

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

YANIKTA STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUNUN YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
İLE KARŞILAŞTIRILMASI
(DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr.OZAN ASLAN

UZMANLIK TEZİ

SAMSUN

2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

YANIKTA STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUNUN YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
İLE KARŞILAŞTIRILMASI
(DENEYSSEL ÇALIŞMA)

Dr.OZAN ASLAN

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr.Lütfi EROĞLU

SAMSUN

2011

TEŞEKKÜR

İhtiyacım olan her basamakta ama özellikle yazım aşamasında değerli fikirleriyle destek olarak bir yıllık çalışmanın ürünü olan bu uzmanlık tezinin derlenmesini sağlayan, saygıdeğer tez danışmanım Sayın Doç.Dr.Lütfi EROĞLU'na içten teşekkürlerimi sunarım.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniğinde bulunduğum süre zarfında ham iken olmamız için bulunan şartlar içinde ellerinden geleni yapan değerli hocalarım başta bölüm başkanımız Sayın Doç.Dr.Ahmet DEMİR'e, öğrencilik yıllarımda elime bıçağı vererek ve düğüm atmayı öğreterek bu anabilim dalını sevdiren Sayın Doç.Dr.Yener DEMİRTAŞ'a, engin sabır ve anlayışını, titizliğini örnek aldığım Sayın Yrd. Doç.Dr.Tekin ŞİMŞEK'e, Sayın Yrd.Doç.Dr.Murat Sinan ENGİN'e teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca bu bilim dalını seçmemde büyük etkisi olan Gazi Üniversitesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ailesine çok teşekkür ederim.

Tezin zorlu laboratuvar incelemesi sırasında desteklerini esirgemeyen Sayın Prof.Dr.Tolga GÜVENÇ'e, özellikle Sayın Vet.Dr.Mehmet Önder KARAYİĞİT'e minnettarım.

Tezin gerçekleşmesinde verdiği içten desteği nedeniyle Sayın Prof.Dr.Gülşen ÖKTEN'e, mezenkimal kök hücreyi üreterek üniverisitemize kazandıran, deney aşamasında hiçbir yardımını esirgemeyen, çok kıymetli Sayın Uzm.Dr.Ferda ALPASLAN PINARLI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Bilgilerini ve değerli zamanlarını esirgmeden, duydukları güven ile yetişmemizde ödenmez emekleri olan değerli hocam Prof.Dr.Ethem GÜNEREN'e, ağabeylerim Sayın Op.Dr.Tale NEİMETZADE'ye, Sayın Op.Dr.Çağlayan YAĞMUR'a ve özel olarak benim için plastik cerrahinin %51'i olan, gurur duyduğum değerli meslektaşım Dr.Osman KELAHMETOĞLU'na ve beraber çalıştığım tüm asistan doktor arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her koşulda benden desteklerini esirgemeyen biricik eşim Dr.Ahu ASLAN'a, sevgili anneme, babama ve kardeşime, doğumuyla ne olduğumu ve ne olmadığını bir kez daha hatırlatan, hayatımızı aydınlatan oğlum Okyanus'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 YANIK	3
2.1.1 Yanık tanımı	3
2.1.2 Tarihçesi	3
2.1.3 İnsidans	4
2.1.4 Etyolojisi ve Epidemiyolojisi	4
2.1.5 Yanık derinliği ve yüzdesi (Sınıflama)	5
2.1.6 Yanığın patofizyolojisi	7
2.1.7.Tedavi	11
2.2.1 Yara İyileşmesi	13
2.2.2 İnflamasyon Fazı	16
2.2.3 Proliferatif Faz	20
2.2.4 Maturasyon Fazı	24
2.3. Kök Hücre	25
2.3.1 Tanımı ve tarihçesi	25
2.3.2 Mezenkimal kök hücre	28
2.3.3 Mezenkimal kök hücre ve rejeneratif tip	31
2.4 Stromal vasküler fraksiyon ve tanımı	31
2.4.1 Adipojenik kaynaklı kök hücre ile kemik iliği kaynaklı kök hücrenin karşılaştırılması	33
2.4.2 Stromal Vasküler Fraksiyon içeriği	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	38
3.1 Deneklerin hazırlanması	38
3.2 Yanık modeli	39
3.3 Çalışma Grupları	40
3.3.1 Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre grubu	41
3.3.2 Stromal vasküler fraksiyon grubu	42
3.3.3 Kontrol grubu	44
3.4 Mezenkimal kök hücre elde edilmesi	44
3.5 Değerlendirme metodları	45
3.5.1.Makroskopik inceleme	45
3.5.2 Histopatolojik İnceleme	47
3.6 İstatiksel Analiz	53
4. BULGULAR	54
5. TARTIŞMA	69
6.SONUÇ ve ÖNERİLER	75

TABLolar DİZİNİ

Tablo I	Wallace dokuzlar kuralı ile Lund & Browder şeması	7
Tablo II	Termal hasarlanmada sıcaklık ve sürenin İlişkisi.....	9
Tablo III	Minör yanıklarda lokal ve sistemik tedavi.....	12
Tablo IV	Makrofajlardan salgılanan büyüme hormonları,sitokinler.....	17
Tablo V	Yara iyileşmesinde etkili bazı büyüme faktörleri ve sitokinler.....	20
Tablo VI	Yetişkin kök hücrenin bulunduğu yerlerden bazıları.....	29
Tablo VII	Mezenşimal kök hücrelerin taşıdıkları sitokin, kemokin, büyüme hormonu reseptörleri ve yüzey belirteçleri.....	30
Tablo VIII	Mezenşimal kök hücrelerin sekrete ettikleri sitokin ve büyüme hormonları.....	30
Tablo IX	Yağ dokusunda bulunan hücreler.....	34
Tablo X	MKH ve perisitlerde eksprese olan ortak moleküler belirteçler.....	39
Tablo XI	Histolojik skorlama.....	51
Tablo XII	Enflamasyon puanlaması.....	52
Tablo XIII	İncelenen histolojik veriler.....	55
Tablo XIV	Yara kontraksiyon oranları.....	57
Tablo XV	Kontraksiyon yüzdesi istatistiksel sonuçları.....	58
Tablo XVI	Yara epitelizasyon süresi istatistiksel sonuçları.....	59
Tablo XVII	Gruplara ait histolojik skorlar	61
Tablo XVIII	Histolojik skor ortalamaları ve istatistiksel sonuçları.....	62
Tablo XIX	Akut enflamasyon skoru istatistiksel sonuçları.....	63
Tablo XX	Kronik enflamasyon skoru istatistiksel sonuçları.....	63
Tablo XXI	Makrofaj sayısına ait veriler.....	64
Tablo XXII	Makrofaj sayısına ait istatistiksel sonuçlar.....	65
Tablo XXIII	Rete uzantısı sayıları ortalamaları ve istatistiksel analizi.....	65
Tablo XXIV	Ki-67 (+) hücre sayımı verileri.....	66
Tablo XXV	Ki-67 (+) hücre ortalaması istatistiksel sonuçları.....	67
Tablo XXVI	Kapiller tomurcuk ve kapiller sayıları verileri.....	68
Tablo XXVII	Kapiller tomurcuk sayısı istatistiksel sonuçları.....	69
Tablo XXVIII	Kapiller sayısı istatistiksel sonuçları.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 3 boyutlu deri kesiti.....	8
Şekil 2.2 Jackson'ın '3 Alan Teorisi'	9
Şekil 2.3 Şematik yara iyileşme süreci.....	14
Şekil 2.4 Yara iyileşmesinde etkili hücre-hücre, hücre-doku, hücre-sitokin etkileşimleri.....	15
Şekil 2.5 Kök hücre plastisitesi.....	29
Şekil 2.6 Perisit ve endotel hücresi arasındaki ilişkinin gösterilmesi.....	38
Şekil 3.1 Yüzüstü yatış pozisyonunda tıraş edilmiş, savlon ile dezenfekte edilmiş denek.....	40
Şekil 3.2 Otomatik termostatlı elektrikli ısıtıcı.....	41
Şekil 3.3 Aralarında yaklaşık 20 mm uzaklık bulunan yanık lezyonları.....	41
Şekil 3.4 Lezyonların planlanması.....	42
Şekil 3.5 Lezyonların dört kadranına intradermal planda MKH ve SVF hücrelerinin uygulanışı.....	43
Şekil 3.6 İnguinal yağ yastığından yaklaşık 1 cm ³ 'lük doku eksizyonu.....	44
Şekil 3.7 Alınan dokunun steril petri kabı içinde mekanik doğranma işlemi....	45
Şekil 3.8 Santrifüj sonrası SVF'nun aspirasyonu.....	45
Şekil 3.9 İki zamanlı şematik yara kontraksiyonu	47
Şekil 3.10 Kapanmış yara.....	48
Şekil 3.11 Makrofaj ve fibroblast'ın X 320'lik büyütmede histolojik kesiti....	52
Şekil 3.12 Rete uzantısının X 80'lik büyütmede histolojik kesiti.....	53
Şekil 3.13 Ki-67(+) keratinositin X160 lık büyütmede histolojik kesiti.....	54
Şekil 4.1 Karşılaştırmalı kontraksiyon yüzdesi grafiği.....	58
Şekil 4.2 Şematik yara epitelizasyon süresi.....	59

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

MKH	Mezenkimal kök hücre
SVF	Stromal vasküler fraksiyon
ATPaz	Adenozin trifosfataz
PDGF	Platelet derive edici büyüme hormonu
TGF	Doku büyüme hormonu
FGF	Fibroblast uyarıcı büyüme hormonu
KGF	Keratinosit uyarıcı büyüme hormonu
EGF	Epidermal uyarıcı büyüme hormonu
IGF	İnsülin benzeri büyüme hormonu
TNF	Tümör nekrotize edici faktör
VEGF	Vasküler endotelyal uyarıcı büyüme hormonu
ECM	Ekstra selüler matris
IL	İnterlökin
MCP	Monosit kemotaktik faktör
GM-CSF	Granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör
G-CSF	Granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör
IFN- γ	İnterferon gama
NO	Nitrik oksit
HGF	Hepatosit uyarıcı büyüme hormonu
CTGF	Bağ doku uyarıcı büyüme hormonu
t-PA	Doku plazminojen aktivatörü
HIF	Hipoksiye bağımlı faktör
NAD	Nikotinamid dehidrogenaz
MCP	Monosit kemoatraktan protein
SDF	Stromal derive edici faktör
EPH	Endotelyal prekürsör hücre
nm	Nanometre
μ l	Mikrolitre

ÖZET

Yanık tedavisinin hızlı sonuçlanması; komplikasyonların azaltılması, bireyin sosyal yaşamına çabuk dönmesinin sağlanması ve düşük tedavi maliyeti açısından son derece önemlidir. Ayrıca kararsız staz zonunun hızlı resüsitasyonu, oluşacak hasar alanını küçültmek için hayati öneme sahiptir.

Kök hücreler, epitelizasyonu, yeni damar oluşumunu arttırarak bu beklentiyi karşılayacak özelliktedirler. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği dışında pek çok dokuda bulunur ve yağ dokusu da bunlardan biridir. Çalışmamızda yağ dokudan çok daha kolay ve bol miktarda elde edilen stromal vasküler fraksiyonun yanık iyileşmesi üzerine olan etkisinin pasajlanmış kök hücre tedavisi ile karşılaştırılması amaçlandı.

Çalışmada toplam 40 adet dişi Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Deneklerin sırtlarında 15 mm çaplı 2'şer lezyon oluşturuldu. İn vitro pasajlanmış kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre süspansiyonu her lezyona intradermal planda toplam 200 mikrolitre olacak şekilde uygulandı. Stromal vasküler fraksiyon ise her deneğin kendi inguinal yağ yastığından elde edilerek 1 mililitrelik doku süspansiyonu şekilde intradermal plana uygulandı. 7, 14 ve 21. günlerde biopsi alınarak, grupların yara iyileşmeleri; epitelizasyon hızı, kontraksiyon yüzdesi ve yeni damar oluşturma kapasitesi açısından değerlendirildi.

Literatürde mezenkimal kök hücrelerin yanık ve yara iyileşmesi üzerine olan etkileriyle ilgili çalışmalar mevcuttur. Ancak stromal vasküler fraksiyonun yanık iyileşmesi üzerine olan etkisi kemik iliği kaynaklı kök hücre tedavisi ile karşılaştırılmamıştır.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, stromal vasküler fraksiyonun yeni damar oluşumunu arttırıcı etkisinin olmadığı ancak yüksek kontraksiyon hızı ve epitelizasyon kapasitesi ile erken iyileşme sağladığı saptanmıştır ($p<0.05$). Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücre ise yenedamar oluşumunu da arttırarak iyileşmeyi hızlandırıcı etki sağlamıştır.

Yaptığımız deneysel çalışmada stromal vasküler fraksiyonun yanık hasarında iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi saptandı. Hastanın öz dokusundan hazırlanması ve ameliyat sırasında uygulanabilmesi sebebiyle donör alan yetersizliğinin bulunduğu vakalarda staz zonunun hızlı resüsitasyonu için kullanılacak güvenli ve ekonomik bir yöntem olabilir.

Anahtar Kelimeler: Yanık, mezenkimal kök hücre, stromal vasküler fraksiyon, epitelizasyon, yeni damar oluşumu

ABSTRACT

It is important for reducing complications, low cost of treatment and to provide a quickly return to social life by obtaining a promptly burn treatment. In additionally resuscitation of stasis zone is vital to reduce the potential area of the damage would be occurred.

Mesenchymal stem cells provide this expectation by increasing epithelialization and formation of new blood vessels. The aim of this study is to compare the effects of stromal vascular fraction versus co-cultured stem cell on burn lesion healing.

A total of 40 female Sprague-Dawley rats were used in this study. 15 mm diameter double burn lesion was created on the backside of the rats. Co-cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cell (BM-MSC) suspensions of 200 microliter was performed every lesion's background intradermally. The stromal vascular fraction were obtained by preparing each rat's own inguinal fat pad. Tissue suspension of 1 milliliter was administered in the same layer. 7, 14 and 21 days of taken the biopsy, groups wound recovery were evaluated in terms of; epithelialization rate, the percentage of contraction and new blood vessels generating (neoangiogenesis) capacity.

There have been studies investigating the effects of the mesenchymal stem cells on burn lesions and wound healing. However the effects of the stromal vascular fraction on burn lesion healing has not been compared to bone marrow derived stem cell therapy.

Stromal vascular fraction had no effect on enhancing the formation of new blood vessels, but by the higher rate of contraction and epithelialization capacity, early recovery was reported when compared to sham group ($P < 0.05$). Bone marrow derived mesenchymal stem cell improved healing by enhancing the formation of new blood vessels.

In our experimental study, it is found that stromal vascular fraction has a healing accelerator effect in burn injury. They have superiority to BM-MSC in terms of harvesting from otolog tissue and easy to use during the operation. It will be a safe and inexpensive way for rapid resuscitation of stasis zone in case of donor area failure.

Keywords: Burns, mesenchymal stem cells, stromal vascular fraction, epithelialization, neoangiogenesis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dokuların tolere edebileceğinin üzerinde ani ve yüksek ısı enerjisine maruz kalması sonucu oluşan yaralanmaya yanık denir.

Tüm yaş gruplarının risk altında olması, uzun süren tedavisinin yüksek maliyetli olabilmesi, yarası iyileşse bile bıraktığı sekellerin bireyin sosyal yaşamını derinden etkileyebilmesi ve alınacak önlemlerle yanığın engellenebilir olması, bu travmayı halk sağlığı açısından önemli bir konuma getirmiştir.

Yanık tedavisi, hasarlı alanın kademeli olarak soğutulmasını, sıvı resüsitasyonu ile lokal ve sistemik perfüzyon desteği sağlanırken, topikal uygulamalarla nemlendirme ve epitelizasyona yardımcı olunmasını, cerrahi debridman ve doku defekti onarımını içerir (Herndon DN ve ark., 1987; Mills SM, 2005). Yanık hasarında tedavinin hızlı sonuçlanması, hipertrofik skar ve kontraktür gelişmesi gibi komplikasyonları azaltabilmek, bireyin sosyal yaşamına çabuk dönmesini sağlamak ve tedavi maliyetini düşürmek için son derece önemlidir (Atiyeh BS ve ark., 2005). Ayrıca kararsız staz zonunun hızlı resüsitasyonu, oluşacak hasar alanını küçültmek için hayati öneme sahiptir.

Son zamanlarda iyileştirici hücresel tedavi yöntemlerindeki gelişmenin ivme kazanması, yanık ile ilgilenen disiplinlerin konu üzerine ilgisini çekmiş, bu konuda deneysel ve klinik çalışmalar da artış gözlenmiştir. Kök hücreler, uzun süreyle bölünebilme, kendini yenileyebilme ve kendinden başka hücreye farklılaşabilme kapasitesine sahip hücrelerdir (Owen M, 1988; Quesenberry PJ ve ark., 2005). Farklı sınıflamalar olmakla birlikte kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere iki genel grupta incelenebilir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH), başta kemik iliği olmak üzere pek çok dokuda bulunan ve çeşitli biyolojik faktörlerin etkisiyle *invivo* ve *invitro* ortamlarda kendileri gibi mezoderm kökenli olan adiposit, osteoblast ve kondrosit farklılaşabilir (Minguell JJ ve ark., 2001; Oreffo RO ve ark., 2005; Gregory CA ve ark., 2005). Bu özellikleri nedeniyle pek çok hastalığın tedavisinde deneysel ve klinik olarak kullanımları denenmektedir.

Yağ dokusu da genç ve erişkin yağ hücreleri içermekle birlikte aynı zamanda zengin bir kök hücre kaynağıdır (Gimble JM ve ark., 2007). Yağ dokusu, sık uygulanan plastik cerrahi girişimlerinden olan yağ aspirasyonu, meme küçültme, karın germe ameliyatları sırasında bol miktarda ve kolayca elde edilmektedir. Elde edilen yağ dokusunun dolgu malzemesi olarak estetik ve rekonstrüktif cerrahide kullanımı uzun yıllardır uygulanmaktadır (Khater RH ve ark., 2007; Spear SL ve ark., 2005; Marcus BC, 2010).

Ailhaud ve ark. santrifüj ettikleri yağ dokusu süspansiyonunu fraksiyonlarına ayırmayı başarmış, bu süspansiyonun; parçalanmış olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserid, olgun yağ hücreleri ve stromal vasküler fraksiyondan (SVF) (preadipositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, çeşitli büyüme hormonları, düz kas hücreleri, perisitler, kök hücreler) oluştuğunu göstermiştir (Ailhaud G ve ark., 1997).

SVF, içerdiği büyüme hormonlarının ve hücrelerin etkisiyle yara iyileşmesini hızlandırabilir. Kültür ortamında pasajlanmasına gerek kalmadan elde edilme ve uygulama kolaylığı gibi MKH'ya olan üstünlükleri vardır. Bu çalışmada, sıçanlarda bir termal yanık modelinde SVF'nin yara iyileşmesi üzerine olan etkisinin MKH'nın yara iyileşmesi üzerine olan etkisi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 YANIK

2.1.1 Yanık tanımı

Yanık, tüm yaş gruplarını etkileyebilen, organizmanın karşılaşılabileceği en büyük travmalardan biridir. İnsan derisi 40-44°C'ye kadar değişik peryotlardaki sıcaklıkları tolere edebilir. Bunun üzerindeki ısılar yaşa, etkene, temas süresine göre değişmekle birlikte logaritmik olarak artan bir şekilde doku hasarına neden olur. Dokuların tolere edebileceğinin üzerinde ani ve yüksek ısı enerjisine maruz kalması sonucu oluşan yaralanmaya 'yanık' denilir. Protein denatürasyonu, direk enerji maruziyeti, mikrosirkülasyon bozukluğu nedeniyle oluşan iskemi, asidoz-hipoksi, serbest radikal hasarı gibi birtakım nedenlerle meydana gelebilir.

2.1.2 Tarihçesi

Yanık travması ateşin keşfi kadar eskidir. Ateş, insanlığın gelişim sürecinde sosyal hayatta ve savaşlarda kontrol edilmek istenen, ama aynı zamanda verdiği tahribatlarla korunulması gereken bir güç olmuştur.

Yazılı kaynaklarda yanık için uygulanan ilk tedavi, M.Ö. 15.yy'da Ebers papirüsünde tariflendiği gibi, tapınak rahiplerince, öküz gübresi ile siyah çamur karışımının yaraya uygulanması şeklindedir. Yüzyıllar boyunca yanığın sebep olduğu yara ve ızdırap dindirilmeye çalışılmış, ancak 19.yy'da ünlü Fransız cerrahı Dupuytren'in yanık kontraktürlerinin tedavi edilmesi gerektiğini belirtmesi üzerine, yanık sonrası rehabilitasyon ve deformite onarımına dikkat çekilmiştir (Xu RX ve Sun X, 2004). 15. yy'da Fabricius Hildanus isimli Alman bir bilimadamı tarafından yanıklar 3 derece içinde sınıflandırılmış olmakla birlikte, 20. yy'a gelindiğinde yanık yarasının serin tutulup tutulmaması gerekliliği, nemli ya da kuru takip edilmesi, bül sıvısının boşaltılması gibi konular halen netlik kazanmamıştır. 1905 yılında Haldor Sneve Journal of American Medical Association (JAMA)'da ciddi yanıklı vakalarda şoktan kaçınmak için oral, rektal veya damar yoluyla tuz içerikli solüsyonların kullanılması gerektiğini bildirmiştir (Alvarado R ve ark., 2009). Birinci dünya savaşı ile birlikte,

yanık travmasına yaklaşım netlik kazanmaya başlamış ve yanık üzerine olan çalışmalar hız kazanmıştır. 1931 yılında Alfred Blalock, yanıklı hastalarda doku ödemi, hemodinamik parametreler, kan basıncı ve hemokonsantrasyon ilişkilerini incelemiştir. Kan basıncındaki düşüşün travmatik dokudaki ödemin artmasıyla ilişkilendirildiği deneysel çalışmalar Underhill'in tezini desteklemiştir. İkinci dünya savaşının ardından hematokrit ve hemoglobin konsantrasyonundaki artış, sıvı resüsitasyonu için gerekli dozun ayarlanmasında yol gösterici olarak kullanılmaya başlanmıştır.

1960'lı yıllarda, yanık eskarının tanjansiyel eksizyonu ve nekrotik dokuların uzaklaştırılması sonunda ortaya çıkan doku defektleri için otogreftler ve deri eşdeğerleri kullanılmaya başlandı. Kök hücrenin tanımlanmasından sonra epidermal hücre kültür tabakaları şeklindeki erken hücre tedavisi çalışmaları denenmeye başlanmış olup doku mühendisliği alanında ilgili çalışmalar halen sürmektedir.

2.1.3 İnsidans

Dünya genelinde her yıl 6 milyon insan yanık nedeniyle acil servislere başvurmaktadır. Bunların çoğu hayatı tehdit edici olmayan, konservatif yöntemlerle tedavi edilen hastalardan oluşsa bile, yaklaşık her 10 kişiden birinin yılda bir kez yanığa maruz kaldığını göstermektedir (Brusselaers N ve ark., 2010). ABD'de yılda yaklaşık 500 bin kişi yanık nedeniyle medikal tedavi almaktadır. 40 bin hasta hastaneye başvurmakta, bunların %10' unda hasar, vücut alanının %30' undan fazlasını etkilenmiş olup, %60'ının yanık ünitelerinde tedavisi gerekmektedir. Yaşamı kolaylaştırmak için geliştirilen teknoloji; elektirik kullanımı ve ısı üretmeleri ile yanma tehlikesini de beraberinde getirdiği için bu oran giderek artmaktadır. Böylece yanık ciddi bir halk sağlığı problemi haline gelmektedir .

2.1.4 Etyolojisi ve Epidemiyolojisi

Yanık etyolojisinin yaş, cinsiyet ve sosyokültürel çevre içinde incelenmesi uygundur. Alev, haşlanma ve temas yanıkları en sık karşılaşılan üç yaralanma şeklidir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda haşlanma yanıklarının daha sık olduğu saptanmıştır (Haberal M ve ark., 1995).

Yanık en sık kaza sonucu oluşur (%80 - %90). Bu nedenle vakaların yarıya yakını (%40-%57) çocuklar oluşturur (Türegün M ve ark., 1997; Elberg JJ ve ark.

1987; Tejerina C ve ark., 1989). 5 yaş altı yaralanan çocuklar, pediatrik popülasyonun %50-%80' ini oluşturur (Anlatıcı R ve ark., 2002). İngiltere'de bir yılda başvuran 6400 pediatrik vakanın %80' inin 5 yaşın altında ve büyük oranda haşlanma sonucu meydana geldiği saptanmış. İkinci sıklıkta 2.ve 3. dekadadaki genç erişkinlerde görülür. Yatarak tedavi edilen yanıklarda taburculuk süresi ortalama 7 ile 33 gün arasında değişmektedir (Brusselaers N ve ark., 2010).

