

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**KRONİK LENFÖDEM OLUŞTURMADA SIÇAN
MODELLERİNİN UYGUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ:
DENEYSEL ÇALIŞMA**

Dr. Dicle Yaşar AKSÖYLER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.**

**Ankara
2017**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**KRONİK LENFÖDEM OLUŞTURMADA SIÇAN
MODELLERİNİN UYGUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ:
DENEYSEL ÇALIŞMA**

Dr. Dicle Yaşar AKSÖYLER

**UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Serdar Nazif NASIR**

**Ankara
2017**

KABUL VE ONAY

Dr. Dicle Yaşar AKSÖYLER tarafından hazırlanan ‘‘ KRONİK LENFÖDEM OLUŞTURMADA SIÇAN MODELLERİNİN UYGUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ: DENEYSEL ÇALIŞMA’’ başlıklı bu çalışma 11 Ocak 2017 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serdar Nazif NASIR

Hacettepe Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Ali Emre AKSU

Hacettepe Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi (Üye)

Doç. Dr. Burak KAYA

Ankara Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi (Üye)

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Figen ÖZGÜR

Hacettepe Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi (Anabilim Dalı Başkanı)

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimimin başından itibaren her zaman sevgi, bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan, tez hazırlama sürecinde desteğini hep hissettiğim, birlikte çalışmaktan onur duyduğum hocam ve tez yöneticim değerli Serdar NASIR'a

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım, güler yüzünü ve bilgi birikimini benden esirgemeyen, tezimin histopatolojik çalışmasını yürüten hocam Özyay GÖKOZ'a

Her zaman bilgisinden yararlandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edinmeye çalıştığım hocam ve abim olan Hakan UZUN'a, deneyler sırasında beni yalnız bırakmayan Damla MENKÜ'ye, Tuğçe PAŞAOĞLU'na

Eğitimimiz için hiçbir fedakarlığı esirgemeyen başta anabilim dalı başkanımız olan değerli Figen ÖZGÜR' e, tecrübeleri ile bana ve tüm çalışma arkadaşlarıma her zaman yol gösterici olan, yetişmemizde büyük katkı ve emeği bulunan tüm hocalarıma

Değerli fikirleri ile bu çalışmaya ışık tutan tez savunma jürisi hocalarım olan değerli Emre AKSU ve Burak KAYA' ya

İstatiksel analizleri yapan Elif ÖZTÜRK'e

İlacı hazırlama sürecinde sabrını ve özverisini takdir ettiğim Elif ÇINAR'a, hayvan deneyleri konusunda sonsuz özverisine tanık olduğum ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Hüseyin KONUKÇU'ya

Her zaman yanımda olan, hekimlik mesleğini seçmeme vesile olan annem Çiğdem AKSÖYLER' e, hayallerimi hep destekleyen babam Recep AKSÖYLER'e ve diğer yarım, canım kardeşim Fırat AKSÖYLER'e

Başta Murat KARA, Gökhan SERT olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma

5 yıl boyunca onların sayesinde her gün severek geldiğim plastik cerrahi ailesinin her bir servis, poliklinik ve ameliyathane üyelerine

Destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi' ne

SONSUZ teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Lenfatik Sistem.....	4
2.1.1. Lenfatik Sistemi Oluşturan Yapılar.....	4
2.1.2. Lenfatik Vasküler Sistem.....	4
2.1.2.1. Lenf Kapillerleri.....	4
2.1.2.2. Lenfatik Damarlar	5
2.1.2.2.1. Duktus Torasikus.....	6
2.1.3. Lenf Düğümleri ve Lenfatik Organlar Lenf Düğümleri.....	9
2.1.3.1. Timus.....	10
2.1.3.2. Tonsilla.....	10
2.1.3.3. Dalak	11
2.1.4. Lenfatik Sistem Görevleri ve Fizyolojisi	11
2.2. Lenfanjiogenez	13
2.2.1. Lenfatik Sistem Gelişimi ve Embriyogenez.....	13
2.2.2. Lenfatik Endotel Hücre Belirteçleri	16
2.2.2.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörleri (VEGF).....	17
2.2.2.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörleri.....	19
2.2.2.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Benzerleri	22
2.2.2.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF).....	22
2.2.2.5. Tip 1 Kollajen.....	22

2.2.2.6. Podoplanin.....	22
2.2.2.7. Prox-1 (Prospero-Related Homeobox 1).....	23
2.2.2.8. Lenfatik Damar Endotelial Hyaluronan Reseptör 1 (LVYE-1)	23
2.2.2.9. β Kemokin Reseptör 6.....	24
2.2.2.10. Makrofaj Mannoza Reseptörü.....	24
2.2.2.11. 5'Nükleotidaz ve Desmoplakin.....	24
2.3. Lenfödem.....	25
2.3.1. Primer Lenfödem.....	26
2.3.2. Sekonder Lenfödem	27
2.3.3. Lenfödem Evrelemesi ve Fibrozis İle İlişkisi	28
2.3.4. Lenfödem Tanı Yöntemleri.....	32
2.3.5. Lenfödem Tedavi Yöntemleri	33
2.3.5.1. Konservatif Yöntemler.....	33
2.3.5.2. Cerrahi Yöntemler.....	33
2.3.5.2.1. Charles Prosedürü.....	34
2.3.5.2.2. Liposakşın Aracılı Teknik.....	34
2.3.5.2.3. Vaskularize Lenf Nodu Transferi (VLNT).....	35
2.3.5.2.3.1. VLNT Donör Saha	36
2.3.5.2.3.2. VLNT Alıcı Saha	37
2.3.5.2.4. Lenfatikovenüler Anastomozlar (LVA)	38
2.3.5.2.5. Lenfatikolenfatik Bypass.....	39
2.4. Sirolimus.....	40
2.4.1. Sirolimusun Keşfi.....	40
2.4.2. İçeriği	41
2.4.3. Kimyasal Adı.....	41
2.4.4. Mekanizması-Farmakodinamiği.....	41
2.4.5. Farmakokinetiği ve Metabolizması.....	43
2.4.6. Yan Etkileri	43
2.4.7. Sirolimusun Sıçan Dokularındaki Metabolizması.....	44

2.4.8. Sirolimusun İnsanlarda Oluşturduğu Lenfödeme Dair Literatür Taraması	44
2.5. Hayvan Modelleri	48
2.5.1. Tavşan Kulağı	48
2.5.2. Koyun Alt Ekstremitesi Lenfödem Modeli	49
2.5.3. Köpek Alt Ekstremiteli Lenfödem Modeli	50
2.5.4. Fare Kuyruğu Modeli	51
2.5.5. Sıçan Arka Bacağı Modeli	51
2.6. Sıçanların Lenfatik Sistemi	52
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	55
3.1. Cerrahi İşlemler	55
3.1.1. Sekonder Lenfödem Modelinin Oluşturulması	56
3.2. İlacın Hazırlanması	62
3.3. Grupların Oluşturulması	63
3.3.1. Grup 1 (CR1)	63
3.3.2. Grup 2 (CR1.4)	63
3.3.3. Grup 3 (CR2)	63
3.3.4. Grup 4 (R Grubu)	64
3.3.3. Grup 5 (V Grubu)	64
3.3.2. Grup 6 (VC Grubu)	64
3.3.7. Grup 7 (C Grubu)	65
3.4. Kan Rapamisin Düzeyi Ölçümü	65
3.5. Ayak Bileği Çap Ölçümleri	65
3.6. Mikro Bilgisayarlı Tomografi İle Hacim Ölçümü	65
3.7. SPY Perfüzyon Değerlendirme Sistemi ile Lenfödem Değerlendirilmesi	67
3.8. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi	67
3.9. Histopatolojik Değerlendirme	67
3.10. İstatistiksel Değerlendirme	68
4. BULGULAR	69
4.1. Ayak Bileği Çap Ölçümü	69
4.2. Mikro BT ile Çap Ölçümleri	73

4.3. Kan Rapamisin Düzeyleri.....	77
4.4. SPY PERFÜZYON DEĞERLENDİRME SİSTEMİ İLE LENFÖDEM DEĞERLENDİRİLMESİ	77
4.5. Histopatolojik Değerlendirme	81
5. TARTIŞMA	84
6. SONUÇLAR	91



KISALTMALAR

Ark.	:	Arkadaşları
ASH	:	Antijen Sunan Hücre
ASİS	:	Anterior Superior İliak Spine
AV	:	Atrioventriküler
AVF	:	Arteriovenöz Fistül
CDT	:	Komplet Dekonjestan Tedavi
DİEA	:	Derin İnfierior Epigastrik Arter
ESRD	:	End Stage Renal Disease
ECM	:	Ekstraselüler matriks
FKBP	:	FK506 Binding Protein
GAG	:	Glikozaminoglikan
HA	:	Hyaluronan
HGF	:	Hepatosit Growth Faktör
HÜS	:	Hemolitik Üremik Sendrom
ICG	:	İndosiyenin Yeşili
IG	:	Immunoglobulin
IL	:	Interlökin
LEC	:	Lenfatik Endotel Hücreler
LVA	:	Lenfatikovenüler Anastomoz
LYVE	:	Lenfatik Damar Endotel Hyaluronan Reseptor
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz
MPA	:	Mikofenolat
MRL	:	Manyetik Rezonans Lenfanjiografi
NSAİİ	:	Non Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar
PDE	:	Photo Dynamic Eye
PHTF	:	Prox1 Homeodomain Transcription Factor
PROX-1	:	Prospero-Related Homeobox
PT	:	Pubik Tüberkül
ROM	:	Range Of Motion
SCİA	:	Süperfisyal Sirkümfleks İliak Arter

SCİV	:	Süperfisyal Sirkümfleks İliak Ven
SDS	:	Sodyum Tetradösil Sülfat
SİEA	:	Süperfisyal İinferior Epigastrik Arter
SİEV	:	Süperfisyal İinferior Epigastrik Ven
SRL	:	Sirolimus
TCGF	:	T hücre Büyüme Faktörleri
USG	:	Ultrasounografi
VLNT	:	Vaskülarize Lenf Nodu Transferi
YY	:	Yüzyıl



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. Vücudumuzda Bulunan Lenfatik Yapılar	8
Şekil 2.2. Lenf Düğümü Yapısı	9
Şekil 2.3. Lenfatik Sıvı Akış Seması	13
Şekil 2.4. İnsan Embriyosu Görünümü.....	15
Şekil 2.5. A. VEGFR-3 enjekte edilen fare lenfatik damarları, B: Normal fare lenfatik damarları	16
Şekil 2.6. VEGF'lerin PIGF ile bağlandıkları reseptör aileleri ve nihai etkileri.....	18
Şekil 2.7. VEGF'lerin bağlandıkları reseptörler	21
Şekil 2.8. Damar Yapıları, evreler ve klinik	31
Şekil 2.10. Uzun süreli sirolimus tedavisi	47
Şekil 2.11. Şekil 2.10'da klinik fotoğrafları olan hastanın lenfosintigrafi görünümleri	47
Şekil 2.12. Koyun arka bacağı lenfödem modeli, cerrahi sonrası 1. Hafta	49
Şekil 2.13. Köpek alt ekstremitesi akut lenfödem modeli	51
Şekil 2.14. Sıçanların Lenfatik sistemi	54
Şekil 3.1. Evans Mavisi	57
Şekil 3.2. 0.5 cm' lik cilt adasının çizilmesi.....	57
Şekil 3.3. Femoral arter ve ven komşuluğunda ana lenfatik kanal	58
Şekil 3.4. Kas üzerinde yerleşim gösteren lenfatik damarlar	58
Şekil 3.5. Popliteal lenf düğümü.....	59
Şekil 3.6. İnguinal yağ yastıkçığı içerisindeki lenf düğümü.....	59
Şekil 3.7. Popliteal lenf düğümünün çıkarılması.....	60
Şekil 3.8. Popliteal lenf düğümü, inguinal yağ yastıkçığı, cilt	60
Şekil 3.9. Ana Lenfatik Kanalın koterizasyonu	61
Şekil 3.10. Unipolar Koter	61
Şekil 3.11. Pansuman.....	62
Şekil 3.12. Hepa Filtreli Kafes.....	66

Şekil 3.13.	Mikro- BT Cihazı	66
Şekil 4.1.	Ameliyat sonrası erken görüntü.....	70
Şekil 4.2.	Ameliyat sonrası 3. Gün	70
Şekil 4.3.	Ameliyat sonrası 3. Gün çap ölçümü sağ ekstremite.....	71
Şekil 4.4.	Ameliyat sonrası 3. Gün çap ölçümü sol ekstremite	71
Şekil 4.5.	Ameliyat sonrası 3. Hafta çap ölçümü sağ ekstremite.....	71
Şekil 4.6.	Ameliyat sonrası 3. Hafta çap ölçümü sol ekstremite	72
Şekil 4.7.	3. Hafta makroskopik görünüm: Her iki alt ekstremitede belirgin çap farkı makroskopik olarak gözlenmedi.....	72
Şekil 4.8.	6. Hafta makroskopik görünüm	73
Şekil 4.9.	Koronal kesit mikro BT görüntüsü 1. Hafta, sağ alt ekstremitede belirgin hacim artışı izlenmektedir.	75
Şekil 4.10.	Aksiyal kesit CR2 grubu 3. hafta.....	76
Şekil 4.11.	Aksiyal kesit CR2 grubu 6. hafta.....	76
Şekil 4.12.	2. Hafta SPY görünümü (C grubu).....	77
Şekil 4.13.	2. Hafta SPY görünümü (CR1 5 grubu.....	78
Şekil 4.14.	2. Hafta SPY Görünümü (C grubu).....	79
Şekil 4.15.	6. Hafta SPY görünümü (CR2 grubu)	80
Şekil 4.16.	6. hafta SPY görünümü (CR2 grubu	80
Şekil 4.17.	Lenfatik Damar Yapısı	83

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. Lenfanjiogenezde görevli reseptörler, büyüme ve transkripsiyon faktörleri ve etkileri	25
Tablo 2.2. Lenfödem evresine göre lenfatik damar yapıları ve histolojileri.....	30
Tablo 2.3. Lenfödem Evrelerine göre damar tiplerinin dağılımı	31
Tablo 4.1. Manuel Bacak Ölçüm Değerleri (mm cinsinden).....	70
Tablo 4.2. Mikro BT ile Bacak hacimleri ölçüm değerleri (mm ³ cinsinden)	74
Tablo 4.3. Kan RapamisinDüzeyleri (ng/ml cinsinden)	77
Tablo 4.4. Lenfatik Damar- Makrofaj ilişkisine ait veriler.....	81
Tablo 4.5. Makrofaj sayısının gruplar içinde dağılımı	82

ÖZET

Lenfödem lenfatik damar sayısının azalmasına, lenfatik damar disfonksiyonuna veya lenfatik akımda obstrüksiyona ikincil olarak oluşur. İnsanlardaki lenfödem kronik ilerleyen bir süreçtir. Deneysel çalışmalarda değişik hayvan türlerinde kronik lenfödem modeli oluşturulmaya çalışılmaktadır. Sıçan arka-bacak modelinde lenf nodlarının eksizyonunu takiben radyoterapi, splint ile yabancı cisim reaksiyonu yaratılarak, bleomisin verilerek lenfödem modelleri oluşturulmaktadır. Literatürde 4 aya kadar devam eden lenfödem modelleri bildirilmektedir.

Çalışmada ağırlıkları 300-400 gr arasında 42 adet Wistar türü sıçan kullanıldı. Sıçan arka bacağında cerrahi olarak akut lenfödem modeli oluşturulduktan sonra değişik dozlarda lenfanjiogenezin başlangıç aşamasını inhibe etme özelliğine sahip Sirolimus (Rapamisin) verilerek kronik bir lenfödem modeli oluşturulması hedeflendi.

En belirgin lenfödem ameliyat sonrası 2. günde izlendi. Gruplar arasında en uzun süreli lenfödem 3 hafta süre ile izlendi. Histopatolojik olarak gruplar arasında lenfatik sayısı ya da çapı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi.

Rapamisin bir m-TOR (mammalian target of rapamycin) inhibitörüdür. Rapamisin m-TOR inhibisyonu ile VEGF-C/VEGF-D yolağında inhibisyona sebep olmaktadır ve bu etkisiyle insanlarda lenfödem oluşturmaktadır. Kanter ve ark. tarafından insanlarda radyoterapi etkisi ile fibrozisin ön planda olduğu bir lenfödem modeli tanımlanmıştır. Biz de küçük deney hayvanlarında fibrozisin geçici olduğunu ve her zaman rejenerasyon kapasitelerinin insanlardan fazla olduğunu göz önünde bulundurarak cerrahi ile oluşturduğumuz akut lenfödem modelini lenfanjiogenezini inhibe ederek makroskopik ve histopatolojik olarak insanlara benzer kronik bir model haline getirmeyi amaçladık. Yaptığımız deneysel çalışmalar sonucunda ve literatürde daha önceden tanımlanmış sıçanlardaki deneysel modellerin incelenmelerini beraber değerlendirdiğimiz zaman; sıçan ve fare gibi küçük deney hayvan modellerinde kronik bir lenfödem oluşturulmasının mümkün olmadığını ve küçük hayvan lenfödem modellerinde bazı tedavi yöntemlerinin denemesinin bazı hatalı sonuçlar doğurabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Lenfödem, Fibrozis, Rapamisin, Lenfanjiogenez

ABSTRACT

Lymphedema occurs secondary to the reduced number of lymphatic vessels, lymphatic vascular dysfunction or obstruction in lymphatic flow. Lymphedema in humans is a chronic progressive process. Experimental studies try to establish a chronic lymphedema model in various types of animals. In the rat posterior limb model, lymphedema models are created by radiotherapy following the excision of lymph nodes, foreign body reaction with splint, bleomycin administration.

The most prominent lymphedema was observed on day 2 after the surgery. The longest duration of lymphedema among the groups was observed to be 3 weeks. Histopathologically, there was no statistically significant difference between the groups in terms of number and size of lymphatics.

As is known, Rapamycin is a m-TOR (mammalian target of rapamycin) inhibitor. Rapamycin causes inhibition of VEGF-C/VEGF-D pathway through m-TOR inhibition and resulting in lymphedema in humans due to this effect. Kanter et al. defined a lymphedema model in humans, in which fibrosis; an effect of radiotherapy becomes prominent. Considering that fibrosis is transient in small experimental animals and that their regeneration capacities are always higher than humans, we have aimed to make the acute lymphedema model that we have created by surgery a chronic model macroscopically and histopathologically similar to humans by inhibiting lymphangiogenesis.

As a consequence of the experimental studies we have performed and assessment of the reviews of experimental models in the predefined rats in the literature; we believe that it is not possible to create a chronic lymphedema in small animal models such as rats and mice and that testing some treatment techniques in a small animal lymphedema models may produce some incorrect results.

Key Words: Lymphedema, Rapamycin, Fibrosis, Lymphangiogenesis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lenfödem, lenfatik fonksiyon bozukluğunun sonucunda proteinden zengin hücreler arası sıvının deri ve cilt altı doku içerisinde birikmesi ile oluşan kronik, ilerleyici bir hastalıktır. Hastalığın yönetimi ve tedavi süreci hastalar ve sağlık personelleri açısından sabır ve özveri gerektirmektedir.

Tüm dünyada 200 milyona yakın lenfödem hastasının olduğu ön görülmektedir. Lenfödem etiyojisine göre primer ve sekonder lenfödem şeklinde ikiye ayrılır. Etiyojisi bilinmeyen ya da doğuştan lenfatik fonksiyon bozukluğu sonucu oluşan olgular primer lenfödem olarak adlandırılır. Var olan bir nedene ikincil gelişen diğer tüm olgular sekonder lenfödem olarak adlandırılır.

Sekonder lenfödem; enfeksiyon, travma, cerrahi lenf nodu disseksiyonu, radyoterapi, tümör, lenfoproliferatif hastalıklara ikincil olarak gelişebilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre tüm dünyada edinsel lenfödemin en yaygın sebebi *filariae* adlı nematod olan bir parazitin sebep olduğu filaryazis adlı paraziter hastalıktır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa ülkelerinde ise malignite için uygulanan cerrahi ve sonrasında verilen adjuvan radyoterapi en sık edinsel lenfödem sebebidir. Maligniteler arasında en sık sebep ise meme kanseri ve eşlik eden aksiller lenf nodu disseksiyonu ile kombine adjuvan radyoterapi sonrasında gelişen lenfödem kliniğidir. Meme kanseri cerrahisi sonrasında ipsilateral üst ekstremitede lenfödem görülme sıklığı %30 olarak bildirilmiştir. İkinci sıklıkta ise alt ekstremitede maligniteleri sonrası inguinal lenf nodu disseksiyonu yapılan hastaların %20'sinde lenfödem geliştiği bildirilmiştir. Lenf damarlarının taşıma kapasitesi aşıldığında, anormal oluşmuş lenf damarı veya lenf nodlarına bağlı tıkanıklık neticesinde plazma proteinleri, lenfosit hücreleri, immunoglobulinler ve sitokin gibi proteinden zengin yapıları içeren sıvı, hücreler arası alanda birikir. Bu maddeler cilt altı doku planında kronik inflamatuvar değişikliklerin oluşmasına ve fibrozise neden olur. Bu kronik ve ilerleyici kliniğin neticesinde bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara yatkınlık oluşur ve lenfanjiosarkom gibi neoplazmlar kolaylıkla meydana gelebilir. Lenfödem kliniği tamamen cilt altı dokuya sınırlıdır. Tedavi yöntemleri evresine göre değişmekle birlikte her hastalıkta olduğu gibi erken tanı hayat kalitesi ve hastalığın ilerleyişi

açısından önemlidir. Erken dönem tedavilerini; masaj, bası giysileri, ekstremitte elevasyonu, lenfatik akışı arttıracak egzersizler gibi konservatif yöntemler oluşturmaktadır. Cerrahi işlemler ile ilgili oluşmuş ortak bir kanı yoktur ve hangi yöntemin üstün olduğu hala tartışmalıdır. Ancak bu yöntemleri liposakşın, Charles Prosedürü gibi geniş eksizyon ve greftleme yapılan ablatif yöntemler ve vaskülarize lenf nodu transferi, lenfatiko-lenfatik bypass ya da lenfati-venüler by-pass işlemleri yapılan mikrocerrahi yöntemler olarak kabaca ikiye ayırmak uygun olacaktır. Yöntem seçimi hastanın evresine ve cerrahın tecrübesine göre değişmektedir. Özellikle ileri evre hastalarda biriken sıvıya bağlı olarak artan ekstremitte hacmi hastanın ambulasyonunu kısıtlamakta, iş gücü kaybına neden olmaktadır. Ayrıca kronik fibrozis zemininde zaman zaman akut bakteri ve mantar enfeksiyonları alevlenmeleri olmakta ve bu enfeksiyonlar hastane yatışına ve parenteral antibiyotik kullanımına sebep olmaktadır. Tahmin edildiği üzere bu hastalar düzenli olarak çalışmamakta ve sıklıkla hastane yatışı ile hastalık alevlenme dönemleri iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Yaşam boyu düzenli bakım ve yoğun kontroller altında olmaları, ciddi tedavi maliyetleri ve iş gücü kayıpları hem hastalar hem de sağlık sistemi açısından yüksek maliyetler oluşturmaktadır. Bu nedenle kronik lenfödem tedavileri için yeni yöntemler araştırılmaktadır ve bu durumda hayvan deneyleri önem kazanmaktadır.

Lenfatik sistemin gelişimini değerlendirmek için Milroy Hastalığı fizyopatolojisi incelenmiştir. Bilindiği üzere Milroy Hastalığı konjenital lenfatik damarların gelişmemesi durumudur. Milroy hastalığında Vasküler Endotel Büyüme Faktör Reseptörü- 3 (VEGFR-3) eksikliği vardır. Lenfanjiogenez için esas uyarı VEGFR-3 tarafından sağlanmakta ve bu uyarı neticesinde Vasküler Endotel Büyüme Faktörü-C (VEGF-C) / Vasküler Endotel Büyüme Faktörü-D (VEGF-D) sinyal yolağı lenfatik damarların proliferasyonunu ve migrasyonunu sağlamaktadır. Lenfanjiogenez için gereken VEGFR-3 sinyali ve sinyal sonrasında aktifleşen VEGF-C/ VEGF-D sinyal yolağıdır. Hayvan modellerinde lenfödem oluşturulduktan sonra Vasküler Endotel Büyüme Faktörü-C (VEGF-C) gibi kök hücre tedavileri verilebildiği gibi vaskülarize lenf nodu transferleri yapılmakta ve bu tedavilerin insanlar için sağlayabileceği yeterlilik, avantajlar ve dezavantajlar tartışılmaktadır. Bilindiği üzere insanlarda oluşan lenfödem kronik ve ilerleyici bir kliniğe sahipken deney hayvanlarında cerrahi ve radyasyonun kombine edilmesi ile en fazla üç aya kadar

uzayan lenfödem modelleri bildirilmiştir. Özellikle fare ve sıçan gibi kemirgen hayvanlar ya da küçük deney hayvanlarında yara iyileşmesi için muazzam bir rejenerasyon yanıtı bulunmaktadır. Özellikle küçük deney hayvanlarında kendiliğinden yara iyileşmesi, sinir rejenerasyonu ve skar oluşmaması gibi gerçekleri göz önüne aldığımız zaman tahmin edileceği üzere lenfödem kliniği de kendiliğinden iyileşebilmekte ve insanlardaki gibi fibrozisin baskın olduğu ilerleyici bir kliniğe sahip olmamaktadır. Bu durumda küçük deney hayvanlarında yapılan lenfödem tedavileri ne kadar yararlıdır?

Bu çalışmada insanların lenfödem kliniğine benzer kronik, ilerleyici, kendiliğinden gerilemeyen bir lenfödem kliniği yaratabilmek amacıyla sıçan arka bacağına lenf nodu eksizyonu ile akut lenfödem oluşturulmuş ve günlük Sirolimus ilacının idame tedavisi ile lenfanjiogenez baskılanarak kronik bir lenfödem modeli oluşturulması amaçlanmıştır. Böylece geliştirilen lenfödem tedavi yöntemlerinin insan çalışmaları için daha iyi bir öngörü oluşturabilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lenfatik Sistem

Lenfatik sistem; interstisyel sıvıdan kan dolaşımına sıvı transferini sağlayan ve immun sistem ile beraber çalışarak ekzojen maddelere karşı koruyucu filtre görevi gören bir sistemdir. Bu drenaj sistemi sayesinde, hücreler arası sıvıdan kan kapillerlerine geçemeyen plazma proteinleri ve büyük molekülü maddeler venöz yatağa aktarılır. Lenfatik sistemi; lenfatik organlar, lenf sıvısı ve lenf damarları oluşturur.¹⁻³

Lenfatik damarlar dokular arası sıvının uzaklaştırılmasında kardiyovasküler sisteme yardımcıdır. Santral sinir sistemi, meninksler, orbita, kornea, iç kulak, epidermis, kıl folikülleri, tırnak, kıkırdak, kemik iliği ve kemik dışındaki tüm organlarda lenfatik damarlar bulunur.⁴⁻⁵

2.1.1. Lenfatik Sistemi Oluşturan Yapılar

Lenf kapillerlerinde başlayan lenf akımı, lenf damarlarında devam ederek venöz sisteme drene olur. Timus, dalak, tonsil, lenf düğümleri lenfatik doku ve organları oluşturur.⁶ (şekil 2.1)

Lenfatik organlar primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılır.

- Primer lenfatik organlar: Kemik iliği ve timus
- Sekonder lenfatik organlar: Dalak, lenf nodları ve mukoza ile ilişkili lenfatik doku (MALT).

2.1.2. Lenfatik Vasküler Sistem

2.1.2.1. Lenf Kapillerleri

Doku ve interstisyel alandaki sıvı iletiminin başlangıcı olan lenf kapillerleri periferde kapalı uçlu gözenekli yapılar olup, kan damarları ve interstisyel aralık ile herhangi bir bağlantıya sahip değildir. Lenf kapillerlerinin kan kapillerlerinden en

önemli farkı daha geniş yapıda olan lümenidir. Esnek ve gözenekli duvar yapısı protein ve büyük molekülü maddelerin geçişini mümkün kılar. Bu lenfatik kapillerler tek tabakalı endotelden oluşur ve birbirleri ile ağ oluşturarak yaygın bir bağlantı içindedir. Kapakçık içermezler. Önce lenf damarlarına ardından da lenf düğümlerine doğru bir seyir gösterirler. Lenf kapillerleri ciltte, müköz membranlarda, seröz membranlarda ve sinoviyal membranlarda bol miktarda bulunur.⁵⁻⁷

2.1.2.2. Lenfatik Damarlar

Lenf kapillerlerinin birleşmesi sonucu lenfatik damarlar oluşur ve bu lenf damarlarına lenfatik adı verilir. Lenfatikler yapısal olarak küçük çaplı venlere benzerdir. Lenfatiklerin duvarı venlerden daha incedir ve ek olarak duvarlarında bağ dokusu ve düz kas yapısı görülür. Venlere göre daha fazla lüminal kapakçık içerirler ve bu kapakçıklar sayesinde lenf sıvısının (lenfa) akım yönü periferden merkeze doğru geri akım olmayacak şekilde olur. Lenf damarları ayrı ayrı güzergahlarda ilerleyerek bu yolaklar boyunca yerleşim gösteren lenf düğümlerine drene olurlar.

Lenf, lenf nodlarının endotelle ve bol makrofaj ile örtülü olan kanallarında ilerlerken süzülür ve mevcut partiküllerinden arındırılır. Lenf düğümlerinden lenfayı götüren boşaltıcı efferent lenfatikler, afferent lenfatikler ile benzer yapıdadır ve tek farkı afferent lenfatiklere göre daha geniş lümene sahip olmalarıdır.⁷⁻⁹

Lenfatikler yüzeysel ve derin olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Yüzeysel Lenfatikler: Deri ve deri altı doku içerisinde yerleşirler, birleşerek daha büyük damarları oluşturup derin lenfatiklere dökülürler. Vücudumuzdaki yüzeysel lenfatik damarlar üç gruba ayrılır.

- Birinci grup; baş, yüz ve boyun gibi kraniyal bölgeden gelenler olup servikal lenf düğümlerine boşalır.
- İkinci grup; üst ekstremitelerden ve gövdenin T10 göbek hizasının üstü ile önde klavikula, arkada ensenin ortası arasında kalan bölgeden gelen lenfatikler olup aksillada yerleşim gösteren lenf düğümlerine boşalır.

- Üçüncü grup; alt ekstremité derisinden, perineden, dış genital organlardan, gövdenin umblikus hizasının altından gelenler olup inguinal lenf düğümlerine açılırlar.⁷ (Şekil 2.1)

Yüzeyel lenfatiklerde kapakçıklar 1-2 milimetre aralıklar ile yerleşim göstermiştir ve kapakçıklar arası mesafe lenfatığın lümeninin çapının artması ile ters orantı göstererek azalır.^{7,10,11}

Derin Lenfatikler: Derin lenfatikler yüzeyel ile derin fasyanın arasında yer alıp, fasya profunda'nın daha derininde yer alan yapıların lenfasını taşır. Bölgesel olarak yerleşim gösteren büyük kan damarlarına eşlik ederler. Derin lenf damarlarının duvarları daha kalın olup, duvar yapısında bağ dokusu ve düz kas dokusu bulunmaktadır. Damar duvarında yerleşim gösteren kapakçıklar bulunur. Esasında eklemlerin sinovyal membranlarından başlarlar. Büyük lenf damarlarının içi tamamen sıvı ile dolu değildir, sadece uzun süren tıkanıklık oluştuktan sonra tam doluş gerçekleşir. Lenf damarları birleşerek yerleşim yerine göre farklı olarak isimlendirilen trunkusları oluşturur. Trunkuslar da daha büyük lenf damarlarına dökülürler. İnsan vücudunda yer alan trunkuslar ise duktus torasikus ve sisterna şili'dir.^{5,10,11} (Şekil 2.1)

2.1.2.2.1. Duktus Torasikus

Erişkinde ortalama 38-45 cm uzunluğundadır ve çapı değişkenlik gösterir. Başlangıçta 3-4 mm çapındadır ve ortalarında çapı bir hayli azalır ve sonlanmasına yakın bir bölgede tekrar genişler. Duktus torasikus genellikle kavisli bir yol izler ve aralıklı olarak boğumlanır. Bazı insanlarda varyasyon göstererek orta kısımlarında birbirine eşit olmayan iki farklı dala ayrılır. Bu dallar biraz proksimalde tekrar birleşir ya da birçok farklı dala ayrılarak bir ağ görünümü oluşturur ve venosus dekster 'e dökülür. Duktus torasikusta birçok kapakçık vardır.^{6,9,12}

Duktus Torasikus baş, boyun ve toraks duvarının sağ tarafı, sağ üst ekstremité, sağ akciğer, kalbin sağ tarafı ve karaciğerin diyafragmatik yüzü haraicinde kalan vücut kalan kısımlarının lenfasını taşır. Onikinci torakal vertebra alt kenarından başlayarak boyun köküne kadar uzanır.⁶ (Şekil 2.1)

Birinci ve ikinci lumbal vertebra dolaylarında sisterna şili'nin üst ucundan başlayarak duktus torasikus pars abdominalis, pars torasika, pars servikalıs ve arkus duktus torasi olmak üzere dört bölüme ayrılır.^{9,11,12}

Pars abdominalis bölümü kısadır ve diyafragmayı hiatus aortikus seviyesinde aort ile birlikte ve arkasında olmak üzere geçip toraks boşluğuna ulaşır.

