



1993

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**EVEROLİMUS İLE İMMUNSUPRESE EDİLEN SIÇANLARDA
YAPILAN KOLON ANASTOMOZLARINDA KÖK HÜCRENİN
ANASTOMOZ ÜZERİNE ETKİLERİ:
DENEYSEL ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre KARAKAYA

Ankara, 2017



1993

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**EVEROLİMUS İLE İMMUNSUPRESE EDİLEN SIÇANLARDA
YAPILAN KOLON ANASTOMOZLARINDA KÖK HÜCRENİN
ANASTOMOZ ÜZERİNE ETKİLERİ:
DENEYSEL ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre KARAKAYA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sedat YILDIRIM

Ankara, 2017

TEŞEKKÜR

Genel Cerrahi uzmanlık eğitimine başladığım günden bu yana, mesleki bilgi, beceri ve tecrübeleriyle bana her zaman en iyi, en doğru yolu gösteren; başta saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mehmet HABERAL olmak üzere, Prof. Dr. Esat HERSEK, Prof. Dr. Gökhan MORAY, hocalarım, Prof. Dr. Sedat YILDIRIM ve Prof. Dr. Yahya EKİCİ'ye şükran ve minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tecrübe ve bilgilerini bana aktarmaktan hiçbir zaman imtina etmeyen Yrd. Doç Dr. Cem AYDOĞAN, Yrd. Doç. Dr. Tugan TEZCANER, Yrd. Doç. Dr. Aydınca AKDUR, Yrd. Doç. Dr. Mahir KIRNAP, Yrd. Doç. Dr. Ebru SOY, Uzm. Dr. Tefvik AVCI ve Uzm. Dr. Onur AYDIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki yardımları nedeniyle Biyoistatistik Anabilim dalından Prof. Dr. Ersin ÖĞÜŞ'e, Plastik ve Rekonstruktif Cerrahi Anabilim dalından Doç. Dr. Çağrı UYSAL'a, Biyokimya Anabilim dalından Yrd. Doç. Dr. Eda ÖZTURAN ÖZER'e, Patoloji Anabilim dalından Uzm. Dr. Alev OK ATILGAN'a, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim dalından Uzm. Dr. Hanifi ŞAHİN'e Biyoistatistik Anabilim dalından Arş. Gör. Hatice Yağmur ZENGİN'e, Veteriner Hekim Evren ÖZDEMİR KOCABAŞ'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan babam İbrahim KARAKAYA, annem Suna KARAKAYA'ya, her zaman desteğini hissettiğim kardeşim Dr. Ebru KARAKAYA'ya teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve bana bu yolda en büyük gücü veren eşim Dr. Deniz KARAKAYA'ya ve varlıkları ile bana güç veren oğullarım Emir KARAKAYA ve Efe KARAKAYA'ya teşekkür ederim.

Dr. Emre KARAKAYA

ÖZET

Gastrointestinal sistem cerrahisi, benign veya malign nedenlerden dolayı yoğun olarak yapılan ameliyatlardır. Gastrointestinal sistem ameliyatları sonrası görülen anastomoz kaçakları önemli mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Anastomoz kaçaklarının azaltılması ve yönetimi konusunda uzun yıllardan beri yapılan birçok çalışma vardır.

Solid organ nakli yapılan hastalara, nakledilen organa karşı gelişen immün reaksiyonu önlemek ve greftin uzun süreli sağ kalımını sağlamak amacıyla immünespresif tedaviler verilmektedir. İmmünespresif tedavi alan bu hastalara, organ nakli cerrahisi sırasında veya sonrasında, gastrointestinal sistem ameliyatları yapılabilmektedir. İmmünespresif tedaviler sıklıkla; kalsinörin inhibitörleri, kortikosteroid ve antiproliferatif ajanların tekli veya kombine şeklinde kullanılması şeklindedir. Kalsinörin inhibitörlerinin kullanılmadığı durumlarda genellikle mTOR inhibitörlerinin yer aldığı tedavi protokolleri tercih edilmektedir. mTOR inhibitörleri, kalsinörin inhibitörlerine göre daha az nefrotoksik olmasına ve daha güçlü immünespresyon sağlamasına rağmen yara iyileşmesinde gecikme, infertilite, pnömonitis ve trombositopeni gibi yan etkileri vardır. mTOR inhibitörlerinin, kalsinörin inhibitörlerine göre yara iyileştirmesini belirgin oranda geciktirdiği birçok çalışmada gösterilmiş ve mTOR inhibitörlerinin yara iyileşmesindeki olumsuz etkilerini azaltan çeşitli tedaviler denenmiştir. Mezenkimal kök hücre tedavisinin, çoklu dokulara farklılaşma özelliklerinden ve yeni damar oluşumunu arttırdığından ötürü yara iyileşmesine pozitif etkileri olduğu ve anastomoz kaçaklarını azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada; mTOR inhibitörü ile immünespresyon sağlanan sıçanlarda, kolon anastomuzunda adipoz dokudan elde edilen kök hücrenin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada 60 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her biri 14 adet sıçan bulunduran 4 grup oluşturuldu. Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre. 4 adet sıçan ise kök hücre eldesi için kullanıldı. 4 ana gruptan 3. ve 4. gruplar laparotomiden 7 gün öncesinden itibaren mTOR inhibitörü(everolimus) ile immünesprese edildi. Tüm gruplardaki sıçanların inen kolonu tam kat kesildikten sonra anastomoz yapıldı. İkinci ve dördüncü gruplarda anastomoz bölgesine subserozal kök hücre enjeksiyonu yapıldı. Tüm gruplar eşit şekilde iki alt gruba ayrıldı. Alt gruplardan bir tanesi 4. gün, diğeri ise 7. gün sakrifiye edildi. Tüm gruplarda vücut kitle kaybı, anastomoz patlama basıncı, doku hidroksprolin düzeyi ölçümü ve

histopatolojik değerlendirme yapıldı. İmmünohistokimyasal olarak; çalışma grubunda Dil ile işaretli adipoz kökenli kök hücrelerin takibi için floresan mikroskopta inceleme yapıldı.