Uzun süre tedavi gerektirebilmesi, tedavi ve bakımının maliyetli olması, yarattığı iş gücü kaybı ile ekonomik açıdan da ciddi bir kayba neden olmaktadır.

İngiltere'de yapılan bir çalışmada her hastanın ortalama maliyetinin, 3183 Amerikan Doları ve her bir yanık alanı yüzdesi için 1061 Amerikan Doları olduğu tespit edilmiştir (Griffiths HR ve ark., 2006). Kanada'da (Han C ve ark., 2007) yanık nedeni ile acil servise başvuran 10 yaş altı 187 çocukta yapılan maliyet analizi şu şekildedir: Sadece acil serviste tedavi edilen 65 çocuğun hasta başı maliyeti 149 Kanada Doları, klinik izlem gerektiren 103'ünde kişi başı 149 Kanada Doları, yatıralarak takip edilen 14'ünde hasta başı 5203 Kanada Doları, greft gerektiren 2 hastada ise hasta başı 28.526 Kanada Doları olarak saptanmış (Moritz AR ve ark., 1947). Benzer çalışmalar gösteriyor ki yanık sık karşılaşılan, ölümcül olan, yarası iyileşse bile rehabilitasyonu uzun süren, yüksek maliyetli bir travmadır. Bu durum, birçok devleti, bireylerin yanıktan korunmaları için alınması gereken önlemler konusunda, kanuni yaptırımlar hazırlamaya yöneltmiştir.

2.1.5 Yanık derinliği ve yüzdesi (Sınıflama)

Yanık, hasarın tanımlanmasının kolaylığı açısından derecelendirilmiş olsa da, klinikte üst üste binmiş yaralanmalar olarak karşılaşırlar. Yanığın deride meydana getirdiği hasarın derinliği üç derece şeklinde, genişliği ise vücut yüzeyine göre yüzde cinsinden ifade edilir (Mathes SJ ve Hansen SL, 2006).

a)Derinliğine göre yanık şiddetinin hesaplaması

I) Birinci derece yanık: Etyolojisinde kısa süreli alev parlaması, ultraviyole ışınları vardır. Patogenezinde epiderminin yüzeyel tabakasında harabiyet vardır. Damarlarda salınan histamin/kinin nedeniyle vazodilatasyon ve endotel hücre mobilizasyonu vardır.

Bazal tabaka sağlamsır. Klinik olarak; cilt pembe, parlak renkli ve kurudur. Ağrılıdır. Nemli pansuman ile takip edilir ve 1 hafta içinde sıklıkla skar bırakmadan iyileşir.

II) İkinci derece yanık: Sıcak cisimlerle temas, alev, kısa süreli kimyasal ajan ile temas sonucu gelişir. Cilt ıslak nemli, pembe kızarık ve ödematözdür. Yanık alan çok ağrılıdır. Patogenezinde koagölasyon nekrozuna bağlı epidermal ve kısmi dermal hasarlanma vardır. Dermal tutulum oranına göre yüzeysel / derin olarak alt gruplara ayrılabilir. Subdermal pleksusta konjesyon nedeniyle epidermis ile dermis arasında proteinden zengin sıvı içeren bül oluşur. İkinci derece yüzeysel yanıklar daha hassastır ve cilt hiperemik görünür. İyileşme, sağlam kalan kıl kökü, yağ ve ter bezleri gibi deri eklerinden spontan epitelize olarak gerçekleştiğinden aylarca sürebilir ve derin formlarda hipertrofik skar bırakma eğilimi yüksektir. Derin dermal tabakanın tutulduğu yanıklarda, kılcal damarlarda yoğun trombüs gelişimi ve yanık yüzeyinin nekrotik bir tabaka ve debris ile kaplı olması, yanık yüzeyinden sıvı kaybını engeller. Ancak evre dokularda kapiller geçirgenlik arttığı için ödem kaçınılmazdır. Bu tip yanıklar yakından takip edilmeli, hasta travmadan veya enfeksiyondan korunmalı, doku perfüzyonu sağlanmalıdır. Aksi takdirde 3. derece yanığa dönüşebilir.

III) Üçüncü derece yanık: Sıcak cisimlerle uzun süreli temas, alev, elektrik yanığı veya kimyasal ajan ile yanma sonucu gelişir. Epidermisi ve deri eklerini içeren tam kat dermal hasar vardır. Staz zonları mevcuttur. evre dokularda yanık şiddeti ile orantılı ödem gelişir. Subdermal pleksusta koagölasyon nekrozu bulunduğundan yanık alan kurudur, deri beyazımsı kösele gibi görünür. Serbest sinir uçları da hasaralanmış olduğundan ağrısızdır. Cerrahi uygulanmadan iyileşmez.

b) Genişliğine göre yanık şiddetinin hesaplanması

Yaygınlık derecesi tüm vücut yüzeyine oranla yüzde olarak belirtilir. Bu amaçla vücuttaki çeşitli bölgeler kapladığı alanın büyüklüğü oranında derecelendirilmiştir. Bu yüzdelerin doğru hesaplanması, sağkalımda en önemli müdahale olan sıvı replasmanının doğru yapılmasını sağlar. Yanık alan yüzdesi tayini için erişkinlerde Wallace'ın dokuzlar kuralı kullanılırken, çocuklarda başın büyük ve alt ekstremitelerin kısa olması nedeniyle Lund ve Browder'in şeması kullanılır (Tablo I).

Tablo I: Erişkinde Wallace’ın dokuzlar kuralı kullanılırken, çocuklarda başın büyük ve alt ekstremitelerin kısa olması nedeniyle Lund & Browder şeması kullanılır.

	Erişkin	Çocuk (10-14)	Çocuk(5-9)	Çocuk(1-4)
Baş-boyun (ön ve arka)	10	13	15	19
Kol (ön ve arka)	9	9,5	9,5	9,5
Gövde (ön)	18	16	16	16
Gövde (arka)	18	16	16	16
Bacak (ön ve arka)	18	18	17	15

2.1.6 Yanığın patofizyolojisi

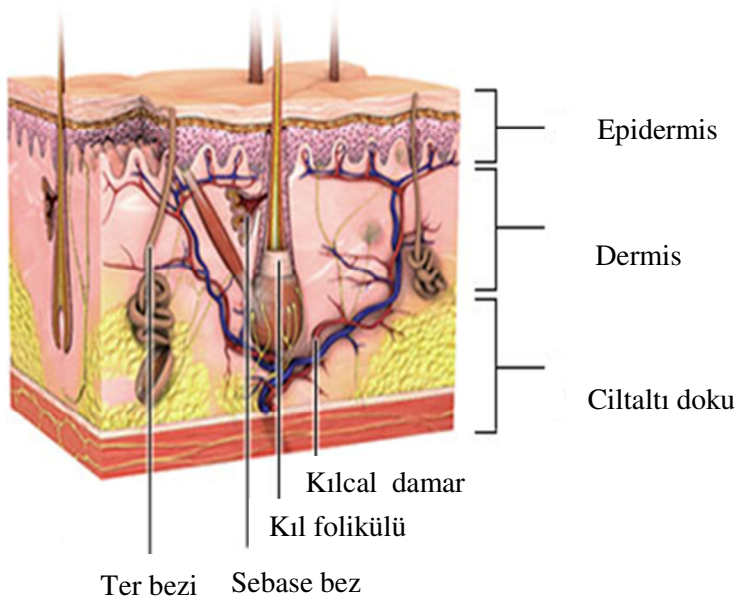
Protein denatürasyonu, direk enerji maruziyeti, mikrosirkülasyon bozukluğu sonucu oluşan iskemi, asidoz - hipoksi, serbest radikal hasarı sonucu oluşabilir.

Ciddi yanıklarda kan akımındaki azalma, damar geçirgenliğindeki artma ile oluşan hipovolemi ve ödem, lokal olarak toksinlerin uzaklaştırılmamasına, travma bölgesinin soğutulmamasına ve hasarın artmasına sebep olur. Yanık travmasına organizma yara iyileşmesi süreci ile yanıt verir.

Yanık hasarı hem lokal hem de yanık alanın genişliği ile bağlantılı olarak sistemik değişikliklere neden olur.

a) Lokal etki (Yanık yarası ve İnflamasyon)

Epidermis fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere karşı bariyer görevi görür. Dermis, özellikle mekanik bariyer olarak altında bulunan doku ve organları korurken, içerdiği zengin kapiller ve sinir ağı sayesinde vücudumuzun sıvı, elektrolit, ısı ve nem dengesinin korunmasından sorumludur (Şekil 2.1). Deri bütünlüğü bozulduğunda bu görevleri yerine getiremez.



Şekil 2.1: 3 boyutlu deri kesiti (<http://curezone.com/forums/am.asp?i=1682179>'den alınmıştır, 23.03.2011)

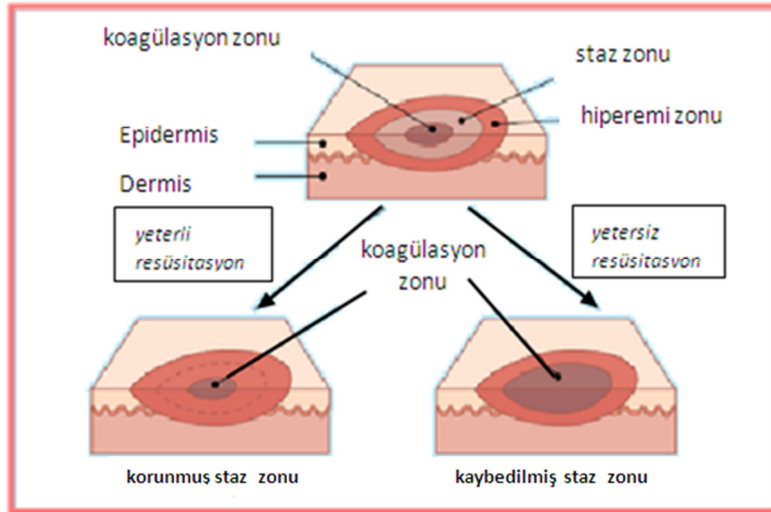
Yanık yarásındaki lokal fizyopatolojik değişiklikler, bir alana düşen ısının neden olduğu etkiler ve bunların üzerine eklenen belirgin bir akut iltihabi süreç ile karakterizedir. Termal yanıklarda yaralanmanın ciddiyeti sıcaklık dercesine, temas süresine bağlıyken, elektrik yanıklarında dokuların iletkenlik (direnç) özellikleri belirleyici rol oynar (Moritz AR ve Henriquez FC, 1947).

44°C altındaki sıcaklıklar çoğunlukla yanığa neden olmazken sıcaklık arttıkça, yanık oluşturabilecek temas süresi belirgin olarak azalır (Tablo II). 60°C üzerinde proteinlerin büyük kısmı denatüre olur. Çift kat lipid tabaka ve membran bağımlı adenozin trifosfatazlar (ATPaz) termal denatürasyona en duyarlı proteinlerdir. Termal değişiklikler sonucu oluşan hücre membran harabiyeti doku nekrozunun esas sebebidir.

Tablo II: Erişkinde Oluşan Termal Hasarlanmada Sıcaklık ve Sürenin İlişkisi (İngiltere Sağlık Bakanlığı Sağlık ve Sosyal Güvenlik Bölümü-1977)

Sıcaklık (°C)	Kısmi kalınlıkta hasar (sn)	Tam kalınlıkta hasar (sn)
65	1	20
60	5	80-100
54	35	700-800
50	60	

Termal yaralanma ile ciltte oluşan doku hasarı Jackson ve ark. tarafından 3 Alan Teorisi ile açıklanmıştır (Jakson DM, 1953). Bu teori, yüzeyden derine doğru iç içe geçmiş, eşmerkezli, üç boyutlu çembersel alanlardan meydana gelir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Jackson'ın '3 Alan Teorisi' ve staz zonunun resüsitasyona cevabı. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. BMJ. 2004; 328(7453): 1427-9

Nekrotik alan; ısı kaynağına en yakın alandır, temas ile olan koagülasyon nekrozuna bağlı direk hücre ölümünün gerçekleştiği alandır.

Staz alanı; ısı hasarının indirek etkisi, doku dejenerasyonu ve kimyasal hasarın bulunduğu, kurtarıma potansiyeline sahip en kritik yanık bölgesidir. Yetersiz doku resüsitasyonu sonucu nekrotik alana da dahil olabilir (Hettiaratchy S ve Dziewulski P,

2004). Bu bölgede dolaşım progresif olarak bozulur, iskemi gelişir ve bu da hücrelerin ölümüne neden olur.

Mikrovasküler düzeydeki patoloji, ortaya çıkan prostoglandin F₂ ve tromboksan A₂ gibi vazoaaktif aminler ile derinleşebilir. Yapılan bazı çalışmalarda bu mediatörlerin inhibe edilmesi ile trombosit adezyonunun ve vazokontrüksiyonun baskılanarak dermal perfüzyonun arttığı gösterilmiştir (Robson MC ve ark., 1980; Del Becarro EJ ve ark., 1980).

Hiperemi alanı; kapiller vazodilatasyonun, termal veya kimyasal hasara bağlı inflamasyonun görüldüğü, en dıştaki perfüzyonu artmış bölgedir. Ödem, hiperemi, anoksi, eksudasyon gibi geri dönüşü olan kısmi hücre hasarı vardır.

İnflamasyon, özellikle membran fosfolipidleri hasarlandığı zaman başlar. Fosfolipaz A aktive olarak fosfolipidleri araşidonik aside yıkarak araşidonik asit kaskadını aktifler. Bu kaskadın ürünü olan çeşitli prostanoidler ve lökotrienler vazodilatasyona, kapiller geçirgenlik artışına, nötrofil kemotaksisi ve diapedezine, mast hücre degranülasyonuna neden olur. Diğer yandan aktive olan kompleman kaskadı da nötrofil kemotaksisini stimüle eder. Nötrofillerden serbest oksijen radikallerinin serbestleşmesi bir taraftan hücre membran peroksidasyonu ile hasar oluştururken diğer taraftan da fosfolipaz A'yı stimüle ederek (araşidonik asit kaskadını aktifleştirir) inflamasyonu şiddetlendirir. Yapılan çalışmalarda nötrofilin damar duvarına yapışmasını önleyecek antikörlerin, yanık sonrası verildiği vakalarda lokal ödem ve nekrozu belirgin derecede azalttığı gözlenmiştir (Bucky LP ve ark., 1991; Bucky LP ve ark., 1994). Benzer şekilde lökositlerin bloke edildiği deneysel çalışmalarda flep yaşayabilirliğinin arttığı da gösterilmiştir (Vedder NB ve ark., 1994).

Yanık travması, etken ortadan kalksa bile hasarlanmanın devam ettiği dinamik bir olaydır. İlk anda sıcak temasının neden olduğu direk koagülasyon nekrozu ile hücre ölümü, ardından mikrotromboz ve kimyasal etkenlere bağlı ilerleyici iskemi ile hücre ölümü gelişir. Bu yüzden derinleşme riski bulunan yara 3-5 gün boyunca yakından takip edilmelidir (Kao CC ve Garner WL, 2000). Yanık sırasındaki doku perfüzyonun bozulması bölge de ısı değiştirme mekanizmasının yetersiz kalmasına, mikrotromboz ve mediatörler aracılığı ile doku iskemisinin derinleşerek hasarın artmasına neden olur (Latha B ve Babu M, 2001).

Hücresel hasarın çoğunun oluştuğu bölge kapiller endotelyumdur. Tüm yanıklarda ya doğrudan kapiller endotelial hasara bağlı ya da dolaylı yoldan kininlerin salınımı ile ilgili kapiller geçirgenlik bozulur.

b) Sistemik Etki

Vücut alanının %20' den fazlasının tutulduğu yanıklarda sistemik yanıt gözlenir (Grunwald TB ve Garner WL, 2008). Ciddi yanıklarda hem yanık hem de yanmamış bölgelerden aşırı miktarda sitokin ve diğer inflamatuvar mediyatör salınımı olur. Bu mediyatörler vazokonstriksiyon ve vasodilatasyona, kapiller permeabilitede artışa ve hem yanık bölgesi hem de uzak organlarda interstisiyal ödem gelişimine neden olurlar (Demir A, 2010). Metabolik, kardiyovasküler, renal, gastrointestinal sistemlerde ve koagülasyon kaskadında patolojik değişiklikler olur. Kompleman ve koagülasyon sistem aktivasyonu ile mikrotrombozlar görülür. Histamin ve bradikinin salınımı kapiller geçirgenliğin artmasına, bölgesel ve uzak interstisiyal ödem gelişimine neden olur. Proinflamatuvar ve antiinflamatuvar cevap dengesizliğinden dolayı immün disfonksiyon gelişebilir. Ödem artışı, organ disfonksiyonu ve immün yetmezlik sonucu sepsis ve çoklu organ yetmezliği ile sonuçlanan bakteri translokasyonu görülebilir.

Dietzman ve Lillehei şoku; Dokuların oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılayamayıp, metabolitlerini uzaklaştıramayacak derecede dolaşım yetmezliği ve buna bağlı doku perfüzyon bozukluğu olarak tariflemiştir. Yanığa bağlı olarak gelişen şok, hipovolemik tipte bir şoktur. Buharlaşımla ve vazoaktif kininlerin artması nedeniyle artan kapiller geçirgenliğe bağlı olarak gelişen interstisiyal ödem nedeniyle meydana gelir.

Toplam vücut alanının %40'dan fazlasının tutulduğu üçüncü derece yanıklarda, katekolamin, glukagon, glukokortikoid, prostoglandin seviyelerindeki artışa bağlı olarak yanık sonrası 48 saatte başlayan ve birkaç yıl sürebilen 'hipermetabolik cevap sendromu' gelişebilir. İskelet kasında katobolizma, lipoliz artışı, immün yetmezlik, kemik mineralizasyonunda ve lineer büyümede azalma görülebilir (Murphy KD ve ark., 2003). Bu uzamış inflamasyon fazında, katobolizmaya bağlı hipermetabolizma ile birlikte hastaların %10'unda mortalite ve morbiditeye neden olan kardiyak disfonksiyon, hormonal değişiklikler görülür (Williams FN ve ark., 2009).

2.1.7.Tedavi

Yanık tedavisi yaralanmanın şiddetine göre nemli pansumandan greft veya flep gerektiren rekonstrüksiyona kadar değişebilir. Tedavi basamakları, yanık derinliği değerlendirilerek cerrah, infeksiyon uzmanı, psikiyatrist, hemşire, yara bakım teknisyeni, fizyoterapist ve diyetisyenin de dahil olduğu büyük bir yanık tedavi ekibi tarafından uygulanmalıdır. Birinci derece yanıklar nemli yara bakımı dışında özel tedavi gerektirmezler. İkinci derece yüzeysel yanıklarda epidermis hasarlanmıştır ancak yara reepitelizasyonunu sağlayacak deri ekleri (ter bezi, kıl folikülü, sebasöz bezler) kısmen sağlamdır. Bu derece yanıklar 2-3 hafta içinde iyileşirler. İyileşmesi 3 haftadan uzun süren yanıklarda çoğunlukla hipertrofik skar gelişir. Bu yüzden yüzeysel yanıklardaki hedef, yara iyileşme ortamını optimize ederek iyileşme sürecini mümkün olan en kısa zamanda tamamlanmasının sağlanmasıdır. Minör yanıklardaki tedavi basamakları Tablo III' te özetlenmiştir.

Tablo III: Minör yanıklarda tedavi basamakları

Non - operatif Tedavi	
<u>Yara bakımı</u>	<u>Sistemik tedavi</u>
<i>Günlük debridman</i>	<i>Ağrı kontrolü</i>
<i>Gümüş nitrat/mafenid asetat/acticoat/ gümüş sülfodiyazin/asetik asit(%5) / klorheksidin (%0.05)</i>	<i>Enfeksiyon profilaksisi</i> <i>Nutrisyonel destek</i>
Operatif Tedavi	
<i>Cerrahi debridman</i>	
<i>Yara pansumanı</i>	
<i>Donör saha bakımı</i>	

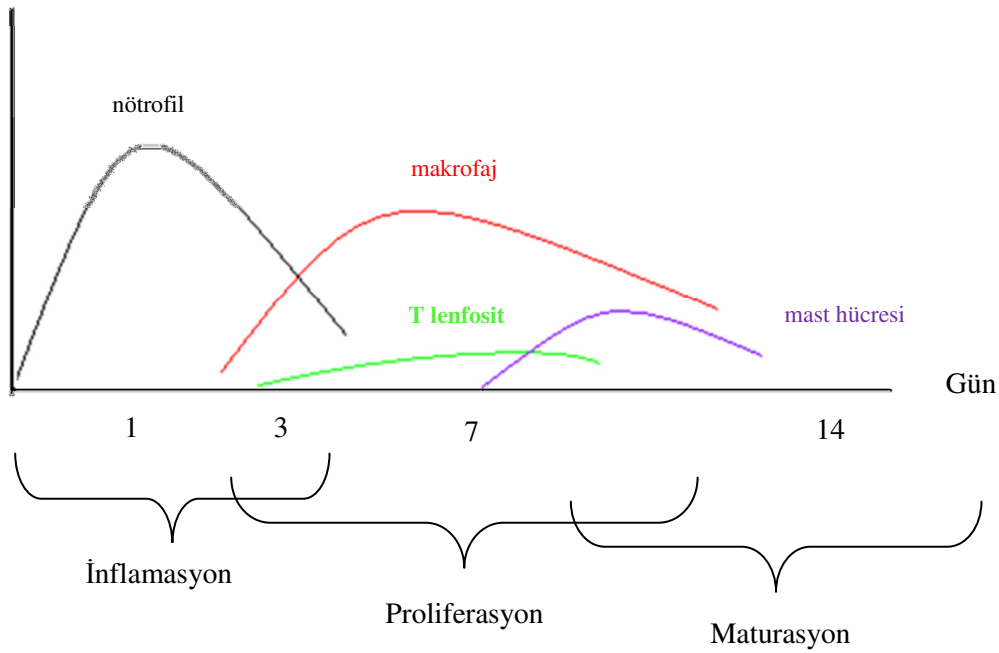
Daha ciddi yanıklarda solunum yolunun açık tutulması, sistemik ve mikrodolaşımın sağlanması gibi travmalarda uygulanan ilkyardım basamakları uygulanmalıdır. Yara iyileşmesi ise etkilenen yüzeyin geniş olması veya yanık hasarının derin olması nedeniyle daha güçtür. Bu tür yaralanmalarda amaç yüzeysel yanıkların

hızla yara iyileşme süreçlerinin tamamlanması, derin yanıklarda ise yeterli hiperemik alan resüsitasyonu ile koagülasyon alanının daraltılmasıdır.

