



T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**SIÇAN DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER
PERFORATÖR FLEP MODELİNDE
YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRE UYGULAMASININ
FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ**

Dr. Eda İŞİL ALP

**PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİMDALİ
UZMANLIK TEZİ**

KOCAELİ-2011

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇAN DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER
PERFORATÖR FLEP MODELİNDE
YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRE UYGULAMASININ
FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ**

Dr. Eda IŞIL ALP

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİMDALI
UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Çiğdem ÜNAL
Anabilim Dalı Başkanı: Doç. Dr. Tonguç İŞKEN

Etik Kurul Onayı: 06.07.2010, HADYEK 7/1, Proje No: 2010/16

İçindekiler

I. ÖNSÖZ.....	V
II. KISALTMALAR	VI
III. ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
IV. TABLOLAR DİZİNİ	IX
1 AMAÇ VE KAPSAM	1
2 GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 TARİHÇE: FLEP CERRAHİSİ	2
2.1.1 DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER FLEBİ ÖNCESİ DÖNEM: TRANSVERS REKTUS ABDOMİNİS MUSKULOKÜTAN FLEBİ	4
2.1.2 PERFORATÖR FLEP KAVRAMI VE DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER PERFORATÖR FLEBİNİN TANINMASI	6
2.2 DİEAP FLEP	8
2.2.1 DİEAP FLEBİ VENÖZ DOLAŞIMI	15
2.3 KÖK HÜCRE VE YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN TANINMASI .	16
2.3.1 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN PLASTİK CERRAHİDEKİ YERLERİ	18
3 GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ.....	21
3.1.1 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRE HAZIRLANMASI	21
3.1.2 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU.....	22
3.1.2.1 İMMUNFENOTİPLEME: AKİM SİTOMETRİK ANALİZ.....	23
3.1.3 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO FARKLILAŞMASI	24
3.1.3.1 ADİPOJENİK FARKLILAŞMA	24
3.1.3.2 OSTEOJENİK FARKLILAŞMA	24
3.1.4 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN GFP İLE İŞARETLENMESİ	24
3.1.4.1 PLAZMİD DNA İZOLASYONU.....	24
3.1.4.2 GFP GEN TRANSFORMASYONU	25
3.2 CERRAHİ: KARINDA DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER FLEBİ KALDIRILMASI VE YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN UYGULANMASI ...	26

3.3	DEĞERLENDİRMELER	31
3.3.1	ANJİOGRAFİ:.....	31
3.3.2	FLEP CANLI ALANININ BELİRLENMESİ:.....	31
3.3.3	DOKU DAMARLANMASININ HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ.....	32
3.3.4	DOKU KESİTLERİNDE GFP+ HÜCRELERİN İZLENMESİ.....	33
3.3.5	İSTATİSTİKSEL İNCELEMELER.....	34
4	BULGULAR	35
4.1	FLEP CANLI ALANI ÖLÇÜMLERİ:.....	35
4.2	DOKU DAMARLANMASININ HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ:.....	38
4.3	DİĞER DEĞERLENDİRMELER.....	41
4.3.1	ANJİOGRAFİ	41
4.3.2	DİEAP FLEPLERİNİN ELDE EDİLMESİ.....	42
4.3.3	DOKU KESİTLERİNDE GFP+ HÜCRELERİN İZLENMESİ.....	43
5	TARTIŞMA.....	46
6	SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	57
7	ÖZET.....	58
8	ABSTRACT.....	60
9	KAYNAKLAR.....	62

I. ÖNSÖZ

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

Uzmanlık tezimin aşamalarında, bilimsel çalışmaların yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında emeği geçen, danışmanım Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Ünal'a teşekkür ederim.

Uzmanlık tezimin bilimsel çalışmalarındaki destekleri için Prof. Dr. Erdal Karaöz ve Prof. Dr. Bahar Müezzinoğlu'a teşekkür ederim.

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

Uzmanlık tezimin en zor aşamalarında yardımını esirgemeyen arkadaşım Dr. Mustafa Hasdemir'e ve Dr. Erkan Atak'a teşekkür ederim.

Bana böylesine iyi bir kıdemli olduğu ve hiç farkında olmadan sağladığı duygusal destek için "ağabeyim" Dr Murat Onyedi'e,

Hayatım her döneminde emeği ve desteği ile yanımda olan, benim için endişelenip duran sevgili annem, babam ve ağabeyime,

Tıp eğitimim ve uzmanlık eğitimim boyunca kendisinden çok okuluma, işime zaman ayırdığım halde desteği ile hayatımda ve benliğimde anlamlı fark yaratan, sevgili eşim İlker Alp'e,

Benimle oyun oynamak istediği halde, "Ben ders çalışıyorum!" dediğim için yanımda sessizce yatıp bekleyerek, henüz 3 yaşında bile olmamasına rağmen olgunluk dersi veren kızım Defne'e,

Teşekkür ederim.

II. KISALTMALAR

DİEAP	: DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER PERFORATÖR
YDKKH	: YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRE
TRAM	: TRANSVERS REKTUS ABDOMİNİS MUSKULOKUTAN
DSEA	: DERİN SUPERİOR EPİGASTRİK ARTER
RA	: REKTUS ABDOMİNİS
DİEA	: DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER
EİA	: EKSTERNAL İLİAK ARTER
BTA	: BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ ANJİOGRAFİ
SİEV	: SUPERFİSYAL İNFERİOR EPİGASTRİK VEN
DİEV	: DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK VEN
KİKKH	: KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI KÖK HÜCRE
YDKKH	: YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRE
VEGF	: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR DAMAR ENDOTELİ BÜYÜME FAKTÖRÜ
HBSS	: HANK'S BALANCED SALT SOLUTION
FBS	: FETAL BOVINE SERUM
A-MEM	: A-MODIFIED MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM
KOÜ-KÖGEM	: KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ KÖK HÜCRE VE GEN TEDAVİLERİ ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
PBS	: PHOSPHATE BUFFERED SALINE
FITC	: FLUORESCCEIN ISOTHIOCYANATE
PE	: PHYCOERITRIN
RT-PCR	: REVERSE TRANSCRIPTASE - POLYMERASE CHAIN REACTION

IF/IHC	: IMMUNOFLOURESENCE/ IMMUNOHISTOCHEMISTRY
GFP	: GREEN FLOURESCENT PROTEIN
LB	: LURIA BERTANI BROTH
KOÜ HADYEK	: KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
DMEM	: DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM
EÖH	: ENDOTELYAL ÖNCÜ HÜCRELER
TGF	: TRANSFORMING GROWTH FACTOR; DÖNÜŞTÜRÜCÜ BÜYÜME FAKTÖRÜ
FGF	: FIBROBLAST GROWTH FACTOR; FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ
MRA	: MANYETİK REZONANS ANJİOGRAFİ
ADSC	: ADIPOSE DERIVED STEM CELL (YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRE)

III. ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Mathes-Nahai fasyokutan ve fasyal flepler sınıflaması.....	7
Şekil 2: TRAM ve DİEAP flepleri Şematik çizimleri	9
Şekil 3: Eksternal iliak arter ve DİEA'nın vücutta yerleşimi.	10
Şekil 4: DİEA dallanma sınıflaması.....	11
Şekil 5: TRAM flebi transfüzyon bölgeleri	12
Şekil 6:DİEAP flebinde perforatörlere özgü perfüzyon alanları; perforazomlar.....	14
Şekil 7: Sıçan YDKKH'lerin karakterizasyonu.	22
Şekil 8 :YDKKH'lerinin akım sitometrik değerlendirme verileri	23
Şekil 9 : Sıçan DİEAP flebi kaldırılması	27
Şekil 10: Sıçan DİEAP flep modelinde DSEA bağlanması	28
Şekil 11: Sıçan DİEAP flebinin kaldırılmış görüntüsü.	28
Şekil 12: DİEAP flebine medyum ve kök hücre uygulanması	29
Şekil 13 : D grubunda sıçan karın cildinden alınan biyopsi.....	30
Şekil 14: Flep canlı alanının ölçülmesi sırasında çalışma ortamı	32
Şekil 15: Histopatolojik değerlendirmeler için flep dokusundan alınan biyopsi.	33
Şekil 16: Canlı alan ölçümü örnek çalışma görüntüleri	36
Şekil 17: Kök hücre grubu histolojik kesit.....	40
Şekil 18: Ameliyatsız cilt grubu histolojik kesit.....	41
Şekil 19: Anjiografi görüntüleri	42
Şekil 20 : Flep eksizyonu sırasında perforatör damarın görünümü	43
Şekil 21 : Şekil 20'de görülen flebin damarlanma görüntüsü.....	43
Şekil 22 : GFP işaretli YDKKH'lerin kesitlerde izlenmesi	44
Şekil 23 : GFP işaretli YDKKH'lerin kesitlerde izlenmesi	45

IV. TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Daniel ve Kerrigan'ın flep sınıflaması	4
Tablo 2 : A, B ve C gruplarında alınan canlı alan yüzde sonuçları	36
Tablo 3 : Ölçülen canlı alan yüzde sonuçları grafiği	37
Tablo 4 : Ortalama canlı alan yüzdeleri grafiği	37
Tablo 5 : A, B, C ve D gruplarında alınan damar sayıları sonuçları.....	39
Tablo 6 : Alınan damar sayıları sonuçları grafiği	39
Tablo 7: Ortalama damar sayıları grafiği	40

1 AMAÇ VE KAPSAM

Plastik cerrahide perforatör flepler rekonstrüktif cerrahi tarihinin geldiği önemli noktalardan birini temsil etmektedir. İlk tanımlanan perforatör flep olan derin inferior epigastrik arter perforatör (DİEAP) flebi günümüzde meme kanseri cerrahi tedavisi sonrası otojen meme rekonstrüksiyonu için sık kullanılan ve en iyi rekonstrüktif sonucu veren yöntemlerden biridir.

Fakat DİEAP flebinin, bu ayrıcalıklı konumuna rağmen rapor edilen bazı sorunları bulunmaktadır. Flebin besleyici arterine en uzak 4. bölgesinde gelişebilen dolaşım bozuklukları hala rekonstrüktif cerrahlara zorluklar çıkarmaktadır. Çeşitli cerrahi merkezlerin yayınlarında farklı çözümler önerilmiştir fakat bu çözümler ileri derecede cerrahi beceriyi ve tecrübeyi gerektirmekte ve çoğunlukla ek işlem içermektedir.

Gerek perforatör olsun gerek diğer tip fleplerde olsun, günümüzdeki ileri teknik olanaklar ve cerrahi tecrübeye rağmen, hala kan dolaşımı ile ilgili sorunlarla karşılaşmaktadır. Dokuda neovaskülarizasyon sağlayan tedavi arayışları son zamanlarda kök hücre temelli tedavileri benimsemiştir. Özellikle yağ doku kaynaklı kök hücreler (YDKKH) hem elde edilmiş şekilleri ile hem de deneylerle gösterilen doku yenilenmesi ve neovaskülarizasyon yetenekleri ile plastik cerrahinin ilgisini çekmektedir.

Her ne kadar YDKKH'lerle flep yaşayabilirliği üzerinde çalışmalar yapılmış olsa da perforatör flep modeli üzerinde yapılmış bir araştırma yoktur.

Bu çalışmamızda YDKKH'lerinin sıçan DİEAP flep modeli 4. bölgesinde flep yaşayabilirliği üzerine etkilerini araştırmayı hedefledik.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 TARİHÇE: FLEP CERRAHİSİ

Günümüzde yeniden yapım cerrahisinde temel yöntemlerden biri flep uygulamalarıdır. Plastik cerrahide fleplerin bilinen ilk kullanımı M.Ö. 600 yıllarına Hindistan’da Sushruta Samhita adlı yayında anlatılmıştır. Bu kitapta Sushruta, alından cilt flebi transpozisyonu ile burun rekonstrüksiyonu yöntemlerini anlatmaktadır.

Batı dünyasında 1545-1599 yıllarında İtalyan Gaspare Tagliacozzi, burun rekonstrüksiyonu için cerrahi geciktirme işlemi uygulanmış kol flebinin özenli tarifini yapmış ve yayını, plastik cerrahi tarihinde mihenk taşlarından biri olmuştur.

19. yüzyıl başında Carpue ve Von Graefe, Hint yöntemi ve Tagliacozzi yöntemi ile burun rekonstrüksiyonları yapmıştır. Bu faaliyetlerin üzerine Diffenbach ve Von Langenback’in çalışmaları eklenmiştir. Plastik cerrahi alanında asıl büyük adım anestezi ve asepsi tekniklerinin de gelişmesi ile sağlanmıştır. (1)

20.yy ‘da iki dünya savaşı ile plastik cerrahi Avrupa ve Kuzey Amerika’da savaş yaralıları onaran cerrahi dal olarak gelişti. Dokular lokal olarak transpoze ediliyor veya uzuvlar üzerinde uzak bölgelere taşınıyordu ve bazen de nekrozla karşılaşılıyordu. Gillies “plastik cerrahi güzellik ve kan dolaşımı arasındaki bitmez bir savaştır” diyordu. Dikkatler daha çok tüp haline getirilmiş rastgele beslenen “random” fleplerde idi. Bu flepler için ayrıntılı uzunluk- genişlik hesaplamaları yapılmıştı. Flepleri besleyen kan damarları hakkında belirli bir bilgi bulunmamakta idi.

Manchot’un “İnsan vücudunun cilt arterleri” adlı çalışması 1889 yılında yayınlandığında, Almanca olduğundan takip bulamamıştı. Manchot bu çalışmasında cilt perforatörlerini tanımlamış, onları altta yatan ana arterler ile bağlantılandırmış ve yaklaşık 40 adet vasküler alanı haritalandırmıştı. 1893 yılında Spalteholz, “direkt cilt damarları”nı ve “indirekt cilt damarları”nı tanımlamıştır. 1930 yılında Salmon,

Manchot'un araştırmasını temel alarak ve radyolojik tekniklerle destekleyerek 80'den fazla alan ve perforatörler arası ara bağlantılar tanımlamıştır. (2)

1970 yılında Milton fleplerin canlılığı için büyük bir damar içeren bir pedikülün flebe katılması gerektiğini gösterince rastgele beslenen fleplerin dönemi büyük ölçüde kapanmış oldu. (3)

1965 yılında Bakamjian deltopektoral flebi tanımladıktan (4) sonra "Aksiyal flep" kavramı ilk olarak 1972 yılında Mc Gregor ve Jackson'un "kasık flebi" tanımı ile ortaya atıldı. (5) 1970'li yıllarda Manchot'un çalışmalarının tercüme edilmesi ile birçok aksiyal flebin, onun daha önce tanımladığı damarları temel aldığı ortaya çıktı.(6; 7)

Ger ve Orticochea tarafından tanıtılan muskulokutan flepler güvenilirliği ve rotasyon arklarının genişliği nedeni ile hızla popülerleşti. (8; 9) 1981 yılında Pontén, septokutan perforatör damarların cilt dolaşımına yaptığı katkıyı fark ederek fasyokutan flep kavramının önünü açtı (10). Fasyokutan fleplerin anatomik temeli daha sonra Haertsch, Barclay ile ark. ve Cormack ve Lamberty tarafından tanımlandı. (11; 12; 13)

Farklı flep çeşitlerinin tanımlanması ile bazı flep sınıflamaları gündeme gelmiştir. Daniel ve Kerrigan flepleri kan dolaşımlarına , flebe cerrahi olarak yaptırılan harekete ve flebin içerdigi dokulara göre 3 ana sınıfa ayırmışlardır. (Bkz: Tablo 1) (14)

Tablo 1: Daniel ve Kerrigan'ın fleplerin beslenmesi, yaptığı hareket ve içerdiği dokuya göre sınıflaması

1- Beslenme	
Random(kutanöz) Aksiyal/pediküllü	
2- Teknik(hareket)	
	İlerletme V-Y, Y-V Tek pediküllü Bipediküllü
	Pivot Rotasyon Transfosisyon İnterpolasyon/ada
	Uzak Direkt Tüp haline getirilmiş
	Serbest
3- Doku içeriği	
Kutanöz Fasyokutan Muskulokutan Kas Osseokutan Sensoryel	

2.1.1 DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER FLEBİ ÖNCESİ DÖNEM: TRANSVERS REKTUS ABDOMİNİS MUSKULOKÜTAN FLEBİ

Mathes 1977 yılında meme rekonstrüksiyonu için rektus abdominis muskulokutan flebini vertikal bir cilt adası ile kullanmıştı. (15) Transvers rektus abdominis muskulokutan (TRAM) flebi ilk olarak 1982 yılında Hartrampf tarafından yine meme rekonstrüksiyonu için tarif edildi. (16) Bir mihenk taşı haline gelen yayında, Hartrampf normalde abdominoplastide eksizye edilen dokunun, derin

superior epigastrik arterden (DSEA) beslenen proksimal temelli rektus abdominis (RA) kası üzerinde, mastektomi defektinin rekonstrüksiyonunda kullanımını tarif etmiştir. İlk tanıtıldığında bu flep o dönemde yaygın olarak kullanılan implant, meme hacmini tam veremeyen lattisimus dorsi kas flebi veya çok basamaklı tüp haline getirilmiş abdominal flep rekonstrüksiyonlarının yanında çekici bir alternatif oluşturmuştur.

TRAM flebinin kan dolaşımı, derin epigastrik arteryel sisteminin, RA kası içinden geçen perforatörlerinden beslenen karın ön duvarı dolaşımına dayanır. Kası delip geçen bu perforatör arterler asıl olarak derin inferior epigastrik arterin (DİEA) dallarıdır ama superiordan inerek anastomoz yapan DSEA'den de beslenebilirler. Cerrahi sırasında flebi oluşturan cilt ve ciltaltı dokusu, RA kasının anterior kılıfından ayrılmayarak, derin epigastrik sistemin kastan geçerek cilde giden perforatörleri korunur. Cilt adası mastektomi alanındaki cilt defektini doldururken, ciltaltı yağ dokusu ve kas, gerekli hacmi sağlar. Alt karında abdominoplasti skarına benzer bir skar kalırken, karındaki fazla cilt ve yağ dokusu yok olur ve karın silüeti düzelir.

Bu avantajlar sayesinde TRAM flebi, otojen meme rekonstrüksiyonunda en tercih edilen yöntemlerden biri olmuştur. Öte yandan her hasta TRAM flep ile memnun edici sonuçlar almayabilmektedir ve şüphesiz bazı hastalar belirgin karın bölgesi morbiditesi ile tanışmışlardır. Hartrampf serilerinden birinde hastalarının hiçbirinde fıtıklaşma olmamasına rağmen bipediküllü TRAM hastalarının yarıdan fazlasında ve tek pediküllü TRAM hastalarının üçte birinde, karın güçsüzlüğü kaydetmiştir (17).

Zamanla mikrocerrahi tekniklerin de gelişmesi ile bu flebin ana besleyici damarı olan DİEA'nın kullanılabilirdiği serbest TRAM flebi de yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Serbest TRAM flebi cerraha flep şekillendirilmede fazladan bir özgürlük sağlıyordu ve daha az miktarda RA kası gerektiriyordu (18; 19).

2.1.2 PERFORATÖR FLEP KAVRAMI VE DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER PERFORATÖR FLEBİNİN TANINMASI

1987 yılında Taylor ve Palmer, Manchot ve Salmon'un çalışmalarına dayanarak anjiozom ismini verdikleri kaynak arterlerin vasküler bölgelerini tanıttıkları çalışmalarını yayınladılar (20).

Taylor ve Palmer'a göre insan vücudu, belirli arterlerden beslenen doku ünitelerinden yapılmış üç boyutlu bir yapıdır. Bu doku ünitelerine anjiozom denir. Anjiozomların başlıca iki beslenme yolu vardır. Direkt rota, ana görevi cildi beslemek olan arterler tarafından takip edilir. İndirekt rota, ana görevi kas ya da başka derin dokuları beslemek olan arterler tarafından takip edilir. Damarlar sabit noktalardan çıkarlar ve hareketli bölgelere dağılırlar. Kan dolaşımı, birbiri ile "choke" arterler ve arterioller üzerinden bağlı arterlerden oluşan bir sistemdir (21; 22).

Bir perforatör flebin ilk tanımı, DIEAP flebinin 1989 yılında Soeda ve Koshima tarafından ağız tabanı ve kasık defektini rekonstrüksiyonu için kullanılması ile yapılmıştır (23). Yazarlar geniş bir flebin kas olmadan, tek bir kas perforatöründen beslenebileceğini belirterek, flebi RA kası olmadan kaldırmayı tarif etmişlerdir. Böylece perforatör flep devri başlamıştır.