Deney sonucunda dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanlar dikkate alındığında uygulama grupları arasında kilo kaybı dağılımı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Ancak, Grup 3 de ortanca kilo kaybı yaklaşık %13,5 olarak gözlenirken grup 1 yaklaşık %5,4 oldu. Bununla birlikte 7.günde Grup 3'te ortanca kilo kaybı %13,4 olarak gözlenirken Grup 1 de yaklaşık %1,3 olmuştur ($p<0,001$). Karın içi yapışıklığı açısından gruplar değerlendirildiğinde dördüncü günde daha fazla yapışıklık görüldü. Grup 2, 3 ve 4, Grup 1 ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında hafif dereceli yapışıklıklarda azalma gözlenirken, orta ve ileri dereceli yapışıklıkların arttığı görüldü. Ancak Grup 3 ile 4 karşılaştırıldığında yapışıklık skoru ve oranın kök hücre verilmesi ile Grup 4'de daha az olduğu gözlemlendi. Yedinci günde gruplar arasında yapışıklık olarak bir fark görülmedi. Yedinci günde sakrifiye edilen sıçanlarda hidroksiprolin düzeyinin dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanlara göre daha yüksek olduğu görüldü. Bununla beraber 4 ve 7. günde kök hücre uygulaması Grup 2'de Grup 1'e göre doku hidroksiprolin seviyesinde artmaya neden olurken, immunsuprese edilen Grup 3'te aynı etkiye neden olmadı. Everolimus verilmesi sıçanlarda dördüncü günde doku hidroksiprolin seviyesinde azalmaya neden oldu. Dördüncü günde, kök hücre uygulaması Grup 2 ve Grup 4'te patlama basıncında artışa neden oldu ($p <0,05$). Yedinci günde bu farklılık gözlenmedi. Histopatolojik inceleme sonucunda reepitelizasyon, iskemik nekroz, fibrozis ve muskuler tabakada bozulma açısından farklılık saptanmadı. Vasküler proliferasyon açısından yapılan değerlendirmede 4. gün sakrifiye edilen sıçanlar arasında anlamlı farklılık saptanmazken ($p=0,226$), 7. günde kök hücre verilen Grup 2 ve Grup 4'te daha fazla vasküler proliferasyon saptandı ($p=0,003$).

Everolimus ile immunsuprese edilen ve edilmeyen sıçanlarda yapılan kolon anastomozuna subserozal kök hücre enjeksiyonunun yapılması anastomoz dayanıklılığını artırmakta, kilo kaybını azaltmakta, vasküler proliferasyonu arttırmaktadır. Riskli gastrointestinal anastomozlarda, adipoz doku kaynaklı kök hücre uygulaması uygun bir yöntem olabilir.

Anahtar kelimeler: immunsupresyon, everolimus, kök hücre, anastomoz

ABSTRACT

Gastrointestinal system surgery operations have been applied intensively due to the malignant or benign causes. Anastomosis leakages that are seen after the gastrointestinal system operations cause important mortality and morbidity. There have been a lot of studies on the reduction and management of anastomosis leakage for many years.

After the solid organ transplantation, to prevent the formation of the immune reaction against to transferred organ and to provide long-term survival of the graft, immunosuppressive treatment protocols are applied to the patients. Gastrointestinal system operations can be performed during or after the organ transplant surgery in these patients receiving immunosuppressive treatment. Commonly applied immunosuppressive treatment protocols are, calcineurin inhibitors, corticosteroids and the single or multiple combinations of the antiproliferative agents. When the calcineurin inhibitors can not be used, treatment protocols with m-TOR inhibitors have been preferred. Although m-TOR inhibitors are less nephrotoxic than the calcineurin inhibitors and they provide stronger immunosuppression, they have adverse effects like delay in wound healing, infertility, pneumonitis and thrombocytopenia. However, several treatments have been tried to reduce the adverse effects of mTOR inhibitors in wound healing. Mesenchymal stem cell therapy has positive effects on wound healing and it decreases the anastomosis leakages due to the differentiation characteristics to multiple tissues and the increased formation of new blood vessels. In this study, it is aimed to investigate the effect of the stem cells that are derived from adipose tissue on wound healing in rats that are immunosuppressed with m-TOR inhibitors.