2.2.1 Yara İyileşmesi

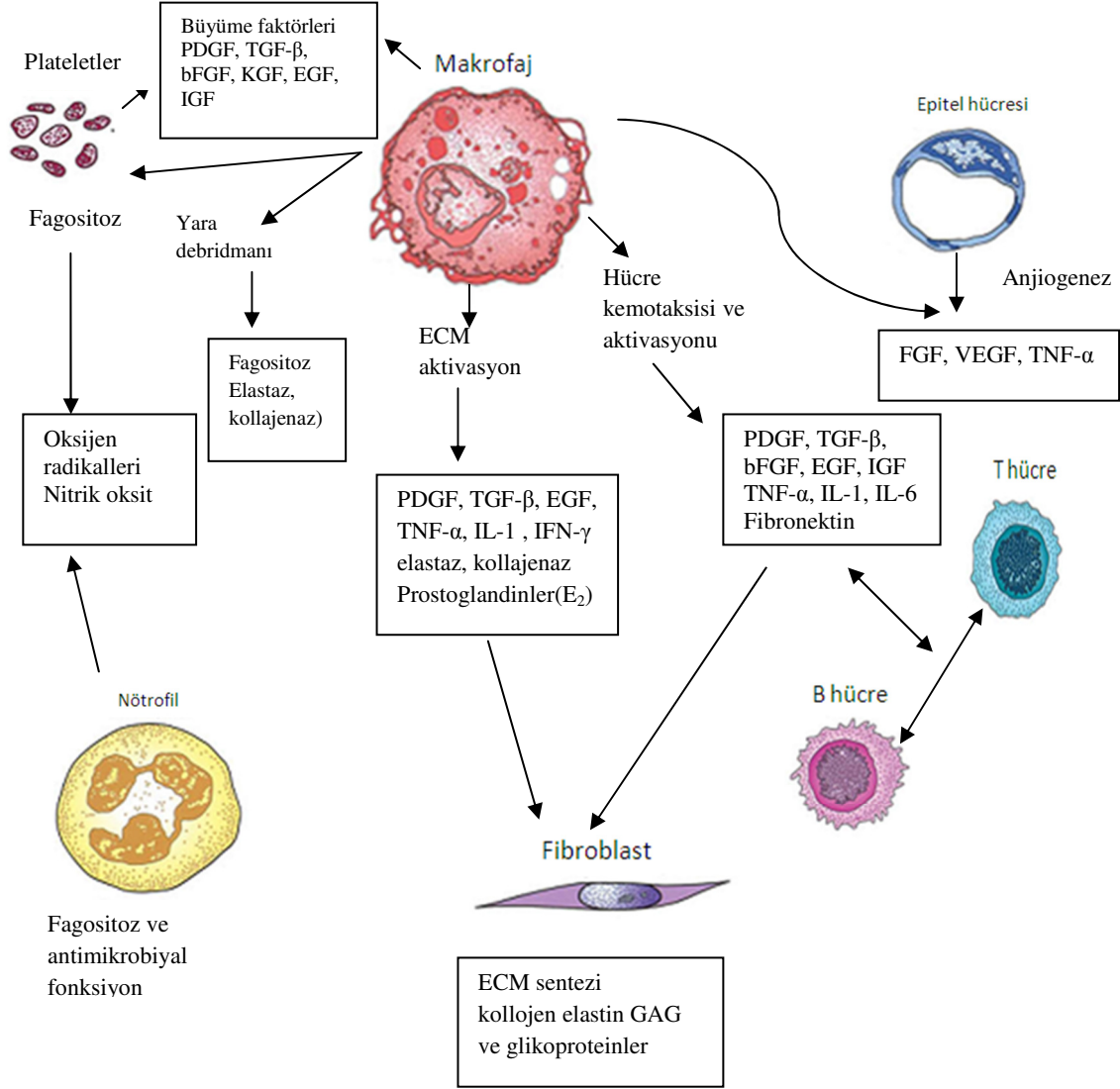
Yara bakımı hekimliğin en eski uğraşı alanıdır. Yara iyileşmesi, bir organ yada dokudaki defektin tamiri ve yeniden düzenlenmesi için organizmanın verdiği birbiri içine geçmiş reaksiyonlar bütünüdür. Yara iyileşmesi birçok değişik hücre tipinin yanı sıra çözünebilir mediyatörlerin ve ekstraselüler matriksin dahil olduğu dinamik bir süreçtir. Yaralanmadan stabil bir skar veya doku rejenerasyonu oluşuncaya kadar geçen süreçte; intrinsik ve ekstrinsik pıhtılaşma faktörlerinin aktive olduğu koagülasyon ve hemostaz evresi, nötrofil inflamasyonu ile başlayıp ardından bölgeye gelen makrofaj, fibroblast, mast hücre ve diğer hücre infiltrasyonları, yeni damar oluşumu, destek doku ve epitelizasyon, skar kontraksiyonu aşamaları birbiri içine geçerek devam eder (Şekil 2.3).

İnflamatuvar hücre sayısı



Şekil 2.3: Şematik yara iyileşme süreci (hücre sayısı / zaman)

Damar dışına hücre göçü (kemotaksis), kompleman faktörleri, histamin, bakteriyal ürünler, prostaglandinler, lökatrienler ve growth faktörler gibi kemotaktik ajanlarla düzenlenir. Bu maddeler nötrofil, makrofaj ve lenfositlerden salgılanır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Yara iyileşmesinde etkili hücre-hücre hücre-doku hücre-sitokin etkileşimleri (Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. Surg Clin North Am. 1997; 77(3):509-28.)

Nötrofiller: Yaraya intikal eden ilk lökosit alt grubudur. Akut inflamasyonda görülür ve yara yerinde ilk 24-48 saat içinde en fazla miktarda bulunur (Hanson D ve ark., 2005; Furie B ve ark., 2008). Primer görevi salgıladığı proteazlar ile yaranın bakteri ve doku debrisini yükünden arındırılmasıdır. Degrade edilen artıkları fagosite edebilirler.

Nötrofiller aynı zamanda serbest oksijen radikalleri ile bakterisit etkiye de sahiptirler. İnflamasyon sürecinde etkili sitokinler salgılayarak diğer hücreleri uyarıcı etki de gösterirler.

Makrofajlar: Yaralanmadan 48-96 saat sonra hakim hücredir. Dolaşımında monosit formunda bulunurlar. İnflamatuvar ve proliferatif fazlarda etkilidirler. Nötrofiller gibi proteaz salgılayarak, fagositoz yaparak bakteri ve debris yükünü azaltırlar. Anjiogeneizde, matriks üretiminde ve yeniden şekillendirmede (remodelling) ve hücre göçünde uyarıcı etkisi olan büyüme hormonu ve sitokinleri salgırlar (Diegelmann RF, 1997) (Tablo IV). Nötrofillerden farklı olarak makrofajlar iyileşme süreci tamamlanıncaya kadar yara da bulunurlar.

T-lenfositler: Başta IL-2 olmak üzere diğer faktörlerin de etkisiyle yara yerinde makrofajlardan daha az popülasyonda bulunurlar. Yaralanmanın ikinci haftasında yara yerindeki esas lökosit alt grubudur. Makrofajlar gibi hem inflamatuvar hemde proliferatif fazda bulunurlar. Belli bir antijen tarafından harekete geçiriliren T hücresi, antijeni antikor üreten hücelere tanıtır. Aynı zamanda lenfokinler salgılayarak lenfosit ve fibroblastar üzerine de etkilidir. Lenfositlerin yara iyileşme sürecini nasıl etkilediği tam olarak netlik kazanmamıştır (Gillitzer R ve Goebeler M, 2001).

Mast hücreleri: İnflamasyon fazında etkili lökosit alt grubudur. İçerdiği granüllerinde histamin, sitokin (TNF- α), prostaglandin ve proteaz içerir. Degranülasyon ile kapiller geçirgenlik artar, hücrel aktivite ve kollajen depozisyonu ve yeniden şekillenmesi gerçekleşir.

Tablo IV: Makrofajlardan salgılanan büyüme hormonları, sitokinler ve yara iyileşmesindeki etkileri. (Diegelmann RF. Cellular and biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. J Urol. 1997; 157(1): 298-302).

Fagositoz ve antimikrobiyal fonksiyon	Debridman	Hücre aktivasyonu	Ekstraselüler matriks sentezi	Anjiogenez
Serbest oksijen radikalleri	Kollajenaz	Büyüme hormonları: PDGF, TGF- β , bFGF, EGF, IGF	Büyüme hormonları: PDGF, TGF- β , EGF	Büyüme hormonları: FGF, VEGF
Nitrik oksit	Elastaz	Sitokinler :TNF- α , IL-1, IL-6	Sitokinler : TNF- α , IL-1, IFN- γ	Sitokinler : TNF- α
	Metalloproteinaz	Fibronektin	Enzimler: Elastaz, Kollajenaz, Arjinaz	Nitrik oksit
			Prostoglandinler	
			PgE ₂	
			Nitrik oksit	

2.2.2 İnflamasyon Fazı

Yara iyileşmesinin bu ilk fazı doku yaralanmasını takiben hemen başlar. Yara bölgesindeki damarlarda geçici vazokonstriksiyon oluşur ve yaralanan damarlarda trombositlerin subendotel kollajen ile karşılaşması sonucu trombosit agregasyonu ve degranülasyonu oluşur. Ekstravasküler hücre yüzeyinde bulunan doku faktörlerinin etkisiyle intrinsik ve ekstrinsik koagülasyon kaskadı aktive olur. Trombin, fibrinojeni fibrine dönüştürür. Oluşan pıhtı ve geçici vazokonstriksiyon ile hemostaz sağlanır. Trombosit degranülasyonu ile sitokinler, büyüme faktörleri, serotonin, kallikrein salınır. Salgılanan bu mediatörlerin etkisi ile bir taraftan kapillerlerde vazodilatasyon ve permeabilite artışı olurken diğer taraftan da kemotaksis ile nötrofillerin, makrofajların ve diğer inflamatuvar hücrelerin migrasyonu uyarılır. Hücre göçü ile birlikte yara bölgesinde kan akımı ve geçirgenliğin artar. Nötrofil, makrofaj, mast hücresi, vasküler endotel hücresi, kompleman ve antikordan zengin interstisyel ödem meydana gelir. Bu olaylar klinik olarak yarada kızarıklık ve şişme olarak kendini gösterir.

Yara yerine ilk gelen inflamatuvar hücreler nötrofillerdir ve yaralanmadan sonraki birkaç gün içinde bölgedeki baskın hücrelerdir. Yaralanmanın erken aşamasında hasarlanmış keratinositlerden ve endotel hücrelerinden salgılanan monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler ve fibroblast growth faktör (FGF), platelet derive edici büyüme hormonu (PDGF) gibi bağ dokusu büyüme hormonları nötrofil ve monositlerin kemotaksisini sağlarlar (Gillitzer R ve Goebeler M, 2001).

Nötrofiller oksijen radikalleri, hidrolitik enzimlerle yaradaki yabancı cisim, ölü doku ve bakteri fagositozunu yaparak hücrel debridman yaparlar. Nötrofiller çeşitli tipte proteazlara sahiptirler. Serin proteazlar geniş etki spektrumuna sahipken, metalloproteinazlar (çinko iyonu içeren) özellikle kollajen yıkımı yaparak matrikste makrofaj, fibroblast ve keratinositlerin yerleşmesini kolaylaştırır (Toriseva M ve Kahari VM, 2009). Ayrıca nötrofiller prostoglandin E salgılayarak nekrotik dokunun daha kolay yıkılmasını sağlarlar. Nötrofiller, vasküler endotel büyüme hormonu (VEGF), TNF- α , IL-1 gibi yeni damar oluşumun sağlayan faktörler de salgırlar. Enfeksiyon bulunmadığı takdirde nötrofillerin yaradaki sayısı üçüncü günden itibaren hızla azalır. Nötrofiller bilinmeyen bir uyarıcıyla ölürler ve yerlerini makrofajlara bırakırlar.

Yaralanmadan 48-96 saat sonra yaralanma bölgesindeki baskın hücre tipini, dolaşımda monosit olarak bulunan makrofajlar oluşturur. Monositlerin kemotaksisini sağlayan başlıca faktörler; transforming growth faktör beta (TGF- β), MCP-1, IL-1 ve TNF- α dır (Wolpe SD ve ark., 1988).

Monositler, IL-2, TNF- α , interferon gama (IFN- γ) ve PDGF yardımıyla dokuda aktif makrofajlara dönüşürler. Aktifleşmiş makrofaj onlarca madde salgılayarak fagositoz, matriks sentezi ve anjiogenezde rol alıp, yara iyileşmesinin esas düzenleyicisi olurlar (Singer AJ ve Clark RA, 1999). Makrofaj yokluğunda yara iyileşmez. Makrofajların salgıladıkları sitokinler (IL-1, TNF- α) aracılığıyla hem kendi üzerinde hem de nötrofiller üzerinde aktive edici etkisi vardır (Luster AD ve ark., 1997; Murphy PM, 1994).

Aktive makrofajlar; IL-6, IL-8, granülosit monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), MCP-1, IL-1, nitrik oksit (NO) salınımı yaparak anjiogenezde etkili olurlar. NO'nun aynı zamanda anti mikrobiyal etkisi de vardır. Endotel hücreleri, trombositler, fibroblastlar ve monositler de nitrik oksit salgılayarak yarada sürekli NO bulunmasını sağlarlar. Yapılan deneysel çalışmalarda düşük konsantrasyondaki NO'nun hücre proliferasyonunu arttırdığı, yüksek konsantrasyonlarda ise hücre farklılaşmasına neden olduğu belirtilmektedir. İnflamasyonun geç hücre tipi lenfositler ve mast hücreleridir. Sayıca birinci haftanın sonuna doğru pik yapmaya başlarlar. Lenfositlerin salgıladıkları IL-1 ve IFN- γ ile inflamasyon artırıcı etkileri vardır. Yara iyileşmesinde etkili bazı büyüme faktörleri ve sitokinler Tablo V'te özetlenmiştir.

Tablo V: Yara iyileşmesinde etkili bazı büyüme faktörleri ve sitokinler

Keratinosit	Fibroblast
IL-1 α/β	KGF-1, 2
IL-1ra	FGF-7, 10
IL-1, 3, 6, 8, 10, 18	TGF- β 1
G-CSF, M-CSF, GM-CSF	CTGF
TGF- α / β 1	FGF-2
PDGF	PDGF-A
VEGF	IGF-1
TNF- α / β	VEGF
IFN- γ	HGF
IGF-1	IL-6, 8
b-FGF, FGF-22	TNF- α
	GM-CSF, G-CSF
	FGF-22

b-FGF:basic fibroblast growth faktör, CTGF: connettive tissue growth faktör, FGF: fibroblast growth faktör, HGF: hepatosit growth faktör, KGF:keratinosit growth faktör, IGF:insülin benzeri growth faktör, TGF:transforme edici growth faktör, VEGF:vasküler endotel growth faktör, PDGF: platelet derived growth faktör, IL: interlökin, TNF: tümör nekroze edici faktör, IFN:interferon, G-CSF:granülosit koloni stimüle edici faktör, GM-CSF:granülosit monosit koloni stimüle edici faktör, M-CSF:monosit koloni stimüle edici faktör

Mediyatörlerin tümü stimulan özellikte değildir. IL-4 ve IL-10 gibi sitokinler diğer sitokinlerin ekspresyonunu azaltırlar. İnflamasyon, koruyucu ve tamir mekanizmaları ile ortadan kaldırılamazsa doku hasarına neden olmaktadır. Sonuçta fibrozis ve doku harabiyeti oluşmaktadır. İnflamasyona katılan değişik hücreler (makrofajlar, başta CD 8 olmak üzere T lenfositler, nötrofiller) ve bunlardan salınan değişik mediyatörler (proteazlar, oksidanlar, ve toksik peptitler) bir taraftan direk doku hasarına neden olurken diğer taraftan makrofajları uyarmaktadır. Bu durum aktive makrofajlardan, CD8 T lenfositlerden nötrofil kemotaktik faktörler salınmasına yol

açmaktadır. Aktive olan makrofajlardan TNF- α , IL-8 ve lökotrien B₄ (LTB₄) gibi çeşitli inflamatuvar mediyatörler ve reaktif oksijen radikalleri serbestleşmektedir. Makrofaj ve T lenfosit sayısı, parankim hasarının boyutları ile yakından ilişkilidir. Makrofajların, gerek nötrofil kemotaktik faktörler, gerekse proteolitik enzimler (matriks metalloproteinazlar) üreterek, inflamatuvar süreci yönlendirdiği düşünülmektedir. IL-8 makrofaj, nötrofil ve hava yolu epitel hücrelerinden salınabilir. TNF- α 'nın IL-8 yapımını artırdığı düşünülmektedir. T lenfositlerin inflamatuvar sürece katkıları ise çok iyi bilinmemektedir. Ancak T hücre patofizyolojisi henüz netleşmemiştir. CD8(+) hücrelerinden salınan perforin, granzyme-B ve TNF- α salınımı ile alveolar epitel hücreleri sitoliz ve apoptoza uğrar .

2.2.3 Proliferatif Faz

Yara iyileşmesi fazları birinin bitip diğerinin başladığı basamak şeklinde seri reaksiyonlar olmayıp, birbiri içine geçmiş süreçler olarak düşünülmelidir. Proliferatif fazda ekstraselüler matriks (ECM) sentezi, epitelizasyon, anjiogenez ve yara kontraksiyonu görülür. Yarada pıhtı, nekrotik doku, yabancı cisim veya enfeksiyon gibi yara iyileşmesi için bariyer oluşturup inflamasyon sürecini uzatan etkenler ortadan kaldırıldıktan sonra, makrofajlarla birlikte fibroblastlar ve endotelial hücreler granülasyon dokusunu oluşturmaya başlarlar

Ekstra selüler matriks: Normal yara iyileşmesinde en belirgin gösterge, düzenli biçimde granülasyon dokusu oluşmasıdır (Kirsner RS ve Eaglsterin WH, 1993). Granülasyon dokusu; ECM, yeni kapillar tomurcuklanma ile fibroblast ve inflamasyon hücrelerinin birleşiminden oluşan yeni stromayı tanımlar (Mutsaers SE ve ark., 1997; ReganMC ve Barbul A, 1994; Calvin M, 1998). Granülasyon deyimi, yara yüzeyindeki dokunun parlak kırmızı granüler görünümünden ileri gelmektedir. Her bir granül yeni bir kapillar tomurcuğu temsil eder.

Makrofaj kaynaklı sitokinler özellikle PDGF, TGF- β 1 48-72 saatten itibaren ECM proteinleri ile etkileşerek yara çevresindeki dokudaki fibroblastlarda integrin ekspresyonuna, fenotipik değişikliklere, proliferasyona, yaraya migrasyonuna neden olur. Yaraya göç etmiş olan fibroblastlar özellikle TGF- β 1 etkisiyle ECM için kollajenoz matriks üretirler (Clark RAF ve ark., 1995; Welch MP ve ark., 1990).

İntegrinler fibroblast ve epidermal hücre yüzeyinde bulunan transmembran reseptör kompleksleridir. Yara iyileşmesi esnasında hücre fonksiyonunu düzenlerler. IL-1, TNF- α , PDGF, TGF- β ve EGF fibroblastlar için en önemli uyaranlardır. Otokrin ve parakrin etkiyle fibroblastlar Tip III kollajen, glikozaminoglikan (GAG) ve fibronektinden oluşan matriks sentezlerler. Fibroblastlar bağ dokuyu çevreleyen farklılaşmamış mezankimal hücrelerden ve perivasküler adventisyadan köken alarak, önceden şekillenen fibrin pıhtısı içindeki lifler ve yeni gelişen kapillerler boyunca stoplazmik uzantılar oluşturarak yaranın içine doğru hareket ederler. Yaradaki fibroblastlar makrofajlardan salınan TGF- β etkisiyle miyofibroblastlara dönüşürler. İnflamatuvar fazda oluşan geçici fibrin matriks, makrofajlar ve fibroblastlardan salınan metalloproteinazlar ile yıkılarak kollajen (önce tip III daha sonra tip I kollajen), glikoprotein (fibronektin, laminin) ve protoglikandan (hyaluronik asit) zengin gevşek ekstraselüler matriks oluşur. Hyalüronik asitin hidrofilik etkisi ECM yoğunluğunu düşürerek yara iyileşmesi için uygun ortam oluşmasını sağlar. Kollajen üç sarmallı, sağlam polipeptid yapısında oluşur. Dermisin ve granülasyon dokusunun ana proteindir. Ağırlıklı olarak hidroksiprolin, hidroksilizin aminoasit dizilimlerinden oluşur. Kollajen matriks ile dolan yarada, fibroblastların kontakt inhibisyonu ile kollajen üretimini durur. Mevcut durum fibroblasttan zengin granülasyon dokusu şeklindedir. Daha sonra hücreler bilinmeyen bir mekanizma ile apoptozise giderek aselüler skar formasyonu oluşur.

a) Epitelizasyon

Epitelizasyon, yaralanmadan sonra derinin bariyer özelliğinin yeniden kazandırılması amacıyla epitel hücrelerin ayrılmasını, göç etmesini, çoğalmasını organize ve keratinize olmasını sağlayan bir süreçtir. Bu süreç yaralanmayı takiben hemen başlar. Normal şartlarda keratinositler (epidermal hücreler) hemidesmozomları aracılığıyla bazal tabakada laminine, desmozomlar aracılığıyla da birbirlerine bağlanmışlardır. Yaralanma da ise bu bağlanmada etkili olan integrinler ($\alpha 6$ - $\beta 4$) değişime uğrarlar. Yeni integrinler ($\alpha 5$ - $\beta 1$) keratinosit içindeki aktinomyozin filamanlarda kontraksiyona, hemidesmozom yapılarında zayıflamaya neden olur. Ayrıca monofilamanların kısalması, psödopod benzeri çıkıntılarının şekillenmesiyle hücreler belirgin bir fenotipik değişikliğe uğrar (Martin P, 1997; Efron DE ve ark., 2005).

Epidermal hücrelerinin integrin reseptör ekspresyonu aynı zamanda ECM proteinleri (vitronektin / fibronektin) ile epidermal hücrelerin etkileşimine neden olur. Yara kenarlarından serbestlenen keratinositler merkeze doğru göç etmeye başlarlar. Ancak hemostaz sırasında meydana gelen pıhtı epitelizasyon için engel oluşturur. Yaralanan dokuda bulunan plasmin ana fibrinolitik enzimdir. Göç eden keratinositlerde, plasminojeni plasmine çevirecek olan doku tipi plasminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz plasminojen aktivatörü (uPA) ezimleri ve enzim reseptörlerinde upregülasyon vardır. t-PA, u-PA aynı zamanda kollajenazları (matriks metalloproteinaz) da aktifleştirerek kollajen ve ECM protein yıkımına yardımcı olur. Bu etki epidermal hücrelerin gevşek granülasyon dokusu üzerinde fibrin tıkaç içerisinde ilerlemelerini kolaylaştırır. Epidermal hücrelerin migrasyon ve proliferasyonunu başlatan uyarı henüz tanımlanmamakla birlikte *serbest kenar etkisi*'ne bağlı olabileceği bildirilmiştir. Yara kenarında komşusu bulunmayan epidermal hücrelerin lokal büyüme faktörü salınımı ve reseptörlerinin ekspresyonu ile hem kendi üzerindeki proliferasyonu hemde migrasyonu aktive edebilir.

b) Anjiogenez

Yeni damar oluşumunda anjiyogenik sitokinler, proteolitik enzimler, migratuar faktörler gibi farklı proteinlerin etkin rol aldığı düşünülmektedir. Bunlar tümör hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar ve tümör komşuluğundaki makrofajlar tarafından salgılanabilmektedir (Leek RD ve ark., 2000).

Anjiogenez (neovaskularizyon); epitelizasyon ve bağ doku oluşumu için gerekli oksijen, enerji ve ham maddelerin bölgeye taşınım, metabolit ve artık ürünlerin geri dönüşümü için gerekli olan yeni kan damarı oluşumunu tanımlar. Anjiogenez 24-48 saat içinde başlar ve yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra makroskopik olarak saptanabilir düzeye gelir. Periferdeki intakt venüllerden yara kenarına göç eden endotel hücreler proliferasyon olarak yeni kapiller tübüller meydana gelir.

Yaralanma, doku yıkımına ve hipoksiye neden olur. Hücre hasarlanması sonucu makrofajlardan FGF ve hipoksi sonucu keratinositlerden VEGF salgılanır. Yarayı çevreleyen ekstraselüler matriks proteinlerinin proteolitik enzimlerce yıkılması, yeni kapiller tübüllerinin oluşumunu ve granülasyon dokusuna doğru uzanımlarını kolaylaştırır (Pintucci G ve ark., 1996). Proteolitik enzimlerce yıkılmış proteinlerin artık

parçacıkları periferik dolaşıma geçerek monositleri hasarlı bölgeye çeker. Monositler dokuya geçerek aktive makrofaj olurlar ve anjiogenik faktörler (başta FGF olmak üzere TNF- α , VEGF, hipoksiye bağımlı faktör (HIF) ve IL-8 bunlardan bazılarıdır) salgırlar (Shimura S ve ark., 2000; Hashimoto I ve ark., 2000; Khorana AA ve ark., 2003).