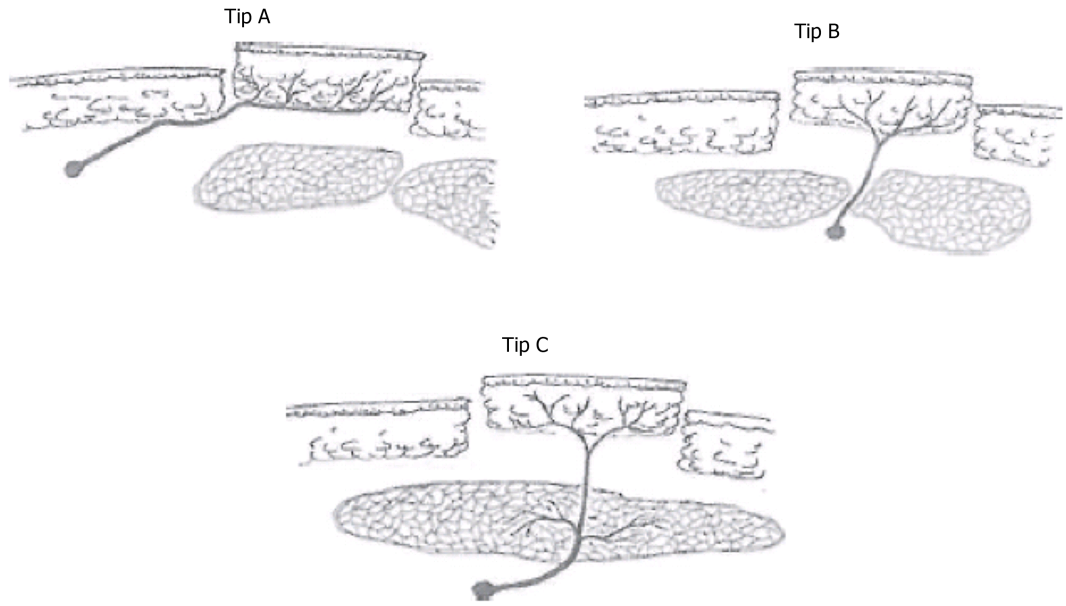
1994 yılında Allen ve Treece, DIEAP flebinin post-mastektomi meme rekonstrüksiyonlarındaki kullanımını anlatmıştır. (24)

Perforatör flepler bundan sonra yaygın bir şekilde kullanılmaya ve her geçen gün başka bir perforatör flep tanımı yapılmaya başlandı. Popülerleşme ile birlikte ortaya çıkan adlandırma ve iletişim hatalarını gidermek için pek çok toplantı ve yayın yapıldı. Bazı tanımlarda fikir birliğine varıldı. (25; 26)

Perforatör damar, vücudun aksiyal damarlarından birinden köken alan, subkutan yağ dokusuna gelinceye kadar yağ ve interstisiyel bağ dokusu dışında başka bir dokunun içinden geçen damardır. Sadece derin fasyayı delen direkt perforatörler ve yolları boyunca kas içinden veya intermusküler septumdan geçen indirekt perforatörler olarak iki grupta sınıflanırlar. Bir flebin temel aldığı perforatörün direkt ya da indirekt olup olmaması cerrahi teknik açısından belirleyici olmaktadır.

İndirekt perforatörlerin cerrahisi titiz bir kas içi disseksiyon, buna bağlı ameliyat süresinin uzaması ve geniş bir öğrenme eğrisini beraberinde getirmektedir. (26)

Perforatör fleplerin besleyici damarları olan perforatör damarların, kas içinden geçerek çıktığı, tüm perforatör fleplerin gerçek muskulokutanöz flepler olduğu (Mathes ve Nahai sınıflamasına göre tip C fasyokutan flep (27)) kabul edilir. (21)



Şekil 1: Mathes-Nahai fasyokutan ve fasyal flepler sınıflaması: A: direkt kutanöz pedikül; B: septokutanöz pedikül; C: muskulokutan pedikül. (28)

Flepler kaynak aldığı damara göre adlandırılırlar, arter kısaltmasının sonuna “-AP” (A:Arter, P:Perforatör) eki getirilir.

Perforatör fleplerin düşük donör saha morbiditesi daha kısa iyileşme süresi sağlarken ve post-operatif ağrıyı da azaltmaktadır. Defektin rekonstrüksiyonu için fleplere uygun şekil verilebilmesi, yüzeysel defektler için flebin inceltilebilmesi, pedikül oryantasyonunda cerrahın özgürlüğü, muskulokutan fleplerde mümkün olandan daha uzun bir pedikül elde etme olanağı, istenildiğinde duysal sinirlerin flebe dahil edilebilmesi perforatör fleplerin ek avantajlarından. (21; 26)

Kroll ve Rosenfield perforatör fleplerin, muskulokutan fleplerin güvenilirliğini ve fasyokutan fleplerin düşük donör saha morbiditelerini birleştirdiğini savunmaktadır. (29) Perforatör fleplerde cilt adasının hiperperfüzyonu

sayesinde komşu iki anjiozomun tek perforatör arterden beslenebilmesi mümkün olabilmektedir. (30; 31)

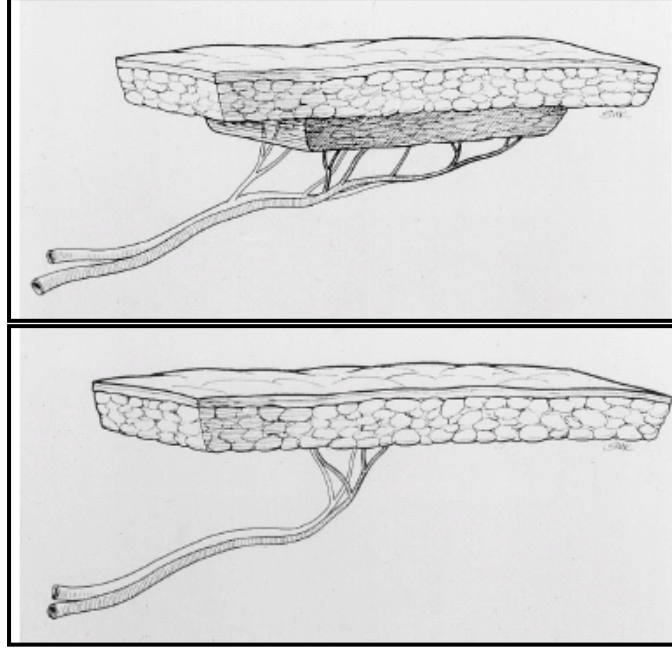
2.2 DİEAP FLEP

Meme kanseri teşhisi konan kadınlardan yaklaşık üçte ikisi meme koruyucu tedavi alabilirken, en az üçte birine mastektomi uygulanmaktadır ve bu hastalar meme rekonstrüksiyonu adayı olmaktadır. Rekonstrüksiyona ihtiyaç duyacak bir diğer hasta grubu da önlem olarak mastektomi uygulanan kadınlardır (örneğin anormal BRCA 1 ve 2 genleri olduğu gösterilenler). Avrupa Meme Kanseri Direktifi'ne (direktif 2001/20/EC) göre meme rekonstrüksiyonu mümkün olan en kısa zamanda, hastanın kendi dokusu kullanılarak yapılmalıdır. (32; 33)

Otojen meme rekonstrüksiyonunun sağladığı memenin, şekil, yumuşaklık, hareketlilik, doğal ptoz ve doku sıcaklığı gibi özellikleri, protez ile yapılan rekonstrüksiyonlar ile elde edilememektedir. Erken ve otojen rekonstrüksiyonunun daha ucuz olduğu da gösterilmiştir. Hartrampf ile birlikte yaygınlaşan TRAM flebi önceleri pediküllü flep olarak daha sonraları serbest flep olarak meme rekonstrüksiyonunda ilk seçenek olmuştur. Fakat karın duvarında oluşan önemli komplikasyonlar nedeni ile cerrahların daha az kas rezeksiyonu gerektirecek yöntem arayışları başlamış ve bu arayış meyvesini perforatör flepler olarak vermiştir. DİEAP flebi, artık meme rekonstrüksiyonunun için kesin vazgeçilmezi haline gelmiştir. (34; 35)

DİEAP flebi cerrahisinde RA kası bütünlüğünün mümkün olduğunca korunması için birçok perforatörden vazgeçmek sureti ile, seçilen bir veya birkaç perforatör, kasın içinde disseke edilir. Böylece yapılan fasya ve kas içi insizyonlar dışında kasın ve fasyanın tamamı korunmaktadır. DİEAP flebinin perforatör fleplerin daha önce belirtilen genel özelliklerine uyacak şekilde postoperatif ağrıyı ve iyileşme süresini azalttığı, cerrahi tekniğinin bariz bir öğrenme eğrisi ile ileri beceri gerektirdiği görülmüştür. (21)

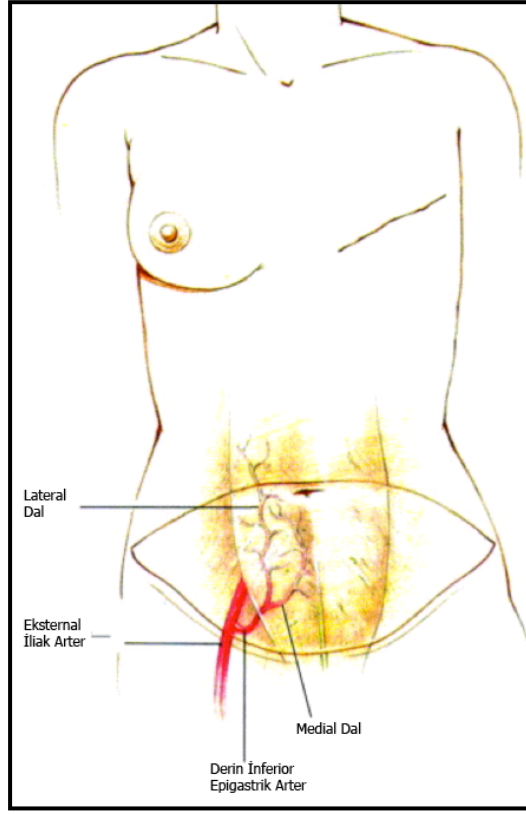
DİEAP cerrahisinde TRAM flebine göre karın duvarı asimetrisi, herniler ve şişkinlikler en aza indirilir. Ayrıca bu flebin içinde flebin transferi sonrası atrofiye uğrayacak kas bulunmaz, bu nedenle tahmin edilebilir sonuçlar verir. (34; 36)



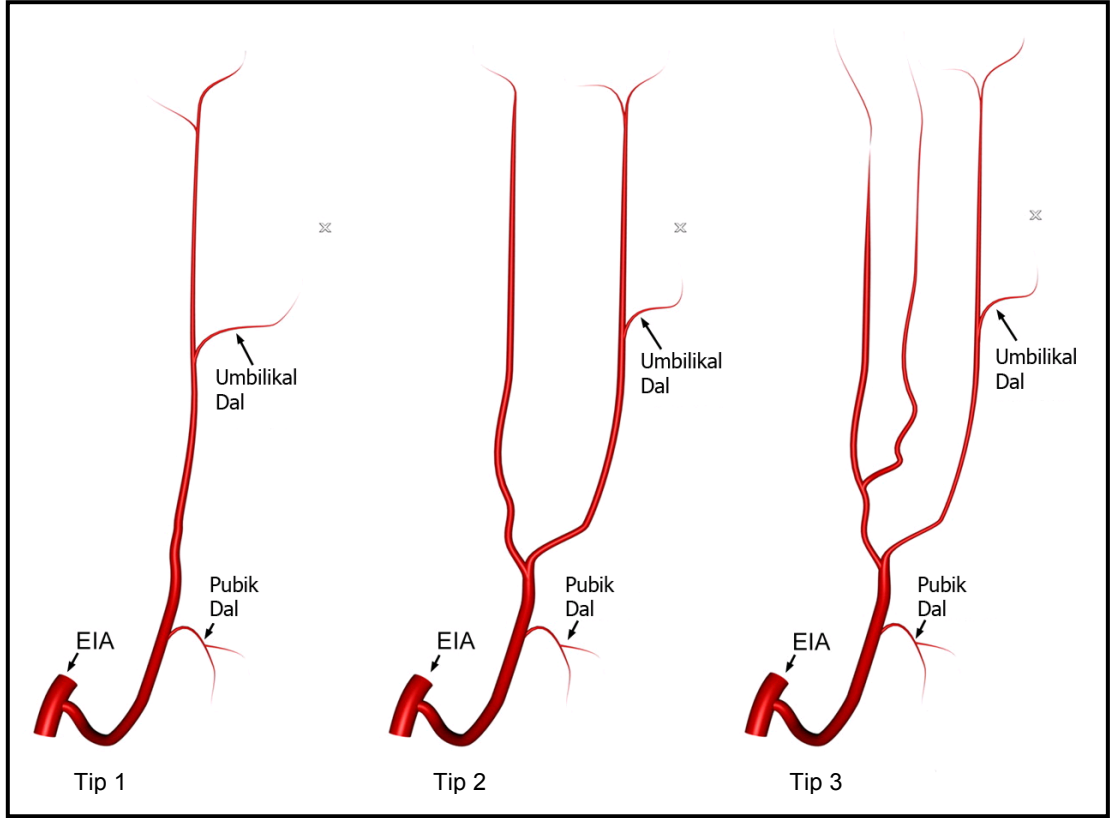
Şekil 2: TRAM ve DİEAP flepleri şematik çizimleri. Üst resim: RA kası ve birden fazla perforatör içeren serbest TRAM flebi, alt resim: RA kası içermeyen ve daha az sayıda perforatör ile beslenen DİEAP flebi. (37)

TRAM ve DİEAP flepleri araştırmalarını karşılaştıran bir çalışmada DİEAP flebi ile dolaşım eksikliğine bağlanan flep komplikasyonlarında artış olduğu görülmüştür. Donör sahayı korumak için kan dolaşımı güvenilirliğinden kısmen de olsa feragat edilmesi gerekmektedir. (38)

DİEA karın ön duvarı cildini besleyen ana arterdir. İki adet eşlik eden veni bulunur. Arter kas içine girdikten sonra vakaların çoğunda iki ana dala ayrılır; lateral dal, kasın 1/3 lateral kısmında lateral sıra perforatörleri, medial dal, kasın 1/3 medial kısmında medial sıra perforatörleri ve bir umbilikal dalı verir. (21; 39) (Bkz: şekiller 3 ve 4)



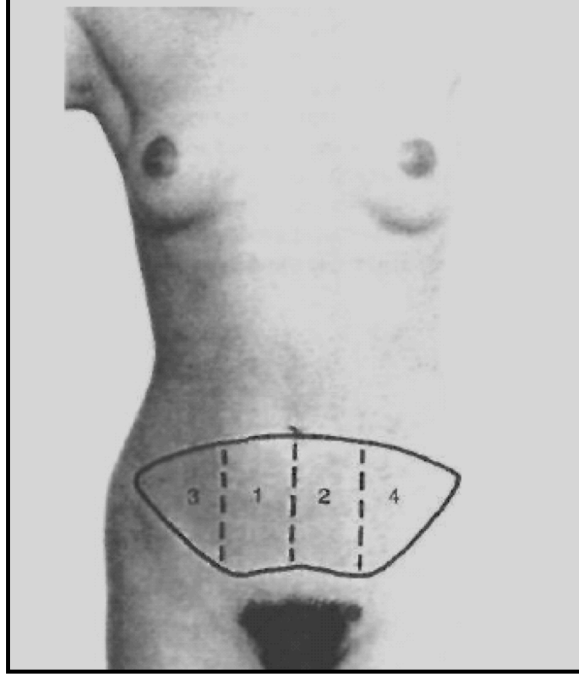
Şekil 3: Eksternal iliak arter ve ondan çıkan DİEA'nın vücutta yerleşimi. (40)



Şekil 4: Moon ve Taylor tarafından tanımlanan DİEA dallanma sınıflaması: tip 1: tek dal, tip 2: çift dal, tip 3: ikiden fazla dal. (39) En sık tip 2 görülürken en seyrek de tip 3 görülmektedir. Pubik dal ve umbilikal dal hemen her zaman görülür. EİA: eksternal iliak arter.

Transvers alt karın flebinin kan dolaşımı bir çok tartışmaya yol açmıştır. Pediküllü TRAM ada flebi perfüzyonu hakkında ilk olarak Sheflan ve Dinner bazı yorumlar yapmışlar, klinik gözlemlerine dayanarak flebi, orta kısmı perfüze olan ve bu perfüzyonu her iki periferik uca doğru azalan cilt elipsi olarak anlatmışlardır. Cilt flebini vertikal olarak dört eşit bölgeye (zone) bölmüşler ve dolaşımın en çok olduğu 1'den en az olduğu 4'e doğru numaralandırmışlardır. Buna göre pedikülün bulunduğu tarafta (ipsilateral taraf) RA kasının üzerine denk gelen alana 1. bölge (zone), orta hattın diğer tarafında (kontralateral) bulunan komşu alana 2. bölge (zone), ipsilateralde 1. bölgeye komşu olan alana 3. bölge ve kontralateral hemiabdomende en periferdeki alana 4. bölge ismi verilmiştir. (41; 42; 43) (Bkz: Şekil 5) Her ne kadar “zone”lar yani bölgeler, Sheflan ve Dinner tarafından tarif edilmiş olsa da ilk olarak Hartrampf’in yayınladığı hasta serisi sayesinde tanınmış ve yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. (41; 16)

Taylor ve Palmer daha sonra anjiozom konseptini tanımlamış ve komşu iki bölgenin “choke anastomoz”lar üzerinden bağlantılı olduğunu tarif etmişlerdir. (39; 20; 44) Bu bilgiler ışığında, son zamanlarda TRAM flebinde 1. bölgenin her iki yanındaki komşu bölgeler, 2. bölge olarak kabul görmeye başlamıştı. (39; 45)



Şekil 5: Sheflan ve Dinner ve Hartrampf'a göre TRAM flebi transfüzyon bölgelerinin karın duvarına işaretlenmiş görünümü. (Hastanın sağ RA kası ipsilateral olarak kabul edilmiştir.)

Erken dönemdeki bu perfüzyon çalışmalarını kontralateraldeki komşu alanın 3. bölge olarak adlandırılmasını öneren bir dizi çalışma takip etmiştir. Dinner daha önceki tarifinin ilk halini düzeltmiş ve ipsilateral tarafta kan dolaşımının, kontralaterale göre istikrarlı şekilde daha güçlü olduğunu belirtmiştir. (46; 41) Daha sonra farklı olarak serbest TRAM flebine ek olarak serbest DIEAP flebinin de incelendiği in vivo videoanjiyografi (47), laser doppler flowmetri (48), floresan perfüzyon (49) ve doku oksijenizasyonu (50) çalışmaları, bu gözlemi destekleyen bulgular vermiştir. Ayrıca bazı anatomik bulgular da ipsilateral bölgeler arasında orta hattakilere göre sayıca daha fazla damarsal bağlantı olduğunu göstermiştir. (47; 51)

Blondeel, klinik serilerinden birinde, 4. bölgelerinde kan dolaşımı eksikliği görülen tüm fleplerin lateral sıra perforatörlerini temel aldığını kaydetmiştir. Buna dayanarak Blondeel, rekonstrüksiyon için 4. bölgenin gerekliliği halinde medial sıra

perforatörlerinin kullanılmasını önerir. Öte yandan 4. bölge birçok cerrah tarafından rutin olarak flepten çıkarılmaktadır. (21; 34; 52)

Tüm bu bilgiler ışığında düşünüldüğünde alt karın flebinin perfüzyonu ile ilgili ilk yapılan yorumların ve tanımlanmış 4 bölgenin, günümüz tek ya da birkaç perforatör temelli DIEAP flebi için uygun olmadığı fark edilmeye başlanmıştır. Her perforatör damarın köken aldığı aksial arterinkinden farklı bir besleme alanı vardır. Üstelik iki ana grup olan lateral grup perforatörler ve medial grup perforatörlerin alanları arasında belirgin fark mevcuttur. Bu ana gruplar içindeki perforatörlerin besledikleri alanlar bile kendi içlerinde farklılıklar göstermektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar eski tanımlanmış “bölge”lerin yeniden gözden geçirilmesini sağlamıştır. “Perforatör anjiozom” ve “perforazom” kavramları ortaya konmuştur. (53; 54)

Perforatörlerin besledikleri bölgelerin, “perforazom”ların aydınlatılması amacı ile kadavra disseksiyonu ve perfüzyonu, taze abdominoplasti materyallerinde anjiyografi çalışmaları ve klinikte artık neredeyse rutinleşmiş olan bilgisayarlı tomografi anjiyografi görüntülerinin değerlendirmeleri kullanılmıştır. (41; 53; 54)

Medial sıra perforatörlerin, lateral grup perforatörlere göre, sayıca daha fazla ve daha geniş oldukları görülmüştür. Medial perforatörlerin RA kasını deldikten sonra, skarpa fasyasına kadar nispeten dik bir uzanımda oldukları, skarpa fasyasını geçince sayıca çok, geniş ve hem lateral hem medial olmak üzere birçok yöne doğru dağılan dallar verdikleri izlenmiştir. Yanı sıra medial sıra perforatörlerinin hemen her zaman orta hattı geçen dallar verdiği (41; 53; 54) ve bu dalların alışılmış “choke anastomoz” damarlarına göre sıra dışı şekilde geniş olduğu kaydedilmiştir. (41; 54) Diğer yandan lateral sıra perforatörler, medial sıra perforatörlere göre, sayıca daha az ve daha ince bulunurken, bu perforatörlerin RA kasını deldikten sonra, skarpa fasyasına kadar laterale doğru bir uzanımda oldukları, skarpa fasyasını geçince sayıca daha az, daha ince ve laterale doğru dağılan dallar verdikleri izlenmiştir. Lateral sıra perforatörlerinin çok seyrek şekilde orta hattı geçen dallar verdikleri kaydedilmiştir. (41; 53; 54)

Taze abdominoplasti materyali üzerinde yapılan bir çalışmada , bir lateral sıra perforatörüne verilen boyanın, flep vücuttan ayrıldıktan sonraki ilk 1 saatte orta hattı geçtiği, ama flep buzdolabında 72 saat tutulduktan sonra aynı işlem tekrarlandığında

boyanın kontralaterale geçemediği gözlenmiştir. Bu durum kadavra çalışmalarının gerçek fizyolojinin azaltılmış bir göstergesi olduğunu kanıtlamıştır. Aynı çalışmada ilk 1 saatte medial sıra perforatörü kullanıldığında 4. bölgenin kanlanıyor olduğu gözlenmiştir. Medial perforatörlerin kullanıldığı kadavra uygulamalarında da kontralateral komşu bölgenin perfüze olduğu ve bu perforatörlerin 4. bölgeye uzanan damarlar içerdiği izlenmiştir. (41)



Şekil 6: DIEAP flebinde perforatörlere özgü perfüzyon alanları; perforazomlar. Solda medial sıra perforatörlerin, sağda ise lateral sıra perforatörlerin perforazomları görülmektedir. (54)