Pars torasika, göğüs boşluğunda aorta ve v. azigos arasında yer alarak arka mediastende ilerler. Burada, arkasında kolumna vertabralıs, sağ interkostal arterler ve ön tarafında v. hemiazigos'un v. azigos'a açılmak üzere sağ tarafa dönen bölümü de vardır. Ön tarafında ise diyafram, özefagus ve sağ plevra boşluğunun bir çıkması ile ayrılmış olup, perikardiyuma komşudur. Pars torasika, beşinci torakal vertebra hizasında sol tarafa doğru dönerek üst mediastene geçer ve yine burada, arkus aorta ve sol a. subklavia'nın göğüs parçasının arkasında ve sol plevra ile özefagusun sol tarafı arasında olmak üzere yukarı çıkar ve apertura torasik superior'a ulaşır.^{7,12}

Pars servikalise ise yedinci servikal vertebra'nın prosesus transversus'u seviyesinde laterale doğru yaptığı kavisten ötürü arkus duktus torasi adı verilir. Bu kavis klavikula'nın 3-4 cm yukarısına kadar çıkar. Arkus duktus torasi'nin arka tarafında a. subclavia, a. ve v. vertebralis, trunkus tiroservikalıs ve dalları da bulunmaktadır. Bu kavis aynı zamanda a. karotis kommunis, n. vagus ve v. jugularıs interna'nın arkasından da geçmektedir. Duktus torasikus v. jugularıs interna ile v. subklavia'nın birleşme yeri olan angulus venosus sinistra'ya yani diğer adı ile Pirogow Açığı'na açılır.^{7,13}

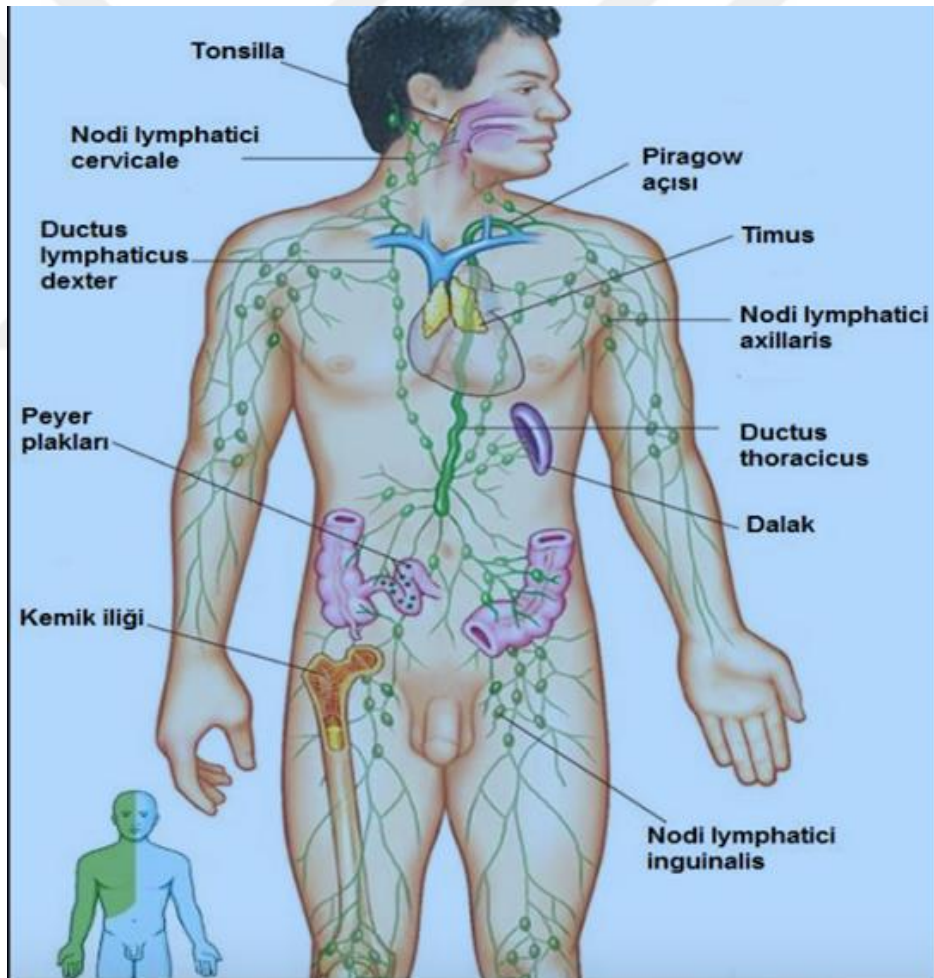
Duktus torasikus ince duvarlı ve renksiz olduğundan mediastinum arka kısmında yapılan tanı amaçlı girişimlerde veya cerrahi işlemlerde yaralanması olasıdır. Duktus torasikus' un laserasyonuna bağlı olarak 75-200 ml arasında lenf sıvısı toraks boşluğuna sızabilir. Lenf sıvısı plevral boşluklara da sızarak şilotoraksa sebep olur.⁶

Duktus Lenfatikus Dekster (Duktus Torasikus Dekster): Yaklaşık 1,3 cm uzunluğundadır ve boyun kökündeki sağ musculus skalenius anterior 'un iç yan kenarı boyunca uzanır. Sağ angulus venosus'a açılmaktadır. Döküldüğü alanda sahip olduğu iki adet kapakçık ile venöz kanın lenf damarına geçişini engeller.^{6,7,9}

Sisterna Şili (Pecquet Sisternası): Duktus Torasikus'a kıyasla daha geniştir. Uzunluğu 6-7 cm'dir, birinci ve ikinci lumbal vertebra korpuslarının ön kısmında yer

alan trunkus lumbalis dekster, trunkus lumbalis sinister, trunkus intestinalis'in birleşmesi ile oluşur. Trunkus lumbalis'ler ise nodi aortiki laterales'ten çıkan efferent lenfatiklerin birleşmesi ile oluşur. Bunlar alt ekstremitelerden, pelvis organları ve duvarından, böbreklerden, böbrek üstü bezlerinden ve karın duvarının büyük bölümünden gelen derin lenfayı toplar.⁶

Trunkus intestinales karın boşluğundaki organların büyük bir kısmından başta mide, olmak üzere bağırsaklar, pankreas, dalak ve karaciğerin alt yüzünden lenfatik damarları toplar. Bazı insanlarda sisterna şili olmaz, fonksiyonu ise duktus torasikus tarafından birkaç kök halinde bir lenfatik ağ şeklinde başlayabilir.^{7,14,16}



Şekil 2.1. Vücudumuzda Bulunan Lenfatik Yapılar

(Rovenska E. ve ark., Lymphatic vessels: structure and function. IMAJ 2011; 13 (12): 762-8.)

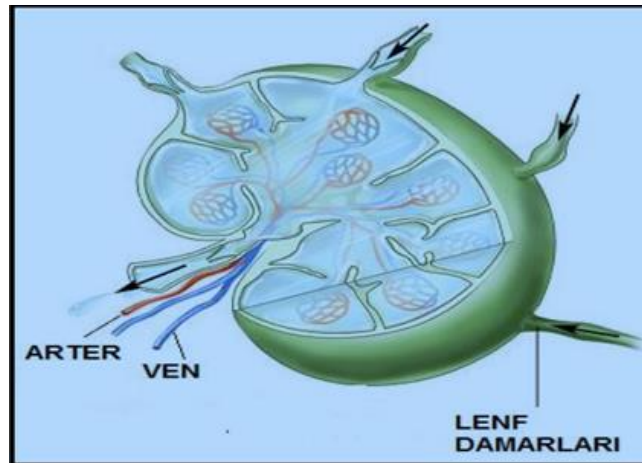
2.1.3. Lenf Düğümleri ve Lenfatik Organlar Lenf Düğümleri

Lenf düğümleri lenfatiklerin seyri boyunca dizili olan, 1-25 mm boyutlarında; kapsüllü, gri- pembe renkli oval yapılardır. Boyun, koltuk altı, kasık, mezenter ve büyük damarların etrafında kümeler oluştururak dağılım gösterirler.^{14,15}

Lenf düğümleri içerisindeki lenfatik sıvı akışı yavaş olduğu için primer tümörden uzağa göç eden kanser hücreleri, enfeksiyonlar ve diğer patolojik oluşumlar düğümlerde tutularak lenf düğümlerinde sertlik veya hassasiyet oluşturabilirler. Primer olarak lenf düğümlerinden çıkan malignitelere lenfoma ismi verilmektedir.⁶

Genel olarak lenf sıvısı, ana lenf kanalına ulaşana kadar bir veya birden fazla lenf düğümünden geçer. Ancak tiroid bezi, özefagus ve karaciğer ligamentlerinin lenfasını boşaltan bazı lenf damarları, lenf düğümlerinden geçmeden direkt olarak duktus torasikusa dökülürler. Bir lenf düğümüne birden fazla sayıda lenf damarı uğrar. Büyük lenf düğümlerinde ise kan damarlarının da uğradığı ve efferent lenf damarının çıktığı hilum bölümü bulunur.^{10,11} (Şekil 2.2)

Lenf düğümlerinin dış çekirdek- kortikal ve iç çekirdek- meduller olmak üzere iki tabakası vardır ve bu tabakalar retiküler bağ dokusu elemanlarından oluşmaktadır. Kortikal tabakada lenfositler kümelenerek lenf foliküllerini oluşturmaktadır. Her folikülün merkezi lenfoblastlardan oluşur. Lenfoblastların bulunduğu bölüme germinal merkez ismi verilir.^{13,16}



Şekil 2.2. Lenf Düğümü Yapısı

(Gövsü Gökmen F. Sistematik Anatomi. İzmir: İzmir Güven Kitabevi, 2003: 373-402.)

2.1.3.1. Timus

Üst mediasten’ de yerleşmiş olan primer lenfoid organdır. Ön mediasten’ de manibrum sterninin arkasında ve perikardın önünde yer alır. Üçüncü yutak kavsinin ön çıkıntısından oluşur. Özellikle puberte sonrasında hacminde azalma izlenir ve zamanla parankimi yağ dokusuna farklılaşır.¹⁷

Timus iki lobludur ve her lobulu içerisinde lenfositlerin daha yoğun bulunduğu korteks ile merkezi kısmını oluşturan medulladan oluşur. Medullada timusa özgü timik cisimcikler olan (Hassal korpüskülleri) bulunur.¹⁷

Timus kemik iliğinde yapılan lenfositleri T lenfositlerine dönüştürerek hücrel immunitiyi sağlar. Lenfosit sentezini medullası tarafından salgılanan bir büyüme faktörü olan lenfopoetini salgılayarak kontrol eder. Yeni doğanda lenfoid organların gelişimi için mutlak surette gereklidir. Timus’un hipoplazisi veya aplazisi görülebilir. Hipoplazisine; Timik Hipoplazi (Di George Sendromu) denir. Timus aplazisine sahip yenidoğanlara ölü doğmuş bebeklerden alınan timus dokusunun transplantasyonu yapılabilir. Otoimmün hastalıklarda timus yapısı bozulur.^{6,17}

2.1.3.2. Tonsilla

Bölgesel lenf düğümlerinin dışında yabancı antijen veya mikroorganizmaların en sık giriş yolları olan sindirim sistemi, solunum sistemi ve genitoüriner sistem mukozalarının altında lenfoid dokular yer almaktadır. Mukoza altındaki bu lenfoid dokular mukozayı iterek makroskobik olarak görünen ve tonsilla olarak adlandırılan yapıları oluşturur. Tonsillalar özellikle nazofarenks ve orofarenkste bulunur. Farinksin üst bölümünde Anulus Lenfoideus Farinks (Waldeyer’in lenfatik halkası) denilen lenfoid savunma halkası vardır. İnkomplet sirküler bir lenfoid doku bandından ibaret olan bu tonsiller halkayı; Tonsilla Faringea (Tonsilla Adenoidea), Tonsilla Palatina, Tonsilla Tubarya (Gerlach Bademciği) ve Tonsilla Lingualis oluşturur. İnflamasyonu sonucunda hava yolunu tıkanabilir ardından da ağızdan nefes alma ve horlama gibi rahatsızlıklar oluşabilir. Tonsilla Faringea’da yer alan enfeksiyon yayılıp Tonsilla Tubarya’ yı büyütür ve otitis media ile sağırlık oluşabilir.^{6,14,16}

2.1.3.3. Dalak

Diyafraamın altında intraperitoneal olarak yerleşmiş olup vücudumuzun en büyük lenfoid organıdır. Hilum splenikum haricinde tamamen periton ile sarılmıştır. Damardan zengin, koyu mor renkli bir organdır. Dokuz, on ve on birinci kaburgalar ile komşudur. Bu kaburgalardan diyafraam sayesinde ayrılır. Önde mide, pankreas, aşağıda fleksura koli sinistra, iç yanda sol böbrek sınırlarını oluşturur.^{18,19}

Dalak, fibröz kapsül ile kaplıdır. Kapsülden derine doğru dallanıp anastomoz yapan uzantılar yani trabeküller çıkar. Bunlar hilus yakınında büyük damar dallarını içermektedir. Dalak parenkimi ise esasen kapsül ve trabekülaların arasını dolduran bir retiküler bağ dokusudur. Dalak parenkiminde lenfatik bulunmaz.^{18,19}

Dalak kırmızı pulpa ve beyaz pulpa olmak üzere histolojik olarak iki farklı kesitte incelenir. Kırmızı pulpa koyu renklidir ve içerisinde bol miktarda hasarlı eritrosit bulunan venöz sinüzoidlerden oluşur. Beyaz pulpa soluk renklidir ve a. santralis çevresinde yer alan lenfoid dokudur. Bu dokuda arteriolün hemen çevresinde T lenfositleri kümelenmiş vaziyette gözlemlenir. Ayrıca beyaz pulpa içinde B lenfositlerinin oluşturduğu foliküller ve ek olarak antijen sunan hücreler ve makrofajlar da bulunmaktadır.^{18,19}

Dalak; intrauterin dönemde eritrosit üretirken, doğumdan sonra bu fonksiyonunu kaybeder. Miyeloskleroz gibi lenfoproliferatif neoplazmlarda tekrar fonksiyon kazanır. Dalak kan hücreleri için bir yıkım merkezidir. Ayrıca kan hücrelerinden antikorla kaplı olanları ya da bozuk yapıda olanları vücuttan uzaklaştırır.^{18,19}

2.1.4. Lenfatik Sistem Görevleri ve Fizyolojisi

Lenfatik sistemin üç temel görevi vardır.

- Dokuların sıvı dengesinin ayarlanmasına yardım eder. Protein ve lipid gibi nütrisyonel elementlerin kandan periferik dokulara iletimini ve emilimini kontrol eder. Ayrıca sitokin ve kemokinlerin interstisyel aralıktan lenfatik damarlara taşınmasında görev alır.²⁰

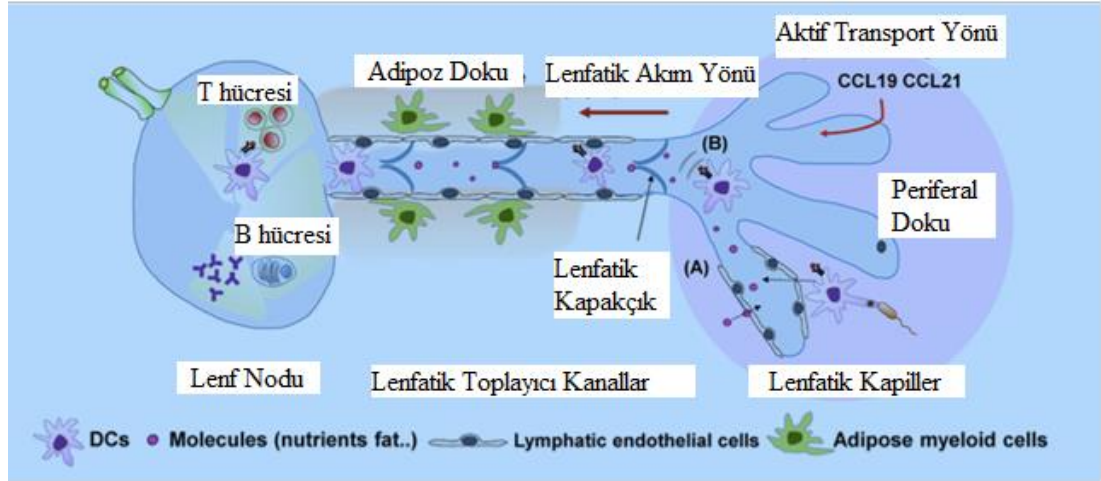
- Lenfatik sistem, immun sistem trafiğinde önemli bir duraktır. Yabancı antijenler; lenfositler ile dendritik hücrelere kemokinler aracılığı ile lenfatik kapillerler üzerinden sunulurlar. Lenf düğümleri vücuda giren organik veya organik olmayan yabancı yapıların vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar.¹
- Doku sıvısının hemostazında rol alır. Lenfatik sıvıyı torasik lenfatik duktuslara aktarır ve burdan tekrar sistemik dolaşıma verir. Bu lenfatik sıvı osmotik gradientler ve kan sıvı bariyeri ile sitokin, kemokin ve makromolekül transportunda rol alır.²⁰

Normal koşullarda gün içerisinde 2-4 litreye kadar ulaşan lenf akımı sayesinde kana tekrar geri dönen protein miktarı, dolaşımdaki toplam plazma protein miktarının % 25-50'si kadardır.⁶

Lenf akımını sağlayan lenfa, lenfosit hücrelerini içeren, kan plazmasına benzeyen şeffaf, renksiz bir akışkandır. Plazma ile mukayese edildiğinde daha düşük oranda tuz ve albümin içerir. Lenf sıvısı interstisyel alandaki sıvının lenf kapilleri endotelinden lümeneye geçmesi sonucunda oluşur. Doku içi basınç artışına ikincil olarak lenfa sentezi de artar. Lenfanın içeriği vücudun farklı bölgelerinde kimyasal ve histolojik farklılıklar gösterir. Bağırsaklardan gelen "lakteal" adı verilen lenfa en farklı yapıdaki lenfatikleri içeren sıvıdır. Lakteal emülsiyon şeklindeki yağ partiküllerini içerdiği için bulanık renkte görülür. Lakteal içerisindeki lenfaya "şilöz" adı da verilir. Lenfa venöz sisteme geri dönüşünü gerçekleştirmeden önce sinüslerde temizlenir.⁶

Lenf sıvısının venlere akışı bazı etmenlere bağlıdır. Bu etmenlerden belki de en mühim olanı kan kapillerlerinden süzülen lenfatik sıvının neticesinde oluşan yüksek filtrasyon basıncıdır. Periferden santrale doğru meydana gelen lenf akımı çoğunlukla basınç değişikliklerinden etkilenir ve basıncın yüksek olduğu yerden düşük olduğu yere doğru hareket gösterir.^{4,10,11} (Şekil 2.3)

Lenf damarlarına yakın yerleşim gösteren kasların kasılması ve arterlerin pulsasyonuna ek olarak lenf damarı duvarındaki düz kasların kasılması basınç değişikliklerine neden olur. Solunum hareketleri adeta lenf akımı için bir pompa vazifesi görür ve ek olarak abdominal basınç da sisterna şili üzerinde gerçek bir basınç etkisi yaratır.^{6,14,21}



Şekil 2.3. Lenfatik Sıvı Akış Seması

(A) Aktive olan Dendritik hücreler lenfatik kapilerlere CCR-7 bağımlı, integrin bağımsız yolla girerler. Protein ve lipidler lenfatik kapilerler tarafından emilir. (B) Kapillerlerde LEC ve dendritik hücreler (DC) kemokinler aracılığı ile yönlendirirler. (C) DC'ler toplayıcı kanallara girdiğinde adipoz myeloid hücreler ve toplayıcı endotelial hücreler aracılığıyla lenfatik akım sağlanır. Böylece dendritik hücrelerden lenf noduna pasif drenaj gerçekleşmiş olur. (Kim K.W. ve ark., Emerging Roles of Lymphatic Vasculature in Immunity. Immune Netw., 2017 Feb; 17 (1):68–76.)

Basitçe lenfödem nasıl oluşur diye bir soru sorarsak aslında yanıtını bulmak o kadar da zor olmaz. Lenf damarlarının taşıma kapasitesi aşıldığında, anormal oluşmuş lenf damarı veya lenf nodlarına bağlı tıkanıklık neticesinde hücreler arası sıvı birikimi oluşur ve bu duruma lenfödem denir. Lenfödem sonucu farklı yapıdaki plazma proteinleri, lenfosit hücreleri, immünglobinler ve de sitokinler birikir. Bu maddeler cilt- cilt altı doku bileşim hattında kronik inflamatuvar değişikliklerin oluşmasına neden olur. Lenfödem neticesinde bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar, kronik inflamasyon ve neoplazmlar kolaylıkla meydana gelebilir. Ayrıca Turner Sendromu, Klinefelter Sendromu, Meige's Sendromu gibi birçok kalıtsal hastalıkta konjenital lenfödem kliniği mevcuttur.^{6,7,16}

2.2. Lenfanjiogenez

2.2.1. Lenfatik Sistem Gelişimi ve Embriyogenez

Sistemik vasküler sisteme paralel seyreden lenfatik sistem; yaklaşık dört yüzyıl önce Gasparo Aselli tarafından keşfedilmiştir. İtalyan anatomist bir köpeğin

diseksiyonu esnasında karında mezenter etrafındaki beyaz ağsı, damarsı yapıları fark etmiş ve bu yapıları keserek süt benzeri şilöz bir sıvının geldiğini görmüştür, kandan farklı yapıda olan bu sıvının farklı bir sisteme ait olduğunu düşünmüştür.

William Harvey ise lenfatik sistemin bulunmasından daha önceki tarihlerde sistemik dolaşımı bulmuştur. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda lenfatik sistem ikinci plana atılmış ve kan dolaşımına yönelik çalışmalar ön planda olmuştur. Belki de bu yüzden lenfatik sistem hala gizemini korumaktadır.

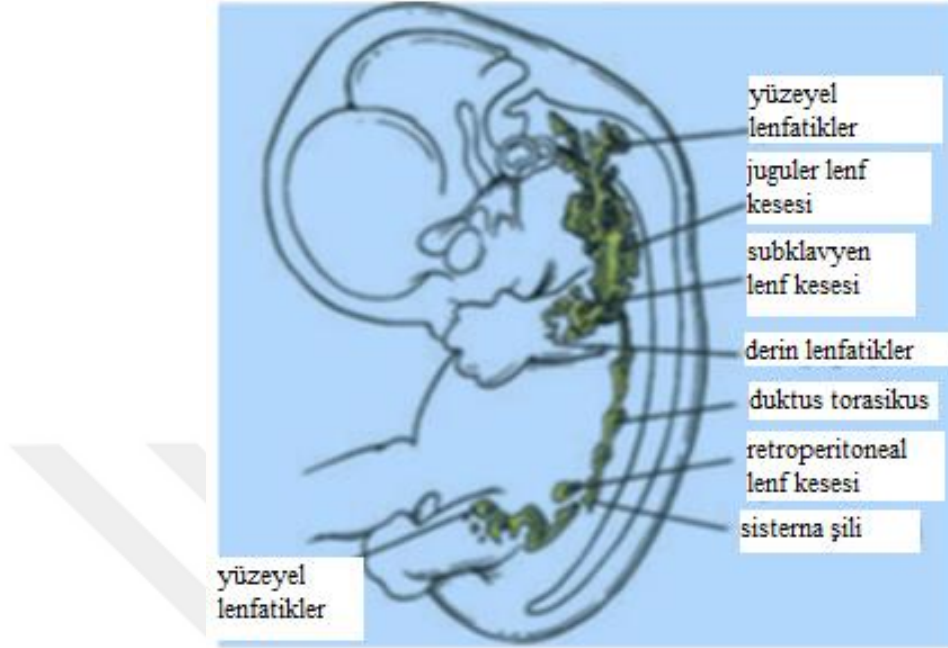
Şu ana kadar lenfanjiogenez ile ilgili iki teori ortaya atılmıştır. Bu teoriler sentrifugal ve sentripedal teorilerdir. Sentrifugal teoride lenfatik keseler venöz endotelden bağımsız olarak gelişmiş olup çevre doku ve organların endotel hücrelerine lokal lenfatik kapiller ağlar yardımı ile ilerler. Bir başka deyişle lenfatik endotelin lenfanjiyoblastlardan, kan damarı endotelinin ise anjiyoblastlardan *de-novo* olarak şekillenmesi söz konusudur.²²

Sentripedal teoride ise mevcut venüler ağdan lenfatik damar oluşumu başlar ve primitif lenfatik keseler venlerden gelişir ve kan kapillerleri ise venlerden bağımsız olarak anjiogenez yolu ile meydana gelir. Bu teori Sabin tarafından ortaya atılmıştır ve birçok otorite tarafından daha geçerli olduğu öngörülmektedir. Bazı teorisyenler bu iki teorinin de doğru olduğunu düşünmektedir.^{22,23}

Lenfatik sistem kardiyovasküler sistem gelişiminin ardından oluşmaya başlar ki bu dönem gestasyon sonrasındaki 6. haftaya tekabül eder. Lenfatik damarlar bölgesel mezenkimal dokulardan veya venöz endotelden çıkan kese benzeri oluşumlardan meydana gelir. İki tane juguler lenf kesesi, iki tane iliak lenf kesesi, bir tane retroperitoneal lenf kesesi ve bir tane de sisterna şili adlı lenf kesesi olmak üzere toplamda altı tane birincil lenf kesesi vardır. Lenfatik keseler kendi aralarında sayısız lenfatik kanallarla birleşirler. Bu lenfatik kanallar anastomoz yaparak iki ana kanal ile duktus torasikus oluşturur. Duktus torasikus venöz sistemle bağlantı kurar.⁶ (Şekil 2.4)

Lenfatik keseler embriyogenezin erken fetal dönemi esnasında bir grup lenf düğümüne dönüşür. Bu dönüşüm sisterna şili'nin üst kısmında görülmez. Mezenşimal hücreler tüm lenfatik keselere girer ve boşluğun içinde lenfatik kanal ağı şeklinde

bölünerek lenf sinüslerini oluştururlar. Diğer mezenşimal hücreler ise, lenf düğümünün kapsülünü ve bağ dokusunun çerçevesini yaparlar.^{5,24}

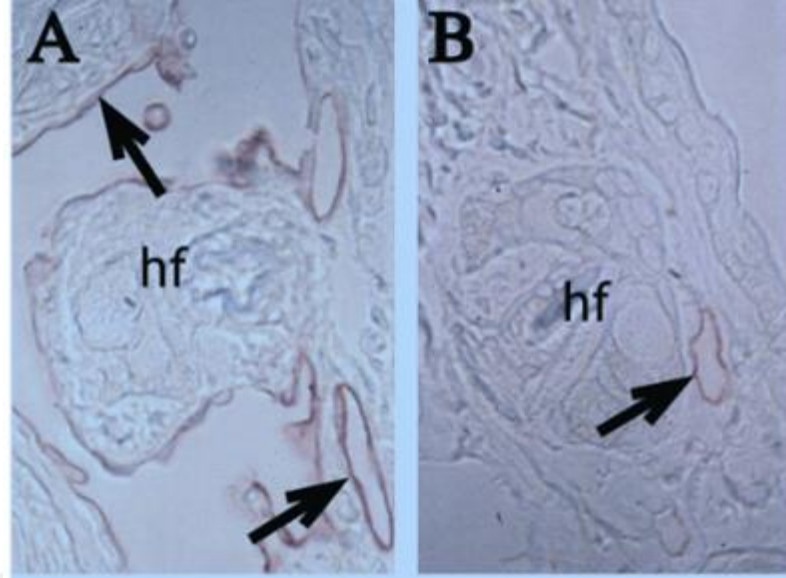


Şekil 2.4. İnsan Embriyosu Görünümü

(Iwasaki D.ve ark., Establishment of an Acquired Lymphedema Model in the Mouse Hindlimb: Technical Refinement and Molecular Characteristics.Plast Reconstr Surg,2017 Jan; 139 (1):67-78.)

Son çalışmalar göstermiştir ki memelilerde lenfatik endotel kapillerleri (LEC) embriyonik venlerden diferansiyasyon yolu ile oluşur. LEC'lerin diferansiyasyon sırasında Homeodomain Transkripsiyon Faktör (Prox1) bulunması gereklidir. Prox1 kan elemanlarının diferansiyasyonunu bloke eder ve VEGFR- 3 ekspresyonunu arttırarak LEC yaşamsallığını, migrasyonunu ve proliferasyonunu sağlar. Embriyogenez esnasında lenfatik işaretleyici olan Lenfatik Damar Endotelial Hyaluronan Reseptör 1 (LVYE-1) lenfatik damar ağında yerini almaya başlar. *İn vivo* çalışmalarda Prox1 geninin de lenfatik gelişim esnasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir.²⁶ (Şekil 2.5)

Son çalışmalarda; kullanılan yeni histokimyasal yöntemlerin de yardımıyla lenfatik kapillerler ve kan damarları kapillerleri seviyesinde dahi artık ayırım yapılabilmektedir. Kan damarlarının aksine lenfatiklerde perisitler yoktur ve lenfatik endotel hücreleri lenfanjiogenez esnasında önemli rol oynamaktadır.²²



Şekil 2.5. A. VEGFR-3 enjekte edilen fare lenfatik damarları, B: Normal fare lenfatik damarları

(Choi I., ve ark., Visualization of lymphatic vessels by Prox1-promoter directed GFP reporter in a bacterial artificial chromosome-based transgenic mouse. *Blood*, 2011; 117: 362-365.)