Bu faktörler, prokollajenaz ve PA salgılaması için endotel hücreleri uyarır. PA, plasminojeni aktive plazmine, prokollajenazı da aktive kollajenaza çevirir. Bu iki proteaz bazal membranı yıkar. Yıkılmış basal membran endotel hücrelerin anjiogenetik faktör salgılamalarına neden olur. Ayrıca endotel hücrelerinin ürettiği fibronektin reseptörleri damar çevresinde bulunan fibronektin ile etkileşerek yeni damar oluşumunun yarıya doğru ilerlemesi için kanal görevi görür (Clark RAF ve ark., 1982; Brooks PC ve ark., 1994). Hem neovaskülarizasyonun başlatılmasında hem de yeni damar tomurcuklarının yarıya doğru yönelmesinde protezların çok önemli bir yeri vardır. Kapalı takip edilen yaralarda karşı kutuplardan birbirlerine karşı ilerleyen kapiller tübüller yarıya vaskülarize etmek için hızlıca birleşirler. Aksine açık takip edilen yaralarda yeni oluşan tübüller birbirlerine komşu olarak aynı yöne doğru büyüme gösterirler ki bu granülasyon dokusunun oluşmasını sağlar (Hunt TK, 2006). Neoanjiogenezde rol alan büyüme hormonlarından bazıları; TNF- α , TGF- β , VEGF, FGF, PDGF, anjiogenin, anjiotropin, anjiopoyetin-1, trombospondin, ürokinaz şeklinde olup, plaketlerden, makrofajlardan ve hasarlanmış endotel hücrelerinden salgılanır (Iruela-Arispe ML ve Dvorak HF, 1997). VEGF en fazla yara kenarındaki keratinositlerden salgılanır. TNF- α , KGF (keratinosit büyüme hormonu), TGF- β 1, IL-1 keratinositlerden VEGF salınımına neden olur. Hipoksi endotel hücrelerinden NO salınımına neden olur ve VEGF salınımını arttırarak anjiogenezde stimüle edicidir. NO ayrıca yeni oluşan dokuyu 'iskemi reperfüzyon hasarı'na karşı koruyucudur. Büyüme hormonları gibi mediatörlerin yanında metabolik faaliyetler sonucu oluşmuş yara ortamı da anjiogenez sürecini etkiler. Laktik asidin artması ve pH'nın düşmesi, nikotinamid dehidrogenaz (NAD) düşüşüne bağlı oksijen konsantrasyonu azlığı neovaskülarizasyonu inhibe ederler.

c)Yara Kontraksiyonu

Yara kontraksiyonu da yaralanmadan birkaç gün sonra başlar ve defektin kapatılması için yarayı çevreleyen yara dudaklarının merkeze doğru hareketi sonucu gelişen bir küçülmedir.

Deri bütünüünün bozulmasıyla deride elastik geri çekilme etkisine bağlı yara kenarlarının uzaklaşması defektin büyümesi ile sonuçlanır. Ancak granülasyon dokusu yara kenarlarını içeri çekerek epitelizasyon ile kapatılacak alanı daraltır. Hücre-hücre, hücre-ECM ve sitokinlerin etkileşimiyle gelişir. İyileşmenin 2. haftasında fibroblastlar aktin filamanı içeren miyofibroblastlara dönüşür. Bu hücreler sadece yarada bulunurken sağlam bağ dokusunda bulunmaz. Miyofibroblastların başlıca kaynağı hasarlı doku fibroblastları iken vasküler düz kas hücreleri (perisitler) de miyofibroblastlara dönüşebilir (Gabbiani G ve ark.,1971). Kontraksiyonu başlatan esas uyarı EGF , TGF- β 1 veya β 2 , PDGF olabilir (Montesano R ve Orci L, 1971). Kontraksiyon geri dönüşsüz bir kontraksiyondur (düz kas hücrelerinden farklı). Yara dudakları birbirleri ile temas sağladıklarında, miyofibroblastların gerim gücü yarayı çevreleyen derinin gerilimine eşit olduğunda ve miyofibroblastlarda yapısal bir bozukluk olduğunda kontraksiyon durur. Kontraksiyon sona erdiğinde miyofibroblastlar ortadan kalkar (Bogatkevich GS ve ark., 2003).

2.2.4 Maturasyon Fazı

Yara iyileşme sürecinin son evresi olan maturasyon fazı, granülasyon dokusunun skar dokusuna dönüşmesini, ekstraselüler matriksin olgunlaşmasını kapsayan yara iyileşmesinin en uzun evresidir. Kollajen sentezinin başladığı proliferasyon evresinin son aşamasından (hasar sonrası ~ 1 hafta), skar formasyonunun tamamlandığı (12-18 aya kadar uzayabilir) zamana kadar devam eder .

Bu süreçte yara yeniden şekillenenmesi ve güçlenmesi için kollojen matriks depolanması ve çözünmesi devam eder. Yaralanmamış doku kollajen matriksi %80-%90 Tip I kollajen , %10-%20 Tip III kollajen içerirken, yaralanmış doku matriksinde erken dönemde %30 Tip III kollajen depolanır. Tip III kollajenin baskın olması, bir birine geçmek yerine paralel şekilde dizilimi ve kollajen içeriğinin büyük oranda glikolize halde bulunması nedeniyle erken dönemde güçsüz destek doku vardır ve yara direnci çok düşüktür. Yaralanmanın 1.haftasında matriks dayanıklılığı yaralanmamış

dokunun %3 oranındadır. Kollajenazlar ve proteazlar bu erken kollajeni parçalayarak yeni kollajen depolanmasını sağlarlar. Yeni biriken kollajen ile matriks kalınlığının artması, lizil oksidaz ile bu kollajen fibriller arasındaki çapraz bağlanmanın sağlanması yara dayanıklılığını artırır. Zamanla tip I ve tip II kollajen miktarları hasarsız dokudaki miktarlarına yaklaşır. 3.haftada doku dayanıklılığı %30'a ve iyileşmenin 3. ayında maksimum oran olan orjinal dayanıklılığın %80'ine ulaşılmış olur. Bu sürecin kısılalığı, oluşan matriksin miktarı skar oluşumunu etkiler. Yara bölgesindeki fibroblastların sayısı azalır, kollajen üretimi dengeye ulaşır, epitelizasyonun tamamlanmasıyla yara makroskopik olarak soluk yara renginde görülür.

2.3. Kök Hücre

2.3.1 Tanımı ve tarihçesi

Dejenere ve deforme olan doku ve organların yenilenebilmesi model alınarak araştırılmaya başlanan ve tıp teknolojisi ile paralel olacak şekilde gelişen rejeneratif tıp, kök hücre kavramıyla birlikte tıp uygulamalarında yerini almıştır.

İlk kök hücre izolasyonu Evans ve ark. tarafından 1981 yılında gerçekleştirildi (Evans MJ ve Kaufman MH, 1981). Kök hücreler embriyonik dönemden başlayarak fetal ve doğum sonrası dönemde doku ve organların gelişmeleri ve idamelerinde çok önemli rol oynarlar. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler kendilerini yenileme, organ ve dokulara farklılaşabilme gibi organizmada başka hiçbir hücrede bulunmayan özelliklere sahiptir.

Kendi kendini yenileyebilen (repopulating) hücrelerin varlığı ilk kez 1950'li yılların başında gösterilmiş olmakla birlikte kök hücre tanımı bugünkü anlayışımıza 1961 yılında Till ve McCulloch'un irradiye edilmiş farelere sinjeneik türden kemik iliği verdiği zaman fare dalakları üzerinde oluşan kolonileri tanımlamaları ile gelmiştir. İrradiye edildikten sonra sinjeneik kemik iliği nakli yapılan farelerin dalaklarında mikroskopik olarak belirlenmiş eritroid, miyeloid ve megakaryositik serilere farklılaşabilen kolonilerin varlığının gösterilmesi, bu kolonilerin multipotansiyel kök hücreyi ifade edebileceği görüşünden hareketle bu kolonilere **Colony-Forming-Unit-Spleen (CFU-S)** adı verilerek multipotansiyel kök hücrenin tanımı yapılmıştır (Till JE ve McCulloch EA, 1961).

Dr.Rudolf Virchow'un da dediği gibi '*omnis cellula e cellula*' yani her hücre başka bir hücreden meydana gelmiştir ve bu hücrelerin en başında döllenmiş ovum 'zigot' bulunur.

Kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerine göre hiyerarşileri vardır; totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak adlandırılabilir. Bu hücreler embriyo, embriyo-sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo-dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanır.

Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme ve bir canlıyı oluşturabilme potansiyeline sahip olan ilk embriyonel hücreye **totipotent** hücre denmektedir. Zigot ve morula evresindeki hücreler totipotent hücredir. Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir.

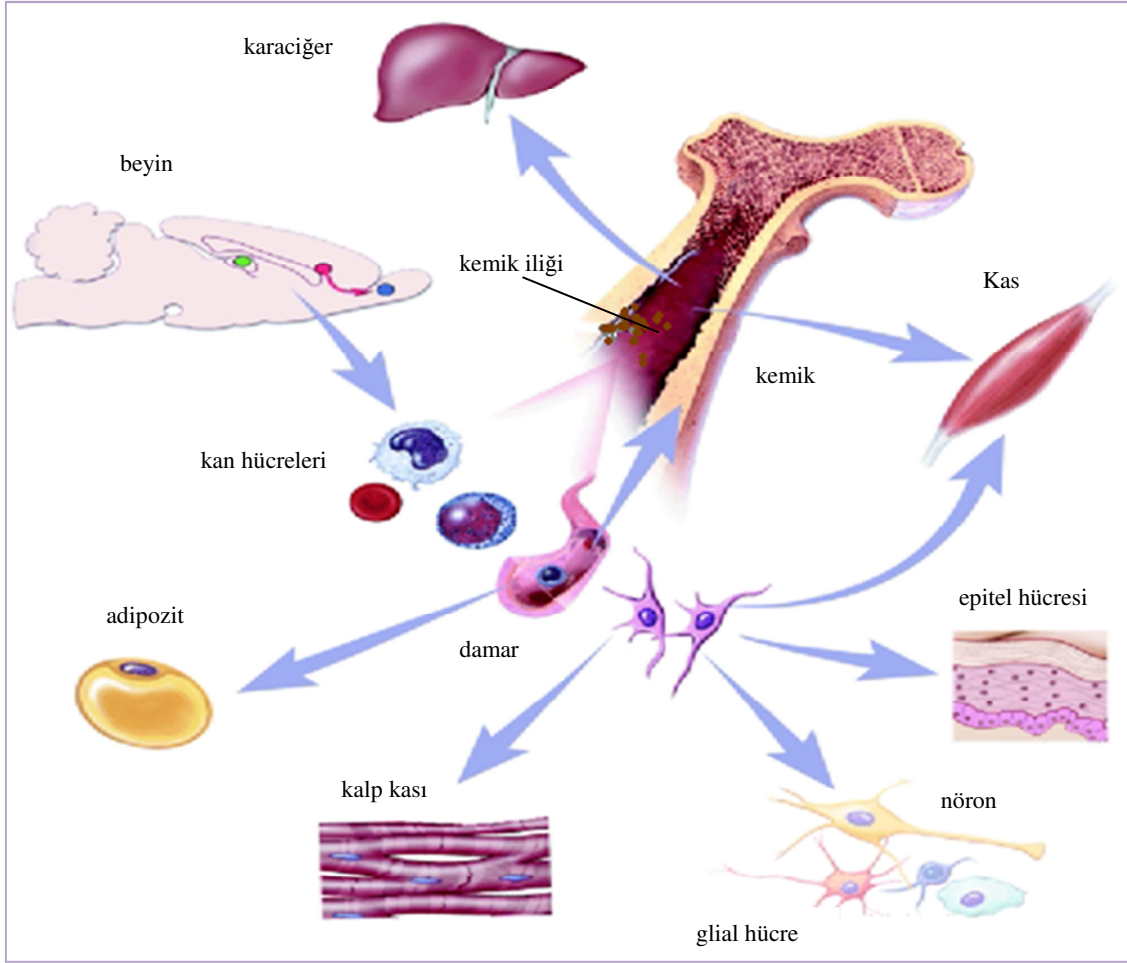
Fertilizasyonun yaklaşık beşinci gününde, yaklaşık 150 hücreden oluşan ve içi sıvı ile dolmaya başlayan kistik bir yapı oluşur. Bu yapı *blastokis*' olarak adlandırılır. Blastokisiti oluşturan bu hücreler mezoderm, endoderm ve ektodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine dönüşebilme potansiyelindedir. Bu özelliğe sahip hücrelere de **pluripotent** hücreler denir. Vücuttaki bütün dokuları ve trofoblastları oluşturabilir ancak bir bireyi meydana getiremez. Hayatın ilerleyen dönemlerinde yerleştikleri dokunun hücre tipini üreten daha özelleşmiş olan bu tip kök hücreler **multipotent** yetişkin tip kök hücreler olarak adlandırılır. Yetişkin kök hücre bir doku ya da organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olup kendisini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku ya da organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Kemik iliği, kas gibi bir doku da yerleşik olarak bulunan kök hücreleri ise **unipotent** yetişkin kök hücreleri olarak adlandırılır. Embriyonik kök hücrelere göre gelişmenin daha sonraki basamaklarında görülen multipotent kök hücreler elde edildikleri döneme göre daha kararlıdırlar, giderek daha sınırlı bir bölünme ve farklılaşma yeteneği gösterirler.(örn: kemik iliği kök hücresi, mezenkimal kök hücresi, hematopoetik kök hücresi)

Yetişkin kök hücreleri vücutta birçok doku ve organda bulunurlar (Tablo VI). Organizmadaki esas görevleri buldukları bölgedeki hücrelerin hasar görmesi durumunda çoğalarak hasarlı dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. Bunlar, farklılaşmasını tamamlamış dokularda uygun mikroçevre (yuva; kök hücre niş) içerisinde uykuda bulunan henüz farklılaşmamış hücrelerdir. Bu

hücreler her yaştaki insanda bulunur. Vücudun gereksinimi olduğunda bu hücreler buldukları dokuya özgül hücre türlerine dönüşürler. Bunlar ölen hücrelerin yerine geçmek üzere yedek hücreler olarak bekler. Yetişkin kök hücreler kas, göz, karaciğer, deri, adipoz doku, kemik iliği ve sinir dokularında bulunurlar. Tipik olarak yetişkin kök hücreler buldukları dokunun hücre tiplerine farklılaşmaktadır. Son yıllarda gerçekleşen birçok deneyde belirli dokudaki kök hücrelerin tamamen farklı doku hücre tiplerini oluşturabileceği gösterilmiştir. Bu olgu **plastisite** olarak bilinmektedir (Şekil 2.5).

Tablo VI: Yetişkin kök hücrenin bulunduğu yerlerden bazıları

Kemik iliği	Yağ dokusu	İskelet kası	Deri
Periferik kan	Gonadlar	Diş dokusu	Beyin
Damarlar	Akciğer		Göz



Şekil 2.5: Kök hücre plastisitesi

Mezenkimal Kök Hücreler ilk olarak Friedenstein ve Petrakova tarafından tanımlanmışlardır (Friedenstein AJ ve ark., 1967). MKH henüz diferansiye olmamış multipotent hücreler olup asıl olarak kemik iliği stroması içerisinde yer alırlar ve osteoblast, kondrosit, adiposit ve fibroblasta farklılaşabilirler (Pittenger MF ve ark., 1999; Caplan AI ve ark., 1994). MKH'lar, kültürde izolasyon ve ekspansiyonlarının kolay olması, multipotent özellikleri, migrasyon özellikleri, immünmodülatuar etkileri ve tedavi amacıyla birçok ihtiyacı karşılayabilecek kapasitededirler.

MKH'lar tarafından salgılanan anjiogenik, antiapoptotik ve mitojenik faktörlerden transforming growth faktör (TGF), hepatosit growth faktör, IL-1, IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, kök hücre faktörü hasara uğramış dokuların rejenereasyonunu ve çoğu dokuda gösterilmiş olan endojen kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını artırır (Baddoo M ve ark., 2003; Kode JA ve ark., 2009).

Mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları sitokin, kemokin, büyüme hormonu reseptörleri ve yüzey belirteçleri Tablo VII' de, salgıladıkları sitokin ve büyüme hormonları ise Tablo VIII'de örneklenmiştir (Chen L ve ark., 2008).

Tablo VII: Mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları sitokin, kemokin, büyüme hormonu reseptörleri ve yüzey belirteçleri.

Belirteç tipi	Örnek
Yüzey belirteci	CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, Stro-1, Sca-1
Sitokin reseptörleri	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, IL-11R
ECM reseptörleri	ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM, endoglin, hyaluronat reseptör integrinleri a1, a2, a3, aA, aV, b1, b2, b3, b4
Büyüme faktör reseptörleri	BFGF-R, PDGF-R

Tablo VIII: Mezenkimal kök hücrelerin sekrete ettikleri sitokin ve büyüme hormonları.

IL-6, 7, 8, 11, 12, 14, 15	fms benzeri tirozinkinaz-3 ligandı (flk-3L)
Lökemi inhibe edici faktör	VEGF- α
Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF)	İnsülin benzeri büyüme hormonu-1 (IGF-1)
Granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF)	Epidermal büyüme hormonu (EGF)
Stem cell faktör	Keratinosit büyüme hormonu (KGF)
Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF)	Anjiopoetin-1

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından MKH'ları tanımlamak üzere üç ölçüt belirtilmiştir:

1. Uygun kültür koşullarında plastik yüzeye yapışmaları gereklidir.
2. Akım sitometrisi ile >%95 hücrede CD73, CD90, CD105 belirteçleri pozitif olmalı. Ek olarak >%98 hücrede CD45, CD34, CD11b veya CD14, CD19 veya CD79a belirteçleri negatif olmalıdır.
3. Uygun farklılaştırma mediası içinde osteoblast, kondroblast ve adiposite farklılaşmaları gerekir (Spitskovsky D ve Hescheler J, 2008).

MKH'ların tanımlanmasında ortak kanı fibroblastik morfolojileri yanında insan için CD73+, CD90+, CD105+, CD45- ve fare için Sca-1+ CD90+ ve CD45- ifade etmeleridir (Brooke G, 2007). Fetal hayatta MKH'lar kan, kemik iliği, karaciğer, amniyon sıvısı, akciğer ve pankreastan; erişkin hayatta ise kemik iliği, kordon kanı, plasenta, periferik kan, iskelet kası, dermis, yağ dokusu, diş pulpası, sinovial membran ve kalpten izole edilmiştir .

Adipojenik dokunun zengin bir kök hücre kaynağı olduğu ilk olarak Zuk tarafından bildirilmiştir (Zuk PA, 2001). Plastik cerrahlar tarafından birçok prosedürde sıkça elde edilen ve atılan bu doku dikkatleri üzerine çekmiş ve konuyla ilgili pek çok araştırma yapılmıştır (Mizuno H ve Hyakusoku H, 2003; Mizuno H, 2009; Zuk PA ve ark., 2002).

Kemik iliğinde bulunan MKH'lar hematopoetik kök hücre nişinin oluşmasına katkıda bulunurlar. Bu hücreler kemik iliğinde uygun bir hematopoetik mikroçevre sağlarlar ve salgıladıkları VEGF-C, CXCL-12, VEGF-A, Angpt-1, Agpt-2, Flt-3 Ligand gibi çeşitli büyüme faktörleri ve kemokinler sayesinde hematopoetik kök hücreler üzerine pozitif ve negatif düzenleyici etki gösterirler (Valtieri M, Sorrentino A, 2008). MKH'lar intravenöz olarak verildiklerinde tercihen yönelttikleri yer kemik iliğidir. Ancak vücutta inflamasyon ve doku hasarı olduğunda, bu bölgede artan kemokinler MKH yüzeyindeki reseptörler ile etkileşerek hücreleri inflamasyonun, hasarın veya tümörün bulunduğu dokuya yönlendirir .

MKH'ların diğer önemli özellikleri immün düzenleyici özellikleridir. MKH'lar çok az MHC sınıf I ekspresyonu gösterip, MHC sınıf II molekül ekspresyon etmediklerinden (veya çok az ettiklerinden) *universal donör* olarak adlandırılmalarına

neden olan düşük immünolojik aktiviteye sahiptirler (Klyushnenkova E ve ark., 2005). MKH'lar T lenfosit, B lenfosit ve NK hücre fonksiyonlarını baskılar ve dentritik hücre farklılaşmasını, fonksiyonunu inhibe eder. Bu özellikleri *mixed lymphocyte reactions* (MLRs) olarak adlandırılan mikst lenfosit reaksiyonu üzerinden değerlendirilir. Genetik bakımdan birbirinden farklı kişilerin lenfositleri in vitro ortamda karşılaştırıldığında bu kişilerden birinin lenfositleri diğerinin lenfositlerinde DNA sentezini uyarır. Mikst lenfosit reaksiyonu olarak adlandırılan bu reaksiyonda DNA sentezindeki artış, vericiyle alıcı arasındaki uyumsuzluğun derecesiyle orantılıdır. Klinik uygulamada bu reaksiyon kişilerden birine ait hücrelerin ışınlanmasıyla ya da DNA sentezini önleyen mitomisin-C gibi bir ilaçla muamele edilmesiyle tek yönlü duruma getirilir. MKH'larda T lenfosit ve dentritik hücreleri baskılayarak bu reaksiyonu süprese edebilirler. Di Nikola ve ark.nın bildirdiği bir diğer mekanizma ise TGF1 β ve hepatosit growth faktör (HGF)'ü inhibe eden monoklonal antikor ekspresyonunu arttırmak suretiyledir (Di Nicola M ve ark., 2002). Cutler ve ark. umbilikal korddan derive edilmiş MKH üzerinde yaptıkları çalışmada, MKH'lar Th-1 lenfosit aktivasyonunu önleyerek proinflamatuvar cevap inhibisyonuna neden olurlar. Ayrıca PgE₂, TGF-beta, NO, IL- 4/ 5/ 6/ 9/ 10/ 13 gibi sitokinleri salgılayarak immünsüpresan etkili Th-2 aktivite artışı yaparlar. PgE₂ inhibitörü verildiğinde MKH'ların Th-1 lenfosit inhibisyonunu gerçekleştiremedikleri gösterilmiştir. MKH'lar immünolojik olarak bağımsız hücrelerdir ve allojenik olarak ilave immünsüpresyona gerek kalmaksızın uygulanabilirler. İmmün sistemde bozuklukla giden Crohn hastalığı, graft versus host hastalığı ve multiple skleroz gibi rahatsızlıklarda kullanımları için deneysel ve klinik çalışmalar yapılmaktadır.

2.3.3 Mezenkimal kök hücre ve rejeneratif tip

MKH'in kendi dizinleri dışındaki farklı hücre dizilerine de farklılaşabilme niteliği, özellikle rejeneratif tip ile ilgili dallarda çok ilgi uyandırmıştır. Hasarın iyileştirilmesinde etkili mekanizmalar; MKH'ların farklılaşarak olgun fonksiyonel hücrelere dönüşmesi (plastisite), hasarlı hücre - MKH füzyonu sonucu hücre fonksiyonunun yeniden kazanılması, MKH'nin hasarlı dokuda hücre/ hücre, hücre/ ekstraselüler matriks ilişkileri ve solubl faktörlerin (büyüme faktörü, sitokin, kemokin v.s), parakrin faktörlerin, enzimlerin salınımı veya immünmodülatör, antiinflamatuvar, antiapoptotik, anjiyogenik etki göstermek yoluyla hasarın giderilmesine katkıları olarak

sayılabilir. Burada en önemli mekanizmanın solubl faktörler ve hücre/matriks etkileşimi aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (Tae SK, 2006). MKH'ların buldukları bölgeledeki nişlerden, hasarlı dokuya doğru mobilizasyonu gerekmektedir. Bunu sağlayan uyarının da hasarlı dokunun değişen mikroçevresinden geldiği gösterilmiştir. Hasarlı bölgede salınan solubl faktörlerden stromal derived factor (SDF-1), monosit kemoatraktan protein ve kompleman C₃ fraksiyonunun önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir.

MKH'lar multipotent özelliklerini kaybetmeden kemik iliğinden veya kemik iliği aspiratından izole edilerek, kültür kabında eksande edilebilir. Preklinik olarak kemik, kıkırdak, tendon, kas, yağ gibi konnektif doku modellerine farklılandırılarak doku mühendisliği alanında kullanılabilir. Bütün bu uygulamalar sırasında embriyonik kök hücreye uygulanan etik kısıtlamalardan ise tamamen bağımsızdırlar.

2.4 Stromal vasküler fraksiyon ve tanımı

Adipoz dokuya ait mononükleer fraksiyon *mitojenik aktivitesi süren adipozit prekürsörleri* olarak 1968 yılında Hollenberg tarafından tanımlanmıştır (Hollenberg CH ve Vost A, 1969). Daha sonra literatürde stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak bahsedilmiştir. SVF; MKH, preadipozit, endotelyal prekürsör hücre, T düzenleyici hücre ve M2 makrofaj içerir (Riordan NH ve ark., 2009; Gimble JM, 2007; Gimble JM, ve Nuttall ME, 2011).

Yağ dokusunun içerdiği en az 2 kök hücre kompartmanı vardır. Birincisi MKH, ikincisi ise endotelyal progenitör hücredir (EPH). Yağ dokusunun içeriği Tablo IX' da özetlenmiştir.