Schaeffer ve Saint-Cyr'in çalışmalarında da subdermal pleksusun önemi ortaya çıkmıştır. Derinde suprafasyal bir damar pleksusu görülmesine karşın, yüzeysel subdermal pleksusun, kan dolaşımının başlıca sağlandığı seviye olduğu gözlenmiştir. Kanın, bir perforazomdan diğerine veya kontralateral karın yarısına geçerken de önce bu subdermal pleksus seviyesine yüzeye çıktığı, geçişini bu seviyede yaptıktan sonra rekürren damarlar üzerinden derine indiği görülmüştür. "Choke anastomoz"ların yerleşiminin muhtemel olarak bu yüzeysel seviyede olduğuna inanılmaktadır. Subdermal pleksusun derininde bulunan suprafasyal pleksus, daha çok scarpa fasyası altında bulunan yağ dokunun perfüzyonundan sorumlu bulunmuştur. Medial sıra perforatörleri kullanıldığında bile 4. bölgede skarpa fasyası altındaki yağ dokuda dolaşım görülememiştir. Bu alanın yağ nekrozunun başlıca rastlandığı bölge olduğu başka araştırmacılar tarafından da teyid edilmiştir. (39; 41)

Medial ve lateral sıra perforatörleri hakkındaki bu bulgulara rağmen araştırmacılar pre-operatif Bilgisayarlı Tomografi Anjiyografi (BTA) ile görüntüleme yapılması, operasyon sırasında en geniş perforatörün seçilmesi ve her hastaya göre farklı yaklaşılması konularında hemfikirdirler. (53; 54)

2.2.1 DİEAP FLEBİ VENÖZ DOLAŞIMI

Yüzeyel inferior epigastrik venin (SİEV), derin inferior epigastrik vene (DİEV) göre daha geniş olması normal fizyolojik koşullarda alt karın bölgesi venöz drenajının yüzeyel venöz sistemden olduğuna dair bir göstergedir. Değişik çalışmalarda bunu destekleyen bulgulara ulaşılmıştır. (21; 41; 55) DİEAP ameliyatları öncesi çekilen BTA'nın da yaygınlaşması ile bu fizyolojik durum görüntülenebilmektedir. (41)

Kadavrular üzerinde yapılan DİEAP flebi venöz perfüzyonu çalışmasında, venöz drenajın kontralateralden ipsilaterale dönmesi, orta hatta bulunan, her iki yandaki SİEV'ler arası direkt komunikan venler ile olduğu görülmektedir. (41)

Derin ve yüzeyel venöz sistemler birbirleri ile perforatör arterlere eşlik eden venlerle ilişkidirler. Bunun yanı sıra SİEV'in anatomisi sayıca az ve ince medial , daha kalın ve fazla sayıda lateral perforatör venler şeklindedir. Blondeel çalışmalarında fleplerin %36 kadarında orta hattı geçen ven bulunmadığını görmüştür. Yanısıra ciddi venöz konjesyon gözlemediği fleplerin hepsinde disseksiyon sırasında yüzeyel epigastrik venin sıra dışı genişliği dikkat çekmiştir. (21; 51)

DİEAP flebinde olası komplikasyonları azaltmak için çözümler aranmıştır. Bazı araştırmacılar DİEAP flebinde kontralateral tarafın, özellikle de 4. bölgenin kullanılması gereken olgularda, BTA'da perforatörlerin lateral yerleşimli veya ince olduğu görüldüğünde, modifiye bir cerrahi teknik ile operasyon sırasında cerrahi geciktirme işlemi yapılabileceğini savunmuşlardır.

Bunun dışında güvenilirliği artırmak için; perforatör flebi birden fazla perforatör ile kaldırmak, 4. bölgenin tamamı ve hatta 3. bölgenin kısmen flepten çıkarılması, ameliyat öncesi perforatörlerin BTA ile görüntülenerek seçilmesi, ameliyat sırasında sorunla karşılaşıldığında serbest TRAM flebi kaldırılması veya abdominal alanı iki ayrı flep halinde kaldırıp, flepleri kombine kullanmak gibi önerilerde bulunulmuştur. (23; 34; 53; 52; 56)

DİEAP fleplerde güvenilirliği artıracak diğer bir yöntem de flep dokusunda damarlanma artışını sağlamak olabilir. Deneysel olarak kök hücre kullanılarak yapılan yeni damar oluşumu tedavileri umut vaat etmektedir. Bu çalışmada,

YDKKH uygulamasının sıçan DİEAP flep modelinde flep yaşayabilirliği üzerine etkilerini araştırmak hedeflenmiştir.

2.3 KÖK HÜCRE VE YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN TANINMASI

Farklı tiplerde hücre ailelerine farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerin, doku mühendisliği ve gen terapisi alanlarındaki terapötik potansiyelleri çok büyüktür.

Günümüzde bu tip uygulamalar için iki uygun grup kök hücre vardır: embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler. Embriyonik kök hücreler birden çok değişik potansiyelleri olması dolayısı ile uygulama için uygun gibi gelse de bu hücrelerin elde edilmesinde ve kullanılmasında hücre regülasyonu problemleri ve etik konular engeller teşkil etmektedir. Buna karşın yetişkin kök hücreler hem immunolojik olarak sorunsuzdur hem de benzer etik sorunları getirmezler. 1961 yılında Moss ve diğ., kas dokusunda elde edilmiş satellit hücreleri ve 1963 yılında Becker ve diğ., fare kemik iliğinde kendi kendini yenileyebilen hücreleri tanımladılar. Bunlar hematopoietik kök hücrelerdir. Bu tanımlar yetişkin kök hücrelerin ilk tarifleri olmuştur. Bundan sonra McCulloch ve Till'in araştırmaları ile 1960 'lı yılların sonunda çalışmalar hız kazanmış, kemik iliği mezenkimal kök hücreleri tanımlanmış ve 1970'li yılların başında "Ağır Kombine İmmun Yetmezlik" hastaları kemik iliği nakli ile tedavi edilmeye başlanmıştır. 1978 yılında kordon kanında yetişkin hematopoietik kök hücreler bulundu. 1992 yılında nöral kök hücreler tanımlandı. (57)

Yetişkin kök hücreler üzerinde yapılan birçok araştırma kemik iliği kaynaklı kök hücreler (KİKKH) üzerinde olmuştur. İnsan kemik iliği embriyonik mezodermden köken alır. Kemik iliği hücre grubu başlıca iki hücre grubundan oluşur; hematopoietik kök hücreler ve destek verici mezenkimal stromal hücreler. Hematopoietik hücrelerin büyüme ve farklılaşmaları iyi dokümanle edilmiş olmasına rağmen stromal komponent 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. Mezenkimal kök hücre grubu üzerinde yapılan çalışmalar, bu

hücrelerin adiposit, kondrosit, myoblast ve osteoblast hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir. (58)

Doku mühendisliği için kemik iliğinden elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin umut verici olduğunu gösteren deneysel çalışmalar yapılmıştır. Dolayısı ile mezenkimal kök hücre grubu gelecekteki doku mühendisliği statejileri için önemli bir kaynak teşkil etmektedir. Öte yandan geleneksel kemik iliği biyopsi yöntemleri genel veya spinal anestezi gerektirecek kadar ağrılı olmakta, bu şekilde alınan materyalden ancak az miktarlarda mezenkimal kök hücre elde edilebilmektedir. Miktarın bu kadar az olması ex-vivo bir ekspansiyon işlemi gerektirmekte ve bu da zaman alıcı ve pahalı olmasının yanı sıra, hücre kontaminasyonu ve hücre kaybı olasılığını getirmektedir. Böylece hastanın konforunu çok bozmayan ve hücre ekspansiyonunu gereksiz kılacak kadar hücre sayısını sağlayan, kolay bir teknikle kök hücre elde etme olanağı sağlayacak bir kaynak arayışı başlamıştır.

Vücuttaki çoğu dokuda o dokuya farklılaşmaya programlanmış, bir çeşit kök hücre grubunun, bakım ve onarım için kullanılmak üzere varlığı bilinmektedir. Ek olarak çeşitli deney hayvanlarının birden çok organının içinde, farklılaşma programı o dokuya ait olmayan kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Yağ dokunun da kemik iliği gibi embriyonik mezodermden köken alması ve heterojen stromal hücre topluluğu içeriyor olması, yağ dokudan kök hücre elde edilebileceği fikrini doğurmuştur. (58)

2001 ve 2002 yıllarında Zuk ve diğ., yağ dokudan, birden fazla farklı doku gruplarına farklılaşma yeteneği bulunan bir kök hücre topluluğunu ilk olarak izole etmeyi başarmışlardır. (58; 59) Bu hücre topluluğunun farklı öncü hücrelerden oluşan bir topluluk olmadığı, tek bir tip hücre olduğunu kanıtlamışlar ve bu hücreleri YDKKH olarak tanımlamışlardır. Bu hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve myojenik gibi farklı mezodermal hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri gösterildi. Yanı sıra ektodermal menşeyli doku gruplarına farklılaşma da gösterilmiştir; nöron, oligodendrosit benzeri hücreler, fonksiyonel Schwann hücresi ve epidermal diziden hücreler. Ek olarak hepatosit ve pankreas adacık hücreleri gibi endodermal diziden bazı hücrelere farklılaşmaları sağlanmıştır. Bu hücrelerin embriyonal kök hücreler kadar fazla potansiyelleri olduğu ve üç germ dizisine de farklılaşabildikleri savunulmuştur. (58; 59)

İlk tanımlandığından bu yana YDKKH'lerle sayıca çok fazla çalışma yapılmıştır. En yaygın araştırma konuları doku iyileşmesi ve rejenerasyonudur. İskemi sonrası revaskülarizasyon, kalp-damar sistemi rejenerasyonu, kemik-kıkırdak defektlerinin onarımı, intervertebral disk yenilenmesi ve üriner sistem rekonstrüksiyonu araştırılan en sıcak konulardır. Fakat bunlar dışında YDKKH 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 düşme sağlanmıştır. (57)

Bazı yazarlara göre YDKKH'lerin 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 şüphelenmektedirler. (59; 60)

2.3.1 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN PLASTİK CERRAHİDEKİ YERLERİ

Elde edilme yöntemleri sebebiyle ilk tarif edildiklerinden beri kök hücreler plastik cerrahlar tarafından ilgi görmektedir. Doku mühendisliği çalışmalarında mezenkimal kök hücrelerle ve klinikte yağ doku transferleri ile çalışmaya alışık olan rekonstrüktif cerrahlar arasında YDKKH kolaylıkla kabul görmüştür. YDKKH'ler ile yapılan klinik çalışmalar başta yağ dokusu olmak üzere doku transferlerinin sonuçlarını düzeltmeye ağırlık vermiştir. Deneysel çalışmalar ise YDKKH'lerin yeni damar oluşumu, doku veya doku onarımları için kemik, kıkırdak, kas ve yağ dokusuna farklılaşma özellikleri üzerine olmuştur. (60)

YDKKH elde etmek için yağ emme yöntemi ile alınan yağda hemen çalışılmaya başlanabilir, eğer yağ dokusu abdominoplasti ya da başka bir tür vücut şekillendirme ameliyatı ile elde edilmişse çalışmaya başlamadan önce yağ dokunun çok küçük parçalara bölünmesi gereklidir (mikrodisseksiyon). Bundan sonra sırasıyla, eritrosit sayısını azaltmak için yıkama, kollajenaz sindirimi, arkasından filtrasyon ve santrifüj yapılır. Elde edilen süspansiyonda, stromal vasküler

fraksiyonda YDKKH bulunur. Bu aşamadan sonra bu fraksiyon direkt olarak kullanılabilmesi gibi kültür ortamına koyularak çoğaltılabilir. (60) Stromal vasküler fraksiyon ile “aşılınmış” ya da “zenginleştirilmiş” yağ dokusu transferlerinin, yüz atrofisi, kozmetik meme büyütme gibi alanlarda başarılı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. (61; 62)

Kültüre konan ve çoğaltılan YDKKH’lerin olası bir uygulama alanı, dokularda hücre tedavisi ile neovaskülarizasyonun sağlanmasıdır. Neovaskülarizasyon tedavisi doku greftlerinin yaşayabilirliğinin ve iskemik dokuların iyileştirilmesi üzerinde umut vaat etmektedir. Flep cerrahisi sonrasında, tam veya kısmi doku iskemisi ve nekroz seyrek rastlanılan bir sorun değildir. Bu sorun flebin beslenmesinde bir bozuklukla ilgilidir. Cerrahi teknik dışında, hastada sigara içiciliği, diabetes mellitus, periferik arter hastalığı gibi sebepler de buna neden olabilir.

Dokuda yeni damar gelişimi anjiogenez ve vaskülogenez olarak iki ayrı grupta incelenir. Anjiogenez mevcut kapillerlerden tomurcuklanma ve uzama ile yeni dal oluşması olarak tarif edilebilir. Burada endotel hücreleri uyarılarak bölünür ve çoğalır. Vaskülogenezde ise embriyonal mezodermal hücreler öncelikle anjioblastlara ve ardından endotelyal hücrelere farklılaşırlar. (63)

Daha önce vaskülogenezin sadece embriyonal dokularda geliştiği düşünülüyordu, Ashara ve diğ. 1997 yılında periferik kandan elde edilmiş hematopoietik öncü hücrelerin invitro ortamda endotelyal bir fenotipe farklılaşabildiklerini göstererek yetişkin dokularda da vaskülogenez olabileceğini kanıtlamıştır. (64)

Vaskülogenez, sadece embriyoda değil yetişkin dokularda da varlığı gösterildiğinden beri iskemik dokuların kurtarılmasında ilgi çeken bir hedef olmuştur. Flep yaşayabilirliğini artırmak için terapötik vaskülogenezin uygulanabileceği fikri ile bazı çalışmalar yapılmıştır. Anjiogenez ve vaskülogenezi uyabilecek “vascular endothelial growth factor” (VEGF; damar endoteli büyüme faktörü) gibi büyüme faktörlerinin kullanımı başarılı olmuştur. (65) Fakat sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin yarı ömrünün kısa olabilmesi, hem anjiogenez hem de vaskülogenez için farklı sitokinlerin ve faktörlerin, farklı zamanlarda

etkimesi gerekliliği ve benzeri sebeplerden dolayı, tek başlarına başarılarının sınırlı olabileceği düşüncesi benimsenmeye başlamıştır. (66; 67)

Dokuya yeni damar gelişimini uyaran sitokinler yerine yapıtaş olarak kök hücre verilmesi, yeni damar gelişiminin ortamdaki belirli sayıda endotel hücrelerle sınırlı kalmamasını sağlar. Bir veya birkaç sitokin dokuya uygulanmasından ziyade birçok farklı hücreye farklılaşabilme potansiyeline ve muhtemelen karmaşık vaskülojeniz basamaklarını düzenleyici etkiye sahip kök hücrelerin terapötik vaskülojeniz için kullanılmaları savunulmaktadır. (65)

YDKKH'lerin gösterilmiş olan vaskülojeniz potansiyelleri endotel hücrelere farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra salgıladıkları büyüme faktörlerinden de kaynaklanmaktadır. YDKKH'lerin invitro ortamda VEGF salgıladıkları gösterilmiştir. (68; 69; 70)

2006 yılında Mizuno ve diğ., rastgele beslenen cilt fleplerinde damarlanmayı artırmak için, fleplere YDKKH uygulaması sonrası fleplerde canlılığın artırılabilirdiğini ve damarlanma artışı sağlanabileceğini göstermiştir. (65) Verilen YDKKH'lerin yeni damar yapısında endotel olarak yer aldıklarını gözlemişlerdir. YDKKH'lerin ayrıca iskemik arka uzvu kurtardığı, myokard enfarktüsü sonrası kalp ventrikül fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir. (71; 72)

Çalışmamızda, YDKKH'lerin sıçan DIEAP flep modelinde flep yaşayabilirliğine etkilerini araştırmak hedeflenmiştir.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ

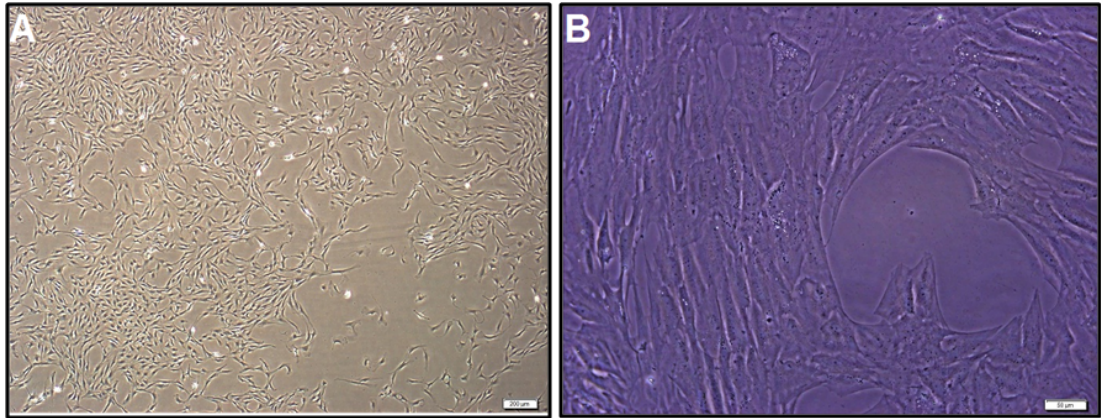
3.1.1 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRE HAZIRLANMASI

YDKKH'lerin hazırlanması ve uygulamaya hazır hale getirilmesi işlemleri Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (KOÜ-KÖGEM) yapılmıştır. Sıçan inguinal bölgesinden alınan yağ dokusu laboratuvar ortamında, %5-10 oranında penisilin-streptomisin içeren Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ile birkaç kez yıkama işleminden geçirilerek makasla 1cm³'lik küçük parçalara ayrıldı. Yıkama işleminden sonra dokular kuru bir petri kutusuna alınıp makas yardımıyla en büyük parça 1mm³ oluncaya kadar kıyıldı ve üzerine Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen HBSS ile hazırlanmış %0.075'lik tip 1 kollajenaz solüsyonundan 2 ml koyuldu. Doku örnekleri 15 ml'lik falkon tüpte toplandı. Son volüm, kollajenaz solüsyonu ile 5 ml'e tamamlanıp 37°C'de çalkalamalı su banyosunda 60 dk bekletildi. İnkübasyon sonunda, karışımın üzerine 5 ml daha HBSS eklenerek 1800 rpm(devir/dakika)'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak, pelet 5ml HBSS ile sulandırıldı ve 70 µm'lik hücre süzgeci ile süzülerek, tekrar 1300 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, pelet üzerine 5 ml eritrosit "lysing" solüsyon eklenip oda ısında 5 dk bekletildi. Süre sonunda 5 ml HBSS eklenerek 1800 rpm'de 10 dk üçüncü kez santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlanıp süpernatant atıldıktan sonra oluşan pelet üzerine %15 oranında Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren α-modified minimum essential medium (α-MEM) kültür besiyerinden 1ml eklenip, pipetaj yapılarak 25 cm² 'lik kültür kabına ekim yapıldı. Gerekli miktarda kültür besiyeri koyulduktan sonra 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda kültüre edildi. 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek yüzen tüm hücreler uzaklaştırıldı. Haftada iki kez

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

3.1.2 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONU

Sıçan YDKKH kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde ayırıldı ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelendi. Resim 4'de KOÜ-KÖGEM de üretilen sıçan YDKKH'lerin çeşitli dönemlere ait zıt-faz mikroskopik görüntüleri görülmektedir.

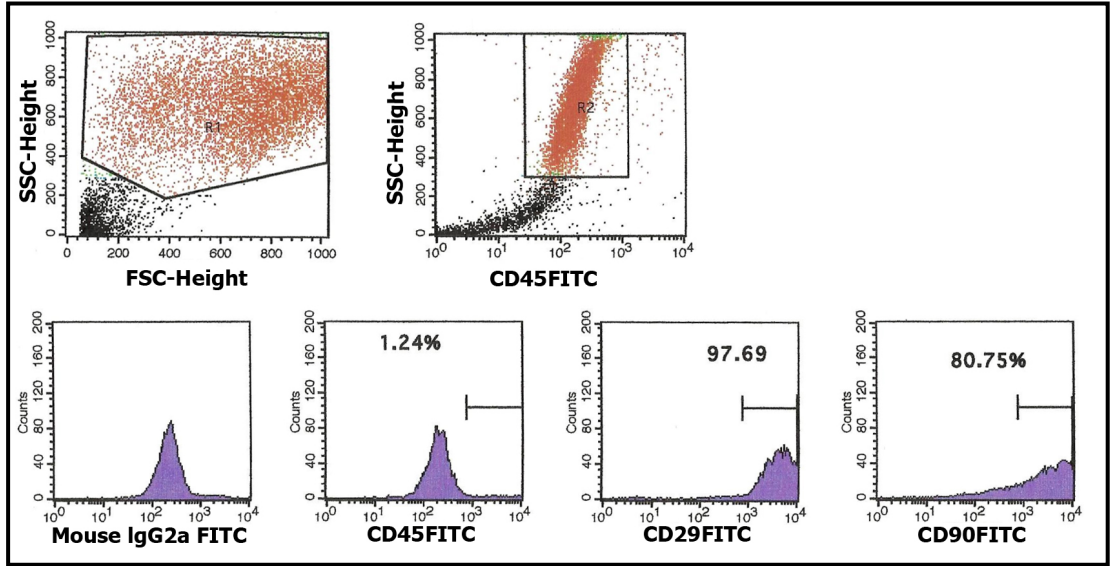


Şekil 7: Sıçan YDKKH'lerin karakterizasyonu: pasaj 0; 5.gün: (A), pasaj 2; 5.gün: (B), zıt-faz mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. Primer kültürdeki hücrelerin kolonizasyon gösterdikleri:(A), ileri pasajlarda ise hücre morfolojilerinin fibroblast-benzeri görünüm aldığı görülmektedir:(B).

İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analizler gerçekleştirildi. YDKKH'ler in vitro farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için; adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya alındı.

