

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**ADİPOZ KÖKENLİ ERİŞKİN KÖK HÜCRELERİN
RADYOTERAPİ UYGULANMIŞ DERİDE PRİMER
YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Dr. Koray URGU

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2011

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**ADİPOZ KÖKENLİ ERİŞKİN KÖK HÜCRELERİN
RADYOTERAPİ UYGULANMIŞ DERİDE PRİMER
YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

KORAY URGU

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Can KARACA

Bu araştırma DEÜ Araştırma Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2010661 talep no ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. İNGİLİZCE ÖZET	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	4
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. RADYOTERAPİ	6
4.1.1. <i>Radyoterapi Tarihçesi</i>	6
4.1.2. <i>Radyoterapinin Etki Mekanizması</i>	7
4.1.3. <i>Radyoterapinin Uygulanması</i>	8
4.2. YARA İYİLEŞMESİ	9
4.2.1. <i>Hemostaz</i>	9
4.2.2. <i>İnflamasyon</i>	10
4.2.3. <i>Proliferasyon</i>	12
4.2.4. <i>Matürasyon</i>	15
4.3. RADYOTERAPİ SONRASI YARA İYİLEŞMESİ.....	16
4.4. KÖK HÜCRELER.....	17
4.4.1. <i>Embriyonik Kök Hücreler (EKH)</i>	18
4.4.2. <i>Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)</i>	18
4.4.2.1. <i>Adipoz Kökenli Erişkin Kök Hücreler</i> <i>(Adipose-Derived Adult Stem Cell (ADAS))</i>	21
4.4.2.1.1. <i>ADAS İzolasyonu</i>	24
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
5.1. ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI BÖLÜMLER.....	26
5.2. RADYASYON UYGULAMALARI	27
5.2.1. <i>Radyasyon Verilmesinin Planlaması</i>	27
5.2.1.1. <i>Radyasyon Verilme Düzenineğinin Hazırlanması</i>	27
5.2.1.2. <i>Ratlara Verilecek Radyasyon</i> <i>Dozunun Belirlenmesi</i>	30
5.2.2. <i>Ratlara Radyasyon Verilmesi</i>	31
5.2.2.1. <i>Ratların Işınlanmaya Hazırlanması</i>	31
5.2.2.2. <i>Ratların Işınlanması</i>	33

5.3. CERRAHİ İŞLEMLER	39
5.3.1. Dorsal Cilt İnsizyonunun Yapılması	39
5.3.2. Yağ Greftinin Alınması	42
5.4. GRUPLAR.....	46
5.4.1. Grup 1	46
5.4.2. Grup 2	47
5.4.3. Grup 3	49
5.4.4. Grup 4	52
5.5. YAĞ GREFTİNDEN SVF VE ADAS ELDE EDİLMESİ.....	56
5.5.1. Yağ Greftinden SVF Elde Edilmesi	56
5.5.2. Kök Hücre Kültürü	62
5.5.2.1. Kök Hücrelerin Pasajlanması	64
5.5.3. Kök Hücrelerin In-Vitro Ortamda Gösterilmesi.....	65
5.5.3.1. Hücrelerin Adipojenik Diferansiyasyon Özelliğinin Gösterilmesi.....	65
5.5.3.2. Hücrelerin Osteojenik Diferansiyasyon Özelliğinin Gösterilmesi.....	66
5.5.3.3. Hücrelerin Yüzeysel İşaretleyicilerinin İmmunfloresan Yöntemlerle Gösterilmesi	68
5.6. DEĞERLENDİRME.....	69
5.6.1. Sakrifikasyon Protokolü	69
5.6.2. Doku Kopma Kuvveti (Breaking Strength) Testleri	72
5.6.3. Histomorfolojik Analiz	75
5.6.3.1. Histolojik inceleme için preperatların hazırlanması	75
5.6.3.2. Preperatların Hematoksilen-Eosin ile boyanması.....	75
5.6.3.3. Preperatların Masson Trikrom ile boyanması.....	76
5.6.3.4. Preperatların immunhistokimyasal yöntemler ile boyanması.....	76
5.6.3.5. Histomorfolojik sonuçların değerlendirilmesi	77
5.6.4. İstatiksel Analiz	79
6. BULGULAR	79
6.1. RATLARIN SAĞKALIMI.....	79

6.2. KÖK HÜCRELERİN IN-VİTRO ORTAMDA GÖSTERİLMESİ.....	80
6.2.1. Kök Hücrelerin Işık Mikroskopunda Takibi.....	80
6.2.2. Kök Hücrelerin İmmunfloresan Mikroskopunda Takibi.....	81
6.2.3. Kök Hücrelerin Adipojenik Diferansiyasyonu	83
6.2.4. Kök Hücrelerin Osteojenik Diferansiyasyonu.....	90
6.2.5. Hücrelerin Yüzeyel İşaretleyicileri.....	91
6.3. SAKRİFİKASYON SIRASINDAKİ BULGULAR	94
6.3.1. Ratların Cildindeki Değişiklikler	94
6.3.2. Cilt Altında İzlenen Makroskobik Değişiklikler.....	97
6.4. DOKU KOPMA KUVVETİ TESTİ SONUÇLARI	103
6.5. HİSTOMORFOLOJİK BULGULAR	105
6.5.1. Histolojik Bulgular	105
6.5.1. İmmunhistokimyasal Bulgular	113
7. TARTIŞMA.....	123
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	131
9. KAYNAKLAR.....	133

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Ratların Deney Hayvanları Laboratuvarındaki Ortamı	26
Resim 2: Işınlama Paneli İçin 'Pleksiglas' Plaklar ve Siyanoakrilat.....	28
Resim 3: Işınlama Paneli, Kurşun Plak Ve 'Gel-Bolus' Materyalleri.....	28
Resim 4: Ratların Işınlama Sırasında Nefes Alması İçin Ön Tarafa Açılan Delikler	29
Resim 5: Kuyrukları Dışarıya Yönlendiren Aralıklar	29
Resim 6: Ratların BT Cihazına Işınlama Paneli İçinde 1 cm. Kalınlığında Gel Bolus Kullanılarak Yerleştirilmesi	30
Resim 7: Anestezi Sonrası Ratların Sırt Bölgesinin Tıraşlanması	31
Resim 8: Ratların Işınlama Paneline Yerleştirilmesi	32
Resim 9: Ratların Transport İçin Kutuya Yerleştirilmesi.....	32
Resim 10: Aplikatöre Kurşun Plağın Yerleştirilmesi.....	34
Resim 11: Işık Düşürülmesi Ve Lazer İle Pozisyonun Ayarlanması.....	34
Resim 12: 1 cm. Kalınlığında 2 Adet Gel-Bolus Materyalinin Ratların Üzerine Yerleştirilmesi	35
Resim 13: 1 cm. Kalınlığında 2 Adet Gel-Bolus Materyalinin Ratların Üzerine Yerleştirilmesi	35
Resim 14: Işınlama Öncesi Hazırlıkların Tamamlanması	36
Resim 15: Verilen Işının Monitörden Takibi	37
Resim 16: Işınlama Sırasında Ratların Kameradan Gözlemlenmesi	37
Resim 17: Işınlanan Alanın Cilt Kalemi İle Çizilmesi.....	38
Resim 18: Ratların Anestezi Etkisi Geçene Kadar Elektrikli Isıtıcı Karşısında Takibi.....	38
Resim 19: İnsizyon Yerinin İşaretlenmesi	40
Resim 20: Işınlanan Alanın Disseksiyonu.....	40
Resim 21: Disseke Edilen Alan Ve Branülün Yerleştirilmesi.....	41
Resim 22: Branülün Dorsal Fasya Altından İlerletilmesi	41
Resim 23: Tıraş Sonrası İnsizyon Yerlerinin Belirlenmesi	43
Resim 24: Cilt İnsizyonu Sonrası Ortaya Çıkan Pannikulus Ve Yağ Dokusu	43
Resim 25: Yağ Ve Pannikulus Dokusu İçeren Fleplerin Elevasyonu	44

Resim 26: Yağ Ve Pannikulus Dokusu İçeren Fleplerin Elevasyonu (Yakından Görünüm)	44
Resim 27: SiEA Bağlanması	45
Resim 28: Disseke Edilen Alanın Kontrolü	45
Resim 29: Alınan Greftlerin %0,9 NaCl İçinde Saklanması	46
Resim 30: %0,9 NaCl Verilmesi.....	47
Resim 31: Alınan Greftlerin Küçük Parçalara Ayrılması	48
Resim 32: Yağ Greftlerinin Disseke Edilen Alana Yerleştirilmesi.....	48
Resim 33: İnsizyonun Sütüre Edilmiş Hali	49
Resim 34: Branül Fiksasyonu	50
Resim 35: DMEM+SVF	51
Resim 36: DMEM+SVF'in Rata Enjeksiyonu	51
Resim 37: Enjeksiyon Ardından Branülün Çekilmesi.....	52
Resim 38: Kulakları İşaretlenmiş Ratların Işınlama Panelindeki Konumları	53
Resim 39: Yağ Greftlerinin Petri Kabında Kıyılması	57
Resim 40: Yıkama Sonrası Askıda Kalan Yağ Dokusu	58
Resim 41: Materyale Kollegenaz İlave Edilmesi	58
Resim 42: Sallamalı İnkübatör.....	59
Resim 43: Kollegenaz Eklenmiş Materyalin Sallamalı İnkübatörde 37 ⁰ C'de Çalkalanması.....	59
Resim 44: 2-3 Saat Çalkalama Sonrası Görünüm.....	60
Resim 45: DMEM İle Kollegenaz İnaktive Edilerek Santrifüje Alınması	60
Resim 46: Santrifüj Sonrası Dibe Çöken Hücre Pelleti	61
Resim 47: Hücre Süspansiyonu Önce 40 µM Sonra 100 µM Süzgeçlerden Geçirilmesi.....	61
Resim 48: Santrifüj Sonrası Elde Edilen SVF	62
Resim 49: Santrifüj Sonrası Elde Edilen SVF ve Çökmüş Eritrositler	62
Resim 50: Hücre Kültürünün Yapıldığı İnkübatörün Görünümü.....	63
Resim 51: Hücrelerin Enjeksiyon Öncesinde Sayılması	64
Resim 52: Sakrifikasyon Protokolü	71
Resim 53: Sakrifikasyon Protokolü	71
Resim 54: Shimatzu Ag-10	73

Resim 55: Materyallerin Kurulanması Ardından Zımpara Kağıdı Takılması	74
Resim 56: X2 Parçasına Uygulanan Doku Kopma Kuvveti (Breaking Strength) Testi	74
Resim 57: ADAS'ların Işık Mikroskopunda Görünümleri.....	81
Resim 58: In-Vitro Ortamda Dil İle Boyanan Hücrelerin Görünümleri	82
Resim 59: In-Vitro Ortamda Dil Ve Dapi ile Boyanan Hücrelerin Görünümleri.....	82
Resim 60: Adipojenik Diferansiyasyonunun 10. Gününde Işık Mikroskopunda Vakuollerin Görünümleri	83
Resim 61: Adipojenik Diferansiyasyonunun 21. Gününde Işık Mikroskopunda Vakuollerin Görünümleri	84
Resim 62: Adipojenik Diferansiyasyonunun 21. Gününde Red Oil İle Boyama Ardından Vakuollerin Kırmızı Renkte Görünümleri	85
Resim 63: Adipojenik Diferansiyasyonunun 21. Gününde Red Oil İle Boyama Ardından Her Bir Hücrede Multipl Sayıda Bulunan Yağ Vakuollerin Görünümleri.....	86
Resim 64: Ticari Rat Mezenkim Kök Hücreleriyle Ratlardan Elde Ettiğimiz ADAS'ların Adipogeneze Yönlendirilmesi Ardından 21. Günde Işık Mikroskopunda 10x Ve 40x Büyütmelerde Karşılaştırılması.....	88
Resim 65: Ticari Rat Mezenkim Kök Hücreleriyle Ratlardan Elde Ettiğimiz ADAS'ların Adipogeneze Yönlendirilmesi Ardından 21. Günde Oil Red İle Boyanarak 10x Ve 40x Büyütmelerde Karşılaştırılması	89
Resim 66: Ticari Rat Mezenkim Kök Hücreleriyle Ratlardan Elde Ettiğimiz ADAS'ların Osteogeneze Yönlendirilmesi Ardından 21. Günde Alizarin Red İle Boyanarak 10x Ve 40x Büyütmelerde Karşılaştırılması.....	91
Resim 67: Örneklerin CD Boyamalarının İmmunfloresan Mikroskopta Karşılaştırılması.....	92
Resim 68: Örneklerin CD Boyamalarının Ticari Rat Mezenkim Kök Hücre İle İmmunfloresan Mikroskopta Karşılaştırılması	93
Resim 69: CD14 Boyaması Dapi İle Çekirdeklerin Görünümü.....	94
Resim 70: CD45 Boyaması Dapi İle Çekirdeklerin Görünümü.....	94
Resim 71: Grup 1b'de İnsizyon Hattında Seperasyon	95

Resim 72: Grup 2a'da Yağ Greftinin Görünümü	95
Resim 73: 28.Günde Tüyenmede Artışının Karşılaştırılması	96
Resim 74: Grup 1a'da Skar Etrafında Damarlanmanın Az Oluşunun Görünümü ..	97
Resim 75: Grup 1b'de Skarın Görünümü.....	98
Resim 76: Grup 2a'da Yağ Grefti Etrafında Damarlanma Artışı	98
Resim 77: Grup 2b'de Yağ Greftlerinin Görünümü	99
Resim 78: Grup 3a'da SVF Uygulanan Alanda Kapiller Artışı	99
Resim 79: Grup 3b'de Skarın Görünümü.....	100
Resim 80: Grup 4b'de Skar Etrafında Yoğun Kapiller Oluşumu	100
Resim 81: Transillüminasyonda Grup 3b'de Skar Etrafında Damarlanmada Minimal Artış.....	101
Resim 82: Transillüminasyonda Grup 4b'de Skar Etrafında Damarlanmada Belirgin Artış	102
Resim 83: Doku Kopma Değerlerinin Kuvvet/Zaman Eğrileri	103
Resim 84: Gruplara Ait Radyasyona Maruz Kalan Epidermis ve Dermise Ait Kesitler (HE)	109
Resim 85: Grup 1b ve 4b'ye Ait Radyasyona Maruz Kalan Epidermis ve Dermise Ait Kesitler (HE)	110
Resim 86: Gruplara Ait Radyasyona Maruz Kalan Epidermis ve Dermise Ait Kesitler (Masson Trikrom)	111
Resim 87: Grup 1b ve 4b'ye Ait Radyasyona Maruz Kalan Epidermis ve Dermise Ait Kesitler (Masson Trikrom)	112
Resim 88: Radyasyona Maruz Kalan Epidermis Ve Dermise Ait Kesitler (VEGF İmmunohistokimyası).....	117
Resim 89: Grup 1b İle 4b'nin VEGF İmmunohistokimyası	118
Resim 90: Radyasyona Maruz Kalan Epidermis Ve Dermise Ait Kesitler (TGF-β İmmunohistokimyası)	119
Resim 91: Grup 1b İle 4b TGF- β İmmunhistokimyası	120
Resim 92: Radyasyona Maruz Kalan Epidermis Ve Dermise Ait Kesitler Tip 1 Prokollajen İmmunohistokimyası	121
Resim 93: Grup 1b İle 4b'nin Karşılaştırılması Tip 1 Prokollajen İmmunhistokimyası	122

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Trombositlerin Degranülasyonu ve Tromboplastik Doku Elemanlarının Ortaya Çıkışı İle Hemostazın Oluşumu	10
Şekil 2: İlk 24 Saat İçinde Nötrofillerin Yoğunlaşması.....	11
Şekil 3: 2-3. Günde Makrofajların Yoğunluğu	12
Şekil 4: Fibroblastların Protein Ve Büyüme Faktörü Sentezi ve Keratinositlerin Yara Komşuluğundan Migrasyonu	14
Şekil 5: Skar Maturasyonu.....	15
Şekil 6: MKH'lerin Biyolojik Özellikleri.....	21
Şekil 7: ADAS'ın Yara İyileşmesindeki Rolü	23
Şekil 8: ADAS'ın Mezenkimal Diferansiyasyonları.....	24
Şekil 9: Grup 1 Ve 2'nin Şematik Görünümü	54
Şekil 10: Grup 3 Ve 4'ün Şematik Görünümü	55
Şekil 11: Grupların Kopma Kuvvetlerinin Grafik Üzerinde Karşılaştırılması.....	104
Şekil 12: 28. Gündeki Kopma Kuvveti Değerlerinin Grafik Üzerinde Karşılaştırılması	105
Şekil 13: 'A' Gruplarının Histolojik Skorlarının Grafik Üzerinde Karşılaştırılması	108
Şekil 14: 'B' Gruplarının Histolojik Skorlarının Grafik Üzerinde Karşılaştırılması	108
Şekil 15: 'A' Gruplarının VEGF Skorlarının Grafik Üzerinde Karşılaştırılması	114
Şekil 16: 'B' Gruplarının VEGF Skorlarının Grafik Üzerinde Karşılaştırılması	114
Şekil 17: 'A' Gruplarının TGF- β Skorlarının Grafik Üzerinde Karşılaştırılması	115
Şekil 18: 'B' Gruplarının TGF- β Skorlarının Grafik Üzerinde Karşılaştırılması	115
Şekil 19: 'A' Gruplarının Tip 1 Prokollajen Skorlarının Grafik Üzerinde Karşılaştırılması.....	116
Şekil 20: 'B' Gruplarının Tip 1 Prokollajen Skorlarının Grafik Üzerinde Karşılaştırılması.....	116

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: ADAS'ın İmmunfenotip İşaretleyicileri.....	25
Tablo 2: Adipojenik Diferansiyasyon İçin Kullanılan Kültür Ortamı İçeriği.....	66
Tablo 3: Osteojenik Diferansiyasyon İçin Kullanılan Kültür Ortamının İçeriği	67
Tablo 4: Histolojik Skorlama	78
Tablo 5: İmmunhistokimyasal Skorlama	78
Tablo 6: Grupların Kopma Kuvveti Sonuçlarının Ortalamaları ve Standart Sapma Değerleri.....	104
Tablo 7: Grupların Histolojik Skorlama Sonuçları	107
Tablo 8: Grupların İmmunhistokimyasal Skorlama Sonuçları	113

KISALTMALAR

- ADAS:** Adipose Derived Adult Stem Cell (Adipoz Kaynaklı Erişkin Kök Hücre)
- RT:** Radyoterapi
- DNA:** Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
- GRAY:** Gray
- cGy:** centi-Gray (Santigray)
- cGRAY:** centi-Gray (Santigray)
- Co:** Cobalt (Kobalt)
- PDGF:** Plattelet Derived Growth Factor (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)
- TGF- β :** Transforming Growth Factor- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü)
- IGF:** Insuline-like Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü)
- EGF:** Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
- C3a:** Complement 5a (Kompleman 3a)
- C5a:** Complement 5a (Kompleman 5a)
- TNF:** Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
- FGF:** Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
- IL:** Interleukin (İnterlökin)
- CTFG:** Connective Tissue Growth Factor (Bağ Dokusu Büyüme Faktörü)
- VEGF:** Vasculer Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
- m-RNA:** Messenger Ribonucleic Acid (Mesajcı Ribonükleik Asit)
- bFGF:** Basic Fibroblast Growth Factor (Temel Fibroblast Büyüme Faktörü)
- HIF:** Hypoxia Induced Factor (Hipoksi Tetikleyici Faktör)
- MMP:** Matrix metalloproteinase (Matriksmetalloproteinaz)
- NO:** Nitric Oxide (Nitrik Oksit)
- IFN:** Interferon (İnterferon)
- ICAM:** Inter-Cellular Adhesion Molecule (Hücreler Arası Yapışma Molekülü)
- EKH:** Embryonik Kök Hücre
- YKH:** Yetişkin Kök Hücre
- MKH:** Mezenkimal Kök Hücre
- HKH:** Hematopoetik Kök Hücre
- CFU-F:** Colony Forming Unit Fibroblast (Fibroblast Koloni Şekillendirici Ünitesi)

Kİ: Kemik İliği
CD: Clusters of Differentiation (Farklanma Kümeleri)
GVHH: Greft Versus Host Hastalığı
SVF: Stromal Vascular Fraction (Stromal Vasküler Fraksiyon)
HGF: Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
SOD: Superoxide Dismutase (Süperoksit dismutaz)
D.E.Ü.T.F: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
SSD: Source –Skin Distance (Kaynak-Cilt Mesafesi)
BT: Bilgisayarlı tomografi
MU: Monitor Unit (Monitör Ünitesi)
G: Gauge
SİEA: Superficial Inferior Epigastric Artery (Süperfisiyel İnferior Epigastrik Arter)
NaCl: Sodyum klorür
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
PBS: Phosphate Buffer Saline (Fosfat İle Tamponlu Salin)
FBS: Fetal Bovine Serum (Fetal İnek Serumu)
PFA: Paraformaldehit
mN: Millinewton
SD: Standart Deviation (Standart Sapma)
HE: Hematoksilen-eosin
ePTFE: Ekspanse Politetrafluroetilen
KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü
BHK: Bazal Hücreli Karsinom
SHK: Skuamöz Hücreli Karsinom

TEŞEKKÜR

Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi uzmanı olmak için ilkokuldan itibaren uzun ve yorucu olduğu kadar eğlenceli bir eğitim sürecini geride bırakmak gerekmektedir. Eğitim sürecim boyunca desteklerini esirgemeyen, stresli ve sevinçli anlarımı benimle paylaşan ve yaşayan annem, babam ve ağabeyime sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son 6,5 yılımı yanlarında geçirdiğim, deneyim ve bilgilerinden yaralandığım ve de mesleki hayatım boyunca yararlanacağım hocalarım Prof.Dr. Ali Barutçu'ya, Prof.Dr. Can Karaca'ya, Prof.Dr. Mustafa Yılmaz'a, Prof.Dr. Atay Atabey'e, Prof.Dr. Adnan Menderes'e, Doç.Dr. Haluk Vayvada'ya ve Yard. Doç.Dr. Cenk Demirdöver'e, asistan arkadaşlarıma, anabilim dalı sekreterimiz Tülay Güler ve servis sekreterimiz Gülay Elölen başta olmak üzere tüm plastik cerrahi personeline ve ameliyathane hemşire ve personel ekibine teşekkür ederim.

Değerli hocalarımla bilgi alışverişi şeklinde kıvılcımlanan bu çalışma, birçok kişinin bilgisi ve emeği eklenerek şekillenmiş ve bitirilmiştir. Başta tez danışmanım Prof.Dr. Can Karaca olmak üzere bu çalışmaya verdikleri destek nedeni ile tüm hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Ratlara verilecek radyasyonu planlayan ve uygulayan Uzm.Dr. Zümre Arıcan ve Öğr.Gör. Zafer Karagüler'e, radyasyon onkolojisi bölümü imkanlarını sunan Prof.Dr. Rıza Çetingöz'e, Moleküler Biyoloji labrotuvarlarını kullanma imkanı sağlayan ve deneyin hücresel aşamasını planlayan Prof.Dr. Neşe Atabey'e, mesai saatleri haricinde olsa dahi üstün emek harcayarak titizlikle çalışan Araş.Gör. İmge Kunter'e, histolojik incelemelerin planlaması ve görüntülenmesini titizlikle yerine getiren Doç.Dr. Bekir Uğur Ergür ve Uzm.Dr. Serap Mıcılı'ya, biyomekanik testleri uygulayan Araş.Gör. Bora Uzun'a ve de cerrahi ve sakrifikasyon işlemleri sırasında yardımını esirgemeyen asistan arkadaşım Dr. Bilgehan İlker'e bu çalışmaya verdikleri bilgi ve emek gücü nedeniyle teşekkür ederim.

1.ÖZET

Başlık: Adipoz Kökenli Erişkin Kök Hücrelerin Radyoterapi Uygulanmış Deride Primer Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisi

Araştırmacının Adı, Fakültesi ve Yazışma adresi:

Koray URGU

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı İnciraltı-İzmir

Amaç ve Hipotez:

Bu çalışmada ratların inguinal bölgesinden elde edilen yağ grefti, stromal vasküler fraksiyon ve kültüre edilmiş adipoz kökenli erişkin kök hücrelerin (ADAS), radyoterapi uygulanmış deride primer yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Radyoterapi sonrasında yetersiz kollajen üretimi ve hipovaskülarizasyon, yara iyileşmesini geciktirerek komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu çalışma, ADAS'ların diferansiyasyon, parakrin olarak diğer hücreleri uyarma ve büyüme faktörleri salgılama özellikleri sayesinde neovaskülarizasyonu ve kollajen üretimini artırarak radyoterapi verilmiş alandaki insizyon skarının kalitesini arttıracığı hipotezi üzerine kurulmuştur.

Gereç ve Yöntem:

Çalışmada 48 adet 250-280 gr. ağırlığında Wistar suşu ratlar kullanıldı. Ratların 8 tanesi çeşitli nedenlerle kaybedilerek çalışma 40 rat ile tamamlandı. Ratların dorsal cildinde 8x3 cm.lik alana 2500 cGy radyasyon uygulanması ardından tam kat cilt insizyonu ve cilt altı diseksiyonu uygulandı. Diseke edilen alana Grup 1 (n=10)'de %0,9 NaCl, Grup 2 (n=10)'de yağ grefti, Grup 3'te (n=10) stromal vasküler fraksiyon ve Grup 4'te (n=10) kültüre ADAS'lar verilerek insizyon suture edildi. Gruplar kendi

içerisinde 14. günde sakrifiye edilenler 'a' ve 28. günde kiler 'b' olarak ayrıldı. İnsizyon skarının biyomekanik, histomorfolojik ve immunhistokimyasal özellikleri değerlendirildi. In vitro ortamda ADAS'ların yüzeyel işaretleyicileri ve diferansiyasyon özellikleri gösterildi.

Bulgular:

Sakrifikasyonda makroskobik olarak grup 4b'de tüylenmede artış ve skar etrafında kapiller yoğunlaşma gözlemlendi. ADAS'ların in-vitro ortamda adipojenik ve osteojenik diferansiyasyon özellikleri gösterildi. Yüzey adezyon molekülleri olan CD29 ve CD54 ile pozitif boyanma, CD14 ve CD45 ile negatif boyanma izlendi. Doku kopma kuvveti en yüksek grup 4b'de saptandı. Histolojik olarak, epidermal rejenerasyon ve anjiogenez en fazla Grup 4'te gözlemlendi. VEGF, TGF- β ve Tip-1 prokollajen immunhistokimyasal boyanmaları Grup 4'te daha yoğun izlendi.

Sonuç:

Radyasyon uygulanan alanda ADAS'ların vaskülarizasyonu ve kollajen üretimini arttırması sayesinde insizyonel skarın kalitesini ve kuvvetini arttırdığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Adipoz kökenli erişkin kök hücre (ADAS), radyasyon hasarı, yara iyileşmesi

2. ABSTRACT

Title: The Effect of Adipose Derived Adult Stem Cells in Primary Wound Healing on Irradiated Skin

Name, School and Address:

Koray URGU
Dokuz Eylül University School of Medicine
Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Inciralti-Izmir

Aim and hypothesis:

The aim of this study is to investigate primary wound healing effect of fat graft, stromal vascular fraction (SVF), and cultured adipose derived adult stem cells on irradiated rat skin.

Materials and Method:

Forty-eight Wistar rats were underwent dorsal skin surface irradiation of 2500 cGy using a medical linear accelerator producing energy of 6 MeV followed by creation of a full-thickness skin incision and subcutaneous dissection. Four groups with 10 rats in each were divided according to application of saline (control group); fat graft; SVF; and cultured ADAS. Five animals from each group were euthanized at 14th and 28th day and the harvested specimens underwent biomechanical and histological evaluation. Differentiation and surface marker expression properties of ADAS were approved.

Findings:

According to biomechanical tests, the highest rate of breaking strength was determined in Group 4. However, the rate for all three groups was significantly higher than the control group. In histopathological assesment, angiogenesis, epidermal regeneration, and better organized collagen architecture were observed in Group 4. Immunohistochemical analyses with TGF- β , Procollagen Type-1, and VEGF revealed with denser findings in Group 4.

Results:

Depending on these results, it can be concluded that ADAS may improve primary wound healing on irradiated skin by increasing neovascularization and collagen production.

Keywords: Adipose derived adult stem cell (ADAS), radiation injury, wound healing

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Radyoterapi, sıklıkla malign tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Yüksek enerjili parçacıklar veya elektromanyetik dalgalar sayesinde tümör hücreleri üzerinde DNA hasarı yaratmak amaçlanmaktadır. Ancak beraberinde tümör olmayan dokuların etkilenmesi sonucunda radyasyonun olumsuz etkileri sıklıkla deride görülmektedir. Radyasyonun yara iyileşmesini geciktirmesi nedeni ile birçok malignitenin tedavisinde cerrahi girişim öncesi radyoterapi tercih edilmemektedir.

Radyasyon yara iyileşmesinde temel olarak fibroblastların yapısını bozarak kollajen sentezini azaltmaktadır. Damarlar üzerindeki etkisi sonucu hipovasküler ve hiposellüler bir ortam oluşturmaktadır. Literatürde mezenkimal kök hücrelerin (MKH) yara iyileşmesinde ve epitelizasyonda görev alan hücrelere diferansiye olabilme özellikleri, büyüme hormonları ve sitokin salgılayarak yara yerine migrasyonu ve vaskülarizasyonu artırıcı etkileri ve parakrin olarak mikroçevredeki diğer hücreleri uyarma özellikleri gösterilmiştir. MKH'lerin bu özellikleri göz önüne alındığında

radasyonun yara iyileşmesini etkilediği birden çok evresinde faydalı olabileceği düşünölmektedir.

Adipoz kökenli erişkin kök hücreler (ADAS) 2001 yılında Zuk ve ark. tarafından tanımlandıktan sonra elde edilşinin kolay olması ve diğör MKH'lerin özelliklerini taşıması rejeneratif tıpta birçok çalışmada kullanılmıştır. ADAS'lar fibroblast görünümünde plastik yüzeye yapışma özelliğı olan, uygun koşullarda osteojenik, adipojenik ve kondrojenik diferansiyasyon gösteren ve çeşitli yüzeyel antijenlere sahip erişkin kök hücrelerdir. Literatüre bakıldığında ADAS'ları içeren yağ greftleri ve stromal vasköler fraksiyon radasyonun geç dönem yan etkileri olan fibrozis, kronik yara ve implant uygulamaları öncesi ve sonrasında kliniklerde kullanılmaktadır. Ancak radasyon uygulaması ardından yapılacak insizyonun iyileşmesi üzerindeki etkileri daha önce incelenmemiştir. Radasyonun yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılması veya önlenmesi sayesinde özellikle radyosensitif olan cilt tümörlerinde operasyon öncesinde radyoterapi uygulanması, tümör kitlesini ve eksizyon miktarını azaltarak rekonstrüksiyon seçeneklerini daha basite indirgeyebilecektir. ADAS'ların yara iyileşmesindeki olumlu etkileri göz önüne alarak, neovaskölarizasyon ve kollajen üretiminde artış sonucunda radyoterapi verilmiş alandaki insizyon skarının kalitesinde ve dayanıklılığında artış olacaktır. Bu artışın, radasyonun yara iyileşmesi üzerindeki negatif etkilere karşı koruyucu olacağı hipoteziyle bu çalışma planlanmıştır. Bu çalışmadaki amaçlar:

- 1- Ratlarda tek doz ışınlama ile ciltte radasyon hasarı modeli oluşturulması
- 2- Kültüre ADAS'ların radasyon uygulanmış ciltte yapılan insizyon skarı üzerindeki etkilerin incelenmesi
- 3- Bu etkilerin ADAS'ların elde edildiğı yağ greftinin ve SVF'nin etkileri ile karşılaştırılması
- 4- Elde edilen ve kültüre edilen ADAS'ların MKH olduklarının in vitro ortamda gösterilmesi

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Radyoterapi

4.1.1. Radyoterapi Tarihçesi

İlk kez 1895 yılında Wilhelm Konrad Röntgen X-ışınlarını Crookes tüpünden geçirerek arkadaşı Rudolph Albert von Kolliker'in el kemik yapısını fotoğraf plağına düşürmüş ve radyasyonu tetkik amaçlı tıp dünyasına sunmuştur.^{1,2} X-ışınları, 1897 yılında Freud tarafından mol tedavisinde tedavi amaçlı kullanılmıştır. Sonrasında 1898'de Curie, ilk radyoaktif madde olan radyumu tanımlamış ve aynı yılda Bequerel radyoaktivite kavramını geliştirmiştir. Bequerel, sol cebinde unuttuğu 200 mg.lık radyum paketinin, iki hafta içinde cildinde önce eritem sonra ülserasyon oluşturması, radyobiyojik etkinin ilk kez gözlenmesine neden olmuştur.² Bu olaydan kısa bir süre sonra Daniel radyasyon dermatitli bir olgu yayınlamıştır.¹

Bergonie ve Tribeondeu, 1900'lü yılların başında yüksek mitotik aktivite gösteren kötü diferansiye dokuların radyasyona duyarlı olduğunu gözlemlemişlerdir.² Butlin, 1909 yılında oral kanserde radyum kullanarak radyasyonun tümör hücrelerini azalttığını göstermiştir.¹ Mucizevi bir tedavi yöntemi olarak görülen radyasyonun yan etkileri hızlı biçimde görülmeye başlanmıştır. Yüksek doz uygulamalarda cerrahi tedaviye benzer sonuçlar alınmasına rağmen, hastalar kısa dönemde akut reaksiyonlarla kaybedilmiştir.

Regaund, 1919 yılında koçların testislerine fraksiyonel olarak radyasyon verilmesinin tek doz verildiğindeki gibi steriliteye neden olduğunu ancak deri reaksiyonlarının daha az olduğunu gözlemlemiştir. Cauntard, 1934 yılında radyasyon tedavisinde fraksiyon şemaları geliştirmiştir.²

II. Dünya savaşında atom bombası kullanımından sonra radyobiyojik alanda araştırmalar hız kazanmıştır. Parker, 1952 yılında, 5 hafta süren günlük bölünmüş dozlarda tedavi şeması oluşturmuştur. Sonrasında 1970'li yıllarda yüksek dozda radyasyonun tümör dokusuna penetre olmasını sağlarken ciltteki yan etkilerin daha az gözlemlendiği süpervoltaj makineleri geliştirilmiştir.¹ Günümüzde meme, kolorektal, baş-boyun ve jinekolojik kanserler olmak üzere birçok malignitenin tedavisinde,

ekstremitelerde koruyucu cerrahilerde ve palyatif tedavide radyoterapi multidisipliner prensipler doğrultusunda uygulanmaktadır.

4.1.2. Radyoterapinin Etki Mekanizması

Radyoterapi (RT), genelde malignitelerin tedavisi amacıyla yüksek enerjili parçacıklar veya elektromanyetik dalgalar kullanılmasıdır. Elektromanyetik iyonize radyasyon X-ışınları ve γ -ışınlarını kapsar. Yüksek enerjili parçacıklar ise pozitif yüklü helyum çekirdeği olan α -parçacıkları, negatif yüklü elektronlar, β -parçacıkları ve nötronlardır.^{3,4}

Radyasyonun doku üzerindeki etkisi doğrudan veya dolaylı yoldan olabilir. Işınım enerjisi yeterince yüksek olduğunda atom veya molekülden bir veya daha fazla elektronu kopartabilir. Radyasyonun hücre içindeki oksijen ve su molekülleri ile etkileşimi sonucu oluşan ve hızlı hareket eden elektrik yüklü serbest radikaller, çevresindeki organik maddelerin kimyasal, yapısal ve fonksiyonel özelliklerini değiştirerek, hücreyi dolaylı olarak iyonize etmektedirler. İyonizasyon sırasında açığa çıkan enerji hücreye zarar verir. Hücre içinde oluşan hasarda hedef yapı Deoksiribonükleik asit (DNA)'tir.³ Buradaki DNA hasarının %60-70'inden sorumlu olan serbest radikal hidroksil (-OH) radikalleridir.⁵

Morfolojik olarak bakıldığında düşük doz radyasyon apoptozis mekanizmalarını devreye sokarken yüksek doz radyasyon nükleus membran hasarı, sitoplazma ödemlenmesi ve hücre nekrozuna neden olmaktadır.⁵

Radyasyon miktarı, uygulandığı dokunun ağırlık başına absorbe ettiği enerjiye göre belirlenir. Buna göre 1 kg dokuya 1 jul enerji veren radyasyon miktarı 1 Gray (Gy)'dir.

- 1 Gy (Gray) = 100 cGy (cGray)
- 1 Gy (Gray) = 100 rad

4.1.3. Radyoterapinin Uygulanması

Radyoterapi eksternal, internal ve brakiterapi olmak üzere üç yoldan uygulanabilir. Eksternal tedavide kaynak ile hasta cildi arasındaki uzaklık 5-350 cm.dir. X-ışınları, Co-60 (Kobalt-60), γ ışınları ve parçacık şeklindeki (genellikle elektronlar) radyasyonlar kullanılır. Radyoaktif maddelerin, cilt üzerine, doku arasına veya doku boşluklarına yerleştirilerek uygulanmasına brakiterapi adı verilir. İnternal tedavi ise β parçacıkları ve γ ışınları veren açık kaynakların sıvı ve koloidal radyoizotoplar vücuda uygulanmasıdır.⁶

Günümüzde en yaygın kullanılan eksternal tedavi cihazları lineer hızlandırıcılardır.^{3,4,6} Elektronlar elektromagnetik dalganın elektrik alanı etkisiyle hızlandırılır. Hızlandırma esnasında elektronları ince bir demet halinde toplamak ve hedef üzerine göndermek için tüp boyunca manyetik odaklayıcı alanlar uygulanır. Hızlandırıcı tüpün sonunda elektronlar maksimum enerjilerini kazanmış olurlar. Yeterli enerjiye ulaşan elektronlar ya uygun aplikatörlerle hastaya gönderilir ya da yoğun bir hedefe çarptırılarak yüksek enerjili X ışınları elde edilir ve üretilen bu ışınlar hastaya gönderilir. Hangi enerjinin kullanılacağına tümörün büyüklüğüne ve yerine göre karar verilir. Genellikle derin yerleşimli tümörlerde X veya γ ışınları kullanılırken yüzeysel tümörlerde elektronlar kullanılmaktadır. Tek bir lineer hızlandırıcı ile farklı enerjilerde X ışını ve elektron üretilmesi tedavide geniş hareket alanı sağlamaktadır.⁶

Radyoterapinin temel hedefi, tümörde yüksek doz normal dokularda mümkün olduğu kadar düşük doz oluşturarak etki göstermektir. Özellikle ciltte oluşturduğu akut ve kronik etkiler, yara iyileşmesini olumsuz olarak etkilemesi kullanımını kısıtlayıcı faktörler olabilmektedir.

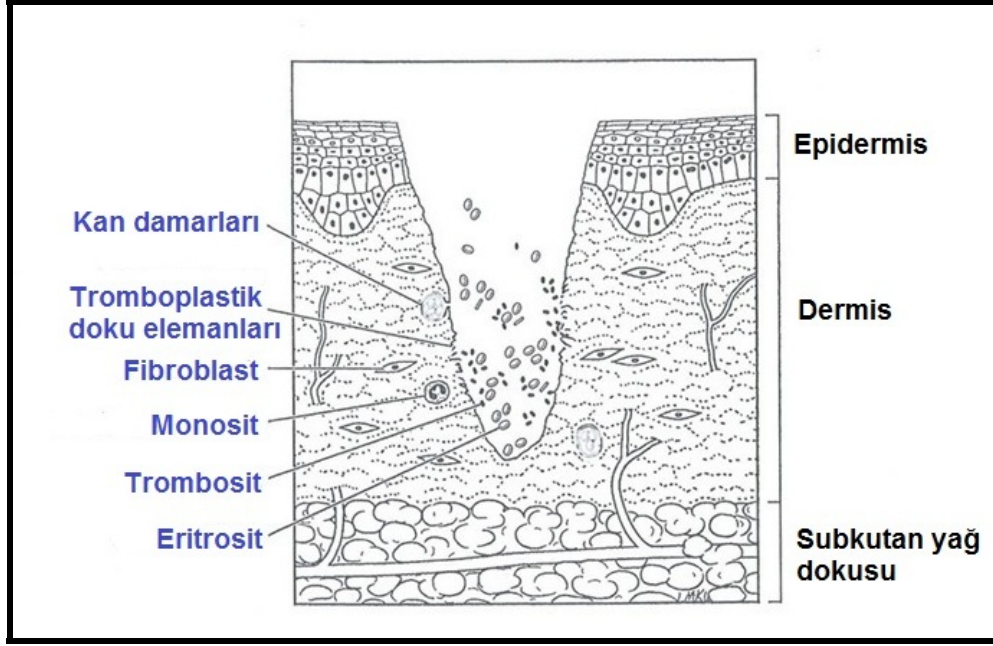
4.2. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, birçok özelleşmiş hücrenin görev aldığı, birbiri içine geçen ama biyolojik olarak ayrı 4 evreden oluşur.

- 1- Hemostaz
- 2- İnflamasyon
- 3- Proliferasyon
- 4- Matürasyon

4.2.1. Hemostaz

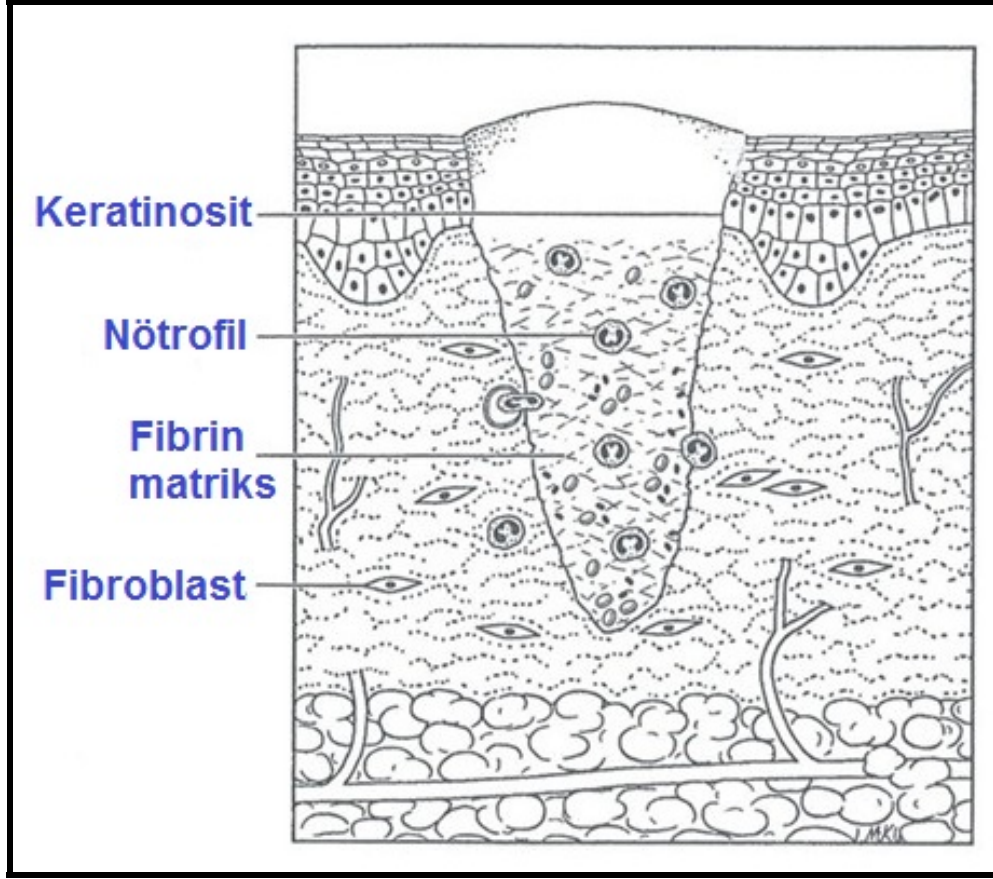
Kanamayı kontrol altına almak için yaralanmadan sonra hemostaz mekanizmaları devreye girer. Yaklaşık 5-10 dakika sonra vazokonstriksiyon ile kan akımı yavaşlar. Açığa çıkan tromboplastik doku ürünleri trombositleri aktive eder. Trombositlerin agregasyonu sonucu hemostatik plak oluşur. İntrensek ve ekstrensek koagülasyon yollarının aktivasyonu ile protrombinden trombin oluşur. Trombin ise fibrinojeni fibrine dönüştürerek stabil plak oluşturur ve yara yerinde hemostaz sağlanmış olur.⁷ Trombositlerin alfa granülleri içinde yer alan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörü çevre dokulara salınır (Şekil-1).⁸ TGF- β ve PDGF nötrofil ve makrofajlar için kemotaktiktir. PDGF aynı zamanda fibroblastların yara yerine gelmesini sağlar ve fibroblastlardan sentezlenen ve ekstrasellüler matriks onarımı için önemli olan glikozaminoglikan ve kollajen sentezinde rol oynar. Büyüme faktörlerinin fazla salgılanması anormal yara iyileşmesi ile sonuçlanır.⁷



Şekil 1: Trombositlerin degranülasyonu ve tromboplastik doku elemanlarının ortaya çıkışı ile hemostazın oluşumu⁹

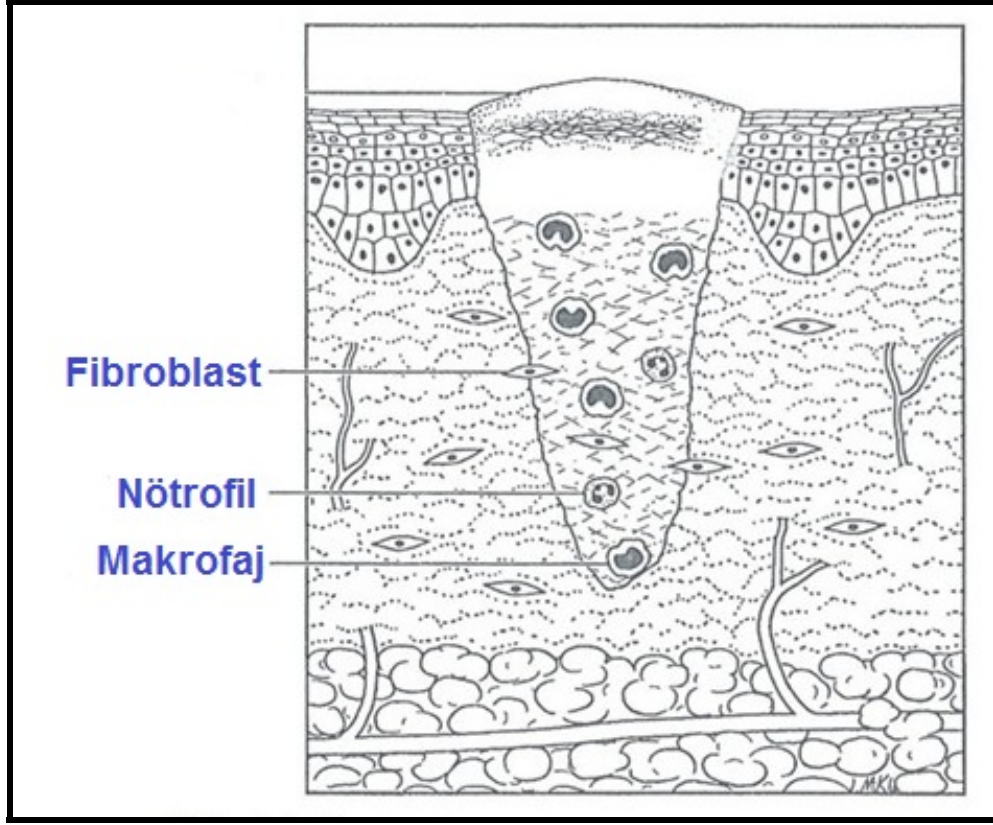
4.2.2. İnflamasyon

Yara iyileşmesinin 2. evresi olan inflamasyon yaralanmadan sonra 24 saat içinde başlar. Hemostaz sonrası koagülasyon ve kompleman zincirinden ortaya çıkan bradikinin, kompleman 3a ve 5a (C3a ve C5a) vazodilatasyon ve damar duvar permeabilitesinde artışa neden olarak nötrofil ve monositlerin yara yerine ulaşmasını sağlar. Kompleman elemanları aynı zamanda mast hücrelerinden histamin, lökotrien C₄ ve D₄ salınımını stimüle eder.⁹ Vazoaktif aminlerin ve histaminin artması klinikte kızarıklık (rubor) ve sıcaklık artışı (color) olarak kendini gösterir. Damar permeabilitesinde artış sonucu damar içerisinden intersitisyel alana geçen sıvı ise kliniğe şişlik (tumor) olarak yansır ve oluşturduğu basınç ağrıya (dolor) neden olur.⁷



Şekil 2: İlk 24 saat içinde nötrofillerin yoğunlaşması⁹

İlk olarak yara yerinde görülen hücreler nötrofillerdir (Şekil 2). Nötrofiller ortamdan yabancı maddeleri ve hücreleri temizlediği gibi kompleman aktivasyonu ile bakterileri opsonizasyon yoluyla ortadan kaldırır. Monosit hücreleri 2-3 gün içinde yara yerinde baskın hale geçer. Monositler makrofajlara diferansiye olurlar (Şekil-3). Makrofajlar fagositoz yolu ile bakterileri ve doku artıklarını ortadan kaldırır ve aynı zamanda endotel hücreleri, keratinositler ve fibroblastlara etki edecek 20'den fazla sitokin ve büyüme hormonu salgırlar. Bunlardan başlıcaları PDGF, TGF- β , IGF-1, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), fibroblast büyüme faktörü (FGF), interlökin-6 (IL-6), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür.⁹



Şekil 3: 2-3. günde makrofajların yoğunluğu⁹

4.2.3. Proliferasyon

Yaralanmanın 3-4. gününde başlayan proliferasyon fazı fibroplazi, granülasyon, kontraksiyon ve epitelizasyon ile karakterizedir ve yaranın durumuna göre 2-4. haftada sona erer.⁸⁻¹⁰ Proliferasyon döneminde stabil ekstrasellüler matriks oluşturmak amacıyla fibroblastların proliferasyonu ve kollajen üretimi izlenir (Şekil-4). Yeni matriks kollajen, proteoglikan ve fibronektinden oluşur. Bu dönemde ayrıca anjiogenezis gözlenmektedir.