In this study, 60 Sprague-Dawley male rats were used. Four groups of 14 rats each were formed. Also 4 rats were used to obtain the stem cells. We immunosuppressed the third and the fourth groups of four main groups with everolimus everyday from 7 days prior to laparotomy. Anastomosis was performed, after the descending colon of all the rats in all groups was completely cut. In the second and fourth groups we performed subserosal stem cell injection into the anastomotic region. All of the groups were randomly divided into two equal subgroups. One of the subgroups of each main groups were sacrificed on the 4th day, and the other ones were sacrificed on the 7th day. In each groups, the bursting pressure of the colonic anastomosis, tissue hydroxyproline level measurement and histopathological evaluation were done. Immunohistochemically, fluorescent microscopic examination was done for the following of the DiI marked adipose derived stem cells in the study group.

As a result of the analysis, there is no statistically significant difference in the weight loss distribution between the experimental groups when considering the animals that are sacrificed on the 4th day ($p= 0,013$). When all the groups are evaluated in terms of adhesion parameters, minimal adhesion was observed in the 85,7 % of the animals that are sacrificed on the 7. day and that are in the groups of everolimus+ stem cell while intermediate adhesion was observed in the 14,3 % of them. Adhesion rate on the 4th day is significantly higher than the adhesion rate on the 7th day. The effect of the sacrifice day on the level of the hydroxyproline is statistically significant at 95 % confidence level. ($p< 0,001$). When we look, it is observed that the average hydroxyproline levels of the animals that are sacrificed on the 7th day are higher than the average hydroxyproline levels of the animals sacrificed on the 4th day. When the animals sacrificed on the 4th day are considered, there is a statistically significant difference in terms of the average of the bursting pressures between the Control and Stem Cell groups ($p= 0,002$) and between the Stem Cell and Everolimus groups ($p<0,001$). When evaluating the results of the analysis of reepithelization, ischemic necrosis, fibrosis and the deterioration of the muscular layer, no significant difference was determined. When evaluating the vascular proliferation results, there was no significant difference between the groups that were sacrificed on the 4th day ($p= 0,226$) , whereas there was a significant difference among the groups that were sacrificed on the 7th day ($p= 0,003$).

Subserosal stem cell injections to colon anastomosis in immunosuppressed rats with everolimus and in non- immunosuppressed rats increase the anastomotic resistance, decrease the weight loss and increase the vascular proliferation. In the risky gastrointestinal system anastomosis, adipose tissue derived stem cell application may be an appropriate method.

Key words: Immunosuppression, everolimus, stem cell, anastomosis

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolon Anatomisi.....	3
2.2. Kolon Histolojisi.....	5
2.3. Anastomoz Teknikleri.....	5
2.4. Yara İyileşmesi	6
2.4.1. Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi	8
2.4.2. Anastomoz İyileşmesini Etkileyen Faktörler	9
2.4.3. Anastomoz İyileşmesinin Değerlendirilmesi	12
2.5. Kök Hücre.....	12
2.5.1. Mezenkimal Kök Hücreler	15
2.5.2. Kök Hücrelerin Potansiyel Kullanım Alanları.....	16
2.5.3. Kök Hücre Kaynağı Olarak Adipoz Doku	17
2.5.4. Kök Hücrelerin Dokularda Takibi	18
2.6. Solid Organ Transplantasyonu ve İmmüsupresyon	18
2.7. Everolimus	21
2.7.1. Tanımı ve Tarihçesi	21
2.7.2. Etki Mekanizması.....	22
2.7.3. Yan Etkileri	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı	30
3.2. Deney Hayvanlarının İmmüsupresyonu	30
3.3. Cerrahi İşlem.....	31
3.4. Adipoz Doku Temini	34
3.5. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrenin Hazırlanması.....	36

3.6. Anastomoz Patlama Basıncı Ölçümü	39
3.7. Doku Hidroksiprolin Düzeyi Analizi.....	40
3.8. Patolojik Değerlendirme	41
3.9. İşaretili Kök Hücrelerin Tespiti	41
3.10. İstatiksel Yöntem	42
4. BULGULAR	44
4.1. Kilo Kaybı.....	44
4.2. Yapışıklık.....	45
4.3. Doku Hidroksiprolin Düzeyi	47
4.4. Patlama Basıncı.....	48
4.5. Patolojik Değerlendirme	49
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ.....	55
7. KAYNAKLAR.....	56

KISALTMALAR

ADKKH	: Adipoz Doku Kökenli Kök Hücre
AKT	: Protein kinaz B (PI3K sinyalizasyon yolağının bir bileşeni)
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
APC	: Antijen sunan hücre
CFSE	: Karboksifloresein diasetat süksinimidil ester
DiI	: 1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin
EGF	: Epitelyal Büyüme Faktörü
FBS	: Fetal Buzağı Serumumu
FKBP 12	: FK506 bağlayıcı protein 12
GFP	: Yeşil Floresan Protein
GIS	: Gastrointestinal sistem
HER 2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörleri 2
HLA	: İnsan lökosit antijen sistemi
IFN-γ	: İnterferon- γ
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1	: İnterlökin-1
IL-2	: İnterlökin-2
IL-12	: İnterlökin-12
IL-15	: İnterlökin-15
İMA	: İnterior mezenterik arter
İMV	: İnterior mezenterik ven
KİKKH	: Kemik İliği Kökenli Kök Hücre
MHC	: Majör histokompatibilite kompleks
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MMF	: Mikofenolatmofetil/mikofenolik asit
mTOR	: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
mTORC1	: mTOR-raptor sinyal iletim kompleksi 1
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
PDGF	: Trombosit benzeri büyüme faktörü
PI3K	: Fosfatidilinozitol-3-kinaz
PLA	: İşlenmiş Lipoaspirat
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit

SEGA	: Subependymal Giant Cell Astrocytoma
SMA	: Superior mezenterik arter
SMV	: Superior mezenterik ven
S6K1	: S6 ribozomal protein kinaz
TGF β	: Transform edici büyüme faktörü β
TNFα	: Tümör Nekroz Faktörü α
TOR	: Target of Rapamycin
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
4E-BP	: 4E-bağlayıcı proteini



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolonu oluşturan intestinal segmentler.....	3
Şekil 2.2. Drummond'un marjinal arteri	4
Şekil 2.3. T lenfosit aktivasyonu için tanımlanan üçlü sinyal modeli.....	21
Şekil 2.4. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı	24
Şekil 3.1. Sıçanlara oral gavaj yoluyla everolimus verilmesi	31
Şekil 3.2. Ameliyat bölgesinin traşlanmış ve steril edilmiş hali	32
Şekil 3.3. Hafif dereceli yapışıklık.....	33
Şekil 3.4. Orta dereceli yapışıklık	33
Şekil 3.5. İleri dereceli yapışıklık.....	34
Şekil 3.6. Rezeke edilen, anastomoz bölgesini içeren kolon segmentinin patlama basıncı ölçümü sonrası patolojik ve biyokimyasal değerlendirme amacı ile longitudinal olarak iki eşit parçaya bölünmüş görünümü.	34
Şekil 3.7. İnguinal yağ yastıkçığı eksizyonu	35
Şekil 3.8. Serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra steril kaba alınmış yağ dokusu.....	35
Şekil 3.9. Petri kabında doku makasıyla parçalama işlemi ve pipetle transferi	36
Şekil 3.10. Santrifüj işlemi.....	37
Şekil 3.11. Santrifüj sonrasında tüp üzerindeki serum ve tüp dibindeki SVF'nin görünümü.	37
Şekil 3.12. Thoma lamında görülmekte olan büyük nükleuslu büyük sitoplazmalı kök hücreler.....	38
Şekil 3.13. Anastomoz bölgesine subserozal ADKHH enjeksiyonu yapılması	39
Şekil 3.14. Anastomoz patlama basıncı ölçümü	39
Şekil 3.15. Siemens SC 7000 monitor ve JMS BP-100 infüzyon pompası	40
Şekil 3.16. Hidroksiprolin standart eğrisi.....	41
Şekil 3.17. Villus komşuluğunda ve endotelde kök hücre	42
Şekil 4.1. Grupların kilo kaybı (%) dağılımı açısından sakrifiye günlerinin karşılaştırılması	45
Şekil 4.2. Hidroksiprolin düzeyinin, gruplar, işlem türü ve sakrifikasyon günü ile ilişkisi.....	47
Şekil 4.3. Aynı grup içerisinde 4.ve 7. gün sakrifiye edilen alt gruplar arasında patlama basıncı ortalaması açısından istatistiksel değerlendirme.	49

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Anastomoz iyileşmesine etki eden faktörler.....	9
Tablo 3.1. Sıçanların gruplandırılması	29
Tablo 3.2. Laparotomi sonrası yapışıklık derecelendirilmesi.....	33
Tablo 4.1. Dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanlarda kilo kaybı dağılımı açısından grupların karşılaştırılması	44
Tablo 4.2. Dördüncü günde sakrifiye edilen grupların yapışıklık derecelerinin dağılımı ..	46
Tablo 4.3. Yedinci günde sakrifiye edilen grupların yapışıklık derecelerinin dağılımı	46
Tablo 4.4. Grupların, sakrifikasyon günü ile yapışıklık arasındaki ilişkisi	46
Tablo 4.5. Grupların, sakrifikasyon günü ile doku hidroksiprolin düzeyi arasındaki ilişkisi.....	48
Tablo 4.6. Grupların, sakrifikasyon günü ile patlama basıncı arasındaki ilişkisi.....	49
Tablo 4.7. Gruplar ile patolojik parametreler arasındaki ilişkisi	50
Tablo 4.8. Dördüncü gün sakrifiye edilen gruplar ile patolojik parametreler arasındaki ilişkisi.....	50
Tablo 4.9. Yedinci gün sakrifiye edilen gruplar ile patolojik parametreler arasındaki ilişkisi.....	50
Tablo 4.10. Tüm gruplar ile patolojik parametreler arasındaki ilişkisi.....	51

1. GİRİŞ

Genel cerrahi ameliyatlarının içerisinde gastrointestinal sistem cerrahisi, önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle kolorektal ameliyatları, diğer gastrointestinal sistem ameliyatlarına nazaran geniş endikasyon sahası olması, ameliyat sonrası komplikasyonlarının ağır sonuçlar doğurabilme ihtimali nedeni ile her zaman gelişime ve yeniliklere ihtiyaç duymaktadır (1). Her ne kadar bu alanda gelişmeler hızla devam etse de, ameliyat sonrası komplikasyonların önemli bölümünü oluşturan anastomoz kaçakları, ameliyat sonrası mortalite ve morbiditenin halen en önemli nedenlerinden biridir (2). Yapılan anastomozlardaki kaçak oranı literatürde yaklaşık %5-69 oranında bildirilmiştir (3). Bazı kaçaklarda anastomozda yenilenme gerektirirken, bazıları ise klinik belirti vermez ve tedavi gerektirmez. Anastomozu yapan cerrahlar arasında kaçak oranı arasında önemli farklılıklar görülmekle birlikte tecrübeli kolorektal cerrahların elektif koşullarda yaptığı anastomozun kaçak oranı ise %3 ile %6 arasındadır (4). Anastomoz kaçaklarının azaltılması ve yönetimi konusunda uzun yıllardan beri yapılan birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir (5-7).