3.1.2.1 İMMUNFENOTİPLEME: AKIM SİTOMETRİK ANALİZ

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (Pasaj 1’den Pasaj 5’e kadar) ve FACS Calibur akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapıldıktan sonra (yaklaşık olarak 8×10^6 hücre) Phosphate Buffered Saline (PBS) içinde homojenize edildi. Belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özgü fluoresan izotiyosiyonat (FITC) ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikorlardan (CD45, D90, CD29) ve uygun izotip kontrollerinden 10 μ l eklenerek inkübe edildi (oda ısısında, karanlıkta, 45 dak.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edildi (5 dk. 1780 rpm) ve 400 μ l hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutuldu ve analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirildi. (Bkz: Şekil-8).



Şekil 8 : Pasaj 3 sıçan YDKKH’lerinin akım sitometrik değerlendirme verileri. YDKKH’ler CD29 (%97.69) ve CD90 (%80.75) için pozitif iken, bir hematopietik belirteç olan CD45 %1.24 oranında tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, sıçan yağ dokusundan elde edilen hücreler mezenkimal tipte kök hücreler olarak tanımlanabilir.

3.1.3 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO FARKLILAŞMASI

3.1.3.1 ADİPOJENİK FARKLILAŞMA

Kültür kabının cm^2 'sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen YDKKH'ler; içinde %10 FBS, 0,5 mM isobutil-methilksantin, 10^{-6} M deksametazon, 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin, 200 μM indometasin ve 1% penisilin- streptomisin bulunan MEM kültür medyumunda iki hafta kültüre edilerek ve kültür sonrası hücre içi biriken lipidler, Oil Red O histolojik boyaması ve RT-PCR ve IF/IHC ile bazı gen ve protein ekspresyon panelleri çalışılarak tespit edildi.

3.1.3.2 OSTEOJENİK FARKLILAŞMA

Kültür kabının cm^2 'sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen YDKKH'leri; 100 nM deksametazon, 0.05 μM askorbat-2-fosfat, 10 mM β -gliserofosfat, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren MEM kültür medyumunda 4 hafta boyunca kültüre edildi. Osteojenik farklılaşma Alizarin Red S histolojik boyaması ve RT-PCR ve IF/IHC ile bazı gen ve protein ekspresyon panelleri çalışılarak tespit edildi.

3.1.4 YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN GFP İLE İŞARETLENMESİ

3.1.4.1 PLAZMİD DNA İZOLASYONU

Yüksek kalitede plazmid DNA izolasyonu, ayırma ve saflaştırma işlemleri sonrasında E.coli 'den toksik lipopolisakkaritler gelmemesi için EndoFree Plazmid Maxi Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Seçici katı besi ortamından yeni çoğalmış tek bir koloni alındı ve 2-5 ml uygun antibiyotik içeren Luria Bertani broth (LB) sıvı besi ortamına ekilerek 8 saat boyunca 300 rpm ve 37°C 'de çoğaltıldı. 250 ml seçici

LB ortamı, 1 ml içerisinde, bakteri çoğalmış ortam ile inoküle edilecek ve aynı koşullarda 12-16 saat bekletildi. Hücreler 6000 rpm hızda 15 dakika boyunca 4° C'de döndürülerek toplandı ve 10 ml süspansiyon tampon çözeltisi içerisinde homojen hale getirilip oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmeden önce, 10 ml sindirim sıvısı tamponu eklenip sertçe 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı. 10 ml buzda soğutulmuş sindirim sıvısını nötralize edici tampon eklenerek, 4-6 kez ters çevrildikten sonra karışım filtre kolonuna aktarıldı ve 10 dakika bekletildikten sonra akıtıldı. Bundan sonra karışım, 50 ml tüp içerisine aktarılıp 2,5 ml çöktürme tamponu eklendi ve 30 dakika buzda bekletildi. Bundan sonra karışım, 10 ml ilk yıkama tampon çözeltisi ile önceden dengelenmiş QIAGEN-tip 500 kolonuna eklenip, süzülmesi beklendi. Kolon, 2 kez 30 ml ikinci yıkama tamponu ile yıkandı ve 15 ml ikinci nötralizasyon tamponu içerisinde DNA çözüldü. Plazmid DNA 'sı 10,5 ml izopropanol eklenerek 4° C'de, 30 dakika boyunca asgari 15,000 rpm hızla çöktürüldü. DNA, 5 ml endotoksin içermeyen %70 etanol içerisinde yıkanıp 10 dk boyunca asgari 15,000 rpm hızla çöktürüldü. Yıkanmış plazmid DNA'sı oda sıcaklığında 5-10 dakika kurutulduktan sonra endotoksin içermeyen TE tamponu içerisinde istenilen hacimde çözüldü.

3.1.4.2 GFP GEN TRANSFORMASYONU

Gen aktarımı elektroporasyon yöntemini temel alan Neon Transfection Sistemi, 10 µl Neon Kit ve 100 µl Neon Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Yüksek kalitede (endotoksin içermeyen) plazmid DNA'sı 1–5 µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlandı, YDKKH'ler ise deneyin olacağı günde % 70-90 kaplama (konfluent) oranına ulaşacak şekilde (transfeksiyon başına $0,5-1 \times 10^6$ hücre) çoğaltıldı. Deney gününde hücreler kültür kabından kaldırılarak ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS'le yıkanıp, 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° C 'de, %5 CO₂ devridaimli, nemli ortamda inkübe edildi. Steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine

transfeksiyon başına 2- 4 µg plazmid DNA'sı ve plazmid DNA'sı bulunan tüp içerisine transfeksiyon başına DNA ile birlikte 10 µl olacak miktarda hücre aktarılıp, Neon™ Pipeti ile yavaşça tüp içerisine 10 µl DNA-hücre süspansiyonu çekildi ve ucundaki hücre-DNA karışımı ile birlikte Neon™ 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 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Transformasyon sonrası 3. günde (transient/geçici ekspresyon) ortam değiştirilerek besi ortamı tazelandı, ilk bu noktadan sonra seçici antibiyotik (pGFP için G418, Kat. No. 11811-098) eklendi. Kalıcı olarak gen ekspresyonu için, 2-3 ay (5-10 pasaj) boyunca hücreler antibiyotik direncine göre seçildi.

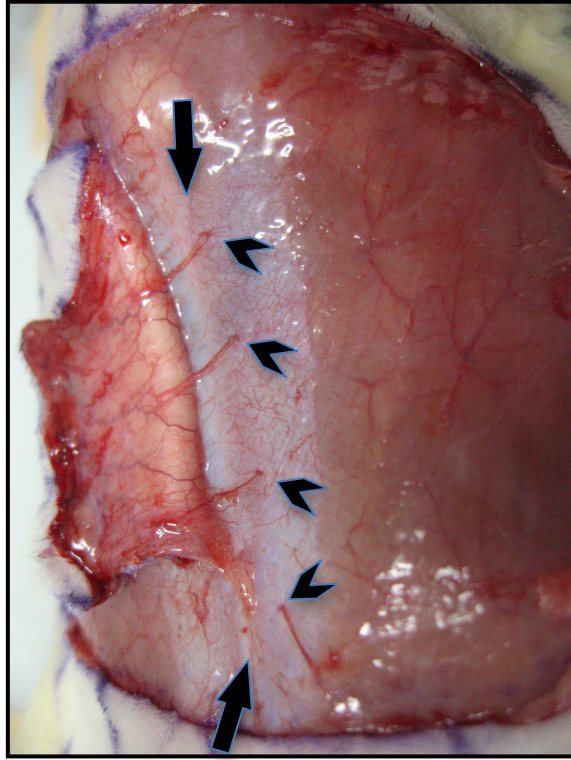
3.2 CERRAHİ: KARINDA DERİN İNFERİOR EPİGASTRİK ARTER FLEBİ KALDIRILMASI VE YAĞ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN UYGULANMASI

Tüm hayvan deneyleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KOÜ HADYЕК) tarafından onaylanarak yapıldı. Ağırlıkları 180-350g arasında değişen 30 adet Wistar Albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanların tümü Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilmiş ve yine orada 22°C sıcaklıkta ve 12 saatlik karanlık-ışık döngüsünde barındırılmıştır. Tüm deneyler Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde yapılmıştır. Ketamin (0,9g/kg) (Ketalar®, Pfizer) ve Ksilazin (10mg/kg) (Xylazin® Bio, Bioveta) kombinasyonu ile elde edilen anestezi altında karın bölgesi elektrikli traş aleti ile tüylerden arındırıldı. Korneaların kurumasını önlemek için göz pomadı (Kemicetine®, Deva) kullanıldı. Sıçan çalışma tepsisine yapışkan bantlarla sabitlendi, karın bölgesi alkolle silindi ve kurutuldu.

Sıçan büyüklükleri farklı olduğundan flep tasarlanırken anatomik nirengi noktaları temel alındı. Buna göre flebin sınırları; superiorda ksifoid çıkıntı, inferiorda her iki spina iliaka anterior superior, laterallerde posterior aksiller çizgi olmak üzere, gazlı kalemle sıçanın cildine işaretlendi. Ortalama flep boyutları 5,5-7

cm X 3,5-5,8cm idi. Temiz fakat steril olmayan ortamda, 2,5 büyütme gözlüğü ile çalışıldı.

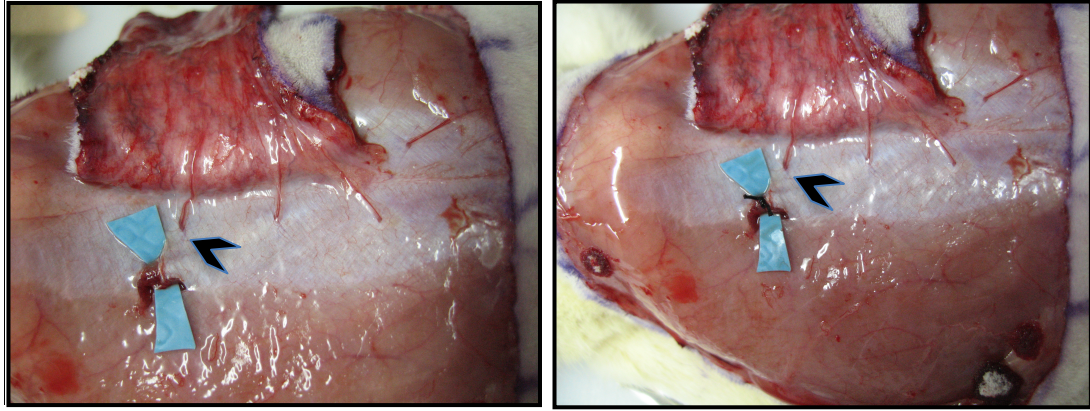
Cilt insizyonlarının ardından flep, lateralden mediale devam eden bir tarzda pannikulus carnosusun hemen derininden, RA kas fasyası üzerinden kaldırıldı. Kanama odakları koterle yakıldı. Her iki taraflı RA kasını delerek çıkan perforatörler görülerek korundu. (Bkz. Şekil 9)



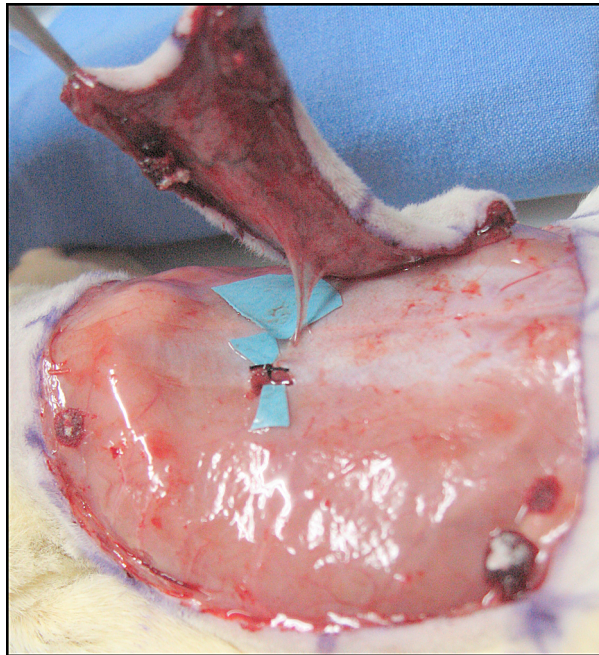
Şekil 9 : DIEAP flebi lateralden mediale, perforatör damarlar korunarak kaldırılmış. Ok başları sol RA kas fasyasını (açık renkli) delerek çıkan 3 adet perforatörü göstermektedir. Bir dördüncü perforatör de flebin inferior sınırının dışında kalmıştır. Orta hat ok ile gösterilmiştir.

Tüm gruplarda sağ RA kasının birinci veya ikinci perforatör damarı, flebin besleyici damarı olarak seçildi. Bundan sonra seçilen damarın DSEA'den çıktığı nokta korunarak DSEA bağlandı. Bu işlem için perforatörün çıkış noktasının superiorunda, RA kas fasyası, kasın lateral sınırından başlanarak mediale doğru kesildi. Disseksiyon ile RA kasının içinde kranial epigastrik arterin posteriorundan

dönülerek arter bağlandı. Bundan sonra seçilen perforatör dışındaki tüm epigastrik arter perforatörleri koterle kaogüle edildi. (Bkz: Şekil 10 ve 11)



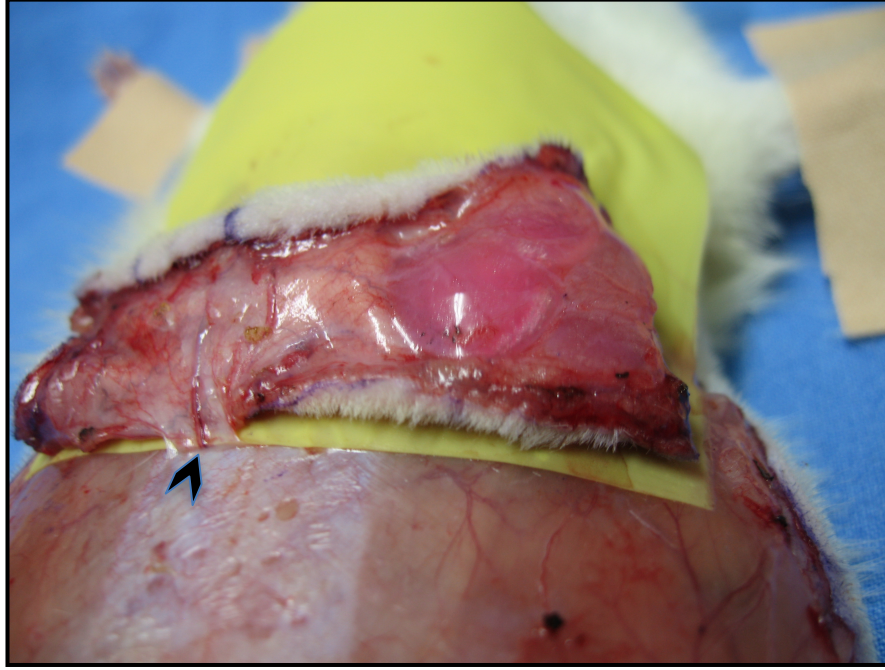
Şekil 10: Derin Superior Epigastrik Arterin (DSEA) Bağlanması. Sağ resim: Sağ RA kasının fasyası açık renkli olarak ayırt edilebilmektedir), seçilen perforatörün (ok ile işaretli) çıkış noktasının superiorunda, kasın lateral sınırından başlanarak mediale doğru kesilmiş. Disseksiyon ile RA kasının içinde kranial epigastrik arterin posteriorundan dönülmüş. Sol resim DSEA sütürle bağlanmış.



Şekil 11 : Sıçan DIEAP flebinin tek perforatör üzerinde kaldırılmış görüntüsü. DSEA bağlanmış ve seçilen perforatör dışındaki diğer perforatörler koterize edilmiş.

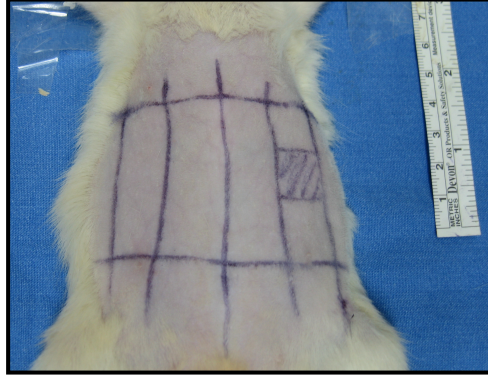
Bu aşamadan sonra hayvanlar 4 gruba ayrıldı. A grubu (n=6) , kontrol grubunu oluşturdu. Bu hayvanlardan flep tek perforatör üzerinde anlatıldığı şekilde

kaldırıldı. B grubu hayvanların (n=8) fleplerine 0,5 ml kök hücre medyumunu (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose (1 g/l)) uygulandı. Uygulama için flep alt yüzeyi çevrildi ve 4. bölgede ciltaltı alana, görülebilen damarlar travmatize edilmeden, beş ayrı noktaya 0,1 ml olacak şekilde injeksiyon yapıldı. (Bkz: şekil 12)



Şekil 12: DİEAP flebi tek perforatör (ok başı) üzerinde kaldırıldıktan sonra, pediküle en uzak bölgenin ciltaltı dokusuna medyum ve kök hücre uygulandı. Flep dokusunda solüsyona bağlı oluşan genişleme açıkça görülebilmektedir.

C grubunda (n=8) hayvanlara 0,5 ml medium içinde 3×10^6 adet YDKKH aynı şekilde enjekte edildi. Enjeksiyonlarda tümünde standart insulin enjektörü (25 guj) kullanıldı ve 2,5 büyütmeli gözlük altında görülebilen damarların travmatize edilmesinden kaçınıldı. D grubunda (n=7) sıçanların karın cildinde işaretlemenin ardından flep kaldırılmadan, 4. bölgeye denk gelen ciltten 1,5 X 1,5 cm'lik bir cilt biyopsisi alındı ve defekt primer kapatıldı. (Bkz: şekil 13)



Sekil 13 : D (ameliyatsız cilt) grubunda sıçan karın cildinden alınan biyopsinin bölgesi (taralı alan)

A, B ve C gruplarında (flep grupları) flepler yerlerine iade edilerek dikildi. Sıçanlara dehidratasyonu önlemek amacıyla sırt bölgesine ciltaltı 2 ml kadar 0,09'luk NaCl verildi. Literatürde tanımlanmış koruyucu sıçan yeleşği modifiye edilerek giydirildi ve sıçanların sırt bölgesine Shiene teli ve sütün yardımı ile sabitlendi. (73) Sıçanlar tek hayvanlık kafeslerde, uygun ortamda tutuldu ve standart yem verildi. Deneyin herhangi safhasında yem ya da sıvı kısıtlaması uygulanmadı. Sıçanlar günlük olarak özyamyamlık ve genel durum açısından incelendi.

3.3 DEĞERLENDİRMELER

3.3.1 ANJİOGRAFİ:

7. Günde, B ve C gruplarından birer adet sıçan rastlantısal olarak seçilerek anestezi uygulandı. Sıçanın göğüs kafesi açılarak sol ventrikül kanülizasyonu sağlandı ve ısıtılmış, heparinli (Nevparin® 5000 IU/ml, Mustafa Nevzat, ile hazırlanmış 25 IU/ml konsantrasyonunda) %0,9luk NaCl solüsyonu ile perfüzyona başlandı. Vakit kaybetmeden sağ atriuma yapılan insizyonun ardından, deney hayvanının tüm damar yatağı, 500 ml kadar perfüzyon solüsyonuyla yıkandı. İşlem sırasında hayvanlarda ventrikül atımının yaklaşık 1 dakika sonra durduğu gözlemlendi. Yıkama işlemini takiben aynı kanül yoluyla 60 ml kadar ısıtılmış %25'lik baryum sülfatlı, NaCl solüsyonu, 60 ml'lik enjektör yardımı ile yavaş bir şekilde verildi. Bundan sonra ölü sıçan 24 saat boyunca 4°C'de tutuldu ve akabinde flep eksize edilerek fotoğraflandıktan sonra mamografi çekildi.

3.3.2 FLEP CANLI ALANININ BELİRLENMESİ:

7. günün sonunda gruplardaki hayvanlar yüksek dozda anestezi altında öldürüldü. Flepleri eksize edildi ve mavi renkli bir örtünün üzerine yayılarak, sabit aydınlatma koşulları ve sabit uzaklıktan (25 cm), digital fotoğraf makinesi (Canon PowerShot SD 500) yardımı ile fotoğraflandı. Dijital imajlar bilgisayar ortamına yüklendi ve 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 ve canlı alan sınırları çizildi. (Bkz: şekil 14)



Şekil 14: Flep canlı alanının ölçülmesi sırasında çalışma ortamı

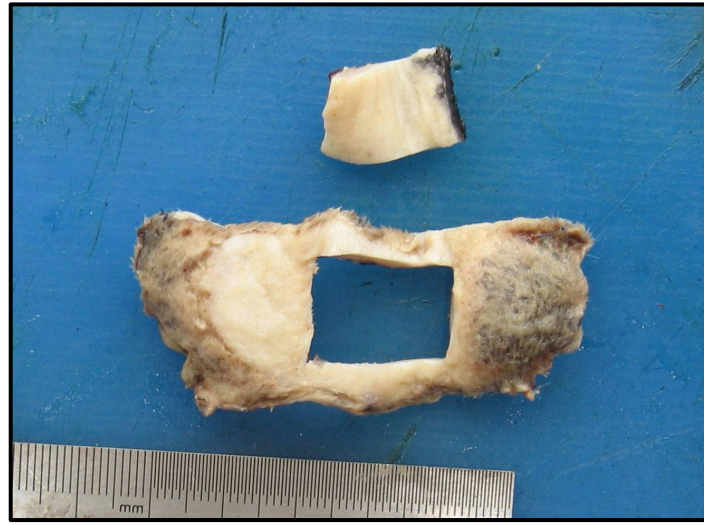
Her bir çizim sonrasında çizilen yüzeyin bilgisayar programında verilen birim kare alanı kaydedilerek canlı alan yüzeyi, toplam flep yüzeyine yüzde olarak oranlandı. Her flep fotoğrafında peşpeşe olmamak sureti ile iki ayrı zamanda değerlendirme yapıldı. İstatiksel değerlendirmelerde bir flebin canlı alan yüzdesi için bu iki ölçümün ortalaması kullanıldı.