2.2.2. Lenfatik Endotel Hücre Belirteçleri

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ailesi; VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasental Büyüme Faktörünü (PlGF) içermektedir. Bu büyüme faktörleri tirozin kinaz reseptör ailesine bağlanarak etki gösterirler. Böylece embriyonik hücre büyümesi, diferansiyasyonu, yeniden şekillendirilmesi ve regülasyonu sağlanmaktadır. VEGF reseptör ailesi ise; Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Reseptörü -1 (VEGFR-1) (diğer adı ile Flt-1), Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Reseptörü-3 (VEGFR-3) (diğer adı ile Flt4)'ü içermektedir. Ayrıca Nörofilin 1 (NRP-1) ve Nörofilin 2 (NRP-2) yüksek affiniteli non-tirozin kinaz reseptör ailesi olup endotelial ve nöronal hücre yüzeylerinde bulunan VEGF' lere bağlanırlar.²³

1995 yılında bulunan VEGFR-3 lenfatik damarlar için spesifik büyüme faktörüdür. Ardından yapılan çalışmalar ile diğer faktörler keşfedilmiş ve bu keşifte lenfatik dolaşımın sistemik dolaşıma paralel seyretmesinden faydalanılmıştır. Sistemik dolaşım belirteçleri üzerinden lenfatik sistem belirteçleri bulunmuştur.²³

2.2.2.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörleri (VEGF)

VEGF 1989 yılında major vaskülogenez ve anjiogenez düzenleyicisi olarak bulunmuştur. Keşfedildiği esnada kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlattığı için Vasküler Permeabilite Faktörü olarak isimlendirilmiştir. Endotel hücrelerinde VEGFR-1 ve VEGFR-2' ye bağlanarak etki gösterir. Etkisi ile endotel hücrelerinin yaşamsallığını; endotel hücrelerinden antiapoptotik faktör salınımı üzerinden sağlamaktadır. Böylece endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve diferansiyasyonuna sebep olur. Yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki tek bir allelinin bile aktif olmaması fare embriyolarında ölüm ile sonuçlanmaktadır. Psöriyazis, Romatoid Artrit ve Proliferatif Retinopati gibi hastalık süreçlerinde VEGF disfonksiyonu söz konusudur.²³

VEGF-A: VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen altı adet alt tipi vardır. Bunlar VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 ve VEGF206 olarak adlandırılmışlardır ve adlandırıldıkları sayılar içerdikleri aminoasit sayılarını belirtmektedir. Anjiogenezin sağlanması ve damarsal geçirgenliğin artırılmasında önemli rol oynarlar. Yeni damar oluşumu ile hematogen metastazlarda etkindirler.²³ (Şekil 2.6)

VEGF-B: Myokard, kemik, pankreas, böbrek üstü bezi ve birçok damarın düz kas tabakasında bulunur. Zayıf mitojen etki göstermektedir ve biyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda farelerde VEGF-B eksikliği oluşturulmuş; sağlıklı ve fertil fareler elde edilmiş sadece deney hayvanlarının bir kısmında 1. derece AV Blok bildirilmiştir.²³ (Şekil 2.6)

PIGF: PIGF insan plasentasından keşfedilmiş olup %50 oranında VEGF ile yapısal benzerlik gösterir. PIGF membrana bağlı VEGFR-1' i aktive etmekte ve VEGF' nin anjiogenik yanıt potansiyelini arttırmaktadır. Tümöre bağlı neovaskülarizasyon sonucu gerçekleşen patolojik damar oluşumunu inhibe etmekte ve kanser terapileri için bir umut olarak araştırılmaktadır.²³ (Şekil 2.6)

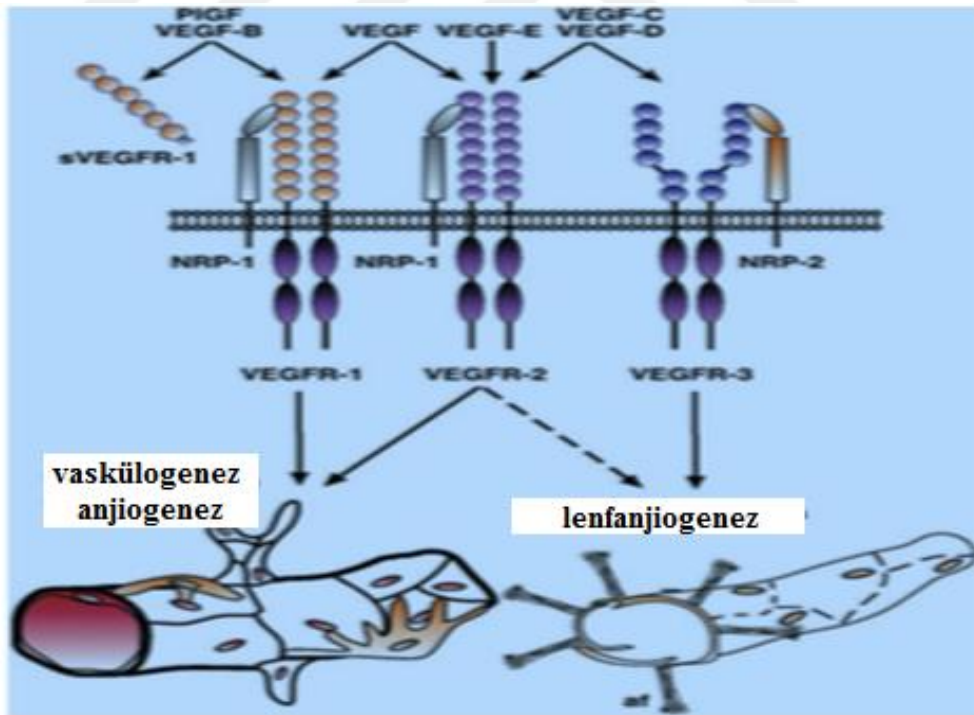
VEGF- C ve VEGF-D: VEGF-C insan prostat hücrelerinden kolonize edilmiş olup, %30 oranında VEGF165 ile benzerlik göstermektedir. VEGFR-2 ve VEGFR-3' e bağlanarak VEGF gibi endotel hücre migrasyonunu, proliferasyonunu ve vasküler permeabiliteyi arttırmaktadır. VEGF'nin aksine hipoksi ile indüklenmeyip

proinflamatuar sitokin yanıtları ile indüklenmektedir. Bu durumda inflamatuvar süreçteki rolünü daha iyi ortaya koymaktadır.²³

VEGF-C ve VEGFR-3 embriyogenezin erken safhalarında salınarak lenfojeniz, vaskülojeniz ve anjiogenezde etkin rol oynamaktadır.²³

VEGF- D (diğer adı ile *c-fos-induced factor* ya da FIGF) en son keşfedilen VEGF ailesi üyesidir. VEGF-C ile %61 oranında yapısal benzerlik gösterir. Farelerde sadece VEGFR-3' e bağlanır ve belki de bu durum insanlarda ve farelerde farklı etki göstermesinin sebebidir. Deri keratinositlerinden aşırı salınımı ile lenfojenik etki göstermektedir. *İn-vivo* ve *in-vitro* çalışmalarda anjiogenik etkinliği kanıtlanmıştır.²³ (Şekil 2.6)

VEGF- E: Yakın zamanda *parapoxvirus* genomundan izole edilmiştir. Bu orf virüsü insanları ve koyunları enfekte ederek ciddi kapiller proliferasyonu ve dilatasyonunun gözlemlendiği cilt lezyonlarına sebep olmaktadır.²³ (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. VEGF'lerin PIGF ile bağlandıkları reseptör aileleri ve nihai etkileri

(Jussila L. ve ark., Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*, 2002 Jul; 82 (3):673-700.)

Hipoksi; VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiyogenezi başlatan en etkili uyarıcıdır. Tümörler hızlı katabolizmaları ile hipoksik bir çevre oluşturmakta ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF salınımı ve buna ikincil gelişen neovaskülarizasyon bu hipotezi desteklemektedir. Koroner tıkanıklığa ikincil olarak da hipoksi ve sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF' ü artırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmıştır. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, Karbonmonoksit (CO) tarafından da inhibe edilmektedir. Hipoksinin yanında azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır.²³

VEGF-C ise VEGF'nin aksine hipoksi ile indüklenmeyip proinflamatuvar sitokin yanıtları ile indüklenmektedir. Bu durum da inflamatuvar süreçteki rolünü daha iyi ortaya koymaktadır.²³

2.2.2.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörleri

VEGFR ailesi yedi farklı ekstraselüler *Immunoglobulin homolog domain*'inden oluşur. İkinci ve üçüncü *domainler* büyüme faktörlerine olan afiniteden sorumludur.

VEGFR-1 ve VEGFR-2 kan damarlarının, endotel hücrelerinin; proliferasyonunda, migrasyonunda ve yaşamsallığında söz sahibidir.

VEGFR-1: Monosit, makrofaj, plasental trofoblast ve renal mezenkimal hücrelerden salınmaktadır. VEGFR-1 tanımlanan ilk VEGFR' dir ve VEGF' e karşı en yüksek afiniteye sahiptir. VEGFR-1, VEGF dışında PIGF ve VEGF-B gibi benzer büyüme faktörleri tarafından da paylaşılmaktadır. VEGFR-1 vaskülogenez süresince esansiyeldir, mezenkimal hücrelerin hemanjiyoblast haline gelebilmek için VEGFR-1 'in gerekli olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.³ (Şekil 2.7)

VEGFR-2: Hematopoetik kök hücreler, megakaryositler, trombositler ve retinal progenitör hücrelerden salınmaktadır. VEGF-C ve VEGF-D için reseptör görevi görmektedir. İnsanlarda tirozin kinaz reseptörleri için yapılan endotelyal cDNA taramaları sırasında tanımlanan bu reseptör, daha önceden keşfedilmiş olan fare fetal karaciğer kinazı-I (Flk- 1) ile %85 oranında benzer bir yapıya sahiptir. VEGFR-2

oluşturamayan fareler, endotelial ve hematopoetik prekürsörlerin gelişiminde çeşitli defektler göstererek embriyo halinde iken 9. günde ölmektedir. VEGFR-1 her ne kadar VEGF için daha yüksek bir afiniteye sahip olsa da, VEGFR-2 ligandı ile bağlandıktan sonra tirozin ile çok daha etkin bir şekilde fosforile edilir. Sonrasında intrasellüler pek çok yolak aktive olur ve endotel hücrelerinde mitojenez, kemotaksis ve morfolojik değişikliklere sebep olur.²⁸ (Şekil 2.7)

VEGFR-3: İnsan lösemi hücre hattından ve insan plasentasında izole edilmiştir. Diğer adı ile '*fms- like tyrosine kinase 4*' (*Flt-4*) olarak da isimlendirilir. VEGFR-3, yalnızca endotel hücrelerinde bulunduğu düşünülen bir tirozin kinaz reseptörüdür ve ligandları büyüme faktörlerinden VEGF-C ve VEGF-D' dir. Alitalo ve ark'nın 2002'de VEGF-C' yi lenfanjiogenik bir faktör olarak tanımlamalarından sonra lenfatik damarlara özel belirteçlerden biri olarak kullanılmaya başlanmıştır.²³

VEGFR-3, LYVE-1' in aksine, embriyogenez esnasında primitif kan ve lenf damarlarında yüksek oranda bulunur ve bu sebeple her iki damar yapısının gelişiminde kritik rol oynar. VEGFR-3, lenfatik endotel hücrelerinin proliferasyonu ve lenfatik damarların şekillenmesinde kullanılan moleküler mekanizmalarda da söz sahibidir.²³ (Tablo 2.1)

Transgenik fare modelinde solubl VEGFR-3- Ig füzyon proteininin fazla miktarda sekrete olması sağlandığında, deride dermal lenfatiklerin oluşmadığı, daha derinlerde bulunan lenfatik damarların ise hipoplastik olduğu görülmüştür. VEGFR-3'deki *missens* mutasyonlar herediter lenfödem ile ilişkilendirilmiş benzer bir durumun fare lenfödem modelinde de olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise deneysel, fare kornea transplantasyon modeli oluşturulmuş ve VEGFR-3' ün adaptif immunitede görev aldığı sonucuna varılmıştır.²⁷⁻³⁰

VEGFR-3' ün, tümör dokusu içinde yeni damarların oluşumu sırasında proliferen kan kapillerinde, yara granülasyon dokusu içinde ve fenestrasyon özelliğine sahip bazı kan damarlarında da eksprese olduğu gösterilmiştir.^{31,32}

Bu bilgiler ışığında VEGFR-3, tek başına lenfatik damar belirteci olarak kullanılması için gerekli olan özgüllüğe sahip olmadığı düşünülmektedir.³³

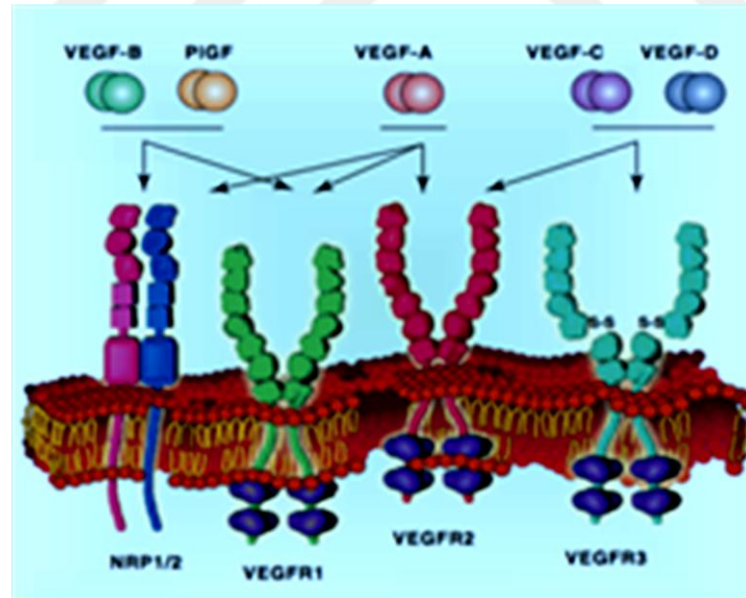
Kabaca özet geçmek gerekirse VEGF alt tipleri VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerine bağlanarak anjiogenez, VEGF-C ise VEGFR-2 ve VEGFR-3

reseptörlerine bağlanarak anjiogenez ve lenfanjiogenez yolağında etki gösterir. VEGF-C' nin VEGFR-3' e afinitesi VEGFR-2 ile kıyaslandığı zaman kırk kat daha fazladır. Ek olarak VEGFR-3 lenfatik endotelde daha fazla bulunurken kan damarı endotelinde pek bulunmaz.³⁴

Erişkin modellerde VEGFR-3 sinyali; LEC ve monositlerde sınırlı iken, embriyo modellerinde embriyogenezin başlangıcında VEGFR-3 ekspresyonu tüm vasküler sistem tarafından sağlanırken, gelişmenin ilerlemesi ile kan damarlarındaki ekspresyonu düşüp lenfatik damar ekspresyonu ile sınırlı kalmaktadır.²³

Yani özet olarak VEGFR-3' ün iki farklı rolü vardır. Embriyogenez esnasında önce vaskülogenezde rol alır ardından bu görevini sonlandırıp yine embriyogenez esnasında lenfatik damar proliferasyonunu sağlar. Erişkin dönemde ise sadece lenfatik damar regülasyonunu sağlar.²³ (Şekil 2.7)

Çalışmalar göstermiştir ki VEGFR-2 LEC maksimum aktivasyonu ve yaşamsallığı için önem teşkil etmektedir.^{35,36}



Şekil 2.7. VEGF'lerin bağlandıkları reseptörler

VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1, NRP-2 olmak üzere 5 reseptöre bağlanırlar. VEGF-A; VEGFR-1, VEGFR-2 ve NRP 1/2'ye, VEGF-B ve PlGF; VEGFR-1 ve NRP 1/2'ye, VEGF-C ve VEGF-D; VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanır.

(Iwasaki D.ve ark., Establishment of an Acquired Lymphedema Model in the Mouse Hindlimb: Technical Refinement and Molecular Characteristics. *Plast Reconstr Surg*,2017 Jan; 139 (1):67-78.)

2.2.2.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Benzerleri

NRP-1 ve NRP-2: Akson rejenerasyonu ve anjiyogenez regülasyonu için gerekli transmembran proteinleridir. VEGF, VEGF-E, PlGF-2 ve VEGF-B' ye bağlanarak etki gösterirler. NRP-2 ve ona bağlanan VEGF-C' nin VEGFR-3 ekspresyonunu arttırmakta olduğu bildirilmiştir.²⁹ (Şekil 2.7)

2.2.2.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Anjiyogenez, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim ve tümörogenezde görev alır. FGF-1 ve FGF-2 olmak üzere iki esas grubu vardır ve toplamda yirmi iki adet alt tipi mevcuttur.

Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü (FGFR) ailesinin 4 üyesi bulunmaktadır: FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 ve FGFR-4. Genellikle mitojen olarak etki göstermelerine rağmen düzenleyici, morfolojik ve endokrin etkileri de vardır. FGF' lerin görevleri; mezoderm indüksiyonu, ekstremitelerin oluşumu, nöral indüksiyon, beyin gelişimi, dokularda anjiyogenez, keratinosit organizasyonu ve yara iyileşmesidir.³

2.2.2.5. Tip 1 Kollajen

Bağ dokunun esas proteini ve memelilerde en çok bulunan protein olan tip 1 kollajen, insan vücudunda da en çok bulunan kollajen tipidir. Tip 1 kollajenin sentezi, yara iyileşmesi doku morfogenezi ve fibrozisini içeren birçok biyolojik olayda artar. Skar dokusunda bulunur.³

2.2.2.6. Podoplanin

Glomerüler podosit membran glikoproteinidir ve glomerüler filtrasyonu düzenler. VEGFR-3 ile birlikte LEC, benign vasküler tümörlerde ve anjiyosarkomalarda salınımı artmıştır. Ayrıca osteoblastlar, böbrek podositleri ve akciğer alveolar tip 1 hücrelerinden de salınmaktadır. Küçük lenfatik hücrelerde bulunur, lenf düğümlerinde bulunmaz.²³

Biyolojik fonksiyonu bugün için tam olarak bilinmiyor olsa da *in-vitro* çalışmalarda, hücre iskeletini oluşturan moleküllerden biri olan aktini yöneterek hücre hareketlerinde görev aldığı gösterilmiştir. Podoplanin ekspresyonu bulunmayan farelerde lenfödem geliştiği, lenf damarlarının dilate olduğu, sıvı taşınımının bozulduğu ve bu nedenle doğumda solunum yetmezliği ile öldükleri gösterilmiştir.²³ (Tablo 2.1)

2.2.2.7. Prox-1 (Prospero-Related Homeobox 1)

Homeobox transkripsiyon faktörüdür ve lenfatik damar gelişiminde rol alır. Tek bir allelinin eksikliğinde şilöz asit ve neonatal ölüm bildirilmiştir. Lens, kalp, karaciğer, pankreas ve sinir sistemi gibi endotelyal olmayan hücrelerde de bulunabilir.²³

Drosophila melanogaster isimli sirke sineğinde bulunan *prospero* geninin homologue olarak izole edilmiş bir nükleer transkripsiyon faktörüdür. Prox-1 transkripsiyon faktörü genetik olarak çıkarılmış farelerde lenfatik sistemin gelişimini tamamlayamadığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda Prox-1 yokluğunda, LYVE-1' in de içinde bulunduğu lenfatik endotele özgü belirteçlerin ekspresyonu yapılamaz. Buna karşın kan damarlarının belirteçleri eksprese olmaya devam eder. Yani, vasküler belirteçlerden, lenfatik belirteçlerin ekspresyonuna geçişi sağlayan Prox-1' dir.^{3,23}

2.2.2.8. Lenfatik Damar Endotelyal Hyaluronan Reseptör 1 (LVYE-1)

Ekstraselüler matriks ve lenfatik sıvıda bulunan glikozaminoglikanlar için ilgi gösteren bir LEC reseptörüdür. Tip1 integral membran glikoproteini ve ek olarak hyaluronik asit (HA) reseptörüdür. Yapısal olarak CD 44' e %57 oranında benzerlik gösterir. Hyaluronik aside CD 44' ten daha yüksek oranda ilgi ile bağlanır.³⁷

LEC ve lenf düğümü sinüzoidlerine spesifik olarak eksprese olduğu ilk olarak proteinin kendisini de tanımlayan Banerji ve ark. tarafından 1999 yılında immumohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Kan damarı endotelinde saptanamayan ancak deri, intestinal mukoza ve sekonder lenfoid organlarda saptanan LEC' ler karakteristik özellik göstererek boyanmıştır.³⁷ (Tablo 2.1)

Embriyogenez esnasında LYVE-1' in kardinal vende, PROX-1' e benzer şekilde spontan olarak, ilk lenfatik kesenin tomurcuklanmasından hemen önce eksprese olmaya başladığı, erişkin dönemde ise lenfatik damar ve sinüzoidlerinde sekrete olurken Duktus Torasikus' ta bulunmadığı gösterilmiştir.³⁷

Normal kan damarlarında eksprese olmamasına karşın lenfatik endotelde eksprese olması nedeniyle, lenfatik belirteç olarak kullanılabilir.³⁸

LYVE-1' in son çalışmalarda tümör tarafından infiltre edilmiş doku içerisinde bulunan, makrofaj benzeri hücreler üzerinde de bulunduğu gösterilmiştir. Bu hipotez korneal neovaskülarizasyon sırasında oluşan lenfanjiyogenez ve transplant böbrek rejeksiyonu çalışmalarıyla desteklenmiştir. Bu hücrelerin LYVE-1+/CD68+ şeklinde işaretlendiği ve yeni oluşan lenfatik damarların içinde buldukları gösterilmiştir. Bu LYVE-1+ makrofaj benzeri hücrelerin, belki de kemik iliğinden kaynaklanan progenitör hücreler olabileceği ve VEGF-C' nin uyardığı lenfanjiyogenez sırasında lenfatik endotel hücrelerine dönüştüğü bir görüş olarak ileri sürülmüştür.^{3,39}

2.2.2.9. β Kemokin Reseptör 6

Deri, barsaklar ve lenfatik dokularda bulunmaktadır. Lenfatik vasküler yapı ile ilgili fonksiyon göstermektedir. Kan damarı endotelinde bulunmazlar.²³ (Tablo 2.1)

2.2.2.10. Makrofaj Mannoze Reseptörü

LEC, makrofajlarda bulunur. İnflamasyon ve immunitede görevlidir.²³ (Tablo 2.1)

2.2.2.11. 5'Nükleotidaz ve Desmoplakin

Sistemik vasküler dolaşıma ait endotel hücrelerinde olmayıp LEC' de bulunurlar. Bu yerleşimleri LEC' in devamlı bir bazal membrana sahip olmayıp fenestralarının olmasına bağlanmıştır.²³

Desmoplakin LEC' lerin birbirlerine yapışma yerlerindeki sitoplazmik bağlantı proteinleridir. İntermediyan filamentlerle plazma membranlarını birbirine bağlarlar.

Küçük lenfatik damarların belirteci olduğu, fakat daha büyük lenfatik damarlarda eksprese olmadığı gösterilmiştir.²³ (Tablo 2.1)

Tablo 2.1. Lenfanjiogeneizde görevli reseptörler, büyüme ve transkripsiyon faktörleri ve etkileri

Molekül	Protein Sınıfı	Biyolojik Etkisi
VEGFR-3	Endotel hücresi üzerinde tirozin kinaz reseptörü	Lenfanjiogenezis
LVYE-1	ECM GAG reseptörü	Hyalüronik asidin dokulardan LN a transferi
PROX-1	Transkripsiyonn Faktörü	Lenfanjiogenezezin gelişimi
Podoplanin	İnetgral Membran Proteini	Bilinmiyor
B Kemokin ReseptörD6	Afferent lenfatik kemokin reseptörü	Lökosit resirkülasyonu
Desmoplakin	LEC interselüler komponenti	LEC adhezyonu
Makrofaj Mannoze Reseptör	Makrofaj Reseptörü	Mikroorganizmaların fagositozu, viral endositoz

(Jussila L. ve ark., Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*, 2002 Jul; 82 (3):673-700.)

2.3. Lenfödem

Lenfödem mekanizması tam olarak anlaşılmamış genelde hem hasta hem de doktor tarafından hastalık yönetimi ve tedavi sürecinde artmış sabır ve özveri gerektiren bir hastalıktır. Lenfödem basitçe lenfatik damar sayısının azalmasına, lenfatik damar disfonksiyonuna ya da lenfatik akımda obstrüksiyona ikincil olarak oluşur.

Dünya genelinde 200 milyon insanı etkilemektedir. Üst ekstremitte tutulum oranı $\leq 10\%$, alt ekstremitte tutulum oranı $\geq 90\%$ ve genital bölge $\leq 1\%$ olacak şekilde dağılım gösterir.⁴⁰

Lenfödem etiyojisine göre primer ve sekonder olarak sınıflandırılabilir.

2.3.1. Primer Lenfödem

Primer lenfödem 1/ 6000-10.000 oranında görülür.⁴¹

Primer lenfödem: Konjenital lenfödem, lenfödem prekoks ve lenfödem tarda olmak üzere üçe ayrılır.

Primer lenfödemin alt tiplerinin başlangıç zamanı ile ilgili ortak bir karara varılamamıştır. Klasik sınıflandırma biyolojik bir paterne dayanmamaktadır. Çünkü otuz beş yaşına kadar tanı konulabilen puberte prekoks hastalığı yenidoğan dönemini, çocukluk dönemini, adolesan dönemi ve erişkinlik dönemlerini de içermektedir.⁴²

Konjenital lenfödem doğumdan itibaren iki yaşına kadar semptom verir. Konjenital lenfödemin ailesel formu Milroy Hastalığı olarak da bilinir ve otozomal dominant (OD) geçişlidir. Bilateral alt ekstremitte tutulumu tipiktir. Son çalışmalar göstermiştir ki embriyogenez esnasında lenfatik damarlanmanın sağlanması için VEGFR-3 reseptörü gerekmektedir ve VEGF-C lenfanjiogenez ve lenfatik onarım esnasında önemli role sahip olabilir.⁴⁰

Hereditör Lenfödem Prekoks Hastalığı; Meiges Hastalığı olarak da bilinir, pubertede semptom vermeye başlar. Meiges Hastalığı' na vertebral anomaliler, serebrovasküler anomaliler, sensorinöral işitme kaybı, sarı tırnak deformitesi ve ekstradural kistler de eşlik edebilir. Meibomian glandlarda şişlik ve ödem hali olabilir.^{40,43}

Hennekam Sendromu; ekstremiteler ve genitalyada oluşan lenfödeme mental retardasyonun ve yüz anomalilerinin de eşlik ettiği bir klinik ile tanımlanmıştır.⁴³

Literatürde yer alan geniş bir çalışmada primer pediatrik lenfödem vakalarının cinsiyete göre eşit dağılım gösterdiği, başlangıç yaşının genel olarak neonatal dönem ya da adolesan dönem olduğu, erkeklerde konjenital dönem ağırlıklı başlangıç ön planda iken, kız çocuklarında adolesan dönemli başlangıcın ön planda olduğu, genital lenfödem halinin erkek çocuklarda daha belirgin olduğu, infant döneminde başlayan lenfödemin ise erken çocukluk ya da adolesan döneme göre klinik olarak daha agresif seyretmediği bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada en çok tutulumun alt ekstremitede olduğu, vakaların %11' inin ailesel olduğu kalanlarının ise sporadik geliştiği bildirilmiştir.⁴³

Lenfödem tarda ise otuz beş yaşından sonra semptom verir ve en nadir primer lenfödem alt grubudur, vakaların %10' unu oluşturur. Histolojik incelemede lenfatik kapakçıklar görülmez ve hiperplastik tortüöz damarlar gözlemlenir.⁴³

2.3.2. Sekonder Lenfödem

İnterstisyel alandaki sıvının sistemik dolaşıma yetersiz drenajı sonrası oluşur. Travma, infeksiyon ve onkolojik tedaviler sonrası oluşur.⁴⁴ Lenf nodlarının cerrahi eksizyonu lenfatik akımda bozulmaya sebep olur. Böylece sıvı cilt altı aralığa birikir. Ek olarak hemodinamik faktörler ödem halinin sebat etmesinde etkilidir ve bu tablonun geri dönüşümsüz ilerleme ihtimalini arttırır. Dermal lenfatiklerden gözlenen geri akım lenfatik yetmezliğin patognomik bulgusudur ve bunun sebebi de derin lenfatiklerden yüzeysel lenfatiklere olan akışın lenfatik kapakçık yetmezliğine bağlı olarak oluşmasıdır. Fibrozis ve skleroz dermal yapılarda ve cilt altı adipoz dokuda hipertrofiye yol açarak morfolojik olarak da geri dönüşümsüz lenfödem kliniğinin oluşmasına sebep olmaktadır.⁴⁵

Meme kanseri, melanomlar, jinekolojik kanserler, ürolojik kanserler ve bazı deri kanserleri sırasında veya tedavilerine ikincil olarak oluşabilir.⁴⁴

Sekonder lenfödem hastalarının %49' unda; meme kanseri tedavisi için uygulanan cerrahi eksizyon ve radyoterapi etiyolojide sorumlu iken jinekolojik kanserler için bu oran %20, melanomlar için %16, genito-üriner bölge kanserleri için %10 ve baş-boyun kanserleri için %6' dır. Sentinel lenf nodu biyopsisi yapılan hastaların %7' sinde de lenfödem görülebilmektedir.⁶ Hastalar genel olarak ağrı, şişlik, mevcut ekstremitede ağırlık hissi, mobilizasyon kısıtlılığı, uygun kıyafet bulamama ve tekrarlayıcı olabilen cilt enfeksiyonlarından yakınırırlar.⁴⁶

Dünya genelinde sekonder lenfödemin en sık sebebi *Wuchereria Bancrofti* adlı parazit enfeksiyonudur. ABD gibi gelişmiş ülkelerde ise en sık sebep meme kanseri tedavisi için yapılan aksiller lenf nodu disseksiyonu ya da verilen radyoterapidir. Ayrıca kol germe ve iç uyluk germe ameliyatlarından sonra da lenfödem ihtimali bulunmaktadır.⁴⁰

Genel olarak lenfödem hastalarının çoğunluğu konservatif yöntemlerle tedavi edilmektedir. Ayırıcı tanıda; lipödem, venöz staz, kardiyak yetmezlik, hipoalbuminemi, obezite gibi bacakta şiş ve ödem görünümüne yol açan hastalıklar düşünülebilir. Etkilenen bacakta hamurumsu şişlik ve topaklanma olabilir ve her zaman ayak sırtı tutulumu eşlik eder. Kesin tanıyı koymak için lenfosintigrafiden faydalanılır. Volumetrik ölçümler ile tedavi yanıtı izlenebilir.

Komplikasyonları arasında bakteriyel ve fungal infeksiyonlar selülit, lenfanjit ve nadir olarak görülebilen ve ekstremitenin amputasyonu ile de tedavi edilebilen Lenfanjiosarkoma' ya rastlanılır. Etkilenmiş olan ekstremitede normale göre iki kat artmış oranda selülitte rastlanılır. Bu selülit klinik olarak daha agresif seyreden, daha hızlı ilerleyen ve hastane yatışı ile parenteral antibiyotik tedavisi gerektiren bir tabloya sebebiyet verir. Nadir olarak Lenfanjiosarkoma (Stewart- Treves Sendromu), Kaposi Sarkomu ve Lenfoma' ya dönüşebilir.⁴⁰

2.3.3. Lenfödem Evrelemesi ve Fibrozis İle İlişkisi

Uluslararası Lenfoloji Derneği tarafından bir klinik sınıflama yapılmıştır.