Solid organ nakli yapılan hastaların bir kısmına eş zamanlı ya da nakil sonrası alt gastrointestinal sistem (GIS) cerrahisi yapılmaktadır. Nakil sonrası, nakledilen organa karşı gelişen immün reaksiyonu önlemek ve greftin uzun süreli sağ kalımını sağlamak amacıyla bu hastalarda immunsupresif tedavi uygulanmaktadır (8). Sıklıkla immunsupresif tedaviler, kalsinörin inhibitörleri ile birlikte kortikosteroid ve antimetabolit ajan kombinasyonunun kullanımı olmakla birlikte, kalsinörin inhibitörlerinin kullanılmadığı durumlarda mTOR inhibitörleri kullanılmaktadır (9). mTOR inhibitörleri, kalsinörin inhibitörlerine göre daha az nefrotoksik ve daha güçlü immunsupresyon sağlamasına rağmen en önemli yan etkileri ise yara iyileşmesinde gecikme, infertilite, pnömonitis ve trombositopenidir (9-15). mTOR inhibitörlerinin, kalsinörin inhibitörlerine göre yara iyileştirmesini belirgin oranda geciktirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (14, 16).

Son dönemlerde, birçok alanda olduğu gibi, yara iyileşmesinin kalitesini arttırmak, anastomoz kaçaklarını azaltmak ve anastomoz dayanıklılığını arttırmak amacı ile de kök hücre tedavisi kullanılmasına dair çalışmalar yayınlanmıştır (17-19).

Kök hücre; henüz farklılaşmamış fakat birçok kez bölünüp farklılaşmış hücreler oluşturabilme potansiyeline sahip hücreye verilen isimdir. Kendisine verilen sinyal

doğrultusunda farklılaşabilen kök hücresi, bu sayede hasarlı dokuda rejenerasyon sağlayabilir.

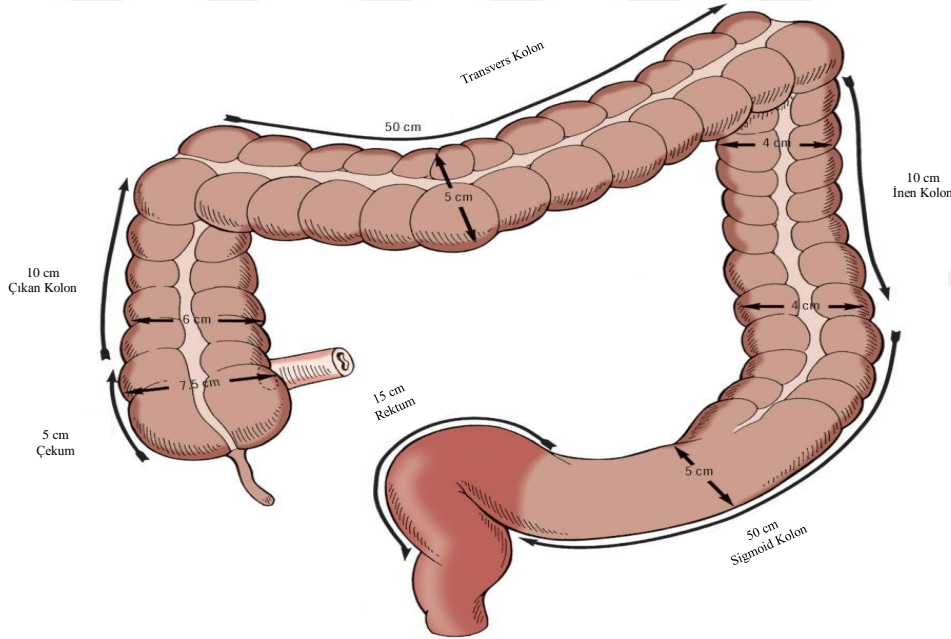
Vücutta çok sayıda dokudan üretilen mezenkimal kök hücreler (MKH), uzun ömürlü olmalarının yanı sıra birçok kez çoğaltılarak kullanılabilir. Esas elde edilme yerleri kemik iliği ve adipoz dokular olan MKH, buldukları dokuda anjiogenezi, lokal kan akımını, fibroblast ve kollajen sentezini arttırarak yine hasarlı dokunun onarımına büyük katkı sağlar (17).