3.3.3 DOKU DAMARLANMASININ HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ

A, B ve C gruplarında baryum sülfat infuzyonu yapılan sıçanlar dışındaki diğer sıçanların eksiz edilen flepleri fotoğraflamayı takiben %10'luk formaldehide kondu. En az 24 saat %10'luk formaldehitte kalan fleplerden patolojik inceleme için 1,5 X 1,5 cm biyopsiler alındı. (Bkz: Şekil 15) Biyopsinin lateral sınırı, flepte varsa pediküle uzak olan nekrozun sınırına yaslandı ve gözle görülen nekrotik doku

içermemesine dikkat edildi. D grubunda hayvanlardan alınan biyopsi dokusu formaldehite konduktan sonra tümüyle kullanıldı.

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 mikroskobunda (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.



Sekil 15 : Doku damarlanmasının histopatolojik değerlendirmesi için flep dokusundan alınan biyopsi. Sağ taraf pediküle uzak olan bölgedir. Biyopsi alınırken distal nekroz alanı sınırından insizyon yapılmıştır.

3.3.4 DOKU KESİTLERİNDE GFP+ HÜCRELERİN İZLENMESİ

Sıçanlara transfer edilen GFP işaretli YDKK'lerin in vivo davranışlarının analizi için 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 ve mezenkimal kök hücre ve mezenkimal seri kaynaklı hücre belirteci olan Vimentin eklenerek, oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3 X 2 dk yıkama işleminden sonra

immunfloresan çalışmalar için uygun floresan (FITC, ve Texas Red) işaretili sekonder antikorla oda sıcaklığında 30dk. inkübe edilerek, son aşama hücre çekirdek boyası (DAPI) içeren kapatma medyumu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Kesitler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı. DAPI, Vimentin ve GFP 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 YDKKH’ler olarak tanındı.

3.3.5 İSTATİSTİKSEL İNCELEMELER

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, medyan) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde ve iki grup değerlendirmelerinde Mann Whitney U test kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4 BULGULAR

4.1 FLEP CANLI ALANI ÖLÇÜMLERİ:

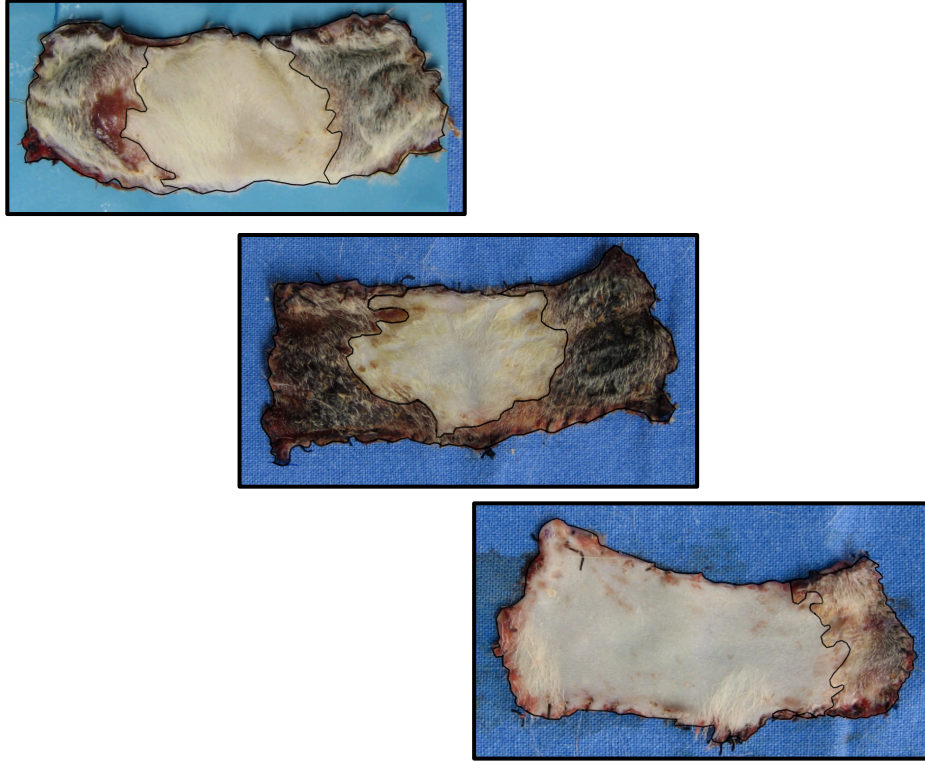
A (kontrol) grubunda (n=6), sıçan DİEAP fleplerinde canlılık oranları % 34,89 ve % 56,94 arasında değişiyordu. (ortalama: % 45,01 ± 8,15; medyan: 44,46).

B (medium) grubunda (n=8), sıçan DİEAP fleplerinde canlılık oranları % 27,33 ve % 87,46 arasında değişiyordu (ortalama: % 51,68 ± 24,62; medyan: 38,30).

C (kök hücre) grubunda (n=8), sıçan DİEAP fleplerinde canlılık oranları % 27,15 ve % 86,87 arasında değişiyordu (ortalama: % 68,20 ± 25,18; medyan: 83,08).

C (kök hücre) grubunun ortalama canlılık oranları (% 68,20), diğer gruplardan fazla olarak izlenmiştir. B (medyum) grubunun da ortalama canlılık değerleri (% 51,68), A (kontrol) grubuna (% 45,01) göre fazla olsa da, bu fazlalık C grubunun fazlalığı kadar değildir. (Bkz.: Tablo 2 ve 3)

A, B ve C grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,141; p>0,05). (Bkz.: Tablo 4)



Şekil 16: SketchUp Yazılımında canlı alan ölçümü örnek çalışma görüntüleri. Üst resim: kontrol grubu, orta resim: medyum grubu, alt resim kök hücre grubu

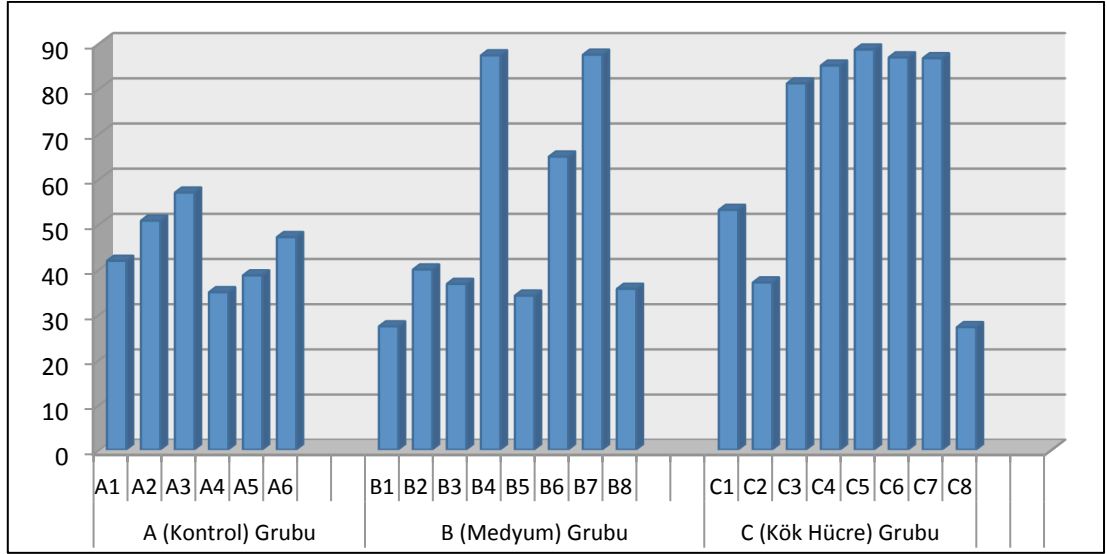
Tablo 2 : A, B ve C gruplarında alınan canlı alan yüzde sonuçları

Gruplarda Canlı Alan Yüzdeleri (%)

A (Kontrol) Grubu		B (Medyum) Grubu		C (Kök Hücre) Grubu	
A1	41.83	B1	27.33	C1	53.11
A2	50.73	B2	39.91	C2	37.04
A3	56.94	B3	36.75	C3	81.1
A4	34.89	B4	87.31	C4	85.06
A5	38.62	B5	34.14	C5	88.6
A6	47.1	B6	64.91	C6	86.87
		B7	87.46	C7	86.68
		B8	35.64	C8	27.15

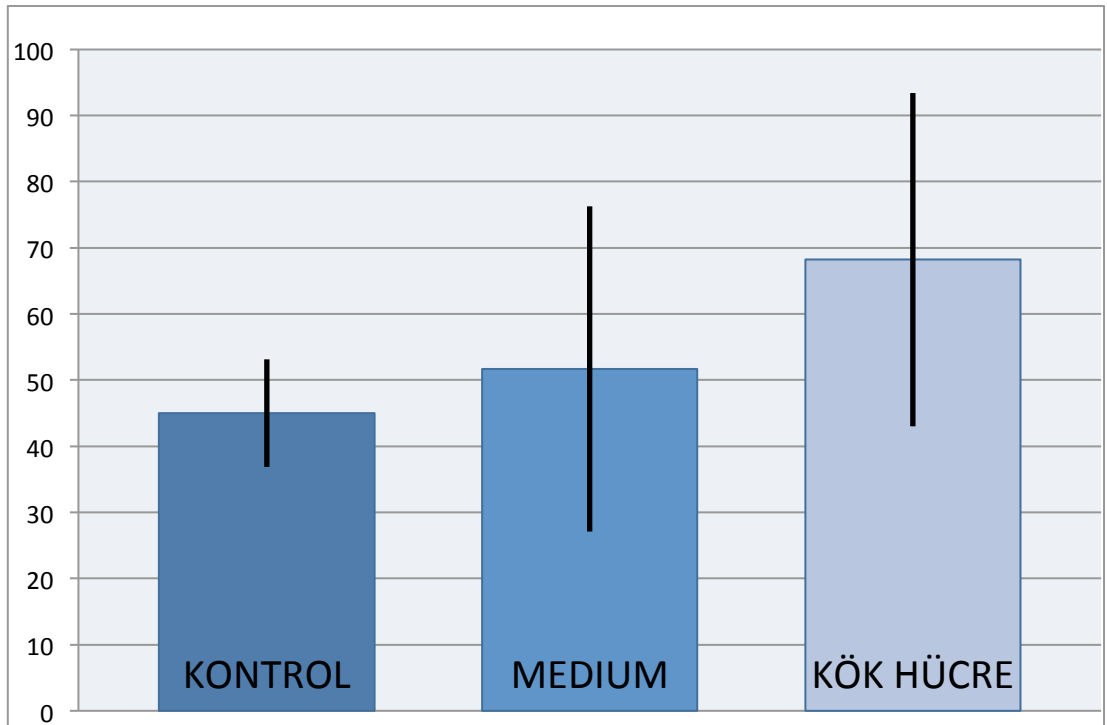
Tablo 3 : Grafikte, gruplarda alınan canlı alan yüzde sonuçları görülmektedir.

Gruplarda Canlı Alan Yüzdeleri



Tablo 4 : Grafikte, grupların ortalama canlı alan yüzdeleri ve standart sapmaları görülmektedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Grupların Ortalama Canlı Alan Yüzdeleri (\pm SD.)



4.2 DOKU DAMARLANMASININ HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRMESİ:

A (kontrol) grubunda (n=6) histolojik preparatlarda 10 alanda sayılan ortalama damar sayısı 43 ve 92,5 arasında değişiyordu (ortalama: $66,08 \pm 20,41$; medyan: 63).

B (medyum) grubunda (n=8) histolojik preparatlarda 10 alanda sayılan ortalama damar sayısı 59 ve 115,5 arasında değişiyordu (ortalama: $82,0 \pm 23,12$; medyan: 71,5).

C (kök hücre) grubunda (n=7) histolojik preparatlarda 10 alanda sayılan ortalama damar sayısı 63 ve 89,5 arasında değişiyordu (ortalama: $77,35 \pm 11,331$; medyan: 73).

D (ameliyatsız cilt) grubunda (n=7) histolojik preparatlarda 10 alanda sayılan toplam damar sayısı 38 ve 46 arasında değişiyordu (ortalama: $41,42 \pm 2,68$; medyan: 41).

A (kontrol), B (medyum), C (kök hücre) ve D (ameliyatsız cilt) grupları arasında, en fazla ortalama damar sayısı B grubunda izlenmiş olup, C grubu az bir farkla B'yi takip etmektedir. A grubunun ortalama damar sayısı B ve C'e göre daha azdır. Dört grup içinde D grubu açık ara ile en az ortalama damar sayısına sahiptir. (Bkz.: Tablo 5 ve 6)

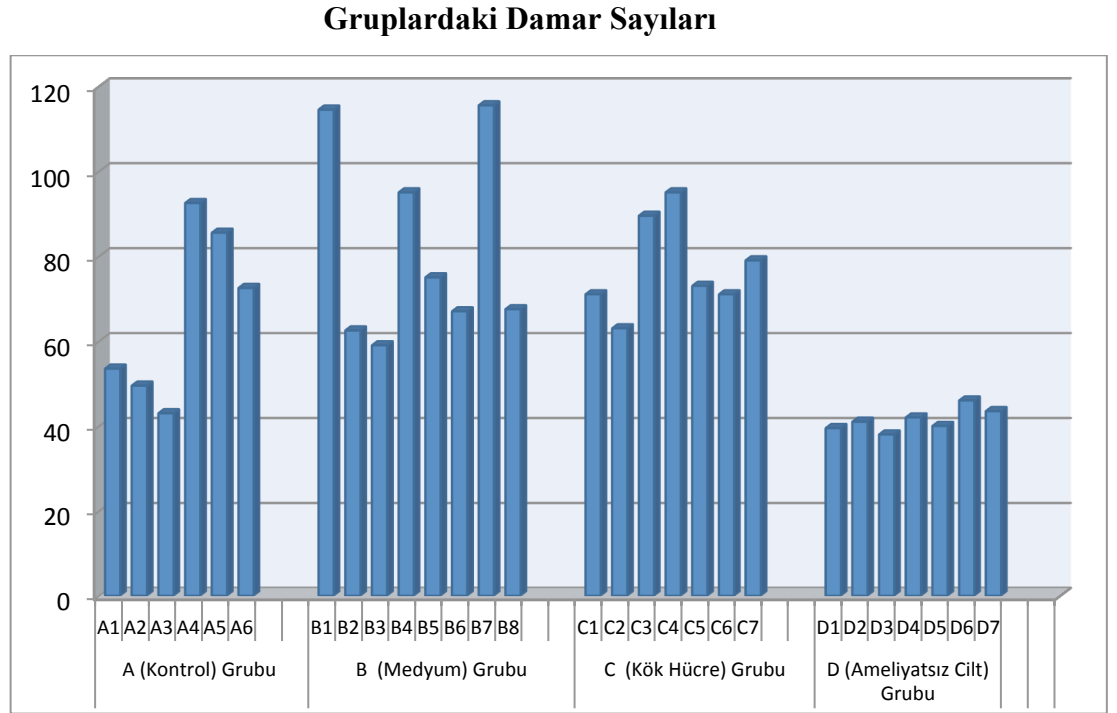
A, B ve C gruplarından alınan kesitlerde damar yoğunluğunun, özellikle epidermis altında artmış olduğu görüldü. (Bkz.: Şekil 17) D grubu kesitlerde, aynı bölgede benzer bir yoğunluğa rastlanmadı. (Bkz.: Şekil 18)

A, B, C ve D grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,01$). A (kontrol), B (medyum) ve C (kök hücre) gruplarının damar sayıları, D (ameliyatsız cilt) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olarak saptanmıştır (B ile D ve C ile D grupları arasındaki ikili karşılaştırmaları sonuçları sırası ile 0,001 ve 0,002). Diğer grupların damar sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). (Bkz.: Tablo 7)

Tablo 5 : A, B, C ve D gruplarında alınan damar sayıları sonuçları.

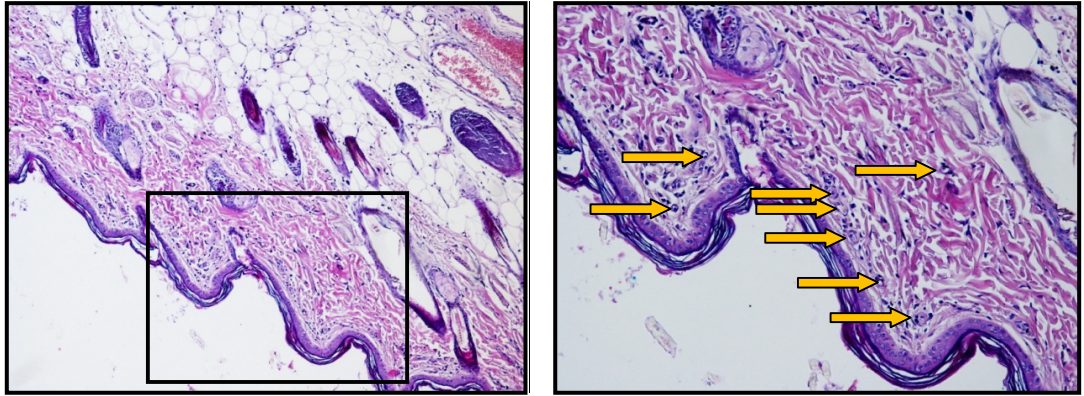
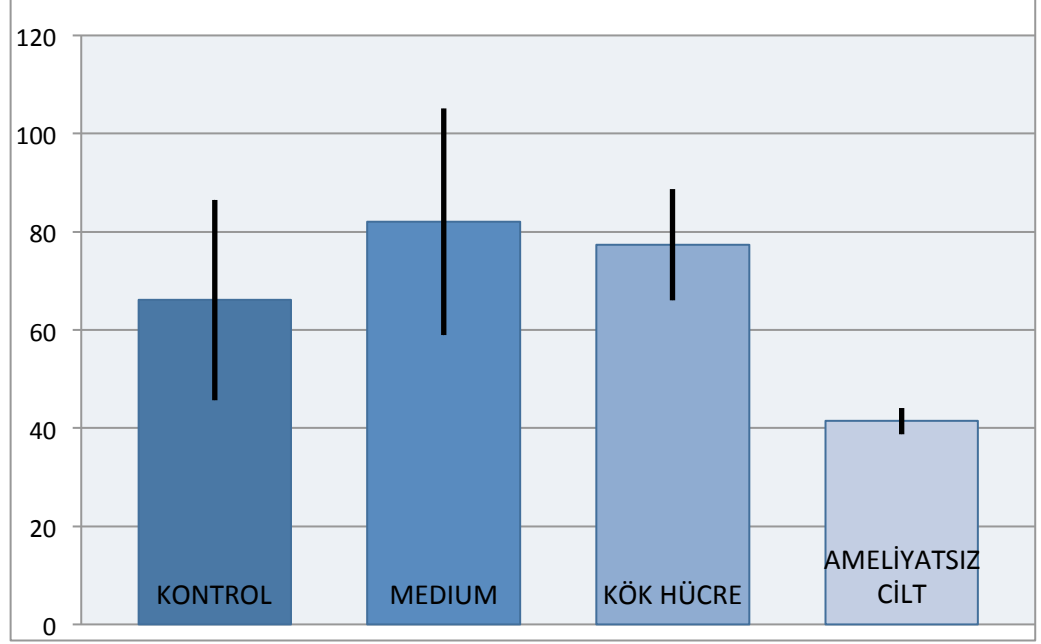
Gruplardaki Damar Sayıları							
A (Kontrol) Grubu		B (Medyum) Grubu		C (Kök Hücre) Grubu		D (Ameliyatsız Cilt) Grubu	
A1	53.5	B1	114.5	C1	71	D1	39.5
A2	49.5	B2	62.5	C2	63	D2	41
A3	43	B3	59	C3	89.5	D3	38
A4	92.5	B4	95	C4	95	D4	42
A5	85.5	B5	75	C5	73	D5	40
A6	72.5	B6	67	C6	71	D6	46
		B7	115.5	C7	79	D7	43.5
		B8	67.5				

Tablo 6 : Grafikte, gruplarda alınan damar sayıları sonuçları görülmektedir.

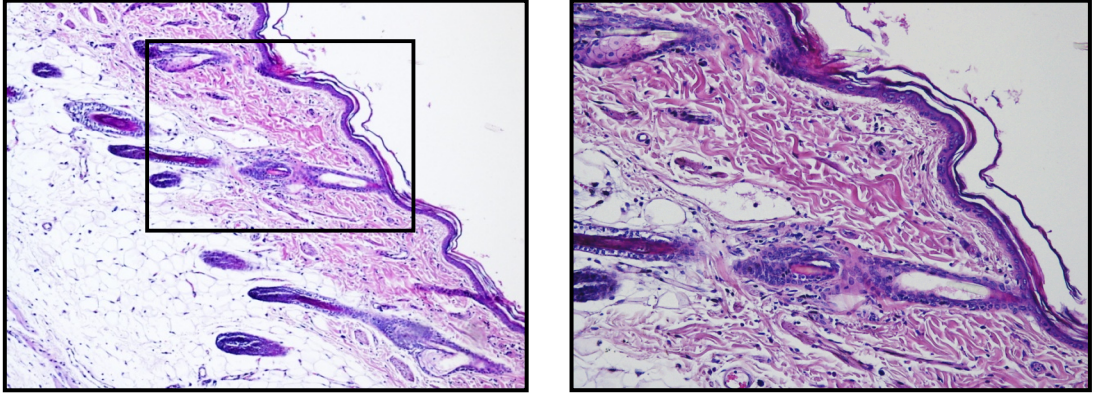


Tablo 7: Grafikte, grupların ortalama damar sayıları görülmektedir. Ameliyatsız cilt grubu ortalama damar sayıları, diğer üç grubun ortalama damar sayılarından istatistiksel anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Ortalama Damar Sayıları (\pm SD.)