Tablo IX: Yağ dokusunda bulunan hücreler

	Hücreler	Büyüme faktörleri
1	Mezenkimal kök hücre	TGF- β
2	Endotelyal progenitör hücre	VEGF
3	Hematopetik kök hücre	TNF- α
4	Monosit/makrofaj	PDGF
5	T / B lenfosit	FGF
6	Eritrosit	IGF-1
7	Mast hücresi	HGF-1
8	NK	MSP
9	Preadiposit – Adiposit	
10	Fibroblast	
11	Perisit	

IGF-1:insülin benzeri büyüme hormonu, HGF-1: hepatosit büyüme hormonu , MSP: makrofaj uyarıcı protein , TGF- β : transforme edici growth faktör, VEGF: vasküler endotel growth faktör, TNF- α : tümör nekroze edici faktör, PDGF: platelet derived growth faktör, FGF: fibroblast growth faktör, NK: natural killer hücreler

Yağ doku enjeksiyonları estetik cerrahide sıkça kullanılırken, in vitro ortamda genişletilmiş MKH uygulamaları üzerinde de çalışılmaktadır. Ekspande edilmemiş SVF hücrelerinin antiinflamatuvar ve rejeneratif etkileri yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. SVF klinik uygulamalar için alternatif bir mezenkimal kök hücre kaynağıdır (Astori G ve ark., 2007; Fernyhough ME ve ark., 2008; Rodriguez AM ve ark., 2005).

2.4.1 Adipojenik kaynaklı kök hücre ile kemik iliği kaynaklı kök hücrenin karşılaştırılması

Kök hücre kaynağı olarak yağ dokusu kemik iliği kadar ilgi çekicidir. Kolay ekstraksiyon, kemik iliğinden daha yüksek MKH içeriği, ex vivo olarak kemik iliği kadar MKH ekspansiyon kapasitesi ve sık koloni oluşturma gibi özellikleri vardır.

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin pasaj süresi kısa olup hücrelerin proliferasyon kapasiteleri en fazladır. Yapılan başka çalışmalarda yağ doku kaynaklı kök hücrenin diferansiyasyon kapasitesi, neoanjiogenez kapasitesi, immün modülatör etkisi, kemik iliği kaynaklı kök hücre kadar iyi olduğu raporlanmıştır (Kim Y ve ark., 2008; Noel D ve ark., 2008; Hayashi O ve ark., 2007).

Yağ dokudan elde edilen kök hücreleri, immünglobulin salgılanmasını inhibe edip B hücre fonksiyonunu baskılayarak kemik iliği kaynaklı kök hüclere göre daha etkili immün süpressör etki göstermektedir (Bochev I ve ark., 2008). Kemik iliği kaynaklı MKH'lar gibi adipoz kaynaklı kök hücrelerin de pasajlanmadan klinik kullanımı biyoyararlılık açısından sınırlıdır (Riordan NH ve ark., 2009).

2.4.2 Stromal Vasküler Fraksiyon içeriği

Ailhaud ve ark. yaptıkları bir çalışmada taze yağ dokunun santrifüjünden; trigliserid, olgun yağ hücreleri ve stromal vasküler fraksiyon (preadipositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, perisitler, kök hücreler) elde edilebildiğini göstermişlerdir. Ayrıca SVF, yağ dokuyu besleyen kapillerlerden de hücreler (eritrositler, B ve T lenfositler, monosit ve makrofajlar, mast hücreleri, natural killer hücreler ve hematopoetik kök hücreler) içermektedir (Gimble JM, 2007). SVF, yağ dokudan elde edilen multipotent diferansiyasyon kapasitesine sahip (osteojenik, adipojenik, endotelyal, kondrojenik, keratinosit, myosit, nöral) heterojen hücre

popülasyonu içerir (Zavan B ve ark., 2010; Ashjian PH ve ark., 2003; Ferrari G ve ark., 2009).

a) Mezenkimal kök hücreler: SVF yoğun şekilde MKH benzeri hücre içerir (Rodriguez AM ve ark., 2009; Zuk PA ve ark., 2002). İn vitro olarak yağ dokusu oluşturabilen mitotik aktivitesi bulunan adipozit öncülü (preadipozit) hücrelere dönüşebilen hücrelerdir. Morfolojik olarak fibroblastlara benzerler. Özel besi yerlerinde adipoz dışı dokulara da diferansiye olabirler. İn vitro ekspande edilmiş SVF kökenli hücrelerin yüzey belirteçleri de kemik iliği kökenli kök hücrelerininkine benzerlik göstererek CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 ve SH3 pozitif, CD34, CD31, CD45 negatiftirler. Boquest ve ark. yaptıkları bir çalışmada yüzey belirteçleri CD 45 negatif, CD34 pozitif, CD105 pozitif özellik gösteren SVF hücrelerinden CD 31 negatif hücrelerin mezenkimal özellik sergileyerek invitro ortamda ekspande olabildiklerini, aksine CD 31 pozitif hücrelerin ise endotelial özellik göstererek invitro ortam da zayıf ekspansiyon gösterdiklerini bildirmişlerdir (Boquest AC ve ark., 2005).

b) Endotelial progenitör hücreler: SVF da MKH içeriğine ek olarak endotelial prekürsör hücreler (EPH) de bulunmaktadır. Hasar görmüş damarların endotel hücreleri dolaşımda bulunan kemik iliği kökenli EPH ile yenilenir. Yaşlanma damar endoteli ve onu onaran EPH disfonksiyonuyla ilişkilendirilmiştir. Endotel disfonksiyonu ateroskleroza ve kardiyovasküler hastalıklara sebep olur. Endotel hücrenin yaşlanması kronojik bir hadise olmayıp bölünme yeteneğinde ki yavaşlamadır. EPH uygulanması damarda endotel, kalpte kardiyomyosit apoptozisini, engelleyerek kardiyovasküler remodellingi sağlayabilir (Asahara T ve ark., 1997).

Damar yaralanması oluşturulan hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda ekzojen uygulanan EPH'in ateroskleroz ve yeniden tıkanmayı azalttığı gösterilmiştir (Miranville A ve ark., 2004). Ciltaltı ve visseral yağ dokularından elde edilen SVF hücreleri içinde CD 34, CD 133 pozitif yüzey belirteçleri taşıyan hücre grupları gösterilmiştir. Özellikle CD 34 pozitif ve CD 31 negatif kümeler yüksek anjiyogenik özellik göstermektedir. Bu etkiyi direk anjiogenezi uyararak yada IGF-1, HGF-1 ve VEGF gibi büyüme hormonlarının salınımını artırarak gösterirler (Planat-Benard V ve ark., 2004; Rehman J ve ark., 2004; Ungefroren H ve ark., 2010).

c) İmmün düzeleyici monosit ve makrofajlar: SVF’de kök ve progenitör hücrelere ek olarak monosit ve makrofajlar da mevcuttur. Periferik kandan elde edilen monositlerin yetişkin kök hücre özelliği göstererek hepatositlere, pankreatik β benzeri hücrelere ve insülin sekrete edebilen neoislet hücrelere dönüşebildiği gösterilmiştir (Ungefroren H ve ark., 2010; Ruhnke M ve ark., 2005; Ruhnke M ve ark., 2005). Adipoz dokunun içerdiği makrofajların, proinflamatuvar mediatör olan TNF- α ve leptin salgılanmasında upregülasyon, anti-inflamatuvar etkili mediatör adiponektin salgılanmasında ise downregülasyon yaparak, inflamasyonu arttırdıkları gösterilmiştir. Bu durum klinik olarak obez hastalarda makrofajların adipoz doku infiltrasyonunu ve artmış inflamasyonu ile ilişkilendirilebilir (Bastard JP ve ark., 2006). Bununla birlikte yağ doku kaynaklı makrofajlarda (M2 fenotipi gösterenler) yapılan bir diğer çalışmada ise IL-10 ve IL-1 reseptör antagonisti etkileri nedeniyle anti inflamatuvar etki de gösterebildikleri bildirilmiştir (Zeyda M ve Stulnig TM, 2007).

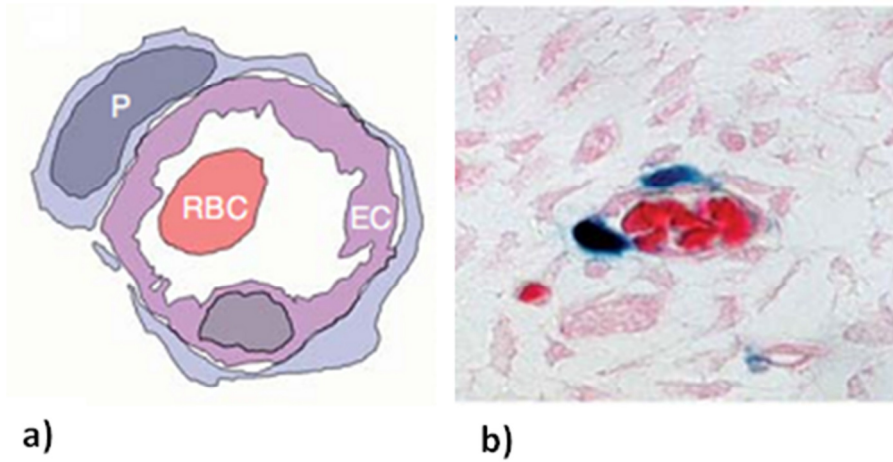
d) Preadipozit hücreler: Preadipositler, adipojenik progenitör yani olgun yağ hücresi haline gelebilme özelliği taşıyan öncül hücrelerdir. Olgun yağ hücrelerinden farklı olarak küçük hacime sahip olduklarından ve stoplazma içi yağ damlacıkları olmadığından mekanik travma ve iskemiye olan toleransları daha fazladır.

Charriere ve ark. yaptıkları bir çalışmada adipoz dokudan elde edilen SVF hücrelerini işaretleyerek fare peritoneal kavitesine enjekte etmişler ve preadipozitlerin fenotipik değişikliklerini incelemişler. Preadipozitlerin hızla yüksek fagositik özellik kazandığı, preadipozitlerin %60-70’inin makrofaja spesifik beş antijeni (F4/80, Mac-1, CD 80, CD 86, ve CD 45) ekspresse ettiğini göstermişlerdir. İn vitro yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup preadipositlerin plastisite yetenekleri ile adipoz hücre kadar etkin şekilde hücrel immünitede etkin olan makrofajlara da dönüşebildiği gösterilmiştir (Charriere G ve ark., 2003).

e) Perisitler: Mikrovasküler perisitler ilk olarak 1871 yılında Eberth, 1873 yılında ise Rougeth tarafından tanımlanmış, ‘perisit’ terminolojisi ise 1923 yılında Zimmermann tarafından literatüre kazandırılmıştır (Hirschi KK ve D'Amore PA, 1996; Kelley C ve ark., 1987).

Perisitler, *Rouget hücreler* veya *adventisyal hücreler* olarak da bilinirler ve mezenkimal orjinlidirler. Kapiller venüllerin bazal membranında, endotel hücrelerini

(EH) dış yüzeyden çevrelerler (Feng J ve ark., 2003) (Şekil 2.6). EH ile birbirlerini tamamlayacak şekilde (anahtar- kilit modeli) hücre-hücre bağlantıları vardır. EH ile aralarındaki mesafe 20 nm'den azdır. Uzun, ayaksız uzantıları olan polimorfik hücrelerdir.



Şekil 2.6: a) resimleme ile, b) α -SMA ve NG2 immünohistokimya boyaları kullanılarak perisit ve endotel hücresi arasındaki ilişkinin gösterilmesi. (P: perisit; RBC: eritrosit; EC: endotel hücresi) (Feng J, Mantesso A, Sharpe PT. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(10): 1441-51.)

Perisitler; vimentin, desmin, aktin-miyozin, siklik GMP-protein kinaz ve tropomyosin sekrete edebilirler (Da Silva Meirelles L ve ark., 2008). MKH ve perisitlerden eksprese edilen ortak moleküler belirteçler Tablo X' da özetlenmiştir. Sağladıkları bu sitokin ve hormonlarla mikrodolaşımı düzenlerler ayrıca immüniteden doku rejenerasyona kadar değişen birçok görevleri vardır. Perisitlerin bazı özellikleri; matriks protein sentezi, kontraktilite, permeabilitenin düzenlenmesi, endotel hücrelerin yenilenmesi, olup ayrıca adipositlere, kondroblastlara, osteoblastlara, fibroblastalara,

makrofajlara ve damar düz kas hücrelerine dönüşebilen mezenkimal potansiyelleri de mevcuttur (kök hücre gibi).

Tablo X: MKH ve perisitlerde eksprese olan ortak moleküler belirteçler. (Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells Stem Cells. 2008; 26(9): 2287-99.)

3G5	Vimentin
NG2	α -SMA
Sca-1	Thy-1
Stro-1	V-CAM1
PDGF -R	

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada deney hayvanlarına uygulanan tüm cerrahi işlemler ve hayvanların bakımı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) onayı ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi bünyesindeki Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışmada denek olarak 300-350 gram arasındaki ağırlığa sahip toplam 40 adet dişi Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Deney süresince, hayvanlar farklı kafeslerde, aynı laboratuvar koşullarında (standart oda sıcaklığı ve normal gün ışığı), sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendiler. Referans makalelerde bulunan yanık modellerini test edebilmek amacıyla Ondokuz Mayıs Üniversitesi HADYEK/ 113 sayılı önçalışma izni ile uygun yanık modeli oluşturuldu. Ardından HADYEK/ 46 sayılı çalışma izni ile çalışmaya başlandı.

3.1 Deneklerin hazırlanması

Tüm cerrahi girişimler genel anestezi altında yapıldı. Anestezi, kas içi 50 mg/kg ketamine hidrokloride (Ketalar® 50 mg/ml flakon, Pfizer) ve 0,65 mg/kg xylazine hidrokloride (Rompun® flakon, Bayer) enjeksiyonu ile sağlandı. Anesteziyi takiben deneklerin sırtı önce elektrikli traş makinesi ile ardından da traş bıçağı ile traş edilerek Savlon (%10) solüsyon ile temizlendi. (Şekil 3.1)



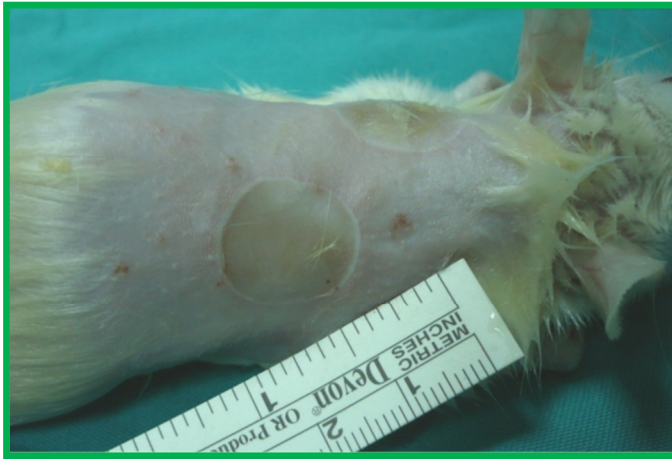
Şekil 3.1: Yüzüstü yatış pozisyonunda traş edilmiş, savlon ile dezenfekte edilmiş denek

3.2 Yanık modeli

Çeşitli çalışmalardan (Wu ve ark., 2007; Shumakov ve ark., 2003; Liu ve ark., 2008) derlenen yanık modeli geliştirilerek ucunda 15 mm çapında bakır bulunan otomatik termostatlı elektrikli ısıtıcı (Şekil 3.2) ön çalışma ile saptanan 120°C' da 16 sn. boyunca uygulanarak, her deneğin sırtında aralarında yaklaşık 20 mm uzaklık bulunacak iki lezyon oluşturuldu (106-108) (Şekil 3.3). Uygun süre ve sıcaklık ile dermal doku hasar derinliğinin, rejenerasyon için kaynak oluşturabilecek germinatif tabaka ve kök hücre içeren deri eklerini de kapsamaları sağlandı.



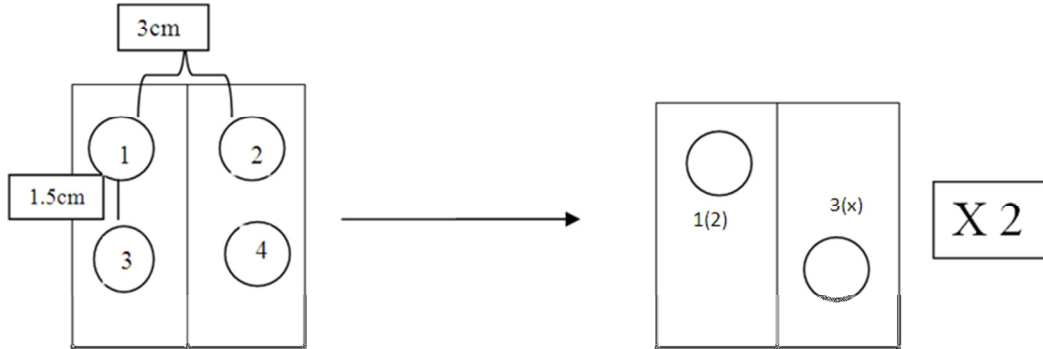
Şekil 3.2: Otomatik termostatlı elektrikli ısıtıcı



Şekil 3.3: Aralarında yaklaşık 20 mm uzaklık bulunan yanık lezyonları

3.3 Çalışma Grupları

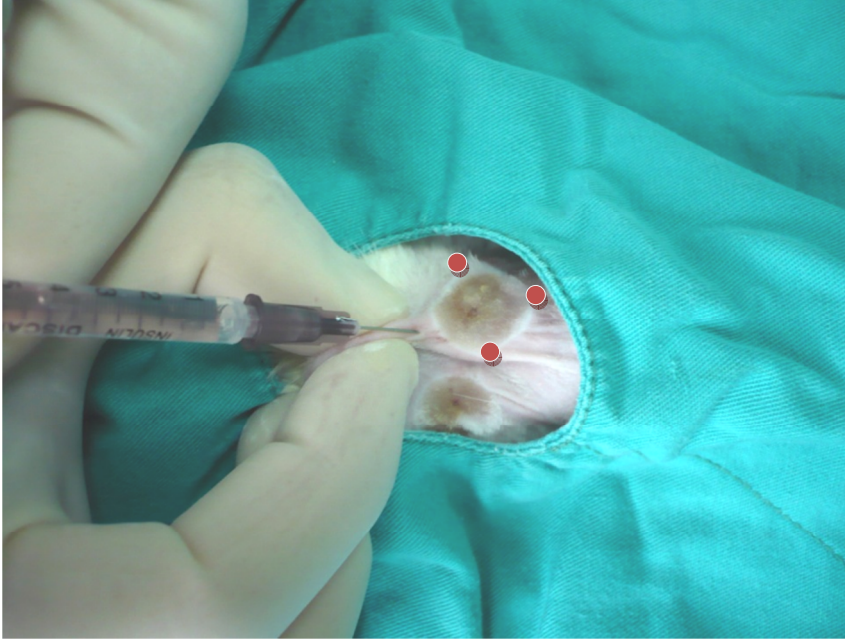
Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre grubu (n:16), Stromal vasküler fraksiyon grubu (n:16), Kontrol grubu (n:8) şeklinde olacak şekilde toplam 40 denek üzerinde 3 grup planlandı. Deneklerin sırtında 15 mm çaplı 4 lezyon oluşturulması planlanmıştı ancak yapılan ön çalışmada sıçan sırtındaki yüzey yetersizliği sonucu lezyonların birbirine çok yakın olması, bir lezyona uygulanan hücre süspansiyonunun parakrin etkileşim ile diğer lezyonuda etkileyebilecek olması ve sıçanın skapulasından daha alt seviyedeki lezyonların sıçan tarafından tırnaklanarak travmatize edilmesinden dolayı, çalışma her sıçana 2 lezyon oluşturulacak şekilde değiştirildi. Yanık lezyonların literatürde belirtildiği üzere 7, 14, 21 ve 28. günlerde değerlendirilmesi planlanmıştı. Bunun üzerine deneklerin sık anestezi almamaları için denekler 1-3. haftalar ve 2-4. haftaları temsilen altgrupları oluşturacak şekilde planlandı. Ancak deneye başlandığında 4. haftada yanık lezyonun tamamen iyileşmiş olduğu görülerek 4. haftada patolojik inceleme için yapılacak olan biopsi iptal edilerek, yerine makroskopik tam yanık iyileşmesinin görüldüğü gün (X) kaydedilerek veri sağlandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Lezyonların planlanması.1) 1.hafta, 2) 2. Hafta 3) 3. Hafta da alınacak biopsiyi belirtiyor. X) yaraların epitelize olup tam olarak kapandığı günü belirtiyor.

3.3.1 Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre grubu

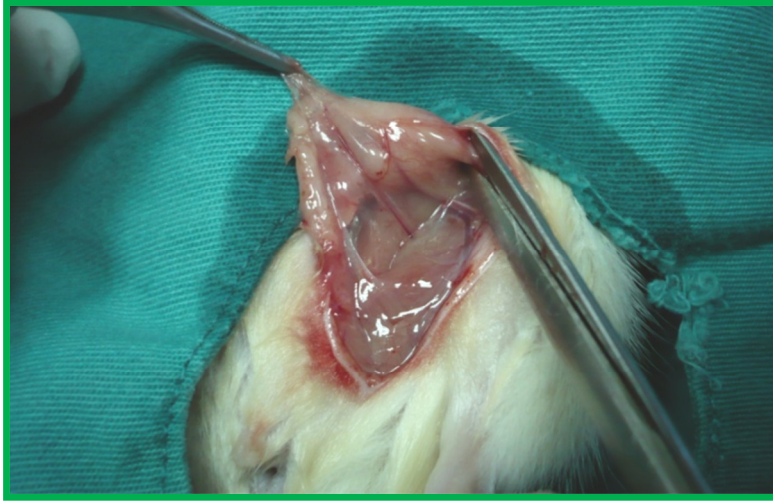
Daha önce dişi (XX) Sprague-Dawley cinsi sıçan iliak kemik iliğinden alınmış ve invitro pasajlanmış mezenkimal kök hücre kültürü, yanık oluşturulup lezyon bölgesinin soğuması için lezyona uygulanan % 0.9 'luk SF emdirilmiş gazlı bez pansumanı ile 10 dk beklendikten sonra, her bir yara çevresine 200 µl, 4 yöne intradermal planda toplam 1 milyon IU (4X250 bin IU) olacak şekilde uygulandı (Şekil 3.5). Daha önce yapılan çalışmalarda tranplantasyon sırasında oksijen ve nutrisyon eksikliğine maruz kaldığında, MKH'nin apoptozise gittiği ve engrafmanın gerçekleşmediğini gösterilmiştir. Bu yüzden hücre transplantasyonu staz zonuna uygulanarak hücre yaşayabilirliğinin artırılması amaçlandı.



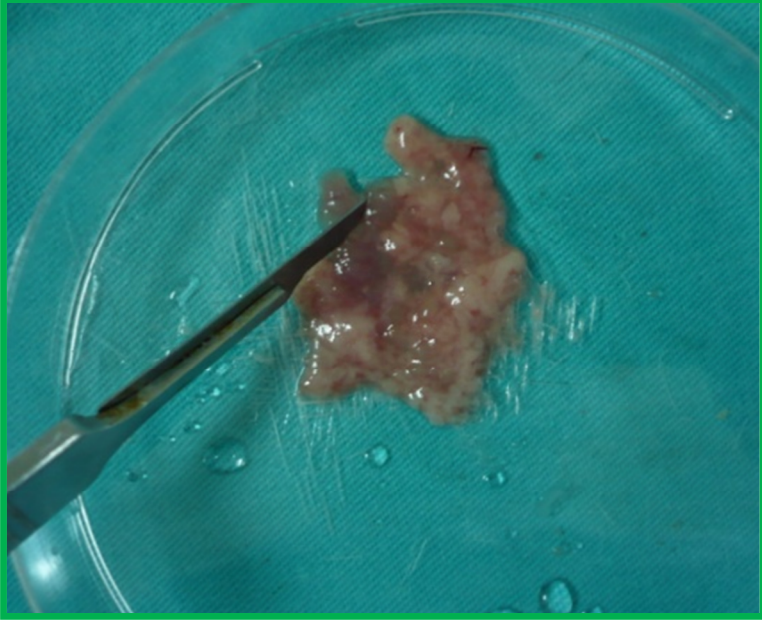
Şekil 3.5: Lezyonların dört kadrana MKH ve SVF hücrelerinin uygulanışı.

