üzerinde benzer azaltıcı rollere sahip olduğu gösterilmiştir.

Dermal ve deri altı kronik radyasyon fibrosizini azaltmak amacıyla FDA onaylı anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) ramipril, kullanılarak zararlı etkileri hafiflettiği görülmüştür. TGF- $\beta$  reseptörü 1 inhibitörü kullanarak fibrosiz azaltılabilir. TGF- $\beta$  sinyalizasyon yolunda bulunan hücre içi protein olan smad3 topikal olarak kullanılabilir (10,12). 2012 yılında Brown ve arkadaşları göstermiştir ki TNF-  $\alpha$  inhibitörü olan etanersept de radyasyona bağlı deri hasarını azaltmaktadır (12).

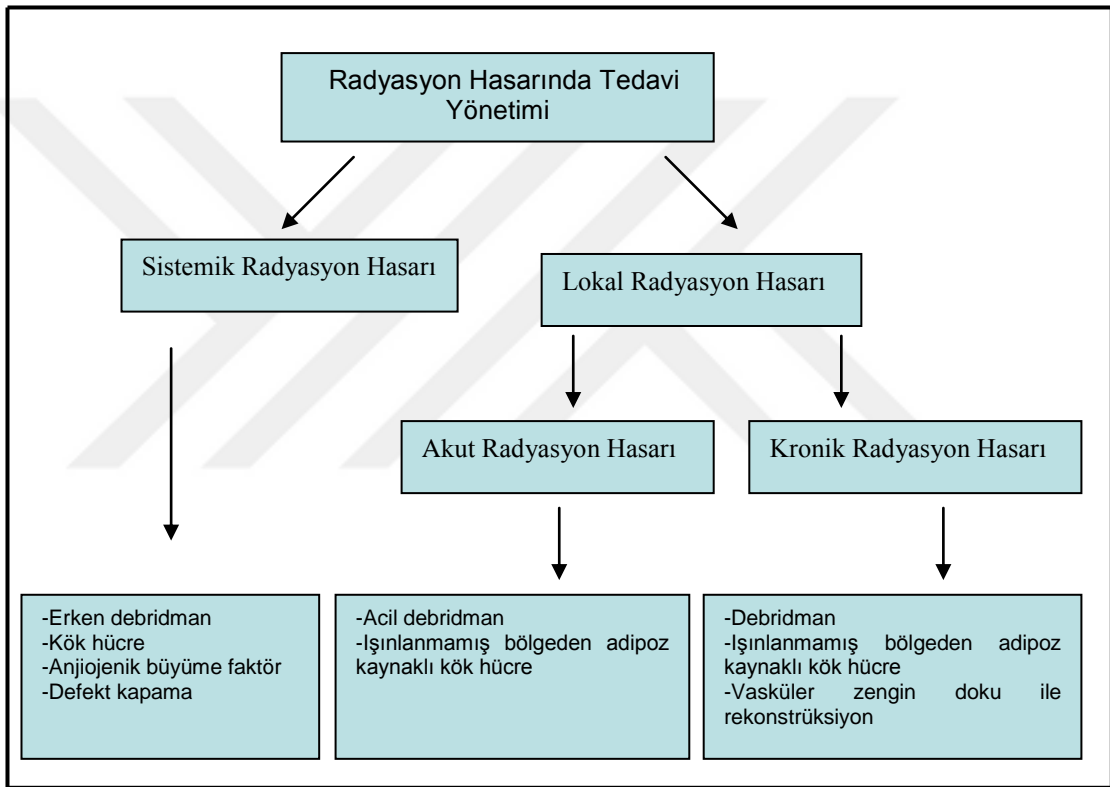
Non-steroidal anti-inflamatuar (NSAİİ) ajanlar enflamasyonu baskılamak için kullanılır. Pentoksifilin kan akımını dengeler.  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E) güçlü bir antioksidan olarak kullanılır (12).

Radyasyon hasarlı dokuya cerrahi operasyonlar, radyasyona bağlı hipovaskülerite sonucu gelişen doku nekrozu başarısızlıklara neden olmaktadır. Radyasyon hasarlanmaları kurnazca ilerleyerek nekroz, bölgesel enfeksiyon ve iyileşme bozukluğu sonucu kötü ve yetersiz yara iyileşmesine neden olmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda Lazer Doppler ile ışınlanmış dokularda kan akışını kötüleşme görülmüştür (10). Radyasyona bağlı deri ve deri altı dokusu hipervaskülerite nedeniyle cerrahi başarısızlık, enfeksiyon ve kötü iyileşmek olabilir. Hiperbarik oksijen radyasyon hasarlı dokuda anjiyojenezi teşvik ettiği gösterilmiştir (15).

Kök hücreler, radyasyona bağlı doku hasarını azaltmak için kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda doku hasarında kemik iliğinden salınan endotelial ve hematopoetik progenitör hücrelerin doku onarımına katkı sağladığı gösterilmiştir (19,21). Hill ve arkadaşları (2001) kemik iliğinden salınan mezenkimal progenitör hücrelerin, endotel ve hematopoetik progenitör hücrelerine farklılaşarak, yaralı dokulara göç ettiğini ve doku onarımı ve yeniden şekillendirmeyi sağladığını göstermişlerdir. Colvin ve arkadaşları da, 2007'de yaptıkları çalışmalarda, radyasyon sendromunda da kök hücrelerinin benzer roller üstlendiğini göstererek buna katkıda bulunmuşlardır.

Lombaert ve arkadaşları 2006 da farelerde tükürük bezlerinde oluşan radyoterapi hasarında kök hücre tedavisi uyguladılar. Benzer şekilde, 2012'de Riccobono ve arkadaşları otolog yağ dokusundan türetilmiş kök hücreler ile domuzlarda radyasyon sonrası oluşan deri hasarını azalttığını gösteren çalışmalar yapmışlardır (12).

FDA onaylı ilaç bisiklam türevi olan plerixafor, CXCR4 kemokin seçici antagonistidir ve HIV tedavisinde kullanılmaktadır. 2009'da Varmavuo ve arkadaşları bu ilacın radyasyon cilt hasarını azalttığı rapor etmişlerdir. Kim ve arkadaşları 2012'de fare modelinde yüksek doz radyasyon takiben, radyasyonun akut deri reaksiyonu azalttığını tespit etmişlerdir (12). Donahue ve arkadaşları, 2009'da granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve plerixafor uygulayarak progenitör ajanları stimüle ederek, radyasyona bağlı doku hasarı tedavisinde kullanılabileceğine yönelik çalışmalar yapmışlardır.



Şekil 3: Radyasyonu hasarında tedavi (17).

### Radyasyonun Neden Olduğu Yararın Cerrahi Onarımında Göz Önünde Bulundurulması Gereken Hususlar

- 1) **Ağrı:** Yüksek doz narkotik analjezik gerektiren dindirilemeyen ağrı.
- 2) **Kanser Riski:** Uzun süredir varolan ve iyileşmeyen yaralarda rekürrens veya yeni bir kanser gelişimi ekarte edilmelidir. Bunun için biyopsiler alınmalıdır.
- 3) **Cerrahi Komplikasyon:** Radyoterapi yaraları kapatmak için cerrahi girişimlerde komplikasyon riski yüksektir.

4) **Defekt Onarımı:** Radyasyon yarası yarayı kapatacak yöntem önceden planlanarak opere edilmelidir.

5) **Yaranın Boyutu:** Yaralanma zonu görüldüğünden her zaman daha geniştir.

6) **Yaranın Zemini:** Cerrahi için uygun bir yüzey elde etmek için granülasyon dokusunun gelişmesi zordur. Yara debridmanı sonrası hemen greftleme yapılabilir ama dayanıklı bir yüzey elde edilmesi güçtür.

7) **Flep Seçimi:** Geleneksel random beslenen fleplerden çok arteryel flepler tercih edilmelidir. Myokutanöz flepler daha güvenilirdir. Komplikasyonların ana nedeni yetersiz debridmandır.

8) **Konservatif Tedavi:** Bir radyasyon yarasının kapatılması önemli riskler taşıyorsa cerrahi seçenek olmaktan çıkarılarak konservatif tedaviye geçilmelidir.

## 2.5 Defektlerin Onarımında Cerrahi Seçenekler

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi’de bir defektin onarımı için primer iyileşme, sekonder iyileşme, deri greftiyle onarım, yakın flepler, uzak flepler ve serbest doku aktarımları basamakları izlenir (23). Koşullara göre en basit seçenek çoğu zaman ilk olarak kullanılsa da artan bilgi, gelişen mikrocerrahi ve teknoloji nedeniyle uygun olgularda daha üst basamaklar ilk tedavi seçeneği tercih edilebilmektedir (24).

### 2.5.1 Primer Kapama

En basit kapama yöntemidir. Yara dudaklarının gergin olmaması önemlidir. Radyoterapiye bağ fibrosiz ve yara iyileşmesindeki bozukluklar primer kapamayı güçleştirir.

### 2.5.2 Sekonder İyileşme

Temiz, granülasyon dokusu gelişebilecek küçük yaralar sekonder iyileşmeye bırakılabilir. Sekonder iyileşmede yara kontraksiyonu ve hipertofik skar daha sık görülür. Radyoterapi almış dokularda granülasyon dokusu gelişmesi ve sekonder iyileşme yavaştır.

### **2.5.3 Deri Yaması (Greffti)**

Cilt greftleri primer olarak kapatılamayan defektlerin onarımında standart bir seçenektir. Deri grefti epidermis ve dermisin bir kısım veya tamamını içermektedir. Tanım olarak deri greftleri vücuttan alınıp, tamamen devaskülarize olarak, vücutta bir başka noktaya taşınmasıdır. İçerdiği dermisin miktarına göre ikiye ayrılır.

#### **2.5.3.1. Kısmi Kalınlıkta Deri Yaması**

Dermisin bir kısmını içerir. Myofibroblast aktivitesine bağlı sekonder kontraksiyon esas sorunudur. Ne kadar ince olursa kontraksiyon o kadar fazla olur. Geniş yüzeyleri kapatmak için kullanılabilir.

#### **2.5.3.2. Tam Kalınlıkta Deri Yaması**

Dermisin tamamını içerir. Dermisdeki elastine bağlı primer kontraksiyon fazla görülür. Donör sahaları daha kısıtlıdır.

Cilt greftlerinin başarısı ve beslenmesi alıcı sahanın kanlanması ile direkt bağlantılıdır. Cilt greftlerinin yaşaması üç aşamada gerçekleşir. İlk aşama serum imbibisyonudur ve 24, 48 saat sürmektedir. Öncelikle, cilt grefti alıcı sahaya yerleştiğinde fibrin tabakası oluşur ve tabana yapışır. Greftin beslenmesi kapiller seviyede gerçekleşir. İkinci aşama donör ve alıcı sahadaki anastomozları geliştiği inoskülasyon fazıdır ve anastomozlar gelişir. Üçüncü aşama greftin revaskülarize olmasıdır.

Cilt greftleri vaskülarize yatağa ihtiyaç duyar. Periost, perikondrium veya paratenon içermeyen kemik, kıkırdak veya tendon nadiren greft tutar. Önemli vasküler ve sinir yapılarının üzerine direkt greft konması önerilmez.

Radyoterapiye bağlı oluşan defektlerin kapatılmasında deri greftleri tercih edilebilir. Bunun için yeterli vasküler yatağın olması gerekmektedir. Radyoterapi sonucu gelişen fibrosiz, iskemi, nekroz, yetersiz granülasyon ve yara iyileşme problemleri defektlerin kapatılmasında greft kullanımının önündeki en önemli sorunlardır.



#### **2.5.4 Lokal Flepler**

Flepler kendi içerdği vasküler yapıdan beslenen dokulardır. Kaldırıldıkları lokalizasyona göre yağ, periost, bağırsak, sinir, tendon, kas ve kemiği içerebilirler. Flebin yaşayabilirliğinde onu besleyen bir damarsal yapı olması önemlidir. Flep cerrahisinde vasküler anatomisinin iyi bilinmesi ve buna uygun flep planlanarak kaldırılması flep yaşayabilirliğini arttıran en önemli etkidir.

##### **2.5.4.1. Flep Tarihçesi**

Tarihte deri fleplerini ilk olarak milattan önce 600'de Hindistan'da Sushruta Samita kullanmıştır. Taglicozzi 1500'lü yıllarda koldan hazırlanan random pediküllü cilt flebi ile yaptığı burun rekonstrüksiyonu önemli gelişmelere neden olmuştur. Gilles ve Fillatov 1900'lü yılların başında flepleri boy/en olarak (yüz bölgesi için 5/1, alt ekstremitte için 1/1) olarak sınırlamalarına rağmen, delay yöntemi 1921 yılında Blair tarafından tarif edilerek flepte boy/en oranının artırılacağı gösterilmiştir. Bakamjian 1965'te deltopektoral flebi yayınlayarak gövde ve ekstremitelerden hazırlanan fleplerin boylarının enlerinden fazla olabileceğini belirtmiştir. Manchot, (1970) flep yaşayabilirliğinde flebe ait vasküler yatağın ve kan dolaşımının önemini rapor etmiştir. McGregor ve Morgan (1972) inguinal flebi tariflemiş, Daniel ise (1973), flep dolaşımının hem muskükökütan hem de direkt kutanöz damarlar ile sağlandığını göstermiştir (25).

Daha sonraki yıllar içinde birçok yeni flep tanımlanmış, kas ve kas-deri flebi kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Ameliyat mikroskobunun kullanılmaya başlanmasıyla birlikte serbest doku aktarımları gündeme gelmiş ve cerrahide yeni bir dönem başlamıştır.

##### **2.5.4.2. Genel Bilgiler**

Fleplerin beslenme paternlerinin anlaşılması ile birlikte flep yaşayabilirliğini arttırmak için pek çok çalışma yapılmıştır. Gelişmiş anatomik çalışmalar ile flep

tasarımlarının ve anjiozomların tanımlanmasına rağmen, kısmi ya da tam flep nekrozu rekonstrüktif cerrahinin önemli bir sorun olmaya devam etmektedir.

Flep cerrahisi sonucu flepte oluşabilecek iskemi, kısmi veya tam flep kaybına yol açabilir. Flep kaybını azaltmak için, kan dolaşımını arttıran sempatolitik ajanlar, direkt etkili vazodilatatörler, antitrombotik ve antikoagülan ajanlar, antioksidan ilaçlar kullanılmaktadır (26-28). Tüm deneysel çalışmalara rağmen, günümüzde flep yaşayabilirliğini arttıran klinik olarak denenmiş, güvenilir ya da geniş olarak kabul görmüş ideal bir farmakolojik ajan bulunamamıştır.

Cerrahi geciktirme (delay fenomeni) ile flep uzunluğunda güvenli bir vasküler dolaşım alanı oluşturulabilmektedir. Cerrahi geciktirme uyarımına cevap olarak, anastomotik ('choke') damarlarının genişlemesiyle birbirleriyle bağlantılar geliştiği gösterilmiştir. İlk olarak Murry ve arkadaşları, köpek kalbinde yaptıkları çalışmalarda koroner arter üzerinde klempleme işlemiyle oluşturdukları kısa iskemik periyotları ve bunu takiben doku reperfüzyonları ile daha uzun bir iskemik periyoda toleransın arttığını göstererek, iskemik ön koşullama fenomenini tanımlamışlardır (29). Plastik cerrahide de ön koşullama uygulanması ile flep sağ kalımının arttırılabileceğine dair çalışmalar yapılmıştır (29,30). Delay fenomeni deri flep pediküllerinin iki veya daha fazla safhada ayrıldığında, flebin kanlanması ve yaşam oranı artırılabilir. Delay yöntemi flep yaşayabilirliğini arttıran iyi bir yöntem olmasına rağmen ikincil cerrahi girişimler gerektirmesi önemli bir sorundur (31).

#### **2.5.4.3. Flep Kan Akımının Düzenlenmesi**

Derinin primer fonksiyonlarından biri, deri kan akımının düzenlenmesiyle oluşan ısı regülasyonudur.

Deri kan akımı esas olarak arteriolar seviyede, sempatik tonus etkisiyle prekapiller sfinkter, arteriol ve arteriovenöz anastomozlarda kan akımı düzenlenir. Sempatik etki sonrası prekapiller sfinkterin kasılmasıyla kan doğrudan arteriovenöz anastomozlara yöneldiği belirtilmiştir (33,34).

Mikro dolaşımdaki endotel, trombosit ve lökosit gibi hücrel faktörler ve sistemik santral kan basıncı da kan akımını etkileyen diğer unsurlar arasında sayılabilir. Endotel gerek direkt vazoaaktif maddeler salarak, gerekse dolaşımdaki

lökosit ve trombositler üzerindeki etkileri nedeniyle kan akımının düzenlenmesinde kritik rol oynadığı bilinmektedir (35).

Deriye olan kan akımı yaklaşık olarak 100 gr doku için 100 ml. dir. Bu miktar kaslarda metabolik aktivite fazlalığı nedeniyle çok daha yüksektir. Flep yaşayabilirliğinde, kan akımı ile metabolik ihtiyaç arasındaki denge önemlidir. Deri kan akımı, lokal ve sistemik olmak üzere iki seviyede kontrol edilmektedir. Sistemik kontrol, nöral ve hormonal olabilmektedir.

Nöral dengeleme daha baskındır. Sempatik uyarı ile alfa adrenerjik reseptörler üzerinden vazokonstriksiyon, beta adrenerjik reseptörler aracılığıyla da vazodilatasyon gerçekleşir. Böylece arteriol ve arteriovenöz anastomoz seviyesinde damar düz kas tonusu düzenlenebilir (33,36).

Hormonal düzenleme, sistemik vazoaaktif maddelerin kendilerine özgün reseptörlerdeki aktiviteleriyle sağlanmaktadır. Sistemik vazokonstriktörler arasında, serotonin, tromboksan A<sub>2</sub> ve prostaglandin F<sub>2α</sub> sayılabilir. Vazodilatatörler ise prostaglandin E<sub>1</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub> (prostasiklin), histamin, bradikinin ve lökotrien C<sub>4</sub> ve D<sub>4</sub>'ten oluşur (33,36).

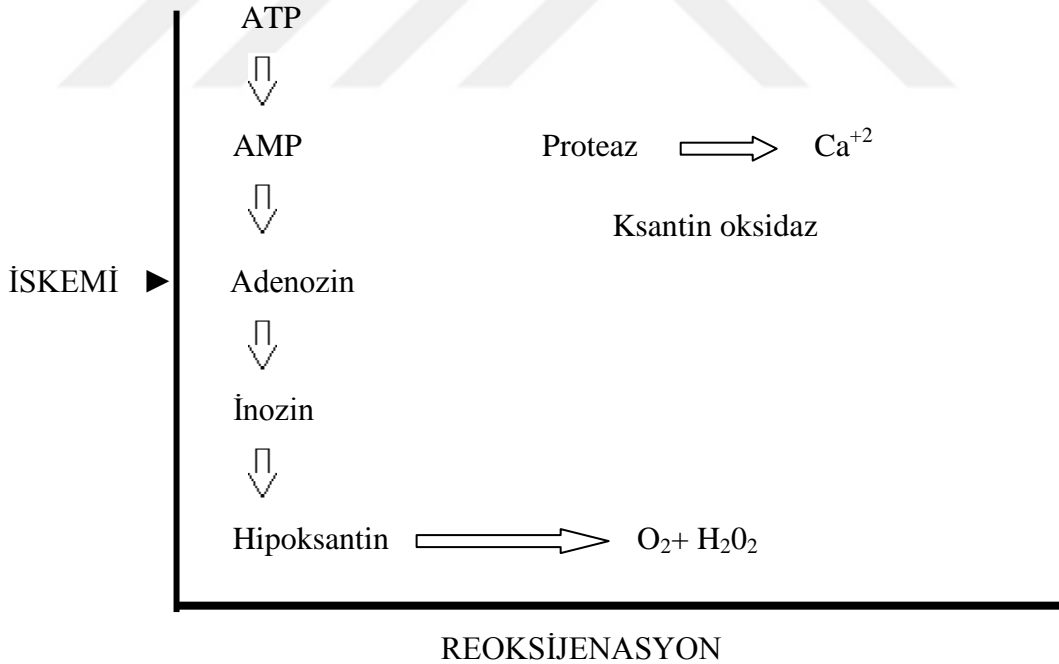
Lokal düzeyde vazodilatasyona yol açan hiperkapni, hipoksi ve asidoz gibi metabolik faktörler, deri kan akımını etkilemektedir. Artmış doku perfüzyonu ve hipotermi ise lokal olarak vazokonstriksiyon ile kan akımını azalttığı bilinmektedir (33).

Hücre hasarını oluşturan biyokimyasal süreçlerin başlamasında başlangıç noktası, hücrenin enerji depolarının kritik seviyenin altına inmesidir. Bu basamak, daha sonra oluşacak, yıkım potansiyeli çok daha fazla olan ve moleküler oksijenin geri gelmesi ile tetiklenen reaksiyonlara zemin hazırlamaktadır. Sonuçta hücre içerisinde çok yüksek oranlarda süperoksit ile bundan oluşan sekonder reaktif moleküller üretilen ve doku yıkımı oluşacaktır. Kritik iskemi süresi (KİS), kan akımının kesilmesinden sonra, dokunun canlı kalması ve enerji depolarının eşik seviyenin altına düşmesine kadar geçen süreyi ifade eder. Bu süre aşıldığında doku perfüzyonu yeniden sağlansa dahi doku hasarı gerçekleşir. Oluşan iskemi sonucu dokularda gelişen hasar geri dönüşümsüz ve çoğunlukla ilerleyicidir (37,38).

#### 2.5.4.4. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Flep cerrahisinde en büyük problemlerden biri iskemi sonrası gelişen hasardır. Ancak iskemi sonrası reoksijenizasyon ile flepte gelişen hasar daha şiddetli olabilmektedir. İskemi flep toleransından daha ağır ve daha uzun sürerse geri dönüşümsüz hasarlara yol açabilir (37).

İskemi sonrası dokuda oluşan süperoksit radikalleri genellikle ksantin oksidaz enzim sistemi üzerinden sağlanır (Şekil 4). Doku oksijenizasyonunun azalmasıyla birlikte ATP üretimi düşerek enerji depolarının azalmasına neden olur. Hücre membranında iyon transportu bozularak hücre içinde  $Ca^{+2}$  nin birikmesine yol açar. Hücre  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu da ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürecek proteazları aktif hale getirir (38). Sonuçta ATP miktarının azalıp AMP miktarının artması ile birlikte hücre içinde adenozin, inozin hipoksantin dönüşümünün olduğu bir döngü başlar.



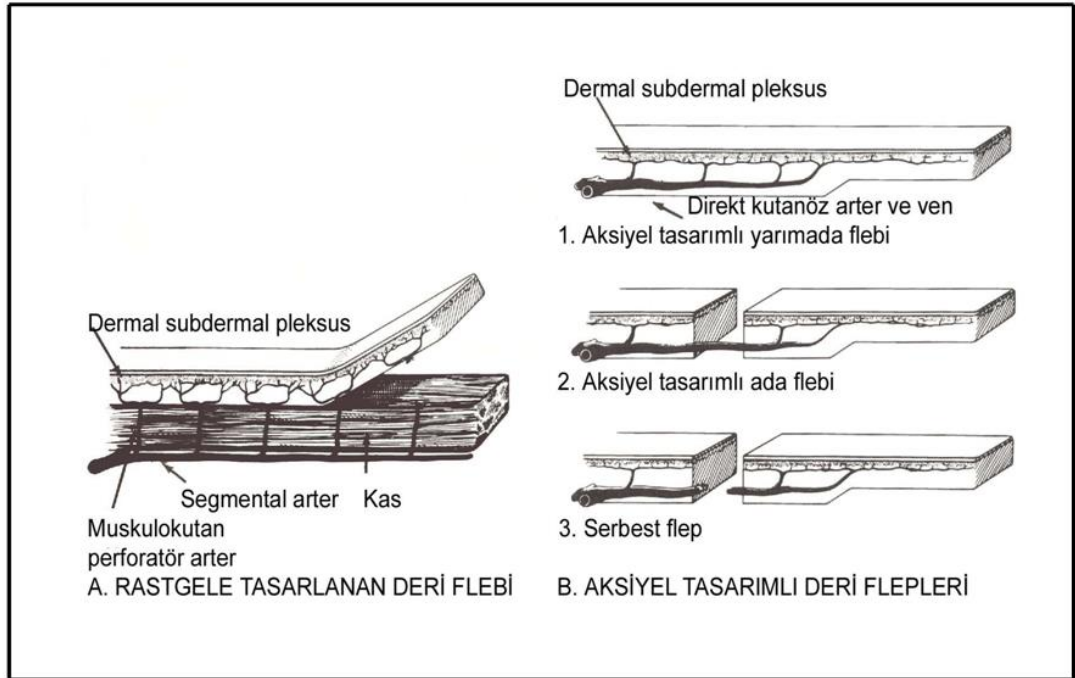
Şekil 4: İskemik dokularda serbest oksijen radikali üretimi (38).