Şekil 17: Cilt ciltaltı dokusunda özellikle subepidermal bölgede daha belirgin damarlanma artışı (Resimdeki örnek, kök hücre grubundan alınan kesitlerden biridir.) (H&E x100) (H&E x200)

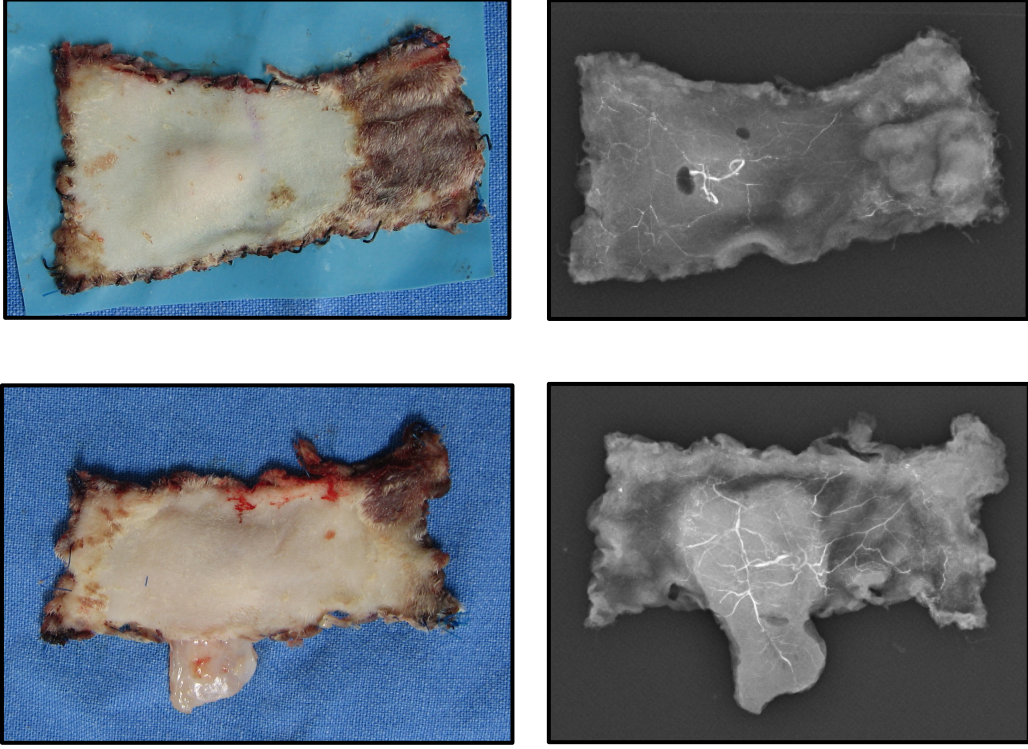


Şekil 18: Doku Damarlanmasının Histopatolojik Değerlendirmesi: resimlerde D (ameliyatsız cilt) grubu sıçanların biyopsisinde doğal yapıda cilt ciltaltı görünüm izlenmektedir. (H&E x100) (H&E x200)

4.3 DİĞER DEĞERLENDİRMELER

4.3.1 ANJİOGRAFİ

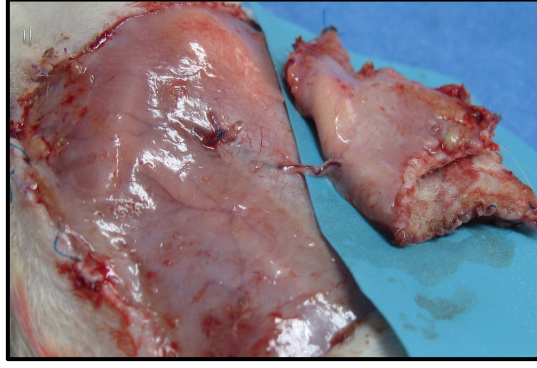
C (kök hücre) grubunda yapılan anjiografide damarlar geniş ve sayıca çok olarak izlendi, görülebilen damarlar, flebin geniş bir bölgesine yayılmış olarak görüldü. B (medyum) grubu anjiografisinde buna benzer bulgular izlenmedi. (Bkz.: Şekil 19)



Şekil 19 : Üst Resimler : Medyum grubu baryum sülfat uygulanmış flebin ve anjiografisinin görünümü. Alt resimler : Kök hücre grubu baryum sülfat uygulanmış flebin ve anjiografisinin görünümü

4.3.2 DİEAP FLEPLERİNİN ELDE EDİLMESİ

7. günün sonunda sıçanların öldürülmesi sonrasında tüm gruplarda flep eksizyonu sırasında, pedikül damarının kalınlaşmış olduğu, kıvrımlı bir hal aldığı gözlemlendi. (Bkz.: Şekil 20 ve 21)



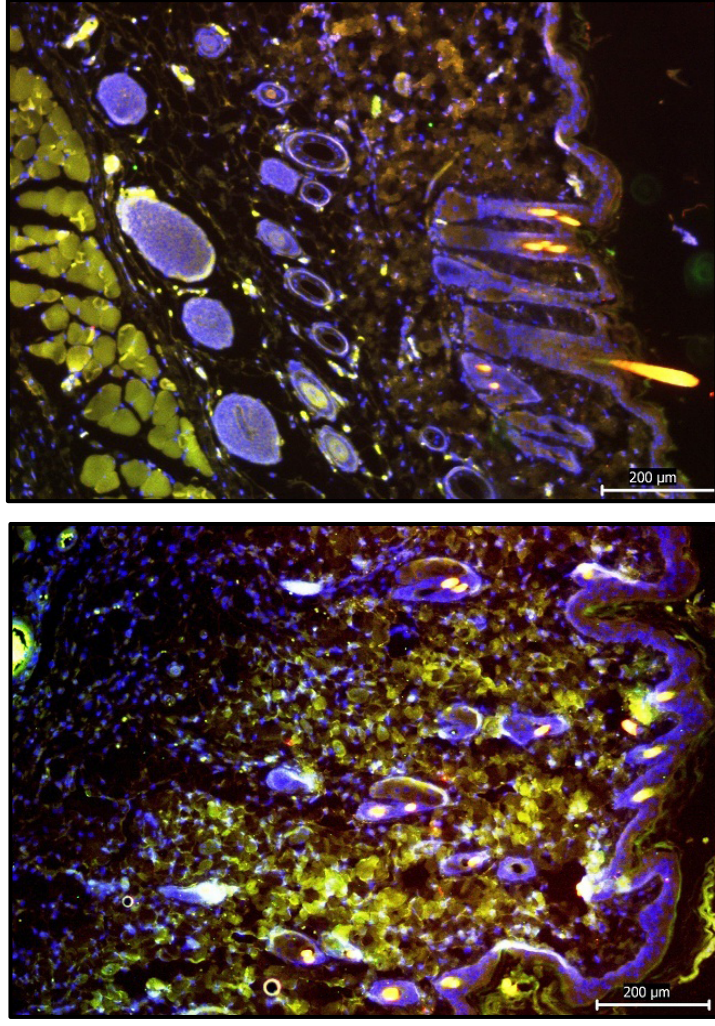
Şekil 20 : 7. Günde flep eksizyonu sırasında perforatör damarın görünümü (Kök hücre grubu)



Şekil 21 : Şekil 15'te görülen flebin damarlanma görüntüsü (flep eksizyonu sırasında damar içinin boşalmasını önlemek amacı ile pedikül ipek sütür ile bağlanmıştır).

4.3.3 DOKU KESİTLERİNDE GFP+ HÜCRELERİN İZLENMESİ

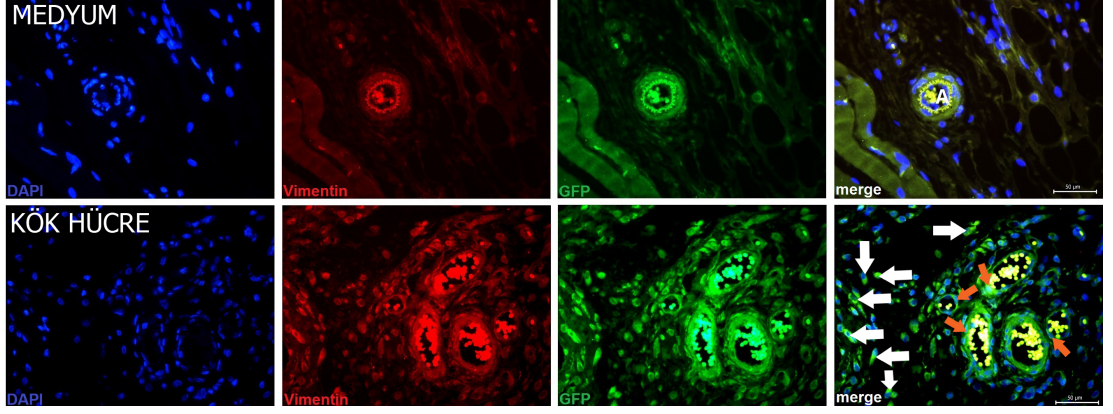
Doku kesitlerinin Vimentin, DAPI ve GFP ile boyanmasından sonra kesitler floresan mikroskopta incelendiğinde A (kontrol) ve B (medyum) grubundan alınmış doku kesitlerinde GFP ile pozitif reaksiyon veren hücelere seyrek rastlandı. Vimentin ve DAPI boyamalarının fotoğrafları ile üst üste bindirildiğinde, bu gruplarda 3 boyaya pozitif reaksiyon veren hücre olmadığı görüldü. (Bkz.: Şekil 22)



Sekil 22 : Vimentin, DAPİ ve GFP boyamalarının bilgisayar ortamında üst üste bindirilmiş görünümleri. Üst resim A (kontrol) grubu ve alt resim C (kök hücre) grubundan alınmış örnekler. Kök hücre grubunda dermis altında yoğun floresans yayan ve üç boyaya da pozitif reaksiyon veren hücreler (YDKKH'ler) görülmektedir.

Kök hücre grubundan alınan doku kesitlerinde dermis altında GFP için floresans veren ve 3 boyaya da pozitif reaksiyon veren hücelere yoğun olarak rastlandı. (Bkz.: Şekil 22) Bu hücreler YDKKH olarak tanındı.

Kesitlerden alınan fotoğrafların ayrıntılı incelenmesinde kök hücre grubunda YDKKH'lerin dokuda serbest şekilde veya damarların çeperinde endotel olarak bulunduğu görüldü. (Bkz.: Şekil 23)



Şekil 23 : B (medyum) grubu (üst 1,2,3,4) ve C (kök hücre) grubu (alt 1,2,3,4) fleplerin histolojik kesitlerinin immun boyama sonrası floresan mikroskopik görüntüleri.

Üst 1’de DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (A filtresi), üst 2’de vimentin ile pozitif reaksiyon veren mezenkimal seri kaynaklı hücreler (TR-filtresi) görülebilir. Üst 3’de (GFP boyama) damariçi eritrositlerin ve lamina elastica interna’nın verdiği otofloresan reaksiyon dışında floresan reaksiyon veren hücre görülmemektedir. A4’de (medyum grubu) bu üç görüntünün üst üste bindirilmiş şekli görülmektedir.

Alt 1’de DAPI ile boyanmış hücre çekirdekleri (A filtresi), alt 2’de vimentin ile pozitif reaksiyon veren mezenkimal seri kaynaklı hücreler (TR-filtresi) görülebilir. Alt 3’de damar içi eritrositlerin otofloresan reaksiyonu dışında GFP+, floresan reaksiyon veren hücreler açıkça görülmektedir. Alt 4’de bu üç görüntünün üst üste bindirilmiş şeklinde üç boyamaya pozitif reaksiyon veren YDKKH’ler oklarla gösterilmektedir. Beyaz oklar: dokudaki serbest YDKKH’ler, turuncu oklar: Damar çeperinde bulunan YDKKH’ler.

5 TARTIŞMA

DİEAP flebi TRAM flebi'nin yarattığı donör saha morbiditelerinden kaçınma arayışları sonunda uygulanmaya başlanmış ve karın duvarı komplikasyonlarında bariz düzelmeler sağlamıştır. Fakat flebi besleyen birçok perforatörden vazgeçilmesi DİEAP kan dolaşımında bazı sorunları ve akabinde gelişen bazı flep komplikasyonlarını da beraberinde getirmektedir.

Serletti ve diğ., yaptıkları bir meta-analiz çalışmasında, 2007 yılına kadar yayınlanmış DİEAP ve serbest TRAM flep serilerindeki komplikasyon oranlarını karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada DİEAP flep için donör saha komplikasyonları serbest TRAM flebinde görülenin yarısı iken, yağ nekrozu, flebin tam veya kısmi nekrozu gibi komplikasyonlar, serbest TRAM flebinde görülenin iki katı kadar izlenmiştir. Donör sahayı korumak için kan dolaşımı güvenilirliğinden kısmen de olsa feragat edilmesi gerekmektedir. (38)

Dolaşım sorunlarından ilk fark edilen ve en bilineni perforatöre en uzak bölgelerde yani 3. ve 4. bölge ile ilgili olanlardır. Aslında alt karın duvarını kullanan tüm fleplerde bu bölgelerde sorunlar belirtilmiştir. Serbest TRAM flebinde az sıklıkta görülebilen bu durum, tek pediküllü TRAM flebinde daha sık olarak görülebilmektedir. DİEAP hastalarını inceledikleri bir serilerinde Blondeel ve Kroll, 4. bölgede % 52 oranında venöz konjesyon izlendiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar hangi cerrahi teknik kullanılırsa kullanılsın 4. bölgede dolaşımın iyi veyahut kötü olabileceğini bildirmiştir. (51)

Öte yandan bazı hasta serilerinde vakaların tümünde 4. bölge dolaşımının yetersiz olduğu gözlenmiştir. (74) Görüldüğü gibi serbest DİEAP flep klinik serileri 4. bölge yaşayabilirliği ile ilgili birbiriyle uyuşmayan sonuçlar vermiştir. (34; 36; 41; 52) DİEAP fleplerinde 4. bölgenin asıl özelliği işte bu güvenilmez ve tahmin edilemez durum olarak tarif edilmektedir. Birçok cerrah DİEAP flebi planlanmasında 4. bölgenin hesaba katılmaması ve rutin olarak eksize edilerek atılmasını önerirler. (34; 51) 4. bölgenin atılması ile yağ nekrozu ve kısmi flep nekrozu sayılarının azaltılabileceği savunulmaktadır. Bu nedenle DİEAP flebinin,

ancak küçük meme veya flebin %70'inden fazlasının gerekmediği rekonstrüksiyonlarda seçilmesi önerilmiştir. Kroll ve diğ. inceledikleri bir seride flebin % 70'inden fazlasının kullanılmış olduğu büyük meme rekonstrüksiyonlarında, kısmi flep kaybı ve yağ nekrozu ile daha sık karşılaşmışlardır. (37) Ali ve diğ. ameliyat sırasında 4. bölgede venöz konjesyon ile karşılaşılırsa bu bölgenin atılmasını önermişlerdir. (75) Öte yandan ameliyat sırasında 4. bölge dolaşımında sorun görülmediği halde Blondeel ve diğ., bu bölgenin kullanıldığı hastalarında kısmi flep nekrozlarına ve yağ nekrozlarına daha sık rastlamıştır. Blondeel bu hasta serisinde 4. bölgede sorunla karşılaşılacak tüm fleplerin, DIEA lateral sıra perforatörlerinden köken aldığını gözlemlemiş ve flebin büyük bölümünün kullanılması gerekiyorsa medial sıra perforatörlerin seçilmesini önermiştir. (34) Ulusal ve diğ., yaptıkları laser doppler akımölçer çalışmalarında , DIEAP flebinin disseksiyonu sonrasında, DIEA pedikülü ayrılmadan önce 4. bölgede alınan ölçüm değerlerinin 1. bölgeden az olduğunu görmüşlerdir. (76)

Serisini yağ nekrozu açısından inceleyen Bozиков ve diğ., 4. bölge flebe dahil edildiğinde yağ nekrozu ile flep hacmi arasında anlamlı bir ilişki çıktığını bulmuşlardır. (77) Daha yeni serilerde ise bazı araştırmacılar, 3. bölgede dahi yağ nekrozu ve kısmi flep nekrozu gibi komplikasyonlar gördüklerinden, medial sıra perforatörlerin bile değil 4. bölgeyi, 3. bölgenin tamamını beslemekte yetersiz kalabileceğini savunmaktadır. (78)

DIEAP flebinin 4. bölgesindeki bu duruma rağmen, hastanın sağlam memesinin büyük ve pendüloz olduğu durumlarda, 4. bölgenin flebe dahil edilmesi gerektiğini belirten Wei ve diğ., inceledikleri hasta serilerinde, hastalarının yarısından fazlasında flebin en az %90'ını kullanmalarına rağmen yağ nekrozu ve kısmi flep nekrozu açısından literatüre göre fazla sonuçlar almamıştır. Hastaların görece zayıf uzakdoğu ırkından olmasının bu sonuçlara etkisi olabileceği görüşünü benimseyen araştırmacılar yağ dokusunun fazla olduğu hastalarda “choke” arterlerin etkilenebileceğini ve damar içi basıncın artabileceğini öne sürmüşlerdir. (36) Birçok araştırmacı daha sıklıkla 4. bölgede rastlanan venöz konjesyon probleminin, bazı vakalarda tüm flepte de rastlanabileceğine dikkati çekmiştir. (51; 75; 79; 80; 81)

DİEAP flepte rastlanan venöz konjesyon, ven anastomozunda oluşan tromboza bağlı gelişebileceği gibi sıklıkla DİEAP flebinin venöz anatomisinin özelliklerine bağlı olarak da gelişir. (79)

Flep kaldırılması esnasında yüzeysel venöz sistem kesintiye uğrar ve derin sistemle bağlantı kuran perforan venlerin de bir kısmı kesintiye uğrar ve geriye kalan bağlantıların yetersiz kalması durumunda flepte venöz konjesyon gelişir. (41; 51)

Blondeel ve diğ., yaptıkları anatomik çalışmalarında vakaların %36'sında venöz dolaşımın orta hattı hiç geçmediğini, vakaların sadece %18'inde orta hattı geçen venlerin direkt bağlantı sağlayabilecek güçte belli bir kalınlıkta olduğunu izlemişlerdir. Bu durumun ayrıca 4. bölgede alınan değişik sonuçları da açıklayabildiği düşünülmüştür. (51)

Öte yandan Shaverien ve diğ. vakaların % 32'sinde derin ve yüzeysel sistem arasında direkt ilişki bulamamışlardır. Ayrıca tek tek perforatör arterlerin eşlik eden venleri incelendiğinde, medial sıra venlerin sadece % 76'sının ve lateral sıra venlerin sadece % 56'sının yüzeysel ven sistemi ile direkt ilişki gösterdiği izlenmiştir. (80)

Bazı araştırmacılar 1,5 mm üzerinde kalınlığa sahip SİEV'leri baskın ven olarak kabul eder ve ameliyat sırasında disseke ederek korurlar. (51) Venöz konjesyon sorununu çözmek için literatürde birçok yazar SİEV'in ameliyat sırasında "can yeleği" olarak disseke edilmesini, korunmasını ve gerekli görülmesi halinde çeşitli tekniklere ek olarak venöz dönüşün güçlendirilmesinde kullanılmasını önermektedirler. (51; 79; 81; 82)

DİEAP flep hakkında tartışılan komplikasyonlardan bir diğeri de daha sıklıkla 4. bölgede, ama diğer bölgelerde de karşılaşılan yağ nekrozudur. Rekonstrükte memede yağ nekrozu gelişmesi, rekonstrüksiyonu bozar, yara iyileşme sorunlarına neden olur, flebin infekte olma ihtimalini artırır ve kanser nüksünü taklit ederek invazif tanı uygulamalarına yol açabilir. (35) Blondeel serilerinden birinde yağ nekrozunun her zaman perforatör artere en uzak bölgede görüldüğünü kaydetmiş ve yağ nekrozu oranını %6 olarak belirtmiştir. (34)

DİEAP flepte karşılaşılabilecek komplikasyonları artıran ve cerrahların flep kan dolaşımında ek güvenilirliğe ihtiyaç duydukları bazı risk faktörleri de vardır. Bunlardan ilk başlıcaları hastada sigara içiciliği, obezite, ileri yaş, preoperatif veya

postoperatif radyoterapi hikayesi ve diabetes mellitus, hipertansiyon, ateroskleroz ile otoimmün hastalık gibi kan dolaşımı mekanizmasını olumsuz etkileyebilecek sistemik hastalıklardır.