Evre 0; Subklinik hastalık, lenfatik transportta bozukluğa dair bir kanıt yok.⁴⁷

Evre 1; Biriken sıvı bacak elevasyonu ile azalır, basmakla ciltte çöküntü oluşabilir. Ödem genelde distalden başlar, konservatif tedavi yöntemlerinden fayda görür.⁴⁷

Evre 2; Bacak elevasyonu ile bir miktar ödem azalabilir, çöküntü vardır eğer fibrozis ön planda ise daha geç dönemde oluşabilir. İlerleyici fibrozis, adiposit proliferasyonu ve konservatif yöntemlere azalmış yanıt hali vardır.⁴⁷

Evre 3; Lenfostatik elefantiazis vardır, çöküntü yoktur ancak ciltte akantoz, pullanma, deri kalınlaşması ve yağ depolanması vardır. Stemmer işareti mevcuttur. Stemmer işaretinde; hastanın ödemli ekstremitesi kolaylıkla hekimin birinci ve ikinci parmakları arasında sıkıştırılıp çöktürülemez. Ayrıca ciltte *peau d'orange* görünümü ve polipoid nodüller olabilir.⁴⁷

Koshima ve ark tarafından literatüre kazandırılan kanser ile ilintili lenfödem vakaları ile lenfatik toplayıcı kanalların fibrozis ile ilişkisine dair otuz yedi vakalık bir

seride toplamda yüz on dört doku örneği incelenmiş ve çalışma neticesinde lenfödemin fibrozis ile ilintili olduğu vurgulanmıştır. Lenf nodu disseksiyonuna ikincil gelişen lenfödem kliniğine sahip değişik lenfödem evrelerindeki hastalarda doku örnekleri değerlendirilmiştir. Lenfatik toplayıcı kanallar histopatolojik olarak; normal, ektazik, kontraksiyon ve skleroz tipleri olmak üzere dört gruba ayırmışlardır.⁴⁸ (Tablo 2.2)

Toplayıcı kanallar lenfödem gelişiminde önemli bir role sahiptir. Toplayıcı kanalların aynı venler gibi iç, orta ve dış tabakalar olmak üzere üç tabakalı yapısı vardır. İç tabakada endotelial hücreler, orta tabakada düz kaslar ve en dış tabakada kollajen ve elastik lifler gibi hücre dışı matriks elemanları bulunur. Toplayıcı kanallar lenfanjiektazi varlığı, lenfatik duvar kalınlığı ve lümen genişliğine göre puanlandırılarak normal, ektazik tip, kontraksiyon tipi ve skleroz tipi olarak isimlendirilmiştir.⁴⁸ (Şekil 2.8, Tablo 2.3)

Aslında bu çalışma göstermiştir ki toplayıcı lenfatiklerdeki düz kas hücrelerinin gelişimi, transformasyonu ve hipertrofisi; kollajen liflerin proliferasyonu ile ilintilidir ve otoritelere göre toplayıcı tübüllerdeki bazal membran değişimi ve fibrozis ile lenfödem bağlantısını ortaya koyan ilk çalışmadır. Toplayıcı lenfatik kanalların lümeni normalde endotel hücreleri ile döşelidir. Endotel hücreleri düz kas ve fibröz elementlerle kaplı olan bazal membran tarafından sarılmıştır. Birçok besleyici damar ve myelinsiz sinir, lenfatiklerin düz kasını uyarmak için adventisyadan bazal membrana ulaşır. Lenfatik damarların 2-4 atım/dakika olmak üzere atımları vardır ve bu kasılmalar sayesinde lenfatik akım sağlanır.⁴⁸

Normal Tip Toplayıcı Kanallar: LEC tüm lümeni çepeçevre sarmıştır. Kollajen lifler ve düz kas hücreleri orta tabakada yer alır.⁴⁸

Ektazik Tip: Lenfadenektomi sonrası erken dönemde görülür. Toplayıcı lenfatikler akım yönündeki kapakçıklarını tam açamazlar ve endolenfatik basınç artar, lenfatik akım yavaşlar. Endolenfatik basınç artışına ikincil olarak toplayıcı kanalların lümeni genişler, LEC düzleşir, hücreler arası bağlantıların (desmozom) gücü zayıflar. Zamanla zayıflayan bu bağlantıların arasında fibrozis oturmaya başlar. Bazal membrandaki kollajen lifler incelik ve uzar.⁴⁸

Kontraksiyon Tipi: Artan endolenfatik basınç düz kas hücrelerinde değişikliklere yol açar. Fibrozis kas hücrelerinde de oluşumunu hızlandırır. Böylece kalın kollajenin yapısına katıldığı düz kas hücreleri yeterli kasılmayı sağlayamaz.⁴⁸

Skleroz Tipi: Desmozomlar tamamen kaybolur. Lenfatik sıvı kendiliğinden olarak hücre dışı alana sızar. Lümen neredeyse kollajen ve kalın düz kas hücrelerinde oluşmaktadır ve bu düz kas hücreleri pompa fonksiyonunu görememektedir. Konsantre etme, taşıma fonksiyonu olmayan bir damar yapısı vardır.⁴⁸

Tablo 2.2. Lenfödem evresine göre lenfatik damar yapıları ve histolojileri

	Normal Tip Evre 0	Ektazik Tip Evre 1	Kontraksiyon Tipi Evre 2	Skleroz Tipi Evre 3
Vazo Lenfatikum	(++)	(+)	(-)	(-)
Lenfanjektazi	(-)	(+)	(-)	(-)
Lenfatik Damar Duvarı Kalınlaşması	(-)	(-)	(+)	(++)
Lümen Daralması	(-)	(-)	(-)	(+)

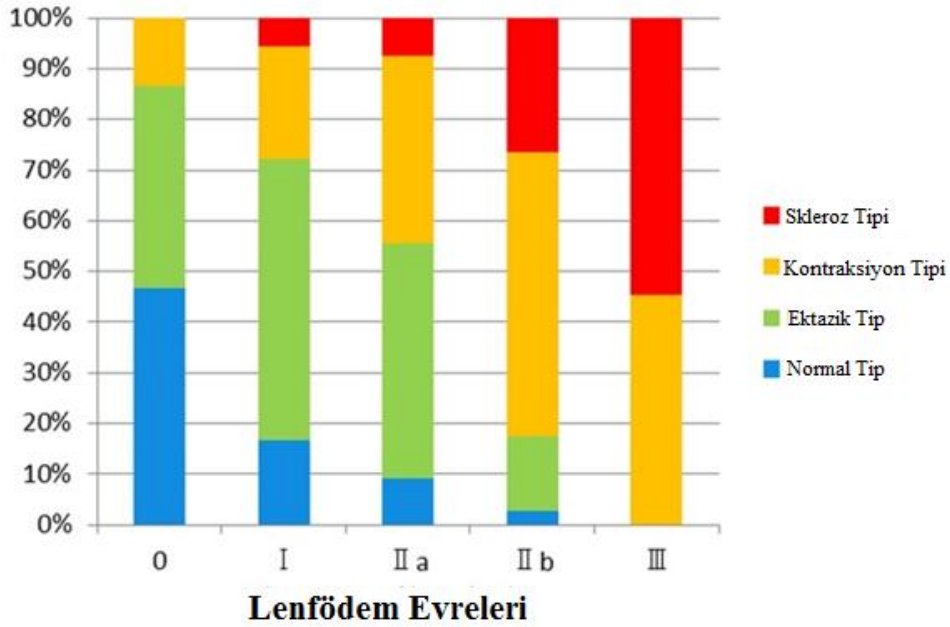
(Koshima I. ve ark., Pathological steps of cancer-related lymphedema: histological changes in the collecting lymphatic vessels after lymphadenectomy. Plos One, 2012; 7 (7):41126.)



Şekil 2.8. Damar Yapıları, evreler ve klinik

(Koshima I. ve ark., Pathological steps of cancer-related lymphedema: histological changes in the collecting lymphatic vessels after lymphadenectomy. Plos One, 2012; 7 (7):41126.)

Tablo 2.3. Lenfödem Evrelerine göre damar tiplerinin dağılımı



(Koshima I. ve ark., Pathological steps of cancer-related lymphedema: histological changes in the collecting lymphatic vessels after lymphadenectomy. Plos One, 2012; 7 (7):41126.)

2.3.4. Lenfödem Tanı Yöntemleri

Lenfatikleri incelemek için birçok yöntem bildirilmiş olmasına rağmen altın standart yöntem ekstremitelere Radyonükleoid Teknesyum 99 kolloidinin subdermal enjeksiyonu ile yapılan lenfosintigrafidir. Teknesyum 99 lenfatikler tarafından alınır ve böylece lenfatik damarların bölgesel lenf nodlarına drenajı, herhangi bir obstrüksiyon varlığı ve lenfatik damarların sayısı ve yeterliliği incelenir. Lenfatik sistem ve lenf düğümlerinin fonksiyonu ile ilgili yeterli bilgi sağlar. Ancak kötü çözünürlük kalitesi bu yöntemin dezavantajıdır.⁴⁴

Son yıllarda Manyetik Rezonans Lenfanjiografi (MRL) yüksek çözünürlüklü anatomik değerlendirme imkanı sağlamış ve detaylı olarak yumuşak doku değişikliklerinin incelenmesi fırsatını doğurmuştur. MRL ile ekstremitenin çapı ve hacmi hesaplanabilmektedir. İntravenöz olarak enjekte edilen *ferumoxylol* ile venlerin kontrast tutmasına bağlı olarak sinyal değişiklikleri göz ardı edilebilmekte ve sadece lenfatiklere odaklanılabilmektedir. MRL ile hastanın lenfatikleri, bölgesel lenf düğümleri ve yumuşak doku değişiklikleri, ekstremitenin hacmi ve çapı incelenmekte böylece cerrahi tedavi planı ile ilgili fikir sahibi olunmaktadır. Bu duruma örnek vermek gerekirse eğer hastada ciddi fibrozis ve minimal ödem mevcutsa hastanın fizyolojik tedavi işlemlerinden fayda görmeyeceği öngörülebilir.⁴⁴

Bir diğer inceleme yönteminde ise İndosiyanın Yeşili Lenfanjiografi (ICG) ile lenfatik akım gerçek zamanlı olarak gösterilebilmektedir. Kontrast allerjisi ya da metal implantı olan ve MRL'e giremeyen hastalar için uygundur. İnfrared kamera yardımı ile ICG lazer ışık kaynağı tarafından emilerek subdermal lenfatikleri görünür kılar. Değişik paternlerde difüzyonu lenfödemnin ciddiyeti ile orantılıdır. Lineer paternde dağılım normal iken, diffüz, sıçrayıcı ya da toz halinde dağılım paterni ciddi lenfödem kliniğine ve fibrozise işaret eder. Aslında en uygun kullanımı intraoperatif görüntüleme ve planlama içindir. Vaskülarize lenf nodu transferi ICG olmadan yapılabilirken, lenfatikovenüler anastomoz esnasında kullanımı elzemdir.⁴⁴

2.3.5. Lenfödem Tedavi Yöntemleri

2.3.5.1. Konservatif Yöntemler

Diüretikler, vitamin E, selenyum, steroidler ve Non- Steroidal Anti-inflamatuar ilaçlar farmakoterapide denenmiştir. Venöz staz veya konjestif kalp yetmezliği ile ilgili alt ekstremitte ödeminde diüretiklerin erken dönemde faydası ortaya konmuştur. Ancak izole lenfödeme yönelik olarak bu ilaçların herhangi birinin faydasına rastlanılmamıştır.⁴⁴

Lenfödem tedavisine yönelik olarak ilk olarak konservatif tedavi yöntemleri düşünülmelidir. Yeni tanı koyulan hastada Komplet Dekonjestan Tedavi (CDT) modalitesi başlangıç için uygundur. Manual lenfatik drenaj, günlük olarak bandaj kullanımı, egzersiz ve cilt bakımını içerir. CDT lenfödem konusunda uzmanlaşmış bir terapist gözetiminde yapılır. Hasta terapist ile haftada beş kez olmak üzere altı hafta süre ile görüşür. Bu terapi Lenfödem Evre 1 ve Evre 2 hastalar için uygundur. Bu terapi neticesinde ekstremitede Range of Motion (ROM) kaybı azaltılarak kontraktür gelişmesi engellenebilir ve hastanın postürü iyileştirilebilir. Lenfödem Evre 1 hastalarda amaç ödemi azaltmak iken; Evre 2 hastalarda amaç lenfödem kliniğinin ilerlemesini engelleyerek, Evre 2' de hastanın kliniğinin stabilize olmasını sağlamaktır. Her iki hasta grubu için de cilt ve tırnak bakımı önem haiz etmektedir.

2.3.5.2. Cerrahi Yöntemler

Cerrahi seçenekleri arasında longitudinal eksizyon ve primer onarım (Miller Prosedürü), geniş eksizyon ve deri greftleri ile onarım (Charles Prosedürü) bulunmaktadır ancak kullanımları oldukça nadirdir. Bu prosedürler öncesi hasta en az 3-6 ay süre ile kompresyon giysileri kullanmalıdır. Liposakşın aracılı lenfödem tedavi yöntemleri de tarif edilmiştir.⁴⁰ Şu anki mevcut tedavi modaliteleri geçmiş yöntemlerle kıyaslandığında daha az invaziv, mikrocerrahi yöntemlerin ön planda olduğu yöntemlerdir.⁴⁶ Bu yöntemler arasında Lenfatikovenüler Anastomozlar (LVA), Vaskülarize Lenf Nodu Transferleri (VLNT) ve lenfatikolenfatik bypasslar denenmektedir. Ayrıca deneysel hayvan çalışmalarında VEGF, PDGF ve adiposit kökenli kök hücre tedavileri denenmektedir. Ancak kök hücre tedavilerinin özellikle kanser zemininde gelişen lenfödem kliniğinde anjiogenezi ve böylece metastaz

ihtimalini arttırabileceği öngörüsü bu kök hücre tedavilerinin insanlar üzerinde kullanımını kısıtlamaktadır.⁴⁷

2.3.5.2.1. Charles Prosedürü

1912 yılında tanımlanan Charles Prosedürü lenfödeme yönelik tanımlanan ilk cerrahi işlemdir. Aynı zamanda tanımlanmış olan en agresif işlemdir. Bu işlemde derin kas fasyasına kadar tüm deri ve deri altı yağ dokusu eksize edilip greftlenmektedir. Bu deri greftleri eksize edilen dokudan alınabileceği gibi başka bir verici alandan da kaldırılabilir. Lenfödem hacmini azaltmak açısından faydalı bir işlem olmasına rağmen gelişen lenfatik stazı yönetmeye yönelik herhangi bir katkısı yoktur. Bu yöntem ile ekstremitenin yüzeysel lenfatik drenajı tamamen hasarlanır ve lenfödem daha agresif bir kliniğe dönüşür, ayrıca ekstremitede boğum boğum bir görüntü oluşur. Ayrıca deri greftlenmesi işleminin kendisine ait olabilen hiperkeratoz, papillomatoz reaksiyon oluşumu, ülserasyonlar ve kronik enfeksiyonlar görülebilir. Günümüzde morbiditesi nedeni ile tercih edilmemektedir.^{46,47}

2.3.5.2.2. Liposakşın Aracılı Teknik

Avrupalı plastik cerrahlar ilk olarak liposakşın aracılı olarak ekstremitte hacmini azaltmayı tariflemişlerdir. Bu işlemin uygulanacağı ekstremitede belirgin gode bırakan lenfödem hali olmalıdır.

Bu işlemde etkilenen ekstremitteye sirküferansiyel olarak fibröz dokuyu da alacak şekilde modifiye edilmiş kalın bir kanül ile liposakşın yapılır ve eksize edilebilen kadar cilt, cilt-altı doku eksize edilir. Ancak bu yöntem ile tedavi olmayı kabul eden hastalar kompresyon giysilerini sürekli kullanmak durumundadırlar. Bu yöntemin dezavantajları; yüzeysel sinirlerde hasar ve ilgili dermatomlarda hipoestezi, anestezi ve hastalarının ömür boyu kompresyon giysilerini kullanmalarıdır.^{40,47}

2.3.5.2.3. Vaskülarize Lenf Nodu Transferi (VLNT)

Histolojik olarak lenfadenektomi sonrasında lenfatiklerde hızlıca bir dejenerasyon ve dilatasyon gelişmektedir. Lenfatik düz kaslarında gelişen güçlü kontraksiyon ise tekrarlayan lenfatik enfeksiyonların üstesinden gelmek için yetersizdir. Lenfatik disfonksiyonu olan hastaların periferik lenfatikleri sağlam iken bu damarlardaki kapakçıkların yetersizliğine bağlı lenfatik geri akım olmaktadır.⁴⁹

Otolog veya VLNT ilk kez 1979 yılında Shesol tarafından hayvan modellerinde tanımlanmıştır, insanlarda ise ilk klinik kullanımı 1982 yılında Clodius tarafından gerçekleştirilmiştir.⁴⁹

Lenfödem tedavisinde son yıllarda serbest doku transferleri popülerlik kazanmıştır. Transfer edilen lenf nodları ile ilgili iki hipotez mevcuttur. İlk hipotezde transfer edilen doku adeta bir sünger gibi lenfatik sıvıyı emmekte ve pompa fonksiyonu görerek lenfayı direk olarak vasküler dolaşıma kazandırmaktadır. Arteryel anastomoz pulsasyonları güçlü hidrostatik basınçları ile sıvıyı flep içine emmekte ve düşük venöz sistem damarları ile de bu emme azalarak devam etmekte ve lenfatik sistemin kandan daha düşük bir kolloid basıncı olduğu için de emilen sıvı lenfatik sisteme verilerek fizyolojik bir lenfatiko-venüler anastomoz gerçekleşmektedir. Yine bu teoriye göre yerleştirilen flep ne kadar distalde yer alırsa yerçekimi etkisi ile o kadar fazla drenaj gerçekleştirilerek, normale yakın interstiyel basınç yakalanacaktır.^{44,49}

İkinci hipotezde ise transplante edilen lenf nodları lenfanjiogenezi indükleyecek büyüme faktörlerini salgılamakta ve yeni lenfatik yollar oluşmaktadır.^{44,49}

Lenf nodları yüksek rejenerasyon kabiliyetine sahiptir ve hızlı rejenerasyonun gerçekleştiği hayvan çalışmalarında da bildirilmiştir. İnsanlarda ise bu rejenerasyon kabiliyetinin daha yavaş olduğu için getirilen VLNT zamanlamasının da önemli olduğunu vurgulamaktadır. Yine hayvan çalışmaları göstermiştir ki lenfadenektomi sonrası kısa zamanda spontan lenfatiko-lenfatik anastomoz oluşmaktadır. İnsanlardaki bu rejenerasyon ise öngörülenden çok daha uzun sürmektedir.⁴⁹

Belki de bu hipotezi savunmak için VLNT gerçekleştirildikten sonra ICG ile yeni lenfatiklerin oluşup oluşmadığı araştırılabilir.

Kasık, torasik, submental, supraklavikular vaskülarize lenf nodları VLNT için kullanılırken alıcı sahalara olarak üst ekstremitelerde; aksilla, dirsek ve el bileği, alt ekstremitelerde ise uyluk, diz ve ayak bileği denenmiştir. Ek olarak son yıllarda literatüre omentum ve mezenter vaskülarize lenf nod transferleri kazandırılmıştır.⁴⁴

VLNT endikasyonları tam olarak netlik kazanmamıştır, ancak lenfosintigrafide total tıkanıklık Lenfödem Evre 2 ve tekrarlayan selülit hali, ve on iki aydan fazla süre ile konservatif tedaviye yanıtızsızlık sayılabilir.⁴⁴ VLNT güvenli bir yöntemdir ancak flep kaybı, donör sahada lenfödem riski, seroma, lenfosel, enfeksiyon ve doku iyileşmesi ile ilgili komplikasyonlara neden olabilir.⁴⁴

2.3.5.2.3.1. VLNT Donör Saha

KASIK-GROIN: İnguinal alanda yer alan lenf nodları; santral (safenofemoral), superomedial, superolateral, inferomedial ve inferolateral olmak üzere beş bölüme dağılmıştır. Alt ekstremiteyi drene eden lenf nodları santral ve medial yerleşimlidir, bu yüzden Süperfisyal İnferyor Epigastrik Arter Flebi (SİEA flebi) ile VLNT için santral ve inferomedial yerleşimli lenf nodlarının transferini gerçekleştirip alt ekstremitelerde lenfödeme neden olabileceği için önerilmemektedir. Aynı zamanda kommon femoral arterlerin etrafındaki derin lenf nodlarının da VLNT için kaldırılmaması önerilmektedir. Tüm yapılan çalışmalar ışığında süperfisyal mediyal grubun VLNT için kullanılması yönünde fikir birliğine varılmıştır. MRL' nin kullanıma girmesi ile birlikte lenf nodları lokalize edilmiştir. Transfer edilecek nodlar skarpa fasyası altında Anteriyor Superiyor İliyak Spine (ASİS) ile pubik tüberkül arasındaki aksta yer almaktadır. Nodların %68' i Süperfisyal İnferyor Epigastrik Ven (SİEV) ve Süperfisyal Sirkümfleks İliak Ven (SCİV) venöz bifurkasyonu etrafındaki üç santimetrelik alanda yer almaktadır. Bu yüzden uyluk VLNT için hazırlanırken Pubik Tüberkül (PT) ile ASİS arası hattın PT' e yakın ilk 1/3' lük bölümündeki üç santimetre çaplı perpendiküler alandan SCİA ve SCİV bazlı olarak kaldırılır. Doppler USG ve ICG yardımı ile bu yöntemle 35 başarılı VLNT tariflenmiştir. Eğer eş zamanlı meme rekonstrüksiyonu planlanıyorsa Derin İnferyor Epigastrik Arter (DİEA) bazlı olarak kaldırılan meme flebine SCİA bazlı kaldırılan vaskülarize lenf nodu dahil edilip

kimerik olarak kaldırılarak aksilladaki torakodorsal arterlerle anastomozu gerçekleştirilebilir.⁴⁹

SUBMENTAL: Cheng tarafından tarif edilen bu yöntemde alt mandibula sınırından yapılan insizyon ile eliptik bir deri adası mandibula simfizisi ile angulusu arasında subplastismal planda submental arter ve veni bazlı olarak septokutanöz perforatörleri de içerecek şekilde kaldırılır. Flep elevasyonu esnasında mutlaka marjinal mandibular sinir korunmalıdır.⁴⁹

SUPRAKLAVİKULAR: Bu flep transvers servikal arter bazlı olarak horizontal eliptik bir paternde kaldırılır. Genelde arter etrafında belirgin olarak büyük lenf nodları görülür.⁴⁹

TORASİK: Lateral torasik damarlar bazlı olarak pektoralis minor lateralinde kalan *Level 1* aksiller lenf nodlarını içerecek şekilde flep kaldırılır.⁴⁹

Uyluk ya da torasik bölgeden kaldırılan VLNT en büyük problemi ise verici alanda oluşabilecek lenfödemdir bunu engellemek için önerilen ise SLNB ya da ICG eşliğinde radyonükleoidi tutan yüzeysel lenf nodlarının transferidir. Her iki bölgenin en belirgin avantajı ise skarlarının kolaylıkla gizlenebiliyor oluşudur.⁴⁹

2.3.5.2.3.2. VLNT Alıcı Saha

Lenfanjiogenezin pompa mekanizması ile indüklendiğini düşünen cerrahlara göre alıcı saha ne kadar distalde olursa öngörülen başarı da o kadar yüksek olacaktır. Lenfanjiogenezin yeni oluşan lenfatiko-lenfatik anastomozlar ile sağlandığını düşünen cerrahlar için alıcı damarların proksimalde seçilmesi başarı oranını yükseltecektir.⁴⁹ Bir çok çalışmada ekstremitte hacim veya çapında %30-60 oranlarında azalma gösterilmiştir. Ancak bu çalışmaların çoğunluğu retrospektif paterndedir ve prospektif çalışma dizaynlarına ihtiyaç vardır.⁴⁷

AKSİLLA: Genelde hastalar bu bölgeye radyoterapi aldıkları için aksillada skar kaçınılmazdır ve yapılması gereken damar ve sinirleri zedelemeyecek şekilde tüm fibrotik dokunun eksizyonu ile birlikte uygun damarların anastomoz için hazırlanmasıdır.⁴⁹

DİRSEK: Anterior ulnar rekürren arter ve basilik ven dirsek medial epikondil üzerinden yapılan bir *lazy S* insizyon ile ulaşılarak anastomoz için hazırlanır. Alternatif olarak radial arter uç-yan ve eşlik eden komitan veni de uç-uç anastomoz için hazırlanabilir.⁴⁹

EL BİLEĞİ: El bileği dorsalinden yapılan bir transvers insizyon ile saha hazırlanır. Alıcı damarlar olarak radyal arter superfisyal dalı ve sefalik vene anastomozlar gerçekleştirilir.⁴⁹

GROİN-KASIK: Aksillada olduğu gibi tüm fibrotik dokular eksize edilerek SCİA anastomoz için hazırlanır.⁴⁹

AYAK BİLEĞİ: Düz veya S şeklinde bir insizyon ile anterior tibial arter veya dorsalis pedis damarları hazırlanır.⁴⁹

DİZ: Daha nadir tercih edilen bir lokalizasyon olmakla birlikte diz medialinden yapılan bir insizyon ile medial genikular arter ve safen ven anastomoz için hazırlanır.⁴⁹

2.3.5.2.4. Lenfatikovenüler Anastomozlar (LVA)

Lenfovenöz anastomoz konsepti ilk kez 1962 yılında Jacobson ve Suarez tarafından tanımlanmıştır. Yamamoto ilk olarak bu yöntemi köpeklere uygularken 1970'lerde O'Brien insanlarda denemiştir. Lokal anestezi altında bile yapılabilen minimal morbiditeye sahip bir işlemdir. Ancak ileri evre lenfödem hastalarında fibrotik dokunun çok fazla olması sebebiyle anastomozu uygun lenfatik ve venüller bulmak zorlaşacağı ve anastomoz gerçekleşse bile etkin bir şekilde varlığını sürdüremeyeceği için erken evre hastalarda kullanımı daha uygundur.^{44,50} Son yıllarda mikrocerrahinin gelişmesi ile birlikte 0.3-0.8 mm çaplı kapiller damarlara anastomozlar yapılmaktadır.⁴⁴ LVA'lar primer ve sekonder lenfödem hastalarına denenmektedir ancak literatürde bununla ilgili ortak bir fikir birliğine varılamamıştır. Şöyle ki bazı cerrahlar primer lenfödem hastalarının lenfatiklerinin hipoplastik olduğunu ve anastomozların yeterli olmayacağını savunurken bazı cerrahlar primer lenfödem vakalarında başarılı LVA sonuçları bildirmekte ve bu yöntemi savunmaktadır.⁴¹

İntraoperatif olarak *Lymphazurin boyası* ve *ICG yeşili* ameliyathanede, cerrahi kesiye başlamadan hemen önce; ayak 1. dorsal aralığından ve bilateral aşil tendonu lateralinden verilir. İşlem lokal anestezi veya genel anestezi altında yapılabilir.⁴¹ Birden fazla anastomoz önerilmektedir.

ICG yeşili enjeksiyonu sonrası lineer dağılım paterni görülürse bu hat üzerindeki lenfatikler anastomoz için kullanılır ancak yıldız tozu ya da diffüz bir dağılım paterni görülürse o zaman yapılması gereken; safen venin etrafında uygun toplayıcı lenfatik damar aramak olacaktır. Lenfatik damarlar genel olarak sekonder lenfödem hastalarında süperfisyel fasya etrafında primer lenfödem hastalarında ise derin fasya etrafında bulunur. 11.0 ve 12.0 naylon mikrocerrahi sutürlerle cilt altı venüller ile lenfatik kapillere uç-uç ya da uç-yan anastomozlar yapılır. Anastomozun gerçekleştiği alan yüzeyledir. Toplayıcı lenfatik kapillerde *ICG* ile gösterilen dermal geri akım veya distale geri akım olmaması anastomoz başarısını belirleyen esas faktördür. Literatürde yapılan retrospektif geniş çalışmalarda da hastalığın süresinden ziyade lenfatik kapillerdeki geri akım paterni LVA başarısının esas faktörü olarak bildirilmiştir.^{41, 46}

Literatürde bu yöntem ile %35-50 oranlarında bir yıldan fazla süreli takiplerde ekstremitte çap veya hacimlerinde azalma bildirilmiştir.⁴⁷

2.3.5.2.5. Lenfatikolenfatik Bypass

İlk kez 1986 yılında Baumeiter tarafından tanımlanan bu prosedürde iç uyluk başta olmak üzere verici alandan alınan sağlıklı lenfatik damarlar etkilenen ekstremitedeki lenfatiklere anastomoz edilir. Literatürde üst ekstremitede bu işlem sonrasında alt ekstremiteye göre daha yüksek oranda hacim azalması gözlemlendiğine dair yayınlar vardır. Ancak bu işlem sonrası teorik olarak donör sahada lenfödem oluşabileceği bildirilmektedir.⁴⁶

2.4. Sirolimus

Son on beş yıl içerisinde Son dönem Böbrek Yetmezliği'nin (SDBY) insidansı, prevalansı ve SDBY'e bağlı ölüm oranları iki katına çıkmıştır. Son dönem böbrek yetmezlikli hastalar için en iyi tedavi seçeneği ise böbrek naklidir.⁵¹

Günümüzde bir yıllık renal greft yaşamsallığı %90 dolaylarında iken transplant rejeksiyon oranları %10-15 dolaylarında seyretmektedir. Kronik greft rejeksiyonu sebepleri arasında immunolojik ve immunolojik olmayan faktörler yer almaktadır. İmmunolojik olmayan faktörler arasında iskemi-reperfüzyon hasarı, vericinin yaşı, Sitomegalovirüs (CMV) infeksiyonları, hipertansiyon, diabet ve kalsinörin inhibitörü özelliğindeki ilaçların toksisiteleri yer almaktadır.⁵²

Mevcut tedavi modaliteleri arasında Kalsinörin inhibitörleri, kortikosteroidler ve mikofenolat gibi ilaçların kombinasyonu önerilmektedir. Ancak bu ilaçların artmış kardiyovasküler risk, kronik renal disfonksiyon ve aşırı immunosupresyon gibi yan etkileri bulunmaktadır. Kombine tedavi modalitesinin yüksek oranda T hücre aracılı rejeksiyonları engelleme etkisinin mevcut olmasına rağmen; yine de bu tedavi altında akut ve kronik greft rejeksiyonları izlenmektedir. Bu ilaçlara alternatif yeni ilaç tedavilerinin aranması ile sahneye Sirolimus gibi m-TOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) inhibitörleri girmiştir.⁵³

1991 yılında m-TOR yolağı hücre içi sinyal iletiminde oynadığı rol ile değer kazanmıştır. Şu an için iki farklı m-TOR inhibitörü renal transplantasyon sonrası rejeksiyon profilaksisinde kullanılmaktadır. Sirolimus ilk bulunan m-TOR inhibitörüdür. Sirolimusun ateroskleroz engelleyici ve antineoplastik etkileri bulunmaktadır. Nefrotoksik yan etkisi bulunmadığı gibi özellikle yan etki profili sayesinde diğer immunosupresif ajanlara göre popülerite kazanmıştır. Son zamanlarda Sirolimus'un (SRL) Kalsinörin İnhibitörleri (CNI) ile kombine kullanımı azalmış greft kayıp oranları ile birlikte dir.^{54,55}

2.4.1. Sirolimusun Keşfi

Sirolimus ya da diğer adı ile Rapamisin 1965 yılında yerel halkı *Rapa Nui*'ler olan Easter Adası'ndaki toprak örneklerinden elde edilmiş, *Streptomyces*

Hygroscopicus bakterisinin fermentasyon ürünü olarak izole edilmistir. Bu ilaç çeşitli maya ve mantar türlerine karşı etkili iken gram pozitif ve negatif bakterilere karşı bir etkinliği saptanmamıştır. İlk kullanımı antifungal etkileri dolayısıyla olmuştur. 1988 yılında ilk kez immunsupresif etkileri gözlemlenmiş ve ikinci kuşak immunsupresif ajan olarak geliştirilmiştir.^{51,56}

1999 yılından beri FDA onayı ile organ rejeksiyonu profilaksisinde kullanılmaktadır.⁵⁶

2.4.2. İçeriği

Sirolimus dışında kullanımda olan diğer m-TOR inhibitörleri; Everolimus ve Deferolimus'tur. Temsirolimus ise Sirolimusun ön ilaç formudur. Temsirolimus ve Deferolimus intravenöz formları olan kanser karşıtı ilaçlardır. Everolimus ise %16 kadar biyoyararlanımı olan kardiyak ve renal allogreft rejeksiyonlarında kullanılan ilaçtır. Everolimus ve Sirolimus' un çok düşük oranda su içinde çözünürlüğü mevcuttur ve oral formları klinik olarak kullanılmaktadır.^{57,58}

2.4.3. Kimyasal Adı

Sirolimus' un moleküler formülü C₅₁H₇₉NO₁₃ olup moleküler ağırlığı 914.172 g/mol. Suda çözünmez ama organik çözücülerde çözünür.⁵⁶

3(S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)
9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a- hexadecahydro-9,27-dihydroxy-3-
[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-hydroxy-3methoxycyclohexyl]-1-methylethyl]-10,21-
dimethoxy-6,8,12,14,20,26-hexamethyl-23,27-epoxy-3H-pyrido[2,1-
c]oxaazacyclohentacontine-1,5,11,28,29 (4H,6H,31H)-pentone tam kimyasal
 adıdır.⁵¹

2.4.4. Mekanizması-Farmakodinamiği

Sirolimus Siklosporin ve Takrolimus' a benzer yapıda olmasına rağmen onlar gibi kalsinörin inhibisyonunu gerçekleştirmez. Sirolimus Immunoglobulin FK506

Bağlayıcı Protein 12'ye bağlanarak önemli bir regülatuar kinaz olan m-TOR inhibisyonunu gerçekleştirir. Bu inhibisyon neticesinde hücre siklusunun G1-S fazı geçişi baskılanır böylece T supresör lenfositler proliferer olur ve aktiflenir.⁵⁹

SRL' un deneysel modellerde en merak uyandıran özelliği; Siklosporin ve FK506 Takrolimus ile kombine kullanımı ile ortaya çıkan sinerjizmdir, çünkü SRL ilk bulunduğu zaman anti-tümörosidal ve anti-kandidal etkileri ile kullanıma girebileceği ön görülmüş ancak *in vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalarda bu potansiyeli ortaya çıkmıştır.⁶⁰

Hücre siklusu esnasında aktif olmayan T hücreleri; G0 fazında beklerler ve gelen üç sinyal ile aktive olurlar. İlk sinyal T hücre antijen reseptörü/ alloantijen bağlanması ile oluşur. İkinci sinyal CD28/B7 etkileşimi ile oluşur. Bu iki sinyal T hücrelerini G1 fazına sokmak için gereken Interlökin 2 (IL-2) ve T hücreleri büyüme faktörleri (TCGFs) üretimi ile ilintilidir. Üçüncü ve son sinyal olarak IL-2 ve TCGFs yüksek afinite ile T hücre reseptörlerine bağlanırlar ve T hücrelerinin S fazına geçişi ve dolayısıyla T hücre proliferasyonu ve klonal ekspansiyonu sağlanır. Çalışmalar göstermiştir ki Siklosporin A siklofilin ile kompleks yaparak Kalsinörin inhibisyonuna sebep olmaktadır. Dolayısıyla IL-2 üretiminin inhibisyonu ve T hücrelerinin G0-G1 fazına geçişi engellenmektedir. Benzer olarak FK506 FKBP12'ye bağlanarak Kalsinörin defosforilasyonunu ve ek olarak TCGFs üretimini inhibe etmektedir.⁶⁰

Aksine SRL'un aynı FKBP12 reseptörüne bağlanması ile oluşan SRL-FKBP12 kompleksi IL 2 ve TCGFs sinyal iletimini geç G1 fazında inhibe etmektedir. Çünkü CsA ve FK506 SRL ile mukayese edildiği zaman farklı aşamalarda T hücre aktivasyonuna etki etmektedir ve bu tedavilerin kombinasyonu birbirlerinin etkilerini tamamlamaktadır.⁶⁰

Siklosporin A; Kalsinörin aracılı sitokin sentezini erken G0/G1 fazında inhibe ederken, Sirolimus m-TOR bağımlı olarak sitokin sentezini geç G1 fazında inhibe etmektedir. Çalışmalar göstermektedir ki bu ilaçlar hücre siklusunun farklı evrelerinde hücre diferansiyonuna ve proliferasyonuna etki etmektedir. Bu ilaçların kombinasyonlar halinde kullanımı ile sinerjistik etkilerinden yararlanılarak daha düşük dozlarda kullanımı mümkün olmaktadır.⁶⁰

Ek olarak Sirolimus'un mTOR inhibiyonu ile VEGF konsantrasyonunda azalma ve bu etkiye ikincil olarak tuberoz skleroz hastalarındaki hamartomlarda gerileme etkisi gözlemlenmiştir.³ Erişkin hastalarda solid organ rejeksiyonu profilaksisinde, birçok hematolojik ve solid organ neoplazmlarında ve hamartomlarda kullanılmaktadır.⁶¹

2.4.5. Farmakokinetiği ve Metabolizması

Düşük suda çözünürlüğü nedeniyle oral formu piyasada kullanımdadır. Biyoyararlanımı %14 oranındadır. Uygulandıktan sonra, 1-2 saat içinde emilmeye başlar, intestinal ve *hepatik CYP3A4 ve P Glikoproteinleri* tarafından metabolize edilir. İnsanlarda yarı ömrü 62±16 saattir. SRL %95 oranında eritrositlere bağlanırken, %2.5' luk kısmı plazmada serbest halde bulunur, %0.5' lik kısmı ise albümine bağlanır.⁵¹

SRL'un; 1 - 2 mg/gün dozunda kullanımında plazma düzeyi 5 - 8 ng/ml olarak ölçülmüştür ve bu doz da istenen immunsupresif etki için yeterlidir. SRL kan düzeyi > 10 ng/ml olduğunda yan etkileri artmakta ve hastalar tarafından tolere edilememektedir.⁵¹

2.4.6. Yan Etkileri

Sirolimus; Takrolimus ve Siklosporin'den farklı olarak nefrotoksik hastalarda, hipertansiyonu olan hastalarda ve nörotoksitesisi olan hastalarda güvenle kullanılabilir. Trombositopeni, lökopeni, anemi, dislipidemi, interstisyel pnömoni, anjioödem, göz etrafında ödem, gecikmiş yara iyileşmesi, trombotik mikroanjiyopati, herni ve lenfösel oluşumu gibi yan etkileri vardır.^{61,62}

Genel olarak m-TOR inhibitörleri deneysel ve prelinik modellerde; insülin direncini arttırmış, insülin duyarlılığını azaltmış ve pankreatik yanıtta azalma oluşturmuştur.⁵¹

SRL'un *de novo* çalışmalarındaki yüksek yara iyileşmesi problemleri nedeni ile kullanımını kısıtlıdır.