Serbest oksijen radikalleri son derece reaktif ve sitotoksik olup, kapiller geçirgenliği artırarak doku ödemine, trombositlerin damar duvarına yapışma özelliğini artırarak mikrodolaşımın tıkanarak bozulmasına neden olurlar. Mikrodolaşımdaki bu tıkanma, flep kaldırılmasını takiben doku hasarı, iskemi dolayısıyla nekroz ve doku kaybına yol açar. Serbest oksijen radikalleri ve nötrofil birikimiyle toksisiteye neden olur.

#### 2.5.4.5. Kanlanmasına Göre Deri Fleplerinin Sınıflandırılması

Bazı fleplerin tamamı yaşarken, bazılarının distal veya periferik kısımlarında kayıp olmasında pek çok faktör etkili olmakla birlikte mekanizma tam anlamıyla ortaya konulamamaktadır. Flebin kendi kan akımı ve iskemi toleransı yaşayabilirlikte önemlidir. Deri flepleri daha az kan akımına sahip olsalar da, metabolik ihtiyaçları kaslardan daha azdır ve iskemi periyotlarına karşı daha dayanıklıdırlar (39).

Fleplerde iskemi gelişiminde, mikrosirkülasyonu oluşturan damarların ana besleyen damara uzaklığı önemli bir etkidir.



Şekil 5: Beslenme paternlerine göre flepler (Grabb and Smith's Plastic Surgery, 1997) (24).

#### **2.5.4.5.1. Aksiyal Patern Flepler**

Flebin aksı boyunca seyreden bir arter ve ona eşlik eden bir veya iki ven bulunmaktadır. Flebin asıl dolaşımı bu damarlar aracılığıyla sağlanır (Şekil 4). Aksiyal flepler daha güçlü bir dolaşıma sahiptir. Bu nedenle bir pedikülden uzunca bir flep güvenli bir şekilde kaldırılabilir. Dolayısıyla fleplerde boy/en oranı daha yüksektir (24).

#### **2.5.4.5.2. Random Patern Flepler**

Baskın bir besleyici damar sistemi olmayan subdermal ve subfasyal pleksuslar yoluyla beslenen fleplerdir. Sonuç olarak daha az güvenlidirler ve uzunlukları aksiyal fleplere göre daha sınırlıdır (40).

Taylor yaptığı çalışmalarda bir flebin kan akımının sadece derideki damarlara değil, flebi oluşturan tüm dokulardaki damar ağının yapısına bağlı olduğunu göstermiştir. Deri ve derin dokuları besleyen bir ana arterin oluşturduğu alan angiozom alanı olarak adlandırılır. Derinin beslenmesini sağlayan direkt kutanöz arterlerin çapları, uzunlukları ve yoğunlukları anatomik bölgelere göre farklılıklar gösterebilir. Direkt kutanöz arterlerin dolaşımını sağladığı alanların, indirekt arterlerin terminal dalları tarafından desteklendiği belirtilmiştir (32).

Random ve aksiyal fleplerde hatalı flep planlaması, iskemi reperfüzyon hasarı, mikrodolaşımı etkileyen sistemik faktörler (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstrüktörler) veya flep üzerine fiziksel baskı (hatalı yerleştirme, pedikülde sıkışması veya hematoma) nedeniyle mikrodolaşım düzeyinde düşük akımın ve sonuçta trombozisin gelişmesine neden olabilir.

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahide cilt defektlerinin onarımı için random paternli cilt flepleri oldukça sık kullanılmaktadır. Ancak flebin dolaşımının daha zayıf olduğu distal bölgesinde ve periferinde iskemiye bağlı oluşan nekroz, defekt onarımında gecikmelere neden olmakta ve sekonder girişimlere gereksinim doğurmaktadır. Bu yüzden, bir flebin yaşayan uzunluğunun artırılması veya flepteki nekroz miktarının azaltılması, Plastik Cerrahinin başlıca araştırma konuları arasına girmiştir. Tüm dokularda olduğu gibi flebin vasküler dolaşımı mikrosirkülasyon ve

makrosirkülasyon komponentleri tarafından düzenlenmektedir. Her iki komponent de iç ve dış faktörlere de bağlı olarak flep perfüzyonunu dolayısıyla yaşayabilirliğini etkilemektedirler (33,35).

Flebin tanımlanmasında ve planlamasında makrosirkülasyonun anatomisi önemlidir. Flebin ana arteriyal akımı ve venöz geri dönüşü mikrosirkülasyon yatağı tarafından sağlanır. Bu şekilde flebin beslenmesi ve oksijen ihtiyacı karşılanırken karbondioksit ve metabolik atıkların flepten uzaklaştırılması gerçekleştirilmiş olur. Bu mikrosirkülasyon düzeyi arterioller, venüller, kapiller damarlar ile arteriovenöz anastomozlardan gelişir ve perfüzyon kontrolünün en fazla olduğu, asıl metabolik değişimin gerçekleştiği bölge burasıdır (36,38,39).

Kas fleplerinin kan akımının düzenlenmesi deri fleplerine benzer etmenlere bağlı olsa da bazı farklılıklar mevcuttur. Kas dokusunun kapiller yoğunluğu deriden fazladır ve arteriovenöz şantlar içermezler. Kas dokusu ve benzer yüksek metabolik aktiviteye sahip dokularda kan akımının düzenlenmesi gerekli metabolik ihtiyaca bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

Flep kaldırılması sonucunda dokunun kan akımını sağlamış olduğu dengenin ciddi şekilde bozulmasına neden olur. Sempatik innervasyon akut bir şekilde ortadan kalkar ve spontan olarak vazokonstrüksiyona neden olan nörotransmitterler salınır. Bununla birlikte akım sağlayan damarların fiziksel olarak ortadan kalkması flebin distal ve periferinde akut iskemiye yol açar. Bunu takip eden süreç içinde bu alanlardaki mikrosirkülasyonun yeterliliği flebin ne kadarlık bir kısmının yaşayacağını belirler (38). Cerrahi işlemden sonra flep pedikülünün tabanındaki akım korunurken flebin en distalindeki akım saatler içinde normalin %20'sine kadar geriler. Flep dolaşımı 1-2 hafta içinde normalin % 75'ine çıkarken normale dönmesi 3-4 hafta kadar sürer.

Flep cerrahisini takiben, başlangıçta besleyici damarlar ve sempatik sinirler ayrılarak 12-18 saatte, sempatik vazokonstrüktörlerin salınımı ve gelen akımın azalmasıyla özellikle flebin distal kısmında akım hızlı bir şekilde azalır. Distal kısmın yaşayabilirliğini devam ettirmesi besleyici damarların 6-12 saat içinde bu bölgeye ulaştırması ile korunabilir. Sempatik nörotransmitterlerin 12-24 saat içinde azalması ve 2-3 gün içinde inoskülasyonla flep yatağından beslenmenin başlamasıyla flep kan akımı kademeli olarak yeniden sağlanmış olur. Ancak ilk 6-12 saatte flebin

distal kısımdaki ileri derecedeki iskemi sonrasında, akımın geri dönmesi iskemi reperfüzyon hasarına ve mikrovasküler dolaşımın tıkanarak durmasına dolayısıyla doku nekrozuna sebep olur.

Flep elevasyonundan sonra ortaya çıkan metabolik değişiklikler özellikle flebin iskemik distal kısımlarında ileri derecede görülmektedir. İskemik dokular oksijen, glukoz ve ATP seviyelerinin hızlı düşüşü, buna karşın karbondioksit ve laktik asit seviyesinin artışı sonucunda anaerobik metabolizma geçiş yaparak yaşayabilirliklerini sürdürmeye çalışırlar. Prostaglandin ve tromboksan düzeyleri ciddi bir şekilde artar. Glukoz ve glikojen tüketimi flebin iskemiye maruz kalmış ancak yaşayan bölümlerinde, iskeminin derecesine göre artış gösterir. İskemik fleplerde glukoz tüketimi 3. günde maksimum seviyeye ulaşırken, 7. günde normale döner (41). İskemik alanlarda anaerobik mekanizmaya geçişle birlikte toksik superoksit radikallerini üretimi artar. Artan oksijen radikalleri direkt sitotoksik etkiye neden olabilecekleri gibi, lokal akut enflamasyonu tetikleyip lökositlerin birikimine ve adezyonuna, bunu takiben endotel hasarına neden olarak mikrovasküler dolaşımı tamamen durdurabilirler.

İskemi sonrasında reoksijenasyon esnasında pek çok mekanizma harekete geçer. Vücudun ana koruyucu enzimi olan süperoksit dismutaz enzim seviyesi düşer. Bu nedenle flebin distal kısmında doku koruyucu mekanizmaları aktive edilmesinde problemler yaşanabilir.

Ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşerek etki eder. Ksantin oksidaz enzimi de oksijenle birlikte iskemi boyunca ATP'nin yıkılması sonucunda ortaya çıkan hipoksantini ksantine ve yan ürün olarak süperoksit anyona dönüştürür. Süperoksit anyon başka oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olarak endotel ve direkt hücre hasarına sebebiyet verebilir.

#### **2.5.4.6. Flep Neovaskülarizasyonu**

Son yıllarda bazı büyüme faktörlerinin tanımlanması ve elde edilmesi flep vaskülarizasyonu ve yaşayabilirliğinin artırılmasına katkıda bulunabilecek yeni uygulamaların gelişmesine neden olmuştur. Bunlardan vasküler endotelial büyüme faktörü flep neovaskülarizasyonu angiogenik büyüme faktörleri aracılığıyla



sağlanmaktadır. Basic fibroblast büyüme faktörünün iskemik deneysel flep modellerinde, flep ile alıcı alan arasında yeni damarların oluşumunu arttırdığı, pediküllü fleplerde distal perfüzyonu artırarak flebi nekrozdan koruduğu gösterilmiştir (41).

Yeni damar oluşumu, anjiogenez ve vaskülogenez olarak iki mekanizma ile sağlanmaktadır. Anjiogenez mevcut olan damar endotel hücrelerinin aktivasyonu, göçü ve proliferasyonunu içeren yeni kapiller ağ gelişmesidir (41,42). Anjiogenez, nitrik oksit (NO), VEGF (vascular endothelial growth factor) gibi ürünlerle damar geçirgenliğinde artış mekanizmasıyla tetiklenir. Anjiogenezin ileri aşamalarında VEGF, PDGF (platelet derived growth factor) ve bFGF (basic fibroblast growth factor) gibi çok sayıda büyüme faktörü ve sitokinler devreye girer (43,44). VEGF anjiogenik, mitojenik ve vasküler geçirgenliği artırır. Endotel hücrelerinde de nitrik oksit sentazı uyarma yoluyla vazodilatasyona neden olup aynı zamanda hücre göçünü uyarıp, apoptozisi inhibe eder (45).

Anjiogenik büyüme faktörleri lokal olarak salınan proteinlerdir ve embriyogenez, tümör büyümesi, yara iyileşmesi, damar büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynarlar. bFGF, PDGF, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- beta) ve VEGF gibi büyüme faktörleri anjiogenezi aktive edebilir ve iskemik olarak etkilenmiş olan deri fleplerinde fonksiyonel mikrodolaşıma katkı sağlayabilmektedirler (42).

Son yıllarda birçok büyüme faktörünün tanımlanmasıyla birlikte, flebin damarlanması ve canlılığını artıran başka yöntemler gelişmesini sağlamıştır. Neovaskülarizasyonda anjiogenik faktörler önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda temel fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörünün flep distalinde perfüzyonu iyileştirdiği ve nekrozu azalttığı gösterilmiştir (46-49).

Radyoterapi uygulamaları sonrasında hem direkt ışına maruz bölgelerde, hem de indirekt olarak etkilenmiş bölgelerde ciddi bir doku hasarı meydana gelebilmektedir. Radyoterapi sonrasında oluşan fibrozis, iskemi ve yara iyileşme problemleri aynı bölgedeki defektlerin onarımında, güvenli lokal flep kaldırma konusunda cerrahların önündeki en önemli bir sorundur.

### **2.5.5 Serbest Flepler**

Serbest flepler ise, içerdği kendi vasküler yapısıyla vücutta başka yerlere taşınabilen fleplerdir. Radyasyon hasarı sonucu gelişen yetersiz kan akımı nedeniyle kıkırdak ve kemiğe kadar ilerlemiş yaralar veya sertleşmiş skarlar ortaya çıkar. Radyasyon sonrası defektin kapatılmasında yerel ve uzak mikro vaskülarize flepler kullanılabilir.

Serbest flepler içinse total flep nekrozu aksiyal arteryel veya venöz tromboz, anastomoz hattından kaynaklanmaktadır. Bu durum genellikle düzgün endotel uzanımı yerine adventisya ve medianın lümen içinde trombosit ve fibrin depolanmasına yol açan kötü teknik sonucudur. Doğru hastalarda doğru flep ameliyatı uygunluğu seçimi, risklerin tartılması, ameliyat sonrası erken dönemde sıkı takip çok önemlidir. Serbest fleplerde başarı, cerrahın bu ameliyatların sıklıkta yapıldığı merkezlerde eğitim alması ve tecrübeli olması yanında hastanın var olan probleminin ciddiyetine de bağlıdır. Serbest flep uzun süren, maliyetli, morbidite ve mortaliteleri olabilen bir uygulamadır.

### **2.6 Kök Hücreler**

Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahip, kendilerinden başka hücelere farklılaşabilen ve hasarlı dokuya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen hücreler olarak tanımlanırlar. Tedavisi mümkün görünmeyen hastalıkların birçoğunda bazı hücre, doku ya da organların normal yapı ve işlevlerine döndürülmeyecek şekilde hasarlanmış olması söz konusudur. Kök hücrelerin araştırma alanlarında kullanımlarının yaygınlaşması ile bahsi geçen hastalıkların patogenezlerinin açıklanmasındaki rolleri giderek önem kazanmakta, ayrıca hücre bazlı tedavilerde kullanılabilecekleri yönünde de gelecek vaat etmektedirler (50-52).

Kök hücrelerin genel özelliklerinden birisi uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileme yeteneğine sahip olmalarıdır. Bu hücreler, yaşamları boyunca kendi kopyasını alacak şekilde, özelleşme olmaksızın çoğalmakta

ve gerektiğinde organ ve dokuya özgü, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilmektedirler (50,51,53).

Kök hücrelerin, en çok ilgi çeken bir diğer özelliği ise, bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyellerinin olmasıdır. Farklılaşma, çok hücreli organizmalarda hücrelerin özelleşme sürecinde sitokin ve büyüme faktörlerinin eşliğinde hücreler arası iletişimlerini de içeren değişimler olarak tanımlanabilir. Yapılan çalışmalar neticesinde, kök hücrelerin uygun ortam şartlarında, uygun uyarılarla farklı doku hücrelerine dönüşebilme yetenekleri gösterilmiştir (50,54).

### **2.6.1 Kök Hücre Tarihçesi**

1950'li yıllarda hayvanlarda fetal ve kordon kanı greftleri ile ilgili olarak yapmış olduğu araştırmalarında, kök hücre tedavisi üzerine dünyada belki de ilk çalışmaları yapan araştırmacılardan biri Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün olmuştur. Sonrasında invitro fertilizasyon ile başlamış olan çalışmalar hız kazanarak günümüze kadar gelmiştir. 1968 yılında, Edwards ve arkadaşları tarafından insan ovumunun invitro fertilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Evans ve Kaufman 1981 yılında fare embriyonik kök hücrelerini, 1998 yılında ise Thomson ve arkadaşları, ailelerin yazılı izni ile bağışlanmış embriyolardan insan embriyonik kök hücrelerini elde etmişlerdir. 2000'li yıllara gelindiğinde insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent olduğu anlaşılmış ve 2006 yılında Yamanaka ve arkadaşlarının indüklenebilir pluripotent kök hücrelerini tanımlamasıyla 2012 yılında Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir (54-56).

### **2.6.2 Farklılaşma Kapasiteleri Bakımından Kök Hücreler**

Kök hücreler, farklı hücrelere dönüşebilme kapasitelerine göre sınıflandırılmak istenildiğinde 4 grup altında toplanabilirler;

- 1- Totipotent kök hücre
- 2- Pluripotent kök hücre
- 3- Multipotent kök hücre
- 4- Progenitör kök hücre

**Totipotent hücreler**, master hücre olarak da adlandırılır ve vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonel hücrelerdir. **Pluripotent hücreler** (embriyonik kök hücreler), zigot oluşumunu takip eden erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde oluşan blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler ve embriyoya ait üç germ yaprağından köken alan tüm hücreleri oluşturabilirler. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde hücreler pluripotensi özelliklerini kaybederek daha özel görevlere sahip olup erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Bu hücreler yer aldıkları dokunun hücre tiplerini oluşturabilirler ve **multipotent hücreler** olarak adlandırılırlar. Bu hücreler belirli hücre türlerini meydana getirebilir, örneğin; multipotent hematopoetik kök hücreler kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde eritrosit, lökosit veya trombositlere dönüşebilir. **Progenitor hücreler** ise daha da kısıtlı farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler. Örneğin eritroid progenitor hücreler sadece eritrositlere dönüşebilmektedir (51,53,54).

### 2.6.3 Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre genel olarak iki grup altında incelenebilir:

1. Embriyonik kök hücreler
2. Embriyonik olmayan (Yetişkin) kök hücreler.

Blastosist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler **embriyonik kök hücreler** olarak adlandırılırlar. Kendini yenileme ve çoğalma özelliğine sahip olan bu hücreler embriyonun tüm hücre tabakalarını oluşturma yeteneğine sahiptirler (51-55). Embriyonik kök hücreler, farklılaşmaksızın çoğalabilmeleri ve farklılaşma için indüklendiklerinde ise özelleşmiş hücre türlerini oluşturabilme potansiyelleri ile rejeneratif tıpta ilgi odağı haline gelmişlerdir. Ancak klinikte hastaya uygulama aşamasında, teratom oluşumu ve immun reaksiyona sebep olabilmeleri ayrıca elde edilmeleri aşamasındaki etik konular ile bir takım kısıtlamaları da beraberinde getirmektedir.

Farklılaşmış bir dokuda farklılaşmamış halde bulunan ve kendini yenileme özellikleri ile köken aldığı organın hücrelerine dönüşebilen hücrelere **yetişkin**

*(erişkin) kök hücreler* denir. Dokularda nadir bulunurlar ve buldukları dokuda hasar meydana geldiğinde kısmen dokuyu tamir etme yeteneğinde olan hücrelerdir. Bu hücreler somatik kök hücreler olarak da adlandırılırlar ve özel koşullar altında farklılaşma göstererek diğer dokulara ait hücre tiplerine de dönüşebilirler. Başta kemik iliği olmak üzere pek çok organda, gerektiğinde çoğalabilen, farklılaşabilen hücreler bulunur. Erişkin kök hücrelerin en güzel örneği kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerdir (52-55).

Yetişkin kök hücreler üzerinde yapılan birçok araştırma kemik iliği kaynaklı kök hücreler üzerinde olmuştur. Kemik iliği genel olarak iki hücre grubundan oluşur; hematopoetik kök hücreler ve destek verici mezenkimal stromal hücreler. Hematopoetik hücrelerin büyüme ve farklılaşmaları iyi dökümante edilmiş olmasına rağmen stromal bileşenler hakkında bilgiler sınırlıdır. Hem deney hayvanlarında hem de insanlarda söz konusu stromal hücre grubu, heterojen hücre gruplarından oluşmaktadır. Gruplardan biri de mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılan bir grup hücredir (51, 53, 54, 55, 57).

#### **2.6.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Kullanımı**

Mezenkimal kök hücreler (MKH) de, erişkin kök hücre tiplerinden biridir. Bu hücreler bağ dokunun öncül hücreleridir, birçok dokudan elde edilebilir ve uygun koşullarda, osteojenik, kondrojenik, adipojenik yönde farklılaşabilmektedirler. Elde edildikleri dokularda sayıca az bulunurlar ancak kültür ortamında çoğaltılabilmektedirler (58-61).

Kemik iliğinde non-hematopoetik kök hücrelerin varlığı daha önceleri belirtilmiş olmakla birlikte mezenkimal kök hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, fetal buzağı serumu kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu göstermiştir (53,54,55,57).

Kök hücrelerin farklı dokulara ait hücrelere farklılaşabilme kapasiteleri kliniğe uyarlama çalışmalarında, araştırmacıları daha kolay ve pratik elde edilebilecekleri farklı kaynaklar bulmaya zorlamıştır. Mezenkimal kök hücrelerin ana kaynağı kemik iliği olmasına rağmen son zamanlarda kordon kanı, plasenta, Wharton

jeli, amnion sıvısı, yağ dokusu ve diş gibi farklı kaynaklardan da elde edilebildikleri belirtilmektedir (52,54).

Yağ dokusu bağ dokusunun yağ depolayan hücrelerinden oluşan özel bir tipidir. Yağ aspirasyonu veya abdominoplasti operasyonlarından kolay ve bol miktarda elde edilebilen yağ dokusu, özellikle greft olarak kullanılabilir. Enjeksiyon yöntemi veya eksizyonel greft olarak transfer edilebilen yağ dokusu içindeki olgun yağ hücrelerinin travmaya olan hassasiyeti ve transfer sırasındaki önlenemeyen kayıplar, ilgiyi travmaya daha dayanıklı olan ve preadiposit denilen yağ hücre öncüllerine çekmiştir. Poznanski ve arkadaşları, yağ dokusunun olgun yağ hücrelerinin yanı sıra öncü hücreler de içerdiği ile ilgili olarak çalışmalar yapmışlardır (62,63). Ailhaud ve arkadaşları ise, santrifüj ettikleri yağ dokusu süspansiyonunu fraksiyonlarına ayırmayı başarmış bu süspansiyonun, parçalanmış olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserid, olgun yağ hücreleri ve stromal vasküler fraksiyondan (SVF) (preadipositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, perisitler, kök hücreler) oluştuğunu göstermişlerdir (64). Yağ hücreleri bu hücre topluluğunda bulunan preadipositlerden farklılaşırlar. Preadipositler, adipojenik progenitör hücrelerdir. Olgun yağ hücrelerinden farklı olarak küçük hacme sahip olduklarından ve sitoplazma içi yağ damlacıkları olmadığından mekanik travma ve iskemiye olan toleransları daha fazladır (65). Birçok çalışmada preadipositlerin mikrovasküler endotelial hücrelerle parakrin etkileşim gösterdiği ortaya konulmuştur (66). Örneğin az bilinen bir anjiogenik faktör olan 'monobutyrim' preadipositler tarafından sentezlenir ve endotelial hücre çoğalmasını sağlar (67).