Trombosit ve makrofajlardan salınan mediatörler sonucu fibroblastların yara yerine migrasyonu olur. Fibroblastların aktivitesi genel olarak PDGF ve TGF- β sayesinde izlenir. PDGF, trombosit ve makrofajlar tarafından salınır ve fibroblastların proliferasyonu, kemotaksisi ve kollajen ekspresyonunda önemli rol oynar.

TGF- β 'nın 3 izoformu bulunmaktadır. TGF- β 1 fibrozisi artırdığı halde diğer izoformları TGF- β 2 ve TGF- β 3 ters etki göstererek fibrozis ve skarı azaltıcı etkisi vardır.⁷

Fibronektin ve hyaluronik asit yara matriksinin ilk komponentleridir. Fibroblast hücre yüzeyindeki integrinler, matriks yapısındaki glikozaminoglikan ve glikoproteinlere tutunurlar. Fibronektin ve glikozaminoglikanlar ayrıca sentezlenen kollajen için zemin oluştururlar.⁹

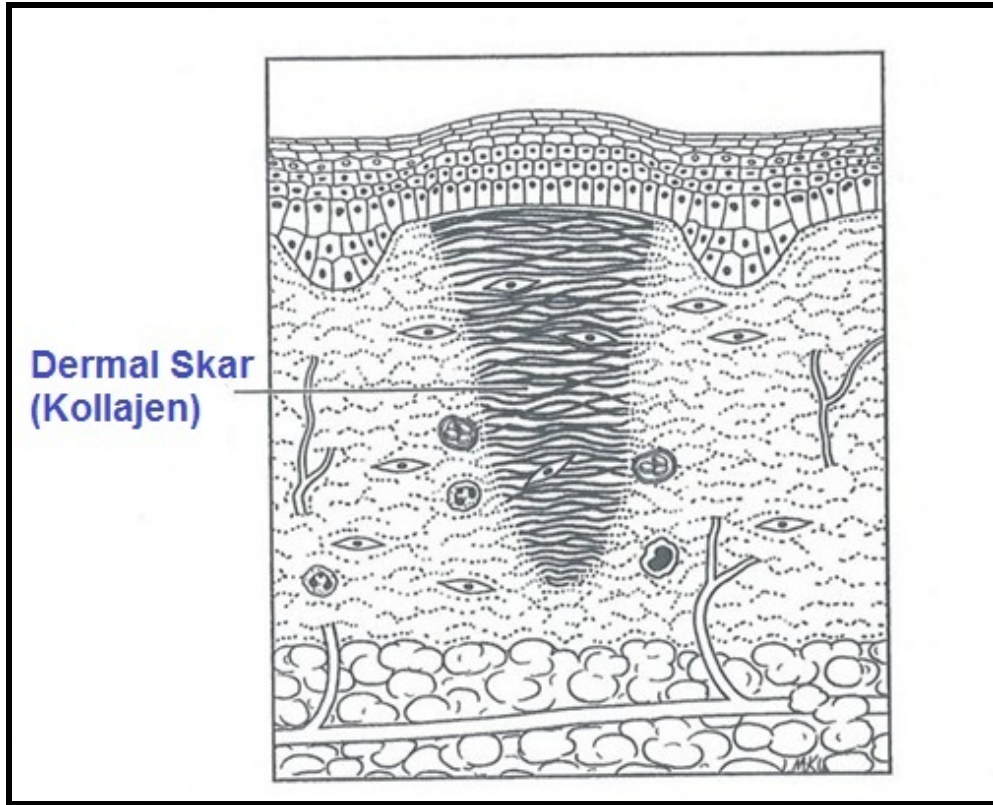
Kollajen üç adet polipeptid zincirin oluşturduğu heliks yapısındadır. Çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler kollajen sentezi için gen transkripsiyonunu tetikler. Gen transkripsiyonu sonucu oluşan pre-prokollajen hücre içinde mesajcı ribonükleik asit (m-RNA) ile endoplazmik retikuluma taşınır. Sinyal peptidaz enzimi sayesinde m-RNA'dan ayrılan prokollajen molekülleri posttranslasyonel modifikasyona uğrar. Prokollajen moleküllerinin yapısındaki lizin ve prolin aminoasitleri lizin hidroksilaz ve prolin hidroksilaz enzimleri sayesinde hidroksilasyonu gerçekleştirir. Bu enzimler için askorbik asit, demir ve moleküler oksijen gerekmektedir. Oluşan hidroksilizin ve hidroksiprolin yapılarına transferaz enzimleri sayesinde glukoz ve galaktoz eklenir. Golgi cisimciğine iletilen prokollajen trimerleri ekstrasellüler matrikse salınır. Çinko bağımlı proteinaz enzimi ile polipeptid zincirler kovalan bağlarla birbirleri ile bağlanarak tropokollajen yapısı oluşur. Tropokollajen molekülleri birleşerek kollajen filamentlerini, bu filamentler fibrilleri, fibriller de demetleri meydana getirir.^{11,12} Kollajen yapısına göre tiplere ayrılır. Yara iyileşmesinin erken döneminde Tip 3 kollajen miktarı fazla olmasına rağmen matür skar dokusunda hiçbir zaman Tip 1 kollajen miktarını geçemez.¹⁰

Endotel hücreleri TNF- α ve temel FGF (bFGF) sayesinde anjiogenezis için aktive edilmektedir. Anjiogeneziste ayrıca lokal uyarı faktörleri olan VEGF ile anjiostatin, endostatin, trombospondin ve pigment epitel bezeri büyüme faktörü gibi antianjiogenik faktörler rol almaktadır. Oksijen basıncı ve pH düşüklüğü, laktat yüksekliği anjiogenezi tetikleyen lokal faktörlerdir. Kapiller endotel hücreleri çevresinde oksijen seviyesi azalınca, hücre içinde hipoksi tetikleyici faktör (HIF) DNA üzerinde spesifik dizisine bağlanarak anjiogenezis için VEGF transkripsiyonunu artırmaktadır.

Granülasyon dokusu kapiller damar ağları, fibroblast ve makrofajlardan oluşan hücre toplulukları ve organize kollajen liflerinden meydana gelmektedir ve skar oluşuncaya kadar dermis için dolgu oluşturmaktadır. Yaranın iyileşmesi amacıyla

4.2.4. Matürasyon

Granülasyon dokusunun matür skar dokusuna dönüştüğü fazdır. Küçük kapillerlerin geniş damarlara yönelmesi ile yarada bulunan su miktarı, hücre yoğunluğu ve metabolik aktivite azalır. Ekstrasellüler matrikste fibroblastlar tarafından salgılanan lizil-oksidadz enzimi sayesinde kollajen liflerinin çapraz bağlantısı artar (Şekil-5).



Şekil 5: Skar matürasyonu⁹

Matriksmetaloproteinazlar (MMP), çinko bağımlı ekstrasellüler endopeptidazlardır ve epitel hücrelerinin migrasyonu, anjiogenezis ve skar matürasyonuna neden olan ekstrasellüler matriks proteinlerinin salınımını kontrol eder. Keloid gibi patolojik yara iyileşmesinde MMP-1 ve MMP-2 miktarları yüksek bulunmuştur.⁹

Skar matürasyonu aylar veya yıllar boyunca devam eder. Kapiller damar ağları nedeniyle erken dönemde kırmızı renkte izlenen skar matürasyonla beraber hipopigmente görünüm alır.⁹

Yaranın açılmasına neden olan kuvvete 'breaking strength' (kopma kuvveti) denir. Bir yarada birim alana düşen yük kapasitesi ise 'tensile strength' (yara gerim kuvveti) olarak adlandırılır. Yara gerim kuvveti tüm yaralarda 14-21.günde artar. Matürasyon sonunda yara gerim kuvveti normal dokunun %80'ine kadar ulaşır.^{10,13}

4.3 Radyoterapi Sonrası Yara İyileşmesi

Tümör tedavisinde kullanılan radyoterapi, tümör hücreleri ile beraber sağlıklı hücreleri de etkileyerek ciddi yara iyileşme sorunlarına yol açmaktadır.

Radyasyon sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri antikoagülan faktörleri inhibe ederken koagülasyon kaskadını da aktive eder. Koagülasyonun artmasına bağlı olarak damarlarda staz ve oklüzyon, damar duvarında ödem ve tromboz gelişir.^{3,13} Neovaskülarizasyonun azalmasıyla hipovasküler ve hipoksik bir ortam oluşur.^{5,13,14} Radyasyon uygulanmış ciltte erken dönemde eritem vazoaaktif aminlerin salınımına bağlı iken 2-3 haftadaki eritem damarlardaki hasarlanmaya bağlıdır.¹⁴

Fibroblastların yapısında kalıcı değişiklikler sonucu kollajen üretimi azalır ve matürasyon gecikir.¹³ Makrofaj ve fibroblastlardan salınan nitrik oksit (NO) kollajen depolanmasında rol oynamaktadır ve radyasyon uygulanmış yarada miktarı düşük bulunmuştur. Kollajen depolanmasını önleyen TNF- α ve interferon- γ (IFN- γ) radyasyon sonucu yarada artmaktadır.^{3,15} Yeterli kollajen sentezlenememesi sonucunda yara kopma kuvvetinde azalma gözlenir. Radyasyonun ileri dönem etkileri olan atrofi, kontraksiyon ve fibrozis fibroblastların yapısının bozulmasına bağlıdır.

Radyasyon ayrıca keratinosit ve melanositleri etkileyerek dermiste düzensizlik ve ciltte pigmentasyon değişikliklerine neden olur. Bazal membranın etkilenmesi sonucunda epitelizasyon gecikme izlenir.¹³ Granülasyon dokusunun oluşumu gecikir ve oluşan granülasyon dokusunun vaskülaritesi düşük olur. Migrasyon, anjiogenez ve skar matürasyonunda görev alan matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1) salgılanması radyasyon sonucunda azalmıştır.^{3,16}

Ekstrasellüler matriks oluşumunda görev alan, monosit ve fibroblastlar için kemotaktik olan TGF- β , bFGF ve PDGF radyasyon sonucu azaldığı izlenmiştir.

Deneysel olarak bu maddelerin dışarıdan verilmesinin yara iyileşmesini olumlu yönde değiştirdiği gözlemlenmiştir.¹

Geç dönemde radyasyon etkisi sonucu nekroz, atrofi, fibrozis, damarsal hasarlanma ve karsinogenezis gözlenir. Endotel hücrelerinden TNF- α ve PDGF salınımı artar, NO-sentetaz enzimi ve trombomodulin down-regülasyonu fibrozise zemin hazırlar. Endotel hücrelerindeki hücreler arası yapışma molekülü (ICAM-1) ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin de yapısında bozulma oluşur.³

Yara iyileşmesindeki sorunun temel kaynağı fibroblastların etkilenmesi sonucu kollajen sentez ve salınımının bozulmasıdır. Kollajen sentezi azaldığı gibi defektif kollajen sentezi de olabilmektedir. Fibrozis, geç dönemde lokal fibroblast progenitörlerinin artışına bağlı olarak aşırı kollajen depolanması sonucu da olabilmektedir.³ Dışarıdan ışınlanmamış fibroblastların enjeksiyonu yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir.^{18,19}

4.4. Kök Hücreler

Kök hücreler, belirli doku hücre karakterleri taşıması, uygun sinyal oluncaya kadar farklılaşmamış fenotiplerini koruması ve kendini yenileme özellikleri ile diğer hücrelerden farklılıklar gösterirler. Organizmanın tüm yaşamı boyunca kendini yenileme özelliklerinden dolayı kök hücreler in vitro kültürlerde kolaylıkla çoğalabilmektedirler. Belirli biyolojik sinyaller altında diferansiye olarak tamamen farklı terminal diferansiye hücre tiplerine dönüşebilme potansiyelleri mevcuttur. Kök hücreler buldukları yerlere göre embriyonik (EKH) ve yetişkin, kaynak aldıkları embriyonik tabakaya göre, ektodermal, mezodermal, endodermal, farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyellerine göre totipotent, pluripotent ve multipotent olarak sınıflandırılabilirler.

Totipotent embriyonik kök hücreler bir organizmayı oluşturabilecek tüm hücrelere dönüşme özelliği taşıyan, embriyonun 3. gününe kadar elde edilebilen hücrelerdir. Pluripotent EKH'ler erken embriyo döneminde blastokistin iç tabakasında bulunurken, yetişkin kök hücreler (YKH) yetişkin organizmanın dokularında bulunurlar. Bazı kök hücre tipleri belirli dokuların hücre tiplerine dönüşebilen 'multipotent' özellik taşırlar. Mezenkimal kök hücreler (MKH), bu tip 'multipotent'

hücrelere örnektir. MKH'lerin kolay izole edilme ve multipotent özellikleri nedeniyle rejeneratif tıpta kullanılmaktadırlar. Hematopoetik kök hücreler (HKH) ise birçok kan hücresi tipine dönüşebilen 'pluripotent' kök hücrelerdir.²⁰

4.4.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Pluripotent özellikteki EKH'ler blastokistin iç yüzeyinde bulunurlar. Embriyogenezde blastokistin iç yapısından epiblast ve hipoblast oluşur. Hipoblast 'yolk sac' kesesini oluştururken epiblasttan organ ve dokuları oluşturacak 3 germ tabakası (ektoderm, mezoderm, endoderm) gelişir. EKH'ler ilk kez 1981 yılında Martin tarafından tanımlanmıştır. Thompson 1998 yılında 225 insan EKH dizisi tanımlamıştır.²⁰ Ölümsüz diziler oluşturan EKH'ler, doku mühendisliği, ilaç araştırmaları ve insan gelişimi araştırmalarında kullanılabilir.²¹ EKH'de bulunan yüksek telomeraz enzimi aktivitesi, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yol açarak teratom oluşturabilir.²² İlk pluripotent özellikteki hücreler, 1972 yılında 'embryonik karsinoma' diye adlandırılan ve üç germ yaprağına ait doku içeren teratokarsinomadan elde edilmiştir.²³ EKH'ler rejeneratif tıp için etkin görünmelerine rağmen kullanımını etik ve yasal nedenler kısıtlamaktadır.²¹

4.4.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Friedenstein 1968 yılında kemik iliğini alarak plastik hücre kültür kabında kültüre etmiştir. Dört saat sonra kaba yapışmayan hücreleri ortamdaki uzaklaştırmış, geriye kalan hücrelerin fibroblast gibi iğsi şekilde olduklarını ve hızlı olarak çoğaldıklarını fark etmiştir. Koloni oluşturan bu hücrelere 'fibroblast şekillendirici ünitesi (CFU-Fs)' veya 'kemik iliği stroma hücresi' adını vermiştir. Yapılan araştırmalarda bu hücrelerin non-hematopoetik hücreler olduğu ve de kemik, kırıkta ve yağ dokusuna diferansiyasyon özelliklerinin olduğunun saptanması üzerine 'mezenkimal kök hücreler' olarak adlandırılmışlardır.^{20,24,25}

MKH'lerin % 10'u hücre döngüsünün S, G2 ve M fazında bulunurken % 90'ı G0/G1 fazındadır ve de yüksek proliferatif potansiyele sahiptirler.²⁶

MKH'ler kemik iliği haricinde yağ dokusunda, periostta, sinovyal membranda, kasta, dermiste, diş kökünde, perisitlerde, trabeküler kemikte, infrapatellar yağ yastığında, eklem kıkırdağında, dolaşım sisteminde, amnion sıvısında ve umbilikal kordon kanında da bulunmaktadır. Sayısal olarak en fazla neonatal dönemde görülen MKH'ler 80 yaşına gelindiğinde vücuttaki miktarı %50 azalmaktadır.²⁶

Otolog transplantasyonda ilk olarak kemik iliği kökenli MKH'ler kullanılmıştır. Kemik iliğinde yer alan çekirdekli hücrelerin sadece %0,001-0,01 kadarı MKH'dir.^{25,27} İnvaziv bir işlem olan kemik iliği aspirasyonunda elde edilen 10^5 hücreden sadece 1-10 tanesinin MKH olduğu saptanmıştır.²⁸ Ayrıca bu hücrelerin yaşla beraber diferansiyasyon kapasitelerinin azalmasına paralel olarak terapötik etkileri de azalmaktadır.²⁹ Bu nedenlerle araştırmacılar MKH elde etmek amacıyla değişik kaynaklara yönelmişlerdir.

Kolay elde edilmesi, vücutta bol oranda bulunması nedeni ile otolog kök hücre terapileri yağ dokusu üzerinde yoğunlaşmıştır. Yağ kökenli MKH'leri kemik iliği (Kİ) kökenli MKH'lerle proliferasyon ve diferansiyasyon özellikleri açısından benzerdirler.^{30,31}

Genç MKH'leri barındıran umbilikal kordon kanı, etik sorun olmaması, kolay alınabilmesi ve düşük derecede immunojenitesi olması nedeniyle otolog MKH tedavisinde uygun bir kaynaktır. Ancak umbilikal kordon kanında hücre sayısının az olması (10^9 hücrede yaklaşık 4 tane) ve hücre izolasyonu oranının düşük olması (<%30) kullanımını zorlaştıran faktörlerdir.³²

Son yıllarda ayrıca umbilikal kordon, amniyotik sıvı ve amniyotik membrandan MKH'ler elde edilmiştir. Bu hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyon kapasiteleri Kİ kökenli MKH'lerden farklı olmadığı izlenmiştir.³³⁻³⁶

Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya adezyon molekülleri olarak rol oynayan belirteçler "CD" (Farklanma Kümeleri = Clusters of Differentiation) olarak adlandırılmıştır. Bu belirteçler hücre türüne göre özgün veya yaygın olarak bulunurlar. MKH immun fenotiplendirilmesi için yapılan çalışmalar sonucunda MKH'ler için spesifik bir marker gösterilememiştir. Uluslararası Hücre Terapi Topluluğu (International Society for Cell Therapy (ISCT)) 2006 yılında MKH'lerin kimliklendirilmesi için bazı kriterler yayınlamıştır. Bu kriterlere göre MKH'ler;

- 1- Plastik yüzeye yapışmalı
- 2- CD73, CD90, CD105 ekspresyonu yapmalı
- 3- CD14, CD19, CD34, CD45 ve HLA_DR ekspresyonu göstermemeli
- 4- Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik diferansiyasyon özelliği taşımalıdır (Şekil-6).

Lökosit işaretleyicisi olan CD45, hematopoetik progenitör hücreler ve endotel hücreleri belirteci CD34, monosit ve makrofaj belirteci CD14 ve de B hücre belirteci CD19 MKH'lerde %2 den fazla pozitif olarak bulunmamaktadır.³⁷

MKH'ler mezodermal kaynaklı olan kemik, kıkırdak ve yağ dokusuna diferansiye olabildiği gibi uygun beslenme ortamında ektodermal kaynaklı sinir veya epitel hücrelerine ve endodermal kaynaklı kas veya hepatosit hücrelerine diferansiye olabilmektedir. Bu tarzdaki diferansiyasyon 'trans-diferansiyasyon' olarak adlandırılmaktadır.³⁸⁻⁴²

Bu hücrelerin in vivo ortamda diferansiyasyonları daha karışıktır. In vivo ortamda MKH'ler çevrenin durumuna göre en az üç tip hücreye dönüşür. Bunlar;

1-Doku spesifik hücreler: Yaralanmış dokuyu tamir amacıyla diferansiye olan hücreler

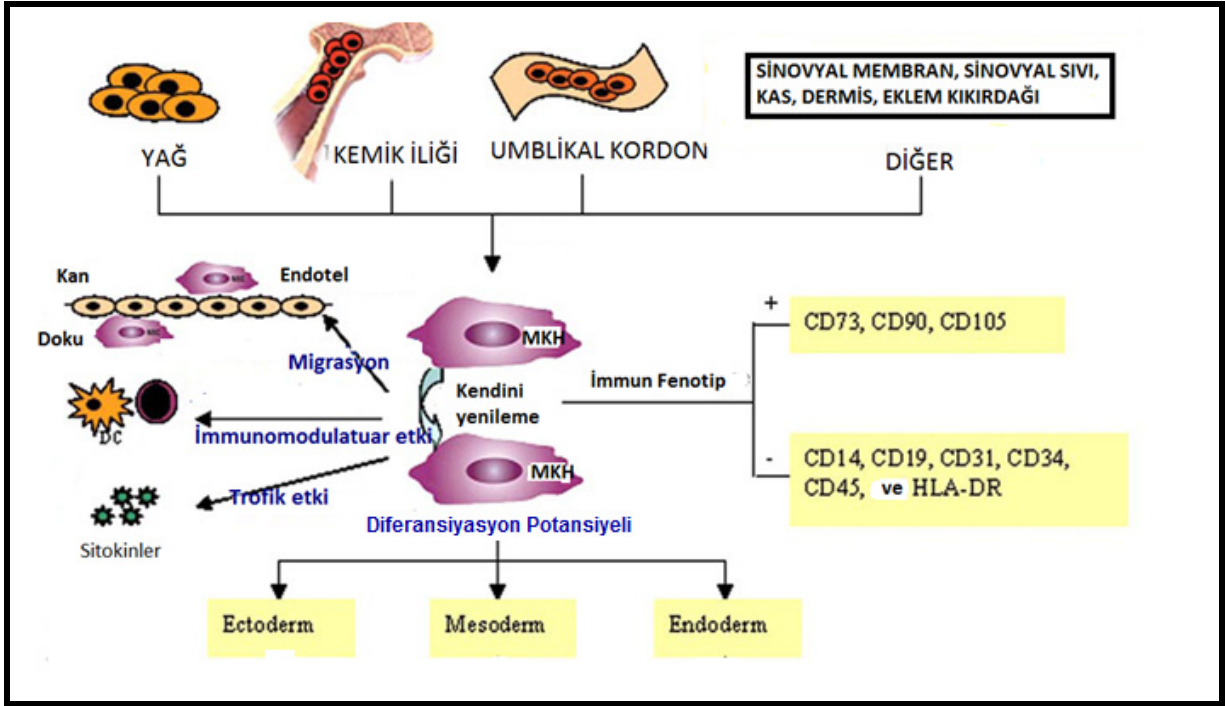
2-Fonksiyonel hücreler: Mikroçevrenin etkileriyle doku onarımı için diferansiye olan hücreler

3-Reguluar hücreler: Doku rejenerasyonu ve onarımı için immunmodülatör görev yapan ve sitokin salgılayan hücreler²⁴

MKH'ler kan yoluyla yaralanmış ve inflamasyon olan dokuya yönlenebilirler. Bu özellikleri, yaralanan dokunun spesifik reseptör ve ligandları up-regüle etmesi ve MKH'lerin integrin, selektin ve kemokin gibi endotelden migrasyonunu sağlayan reseptörleri eksprese etmesine bağlıdır.^{43,44}

MKH'ler T ve B lenfositlerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu engeller ve yaralanan dokuda anti-inflamatuar ve anti apopitotik moleküller salgılayarak immun modülatör özellik gösterirler. Bu özelliği nedeniyle MKH'ler çeşitli kaynaklarda belirtildiği gibi greft versus host hastalığı (GVHH), tip 1 diabetes mellitus, romatoid

artrit, multipl skleroz ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıkların tedavilerinde kullanılmıştır.^{45,46}



Şekil 6: MKH'lerin biyolojik özellikleri²⁴

4.4.2.1. Adipoz Kökenli Erişkin Kök Hücreler (Adipose-Derived Adult Stem Cell (ADAS))

Kemik iliğinden MKH elde edilmesi invaziv bir girişim gerektirmesi ve elde edilen hücre sayısının az olması, araştırmacıları yeni MKH kaynakları bulmaya yönlendirmiştir.

İlk kez 2001 yılında Zuk ve arkadaşları insan lipoaspiratından elde ettikleri stromal vasküler fraksiyonda (SVF) kök hücreleri göstermiş ve bu hücrelere adipoz kökenli erişkin kök hücre adı verilmişlerdir. Fibroblastlara benzer şekilde olan bu hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve myojenik diferansiyasyon kapasiteleri olduğu gösterilmiştir.

SVF içerisinde preadiposit hücreler mevcuttur ve bu hücreler matür adipositlere dönüşürler. ADAS'ların adipojenik diferansiyasyonunu göstermek amacıyla

preadiposit hücreleri ayrı olarak izlemiş ve sonuçta ADAS'ların belirgin olarak adipogeneze yönlendiği izlenmiştir.^{31,47}

Aynı araştırmacının daha sonraki çalışmalarında ADAS'ların MKH'ler gibi birçok yüzeyel işaretleyicileri olduğunu ve bu hücrelerin yönlendirildiği yola göre spesifik proteinler eksprese ettikleri gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin nörojenik tipte proteinleri eksprese eden nöron benzeri hücrelere de diferansiye olabileceğinin gösterilmesi, bu hücrelerin pluripotent olabileceğini düşündürmüştür.⁴⁸

Kök hücre araştırmalarında yeni kaynak olarak yağ dokusunu gösteren bu çalışmalar ardından, 2004 yılında Kang ve ark. ADAS hücrelerinin uygun ortamda nörona diferansiye olabildiğini verileri ile doğrulamıştır. ADAS'ların transdiferansiyasyon kapasitesinin görülmesi üzerine oligodendrosit, schwann hücreleri, epidermal hücreler, hepatosit ve pankreatik ada hücrelerine diferansiyasyonlarını gösteren çalışmalar da yapılmıştır.^{47,49-54}

Kemik iliği aspirasyonu ile karşılaştırıldığında daha az invaziv bir yöntem olan liposakşın, operasyon sonrası hastanın konforunu bozmadığı gibi donör alan morbiditesi düşüktür. Bir gram yağ dokusunda yaklaşık 5×10^3 adet MKH mevcuttur. Bu sayı 1 gr kemik iliğinde yer alan MKH sayısının yaklaşık 500 katıdır. Başka bir kaynağa göre de 100 ml yağ dokusunda 10^6 adet MKH bulunmaktadır.^{30,55,56}

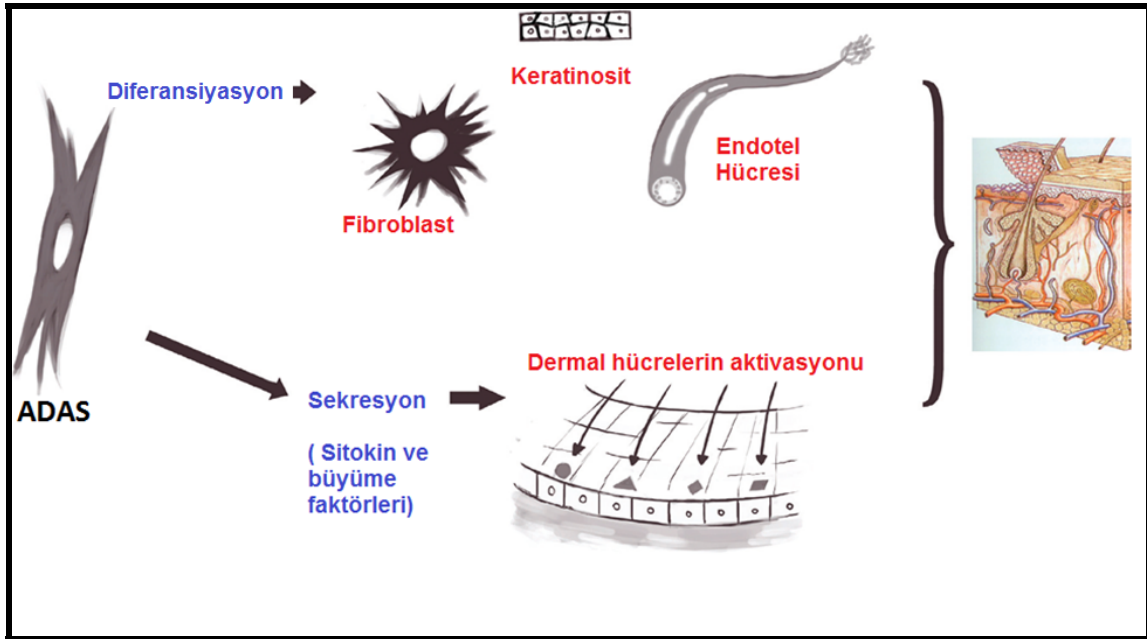
Rejeneratif tıpta MKH kullanımı artması üzerine 2003 yılında Gimble ve ark. uygun hücre kaynağı için 5 adet kriter yayınlamıştır. Bu kriterlere göre;

- 1- Kaynakta hücre bol miktarda bulunmalıdır
- 2- Minimal invaziv teknik uygulanarak MKH elde edilmelidir
- 3- Çıkarılan dokudan elde edilen hücreler tanımlanmış yöntemlerle birçok farklı hücre tipine diferansiye olma özelliği içermelidir
- 4- Otolog ve allojenik transplantasyonları güvenli ve efektif olmalıdır
- 5- Günümüzdeki kabul edilmiş standart yöntemlerle imal edilebilmelidir

Bu kriterlere göre günümüzde yağ dokusu en uygun kaynak olarak görünmektedir.⁵⁷

Klinikte sık görülen lipom ve liposarkomlar gibi yağ dokusu içeren tümörlerde adipogenezin uyarılması halen tedavide kullanılmaktadır ve bu etki liposarkomun kök hücre progenitörlerinden köken aldığı kanıtlar niteliktedir.⁵⁸ Ayrıca yağ dokusu eksizyon veya liposakşın ile uzaklaştırıldığı halde tekrar yeni yağ dokusunun oluşmasında kök hücrelerin görev aldığı söylenmektedir.⁵⁷

İn vivo ortamda rejeneratif etkisini aydınlatmak için ADAS hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, ADAS'ların etkisinin sadece diferansiye olduğu hücre grubundan kaynaklanmadığı aynı zamanda çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler salgılanması sonucu gerçekleştiği ortaya konulmuştur. Yara bölgesine uygulanan ADAS'lar endotel hücrelerine, keratinosit gibi deri eki hücrelerine ve de fibroblastlara diferansiye olmaktadır. Ayrıca bu hücreler VEGF, hepatosit büyüme faktörü (HGF), IGF, TGF- β ve FGF salgılayarak anjiyenik ve mitojenik etki göstermektedirler. Ayrıca kök hücrelerden süperoksit dismutazın (SOD) subtipleri salgılanarak antioksidan etki oluşmaktadır (Şekil-8).^{38,59-62}



Şekil 7: ADAS'ın yara iyileşmesindeki rolü

4.4.2.1.1. ADAS İzolasyonu

ADAS izolasyonu için kullanılan yağ dokusu sadece kök hücre değil aynı zamanda kan hücreleri, fibroblast, perisit, endotel hücreleri, preadiposit, adiposit ve tüm bunları çevreleyen bir hücreler arası matriks içerir. Bu nedenle yağ dokusundan SVF izole etmek için kullanılan yöntem kollajenaz ile enzimatik sindirime dayanır.³¹ Aspire edilmiş veya parçalanmış yağ dokusundan öncelikle kan hücreleri yıkamalarla uzaklaştırılır. Sonrasında enzimatik sindirim yapılarak dokudaki hücreler serbestleştirilir. Hücreler yağ ve atıklardan uzaklaştırılıp kullanılan enzim inaktive edilmesi ardından uygun kök hücre ortamında kültüre edilir.⁶³ ADAS hücre sayısı yaklaşık 2-4 günde 2 katına çıkar. Donörün yaşı, yağın tipi (beyaz ve kahverengi yağ dokusu), yağın lokalizasyonu (subkutan / visseral), cerrahi prosedür, kültür ortamı ve kültür ortamının formülü bu süreyi belirleyen ana unsurlardır.³⁰

Diferansiye edilmeden kültüre edilen bu hücreler, kök hücre olarak veya belli bir diferansiyasyona yönlendirilerek in vivo ortama verilebilirler. ADAS'ların kültür ortamında yağ, kıkırdak ve kemiğe dönüşmesini indüklemek için gerekli etken maddeler tanımlanmıştır (Şekil-8).⁶³



Şekil 8: ADAS'ın mezenkimal diferansiyasyonları⁶³

ADAS hücrelerinin yüzeyel immun fenotiplemesine bakıldığında diğer MKH'lere benzer özellikler taşır. Hematopoetik hücre yüzeyinde bulunan CD14, CD45 ve CD31 ADAS hücrelerinden eksprese edilmez (Tablo-1).^{5,59}

ANTİJEN	+	-
ADEZYON MOLEKÜLLERİ	CD9 (Tetraspan), CD29 (β 1 integrin), CD49 (α ₄ integrin), CD54 (ICAM-1), CD105 (endoglin), CD166 (ALCAM)	CD11b (α _b integrin), CD18 (β 2 integrin), CD50 (ICAM-3), CD56 (NCAM), CD62 (E-selectin), CD104 (α ₄ integrin)
RESEPTÖR MOLEKÜLLERİ	CD44 (hyalarunat), CD71 (transferin)	CD16 (F _c reseptör)
ENZİMLER	CD10, CD13 (aminopeptidaz), CD73 (5'ektonükleotidaz), aldehitdehidrogenaz	
EKSTRASELÜLER MATRİKS MOLEKÜLLERİ	CD90 (Thy1), CD146 (Muc18), kollajen Tip1 ve Tip 3, Osteopontin, Osteonektin	
HÜCRE İSKELETİ	Vimentin, α -düz kas aktin	
HEMATOPOETİK		CD14, CD45, CD31
KOMPLEMAN KASKADI	CD55 (decay-accelerating factor), CD59 (Pronektin)	
HLA	HLA-ABC	HLA-DR
KÖK HÜCRE	CD34, ABCG2	
STROMAL	CD29, CD44, CD73, CD90, CD166	

Tablo 1: ADAS'ın immunfenotip işaretleyicileri^{57,59}

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (D.E.Ü.T.F) Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra çalışmanın yürütülmesi amacıyla Dokuz Eylül Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'nden destek alındı.

Çalışma 48 adet 250-280 gr. ağırlığında Wistar suşu ratlar üzerinde yapıldı. D.E.Ü.T.F Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanan hayvanlar yine aynı laboratuvarında 'D.E.Ü.T.F Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş Esasları' doğrultusunda bakıldı.

5.1. Çalışmanın Yapıldığı Bölümler

D.E.Ü.T.F Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı: Tüm cerrahi işlemler steril koşullar altında D.E.Ü.T.F Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Ratlar standart yem ve su ile beslenmiştir (Resim 1). Radyoterapi uygulaması ve cerrahi işlemler sonrasında ratların beslenmesinde sorun olmamıştır.



Resim 1: Ratların deney hayvanları laboratuvarındaki ortamı

D.E.Ü.T.F Radyasyon Onkoloji Bölümü: Ratlara radyoterapi planlanması ve radyasyon verilmesi işlemleri D.E.Ü.T.F Radyasyon Onkoloji Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir.

D.E.Ü.T.F Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı: SVF elde edilmesi, kök hücre elde edilmesi, kök hücrelerin kültüre edilmesi, in-vitro diferansiyasyonunun ve işaretleyicilerinin gösterilmesi D.E.Ü.T.F Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Biyomekanik Araştırma Laboratuvarı: Doku kopma kuvveti (breaking strength) testleri Biyomekanik Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

D.E.Ü.T.F Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı: Materyallerin histomorfolojik ve immunhistokimyasal incelemeleri D.E.Ü.T.F Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

5.2. Radyasyon Uygulamaları

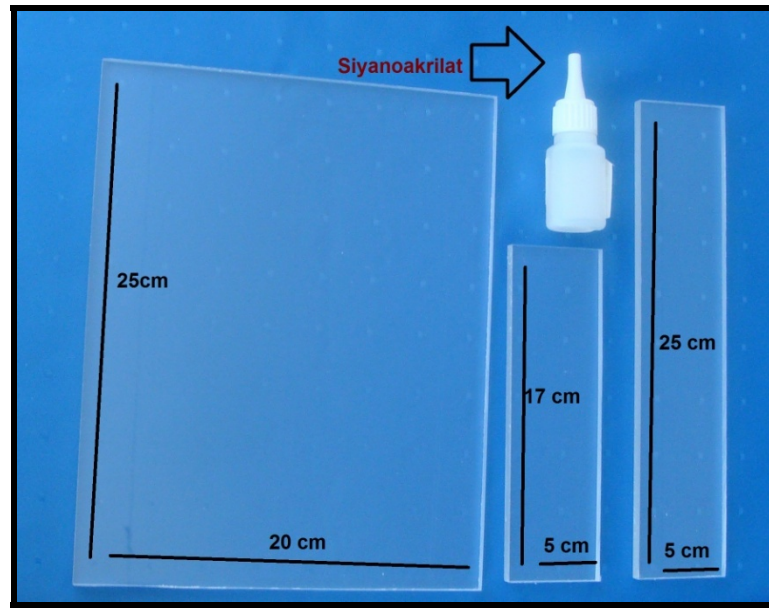
D.E.Ü.T.F Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda ratlara radyasyon verildi. Radyasyon verilmeden önce ratların belirlenen alanında ve derinlikte istenen dozu oluşturmak amacıyla medikal fizikçi tarafından planlama yapıldı.

5.2.1. Radyasyon Verilmesinin Planlaması

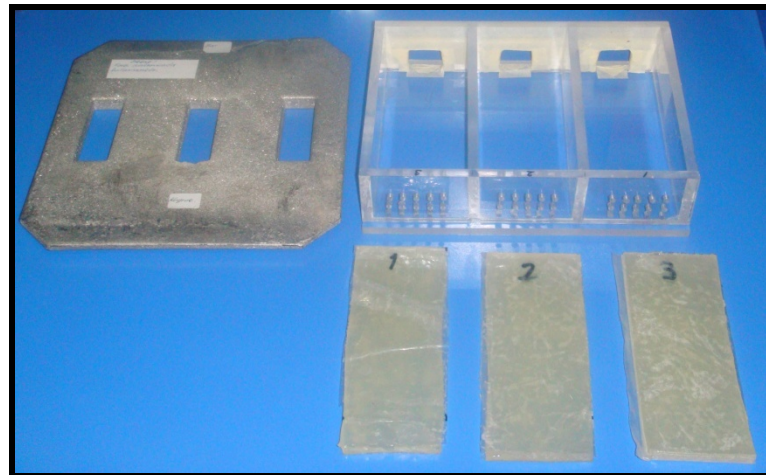
5.2.1.1. Radyasyon Verilme Düzenineğinin Hazırlanması

- Tek doz olacak şekilde ve aynı anda 3 adet ratın ışınlanması planlandı.
- Bu amaçla pleksiglas maddesinden üretilmiş 25x20 cm.lik 1 adet, 17x5 cm.lik 4 adet ve 25x5 cm.lik 2 adet plak temin edildi (Resim 2).
- Plaklar planlandığı şekilde siyanoakrilat ile birleştirilerek ışınlama paneli hazırlandı (Resim 3).

- Işınlama sırasında ratların nefes almasını engellemek için ön tarafa delikler açıldı (Resim 4).
- Işınlama sırasında ratların konumunu bozmaması için kuyruklarını dışarıda bırakacak şekilde alanlar açıldı (Resim 5).
- Oluşturulan ışınlama paneline yerleştirilen ratların sadece 8x3 cm.lik sırt bölgesinin ışınlanabilmesi için 25x25 cm. boyutlarında elektron aplikatörüne uygun koruyucu kurşun blok hazırlandı (Resim 3).
- Radyasyon dozunun cilt üzerinde yoğunlaştırmak ve iç organlara ulaşan dozu azaltmak için 'Gel-Bolus' kullanıldı (Resim 3).



Resim 2: Işınlama paneli için 'Pleksiglas' plaklar ve siyanoakrilat



Resim 3: Işınlama paneli, kurşun plak ve 'Gel-Bolus' materyalleri



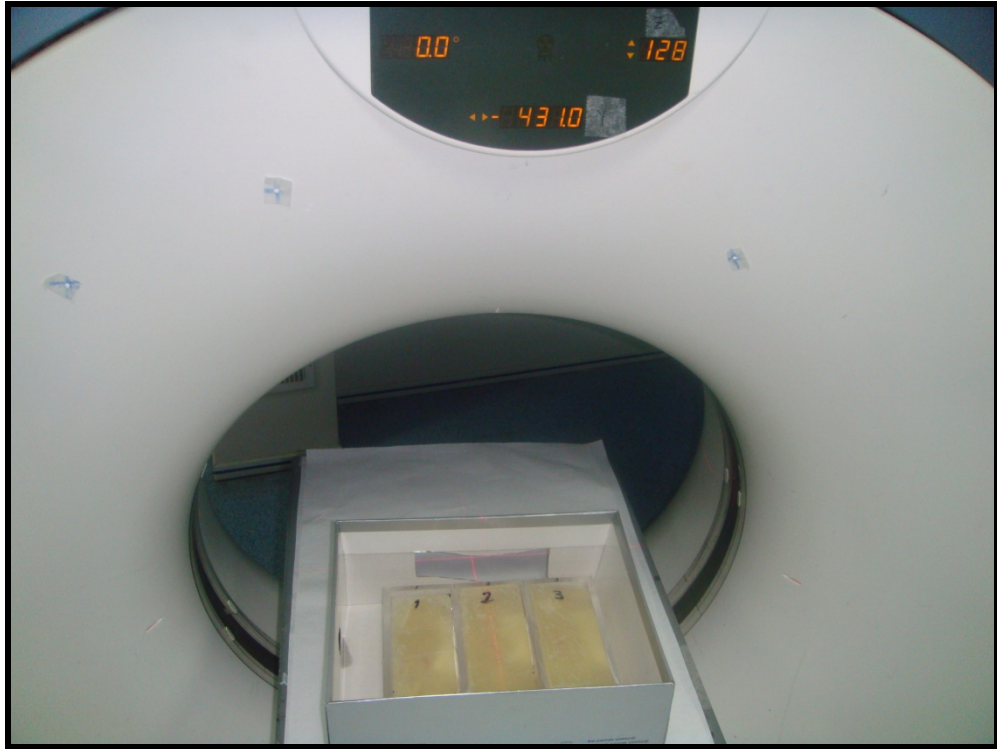
Resim 4: Ratların ışınlama sırasında nefes alması için ön tarafa açılan delikler



Resim 5: Kuyrukları dışarıya yönlendiren aralıklar

5.2.1.2. Ratlara Verilecek Radyasyon Dozunun Belirlenmesi

- 6 MeV'luk elektron üreten *Siemens marka Primus model* lineer hızlandırıcı ile ışınlama yapılması planlandı.
- Ratların dorsal cildinde 2500 cGy ışın düşürülmesi amacıyla planlama yapıldı.
- Ratlara ışınlama paneli içinde 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi altında bilgisayarlı tomografi (BT) çekildi (Resim 6).
- BT görüntüleri üzerinden *Nucletron marka Oncetra tedavi planlama bilgisayarı* ile doz dağılımı oluşturuldu.
- 6 MeV'luk elektron altında 2 cm. kalınlığında Gel-Bolus kullanılarak 2 cm. derinlikte 500 cGy'i geçmeyen, ciltte ise 2500 cGy doz oluşturan bir plan elde edildi. Kaynak-cilt mesafesi (SSD) 100 cm olarak belirlendi.

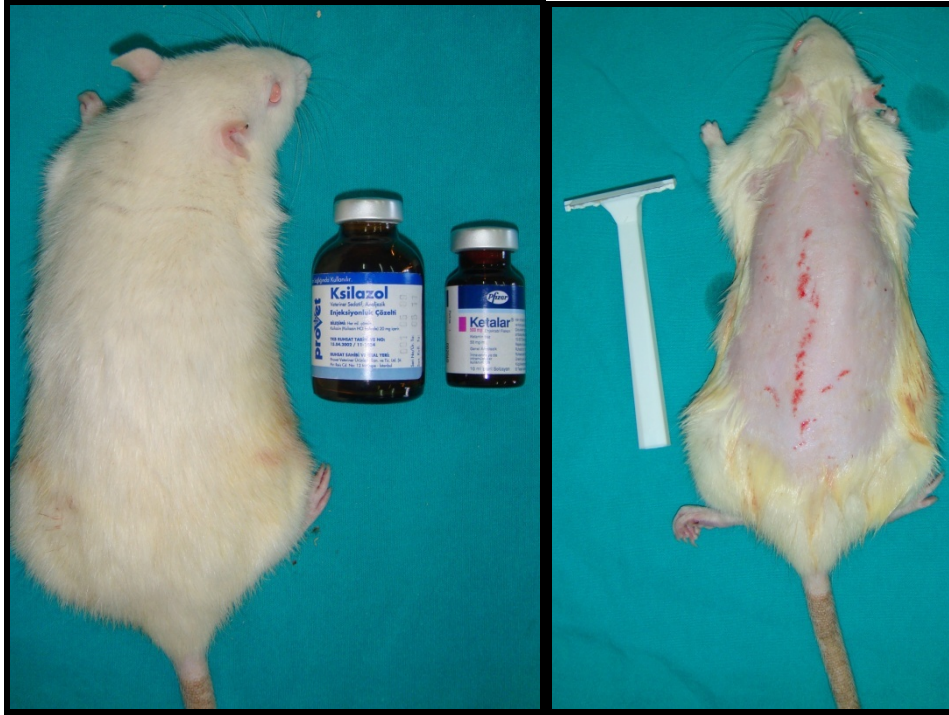


Resim 6: Ratların BT cihazına ışınlama paneli içinde 1 cm. kalınlığında Gel Bolus kullanılarak yerleştirilmesi

5.2.2. Ratlara Radyasyon Verilmesi

5.2.2.1. Ratların Işınlanmaya Hazırlanması

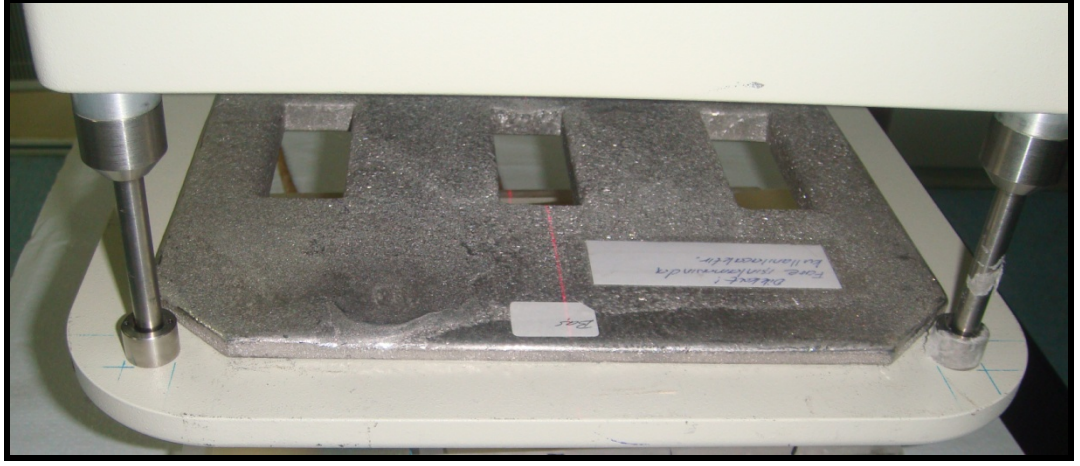
- Ratlara 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi yapıldı.
- Anestezi altında ratların sırt bölgeleri tıraşlandı (Resim 7).
- Işınlama paneline 3 adet rat yatırıldı (Resim 8).
- Panel içindeki ratlar ön tarafı açılmış karton kutu içersine koyularak D.E.Ü.T.F Radyasyon Onkolojisi bölümüne transportu sağlandı (Resim 9).



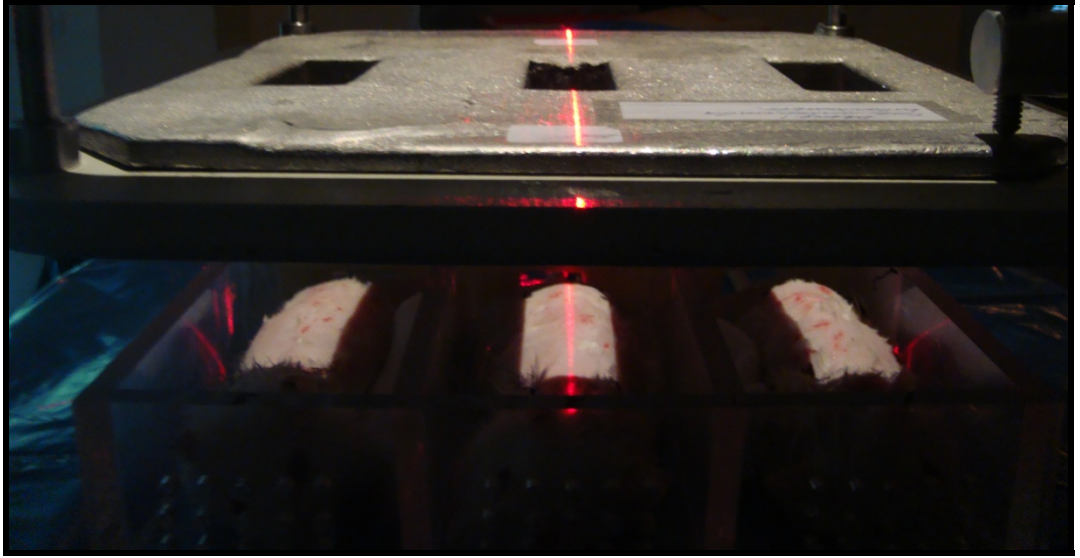
Resim 7: Anestezi sonrası ratların sırt bölgesinin tıraşlanması

5.2.2.2. Ratların Işınlanması

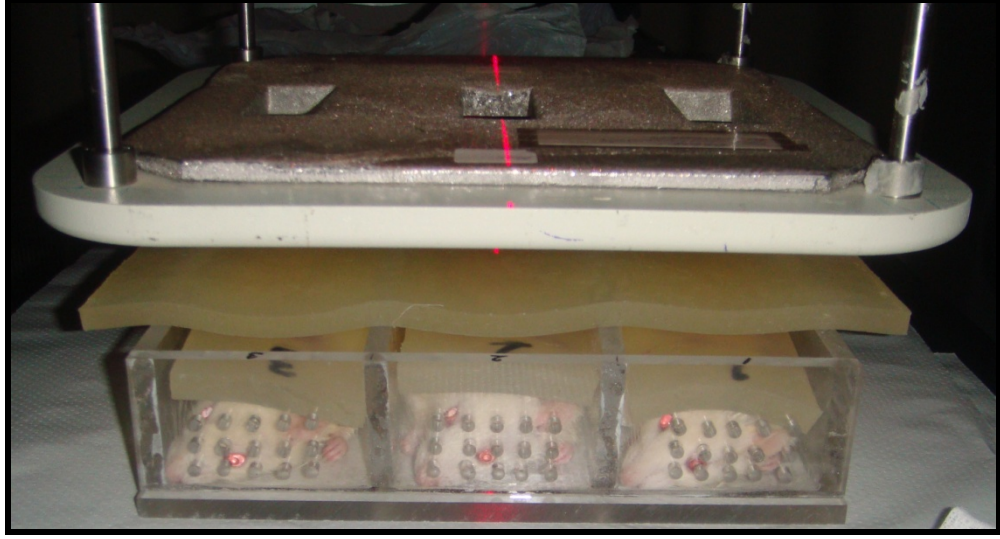
- Anestezi altındaki ratlar ışınlama paneli içinde Simens Primus lineer hızlandırıcı masasına koyuldu.
- Lineer hızlandırıcının aplikatörüne hazırlanan kurşun plak yerleştirildi (Resim 10).
- Anterior-posterior yönde ve lateral yönlerden verilen lazer ışıkları ile masa yüksekliği ve ışınlama panelinin konumu ayarlandı (Resim 11).
- Ratların sırtına ışık düşürülerek ışınlanacak 8x3 cm.lik alan belirlendi ve ratların ışınlama paneli içindeki pozisyonları ayarlandı (Resim 11).
- Pozisyonu düzeltmek amacıyla gerektiğinde tampon ile destek sağlandı.
- Işık ile belirlenen dikdörtgen alanın köşelerine cilt kalemı ile işaret koyuldu.
- Ratların üzerine 1 cm. kalınlığındaki Gel-Bolus materyalinden 2 adet koyuldu (Resim 12-13-14).
- Lineer hızlandırıcı, 6 MeV elektron ile planlama sonucu 2500 cGy'e karşılık gelen 3037 MU (Monitor Unit) verecek şekilde ayarlandı (Resim 15).
- Verilen ışın miktarı monitörden takip edildi ve her bir ışınlama 10 dakika 32 saniye sürdü (Resim 15).
- Anestezi etkisinin azalmasına bağlı hareket etme riski olan ratlar bu süre içinde kameradan takip edildi (Resim 16).
- Işınlamanın bitmesinden sonra cilt kalemı ile daha önce belirlenen köşeler birleştirilerek ışınlanan alan işaretlendi (Resim 17).
- Ratlar, ışınlama panelinde ön tarafı açılmış karton kutu içerisine koyularak D.E.Ü.T.F Deney Hayvanları Labrotuvarına taşındı.
- Geniş bir alanın tıraşlanması nedeniyle ısı kaybı fazla olan ratlar, anestezi süresi geçene kadar (yaklaşık 4-6 saat) elektrikli ısıtıcı karşısında izlendi (Resim 18).
- Anestezi etkisinin geçmesi ardından ratlar laboratuvardaki ortamlarına yerleştirildi.