2.4.7. Sirolimusun Sıçan Dokularındaki Metabolizması

İnsanlarda SRL kan düzeyi ile ilgili çalışmalarda %94 oranında eritrositlerde olduğu, %0.1' den düşük oranlarda plazma konsantrasyonunda serbest olarak bulunduğu bildirilmiştir. Sıçanlarda ise %70' e varan oranda plazmada serbest konsantrasyonda olduğu bildirilmiştir.

SRL *in vitro* çalışmalarda insanda ve sıçanda *karaciğer ve intestinal CYP3A4enzimi* ile hidroksile ve de-metile edilerek metabolitlerine ayrılmaktadır. Yapılan çalışmalarda SRL parenteral yarılanma ömrü sıçanlarda 30.8 saat olarak bildirilmiştir. Yarılanma ömrü ya da ilacın klirensinin yüksek dozlarda dahi değişmediği bildirilmiştir.⁶³

2.4.8. Sirolimusun İnsanlarda Oluşturduğu Lenfödeme Dair Literatür Taraması

Desai ve ark. tarafından Sirolimus'un insanlarda lenfödem oluşturduğuna dair sekiz vakalık bir serileri bulunmaktadır. Hastalarını 2001- 2008 yılları arasında sekiz yıllık bir süre zarfında incelenmişlerdir. Bu hastaların yedisi renal transplant alıcısı olup bir hasta karaciğer transplant alıcısıdır. Hastalarda Sirolimus tedavisinin başlamasının üçüncü ayından itibaren lenfödem kliniği oluşmaya başlamıştır. Bazı hastalarda ise kliniğin oluşması onuncu ayı bile bulmuş ancak ortalama süre beş ay olarak bildirilmiştir. Bu hastalara günlük 2-4 mg/kg Sirolimus; 3-10 ay süre ile verilmiştir. Hastaların lenfödem oluşan ekstremiteleri ya solid organ transferinin gerçekleştiği ekstremiteler ya da hemodiyaliz için arteriovenöz fistülü olan ekstremitelerdir. Hastaların hiçbirinde ailesel olarak lenfödem hikayesi yoktur ya da daha önceden tanı konulmuş bir lenfatik yetmezlik kliniği yoktur. Hastaların hepsinin neredeyse ortak lenfosintigrafi bulgusu ise ana yüzeysel lenfatik toplayıcı damarlarda fonksiyon kaybı, deride yer alan birçok küçük kollateral lenfatik damarlarda yeni yolaklar oluşması ile aks değişimi ve lenfatik sıvının emiliminde ve ana lenfatik trunkus ve lenf nodlarına iletiminde başarısızlıktır. Hastaların hiçbirinde bu sekiz yıllık süre içinde Sirolimus ilacının kesilmesinden sonra lenfödem kliniğinde bir iyileşme saptanmamıştır.⁶¹

Tabi literatürde Sirolimus kullanan hastalar ve bildirilen lenfödem kliniği düşünüldüğü zaman çok nadir bir klinik olduğu aşikardır. Bu durumda akla

Sirolimusun bu etkisinin multifaktöriyel olabileceği gelmektedir. Cerrahi travma bu hastalar için bir etken olabilir.⁶¹

Aboujaoude ve ark. tarafından bildirilen bir başka üç vakalık seride ise hastaların hepsi renal transplant alıcısı olup en erken üçüncü ay olmak üzere ortalama dördüncü aydan itibaren lenfödem kliniğine sahip olmuşlardır. Yine bu hastalarda dikkat çeken renal alıcı ekstremitelerde ya da arterio- venöz fistül (AVF) tarafında klinik tablonun gelişmesidir. Bu çalışmada hastalara lenfosintigrafi yapılmamış hastalarda ilacın kesilmesi ile birlikte %60 - %100 oranlarında klinik tabloda gerileme görülmüştür.⁶⁴

Romagnoli ve ark. tarafından bildirilen iki vakalık seride ise renal transplant alıcısı iki hastada Sirolimus kullanımının 18. ve 24. aylarında lenfödem kliniği oluşmuş, bir hastada arterio-venöz fistül olan tarafta lenfödem oluşmuş iken diğer hastada bilateral alt ekstremitelerde lenfödem izlenmiştir. Hastaların aylık Sirolimus kan düzeyleri bir hastada ortalama 3.2 ng/ml iken diğer hastada 9.5 ng/ml olarak bildirilmiştir. Hastalara yapılan lenfosintigrafide total obstrüksiyon görülmüş bu da çok uzun süreli lenfödem kliniğine bağlanmıştır. Her iki hastada da ilacın kesilmesinden sonra %60- %80 oranlarda lenfödemde çözülme görülmüştür.⁶²

Al-Otaibi ve ark. tarafından bildirilen dört vakalık seride ise dört renal transplant alıcısının renal transplant alan ekstremitesinde ya da AVF olan ekstremitesinde lenfödem kliniği gelişmiştir. Hastaların ilacı kullanma süresi 7-30 ay arasında değişmektedir. Anlamlı ilaç düzeyi 10-20 ng/ml arasında saptanmıştır. Hastalara yapılan lenfosintigrafide vakaların %50' sinde gecikmiş lenfatik akım ve kalan yarısında da total lenfatik obstrüksiyon gözlemlenmiştir. Hastalarda ilacın kesilmesini takiben parsiyel olarak lenfödem kliniğinde iyileşme gözlemlenmiştir.⁶⁵

Vignes ve ark. tarafından bildirilen beş vakalık bir seride ise renal transplant alıcılarında AVF olan tarafta Sirolimus kullanımına ikincil lenfödem kliniği bildirilmiştir. Bu hastaların hepsinde lenfatik akımının AVF olan ekstremitelerdeki komplet obstrüksiyonu gösterilmiştir. Hastalarda ilacı almaya başladıktan sonraki 7-58 ay içerisinde lenfödem kliniği gelişmiştir. Sirolimus ilaç dozu ise günlük olarak 1-2.5 mg/kg verilmiştir. Hastalara lenfödem kliniği fark edildikten sonraki dönemde DCT verilerek ilaç uygulaması devam etmiştir.⁶⁶

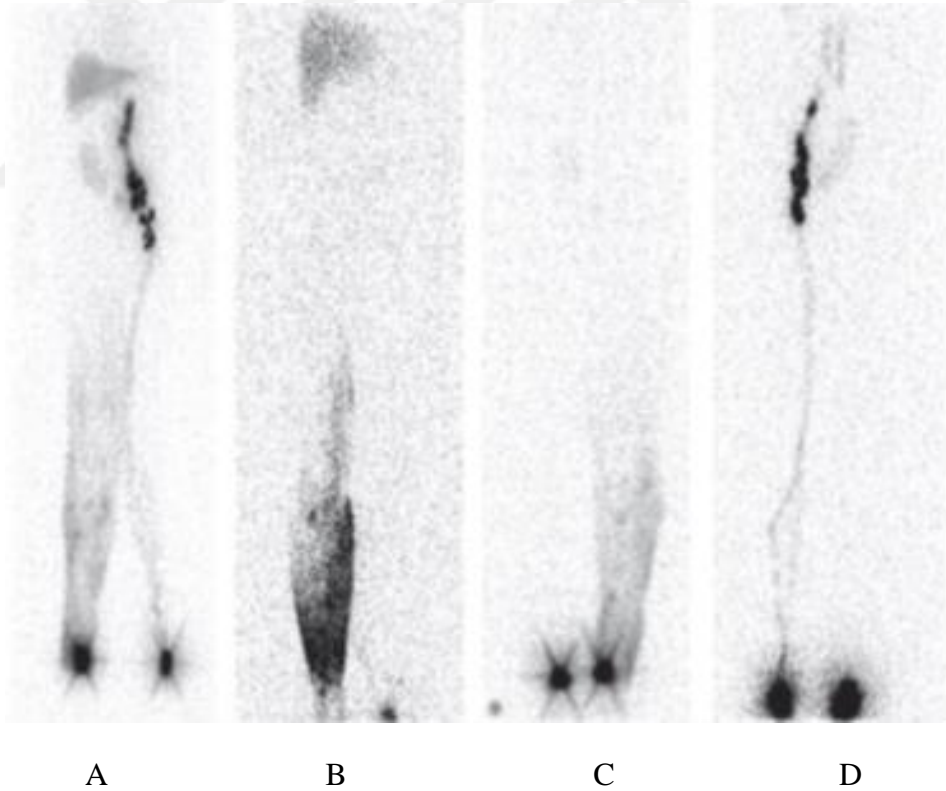
Literatürdeki Sirolimus' un indüklediği vaka serileri incelendiğinde toplamda 51 vaka bildirilmiştir. Vakaların neredeyse %90' ı geri dönüşümlü iken ilk bildirilen vaka 2005 yılında olup 2016 yılına kadar vaka bildirimleri yapılmıştır. Nefroloji otoriteleri tarafından Sirolimus' un yan etkisi olarak lenfödem kabul edilmesi günümüzde tartışılmaktadır. Hastalarda en kısa süre olarak bir ay en uzun süre olarak dokuz yıl süre ile Sirolimus tedavisi altında iken lenfödem gelişmiş ve ilacın kesilmesini takiben 3- 6 ay içerisinde düzelme bildirilmiştir. Hastaların hiçbirisinde önceden tanı konulmuş bir lenfatik yetmezlik olmadığı gibi bir aile öyküsü de yoktur. Hastaların çoğunluğu renal ya da karaciğer gibi solid organ alıcısıdır ve etkilenen ekstremitte çoğunlukla renal alıcı ekstremitte tarafı ya da AVF olan taraftır. AVF olan taraf incelendiğinde hastalarda venöz tromboz görülmemiştir. Hastaların bir kısmında lenfödem kliniğinin fark edilmesi ile ilaç kesilmiş bir kısmında ise ilaç izole ya da CDT ile kombine edilerek uygulamaya devam edilmiştir. Bazı vaka serilerinde ilacın kesilmesinin ardından parsiyel ya da total lenfödem kliniğinde düzelme tariflenirken bazı vaka serilerinde ise düzelme bildirilmemiş ve lenfödem kliniğinin sebat ettiği belirtilmiştir (Şekil 2.10).

Bazı vaka serilerinde lenfosintigrafi ile lenfatik akımda gecikme, yüzeysel toplayıcı lenfatiklerde yeni yolaklar oluşumu veya total distal oklüzyon gösterilmiştir. Ancak bazı vaka serilerinde lenfosintigrafi yapılmamış ve lenfatik şişlik hali hekim tarafından gözlemlenerek bildirilmiştir. Ekstremiteler arası çap ya da hacim ölçümü bazı vaka serilerinde BT ile gösterilmiş bazılarında ise hekim tarafından gözlemsel olarak değerlendirilmiştir.^{61, 62, 64, 65, 66} (Şekil 2.121)



Şekil 2.10. Uzun süreli sirolimus tedavisi

(Desai N. ve ark., Sirolimus-associated lymphoedema: Eight new cases and a proposed mechanism. British Journal of Dermatology, 2008;160(6): 1322-6)



Şekil 2.11. Şekil 2.10'da klinik fotoğrafları olan hastanın lenfosintigrafi görüntüleri

A,C: Yüzeysel toplayıcı lenfatiklerde yetmezlik, B: Sol tarafta lenfödem erken dönem, D: Sol Bacakta Gelişen lenfödem.

(Desai N. ve ark., Sirolimus-associated lymphoedema: Eight new cases and a proposed mechanism. British Journal of Dermatology, 2008;160 (6): 1322-6)

2.5. Hayvan Modelleri

Lenfödeme dair hayvan modellerinden ilki Olszewski tarafından köpeklerde tarif edilmiştir.³⁹ Sonrasında kemirgenlerden, koyun ve domuz gibi hayvanlara uzanacak şekilde değişik hayvan modelleri tariflenmiştir. Daha büyük hayvan modelleri ile insan lenfödem kliniğine daha yakın sonuçlar alınabilirken günümüzde sıçan ve fare gibi kemirgen modelleri daha düşük bütçeli olmaları, hayvanların daha kolay şartlarda barındırılması nedeni ile daha çok tercih edilmektedir. Kemirgen hayvan modelleri kullanılarak lenfödem patofizyolojisi anlaşılmaya çalışılmaktadır.³⁴

Fare - sıçan kuyruğu modelleri lenfödem molekül ve hücre tedavisine yönelik çalışmalar için avantaj sağlar, cerrahi yöntemler ile tedavi seçeneklerinin araştırılması için ise ekstremite modelleri daha uygundur. Tavşan ve köpeklerdeki lenfatik damarların düz kasları dağılmış yapıda iken, kemirgenlerin düz kas yapıları insanlarla benzerlik gösterir.⁶⁷

2.5.1. Tavşan Kulağı

Casley-Smith tarafından ilk kez tavşan kulağı lenfödem modeli tanımlanmıştır. Bu yöntemin avantajı lenfatiklerin kulak tabanındaki yerleşimi dolayısıyla diseksiyonunun kolay olmasıdır.⁶⁸

1983 yılında Kang ve ark. tarafından geliştirilen bu modelde tavşan kulağı lenfödem kliniğini oluşturmak için kullanılır.¹⁸ Öncelikle lenfatikleri işaretlemek için %0.5 metilen mavisi, 0.2 ml hacimde olacak şekilde kulak ucundan deri içine verilir. Nörovasküler yapılar korunacak şekilde tavşan kulağından 1 cm' lik sirkumferansiyel bir deri eksizyonuna deri altı doku ve perikondrium da dahil edilecek şekilde eksizyon gerçekleştirilir. Bu cilt eksizyonu için sınır kulak tabanının 2 cm üzerinden olmalıdır. Sayıları beş ila yedi arasında değişen major kulak lenfatikleri görülür ve bu yapılar da disseke edilip bağlanır. Cilt üst ve alt sınırından komşu perikondriuma inverte edilerek dikilir ve pansuman yapılır. Cildi perikondriuma inverte etmenin amacı yüzeysel lenfatiklerin ilerlemesini ve tekrar bağlantı oluşturmasını engellemektir. Kulak hacim ve ölçüm yöntemleri ile incelenir ve en yüksek şişliğe ameliyat sonrası 7. günde ulaşılır. Sonraki dönemde bu şişlik tedrici olarak azalır ve takipteki 60. günde tekrar artmaya başlar ve toplamda 180 gün kadar sebat eder.

Youn ve ark. yukarıda tariflenen cerrahi yöntemle çok genç tavşanların kulağında lenfödem modeli oluşturmaya çalışmış ancak başarıya ulaşamamışlardır ve bu durum da özellikle hayvan çalışmalarında hayvan yaşı ile lenfödem tablosu gelişimi arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur.⁶⁸

2.5.2. Koyun Alt Ekstremitesi Lenfödem Modeli

İnsizyona başlamadan önce Evans Mavisı koyun toynağının proksimalinden verilerek lenfatik işaretleme gerçekleştirilir. Ardından yaklaşık 8-10 cm arasındaki vertikal bir cilt insizyonu ile biceps femoris kası retrakte edilerek popliteal lenf nodu bulunur. Popliteal lenf nodu ve eşlik eden yağ dokusu eksize edilir. Prenodal ve postnodal damarlar bağlanır ve insizyon onarılır. Şişlikte en bariz artış ameliyat sonrası üçüncü günde olmak üzere lenfödem kliniğinin %80' i 12. haftada iyileşir. 12. haftadan itibaren yeni oluşan farklı çaplardalarda toplayıcı lenfatikler gözlemlenir. Bu lenfatikler bir şekilde prenodal ve postnodal olarak birbirleri ile bağlantılıdır. Bu lenfatikler sayesinde lenf akışı tekrar sağlanmaktadır.⁷⁰ Yeni yüzeysel lenfatik damar ağının insanlarda oluşamaması, mevcut hasarlı lenfatik damarların rejenerasyonlarının mümkün olmaması ve de radyoterapiye ikincil gelişen hasar mekanizması; insanlarda oluşan lenfödem kliniğinin neden hayvan modelleri ile mukayese edildiği zaman geri dönüşümsüz olduğuna işaret etmektedir.⁷⁰ (Şekil 2.12)



Şekil 2.12. Koyun arka bacağı lenfödem modeli, cerrahi sonrası 1. Hafta

(Dalia T. ve ark., Lymphedema development and lymphatic function following lymph node excision in sheep. J Vasc Res, 2009; 46:426–434.)

2.5.3. Köpek Alt Ekstremitte Lenfödem Modeli

İlk kez 1888 yılında Delius köpek bacağına safen ven komşuluğundaki lenfatik damarların ligasyonu ile lenfödem oluşturmaya çalışmış ancak herhangi bir şişlik oluşturamamıştır.⁷¹ Drinker ise cilt eksizyonu ve uyluk bölgesindeki lenf nodu eksizyonuna ilaveten sklerozan madde enjeksiyonu ile lenfödem oluşturmaya başarmış.^{45,71} Olszewski ve ark. ise cildin sirküferansiyel eksizyona ek olarak cilt altı yağ dokusu, kas ve periosteumu da eksize edip sadece damar- sinir paketi ve kemik dokuyu sağlam bırakıp geride kalan dokuyu sekonder iyileşmeye bırakarak bir lenfödem modeli oluşturmuş ve %33 oranında başarı sağlamıştır.³⁹ Daha sonraki çalışmalarda Das ve ark tarafından lenfatiklerin ligasyonu, radyoterapi uygulaması gibi yöntemlerle lenfödem modeli geliştirilmiştir.⁶⁸

Chen ve ark. köpeklere öncelikle 1200 rad dozunda tek doz radyoterapi yapılır ardından 2- 4 hafta sonra 3 cm' lik sirküferansiyel cilt eksizyonu ile cilt, cilt altı yağ dokusu eksize edilir ve cilt üst ve alt sınırı uyluk kaslarının fasyasına inverte edilerek dikilir. Böylece yüzeysel lenfatiklerin tekrar birbirine yaklaşması ve bağlantı kurması engellenmeye çalışılır. Doku 4-6 hafta arası bir sürede iyileşir. 3 ay sonra ikinci bir cerrahi işlem gerçekleştirilir. Bu işlemde tüm derin lenfatik dokular, popliteal fossada yer alan popliteal nodlar ve intermuskuler yumuşak dokular eksize edilir. Lenfatikleri işaretlemek için yine insizyona başlamadan önce Patent Blue' nun köpeğin patisinden intradermal verilmesi suretiyle işaretleme yapılır. 1 yıla kadar varan sürelerde lenfödem kliniğinin oluştuğu bildirilmiştir.⁷² (Şekil 2.13)



Şekil 2.13. Köpek alt ekstremitesi akut lenfödem modeli

(Chen HC. Ve ark., Creation of distal canine limb lymphedema. *Plast Reconstr Surg*, 1989 Jun; 83 (6):1022-6.)

2.5.4. Fare Kuyruğu Modeli

Slavin ve ark. tarafından ilk kez tanımlanan bu modelde fare kuyruğunun tabanından sirküferansiyel bir eksizyon yapılır ve derin lenfatikler koterize edilir, ardından dokular arasında 3 mm kadar bir açıklık bırakılarak kuyruk sekonder iyileşmeye bırakılır. Bu yöntemde 4 haftaya kadar sebat eden lenfödem kliniği bildirilmektedir. Özellikle moleküler çalışmalar için uygun olan bu modelde VEGF-C, Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9), Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) gibi kök hücre tedavilerinin lenfödeme sekonder gelişen oksidatif stres ve inflamasyona yanıtı değerlendirilmektedir.⁶⁸

2.5.5. Sıçan Arka Bacağı Modeli

Sıçanların ucuz olması ve kolay temin edilmesi sıçan bacak modelinin avantajını oluşturmaktadır. İlk kez 1980' li yıllarda Kanter ve ark. tarafından tarif edilen bu yöntemde sıçanlar sekiz grup halinde dağılmıştır. İlk grup kontrol grubu olarak tayin edilmiş. İnsizyon öncesi sıçanların ayak dorsumundan verilen 0.1 ml

intradermal Patent Blue enjeksiyonu sonrası 2. gruptaki ratların yüzeysel ve derin lenfatikleri bağlanmış ve ciltten 5-10 mm arası bir cilt stripi eksize edilip kalan cilt kenarları kas fasyasına suture edilmiş. 3. gruptaki sıçanlara ise tek doz 45 Gy radyoterapi uygulanmış, herhangi bir cerrahi işlem yapılmamış. 4. gruptaki sıçanların ana femoral veni bağlanmış. 5. gruptaki sıçanlara ana femoral venden verilen sklerozan madde olan Sodyum Tetradsil Sülfat enjeksiyonu yapıp ek bir cerrahi işlem uygulanmamış. 6. gruptaki sıçanlara ise 2. ve 4. gruptaki sıçanlara yapılan işlem kombine olarak uygulanmış yani derin ve yüzeysel lenfatiklerin bağlanmasına ek olarak femoral ven de bağlanmış. 7. gruptaki sıçanlara 45 Gy radyoterapi verilmesini takiben 1-2 hafta sonra cerrahi işlem ile lenfatikler bağlanmış. 8. gruptaki sıçanlara ise preoperatif radyoterapiyi takiben, lenfatiklerin ve ana femoral venin ligasyonu ve sklerozan ajan enjeksiyonu gerçekleştirilmiş. Ekstremitayı suya batırma yöntemi ile hacim ölçümü ve topuktan çap ölçümü ile karşı sağlam ekstremita ve diğer gruplarla kıyaslanacak şekilde yapılmış. Gruplarda doku şişliğini ilk postoperatif 3. günde fark etmişler izole cerrahi ya da radyoterapi gruplarında çok kısa süreli bir ödem hali gözlemlerken grup 7'de yaklaşık 9. aya kadar minimal de olsa sebat eden ödem kliniği bildirmişlerdir. Ödem halinin devamının karşı ekstremita ile mukayese edilmesine dair herhangi bir rakam bildirilmemiştir.⁷¹

Yang ve ark. tarafından bu model geliştirilmiş herhangi bir cilt eksizyonu yapılmadan ve cilt cilde dikilerek 20-30 ve 40 Gy dozlarında radyoterapi, sıçanların inguinal lenf nodlarının eksizyonunun takibinde uygulanmış. En fazla ödem kliniği 40 Gy doz altında izlenmiş.⁷¹ Kanter ve ark.'larının⁷³ dokuz ay süre ile bildirilen lenfödem modeli bildiriminin aksine gerek Yang ve ark. tarafından yapılan çalışmada gerekse literatür taramamızda sıçan arka bacak lenfödem modeli en fazla 3-4 ay gibi bir süre olarak tanımlanmıştır.

2.6. Sıçanların Lenfatik Sistemi

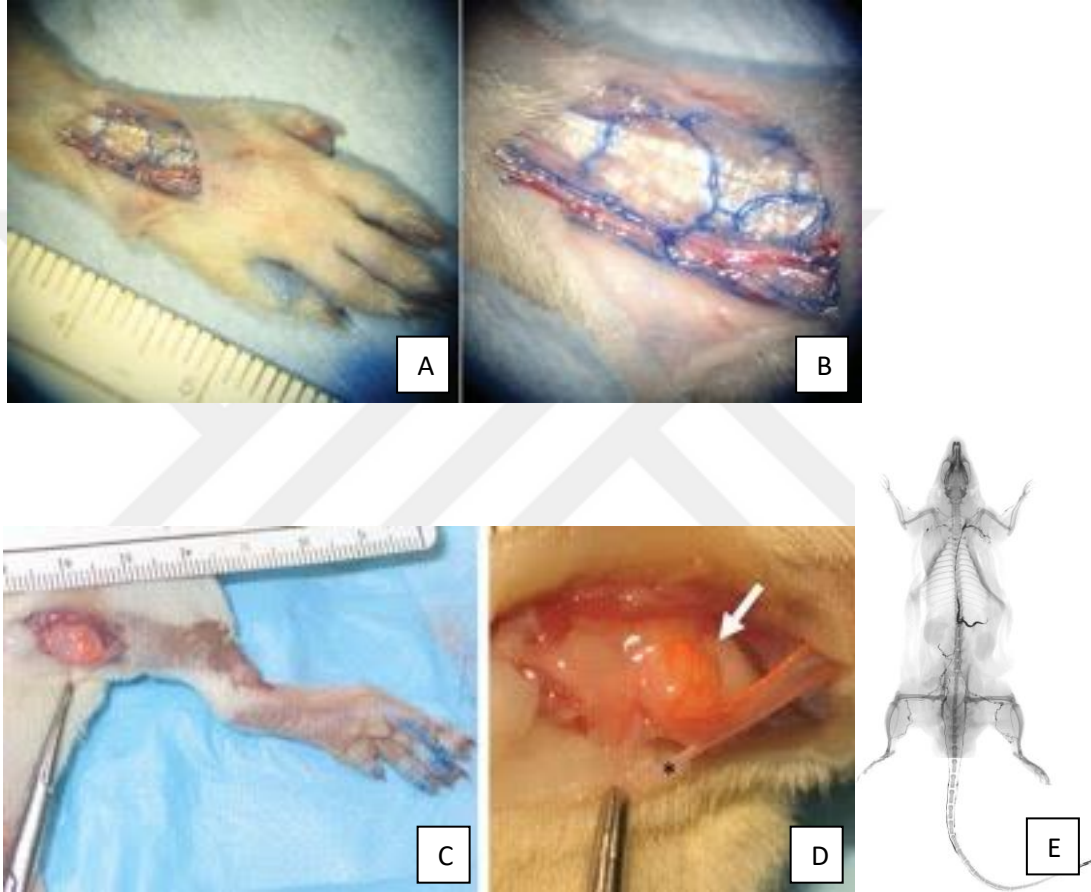
Lenfatik sistem 1627 yılında İtalyan anatomist Gasparo Aselli tarafından keşfedilmiştir. Bir köpeğin disseksiyonu esnasında karında mezenter etrafındaki beyaz ağsı- damarsı yapıları fark etmiş ve bu yapıları kesmesi ile süt benzeri şilöz bir sıvının geldiğini görerek yeni bir sistem bulmuştur. Tarihsel olarak lenfatiklerin

tanımlanması kadavra veya canlı hayvan modellerinde cilt altına civa enjeksiyonu ile demonstrasyonu ilk kez 1692 yılında Anton Nuck tarafından gerçekleştirilmiştir. Gösterilmiştir ki lenfatikler kapakçıklara sahiptirler ve arter ve ven ile mukayese edildikleri zaman çok ince duvarları vardır. İçlerinde renksiz olan lenf sıvısını taşırlar. 17 -20 yy. ‘‘larda aktif olarak civa ile işaretleme yöntemi kullanılmakta ancak birlikte ölü dokularda spontan pompalama mekanizması olmadığı için boya kısa süreli mesafe kat edebilmektedir. Bu yöntemin başarısının artması çok taze kadavra spesmenlerinde çalışılması ile mümkündür. Kullanıma patent blue, Tc 99 kolloid gibi yöntemlerin girmesi ile bu yöntemden uzaklaşmıştır.⁷⁴

Suami ve ark. tarafından yapılan ratların lenfatik sisteminin incelenmesine yönelik çalışmada sıçanların ön ve arka bacak dorsumu üzerinden, 1. web aralığından ve kuyruklarından %97 hidrojen peroksit ve %3 Patent Blue, 0.05 cc intradermal olarak enjekte edilmiş. Enjeksiyon olabildiğince yüzeysel yapılmaya çalışılarak dermal tabakada yer alan yüzeysel lenfatikler görüntülenmiş. Diz seviyesinde 1.0 mm çapındaki kısa safen ven ve ona eşlik eden 0.2 mm çapında lenfatik damarlar gözlemlenmiştir. Bu lenfatikler biceps femoris kasını kat ederek arka tarafta yer alan popliteal düğümüne dökülmektedir. Popliteal düğüm efferent lenfatikleri popliteal arter ve ven ile birlikte seyretmektedir. Femoral arter ve ven komşuluğunda devam etmekte ve inguinal ligaman hizasında abdominal kaviteye girmekte ve hipogastrik noda ardından lumbar noda drene olmaktadır. Her lumbar nod diyafram altında *sisterna şili* ile bağlantı kurmaktadır. Mezenter kökenli lenfatikler de *sisterna şili*'ye drene olmaktadır. Aynı şekilde torasik duktus da aorta sağ taraf komşuluğunda yer alıp *sisterna şili* 'ye drene olmaktadır.⁷⁴

Kuyruk bölgesindeki lenfatikler ise adeta örgü ilmikleri gibi birbirleriyle bağlantılıdır. Lateral kaudal ven komşuluğunda birleşip önce sakral noda ardından abdomendeki lumbal noda dökülürler. Sıçanın üst ekstremitesinde lenfatikler sefalik ven komşuluğunda seyreder ve triceps brachi kasını delip dorsale geçerek aksesuar aksiller lenf nodlarına dökülür. Aksesuar aksiller nod, aksiller nod ile bağlantılıdır ve efferent lenfatikler yoluna devam ederek sol veya sağ subklavikular venlere ulaşırlar. Sıçanlar ile insanların lenfatik sistemleri arasında benzerlikler ve farklılıklar vardır. İnsanlarda üst ekstremitate lenfatiklerinin çapı 0.3 mm iken sıçan üst ekstremitesinde lenfatiklerin çapı 0.2 mm' dir. İnsan ve sıçan vücudunun büyüklüğü karşılaştırıldığı

zaman insan ve sıçan lenfatikleri arasında minimal çap farkı vardır. İnsanlarda yüzeysel ve derin lenfatikler varken, sıçanlarda hemen cilt altında ve kas tabakası içinde seyreden yüzeysel ve derin lenfatikler vardır. İnsanlarda üst ekstremité lenfatikleri aksiller ve subklavikular lenf nodlarına bağlanırken, sıçanlarda dorsaldeki aksesuar lenf nodlarına ve ardından aksiller lenf nodlarına bağlanmaktadır.⁷⁴ (Şekil 2.14)



Şekil 2.14. Sıçanların Lenfatik sistemi

A-B: Ayak dorsumundaki yüzeysel lenfatikler, C: Popliteal Lenf Nodu D: Safen vene eşlik eden lenfatik
E: Lenfatik sistem radyografi görüntüsü.
(Suami H. ve ark., Demonstrating the lymphatic system in rats with microinjection. The Anatomical Record, 2011; 294:1566–1573.)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (H.Ü.T.F.) Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu'nun onayı (toplantı sayısı 2017/12, toplantı kayıt no:2017/06 karar numarası: 2017/06-12 sayı 2017-06 tarih:21.02.2017) alınarak Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Ankara Üniversitesi Nükleer Tıp Ana Bilim Dalı Hayvan Mikro PET-BT Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmanın yürütülmesi amacıyla Hacettepe Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (B.A.P) Koordinasyon Müdürlüğü'nden (sayı: THD- 2017-15150) destek alındı.