Claffey ve arkadaşları adipogenez sırasında, vasküler endotelial hücreler üzerinde güçlü mitotik aktivite gösteren vasküler endotelial büyüme faktörünün yüksek miktarda salınımının olduğunu göstermişlerdir (68).

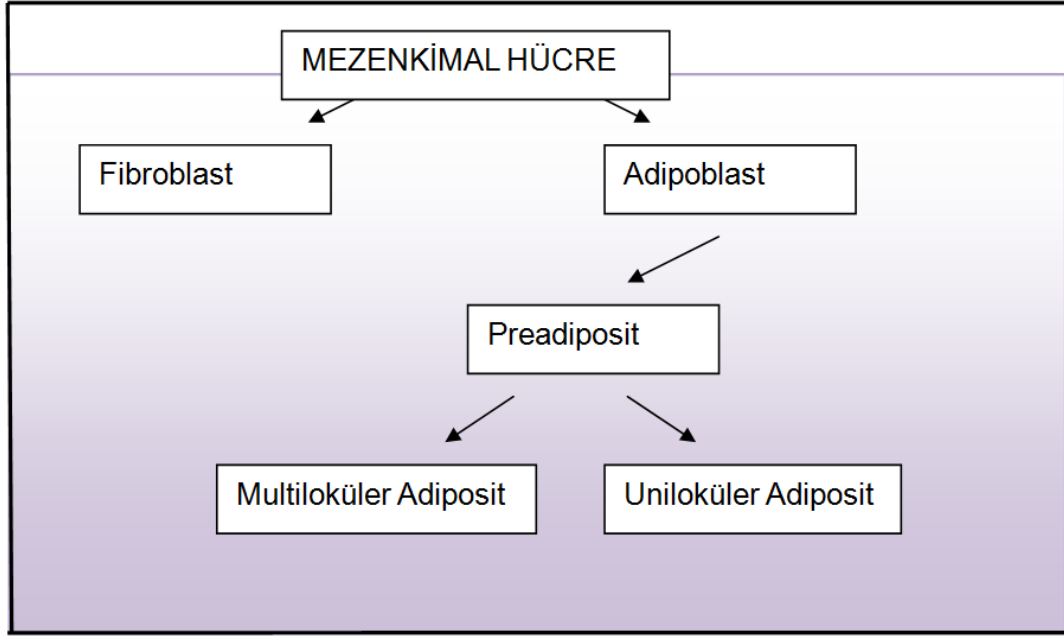
Jalees Rehman ve arkadaşları yaptıkları kapsamlı bir çalışmada yağ dokusundan elde ettikleri stromal vasküler fraksiyonun, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), basic fibroblast büyüme faktörü (bFGF), ve transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) gibi anjiogenik ve antiapoptotik faktörleri salgılama potansiyeli olduğunu göstermişlerdir (69).

Zuk ve arkadaşları 2001 ve 2002 yıllarında yağ dokusundan, birden fazla farklı doku gruplarına farklılaşma yeteneği bulunan bir kök hücre topluluğunu ilk olarak izole etmeyi başarmışlardır (70). Bu hücre topluluğunun farklı öncü hücrelerden oluşan bir topluluk olmadığını, tek bir tip hücre olduğunu kanıtlamışlar ve yağ doku kaynaklı kök hücre olarak tanımlamışlardır. Bu hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve myojenik gibi farklı mezodermal hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerinin olduğu gösterilmiş bunun yanında ektodermden köken alan doku gruplarına ek olarak hepatosit ve pankreas adacık hücreleri gibi endodermal diziden bazı hücrelere farklılaşmaları sağlanmıştır. Sonuç olarak bu hücrelerin embriyonik kök hücreler gibi üç germ dizisinden köken alan hücrelere farklılaşabildikleri savunulmuştur (71).

Kök hücrelerin yetişkin dokularda da varlığı tespit edildikten sonra iskemik dokuların onarılmasında daha da ilgi çekici bir hedef haline gelmişlerdir. Flep yaşayabilirliğini artırmak için terapötik vaskülogenezin uygulanabileceği fikri ile bazı çalışmalar yapılmış, anjiogenez ve vaskülogenezi uyarabilecek VEGF gibi büyüme faktörlerinin kullanımı başarılı olmuştur. Fakat sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin yarı ömrünün kısa olabilmesi, hem anjiogenez hem de vaskülogenez için farklı sitokinlerin ve faktörlerin, farklı zamanlarda etkimesi gerekliliği gibi sebeplerden dolayı, tek başlarına başarılarının sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Bir ya da birkaç sitokinin dokuya uygulanmasından ziyade birçok farklı hücreye farklılaşabilme potansiyeline ve muhtemelen karmaşık vaskülogenez basamaklarını düzenleyici etkiye sahip olan kök hücrelerin terapötik vaskülogenez için kullanılmaları savunulmaktadır.

MKH'lerin belki en ilgi çektiği alan doku iyileşmesi ve rejenerasyonu amaçlı kullanımlarıdır. İskemi sonrası revaskülarizasyon, kalp-damar sistemi rejenerasyonu, kemik-kıkırdak defektlerinin onarımı, intervertebral disk yenilenmesi ve üriner sistem rekonstrüksiyonu araştırılan en yaygın konular arasındadır. Bu çalışmalara ek olarak yağ doku kaynaklı kök hücrelerin kullanımı ile deney hayvanlarında tendon iyileşmesinde ve periferik sinir iyileşmesinde gelişme, akut spinal kord yaralanmalarında iyileşme ile diabetik hayvanlarda kan şekerinde ve karaciğer hasarlı hayvanlarda karaciğer enzim düzeylerinde ki düşüşlerin gözlemlendiği çalışmalar da mevcuttur (72).

Bazı araştırmacılara göre yağ doku kaynaklı kök hücrelerin yağ dokudaki hangi hücrelerden köken aldıkları tam olarak bilinmemektedir. Kimi araştırmacılar bu hücrelerin endotele farklılaşma yeteneklerinden dolayı kan damarlarını çevreleyen perisitleri temsil ettiğini savunurken, farklı araştırmacılar bu hücrelerin yağ doku içindeki fibroblastların bir alt grubu olabileceğinden şphelenmektedirler (Şekil 6).



**Şekil 6:** Yağ hücrelerinin mezenkimal hücreden farklılaşma süreci.

Kök hücrelerin angienez üzerine olan etkileri birçok çalışmada ortaya konulmuş (70-74), ancak flep cerrahisinde kullanımına ait ilk alışma Shigeru ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (75). Ratlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin dorsal cilt fleplerinde neovaskülerizasyon üzerine etkilerini incelemişler ve vasküler dansitede iskemi reperfüzyon hasarını belirgin düzeyde azalttığına dair bulgular tespit etmişlerdir. Multipotent nc hücrelerin vasküler endotelial hücrelere dönüştüğü ve birçok büyüme faktörü sentez ettiğini ortaya koyan Shigeru ve arkadaşları bu hücrelerin, neovaskülerizasyonu artırmada da potansiyel etkileri olduğunu göstermişlerdir (75).



### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

Bu çalışmada ortalama ağırlıkları 250-350 gr olan 40 adet erkek Sprague–Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Deney süresince, hayvanlar aynı laboratuvar koşullarında (standart oda sıcaklığı ve normal gün ışığı), rat yemi ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminden etik kurul izni alındı (Etik Kurul Onay Tarih ve No:22.10.2013, HADYEK 10/3-2013, Proje No:2013/39). Tüm işlemler Ketamin (0,9 g/kg) (Ketalar, Pfizer) ve Ksilazin (10 mg/kg) (Xylazin Bio, Bioveta) kombinasyonu ile elde edilen genel anestezi altında yapıldı.

#### **3.1 Kullanılan Denekler**

Kullanılan deney hayvanları Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinde bulunan Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHYUM) ile irtibata geçilerek alındı. Ortalama ağırlıkları 250-350 gr olan 40 adet erkek Sprague–Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Deney hayvanları Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesine bağlı bulunan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Biriminde (DETAB) barındırıldı.

#### **3.2 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Elde Edilmesi**

Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (sYD-MKH) uygulamaya hazır hale getirilmesi işlemleri Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (KOÜ-KÖGEM) yapılmıştır.

##### **3.2.1 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Kültürü**

Sıçan inguinal bölgesinden alınan yağ dokusu laboratuvar ortamında, %5 oranında penisilin-streptomisin içeren Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ile birkaç kez yıkama işleminden geçirilerek makasla 1cm<sup>3</sup>'lük küçük parçalara ayrıldı. Yıkama işleminden sonra dokular kuru bir petri kutusuna alınıp makas yardımıyla en

büyük parça yaklaşık  $1\text{mm}^3$  oluncaya kadar kıyıldı ve üzerine  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Mg}^{2+}$  içermeyen HBSS ile hazırlanmış %0.075'lik tip 1 kollajenaz solüsyonundan 2 ml eklendi. Doku örnekleri 15 ml'lik flakon tüpte toplandı. Hacim kollajenaz solüsyonu ile 5 ml'ye tamamlanıp  $37^\circ\text{C}$ 'de çalkalamalı su banyosunda 60 dk bekletildi. İnkübasyon sonunda, karışımın üzerine enzimin etkisini durdurmak için Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) içeren besiyeri eklenerek 1800 rpm (devir/dakika)'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti resüspanse edilerek sırasıyla delik çapı  $100\mu\text{m}$  ve  $70\mu\text{m}$  filtrelerden süzülerek tekrar santrifüj edilmiştir. Hücre kültür kaplarına %10 FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) içeren L-DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose, Gibco) besiyeri eklendikten sonra ekim gerçekleştirilmiş ve hücreler  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  ve nemli ortamda kültüre edilmiştir.

Kültür kabının tabanı yaklaşık %70 oranında hücreler ile kaplanınca tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edilmiştir ve bu ilk pasaj (alt-kültür) olarak değerlendirilmiştir. Hücre sayımı hematocytometre (Thoma) lamı kullanılarak trypan blue boyası ile yapılmış ve kültür kaplarının yüzey alanlarına uygun sayıda ekim yapılmıştır. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlanmış ve 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlanmıştır.

### **3.2.2 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Karakterizasyonu**

sYD-MKH'lerin kök hücre özelliği taşıdığını göstermek için çeşitli karakterizasyon analizleri yapılmıştır. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analizler gerçekleştirildi. Ayrıca sYD-MKH'ler in vitro farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için; adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya alındı.

### **3.2.3 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Akım Sitometri Karakterizasyonu**

Çalışmada kullanılacak olan hücreler 3. pasajın sonuna geldiğinde akım sitometri cihazı (BD Biosciences FACS Calibur) kullanılarak uygun monoklonal

antikorlar (CD45, CD29, CD90, CD54, CD106, MHC Sınıf II) ve izotiplerine göre karakterize edilmiştir.

Analizler, FACS Calibur akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapıldıktan sonra (yaklaşık olarak  $8 \times 10^6$  hücre) Phosphate Buffered Saline (PBS, Gibco) içinde homojenize edildi. Belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özgü fluoresan izotiyosiyonat (FITC) ve fikoeritrin (PE) bağlı monoklonal antikorlardan ve uygun izotip kontrollerinden 10 µl eklenerek oda ısısında, karanlıkta ortamda, 45 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edildi (5 dk. 1780 rpm) ve sonrasında 400 µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutuldu ve analizi BD Cell Quest software (BD Pharmingen) programı ile gerçekleştirildi.

### **3.2.4 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin İn Vitro Farklılaşması**

#### ***a. Adipojenik Farklılaşma***

sYD-MKH'leri adipojenik farklılaştırmaya yönlendirmek için hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler uygun yoğunluğa eriştiğinde %10 FBS, indometacin (200 µM), insülin (10 µg/mL), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX; 0,5 mM), deksametazon ( $10^{-6}$  M) ve %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besiyerinde yaklaşık 15 gün inkübe edilmiştir. Kontrol olarak, eş zamanlı ekilen %10 FBS, %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besiyerinde kültüre edilmiş hücreler kullanılmıştır.

Kültür süresinin sonunda hücreler %4 Paraformaldehit (PFA, Merck) ile 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Ardından sırasıyla PBS ve distile su ile yıkanan cam slâyt üzerindeki hücreler son olarak %60 2-propanol (Sigma-Aldrich) ile 5 dk. oda ısısında inkübasyon bırakılarak fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Fiksasyondan sonra, hazırlanan Oil Red O (%0,1, Sigma-Aldrich) boyası ile hücreler yaklaşık 1saat boyunca  $37^{\circ}\text{C}$ ' de inkübe edilmiş ve böylece yağ veziküllerinin varlığı Oil Red O ile boyanarak adipojenik farklılaşma belirlenmiştir.

### **b. Osteojenik Farklılaşma**

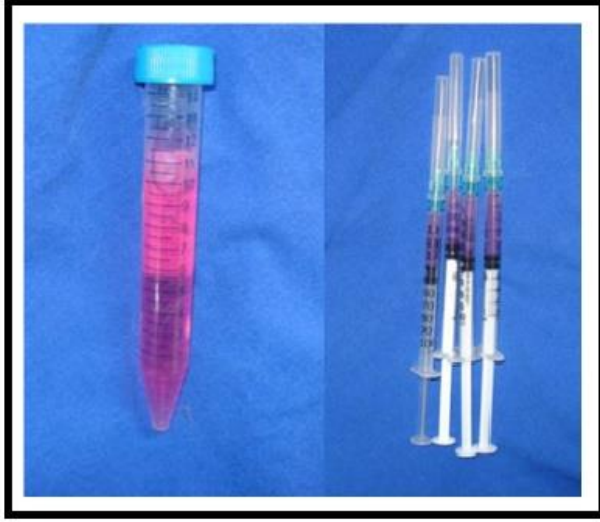
sYD-MKH'leri osteojenik farklılaştırmaya yönlendirmek için hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler uygun yoğunluğuna eriştiğinde, %10 FBS, deksametazon ( $10^{-8}$  M),  $\beta$ -gliserofosfat (10 mM), askorbik asit (50  $\mu$ g/ml), %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besiyerinde yaklaşık 25 gün inkübe edilmiştir. Kontrol olarak, eş zamanlı ekilen %10 FBS, %1 Pen/Strep içeren L-DMEM besiyerinde kültüre edilmiş hücreler kullanılmıştır.

Kemik hücrelerine yönlendirilen hücrelerde yaklaşık 25 günün sonunda morfolojik gözlemlerle kalsiyum nodüllerinin varlığı belirlenmiş ve sonrasında hücreler %70' lik alkol ile 5 dk. oda ısısında inkübe edilerek fikse edilmiştir. Fiksasyonun akabinde, %2 Alizarin Red-S (Fluka) çözeltisi hazırlanmış ve bu boya ile hücreler 45 s inkübe edilmiştir. Osteojenik farklılaşmanın varlığı Alizerin Red-S boyasının kalsiyum nodüllerini boyaması ile belirlenmiştir.

### **3.2.5 Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin GFP İle İşaretlenmesi**

Gen aktarımı elektroporasyon yöntemini temel alan Neon Transfection Sistemi ile gerçekleştirildi. Yüksek kalitede ( $OD_{260/280} > 1.8$ ) ve endotoksin den arındırılmış ( $< 0,1$  EU) plazmid DNA'sı 1  $\mu$ g/ $\mu$ l konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlandı, sYD-MKH'ler transfeksiyon başına  $1 \times 10^6$  hücre olacak oranda çoğaltıldı. Deney gününde hücreler kültür kabından kaldırılarak ve  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içermeyen PBS'le yıkayıp, 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edilip "Resuspension Buffer R" tampon çözeltisi ile son hücre yoğunluğu 1 ml başına  $1,0 \times 10^7$  hücre olacak şekilde hazırlandı. 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine, 2 ml serum içeren, seçici antibiyotik içermeyen uygun besiyeri eklenip,  $37^\circ C$ , %5  $CO_2$ , nemli ortamda inkübe edildi. Steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine transfeksiyon başına 2  $\mu$ g plazmid DNA'sı ve 10  $\mu$ l olacak miktarda hücre aktarılıp hücre-DNA karışımı ile birlikte Pipet İstasyonu içerisinde bulunan ve 3 ml elektrolit tamponu eklenmiş tüpe yerleştirildi. Belirtilen ayarlarda sistem elektrik akımı (atımını/şokunu) uygulanıp, gen aktarılmış hücreler hemen önceden ısıtılmış serum içeren, ama seçici antibiyotik

içermeyen besi ortamına aktarıldı. Hücreler 37°C'de, nemlendirilmiş CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi. Transformasyon sonrası 3. günde ortam değiştirilerek besi ortamı tazelendi, ilk bu noktadan sonra seçici antibiyotik (G418, 200 µg/µl) eklendi. Kalıcı olarak gen ekspresyonu için, 2-3 pasaj boyunca hücreler antibiyotik direncine göre seçildi.



Şekil 7: sYD-MKH içeren solüsyon

Gen aktarımının verimliliği akım sitometresi kullanılarak ölçülmüştür.  $2 \times 10^5$  hücre/200 µL PBS içerisinde FACS Calibur (BD Biosciences) akım sitometre cihazı kullanılarak YFP<sup>+</sup> hücreler belirlenmiştir. Kontrol olarak YFP geni içermeyen sYD-MKH'ler benzer şekilde hazırlanıp okunmuştur. Veriler Cell Quest programı (BD Biosciences) ile hesaplanmıştır

### 3.3 Deney Protokolü ve Deneklerin Gruplandırılması

Öncelikle deney grupları kendi içinde radyoterapi verilip verilmemesine göre ikiye ayrıldı.

Radyoterapi verilmesi ve fleplere kök hücre uygulanmasına göre deney hayvanları 4 gruba ayrıldı.

**A Grubu:** Yalnızca 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı olarak planlanan McFarlane flebi kaldırılan grup (n=10).

**B Grubu:** 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı olarak planlanan McFarlane flebi kaldırılan ve kök hücre uygulanan grup (n=10).

**C Grubu:** Sırt bölgesine tek doz 20 Gy radyoterapi verildikten sonra 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı olarak planlanan McFarlane flebi kaldırılan grup (n1=0).

**D Grubu:** Sırt bölgesine tek doz 20 Gy radyoterapi verildikten sonra 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı olarak planlanan McFarlane flebi kaldırılan ve kök hücre verilen grup (n=10).

Tüm gruplarda fleplerlerde yaşayabilirlik alanları ölçüldü ve fleplerden alınan histopatolojik örneklemelerde damar sayımı yapıldı.

Tüm deney grubundaki hayvanlar işlem öncesi hassas terazide tartılarak 8 hafta boyunca ağırlıkları kaydedildi. İki grup değerlendirmeye alındı

**A Grubu:** Radyoterapi almayan deney hayvanlarında ağırlık değişimi (n=10).

**C Grubu:** Radyoterapi alan deney hayvanlarında ağırlık değişimi (n=10).

Deney grupların sakrifiye edildiklerinde kanları alınarak biyokimya laboratuvarında hemogramları çalışıldı. A ve C grubu değerlendirmeye alındı

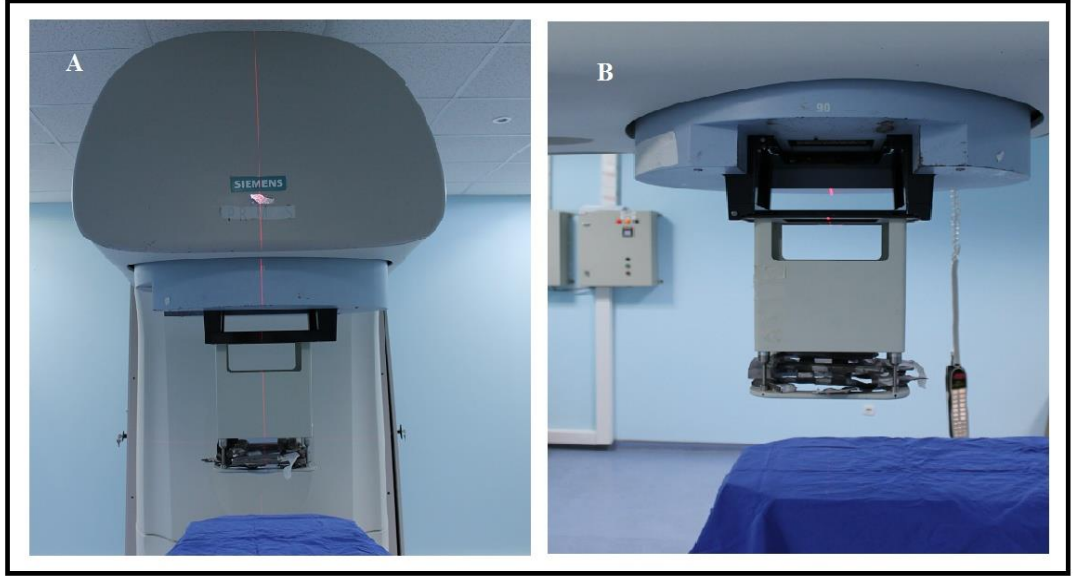
**A Grubu:** Radyoterapi verilmemiş deney hayvanlarında hemogram çalışılması (beyaz küre, hemoglobin, hematokrit ve trombosit) (n=10).

**C Grubu:** Radyoterapi verilen deney hayvanlarında hemogram çalışılması (beyaz küre, hemoglobin hematokrit ve trombosit) (n=8).

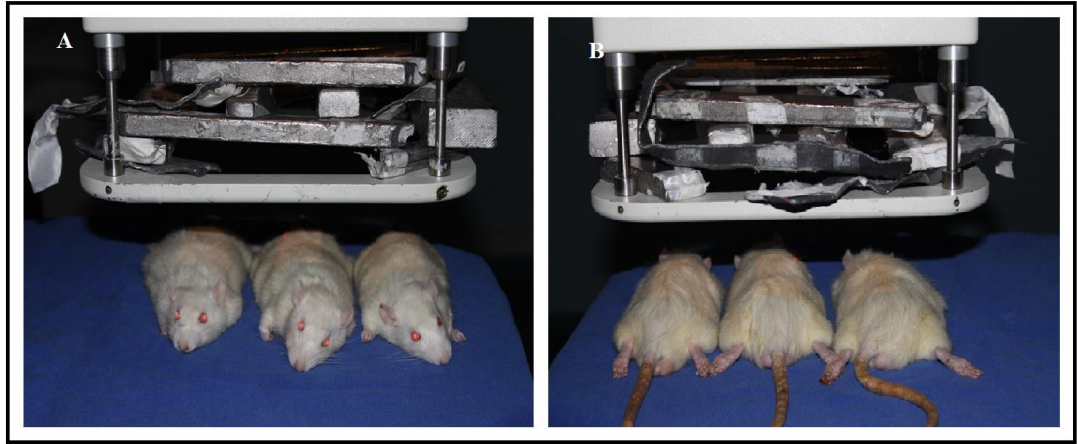
### 3.4 Radyoterapi Uygulaması

Radyoterapi İşlemi Kocaeli Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi bölümünde yapıldı. İşlem öncesi tüm deney hayvanlarına anestezi uygulandı. SIEMENS marka PRIMUS Plus lineer hızlandırıcı 6 MeV e<sup>-</sup> 20x20 elektron aplikatöründe her defasında aynı anda 3 deney hayvanının sırt bölgesinde, flep kaldırılacak alana tek fraksiyonda 20 Gy radyoterapi uygulandı (Şekil 8).

İşlem sırasında deney hayvanının radyoterapiye maruz bırakılacak bölgesi (sırt bölgesi) dışındaki alanlar kurşun levhalarla korundu (Şekil 9).



**Şekil 8:** Radyoterapi cihazı (SIEMENS marka PRIMUS Plus lineer hızlandırıcı, Germany).



**Şekil 9:** Aynı anda 3 sıçan sırtına radyoterapi uygulanması. **A:** Önden görünüm, **B:** Arkadan görünüm.

Deney hayvanları bakıma alınarak radyoterapinin doku üzerinde oluşturduğu etkileri değerlendirmek için 6. haftada histopatolojik örneklemeler alındı.