Örneğin 758 hastada DİEAP flep ile meme rekonstrüksiyonu sonuçlarını inceleyen Gill ve diğ., sigara içiciliğinin, postoperatif radyoterapinin, hipertansiyonun ve diabetes mellitusun flep komplikasyonlarını artırdığını görmüşlerdir. Bunlardan sigara içiciliğinin özellikle flepte yağ nekrozu oranlarını etkilediği izlenirken, obez hastalarda komplikasyonların artmadığı kaydedilmiştir. (52) Benzer şekilde obezitenin risk faktörü olarak tanımlanamadığı serilerden birinde 4. bölge flepten rutin olarak çıkarılmış, ek olarak 3. veya 2. bölgelerde dolaşım bozukluğu olduğu düşünüldüğünde bu bölgeler de çıkarılmıştır. (83) Diğer taraftan hasta serilerinin sonuçlarında obeziteyi DİEAP flebi komplikasyonlarını artıran bir risk faktörü olarak izleyen birçok yazar da vardır. (75; 77; 84; 85)

Serisinde hastalarını yağ nekrozu açısından inceleyen Bauman, 4. bölgeyi rutin olarak flepten çıkarmıştır. Bauman, 3. bölgenin flebe dahil edilmesinin ve sigara içen hastalarında 3. bölgeyi de çıkarmasına rağmen sigara içiciliğinin, yağ nekrozu için risk faktörü olduğunu kaydetmiştir. (35)

Ek olarak sigara içiciliğinin mastektomi bölgesindeki meme cildi fleplerinde nekroza yol açtığı bilinmektedir. Bu durum aslında mastektomi bölgesinde rekonstrüksiyon için gerekli dokunun daha fazla olmasına yol açacaktır. (85)

Postoperatif radyoterapi alan DİEAP flep hastalarını inceleyen Rogers, yağ nekrozu oranlarını artmış olarak bulmuştur. (86)

Birçok rekonstrüktif cerrah günümüzde flep komplikasyonlarından kaçınmak için preoperatif damar görüntülemelerini rutin olarak tüm hastalarında uygulamaktadır. Bu görüntüleme yöntemleri ile DİEA perforatör arterlerinin sayısı, genişliği, yerleşimi, dallanma şekli ve kas içi seyrinin özellikleri hakkında bilgi sahibi olunur. Ek olarak venöz sistem incelenebilir ve perforatörlere eşlik eden venlerin çapı, yüzeysel venöz sistem ile bağlantısı hakkında bilgi edinilebilir. Birçok çalışmacı bu bilgiler için BTA'den yararlanmaktadırlar. (32; 87) Başka yazarlar ise kontrastlı manyetik rezonans anjiyografiyi (MRA) tercih etmektedirler. (80)

Perforatör damarların geniş çaplı olanlarının kullanıldığı veya flep kan dolaşımını artırmak için birden fazla perforatör kullanıldığı durumlarda beklenenin tersine komplikasyonların artabildiği bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. (52; 88)

Anlaşıldığı üzere DİEAP cerrahisinde tüm gelişmelere rağmen iskemi ve sonuçları ile ilgili problemlerle karşılaşılmaya devam edilmektedir. İskemi, DİEAP flebi içinde bir perforazomun alanının yeterince geniş olmaması, kötü cerrahi teknik, sigara içiciliği, diabet ve periferik damar hastalığı gibi durumlardan kaynaklanabilir.

DİEAP flep kan dolaşımını üzerinde yapılan en yeni araştırmalar, anjiozom tanımının yanına perforazom tanımını eklemiştir. Perforatörlerin kendi aralarında kas içi seyir özelliği, çap, yerleşim ve dallanma yapısı açılarından çok farklı olabildikleri artık bilinmektedir. (54; 87) Medial ve lateral sıra perforatörlerin perforazomlarının bariz farklı olduğu gösterilmiştir. (54)

DİEAP flebinin pedikülünü oluşturan perforatör arterin çapından ve flebe gelen kan akımının miktarından ziyade, kanı taşıyan bir ya da daha fazla perforatör arterin perforatör anjiozom, yani perforazom, alanının genişliğinin, flep yaşayabilirliği açısından daha önemli olduğu düşünülmektedir. (35; 88)

Flebe gelen akım miktarından ziyade besleyici damarın dallanma yapısının sorumlu tutulduğu DİEAP flebine özgü sorunlar, terapötik vaskülogenezden özellikle yarar sağlayabilir gibi görünmektedir. Dokuda yeni damar gelişimini artırmak, bir DİEAP perforazomunun beslediği alanın genişlemesini sağlayabilir.

Bu çalışmada yağ doku kaynaklı kök hücrelerin sıçan DİEAP flep modelinde flep yaşayabilirliğine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Farklı kök hücrelerin flep yaşayabilirliği ve neovaskülarizasyon üzerine etkilerini deneyen araştırmalarda sıklıkla rastgele beslenen flep, iskemi reperfüzyon, prefabrike flep ve hatta serbest flep modelleri kullanıldığı görülmektedir. Bu konuda perforatör fleplerle yapılan bir çalışma yoktur. Perforatör fleplerin farklı fizyolojiye sahip oldukları düşünüldüğünde bu konuda çalışmanın sağlayacağı bilgilerin önemi anlaşılabilir.

Çalışmada kullanılan sıçan DİEAP flep modeli daha önce Okşar ve diğ. tarafından tarif edilmiş olan perforatör flep modelinin bir modifikasyonudur. (89; 90) Sıçanda derin superior ve inferior epigastrik arterler her iki ucundan RA kası içine

girerler ve her bir lateralde ortalama 2 ile 7 arası perforatör dal verirler. Bu perforatör dallar rektus kas fasyasını delerek yüzeyelleşir ve pannikulus karnozus kasına girerler. Bu seviyede kontralateral RA perforatörleri, superiorda torasikus longus arteri ile, inferiorda ve lateralde superfisyel epigastrik arterlerin dalları ile çok sayıda ciltaltı anastomoz yaparlar. (91)

Okşar ve diğ.'in tarif ettiği modelde sıçan karın cilt ciltaltı dokusunun tek bir RA kası perforatörü üzerinden neredeyse tümüyle beslenebileceği gösterilmiş ve çalışmada flep canlı alanı ortalama % 77 olarak ölçülmüştür. Çalışmamızda RA kası içinden çıkan perforatörün seçimi sonrasında, DSEA bağlanarak perforatör flebin DİEA'den beslenmesi sağlanmıştır. Bununla amaçlanan, perforatör flep modelinin iskemik sıkıntısını artırmaktır. Sonuç olarak kontrol grubu sıçanlarda flep canlı alanı ortalama % 45 olarak bulunmuştur. DSEA'nın bağlanması, karın flebinin kan dolaşımını ciddi şekilde azaltmıştır. Çalışmamızda flep nekrozunun geliştiği alanlar incelendiğinde tüm gruplarda nekrozun tek taraflı kontralateral veya çift taraflı olarak flebin hem kontralateral hem de ipsilateral tarafında gelişebildiği görülmüştür. Bu açıdan sonuçlarımız literatür ile uyumludur. (89; 90; 91; 92) Nekrozun çift taraflı geliştiği olgularda kontralateral hemiflepte nekroz alanının hemen her zaman gözle görülür biçimde daha geniş olduğu izlenmiştir. Çalışmada bu açıdan niceliksel değerlendirme yapılmamıştır.

Literatürdeki çalışmalarda sıçanlarda karın fleplerine karşı öz veya çapraz yamyamlığın bahsi geçmiştir. (91; 92; 93) Yaptığımız çalışmada, literatürde de tanımlanmış olan, (73) koruyucu yelek, modifiye edilerek kullanılmıştır. Çapraz yamyamlığı önlemek için hayvanlar kafeslere teker teker konmuştur.

Yetişkin vaskülogenezin keşfedilmesi ile tarif edilen endotelial öncü hücreler (EÖH) ile yapılan deneysel araştırmalarda bu hücrelerin kemik iliğinden çıkarak, vücuttaki iskemik alanlarda toplandığı gösterilmiştir. Bu hücreler iskemik dokuda vaskülogeneze katılarak kollateral damar gelişimini sağlarlar. (64; 94)

Park ve diğ.'nin, çalışmasında EÖH'ler sıçanda rastgele beslenen flep kaldırılması ile aynı anda sistemik olarak uygulanmıştır. 7. günde flep canlı alanlarında fark görülemezken, doku damar sayılarında ancak 14. günden itibaren EÖH grubunda artış gözlenmiştir. (95) Çalışmamızda YDKKH'ler flep bölgesine lokal enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Öncelikle hedef dokuda kök hücre

yoğunluğunun en üst düzeyde olması amaçlanmıştır. Ayrıca bu yöntemle hücreler verildikleri dokuda kümeler oluşturacağından canlı kalma ihtimali artırılmaktadır. Lokal uygulamanın diğer bir sebebi de, sistemik uygulamada tetiklenebilecek kanser, romatoid artrit ve diabetik retinopati gibi anjiojenik hastalıklardan kaçınılmak istenmesidir. (65) Ek olarak sıçan gibi deney hayvanlarında sistemik enjeksiyon belli teknik zorlukları beraberinde getirmektedir, buna karşın flebe uygulanan lokal enjeksiyon çok daha kolay ve pratik bir işlemdir. Bu bakımdan uygulamamız diğer kök hücre ile terapötik vaskülogenez çalışmalarının büyük çoğunluğu ile uyumludur. (65; 66; 67; 68; 69; 70; 96; 97; 98)

Bazı araştırmacıların kemik iliği kaynaklı kök hücreleri, flep pedikülüne intravasküler uyguladıkları görülmektedir. (99) Fakat bu çalışmada flep, ilk seansta iki adet yedek pedikülü ile kaldırılmış, aradan 5 gün geçtikten sonra yedek pediküller kesilmiştir. Kök hücre uygulanan grupta damar sayısı ve flep canlılığı kontrol grubuna göre artmış olmasına rağmen, sadece büyüme faktörü uygulanan gruba göre bir fark kaydedilememiştir. Flebin kaldırılış tekniği cerrahi geciktirme işlemini hatırlatmaktadır. Bu tarz bir intravasküler uygulama, flep modelimizdeki tek besleyici olan perforatör arterin yaralanma riski nedeni ile uygun bulunmamıştır.

Çalışmamızda sıçan flepleri üzerinde lokal uygulama için, dokuda iskemik sıkıntının en fazla olmasının beklendiği flep 4. bölgesi tercih edilmiştir. Enjeksiyonun bu bölgeye yapılması ile YDKKH'leri iskemik sıkıntının en fazla olduğu ve vaskülogenezin en yoğun olarak gerektiği bölgeye direkt olarak yerleştirmek amaçlanmıştır. EÖH kullanan çalışmalarda bu hücrelerin sadece iskemik dokularda gösterilebildiği, hatta bu iskemik bölgelerde damar yapısına katılmışken iskemik olmayan bölgelerde doku içinde serbest olarak görüldüğü kaydedilmiştir. (95; 98) Prefabrike flep modeli kullanan başka çalışmalarda da kök hücrelerin en çok vaskülogenez beklenen alan olan taşınan besleyici damarın bittiği bölgeye verildiği görülmüştür. (66; 98) Uysal ve diğ., rastgele beslenen fleplerde YDKKH'leri flep orta kısmına verdikleri grupta damar sayısı ve flep canlı alanı sonuçlarının, hücreleri pedikül kısmına uyguladıkları gruba göre daha fazla olduğunu izlemiştir. Rastgele beslenen fleplerde flebin distaline doğru gittikçe doku iskemisi artmaktadır. (65) Tüm bu araştırmaların sonuçları çalışmamızda kök

hücrelerin iskemik bölgeye direkt uygulanmalarının daha hedefe yönelik bir tedavi sağlayacağını düşündürmüştür.

Çalışmamızda 7. gün değerlendirmelerinin sonucunda, kök hücre grubunda doku damar sayısında kontrol grubuna göre artış yakalanamamıştır. Flep kaldırılan tüm gruplarda doku damar sayısında ameliyatsız cilt grubuna göre anlamlı bir fazlalık vardır. Bu bulgu perforatör fleplerde neovakülarizasyonun, dokularda oluşan yeni fizyolojiye rutin yanıt olduğunu göstermektedir. Flep canlı alanında artış görülse de, fark, istatistiksel açıdan anlamlı bulunamamıştır.

Benzer şekilde Park ve diğ., 7. günde flep canlı alanları açısından gruplar arasında fark görememiş ve doku damar sayısında artışı ancak 14. günden sonra izlemişlerdir. Araştırmacılar, flep dokusunda oluşan tam iskemi ve bunu izleyen doku hasarının, sistemik verilen EÖH'lerin bölgeye giderek farklılaşabilmeleri için geçen süreden daha hızlı gerçekleştiğini savunmuşlardır. (95)

Siman ve diğ. çalışmalarında kemik iliği kaynaklı kök hücreleri lokal olarak flebin kaldırılması aşamasın uyguladıklarında flep canlı alanı ve damar sayısında bir artış görememişlerdir. Araştırmacılar deneyin ikinci fazında kök hücre uygulamasını flep cerrahisinden 1 hafta önce yapmıştır. Kaldırılan flepler, 7. ve 14. günlerde incelenmiştir. Kök hücre gruplarında flep canlı alanında iyileşme görülemezken, doku damar sayımında artış izlenmiştir. Fakat ikinci faz sonuçları birinci faz sonuçları ile karşılaştırıldıklarında, 7. gün için canlı alanlar ikinci fazda daha fazla iken, 14. gün için canlı alanlarda arasında fark bulunamamıştır. Siman ve diğ., ilk fazdan aldıkları sonuçlarla ilgili olarak Park ve diğ. gibi deney modellerinde doku hasarının kök hücre-doku etkileşiminden hızlı meydana geldiğini düşünmüşlerdir. (70) Çalışmamızda uyguladığımız kök hücrelerin direkt olarak sorunlu bölgeye uygulanması ile hücreler için zaman kazanmaya çalışıldı. Aldığımız sonuçlar, kazanılan bu zamanın muhtemelen yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Araştırmacılarda bazıları klasik rastgele beslenen deney modellerinde kök hücreleri bölgeye flep kaldırılmadan önce uygulamış, bir bekleme süresi sonunda flebi kaldırmış ve sonuçta damar sayısı ve flep canlılığında artış bulmuştur. (96)

Kimi çalışmacılar kök hücre uyguladıkları ortamda sadece kısmi iskemik bir alan sağlama amaçlarını belirtmişlerdir. Erken dönemde tam iskemi yaratılmasından, klinik olarak geri dönüşümsüz doku hasarının hızla gelişmesini engellemek amacıyla

kaçınıldığını vurgulamışlardır. Erken dönemde yaratılan, flep periferinin beslenebildiği, kısmen iskemik ortamın kök hücre etkisini göstermesi için uygun olduğu fikrini savunmuşlardır. Bu tarzı benimseyen araştırmacıların deney modellerinde kullanılan fleplerin prefabrike flepler ve iskeminin kademeli uygulandığı flepler olduğu görülmektedir. Prefabrike flep modellerinde araştırmacılar kök hücreleri ilk aşama olan pedikül taşınması sırasında uyguladıkları ve sonrasında flebi kaldırmadan önce 4 hafta kadar beklediklerini belirtmişlerdir. (66) Uysal ve diğ. ek bir iskemi yaratma işlemini, 1 haftalık prefabrikasyon süresi sonuna, flebi kaldırma sırasına ertelemeyi tercih etmişlerdir. (69) Zhang ve diğ. çalışmalarında kök hücre uyguladıklarında fleplerini 3 pediküllü kaldırmışlar ve 5 gün sonra iki pedikülü kesmişlerdir. (99)

Çalışmamızda kök hücrelerin verilmesi ile aynı anda flepte şiddetli iskemi yaratılmış olmasının dokuda hasar gelişme süresini daha da kısaltmış olabileceği ve kök hücre-doku arası tam bir etkileşime imkan kalmamış olabileceği sanılmaktadır.

Öte yandan klasik rastgele beslenen flep modellerine flep kaldırılması ile aynı anda kök hücre uygulayan ve flep canlılığında artış sağlayan deneyler de bulunmaktadır. (65; 68; 97) Bunlardan bir tanesinde verilen kök hücre miktarının çok fazla olduğu görülmektedir. (68) Çalışmamızda flep dokusuna enjekte edilen kök hücre sayısı (0,5 ml içinde 3×10^6 hücre) birçok çalışma ile benzeşmektedir. (65; 97)

Çalışmamızda aldığımız doku biyopsilerinde uygulanan GFP işaretli YDKKH'lerin damar yapısına endotel olarak katıldığı gösterilmiştir. Bu hücrelerin dokuda gösterilmesi, uygulama sırasında hücrelerde herhangi bir canlılık kaybı olmadığını göstermesinin yanı sıra, YDKKH'lerin endotel hücrelerine farklılaşarak vaskülogeneze direkt etkisini kanıtlamaktadır. Birçok çalışmada benzer şekilde kök hücrelerin dokuda damar yapısına katıldığı gösterilmişken, (65; 68; 69; 70; 95; 97; 98; 99) bazı araştırmacılar, damar yapısına katılmış kök hücre gösterememiştir. (67; 96)

Çalışmamızda yağ doku kaynaklı kök hücreler seçilmiştir. Bu hücreler geleneksel olarak kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere göre elde etme koşulları açısından daha avantajlıdır. Yanı sıra bu hücrelerin elde edilmesi yağ emme gibi plastik cerrahi alanında kullanılan bir yöntemle olmaktadır. YDKKH'lerin en az

kemik iliği kaynaklı kök hücreler kadar değişik hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir.

Hücrel vaskülogenez terapilerinin denendiği bazı çalışmalarda kullanılan EÖH'lerin identifikasyonu ve kökeni ile ilgili bilgiler kesin değildir. Ayrıca bu hücrelerin tekrarlanan pasajlarla kök hücre özelliklerini yitirdiklerini ve endotel hücrelerine farklılaştıkları görülmüştür. (67) Ek olarak EÖH'lerin periferik kandan veya kemik iliğinden elde edilebilme sayıları çok azdır. Bu durumu aşmak için kordon kanı kullanılması veya kemik iliğinde bulunan hücrelerin bol miktarda kana çıkmasını sağlamak için çeşitli büyüme faktörleri tedavisi gerekmektedir. (96)

Çalışmamızda kullandığımız kök hücreler mezenkimal kök hücre özelliğindedir. Bu hücreler çok sayıda pasaj sonrasında bile kök hücre değerlerini korur. Ayrıca endotel öncü hücreleri sadece endotel hücrelerine farklılaşabilirken mezenkimal kök hücrelerin farklılaşabildikleri hücreler arasında damar olgunlaşmasında önemli bir rol oynayan düz kas hücresi de vardır. (67)

Bazı kök hücre ve flep yaşayabilirliği çalışmalarında doku veya kanda VEGF düzeyleri ölçülmüştür. VEGF vücutta anjiogenez ve embryonal vaskülogenez yaratan başlıca sitokindir. İskemik fleplerde revaskülarizasyonu artıran kuvvetli bir anjiogenez tetikleyicidir. Deneyler VEGF'in flep yaşayabilirliğini artırdığını ve dokuda iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etki yaptığını göstermiştir. Literatürde VEGF daha önce çeşitli sitokinlerle karşılaştırılarak denenmiş ve en güçlü anjiogenik sitokin olduğu izlenmiştir. (68)

Karmaşık neovaskülarizasyon basamaklarında VEGF'in başlıca düzenleyici olduğu ve endotelial hücrelerin pozitif geribildirimden sorumlu olduğu düşünülmektedir. YDKKH'lerin in vitro ortamda VEGF salgıladıkları bilinmektedir. (66) Ayrıca YDKKH'lerin uygulandıkları deney hayvanında dokuda ve kanda VEGF artışı sağladıkları görülmüştür. (66; 68; 69) YDKKH uygulamaları ve yüksek VEGF düzeyleri arasında bir ilişki olduğunu ama artan VEGF'in kaynak hücresi kesin bilinemediğinden, bu ilişkinin özelliklerinin henüz açığa çıkarılmadığı tahmin edilmektedir. (69)

Ek olarak Uysal ve diğ. YDKKH'lerin, dokuda TGF (Transforming Growth Factor; dönüştürücü büyüme faktörü) ile FGF (Fibroblast Growth Factor; fibroblast büyüme faktörü) düzeylerini artırdığını gözlemlemişlerdir. (68) YDKKH'lerin

başlıca indirekt yani parakrin mekanizma üzerinden etkinlik gösterdiğini savunulmaktadır. (66; 69)

YDKKH'lerin potansiyelini kanıtlayan hem KİKKH'lerin hem de YDKKH'lerin kullanıldığı başka bir çalışmada, doku damar sayısının, YDKKH grubunda, KİKKH grubuna göre anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür. (69)

Tüm bu bilgiler ışığında vaskülogenez amaçlı hücre terapisi için en uygun seçeneğin YDKKH olduğu açıkça ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda flep canlı alan yüzdelerinde kök hücre grubunda ortalama değerlerin kontrol ve medyum grubuna göre belirgin fazla ölçülmesine rağmen bu farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunmayışı gruplardaki hayvan sayılarının azlığından kaynaklanıyor olabilir. Aynı sonuçların alındığı varsayılarak daha fazla sonuç ile istatistiksel çalışmalar tekrarlandığında, farkın anlamlı çıkması bu düşünceyi desteklemektedir. Bu çalışmanın ileri aşamasında deneyin daha fazla sayıda sıçanla tekrarlanması planlanmaktadır.

6 SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Literatürde YDKKH'lerin dokuda neovaskülarizasyon sağlayarak flep yaşayabilirliğini artıran çalışmalar mevcut olmasına rağmen, benzer her çalışma bu artışı gösterememiştir. Çalışmamızda flep canlı alanlarında istatistiksel anlamlı artış izlenmemiştir. Çalışmamızda kullanılan deney hayvanı sayılarının düşük olması anlamlı artışı göstermek için yetersiz kalmış olabilir. Yanısıra alınan sonuçlar literatür bilgisi ışığında değerlendirildiğinde, YDKKH temelli vaskülogenez-anjiogenez tedavisinin başarılı olması için, uygulama zamanlaması, yeri ve hücre miktarı gibi değişkenlerin ileri çalışmalarla optimize edilmesi gerekmektedir.

7 ÖZET

GİRİŞ

DİEAP flebi, günümüzde meme rekonstrüksiyonu için ilk seçenektir. Fakat bu flebin özellikle 4. bölgesinde kan dolaşımı sorunları bazı durumlarda rekonstrüksiyonu sınırlamaktadır.

Dokuda kök hücre temelli neovaskülarizasyon ve yenilenmeyi artırıcı terapilerin başarısı keşfedilmiştir. YDKKH'ler elde edilmiş biçimleri ve çoklu dokulara farklılaşma özellikleri nedeni ile gündemdeki en potansiyel kök hücrelerden biridir.