Çalışmada 42 adet 250-400 gram ağırlığında Sprague- Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. H.Ü.T.F. Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanan hayvanlar yine aynı laboratuvarında 'H.Ü.T.F. Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş' esasları doğrultusunda bakımları yapıldı. Deneysel hayvanlarının tamamı standart fiziki şartların sağlandığı, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık, 20-21°C sıcaklığında tekli kafeslerde barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları, standart laboratuvar yemi ve musluk suyu verilerek sağlandı.

Her cerrahi işlem, mikro BT ile çekim ve ICG ile Floresan görüntüleme (SPY) öncesinde sıçanlara ve 50 mg/kg Ketamin (Ketalar Flakon Pfizer, Brooklyn, New York, USA) ve 5 mg/kg Xylazine (Rompun flakon, Bayer, Leverkusen, Germany) olacak şekilde intraperitoneal olarak bu işlemlerden hemen önce uygulanarak anestezi sağlandı. Anestezi derinliği cilt ya da parmak kıstırma yanıtları ile değerlendirildi.

3.1. Cerrahi İşlemler

Deneysel hayvanlarının anestezisi ve cerrahi işlemleri Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırmaları Laboratuvarı'nda yapıldı. Cerrahi işlemler aseptik-antisepsi kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi. Cerrahi yapılacak alan Batikon %10 (Paviodine TM) ile yıkanarak temizlendi. Cerrahi işlemler cerrahi loupe altında (Zeiss Surgical Loupes 3.5X[®]) ve unipolar elektrokoter (The Hotsy 2000 Loop Tip Cautery, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1.1. Sekonder Lenfödem Modelinin Oluşturulması

Sıçan arka bacağında cerrahi olarak sekonder lenfödem modeli oluşturulması planlandı. Bunun için öncelikle sıçanların her iki bacağı tıraş edildi. Tüm cerrahi işlemler sıçanların sağ arka bacağına uygulanarak belirli bir standardizasyon sağlandı. Sağ arka ayak dorsumundan 0.1 ml %10 Evans Mavisi (Sigma-Aldrich, Saint Louis,MI) deri altı plana enjekte edildi (Şekil 3.1).

Enjeksiyon sonrası yaklaşık beş dakika süre ile bacak daimi olarak fleksiyona ve ekstansiyona getirilerek boyanın distalden proksimale akışı sağlandı. Evans Blue yardımı ile inguinal ve popliteal lenf nodları ve onlara eşlik eden lenfatik duktuslar boyandı. İlaç enjeksiyonunu takiben masaj sonrasında her sıçandan yaklaşık 0.5 cm'lik cilt hattı sirkumferansiyel olarak eksize edilerek onarım sonrası yüzeysel lenfatik kapillerlerin bağlantısının tekrar oluşmasının önlenmesi amaçlandı (Şekil 3.2).

Cilt eksizyonu sonrasında sıçanların lenfatik duktuslarının safen vene eşlik ettiği ve mavi-yeşil görünümde olduğu gözlemlendi. Yine insizyonun proksimal ve distalinde yer alan cilt fleplerinde de, mavi- yeşil boyayı tutmuş olan yüzeysel lenfatikler gözlemlendi. Safen vene eşlik eden lenfatik duktuslar takip edildi. Bu duktusların biceps femoris kasını delerek kasın arka tarafına geçip popliteal lenf nodlarına drene olduğu görüldü (Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5).

Efferent lenfatik damarların popliteal lenf nodunu geçtikten sonra önce popliteal arter ve ven ardından femoral arter ve ven komşuluğunda seyrini devam ettirerek inguinal ligaman altına seyrettiği ve burda bulunan inguinal yağ yastıkçığı içerisinde yerleşim gösteren inguinal lenf noduna drene olduğu görüldü. (Şekil 3.6) Sıçanların popliteal lenf nodu ve inguinal yağ yastıkçığı inguinal lenf nodunu da içerecek şekilde eksize edildi (Şekil 3.7, şekil 3.8).

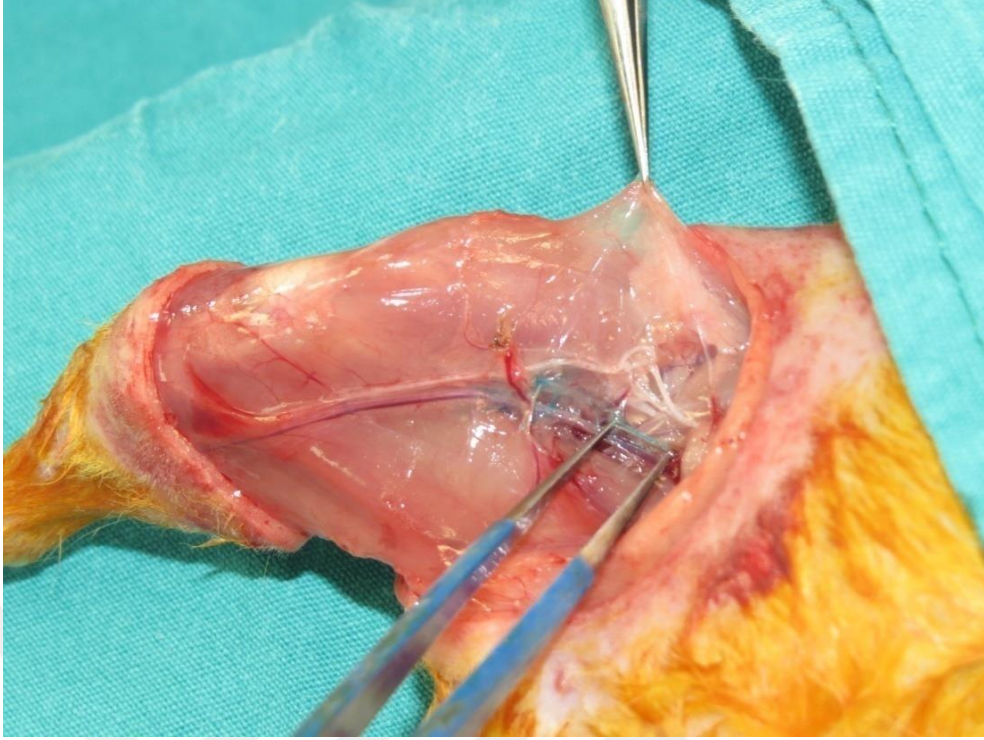
Lenf nodlarına giren lenfatik duktuslar ve femoral ven komşuluğundaki ana lenfatik duktus Unipolar el koteri (The Hotsy 2000 Loop Tip Cautery, ABD) ile koterize edilerek yakıldı (Şekil 3.9, Şekil 3.10). İnsizyonun proksimali ve distalindeki yüzeysel lenfatik yapılar da yine unipolar el koteri ile koterize edilerek yakıldı. Ardından 4.0 prolene ile 3 mm aralıklı olarak cilt hattı onarıldı ve gevşek pansuman yapıldı (Şekil 3.11).



Şekil 3.1. Evans Mavisi



Şekil 3.2. 0.5 cm'lik cilt adasının çizilmesi



Şekil 3.3. Femoral arter ve ven komşuluğunda ana lenfatik kanal

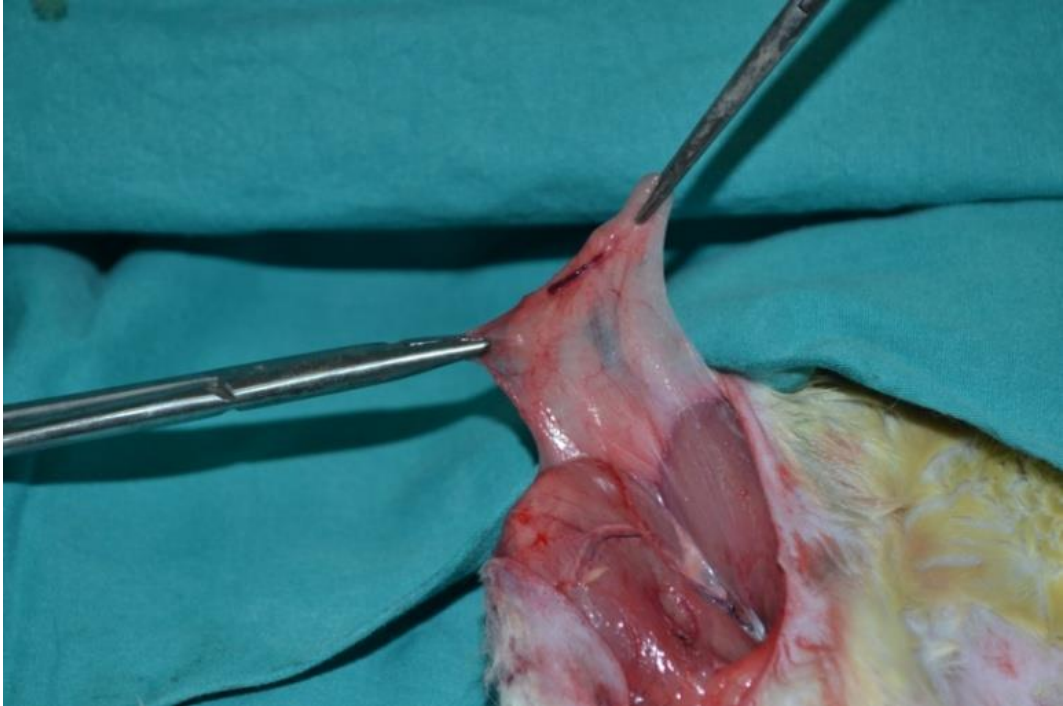
Lenfatik damar mikro forsepsin iki ucu rasında boyalı halde izlenmektedir.



Şekil 3.4. kas üzerinde yerleşim gösteren lenfatik damarlar



Şekil 3.5. Popliteal lenf düğümü Mikrolempin ucunda boyalı popliteal lenf nodu.



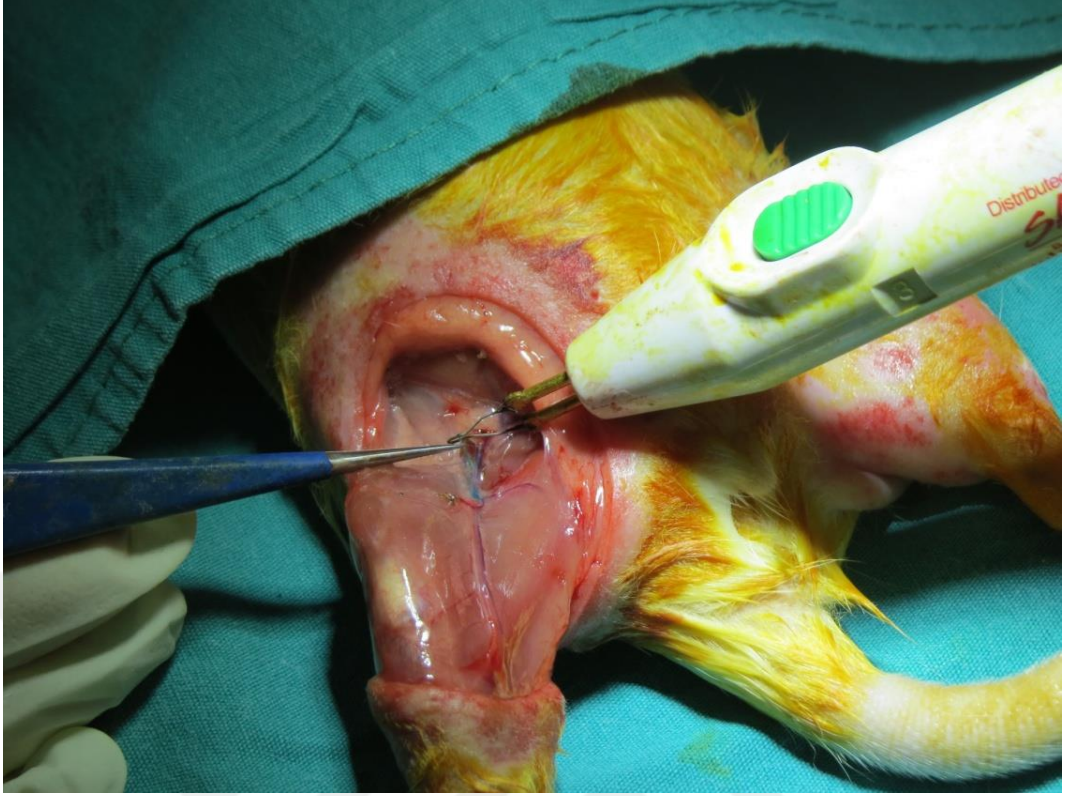
Şekil 3.6. İnguinal yağ yastıkçığı içerisindeki lenf düğümü



Şekil 3.7. Popliteal lenf düğümünün çıkarılması



Şekil 3.8. Popliteal lenf düğümü, inguinal yağ yastığı, cilt



Şekil 3.9. Ana Lenfatik Kanalın koterizasyonu



Şekil 3.10. Unipolar Koter



Şekil 3.11. Pansuman

Otokannibalizmi önlemek için film şeridinden koruyucu pansuman gevşek olarak cilde dikildi ve iki gün süre ile tutuldu.

3.2. İlacın Hazırlanması

Rapamisin (Sirolimus) ilacı toz halinde CaymanChem (Ann Arbor, Michigan, ABD) temin edildi. Rapamisin toz halinde ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ derecede saf olarak H.Ü.T.F Eczacılık Fakültesi Laboratuvarı'nda saklandı. Haftalık olarak ilaç solüsyonları oluşturuldu. İlaç oldukça lipofilik olduğu için %100 Etanol % 4 oranında, PoliEtilenGlikol 400 (PEG 400) %5 oranında, TWEEN 80 %5 oranında ve distile su %86 oranında karıştırılarak ilaç çözücü solüsyonu (= vehikül) oluşturuldu. İlaç konsantrasyonu / Çözücü konsantrasyonu literatüre uygun olarak 1/9 oranında hesaplandı. Rapamisin günlük kullanılacağı dozda bu solüsyon içinde çözülerek ilacın bozulması engellendi ve ilaç günlük olarak hazırlandı. Rapamisinin yarı ömrü sıçanlarda otuz saat ⁶⁶ olarak bildirildiği için günlük intraperitoneal olarak ilaç uygulandı. İki haftalık aralıklarla her gruptan rastgele iki sıçanda kan rapamisin düzeyi intrakardiyak kan alınmak suretiyle ölçüldü.

3.3. Grupların Oluşturulması

3.3.1. Grup 1 (CR1)

Grup 1 alışma kapsamında cerrahi- rapamisin (CR1) olarak kabul edildi. Gruba 250-400 gram ağırlıkları arasında toplam 8 adet sıçan alındı. Bu gruptaki sıçanlara öncelikle sağ arka bacakta cerrahi olarak lenfödem oluşturuldu ve cerrahi işlem sonrasında aynı gün 1mg/kg/gün Rapamisin ilacı intraperitoneal olarak dört hafta süre ile verildi.

Çalışmanın nc ve altıncı haftasında mikro- BT (*Sedecal Argus 2r, Spain*) ile ekstremite hacim ölümleri tibio- fibular eklem başlangıcı bileşkesinden yapıldı. Hayvanların kan rapamisin düzeyleri iki hafta aralıklar ile rastgele seçilen bir sıçan üzerinden değerlendirildi.

3.3.2. Grup 2 (CR1.4)

Grup 2 alışma kapsamında cerrahi- rapamisin (CR1.5) olarak kabul edildi. Gruba 250-400 gram ağırlıkları arasında toplam 5 adet sıçan alındı. Bu gruptaki sıçanlara öncelikle sağ arka bacakta cerrahi olarak lenfödem oluşturuldu ve cerrahi işlem sonrasında aynı gün 1.5 mg/kg/gün Rapamisin ilacı intraperitoneal olarak dört hafta süre ile verildi.

Çalışmanın nc ve altıncı haftasında mikro- BT (*Sedecal Argus 2r, Spain*) ile ekstremite hacim ölümleri tibio- fibular eklem başlangıcı bileşkesinden yapıldı. Hayvanların kan rapamisin düzeyleri iki hafta aralıklar ile rastgele seçilen bir sıçan üzerinden değerlendirildi.

3.3.3. Grup 3 (CR2)

Grup 3 alışma kapsamında cerrahi- rapamisin (CR2) olarak kabul edildi. Gruba 250-400 gram ağırlıkları arasında toplam 6 adet sıçan alındı. Bu gruptaki sıçanlara öncelikle sağ arka bacakta cerrahi olarak lenfödem oluşturuldu ve cerrahi işlem sonrasında aynı gün 2mg/kg/gün Rapamisin ilacı intraperitoneal olarak dört hafta süre ile verildi.

Çalışmanın üçüncü ve altıncı haftasında mikro- BT (*Sedecal Argus 2r, Spain*) ile ekstremitte hacim ölçümleri tibio- fibular eklem başlangıcı bileşkesinden yapıldı. Hayvanların kan rapamisin düzeyleri iki hafta aralıklar ile rastgele seçilen bir sıçan üzerinde değerlendirildi.

3.3.4. Grup 4 (R Grubu)

Grup 4 çalışma kapsamında rapamisin kontrol grubu (R) olarak kabul edildi. Gruba 250-400 gram ağırlıkları arasında toplam 5 adet sıçan alındı. Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı. Bu gruba 1 mg/kg/gün dozunda Rapamisin intraperitoneal olarak dört hafta süre ile verildi. Çalışmanın üçüncü ve altıncı haftasında mikro- BT (*Sedecal Argus 2r, Spain*) ile ekstremitte hacim ölçümleri tibio- fibular eklem başlangıcı bileşkesinden yapıldı. Hayvanların kan rapamisin düzeyleri iki hafta aralıklar ile rastgele seçilen bir sıçan üzerinde değerlendirildi. Kan alımı esnasında iki sıçan kaybedilerek çalışma kapsamından çıkartıldı ve bu grup dört sıçan ile çalışmayı tamamladı.

3.3.3. Grup 5 (V Grubu)

Grup 5 çalışma kapsamında çözücü (=vehikül) (rapamisin ilacının çözücüsü: Tween80-PEG400-Etanol-Distile Su) (V) grubu olarak kabul edildi. Gruba 250-400 gram ağırlıkları arasında toplam adet 5 sıçan alındı. Çözücü 5m/kg/gün hacminde olacak şekilde intraperitoneal olarak dört hafta süre ile verildi. Çalışmanın üçüncü ve altıncı haftasında mikro- BT (*Sedecal Argus 2r, Spain*) ile ekstremitte hacim ölçümleri tibio- fibular eklem başlangıcı bileşkesinden yapıldı.

3.3.2. Grup 6 (VC Grubu)

Grup 6 çalışma kapsamında çözücü [vehikül (V)] “rapamisin ilacının çözücüsü Tween80-PEG400-Etanol-Distile Su” - Cerrahi (VC) grubu olarak kabul edildi. Gruba 250-400 gram ağırlıkları arasında toplam 7 adet sıçan alındı. Haftalık olarak her iki ayak bileği çapı cetvel ile *manuel* olarak ölçüldü. Cerrahi işlem sonrası üçüncü ve

altıncı haftada mikro- BT (*Sedecal Argus 2r, Spain*) ile ekstremitte hacim ölçümleri tibio- fibular eklem başlangıcı bileşkesinden yapıldı.

3.3.7. Grup 7 (C Grubu)

Grup 7 çalışma kapsamında cerrahi (C) kontrol grubu olarak kabul edildi. Gruba 250-400 gram ağırlıkları arasında toplam 6 adet sıçan alındı. Haftalık olarak her iki ayak bileği çapı cetvel ile *manuel* olarak ölçüldü. Cerrahi işlem sonrası üçüncü ve altıncı haftada mikro- BT (*SedecalArgus 2r, Spain*) ile ekstremitte hacim ölçümleri tibio- fibular eklem başlangıcı bileşkesinden yapıldı.

3.4. Kan Rapamisin Düzeyi Ölçümü

Rapamisin alan sıçan gruplarından (R, CR1, CR1.5, CR2) rastgele seçilen birer hayvana iki hafta aralık ile kan rapamisin düzeyi intrakardiyak kan alınımı sonrası ölçülerek ortalama kan rapamisin konsantrasyonu hesaplandı.

3.5. Ayak Bileği Çap Ölçümleri

Manuel olarak cetvel yardımı ile C, VC, CR1, CR1.5 ve CR2 gruplarındaki sıçanların sağ ve sol ayak bileği çapları ölçülerek değerlendirmeye alındı. 2. haftadan başlayarak 4 hafta süre ayak bileği çapları ölçüldü. Makroskopik olarak V ve R gruplarındaki sıçanlarda ayak bileği çaplarında değişiklik olmadığı için bu sıçanlar iki hafta kadar ölçüldükten sonra çalışmanın bu kısmından çıkarılmıştır.

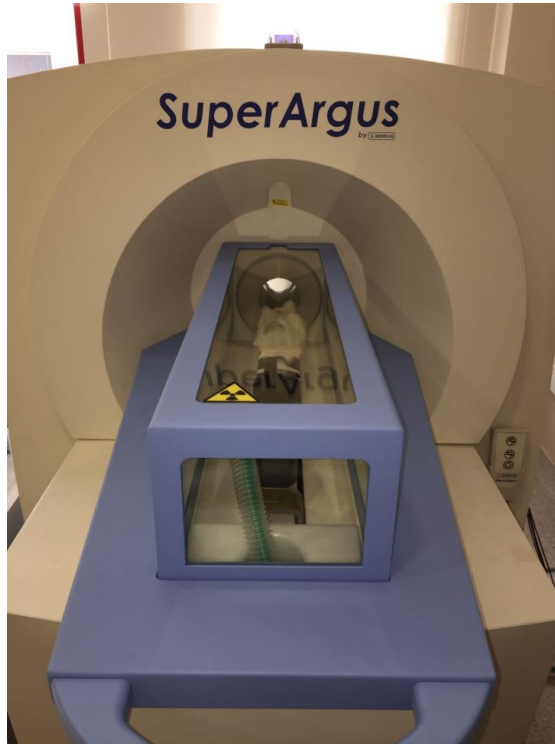
3.6. Mikro Bilgisayarlı Tomografi İle Hacim Ölçümü

Her gruptan iki adet sıçan deney başladıktan sonraki üçüncü ve altıncı haftalarda Ankara Üniversitesi Nükleer Tıp ABD' a bağlı olan Hayvan Mikro PET- BT Laboratuvarı' na HEPA filtreli transport kafesleri (Şekil 3.12) ile götürülerek anestezi sonrası her iki ekstremitte tibiofibular eklem proksimali başlangıcındaki yumuşak dokunun uzunluğu ve eni ölçülüp bu iki değer birbiri ile çarpılarak hacim ölçümü amaçlanmıştır.⁷⁵

Mikro BT (*Sedecal Argus 2r, Spain*) yardımı ile hacim ölçümü ile deney başladıktan sonraki ilk hafta içinde sadece tek bir sığana demonstrasyon sağlaması amacıyla yapılmıştır. (Şekil 3.13)



Şekil 3.12. Hepa Filtreli Kafes



Şekil 3.13. Mikro- BT Cihazı

3.7. SPY Perfüzyon Değerlendirme Sistemi ile Lenfödem Değerlendirilmesi

SPY Perfüzyon Değerlendirme Sistemi (Novadaq Technologies Inc., Richmond, British Columbia, Canada) ve indosiyenin yeşili kullanılarak lenfatik işaretleme yapıldı.

Genel anestezi altında sıçanların ayak dorsumu 1. Web aralığından 0.1 ml İndosiyenin Yeşili (ICG) enjeksiyonu yapıldı. Yaklaşık on dakika boyunca sıçan alt ekstremitesi fleksiyon ve ekstansiyona getirilerek floresan boyanın iyice dağılması sağlandı. Çapı 0.1 mm ve daha büyük olan lenfatikler near-infrared camera sistemi aracılığı ile görüntülere lenfatik akım hakkında fikir sahibi olundu. C, VC, CR1, CR1.5 ve CR2 grubundan ikişer sıçana cerrahi sonrası ikinci ve altıncı haftalarda bu işlem yapıldı.

3.8. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi

Tüm sıçanlar deneyin altıncı haftasında sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sırasında sıçanlara 50 mg/kg Ketamin (Ketalar Flakon Pfizer, Brookyn, New York, USA) ve 5 mg/kg Xylazine (Rompun flakon, Bayer, Leverkusen, Germany) olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı. Sakrifasyon sonrasında da ayak bileği çapları ölçüldü. Ardından her iki ekstremitte femur proksimali hizasından ampute edilerek doku örnekleri formalin içine koyulup fikse edildi.

3.9. Histopatolojik Değerlendirme

Doku örnekleri ayak bileğine yakın olarak insizyon distalinden cilt, cilt altı doku ve kas yapılarını da içerecek şekilde alındı. Doku örnekleri formalin içine koyularak patoloji laboratuvarına teslim edildi. Doku örnekleri Hematoksilen- Eozin ve anti Lyve-1 antikoları (anti LYVE-1 antibody ab 14917, abcam, United Kingdom) ile boyandı.

Rotatuar mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C' lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95' den %60' a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akarsu altında yıkandı.

Hematoksilen ile 8 dakika boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsu altında kesitler yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dakika daha akarsu altında yıkandı. Daha sonra kesitler 3 dakika Eozin boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Anti Lyve-1 antikorlarını boyamak için doku örnekleri Leica- Bond Max (Sermed) cihazı ile işleme tabi tutuldu. ER- 2 ile 10 dakika ön işlem den geçirilen örnekler ardından 120 dakika süre ile antikor inkübasyonu yapıldıktan sonra boyanın kontrolü için fare ince barsak örnekleri fikse edilerek lenfatik damarların boyandığından emin olunuldu.

3.10. İstatiksel Değerlendirme

Tanımlayıcı istatistiklerden sayısal ölçümler için ortalama, ortanca, standart sapma değerleri ile niteliksel veriler için sayı ve yüzdeler verildi. Verier normal dağılım göstermediği için parametrik olmayan testler kullanıldı. İstatistiksel analizlerin tümünde $p < 0.05$ küçük değerler anlamlı olarak kabul edildi. Hesaplamalar için IBM SPSS versiyon 21 (IBM Corporation New Orchard Road Armonk, New York, USA) kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Ayak Bileği ap lümü

Bu işlem C, VC, CR1, CR1.5 ve CR2 gruplarındaki toplam 33 sıçana yapıldı. Haftalık olarak her iki ayak bileğinden çap ölçümleri manuel olarak gerçekleştirildi. İlk hafta cerrahi yapılan sağ ekstremite ile ameliyatsız sol ekstremite arasında gruplar arasında değişen yüzdelerde olmak üzere %17-28 arasında çap farkı izlendi. Tüm gruplarda ilk hafta çap değerleri yüksekti (şekil 4.1, şekil 4.2, şekil 4.3, şekil 4.4).

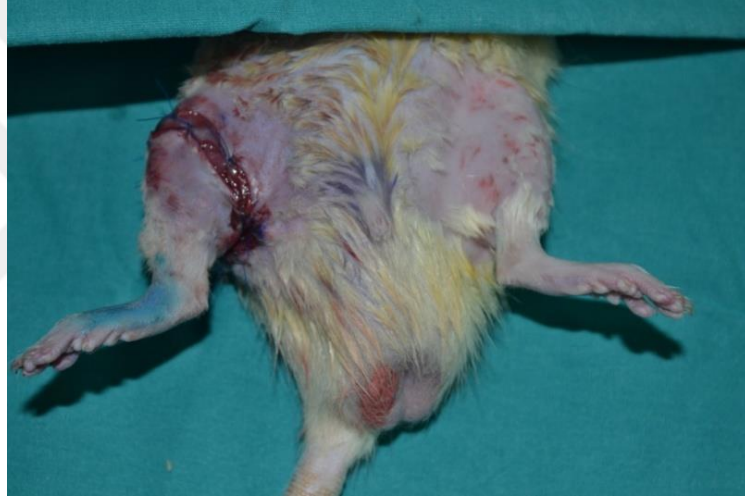
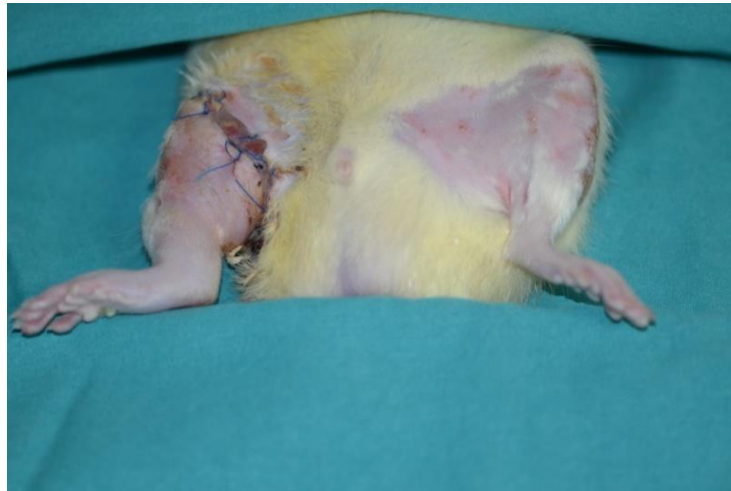
İkinci hafta ortalama değerler incelendiğinde VC, CR1 gruplarında daha belirgin olarak şişlikte azalma görüldü. 3. hafta çap ölçümlerinde özellikle C, VC, CR1 gruplarında diğer bacağa göre minimal fazlalık gösteren çap değerleri izlenirken CR1.5 ve CR2 gruplarında çap değerleri arasındaki fark biraz daha yüksekti (şekil 4.5, şekil 4.6, şekil 4.7).