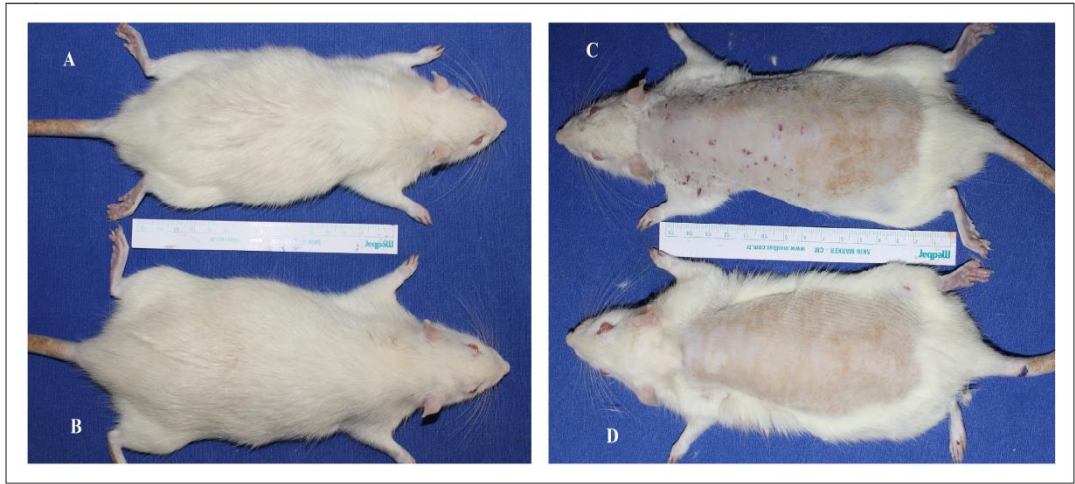
### 3.5 Deney Hayvanlarının Bakımı

Sıçanlar sabit oda sıcaklığında (20 santigrat derece), 12 saat aydınlık–12 saat karanlık ritmi uygulanan ortamda, su ve standart laboratuvar yemine istedikleri zaman ulaşabildikleri kafeslerde barındırılarak takip edildiler.

### 3.6 Histolojik Ön Değerlendirme

Radyoterapi sonrası deney hayvanları takip edildi. Histopatolojik örnekleme için 6. haftada deney hayvanlarının radyoterapiye maruz bırakılmış sırt bölgelerinden 3 adet numune alındı. Makroskobik olarak; sırt kıllarında azalma, cilt renginde koyulaşma, yeryer siyah noktasal alanlar, ciltte incelme ve fibrotikleşmeye başlayan bir görünümle karşılaşıldı (Şekil 10). Alınan numuneler histopatolojik ve mikroskobik inceleme için patoloji laboratuvarına yollandı.

Histopatolojik olarak fokal parakeratoz, ektrin yapılarda azalma, epidermal atrofi, dermiste kollajen doku artışı ve fibrozis geliştiği görüldü. Bu sonuçlarla histolojik incelemede ışınlanmış cilt alanlarında radyoterapinin etkilerinin görüldüğü teyit edildi. Bunun üzerine radyoterapiden 8 hafta sonra deney hayvanları gruplanarak cerrahiye geçildi.



**Şekil 10:** Radyoterapi sonrası 6. haftada sıçan sırtında oluşan makroskobik değişiklikler. **A:** Radyoterapi sonrası tüylerde azalma, **B:** Radyoterapi almayan sıçanın tüy görünümü, **C:** Radyoterapi sonrası ciltte oluşan değişiklikler, **D:** Radyoterapi almayan sıçanın cilt görünümü.



### 3.7 Kullanılan Alet ve Malzemeler

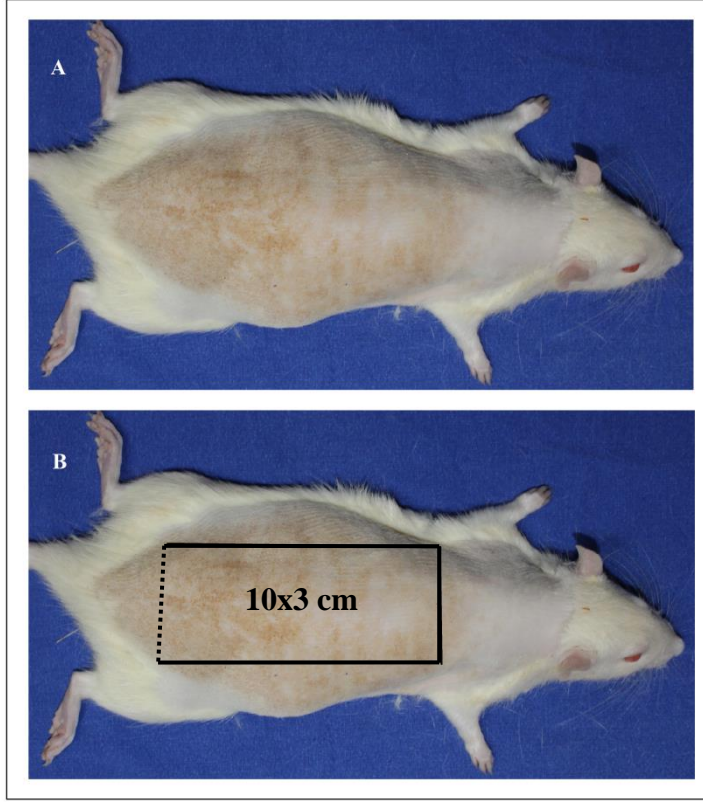
Uygun hassasiyette ve keskinlikte cerrahi malzemeler kullanıldı (Şekil 11).



**Şekil 11:** Kullanılan cerrahi aletler (doku makası penset, portegü, kaba makas ve 4,0 keskin polipropilen dikiş (prolen; doğsan).

### 3.8 Cerrahi Yöntem

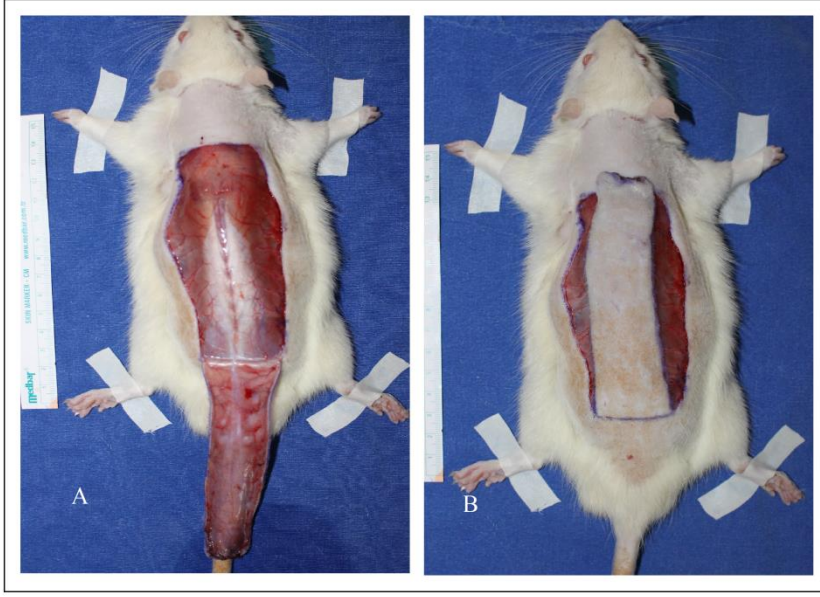
Hayvanların sırtı elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edilerek betadin solüsyon ile temizlendi. Bunu takiben, 3x10 cm boyutlarında, derinin tüm katmanlarını ve panniculus carnosus da içeren, Khouri'nin modifiye ettiği McFarlane flebi, kaudal tabanlı olarak eleve edildi (Şekil 12).



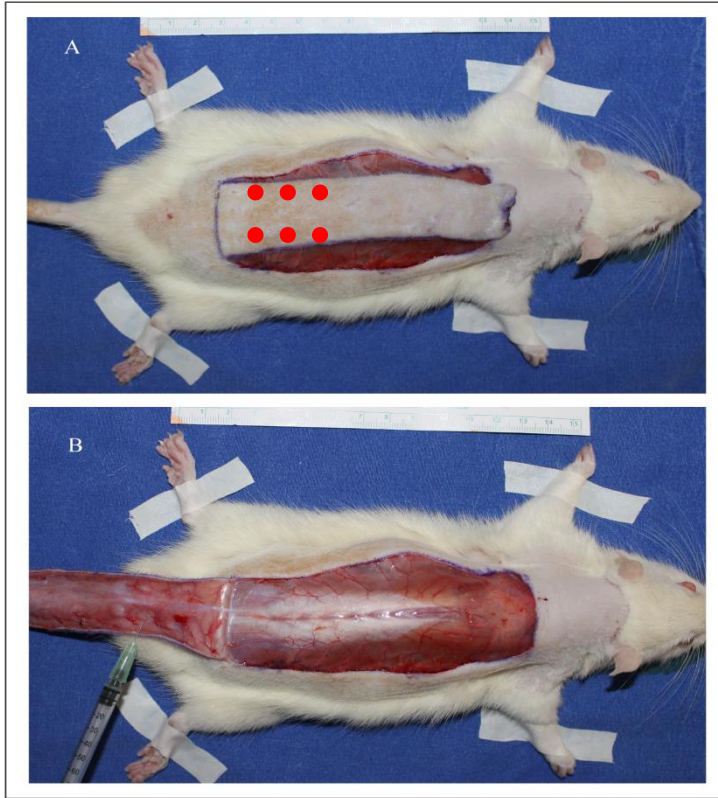
**Şekil 12:** 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı olarak planlanan Mcfarlane flebi tasarlanması. **A:** Tıraş edilmiş rate, **B:** Flep tasarlanması.

Radyoterapi verilmeyen grup A grubu ve B grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. A grubunda flepler kaldırıldıktan sonra yerine iade edildi (Şekil 13). B grubunda ise Mcfarlane flepleri kaldırılarak pediküle yakın kısmında belirlenen 6 noktaya 1,5 cm aralıklarla önceden KÖGEM’de hazırlanan kök hücreler her bir hayvana  $2 \times 10^6$  olacak şekilde eşit miktarda enjekte edilerek flepler yerine iade edildi (Şekil 13).

Radyoterapi verilen grup C grubu ve D olarak kendi içinde ikiye ayrıldı. C grubundaki deney hayvanlarından Mcfarlane flepleri kaldırılarak yerine iade edildi (Şekil 13). D grubuna ise yine KÖGEM’de hazırlanan kök hücreler her bir hayvana  $2 \times 10^6$  olacak şekilde flebin pedikülüne yakın, önceden belirlenen 6 noktaya 1,5 cm aralıklı olarak 1cc 30G lik iğne ile eşit miktarda enjekte edildi. Daha sonra flepler yerine adapte edildi (Şekil 14).

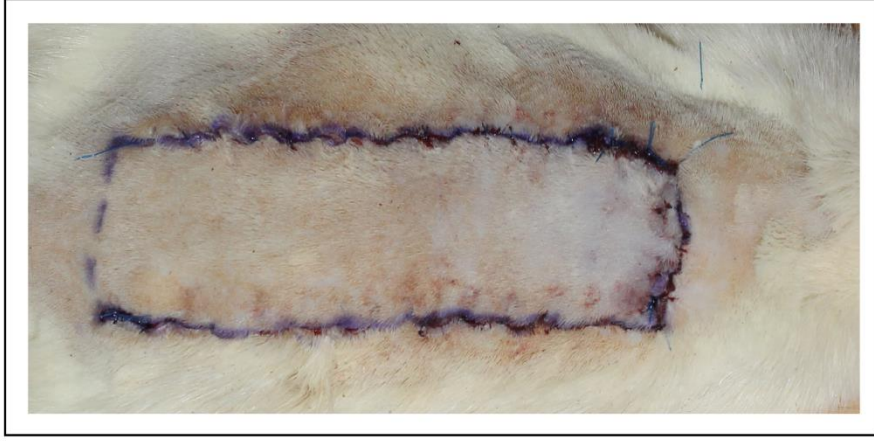


**Şekil 13:** 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı olarak planlanan flebin kaldırılması



**Şekil 14:** Flep üzerine 6 noktada enjeksiyon yapılması **A:** Enjeksiyon yapılacak alanların temsili işaretlenmesi, **B:** Kaldırılan flebe 30G lik iğne ile kök hücre uygulanması.

Flep yerine adapte edilirken, keskin iğneli 4/0 prolene sütür kullanıldı (Şekil 14).



**Şekil 15:** Flep üzerinde 6 noktaya enjeksiyon yapıldıktan sonra flep yerine iade edilmesi.

Operasyon bitiminde, hayvanların birbirlerinin fleplerine zarar vermelerini önlemek için, her bir hayvan ayrı bir kafese yerleştirilerek 7 gün boyunca takibe alındı. Deney süresince yara enfeksiyonu ve fleplerde dikiş hattında açılma gözlenmedi.

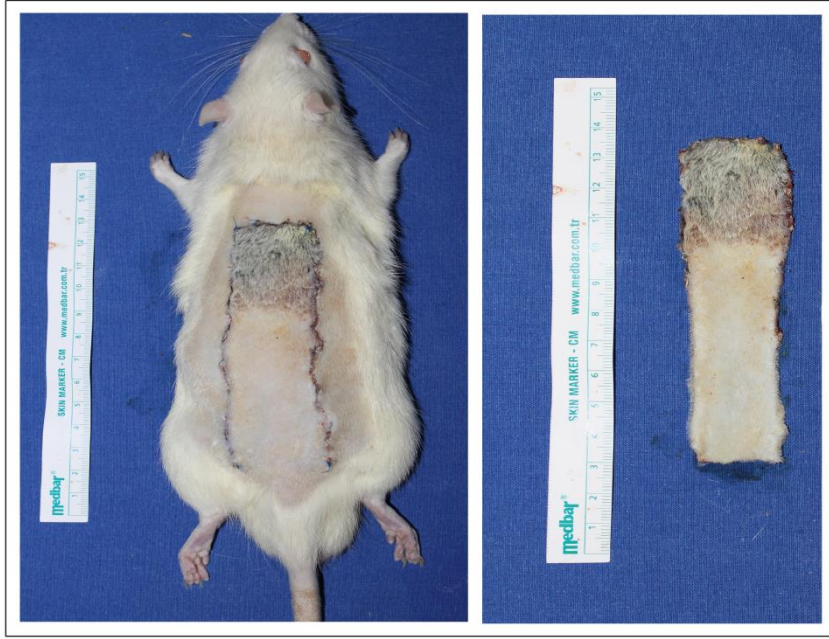
7. günün sonunda gruplardaki hayvanların fleplerinde oluşan nekroz ve diğer komplikasyonlar değerlendirildi. Deney hayvanları yüksek dozda anestezide maruz bırakılıp öldürülerek fotoğrafları çekildi. Daha sonra flepleri alınarak, ayrıca fleplerinin fotoğrafları çekildi (Şekil 16). Fotoğraflama işlemi bilgisayar programında nekroz alanlarının değerlendirilmesinde kullanıldı.

Fleplerin nekroza en yakın yerinden alınan 1,5 cm'lik örneklemeler patoloji laboratuvarına gönderildi.

Radyoterapi alan ve almayan birer gruptaki deney hayvanlarının ağırlık değişimi günlük olarak takip edilerek beslenmeleri değerlendirildi. Ağırlık değişimleri kontrol edilen hayvanların sakrifiye edildiklerindeki son ağırlıkları da kaydedildi.

Radyoterapi alan ve almayan hayvanların birer grubundan sakrifiye edildiklerinde intrakardiyal olarak alınan kanları, biyokimya laboratuvarında lökosit, hemoglobin, hematokrit ve trombosit değerleri çalışılmak üzere hemogram tüpüne alındı.





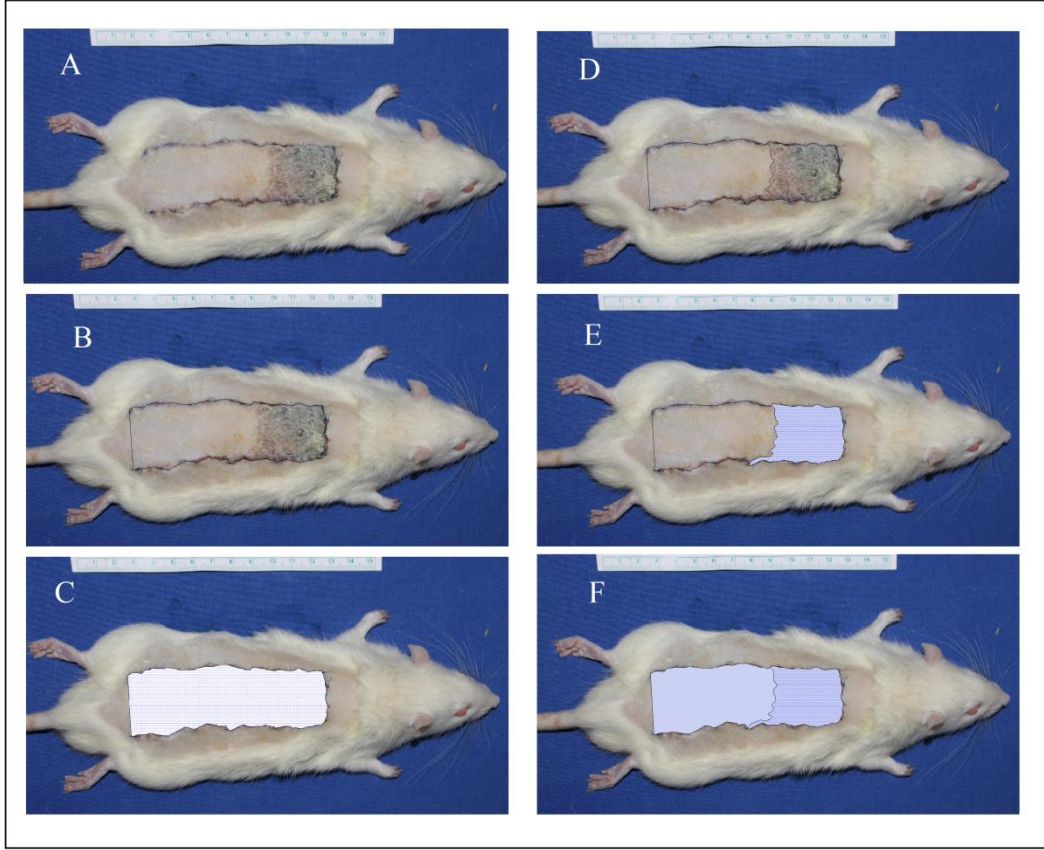
**Şekil 16:** Postoperatif 7. günde flepte gelişen nekroz. **A:** Rate üzerinde flepteki nekroz görünümü, **B:** Flep alındıktan sonra flepteki nekroz görünümü.

### 3.9 Değerlendirmeler

#### 3.9.1 Klinik ve Yüzey Alanı (Topografik) Değerlendirmesi

Sıçanların flepleri ve mavi renkli bir örtünün üzerine yayılarak, sabit aydınlatma koşulları ve sabit uzaklıktan (25cm), dijital fotoğraf makinesi (Canon EOS 1100D) ile fotoğraflandı. Dijital imajlar bilgisayar ortamına yüklenerek Sketch-up (Version 8, Google) programına aktarıldı. Kör bir araştırmacı tarafından, Wacom İntuos Model PTK-840 tableti ve Wacom dijital kalemi yardımı ile her bir imajda sırası ile flep sınırları, nekroze ve canlı alanların sınırları çizildi (Şekil 17).

Elde edilen şekillerden önce tüm flebin alanı, daha sonra da yaşayan ve nekroze olan flep alanları hesaplanarak, bulunan değerler birbirine oranlandı ve % yaşayabilirlik olarak ifade edildi.



**Şekil 17:** Sketch-up programıyla flep nekroz ve yaşayabilir alanlarının ölçüldü. **A:** Fotoğraflama, **B:** Flep alanının çizimi, **C:** Flep alanının ölçümü, **D:** Flep nekroze alanın çizimi, **E:** Flep nekroze alanın ölçümü, **F:** Flep canlı ve nekroze alanlarının oranlanması.

Her flep fotoğrafında peşpeşe olmamak sureti ile iki ayrı zamanda değerlendirme yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde bir flebin canlı alan yüzdesi için bu iki ölçümün ortalaması kullanıldı.

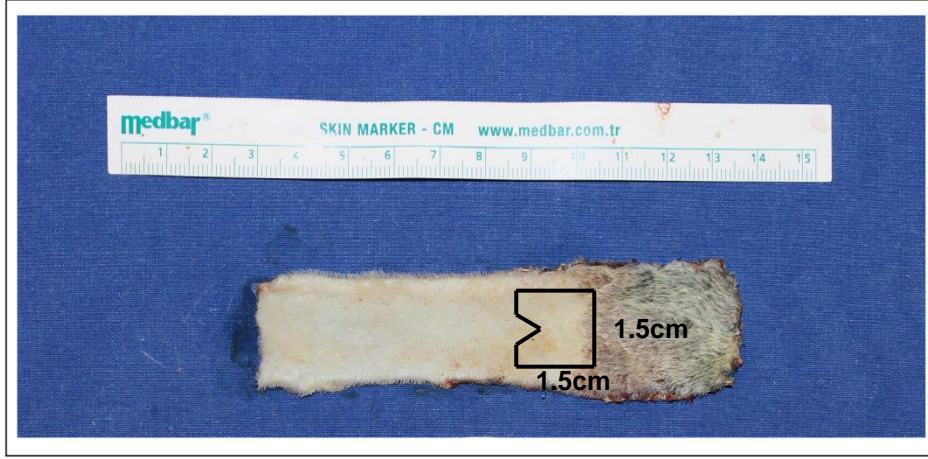
### 3.9.2 Makroskopik ve Mikroskopik Değerlendirme

Radyoterapinin flepler üzerinde oluşturduğu etkiler tüm gruplarda Makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi.

### 3.9.3 Histolojik Değerlendirmesi

A, B, C ve D gruplarında sıçanların 7. gün eksize edilen flepleri fotoğraflamayı takiben %10'luk formaldehite kondu. En az 24 saat %10'luk

formaldehitte kalan fleplerden patolojik inceleme için 1,5 X 1,5cm alanında biyopsiler alındı (Şekil 19). Biyopsinin lateral sınırı, flepte varsa pediküle uzak olan nekrozun sınırına yaslandı ve gözle görülen nekrotik doku içermemesine dikkat edildi (Şekil 18). Biyopsi olarak alınan dokunun nekrozdan uzak olan proksimal bölgesine işaret amaçlı çentik konuldu.



**Şekil 18:** Flepten alınacak 1.5x 1.5cm'lik biyopsinin gösterilmesi.



**Şekil 19:** Flepten alınan 1,5x1,5cm biyopsi materyali alınarak pediküle yakın tarafına çentik konularak işaretleme.

Tüm gruplarda alınan biyopsi dokusu üçe bölünerek, parçalar derialtı dokuyu inceleyebilecek şekilde rutin takibe alınıp, parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan 5 µm kesitler alındı. Kesitler H&E ile boyandı. Kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX51) kör bir çalışmacı tarafından 400 büyütme altında incelendi. Her biyopsinin bir kesitinde 10 adet alan seçilerek, bu alanlardaki toplam kapiller damarlar sayıldı. Aynı biyopsiye ait farklı bir kesitte işlem tekrarlandı ve iki değer ortalaması alındı.

Doku damarlanmasının histopatolojik değerlendirmesi için flep dokusundan alınan biyopsi için pediküle en uzak bölge seçildi. Biyopsi alınırken distal nekroz alanı sınırından insizyon yapılmıştır (Şekil 20).