Bu çalışmada YDKKH'lerin sıçan DİEAP flep modelinde 4. bölge yaşayabilirliği ve perforazom alanının genişletilmesi üzerine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

YDKKH'ler KOÜ-KÖGEM'de, sıçan kasık yağ dokusu kullanılarak elde edildi. YDKKH'ler verildikleri dokuda izlenebilmeleri için GFP ile işaretlendi.

30 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı. A,B ve C gruplarında DİEAP flebi, tek perforatör arter temelli olarak kaldırıldı. Bundan sonra A grubunda herhangi işlem yapmadan flep yerine iade edilirken, B ve C grubunda önce flep 4. bölgesine subkutan yüzeyine sırası ile hücre medyumunu ve YDKKH uygulandı. 7 gün fleplerde, canlı alan oranı hesaplamaları, doku damar sayısı histolojik incelemeleri ve YDKKH aranması için immunfloresans çalışmaları yapıldı. D grubu sıçanların karın cildinden doku damar sayısı incelemeleri için biyopsi alındı.

BULGULAR

A,B ve C gruplarında sırası ile flep canlı alanların tüm flep alanına oranları ortalamaları % 45,01; % 51,68; % 68,20dir. İstatistiksel olarak bu değerler arasında fark bulunamamıştır.

A, B, C ve D gruplarında doku damar sayımı ortalamaları sırasıyla : 66,08; 82,0; 77,35 ve 41,42dir. İstatistiksel olarak A,B ve C gruplarının değerleri,D grubundan anlamlı derecede fazla bulunmuştur.

C grubu fleplerin histolojik kesitlerinde GFP işaretli YDKKH'lerin damar çeperine yapıtaş olarak katıldıkları görülmüştür.

SONUÇ

DİEAP flebinin özellikle 4. bölgesinde rastlanan dolaşım eksikliği, ve buna bağlı komplikasyonlar, cerrahi teknikteki ustalaşmaya rağmen halen karşılaşılan sorunlardır. DİEAP flebi üzerinde yapılan kan dolaşımı çalışmaları, flep içinde damar anatomisi hakkında bilgiler edinilmesini sağlamıştır.

Kök hücre temelli vaskülogenez çalışmalarında YDKKH'lerin diğer kök hücrelere karşı avantajları çoktur.

Çalışmamızda YDKKH'ler bir perforatör flep modeli olan DİEAP flepler üzerinde uygulanmıştır. Yeni damar oluşumu ile bir perforazomun beslediği flep alanı genişletilebileceği düşünülmüştür. Flep canlı alanlarında anlamlı bir artış bulunamamıştır. Fleplere uygulanan YDKKH'lerin damar yapısına girmiş olduğunun görülmesi, hücrelerin canlı kaldığını ve endotel hücrelerine farklılaşabildiğini kanıtlamaktadır. Benzer sonuçlara ulaşmış diğer çalışmalarda öne sürüldüğü gibi, çalışmamızda yaratılan yüksek iskemik ortamın dokuda kök hücrelerin vaskülogenez etkisinden daha hızlı şekilde geri dönüşsüz hasar yarattığı düşünülmektedir.

YDKKH ile terapötik vaskülogenez henüz tam anlaşılammış karmaşık basamaklardan oluşmaktadır. Tedavinin başarılı olmasını sağlamak için YDKKH'lerin uygulama bölgesi, zamanlaması, dozu ve etki mekanizması hakkında ileri ve detaylı araştırmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: DİEAP flebi, yağ doku kaynaklı kök hücre, flep yaşayabilirliği

8 ABSTRACT

INTRODUCTION

Today the deep inferior epigastric artery perforator (DIEAP) flap is the workhorse for breast reconstruction. Still the perfusion problems of zone IV limit the reconstruction in some of the cases.

Cell based therapies for tissue neovascularisation and regeneration has proven effective. Adipose tissue derived stem cells (ADSC) are multipotent and easy to obtain, thus making them a powerful choice. In this experiment effects of adipose derived stem cells on flap viability and perforasome area were tested on rat DIEAP flap model

METHODS:

ADSC's were obtained from Wistar Albino rat inguinal fat pads and labeled with GFP, in order to be able to visualise them in tissue sections. 30 Wistar Albino rats were divided into four groups. In groups A,B and C, DIEAP flaps were elevated. Flap zones IV in B and C, were injected with cell culture medium and ADSC's respectively. Group A served as a control flap group. After postoperative day 7, flaps were evaluated for viable flap area measurements and tissue vascular counts. Immunofluorescence techniques were applied to detect the stem cells in tissue sections. Biopsies were taken from abdominal skin from rats in group D to serve as a control group for tissue vascular counts. Barium Sulfate angiography was done on one animal each from groups B and C.

RESULTS

Percentage of viable flap areas in groups A, B and C were 45,01 %; 51,68 % and 68,20 % respectively. Statistically there was no significance found between these results.

Tissue vascular counts in groups A, B, C and D were 66,08; 82,0; 77,35 and 41,42 respectively. Statistically there was no significance found between these results.

Under fluorescent microscope, GFP labeled ADSC's were found to be integrated in capillary walls.

CONCLUSIONS

Blood perfusion problems in zone IV and resulting flap complications still represent a challenge in DIEAP flap surgery. Perfusion studies yielded important information about vascular anatomy in the DIEAP flap.

For stem cell based vasculogenesis therapies, ADSC's have many advantages over stem cells derived from other tissues.

This study was set out to determine the effects of ADSC's on flap viability and perforasome area on a perforator flap model. ADSC's were found to be integrated into capillary walls, proving that cells remained alive after injection and differentiated into endothelial cells in vivo. However significant improvement in flap viable area was not found. Like other authors of similar studies with similar results, we think that the highly ischemic environment created in our study resulted in irreversible tissue damage in a much shorter time, than the vasculogenesis effect of the ADSC.

ADSC based vasculogenesis therapy comprises complicated steps that are yet to be fully understood. Further detailed studies for determining the optimal site, timing and dosage of ADSC application and the mechanism of their action are needed.

Key words: Flap viability, adipose derived stem cells, DIEAP flap

9 KAYNAKLAR

1. Mathes, Stephen J. *Plastic Surgery*. [2nd edition] Elsevier Health Sciences, 2005; (1):27-28.
2. Mathes, Stephen J. *Plastic Surgery*. [2nd edition] Elsevier Health Sciences, 2005; (1):317-18.
3. Milton, SH. Pedicled skin-flaps: the fallacy of the length: width ratio. *Br J Surg*. 1970;57(7):502-8.
4. VY., Bakamjian. Total reconstruction of pharynx with medially based deltopectoral skin flap. *N Y State J Med*. 1968;68(21):2771-8.
5. McGregor IA, Jackson IT. The groin flap. *Br J Plast Surg*. 1972;25(1):3-16.
6. Manchot, C. *Die Hautarterien des Menschlichen Körpers*. Leipzig: F.C.W. Vogel; 1889.
7. Manchot, C. *The Cutaneous Arteries of the Human Body*. New York: Springer-Verlag; 1983.
8. Ger, R. The operative treatment of the advanced stasis ulcer: A preliminary communication. *Am J Surg*. 1966;111:659–663.
9. Orticochea, M. The musculo-cutaneous flap method: An immediate and heroic substitute for the method of delay. *Br J Plast Surg*. 1972;25:106–110.
10. Pontén, B. The fasciocutaneous flap: Its use in soft tissue defects of the lower leg. *Br J Plast Surg*. 1981;34:215–220.
11. Haertsch, P. The surgical plane in the leg. *Br J Plast Surg*. 1981;34:464–469.
12. Barclay TL, Cardoso E, Sharpe DT, Crockett DJ. Repair of lower leg injuries with fascio-cutaneous flaps. *Br J Plast Surg*. 1982;35:127–132.
13. Cormack GC, Lamberty BG. Fasciocutaneous vessels: Their distribution on the trunk and limbs, and their clinical application in tissue transfer. *Anat Clin*. 1984;6:121–131.
14. Daniel RK, Kerrigan CL Principles and Physiology of Skin Flap Surgery. In: McCarthy J, ed. *Plastic Surgery (I)*. Philadelphia: WB Saunders; 1990:275-32.

15. Mathes SJ, Bostwick J. A rectus abdominis myocutaneous flap to reconstruct abdominal wall defects. *Br J Plast Surg*. 1977;30(4):282-3.
16. Hartrampf CR, Schefflan M, Black PW. Breast reconstruction with a transverse abdominal island flap. *Plast Reconstr Surg*. 1982;69(2):216-25.
17. Mizgala CL, Hartrampf CR Jr, Bennett GK. Abdominal function after pedicled TRAM flap surgery. *Clin Plast Surg*. 1994;21(2):255-72.
18. Mathes, Stephen J. *Plastic Surgery*. [2nd edition] Elsevier Health Sciences, 2005; (6):835.
19. Mathes, Stephen J. *Plastic Surgery*. [2nd edition] Elsevier Health Sciences, 2005; (6):686.
20. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: Experimental study and clinical application. *Br J Plast Surg*. 1987;40(2):113-41.
21. Saint-Cyr M, Schaverien MV, Rohrich RJ. Perforator flaps: history, controversies, physiology, anatomy, and use in reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2009;123(4):132-145.
22. Barton(ed), Melek R. Kayser. Fritz E. Surgical Flaps. *Selected Readings in Plastic Surgery*. 1999;9(2).
23. Koshima I., Soeda S. Inferior epigastric artery skin flaps without rectus abdominis muscle. *Br J Plast Surg*. 1989;42(6):645-8.
24. Allen R. J., Treece P. Deep inferior epigastric perforator flap for breast reconstruction. *Ann Plast Surg*. 1994;32(1):32-8.
25. Blondeel PN, Morris SF, Hallock GG, Neligan PC. *Perforator Flaps: Anatomy, Technique and Clinical Application*. s.l. : St. Louis: Quality Medical, 2006.
26. Blondeel PN, Van Landuyt KH, Monstrey SJ, Hamdi M, Matton GE, Allen RJ, Dupin C, Feller AM, Koshima I, Kostakoglu N, Wei FC. The "Gent" consensus on perforator flap terminology: preliminary definitions. *Plast Reconstr Surg*. 2003;112(5):1378-83.
27. Mathes SJ, Nahai F. General principles. *Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy & Technique*. New York : Churchill Livingstone, 1997:253.
28. Mathes SJ, Nahai F. *Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy, and Technique*. New York : Churchill Livingstone, 1997.

29. Kroll SS, Rosenfield L. Perforator-based flaps for low posterior midline defects. *Plast Reconstr Surg*. 1988;81(4):561-6.
30. Rubino C, Coscia V, Cavazzuti AM, Canu V. Haemodynamic enhancement in perforator flaps: The inversion phenomenon and its clinical significance. A study of the relation of blood velocity and flow between pedicle and perforator vessels in perforator flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59(6):636-43.
31. Morris SF, Taylor GI. Predicting the survival of experimental skin flaps with a knowledge of the vascular architecture. *Plast Reconstr Surg* . 1993;92(7):1352-61.
32. Acosta R, Smit JM, Audolfsson T, Darcy CM, Enajat M, Kildal M, Liss AG. A clinical review of 9 years of free perforator flap breast reconstructions: an analysis of 675 flaps and the influence of new techniques on clinical practice. *J Reconstr Microsurg*. 2011;27(2):91-8.
33. Avrupa Paramentosu web sayfası: www.europarl.europa.eu .
34. Blondeel, P. N. One hundred free DIEP flap breast reconstructions: A personal experience. *Br. J. Plast. Surg*. 1999;52: 104.
35. Baumann DP, Lin HY, Chevray PM. Perforator number predicts fat necrosis in a prospective analysis of breast reconstruction with free TRAM, DIEP, and SIEA flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(5):1335-41.
36. Cheng MH, Robles JA, Ulusal BG, Wei FC. Reliability of zone IV in the deep inferior epigastric perforator flap : A single center's experience with 74 cases. *Breast*. 2006;15(2):158-66.
37. Kroll, SS. Fat necrosis in free transverse rectus abdominis myocutaneous and deep inferior epigastric perforator flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106(3):576-83.
38. Man LX, Selber JC, Serletti JM. Abdominal wall following free TRAM or DIEP flap reconstruction: a meta-analysis and critical review. *Plast Reconstr Surg*. 2009; 124(3):752-64.
39. Moon HK, Taylor GI. The vascular anatomy of rectus abdominis musculocutaneous flaps based on the deep superior epigastric system. *Plast Reconstr Surg*. 1988;82(5):815-32.
40. Granzow JW, Levine JL, Chiu ES, Allen RJ. Breast reconstruction with the deep inferior epigastric perforator flap: history and an update on current technique. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59(6):571-9.

41. Schaverien M, Saint-Cyr M, Arbique G, Brown SA. Arterial and venous anatomies of the deep inferior epigastric perforator and superficial inferior epigastric artery flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(6):1909-19.
42. Schefflan, M., Dinner, M. I. The transverse abdominal island flap: Part I. Indications, contraindications, results, and complications. *Ann Plast Surg*. 1983;10(1):24-35.
43. Schefflan, M., Dinner, M. I. The transverse abdominal island flap: Part II. Surgical technique. *Ann Plast Surg*. 1983;10(2):120-9.
44. Taylor, GI. The angiosomes of the body and their supply to perforator flaps. *Clin Plast Surg*. 2003;30(3):331-42.
45. Shoaib T, Marucci D. Adjacent angiosomes instead of zones ii and iii: Reply to “‘perfusion zones of the diep flap revisited - a clinical study’”. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(3):817-8.
46. Dinner, M. I., Dowden, R. V., Schefflan, M. Refinements in the use of the transverse abdominal island flap for postmastectomy reconstruction. *Ann Plast Surg*. 1983;11(5):362-72.
47. Ohjimi H, Era K, Fujita T, Tanaka T, Yabuuchi R. Analyzing the vascular architecture of the free TRAM flap using intraoperative ex vivo angiography. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(1):106-13.
48. Hallock, G. G. Physiological studies using laser Doppler flowmetry to compare blood flow to the zones of the free TRAM flap. *Ann. Plast. Surg*. 2001;47: 229.
49. Holm C, Mayr M, Höfter E, Ninkovic M. Perfusion zones of the DIEP flap revisited: A clinical study. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(1):37-43.
50. Keller, A. Perfusion zones of the diep flap revisited—A clinical study. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118:1076–1077.
51. Blondeel PN, Arnstein M, Verstraete K, Depuydt K, Van Landuyt KH, Monstrey SJ, Kroll SS. Venous congestion and blood flow in free transverse rectus abdominis myocutaneous and deep inferior epigastric perforator flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2000;106:1295–129.
52. Gill PS, Hunt JP, Guerra AB, Dellacroce FJ, Sullivan SK, Boraski J, Metzinger SE, Dupin CL, Allen RJ. A 10-year retrospective review of 758 DIEP flaps for breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 113(4):1153-60.

53. Wong C, Saint-Cyr M, Mojallal A, Schaub T, Bailey SH, Myers S, Brown S, Rohrich RJ. Perforasomes of the DIEP flap: vascular anatomy of the lateral versus medial row perforators and clinical implications. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(3):772-82.
54. Rozen WM, Ashton MW, Le Roux CM, Pan WR, Corlett RJ. The perforator angiosome: a new concept in the design of deep inferior epigastric artery perforator flaps for breast reconstruction. *Microsurgery.* 2010;30(1):1-7.
55. Carramenha e Costa MA, Carriquiry C, Vasconez LO, Grotting JC, Herrera RH, Windle BH. An anatomic study of the venous drainage of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Plast Reconstr Surg.* 1987;79(2):208-17.
56. Christiano JG, Rosson GD. Clinical experience with the delay phenomenon in autologous breast reconstruction with the deep inferior epigastric artery perforator flap. *Microsurgery.* 2010;30(7):526-31
57. Zuk, PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell.* 2010;21(11):1783-7.
58. 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 Apr;7(2):211-28.
59. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95.
60. Brown SA, Levi B, Lequeux C, Wong VW, Mojallal A, Longaker MT. Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plast Reconstr Surg.* 2010;126(6):1936-46.
61. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg.* 2008;34(9):1178-85.
62. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32(1):48-55.
63. Semenza, GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem.* 2007;102(4):840-7.

64. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7.
65. 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.
66. Li H, Zan T, Li Y, Weng R, Yang M, Du Z, Zhong S, Li Q. Tohoku. Transplantation of adipose-derived stem cells promotes formation of prefabricated flap in a rat model. *J Exp Med*. 2010;222(2):131-40.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. A. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(12):2542-7.
72. Yu LH, Kim MH, Park TH, Cha KS, Kim YD, Quan ML, Rho MS, Seo SY, Jung JS. Improvement of cardiac function and remodeling by transplanting adipose tissue-derived stromal cells into a mouse model of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2010;139(2):166-72.
73. Pynn BR, McKee NH, Nigra CA, Howard CR. A protective rat vest. *Plast Reconstr Surg*. 1983;71(5):716-7.

74. Tran NV, Buchel EW, Convery PA. Microvascular complications of DIEP flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(5):1397-405;.
75. Ali R, Bernier C, Lin YT, Ching WC, Rodriguez EP, Cardenas-Mejia A, Henry SL, Evans GR, Cheng MH. Surgical strategies to salvage the venous compromised deep inferior epigastric perforator flap. *Ann Plast Surg*. 2010;65(4):398-406.
76. Ulusal BG, Cheng MH, Wei FC, Ho-Asjoe M, Song D. Breast reconstruction using the entire transverse abdominal adipocutaneous flap based on unilateral superficial or deep inferiorepigastric vessels. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(5):1395-403.
77. Bozikov K, Arnez T, Hertl K, Arnez ZM. Fat necrosis in free DIEAP flaps: incidence, risk, and predictor factors. *Ann Plast Surg*. 2009;63(2):138-42.
78. Saint-Cyr M, Schaverien M, Arbique G, Hatef D, Brown SA, Rohrich RJ. Three- and four-dimensional computed tomographic angiography and venography for the investigation of the vascular anatomy and perfusion of perforator flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121(3):772-80.
79. Enajat M, Rozen WM, Whitaker IS, Smit JM, Acosta R. A single center comparison of one versus two venous anastomoses in 564 consecutive DIEP flaps: investigating the effect on venous congestion and flap survival. *Microsurgery*. 2010;30(3):185-91.
80. Schaverien MV, Ludman CN, Neil-Dwyer J, Perks AG, Raurell A, Rasheed T, McCulley SJ. Relationship between venous congestion and intraflap venous anatomy in DIEP flaps using contrast-enhanced magnetic resonance angiography. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(2):385-92.
81. Momeni A, Lee GK. A case of intraoperative venous congestion of the entire DIEP-flap—a novel salvage technique and review of the literature. *Microsurgery*. 2010;30(6):443-6.
82. Sojitra NM, Vandervoort M, Ghali S, Fabre G. Two new techniques for correcting venous congestion in the free DIEP flap for breast reconstruction: an analysis of venous augmentation in 581 DIEP flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(2):72-74.
83. Garvey PB, Buchel EW, Pockaj BA, Gray RJ, Samson TD. The deep inferior epigastric perforator flap for breast reconstruction in overweight and obese patients. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115(2):447-57.

84. Nahabedian MY, Momen B, Galdino G, Manson PN. Breast Reconstruction with the free TRAM or DIEP flap: patient selection, choice of flap, and outcome. *Plast Reconstr Surg*. 2002;110(2):466-75.
85. Seidenstuecker K, Munder B, Mahajan AL, Richrath P, Behrendt P, Andree C. Morbidity of microsurgical breast reconstruction in patients with comorbid conditions. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(3):1086-92.
86. Rogers NE, Allen RJ. Radiation effects on breast reconstruction with the deep inferiorepigastric perforator flap. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(6):1919-24.
87. Rozen WM, Grinsell D, Koshima I, Ashton MW. Dominance between angiosome and perforator territories: a new anatomical model for the design of perforator flaps. *J Reconstr Microsurg*. 2010;26(8):539-45.
88. Peeters WJ, Nanhekhan L, Van Ongeval C, Fabré G, Vandevooort M... Fat necrosis in deep inferior epigastric perforator flaps: an ultrasound-based review of 202 cases. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(6):1754-8.
89. Okşar HS, Coşkunfirat OK, Ozgentaş HE. Perforator-based flap in rats: a new experimental model. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108(1):125-31.
90. Coşkunfirat OK, Okşar HS, Ozgentaş HE. Effect of the delay phenomenon in the rat single-perforator-based abdominal skin flap model. *Ann Plast Surg*. 2000;45(1):42-7.
91. Hallock GG, Rice DC. Cranial epigastric perforator flap: a rat model of a true perforator flap. *Ann Plast Surg*. 2003;50(4):393-7.
92. Hallock GG, Rice DC. Comparison of TRAM and DIEP flap physiology in a rat model. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(5):1179-84.
93. Hallock GG, Rice DC. Efficacy of venous supercharging of the deep inferior epigastric perforator flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(2):551-5.
94. 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.
95. 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.

96. Yi C, Xia W, Zheng Y, Zhang L, Shu M, Liang J, Han Y, Guo S. Transplantation of endothelial progenitor cells transferred by vascular endothelial growth factor gene for vascular regeneration of ischemic flaps. *J Surg Res.* 2006;135(1):100-6.
97. Ichioka S, Kudo S, Shibata M, Ando J, Sekiya N, Nakatsuka T. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg.* 2004;52(4):414-8.
98. Zan T, Li Q, Dong J, Zheng S, Xie Y, Yu D, Zheng D, Gu B. Transplanted endothelial progenitor cells increase neo-vascularisation of rat pre-fabricated flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010 Mar;63(3):474-81.
99. Zhang FG, Yao Y, Feng Y, Hua CG, Tang XF. Mesenchymal stem cells transduced by stromal cell-derived factor-1 α augment ischemic free flaps' survival. *Ann Plast Surg.* 2011;66(1):92-7.