Resim 10: Aplikatöre kurşun plağın yerleştirilmesi



Resim 11: Işık düşürülmesi ve lazer ile pozisyonun ayarlanması



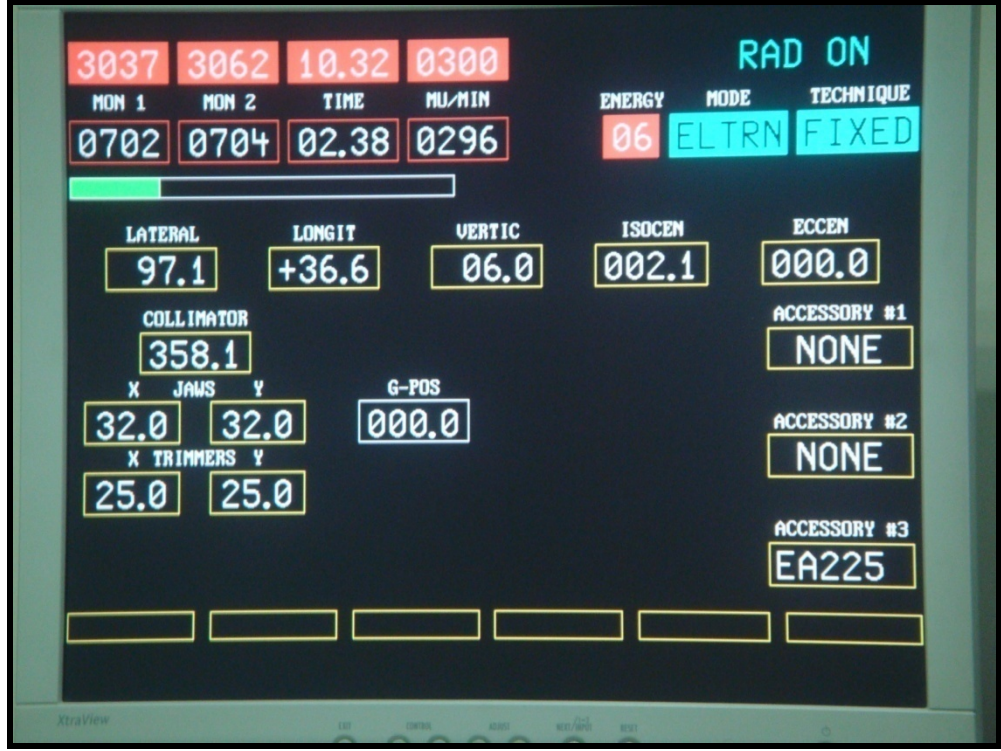
Resim 12: 1 cm. kalınlığında 2 adet Gel-Bolus materyalinin ratların üzerine yerleştirilmesi



Resim 13: 1 cm. kalınlığında 2 adet Gel-Bolus materyalinin ratların üzerine yerleştirilmesi



Resim 14: Işınlama öncesi hazırlıkların tamamlanması



Resim 15: Verilen ışının monitörden takibi



Resim 16: Işınlama sırasında ratların kameradan gözlemlenmesi



Resim 17: Işınlanan alanın cilt kalemi ile çizilmesi



Resim 18: Ratların anestezi etkisi geçene kadar elektrikli ısıtıcı karşısında takibi

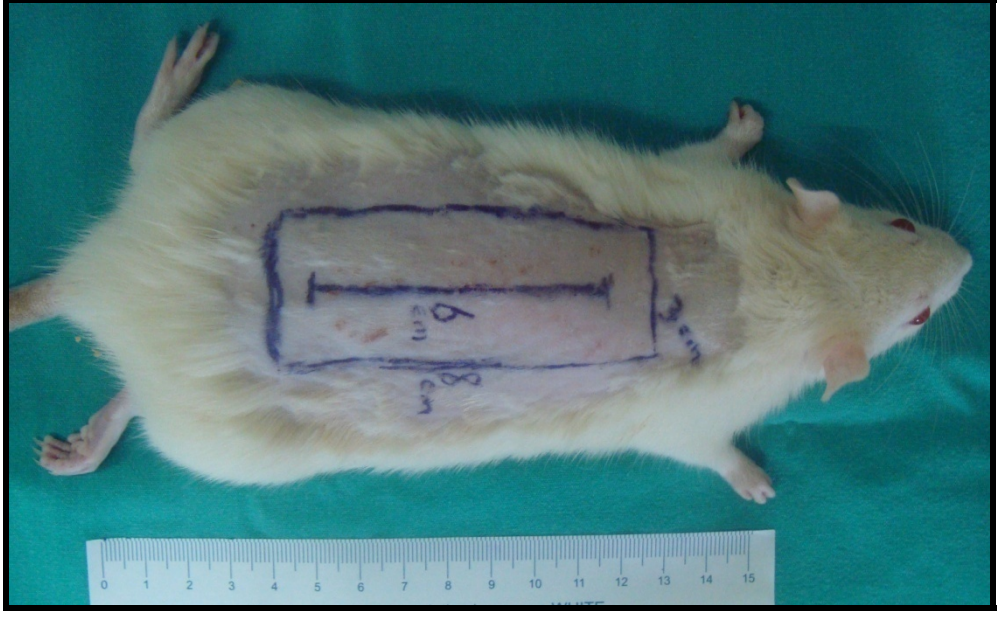
5.3. Cerrahi İşlemler

Cerrahi işlemler steril koşullarda D.E.Ü.T.F Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Ratları hipotermiden korumak amacıyla cerrahi işlemler sırasında ratların altına havluya sarılmış sıcak jel pakeler koyuldu. Anestezi etkisi azalana kadar elektrikli ısıtıcı karşısında takip edildiler.

5.3.1. Dorsal Cilt İnsizyonunun Yapılması

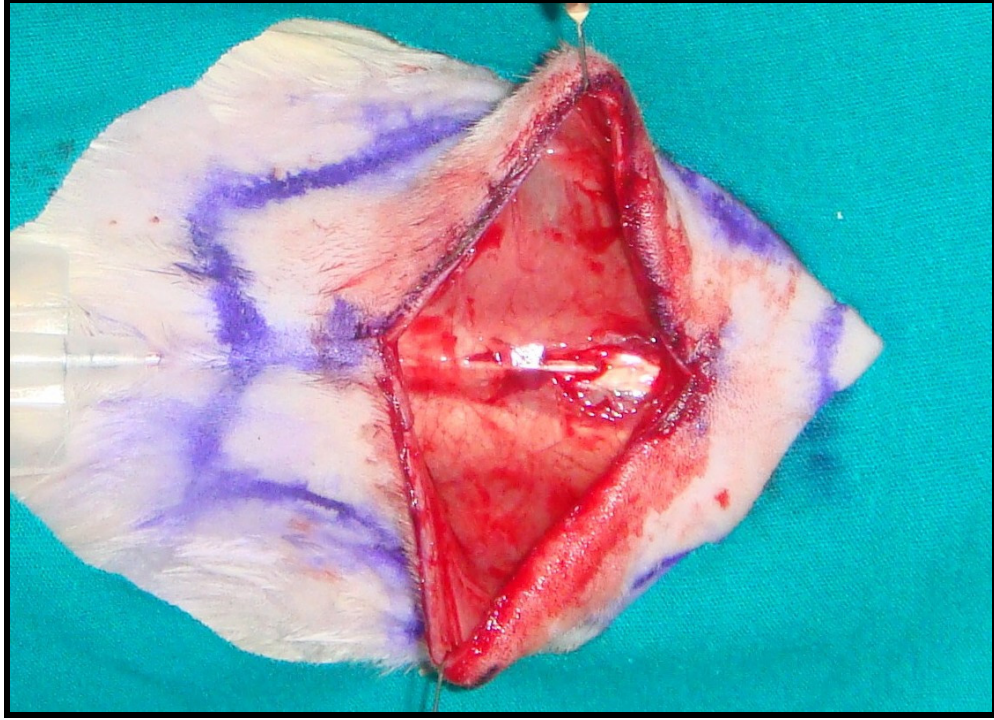
- Tüm cilt insizyonları ratların ışınlanmasından 3 gün sonra gerçekleştirildi.
- Ratlara 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi yapıldı.
- İşinleme sırasında cilt kalemi ile işaretlenen 8x3 cm.lik alanın ortasında kraniyal ve kaudalde 1 cm. kalacak şekilde 6 cm.lik insizyon hattı belirlendi (Resim 19).
- Cerrahi yapılacak alan oktenidin dihidroklorür (Octenisept) ile yıkandı.
- Dorsal kas fasyasına kadar insizyon yapıldı.
- Verilen sıvı için alan oluşturmak amacıyla ışınlanan 8x3 cm.lik alan künt olarak diseke edildi (Resim 20-21).
- Sıvı verilecek gruptaki ratlarda diseke edilen alana insizyonun yaklaşık 2 cm. kaudalinden 16 G branül yerleştirildi (Resim 21-22).
- Branül giriş deliğinden sıvı kaçağını önlemek amacıyla branül giriş kısmında dorsal kas fasyasının ve spinal ligamanların altından geçecek şekilde ilerletildi (Resim 22).
- Yapılan insizyon 3/0 polipropilen ile primer olarak suture edildi.
- Ratlar anestezi etkisi azalana kadar elektrikli ısıtıcı karşısında takip edildi.



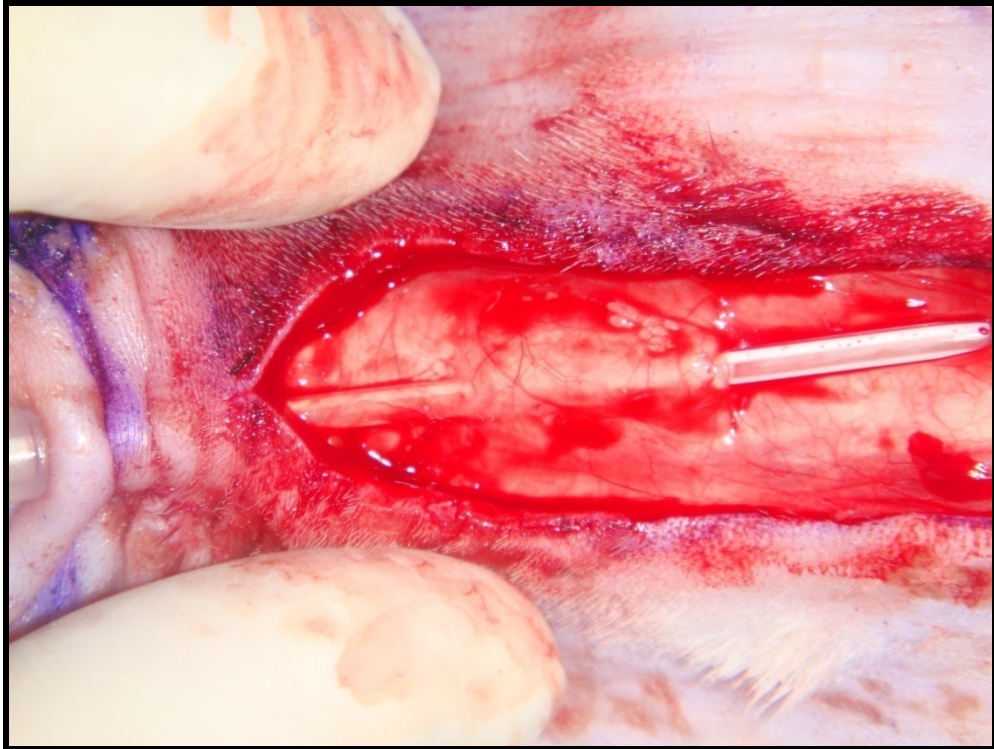
Resim 19: İnsizyon yerinin işaretlenmesi



Resim 20: Işınlanan alanın diseksiyonu



Resim 21: Diseke edilen alan ve branülün yerleştirilmesi



Resim 22: Branülün dorsal fasya altından ilerletilmesi

5.3.2. Yağ Greftinin Alınması

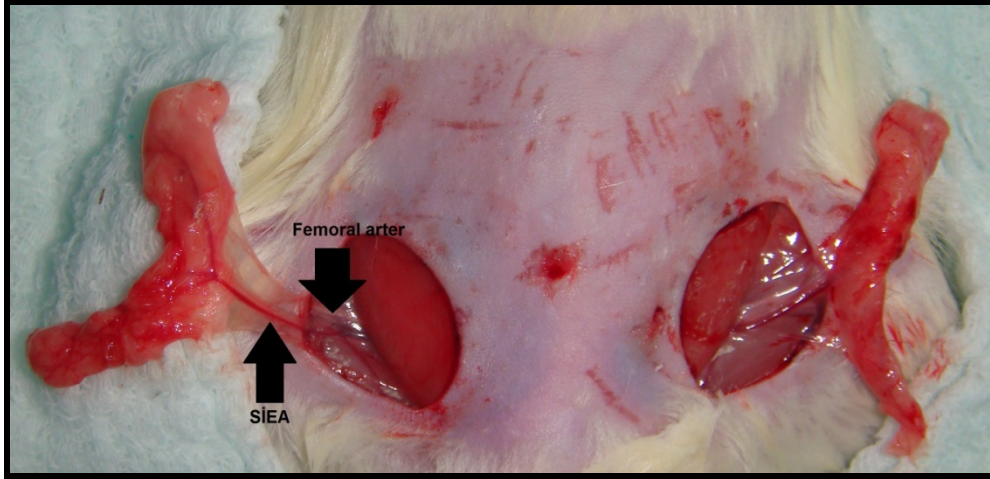
- Ratlara 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi yapıldı.
- Ratlar sırt üstü yatırılarak alt ekstremiteleri flaster yardımıyla traksiyona alındı.
- Karın ve inguinal bölgeler tıraşlandı.
- Rektus abdominalis kaslarının lateralleri belirlendi (Resim 23).
- Cerrahi alan oktenidin dihidroklorür (Octenisept) ile yıkandı.
- Rektus abdominalis kası lateraline paralel olacak şekilde 3 cm cilt insizyonu yapıldı (Resim 24).
- Cilt altından ve pannikulus dokusu üzerinden medialde orta hatta kadar, lateral ve süperiorde pannikulus dokusunun dorsal bölgeye döndüğü yere kadar ve inferiorde femoral arter-ven-sinir distali görülene kadar künt disseksiyon yapıldı.
- Medialden rektus kası fasyası üzerinden pannikulus ve yağ içeren doku rektus kası laterali boyunca diseke edildi.
- Pannikulus dokusu adduktor kaslar arasından dorsale doğru döndüğü yerden kesilerek ayrıldı.
- Pannikulus ve yağ dokusu içeren flep kraniyalden kaudale doğru diseke edilerek eleve edildi (Resim 25).
- Femoral arterden ayrılan süperfisiyel inferior epigastrik arter (SİEA) görülerek korundu ve yağ-pannikulus dokusu ada flebi olarak eleve edildi (Resim 26).
- SİEA 4/0 polyglactin-910 (vicryl) suture ile bağlanarak kesildi (Resim 27).
- Diseke edilen alan kanama açısından kontrol edildi (Resim 28).
- Yağ ve pannikulus içeren doku %0,9 NaCl (Sodyum Klorür) sıvısı içerisine koyuldu (Resim 29).
- Cilt 3/0 ipek ile suture edildi.
- Aynı işlem diğer inguinal bölgeye de uygulandı.



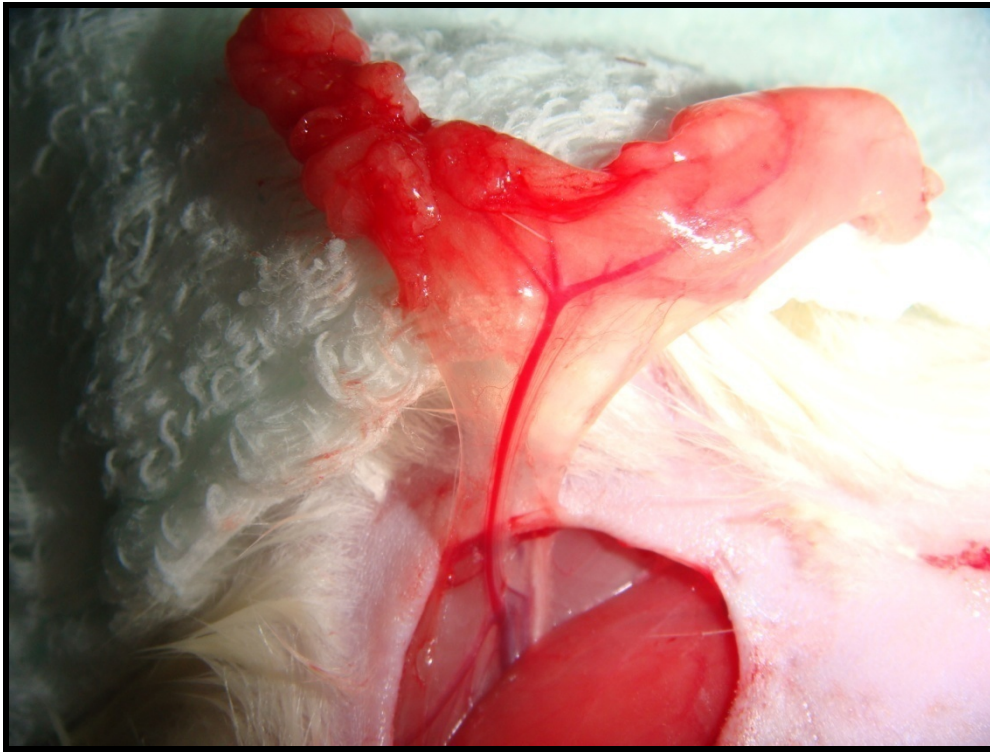
Resim 23: Tıraş sonrası insizyon yerlerinin belirlenmesi



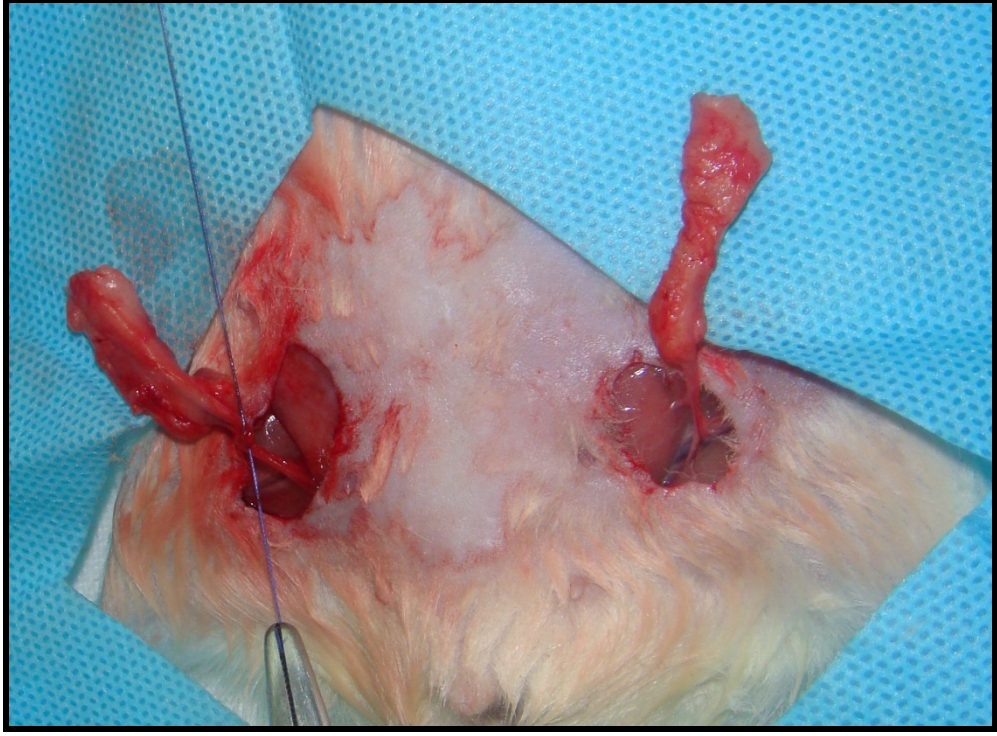
Resim 24: Cilt insizyonu sonrası ortaya çıkan pannikulus ve yağ dokusu



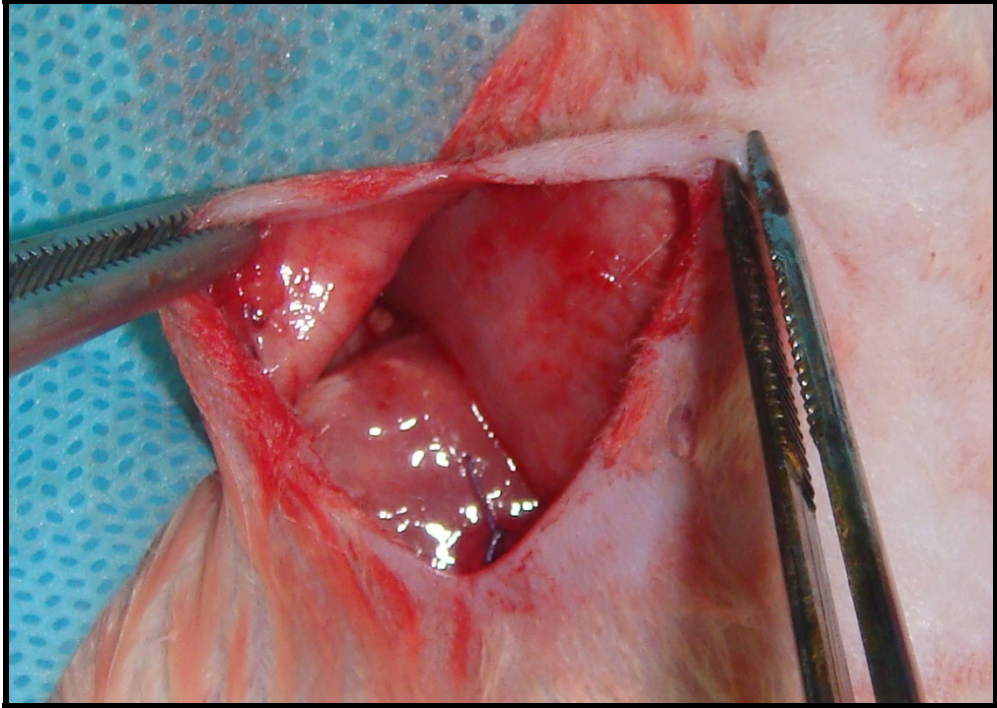
Resim 25: Yağ ve pannikulus dokusu içeren fleplerin elevasyonu



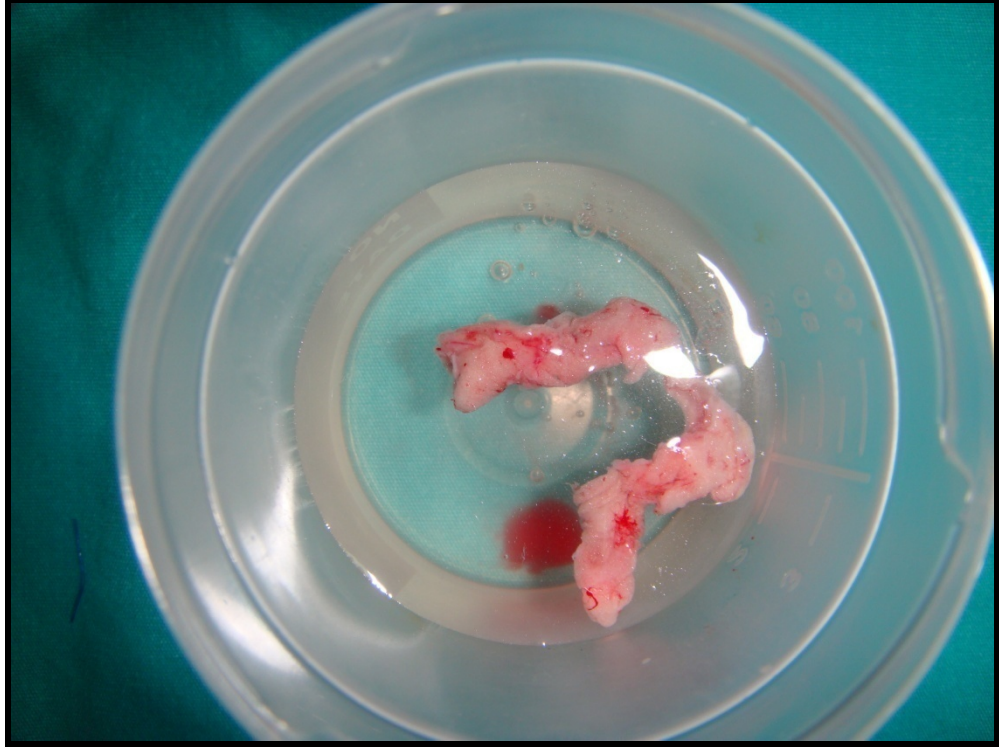
Resim 26: Yağ ve pannikulus dokusu içeren fleplerin elevasyonu (yakından görünüm)



Resim 27: SİEA bağlanması



Resim 28: Disseke edilen alanın kontrolü

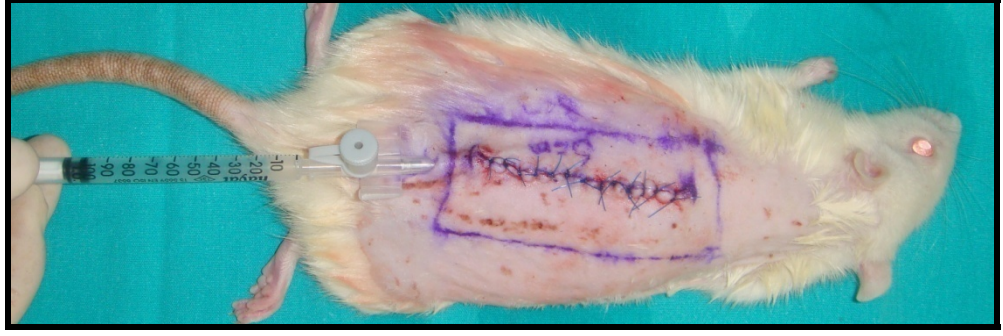


Resim 29: Alınan greftlerin %0,9 NaCl içinde saklanması

5.4. Gruplar

5.4.1. Grup 1

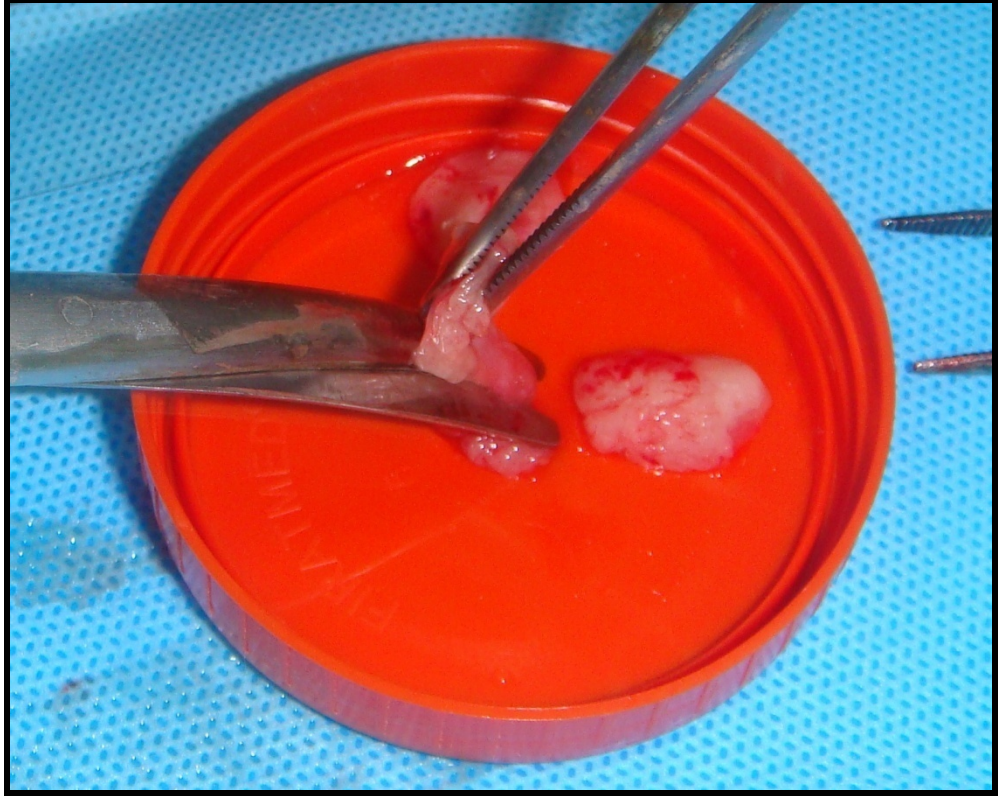
- On adet 250-280 gr Wistar ratlardan oluşmuştur.
- Işınlama panelinde 3 rat ışınlanmıştır.
- Işınlamadan 3 gün sonra 6 cm.lik dorsal cilt insizyonu yapılmıştır.
- İnsizyon ardından 8x3 cm. ışınlanmış alan diseke edilerek 16 G branül yerleştirilmiştir.
- Cildin sütüre edilmesi ardından branülden 1 ml. %0,9 NaCl enjekte edilmiştir (Resim 30).
- Branülün içinde sıvı kalmaması için 0,2 ml. hava enjekte edilerek branül çekilmiştir.
- Grup 1a olarak isimlendirilen 5 rat cerrahiden 14 gün sonra, Grup 1b olarak adlandırılan 5 rat cerrahiden 28 gün sonra sakrifiye edilmiştir (Şekil 9).



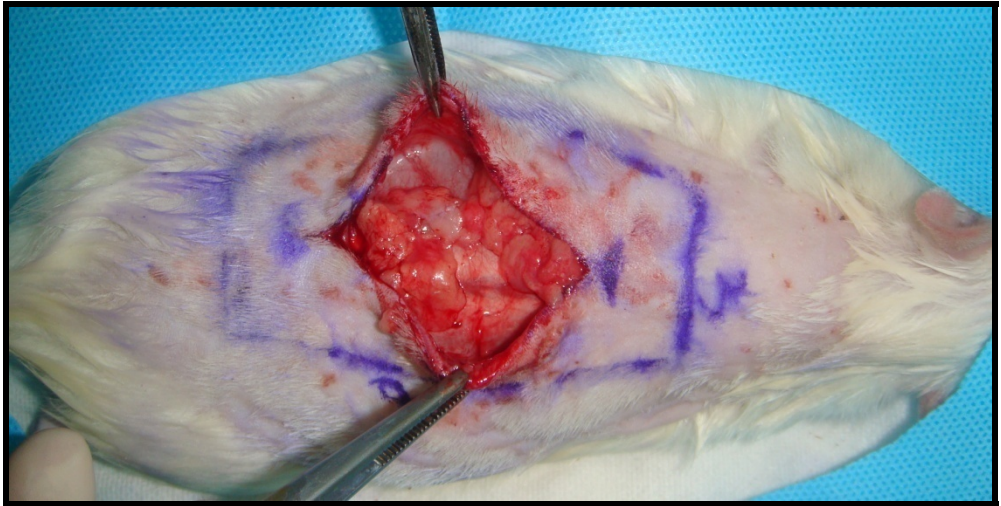
Resim 30: %0,9 NaCl verilmesi

5.4.2. Grup 2

- On adet 250-280 gr Wistar ratlardan oluşmuştur.
- Işınlama panelinde 3 rat ışınlanmıştır.
- Işınlamadan 3 gün sonra inguinal bölgelerden yağ grefti alınarak %0,9 NaCl içerisine koyulmuştur.
- Yağ grefti alım aşamasından sonra ratlar karın üstü pozisyonuna alınarak 6cm.lik dorsal cilt insizyonu yapılmıştır.
- Alınan yağ greftleri kesilerek küçük parçalar haline getirilmiştir (Resim 31).
- Küçük parçalar haline getirilen greftler diseke edilen alana yerleştirilerek cilt sütüre edilmiştir (Resim 32-33).
- Grup 2a olarak isimlendirilen 5 rat cerrahiden 14 gün sonra, Grup 2b olarak adlandırılan 5 rat cerrahiden 28 gün sonra sakrifiye edilmiştir (Şekil 9).



Resim 31: Alınan greftlerin küçük parçalara ayrılması



Resim 32: Yağ greftlerinin diseke edilen alana yerleştirilmesi

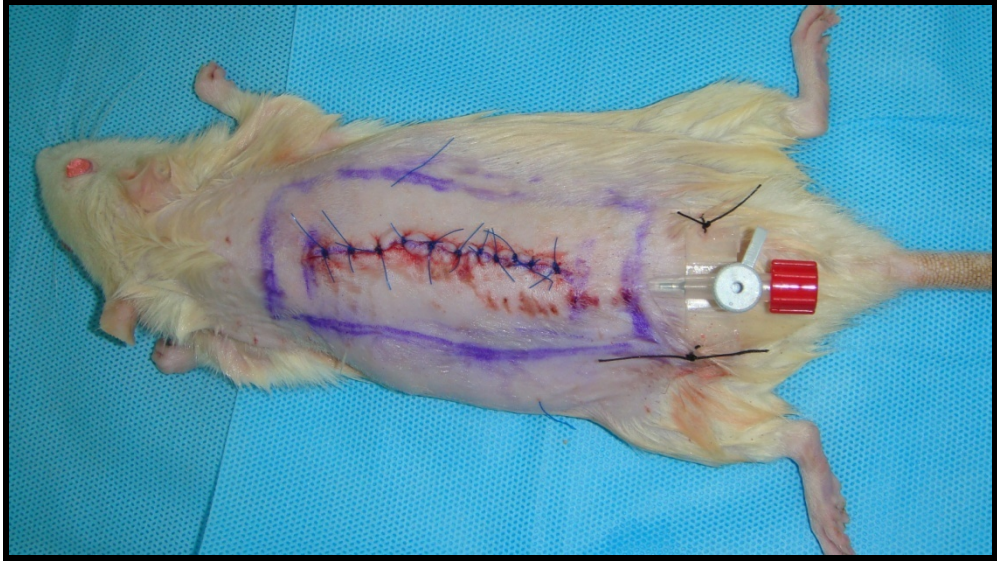


Resim 33: İnsizyonun suture edilmiş hali

5.4.3. Grup 3

- On adet 250-280 gr Wistar ratlardan oluşmuştur.
- Işınlama panelinde 3 rat ışınlanmıştır.
- Işınlamadan 3 gün sonra inguinal bölgelerden yağ grefti alınarak %0,9 NaCl içerisine koyulmuştur.
- Yağ grefti alım aşamasından sonra ratlar karın üstü pozisyonuna alınarak 6 cm.lik dorsal cilt insizyonu yapılmıştır.
- İnsizyon ardından 8x3 cm. ışınlanmış alan diseke edilerek 16 G branül yerleştirilmiştir.
- Branül 3/0 ipek suture ile tespit edilmiştir (Resim 34).
- Branülün ağzı kapak ile kapatılmıştır.
- Cilt suture edilerek ratlar elektrikli ısıtıcı karşısına alınmıştır.
- %0,9 NaCl içindeki yağ greftleri D.E.Ü.T.F Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na götürülmüştür.
- Laboratuvarda yağ greftlerinden yaklaşık 4-6 saat süren işlemler sonrasında stromal vasküler fraksiyon (SVF) elde edilmiştir.
- SVF, *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) solüsyonu ile 1 ml.'ye sulandırılarak enjektöre çekilmiştir (Resim 35).
- DMEM+SVF karışımından oluşan 1 ml. sıvı daha önce yerleştirilen branülden verilmiştir (Resim 36).

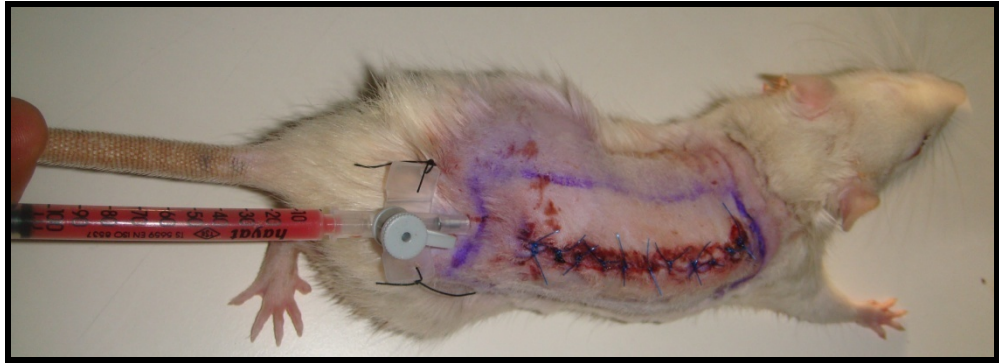
- Branülün içinde sıvı kalmaması için 0,2 ml. hava enjekte edildikten sonra tespit dikişleri alınarak branül çekilmiştir (Resim 37).
- Sıvının enjeksiyonu sırasında ratlarda anestezi etkinliğinin azaldığı görülmüştür.
- Branülün önceden yerleştirilerek tespit edilmesi aynı gün içinde ratlara 2. kez anestezi verme gereğini ortadan kaldırarak anesteziye bağlı ortaya çıkabilecek komplikasyon risklerini azaltmıştır.
- Grup 3a olarak isimlendirilen 5 rat cerrahiden 14 gün sonra, Grup 3b olarak adlandırılan 5 rat cerrahiden 28 gün sonra sakrifiye edilmiştir (Şekil 10).



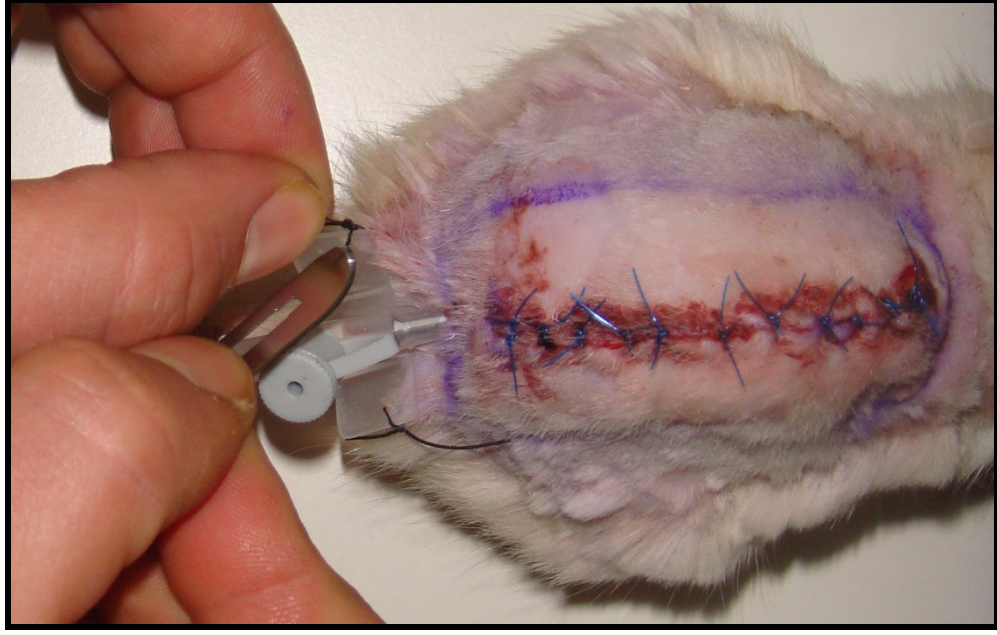
Resim 34: Branül fiksasyonu



Resim 35: DMEM+SVF



Resim 36: DMEM+SVF'in rata enjeksiyonu



Resim 37: Enjeksiyon ardından branülün çekilmesi

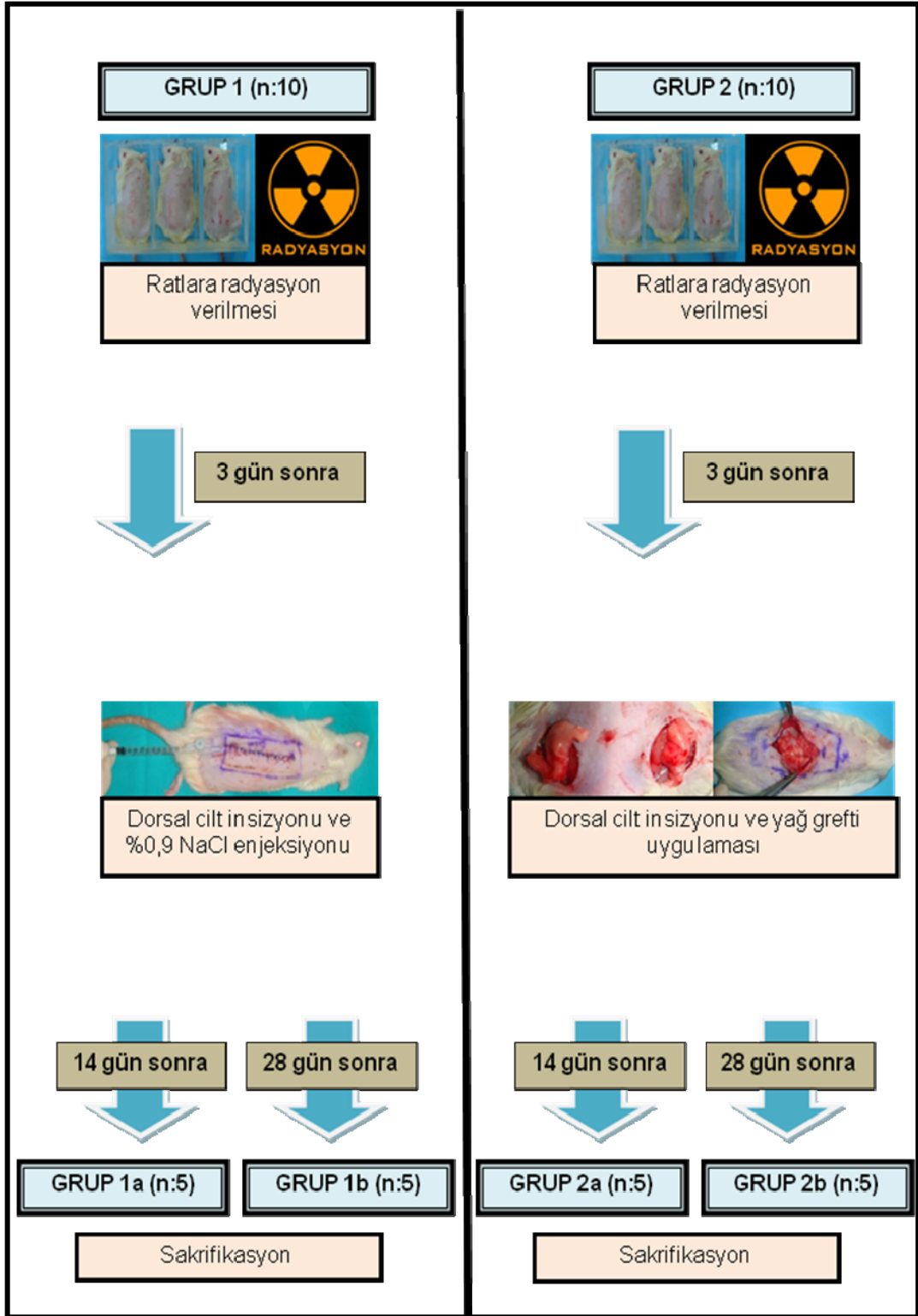
5.4.4. Grup 4

- On adet 250-280 gr Wistar ratlardan oluşmuştur.
- Üç rattın inguinal bölgesinden yağ greftleri alınarak %0,9 NaCl içinde D.E.Ü.T.F Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na götürülmüştür.
- Örneklerin karışmaması amacıyla ratların kulaklarına işaret koyulmuştur.
- Ratların ışınlanacağı zaman, hücre kültüründeki hücre sayısının artışına göre planlanmıştır.
- Kulaklarındaki işaretlere göre ışınlama paneline yerleştirilen 3 rat ışınlanmıştır (Resim 38).
 - ✓ Kulaklarda kesi yok ---- 1 numara
 - ✓ Tek kulakta kesi mevcut ---- 2 numara
 - ✓ İki kulakta kesi mevcut ---- 3 numara
- Işınlamadan 3 gün sonra 6 cm.lik dorsal cilt insizyonu yapılmıştır.
- İnsizyon ardından 8x3 cm. ışınlanmış alan diseke edilerek 16 G branül yerleştirilmiştir.

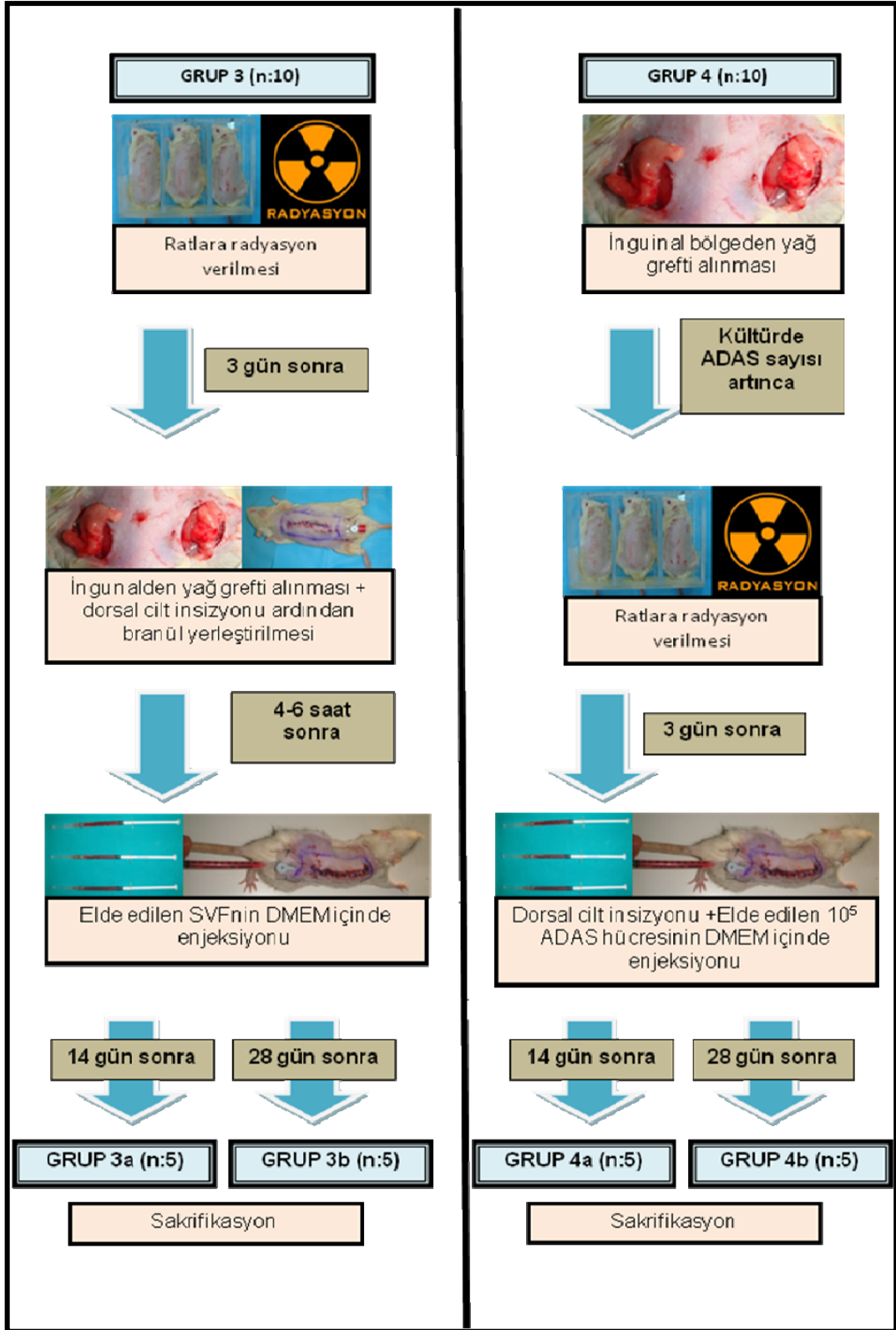
- Derinin sütüre edilmesi ardından branülden DMEM solüsyonu ile 1 ml.'ye sulandırılmış 10^5 adet ADAS verilmiştir.
- Branülün içinde sıvı kalmaması için 0,2 ml. hava enjekte edilerek branül çekilmiştir.
- Grup 4a olarak isimlendirilen 5 rat cerrahiden 14 gün sonra, Grup 4b olarak adlandırılan 5 rat cerrahiden 28 gün sonra sakrifiye edilmiştir (Şekil 10).