Bizim bu çalışmadaki amacımız; kolon anastomozlarında, iyileşme sürecine pozitif katkı gösterdiği bilinen kök hücre tedavisinin, immunsupresyonu mTOR inhibitörü ile sağlanan sıçanlarda yapılan kolon anastomozlarına olan pozitif etkisinin araştırılmasıdır. Bu çalışma sonucunda mTOR inhibitörlerinin yara iyileşmesine negatif yönde olan etkisi, kök hücre tedavisi ile engellenebilirse, solid organ transplantasyonu yapılan ve mTOR inhibitörü kullanan hastalarda yapılacak acil ya da elektif alt gastrointestinal ameliyatlardan önce, hastanın immunsupresif tedavisini değiştirmek ya da kesmek zorunda kalmadan anastomoz iyileşme kalitesi artırılabilir ve kaçak oranı azaltılabilir. Ayrıca bu uygulama ile sadece gastrointestinal anastomozlarında değil, solid organ transplantasyonları sırasında yapılan vasküler anastomozlar, safra yolu anastomozları ya da mesane anastomozlarında kaçak oranları belirgin ölçüde azaltılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolon Anatomisi

Terminal ileumdan başlayıp anal kanala kadarki yaklaşık 200 cm uzunluğundaki intestinal kısma kolon denilmektedir (20, 21), (Şekil 2.1). Terminal ileumun içeriğini boşalttığı kolonun ilk kısmı çekumdur. Kolonun, 7cm ile çapı en geniş kısmıdır (21, 22). Terminal ileum ile çekum arasında invajinasyon yoluyla oluşmuş 'ileoçekal valv' isimli bir kapak mekanizması bulunmaktadır. Bu kapak mekanizması ince barsak içeriğinin çekuma hızla geçişini ya da çekumdaki içeriğin ince barsağa reflüsünü engeller. Daha sonra sırası ile çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektum gelmektedir. Transvers kolon tamamen intraperitoneal olup kolonun en hareketli ve uzun kısmını oluşturur (20, 21, 23).

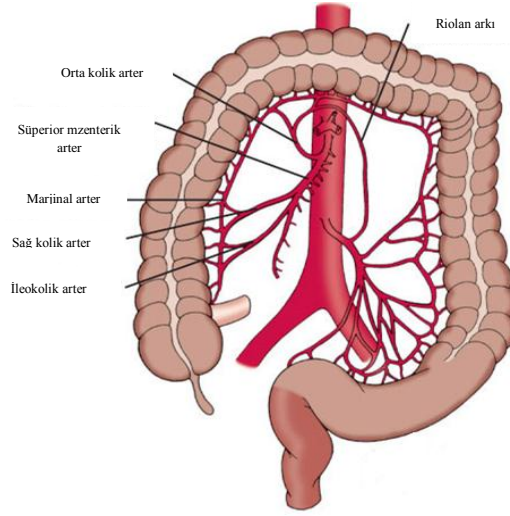


Şekil 2.1. Kolonu oluşturan intestinal segmentler

Çekum ve çıkan kolonun arteriyel beslenmesi, süperior mezenterik arterin (SMA), iliokolik arter ve sağ kolik arter dalları tarafından sağlanır. 'Vasa rekta' adı verilen ve iliokolik arter ile sağ kolik arterin arkuslarından çıkan vasküler yapılar kolon yüzeyine medial taraftan ulaşır kısa ve uzun dallara ayrılır. SMA'nın bir başka dalı olan orta kolik arter, transvers kolonun beslenmesini sağlar (24).

İnferiormezenrik arterin (İMA), inen kolonu besleyen dalına sol kolik arter, sigmoid kolonu besleyen dalına sigmoidal arter ve rektumu besleyen dalına süperior rektal

arter adı verilir. Sol kolik arter %14 oranında, splenik fleksuradan uzak mesafede Drummond'un marjinal arteri ile birleşir (24) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Drummond'un marjinal arteri

Rektum ve anal kanalın arteriyel beslenmesi, İMA'nın terminal dalı olan süperior rektal arter, internal iliak arterin dalı olan medial sakral arter, internal pudental arterden çıkan inferior rektal arter ve aort bifurkasyonunun hemen altından çıkan median sakral arter yoluyla sağlanır.

Gastrointestinal sistemde yapılan anastomozlarda, yara iyileşmesinin tam olarak sağlanabilmesi için en önemli koşullardan bir tanesi doku kanlanması için yeterli düzeyde sağlanmasıdır. Bu nedenle yapılacak ameliyatlarda özellikle arter yapıları iyi bilinmeli ve anastomoz yapılacak uçların arteriyel beslenmesinin iyi olduğundan emin olunmalıdır (24).

Çekumun venöz dönüşü apendiks ile birlikte ileokolik veni takiben süperior mezenterik vene (SMV) olur. Çıkan kolon ve hepatik fleksuranın venöz dönüşü sağ kolik veni takiben, transvers kolonun venöz dönüşü ise orta kolik veni takiben yine SMV'ye olur. Splenik fleksuradaki venöz dönüş hem orta kolik ven, hem de sol kolik ven yardımı ile olur. İnen kolon venöz dönüşü sol kolik ven yoluyla, sigmoid kolon venöz dönüşü ise sigmoidal ven yoluyla inferior mezenterik vene (İMV) olur. Sigmoid kolonun venöz drenajı yine İMV'ye olur (25). Rektumun proksimal kesiminin venöz drenajı süperior rektal veni takiben İMV'ye olurken, rektumun orta ve alt kesimlerinin venöz drenajı orta rektal ven ve süperior rektal veni takip ederek önce internal pudental vene, daha sonra da internal iliak ven aracılığı ile sistemik dolaşıma olur. (21).

2.2. Kolon Histolojisi

Kolon duvarında, sindirim kanallarının genelinde olduğu gibi dört tabaka vardır. Bu tabakalar içerden dışarıya doğru; tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olarak adlandırılırlar.