### **3.9.3.1. Doku Kesitlerinde GFP İşaretli Hücrelerin İmmünohistokimyasal Yöntemlerle İzlenmesi**

Sıçanlara transfer edilen GFP işaretli sYD-MKH'lerin in vivo davranışlarının analizi için immunofloresan (IF) ikili boyama yöntemi uygulandı. Poly-L-Lizin kaplı lamlara alınmış doku kesitleri metanolle tespit edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS'de 30 dk. inkübe edilerek ve Antibody Diluent ile uygun oranlarında dilue edilen primer antikolar, GFP, VEGF ve mezenkimal kök hücre belirteci olan Vimentin eklenerek, oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3 X 2 dk yıkama işleminden sonra İmmünohistokimyasal çalışmalar için uygun floresan (FITC ve Texas Red) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30dk. inkübe edilerek, son aşama hücre çekirdek boyası (DAPI) içeren kapatma medyumunu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Kesitler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı. DAPI, Vimentin, GFP ve VEGF boyamalarının görüldüğü üç ayrı fotoğraf çekildikten sonra, fotoğraflar bilgisayar ortamında "merge" (üst üste bindirme) işlemine tabi tutularak, üç boya için de pozitif reaksiyon veren hücreler dokuya verilmiş sYD-MKH'ler olarak tanındı.

### **3.9.4 İstatistiksel Değerlendirme**

Tezde veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirilmek amacıyla *Tek Yönlü Varyans Analizi* ve grupların farklılıklarını belirlemek için *Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi*, ölçülen ilk ağırlık ve son ağırlık arasındaki farklılığı belirlemek için *Eşleştirilmiş T Testi* kullanılmıştır. Verilerin değerlendirmelerinde IBM SPSS 20,0 for Windows istatistiksel paket programı kullanılmıştır. Sıfır Hipotezinin reddi için  $p < 0.05$  değeri yeterli kabul edilmiştir.



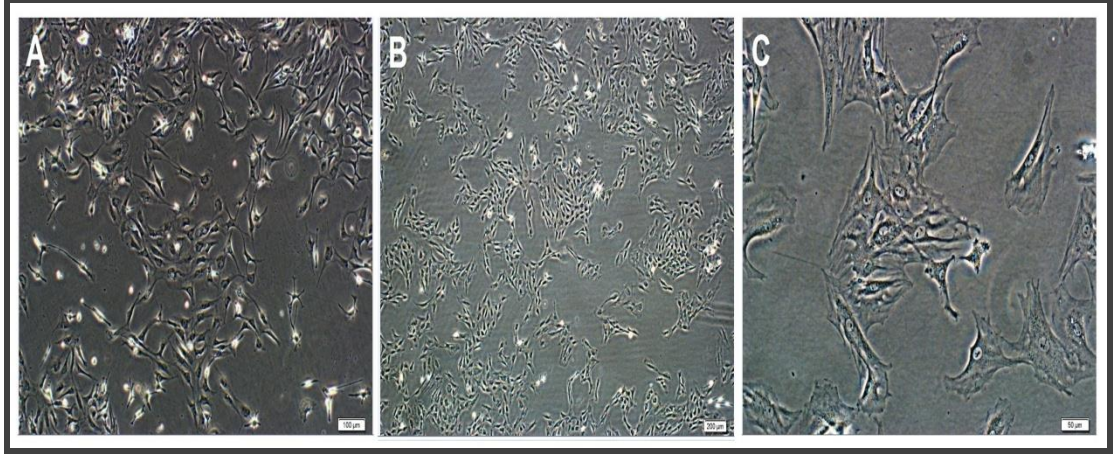
## 4. BULGULAR

### 4.1 sYD-MKH'lerin İzolasyonu ve Kültürü

Sıçanların inguinal bölgesinden çıkarılan yağ dokusundan steril ortamda uygun yöntemle sYD-MKH'lerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Sıçan sYD-MKH kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde ayırt edildi ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt-faz mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 20).

Üçüncü pasaj sonunda sYD-MKH'ler karakterizasyon deneylerine hazır hale getirilmiştir.



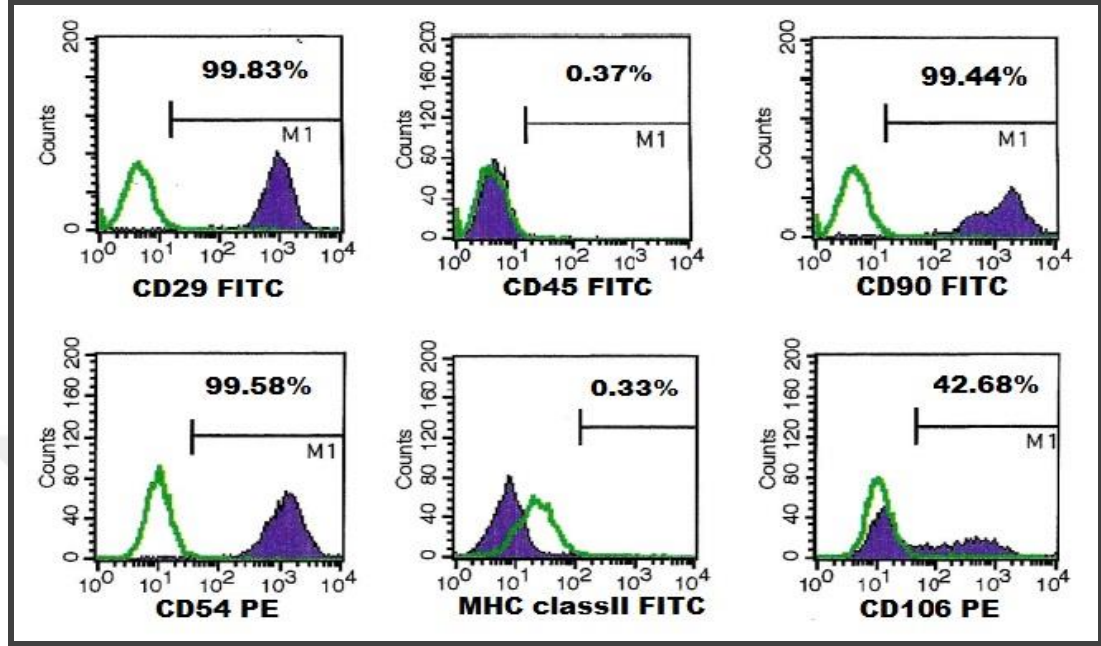
**Şekil 20:** sYD-MKH'lerin (A) pasaj 0-6. gün; (B) pasaj 1-3. gün; (C) pasaj 2-1. gün zıt-faz mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. Primer kültürdeki hücrelerin kolonizasyon gösterdikleri (A, B), ileri pasajlarda ise hücre morfolojilerinin fibroblast-benzeri görünüm aldığı görülmektedir (C) (Bar Çubukları: A- 100 µm, B- 200 µm, C-50 µm).

### 4.2 sYD-MKH'lerin Karakterizasyonu

#### 4.2.1 sYD-MKH'lerin Akım Sitometri ile Karakterizasyonu

Yapılan akım sitometri analizi sonucunda sYD-MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD29 (%99.83), CD54 (%99.58), CD90 (%99.44) ve CD106 (%42.68) yönünden pozitif iken, CD45 (%0.37), ve MHC class II (%0.33) açısından negatif

oldukları gösterilmiştir (Şekil 21). Bu sonuçlara göre, sıçan yağ dokusundan elde edilen hücreler mezenkimal tipe kök hücreler olarak tanımlanmıştır.

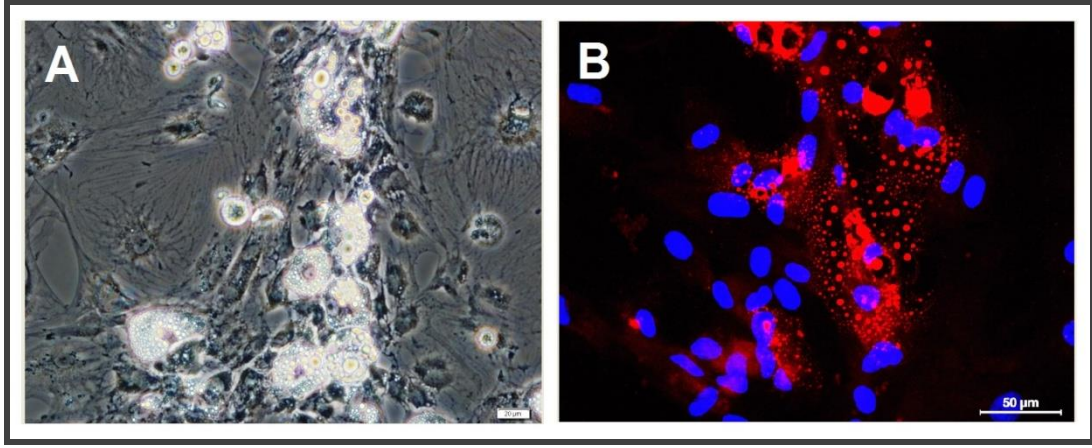


Şekil 21: sYD-MKH'lerinin akım sitometrik değerlendirme verileri. sYD-MKH'ler CD29, CD90, CD54 ve CD106 için pozitif iken, CD45 ve MHC class II için negatif olarak izlenmektedir.

## 4.2.2 Farklılaştırma Çalışmaları

### *Adipojenik Farklılaştırma*

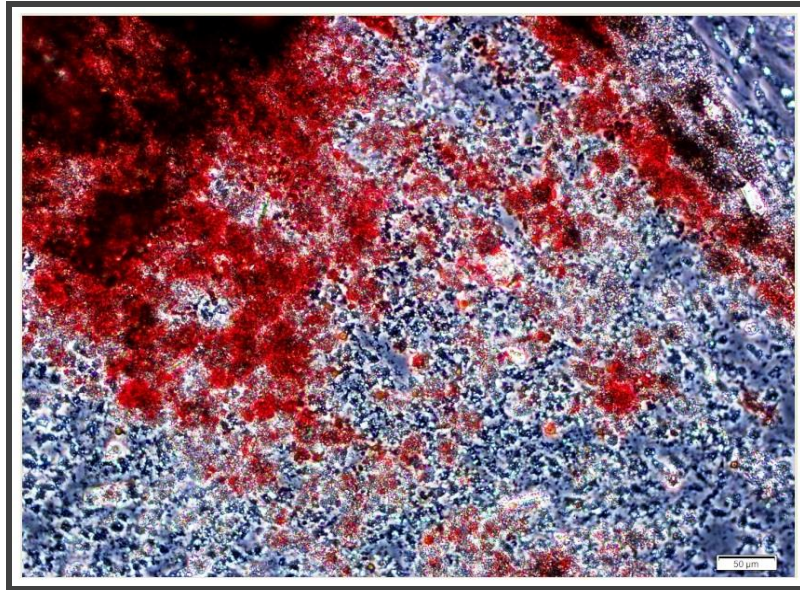
sYD-MKH'leri adipositlere yönlendirmek için alınan adipojenik farklılaşma ortamında yaklaşık 15 gün sonunda morfolojik olarak değişimler gözlenmiştir. sYD-MKH'lerin 15 günlük adipojenik farklılaşma besiyeri ile inkübasyonu sonunda sabitlenerek Oil Red O boyası ile boyandığında, deney grubunda oluşan yağ veziküllerinin Oil Red O boyası ile reaksiyona girerek kırmızı renk verdiği, herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan kontrol grubunda ise hücrelerin farklılaşmaya gitmediği ve dolayısıyla Oil Red O boyası ile pozitif reaksiyon vermediği görülmüştür (Şekil 22).



**Şekil 22:** sYD-MKH'lerin adipojenik farklılaşmasının zıt-faz (A) ve İmmünfloresan mikroskopisi (B) görüntüleri. A: Adipojenik farklılaşma besiyerinde adipositlere yönlendirilmiş sYD-MKH'lerin morfolojik görüntüleri ile, B: sYD-MKH adipojenik farklılaşmasının Oil Red O boyası ile boyanmasının immünfloresan mikroskopisi ile görüntüleri izlenmektedir (Bar çubukları: A-20 µm, B-50 µm ).

### Osteojenik Farklılaştırma

Hücreler osteojenik farklılaşma besiyerinde yaklaşık 25 gün inkübe edilmiş ve bu inkübasyon sonrası Alizarin-Red-S boyaması ile kalsiyum nodüllerinin varlığı gösterilmiştir. Kalsiyum nodüllerinin boyanmasının sonucunda zıt-faz mikroskopik inceleme sonuçlarımız da Alizarin-Red S ile boyanmış kemik nodülleri izlenmiştir (Şekil 23).



**Şekil 23:** sYD-MKH'lerin kemik yönde farklılaşması. Osteojenik farklılaşma besiyerinde kemik farklılaşmasına alınmış hücrelerin kalsiyum nodüllerinin boyanma sonrası görüntüleri izlenmektedir (Bar çubuğu: 50 µm).

Herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinde ise kalsiyum fosfat nodülleri biriktirmediği ve dolayısıyla da Alizarin Red boyası ile pozitif reaksiyon vermediği tespit edilmiştir.

#### **4.3 Gen Aktarımı (Elektroporasyon)**

Aktarım öncesinde plazmid, endotoksinleri ortamdan uzaklaştıracak izolasyon kiti ile saflaştırılmış ve plazmid hücre kültürü ortamına eklenerek hücreler üzerinde toksik etkiye yol açmadığı gösterilmiştir. Gen aktarımından 5 gün sonra alınan görüntülerde yeşil ışık veren hücreler gözlenmiştir.

#### **4.4 Gen Transfeksiyon Verimi Ölçümü**

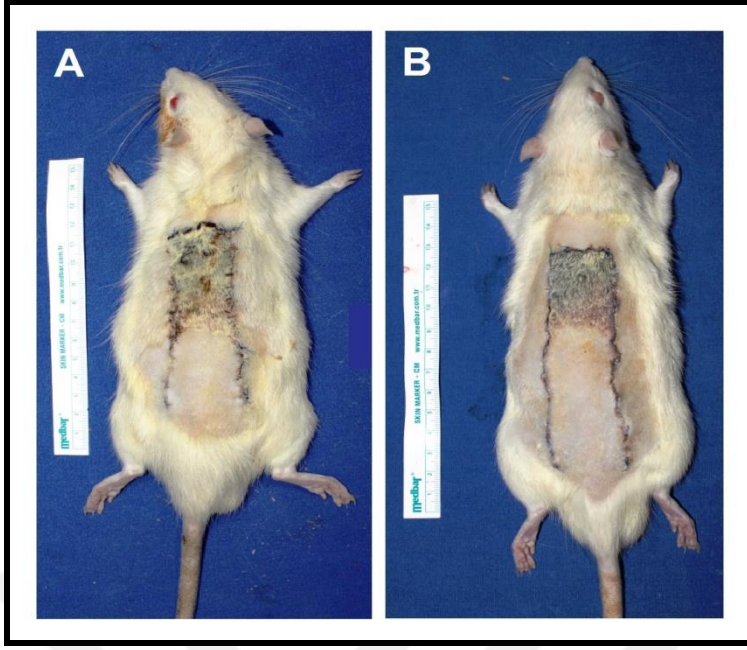
Hücrelerdeki farklı ışımaya miktarları gen kopya sayıları ile doğru orantılıdır. Bu hücrelerin kültürüne G418 içeren L-DMEM ortamında devam edilmiş ve 3. pasajın sonuna gelindiğinde hücreler GFP<sup>+</sup> hücre oranları için akım sitometresinde incelenmiştir. Hücre sayımları sonucunda bu hücrelerin GFP<sup>+</sup> oldukları bulunmuştur.

#### **4.5 Makroskobik ve Mikroskobik Değerlendirme Sonuçları**

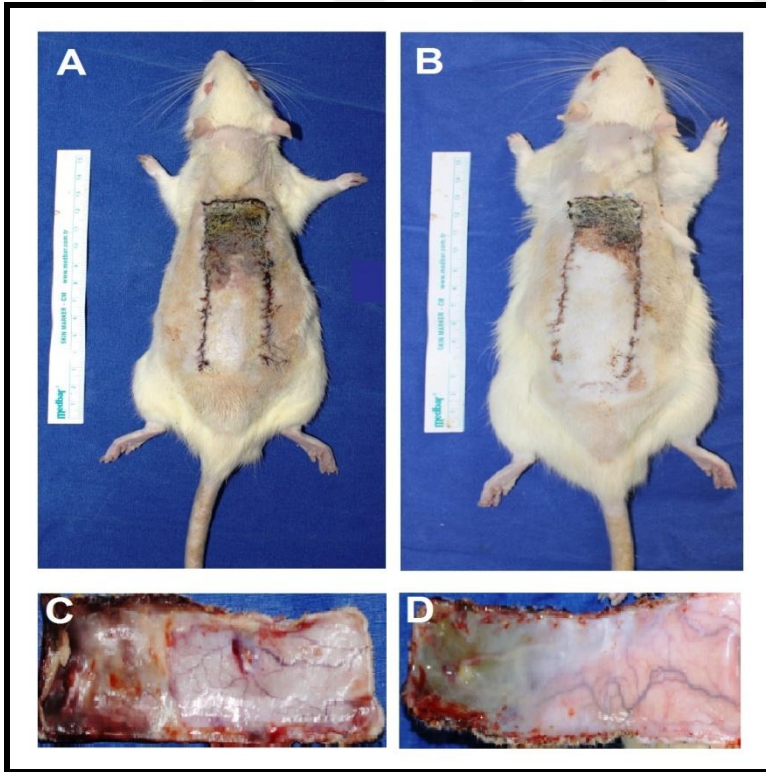
Tüm gruplardaki fleplerin görünümü makroskobik olarak da değerlendirildi. Radyoterapi almış grupta fibrotik, ince yüzeylerinde yeryer ülserasyonların olduğu flepler görülürken radyoterapi sonrası ise bu etkilenmelerin daha az olduğu görüldü (Şekil 24,25).

Fleplerin damar yapısına bakıldığında ise, Makroskobik olarak radyoterapi grubundaki damarların vazokontrükte, dirseklenmeler yapan ve organizasyondan uzak olduğu görülürken, radyoterapi sonrası sYD-MKH uygulanan fleplerde tek ve daha vazodilate damarlar etrafında organize olmuş küçük damarların geliştiği farkedildi (Şekil 25).





**Şekil 24:** Kontrol gruplarından postoperatif 7. gün fleplerin görünümü. **A:** Kontrol flep görünümü, **B:** Kontrol-kök hücre uygulanmış flep görünümü.

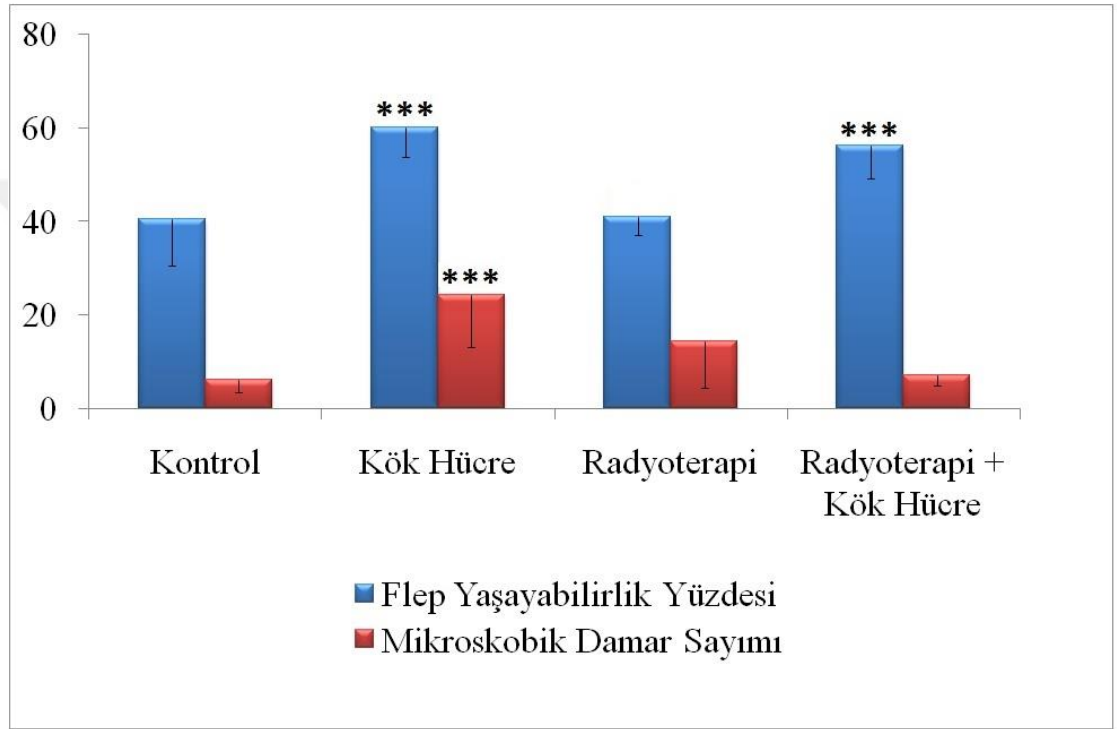


**Şekil 25:** Işınlanmış gruplarda postoperatif 7. gün fleplerin görünümü. **A:** Işın almış flep, **B:** Işın almış-kök hücre uygulanmış flep, **C:** Işın almış flebin damarları, **D:** Işın almış-kök hücre uygulanmış flebin artmış damar çapı.

## 4.6 İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları

### 4.6.1 Flep Yaşayabilirliği ve Damar Sayımı

Gruplar arasındaki flep yaşayabilirliklerini ve damar sayımını değerlendirilmek amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi ile grupların farklılıklarını belirlemek için Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılmıştır.



**Tablo 1:** Gruplar arası flep yaşayabilirliği ve mikroskobik damar sayımı

#### *Flep Yaşayabilirliği*

**A (Kontrol)** grubunda (n=10), sıçan McFarlane flep yaşayabilirlik oranlarında % 26,44 - % 60,60 arasında değişimler gözlemlendi (ortalama: % **40,46** ± 9,93).

**B (Kök Hücre)** grubunda (n=10), sıçan McFarlane flep yaşayabilirlik oranlarında % 50,83 - % 68,58 arasında değişimler gözlemlendi (ortalama: % **60,07** ± 6,40).

**C (Radyoterapi)** grubunda (n=10), sıçan McFarlane flep yaşayabilirlik oranlarında % 32,91 - % 46,87 arasında değişimler gözlemlendi (ortalama: % **40,90** ± 3,91).

**D (Radyoterapi + Kök Hücre)** grubunda (n=10), sıçan Mcfarlane flep yaşayabilirlik oranlarında % 47,48 - %67,89 arasında değişimler gözlemlendi (ortalama %**56,13**± 7,10).

A grubu ve B grubu arasında ileri düzeyde anlamlı fark izlenmiştir (p<0,001). A grubunda flep yaşayabilirliği ortalama % 40,46 iken C grubunda % 40,90 olmuş ve anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05).

B grubu ile diğer gruplar(A ve C grubu) arasında ileri düzeyde anlamlı fark görülürken (p<0,001), D grubuna göre flep yaşayabilirliğini artırsa da iki grup arasında anlamlı fark izlenmemiştir (p>0,05).

C grubu ve D grupları arasında ileri düzeyde anlamlı fark izlenmiştir (p<0,001) (Tablo 1).

### ***Damar Sayısı***

**A (Kontrol)** grubunda (n=10), histolojik preparatlarda 10 alanda sayılan ortalama damar sayısında 3 - 10 arasında değişimler gözlemlendi (ortalama: **6,2** ± 2,65).

**B (Kök Hücre)** grubunda (n=10), histolojik preparatlarda 10 alanda sayılan ortalama damar sayısında 5 - 40 arasında değişimler gözlemlendi (ortalama: **24,3** ± 11,23).

**C (Radyoterapi)** grubunda (n=10), histolojik preparatlarda 10 alanda sayılan ortalama damar sayısında 8 - 35 arasında değişimler gözlemlendi (ortalama: **14,4** ± 9,86).