Resim 38: Kulakları işaretlenmiş ratların işınlama panelindeki konumları



Şekil 9: Grup 1 ve 2'nin şematik görünümü



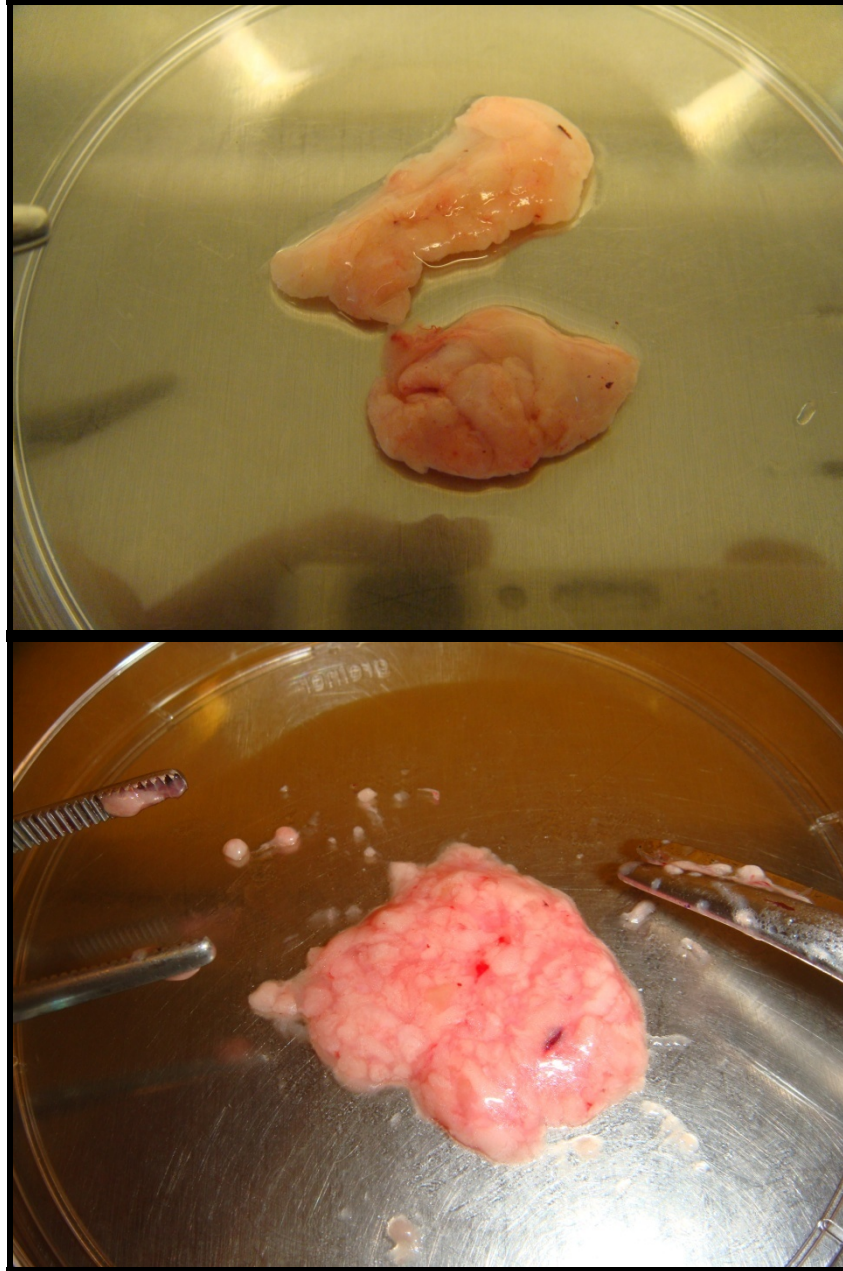
Şekil 10: Grup 3 ve 4'ün şematik görünümü

5.5. Yağ Greftinden SVF ve ADAS Elde Edilmesi

5.5.1. Yağ Greftinden SVF Elde Edilmesi

- Ratlardan alınan yağ greftleri %0,9 NaCl içinde numaralandırılarak D.E.Ü.T.F Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na götürülmüştür.
- Yağ dokuları petri kabında doku makası ile yaklaşık 1mm³ olacak şekilde küçük parçalara kıyılmıştır (Resim 39).
- Kıyılan yağ parçacıkları amfoterisin B, penisilin ve streptomisin içeren *Phosphate Buffer Saline (PBS)* solüsyonu ile yıkanmıştır.
- Yağ dokusunun sıvının üst fazında askıda kalıyor olmasından dolayı alttaki tüm sıvı uzaklaştırılmış ve işlem eritrositler makroskopik olarak azalana kadar 4 kez tekrar edilmiştir (Resim 40).
- Yağ dokusu üzerine enzimatik sindirim amacıyla %0,05 Tip II kollajenaz solüsyonu eklenmiştir (Resim 41).
- Enzimatik sindirimi hızlandırmak için kollajenaz eklenen materyal, sallamalı inkübatöre yerleştirilerek 37 °C de 2-3 saat çalkalanarak inkübe edilmiştir (Resim 42-43).
- İnkübasyon sonrasında (Resim 44) kollajenaz enzimini inaktive etmek için son konsantrasyon %10 olacak şekilde ortama fetal sığır serumu (FBS) eklenmiştir.
- Materyalin 4600 rpm hızında 10 dakika santrifüjü (Resim 45) ardından üstte kalan sıvı atılarak alttaki hücre pelleti ile çalışmaya devam edilmiştir (Resim 46).
- Hücre pelleti içindeki eritrositleri uzaklaştırmak için kullanılan sindirim solüsyonu aşaması optimizasyon çalışmalarımızda hücrelerimize zarar verdiği tespit edildiğinden elenmiştir.
- Hücre süspansiyonu önce 40 µm, sonra 100 µm çapa sahip hücre süzgeçlerinden geçirilerek büyük partiküller uzaklaştırılması sağlanmıştır. (Resim 47).

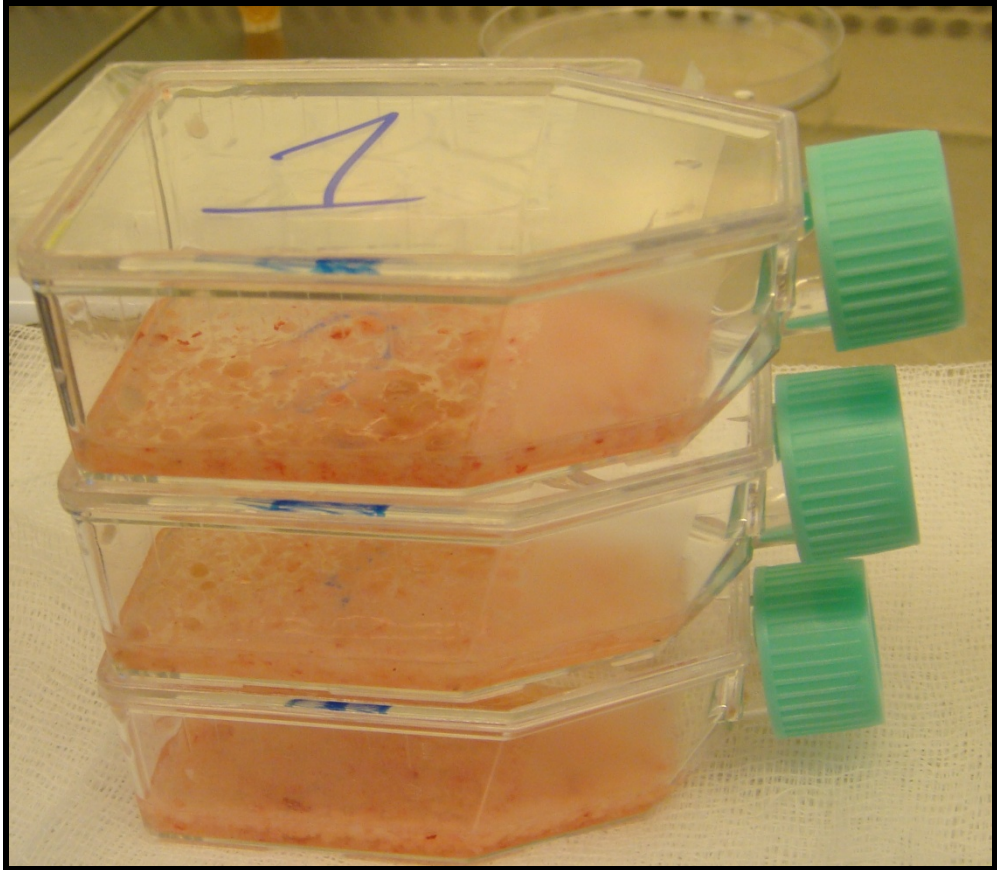
- SVF hücrelerinin çöktürülmesi için 4600 rpm hızında 5 dakika santrifüj yapılmıştır (Resim 48). Bu hücre süspansiyonunun üstte kalan sıvı kısmı atıldıktan sonra tüpün tabanında bulunan pellet, 1 ml. FBS içermeyen DMEM ortamında dilüe edilmiştir (Resim 49).
- Kayıpları engellemek için 1 ml. DMEM içerisindeki SVF insulin enjektörüne çekilmiş (Resim 35) ve hayvanlara verilmek üzere deney hayvanları laboratuvarına transferi sağlanmıştır.



Resim 39: Yağ greftlerinin petri kabında kıyılması



Resim 40: Yıkama sonrası askıda kalan yağ dokusu



Resim 41: Materyale kollajenaz ilave edilmesi



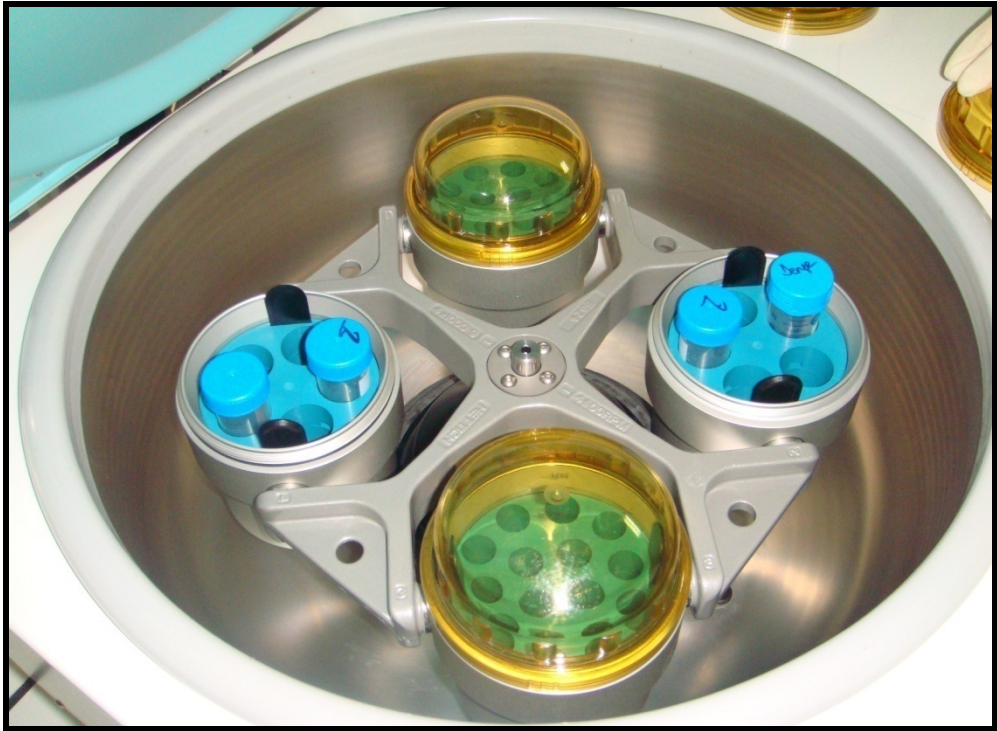
Resim 42: Sallamalı inkübatör



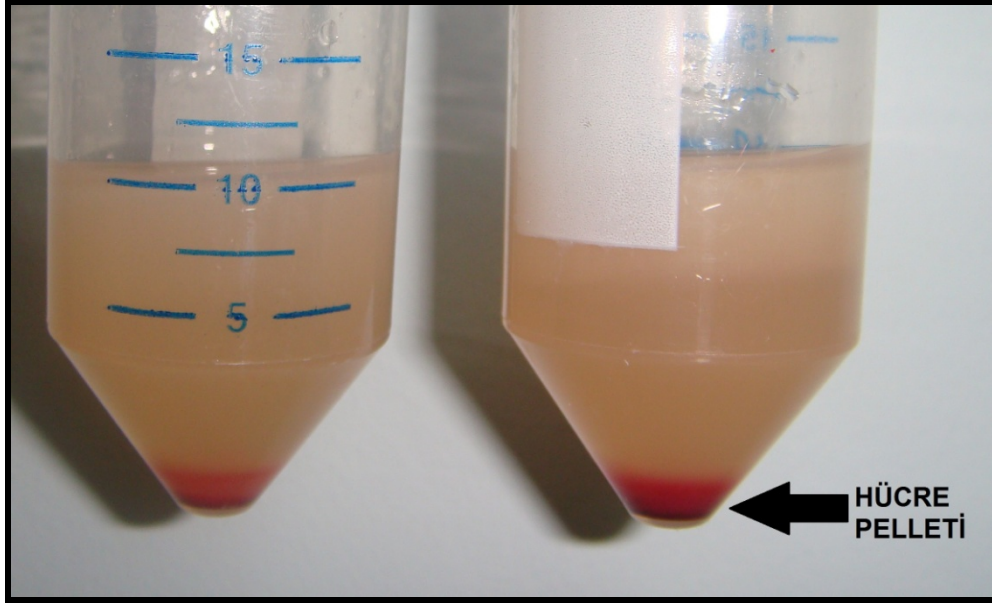
Resim 43: Kollajenaz eklenmiş materyalin sallamalı inkübatörde 37°C'de çalkalanması



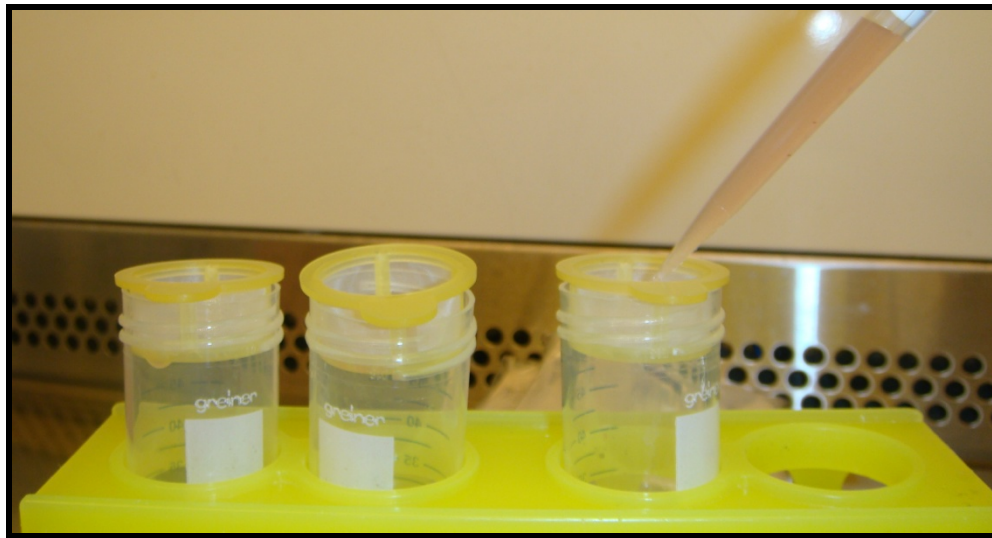
Resim 44: 2-3 saat çalkalama sonrası görünüm



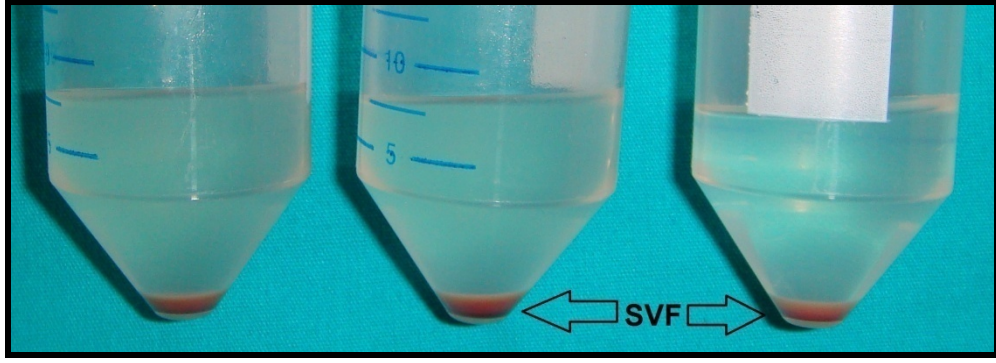
Resim 45: DMEM ile kollajenaz inaktive edilerek santrifüje alınması



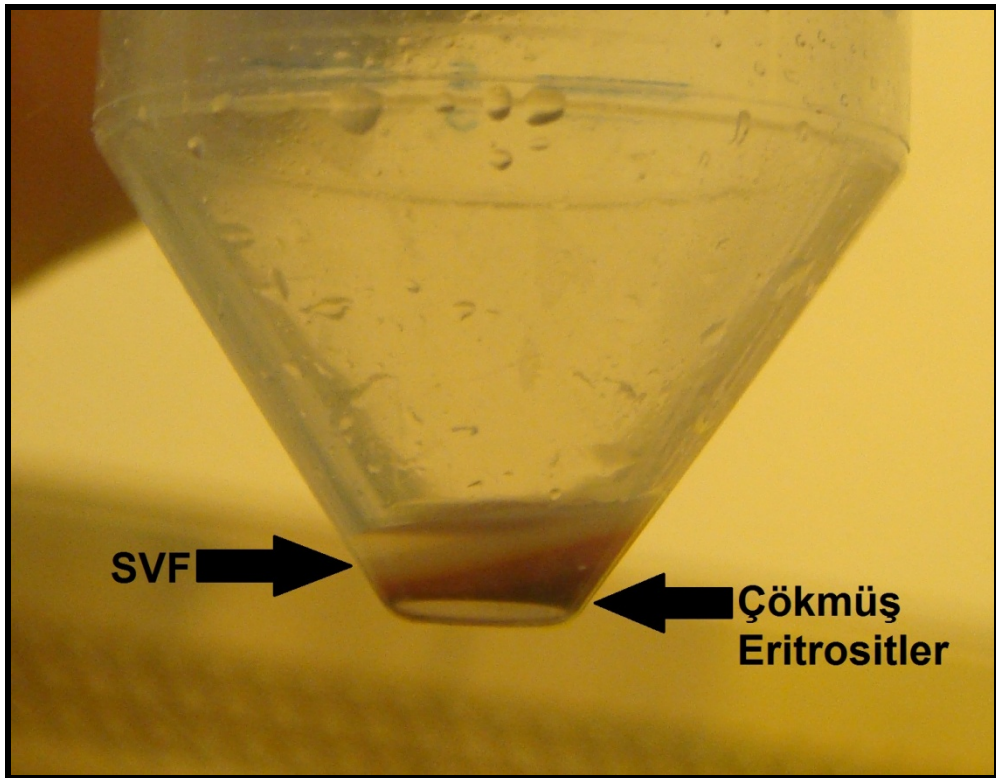
Resim 46: Santrifüj sonrası dibe çöken hücre pelleti



Resim 47: Hücre süspansiyonu önce 40 μm sonra 100 μm süzgeçlerden geçirilmesi



Resim 48: Santrifüj sonrası elde edilen SVF



Resim 49: Santrifüj sonrası elde edilen SVF ve çökmüş eritrositler

5.5.2. Kök Hücre Kültürü

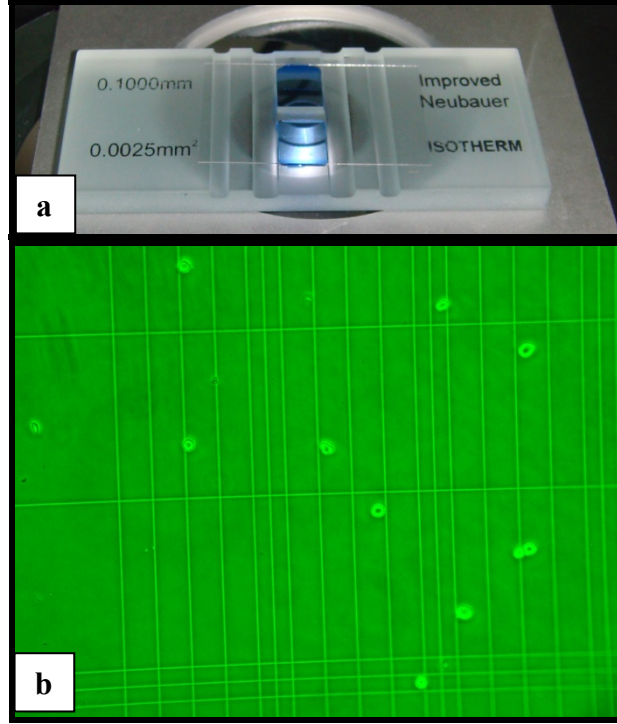
- Elde edilen pellet, 25 cm² hacimli filtrelı kapakları olan flasklara alınarak mezenkimal kök hücre büyüme ortamında kültüre edildi (Resim 50).
- Hücre yapışmasının tamamlanması yaklaşık 48 saat sürdü ve bu süre içinde flasklara müdahale edilmedi.

- Kültür ortamı 2-3 gün arayla değiştirilerek hücre ortamında taze büyüme kültür eklerinin devamlılığı ve hücre artık kimyasallarının uzaklaştırılması sağlandı.
- Hücreler % 70-80 yoğunluğa ulaştıkları zaman pasajlanarak alt kültürler kuruldu. Farklılaşma ve hücre yüzey belirteçleriyle kök hücreleri işaretleme çalışmalarında kullanılmak üzere erken pasajlardan hücreler ayrıldı.



Resim 50: Hücre kültürünün yapıldığı inkübatörün görünümü
a) Inkbatrn dışarıdan görünümü
b) Hücrelerin flask içinde inkbatrdeki görünümleri

- ADAS'lar sıçana verilmeden önce hemositometri ile sayıldı ve 10^5 hücre DMEM içerisinde sulandırıldı (Resim 51).
- İnsulin enjektörüne çekilen DMEM ortamındaki 10^5 hücre sıçanlara verilmek üzere deney hayvanları laboratuvarına transfer edildi.



Resim 51:Hücrelerin enjeksiyon öncesinde sayılması
a) Hemositometri lamı
b) Hücrelerin ışık mikroskopunda sayılması

5.5.2.1. Kök Hücrelerin Pasajlanması

- Petri kabının yüzeyine tutunan ADAS hücreleri, %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında ortamları uzaklaştırıldı ve ölü hücreler ile mezenkimal kök hücre ortamındaki artıklardan arındırmak için PBS ile yıkandı.
- Hücreler yapıştığı petri kabının plastik yüzeyinden ayrılana kadar %0,25 Tripsin/EDTA enzimine maruz bırakıldı.
- Daha sonra enzim aktivitesini durdurmak için %10 FBS içeren 8 ml. mezenkimal kök hücre ortamı ile pipetaj yapılarak aynı büyüklükte olan 2 adet flaska yeni ekim yapıldı.
- Ratlara hücre verilmesinden 1 gün öncesinde, flasklardaki hücreler Dil boyası (1, 1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) ile boyandı.
- Dil boyası hücre lipitlerine yapışan lipofilik bir takip boyasıdır. In-vitro ortamda 3 ay in vivo ortamda 1,5-2 ay flüoresan ışımalarını koruyabilen lipofilik bir ajanıdır.

5.5.3. Kök Hücrelerin In-Vitro Ortamda Gösterilmesi

- Kültüre edilen hücreler günlük olarak ışık mikroskobu altında takip edildi. %70-80 yoğunluğa ulaşıncaya pasajlandılar.
- Dil boyası ile boyanan hücreler immunfluoresan fotoğrafları çekildi. Hücrelerin çekirdekleri DAPI boyası ile tayin edildi.
- Hücreler in-vitro adipogenez ve osteogenez yönüne diferansiyasyon edilerek çok yönlü diferansiyasyon özelliği gösterildi.
- Hücrelerin yüzeyel işaretleyicilerden CD14, CD54, CD29 (İntegrin β 1) ve CD45 immunositokimyasal olarak ekspresyonu incelendi.

5.5.3.1. Hücrelerin Adipojenik Diferansiyasyon Özelliğinin Gösterilmesi

- Normal şartlarda büyütülmüş ADAS'lar en geç 3. pasajda %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak 24 kuyulu hücre kültür kaplarına 6×10^4 adet olacak şekilde ekildiler.
- İki gün bekleme ardından %100 yoğunluğa ulaşan hücrelere, ticari 'Adipogenez yönlendirici kit' (Chemicon® Cat. No. SCR020) içerisinde yer alan adipogenez indükleyici ve adipogenez sürdürücü ortamlar eklendi ve 21 gün sonunda adipojenik diferansiyasyonları değerlendirildi.
- Adipogenez indükleyici kültür ortamı 1., 3., 5., 9., 11., 13., 17., 19. ve 21. günlerde yenilendi ve ADAS'lar 7. ve 15. günlerde adipogenez sürdürücü ortama maruz bırakıldı.
- Kültür ortamı içerikleri aşağıdaki Tablo-2'de verilmiştir.

İÇERİK	Stok Konsantrasyonu	Değer	Son Konsantrasyon
Düşük glukoz içeren DMEM		4.4 mL	~ 90%
FBS		500 µL	10%
İnsulin	10 mg/mL	5 µL	10 µg/mL
Penisilin ve streptomisin	100X	50 µL	1X

Tablo 2: Adipojenik diferansiyasyon için kullanılan kültür ortamı içeriği

- Adipogeneze yönlendirilmiş ADAS'ların diferansiyasyonunun gerçekleştiği ışık mikroskopunda net bir şekilde gözlenmesine karşın, literatürde kabul edilmiş adiposit boyası olan red-oil boyası ile boyanarak yağ vakuolleri gösterildi.
- Boyama için hücre kültür ortamından uzaklaştırılan adipositler %4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu ile 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek fikse edildi.
- PBS'le yıkanıp PFA uzaklaştırıldıktan sonra red-oil boyası ile 50 dakika oda sıcaklığında boyama yapıldı.
- Su ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırılan boyanın ardından hematoksilen boyası ile çekirdekler boyandı.
- Hücre görüntüleri ışık mikroskopunda farklı büyütmelerde fotoğraflandı.

5.5.3.2. Hücrelerin Osteojenik Diferansiyasyon Özelliğinin Gösterilmesi

- Normal şartlarda büyütülmüş ADAS'lar en geç 3. pasajda %70 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak önceden vitronektin ve kollajen ile kaplanmış 24 kuyulu hücre kültür kaplarına 6×10^4 adet olacak şekilde ekildi.
- Kültür kapları kaplaması yapılırken her birinin son konsantrasyonu 12 µg/ml olacak şekilde kollajen ve vitronektin aynı steril PBS içerisinde çözüldü ve 24

kuyulu hücre kültür kaplarına eklendi. Gece boyunca oda sıcaklığında kaplama jellerinin donması bekledi. Bir sonraki gün hücreler bu jellerin üzerine ekildi.

- İki gün sonra %100 yoğunluğa ulaşan hücrelere, 'osteogenez yönlendirici kit' (Chemicon® Cat. No. SCR028) içerisinde yer alan osteogenez indükleyici ortam eklendi ve 21 gün sonunda osteojenik diferansiyasyonları değerlendirildi.
- Kültür ortamı içerikleri Tablo-3'te verilmiştir.

İÇERİK	Stok Konsantrasyonu	Değer	Son Konsantrasyon
Düşük glukoz içeren DMEM		8.7 mL	~ 87%
FBS		1 mL	10%
Deksametazon solüsyonu	1 mM	1 µL	0.1 µM
Askorbik asit-2-Fosfat solüsyonu	0.1 M	20 µL	0.2 mM
Gliserol 2-Fosfat solüsyonu	1 M	100 µL	10 mM
L-Glutamin	100X	100 µL	1X
Penisilin ve streptomisin	100X	100 µL	1X

Tablo 3: Osteojenik diferansiyasyon için kullanılan kültür ortamının içeriği

- Osteogenez indükleyici kültür ortamı 2 günde bir yenilendi.
- Osteogeneze yönlendirilmiş ADAS'ların diferansiyasyonunun gerçekleştiğinin gösterilmesi amacıyla Alizarin Red boyası kullanıldı ve hücreler arası kalsiyum depozitleri gösterildi.
- Boyama için hücre kültür ortamından uzaklaştırılan hücreler, fiksasyon amacıyla %70'lik etanol ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
- PBS ile yıkama ardından etanol ortamdan uzaklaştırıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika süreyle Alizarin Red boyası ile boyama yapıldı
- Boya, su ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı.
- Hücreler ışık mikroskopunda farklı büyütmelelerde incelendi ve görüntüleri fotoğraflandı.

5.5.3.3. Hücrelerin Yüzeysel İşaretleyicilerinin İmmunfluoresan Yöntemlerle Gösterilmesi

- Kültüre edilmiş ADAS'ların MKH olduğunu kanıtlamak için ayrıca MKH'lerden eksprese edilen ve edilmeyen ikişer adet yüzeysel işaretleyici immünohistokimyasal yöntemlerle gösterildi.
- Bu işlem için '*Rat spesifik MKH kiti*' (Chemicon® Catalog No. SCR026) içerisinde yer alan pozitif ekspresyonu beklenen CD29 (integrin) ve CD54 (ICAM-1) yüzeysel adezyon molekülleri ve negatif ekspresyonları beklenen hematopoetik hücre belirteçleri olan CD14 ile CD45 antikorlarını kullanıldı.
- İki gün sonra %70-80 yoğunluğa ulaşacak sayıda hücreler 8 kuyulu slaytlar üzerinde tasarlanmış hücre kültürü kapları içerisine ekildi
- Kültür süresinin ardından hücrelerin üzerinde büyütüldüğü tüm slaytlar %4 PFA ile 40 dakika fikse edildi.
- Bloklama için %5 eşek serumu içeren PBS kullanıldı. Sadece CD29 boyanacak slaytların bloklama solüsyonunun içerisinde permeabilizasyonu sağlayan %0,3 tritonX-100 kullanıldı.
- Tüm primer antikorlar kendi bloklama solüsyonları içerisinde dilüe edilerek gece boyunca +4°C'de antikor bağlanması gerçekleştirildi.

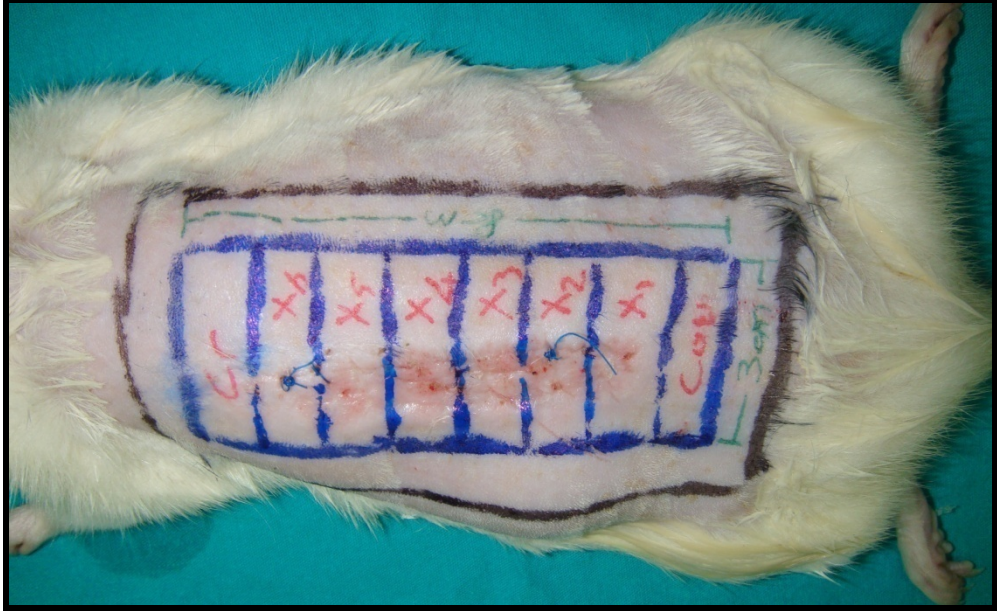
- Her antikor için, ayrı bir örnek üzerinde antikorun izole edildiği hayvanın immunglobulinleri negatif kontrol olarak kullanıldı.
- Bir gün sonra primer antikorlar PBS ile 5 defa, bloklama solüsyonu ile 2 defa 5'er dakika süreyle yıkandı.
- Primer antikorun elde edildiği hayvana spesifik olarak tanıma yapan flüoresan işaretli sekonder antikorlar 2 saat süreyle kullanıldı.
- Sekonder antikorları uzaklaştırmak için kullanılan PBS'in ardından flüoresan bir çekirdek boyası olan DAPI kullanıldı.
- Görüntüler farklı büyüklüklerde flüoresan mikroskopunda incelendi ve fotoğraflandı.

5.6. Değerlendirme

5.6.1. Sakrifikasyon Protokolü

- Gruplarda açıklandığı gibi ratlar cerrahi işleminden 14 veya 28 gün sonra sakrifiye edildiler.
- Sakrifikasyon sırasında dokudaki kanlanmayı gözlemlemek için ratlara 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi uygulandı.
- Makroskopik olarak ciltteki değişiklikler ve tüylenmedeki artış incelendi.
- Sırt bölgesi tıraşlanarak sütürler alındı.
- Skar hattı ortada olacak şekilde 8x3 cm.lik daha önce ışınlanmış alan belirlendi.
- Bu alan transvers olarak 3 cm. uzunluğunda ve 1 cm. genişliğinde 8 eşit parçaya ayrıldı.
- İçinde skarın olmadığı alanlar kraniyal (Cr) ve kaudal (Cau) olarak adlandırıldı.
- Skar içeren alanlar ise kaudalden kraniyale doğru x1, x2, x3, x4, x5 ve x6 olarak adlandırıldı (Resim 52-53).
- 8x3 cm.lik alanın 1 cm. lateralleri işaretlendi.
- İşaretlenen yerden kas fasyası üzerine kadar insizyon yapılarak dorsal cilt flebi sol lateral bazlı olarak eleve edildi.

- Eleve edilen flebin kanlanması ve skar etrafında kapiller damarların yoğunluğu incelendi.
- Flep 1 cm. genişliğindeki 8 eşit parçaya bölündü.
- Biyomekanik Araştırma Laboratuvarı'na götürölmek üzere x2, x4 ve x6 parçaları %0,9 NaCl içerisine koyuldu.
- Histomorfolojik inceleme için Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı'na götürölmek üzere kaudal, x1, x3, x5 ve kraniyal parçalar formole koyuldu.
- Örnek alımı bittikten sonra ratlar eter ile sakrifiye edildiler.



Resim 52: Sakrifikasyon protokolü



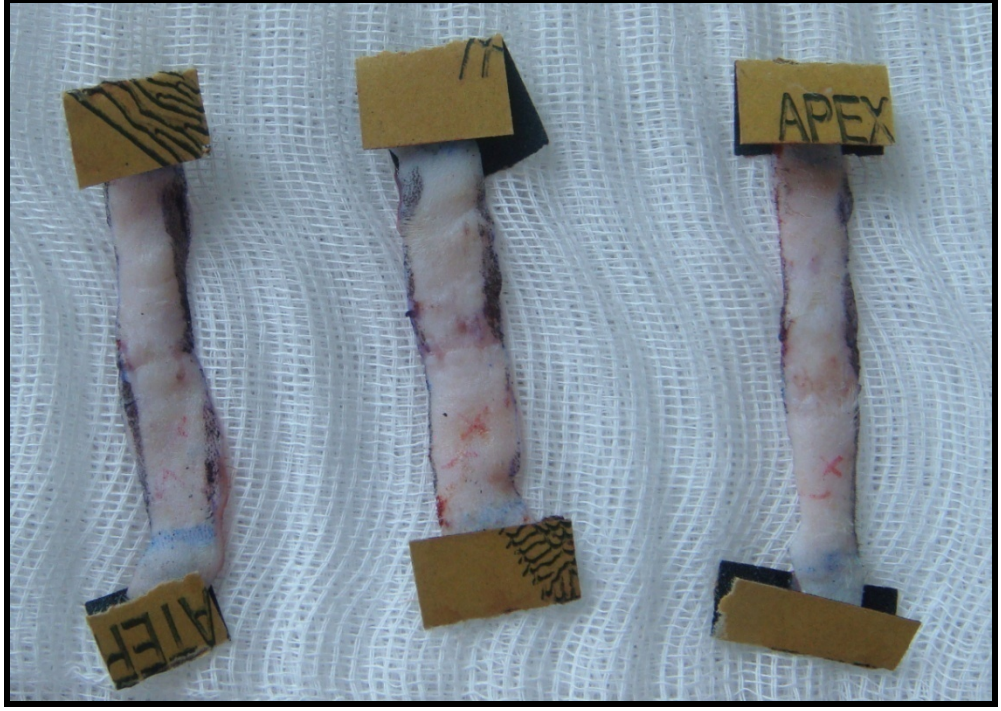
Resim 53: Sakrifikasyon protokolü

5.6.2. Doku Kopma Kuvveti (Breaking Strength) Testleri

- Sakrifikasyon sırasında alınan x2, x4, x6 parçaları %0,9 NaCl içerisinde 2-3 saat sonra Biyomekanik Araştırma Laboratuvarı'na ulaştırıldı.
- Doku kopma kuvvetini ölçmek amacıyla Shimatzu AG-10 isimli cihaz ve cihaza ait yazılım programı kullanıldı (Resim 54).
- Materyaller Shimatzu AG-10 cihazının uygun kısıkaçlarına yerleştirildi.
- %0,9 NaCl içerisinde çıkarılan materyaller tampon ile kurulandı (Resim 55).
- Materyallerin kısıkaçlardan kaymasını engellemek amacıyla sakrifikasyon esnasında 1 cm. laterallerden bırakılan dokuya zımpara kâğıdı yerleştirildi (Resim 55).
- Materyaller kısıkaçlara dengeli biçimde yerleştirildi ve 25,2 mm/dk hızında çekildi (Resim 56).
- Her bir parçanın kopma değerleri mN (millinewton) olarak kaydedildi.



Resim 54:Shimatzu AG-10



Resim 55: Materyallerin kurulanması ardından zımpara kağıdı takılması



Resim 56: x2 parçasına uygulanan doku kopma kuvveti (breaking strength) testi

5.6.3. Histomorfolojik Analiz

5.6.3.1. Histolojik inceleme için preperatların hazırlanması

- %10'luk formaldehit ile tespit edilen doku örnekleri, fiksatifin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı.
- Yıkanan örnekler dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'den %95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi.
- Yirmişer dakika 4 değişim aseton solüsyonlarından geçirilen örnekler 2 değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu.
- Etüv içerisinde 60°C'de 2 değişim parafin uygulanarak 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisinde gömüldü.
- Parafin bloklardan inceleme yapmak amacıyla mikrotom aracılığı ile 5µm'lik kesitler alındı.

5.6.3.2. Preperatların Hematoksilen-Eosin ile boyanması

- Mikrotom (Leica, RM 2255) aracılığı ile alınan 5µm'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 20'şer dakika süreyle üç değişim ksilole uygulandı.
- Dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkandı.
- On dakika hematoksilen (Surgipath, 01562E, Bretton, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda tekrar yıkanan kesitler, 2 dakika eosin (Surgipath, 01602, Canada) boyası ile boyandı.
- %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirildikten sonra havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (Merck 1.07961.0100, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

5.6.3.3. Preperatların Masson Trikrom ile boyanması

- Masson's Trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) kullanıldı.
- Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı.
- Birinci kesit 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu.
- Kesitler rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi.
- Akarsuda 5 dakika bekletilen kesitlerin üzerine Masson Trikrom boyama seti içerisinde bulunan Weigert hematoksilen boyasından ve ferrik klorür çözeltisinden 8'er damla damlatılması ardından 20 dakika beklendi.
- Distile su ile yıkama ardından 8 damla asit-alkol çözeltisi uygulandı ve 1 dakika bekleme ardından kesitler distile suyla iyice yıkandı.
- Kesitin üzerini tamamen kaplayacak şekilde 8 damla Ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi uygulanarak 5 dakika beklendi.
- Beş dakika bekleme ardından 1 ml stok asit çözeltisi ve 29 ml distile su ile hazırlanan asitli su ile preparatlar yıkandı.
- Preperatlar üzerine 8 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası uygulanarak 20 dakika beklendi ve asitli su ile yıkandı.
- Sekiz damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyama ardından akarsu altında yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi.
- Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra preparatlar entellan ile kapatıldı.

5.6.3.4. Preperatların immunhistokimyasal yöntemler ile boyanması

- VEGF (Santa Cruz, sc-65617), TGF- β (Abcam, ab-66043) ve Pro-Kollajen IA1 (Santa Cruz, sc-25973) immunhistokimyasal boyalar ve immunreaktivitelerinin gösterilmesi amacıyla tavşan antikoları kullanıldı.

- İmmunohistokimyasal inceleme için 60°C lik etüvde 1 gece ve ksilolde 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edildikten sonra 10 dakika distile su ile yıkandı.
- Dokuya zarar vermeden kurulama ardından dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandı.
- Tripsin (00-3008, Digest All 2A, Zymed, San Francisco, U.S.A) solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük hidrojen peroksit uygulandı.
- Üç defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında bloklama solüsyonu (İnvitrogen, Histostain- Plus Broad Spectrum, 85-9043) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan antikorlar ile bir gece +4°C'de enkübe edildi.
- Fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum 85-9043) ile 30 dk enkübe edildi.
- PBS solüsyonu ile yıkama yapıldıktan sonra peroksidaz enzimiyle işaretli avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum 85-9043) 30 dakika uygulandı.
- Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) (1718096, Roche) kullanıldı.
- Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı.
- Değişik derecelerde alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

5.6.3.5.Histomorfolojik sonuçların değerlendirilmesi

- Histolojik bulgular semikantitatif yöntem ile skorlandı.
- Bu skora yapılırken epidermal ve dermal iyileşme, granülasyon dokusu artışı, bağ doku artışı ve anjiyogenez değerlendirildi.⁶⁴
- Histolojik skora Tablo 4'te verilmiştir.

Skorlama	Epidermal ve dermal rejenerasyon	Granulasyon dokusu oluşumu ve bağ doku artışı	Anjiyogenez
0	Çok az epidermal ve dermal organizasyon	Kalın granulasyon dokusu ve çok bağ doku artışı	Zayıf anjiyogenez
1	Az epidermal ve dermal organizasyon	Orta granulasyon dokusu ve orta bağ doku artışı	Yeni şekillenen çok az sayıda kapiller
2	Orta epidermal ve dermal organizasyon	Az granulasyon dokusu ve az bağ doku artışı	Yeni şekillenen orta sayıda kapiller
3	Tam epidermal ve dermal organizasyon	Çok az granulasyon dokusu ve çok az bağ doku artışı	Yeni şekillenen çok sayıda kapiller

Tablo 4: Histolojik Skorlama

- VEGF, TGF- β ve Tip-1 Prokollajen immunreaktiviteyi semikantitatif yöntem ile değerlendirildi.
- İmmunhistokimyasal skorlama Tablo 5'te verilmiştir.

Skorlama	Boyanma
0	Yok
1	Az
2	Orta
3	Yoğun

Tablo 5: İmmunhistokimyasal Skorlama

5.6.4. İstatiksel Analiz

- Doku kopma testi sonuçları, histolojik ve immunhistokimyasal semikantitatif skorlama sonuçları istatistiksel olarak analiz edildi.
- Gruplara ait değerler ortalama±Standart sapma olarak verildi.
- Gruplar arası farklılıklar One-Way ANOVA testi ile gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Post-hoc Bonferroni düzeltmeli testi ile analiz edildi.
- İstatistiksel analiz için, Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Version 15.0 for Windows (SPSS Inc, USA) adlı bilgisayar programı kullanıldı.
- $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1-Ratların Sağkalımı

Çalışmaya 48 adet 250-280 gr. ağırlığında Wistar ratlar ile başlandı. Radyasyon verilmesi sonrasında rat kaybı izlenmedi.

Üç adet ratın cerrahi sonrası kaybedilmesi üzerine cerrahi işlemler sıcak pakeler üzerinde yapıldı ve cerrahi sonrası elektrikli ısıtıcı kullanıldı. Bu uygulamalardan sonra cerrahi sonrası toplu kayıp gözlenmedi.

Yağ grefti alınan bir ratın inguinal bölgesinde enfeksiyon gelişmesi üzerine çalışma harici bırakılarak sakrifiye edildi.

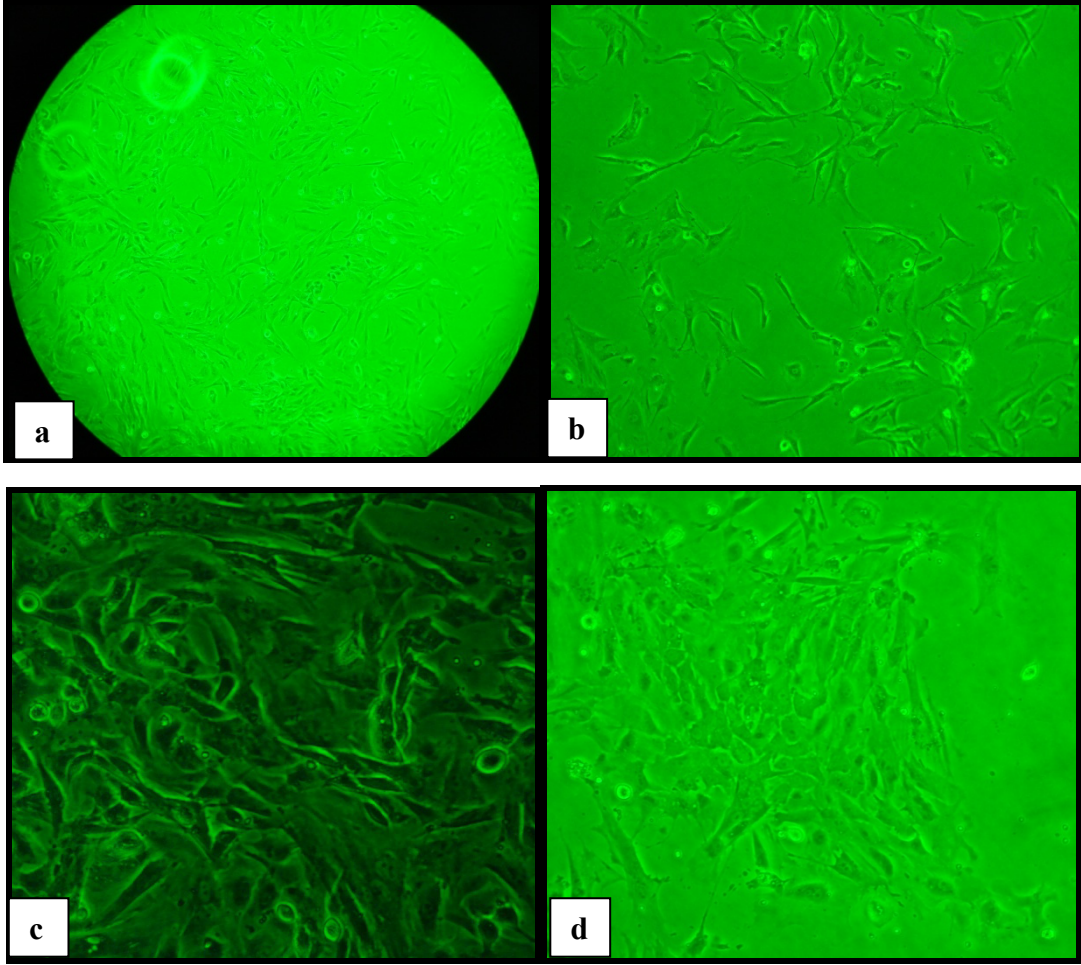
Farklı zamanlarda yapılan cerrahiler sonrası 4 adet rat kaybedildi. Sonuç olarak çalışma 40 adet rat ile tamamlandı. Radyasyon uygulamaları ve cerrahi uygulamalar sonrasında ratlarda hareket kısıtlılığı, beslenme yetersizliği ve kilo kaybı izlenmedi.

6.2. Kök Hücrelerin In-Vitro Ortamda Gösterilmesi

6.2.1. Kök Hücrelerin Işık Mikroskopunda Takibi

Grup 4'te elde edilen kök hücreler günlük olarak ışık mikroskopu ile izlendi ve %70-80 yoğunlukta oldukları grldğinde pasajlandı. On adet rattan elde edilen ADAS'lar ortalama 3 günde bir pasajlandı. Tüm örneklerden 2-3 pasaj sonrası (6-9 gün) 10^5 adet ADAS elde edildi.

Elde ettiğimiz ADAS'lar ve ticari olarak satın alınan rat mezenkimal kök hücreleri ışık mikroskopu altında fibroblastlara benzer görünümde oldukları izlendi. Hücrelerin erken dönemde koloniler şeklinde yerleştikleri gözlendi (Resim 57).