3.3.2 Stromal vasküler fraksiyon grubu

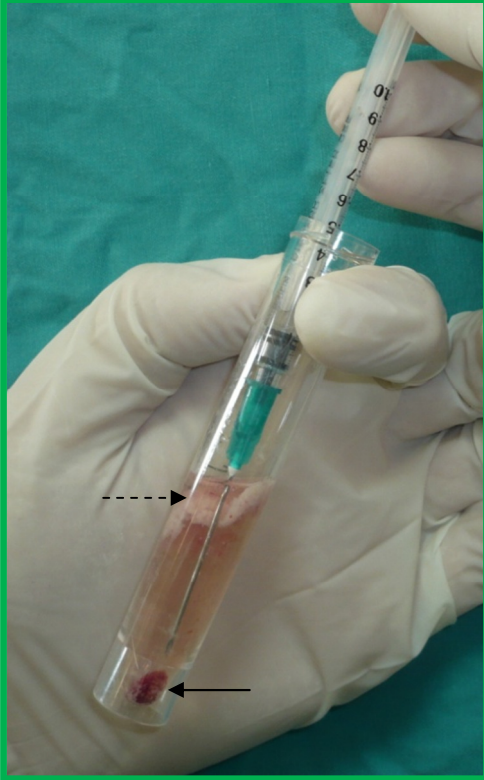
Daha önce literatürde tariflendiği şekilde (Katz ve ark., 1999; Bernard ve ark., 2004) her iki inguinal krize paralel olarak yapılan insizyon ile girilerek inguinal yağ yastıkçıklarından yaklaşık 2x1x1 cm büyüklüğünde yağ dokusu eksize edildi (Şekil 3.6). Elde edilen yağ dokusu içerisinde serum fizyolojik bulunan steril petri kabı içinde 20 nolu bistüri ile doğranarak ezildi ve santrifüj tüpüne alındı (Şekil 3.7). 1500 devirde 5 dk. santrifüj edildikten sonra en üst tabakada toplanan trigliserid ve orta tabakada toplanan olgun yağ hücreleri tüpten uzaklaştırılıp tüpün dibindeki hücre süspansiyonu (SVF) insülin enjektörlerine çekildi. Enjeksiyon için 30 G' lik iğne kullanıldı (Şekil 3.8). 4 kadrana intradermal planda toplam 1cc olacak şekilde uygulandı (Katz AJ ve ark., 1999; Planat-Benard V ve ark., 2004) (Şekil 3.4) .



Şekil 3.6: İnguinal yağ yastığından yaklaşık 1 cm³'lük doku eksizyonu.



Şekil 3.7: Alınan dokunun steril petri kabı içinde mekanik doğranma işlemi



Şekil 3.8: Santrifüj sonrası SVF'nun aspirasyonu. (Stromal vasküler fraksiyon: ← ; parçalanmış yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserid: ---->)

3.3.3 Kontrol grubu

Yanık oluşturulduktan sonra herhangi bir hücre tedavisi uygulanmayıp intradermal plana 1 ml % 0.9 serum fizyolojik enjekte edilerek kontrol grubu oluşturuldu.

3.4 Mezenkimal kök hücre elde edilmesi

Mezenkimal kök hücrelerin elde edilme işlemi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde ve Tıbbi Biyoloji A.D Tıbbi Genetik B.D. sitogenetik laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Erkek donör hayvanların her birinden eter inhalasyonu ile genel anestezi altında eksternal intrakardiyak yolla elde edilen 10 ml kan 4000 devir/dakika (rpm) 10 dk. santrifüj edilerek otolog serum elde edildi. Eter inhalasyonuna devam edilerek hayvanlar öldürülüp, yıkama yöntemiyle femur ve tibialarından kemik iliği alınabilmesi için medüller kavileri insülin enjekteriyle DMEM-LG besiyeriyle her hayvan için toplam 10 ml olacak şekilde yıkandı. DMEM-LG içeren hücreler eşit hacimdeki Ficoll solüsyonu üzerine tüp içerisinde yayıldı. Elde edilen solüsyondan mononükleer hücreleri ayırmak amacıyla dansite gradiyent yöntemi kullanılarak 900 devir/dakika'da 30 dk. süre ile santrifüj edildi. Interfazdan toplanan mononükleer hücrelerden 3 ml'si akım sitometri cihazında hematopoetik ve mezenkimal kök hücre belirteçleri; CD11b/c, CD44, CD45, CD90, CD106 kullanılarak CD11b/c [%97 (+)], CD45 [%99 (+)], CD90 [%34 (+)], CD106 [%11 (-)], CD44 [%1 (-)] olduğu gösterilip tanımlandı. Geri kalan 7 ml hacmindeki kısım 200 ml/L FBS, 100 U/ml penisilin, 100 Ug/ml streptomisin ve 200 ml/L L-Glutamin eklenmiş 3 ml'lik DMEM-LG besiyeri içinde 25 cm² (T25) hücre kültür kaplarına 10⁶/ml konsantrasyonunda ekildi. Hücreler 37⁰C ve 50 ml/L CO₂ içeren %95 nem oranına sahip ortamda inkübe edildi. Besi yeri ilk 3 gün her gün, sonrasında 5 ml'e çıkarılarak 3-4 günde bir değiştirildi. 14. günde invert mikroskopta CFU-F'ler görüldükten sonra kültür kaplarına 1.5 ml Tripsi-EDTA-C öncesinde ve sonrasında 2'şer dakikalık elle vurma yöntemi uygulanıp 5 dakika 37⁰C inkubatörde tutulduktan sonra 5 kez pasajlandı. Çoğaltılan 8 kültür kabında Tripsin-EDTA-C ile kaldırılan hücreler süspansiyon haline getirilip 1 saat içinde akım sitometri cihazında kemik iliği kökenli hematopoetik ve mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri tekrar kullanılarak CD11b/c [%5 (-)], CD45 [%1 (-)], CD90 [%97 (+)], CD106 [%30 (+)], CD44 [%97 (+)]

yeniden tanımlandı. Tanımlamada Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji laboratuvarında bulunan FASC Calibur TM cihazı kullanıldı. Pasajlanarak çoğaltılan diğer hücre kültürleri deneyde daha sonra kullanılmak üzere yine her kültür kabına 1.5 ml Tripsin-EDTA-C konularak kaldırılıp süspansiyon haline getirildikten sonra %10 DMSO ve %20 FBS içeren DMEM-LG'den 1.5 ml eklenerek 2 ml'lik kriyotüpte -80°C'de saklandı (Alpaslan Pınarlı F., 2009).

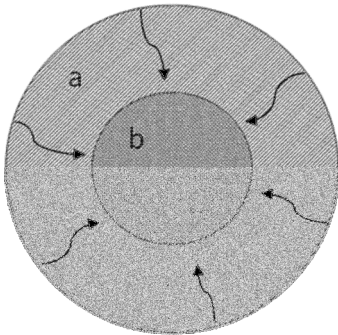
3.5 Değerlendirme metodları

Çalışmada, makroskobik olarak; epitelizasyon süresi ve kontraksiyon yüzdesi, mikroskobik (histopatolojik) olarak; histolojik skor, enflamatuvar hücre infiltrasyonu, makrofaj infiltrasyonu, rete uzantısı sayısı, yüksek mitojenik aktivite gösteren Ki 67(+) keratinosit sayısı, kapiller tomurcuk ve kapiller yoğunluk sayısı değerlendirildi.

3.5.1.Makroskobik inceleme

a) Kontraksiyon yüzdesi:

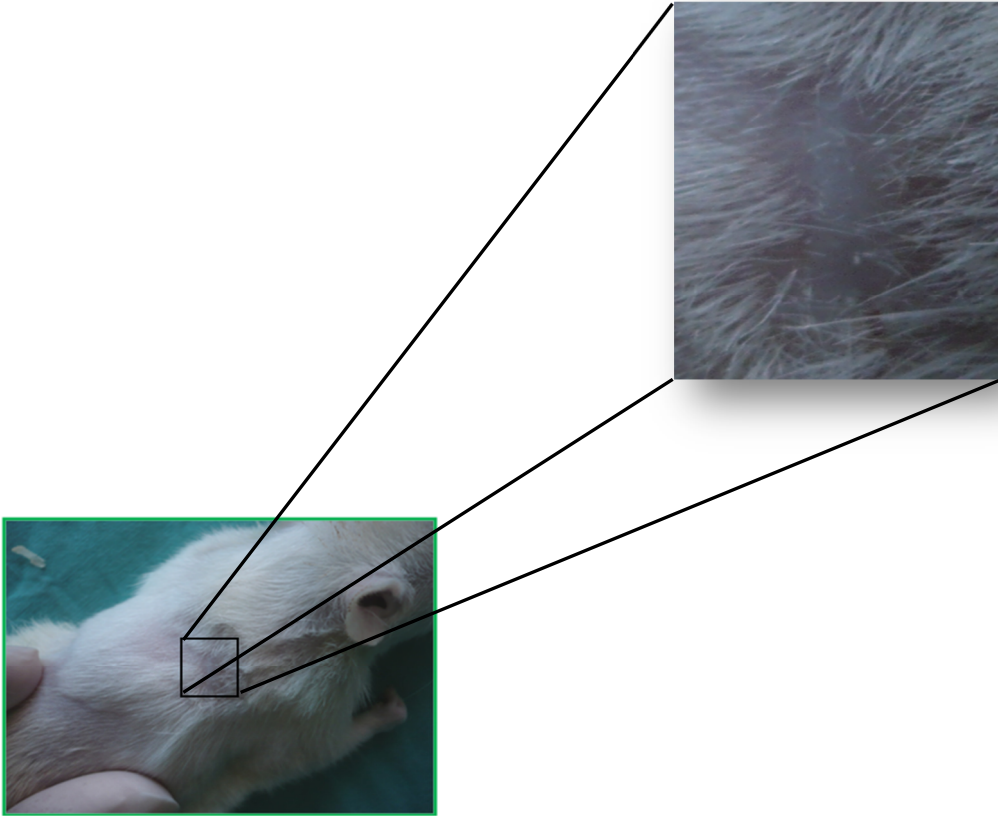
Image Tool programı (UTHSCSA ImageTool Version 3.0, San Antonio, Texas) kullanılarak bağımsız iki kişi tarafından orjinal yara ve 7,14 ve 21. günlerdeki yara alanları fotoanaliz yöntemiyle hesaplandı ve ortalamaları alındı. Yara kontraksiyon yüzdesi: [orjinal yara alanı (a) - ölçülen alan (b)] / orjinal yara alanı (a) X 100 formülü kullanılarak hesaplandı (Wu Y ve ark., 2005) (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: İki zamanlı şematik yara kontraksiyonu a) yaralanma oluşturulduğu anda ölçülen alan, b) biopsi sırasında ölçülen alan

b) Tam epitelizasyon süresi:

MKH ve SVF gruplarında 8'er, kontrol grubunda ise dört deneğin 'X' işaretli lezyonlarının epitelize olup tam olarak kapandığı gün kaydedildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Kapanmış yara

3.5.2 Histopatolojik İnceleme

Mezenkimal kök hücre grubunda her doku örneğinden bir parça PCR analizi için Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, USA) içeren ependorf tüpüne alındıktan sonra geri kalan kısmı histopatolojik inceleme için saklandı. Histolojik skor, enflamatuvar hücre infiltrasyonu, makrofaj infiltrasyonu, rete uzantısı sayısı, kapiller tomurcuk ve kapiller yoğunluk sayısı hemotoksilen ve eosin ile boyanan preparatlarda bakıldı. Yüksek mitojenik aktivite gösteren keratinosit sayısı için anti-Ki 67 Ab, endotel için vWF immünohistokimya boyama teknikleri ile değerlendirme yapıldı.

I) Hematoksilen & Eozin boyama tekniği: Yanık hasarı sonrası 7, 14 ve 21. günlerdeki tüm yaralar ~5 mm marjinal normal deri içerecek şekilde spesmen olarak alındı. Örnekler tamponlanmış nötral %10 formalin solüsyonunda tespit edilip, 24 saat sonra trimlendi ve postfiksasyonları yapıldı. Doku örnekleri bir gün boyunca akarsu altında yıkandıktan sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafinde bloklandı. Mikrotom (Leica RM2125RT) ile ~5 µm kalınlığında alınan kesitler, rutin histopatolojik muayene için Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı. Sonuçların değerlendirilmesi Nikon Eclipse E600W ışık mikroskobu yardımıyla yapıldı ve Nikon DS Camera Head DS-5M ile mikroskopik fotoğrafları çekildi.

II) İmmünohistokimya Boyama Tekniği: Hazırlanan doku bloklarından alınan kesitlerde, epidermiste rejenerasyonu göstermek için rejeneratif çekirdeklerde Ki-67 ve endotel hücrelerinde ise Faktör 8(vWF) isimleri verilen proteinlerin varlığını belirlemek için StreptAvidin Biotin Peroksidaz Kompleks tekniği (SABK) uygulandı. Primer antikorlar, üretici firmanın (Abcam, İNGİLTERE) önerileri doğrultusunda ve daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen oranlarda phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) ile sulandırıldı. İmmünohistokimyasal boyamalarda SABK teknik için alınan hazır kit (Zymed, Histostain Plus Kit, California, USA) kullanıldı ve tüm uygulamalar önerilen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikorların üretici firmalarının önerileri doğrultusunda pozitif kontroller ile negatif kontrol olarak PBS (pH 7.4) kullanıldı. Buna göre kesitler, aseton- 3- *etoksipropilamin* (100 ml aseton- 2 ml 3- *etoksipropilamin*) ile kaplanmış lamlara alındı. 30 dakika 58°C'lik etüvde kurutuldu. Ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için kesitler, sitrat tamponlu solüsyonda mikrodalga fırında 600 watta 20 dakika kaynatıldı ya da %1'lik proteinaz K (Sigma) ile 37°C'de 20 dakika tutuldu.

Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂'te 7 dakika bekletildi ve protein bloke edici serumda 10 dakika tutuldu. Daha sonra primer antikolar ile inkubasyona bırakıldı. Kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dakika bekletildikten sonra Streptavidin peroksidaz enzimi (Histostain-Plus Kits, California, USA) ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Zymed AEC RED substrat kit, ABD) kromojeni ile mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle boyandı. Gill's hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immu-mount) ile kesitler kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi.

a) Histolojik skor: Yara sınırı arasında kalan dermis kesitinde, daha önce literatürde bulunan çalışmalardan (Jacobi ve ark., 2002; Galeano ve ark., 2004; Wu ve ark., 2007) modifiye edilen ve Tablo XI'de listelenen parametreler göz önüne alınarak birbirinden bağımsız 2 patolog tarafından histolojik skora yapıldı ve ortalaması alındı (Wu Y ve ark., 2007; Galeano M ve ark., 2002; Jacobi J ve ark., 2004).

Tablo XI: Histolojik skorlama

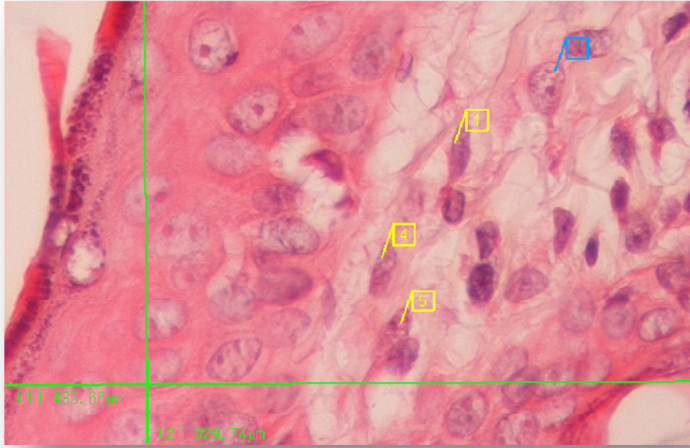
Skor	Rejenerasyon	Hücre infiltrasyonu	Granülasyon
1-3	Az miktarda glandüler yapı ile birlikte olan/olmayan az/orta reepitelizasyon	İnce/orta hücre tabakası ile çevrili yara	Sadece yara kenarında granülasyon
4-7	Minimal glandüler yapı teşekküllü tam reepitelizasyon	Kalın hücre tabakası ile çevrili yara	Yara kenarında ve %30-%50 yara yatağında granülasyon
8-10	Fazla(yeterli) glandüler yapı ile birlikte tam epitelizasyon	Çok kalın ve yoğun hücre tabakası ile çevrili yara	Yara kenarında yoğun bir granülasyon ve >%50 yara yatağında granülasyon

b) Enflamasyon puanlaması: Semi-kalitatif olarak enflamasyonun değerlendirilmesi için literatürde daha önce Güngör ve ark., 2003 tarafından yapılmış olan inceleme, modifiye edilerek ortalama hücre sayısına göre puanlama yapıldı (Gungor A ve ark, 2003). X160'lık büyütmede lezyon sınırları arasında kalan mesafe tarandı, akut enflamasyon puanı için 7. günde nötrofil, kronik enflamasyon puanı için 14. ve 21. günde makrofaj, lenfosit ve plazmosit değerlendirildi (Tablo XII).

Tablo XII: X160' lık büyütmede alandaki lökosit, lenfosit, plazmosit sayılarının ortalamasına göre enflamasyon puanlaması semi-kalitatif olarak incelendi. (Gungor A, Poyrazoglu E, Cincik H, Sali M, Candan H, Ay H. The effectiveness of hyperbaric oxygen treatment in tracheal reconstruction with auricular cartilage grafts (experimental study). Am J Otolaryngol. 2003; 24(6): 390-4.)

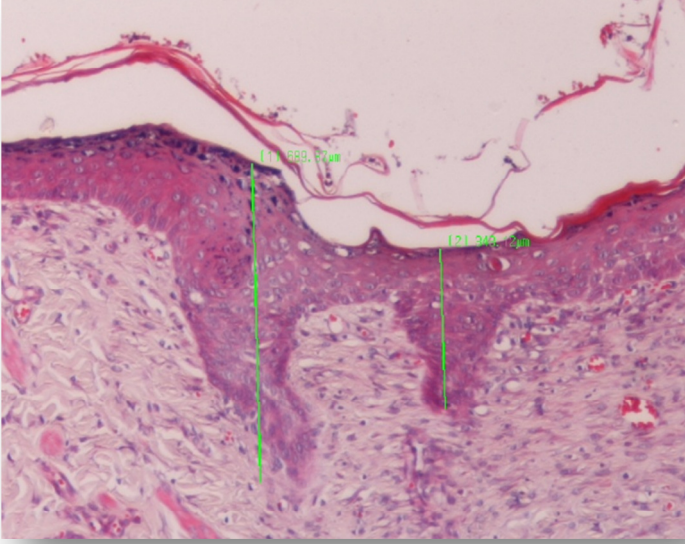
Puan	Akut enflamatuvar hücre sayısı (nötrofil)	Kronik enflamatuvar hücre sayısı (makrofaj, lenfosit, plazmosit)
0	Yok	Yok
1	Hafif	Hafif
2	Orta	Orta
3	Şiddetli	Şiddetli

c) Makrofaj sayısı: 7, 14, 21. günlerde X320'lik büyütmede rastgele 5 bölge seçilerek makrofaj sayıları hesaplandı ve ortalaması alındı (Şekil 3.11).



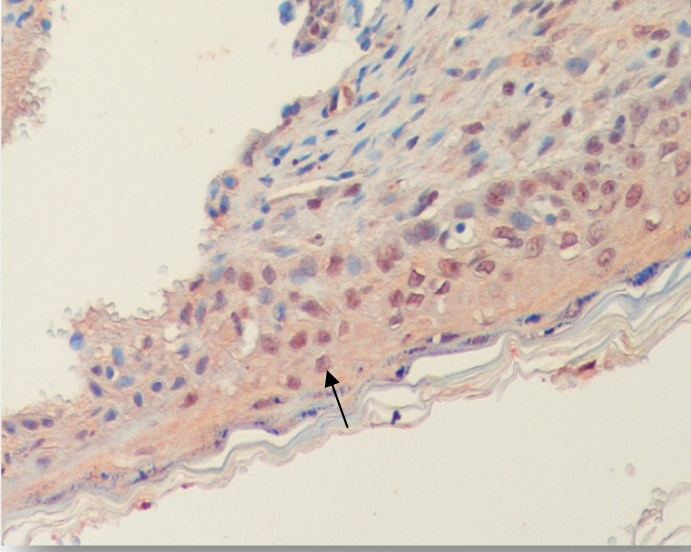
Şekil 3.11: Mavi kutu: makrofaj, sarı kutular: fibroblast (X320)

d) Rete uzantısı sayısı: 7, 14, 21. günlerde X80'lik yara kenarındaki rete uzantısı sayısı ve yüksekliği değerlendirildi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12: Epidermodermal rete uzantıları (X80)

e) Ki 67 (+) keratinosit sayısı: Yara kenarına yakın rastgele 3 bölge seçilerek boyanan Ki67(+) rejeneratif çekirdekler hesaplanarak epitalizasyonu değerlendirecek keratinosit hücre yoğunluğu hesaplandı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: Ki 67(+) keratinosit (X160) (ok ile işaretli)

f) Kapiller dansite ve kapiller tomurcuk: Yanık oluşturulmasını takiben 7, 14 ve 21. günlerde her gruba ait H&E ve faktör 8 (vWF) ile boyanmış doku örneklerinde Weidner, 1991 tarafından tanımlanan *hot spot* yöntemiyle 5 alan taranarak kapiller sayıları (nK) ve kapiller tomurcuk sayıları (nk) hesaplandı. Bunun için öncelikle X80' lik büyütmede 5 bölge seçildi ardından X160' lık büyütmede alan (A) hesaplanıp, kapiller tomurcuk (nk) (eritrosit içermeyen/ sistemik dolaşıma açılmamış) ve kapiller (nK) sayılarak kapiller dansiteye ulaşıldı. İncelenen histolojik veriler Tablo XIII'de özetlenmiştir.

Tablo XIII: İncelenen histolojik veriler

Yanık hasarının değerlendirilmesi	Yara iyileşmesi değerlendirilmesi	Epitelizasyonun Değerlendirilmesi	Neoanjiogenezin değerlendirilmesi
kıl folikülü hasarı	epidermal rete uzantısı sayısı	Ki67(+) keratinosit sayısı (hücre yoğunluğu)	kapiller tomurcuğu sayısı(nk)
subdermal blister	granülasyon dokusu	rete uzantısı sayısı	kapiller sayısı(nK)
derin dermal hasar	nötrofil, makrofaj, lenfosit ve plazmosit infiltrasyonu		

3.6 İstatiksel Analiz

Sonuçlar SPSS (Windows için,13.0) programı kullanılarak bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışmada hiç bir hayvan sakrifiye edilmedi. Ancak MKH çalışma grubundan 3 denek, SVF grubundan 2 denek anestezi sırasında ex oldu. Yine MKH ve SVF gruplarından 3'er denek ile kontrol grubundan 1 denek takip sırasında ex oldu. SVF grubundan 1 denekte adipoz doku donör alanı olan inguinal bölgede enfeksiyon gelişti. Ex olan denekler çalışmadan çıkarılarak yerlerine yedek denekler ile gruplar tamamlandı.

Kontraksiyon yüzdesi: İlginç olarak 7. gündeki kontraksiyon yüzdesi sonuçları SVF için en iyi olup, MKH ve kontrol grubundan anlamlı derecede yüksekti. 14.günde MKH grubunun kontraksiyon yüzdesi artarken yine SVF en iyi kontraksiyon oranlarına sahipti. 21. günde MKH grubu en yüksek ortalamaya sahipken SVF grubuyla arasında anlamlı fark yoktu ve her iki grubun kontraksiyon yüzdeleri anlamlı oranda kontrol grubundan yüksekti. Yara kontraksiyon oranları Tablo XIV'de istatistiksel sonuçlar ise Tablo XV'de verilmiştir. Hiçbir grupta denekler 3 haftadan erken rejenerasyonunu tamamlayamadı (Şekil 4.1).