**D (Radyoterapi + Kök Hücre)** grubunda (n=10), histolojik preparatlarda 10 alanda sayılan toplam damar sayısında 3 - 40 arasında değişimler gözlemlendi (ortalama: **7,1** ± 2,18).

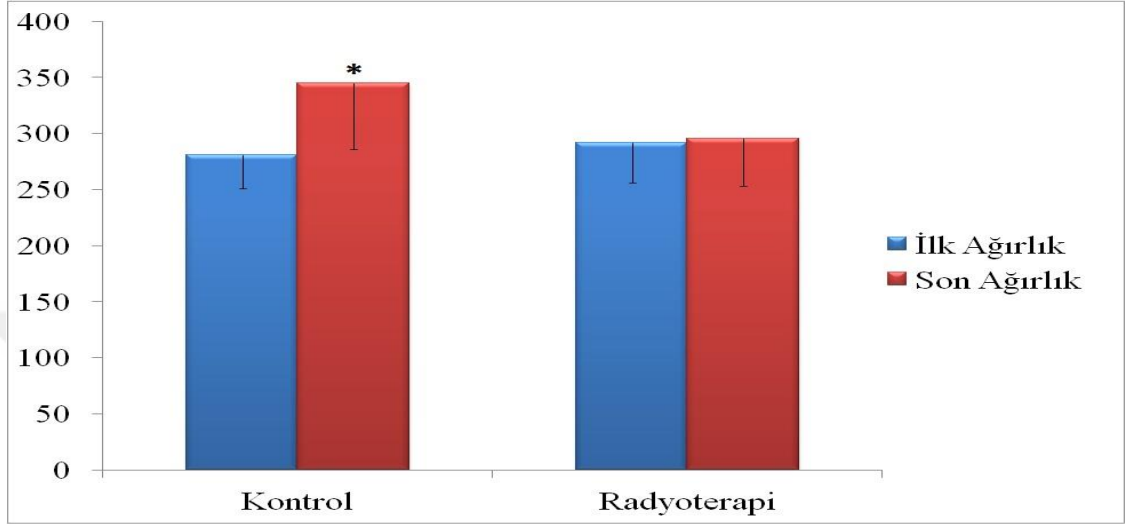
B grubu (kök hücre) grubu ile A ve D grubu arasında damar sayıları açısından ileri düzeyde anlamlı fark saptanmıştır (p<0,001). Yine B grubunda C grubuna göre önemli fark tespit edilmiştir (p=0,032).

C grubunda (radyoterapi) damar sayısı artmış olsa da, A ve D grupları arasında istatistiksel açıdan fark görülmemiştir (p>0,05).

Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak damar sayısı açısından fark izlenmemiştir (p>0,05) (Tablo 1).

#### 4.6.2 Ağırlık Değişimi

Ölçülen ilk ağırlık ve son ağırlık arasındaki farklılığı belirlemek için Eşleştirilmiş T Testi kullanıldı.



**Tablo 2:** Kontrol ve radyoterapi grubunda ağırlık değişimi

**A (Kontrol)** grubunda (n=10), ilk ölçülen ağırlıkların ortalaması **280gr ± 29,74** iken son ölçülen ağırlıklarının ortalaması **345gr ± 59,31** olarak bulundu.

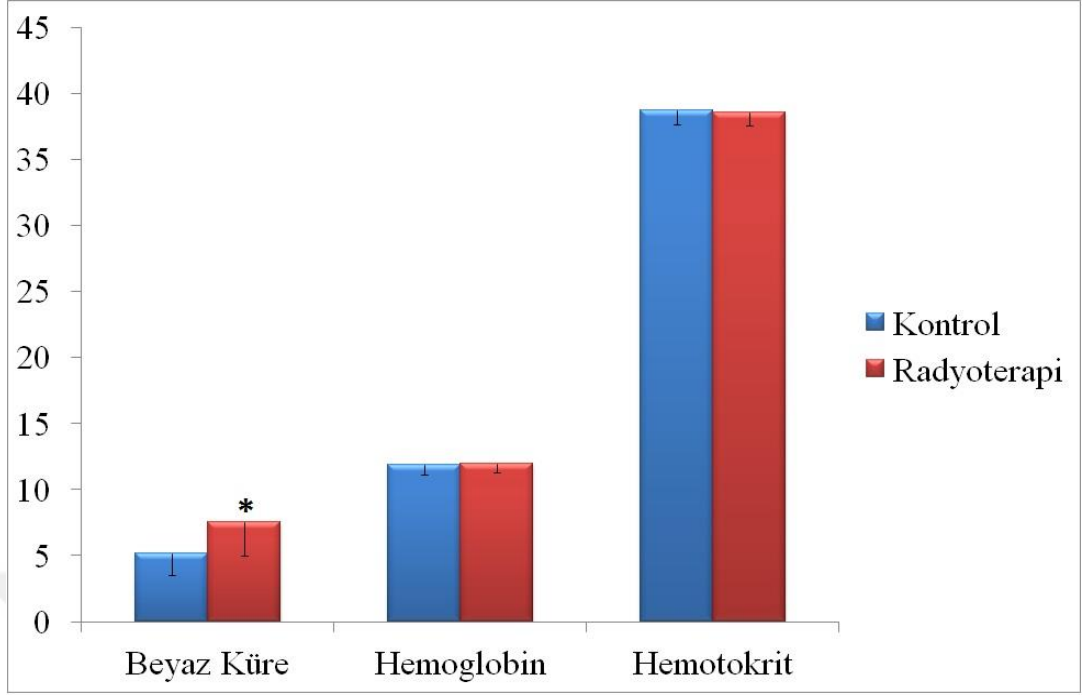
**C (Radyoterapi)** grubunda (n=10), ilk ölçülen ağırlıkların ortalaması **291,70gr ± 35,92** iken son ölçülen ağırlıklarının ortalaması **295,50gr ± 42,31** olarak bulundu.

A (Kontrol) ve C (Radyoterapi) gruplarında, ilk ve son ağırlıklar dikkate alındığında A grubunda istatistiksel olarak önemli bir artış izlenirken ( $p=0,027$ ), C grubunda önemli bir fark tespit edilmemiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo2).

#### 4.6.3 Hemogram değişimi

Deney hayvanları sakrifiye edildiklerinde kanları alındı ve radyoterapi almamış ve almış grupların hemogram değerleri arasındaki farklılığı belirlemek için Eşleştirilmiş T Testi kullanıldı.





**Tablo 3:** Kontrol ve radyoterapi grubunda beyaz küre, hemoglobin ve hematokrit değişimi

**A (Kontrol)** grubunda (n=10), beyaz küre ortalama **5,16 ± 1,62**, hemoglobin ortalama **11,90 ± 0,73** ve hematokrit ortalama **38,73 ± 1,12** olarak tespit edildi.

**C (Radyoterapi)** grubunda (n=8), beyaz küre ortalama **7,50 ± 2,52**, hemoglobin ortalama **11,94 ± 0,62** ve hematokrit ortalama **38,58 ± 0,99** olarak tespit edildi (Tablo 3).

#### ***Beyaz Küre***

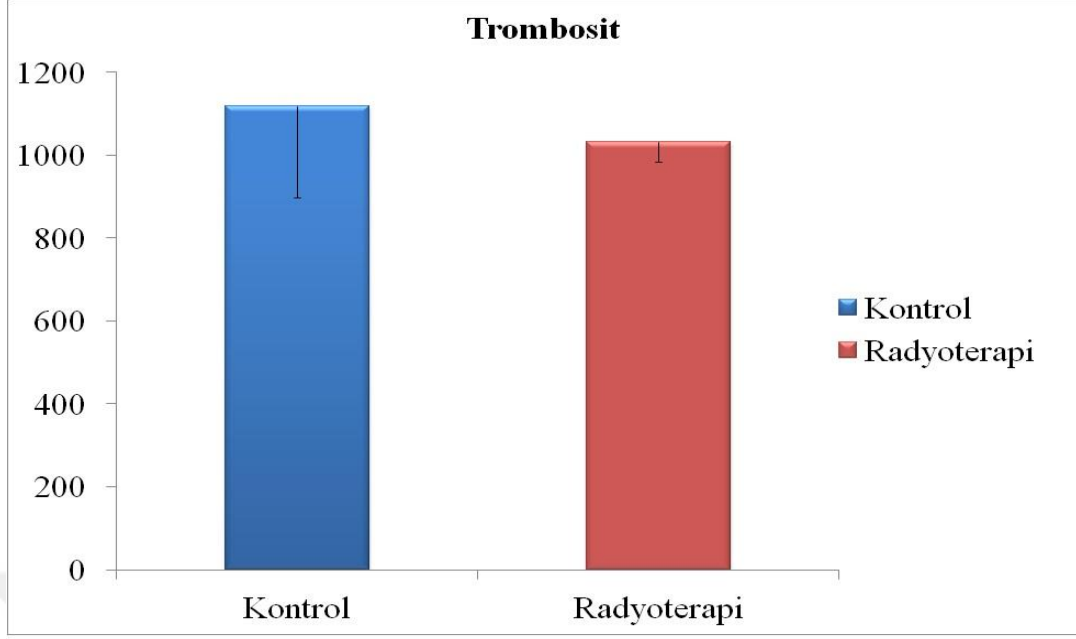
C grubunda A grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir beyaz küre artışı izlendi (p=0,029).

#### ***Hemoglobin***

A grubu ile C grubu arasında hemoglobin değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05).

#### ***Hematokrit***

A grubu ile C grubu arasında hematokrit değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p>0,05).



**Tablo 4:** Kontrol grubu ve radyoterapi grubunda trombosit değışimi

**A (Kontrol)** grubunda (n=10), sıçanda trombosit ortalama  $1119,40 \pm 221,91$  olarak tespit edildi.

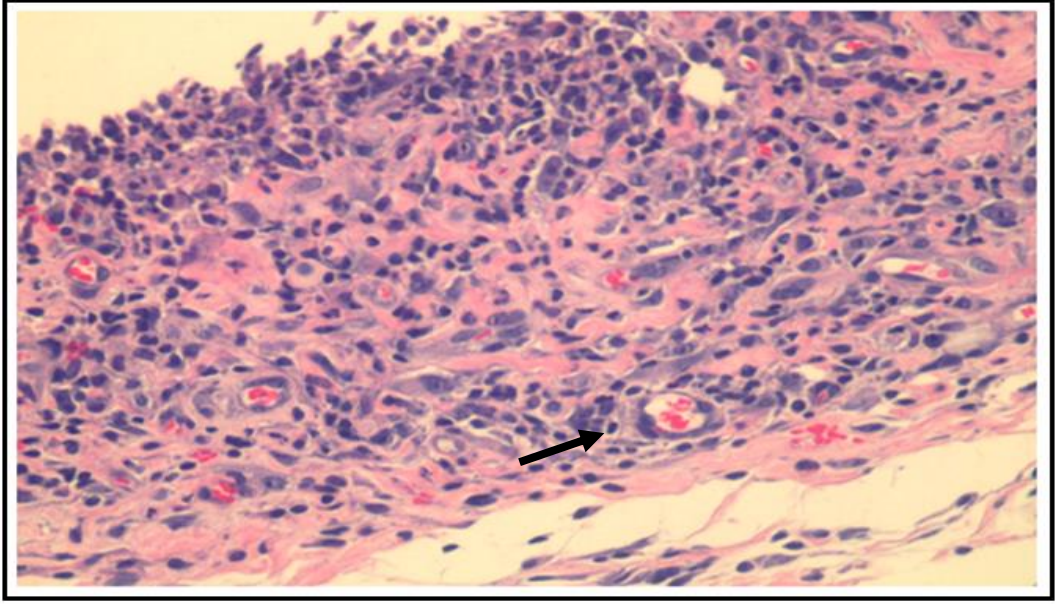
**C (Radyoterapi)** grubunda (n=8), sıçanda trombosit ortalama  $1031,25 \pm 246,30$  olarak tespit edildi (Tablo 4).

#### **Trombosit**

A grubu ile C grubu arasında trombosit değışimi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ( $p>0,05$ ).

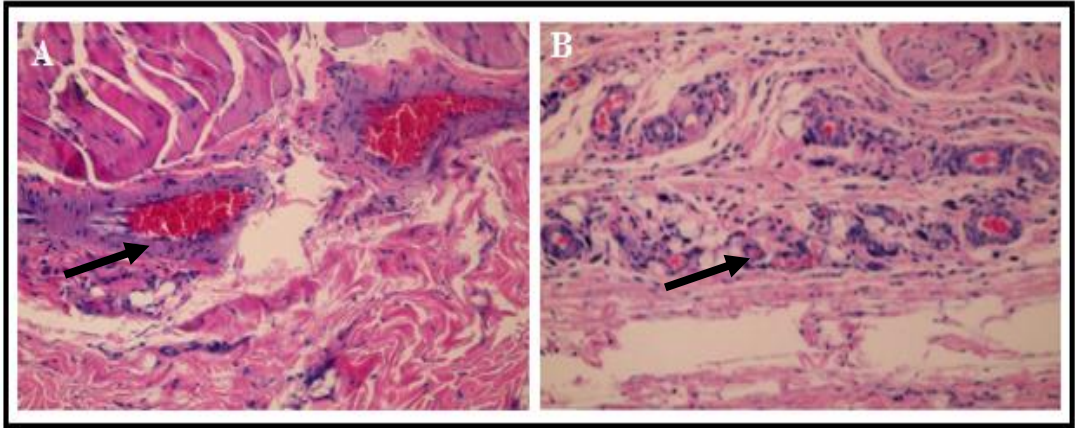
#### **4.7 Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları**

Yapılan histopatolojik değerlendirmede radyoterapi verilmiş gruptan kaldırılan fleplerde fokal parakeratoz, ektrin yapılarında azalma perivasküler lenfositik infiltrat (Şekil 26), vasküler konjesyon bulguları, dermiste kollajen doku artışı, fibrozis, epidermal atrofi ve dermiste fibrozis artışı gözlemlendi. Fleplerde ülserasyon, erozyon dermal damarlarda proliferasyon ve vaskülit benzeri etkiler görüldü (Şekil 27).

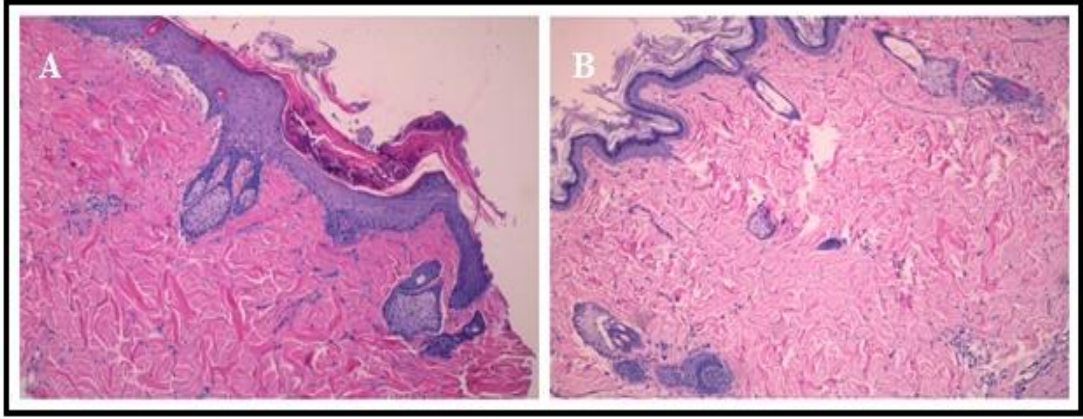


**Şekil 26:** Dermiste perivasküler lenfositik infiltrasyonu

Radyoterapi sonrası kök hücre uygulanan fleplerin histopatolojisinde ise yine hiperkeratoz, fokal parakeratoz, ektrin yapılarında azalma perivasküler lenfositik infiltrat, vasküler konjesyon bulguları, dermiste kollajen doku artışı, fibrozis, epidermal atrofi ve dermiste fibrozis görüldü (Şekil 28). Ancak ülserasyon, erozyon görülmedi ve dermal damar endotelinde daha az etkilenme tespit edildi.



**Şekil 27:** Radyoterapi sonrası damarsal değişimler. **A:** Vasküler konjesyon bulguları **B:** Dermiste kapiller proliferasyon ve perivasküler lenfositik infiltrat.



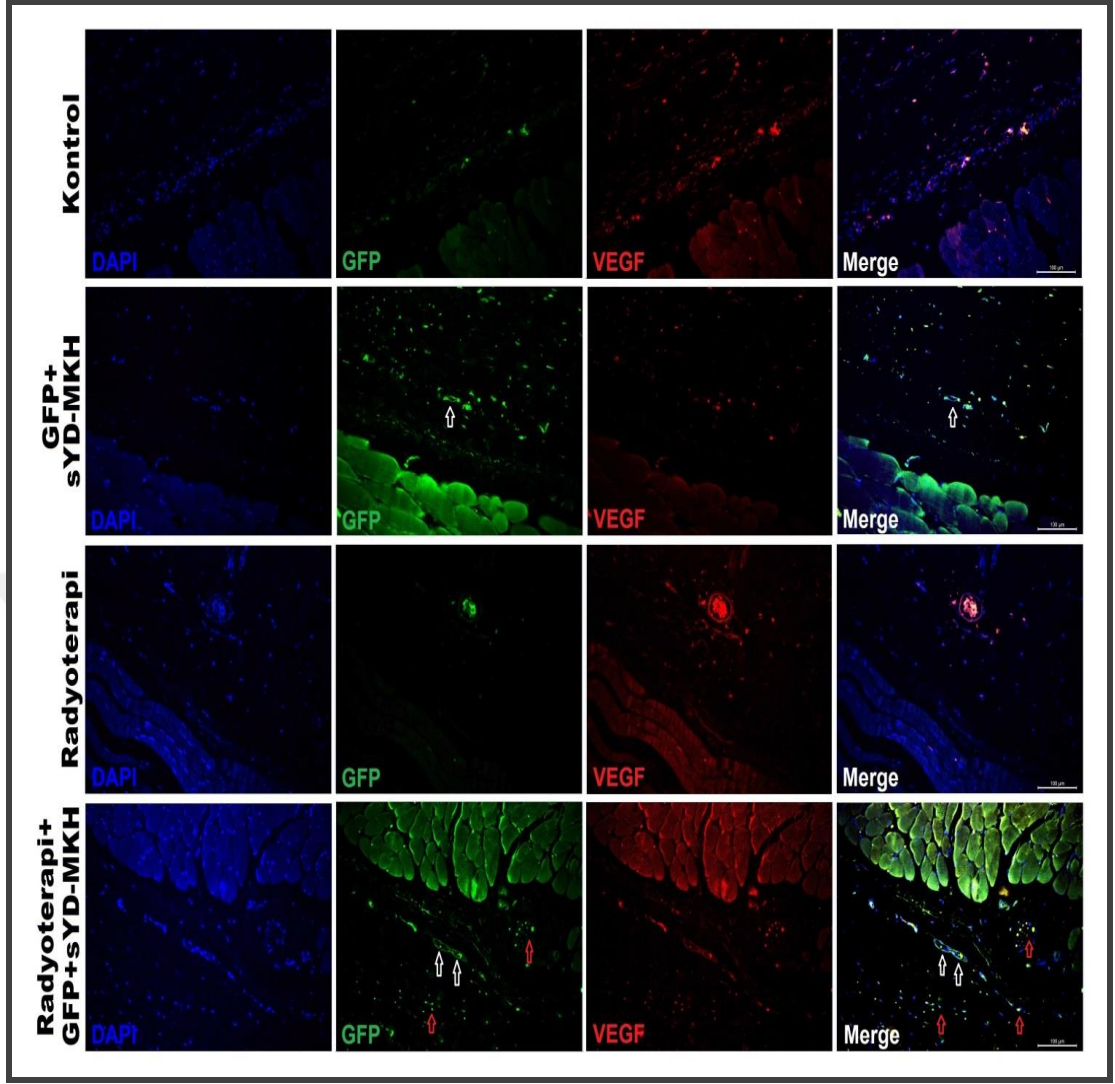
**Şekil 28:** Radyoterapi sonrası histopatolojik değişiklikler. **A:** Dermiste kollajen doku artışı ve ekrin yapılarda azalma, **B:** Fokal parakeratoz ekrin yapılarda azalma.

#### 4.8 İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

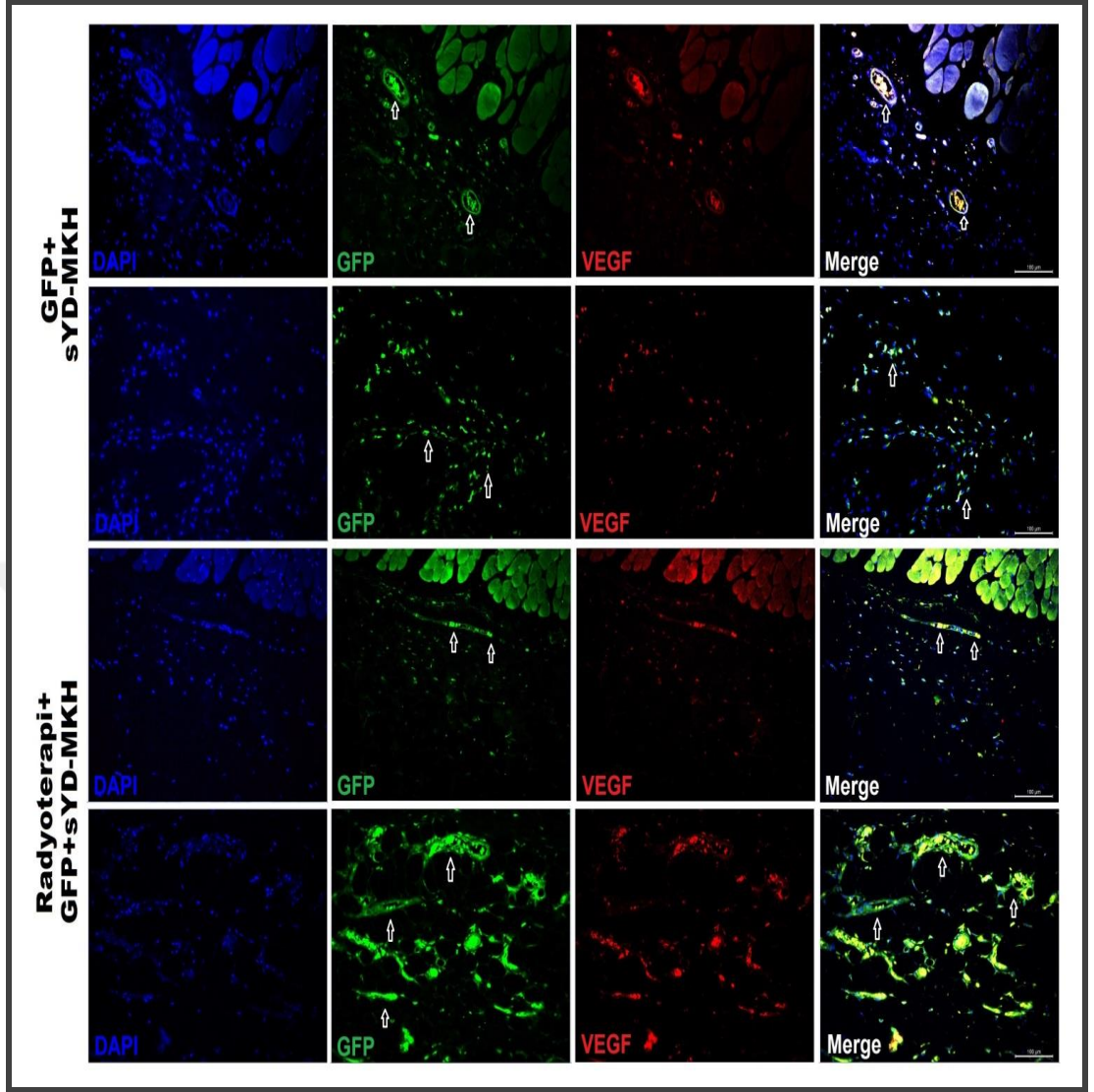
Deney gruplarından hazırlanan doku kesitlerinin DAPI, GFP, VEGF ve DAPI, GFP, Vimentin ile boyanmasından sonra kesitler floresan mikroskopta incelenip her bir boyamanın görüldüğü üçer ayrı fotoğraf çekildikten sonra, fotoğraflar bilgisayar ortamında “merge” işlemine tabi tutularak, üç boya için de pozitif reaksiyon veren hücreler izlendi.