Tunika mukoza; kendi içinde mukoza yüzey epiteli, kripta, lamina propriya ve lamina muskularis mukoza denilen 4 ara tabakadan oluşur. Kolonda villus bulunmaz. Kolon mukozasındaki yüzey epiteli ise, basit kolumnar ve küboidal epitel cinsidir. Bu epitelyal hücreler aralarında T lenfosit hücreleri yer alır (26).

Lamina propriya içerisinde birçok yapı bulunur. Bunlar; fibroblastlar, damarlar, sinirler, düz kas hücreleri ve inflamatuvar hücrelerdir. İnflamatuvar hücreler arasında, lenfositler, plazma hücreleri, mast hücreleri, eizinofiller ve histiyositler yer alır (26). Mukoza ile submukoza arasındaki ayırım noktası ile ince bir kas tabakası olan muskularis mukozadır (26).

Tunika submukoza, yapısında kolonun hareketi için çok önemli olan Meissner pleksusu ve derin submukozal pleksus adında iki nöral pleksus barındırır. Ayrıca tunika submukozada arterioller, venüller ve lenfatikler mevcuttur (26).

Tunika muskularis, sirküler ve longitudinal kas tabakalarından ve bu iki tabaka arasındaki Auerbach nöral pleksusundan oluşur. Dıştaki longitudinal kasların lifleri üç yerde toplanarak 'tenya coli' denilen bantları oluştururlar (26).

Tunika seroza, visseral peritondur. İnen kolon, çıkan kolon ve rektumun bir bölümü ile anal kanal retroperitoneal yapılar olarak bilinir (26).

2.3. Anastomoz Teknikleri

İnce barsak, kolon ve rektum arasında yapılacak olan kolokolik, enterokolik ve kolorektal anastomozlar, farklı tekniklerle ve çeşitli suturler kullanılarak yapılabilir. Bu teknikler arasında uç-uç, uç-yan ve yan-yan anastomozlar, tek kat veya çift kat sutur atılması, devamlı ya da tek tek sutur atılması, el ile ya da stapler ile anastomoz yapılması gösterilebilir (27). Kullanılan tekniklerin güvenilirliği açısından yayınlanmış birçok farklı yayın bulunmaktadır. Çift kat anastomoz tekniği, tek kat anastomoz tekniğinden daha önce tanımlanmış olup, anastomoz güvenilirliği açısından olmazsa olmazlar arasında yer almaktadır. Daha sonra yapılan bazı çalışmalarda çift kat anastomoz yapıldığında, iç kata ait mikroskobik nekroz alanları ve doku dökülmeleri meydana geldiğini göstermiştir (28). Ayrıca tek kat anastomozların daha çabuk yapılabildiği ve barsak lümeninde daha az

daralmaya yol açtığı, böylelikle damarlanmanın ve mukozal iyileşmenin daha hızlı olacağı da yine yayınlanan çalışmalarda gösterilmiştir (29-32).

2.4. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi, doku rejenerasyonu için gerekli olan karmaşık bir mekanizmadır (33, 34). Yara iyileştirme kaskadı kısmen örtüşen üç ana safhadan oluşur. Bu safhalar; hemostaz ve inflamasyon; proliferasyon; maturasyon ve remodelling safhalarıdır (35). Yara iyileşmesi dinamik bir süreçtir ve bu süreç içerisinde yara iyileşmesinin safhaları birbiri ile çakışabilir.

Yara oluşmasıyla başlayan ve birkaç gün süren safhaya hemostaz ve inflamasyon safhası denir. Yaralanma sonrası ekstraselüler matriksin, trombositlere direkt olarak maruz kalması, koagülasyon kaskadının aktivasyonuna neden olur. Bu sırada trombosit- α granüllerinden; trombosit benzeri büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), trombosit aktive edici faktör (PAF), fibronektin ve serotonin gibi bir takım yara uyarıcı maddelerin salınımını yapar. Ek olarak, hemostazisi sağlamak amacı ile fibrin pıhtısı, polimorfonükleer lökositler (PMN) ve monositler gibi inflamatuvar hücrelerin yaraya migrasyonu için bir çatı görevi görür (36). Yara bölgesine ilk gelen infiltrate edici hücreler PMNlerdir ve 24-48 saatte pik yaparlar. PMNler, erken inflamasyon aşamasında sitokinlerin, özellikle de takip eden anjiogenez ve kollajen sentezinde belirgin etkisi olan tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)nın en önemli kaynağıdır. Yara bölgesine ulaşan ikinci inflamatuvar hücre popülasyonu makrofajlardır. 48-96 saat içerisinde belirgin sayılara ulaşan makrofajlar, yara iyileşmesi tamamlanmaya kadar kalır. Nötrofiller ve makrofajlar fagositoz ile yara debridmanına ve oksijen radikalleri ile birlikte nitrik oksit sentezi ile mikrobiyal staza katkıda bulunurlar. Nötrofil ve makrofajların göçü ile birlikte proinflamatuvar sitokinler ve büyüme faktörleri üretilir (37). Bundan sonra anjiyogenez başlayıp yeni kollajen lifleri, çoğalma evresini temsil eden granülasyon dokusunun ana bileşenleri olarak yaralı bölgede sentezlenir (38). TGF- β , vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve epitelyal büyüme faktörü (EGF) bu aşamada rol alan medyatörlerdir. Aynı zamanda, remodelling başlar ve eski kollajen lifleri, kollajenazlar, yani matriks metalloproteinazlar 2 ve 9 tarafından parçalanır (36). T lenfositler yaraya göç eden bir diğer diğer bir inflamatuvar hücrelerdir ve sayıları bir hafta içerisinde pik yapar. T lenfositlerin yara yerine göçü aynı zamanda inflamatuvar evreden

proliferasyon evresine geçiş olarak kabul edilir. T lenfositler interferon- γ (IFN- γ), TNF- α ve IL-1 ile birlikte fibroblast kollajen sentezi üzerine inhibe edici bir etki oluştururlar (36).