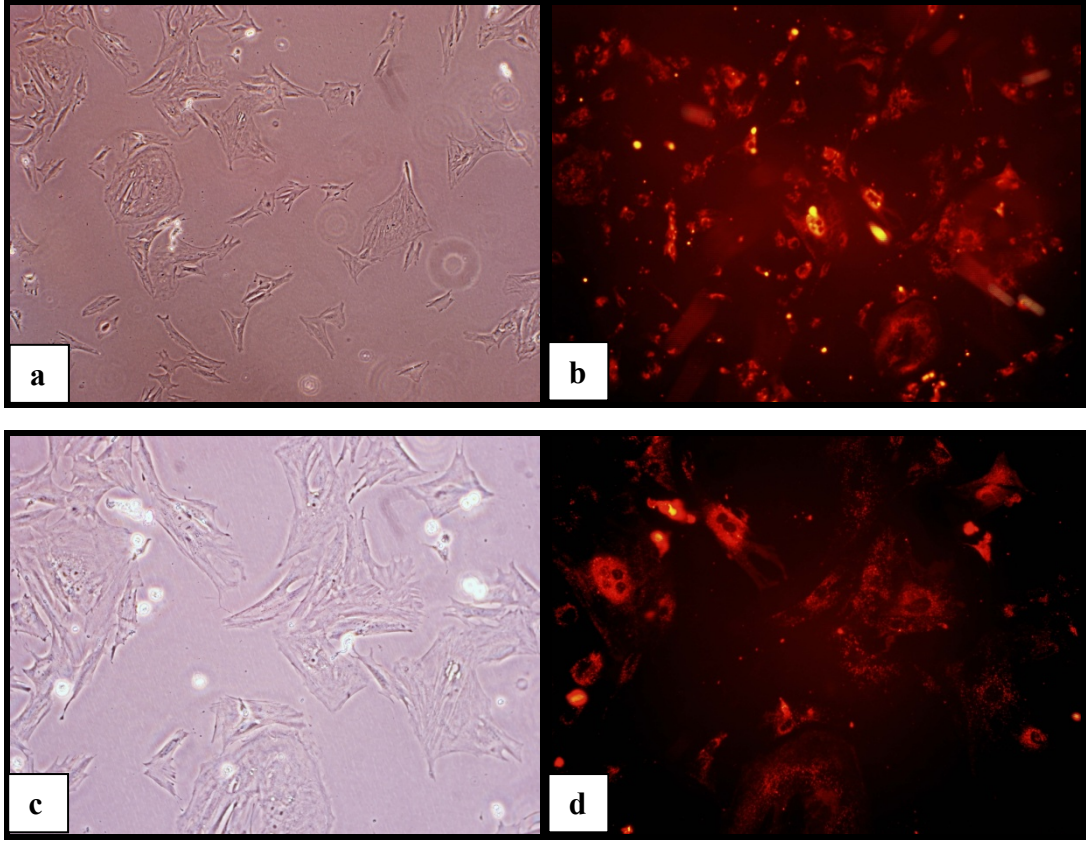


Resim 57: ADAS'ların ışık mikroskopunda görünüşleri a) 10X büyütmede izlenen ADAS'lar b) Ticari rat mezenkimal kök hücreleri c) 40X büyütmede izlenen ADAS'lar d) Koloni oluşturan ADAS'lar

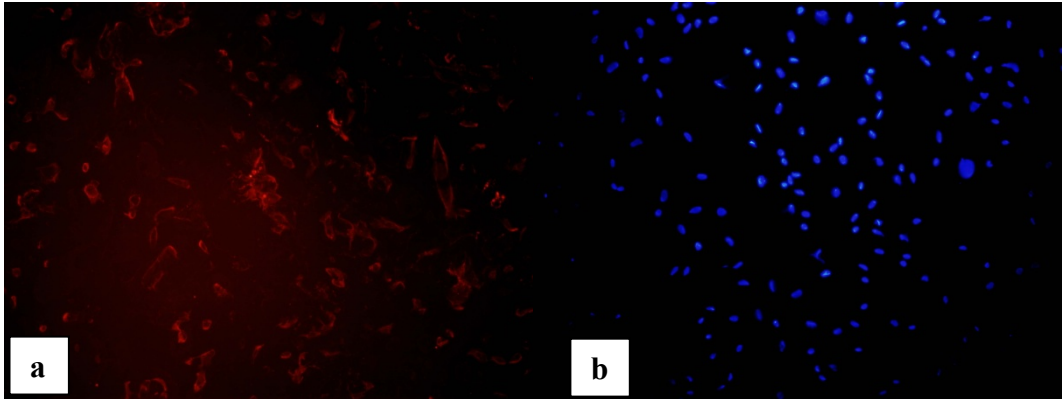
6.2.2. Kök Hücrelerin İmmunfluoresan Mikroskopunda Takibi

Grup 4'te hücre kültürü ardından hücreler Dil boyası ile boyanmıştır. In-vitro ortamda bu hücrelerin çekirdekleri DAPI boyası ile immunfluoresan mikroskop altında gözlenmiştir (Resim 58).

Dil ile boyanan hücrelerin immunfluoresan mikroskop altında ışımaya yaptığı saptandı. DAPI boyası ardından ışımaya yapan hücrelerin çekirdekleri mavi renkte gözlemlendi (Resim 59).



Resim 58: In-vitro ortamda Dil ile boyanan hücrelerin görüntüleri
a-c) Işık mikroskobunda hücrelerin görüntüleri
b-d) İmmunfluoresan mikroskopta Dil ile boyanan hücreler kırmızı renkte ışıdamaları

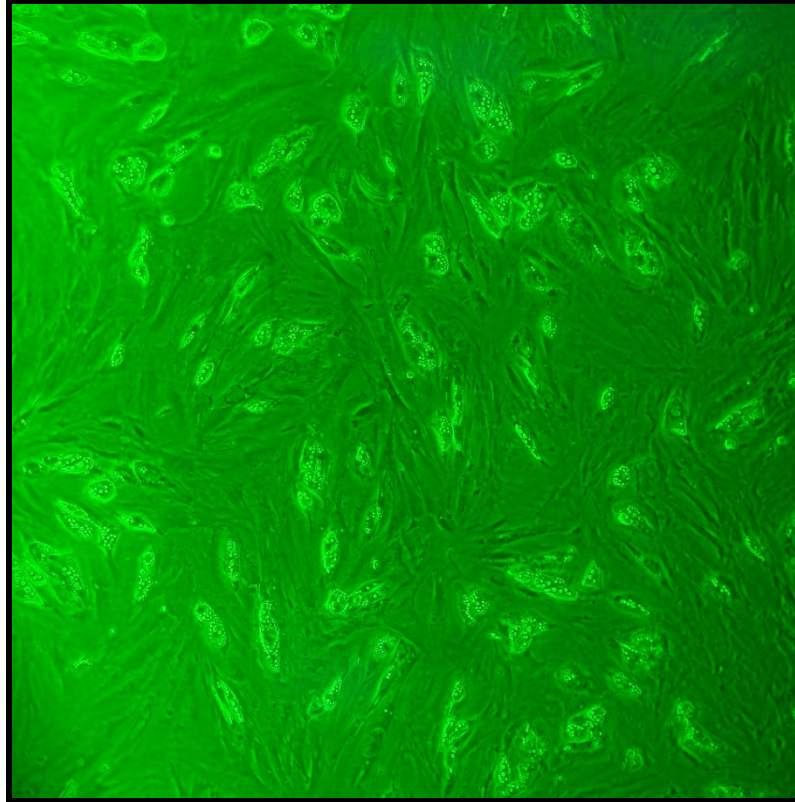


Resim 59: In-vitro ortamda Dil ve DAPI ile boyanan hücrelerin görüntüleri
a) Kırmızı flüoresan veren Dil ile boyalı ADAS'lar
b) Aynı hücrelerin çekirdeklerinin DAPI boyası ile gösterilmesi

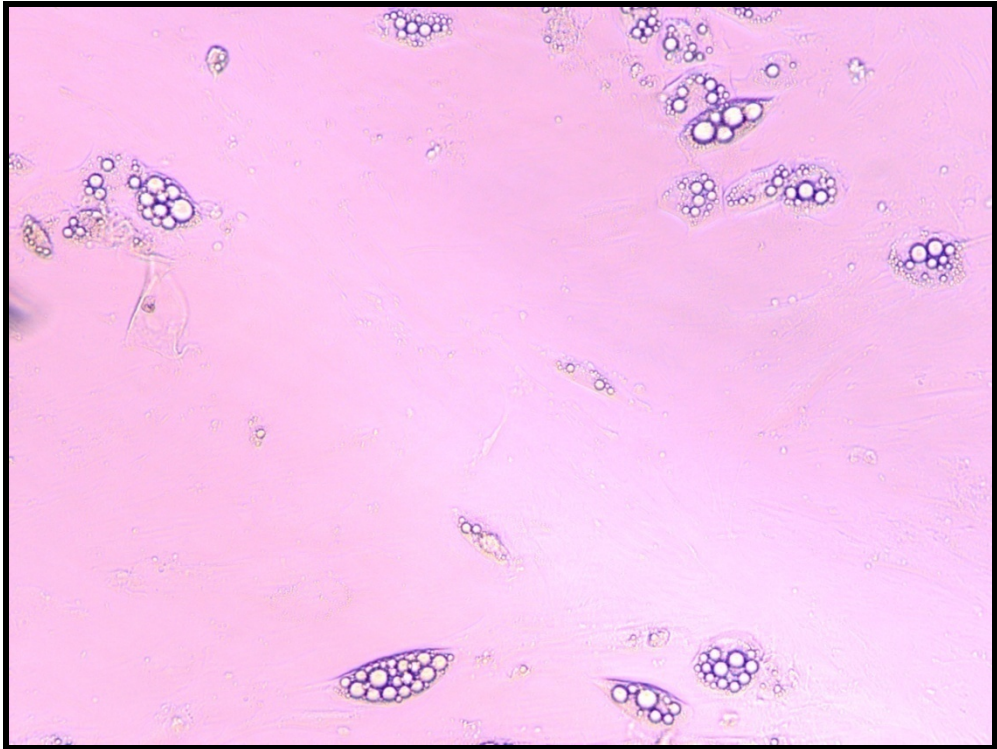
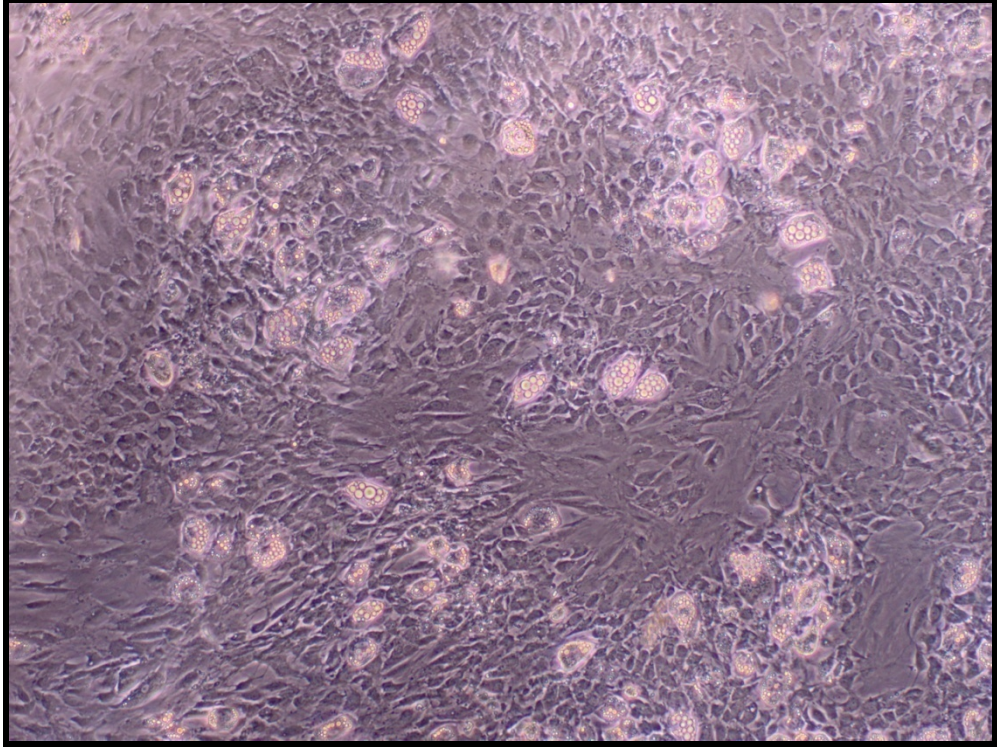
6.2.3. Kök Hücrelerin Adipojenik Diferansiyasyonu

ADAS'ların çok yönlü diferansiyasyon özelliğini göstermek amacıyla Grup 4'te ratlara verilen kök hücrelerin randomize olarak 5 tanesinden bir miktar örnek ayrıldı. Bu rneklerdeki ADAS'lar in-vitro ortamda adipogeneze yönlendirilerek yağ hücrelerine diferansiye edildi. Diferansiyasyon sonrasında rnekler Red-oil boyasıyla boyanarak gösterildi.

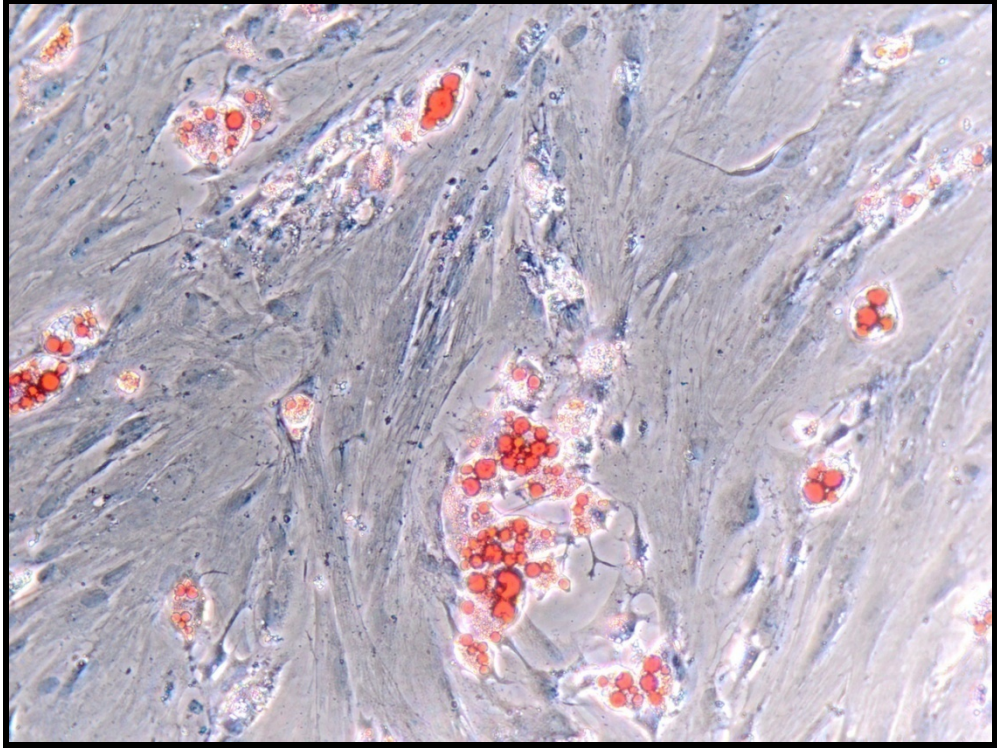
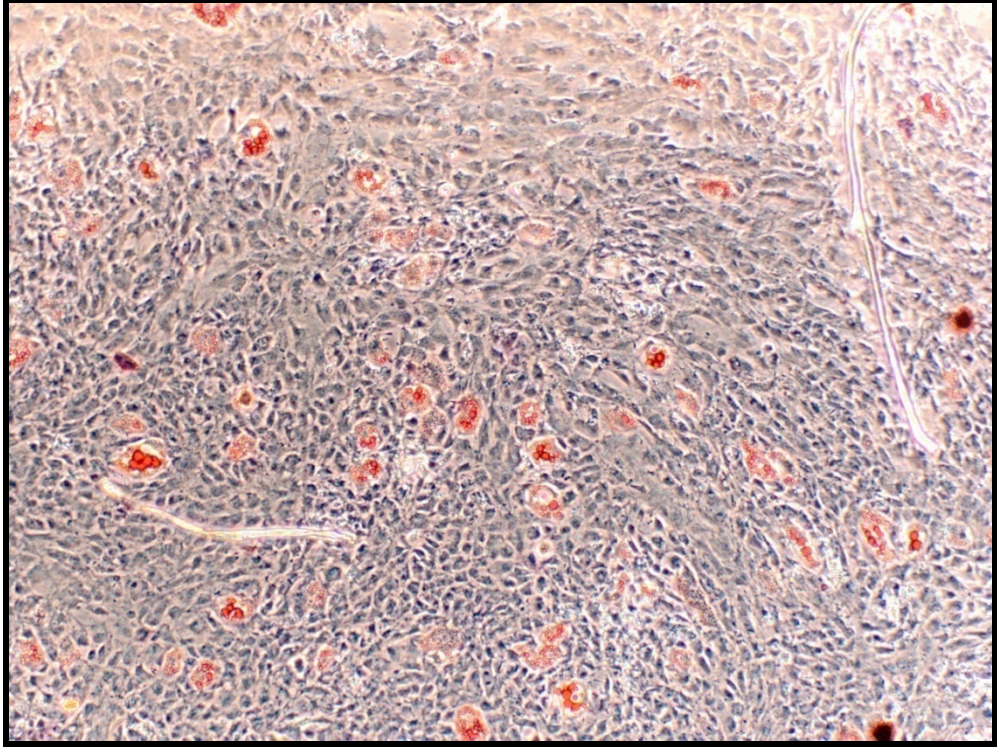
Işık mikroskobu altında 10. günden sonra diferansiye olan hücrelerin sitoplazmalarında yağ vakuolleri izlenmeye başlandı (Resim 60). Bu vakuollerde 21. gün sonunda artış izlendi (Resim 61). Red-oil ile boyanarak bu vakuollerin yağ olduğu gösterildi (Resim 62-63). Diferansiye edilen ticari rat mezenkimal kök hücreleri ile karşılaştırıldığında benzer grnmde hücreler olduğu izlendi. Adipojenik diferansiyasyon uygulanan 5 örnekte de hücrelerin adipogenez yönünde diferansiyasyon kapasiteleri olduğu gösterildi (Resim 64-65).



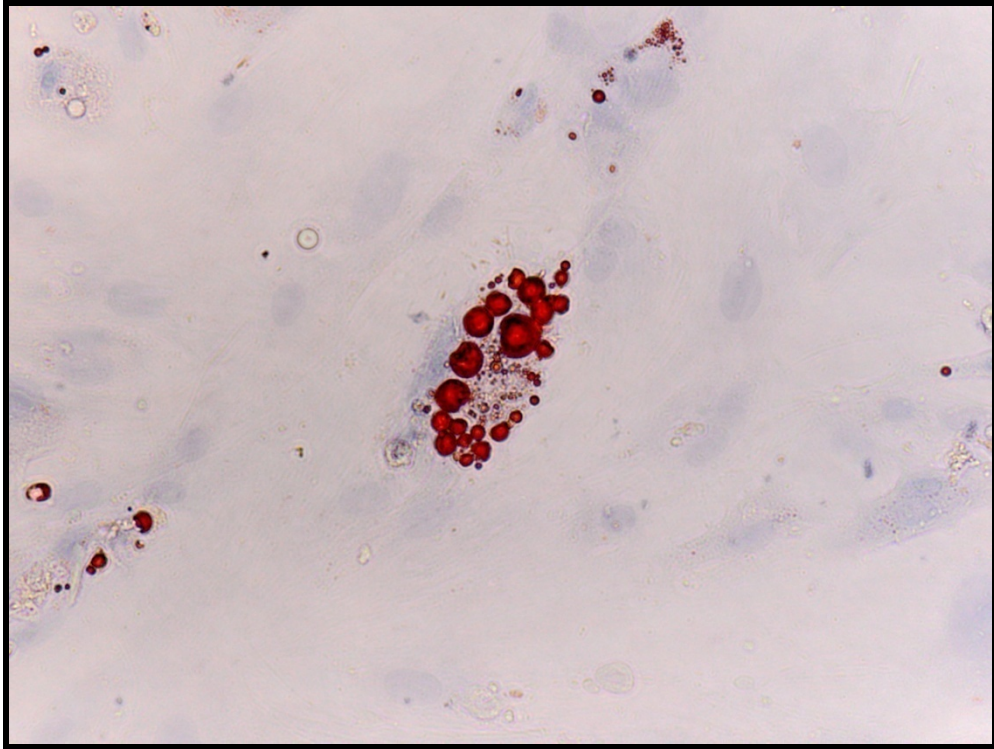
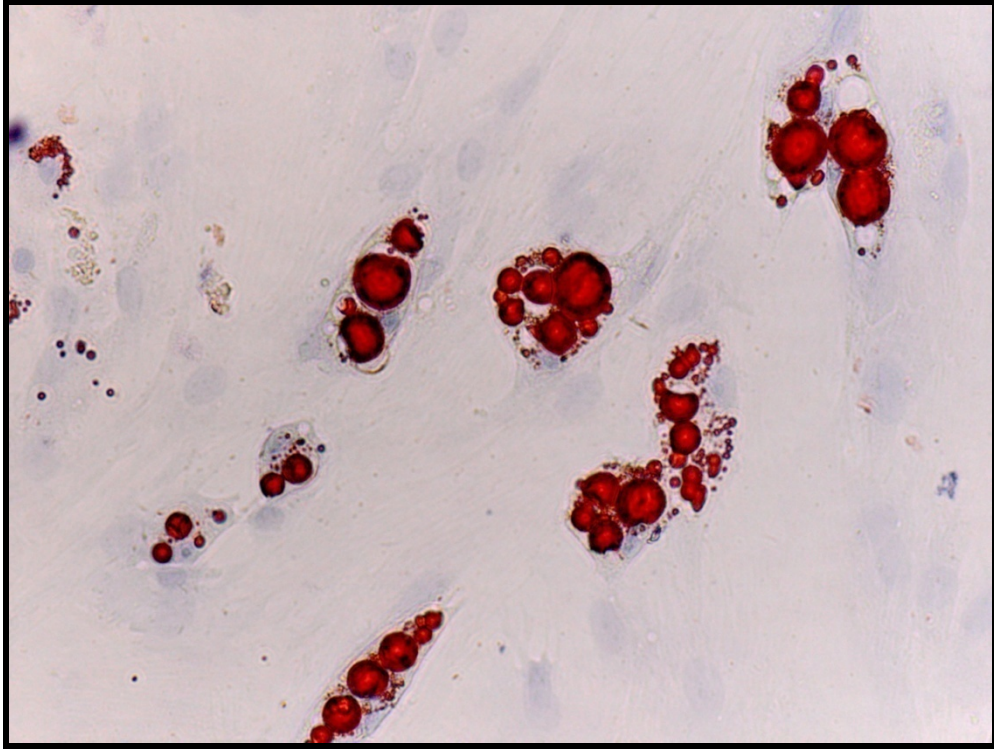
Resim 60: Adipojenik diferansiyasyonunun 10. gününde işık mikroskobunda vakuollerin grnmleri



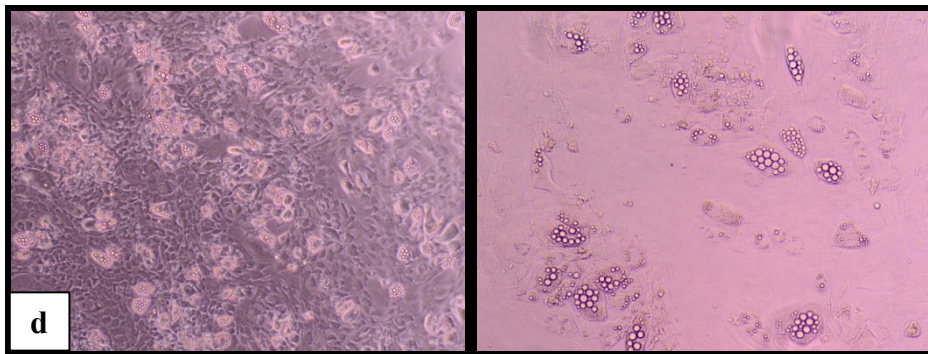
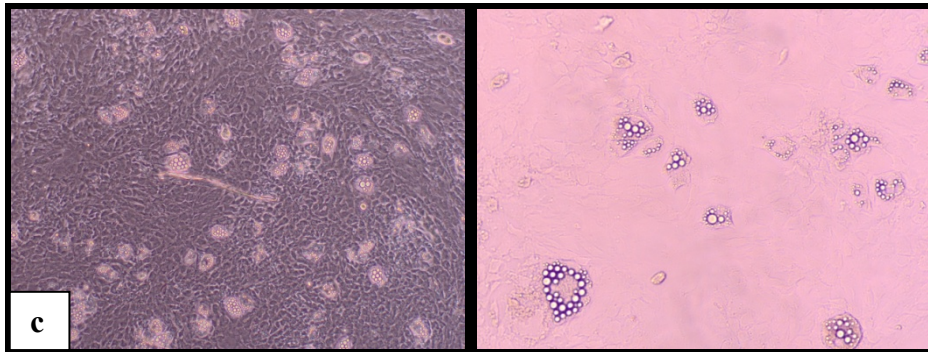
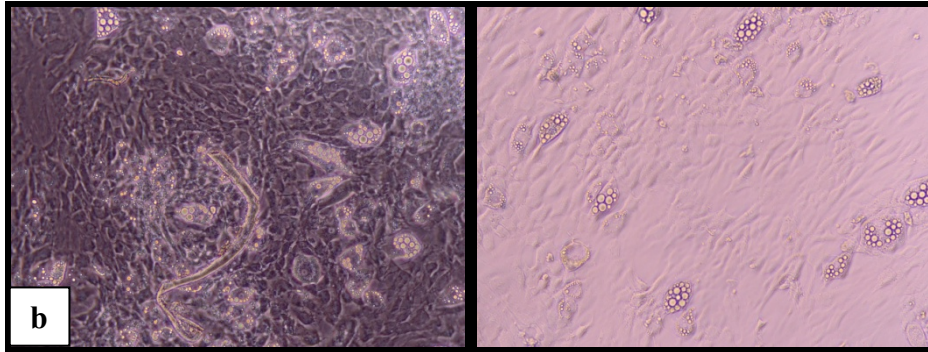
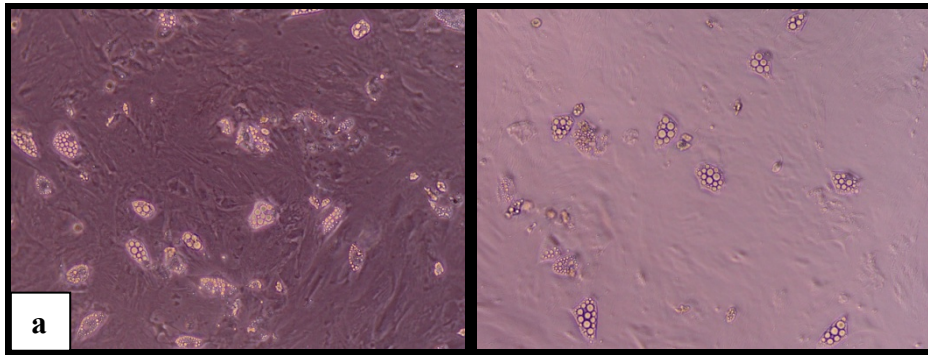
Resim 61: Adipojenik diferansiyasyonunun 21. gününde ışık mikroskopunda vakuollerin görünüşleri

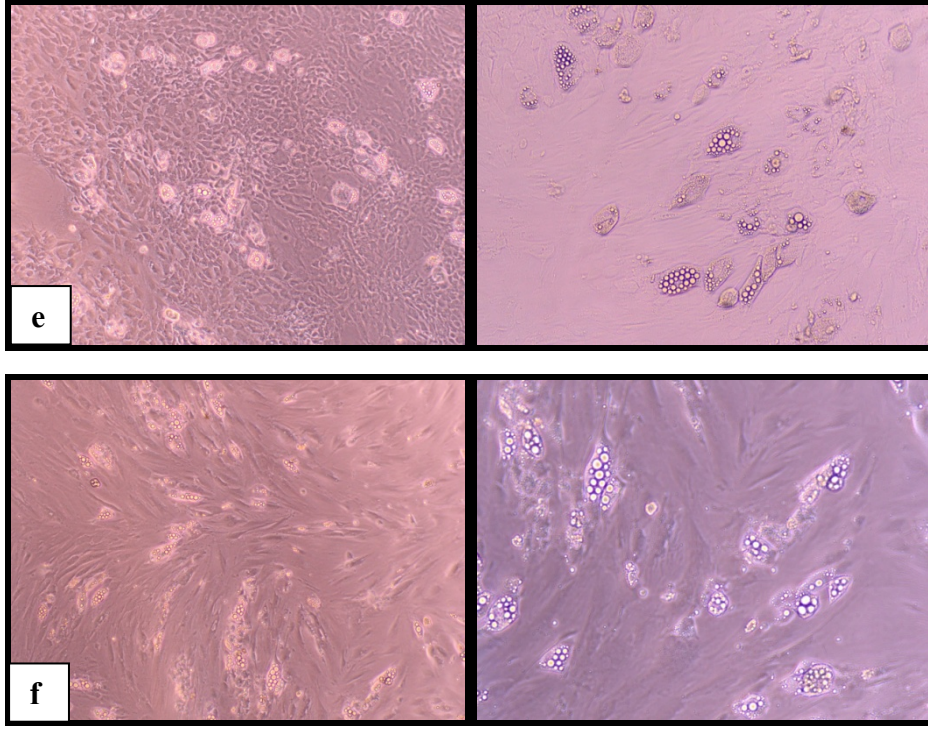


Resim 62: Adipojenik diferansiyasyonunun 21. gününde Red Oil ile boyama ardından vakuollerin kırmızı renkte görünüşleri



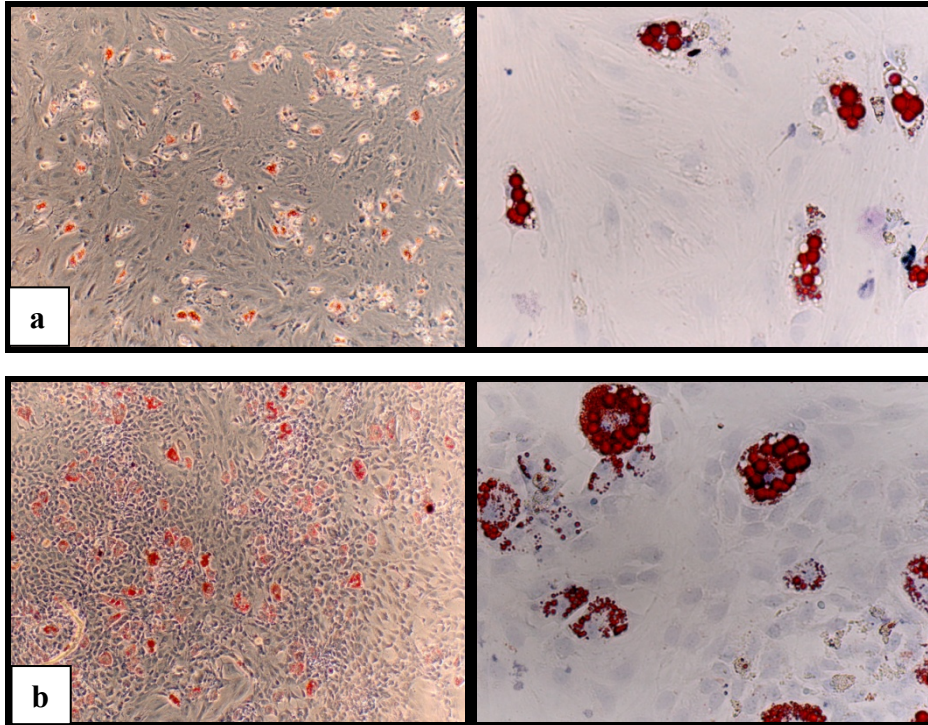
Resim 63: Adipojenik diferansiyasyonunun 21. gününde Red Oil ile boyama ardından her bir hücrede multipl sayıda bulunan yağ vakuollerin görünüşleri

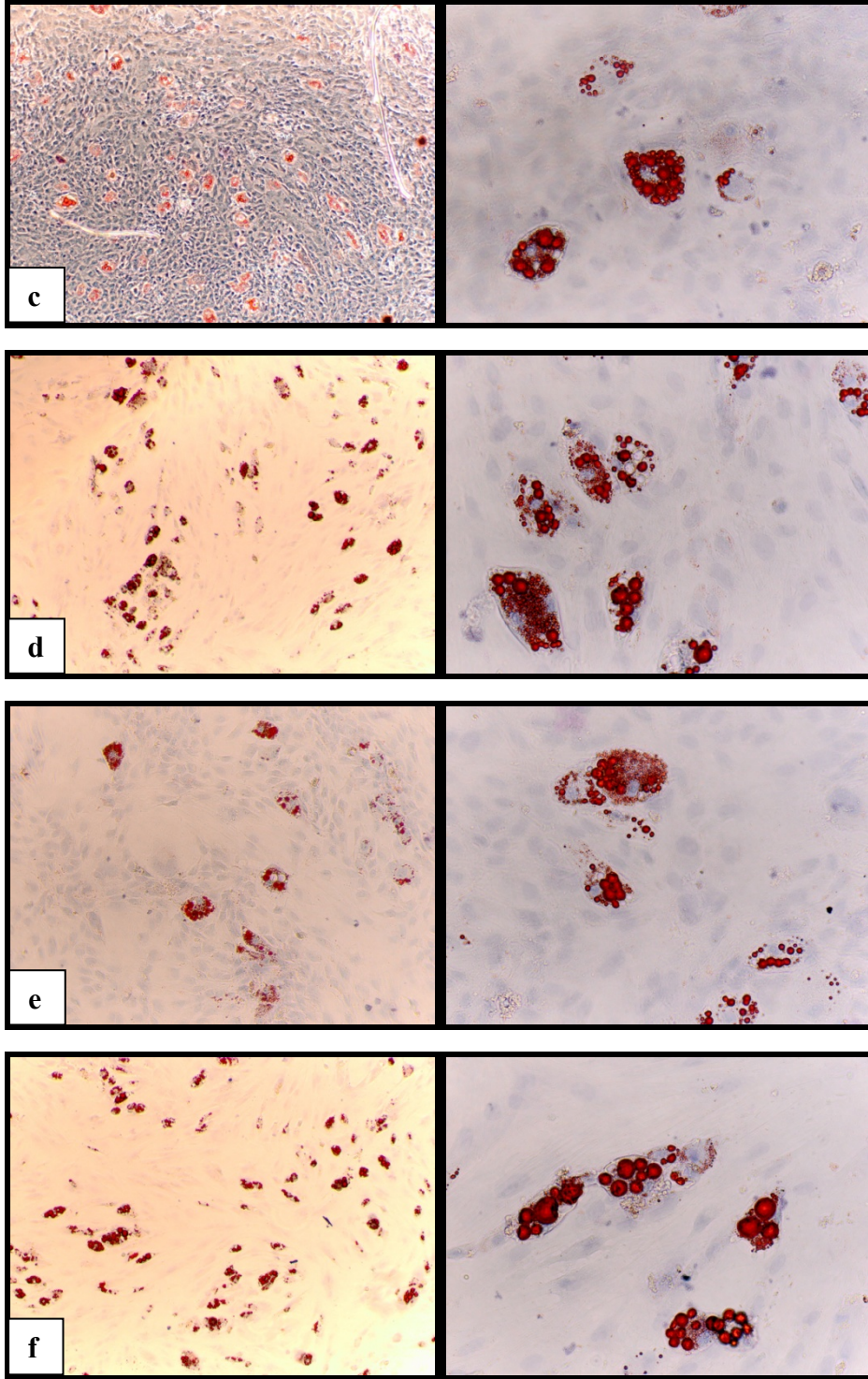




Resim 64: Ticari rat mezenkim kök hücreleriyle ratlardan elde ettiğimiz ADAS'ların adipogeneze yönlendirilmesi ardından 21. günde ışık mikroskopunda 10X ve 40X büyütmelerde karşılaştırılması

a) Ticari rat mezenkimal kök hücrelerin adipojenik diferansiyasyonu
b-c-d-e-f) Randomize seçilmiş ADAS'ların adipojenik diferansiyasyonu

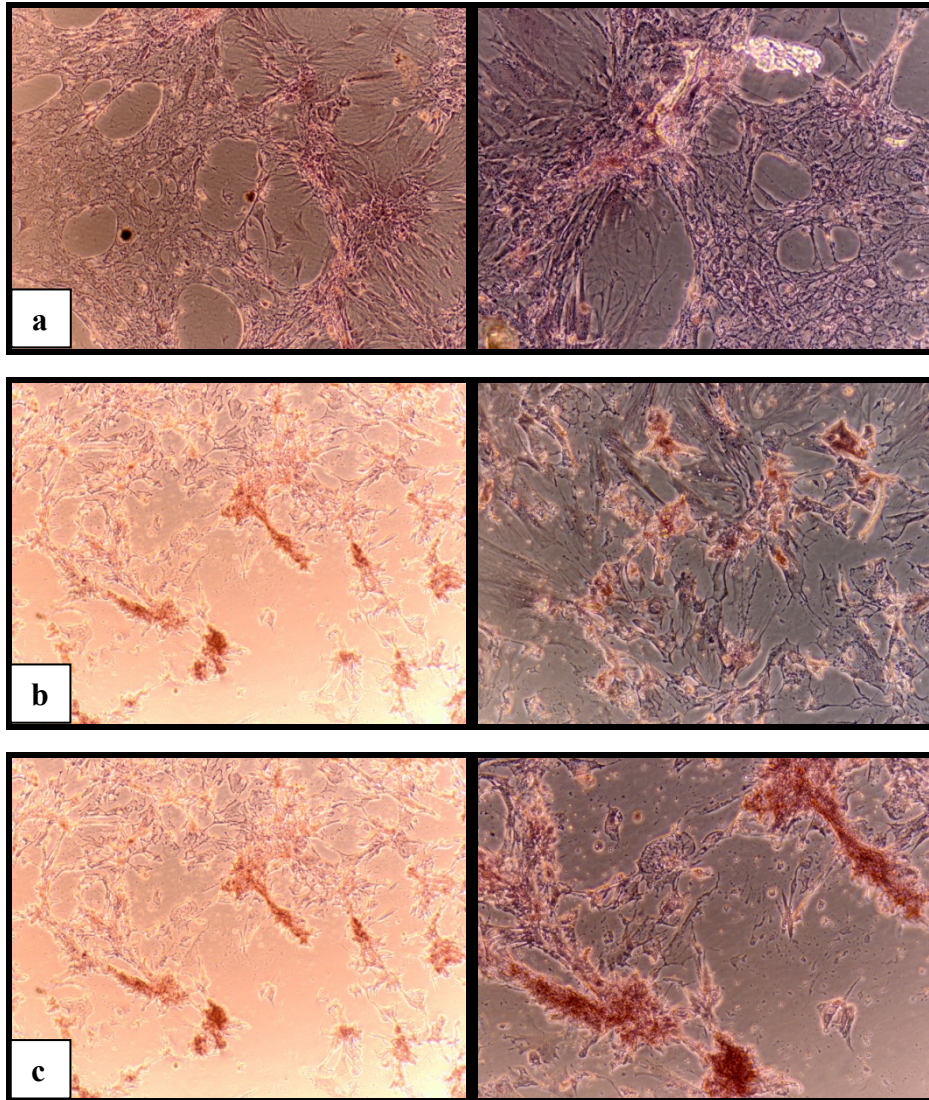


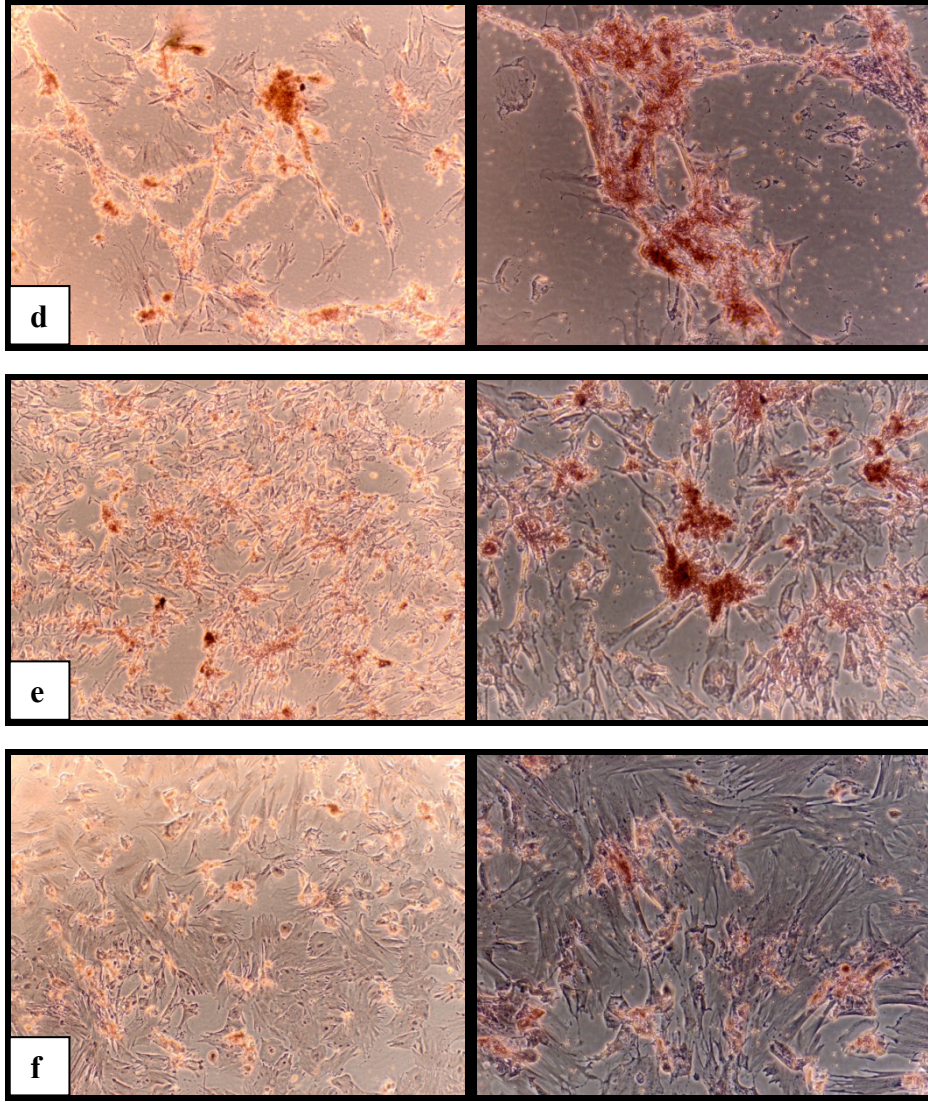


Resim 65: Ticari rat mezenkim kök hücreleriyle ratlardan elde ettiğimiz ADAS'ların adipogeneze yönlendirilmesi ardından 21. günde Red Oil ile boyanarak 10X ve 40X büyütmelerde karşılaştırılması
b) Ticari rat mezenkimal kök hücrelerin adipojenik diferansiyasyonu
b-c-d-e-f) Randonimize seçilmiş ADAS'ların adipojenik diferansiyasyonu

6.2.4. Kök Hücrelerin Osteojenik Diferansiyasyonu

ADAS'ların çok yönlü diferansiyasyon özelliğini göstermek amacıyla Grup 4'te ratlara verilen kök hücrelerin randomize olarak 5 tanesinden bir miktar örnek ayrıldı. Bu örneklerdeki ADAS'lar in-vitro ortamda osteogeneze yönlendirilerek diferansiye edildi. Diferansiyasyon sonrasında örnekler 'Alizarin red boyası' ile boyanarak kalsiyum depozitleri gösterildi. Elde edilen görüntüler diferansiye edilen ticari rat mezenkimal kök hücreleriyle karşılaştırıldı. Osteojenik diferansiyasyon uygulanan 5 örnekte de kalsiyum depozitleri boyanarak hücrelerin osteonez yönünde diferansiye oldukları gösterildi (Resim 66).





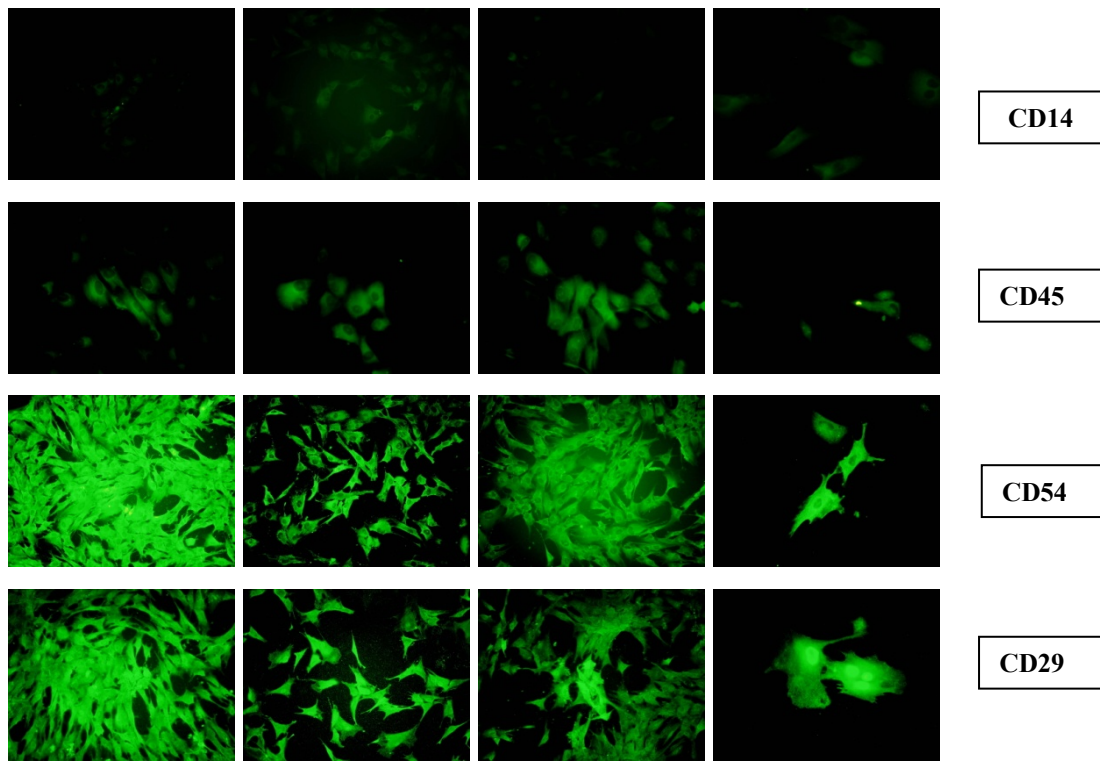
Resim 66: Ticari rat mezenkim kök hücreleriyle ratlardan elde ettiğimiz ADAS'ların osteogeneze yönlendirilmesi ardından 21. günde Alizarin Red ile boyanarak 10X ve 40X büyütmelerde karşılaştırılması
a) Ticari rat mezenkimal kök hücrelerin osteojenik diferansiyasyonu
b-c-d-e-f) Randomize seçilmiş ADAS'ların osteojenik diferansiyasyonu

6.2.5. Hücrelerin Yüzeyel İşaretleyicileri

Grup 4'te elde edilen kök hücrelerden randomize olarak 5 tanesi seçilmiştir. Bu örneklerdeki hücrelerin, yüzeyel adezyon molekülü olan CD29 (β 1-integrin) ve CD54 (ICAM-1) ve hematopoetik hücreler için işaretleyici olan CD14 ve CD45 ekspresyonlarına immünsitokimyasal olarak bakılarak ticari rat mezenkimal kök

hücrelerle karşılaştırılmıştır. Negatif boyanan örnekleri belirtmek amacıyla öncelikle sekonder antijenler boyanmıştır.

Örneklerin hepsinde CD29 ve CD54 ile pozitif boyanma izlenirken CD14 ve CD45 ile boyanmamışlardır (Resim 67). Ticari rat mezenkimal kök hücreleri de bizim örneklerimizde olduğu gibi CD14 ve CD45 boyamalarında ışıldama göstermezken CD29 ve CD54 boyamalarında yeşil renkte ışıldama izlendi (Resim 68). Boyanmayan örneklerdeki hücre çekirdekleri DAPİ ile boyanarak gösterilmiştir (Resim 69-70).