Sonuç olarak, GFP+sYD-MKH ve Radyoterapi+GFP+sYD-MKH gruplarından alınmış doku kesitlerinde GFP, VEGF ve Vimentin ile pozitif reaksiyon veren hücreler gözlemlenirken (Şekil 29,30,31), kontrol ve radyoterapi gruplarında ise GFP negatif ile Vimentin ve VEGF için zayıf pozitif reaksiyon veren hücreler izlendi (Şekil 29,30,31).

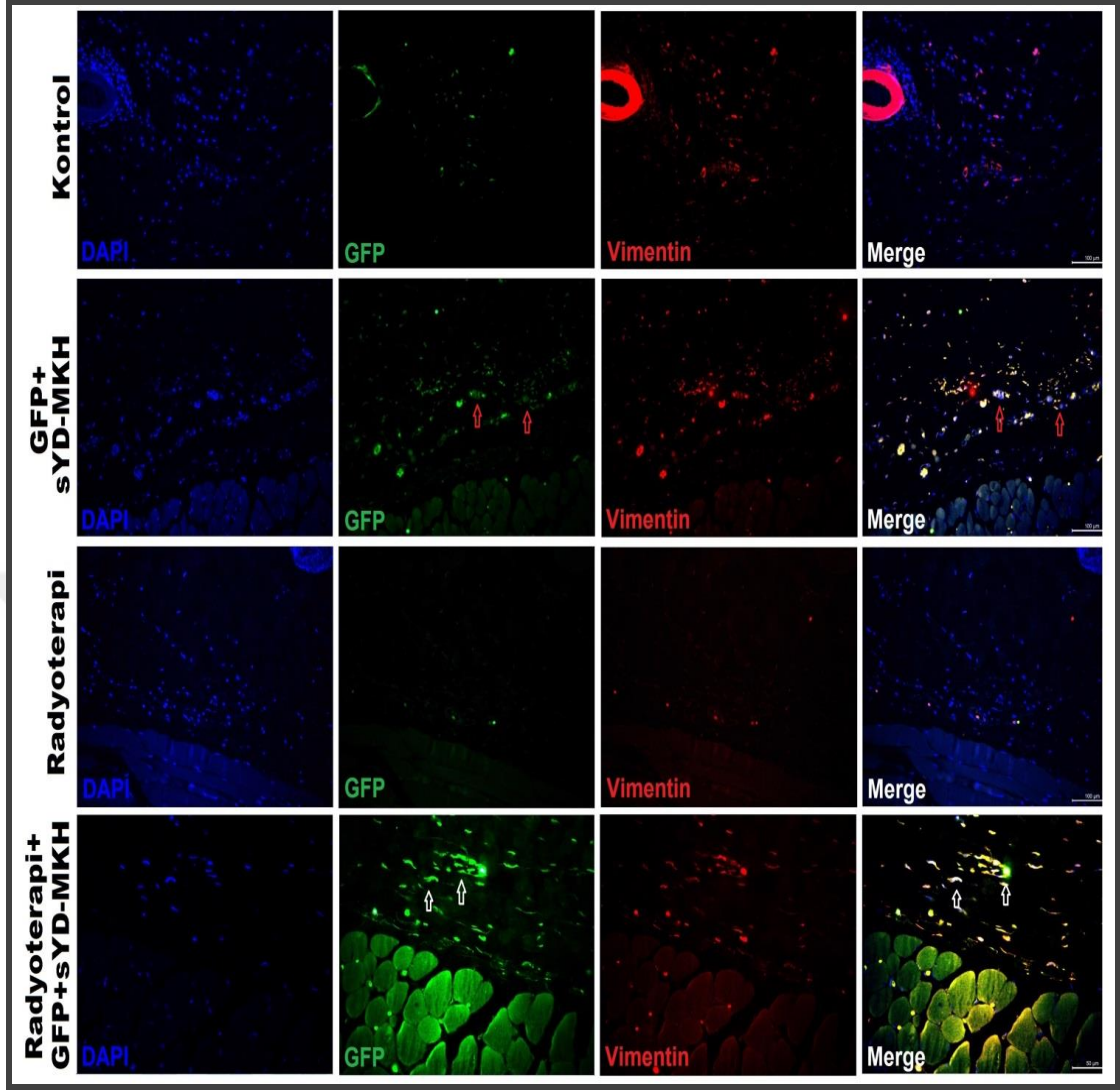




**Şekil 29:** Tüm deney gruplarından hazırlanan doku kesitlerinin GFP ve VEGF antikorları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. GFP+sYD-MKH ve Radyoterapi+GFP+sYD-MKH gruplarında GFP ve VEGF boyamasının pozitif olduğu izlenmektedir (Bar Çubukları: 100 µm).



**Şekil 30:** Kök hücre verilen deney gruplarından hazırlanan doku kesitlerinin GFP ve VEGF antikorları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. GFP+sYD-MKH ve Radyoterapi+GFP+sYD-MKH gruplarında GFP ve VEGF boyamasının pozitif olduğu izlenmektedir (Bar Çubukları: 100 µm).



**Şekil 31:** Tüm deney gruplarından hazırlanan doku kesitlerinin GFP ve Vimentin antikolları ile immün boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. GFP+sYD-MKH ve Radyoterapi+GFP+sYD-MKH gruplarında GFP ve Vimentin boyamasının pozitif olduğu; kontrol gruplarında GFP boyamasının negatif, Vimentin'in ise zayıf pozitif olduğu izlenmektedir(Bar Çubukları: 100 µm).

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde, baş boyun bölgesi, toraks bölgesi ve alt-üst ekstremitte bölgelerinde malignansilerin tedavisinde cerrahi radyoterapi ve kemoterapi kullanılmaktadır. Bu tedaviler tek başlarına veya kombine olarak uygulanabilirler. Radyasyon tedavisi özellikle hızlı çoğalan neoplastik hücreler üzerinde etkilidir (10). 2010 yılı ulusal istatistiklerine göre Türkiye’de yeni kanser tanısı alan hastaların tüm tedavi ve bakımları süresince yaklaşık % 60-70’nin en az bir kez radyoterapi aldığı bildirilmiştir (6). Ancak uygulama sırasında ve sonrasında, vücutta moleküler ve hücresel düzeylerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişiklikler gelişebilmektedir. Bu değişiklikler maruz kalınan radyasyonun cinsine, miktarına ve süresine göre geçici veya kalıcı tipte olabilir (10-14).

Cilt, radyoterapi tedavisinde doz kısıtlayıcı bir doku olmamakla birlikte oldukça sık etkilendiği de bilinmektedir (10). Radyoterapi neticesinde asıl olarak, mikrovasküler endotel hasarı gelişir, endotel hasarı da doku hipoksisine ve iskemiye yol açar. (12-15).

Cilt yaralanmaları derin yumuşak doku içine, hatta altta yatan kas ve kemiğe ulaşabilir. Radyoterapinin yol açtığı bu yaralanmaların veya radyoterapi almış alanlarda uygulanan cerrahi sonucu ortaya çıkan yaralanmaların tedavisi oldukça zordur. Radyasyon hasarlanmaları kurnazca ilerleyerek nekroz, bölgesel enfeksiyon ve iyileşme bozukluklarına neden olabilmektedir (10,13).

Kim J.H 2013’de radyasyon sonrası akut epitel doku ve vasküler endotel hasarının asıl patogenezinde serbest oksijen radikalleri, pro-enflamatuar sitokin/kemokinlerin etken olduğunu belirtmiştir (12).

Günümüzde COX-1, COX-2 inhibitörleri gibi çeşitli farmakolojik ajanlar radyoterapinin cilt üzerine olan semptomlarını hafifletmek ve tedavi etmek için kullanılmaktadır. Deneysel olarak topikal uygulandığında histon deasetilaz inhibitörleri, sodyum butirat ve valproik asit kullanımının yararları gösterilmiştir. HDAC inhibitörleri kronik zedelenme üzerinde benzer azaltıcı rollere sahiptir. Dermal ve deri altı kronik radyasyon fibrosizini azaltmak amacıyla FDA onaylı anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) ramipril, kullanılarak zararlı etkileri



hafiflettiği görülmüştür. Ayrıca TGF- $\beta$  reseptörü-1 inhibitörü kullanarak fibrosizin azaltılabildiği, smad3'ün de topikal olarak kullanılabildiği belirtilmektedir (10,12). Brown ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarla TNF- $\alpha$  inhibitörü olan etanersept'in de radyasyona bağlı deri hasarını azalttığını göstermişlerdir (12). Non-steroidal anti-enflamatuvar ajanların enflamasyonu baskılamak için kullanıldığı, pentoksifilin'in kan akımını dengelediği ve  $\alpha$ -tokoferol'ün (vitamin E) güçlü bir antioksidan olarak kullanıldığı bilinmektedir (12). Hiperbarik oksijenin radyasyon hasarlı dokuda anjiogenezi teşvik ettiği gösterilmiştir (15).

Kök hücrelerin, radyasyona bağlı doku hasarını azaltmak ve yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılabildiği bilinmektedir (11,19,21,22). Donahue ve arkadaşları, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve plerixafor uygulamasının progenitör ajanları stimüle ederek, radyasyona bağlı doku hasarı tedavisinde kullanılabileceğine yönelik çalışmalar yapmışlardır (12).

Hill ve arkadaşları kemik iliğinden salınan mezenkimal progenitör hücrelerin, endotel ve hematopoetik progenitör hücrelerine farklılaşarak, yaralı dokulara göç ettiğini ve doku onarımı ve yeniden şekillendirmeyi sağladığını, Colvin ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, radyasyon hasarında da kök hücrelerinin benzer roller üstlendiğini bildirmişlerdir (12).

Lombaert ve arkadaşları farelerde tükürük bezlerinde radyoterapi neticesinde oluşan hasarın tedavisinde kök hücrelerin olumlu etkilerini göstermişler, Riccobono ve arkadaşları ise otolog yağ dokusundan elde ettikleri kök hücreler ile domuzlarda radyasyon sonrası oluşan deri hasarını azalttığını gösteren çalışmalar yapmışlardır (12).

François 2007'de fareler üzerinde yaptığı çalışmada radyasyon sonrası erken dönemde kök hücre uygulaması ile radyasyon sendromunun olumsuz etkilerinin azaltılabildiğini göstermiştir (22).

Radyonekroz ve lokal nükslerin eksizyonu sonrası oluşan defektleri onarmak ya da aynı alanda yapılacak rekonstrüktif işlemler için greftleme yapılamadığında, ayrıca protez gibi allogreftleri örtmek gerektiğinde lokal ve serbest fleple onarım gerekmektedir. Random paternli deri flepleri, plastik cerrahide oldukça sık kullanılmaktadır. Ancak flep distalinde ve periferinde gelişen iskemi ve nekrozlar hem hasta hem de cerrah açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır (23-29,77,78).

Bu tür fleplerde gelişen dolaşım problemlerinin çözümüne yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Stewart ve arkadaşları hiperbarik oksijenin cilt fleplerinde yaşayabilirliği artırdığını (79), Zaccaria ve arkadaşları C vitamininin iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığını (80), Axfort-Gately ve arkadaşları da yüksek doz E vitamininin iskemiye azalttığını (81), Karacaoğlu ve arkadaşları parenteral pentoksifilin ve topical nitrogliserinin flep surveyini olumlu etkilediğini göstermişlerdir (82).

Rohrich ve arkadaşları flep yaşayabilirliğini artırmaya yönelik ideal ilacı kolay uygulanabilir, güvenilir, etkili sonuçlar alınabilir, postoperatif olarak kullanılabilir, ucuz, kolay elde edilebilir ve flep nekrozunda koruyucu olarak tanımlamışlardır (83). Günümüzde flep yaşayabilirliği üzerine pekçok farmakolojik ajanla çalışmalar yapılsa da standart kullanıma giren bir ilaç bulunmamaktadır.

Kök hücre teknolojisinin gelişimiyle birlikte araştırmacılar, bu hücrelerin farklılaşma özelliklerinden yararlanarak, doku rejenerasyonunda kullanımlarına yönelik çalışmalar yapmışlardır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) taşıyan kök hücrelerin anjiogenezi artırarak iskemide etkin olduğu gösterilmiş (84), sonrasında yapılan çalışmalarda anjiogenez sürecinde VEGF'ün primer mediatör olduğu anlaşılmıştır (85). Ayrıca vaskülogenezin anlaşılmasıyla tarif edilen endotelial öncü hücreler (EÖH) ile yapılan deneysel çalışmalarda bu hücrelerin kemik iliğinden çıkarak, iskemik alanlarda toplandığı gösterilmiş ve iskemik dokuda vaskülogeneze katılarak kollateral damar gelişimini uyardıkları bildirilmiştir (86,87).

Patricia Zuk ve arkadaşları 2001 ve 2002 yıllarında yağ dokusunun farklılaşabilme kabiliyeti yüksek olan, yoğun miktarda kök hücre barındırdığını göstermişlerdir. Ayrıca bu hücrelerin tek tip hücre olduğunu kanıtlayıp yağ doku kaynaklı kök hücre olarak adlandırmışlardır (70,88).

Literatürde kök hücrelerin random patern fleplerinin yaşayabilirliğini artırdığını gösteren çalışmalar vardır (30,42,89). Lu ve arkadaşları (90) 2008'de, Yang ve arkadaşları (91) 2010'da, Li ve arkadaşları (92) 2011'de ve Gong ve arkadaşları (93) 2014 yılında da benzer şekilde kök hücre uygulaması ile flep yaşayabilirliğinin arttığını gösteren çalışmalarını yayınladılar.

Yaptığımız deneysel çalışma, radyasyon hasarına uğramış alanlardan kaldırılan rastgele cilt fleplerinin yaşayabilirliği üzerine kök hücrelerin etkilerinin

incelenmiş olması açısından ilk kez yapılmış bir çalışma olup, literatürde böyle bir çalışma mevcut olmadığından özgün değer taşımaktadır.

Çalışmamızda, deney hayvanları 4 gruba ayrılarak 2 gruba sıçan cildi üzerinde küçük erozyonlar, iyileşebilen cilt ülserleri ve iskemik dermal nekroz ortaya çıkarmak için Schwentker ve Akita'nın da çalışmalarında gösterdiği tek fraksiyonda 20 Gy radyoterapi verildi (15,20). Radyasyon etkileri 6. hafta histopatolojik olarak gösterilerek, 8. hafta da cerrahi işleme geçildi. 3x10 cm boyutlarında kaudal tabanlı McFarlane flebi kaldırıldı (31). Aynı anda sYD-MKH'leri flep pedikülüne yakın 6 noktaya lokal enjeksiyon yoluyla uygulayarak, postoperatif 7. günde flep yaşayabilir alan ölçümü, histopatolojik ve immünohistokimyasal etkiler değerlendirildi (90-93). Ayrıca radyoterapi sonucu beslenme ve hemogram değişiklikleri takip edildi.

Çalışmamızda istatistiksel olarak radyoterapi alan grupta önemli bir ağırlık artışının olmaması, benzer araştırmalarda olduğu gibi radyoterapinin beslenme üzerindeki olumsuz etkilerine bağlandı (6,15 94,95).

Literatürde radyoterapi sonucu kemik iliğinin baskılanarak hemogram değerlerinin düştüğünü belirten yayınlar vardır (6,12). Çalışmamızda denekler kurşun levhalarla korunarak ve yüzeysel radyoterapi uygulayarak kemik iliği baskılanmasının önüne geçilmiştir. Bu nedenle hemoglobin, hematokrit ve trombosit değerlerinde anlamlı artışa rastlanmadı. Ancak radyoterapinin ciltte oluşturduğu enflamatuar etkiden dolayı beyaz kürede artış gözlenmiştir (12,95).

Park ve arkadaşları, sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında kök hücreleri random beslenen flep kaldırılması ile aynı anda sistemik olarak uygulamışlardır (85). Ayrıca kök hücreleri, flep pedikülüne intravasküler uygulayan çalışmalar da mevcuttur (96). Buna karşın başka çalışmalarda, lokal uygulama yöntemiyle hücrelerin verildikleri dokuda kümeler oluşturarak canlılıklarını korudukları gösterilmiştir. Ayrıca lokal uygulama ile sistemik uygulamada tetiklenebilecek kanser, romatoid artrit ve diyabetik retinopati gibi anjiogenik hastalıkların önüne geçilebileceği gösterilmiştir (97) Bununla birlikte sistemik enjeksiyonun belli teknik zorlukları varken, lokal enjeksiyonu çok daha kolay ve pratik bir yöntem olarak belirlenmiştir. Bu açıdan literatürlerin çoğunda çalışmamızda olduğu gibi lokal uygulama kullanıldığı belirtilmiştir (97-102).

Ayrıca Lu ve Uysal random patern flep kaldırılması ile aynı anda kök hücre uygulayarak flep canlılığında artış sağlayan deneyler yapılmışlardır (90,99). Ancak kök hücre uygulayıp bir süre bekledikten sonra, flep kaldırılan çalışmalar da rapor edilmiştir(96).

Histopatolojik değerlendirmemizde, radyoterapi verilmiş gruplardan kaldırılan fleplerde fokal parakeratoz, ektrin yapılarında azalma, dermiste kollajen doku artışı, fibrozis, epidermal atrofi ve dermiste fibrozis artışı gözlemlendi. Yine aynı fleplerde ülserasyon, erozyon, dermal damarlarda proliferasyon, perivasküler lenfositik infiltrasyonu, vasküler konjesyon bulguları, damarsal dirseklenmeler, damar endotelial bozunma ve vaskülit benzeri etkilere rastlandı. Radyoterapiden sonra kök hücre verilen grupta ise radyoterapinin olumsuz etkilerinin (erozyon, ülserasyon, vaskülit benzeri tablo, endotelial bozunma ve dismorfik bağ doku organizasyonu) azaldığı ve fleplerde iyileşmelerin olduğu gözlemlendi.

Akita'nın 2010'da yaptığı çalışmada 20 Gy dozda radyoterapi uygulanan bölgeye debridman sonrası MKH ve bFGF uygulamıştır. Akita 10. günde yaptığı değerlendirmede yara iyileşmesinin arttığını, vasküler yapılar ve hücreler üzerinde olumlu etkiler yaptığını göstermiştir (11). Rezvani de 2013' de kök hücre uygulaması ile radyoterapinin cilt üzerinde oluşturduğu etkilerin histopatolojik olarak gerilediğini belirtmiştir (111). Bizim çalışmamızda da radyoterapi sonrası cerrahi sırasında kök hücre uygulaması ile flepte histopatolojik olarak benzer olumlu etkiler görüldü.

Yaptığımız değerlendirmeler sonucunda, kök hücre grubunda kontrol grubuna göre benzer çalışmalarda olduğu gibi mikroskobik damar sayısında ve flep canlılığında anlamlı düzeyde artış gözlemlendi (90-93).

Çalışmamızda kontrol ve radyoterapi grupları arasında flep yaşayabilirliği açısından anlamlı bir fark görülmedi. Schwentker hiperbarik oksijen tedavisi radyasyon hasarı üzerindeki etkilerini araştırdığı çalışmasında, gruplar arası random fleplerin yaşayabilirliğini de değerlendirmiştir. Schwentker flep canlı alanlarının kontrol ve radyoterapili gruplarda birbirine benzer olduğunu, ancak radyoterapili gruplarda flepte epidermolizis geliştiğini göstermiştir (15).

Radyoterapi sonrası kök hücre verilen grupta, kontrol grubuna göre damar sayısında istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile küçük bir artış izlendi. Ancak flep yaşayabilirliğindeki artış anlamlı düzeydeydi. Makroskobik ve mikroskobik değerlendirmelerde kök hücre uygulanan fleplerin damar çapında artış görüldü. Ek olarak İmmünohistokimyasal boyamalar neticesinde GFP ve VEGF pozitif hücrelerin, kök hücre uygulanan fleplerin vasküler yapısına katıldığı tespit edildi.

Birçok çalışmada kök hücrelerin dokuda damar yapısına katıldığı gösterilmiştir (90,99,100). Çalışmamızda aldığımız doku biyopsilerinde uygulanan GFP işaretli sYD-MKH'lerin damar yapısına endotel olarak katıldığı gösterilmiştir. Bu hücrelerin dokuda gösterilmesi, uygulama sırasında hücrelerde herhangi bir canlılık kaybı olmadığını göstermesinin yanı sıra, sYD-MKH'lerin endotel hücrelerine farklılaşarak vasküler yapılar üzerindeki etkisini göstermektedir.

Yeni damar oluşumunda anjiogenez ve vaskülogenez olarak kabul gören iki teori vardır (103). Rigotti 2007'de yaptığı çalışmada adipoz kaynaklı kök hücrelerin radyasyon hasarında mikroanjiopatileri genişleterek yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilerini göstermiştir (104).

Mikami ve Janeczek 2013 de yaptıkları çalışmalarda büyüme faktörleri etkisiyle, kök hücrelerin damarlar üzerinde dilatasyon yaparak, kan akımını yeniden regüle ederek iskemiye azaltabileceğini gösterdiler (103,104). Flep cerrahisi sonrası kullanılan vasodilatatör ajanların da, flep sağ kalımında olumlu etkilerini gösteren çalışmalar vardır (28,106,107).

VEGF' anjiogenik, mitojenik etkileri olan ve vasküler geçirgenliği artıran bir mediatördür (85). Kryger 2000'de yaptığı çalışmada endotel hücrelerinde de nitrik oksit sentazı uyarma yoluyla vazodilatasyona neden olup aynı zamanda hücre göçünü uyarıp, apoptozisi inhibe ettiğini göstermiştir (45). Zhang ve Colwell'de daha sonra yaptıkları çalışmalarda benzer sonuçları rapor etmişlerdir (43,44).

MKH'lerin terapötik etkilerinin, yalnızca hasarlı dokuda direkt farklılaşmaları ile değil aynı zamanda parakrin ve otokrin faktörlerin üretimi ile de olduğuna inanılmaktadır. Hasarlı doku çevresindeki MKH'lar parakrin ve otokrin aktivitelere sahip olan çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımını destekleyebilir (94,107,108,109). Jalees Rehman ve arkadaşları yaptıkları

çalışmalarda sıçan MKH'larının spontan olarak TGF- $\beta$ 1, HGF ve IL-6 salgıladıklarını göstermişlerdir (69).

Ayrıca MKH'ların doku onarımını inflamasyon ve anjiogen

eze aracılık eden çözünebilir faktörlerin salınımı ile desteklediği kabul edilmektedir. Karaöz ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada, sıçan kemik iliği kaynaklı MKH'lar ile adacıkları birlikte kültüre ettiklerinde IL-6 ve TGF- $\beta$ 1 seviyelerinde artış belirlemiş ve MKH'lar tarafından salgılanan bu sitokinlerin MKH'ların anti-inflamatuar ya da antiapoptotik fonksiyonlarda rol alabileceğine vurgu yapmışlardır.