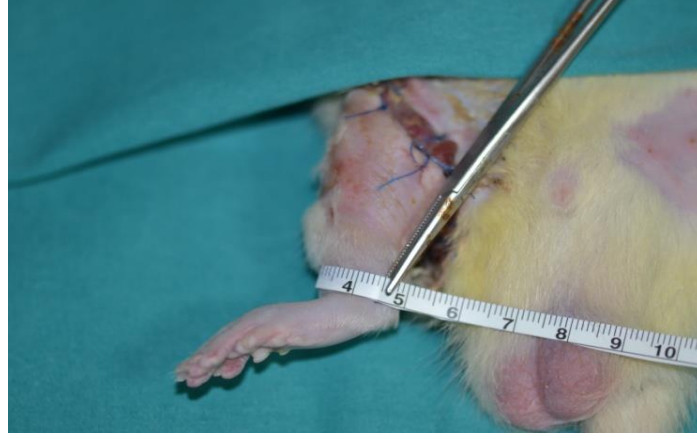
Her grupta cerrahi sonrası sağ ayak bileği çapları sol ayak bileğine göre ortalama olarak ikinci haftadan itibaren azalarak dört hafta süre ile ameliyat olmayan ekstremiteye göre daha şiş seyretti. 4. hafta sağ ve sol ekstremite ayak bileği çap ölçümleri arasında 0.1-0.2 mm çap farkı izlendi ama bu değerler makroskopik yada istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Beşinci haftanın başlaması ile birlikte ameliyat olan ve olmayan ekstremiteler arasında bir fark izlenmedi. (şekil 4.8)

Gruplar arasında ayak bileği çap ölçümleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Hem makroskopik olarak hem de manuel ölçüm değerleri ile özellikle CR1, CR1.5 ve CR2 gruplarında nc haftaya ulaşan ve sonrasında azalan diğer gruplarda ise daha erken dönemde sonlanan bacak şişliği bulgusu, lenfödem hali izlenmiştir (Tablo 4.1).

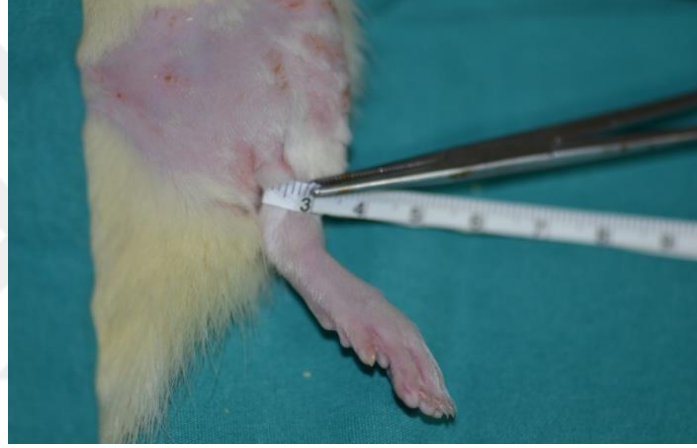
Tablo 4.1. Manuel Bacak Ölçüm Değerleri (mm cinsinden)

Gruplar	1. hafta Sağ Ayak Bileği Ölçümü	1. hafta Sol Ayak Bileği Ölçümü	2. hafta Sağ Ayak Bileği Ölçümü	2. hafta Sol Ayak Bileği Ölçümü	3. hafta Sağ Ayak Bileği Ölçümü	3. hafta Sol Ayak Bileği Ölçümü	4. hafta Sağ Ayak Bileği Ölçümü	4. hafta Sol Ayak Bileği Ölçümü
C	3.350	2.450	3.000	2.450	2.700	2.450	2.550	2.400
VC	3.000	2.500	2.700	2.500	2.600	2.500	2.500	2.500
CR1	3.050	2.200	2.750	2.200	2.450	2.200	2.300	2.200
CR 1.5	3.100	2.300	2.900	2.300	2.600	2.300	2.400	2.300
CR 2	3.200	2.400	3.150	2.400	2.800	2.400	2.600	2.400

**Şekil 4.1.** Ameliyat sonrası erken görüntü**Şekil 4.2.** Ameliyat sonrası 3. Gün. Makroskopik olarak sağ bacakta belirgin şişlik hali



Şekil 4.3. Ameliyat sonrası 3. Gün çap ölçümü sağ ekstremite (yaklaşık 4.6 mm)



Şekil 4.4. Ameliyat sonrası 3. Gün çap ölçümü sol ekstremite (yaklaşık 3.1 mm)

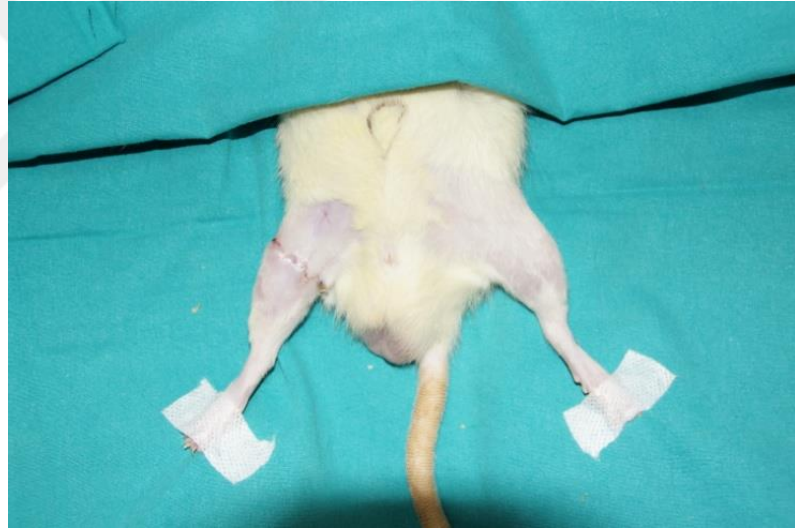


Şekil 4.5. Ameliyat sonrası 3. Hafta çap ölçümü sağ ekstremite

Yapılan ölçümlerde 3. hafta sağ ve sol ayak bileği manuel ölçümlerinde belirgin bir fark olmadığına dair makroskopik görüntü (sağ ayak bileği yaklaşık 2.9 mm genişlikte)



Şekil 4.6. Ameliyat sonrası 3. Hafta çap ölçümü sol ekstremitede (sol ayak bileği yaklaşık 3.1 mm genişlikte)



Şekil 4.7. 3. Hafta makroskopik görünüm: Her iki alt ekstremitede belirgin çap farkı makroskopik olarak gözlenmedi.



Şekil 4.8. 6. Hafta makroskopik görünüm

6. Haftada her iki alt ekstremitte arasında belirgin çap farkı makroskopik olarak gözlenmedi. Yüzeysel iyileşmenin sağlandığı görülmektedir. Lenfödem halinde makroskopik olarak gerileme izlenmektedir. Özellikle yüzeysel lenfatik damar organizasyonunun insizyonun proksimali ve distali arasındaki açıklığa rağmen gelişen epitelizasyon ile oluştuğu düşünülmektedir.

4.2. Mikro BT ile Çap Ölçümleri

Her iki ekstremitte tibiofibular eklem proksimali başlangıcındaki yumuşak dokunun uzunluğu ve eni ölçülüp bu iki değer birbiri ile çarpılarak hesaplanan hacim ölçümünde en yüksek değerlere ameliyat sonrası ilk haftada ulaşılmıştır (Şekil 4.8). Tablo 4.2' deki veriler incelendiği zaman en yüksek üçüncü hafta hacimleri cerrahi ile birlikte rapamisin ilacı uygulanan gruplarda görülmüştür (Şekil 4.9).

3. haftada C grubunda lenfödem tamamen gerilemiş, 6. haftada ise karşı ekstremitteye kıyasla daha az hacimde bir ekstremitte gözlemlenmiştir. VC grubunda 3. hafta minimal sebat eden ve istatistiksel açıdan anlamlı olmayan lenfödem görülmüş, uzun dönemde yine bacak hacminde gerileme izlenmiştir. V ve C gruplarında sağ ve sol ekstremitte göre istatistiksel bir test yapılamamış mevcut veriler ile bir öngörü sağlamıştır. Gruplar arasında ödem açısından anlamlı fark izlenmemiştir (Şekil 4.10). CR1, CR1.5 ve CR2 gruplarında diğer gruplara kıyasla sağ- sol ekstremitte hacimleri açısından daha fazla fark izlenmiş olup, istatistiksel olarak rapamisin ilacını alan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ayrıca tüm gruplar birbiri ile kıyaslandığında

bacak hacimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Mevcut verilere göre CR1, CR1.5, CR2 gruplarında da 6. haftada cerrahi yapılmayan ekstremiteye göre bacak hacimlerinde azalma istatistiksel olarak gösterilmiş ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

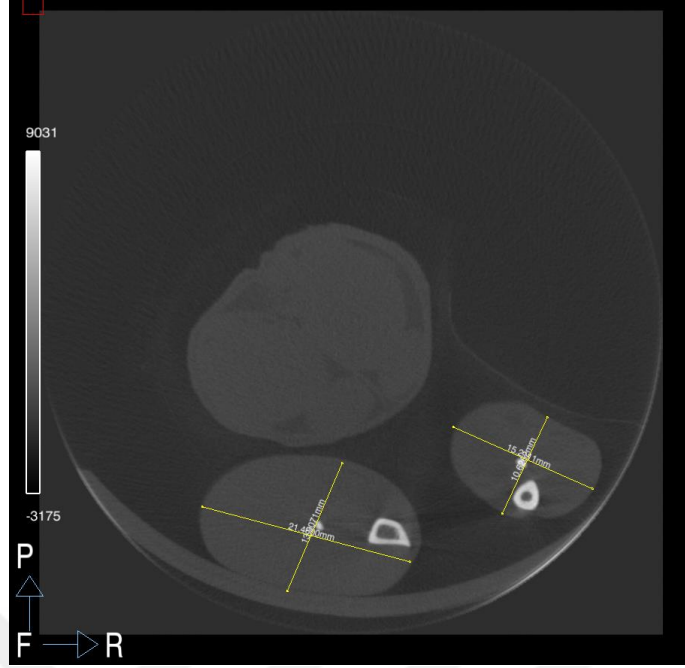
Tablo 4.2. Mikro BT ile Bacak hacimleri ölçüm değerleri (mm³ cinsinden)

Gruplar	3. hafta Sağ Ekstremitte Hacmi	3. hafta Sol Ekstremitte Hacmi	6. hafta Sağ Ekstremitte Hacmi	6. hafta Sol Ekstremitte Hacmi
C1	208,50	205,98	158,68	134,88
C2	149,15	160,66	139,87	160,53
C3	133,04	132,66	110,43	127,58
VC1	177,52	156,05	149,05	141,04
VC2	156,03	140,41	120,16	127,16
V1	125,92	119,22	133,00	118,37
V2	136,32	181,22	152,38	194,63
R1	121,92	135,28	119,24	121,11
R2	127,62	116,01	127,99	121,49
CR1 a	236,17	200,11	150,85	189,31
CR1 b	135,55	114,58	175,05	131,28
CR1 c	216,92	160,24	204,96	155,15
CR 1.5 a	168,17	132,10	118,42	130,22
CR 1.5 B	135,02	111,63	117,06	101,04
CR 2 A	213,88	104,00	150,55	96,48
CR 2B	174,01	144,15	125,79	141,09

Şekil 4.9’da ilk hafta çekilen mikro BT sonucunda koronal kesitte her 2 ekstremitede arasındaki hacim farkı dikkat çekmektedir.

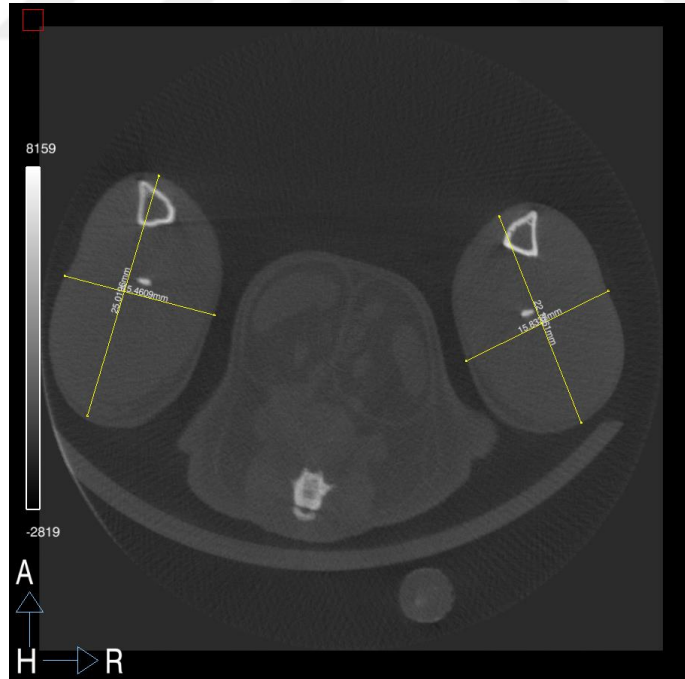


Şekil 4.9. Koronal kesit mikro BT görüntüsü 1. Hafta, sağ alt ekstremitede belirgin hacim artışı izlenmektedir.



Şekil 4.10. Aksiyal kesit. CR2 grubu 3. hafta

Sağ ekstermitede sola göre daha yüksek hesaplanan hacim değerleri. 3. Hafta; tibio-fibular eklem başlangıcından en, boy ölçümleri ile hacim hesaplanması (prone pozisyonda alınan görüntü)



Şekil 4.11. Aksiyal kesit CR2 grubu 6. hafta

Artık her 2 ekstremitde arasında anlamlı bir fark izlenmemektedir.6. Hafta; tibio-fibular eklem başlangıcından en, boy ölçümleri ile hacim hesaplanması (supin pozisyonda alınan görüntü)

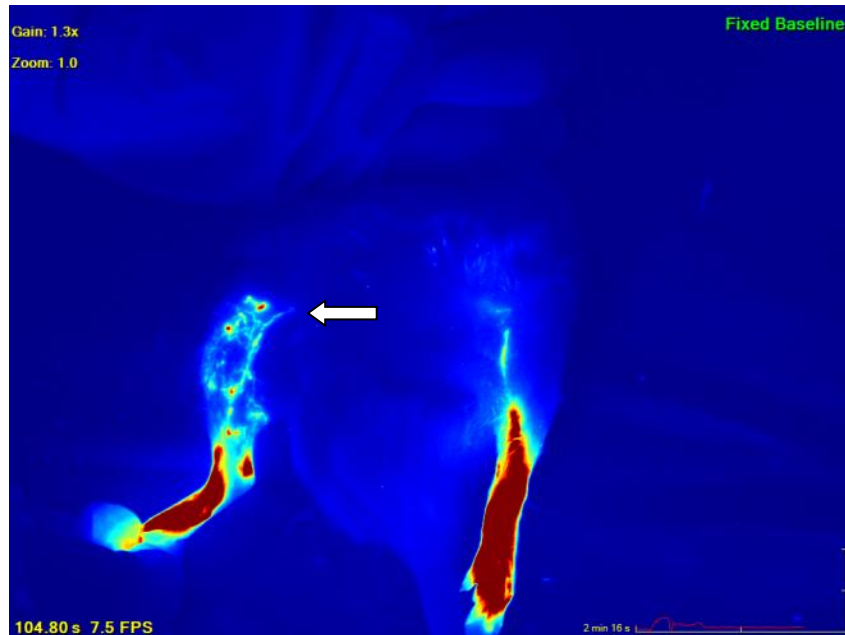
4.3. Kan Rapamisin Düzeyleri

Her gruptan rastgele seçilen iki sıçandan intrakardiyak olarak kan alınarak kan rapamisin konsantrasyonu değerlendirildi. Dört adet sıçan kan alımı işlemi esnasında kaybedildi. Aşağıdaki tabloda verilen değerler ilgili haftasına ait ortanca değerleridir. Aşağıdaki tabloda kan rapamisin konsantrasyonları görülmektedir. 2 mg/kg Rapamisin alan grupta insan lenfödem kliniğine sahip hastalarda olduğundan yaklaşık iki kat fazla düzeyde ilaç konsantrasyonunun dört hafta süre ile sebat etmesine rağmen lenfödem kliniği üçüncü haftadan sonra gerilemiştir.^{65,69} (Tablo 4.3)

Tablo 4.3. Kan Rapamisin Düzeyleri (ng/ml cinsinden)

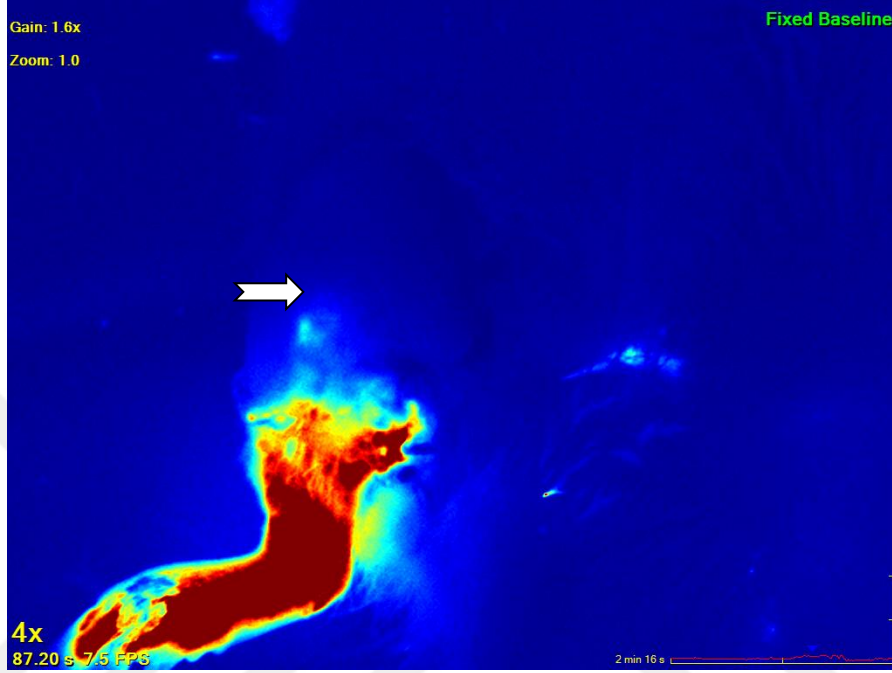
	2. HAFTA DÜZEYİ	4. HAFTA DÜZEYİ
1 mg/kg Rapamisin	16 ng/ml	19 ng/ml
1.5 mg/kg Rapamisin	24 ng/ml	26 ng/ml
2. mg/kg Rapamisin	33 ng/ml	39.8 ng/ml

4.4. SPY PERFÜZYON DEĞERLENDİRME SİSTEMİ İLE LENFÖDEM DEĞERLENDİRİLMESİ



Şekil 4.12. 2. Hafta SPY görünümü (C grubu)

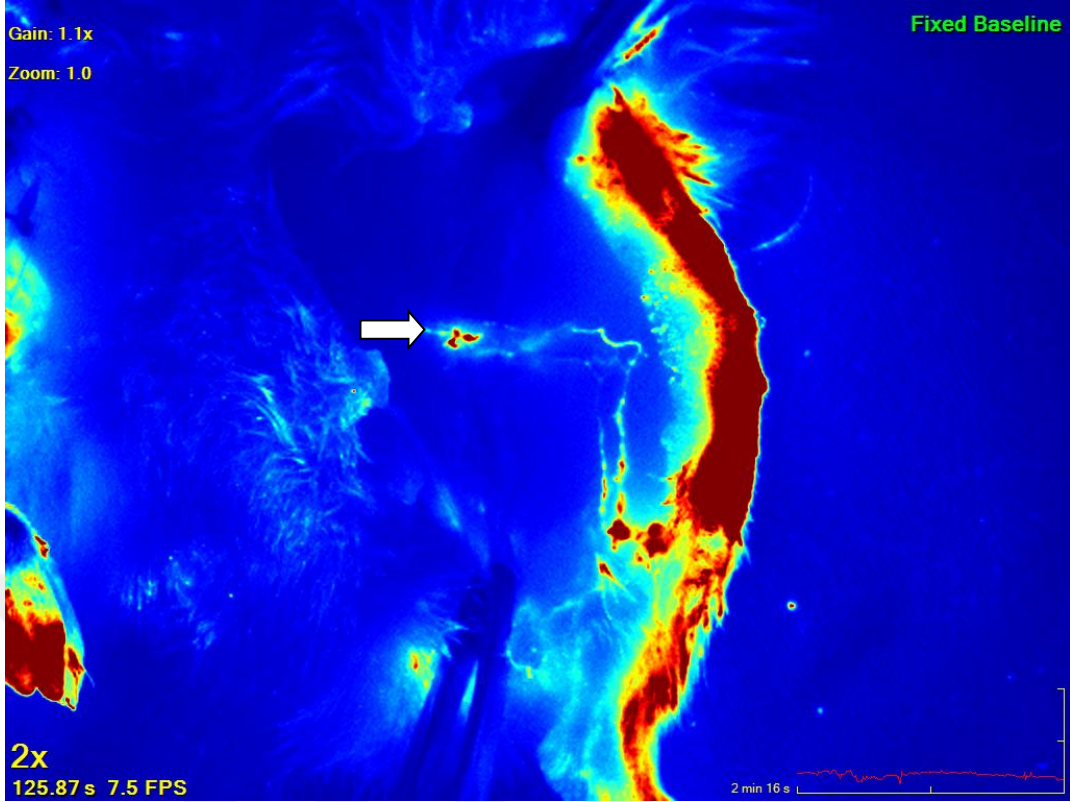
Sadece cerrahi işlem uygulanan C grubu 2. Hafta görünümü, Lenfödem kliniğinde kısmi azalma ve yüzeysel yeni lenfatik damarların oluşumu (← ile işaretli) dikkat çekmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.13. 2. Hafta SPY görünümü

(CR1.5 Grubu): sağ bacakta stardust (= yıldız tozu) paterni dikkat çekmektedir. proksimale . (ile → işaretli) lenfatik sıvı geçişinin olmadığı görülmektedir.

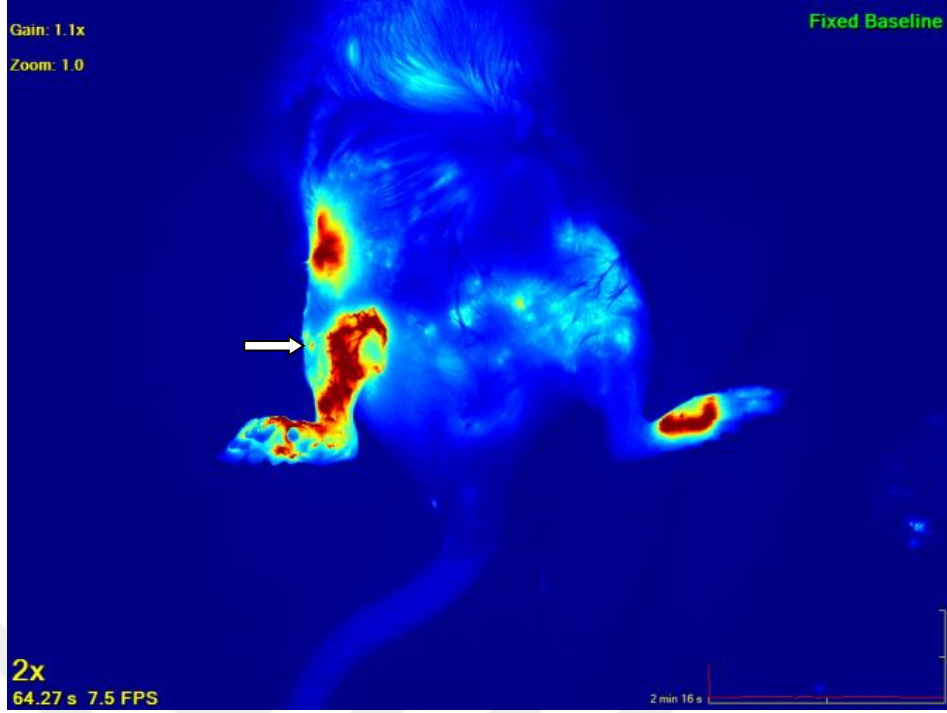
CR1.5 grubu 2. Hafta SPY görüntüsü, sağ bacakta stardust (=yıldız tozu) paterni dikkat çekmektedir. Yüzeysel lenfatik damarlar daha oluşmaya başlamamıştır. (Şekil 4.13) Bu sıçanın ameliyatsız diğer ekstremitesi incelendiği zaman devamlılığı olan derin lenfatik ana kanal ve döküldüğü inguinal lenf nodu görülmektedir. (Şekil 4.14)



Şekil 4.14. 2. Hafta SPY Görünümü

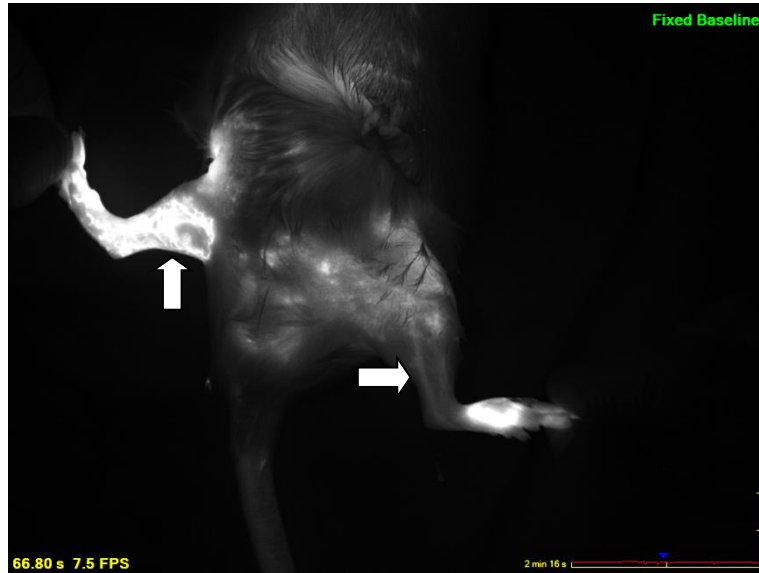
(C Grubu): Derin lenfatiklerin Görünümü, cerrahi işlem uygulanmayan sol arka bacakta derin lenfatik damar ağı ve inguinal lenf düğümü (\rightleftarrows ile işaretli)

6. hafta sonunda CR2 grubu gibi yüksek ilaç alan grupta dahi sağ arka bacakta oluşan lenfödemın rejenere olan yüzeysel lenfatik damarlaşma ile gerilediği gözlemlenmektedir. (Şekil 4.15) Sağ arka bacakta oluşan yüzeysel lenfatiklerin fazlalığı ile sol ekstremiteye göre sağ ekstremitede hacim azalması izlenmektedir. CR2 grubu yüzeysel lenfatiklerin fazlalığı dikkate çekmektedir. Sol ekstremitede düz bir uzanım gösteren derin lenfatik ana damar izlenirken sağ ekstremitede organize olmuş yüzeysel lenfatik damar ağları izlenmektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. 6. Hafta SPY görünümü

(CR2 Grubu) Yüzeysel lenfatikler damar ağının yoğunluğu (\Rightarrow ile işaretli) gösterilmektedir.



Şekil 4.16. 6. hafta SPY görünümü

(CR2 Grubu): Yüzeysel lenfatikler damar ağının yoğunluğu (\Rightarrow ile işaretli) gösterilmektedir. Ameliyatsız sol bacakta ise sadece derin lenfatikler ile lenfatik sıvı akışının sağlandığı (\uparrow ile işaretli) gösterilmektedir.

4.5. Histopatolojik Değerlendirme

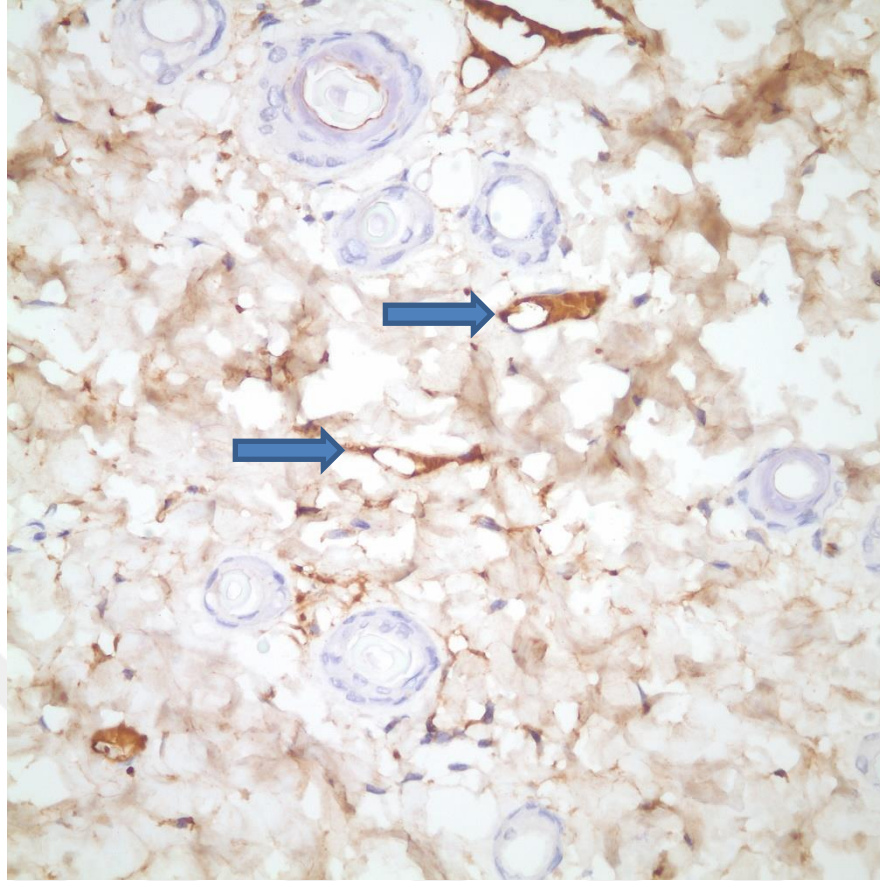
Tablo 4.4'te gruplardan bağımsız olarak sıçanların lenfatik sayıları ve makrofaj ilişkileri arasındaki veriler ortaya konmuştur. Sağ alt ekstremitedeki lenfatik sayıları ölçülmüş ve 1'den 3'e kadar numaralandırılmıştır. Yüksek oranda makrofaj içeren gruplarda, makrofaj sayısı orta veya az olan gruplara kıyasla daha yüksek oranda lenfatik damar sayısı izlenmiştir. Bir başka deyişle 3 olarak kabul edilen en yüksek lenfatik damar sayısını doku örneklerinin %53.8'inde görülmüş olup, bu %53.8' lik değer aynı zamanda doku örnekleri arasında en yüksek makrofaj sayısına ait örneklerdir. Tablo üzerinde de görüldüğü üzere lenfatik damar sayısı 2 olan toplam 13 sıçan dokusunun %76.9'unda yüksek oranda makrofaj izlenmiştir. Lenfatik sayısı 3 olan toplam 6 sıçanın %66.7'sinde yine yüksek oranda makrofaj izlenmiştir. Gruplar arasında ortaya konan bu farklılar istatistiksel açıdan tanımlayıcı olmuş ancak gruplar arasında örneklem büyüklüğü yetersiz geldiği için istatistiksel olarak test yapılamamıştır.

Tablo 4.4. Lenfatik Damar- Makrofaj ilişkisine ait veriler


SAĞ ARKA BACAK LENFATİK SAYISI MAKROFAJ SAYISI- İLİŞKİSİ

			Makrofaj Sayısı			Toplam
			yok	Orta	yüksek	
Lenfatik sayısı	1.00	Sayısal değer	7	6	7	20
		Yüzdellik oran	35.0%	30.0%	35.0%	100.0%
	2.00	Sayısal değer	2	1	10	13
		Yüzdellik oran	15.4%	7.7%	76.9%	100.0%
	3.00	Sayısal değer	0	2	4	6
		Yüzdellik oran	0.0%	33.3%	66.7%	100.0%
Toplam		Sayısal değer	9	9	21	39
		Yüzdellik oran	23.1%	23.1%	53.8%	100.0%

Makrofaj sayısının gruplar içinde dağılımı incelendiği zaman; özellikle C, CR1, CR1.5 ve CR2 gruplarında daha fazla oranda (%53.7- %83.3 oranlarda değerlendirilen) yüksek oranda makrofaj görülmüştür. Makrofaj sayısı orta ve yüksek olarak değerlendirilen gruplar cerrahi işlem uygulanan sonrasında ek olarak ilaç ya da çözücü verilen gruplardır. Bir başka açıdan değerlendirecek olursak R ve V gibi ilaç ya da çözücü kontrol grupları haricindeki gruplarda daha yüksek makrofaj sayısına



Şekil 4.17. Lenfatik Damar Yapısı

(CR2 Grubuna Ait) : LYVE-1 İmmunperoksidaz boyanan ( ile işaretli) lenfatik damar yapıları gösterilmektedir. (X400 büyütme altında)

5. TARTIŞMA

Kronik lenfödem tedavi yöntemleri hastalığın evresine göre değişmekle birlikte her hastalıkta olduğu gibi erken tanı hayat kalitesi ve hastalığın ilerleyişi açısından önemlidir. Erken dönem tedavilerini masaj, bası giysileri, ekstremite elevasyonu, lenfatik akışı arttıracak egzersizler gibi konservatif yöntemler oluşturmaktadır. Mevcut cerrahi tedavi yöntemleri arasında Charles Prosedürü, Liposakşın, vaskülarize lenf nodu transferleri, lenfatikovenüler anastomozlar yer almaktadır. Ancak hangisinin üstün olduğuna dair ortak bir kanı yoktur. Bu sebeple kronik lenfödem tedavileri için yeni yöntemler araştırılmaktadır ve hayvan deneyleri önem kazanmaktadır.