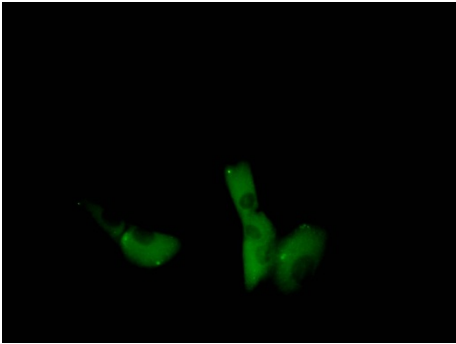
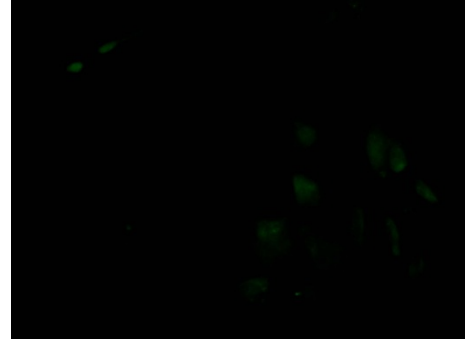
Resim 67: Örneklerin CD boyamalarının immunfluoresan mikroskopta karşılaştırılması. CD54 ve CD29 ile boyama ardından hücrelerde yeşil renkte ışıldama gözlenmektedir

Ticari rat mezenkimal
kök hücreler

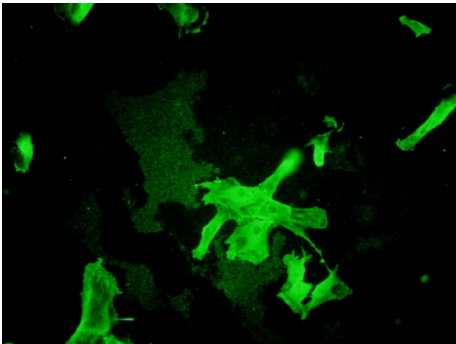
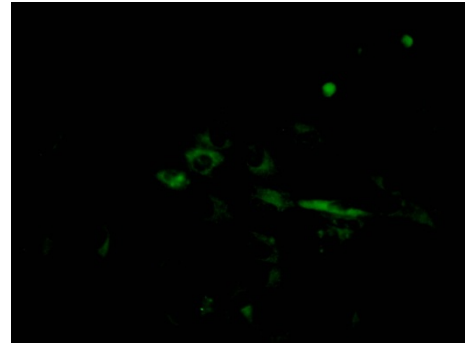
ADAS



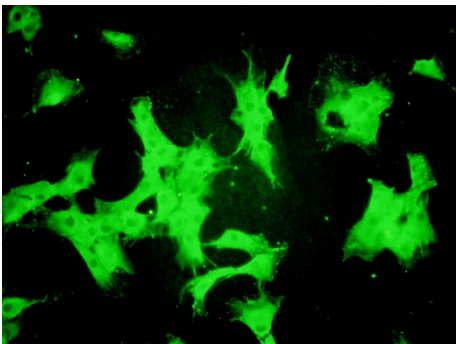
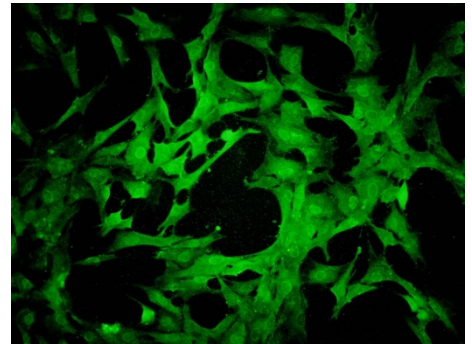
CD14



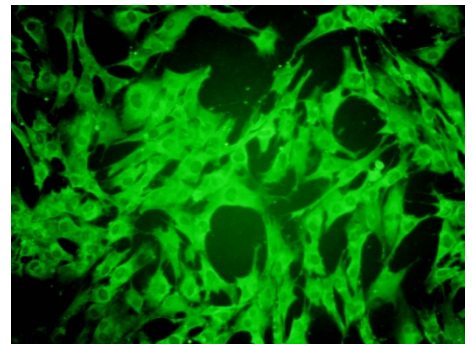
CD45



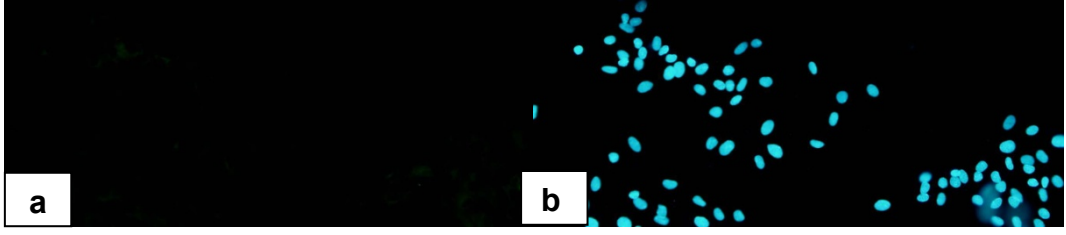
CD29



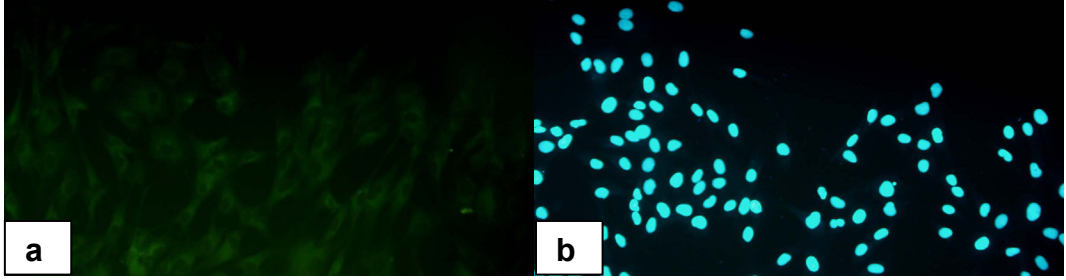
CD54



Resim 68: Örneklerin CD boyamalarının ticari rat mezenkim kök hücre ile immunfloresan mikroskopta karşılaştırılması. Her iki örnekte hücrelerden CD29 ve CD54 ile boyamada yeşil renkte ışıldama mevcut



Resim 69: CD14 boyaması DAPİ ile çekirdeklerin görünümü
a- CD 14 boyaması b- DAPİ ile boyama



Resim 70: CD45 boyaması DAPİ ile çekirdeklerin görünümü
a- CD 14 boyaması b- DAPİ ile boyama

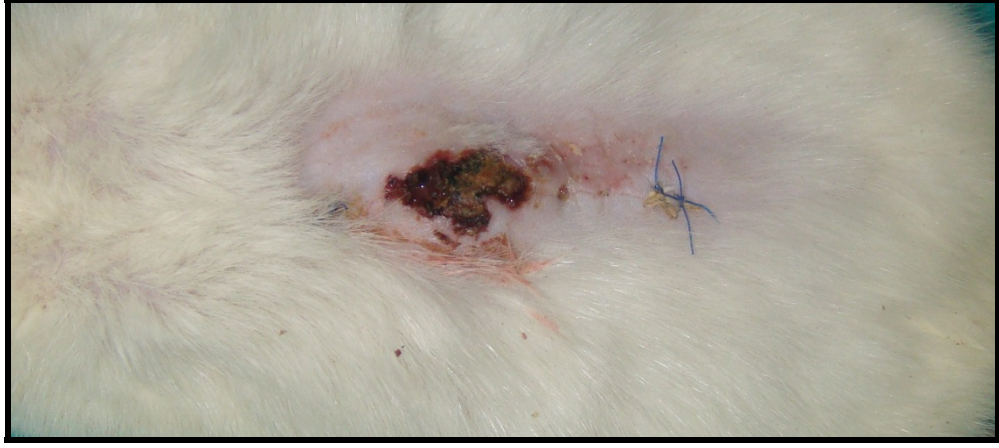
6.3. Sakrifikasyon Sırasındaki Bulgular

6.3.1. Ratların Cildindeki Değişiklikler

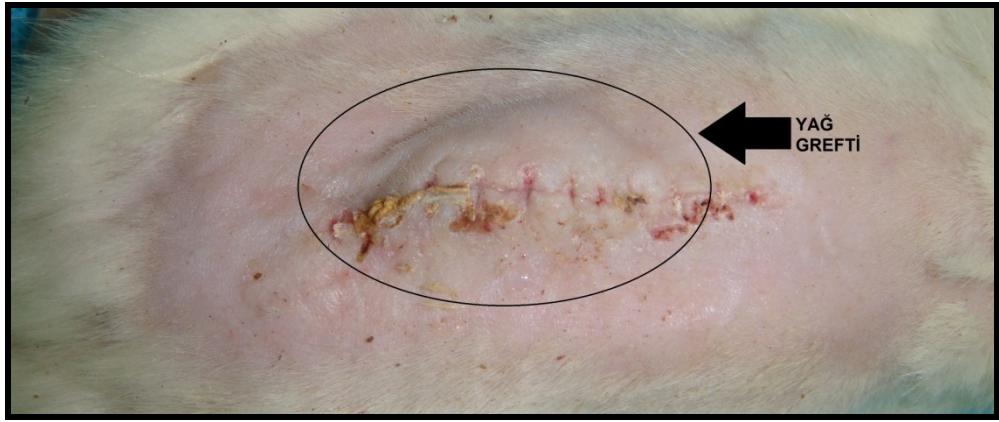
Radyasyon uygulanan ratlarda radyasyon uygulanan ciltte kuruluk ve döküntüler izlendi. Grup 1b'de bir ratın insizyon bölgesinde yaklaşık 1,5 cm. uzunluğunda separasyon izlendi (Resim 71). Diğer ratların insizyon hatlarında komplikasyon izlenmedi. Grup 4'te yer alan ratlarda döküntü miktarı daha az olarak izlendi.

Grup 2a'daki ratlarda uygulanan yağ greftleri cilt altında kitle şeklinde palpe edilebilmekteyken Grup 2b'deki ratlarda böyle bir bulgu izlenmedi (Resim 72).

Radyasyon uygulanan alanlarda tüylenmede azalma belirgin olarak gözlemlendi. Grup 1b, 2b ve 3b'deki ratlarda tüylenmede belirgin derecede azalma gözlemlendi. Grup 4b'deki ratların tüylenmesi diğer gruplara göre daha fazlaydı (Resim 73).



Resim 71: Grup 1b'de insizyon hattında separasyon



Resim 72: Grup 2a'da yağ greftinin görünümü



Resim 73: 28.günde tüylenmede artışının karşılaştırılması

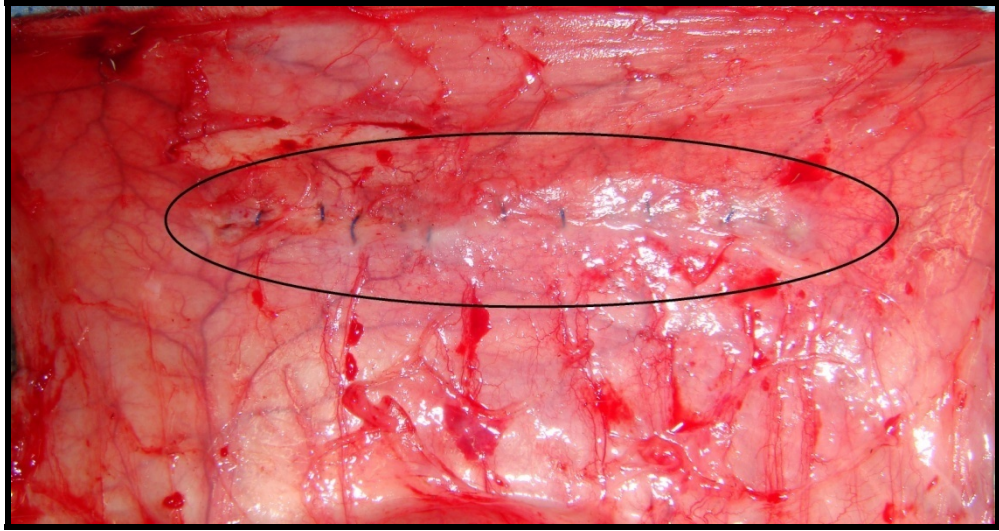
6.3.2. Cilt Altında İzlenen Makroskopik Değişiklikler

Sakrifikasyon sırasında ratların dorsal cildi sol lateral bazlı flep olarak eleve edilerek cilt altındaki ve skar etrafındaki değişiklikler gözlemlendi.

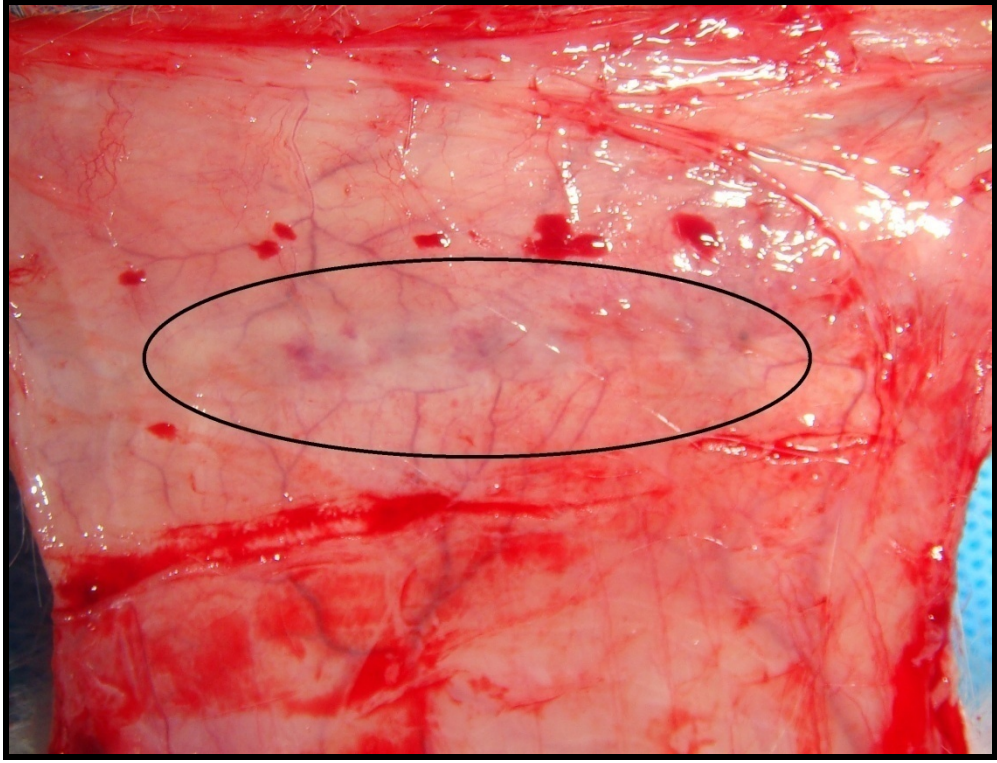
Grup 1a ve 1b'deki ratların flepleri soluk beyaz renkte izlendi. Skar etrafında kapiller damarlarda yoğunlaşma izlenmedi (Resim 74-75).

Grup 2a'da yer alan ratlarda uygulanan yağ grefti tek bir kitle halinde izlendi ve yağ grefti üzerinde yoğunlaşan damar yapıları gözlemlendi (Resim 76). Uygulanan yağ greftinin içi eksplore edildiğinde kanlanmanın yoğun olduğu izlendi. Grup 2b'de ise yağ greftlerinin kitlesi Grup 2a'ya göre belirgin biçimde küçüldüğü ve öbekler halinde flep altında yerleştiği izlendi. Rengi daha açık sarı olan greftlerin etrafında vaskülarizasyonda artış mevcuttu (Resim 77).

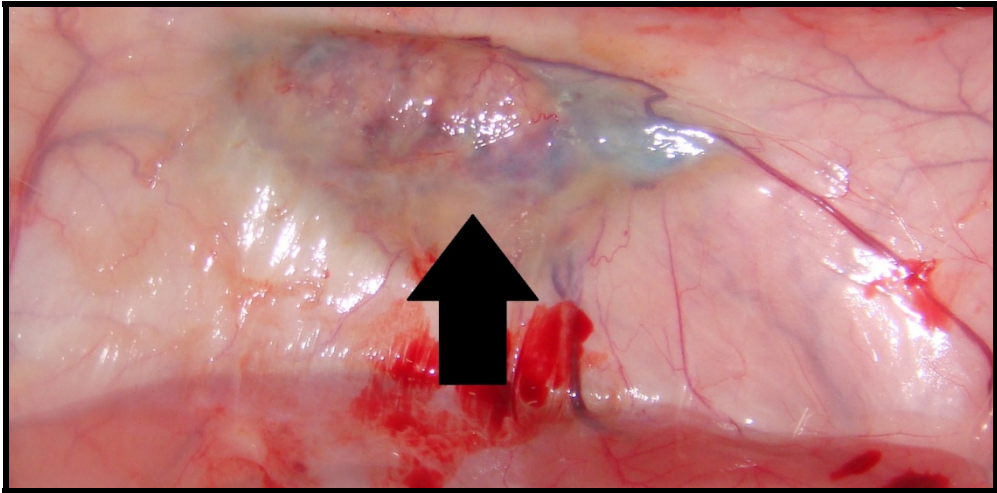
Grup 3a ve 3b'de oluşturulan poş içinde kapiller damarlarda yer yer artış izlendi (Resim 78-79). Skar etrafındaki kapiller artışı diğer gruplara göre Grup 4a ve 4b'de fazla olarak gözlemlendi (Resim 80). Skar etrafındaki kapiller damar değişiklikleri transillüminasyon uygulanarak fotoğrafları çekildi (Resim 81-82).



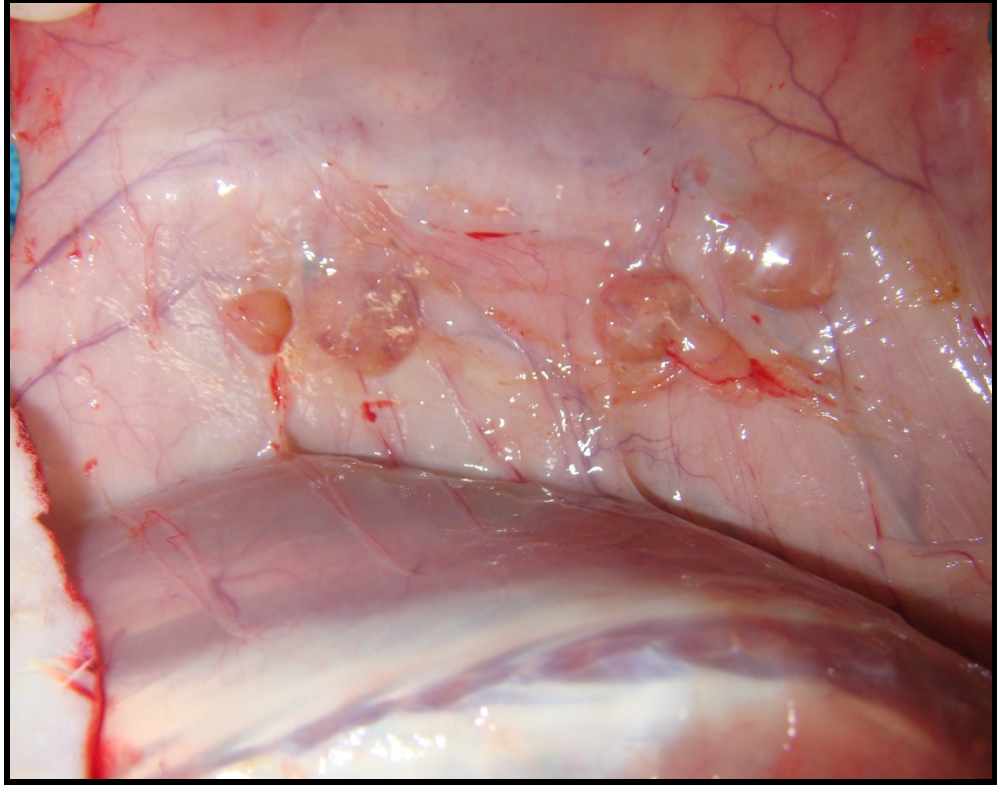
Resim 74: Grup 1a'da skar etrafında damarlamanın az oluşunun görünümü



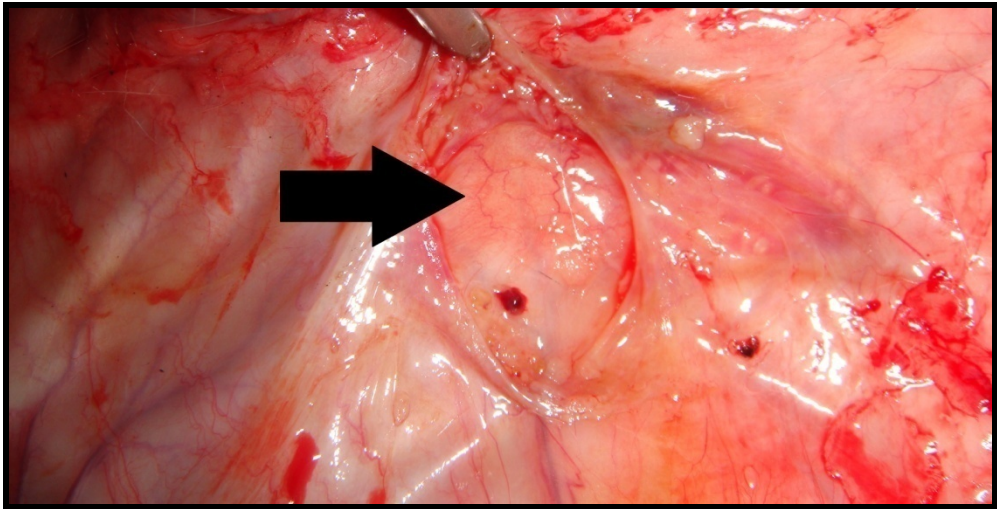
Resim 75: Grup 1b'de skarın görünümü



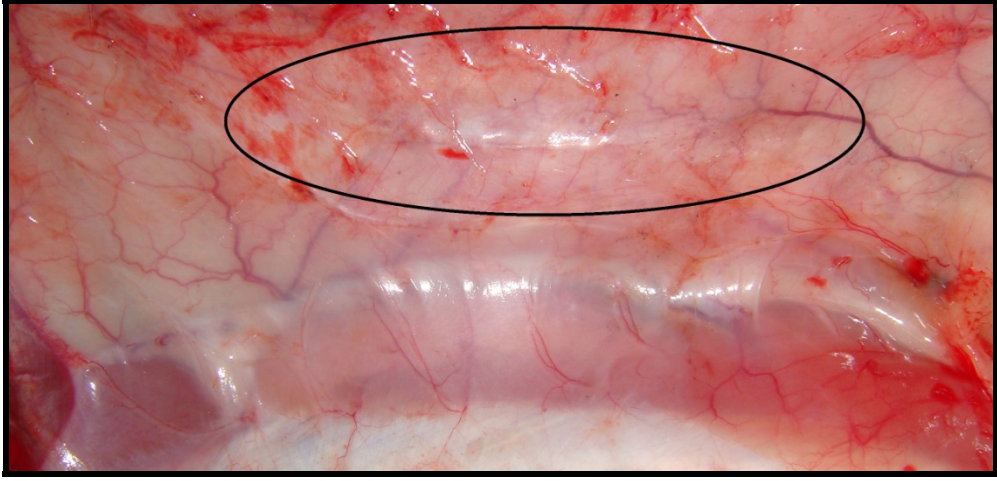
Resim 76: Grup 2a'da yağ grefti etrafında damarlanma artışı



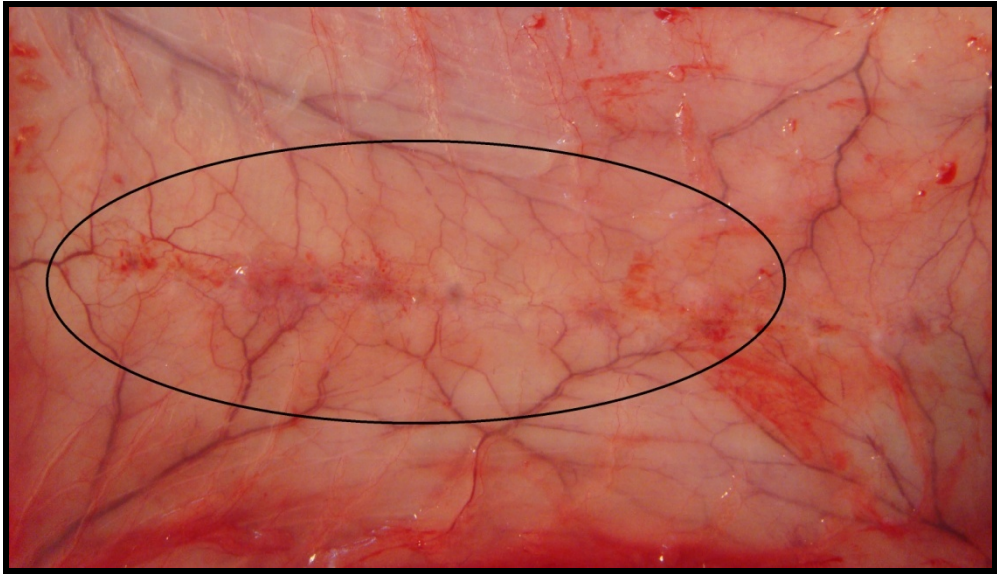
Resim 77: Grup 2b'de yağ greftlerinin görünümü



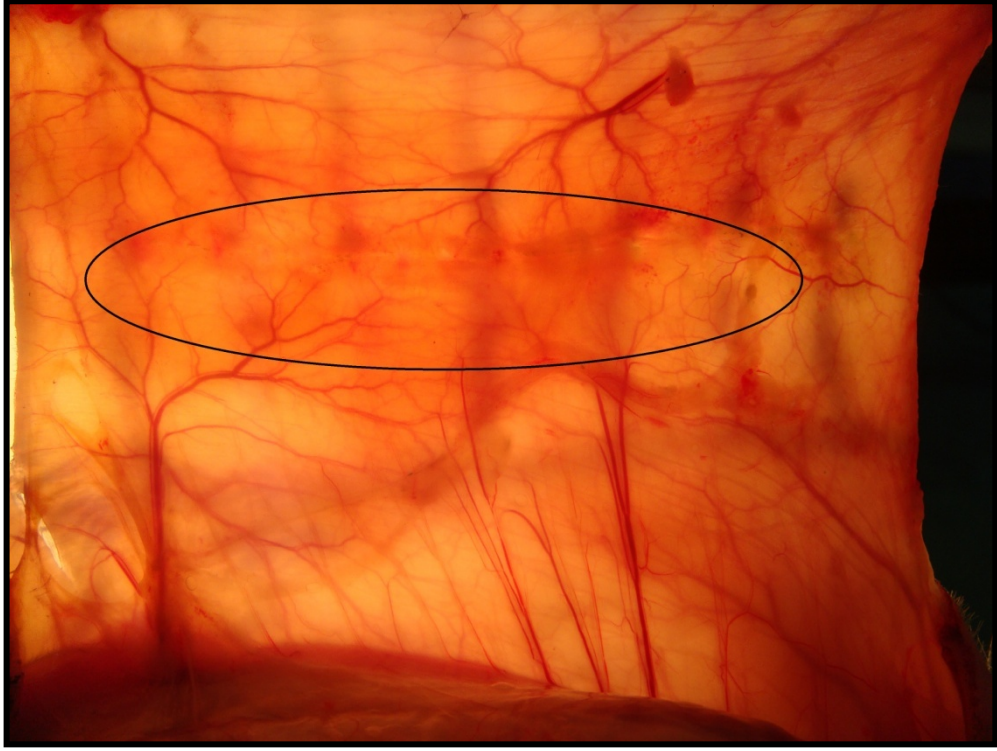
Resim 78: Grup 3a'da SVF uygulanan alanda kapiller artışı



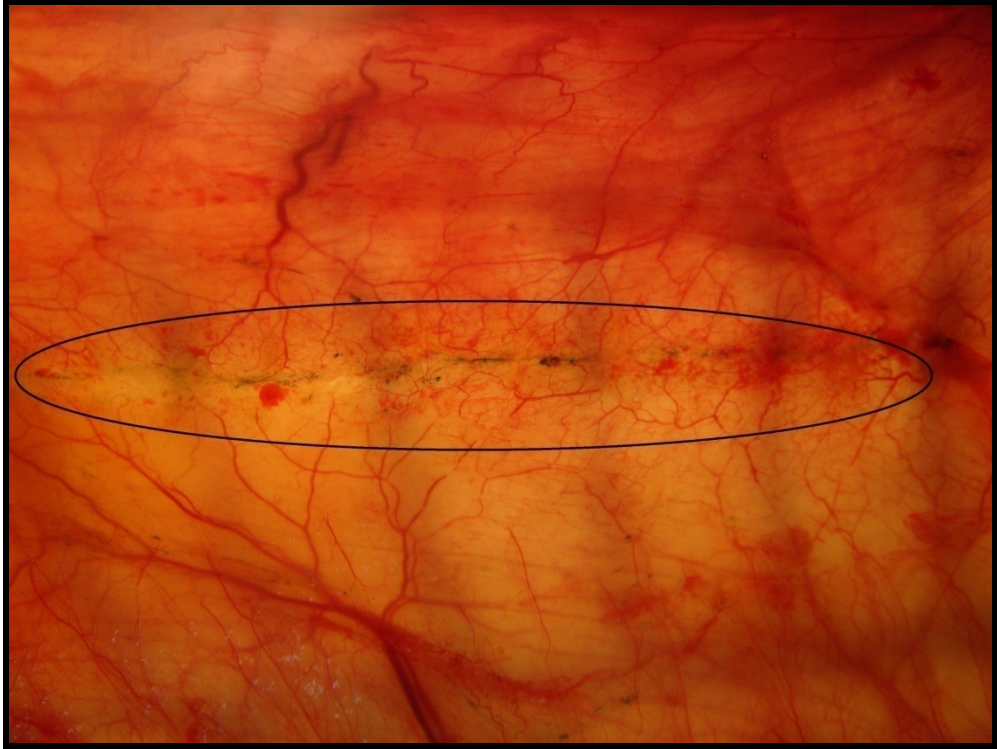
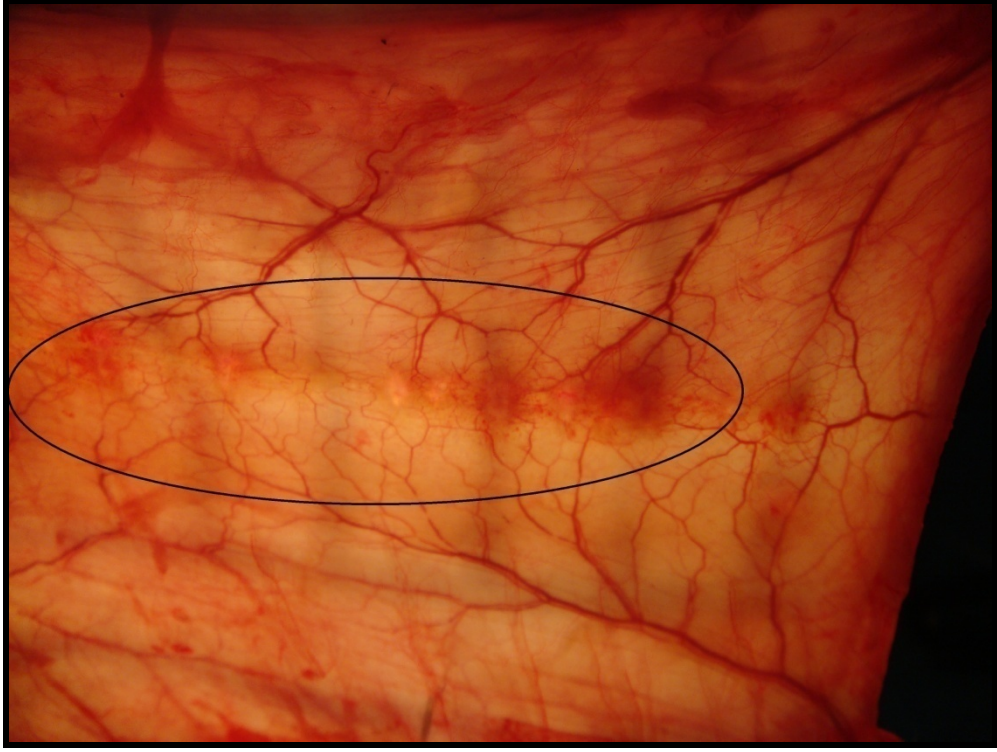
Resim 79: Grup 3b'de skarın görünümü



Resim 80: Grup 4b'de skar etrafında yoğun kapiller oluşumu



Resim 81: Transillüminasyonda Grup 3b'de skar etrafında damarlanmada minimal artış

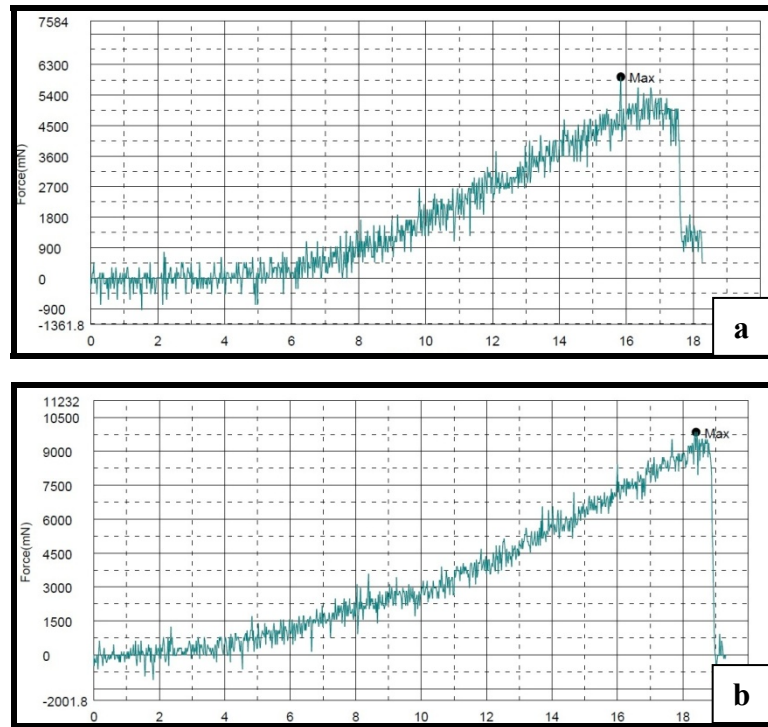


Resim 82: Transillüminasyonda Grup 4b'de skar etrafındaki kapiller damarlanmada belirgin artış

6.4. Doku Kopma Kuvveti Testi Sonuçları

Ratların doku kopma kuvveti x2, x4 ve x6 parçalarının kopma kuvvetlerinin ortalaması alınarak belirlendi (Resim 83). Radyasyon uygulanmış ratlar arasında en yüksek skor 9872,9 mN ile ADAS verilen ve 28. günde sakrifiye edilen Grup 4b'de elde edildi (Tablo 6). Ratların kopma kuvveti değerleri One Way ANOVA istatistiksel test ile değerlendirildi. $P < 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

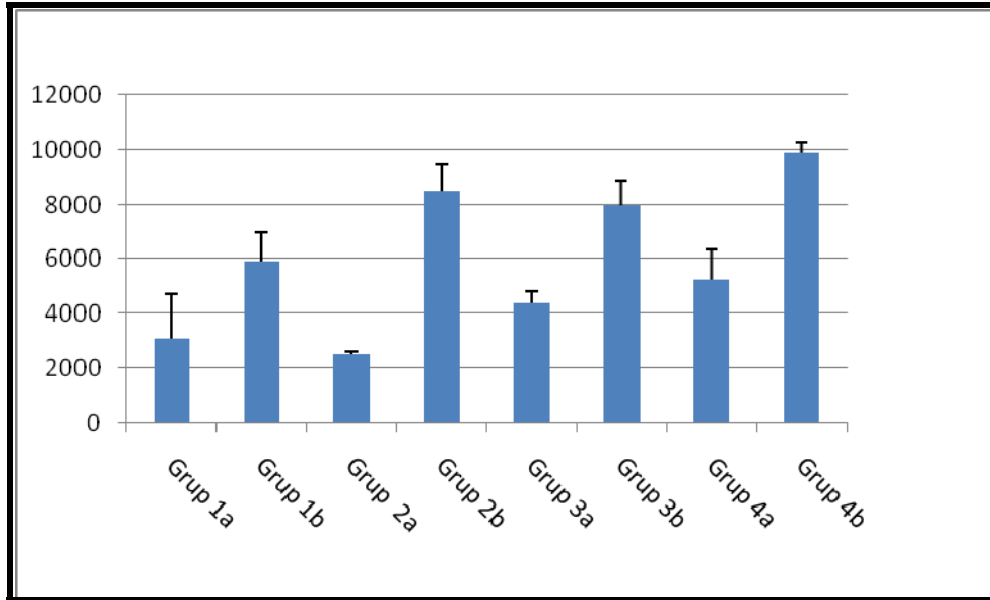
Tüm gruplardaki 14. gün ile 28. gün arasındaki artış anlamlı olarak bulundu. ($p < 0,05$) Grup 4a'nın kopma kuvveti değeri Grup 3a hariç diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksekti. Ancak 28.gündeki değerler karşılaştırıldığında Grup 4b Grup 3b'ye göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı. Grup 2a ve 3a kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik göstermemesine rağmen tüm grupların kopma kuvveti değeri 28. günde kontrol grubu olan Grup 1b'ye göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. Grup 2b ile Grup 4b arasında istatistiksel açıdan fark izlenmedi (Şekil 11-12).



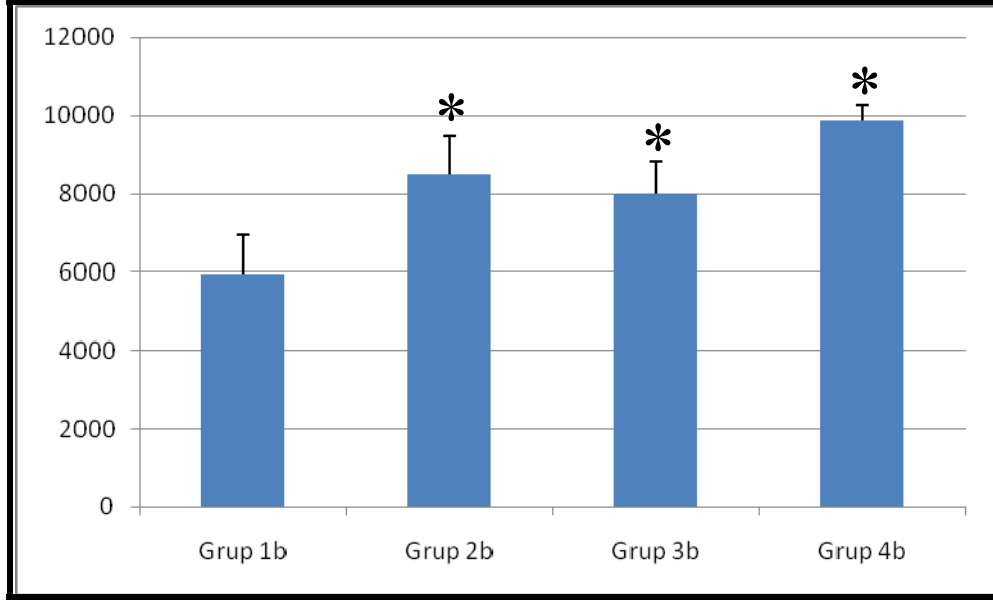
Resim 83: Doku kopma değerlerinin kuvvet/zaman eğrileri
a) Grup 1b'de x4 parçasının kopma kuvveti eğrisi
b) Grup 4b'de x4 parçasının kopma kuvveti eğrisi

	Sıçan 1 (mN)	Sıçan 2 (mN)	Sıçan 3 (mN)	Sıçan 4 (mN)	Sıçan 5 (mN)	Ortalama (mN)	Standart sapma (SD)
Grup 1a	1406	1797	2656	4792	4844	3099	1633
Grup 1b	4479	6461	7242	5992	5365	5908	1052
Grup 2a	2500	2604	2552	2573	2365	2519	94
Grup 2b	8760	7396	8073	8333	9948	8502	948
Grup 3a	4479	4271	4479	3854	4938	4404	393
Grup 3b	7604	7279	7540	8113	9375	7982	835
Grup 4a	4479	4792	4219	6458	6406	5271	1080
Grup 4b	10062,5	10000	10145,85	9989,6	9167	9872,9	400

Tablo 6: Grupların kopma kuvveti sonuçlarının ortalamaları ve standart sapma değerleri



Şekil 11: Grupların kopma kuvvetlerinin grafik üzerinde karşılaştırılması



Şekil 12: 28. gündeki kopma kuvveti değerlerinin grafik üzerinde karşılaştırılması
*:Grup 3b ve 4b'nin skorları Grup 1b'ye göre anlamlı olarak yüksek (p<0,05)

6.5. Histomorfolojik Bulgular

6.5.1. Histolojik Bulgular

Hematoksilen-eosin (HE) ile boyalı Grup 1a ve Grup 1b'ye ait kesitlerin incelenmesinde, radyasyona maruz kalan alanda epidermal ve dermal organizasyonun bozulduğu, rejenerasyonun zayıf olduğu, granülasyon dokusu ve bağ doku artışının oldukça fazla miktarda olduğu gözlemlendi. Radyasyona maruz kalan alanda kapiller damarların ve kıl foliküllerinin miktarında belirgin bir azalma olduğu saptandı. Grup 1a ve Grup 1b'ye ait Masson trikrom ile boyalı kesitlerde granülasyon dokusu ve bağ dokusu artışının belirgin derecede geniş olduğu dikkati çekti.

Grup 2a ve Grup 2b'ye ait Hematoksin-eosin ile boyalı kesitlerin incelenmesinde radyasyona maruz kalan alanda epidermal ve dermal organizasyonda gözlenen rejenerasyonun Grup 1'e göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Granülasyon dokusu ve bağ doku artışının Grup 1'e göre daha az miktarda olduğu saptandı. Radyasyona maruz kalan alanda kapiller damarların ve kıl foliküllerinin miktarının Grup 1'e göre daha fazla olduğu saptandı. Grup 2a ve Grup 2b'ye ait Masson trikrom ile boyalı kesitlerde granülasyon dokusu ve bağ dokusu artışının

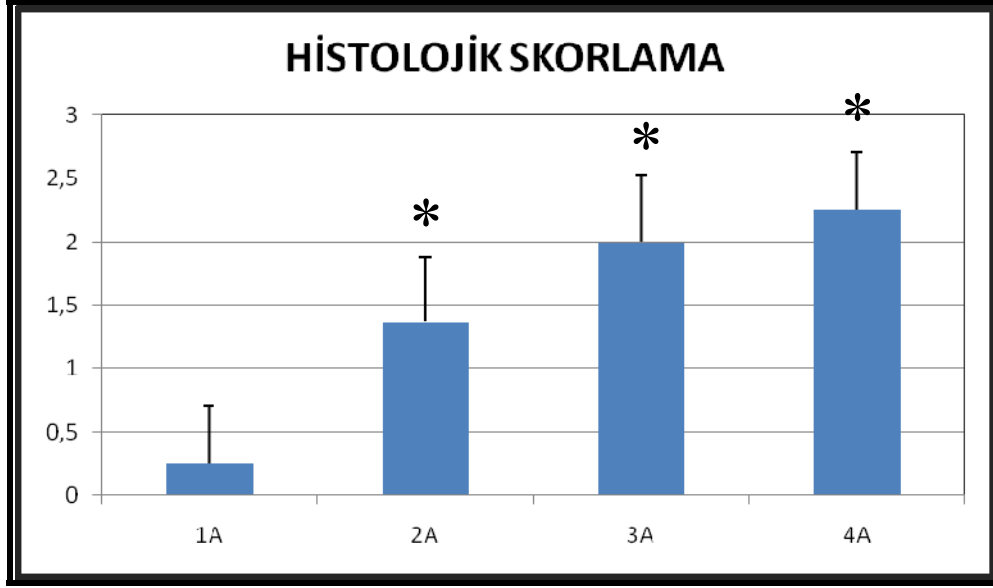
Grup1'e göre azaldığı dikkati çekti. Histolojik skorlara bakıldığında Grup 2b ile grup 1b arasında istatistiksel fark bulunmadı. (p=0,538).

Grup 3a ve Grup 3b'ye ait Hematoksilen-eosin ile boyalı kesitlerin incelenmesinde radyasyona maruz kalan alanda epidermal ve dermal organizasyonun artış gösterdiği, rejenerasyonun Grup 1 ve Grup 2'ye göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Granulasyon dokusu ve bağ doku artışının Grup 1 ve Grup 2'ye göre daha az miktarda olduğu, kapiller damarların ve kıl foliküllerinin miktarının artmış olduğu saptandı. Grup 3a ve Grup 3b'ye ait Masson trikrom ile boyalı kesitlerde granulasyon dokusu ve bağ dokusu artışının azaldığı dikkati çekti. Histolojik skorlara bakıldığında Grup 3b'nin değerinin Grup 1b'nin değerine göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. (p=0,01)

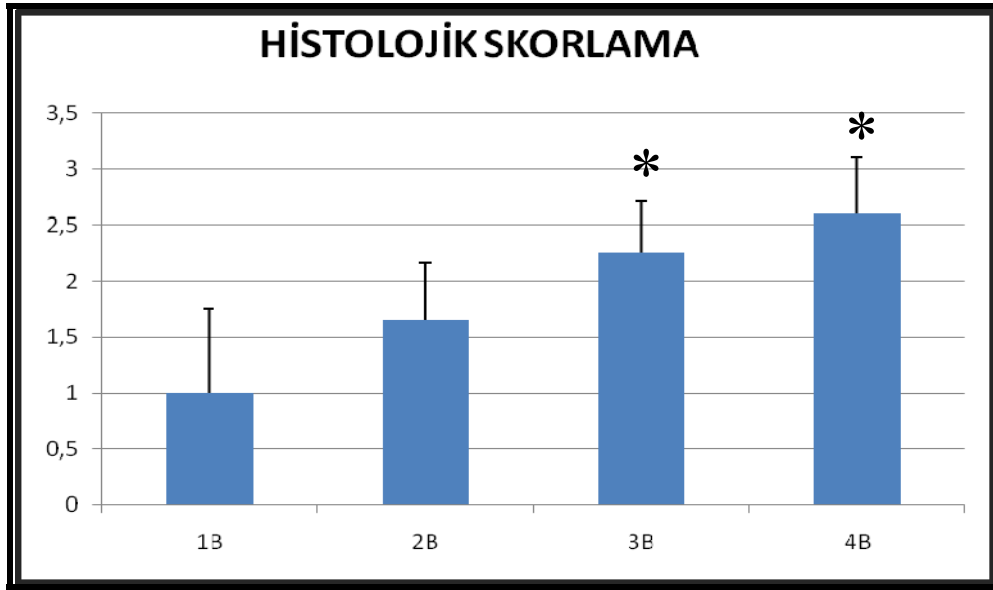
Grup 4a ve Grup 4b'ye ait Hematoksilen-eosin ile boyalı kesitler incelendiğinde ise, radyasyona maruz kalan alanda epidermal ve dermal rejenerasyonun tamamlandığı, diğer tüm gruplara göre granulasyon dokusu ve bağ doku artışının azaldığı, kapiller damarların ve kıl foliküllerinin miktarının artmış olduğu saptandı. Grup 4a ve Grup 4b'ye ait Masson trikrom ile boyalı kesitlerde granulasyon dokusu ve bağ dokusu artışının çok azaldığı ve tüm gruplara göre yara iyileşmesinin artmış olduğu gözlemlendi. Histolojik skorlara bakıldığında Grup 4b'nin değerinin Grup 1b'nin (p=0,000) ve Grup 2b'nin (p=0,29) değerlerinden anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. (Tablo 7) (Şekil 13-14) (Resim 84-85-86-87)

Grup	HİSTOLOJİK SKORLAMA (ORT+SS)
1A	0,25±0,46
1B	1,0 ±0,75
2A	1,3 ±0,51
2B	1,6 ±0,50
3A	2,0±0,53
3B	2,25±0,46
4A	2,25±0,46
4B	2,6±0,51

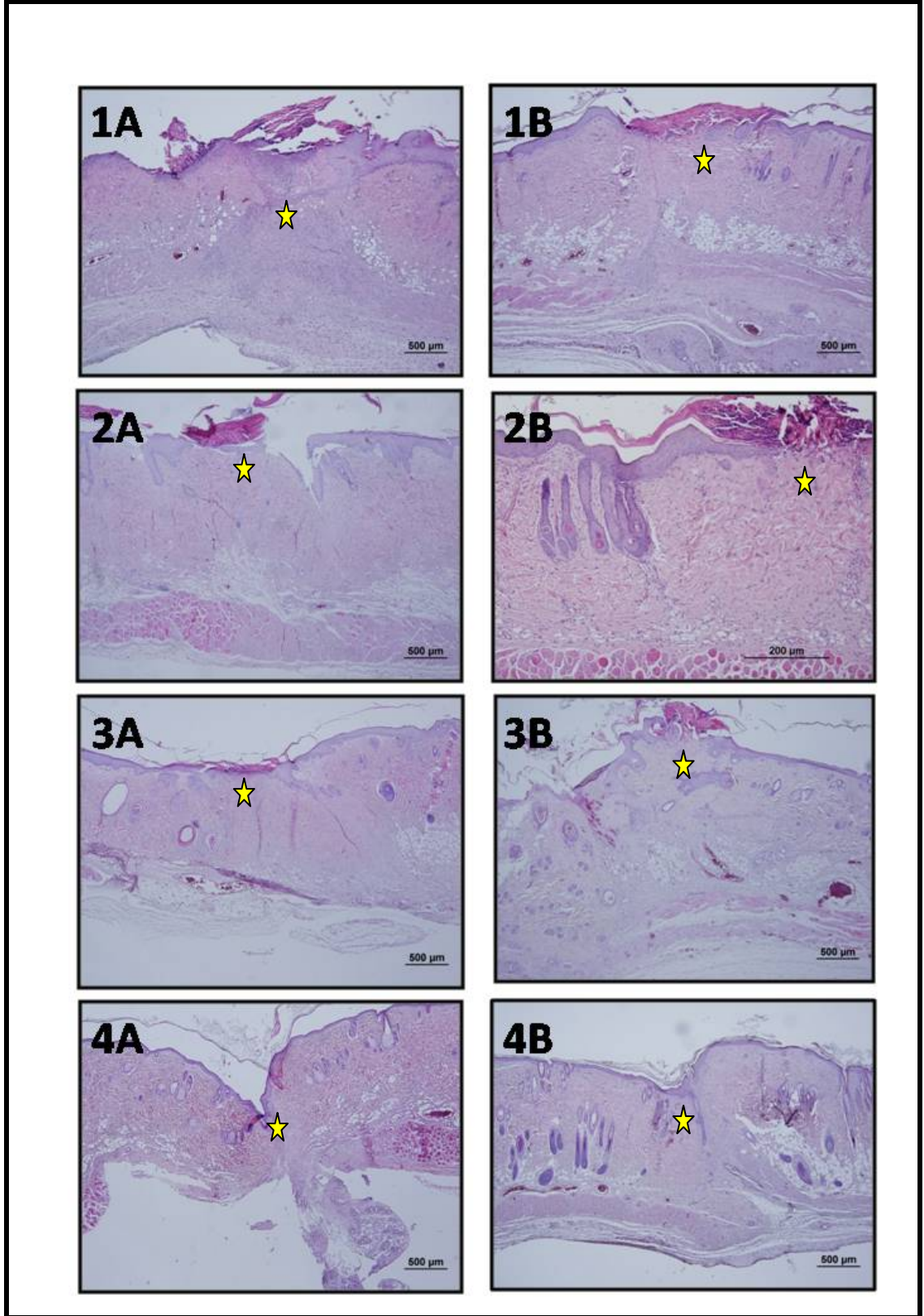
Tablo 7: Grupların histolojik skora sonuçları