Radyoterapi uygulaması ve flep cerrahisi sonucu serbest oksijen radikallerinin doku hasarına neden olduğu bilinmektedir (12,16,38). Nicanor I. Moldovan ve arkadaşları 2014 yılında myokard enfarktüsü sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri üzerine kök hücrelerin etkisini araştırmışlardır. Uygulamadan 7 gün sonra yapılan değerlendirmelerde kök hücrelerin SOD'ı taklit ederek serbest oksijen radikallerinin etkilerini önleyebileceğini göstermişlerdir. Aynı zamanda kök hücrelerin hem kollajen salgılayan miyofibroblastlara, hem de diğer benzer hücrelere farklılaşarak doku iyileşmesinde parakrin katkılarının olabileceğini rapor etmişlerdir (110).

Tüm bu literatür bilgileri sYD-MKH'nin, uygulandığı bölgedeki radyasyon hasarı, damar sayısı ve damar çapı üzerine olan etkilerinin mekanizmalarını açıkça ortaya koymaktadır.

Literatürde radyasyon sonrası kök hücre uygulanarak flep canlılığını değerlendirildiği çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Radyoterapi sonrası erken dönemde kök hücre verilerek, enjekte edilen kök hücre miktarı değiştirilerek, enjeksiyon yeri ve katmanı değiştirilerek ve flep değerlendirmesinde başka-ileri tetkiklerin kullanılarak benzer çalışmaların tekrarlanmasına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Yaptığımız çalışmada yağ kaynaklı kök hücrelerin radyasyon hasarına uğramış alanlardan kaldırılan rastgele cilt fleplerin yaşayabilirliği üzerine olumlu etkileri olduğunu gördük. Bu çalışmanın ilerde başka deneysel çalışmalara ve klinik yaklaşımlara katkı sağlayabileceği görüşündeyiz.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Literatürde sYD-MKH'lerin dokuda neovaskülarizasyon ve vazodilatasyon sağlayarak flep yaşayabilirliğini artırdığına ve radyoterapinin cilt üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığına dair çalışmalar mevcuttur. Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmada yağ kaynaklı kök hücrelerin radyasyon almış bölgelerden kaldırılan fleplerin yaşayabilirliğini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığını gördük.

Alınan sonuçlar ve literatür bilgisi ışığında değerlendirildiğinde, radyoterapi sonrası sYD-MKH kullanımının flep yaşayabilirliğindeki olumlu etkilerini görmek için uygulama zamanlaması, yeri ve hücre miktarı gibi değişkenlerin ve flep değerlendirilmesi için ileri çalışmalarla optimize edilmesi gerekmektedir.

## 7. ÖZET

**Giriş:** Özellikle neoplastik hastalıkların tedavisinde adjuvan radyoterapi uygulaması yaygındır. Fakat radyoterapi sonrası radyonekroz gelişirse rekonstrüksiyonu güçtür. Radyoterapi uygulanmış dokuda sYD-MKH'ler ile random patern flep yaşayabilirliğinin araştırdık.

**Gereç ve Yöntem:** sYD-MKH'ler KOÜ-KÖGEM'de, yağ dokusu kullanılarak elde edildi. sYD-MKH'ler verildikleri dokuda izlenebilmeleri için GFP ile işaretlendi. 40 adet ortalama ağırlıkları 250-350 gr olan 40 adet erkek Sprague–Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar A (Kontrol), B (Kök hücre), C (Radyoterapi) ve D (Radyoterapi + Kök hücre) gruplarına ayrıldı. C ve D gruplarına 20 Gy tek doz radyoterapi verildi. 8. hafta 3x10 cm'lik random flepler kaldırılırken, B ve D gruplarda fleplere kök hücre enjekte edildi. 7. gün tüm fleplerde, yaşayabilirlik ölçümü, damar sayımı, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapıldı. A ve C gruplarında ağırlık ve hemogram değişimleri değerlendirildi.

**Bulgular:** A,B, C ve D gruplarında sırası ile flep canlı alanların tüm flep alanına oranları ortalamaları % 40,46; % 60,07; % 40,90; %56,13'dür. İstatistiksel olarak kök hücre verilen B ve D gruplarında anlamlı artış izlenmiştir. A, B, C ve D gruplarında damar sayımı ortalamaları sırasıyla 6,2; 24,3; 14,4; 7,1'dir. İstatistiksel olarak sadece B grubunda anlamlı artış bulunmuştur. GFP işaretli kök hücrelerin uygulandığı fleplerin damar yapısına katıldığı immünohistokimyasal olarak gösterildi. Radyoterapi verilen grupta kök hücre enjeksiyonu sonrası fleplerde histopatolojik iyileşme tespit edilmiştir. A grubunda ağırlık artışı istatistiksel olarak anlamlıyken C grubunda değildi. C grubunda A grubuna göre beyaz küre istatistiksel olarak artarken hemoglobin, hematokrit ve trombositte anlamlı bir değişim saptanmamıştır.

**Sonuç:** Çalışmamızda sYD-MKH'lerin radyoterapinin cilt üzerine olan olumsuz etkilerini iyileştirerek flep yaşayabilirliğini artırdığını gördük. YDKKH'lerin uygulama bölgesi, zamanlaması, dozu ve etki mekanizması hakkında ileri ve detaylı



araştırmalara ihtiyaç vardır. Radyoterapinin beslenmeyi olumsuz etkilediği görülürken, beyaz kürede radyasyona inflamatuvar cevaba bağlı olarak artış saptandı.



**Anahtar Kelimeler:** radyoterapi, random patern flep, yağ doku kaynaklı kök hücre, flep yaşayabilirliği.

## 8. ABSTRACT

**Introduction:** Adjuvant radiotherapy is commonly used especially in the treatment of neoplastic diseases. But if radio-necrosis develops after radiotherapy, reconstruction will be difficult. We investigated viability of random pattern flap with Rat Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell (rAD-MSC) in radiotherapy applied tissue.

**Materials and Methods:** rAD-MSC's were obtained from KOU-KOGEM using adipose tissue. rAD-MSC's were marked with GFP in order to be seen in their tissues. An average weight of 250-350 g total 40 male Sprague-Dawley rats were used. Rats were divided into four groups as A (Control), B (Stem cell), C (Radiotherapy) and D (Radiotherapy + Stem cell). C and D groups underwent 20 Gy single dose radiotherapy. In 8th week while 3x10 cm random pattern flaps were raised; stem cells injected to B and D groups. In seventh day the viability measurement, vessel count, histopathological and immunocytochemical examinations were performed in all flaps. Weight changes and complete blood count were evaluated in A and C groups.

**Results:** In groups A, B, C and D viable area to the entire flap area ratio is % 40,46; % 60,07; % 40,90; %56,13 respectively. In B and D groups which were given stem cell we observed statistically significant increase. In groups A, B, C and D average vessel counts were 6,2; 24,3; 14,4; 7,1 respectively. Statistically significant increases were found only in group B. GFP-marked stem cells participate in the implementation of the vascular structure of the flap was shown by immunohistochemistry. In the group given radiotherapy have been identified histologic healing after the injection of stem cells. While weight gain in group A was statistically significant, in group C was not. In group C compared with group A white blood cell increased statistically but hemoglobin, hematocrit and platelets did not appear to change significantly.

**Conclusion:** In our study we observed that rAD-MSC's improving the adverse effects of radiation on skin flaps and flap viability. Further research is needed for application area, timing, dose and mode of action for rAD-MSC. While radiotherapy has negative nutrition, white blood cells increased response to radiation inflammation.



**Keywords:** radiotherapy, random pattern flap, adipose tissue-derived stem cells, flap viability.

## 9. REFERANSLAR

1. Urgancıoğlu İ, Karadeniz C, Şengün A. *Radyoizotopların biyolojide ve tıpta kullanılması*, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, 1976.
2. Steel G.G. *Basic clinical radiobiology*. Edward Artnold Pbl, 1993.
3. Bomford C.K. *Textbook of radiotherapy*. Churchill Livingstone Pbl, 1993.
4. Devita V.T. *Cancer P.P of Oncology*, Lipincott Raven Pbl, 1997.
5. Beyzadeoğlu M, Ebruli C, *Temel radyasyon onkolojisi*, Ankara: Gata Yayınları, 2008.
6. T.C. MİLLİ EğİTİM BAKANLIğI *Radyoloji radyoterapi uygulama planı*, Ankara 2012.
7. Seyrek E. *Radyoizotopların üretimi ve radyoterapide kullanılması*, Ankara: Uzmanlık Tezi, 2007.
8. Oğuz N. *Radyasyon Onkolojisinde Kullanılan Tedavi Cihazları ve Simülatörler*, Khan,F.M.: *The Physics of Radiation Therapy* Baltimore. Williams&Wilkins, 1984.
9. Dalcı D, Dörter G, Güçlü İ, *Radyasyon Hasarlarının Tanı ve Tedavisi* (çeviri) ÇNAEM İstanbul, 2005.
10. Vishal D. Thanik, Christopher C. Chang, Richard A. Zoumalan. A novel mouse model of cutaneous radiation injury. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2011; **127**(2) :560-9
11. Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health Phys.* 2010; **98**(6):858-62
12. Kim J.H, Andrew J. Kolozsvary J, Kenneth A. Stephen L. Mechanisms of radiation-induced skin injury and implications for future clinical trials. *International Journal of Radiation Biology* 2013; **89**(5): 311–18
13. Michael S. Chin, M.D. Brian B. Freniere, B.A. Caitlin F. Bonney, B.A. Luca Lancerotto, M.D. Skin perfusion and oxygenation changes in radiation fibrosis. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2013;**131**(4):707-16
14. Rifkin L.H, Stojadinovic S. An athymic rat model of cutaneous radiation injury designed to study human tissue-based wound therapy. *Rifkin et al. Radiation Oncology* 2012; **68** (7):1-8

15. Schwentker A, Evans S. M, Partington M, Johnson B.L, Koch C. J, Thom S.R. A model of wound healing in chronically radiation-damaged rat skin, *Cancer Letters* 1998; **128**: 71-78.
16. Portakal O, Inal-Erden M. Effects of pentoxifylline and coenzyme q10 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Biochem.* 1999;**32**(6):461-6
17. Sagi A, Ferder M, Levens D, et al. Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoxide dismutase. *Plast Reconstr Surg* 1986; **77**(4):639-44
18. Morris SF, Pang CY, Lofchy NM, et al. Deferoxamine attenuates ischemia induced reperfusion injury in the skin and muscle of myocutaneous flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 1993;**92**(6):120-32
19. Agaya D, Scherthanb, Forcherona H et al. Multipotent mesenchymal stem cell grafting to treat cutaneous radiation syndrome: development of a new minipig model. *Experimental Hematology* 2010;**38**: 945–956.
20. Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health Physics.* 2010; **98**( 6):858-62
21. Pyatak OA. The Chernobyl catastrophe and population health: the state of knowledge in 1993. *Stem Cells* 1997;**15**(2):263-8
22. François S, Mouiseddine M, Mathieu N, Semont A, Monti P. Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model. *Ann Hematol* 2007;**86**: 1–8
23. Karacaoğlu E, Yuksel F, Turan S, Zienowicz R. Chemical delay: an alternative to surgical delay experimental study. *Ann Plast Surg* 2002;**49**(1):73-81
24. Place M.J, Herber S.C, Haerdesty R.A. *Basic techniques and principles in plastic surgery. Grabb and Smith's Plastic Surgery Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 1997; 5:13-25.*
25. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *Brit. J. Plast. Surg.* 1973;**26**: 202
26. Nichter LS, Sobieski MV, Edgerton MT. Augmentation of critical skin flap survival following ibuprofen therapy. *Ann Plast Surg* 1986;**16**(4):305-12

27. Karacaoglan N, Akbas H. Effect of parenteral pentoxifylline and topical nitroglycerin on skin flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;**120**(2):272
28. Suarez Nieto C, Suarez Garcia MJ, Barthe Garcia P. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br. J. Plast. Surg.* 1992;**45**: 113-6
29. Ghali S, Butler PE, Tepper OM, Gurtner GC. Vascular delay revisited. *Plast Reconstr Surg.* 2007;**119**(6):1735-44
30. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg.* 2004;**239**(6):866-73
31. McFarlane, R.M, Heagy, F.C, Radin, S., Aust, J.C, Wermuth, R.E. A study of delay phenomenon in experimental pedicle flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 1965;**35**: 245
32. Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: The story unfolds. *Plast Reconstr Surg.* 1999;**104**(7):2079-91
33. Kerrigan C.L. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg.* 1983;**72**(6):766-77
34. Vedder N.B. *Flap physiology*. Mathes Plastic Surgery, 2nd edition Philadelphia: Saunders Elsevier Inc, vol:1;483-506, 2006.
35. Calhoun KH, Tan L, Seikaly H. An integrated theory of the no-reflow phenomenon and the beneficial effect of vascular washout on no-reflow. *Laryngoscope* 1999;**109**(4):528-35
36. Padubidri A.N, Browne E, Banbury J. Arteriovenous cross-flow flap in rat: a novel skin flap. *Plast Reconstr Surg.* 1997;**100**(5):1218-26
37. Coban YK, Kurutas EB, Ciralik H. Ischemia-reperfusion injury of adipofascial tissue: an experimental study evaluating early histologic and biochemical alterations in rats. *Mediators Inflamm.* 2005; **24**(5):304-8
38. Adanali G, Ozer K, Siemionow M. Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2002;**109**(4):1344-51

39. Blaisdell F.W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome. *A Review. Cardiovasc Surg.* 2002; **10**(6):620-30
40. Bobek V, Sramek D, Rokyta R. Local pharmacological preconditioning increases the survival of experimental skin flaps in rats. *Life Sci.* 2005;**77**(2):663-68
41. Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal V.E, Sampalis J. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast. Reconstr. Surg.* 1994;**93**: 1485-95
42. Khouri RK, Brown DM, Leal Khouri SM, et al: The effect of basic fibroblast growth factor on the neovascularisation process: skin flap survival and staged flap transfers. *Br. J. Plast. Surg.* 1991;44: 585-88
43. Colwell A.S, Beanes S.R, Soo C. ve ark. Increased angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor during scarless repair. *Plast Reconstr Surg.* 2005;**115**(1):204- 12
44. Zhang F, Waller W, Lineaweaver W.C. Growth factor and flap survival. *Microsurgery* 2004;162-167
45. Kryger Z, Zhang F, Dogan T. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg.* 2000;**53**: 234-39
46. Huang N, Khan A, Ashrafpour H. ve ark. Efficacy and mechanism of adenovirusmediated vegf-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability. *Am J Physiol Jul* 2006;**291**:127-47
47. Asim K, Ashrafpour H, Huang N. Acute local subcutaneous vegf165 injection for augmentation of skin flap viability: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;**287**:219-29
48. Zhang F, Yang F, Hu E.C. ve ark. Vascular endothelial growth factor gene therapy in improvement of skin paddle survival in a rat tram flap model. *J Reconstr Microsurg.* 2005;**21**(6):391-96
49. Taub P.J, Marmur J.D, Zhang W.X. ve ark. Locally administered vascular endothelial growth factor cdna increases survival of ischaemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1998;**102**(6):2033-39

50. Hui H, Tang Y, Hu M and Zhao X. Stem Cells: General Features and Characteristics. Gholamrezanezhad A, ed. Stem Cells in Clinic and Research. China: InTech, 2011: 3-20
51. Smith MH. Stem Cell Description. *Stem Cell* 2013; **4**(1):141-151
52. Matur İ, Solmaz S. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. Arşiv 2011; **20**: 168-86
53. Özen A, Sancak İG. Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2014; **61**: 79-84
54. İnan S, Özbilgin K. Kök Hücre Biyolojisi. Sağlıkta Birikim 2009; **1**(5):11-23
55. Sağsöz H, Ketani MA. Kök Hücreler. Dicle Üniv Vet Fak Derg 2008; **1**(2):29-33
56. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; **25**: 2739-49.
57. Sandmaier BM, Storb R, Kinley J et al. Evidence of allogeneic stromal engraftment in the bone marrow using canine mesenchymal stem cells. *Blood* 1998; **92**: 116
58. Mais A, Klein T. Prostanoid pattern and inos expression during chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2006; **26**: 121-22.
59. Hauner, H, Schmid, P. and Pfeiffer, E.F. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1987; **64**: 832-35
60. Pittenger M.F, Mackay A.M, Beck S.C, Jaiswal R.K, Douglas R, Mosca J.D, Moorman M.A, Simonetti D.W, Craig S, and Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**:143- 147
61. Yoğun FN. Sıçanlarda silikon implant etrafında kapsül oluşumuna otojen yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin etkisinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Bezmialem Vakıf Üni. Tıp Fak. 2011.
62. Poznanski WJ, Waheed I, Human Fat Cell Precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab invest* 1973; **29**: 570-576
63. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Ann. Rev nutr*: 1992; **12**: 209-13



64. Lau DC. Adipose tissue growth and differentiation: view from the chair. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;**24**(4):20-2
65. Lau DC. Paracrine interactions in adipose tissue development and growth. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996;**20** (3):16-25
66. Dabson DE, Kambe A, 1-Butyryl-glycerol: A novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes. *Cell.* 1990;**61**(2):223-30
67. Claffey KP, Wikison WO. Vascular endothelial growth factor regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J. Biol Chem.* 1992;**267**(23):16317-22
68. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004;**109**(10):1292-8
69. Patricia A. Zuk, Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A. De Ugarte, Jerry I. Huang, Mizuno H, Zeni C. Alfonso, John K. Fraser, Benhaim P, and Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Circulation* 2002; **13**(12): 4279-95
70. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; **275**: 964-967
71. Sandmaier BM, Storb R, Kinley J et al. Evidence of allogeneic stromal engraftment in the bone marrow using canine mesenchymal stem cells. *Blood* 1998;**92**: 116
72. Geddes D.M, Alton E.W.F.W. The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1{alpha} in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur. Heart* 2005; **26**(13): 1327-32
73. P. Madeddu. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp. Physiol.* 2005; **90**(3): 315 - 26
74. Shigeru I, Satoshi K, Masahiro S, Joji A, Naomi S, Takashi N. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. *Annals of Plastic Surgery* 2004;**52**(4):414-18

75. Koenig T.R, Wolff D, Mettler FA, Wagner L.K. Skin Injuries from Fluoroscopically Guided Procedures: Part 1, Characteristics of Radiation Injury AJR 2001;177
76. Knight KR. Review of postoperative pharmacological infusions in ischemic skin flaps. *Microsurgery* 1994; **15**(10):675-84
77. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion Injury and Oxygen Free Radicals: A review. *J Reconstr.*
78. Cherry G. The differing effects of isoxsuprine on muscle flap and skin flap survival in the pig. *Plast Reconstr Surg* 1979;**64**(5):670-2.
79. Stewart RJ, Moore T, Bennett B, Easton M, Newton GW. Effects of free radical scavengers and hyperbaric oxygen on random-pattern skin flaps. *Arch Surg* 1994;**129**: 982-8
80. Zaccaria A, Weinzwieg N, Yoshitake M, Matsuda T, Cohen M. Vitamin reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. *AnnPlast Surg.* 1994; **33**: 620-3.
81. Axford-Gately RA, Wilson GJ. Myocardial infarct size reduction by single high dose or repeated low dose vitamin e supplementation in rabbits. *Can J Cardiol*1993; **9**: 94-8.
82. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. *Plast Reconstr Surg* 1984;**73**(6):943-8
83. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 2002;**105**: 732-38
84. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;**18**(14):3964-72
85. Park S, Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Baharestani S, Kleinman ME, Pelo CR, Levine JP, Gurtner GC. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg.* 2004;**113**(1):284-93

86. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7
87. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28
88. Zacchigna S, Papa G, Antonini A, Novati F, Moimas S, Carrer A, Arsic N, Zentilin L, Visintini V, Pascone M, Giacca M. Improved survival of ischemic cutaneous and musculocutaneous flaps after vascular endothelial growth factor gene transfer using adeno-associated virus vectors. *Am J Pathol*. 2005;167(4):981-91
89. Li GZ, Sun QZ, Xiong ZY, Huang H, Xu J. The effect of adipose-derived stem cells on viability of random pattern skin flap in rabbits. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2011;27(2):119-23.
90. 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. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(1):50-8
91. Gong L, Wang C, Li Y, Sun Q, Li G, Wang D. Effects of human adipose-derived stem cells on the viability of rabbit random pattern flaps. *Cytotherapy* 2014;16(4):496-507
92. Li GZ, Sun QZ, Xiong ZT, Huang H, Xu J. The effect of adipose-derived stem cells on viability of random pattern skin flap in rabbits. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi* 2011;27(2):119-23.
93. Yang M, Sheng L, Li H, Weng R, Li QF. Improvement of the skin flap survival with the bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in a rat model. *Microsurgery* 2010;30(4):275-81.
94. Yıldırım T. Kanserli çocuklarda beslenme durumunun değerlendirilmesi uzmanlık tezi İstanbul 2004
95. Özşaran Z, Yalman D, Yıldırım G, Parvızı M, Esassolak M, Haydarolu A. Baş-boyun kanseri tanısı ile radyoterapi gören olgularda geç yan etkilerin değerlendirilmesi *T Klin Tıp Bilimleri* 2003; 23:195-9

96. Duttaroy S. Transplantation of autologous endothelial cells and endothelial progenitor cells for angiogenesis. *Dan Med Bull.* 2005;**52**(4):259.
97. Li H, Zan T, Li Y, Weng R, Yang M, Du Z, Zhong S, Li Q. Transplantation of adipose-derived stem cells promotes formation of prefabricated flap in a rat model. *J Exp Med.* 2010;**222**(2):131-40
98. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, Guo S. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2008;**121**(1):5969
99. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 2009;**124**(3):804-15
100. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Ann Plast Surg.* 2010;**65**(2):237-44
101. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. *Ann Plast Surg.* 2005;**54**(5):546-52
102. Zhang FG, Yao Y, Feng Y, Hua CG, Tang XF. Mesenchymal stem cells transduced by stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  augment ischemic free flaps' survival. *Ann Plast Surg.* 2011;**66**(1):92-7
103. Duttaroy S. Transplantation of autologous endothelial cells and endothelial progenitor cells for angiogenesis. *Dan Med Bull.* 2005;**52**(4):259
104. Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Ghebati D, Krempera M, Pasini A, Sbarbati A. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007;**119**(5):1409-22
105. Mikami S, Nakashima A, Nakagawa K, Maruhashi T, Iwamoto Y, Kajikawa M, Kihara T.M.Y, et al: Autologous Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cell Implantation and Endothelial Function in a Rabbit Ischemic Limb Model. *Plos One* 2013;**8**(7): 1-11
106. Janeczek A, Zimna A, Rozwadowska N, Fraczek, Kucharzewska, Rucinski M, Mietkiewski T, Kolanowski T, Malcher A, Kurpisz M. Genetically modified

human myoblasts with eNOS may improve regenerative ability of myogenic stem cells to infarcted heart. *Kardiol Pol.* 2013;71(10):1048-58

107. Gümüş N, Ödemiş Y, Yılmaz S, Tuncer E. Effect of topically applied minoxidil on the survival of rat dorsal skin flap. *Aesthetic Plast Surg.* 2012; 36(6):1382-6
108. Milcheski DA, Nakamoto HA, Tumari PJr, Nobrega L, Ferreira MC. Experimental model of degloving injury in rats: effect of allopurinol and pentoxifylline in improving viability of avulsed flaps. *Ann Plast Surg.* 2013;70(3):366-9
109. V. Vegesna, W.H. McBride, J.M.G. Taylor, H.R. Withers, The effect of interleukin-1 b or transforming growth factorb on radiation-impaired murine skin wound healing. *J. Surg.* 1995;59 699-704.
110. Moldovan N.I, Anghelina M, Varadharaj S, Butt OI at all: Reoxygenation-Derived Toxic Reactive Oxygen/Nitrogen Species Modulate the Contribution of Bone Marrow Progenitor Cells to Remodeling After Myocardial Infarction. *J. Am Heart Assoc* 2014;3(1):e000471
111. Rezvani M. Stem cell derived therapy for cutaneous radiation exposure. *Hautarzt* 2013;64(12):910-6