Yeni tedavi modellerinin klinik olarak uygulanmadan önce deneysel hayvan modellerinde araştırılması bilimsel çalışmaların temelidir. Ancak yeni bir tedavi modelinin lenfödem üzerinde etkisi araştırılırken tedavi metodunun etkisini ortaya koymasında bilimsel hatalar yapacak ek dış faktörlerin olmaması lazımdır. Kemirgenlerde oluşan lenfödem hiçbir müdahale yapılmadan kendiliğinden gerilemektedir.⁷¹ bu nedenle bildirilen tedavi yöntemlerinin etkinliği de tartışılabilir. Bilindiği üzere meme kanseri hastalarına aksiller lenf nodu disseksiyonu uygulanmakta ve sonrasında verilen radyoterapi ile kronik lenfödem oluşmaktadır. Hayvan deneylerinde de aynı mantıkla lenfödem modeli oluşturulmaya çalışılmış, köpeklerde dokuz aya kadar,⁷² sıçanlarda ise ortalama üç aya kadar sebat eden⁷⁵ ardından spontan iyileşme gösteren lenfödem modelleri bildirilmiştir.

Lenfanjiogenezin oluşum mekanizması ile ilgili en çok kabul gören teori; embriyogenez esnasında lenfanjiogenez başlatan esas etken olan Vasküler Endotel Growth Faktör Reseptör-3 (VEGFR-3) tarafından uyarılan Vasküler Endotel Growth Faktör C/Vasküler Endotel Growth Faktör D (VEGF-C/VEGF-D) sinyal yolağının aktivasyonudur. Bu aktivasyon ile lenfatiklerin gelişmesi, proliferasyonu ve migrasyonu mümkün olmaktadır ve bu yolla uyarı eksikliği insanlarda Milroy Hastalığı etyolojisinde rol oynamaktadır.⁴⁰ Sirolimus ilacı da bu yolla inhibisyona yol açmakta ve potansiyel bir lenfanjiogenez inhibitörü olarak değerlendirilmektedir.⁶¹

Kanter ve ark.⁷¹ tarafından sıçanlarda radyoterapi etkisi ile fibrozisin ön planda olduğu bir lenfödem modeli tanımlanmıştır. Biz de fibrozisin sıçanlarda lenfödem oluşmasında önemli bir faktör olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızı küçük deney hayvanlarında fibrozisin geçici olduğunu ve her zaman rejenerasyon kapasitelerinin insanlardan fazla olduğunu göz önünde bulundurarak planladık. Cerrahi ile oluşturduğumuz akut lenfödem modelini, Rapamisin vasıtasıyla lenfanjiogenezi inhibisyonunu idame ederek makroskopik ve histopatolojik olarak insanlara benzer kronik bir model haline getirmeyi amaçladık.

Son çalışmalar göstermiştir ki sıçan arka bacak modelleri kuyruk modellerine göre; lenfatik kapiller rejenerasyonu, toplayıcı tübüllerdeki pompalama mekanizmasının ve makrofaj hücre trafiğinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha uygundur.⁶⁷ Kuyruk modellerinde ise ödemin devamlılık hali daha azdır ve subkutan dokuda daha az fibrozis ve adipoz doku depolanması görülür. Bu durumda kuyruk modellerini insandaki akut lenfödem modellerine histolojik açıdan daha benzer kılmaktadır.⁷⁶ Çalışmamızda bu parametreleri göz önünde bulundurarak insan kronik lenfödem benzeri bir model oluşturmayı hedeflediğimiz için kuyruk modelinden ziyade sıçan arka bacak modelini kullandık.

Çalışmamızın sonuçlarını irdelediğimiz zaman, en belirgin lenfödem ameliyat sonrası 2. günde izlendi. Gruplar arasında en uzun süreli lenfödem 3 hafta süre ile cerrahiye ek olarak 1.5 mg/kg ve 2 mg/kg Rapamisin ilacı alan gruplarda izlendi. Literatür incelendiğinde Yan ve ark. Tarafından yapılan çalışmada, cerrahi olarak akut lenfödem modeli oluşturulmasından 2 hafta sonra lenfödemli dokuda en yüksek düzeyde VEGF-C konsantrasyonuna ulaşılmakta, VEGF-C lenfatik rejenerasyonun distalden proksimale doğru oluşmasını sağlamakta ve lenfödem kliniğinde 2. haftanın başından itibaren gerileme gözlemlendiği bildirilmiştir.³² Bizde belirttiğimiz makaledeki sonuçlara paralel olarak çalışmamızda da CR1.5 ve CR2 gibi gruplar haricindeki diğer gruplarda iki hafta içinde bariz olarak çözülmeye başlayan lenfödemi gözlemledik.

Çalışmamızda histopatolojik olarak gruplar arasında lenfatik sayısı ya da çapı açısından bir fark izlenmedi. 6. haftada elde edilen doku örneklerinde fibroze dair bir bulguya rastlanılmadı. Doku örneklerinde fibrozisin olmadığı, ancak rejenerasyonun gerçekleşmiş olduğu görüldü. Fibrozisin olmaması bize lenfödem modelinin kronik

bir süreci yansıtmadığını düşündürdü. Makrofaj sayısının arttığı dokularda ise daha fazla sayıda lenfatik damar görüldü. Bilindiği üzere fibrozis kronik lenfödem kliniğinin esas bileşenidir.⁶⁷ Lenfödemli dokuda makrofaj birikimi beklenir. Makrofajlar fibrozisin yönetiminde aktif rol oynayan hücrelerdir. Lenfödemli bölgede biriken makrofajlar VEGF-C salınımına neden olmaktadır. Kemik ililiğinden makrofajların yapımının engellenmesiyle elde edilen deneysel transgenik fare modellerinde VEGF-C ekspresyonunu inhibe olmaktadır.⁷⁸ Makrofaj azalması aynı zamanda VEGF-C 'nin azalmış salınımı ile beraberdir. Makrofaj yapımı engellendiği farelerde kapiller lenfatik damar sayılarında bariz azalma gözlemlenmiştir. ⁷⁸ Bu bilgiler ışığında çalışmamızın sonuçları içinde makrofaj sayısının daha fazla bulunduğu dokularda daha fazla lenfatik damar gördüğümüzü destekler niteliktedir.

Ayrıca uzun dönemde, 6. haftada SPY ile değerlendirme sonucunda özellikle cerrahi işlem uygulanan sağ arka bacakta, sol arka bacağa oranla daha fazla sayıda yüzeysel lenfatik saptanmıştır. Bu nedenle biz lenfödem kliniğinin iyileşmesine yüzeysel lenfatik kapillerlerin yeniden düzenlenmesinin sebep olduğu düşündük. Goldman ve ark⁷⁶.'larının fare kuyruğu modellerindeki lenfojenезin oluşum mekanizmasını incelendiği çalışmada bizim çalışmamıza paralel sonuçlar saptanmıştır. Şöyle ki bu çalışmada cerrahi alanın distalinde yer alan lenfatik endotel hücrelerinin migrasyonunun, proliferasyonunun ve rejenerasyonunun cerrahiden sonraki 10. günde başlaması, 17. günde ise hem proksimalde hem de distalde rejenerasyonlarının gözlemlenmesi ve 60. günde rejenere olmuş ve hayli organize yüzeysel lenfatik kapillerlerin gözlemlenmesi, çalışmamızdaki 6. haftada organize yüzeysel kapiller lenfatik damar ağını görmemizi destekler niteliktedir.

Dikkatimizi çeken diğer konu ise ekstremitte mikro BT ile hacim ölçümlerinde 6. hafta sonuçlarında cerrahi işlem uygulanan sağ arka bacakta, cerrahi işlem uygulanmayan sol arka bacağa oranla ekstremitte hacminde daha fazla azalmanın olduğu saptanmasıdır. Çalışmamızda sıçanlarda kan rapamisin ilaç konsantrasyonu insanlardaki lenfödem kliniği oluşturduğu bildirilen kan rapamisin konsantrasyonlarından yaklaşık iki kat daha yüksek olmasına rağmen⁶¹ çalışmamızda akut lenfödem idame edildiği gözlemlenmemiştir. Çalışmamızda makroskobik ve histopatolojik sonuçlar sıçanlarda kronik lenf ödem oluşturulmasının imkanı olmadığını oldukça güçlü şekilde mevcut literatür veri ve bilgileri ile

desteklendiğinden istatistiksel bir çalışma yapmayı gerekli görmedik Tanımlayıcı özellikte bulunan ekstremite çap ve hacim ölçümü verilerinin yanında histopatolojik veriler dahilinde; lenfanjiogenezin ilaç yolu ile inhibe olmasıyla dahi kronik bir lenfödem modeli oluşturulamamıştır.

Çalışmamızda Sirolimus' un lenfatik damar proliferasyonunu ve hiperplazisini inhibe edici etkisinden faydalanmak için sıçanların mevcut yüzeysel ve derin lenfatiklerin koterize edip, lenf nodlarını çıkarmamıza ve ilaç vermeme rağmen; histopatolojik olarak ve SPY ile görüntüleme neticesinde yüzeysel lenfatik damar oluşumunun oldukça yüksek oranda bulunduğunu saptadık.

Diğer bir bulguyu tartışırsak, insanlarda izole VEGFR-3 eksikliği sonucu oluşan Milroy Hastalığı' nda lenfödem kliniği izlenmekte ancak deney hayvanlarında monoklonal VEGFR-2 ve VEGFR-3 blokörü antikorları verilmesine rağmen lenfatik rejenerasyon engellenememektedir. Bu durum insanlarda tek bir değişken olan VEGFR-3 eksikliğinin lenfödem yaratabileceğini düşündürürken, küçük deney hayvanlarında iki farklı monoklonal reseptör antikorlarının bile, uzun süreli lenfödem yaratamadığını ve bu hayvanlarda birden fazla değişkenin lenfödem patofizyolojisinde görev aldığını düşündürmektedir.⁷⁶ Goldman ve ark.⁷⁹ tarafından bildirilen başka bir anti VEGFR-3 monoklonal antikor tedavisi ile idame edilmeye çalışılan, ancak sadece 15 gün izlenen lenfödem modeli de göstermiştir ki reseptörlerin blokajı bile deney hayvanlarında yüzeysel lenfatik kapillerler oluşumu engelleyememektedir. O halde akla gelen soru, lenfatik kapillerler organizasyonunu sağlayan parametrenin ne olduğudur?

Bu sorunun cevabını düşündüğümüzde, araştırmalar göstermiştir ki fibrozis ile lenfödem arasında belirgin bir ilişki vardır. Radyoterapi, infeksiyonlar, cerrahi rezeksiyonlar ile artmış lenfödem insidansı aslında fibrozis ile ilişkilidir. Bu faktörler bile fibrozisin anormal lenfatik rejenerasyonu için anahtar element olduğunu göstermektedir. Yeni lenfatiklerin insanlarda oluşamaması, rejenerasyonlarının mümkün olmaması ya da radyoterapiye ikincil gelişen hasar mekanizması, insanlarda oluşan lenfödem kliniğinin neden hayvan modelleri ile mukayese edildiği zaman insanlarda geri dönüşümsüz olduğunu göstermektedir.⁷⁰

Bu verilere paralel başka bilimsel sorularda yanıt beklemektedir. Sıçan modellerinde fibrozisin yetersiz ve kısa süreli oluşmasının sebebi nedir? Hayvan modellerinde fibrozis ile insanlara göre daha kolay başa çıkılmasının esas nedeni nedir? Hayvan çalışmalarında neden kronik lenfödem kliniği bu kadar erken yaklaşık 1 aylık gibi bir sürede kendiliğinden çözülmektedir?

Biz bu soruların cevabının inflamasyona sekonder göç eden makrofajlar olduğunu düşünmekteyiz. Küçük hayvan modellerini inceleyen birçok çalışmada lenfödeme ikincil olarak hasarlı dokuya olan makrofaj göçü gösterilmiştir. Makrofajlar fibrozis ve lenfanjiogenezisin düzenleyicisi olarak değerlendirilmektedir. Fibrozisi yıkmak için kendi salınımlarını indüklemeleri ve VEGF-C salınımı yapmaları sonucunda geçici lenfatik hiperplazinin oluşması ile spontan rezolüsyona uğrayan bir lenfödem kliniği bu soruya cevap olabileceğini düşünmekteyiz.

Ghanta ve ark.⁷⁸ tarafından makrofajdan yoksun transgenik fare lenfödem modellerinde yapılan bir çalışmadaki bulgularda, lenf ödemli uzvun şişliğinde azalma olmamış, VEGF-C daha az salınmış ve dokuda aşırı artmış fibrozis izlenmiştir. Bu çalışma göstermiştir ki makrofajlar lenfödem esnasında antifibrotik role sahiptir ve VEGF-C kaynağıdır. Makrofajların sayıca azalmaları ile lenfatik fonksiyonda kayıp meydana gelmektedir. Bu hipotez aslında klinik olarak değerlendirildiğinde fibrozisin esas lenfödem sebebi olduğunu düşündürmektedir.⁷⁸

Ayrıca Furukawa ve ark. tarafından yapılan çalışmada, çalışmamızdakine benzer şekilde farelerde arka bacak lenfödem modeli oluşturulmuş ve akut inflamasyonun oluşması engellemiştir. Çalışmanın bulgularında dokuda makrofaj sayısında kontrol gruba göre azalma izlenmiş, böylece VEGF-C ekspresyonunda artışın; dolayısıyla yüzeysel lenfatiklerin rejenerasyonunun, migrasyonunun ve proliferasyonunun önüne geçilerek 4 hafta süre ile idame edilen lenfödem kliniği oluşturulmuştur.²⁵

Inoue ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada sıçanların tek taraflı olarak bacak replantasyonu gerçekleştirilmiş ve lenfatik akım takip edilmiştir. Replantasyon esnasında herhangi bir lenfatik anastomoz yapılmadan replantasyon sonrası 3. günden itibaren yüzeysel lenfatiklerin oluşmaya başladığı ve lenfatik akımın proksimale iletildiğini cerrahi sonrası 12. günde ise tamamen normal bir ekstremité gibi lenfatik

akım paternine sahip olduklarını, popliteal ve inguinal lenf noduna giden afferent ve efferent lenfatikleri lenfosintigrafi ile göstererek ortaya koymuşlardır.⁸⁰

Petropoulos ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise köpeklerin bacakları ampute edilmiş ve ardından replante edilerek lenfatik akım incelenmiş. Ameliyat sonrası 21. güne kadar lenfödem kliniği görülmüş, lenfatik rejenerasyon lenfosintigrafi ile ilk kez ameliyat sonrası 7-11. günler arasında oluşmaya başlamıştır.⁸¹

Yukarda bahsetmiş olduğumuz tüm deneysel çalışmalarda kronik lenfödemin oldukça kısa süreli olduğunu literatür araştırmamız sonucunda saptadık. Buna rağmen insanlarda Lein ve ark. tarafından bildirilen replantasyon sonrası lenfödem ile ilgili yaklaşık 190 vakalık bir seride ise bazı hastalarda ameliyat sonrası 4- 6. haftadan sonra replante edilen ekstremitede ödemin azalmaya başladığı, bazı hastalarda ise postoperatif 5.- 6. aya kadar sebat eden ve gerilemeyen kronik lenfödem olduğu bildirilmiştir. Çok önemli bir bulgu olarak hastaların yaşı, yaralanma paterni önemli olmakla birlikte fibrozisin belirgin olduğu vakalarda daha fazla lenfödem olduğu bildirilmiştir.⁸²

Benzer travmanın küçük ve büyük deneysel hayvan modelleri ile insanda oluşturduğu farklı lenfatik rejenerasyon cevabı düşündürücüdür. Bu farklı veriler bile sıçan ya da fare modellerinin insan lenfödem tedavisi açısından yeterliliğini sorgulamaktadır.

Bu bilgiler ışığında bazı varsayımlarda bulunmak olasıdır. İnsanlarda oluşan lenfödem kliniği daima yavaş ilerleyen ve spontan iyileşme göstermeyen bir seyirdedir. Oysa tüm deney hayvanlarında çok hızlı bir sekonder lenfödem seyri oluşmakta ve kısa süre içinde spontan iyileşme göstermektedir. Bizim düşüncemize göre kemirgen hayvanlar insan çalışmaları için uygun örnekler değildir. Bu canlılarda skar bile oluşamamakta ve doku iyileşmesi çok hızlı olmaktadır.⁸³ Belki de bu yüzden hayvan çalışmaları insanlar için yeterli bir simülasyon modeli sağlayamamaktadır.⁸⁴

Literatürü taradığımızda insan lenfödem doku örneklerinden makrofaj miktarı ya da makrofajlardan salınan VEGF-C 'ye dair bir bilgiye rastlayamadık. Belki de insanlarda lenfödemin bu kadar ilerleyici ve fibrozis ile seyretmesinin sebebi bizim düşüncemize göre insan makrofajlarından yetersiz salınan ya da salınmayan

metalloproteinazlar ve VEGF-C' dir. Bilindiği üzere makrofajlar fibrozisi kırmak için Matriks Metalloproteinaz (MMPs) adlı kollejenazı salgırlar. Böylece ekstraselüler matriks yıkımı sağlanır ve fibrozis geriler.⁸⁵ Preklinik modellerde doku fibrozisini azaltacak yöntemler geliştirildiği taktirde lenfatik fonksiyonunun artacağı öngörülmektedir.⁷⁸ İnsanlardaki kronik lenfödem kliniği ile mukayese etmek için insan doku örneklerindeki makrofaj göçü ve bu makrofajlardan salınan VEGF-C miktarını incelemek ve fibrozisin önüne geçmek faydalı olabilir.



6. SONUÇLAR

Literatürde küçük hayvan modellerinde yaklaşık olarak dokuz ay süre ile en uzun lenfödem modeli Kanter ve ark.⁷¹ tarafından bildirilmiş olmasına rağmen yaptığımız literatür taramasında dört aya kadar en uzun süreli olarak radyoterapiyle idamesi sağlanan lenfödem makalelerine rastladık. Bilindiği üzere insanlarda lenfödem hastalığı fibrozis ile ilerleyen kronik bir süreçtir. Yeni tedavi modellerinin klinik olarak uygulanmadan önce deneysel modellerinde araştırılması bilimsel çalışmaların temelidir. Ancak yeni bir tedavi modelinin lenfödem üzerinde etkisi tedavi metodunun dışındaki faktörlerden etkilenmemelidir. Kemirgenlerde oluşan lenfödem hiçbir müdahale yapılmadan kendiliğinden gerilemektedir ve bildirilen tedavi yöntemlerinin etkinliği de tartışmalıdır.

Çalışmamızda küçük deney hayvanlarında fibrozisin geçici olduğunu ve her zaman rejenerasyon kapasitelerinin insanlardan fazla olduğunu göz önünde bulundurarak cerrahi ile oluşturduğumuz akut lenfödem modelini lenfanjiogenezi inhibe ederek makroskopik ve histopatolojik olarak insanlara benzer kronik bir model haline getirmeyi amaçladık. Sonuç olarak gerek kendi oluşturduğumuz lenfödem modelinde ve gerekse literatür taraması sonucunda küçük deney hayvanlarında kronik bir lenfödem modelinin oluşturulmasının mümkün olmayacağını düşünüyoruz, lenfödeme yönelik yeni tedavi yöntemlerinin küçük hayvan modellerinde denenmesinin çok uygun olmadığını ve yeni bir teknik denenirken küçük hayvan lenfödem modellerinde denenmesinin bilimsel olarak hatalı sonuçlar doğurabileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Kubik S., Kretz O. Földi's Textbook of Lymphology for Physicians and Lymphedema Therapists. 2'nd edition. Munich, Mosby-Elsevier. 2006; 1-149.
2. Rautenfeld B.D, Claus P. Terminal Vascular System (Microcirculation), Intertitial Connective Tissue, Lymph Capillaries and Precollectors. Földi's Textbook of Lymphology for Physicians and Lymphedema Therapists. 2nd edition. Munich, Mosby- Elsevier.2006; 151-9.
3. Güç H., Fare Kuyruğunda Oluşturulan Sekonder Lenfödem Modelinde Embriyonik Kök Hücre ve Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinin Lenfanjiogenez Üzerine Etkisi, 2014 Uzmanlık Tezi, İzmir
4. Cueni L.N. ve ark., New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. J Invest Dermatol, 2006; 126 (10):2167-77.
5. Arıncı K. ve ark., Anatomi. 2. Cilt. 4. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2006; 109-29.
6. Ulusoy M. ve ark., Lenfatik sistem ve klinik önemi. Kocatepe Medical Journal, 2014; 15 (3): 365-70.
7. Rovenska E. ve ark., Lymphatic vessels: structure and function. IMAJ 2011; 13 (12): 762-8.
8. Drake R.L. Vogl W., Mitchell A.W.M. Gray's Anatomi. Ankara: Güneş Kitabevi, 2007;333-4.
9. Seeger M. ve ark., Terminal part of thoracic duct: high-resolution US imaging. Radiology, 2009;252 (3):897-904.

10. Barrett K.E, Barman S.M, Boitano S, Brooks H.L. Ganong'un tıbbi fizyolojisi. Gökbel H (Çeviri Editörü). 23' üncü Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2011: 550.
11. Swartz M.A. The physiology of the lymphatic system. Adv Drug Deliv Rev, 2001; 50 (1-2): 3-20.
12. Kaur D. ve ark., An unusual course of the thoracic duct in relation to the vertebral vessels. Singapore Med J, 2012; 53 (1):1-2.
13. Loukas M. ve ark., The lymphatic system: a historical perspective. Clin Anat, 2011; 24 (7):807-16.
14. Gövsa Gökmen F. Sistemantik Anatomi. İzmir: İzmir Güven Kitabevi, 2003: 373-402.
15. Clement O. ve ark., Imaging the lymphatic system: possibilities and clinical applications. Eur Radiol, 2004; 14 (8):1498-507.
16. Moore K.L, Dalley A.F. Kliniğe Yönelik Anatomi. 4. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2007; 870-1.
17. Murthy K. ve ark., Morphological features of human thymus glands from fetal to old age. Int J Biol Med Res, 2012; 3 (2): 1502-5.
18. Ruacan Ş. Lenf nodülleri ve dalak hastalıkları. Temel iç hastalıkları. İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın S, Süleymanlar G (Editörler). İstanbul: 1996: 1336-41.
19. Steiniger B. ve ark., The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. Immunology, 1997; 92 (2):307-16.
20. Kim K.W. ve ark., Emerging Roles of Lymphatic Vasculature in Immunity. Immune Netw., 2017 Feb; 17 (1):68-76.

21. Colvin R.B. Emphatically Lymphatic. *J Am Soc Nephrol*, 2004; 15 (3): 827-9.
22. Kato S. ve ark., Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anatomical Science International*, 2006; 81,71-83.
23. Jussila L. ve ark., Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*, 2002 Jul; 82 (3):673-700.
24. Mc Allaster J.D. ve ark., Role of the lymphatics in cancer metastasis and chemotherapy applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011; 63 (10-11): 867-75.
25. Iwasaki D. ve ark., Establishment of an Acquired Lymphedema Model in the Mouse Hindlimb: Technical Refinement and Molecular Characteristics. *Plast Reconstr Surg*, 2017 Jan; 139 (1):67-78.
26. Choi I., ve ark., Visualization of lymphatic vessels by Prox1-promoter directed GFP reporter in a bacterial artificial chromosome-based transgenic mouse. *Blood*, 2011; 117: 362-365.
27. Ellis L. ve ark., Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer*. 1996; 32: 2451-60.
28. Irrthum A., ve ark., Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase. *Am J Hum Genet*, 2000; 67: 295-301.
29. Karkkainen M. ve ark., A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Oct 23; 98 (22):12677-82.
30. Karkkainen M.J. ve ark., Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphedema. *Nat Genet*. 2000; 25:153-9.
31. Partanen T.A. ve ark., VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *Faseb J.*, 2000; 14 (13):2087-96
32. Paavonen K. ve ark., Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol*. 2000; 156 (5):1499-504.

33. Kenta N. Biomarkers of Lymphatic Function and Disease. *Mol Diag Ther.* 2007; 11 (4):227-38.
34. Liu Y. ve ark., Effect of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) gene transfer in rat model of secondary lymphedema. *Vascular Pharmacology*, 2008 Apr-Jun; 48 (4-6):150-6.
35. Partanen T.A. ve ark., Endothelial growth factor receptors in human fetal heart. *Circulation.* 1999 Aug 10; 100 (6):583-6.
36. Migdal M. ve ark., Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem*, 1998;273: 22272–22278.
37. Mandriota S. ve ark., Vascular endothelial growth factor-C mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *Embo J.*, 2001; 20:672-82.
38. Carreira C.M. ve ark., LYVE-1 Is not restricted to the lymph vessels: Expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Research*, 2001; 61:8079-84
39. Olszewski W. ve ark. , Experimental lymphedema in dogs. *J Cardiovasc Surg* 1968 Mar-Apr;9(2):178-83
40. Bahman Guyuron, Elof Eriksson *Textbook of Plastic Surgery Indications and Practice.* 1'st edition. USA, Elsevier. 2009; 1-1665.
41. Hisako H. ve ark., Indication of lymphaticovenous anastomosis for lower limb primary lymphedema. *Plast Reconstr Surg*, 2015; 136:883.
42. Greene A.K. ve ark., Primary lymphedema: Definition of onset based on developmental age. *Plast Reconstr Surg*, 2012 Jan; 129 (1): 221-222.
43. Carolyn C. ve ark., Primary lymphedema: Clinical features and management in 138 pediatric patients. *Plast Reconstr Surg*, 2011; 127: 2419.
44. David W.C. ve ark., Lymphedema: Surgical and medical therapy. *Plast Reconstr Surg*, 2016 Sep; 138:209 -18.

45. Shin WS. ve ark. , Animal models for the study of lymphatic insufficiency. *Lymphat Res Biol* 2003; 1:159–69.
46. Jay W. ve ark., Review of current surgical treatments for lymphedema. *Ann Surg Oncol*, 2014; 21:1195–1201.
47. Theodore A. ve ark., Current concepts in the surgical management of lymphedema. *Plast. Reconstr Surg*, 2017; 139:1003.
48. Mehrara M. ve ark., Pathological steps of cancer-related lymphedema: histological changes in the collecting lymphatic vessels after lymphadenectomy. *Plos One*, 2012; 7 (7):41126.
49. Ashvin R. ve ark., Vascularized lymph node transfer for treatment of lymphedema; A comprehensive literature review. *Ann Surg*, 2015; 261:1013–1023.
50. Ran I. ve ark., Overview of lymph node transfer for lymphedema treatment. *Plast Reconstr Surg*, 2014; 134: 548.
51. Halleck F. ve ark., An evaluation of sirolimus in renal transplantation, *J Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2012, volume 8, 1337-1356.
52. Nankivell B.J. ve ark., The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*, 2003; 349:2326-33.
53. Nankivell B.J. ve ark., Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet*, 2011; 378:1428-37
54. Webster A.C. ve ark., Target of rapamycin inhibitors (TOR-I; sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression in kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006; (2):CD004290.
55. Cruzado J.M. ve ark., Nonimmunosuppressive effects of mammalian target of rapamycin inhibitors. *Transplant Rev*, 2008; 22:73-81.

56. Paghdal K. ve ark., Sirolimus (rapamycin): from the soil of Easter Island to a bright future. *J Am Acad Dermatol*, 2007; 57:1046-50.
57. Dantal J., Everolimus: preventing organ rejection in adult kidney transplant recipients. *Expert Opin Pharmacother*, 2012; 13:767-78.
58. Kirchner G.I., Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43:8395
59. Rapamune. Philadelphia: Wyeth Pharmaceuticals; 2006.
60. Stepkowski S.M., Preclinical results of sirolimus treatment in transplant models. *Transplant Proc*, 2003 May; 35:219S-226.
61. Desai N. ve ark., Sirolimus-associated lymphoedema: Eight new cases and a proposed mechanism. *British Journal of Dermatology*, 2008;160(6): 1322-6
62. Romagnoli J. ve ark., Severe limb lymphedema in sirolimus-treated patients. *Transplant Proc*, 2005; 37:834–6.
63. Napoli K.L. ve ark, Distribution of sirolimus in rat tissue. *Clin Biochem*. 1997 Mar; 30 (2):135-42.
64. Aboujaoude W. ve ark., Lymphedema associated with sirolimus in renal transplant recipients. *Transplantation*, 2004; 77:1094–6.
65. Al-Otaibi T. ve ark., Lymphedema: An unusual complication of sirolimus therapy. *Transplant Proc*, 2007; 39:1207–10.
66. Stephane V. ve ark., Large volume sirolimus induced upper limb lymphedema after renal transplantation ipsilateral to the arteriovenous fistula. *Lymphatic research and biology*. Volume 12, Number 3, 2014.
67. Catherine L. ve ark., Inflammatory manifestations of lymphedema. *Int. J. Mol*, 2017; 18, 171.

68. Hadamitzky C. ve ark., Acquired lymphedema: An urgent need for adequate animal models. *Cancer Res*, 2008; 68 (2):343–5.
69. Huang G.K. ve ark., An experimental model for lymphedema in rabbit ear. *Microsurgery*, 1983; 4:236-242
70. Dalia T. ve ark., Lymphedema development and lymphatic function following lymph node excision in sheep. *J Vasc Res*, 2009; 46:426–434.
71. Kanter MA ve ark., An Experimental model for chronic lymphedema. *Plas Reconstr Surg* 1990 Apr;85(4):573-80.
72. Chen HC. Ve ark., Creation of distal canine limb lymphedema. *Plast Reconstr Surg*, 1989 Jun; 83 (6):1022-6.
73. Yang C. Ve ark., Developing a lower limb lymphedema animal model with combined lymphadenectomy and low-dose radiation. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2014 Apr; 7;2 (3): 121.
74. Suami H. ve ark., Demonstrating the lymphatic system in rats with microinjection. *The Anatomical Record*, 2011; 294:1566–1573.
75. Nguyen D.H. ve ark., Quantity of lymph nodes correlates with improvement in lymphatic drainage in treatment of hind limb lymphedema with lymph node flap transfer in rats. *Microsurgery*. 2016 Mar; 36 (3):239-45.
76. Goldman J. ve ark., Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis, *Faseb j*, 2007 jun; 21 (8):1942.
77. Yan A., ve ark., Mechanisms of Lymphatic Regeneration after Tissue Transfer, *PloS One*, 2011; 6 (2): e17201.
78. Ghanta S. ve ark., Regulation of inflammation and fibrosis by macrophages in lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015; 308: 1065–1077.

79. Mendez U. ve ark. Functional recovery of fluid drainage precedes lymphangiogenesis in acute murine foreleg lymphedema. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012; 302:2250-2256.
80. Anthony J.P. ve ark., Lymphatic regeneration following microvascular limb replantation: a qualitative and quantitative animal study. *J Reconstr Microsurg*, 1997 Jul; 13 (5):327-30.
81. Smaropoulos E.C., ve ark., Lymphatic regeneration following hind limb replantation: an experimental study in the dog. *Eur J Pediatr Surg*. 2005 Oct; 15 (5):337-42.
82. Datiashvili R.O. ve ark., Restoration of lymph drainage after extremity replantation. *J Reconstr Microsurg*, 1990 Oct; 6 (4):325-9.
83. Avraham T. ve ark., Daluvoy. Blockade of transforming growth factor-1 accelerates lymphatic regeneration during wound repair. *Am J Pathol*, 2010; 177: 3202– 3214.
84. Serizawa F., ve ark., Extracorporeal shock wave therapy induces therapeutic lymphangiogenesis in a rat model of secondary lymphoedema. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2011; 42, 254-260.
85. Wynn T.A. ve ark., Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*, 2010; 30:245–257.