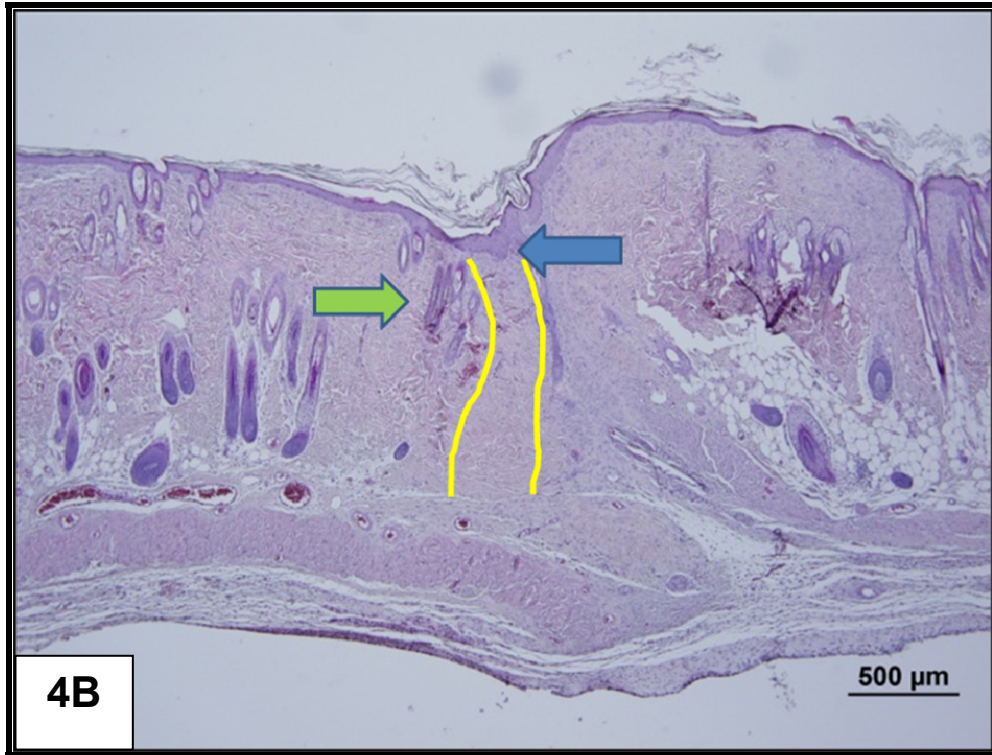
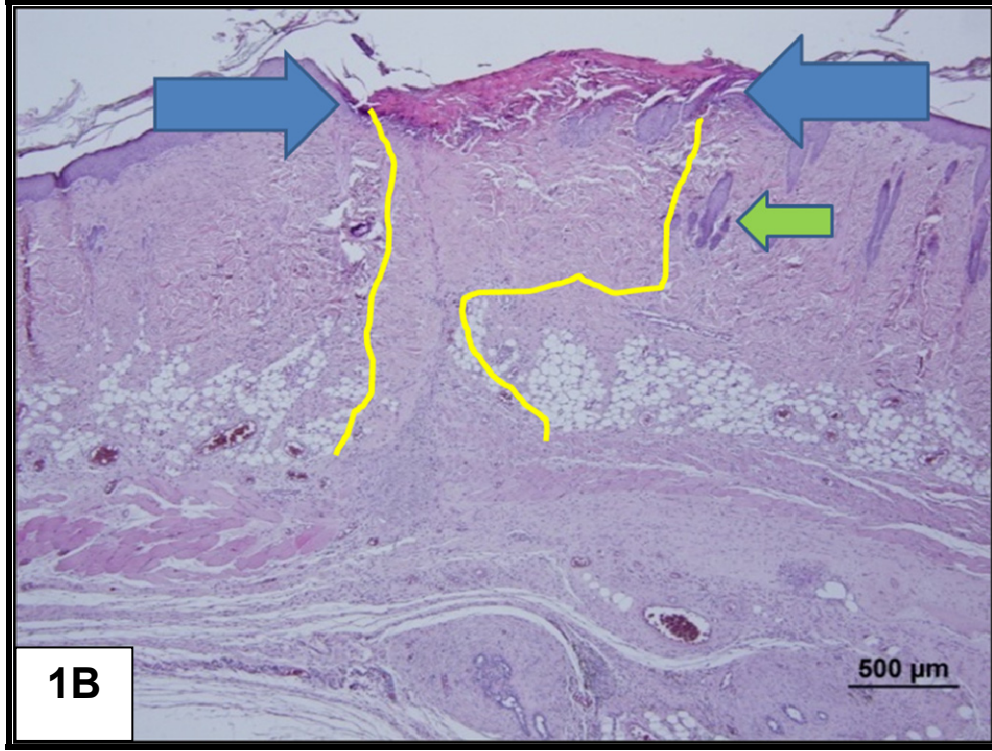
Şekil 13: 'A' gruplarının histolojik skorlarının grafik üzerinde karşılaştırılması.
*:Grup 2a, 3a ve 4a'nın skorları Grup 1a'ya göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0,05$)



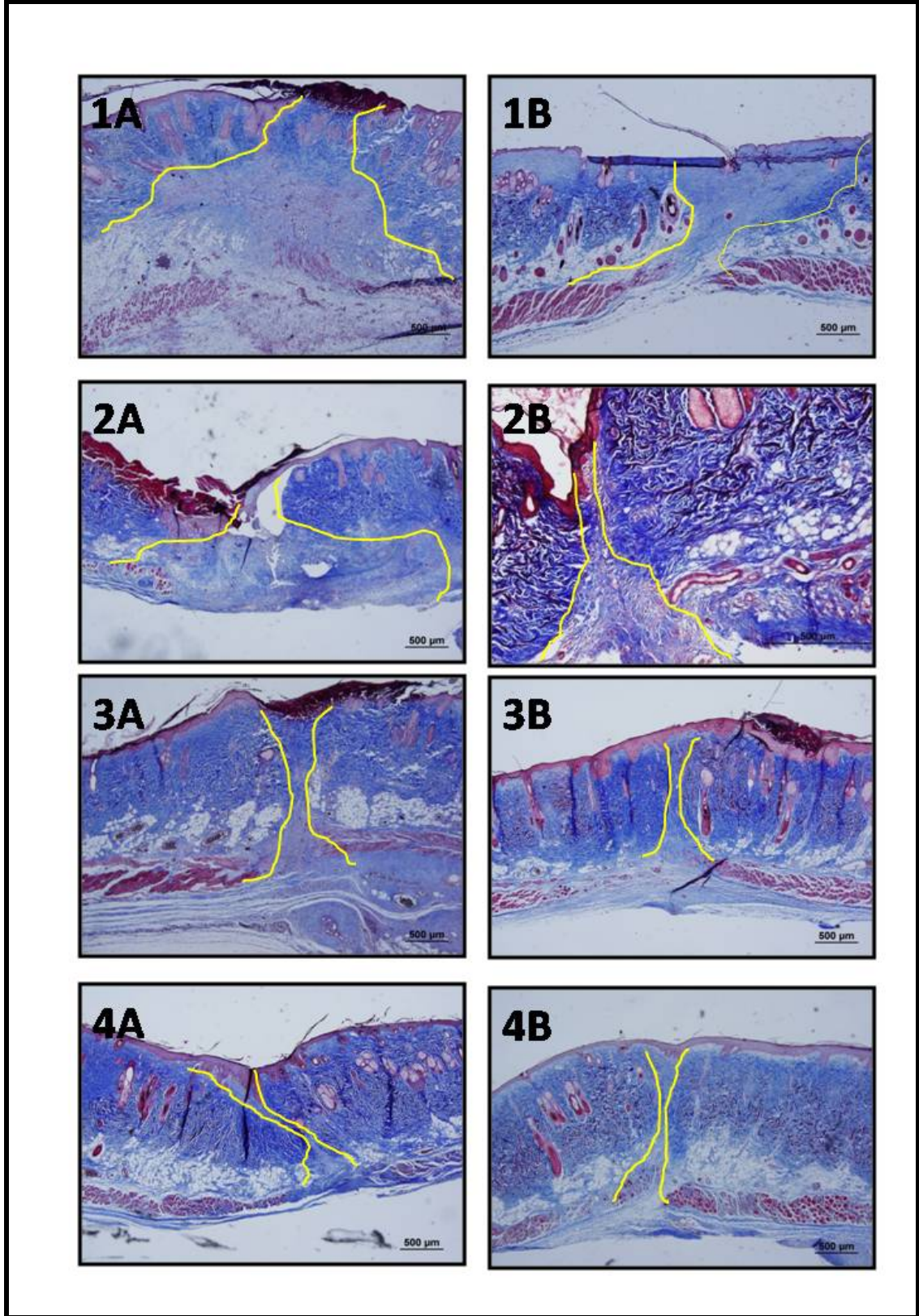
Şekil 14: 'B' gruplarının histolojik skorlarının grafik üzerinde karşılaştırılması.
*:Grup 3b ve 4b'nin skorları Grup 1b'ya göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0,05$)



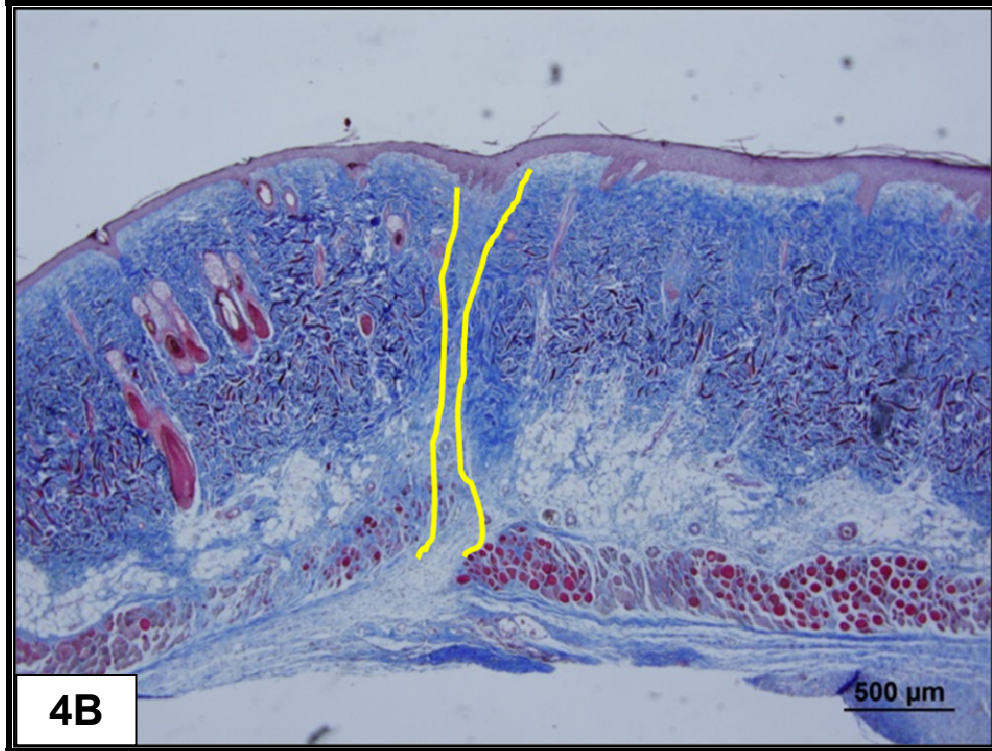
Resim 84: Gruplara ait radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait kesitler (HE).(★): Yara iyileşmesine ait alanlar



Resim 85: Grup 1b ve 4b'ye ait radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait kesitler (HE). **Mavi Ok:** Reepitelize olan alan, **Sarı Çizgi:** Granülasyon dokusu, **Yeşil Ok:** Kıl Follikülleri.



Resim 86: Gruplara ait radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait kesitler (Masson Trikrom). **Sarı Çizgi:** Yara iyileşmesinin gözlendiği radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait alan



Resim 87: Grup 1b ve 4b'ye ait radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait kesitler (Masson Trikrom). **Sarı Çizgi:** Yara iyileşmesinin gözleendiği radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait alan. Grup 4B'de epitelizasyonun tamamlandığı gözlenmekte

6.5.1. İmmunhistokimyasal Bulgular

İmmunhistokimyasal boyamaların sonuçları semikantitatif olarak boyanma miktarına göre skorlanarak One Way ANOVA testiyle istatistiksel olarak değerlendirildi.

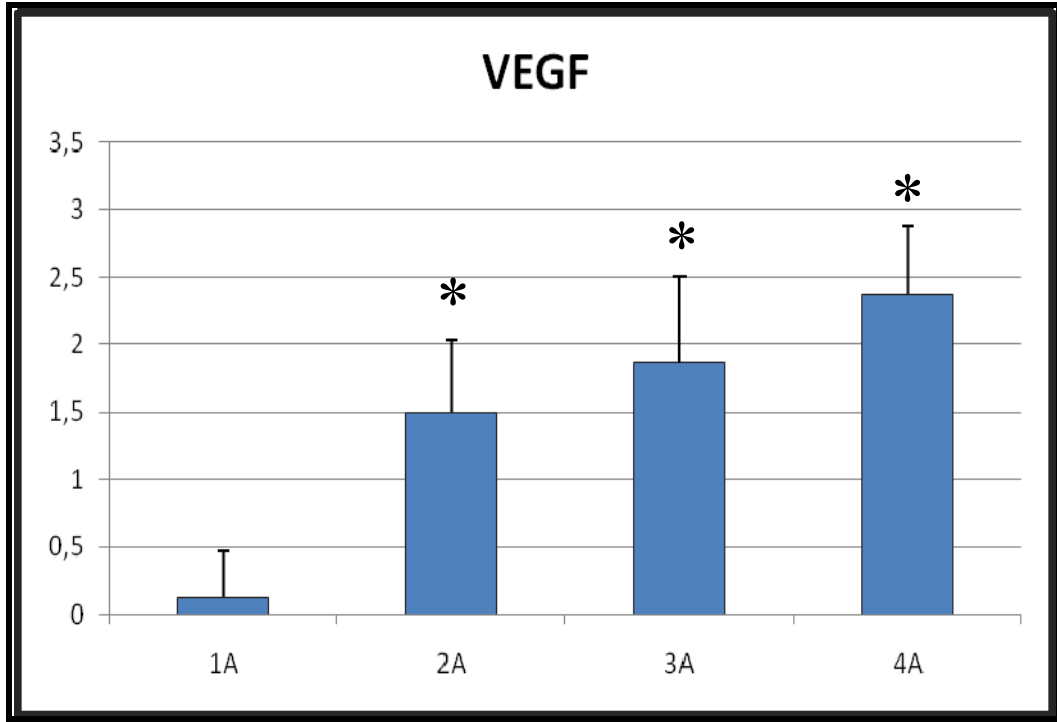
VEGF boyaması olan alanları tüm dokuda ve özellikle perivasküler alanda immün pozitif hücreler kahverengi olarak izlendi. Grup 2b hariç tüm grupların 28. gündeki VEGF skoru kontrol grubu olan Grup 1b'ye göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. ($p<0,05$) Grup 3b ve 4b arasında istatistiksel fark izlenmedi. ($p=1,000$) En yüksek skor Grup 4b'de izlendi. (Tablo 8) (Şekil 15-16) (Resim 88-89)

TGF- β boyaması sonrasında skorlamada en yüksek değer Grup 4b'de saptandı. Grup 4b'nin skorlarının kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu izlendi. ($p=0,00$) Grup 3b ve 4b arasında istatistiksel fark izlenmedi. ($p=0,438$) (Tablo 8) (Şekil 17-18) (Resim 90-91)

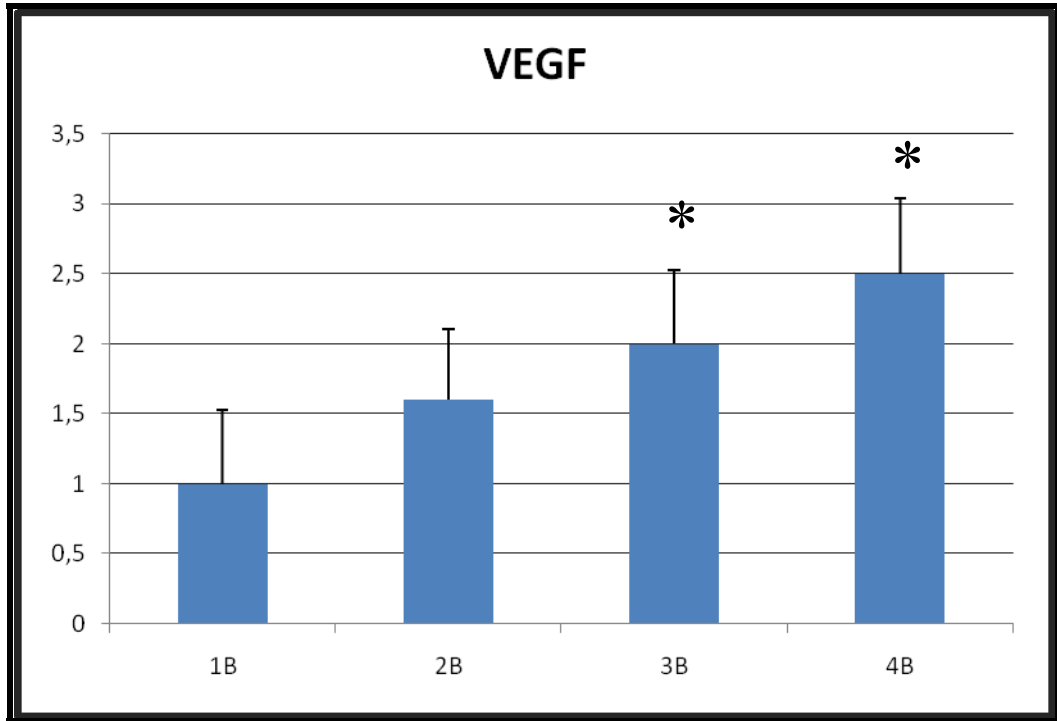
Tip 1 prokollajen boyaması ardından yapılan skorlamada, Grup 2b hariç tüm grupların skorunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. ($p<0,05$) En yüksek skor Grup 4b'de saptandı. Grup 4b ile 3b arasında istatistiksel fark saptanmadı. (0,580) (Tablo 8) (Şekil 19-20) (Resim 92-93)

Grup	VEGF (ORT+SS)	TGF-Beta (ORT+SS)	Tip 1 Prokollajen (ORT+SS)
1A	0,12±0,35	0,25±0,46	0,37±0,51
1B	1,0 ±0,53	1,1 ±0,64	1,12 ±0,64
2A	1,5 ±0,53	1,6 ±0,51	1,5 ±0,53
2B	1,6 ±0,5	1,6 ±0,5	1,77 ±0,44
3A	1,87±0,64	1,8±0,64	1,87±0,35
3B	2 ,0±0,53	1,8±0,64	2,1±0,64
4A	2,37±0,51	2,5±0,53	2,3±0,51
4B	2,5±0,54	2,6±0,51	2,8±0,40

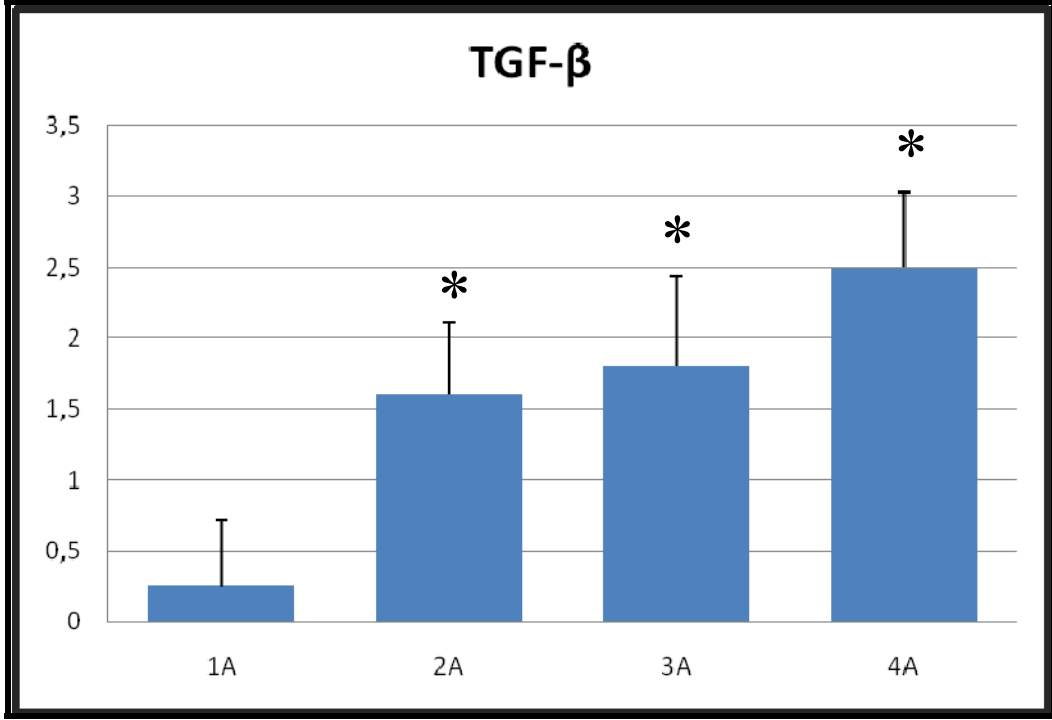
Tablo 8: Grupların immunhistokimyasal skorlama sonuçları



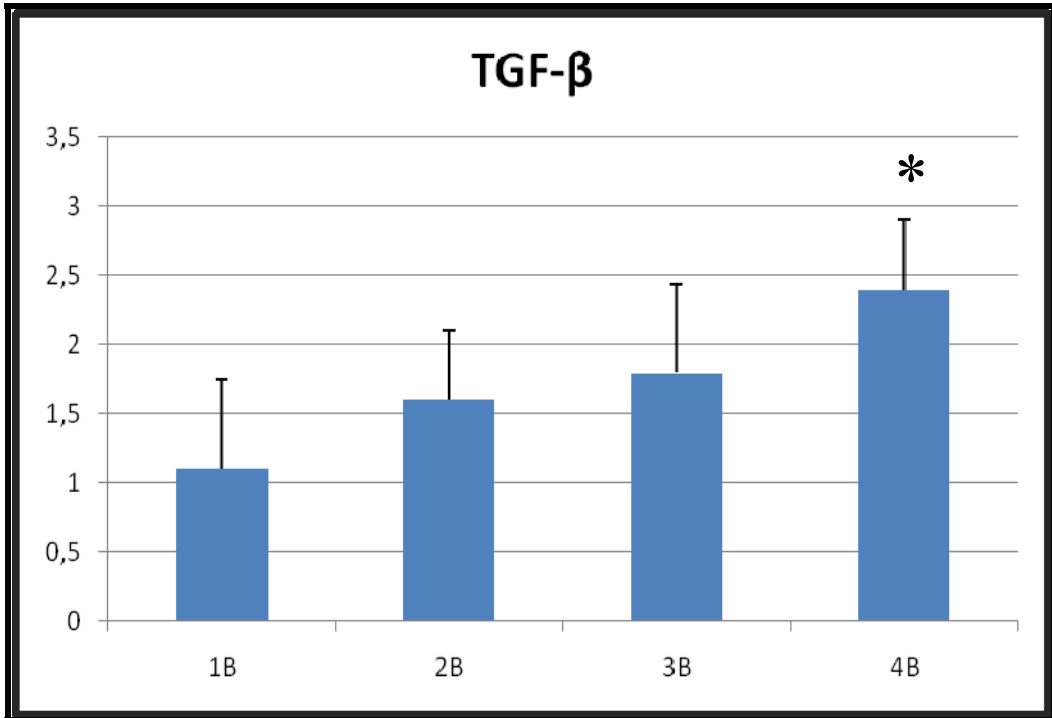
Şekil 15: 'A' gruplarının VEGF skorlarının grafik üzerinde karşılaştırılması.
*:Grup 2a, 3a ve 4a'nın skorları Grup 1a'ya göre anlamlı olarak yüksek ($p<0,05$)



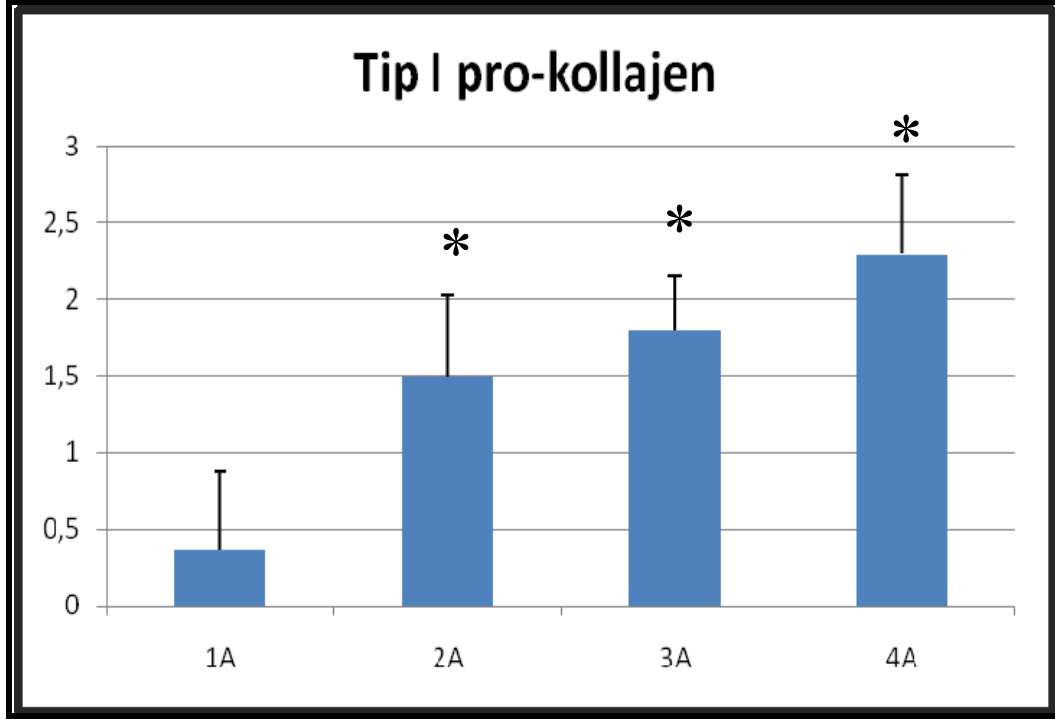
Şekil 16: 'B' gruplarının VEGF skorlarının grafik üzerinde karşılaştırılması.
*:Grup 3b ve 4b'nin skorları Grup 1b'ye göre anlamlı olarak yüksek ($p<0,05$)



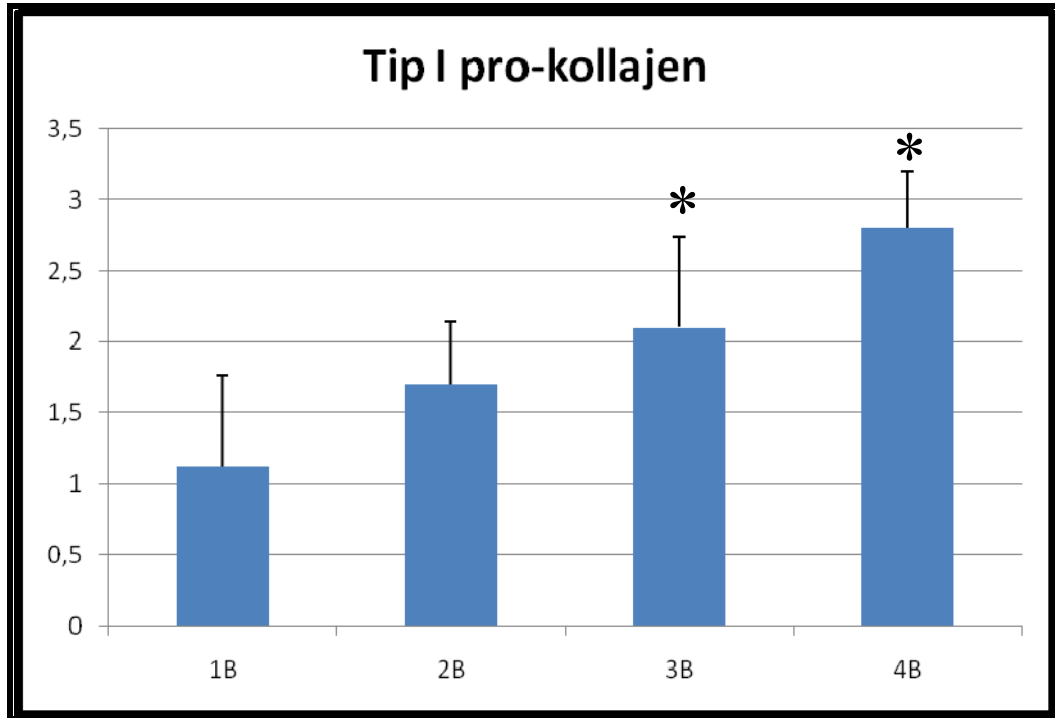
Şekil 17: 'A' gruplarının TGF- β skorlarının grafik üzerinde karşılaştırılması.
*:Grup 2a, 3a ve 4a'nın skorları Grup 1a'ya göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0,05$)



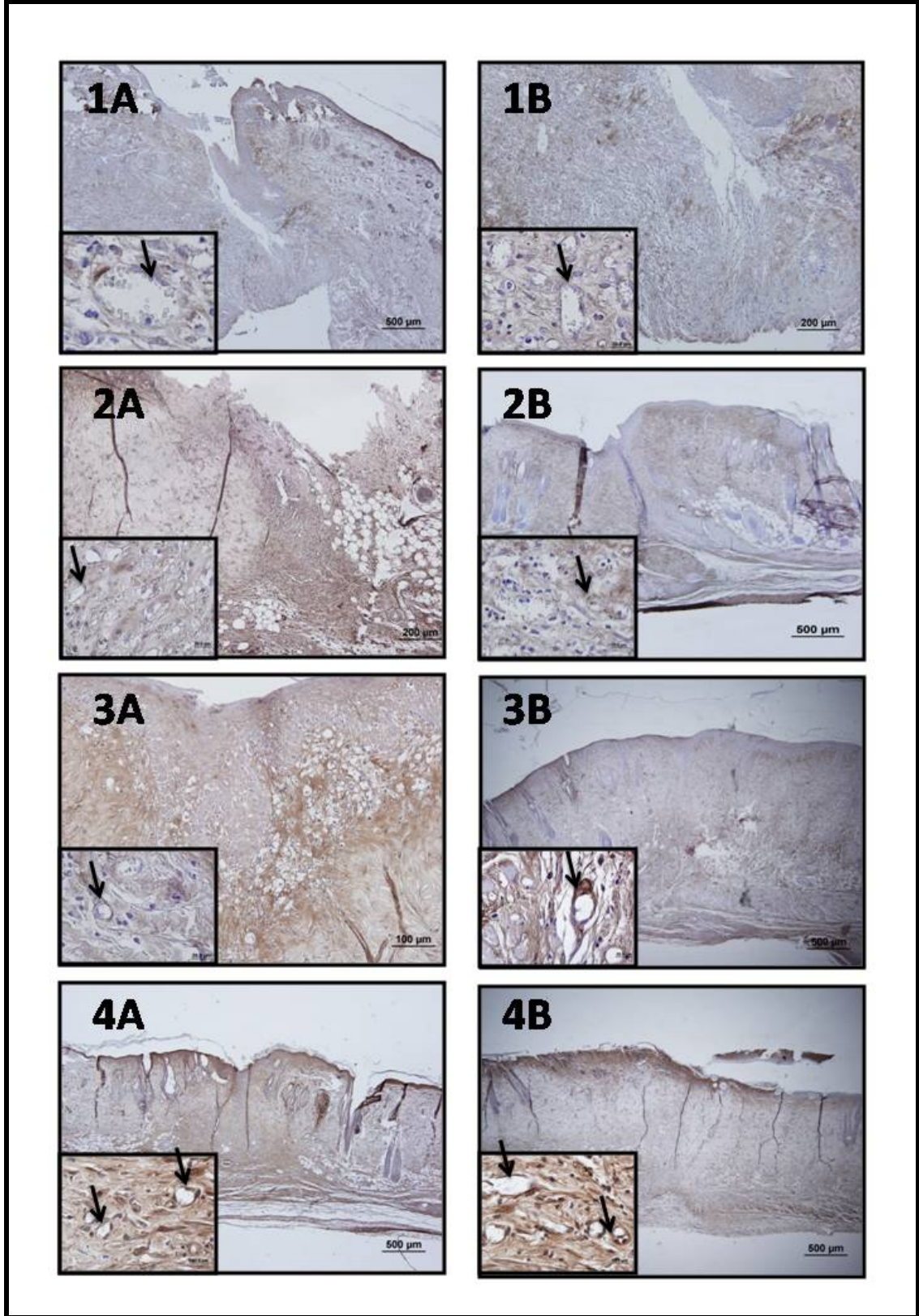
Şekil 18: 'B' gruplarının TGF- β skorlarının grafik üzerinde karşılaştırılması.
*:Grup 4b'nin skoru Grup 1b'ye göre anlamlı olarak yüksek ($p < 0,05$)



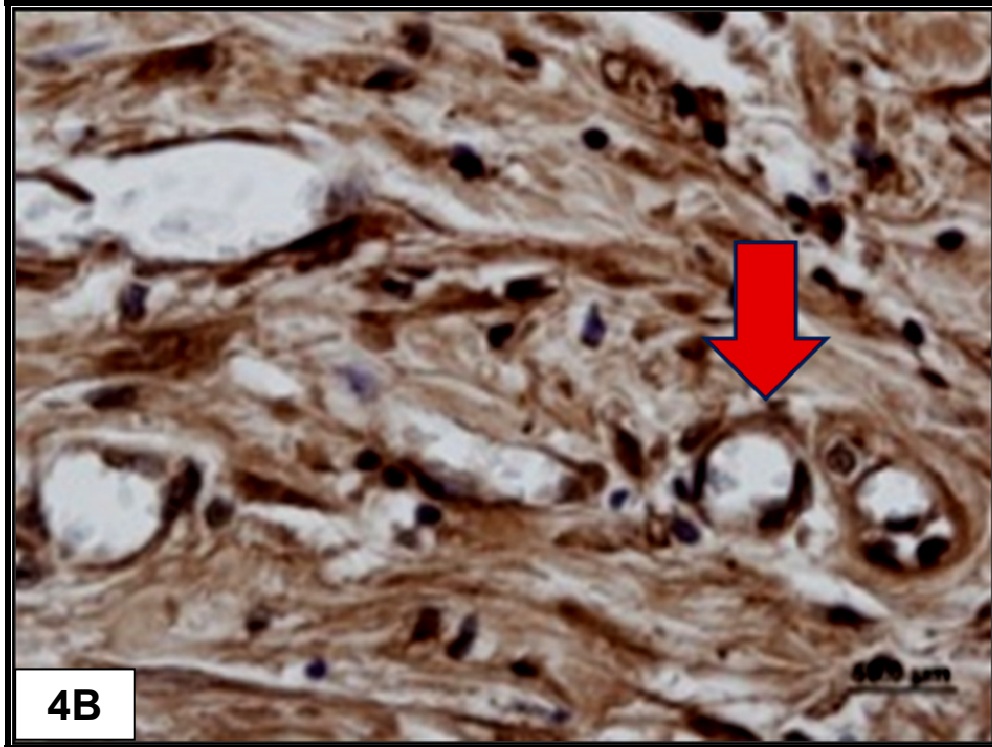
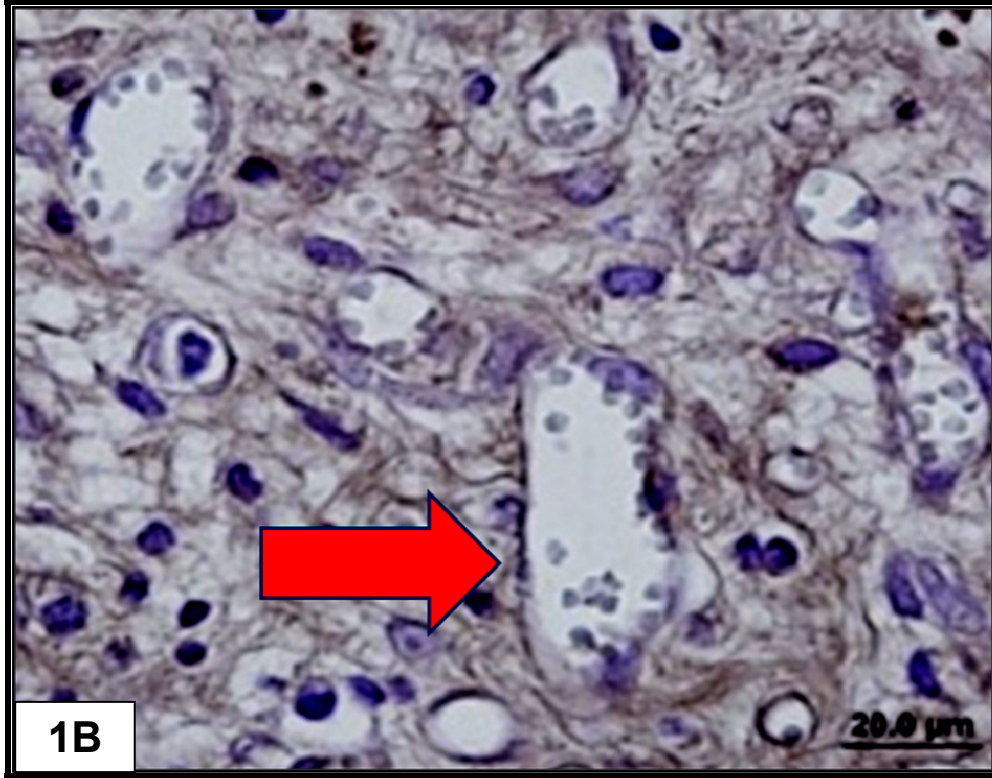
Şekil 19:'A' gruplarının Tip 1 Prokollajen skorlarının grafik üzerinde karşılaştırılması.
*:Grup 2a, 3a ve 4a'nın skorları Grup 1a'ya göre anlamlı olarak yüksek ($p<0,05$)



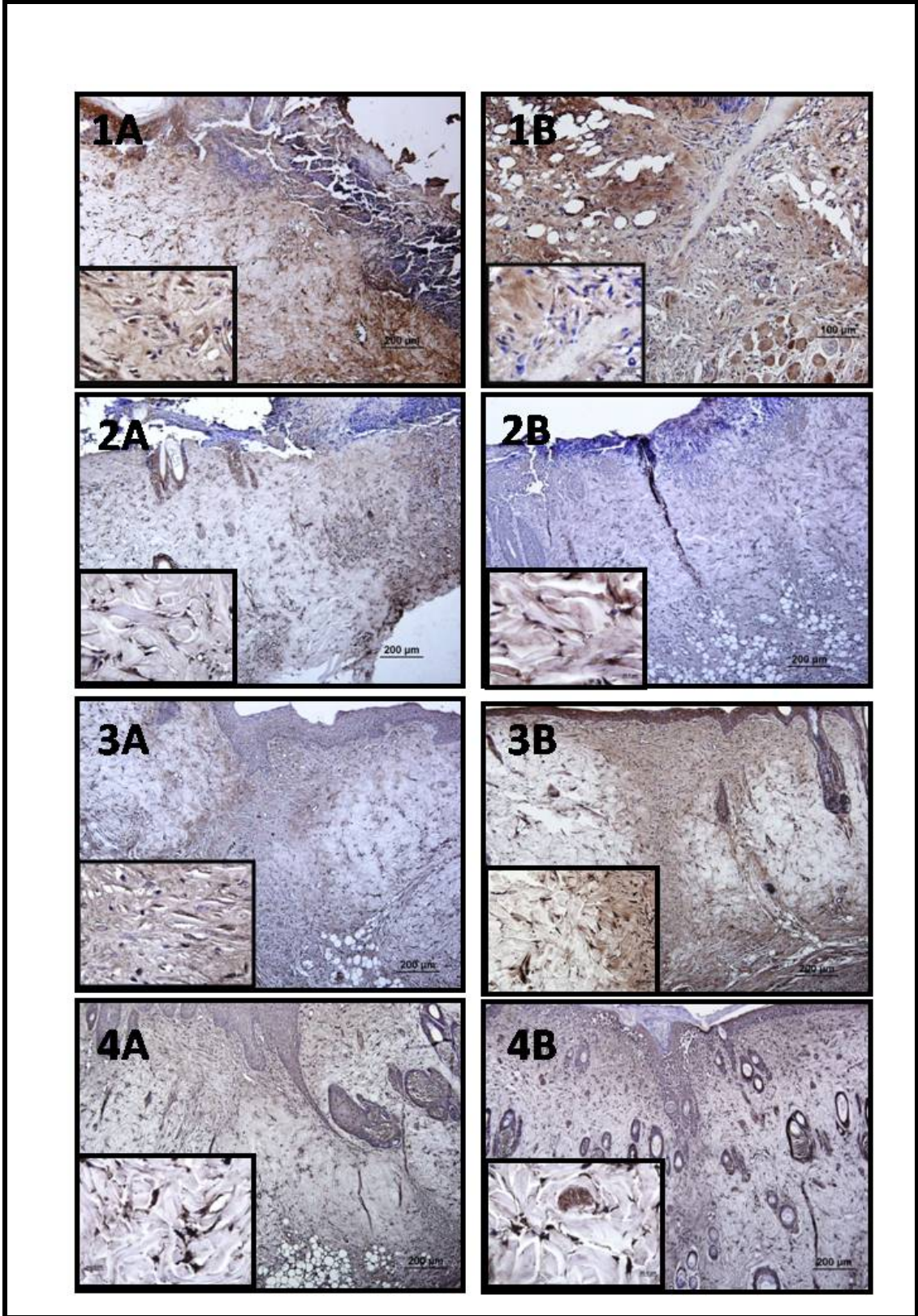
Şekil 20:'B' gruplarının Tip 1 Prokollajen skorlarının grafik üzerinde karşılaştırılması.
*:Grup 3b ve 4b'nin skorları Grup 1b'ye göre anlamlı olarak yüksek ($p<0,05$)



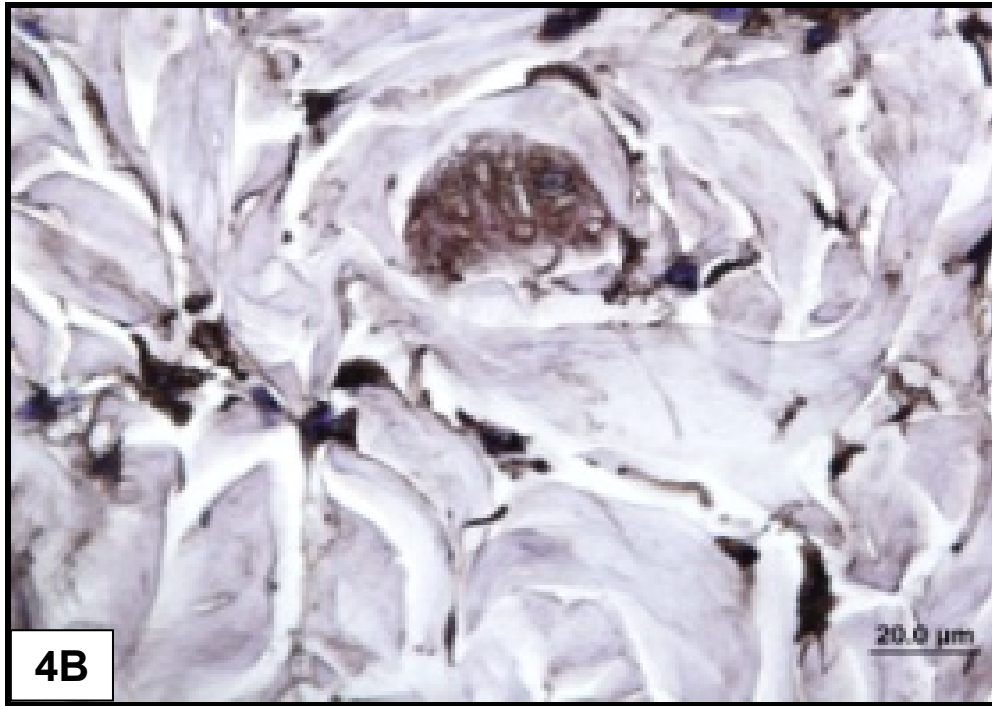
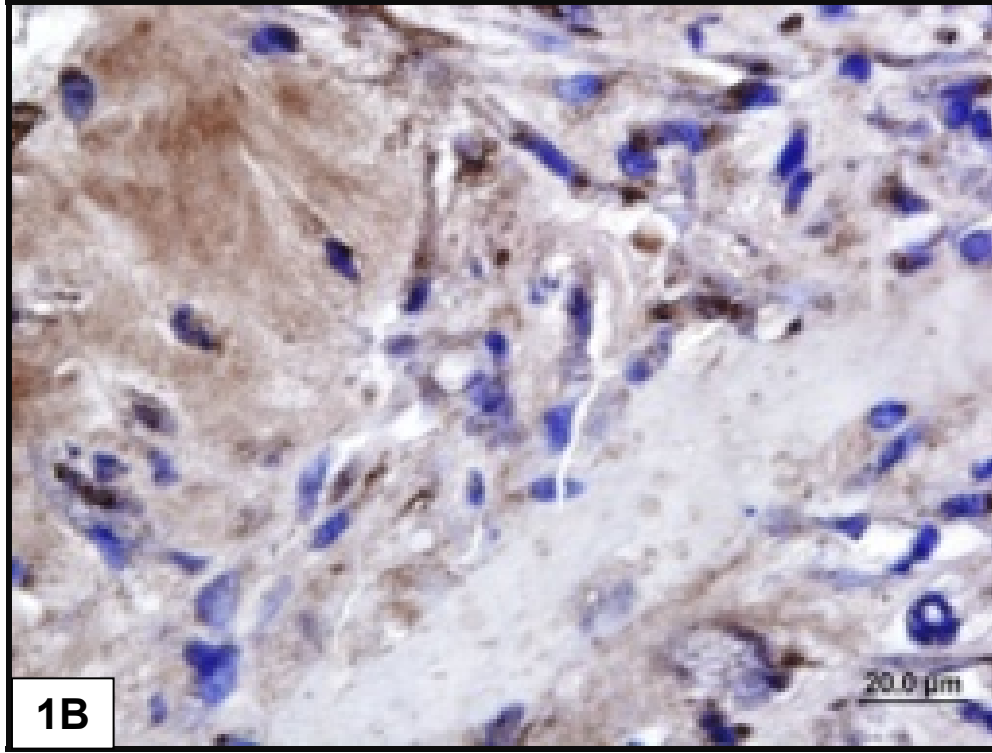
Resim 88: Radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait kesitler (VEGF immunohistokimyası). **Küçük resim:** Perivasküler alan.
Ok: Vasküler yapılar.



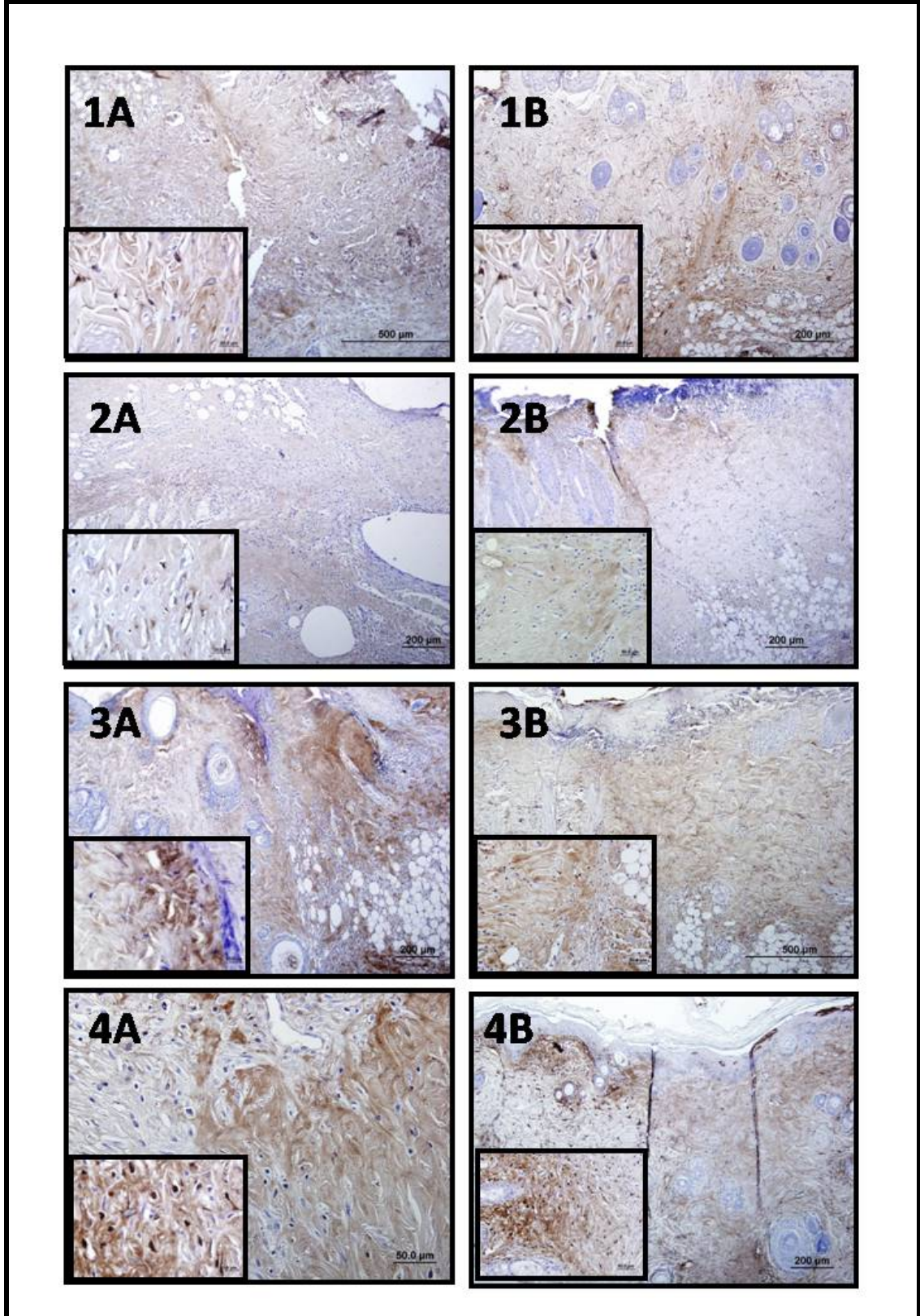
Resim 89: Grup 1b ile 4b'nin VEGF immunohistokimyası. **Kırmızı ok:** Perivasküler alan. VEGF reaktivitesi gösteren alanlar kahverengi olarak izlenmekte.