Tablo XIV: Kontraksiyon yüzdesi verileri

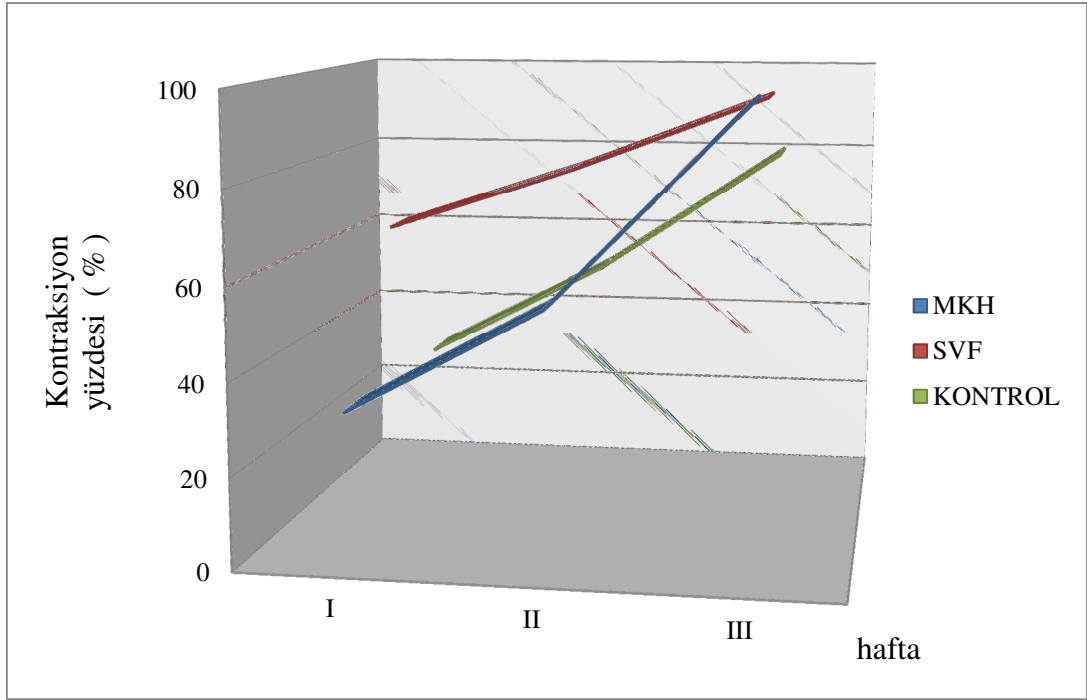
Denek no, Hafta	%
101, 1	41, 91
102, 1	52, 59
103, 1	22, 45
104, 1	50, 53
105, 1	24, 32
106, 1	49, 47
107, 1	34, 41
108, 1	34, 98
109, 2	80, 72
110, 2	60, 87
111, 2	83, 94
112, 2	76, 17
113, 2	74, 69
114, 2	71, 35
115, 2	65, 69
116, 2	58, 72
101, 3	91, 51
102, 3	94, 41
103, 3	93, 86
104, 3	98, 59
105, 3	96, 38
106, 3	92, 88
107, 3	95, 17
108, 3	92, 06

Denek no, Hafta	%
201, 1	75, 62
202, 1	74, 92
203, 1	65, 77
204, 1	58, 84
205, 1	74, 31
206, 1	67, 48
207, 1	58, 40
208, 1	59, 95
209, 2	87, 91
210, 2	87, 08
211, 2	85, 90
212, 2	86, 62
213, 2	77, 62
214, 2	79, 53
215, 2	84, 37
216, 2	84, 96
201, 3	88, 43
202, 3	90, 64
203, 3	91, 13
204, 3	97, 67
205, 3	94, 27
206, 3	97, 20
207, 3	91, 05
208, 3	96, 75

Denek no, Hafta	%
301, 1	25, 01
302, 1	35, 01
303, 1	34, 24
304, 1	27, 79
305, 2	52, 43
306, 2	46, 83
307, 2	42, 94
308, 2	46, 40
301, 3	80, 52
302, 3	81, 89
303, 3	85, 11
304, 3	83, 55

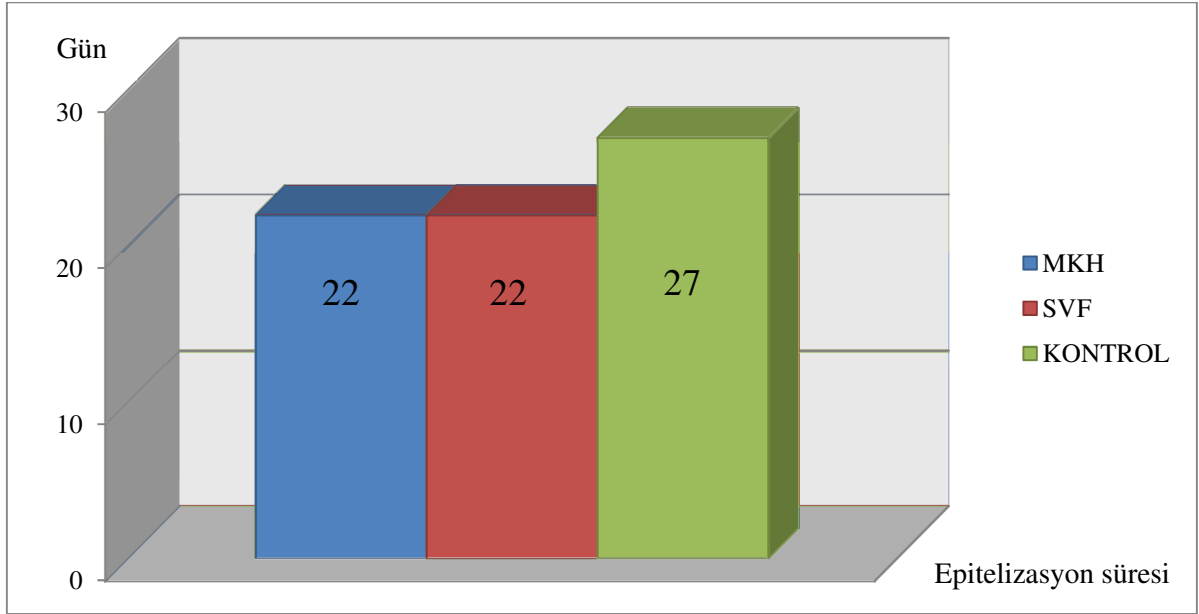
Tablo XV: Kontraksiyon yüzdesi istatistiksel sonuçları

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
I	32.8 ± 11.7	66.9 ± 7.3	30.5 ± 4.8	0.001
II	55.4 ± 9.1	80.7 ± 3.7	52.2 ± 3.9	0.001
III	98.5 ± 2.3	93.3 ± 3.5	82.7 ± 1.9	0.009



Şekil 4.1 Karşılaştırmalı kontraksiyon yüzdesi sonuçları

Yaranın kapandığı gün: Birçok parametre açısından MKH grubu ile SVF grubu farklılık gösterse bile her ikisinde kapanma süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır ($p > 0.05$). Her iki çalışma grubu kontrol grubundan 5 gün erken kapanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 4.2) (Tablo XVI).



Şekil 4.2: Şematik yara epitelizasyon süresi

Tablo XVI: Yara epitelizasyon süresi istatistiksel sonuçları

Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
Gün	22.2 ± 0.4	22.6 ± 0.5	27.2 ± 2.5	0.003

Histolojik skor: 7. günde üç grup arasında histolojik skor ortalaması açısından anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). 7 ve 14. günlerde MKH ve SVF gruplarının histolojik skorları kontrol grubundan fazladır ($p<0.05$). 7, 14 ve 28. günlerde saptanan histolojik skorlar ve istatistiksel verileri Tablo XVII ve Tablo XVIII te verilmiştir.

Tablo XVII: Histolojik skor verileri

(100; MKH grubu, 200;SVF grubu, 300; kontrol grubu)

Denek no, Hafta	A	B
101, 1	2	2
102, 1	1	1
103, 1	1	1
104, 1	3	2
105, 1	3	3
106, 1	3	2
107, 1	2	1
108, 1	1	1
109, 2	8	9
110, 2	9	9
111, 2	8	7
112, 2	9	9
113, 2	7	8
114, 2	10	8
115, 2	8	7
116, 2	9	8
101, 3	10	10
102, 3	9	9
103, 3	10	10
104, 3	10	10
105, 3	10	9
106, 3	10	10
107, 3	8	9
108, 3	10	10

Denek no, Hafta	A	B
201, 1	2	1
202, 1	2	2
203, 1	1	1
204, 1	3	2
205, 1	2	2
206, 1	2	2
207, 1	2	1
208, 1	2	1
209, 2	9	9
210, 2	7	9
211, 2	8	8
212, 2	9	9
213, 2	9	9
214, 2	9	8
215, 2	8	7
216, 2	10	8
201, 3	10	10
202, 3	10	9
203, 3	10	9
204, 3	10	9
205, 3	10	10
206, 3	9	10
207, 3	10	9
208, 3	9	8

Denek no, Hafta	A	B
301, 1	1	1
302, 1	1	1
303, 1	2	1
304, 1	1	1
305, 2	7	7
306, 2	5	5
307, 2	6	6
308, 2	5	5
301, 3	4	4
302, 3	4	4
303, 3	6	6
304, 3	4	4

Tablo XVIII: Histolojik skor ortalamaları ve istatistiksel sonuçları

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	P
I	1.81 ± 0.79	1.75 ± 0.46	1.12 ± 0.25	0.146
II	8.31 ± 0.70	8.50 ± 0.59	5.75 ± 0.95	0.007
III	9.62 ± 0.58	9.50 ± 0.46	4.50 ± 1.00	0.006

Akut ve kronik enflamasyon puanı: Akut enflamasyon skorları açısından üç grup arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Kronik enflamasyon skorları değerlendirildiğinde SVF grubu ile kontrol grubu arasında fark bulunamazken, MKH grubuna ait puanlar diğer iki gruptan daha düşüktü ($p< 0.05$). Akut ve kronik enflamasyon puanlarının ortalamaları ve istatistiksel analizi sırasıyla Tablo XIX ve Tablo XX'de verilmiştir.

Tablo XIX: Akut enflamasyon skoru istatistiksel sonuçları

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
I	1.88 ± 0.99	1.50 ± 0.53	1.75 ± 0.50	0.454

Tablo XX: Kronik enflamasyon skoru istatistiksel sonuçları

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
II ve III	1.38 ± 0.71	2.00 ± 0.96	2.25 ± 0.88	0.042

Makrofaj infiltrasyonu: Makrofaj sayısı açısından her üç grup arasında anlamlı fark bulunamadı. Kantitatif olarak makrofaj infiltrasyonu hesaplandı. Makrofaj sayısına ait hesaplanan veriler ve istatistiksel sonuçlar Tablo XXI ve Tablo XXII’da verilmiştir.

Tablo XXI: Rastgele seçilen 5 bölgede sayılan makrofaj sayıları
(100: MKH grubu, 200:SVF grubu, 300:kontrol grubu)

Gruplar, haftalar	M1	M2	M3	M4	M5
101, 1	2	0	2	1	2
102, 1	0	1	2	2	0
103, 1	2	2	0	1	0
104, 1	3	2	1	0	0
105, 1	0	2	1	1	1
106, 1	2	1	0	0	2
107, 1	2	0	2	1	2
108, 1	0	1	1	1	0
109, 2	4	4	3	4	5
110, 2	1	3	4	4	4
111, 2	2	3	4	1	0
112, 2	4	3	4	0	3
113, 2	1	6	5	3	4
114, 2	3	3	4	5	4
115, 2	0	1	5	6	3
116, 2	5	4	6	6	3
101, 3	1	4	4	4	3
102, 3	3	5	0	3	0
103, 3	4	5	3	6	6
104, 3	7	7	4	7	5
105, 3	7	5	7	4	3
106, 3	4	2	0	5	1
107, 3	5	2	2	4	5
108, 3	5	2	4	0	5

Gruplar, haftalar	M1	M2	M3	M4	M5
201, 1	1	0	2	1	1
202, 1	1	2	0	1	0
203, 1	1	0	2	1	1
204, 1	2	2	0	0	1
205, 1	1	2	0	1	1
206, 1	2	0	0	1	0
207, 1	0	1	2	1	3
208, 1	1	0	0	1	1
209, 2	5	3	4	4	3
210, 2	4	6	6	3	1
211, 2	2	4	2	3	1
212, 2	5	4	1	2	4
213, 2	4	3	2	2	2
214, 2	5	1	2	0	3
215, 2	3	2	3	2	1
216, 2	5	3	2	1	0
201, 3	6	5	4	2	2
202, 3	4	2	3	5	3
203, 3	4	6	5	3	4
204, 3	5	4	5	5	4
205, 3	2	4	6	4	3
206, 3	0	1	2	1	0
207, 3	3	5	4	2	5
208, 3	3	5	4	6	4

Gruplar, haftalar	M1	M2	M3	M4	M5
301, 1	1	0	2	2	1
302, 1	0	1	0	1	0
303, 1	0	1	1	2	2
304, 1	1	2	0	1	3
305, 2	2	1	2	3	5
306, 2	2	2	1	2	2
307, 2	2	0	3	3	3
308, 2	4	3	0	3	1
301, 3	4	0	3	2	3
302, 3	2	4	2	2	1
303, 3	3	2	1	3	4
304, 3	3	1	2	5	4

Tablo XXII: Makrofaj sayısına ait istatistiksel sonuçlar

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
I	1.07 ± 0.26	0.92 ± 0.26	1.05 ± 0.44	0.406
II	3.42 ± 0.85	2.82 ± 0.74	2.20 ± 0.32	0.058
III	3.82 ± 1.36	3.62 ± 1.21	2.55 ± 0.34	0.110

Rete uzantısı sayısı: 7, 14 ve 21. günlerde SVF grubu ile kontrol grubu arasında rete uzantısı sayıları açısından fark yoktu ancak MKH grubunun yara kenarında sayılan rete uzantısı sayıları sırayla (1.38, 2.75 ve 3.00) olarak hesaplandı ve diğer iki gruptan daha yüksekti ($p < 0.05$). Yara kenarında sayılan rete uzantısı sayıları ortalamaları ve istatistiksel sonuçları Tablo XXIII' te gösterilmiştir.

Tablo XXIII: Rete uzantısı sayıları ortalaması ve istatistiksel analizi

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
I	1.38 ± 0.51	0.63 ± 0.51	0.50 ± 0.57	0.026
II	2.75 ± 0.70	0.88 ± 0.35	1.00 ± 0.81	0.001
III	3.00 ± 0.75	1.70 ± 1.06	1.24 ± 0.95	0.003

Ki-67 (+) keratinosit sayısı: 7. günde üç grup arasında hücre sayıları açısından anlamlı fark bulunamadı. Ancak 14. günde SVF ile kontrol grubu arasında fark yokken her ikisinin sonuçları, MKH grubundan istatistiksel olarak anlamlı oranda düşüktü ($p < 0.01$). 21. günde ise MKH ve SVF grubu sonuçları, kontrol grubu sonuçlarından anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.01$). Veriler Tablo XXIV'te istatistiksel sonuçları ise Tablo XXV'te verilmiştir.

Tablo XXIV: Yara kenarındaki 3 alanda yapılan Ki-67 (+) hücre sayımı verileri

Gruplar, haftalar	A1	A2	A3
101, 1	2	0	2
102, 1	0	1	2
103, 1	2	2	0
104, 1	3	2	1
105, 1	0	2	1
106, 1	2	1	0
107, 1	2	0	2
108, 1	0	1	1
109, 2	4	4	3
110, 2	1	3	4
111, 2	2	3	4
112, 2	4	3	4
113, 2	1	6	5
114, 2	3	3	4
115, 2	0	1	5
116, 2	5	4	6
101, 3	1	4	4
102, 3	3	5	0
103, 3	4	5	3
104, 3	7	7	4
105, 3	7	5	7
106, 3	4	2	0
107, 3	5	2	2
108, 3	5	2	4

Gruplar, haftalar	A1	A2	A3
201, 1	1	0	2
202, 1	1	2	0
203, 1	1	0	2
204, 1	2	2	0
205, 1	1	2	0
206, 1	2	0	0
207, 1	0	1	2
208, 1	1	0	0
209, 2	5	3	4
210, 2	4	6	6
211, 2	2	4	2
212, 2	5	4	1
213, 2	4	3	2
214, 2	5	1	2
215, 2	3	2	3
216, 2	5	3	2
201, 3	6	5	4
202, 3	4	2	3
203, 3	4	6	5
204, 3	5	4	5
205, 3	2	4	6
206, 3	0	1	2
207, 3	3	5	4
208, 3	3	5	4

Gruplar, haftalar	A1	A2	A3
301, 1	1	0	2
302, 1	0	1	0
303, 1	0	1	1
304, 1	1	2	0
305, 2	2	1	2
306, 2	2	2	1
307, 2	2	0	3
308, 2	4	3	0
301, 3	4	0	3
302, 3	2	4	2
303, 3	3	2	1
304, 3	3	1	2

Tablo XXV: Ki-67 (+) hücre ortalaması istatistiksel sonuçları

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
I	15.8 ± 4.31	14.04 ± 3.96	10.08 ± 1.81	0.174
II	25.58 ± 5.37	17.50 ± 3.66	13.41 ± 3.87	0.005
III	28.45 ± 8.87	25.20 ± 4.14	13.25 ± 4.09	0.001

Kapiller tomurcuk ve kapiller sayısı: Literatürde neoanjiogenezi değerlendirebilmek için kapiller dansite veya kapiller tomurcuk sayıları hesaplanmıştır. Çalışmamızda iki yöntem arasında fark çıkmamıştır. 7, 14 ve 21. günlerde SVF grubu ile kontrol grubu arasında kapiller tomurcuk ve kapiller sayıları açısından fark yoktu ancak MKH grubunda hesaplanan hem kapiller tomurcuk hem de kapiller sayıları 3 hafta için de diğer iki gruptan daha yüksekti ($p < 0.05$). Kapiller tomurcuk ve kapiller sayıları ortalamaları Tablo XXVI'da, istatistiksel analizleri Tablo XXVII ve Tablo XXVIII' de verilmiştir.

Tablo XXVI: Kapiller tomurcuk ve kapiller sayıları ortalamalar

(nK: kapiller; nk: kapiller tomurcuk)

Denek no, Hafta	nK	nk
101, 1	5, 0	2, 0
102, 1	6, 2	0, 8
103, 1	4, 6	1, 4
104, 1	4, 2	1, 4
105, 1	4, 0	1, 6
106, 1	5, 0	2, 0
107, 1	5, 0	1, 6
108, 1	4, 6	1, 6
109, 2	13, 0	7, 2
110, 2	15, 6	7, 4
111, 2	12, 0	4, 4
112, 2	13, 4	6, 8
113, 2	11, 6	6, 0
114, 2	23, 4	11, 4
115, 2	13, 4	5, 6
116, 2	10, 6	5, 4
101, 3	21, 8	12, 8
102, 3	26, 6	14, 8
103, 3	17, 6	7, 8
104, 3	19, 6	12, 4
105, 3	20, 0	12, 4
106, 3	23, 4	14, 4
107, 3	29, 0	15, 8
108, 3	24, 8	15, 6

Denek no, Hafta	nK	nk
201, 1	1, 00	0, 2
202, 1	1, 80	0, 4
203, 1	1, 20	0, 4
204, 1	2, 20	0, 4
205, 1	1, 80	0, 2
206, 1	1, 80	0, 4
207, 1	1, 60	0, 2
208, 1	2, 00	0, 8
209, 2	3, 80	1, 6
210, 2	5, 40	2, 6
211, 2	2, 00	1, 2
212, 2	3, 40	1, 4
213, 2	3, 20	1, 4
214, 2	4, 20	2, 4
215, 2	4, 00	2, 4
216, 2	3, 60	1, 8
201, 3	14, 40	8, 8
202, 3	13, 00	6, 6
203, 3	19, 80	13, 4
204, 3	16, 80	9, 2
205, 3	8, 20	3, 4
206, 3	19, 20	11, 6
207, 3	7, 40	4, 0
208, 3	14, 80	8, 8

Denek no, Hafta	nK	nk
301, 1	1, 60	0, 4
302, 1	1, 40	0, 4
303, 1	1, 40	0, 4
304, 1	1, 60	0, 4
305, 2	2, 80	1, 0
306, 2	3, 20	1, 2
307, 2	4, 80	2, 6
308, 2	2, 40	0, 8
301, 3	8, 60	3, 2
302, 3	9, 80	3, 4
303, 3	8, 20	3, 6
304, 3	7, 40	2, 8

Tablo XXVII: Kapiller tomurcuk sayısı istatistiksel sonuçları

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
I	1.55 ± 0.38	0.37 ± 0.19	0.40 ± 0.00	0.001
II	6.77 ± 2.12	1.85 ± 0.54	1.40 ± 0.81	0.001
III	13.25 ± 2.59	8.22 ± 3.45	3.25 ± 0.34	0.002

Tablo XXVIII: Kapiller sayısı istatistiksel sonuçları

Hafta / Grup	MKH	SVF	Kontrol	p
I	4.82 ± 1.67	1.67 ± 0.39	1.50 ± 0.11	0.001
II	14.12 ± 4.03	3.70 ± 0.96	3.30 ± 1.05	0.001
III	22.85 ± 3.84	14.20 ± 4.58	8.50 ± 1.00	0.001

5. TARTIŞMA

Yanıkta, sınırlı epidermal hasardan derin dermal yaralanmaya kadar değişen klinik tablo oluşabilir. Yanık iyileşirken bir taraftan epidermal hücreler kıl folikülü, ter bezi gibi derin dermal eklerden rejenere olarak epitelizasyonu sağlarken, diğer taraftan da dermal hücre infiltrasyonu bağ doku sentezini uyarır. Yanığa bağli doku hasarını diğer yaralardan ayıran en önemli özellik yaralanmanın, travmadan sonra da artarak devam edebilmesidir.

Kök hücrelerin iyileştirici etkileriyle ilgili deneysel ve klinik çalışmalar literatürde mevcuttur. Mezenkimal kök hücreler; doku tamirinde kilit rol oynayan kondrosit, ostetoblast, endotelyal hücre, adipozit, satellit hücre (kasta), sinir hücresi gibi farklı fenotipte birçok hücreye farklılaşabilir (Shi C ve ark., 2006). Kemik iliği kaynaklı kök hücreler, fibroblast, makrofaj gibi dermal ve keratinosit gibi epidermal hücreleri uyararak da rejenerayona katkıda bulunurlar (Borue X ve ark., 2004). Mezenkimal kök hücreler, direk etki veya salgılattıkları büyüme hormonlarının parakrin etkileriyle, hasarlı bölgede hücre proliferasyonunu, granülasyon dokusu oluşumunu ve neoanjiogenezi hızlandırır (Hocking AM ve ark., 2010; Smith AN ve ark., 2010).

Çalışmamızda zengin bir kök hücre kaynağı olan adipojenik dokudan elde edilen SVF'nun, epidermal ve dermal iyileşme üzerine etkilerinin kök hücre ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Dermal rejenerasyonu değerlendirmek için inflamasyon fazı ve granülasyon fazları değerlendirilmeye çalışıldı. MKH ve SVF gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek histolojik skor saptanması iki grubun da dermal granülasyon ve selüleriteyi arttırdığı yönünde yorumlanabilir. Akut inflamasyon fazında nötrofiller ve makrofajlar fagositoz yaparak dermisi rejeneratif mikroçevreye hazırlarlar. MKH'ların dolaşımdaki monositleri ve lokal makrofajları uyarıcı etkisi Chen ve ark. tarafından gösterilmiştir (Chen L ve ark., 2008). SVF'de bulunan makrofaj ve GM-CSF gibi büyüme hormonlarının etkisiyle çalışmada her iki grubun makrofaj sayısının artmış olması beklenirdi. Ancak çalışmamızda makrofaj sayısı açısından üç grup arasında 7, 14 ve 21. günlerde anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). MKH ve SVF'nun makrofaj fonksiyonları üzerine etkilerinin daha ileri araştırmalarla değerlendirilmesi uygun olacaktır.

İnflamatuvar yanıt, organizmayı korumaya yönelik fizyolojik ve yararlı bir reaksiyon olmasına karşın, bazen inflamasyonun kontrol edilememesi ve başlatan neden ortadan kalktıktan sonra da olayın devam etmesi devamlı bir inflamatuvar cevaba ve organizmada hasar meydana gelmesine yol açmaktadır. Gecikmiş klinik ve histopatolojik iyileşme ile sonuçlanan bu uzamış inflamasyonda etkili birçok faktör bulunmakla birlikte plazmositler ve lenfositler bu etkileşimlerin merkezinde bulunmaktadır.

MKH'nın IL-6, lökemi inhibe edici faktör, granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), stem cell faktör, makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) sayesinde hematopoezi stimüle edip selüleriteyi arttırması beklenir. Han ve ark. yaptıkları çalışmada SVF'nun hematojenik hücrelerini Yeşil Florasan Protein(GFP) işaretlemişler ve kemik iliği letal dozda irradiye edilmiş deneklere verildiğinde periferik kanda işaretli hematolojik seri hücrelerinin (özellikle T lenfosit, B lenfosit ve myeloid seri) arttığını göstermişlerdir (Han J ve ark., 2010). Bu veri de SVF'nin kemik iliği kadar potent olmasa da hematolojik seriyi üretme kapasitesine sahip olduğunu göstermekte ve artmış enflamasyon skoru beklenmekteydi. Ancak çalışmamızda akut enflamasyon skorları açısından her üç grup arasında anlamlı fark bulunamadı.