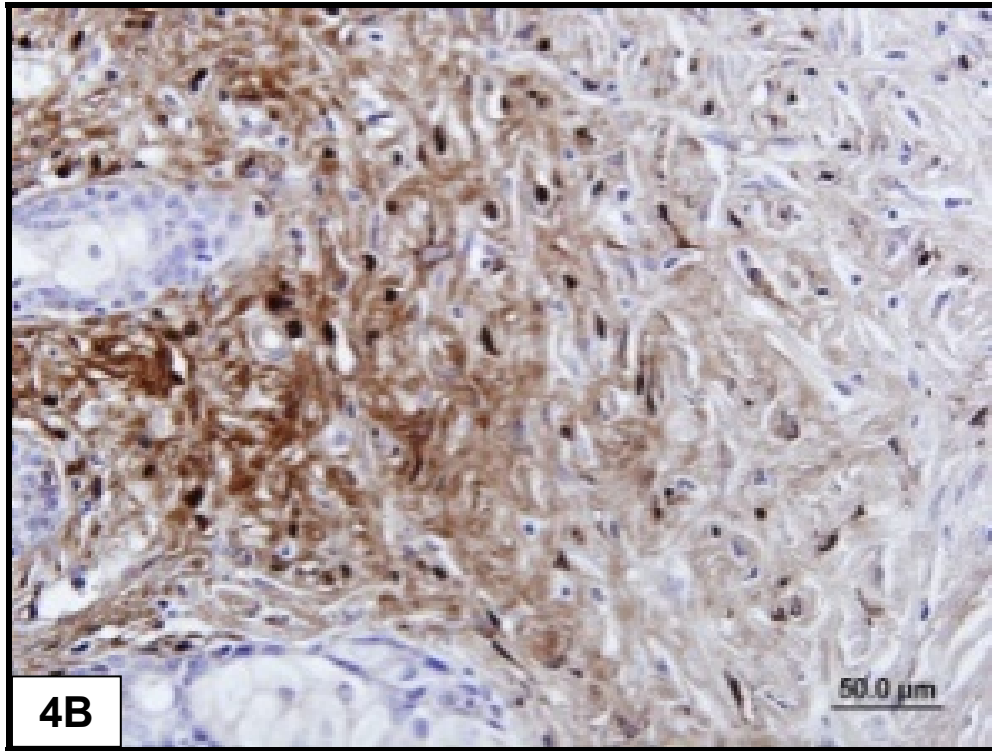
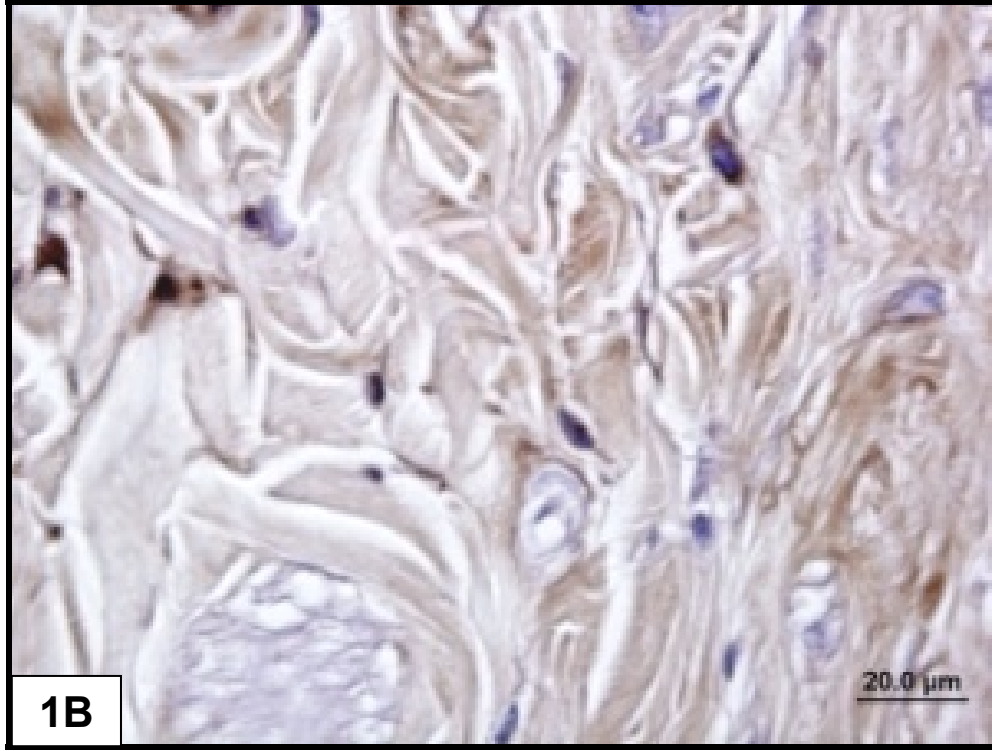
Resim 90: Radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait kesitler (TGF- β immunohistokimyası).



Resim 91: Grup 1b ile 4b TGF- β immunhistokimyası. TGF- β salınımı yoğun olan alanlar koyu renkte izlenmekte



Resim 92: Radyasyona maruz kalan epidermis ve dermise ait kesitler Tip 1 Prokollajen immunohistokimyası.



Resim 93: Grup 1b ile 4b'nin karşılaştırılması Tip 1 Prokollajen immunhistokimyası.
Tip 1 Prokollajen yoğun olan alanlar koyu renkte boyanmakta

7. TARTIŞMA

Radyasyon 1900'lü yılların başından beri malignite tedavisinde kullanılmaktadır. Malign hücrelerin radyasyona karşı etkileşimlerinin anlaşılmasıyla ve modern radyasyon üreten cihazların tasarımıyla beraber günümüzde birçok kanserin tedavisinde radyoterapi yerini almıştır. Radyoterapi, postoperatif dönemde adjuvan tedavi olarak verilebildiği gibi, yumuşak doku sarkomlarında ekstremitte koruyucu yaklaşım amacıyla preoperatif veya operasyona alınması uygun olmayan hastalarda palyatif tedavi olarak da kullanılabilir.

Özellikle yumuşak doku sarkomlarında ekstremitte koruyucu yaklaşım amacıyla operasyon öncesi radyasyon uygulamaları, radyasyonun yara iyileşmesi ile ilgili yan etkilerini ortaya koymuştur.⁶⁵⁻⁶⁸ Lokal rekkürens riskinin azalması ve uzun dönemde fonksiyonel kazançların artması nedenleri ile yumuşak doku sarkomlarının tedavisinde preoperatif RT tercih edilmektedir. Ancak yara iyileşmesindeki sorunlar postoperatif RT uygulamasına göre daha sık görülmektedir. RT sonrası bu komplikasyonları azaltacak uygun cerrahi zaman belli değildir.^{67,69} Preoperatif RT sonrasında gelişen yara iyileşme sorunları %34-45 arasında iken operasyon sonrasında radyoterapi uygulanan hastalarda bu oran %17'lere kadar düşmektedir.^{66,68}

Lineer hızlandırıcıların radyoterapi uygulamalarına girmesi, radyasyonun yüzeysel bölgelere planlanan dozda uygulanabilme imkanı sağlamıştır. Bu cihazlar, BT ile görüntüleme ardından planlama yapılarak yüzeysel 6 cm. derinliğe kadar yerleşmiş malignitelerin tedavisinde istenilen dozda radyasyon verme imkânı sağlamıştır. Sağlam dokuya geçen radyasyon miktarını daha düşük tutabilmesi nedeniyle genelde elektron kullanan lineer hızlandırıcılar cilt tümörleri tedavilerinde tercih edilmektedir.^{7,70} Bu özellikler doğrultusunda cilt yüzeyine radyasyon vermek için çalışmamızda 6 MeV elektron üreten lineer hızlandırıcı kullanarak ratların sırt bölgesine 2500 cGy radyasyon uyguladık. Gel-bolus sayesinde cilt yüzeyinde radyasyonu yoğunlaştıran ve iç organlara zarar vermeyen standart bir ışınlama protokolü oluşturduk.

Preoperatif dönemde radyasyon uygulanması postoperatif dönemde yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyerek yara yeri enfeksiyonlarına, insizyon yerinde

separasyonlara ve de yara iyileşmesinde gecikmelere neden olmaktadır.¹³ Radyasyon sonrası yara iyileşmesinin bozulmasının temel nedenlerinden biri fibroblastların etkilenmesidir. Dermal fibroblastların etkilenmesi ve fibroblastların proliferasyonunun ve migrasyonunun azalması sonucunda yeterli ve efektif kollajen üretilmemekte, kollajen gen ekspresyonu azalmakta, kollajen matürasyonu gecikmekte ve fibroblastlardan TGF- β , FGF, IGF-1 ve CTGF gibi büyüme faktörlerinin salınımı azalmaktadır.^{1,13,18,19}

Ferguson ve ark. X-ışını kaynağı kullanarak ratlara 18 Gy tek doz fraksiyone radyasyon uygulaması ardından fibroblast kültürünün yara iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak intradermal fibroblast kültürü enjekte edilen ratlarda insizyon skarında yara gerim kuvvetinde belirgin derecede artış saptamışlardır. Fibroblastların enjeksiyon öncesinde ışınlanmasında ise bu artışın gözlenmemesi radyasyonun fibroblast fonksiyonunu etkilediğini gösteren bir bulgu olmuştur.¹⁹

Yara iyileşmesinin erken döneminde birçok hücre için kemotaktik olan, ekstrasellüler matriksin oluşumunda ve kollajen üretiminde görev alan TGF- β , radyasyon sonrasında azalmaktadır.^{13,71} Fibroblastlar için kemotaktik olan TGF- β aynı zamanda pozitif geri dönüşüm mekanizmasıyla fibroblastlardan TGF- β salınımını arttırmaktadır.⁷² Cilt altına ekspanse politetrafluroetilen (ePTFE) yerleştirilerek radyasyon uygulaması sonrasında ratlara laparotomi yapılmıştır. Onuncu ve 20. günlerde ePTFE eksize edilerek TGF- β 1 ve kollajen miktarları incelenmiştir. Operasyon öncesi radyoterapi uygulanmasında cilt altında TGF- β 1 ve kollajen miktarlarının azaldığı gösterilmiştir. Radyasyonun geç döneminde oluşan fibrozisi TGF- β 'in reaktif artışı sonucu olabileceği belirtilmiştir.⁶⁹ TGF- β 1'in, radyasyon sonucu oluşan yaralardan izole edilen insan fibroblastlarından in-vitro koşullarda anjiogenik büyüme faktörü olan VEGF sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.⁷³

TGF- β , radyasyon harici oluşan diğer kronik yaraların iyileşmesindeki gecikmeden de sorumlu tutulmaktadır. Kronik yaralardan elde edilen insan fibroblast kültürlerinde TGF- β salınımını indükleyen genin ekspresyonunda azalma olduğu immunhistokimyasal ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri ile gösterilmiştir.⁷⁴

Hücrelerin kemotaksisinden, ekstrasellüler matriks oluşumundan sorumlu olan ve endotel hücrelerinden salınarak anjiogenez arttıran bFGF, radyasyon sonrasında yara iyileşmesindeki gecikmeden sorumlu tutulan bir diğer büyüme faktörüdür. Domuzlar üzerinde radyasyon uygulaması sonrasında flep viabiliteleri incelendiğinde, intradermal uygulanan bFGF'nin neovaskülarizasyonu ve flep viabilitesini arttırdığı gösterilmiştir.^{75,76} bFGF'nin intravasküler yoldan uygulanmasında da endotel hücrelerinde apoptoz oranı azalmıştır.⁷⁵

Ratların mandibulasına radyasyon vererek yapılan kemik ışınlama modelinde ise bFGF'nin anjiogenezini artırıcı etkisi sonucu vital kemik hücresi sayısının ve kemik kalsifikasyonunun artışı gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar kemik için rejeneratif olan kemik morfojenik proteini (BMP) uygulanması sonucunda elde edilen sonuçlara benzer olarak bulunmuştur.⁷⁷

Ratların sırtında 2500 cGy ışınlama ile oluşturulan başka bir çalışmada lokal uygulanan TGF- β ve FGF etkileri incelenmiştir. Büyüme faktörlerinin beraber veya tek başına uygulanmasında doku gerilim kuvvetinin arttığı gösterilmiştir. Histolojik incelemelerde ise tedavi uygulanan gruplarda kollajenin daha düzenli olduğu saptanmıştır.¹⁷ İntestinal sistemde yapılan radyasyon çalışmalarında ise FGF'nin epitel hücrelerinde apoptozu azaltarak barsak epiteli üzerinde radyasyona karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.⁷⁸

Yara iyileşmesinde görev alan hücreleri uyarmak amacıyla rekombinant insan granülosit koloni stimüle edici faktör (rhG-CSF) ve rekombinant insan makrofaj stimüle edici faktör (rhM-CSF) radyasyon sonrası oluşturulan rat yara modelinde kombine olarak uygulanmasının kollajen sentezini arttırarak yara iyileşmesinin hızlandırıldığı gösterilmiştir. Bu stimüle edici faktörlere TGF- β 'yı arttırmak amacıyla TGF- β reseptör kinaz inhibitörü eklendiğinde yara gerilim kuvvetinin daha fazla arttığı saptanmıştır.⁷⁹

Radyasyon hasarı modellerinde yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği gösterilmiş diğer maddeler, oksidatif hasarı önleyici etkisi olan bitkisel ilaçlar ve dolaşımdaki Kİ kökenli kök hücreleri aktive eden nöron büyüme faktörüdür(NGF).⁸⁰⁻⁸²

Son çalışmalar yara iyileşme periyodunun belli bölümüne etkilemek amacıyla azalan madde veya hücrenin verilmesi yerine sistemik veya yara bölgesine kök hücre uygulamaları üzerinde yoğunlaşmıştır Kök hücrelerin diferansiyasyon, sitokin ve

büyüme hormonları salgılama ve doku içindeki diğer kök hücreleri aktive etme özellikleri sayesinde yara iyileşmesinde etkili oldukları gösterilmiştir. Normal yara iyileşme sürecinde de değişik bölgelerde yerleşen kök hücreler görev almaktadır.⁸³ Epidermis bazal tabakasında ve kıl follikülleri etrafında yerleşen kök hücreler yaralanma sonrasında mikro ortamlarındaki değişik sonucunda diferansiye olarak dokunun iyileşmesinde görev almaktadırlar.^{84,85} Ayrıca yaralanma sonrası damar çevresinde yer alan kök hücrelerin ve dolaşımdaki Kİ kaynaklı kök hücrelerin, yaralanma bölgesine yönelerek fibroblast ve myofibroblast yönünde diferansiye oldukları ve yara iyileşmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir.^{83,86-88} Radyasyon hasarı oluşturulan rat modelinde immunfluoresan olarak işaretlenen Kİ kökenli MKH'ler intravenöz yoldan uygulanmıştır. Yara yerindeki hücrelerin %14'ünü işaretlenmiş hücreler olduğu gösterilmiştir.⁸⁷ Dolaşımdaki kök hücrelerin yara yerine yönelmesinde TGF- β ve bFGF'nin etkisi bulunmaktadır.⁸⁹

Kök hücreler, embryonik ve non-embryonik kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Embryonik kök hücrelerin 1980'li yıllarda bulunmasına rağmen etik ve yasal kısıtlamalar nedeniyle rejenaratif tıpta kullanıma girememiştir.²⁰ Bu hücrelerin her tür dokuyu oluşturabilecek hücrelere yönelme kapasitesi vardır. Embryonik kök hücre çalışmaları ulusal yönetimler seviyesinde izin alınması sonucu yapılabilmektedir. Tıbbi açıdan bu hücrelerden tümör gelişme riski yüksektir.⁹⁰ 2009 yılında Ataksi-Telanjektazi tanılı bir hastada embryonik kök hücre uygulaması sonrasında beyin ve spinal kordda teratom oluşumu gözlenmiştir. Embryonik kök hücrelerin yan etkileri tam olarak ortaya koyulmaması araştırmacılarda non-embryonik kök hücrelerin kullanımının daha güvenli ve etkin olacağı düşüncesini uyandırmıştır.⁹¹

Yetişkin kök hücreler, non-embryonik kök hücre grubunda yer alır. Bu hücreler morfolojilerine, yüzeyel işaretleyicilerine diferansiyasyon potansiyellerine göre mezenkimal kök hücre, hematopoetik kök hücre ve endotelial progenitör hücre gibi alt gruplara ayrılırlar. YKH'lerin temel görevi buldukları ortamda oluşacak hasarlardan sonra dokuyu tamir etmek ve doku bütünlüğünün devamını sağlamaktır. Bu hücrelerin farklı hücrelere diferansiye olabilme ve sonsuz bölünebilme özellikleri vücudumuzda bulunan somatik hücrelerden temel farklarıdır. MKH'ler, birçok dokuda bulunurlar ve uygun sinyal oluşuncaya kadar farklılaşma göstermezler.^{24,92}

In-vitro ortamda incelendiğinde MKH'ler diğer hücrelerden farklı olarak plastik yüzeye yapışabilme özelliği vardır. MKH'leri tespit edecek spesifik olmamasına rağmen bazı antijenlerin ekspresyonunu gerçekleştirdikleri gösterilmiştir. Ancak MKH'ler hiçbir şekilde CD14, CD19, CD34, CD45 ve HLA_DR eksprese etmezler. Bu antijenlerin akım sitometri veya immunositokimyasal olarak gösterilmesi mümkündür.^{37,57,59} MKH'lerin uygun ortamda mezoderm kaynaklı adiposit, kondrosit ve osteositlere diferansiye olabilmelidirler.³⁷ Ayrıca MKH'lerin hepatosit, fibroblast, kas, sinir ve epitel hücresi gibi farklı germ tabakasından köken alan hücrelere dönüşebilme özelliklerine 'trans-diferansiyasyon' adı verilmiştir.^{38-41,93} CTGF kullanılarak insan MKH'lerinin fibroblasta diferansiye olabileceği ratlar üzerinde yapılan deneysel çalışmada gösterilmiştir.⁹⁴

Çalışmamızda elde ettiğimiz ADAS'ların yüzey adezyon molekülü olan CD29 (β 1-integrin) ve CD54 (ICAM-1) ekspresyonlarını in-vitro ortamda immunositokimyasal olarak değerlendirdik. Hücrelerin bu antijenleri eksprese ettiğini flüoresan mikroskop altında saptadık. Aynı hücrelerin hematopoetik işaretleyiciler olan CD14 ve CD45'i eksprese etmediğini gösterdik. Ayrıca elimizdeki ADAS'ların MKH olduklarını göstermek için adipogenez ve osteogenez yönlerine diferansiye ettik. Adipositlere diferansiye edilen hücrelerde önceki çalışmalarda belirtildiği gibi ışık mikroskopu altında 10. günde vakuelleri gözlemledik.⁹⁵ Kolesterol ve triaçilgliserol esterlerini boyaması sonucu yağ birikimini gösteren Red-Oil boyası⁹⁶ ile hücreleri 21. günde boyadığımızda vakuollerin yağ vakuolü olduğunu göstererek hücrelerin adipogeneze yönlendiklerini kanıtladık. Osteogeneze yönlendirdiğimiz hücrelerde ışık mikroskopunda belirgin bir bulgu izlemedik ancak kalsiyum depozitlerini Alizarin-Red ile boyadığımızda osteojenik diferansiyasyonun gerçekleştiğini gösterdik. Diferansiyasyon ve antijen çalışmalarımızı ticari rat mezenkimal kök hücrelere de uyguladık ve 21 gün sonunda ADAS'lardan elde ettiğimiz sonuçlara benzer özellikte olduğunu gözlemleyerek deneyde kullandığımız hücrelerin MKH olduğunu kanıtladık.

Kemik iliğinde 1960'lı yıllarda kök hücrelerin gösterilmesi ardından yara iyileşmesindeki etkilerini göstermek amacıyla Kİ kökenli MKH'ler kullanılarak birçok çalışma yapılmıştır.^{20,24} Dantzer ve ark. 18 Gy ile ratları ışınlama ardından Kİ kökenli MKH'lerin intradermal enjeksiyonunun doku gerilim kuvvetini arttırdığını göstermiştir. Başka bir çalışmada ise karın bölgesinde fasya ve cilt insizyonu iyileşmesinde Kİ

kökenli MKH'lerin lokal enjeksiyonunun kollajen oluşumunu ve organizasyonunun arttırdığı gösterilmiştir.⁹⁷

MKH'lerin yara iyileşmesini arttıran bir faktör de yüksek anjiogenik etkileridir. Yara yerine uygulanan Kİ kökenli MKH'lerin %1'inden daha az bir kısmının endotel hücrelerine diferansiye olmasına rağmen bu hücrelerin yüksek anjiogenik etkilerinin, VEGF, anjiopoetin-1 ve bFGF gibi anjiogenik faktörler salgılamaları yanında dolaşımda ve bölgesel yerleşimli kök hücre ve progenitör hücreleri aktive etmeleri sonucunda olduğu deneysel iskemi ve diyabet modellerinde gösterilmiştir.^{24,98-100} MKH'ler ayrıca MMP-9 miktarını artırarak yara yerindeki hücrelerden VEGF salınımını arttırmaktadır.¹⁰¹ Bu hücreler aynı zamanda yara iyileşmesinde keratinositlere diferansiye olarak ve EGF salgılayarak epitelizasyonu hızlandırabilmektedirler.^{93,100,102}

Kİ kökenli MKH'lerin bu kadar çok avantajlı olmasına rağmen klinikte kullanım amacıyla düşünüldüğünde elde edilmesi için invaziv ve ağrılı bir girişim olan kemik iliği biyopsisi yapılması gerekmektedir. Vücutta bol miktarda bulunan yağ dokusundan liposakşın gibi daha az invaziv yöntem sonucunda elde edilmesi ve doku başına düşen MKH sayısının fazla olması kök hücre tedavilerinde kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre ADAS'ları avantajlı kılmaktadır. Taze yağ dokusundaki nükleuslu hücrelerin %27'si kök hücredir. Kİ'nde bu oran %0,001-0,004 arasındadır.¹⁰³ Kİ kökenli MKH'lerin ve ADAS'ların büyüme kinetikleri, salgıladıkları sitokinler ve çok yönlü diferansiyasyon kapasiteleri arasında fark bulunmamaktadır ve her iki kök hücre grubunda düşük telomeraz aktivitesi mevcuttur.^{24,30,95,104}

Yağ dokusunun küçük parçalara ayrılması ve enzimatik sindirime maruz bırakılması sonucu elde edilen SVF, endotel hücreleri, perisitler, preadipositler ve çeşitli stromal progenitör hücreler içermektedir. SVF içerisinde bulunan stromal progenitör hücreler, uygun şartlar ve mikroçevre altında adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik ve nörojenik farklılaşmaya uğrayabilmektedir. SVF içinde bulunan ve erken vasküler öncü hücresi olarak görev yapan hücreler mevcuttur.¹⁰⁵ Kültüre edilmiş ADAS'lar ile karşılaştırıldığında SVF homojen hücre yapısına sahip değildir ve içerdiği kök hücre kültürüne edilmiş ADAS'lar kadar yoğun olmamaktadır. Bu hücrelerin de anjiogenik etkisi olmasına rağmen verilen miktarın kantitatif olarak belirlenememesi dezavantajdır.^{31,106} Rigotti ve ark. radyoterapinin geç dönem

komplasyonları olan skar, kontür bozukluğu ve kronik yarası olan 20 hastada SVF ile zenginleştirilmiş lipoaspirat uygulaması sonrasında neovaskularizasyonda ve yara iyileşmesinde artış gözlemlenmiştir.¹⁰⁷ Hücreden zenginleştirilmiş lipotransfer adını verdiği bu teknik fasiyal lipo atrofi ve yumuşak doku dolgusu amacıyla kullanılmıştır.¹⁰⁸ Lumpektomi ve mastektomi sonrası radyoterapi uygulanan hastalarda protez ile meme rekonstrüksiyonu öncesinde ve sonrasında yağ grefti uygulamasının, yağ dokusu içindeki kök hücrelere bağlı olarak komplikasyon oranlarını azaltıcı etkisini gösteren yayınlar mevcuttur.^{109,110}

ADAS'lar, endotel hücrelerine diferansiye olarak ve VEGF, FGF, TGF- β ve HGF gibi anjiogenik etkili büyüme hormonları salgılayarak neovaskularizasyonu arttırmaktadır.^{38,59,60,111-113} Bu hücrelerin endotel hücrelerine ve keratinositlere diferansiye olabildikleri yeşil flüoresan protein (GFP) ile işaretlenmiş ADAS uygulaması sonucunda gösterilmiştir.³⁸ ADAS'lardan keratinosit büyüme faktörü (KGF) sekresyonu epitelizasyonu artırmaktadır.^{38,59} ADAS'ların anjiogenik etkileri ratlar üzerinde yapılan iskemi modellerinde ve random paternli fleplerde saptanmıştır. Ratların sırt bölgesinden random paternli flep bazına ADAS uygulaması sonrasında flepte nekrozun daha az olduğu ve histolojik olarak kapillerlerin yoğun ve çapının daha fazla olduğu gösterilmiştir.^{61,111} Biz de çalışmamızda Grup 4b'de transillüminasyon ile skar etrafında yoğun bir kapiller ağ gözlemledik. Histolojik incelemelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kapiller sayı ve çap artışı belirgindi. İmmunhistokimyasal olarak VEGF'i incelediğimizde yağ grefti, SVF ve ADAS uyguladığımız gruplarda kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek olduğunu saptadık. Grup 3'ün doku kopma testleri, histolojik parametreleri ve immunhistokimyasal boyama sonuçları kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen Grup 4'ten daha düşük olması, SVF'nin anjiogenik etkisinin, kök hücre sayısının kantitatif olarak düşük olması nedeni ile kök hücre kültürü kadar etkili olmadığını düşündürdü. Uygulanan kök hücre sayısının artmasına bağlı daha fazla etki izlendiğini fareleri ultraviole B (UVB) ile ışınlama sonrasında farklı sayıda ADAS uygulayan Kim ve ark. göstermiştir. Yüksek miktar olarak tarif ettikleri 10^5 ADAS uygulanan grupta dermis kalınlığını ve kollajen miktarını, 10^3 ve 10^4 ADAS uyguladıkları gruplardan daha fazla olduğunu saptamışlardır.¹¹⁴

Diferansiyasyon ve sekresyon haricinde yara iyileşmesini arttırıcı başka bir faktör ise diğer MKH'ler gibi ADAS'ların ortamdaki hücreleri uyararak parakrin etki göstermeleridir. Dermal fibroblastları uyararak kollajen sentezini arttırdıkları in-vitro ortamda gösterilmiştir.¹¹⁵

Grup 4'te 28 gün sonunda tüylenme miktarının diğer gruplara oranla daha fazla olduğunu izledik. Histomorfolojik olarak ta kıl follikülü sayısı Grup 4b'de daha fazlaydı. Bu bulgular, daha önceki çalışmaların ışığında ADAS'ların kıl kökünde yerleşen kök hücreleri uyardığını ve aynı zamanda ortamdaki FGF gibi büyüme faktörlerini arttırarak kıl foliküllerinin apoptoz oranının azalttığını düşündürdü.^{85,116}

Radyasyon sonucu ortamda artan serbest oksijen radikalleri DNA hasarı yaratarak sağlıklı hücrelere zarar vermektedir ADAS'lar dermal fibroblastları ve keratinositleri uyararak antioksidan enzimlerin salınımını arttırmaktadır. ADAS'ların kendisi de süperoksit-dismutazın subtiplerini sekrete ederek serbest radikallere karşı hücreleri korumaktadır.⁵⁹

ADAS'ların proliferasyon kapasitesi hipoksik ortamda artış göstermektedir. Ratlarda oluşturulan yara modelinde hipoksik ortamda kültüre edilen ADAS'ların normoksik ortamda kültüre edilenlere göre yara alanının %27 daha fazla küçüldüğü gözlemlenmiş ve bu grupta VEGF, bFGF ve IGF-1 büyüme faktörlerinin sekresyonunun up-regülasyonuna bağlı arttığı gösterilmiştir.⁴¹ Radyoterapi uygulanan doku ve çevresinde hipoksik, hiposellüler ve hipovasküler ortam olduğu göz önüne alındığında ADAS'ın yararlı olacağı düşünülmektedir.¹¹⁷

ADAS'ların yara yerine lokal uygulanması neovaskülarizasyonu ve reepitelizasyonu hızlandırmaktadır. Ancak hücrelerin intradermal yoldan enjeksiyonu geniş alanda etkisini gösterememesine neden olabilir. Chunlei ve ark. ADAS'ları asellüler dermal matriksten oluşan skafold kullanarak sekonder yara iyileşmesini arttırdığını göstermiştir.⁶⁰ Çalışmamızda ADAS'ların 6 cm. boyunda primer yara iyileşmesini incelediğimiz için hücreleri branül yardımı ile oluşturulan poşa enjeksiyon olarak uyguladık. Daha önce tariflenmemiş bir şekilde branülü dorsal faysa altından oluşturulan poşa yönlendirerek dışarıya enjeksiyon sonrası kaçak olmasını engelledik. Sonuç olarak radyasyondan etkilenen alana ve insizyon skarı altına hücreler homojen olarak yayılmasını sağladık. Hücrelerin erken dönemde beslenme sorunu yaşamamaları için DMEM solüsyonu içinde enjekte edildi. Grup 3'te branülü

ratlara sütür ile sabitledik. SVF elde etmek için gerekli olan 4-6 saat içinde ratlarda anestezi etkisi geçtiğinden dolayı branül sabitlemesi aynı gün içinde 2. kez anestezi uygulama ihtiyacını ortadan kaldırdı.

Primer yara iyileşmesi sırasında fibroblastlar tarafından üretilen kollajenin artması sonucunda skar dokusunun kalitesi artmaktadır.^{10,13} Artan kollajen biyomekanik yöntemlerle, kollajen gen ekspresyonunun ölçümü ile veya histomorfolojik olarak gösterilebilir. Dokuda alan başına düşen gerilim kuvvetine doku gerilim kuvveti (tensile strength) adı verilmektedir. Yara dudaklarının ayrılması için gereken kuvvet ise kopma kuvveti (breaking strength) olarak adlandırılır.^{10,118} Ratlardan aldığımız dokuların boyutlarının eşit olması ve kopma testi kısıkalarına skardan aynı uzaklıkta bağlamamızdan dolayı uygulama sırasında örnekler arasında fark olmamıştır. Sonuçları karşılaştırdığımızda tüm grupların 14. ve 28. günler arasındaki artış, bu dönemde kollajen üretiminin arttığını yansıtmaktadır. 14. günde kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik saptanmayan SVF ve yağ grefti uygulanan grupların kopma kuvveti değeri 28. günde daha fazla artış göstermesi bu gruplarda kollajen yapımının daha fazla arttığını yansıtmaktadır. Ancak hem 14. hem de 28. günlerde kültüre ADAS uygulanan grubun değeri tüm gruplardan yüksek olarak saptanmıştır. İmmunhistokimyasal olarak kollajen öncüsü prokollajen tip-1'in Grup 4b'de yoğun saptanması ve histomorfolojik olarak Grup 4b'de daha düzenli kollajen diziliminin görülmesi kültüre ADAS'ların kollajen sentezini arttırdığını göstermektedir.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmayı radyasyon sonucu etkilenen dokuda azalan moleküllerin yerine konulması veya etkilenen hücrelerin sayısının artırılması yerine, fibroblast ve endotel hücrelerine diferansiye olma zelliğ i yanıda büyüme faktörü salgılayan ve parakrin etki ile diğ er hücreleri aktive eden ADAS uygulanmasının daha etkili olacağını düşünerek planladık. Standart biçimde her sıçanın dorsal cildinde 8x3 cm.lik alana 2500 cGy radyasyon dşrecekle bir düzenek oluşturduk. Ratların inguinal bölgesinden alınan yağ dokusundan elde edilen erişkin kök hücrelerin, radyasyon uygulanan alandaki primer yara iyileşmesi üzerine etkisini inceledik. In-vitro ortamda

çok yönlü diferansiyasyon özelliği ile beraber hücre yüzeyel işaretleyicilerini gösterdiğimiz ADAS'ların, radyasyon uygulanan alanda insizyon skarı iyileşmesinde olumlu etkisi olduğunu biyomekanik, histomorfolojik ve immunhistokimyasal olarak gözlemledik.

Radyasyon radyosensitif tümörlerde tümör miktarını azaltmasına rağmen insizyon yarasının iyileşmesinde görülen komplikasyonlar nedeni ile preoperatif uygulaması kısıtlanmaktadır. Oysaki melanom harici deri tümörlerinin %90'ını oluşturan bazal hücreli karsinom (BHK) ve skuamöz hücreli karsinom (SHK) radyosensitif tümörlerdir. Radyasyon, bu tümörlerde cerrahi sonrası rekkürensi azaltmak amacıyla veya cerrahiye uygun olmayan hastalarda ise palyatif olarak uygulanmaktadır.^{119,120} Elektron ışınlaması sonucunda BHK için %96 ve T3'ten küçük SHK için %93 gibi lokal kontrol sağlanabildiğini gösteren yayınlar mevcuttur.¹²¹ Ancak radyoterapi uygulamasının, cerrahi tedaviye göre bir üstünlüğünün olmaması ve radyasyon sonrasında yara iyileşmesi sorunlarının gözlenmesi cilt tümörleri tedavisinde operasyon öncesi radyoterapi uygulaması gündeme gelmemektedir.¹²² Cilt tümörlerinde preoperatif radyoterapi uygulaması, cerrahi eksizyon sınırlarını azaltarak daha basit rekonstrüktif seçenekler ile tedavi imkânı sağlayabilecektir.

Elde edilebilmesi için uzun süreli pasajlar gerektirmesi, maliyetinin yüksek olması ve özel merkezler gerektirmesi, kültüre MKH'lerin klinikte kullanımındaki dezavantajları oluşturmaktadır. MKH'ler yara iyileşmesi ve diğer rejenaratif uygulamalarda yararlı olduğu gösterilmesine rağmen yan etkileri tam olarak ortaya koyulamadığından klinikte rutin uygulamalara geçilememiştir. Bu hücrelerin kendini yenileyebilme ve sonsuz bölünme özelliklerinden dolayı tümör gelişme potansiyeli bilinmemektedir.¹²³ Kanıtlanmamasına rağmen solid organ ve kemik iliği transplantasyonu ardından görülen malignitelerin MKH'lere bağlı olabileceğini düşünen araştırmacılar mevcuttur. Ayrıca in vivo olarak fare kökenli ADAS'ların 4 aydan uzun süreli pasajlanmasında malign transformasyonu saptanmıştır. İnsan MKH ile yapılan çalışmalarda malign transformasyon, malign hücreler ile kontamine hücre kültürleri haricinde gösterilememiştir.^{30,90,105,124}

Daha geniş çalışmalar ile ADAS'ların tümör hücreleri üzerinde etkilerinin ve in vivo koşullarda davranışlarının belirlenmesi ardından vücutta bol miktarda bulunan

yağ dokusundan elde edilecek erişkin kök hücreler ile preoperatif radyoterapi sonrası cerrahi uygulamaların daha güvenli olacağını düşünmekteyiz.

9. KAYNAKLAR

- 1- Arıyan S. Radiation injury. In: Mathes SJ (ed). Mathes Plastic Surgery Volume1. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2006:835-53.
- 2- Kutman C, Çelebioğlu B. Radyoterapi ve radyasyonun tarihçesi. Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Yıllığı. 2000;1(1):49-50.
- 3- Dormand EL, Banwell PE, Goodacre TE. Radiotherapy and wound healing. Int Wound J. 2005;2(2):112-27.
- 4- Knoetgen J, Lettiri SC, Arnold PG. Radiation and radiation injuries. In:Thorne CH (ed). Grabb&Smith's Plastic surgery. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, 2007:162-8.
- 5- Olascoaga A, Vilar-Compte D, Poitevin-Chaco' n A, Contreras-Ruiz J. Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options. Int Wound J. 2008;5:246–57.
- 6- Dirican B. Radyoterapi teknikleri. 1. Ulusal Parçacık Hızlandırıcıları ve Uygulamaları Kongresi; 2001 Ekim 25-26; TAEK, Ankara
- 7- Goldberg SR, Diegelmann RF. Wound healing primer. Surg Clin North Am. 2010;90(6):1133-46.
- 8- Mast BA, Cohen KI. Normal wound healing. In: Achauer BM, Erikssn E (eds). Plastic Surgery Indications, Operations and Outcomes Volume1. 1st ed. St.Louis: Mosby Inc., 2000:37-52.
- 9- Lorenz HP, Longaker MT. Wound healing. Repair biology and wound and scar treatment. In: Mathes SJ (ed). Mathes Plastic Surgery Volume1. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2006:209-34.
- 10- Rohrich RJ, Roninson JB. Wound healing. Selected Readings in Plastic Surgery 1999;9(3):1-39.

- 11- Kim WS, Park BS, Sung JH. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(7):879-87.
- 12- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 28;55(12):1531-46.
- 13- Tibbs M. K. Wound healing following radiation therapy: A review. *Radiother. Oncol.* 1997;42: 99-106.
- 14- Devalia HL, Mansfield L. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J.* 2008;5(1):40-4.
- 15- Schäffer M, Weimer W, Wider S, Stülten C, et al. Differential expression of inflammatory mediators in radiation-impaired wound healing. *J Surg Res.* 2002 Sep;107(1):93-100.
- 16- Gu Q, Wang D, Gao Y, Zhou J, et al. Expression of MMP1 in surgical and radiation-impaired wound healing and its effects on the healing process. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2002;21(1):71-8.
- 17- Tattini C, Manchio J, Zaporozhan V, Carderelli G, et al. Role of TGF- β and FGF in the treatment of radiation-impaired wounds using a novel drug delivery system. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008;122:1036-45.
- 18- Dantzer D, Ferguson P, Hill RP, Keating A, et al. Effect of radiation and cell implantation on wound healing in a rat model. *J Surg Oncol.* 2003;83(3):185-90.
- 19- Ferguson PC, Boynton EL, Wunder JS, Hill RP, et al. Intra-dermal injection of autologous dermal fibroblasts improves wound healing in irradiated skin. *J Surg Res.* 1999;85(2):331-8.
- 20- Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(4):169-83.
- 21- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
- 22- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* 2000;227(2):271-8.
- 23- Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells.* 2003;5(1):79-88.

- 24- Si YL, Zhao YL, Hao HJ, Fu XB, et al. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev.* 2011;10(1):93-103.
- 25- Hwang NS, Zhang C, Hwang YS, Varghese S. Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2009;1(1):97-106.
- 26- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(4):215-30.
- 27- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
- 28- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003;116(9):1827-35.
- 29- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 2003;33(6):919-26.
- 30- Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and literature review. *J.Nippon Med Sch.* 2009;76(2):56-66.
- 31- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.
- 32- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-16.
- 33- Mageed AS, Pietryga DW, DeHeer DH, West RA. Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2007;83(8):1019-26.
- 34- Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol.* 2007;7:11.

- 35- Chang YJ, Hwang SM, Tseng CP, Cheng FC, et al. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. *Cells Tissues Organs*. 2010;192(2):93-105.
- 36- Yoon BS, Moon JH, Jun EK, Kim J, et al. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(6):887-902.
- 37- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- 38- Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, Buard V, et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(4):503-10.
- 39- Tomita Y, Makino S, Hakuno D, Hattan N, et al. Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. *Med Biol Eng Comput*. 2007;45(2):209-20.
- 40- Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, et al. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol*. 2005;193(2):312-25.
- 41- Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*. 2009;17(4):540-7.
- 42- Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*. 2007;207(2):267-74.
- 43- Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003;5(12):1028-38.
- 44- Brooke G, Tong H, Levesque JP, Atkinson K. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev*. 2008;17(5):929-40.

- 45- Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol.* 2007;179(5):2824-31.
- 46- Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371(9624):1579-86.
- 47- Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell.* 2010;21(11):1783-7.
- 48- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-95.
- 49- Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J, Popescu IR, et al. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. *J Cell Sci.* 2004;117(18):4289-99.
- 50- Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, et al. Characterization of neuronal/glia differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol.* 2004;187(2):319-28.
- 51- Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, et al. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol.* 2007;207(2):267-74.
- 52- Trottier V, Marceau-Fortier G, Germain L, Vincent C, et al. IFATS collection: Using human adipose-derived stem/stromal cells for the production of new skin substitutes. *Stem Cells.* 2008;26(10):2713-23.
- 53- Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(1):258-64.
- 54- Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(4):1135-40.
- 55- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006;24(4):150-4.
- 56- Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW. Adipose-derived cells. *Cell Transplant.* 2007;16(9):963-70.

- 57- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100(9):1249-60.
- 58- Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(1):237-41.
- 59- Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, et al. Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*. 2006;18(1):55-62.
- 60- Nie C, Yang D, Morris SF. Local delivery of adipose-derived stem cells via acellular dermal matrix as a scaffold: a new promising strategy to accelerate wound healing. *Med Hypotheses*. 2009;72(6):679-82.
- 61- Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, et al. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(1):50-8.
- 62- Kim WS, Park BS, Kim HK, Park JS, et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci*. 2008;49(2):133-42.
- 63- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45(2):115-20.
- 64- Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, et al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*. 2004;53(9):2509-17.
- 65- Sheplan LJ, Juliano JJ. Use of radiation therapy for patients with soft-tissue and bone sarcomas. *Cleve Clin J Med*. 2010;77(1):27-9.
- 66- O'Sullivan B, Davis AM, Turcotte R, Bell R, et al. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9325):2235-41.
- 67- Al-Absi E, Farrokhyar F, Sharma R, Whelan K, et al. A systematic review and meta-analysis of oncologic outcomes of pre- versus postoperative radiation in localized resectable soft-tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(5):1367-74.

- 68- Kunisada T, Ngan SY, Powell G, Choong PF. Wound complications following pre-operative radiotherapy for soft tissue sarcoma. *Eur J Surg Oncol.* 2002;28(1):75-9.
- 69- Johnson LB, Adawi D, Agren MS, Jorgensen LN, et al. Combination of pre-operative radiotherapy and surgery suppresses local accumulation of collagen and TGF-beta1 in rats. *J Surg Res.* 2006 Jun 15;133(2):136-42.
- 70- Hogstrom KR, Almond PR. Review of electron beam therapy physics. *Phys Med Biol.* 2006;51(13):455-89.
- 71- Flanders KC, Major CD, Arabshahi A, Aburime EE, et al. Interference with transforming growth factor-beta/ Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin. *Am J Pathol.* 2003;163(6):2247-57.
- 72- Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, et al. Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther.* 2006;18(1):55-62.
- 73- Riedel K, Koellensperger E, Ryssel H, Riedel F, et al. Abrogation of TGF-beta by antisense oligonucleotides modulates expression of VEGF and increases angiogenic potential in isolated fibroblasts from radiated skin. *Int J Mol Med.* 2008;22(4):473-80.
- 74- Cha J, Kwak T, Butmarc J, Kim TA, Yufit T, et al. Fibroblasts from non-healing human chronic wounds show decreased expression of beta ig-h3, a TGF-beta inducible protein. *J Dermatol Sci.* 2008;50(1):15-23.
- 75- Hom DB, Unger GM, Pernell KJ, Manivel JC. Improving surgical wound healing with basic fibroblast growth factor after radiation. *Laryngoscope.* 2005;115(3):412-22.
- 76- Chang HS, Hom DB, Agarwal RP, Pernell K, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on irradiated porcine skin flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 Mar;124(3):307-12.
- 77- Springer IN, Niehoff P, Açil Y, Marget M, et al. BMP-2 and bFGF in an irradiated bone model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2008;36(4):210-7.
- 78- Nakayama F, Hagiwara A, Umeda S, Asada M, et al. Post treatment with an FGF chimeric growth factor enhances epithelial cell proliferation to improve

- recovery from radiation-induced intestinal damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;78(3):860-7.
- 79- Riedel K, Koellensperger E, Ryssel H, Riedel F, et al. Abrogation of TGF-beta by antisense oligonucleotides modulates expression of VEGF and increases angiogenic potential in isolated fibroblasts from radiated skin. *Int J Mol Med*. 2008;22(4):473-80.
- 80- Goyal PK, Gehlot P. Radioprotective effects of Aloe vera leaf extract on Swiss albino mice against whole-body gamma irradiation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2009;28(1):53-61.
- 81- Jagetia GC, Rajanikant GK. Curcumin treatment enhances the repair and regeneration of wounds in mice exposed to hemibody gamma-irradiation. *Plast Reconstr Surg*. 2005;115(2):515-28.
- 82- Shi CM, Qu JF, Cheng TM. Effects of the nerve growth factor on the survival and wound healing in mice with combined radiation and wound injury. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2003;44(3):223-8.
- 83- Verstappen J, Katsaros C, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, et al. The recruitment of bone marrow-derived cells to skin wounds is independent of wound size. *Wound Repair Regen*. 2011;19(2):260-7.
- 84- Verstappen J, Katsaros C, Torensma R, Von den Hoff JW. A functional model for adult stem cells in epithelial tissues. *Wound Repair Regen*. 2009;17(3):296-305.
- 85- Snippert HJ, Haegebarth A, Kasper M, Jaks V, van Es JH, Barker N, et al. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science*. 2010;327(5971):1385-9.
- 86- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):301-13.
- 87- Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, et al. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells*. 2004;22(5):812-22.

- 88- Mori L, Bellini A, Stacey MA, Schmidt M, et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res.* 2005;304(1):81-90.
- 89- Bakhshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, Katebi M. Effects of TGF- β and b-FGF on the potential of peripheral blood-bornes Stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. *Inflammation.* 2011.(Epub ahead of print)
- 90- Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med.* 2011;9:29.
- 91- Aznar J, Sánchez JL. Embryonic stem cells: are useful in clinic treatments? *J Physiol Biochem.* 2011;67(1):141-4.
- 92- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell.* 2008;2(4):313-9.
- 93- Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, et al. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol.* 2005;153(1):29-36.
- 94- Lee CH, Shah B, Moioli EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J Clin Invest.* 2010;120(9):3340-9.
- 95- Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1285-97.
- 96- Fowler SD, Greenspan P. Application of Nile Red, a fluorecent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comprasion with Oil Red O. *The Journal of Histochemistry and Cytochemicstry.* 1985;33(8):833-6.
- 97- McFarlin K, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Repair Regen.* 2006;14(4):471-8.
- 98- Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic

- cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):14022-7.
- 99- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004;94(5):678-85.
- 100- 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.
- 101- Kim CH, Lee JH, Won JH, Cho MK. Mesenchymal Stem Cells Improve Wound Healing In Vivo via Early Activation of Matrix Metalloproteinase-9 and Vascular Endothelial Growth Factor. *J Korean Med Sci*. 2011;26(6):726-33.
- 102- Herdrich BJ, Lind RC, Liechty KW. Multipotent adult progenitor cells: their role in wound healing and the treatment of dermal wounds. *Cytotherapy*. 2008;10(6):543-50.
- 103- Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A*. 2010;77(1):22-30.
- 104- Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol*. 2007;212(3):702-9.
- 105- de la Fuente R, Bernad A, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2010;70(16):6682
- 106- Balwierz A, Czech U, Polus A, Filipkowski RK, et al. Human adipose tissue stromal vascular fraction cells differentiate depending on distinct types of media. *Cell Prolif*. 2008;41(3):441-59.
- 107- Rigotti G, Marchi A, Galiè M, Baroni G, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(5):1409-22.
- 108- Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63(11):1886-92.

- 109- Salgarello M, Visconti G, Farallo E. Autologous fat graft in radiated tissue prior to alloplastic reconstruction of the breast: report of two cases. *Aesthetic Plast Surg.* 2010;34(1):5-10.
- 110- Panettiere P, Marchetti L, Accorsi D. The serial free fat transfer in irradiated prosthetic breast reconstructions. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(5):695-700.
- 111- Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;332(2):370-9.
- 112- Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, et al. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells.* 2007;25(12):3234-43.
- 113- Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, Mizuno H, et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann Plast Surg.* 2009;62(3):317-21.
- 114- Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, et al. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *J Dermatol Sci.* 2009;53(2):96-102.
- 115- Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007;48(1):15-24.
- 116- Nakayama F, Hagiwara A, Kimura M, Akashi M, et al. Evaluation of radiation-induced hair follicle apoptosis in mice and the preventive effects of fibroblast growth factor-1. *Exp Dermatol.* 2009;18(10):889-92.
- 117- Spiegelberg L, Djasim UM, van Neck HW, Wolvius EB, et al. Hyperbaric oxygen therapy in the management of radiation-induced injury in the head and neck region: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(8):1732-9.
- 118- Ozbek N, Guneren E, Yildiz L, Meydan D, et al. The effect of pre-operative conventional and hyperfractionated radiotherapy schedules on wound healing and tensile strength in rats: an experimental study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(2):185-92.

- 119- Veness M, Richards S. Role of modern radiotherapy in treating skin cancer. *Australas J Dermatol.* 2003;44(3):159-66.
- 120- Veness MJ. The important role of radiotherapy in patients with non-melanoma skin cancer and other cutaneous entities. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2008;52(3):278-86.
- 121- van Hezewijk M, Creutzberg CL, Putter H, Chin A, et al. Efficacy of a hypofractionated schedule in electron beam radiotherapy for epithelial skin cancer: Analysis of 434 cases. *Radiother Oncol.* 2010;95(2):245-9.
- 122- Denkler K., Kivett WF. Management of nonmelanoma skin cancer. In: Mathes SJ (ed). *Mathes Plastic Surgery Volume5.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2006:391-464.
- 123- Kassem M, Burns JS, García Castro J, Rubio Muñoz D. Adult stem cells and cancer. *Cancer Res.* 2005;65(20).
- 124- Rubio D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005 15;65(8):3035-9.