Literatürde yapılan çalışmalarda MKH'nin immünmodülatuar ve anti-inflamatuvar etkilerini değerlendirecek çalışmalar yapılmıştır. MKH'ların T lenfosit üzerine baskılayıcı etkileri gösterilmiştir. Çalışmamızda böyle bir etkiyi gösterecek analiz yapılamamakla birlikte MKH grubuna ait düşük kronik enflamasyon skoru, inflamasyon sürecinin bu grupta daha hızlı tamamlanarak granülasyon fazına geçildiğini gösteriyor olabilir. Grupların akut enflamatuvar skorları arasında fark bulunmaması; deney aşamasında bazı deneklerde kök hücre engraftmanın başarısız olması veya histopatolojik inceleme evresinde semi-kalitatif inceleme kullanılması nedeniyle hatalı sonuçlar alınması nedeniyle olabilir. MKH'lar lenfosit sayısını azaltmasalarda fonksiyonel olarak lenfosit inhibisyonu yapabilirler. Bu sebepten enflamasyon puanları arasında fark olmayabilir ancak kök hücre gruplarında baskılanmış T lenfosit fonksiyonuna bağlı azalmış inflamasyon beklenebilir. MKH grubuna ait alınan düşük kronik inflamasyon skoru bu bilgilerle değerlendirildiğinde anlamlıdır.

Fathke ve ark. yaptıkları çalışmada yarada epiderminin lokal kutanöz hücreler sayesinde iyileştiğini, derminin ise kemik iliği kökenli hücreler ve dermal mezenkimal hücreler yardımıyla onarıldığını bildirmişlerdir (Fathke C ve ark. 2004).

Epidermal rejenerasyon sağlam kalan keratinositlerden ve kıl folikülü, sebace bez ve ter bezini döşeyen epitel hücrelerinden sağlanır. 2.derece derin ve 3. derece yanık oluşturulması tam kat epidermal hasara sebep olduğundan epidermal rejenerasyon yanık kenarlarından değerlendirildi. Teorik olarak koagülasyon zonun kenarındaki bu alanlar staz zonuna eş gelmektedir. İyileşme sürecinde bazal tabakadan göç eden keratinositler ve sağlam kıl foliküllerinde epitel hücreleri farklanarak periferden merkeze doğru epitelizasyonu sağlamaya çalışırlar.

Çalışmamızda 7, 14 ve 21. günlerde SVF grubu ile kontrol grubu arasında rete uzantısı sayıları açısından fark yoktu ancak MKH grubunun hesaplanan rete uzantısı sayılarının (1.38, 2.75 ve 3.00) diğer iki gruptan daha yüksek olması rejeneratif etkinliği yönünde değerlendirilebilir.

Bazal membranda sayılan Ki-67(+) hücre sayısı mitotik aktivite gösteren keratinositleri göstermektedir. 7. günde üç grup arasında Ki-67 (+) hücre sayıları açısından anlamlı fark bulunamadı. Ancak MKH'da 14.günde, SVF'de ise 21.günde mitotik aktivite artışı gözlemlendi.

Yara kontraksiyonu, dermal rejenerasyonun bir aşaması olup epitelize olacak yüzeyinin daralmasını sağlayan ve myofibroblastların etkin olduğu bir süreçtir.

İlginç olarak birçok parametrede kontrol grubundan farkı olmayan SVF grubu, ilk iki hafta içinde en iyi yara kontraksiyonu gösteren gruptu. Bunun sebebi ile ilgili literatür bilgisi mevcut değildir. Deneğe verilen otojen SVF' nun bu olumlu etkisi birçok parametre için gerisinde olduğu MKH grubu ile aynı zamanda (22 gün) tamamlanan iyileşme süreci ile sonuçlanmıştır. Stromal vasküler fraksiyonun epitelizasyonu arttırıcı etkisi geç başlasa da hızlı yara kontraksiyonunu sağlayarak yaranın mezenkimal kök hücre grubuyla aynı sürede kapanmasına sağladığı söylenebilir.

Neovaskülarizasyon, yara iyileşme sürecinin en önemli adımlarından birisidir. Yeni oluşan damarlar, dermal ve epidermal hücrelerin artmış enerji ve hammadde ihtiyacını karşılayarak, epitelizasyon ve bağ doku sentezinin sürekliliğini sağlarlar. Ayrıca yanık ile oluşan doku hasarında, yeni damar oluşmasının, yanık bölgenin

soğutulmasında, interstisiyel ödemin çözülmesinde, toksik ürünlerin uzaklaştırılmasında, asidozun düzeltilmesinde, iyileşme sürecine etkiyen diğer hücre ve sitokinlerin bölgeye ulaşmasında ayrı bir önemi vardır.

Miranville ve ark yaptıkları çalışmada insandan elde edilen subkutanöz veya visseral yağ doku kaynaklı SVF hücre popülasyonunda CD34, CD 133 ekspresyonu gösteren hücreleri tespit etmişler ve CD 34⁺/ CD31⁻ ekspresyonu gösterenlerin anjiogenezi stimüle eden endotelial hücre prekürsörleri özelliklerini sergilediklerini göstermişler (Miranville A ve ark., 2004). Planat-Bernard ve ark. adipojenik dokudan elde edilerek invitro kültüre edilmiş SVF hücrelerinin de CD31 ve vWF sekrete eden endotelial hücrelere farkedildiğini göstermişlerdir (Planat-Benard V ve ark., 2004). SVF'nun anjiogenik etkisi, direk veya büyüme hormonlarına olan parakrin etkisiyle olabilir.

Ayrıca SVF yeni damar oluşturucu etkisini perisit ve perivasküler niş transferi yoluyla sağlıyor olabilir. Nişler her dokuda bulunan erişkin kök hücrelerin ihtiyaç duyulan hücreye diferansiye olabilmesi için gerekli mikroçevreyi barındıran kök hücre odağı şeklinde tanımlanabilir (Schofield R, 1978; Voog J ve Jones DL, 2010; Greco V ve Guo S, 2010). Yoğun kapiller dansite içeren adipojenik dokularda daha yüksek oranda kök hücre belirtecinin saptanması kök hücrelerin vasküler yapılarla yakından ilgili olduğunu düşündürmüştü ve perivasküler nişlerde daha yoğun olarak buldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Çalışmamızda 7, 14 ve 21. günlerde SVF grubu ile kontrol grubu arasında kapiller tomurcuk ve kapiller sayıları açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark yoktu ancak MKH grubunda hesaplanan hem kapiller tomurcuk hem de kapiller sayıları diğer iki gruptan daha yüksekti. MKH ve diğer iki grup arasında kapiller tomurcuk ve kapiller sayıları açısından 2. haftadaki artış dramatik olmuştur. Bu sonuç MKH grubunda 14 . günden sonra hem yeni kapiller oluşumu (neoanjiogenez) hemde immatür kapillerlerin dolaşıma açılmasının hızlandığı yönünde değerlendirilebilir. MKH'nin anjiogenik etkisi bilinmektedir. Bu etkiyi IL-1 α , IL-8, Vasküler endotelial growth faktör (VEGF), Fibroblast Growth Faktör-2 (FGF-2), Transforming Growth Faktör- β 2 (TGF- β 2) üzerinden gösterdiği düşünülmektedir.

SVF grubunun 2. haftada ölçülen bazı kapiller dansite değerleri, 3. haftada ölçülen kapiller dansite ve kapiller tomurcuk değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı

fark yaratmasa da sporadik olarak MKH grubunun değerlerine yakındı. Bu sonuç invitro kültüre edilmemiş SVF'nun neoanjiogenezi stimüle edebilme potansiyeline sahip olduğunu göstermekle birlikte kapiller ve kapiller tomurcuk sayıları ortalamalarının kontrol grubundan farklı çıkmaması, MKH kadar potent anjiogenez oluşturamayacağı şeklinde yorumlanabilir. Beklenen yenidoamar oluşturucu etkisinin saptanamaması SVF eldesi veya enjeksiyona hazırlık aşamalarındaki aksaklıklardan olabilir. Ancak daha büyük sayılarla ve değişkenleri sabit tutan çalışmalarla yeni veriler elde edilebilir.

Bu bilgiler ışığında alışmamızda SVF uygulamasının neoanjiogenetik etkisinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada mevcut olduğu ve yanık yarasında hipoksik staz zonuna invivo uygulanmasının neoanjiogenezi arttırabileceği söylenbilir.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekildedir;

- 1.Stromal vasküler fraksiyonun, yeni damar oluşumunu arttırıcı etkisi saptanmadı.
- 2.Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücre ise yenidoamar oluşumunu da arttırarak iyileşmeyi hızlandırıcı etki sağlamıştır.
- 3.Mezenkimal kök hücre grubu ile stromal vasküler fraksiyon grubu arasında yaranın tam epitelize olması için gereken süre bakımından anlamlı bir fark çıkmaması, SVF'nun hızlı yara kontraksiyonuna neden olarak epitelize olacak alanı daraltması nedeniyle olabilir. Bu etkisinin donör sahadan transfer edilen; sitokin ve fibroblast, makrofaj gibi hücrelerin de etkisiyle olduğu düşünülmektedir. Ancak aşırı yara kontraksiyonu, yara iyileşmesi sırasında kontraktür gibi istenmeyen durumların gelişmesine de sebep olabilir. SVF'nun yara kontraksiyonu üzerine olan etki mekanizması ileri düzey çalışmalarla değerlendirilmeye değerdir.

Stromal vasküler fraksiyonun, öz dokudan hazırlanması ve ameliyat sırasında uygulanabilmesi, pasajlanmış mezenkimal kök hücreye olan üstünlükleridir. İleride sağlanacak yeni bilgilerin ışığında yanık hastalarının tedavisi için kullanılacak güvenli ve etkin bir yöntem olabilir.

7.KAYNAKLAR

Anonim-1-<http://curezone.com/forums/am.asp?i=1682179>(erişim tarihi 23.03.2011)

Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. *Annu Rev Nutr. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development.* 1992; 12: 207-33.

Alpaslan Pınarlı F. Sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin insan amnion membranı ile kornea yanık tedavisinde kullanımı: Deneysel çalışma (Doktora Tezi, Tez danışmanı: Ökten G). Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Samsun. 2009

Alvarado R, Chung KK, Cancio LC, Wolf SE. *Burn Resuscitation. Burns.* 2009; 35(1): 4-14.

Anlatici R, Ozerdem OR, Dalay C, Kesiktaş E, Acartürk S, Seydaoğlu G. A retrospective analysis of 1083 Turkish patients with serious burns. Part 2: burn care, survival and mortality. *Burns.* 2002; 28(3): 239-43.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275(5302): 964-7.

Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111: 1922–1931.

Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, Bambi F, Scali G, Castelli D, Rasini V, Soldati G, Moccetti T. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med.* 2007; 5:55

Atiyeh BS, Gunn SW, Hayek SN. State of the art in burn treatment. *World J Surg.* 2005; 29(2): 131-48.

Baddoo M, Hill K, Wikonson R. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell biochem.* 2003; 89: 1235-1249

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006; 17(1): 4-12.

Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int.* 2008 ; 32(4): 384-93.

Bogatkevich GS, Tourkina E, Abrams CS, Harley RA, Silver RM, Ludwicka-Bradley A. Contractile activity and smooth muscle alpha-actin organization in thrombin-induced human lung myofibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 285(2): L334-43.

Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, Collas P, Brinchmann JE. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(3): 1131-41.

Borue X, Lee S, Grove J, Herzog EL, Harris R, Diflo T, Glusac E, Hyman K, Theise ND, Krause DS. Bone marrow - derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol.* 2004; 165(5): 1767-72.

Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, Kambouris M, Kollar K, McTaggart S, Pelekanos R, Rice A, Rossetti T, Atkinson K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Devo Biology.* 2007; 18: 846-58.

Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin avb3 for angiogenesis. *Science.* 1994; 264: 569-71

Brusselsaers N, Monstrey S, Vogelaers D, Hoste E, Blot S. Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality. *Crit Care.* 2010; 14(5): 188.

Bucky LP, Vedder NB, Hong CHZ, May JW, Ehrlich HP. A monoclonal antibody which blocks neutrophil adhesion prevents second degree burn becoming third degree burns. *Proc Am Burn Assn.* 1991; 23: 133.

Bucky LP, Vedder NB, Hong HZ, Ehrlich HP, Winn RK, Harlan JM, May JW Jr. Reduction of burn injury by inhibiting CD18-mediated leukocyte adherence in rabbits. *Plast Reconstr Surg*. 1994; 93(7): 1473-80.

Calvin M. Cutaneous wound healing. *Wounds*. 1998; 10(1): 12-32.

Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg*. 1994; 21(3): 429-35.

Charriere G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem*. 2003; 278(11): 9850-5.

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008; 3(4): 1886.

Clark RAF, Nielsen LD, Welch MP, McPherson JM. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- β . *J Cell Sci* 1995; 108: 1251-61

Clark RAF, Quinn JH, Winn HJ, Lanigan JM, Dellepelle P, Colvin RB. Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. *J Exp Med*. 1982; 156: 646-51.

Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26(9): 2287-99.

Del Becarro EJ, Robson MC, Hegggers JP, Swaminathan R. The use of specific tromboxane inhibitors to preserve the dermal microcirculation after burning. *Surgery* 1980; 87: 137-41.

Demir A. Yanıklar. *Sabiston Textbook of Surgery Modern Cerrahi Pratiğin Biyolojik Temeli*. (Editör: A. N. Ulusoy), Nobel Matbaacılık, 17.baskı, 2010: 569-595s, İstanbul.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002; 99(10): 3838-43.

Diegelmann RF. Cellular and biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. *J Urol*. 1997; 157(1): 298-302.

Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, Mann MM, Marra KG, Rubin JP, Li X, Funderburgh JL. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro. *Mol Vis*. 2010; 16: 2680-9.

Efron DE, Chandrakanth A, Park JE. Wound healing. (Editörler: Brunicardi C, Andersen DK, Billiar TR). *Schwartz's principles of surgery*, 8. Baskı, McGraw-Hill, 2005, New York.

Elberg JJ, Schrøder HA, Glent-Madsen L, Hall KV. Burns: epidemiology and the effect of a prevention programme. *Burns Incl Therm Inj*. 1987; 13(5): 391-3.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292(5819): 154-6.

Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, Isik F. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells*. 2004; 22(5): 812-22.

Feng J, Mantesso A, Sharpe PT. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2010; 10(10): 1441-51.

Fernyhough ME, Hausman GJ, Guan LL, Okine E, Moore SS, Dodson MV. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 368(3): 455-7.

Ferrari G, CusellaDe Angelis MG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279: 1528–1530

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966; 16(3): 381-90.

Furie B, Furie C. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008; 359: 938–49.

Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971; 27(5): 549-50.

Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F. Recombinant human erythropoietin

stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*. 2004; 53(9): 2509-17.

Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol*. 2001; 69(4): 513-21.

Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007; 100(9): 1249-60.

Gimble JM, Nuttall ME. Adipose-Derived Stromal/Stem Cells (ASC) in Regenerative Medicine: Pharmaceutical Applications. *Curr Pharm Des*. 2011; 17(4): 332-9.

Greco V, Guo S. Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches? *Development*. 2010; 137(10): 1586-94.

Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res*. 2005; 306(2): 330-5.

Griffiths HR, Thornton KL, Clements CM, Burge TS, Kay AR, Young AE. The cost of a hot drink scald. *Burns*. 2006; 32(3): 372-4.

Grunwald TB, Garner WL. Acute burns. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121(5): 311-319.

Gungor A, Poyrazoglu E, Cincik H, Sali M, Candan H, Ay H. The effectiveness of hyperbaric oxygen treatment in tracheal reconstruction with auricular cartilage grafts (experimental study). *Am J Otolaryngol*. 2003; 24(6): 390-4.

Haberal M, Uçar N, Bilgin N. Epidemiological survey of burns treated in Ankara, Turkey and desirable burn prevention strategies. *Burns*. 1995; 21(8): 601-6

Han J, Koh YJ, Moon HR, Ryoo HG, Cho CH, Kim I, Koh GY. Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2010; 115(5): 957-64.

Hanson D, Langemo D, Thompson P, Anderson J, Hunter S. Understanding wound fluid and the phases of healing. *Adv Skin Wound Care*. 2005; 18(7): 360-7

Hashimoto I, Kodama J, Seki N, Hongo A, Miyagi Y, Yoshinouchi M et al. Macrophage infiltration and angiogenesis in endometrial cancer. *Anticancer Res*. 2000; 20: 4853-4856.

Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int.* 2008; 82(3): 238-47.

Herndon DN, Curreri PW, Abston S, Rutan TC, Barrow RE. Treatment of burns. *Curr Probl Surg.* 1987; 24(6): 341-97.

Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ.* 2004; 328(7453): 1427-9.

Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res.* 1996; 32(4): 687-98.

Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res.* 2010; 316(14): 2213-9

Hollenberg CH, Vost A. Regulation of DNA synthesis in fat cells and stromal elements from rat adipose tissue. *J Clin Invest.* 1969; 47(11): 2485-98.

Hunt TK. Wound healing. (Editörler: Doherty GM, Way LW). *Current surgical diagnosis and treatment*, 12th edition: McGraw-Hill, New York: 2006.

Iruela-Arispe ML, Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 672-7.

Jacobi J, Jang JJ, Sundram U, Dayoub H, Fajardo LF, Cooke JP. Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *Am J Pathol.* 2002; 161(1): 97-104.

Jakson DM. The diagnosis of the depth of burning. *Br J Surg.* 1953; 40(164): 588-96.

Kao CC, Garner WL. Acute Burns. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 101(7): 2482-2493.

Katz AJ, Lull R, Hedrick MH, Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg.* 1999; 26(4): 587-603.

Kelley C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D. Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol.* 1987; 104(3): 483-90.

- Khater RH, Simov RI, Shipkov CD, Nikolova DT, Anastassov YK. Our experience in the application of lipofilling. *Folia Med (Plovdiv)*. 2007; 49(3-4): 46-51.
- Khorana AA, Ryan CK, Cox C, Eberly S, Sahasrabudhe DM. Vascular endothelial growth factor, CD68 and epidermal growth factor receptor expression and survival in patients with stage 2 and stage 3 colon carcinoma. *Cancer*. 2003; 97: 960-967.
- Kim Y, Kim H, Cho H, Bae Y, Suh K, Jung J. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem*. 2007; 20(6): 867-76.
- Kirsner RS, Eaglsterin WH. The wound healing process. *Dermatol Clin*. 1993; 11(4): 629-640
- Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, Deans RJ, McIntosh KR. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*. 2005; 12(1): 47-57
- Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2009; 11(4): 377-91.
- Latha B, Babu M. The involvement of free radicals in burn injury: a review. *Burns*. 2001; 27(4): 309-17
- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Haris AL. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. *J Pathol* 2000; 190: 430-436.
- Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. 2010; 25(6): 807-15.
- Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N, Lu W, Geng X, Huang S, Jin Y. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif Organs*. 2008; 32(12): 925-31.
- Luster AD, Rothenberg ME. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol*. 1997; 62(5): 620-33
- Marcus BC. The use of autologous fat for facial rejuvenation. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010; 37(4): 521-31.
- Martin P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276(5309): 75-81

Martin P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; 276(5309): 75-81

Mills SM. Burns down under: lessons lost, lessons learned. *J Burn Care Rehabil*. 2005; 26(1): 42-52.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001; 226(6): 507-20.

Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004; 110(3): 349-55.

Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*. 2003; 70(4): 300-6.

Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*. 2009; 76(2): 56-66.

Montesano R, Orci L. Transforming growth factor- β stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 4894-7.

Moritz AR, Henriquez FC. Studies of thermal injury II. The relative importance of time and surface temperature in the causation of cutaneous burns. *Am J Pathol*. 1947; 23: 695-720.

Murphy KD, Lee JO, Herndon DN. Current pharmacotherapy for the treatment of severe burns. *Expert Opin Pharmacother*. 2003; 4(3): 369-84. Review.

Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*. 1994; 12: 593-633.

Mutsaers SE, Bishop JE, Mcgrouter G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997; 29(1): 5-17.

Noel D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C, Cousin B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res*. 2008; 314(7): 1575-84.

Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev.* 2005; 1(2): 169-78.

Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 1988; 10: 63-76.

Pintucci G, Bikfalvi A, Klein S, Rifkin DB. Angiogenesis and the fibrinolytic system. *Semin Thromb Hemost.* 1996; 22: 517-24

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284(5411): 143-7.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L.

Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004; 109(5): 656-63.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. *Circulation.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. 2004; 109(5): 656-63.

Quesenberry PJ, Colvin GA, Abedi M, Dooner G, Dooner M, Aliotta J, Keaney P, Luo L, Demers D, Peterson A, Foster B, Greer D. The stem cell continuum. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1044: 228-35.

Regan MC, Barbul A. The cellular biology of wound healing. In: *Wound Healing.* (editörler: Schlag G, Redl H). Springer-Verlag, 1994. s: 3-17, Almanya

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004; 109(10): 1292-8.

Riordan NH, Ichim TE, Min WP, Wang H, Solano F, Lara F, Alfaro M, Rodriguez JP, Harman RJ, Patel AN, Murphy MP, Lee RR, Minev B. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med.* 2009; 7: 29.

Robson MC, Del Becarro EJ, Heggers JP, Loy GL. Increasing dermal perfusion after burning by decreasing tromboxane production. *J Trauma* 1980; 20: 722-5.

Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005; 87(1): 125-8.

Ruhnke M, Nussler AK, Ungefroren H, Hengstler JG, Kremer B, Hoeckh W, Gottwald T, Heeckt P, Fandrich F. Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation*. 2005; 79(9): 1097-103.

Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fandrich F. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology*. 2005; 128(7): 1774-86.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4(1-2):7-25.

Shi C, Zhu Y, Su Y, Cheng T. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trends Biotechnol*. 2006; 24(1): 48-52.

Shimura S, Yang G, Ebara S, Wheeler TM, Frolov A, Thompson TC. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res*. 2000; 60: 5857-5861.

Shumakov VI, Onishchenko NA, Rasulov MF, Krasheninnikov ME, Zaidenov VA. Mesenchymal bone marrow stem cells more effectively stimulate regeneration of deep burn wounds than embryonic fibroblasts. *Bull Exp Biol Med*. 2003; 136(2): 192-5.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999; 341(10): 738-46

Smith AN, Willis E, Chan VT, Muffley LA, Isik FF, Gibran NS, Hocking AM. Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp Cell Res*. 2010; 316(1): 48-54.

Spear SL, Wilson HB, Lockwood MD. Fat injection to correct contour deformities in the reconstructed breast. *Plast Reconstr Surg*. 2005; 116(5): 1300-5.

Spitskovsky D, Hescheler J. Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2008; 17: 79-90.

Surgery. 2th Edition. Saunders Elsevier. Philadelphia, 810-833, 2006.

Tae SK, Lee SH, Park JS, Im GI. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater.* 2006; 1(2): 63-71.

Tejerina C, Reig A, Codina J, Safont J, Baena P, Mirabet V. An epidemiological study of burn patients hospitalized in Valencia, Spain during 1989. *Burns.* 1992; 18(1): 15-8.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961; 14: 213-222.

Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(2): 203-24.

Türegün M, Sengezer M, Selmanpakoglu N, Celiköz B, Nişancı M. The last 10 years in a burn centre in Ankara, Turkey: an analysis of 5264 cases. *Burns.* 1997; 23(7-8): 584-90.

Ungefroren H, Fandrich F. The programmable cell of monocytic origin (PCMO): a potential adult stem/progenitor cell source for the generation of islet cells. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 654: 667-82.

Valtieri M, Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *Cell Physiol.* 2008; 217: 296-300.

Vedder NB, Bucky LP, Richey NL, Winn RK, May JW Jr. Improved survival rates of random flaps in rabbits with a monoclonal antibody that blocks leukocyte adherence. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 93(5): 1035-40.

Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo. *Cell Stem Cell.* 2010; 6(2): 103-15.

Welch MP, Odland GF, Clark RAF. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol.* 1990; 110: 133-45

Williams FN, Herndon DN, Jeschke MG. The hypermetabolic response to burn injury and interventions to modify this response. *Clin Plast Surg.* 2009; 36(4): 583-96.

Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med.* 1988; 167(2): 570-81.

Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis..*Stem Cells.* 2007; 25(10): 2648-59.

Xu RX, Sun X. *Burns Regenerative Medicine and Therapy, Brief Introduction to the History of Burns in Medical Sciences*, Karger, ISBN: 978-3-8055-7661-1, e-ISBN: 978-3-318-01037-4, 2004; 152 s. İsviçre

Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Fujimori H, Sakurai S, Tanaka N, Yamamoto H. Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Lab Invest.* 1999; 79(4): 501-9.

Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G, Cortivo R. Neural potential of adipose stem cells. *Discov Med.* 2010; 10(50): 37-43. Review.

Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett.* 2007; 112(2): 61-7.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(12): 4279-95.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. *Tissue Eng.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. 2001; 7(2): 211-28.