Proliferasyon fazı yara iyileşmesinin 4-12. günler arasında olan ikinci evresidir. Doku devamlılığının sağlanması bu evrede olur. İyileşen yaraya son göç eden hücre popülasyonu fibroblastlar ve endotel hücrelerdir. Fibroblastlar için en önemli kemotaktik faktör PDGF'dir. Fibroblastlar yara yerine ulaştıktan sonra kısa bir sürede çoğalırlar. Daha sonra makrofajlardan salınan sitokin ve büyüme faktörleri tarafından matriks sentezi amacı ile uyarılarak aktif hale getirilirler. Proliferasyon fazında endotel hücreleri de yaygın olarak çoğalırlar ve anjiyogeneze rol alırlar. Anjiyogeneze anahtar rol oynayan VEGF'nin ana kaynağı makrofajlardır ve VEGF reseptörleri endotel hücrelerinde yer alır (39, 40).

Kollajen; vücutta en fazla miktarda bulunan proteindir ve yara iyileşmesinin başarılı bir şekilde tamamlanmasında anahtar rol oynar. En az 18 tip kollajen olsa da yara iyileşmesini asıl ilgilendiren tip 1 ve tip 3 kollajendir. Tip 1 kollajen deride ekstraselüler matriksin temel bileşenidir. Tip 3 kollajen ise esas olarak onarım sürecinde önem kazanır. Kollajen esas olarak; öncül aminoasitler olan prolin ve lisinden oluşan protokollajenin hidroksilasyonu sonrası oluşan bir dizi enzimatik reaksiyon sonucunda meydana gelir. Prolinin hidroksilasyonu sonrası hidroksiprolin, lisinin hidroksilasyonu sonucu hidroksilisin meydana gelir. Deneysel çalışmalarda yara iyileşmesi ve kollajen sentez durumunun değerlendirilmesinde hidroksiprolinin in vitro koşullarda ölçümü yapılır. Bu enzimatik reaksiyonların sorunsuz bir şekilde devam edebilmesi için gerekli olan kofaktörlerden bir tanesi askorbik asit (C vitamini)dir (41).

İyileşmekte olan skar dokusunun maturasyon ve remodellingi fibroblastik evrede başlar ve daha önceden sentezlenmiş olan kollajenin yeniden organize olması ile karakterizedir. Bu evrede kollajen yıkımı ve sentezi arasında bir denge kurulur. Bu denginin kurulmasında, kollajen yıkımına neden olan matriks metalloproteinazlar anahtar rol oynar. Sonuçta kollajen sentezinin lehine bir durum oluşur ve aselüler kollajenden zengin bir skar dokusu meydana gelir. Yaralanmadan birkaç hafta sonra, yaradaki kollajen miktarı nispeten durağan bir değere ulaşır fakat gerilim kuvveti birkaç ay daha artmaya devam eder (42). Fibroblastlardan oluşan fibrillin, bağ dokuda bulunan elastik liflerin oluşumu için gereklidir. Yaralanma sonrası skar remodellingi 6 ila 12 ay kadar devam eder ve bu süre içinde kademeli olarak gelişkin, avasküler ve aselüler skar dokusu şekillenir. Skar dokusunun mekanik kuvveti hiçbir zaman yaralanmamış doku seviyesine ulaşamaz (36).

Yara iyileşmesi sırasında yaraya bitişik epitel hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonu olarak tanımlanan sürece epitelizasyon denir. Bu süreç yaralanmanın birinci

günü başlar ve yara kenarındaki epidermisin kalınlaşması olarak görülür. Yara alanına yakın konumdaki bazı hücreler defekt kapanıncaya kadar bir dizi mitotik bölünmeye uğrarlar. Defekt kapandığında ise epitel hücreleri bölünmeye başlar ve reepitelizasyon meydana gelir. Yara dudaklarının birbirine yakın olduğu durumlarda reepitelizasyon 48 saatten daha kısa bir sürede tamamlanır ancak defektin büyük olduğu durumlarda bu süreç uzar (43, 44).

2.4.1. Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi

Gastrointestinal sistemde tam kat meydana gelmiş bir yaranın iyileşme süreci, barsak uçlarının cerrahi ya da mekanik olarak bir araya getirilmesi ile başlar. İyileşmenin yetersiz olması durumunda, yüksek morbidite ve mortalitenin taşıyan kaçak ve fistüller meydana gelir. Tersine, fazla iyileşme meydana geldiği durumlarda striktür oluşumu ve lümenin obstruksiyonu gibi sorunlar meydana gelebilir (36).

Barsak anastomozlardan sonra barsaklarda meydana gelen gerilme kuvveti, düz kas hücrelerinin de fibroblastlar ile birlikte kollajen sentezlemesi sayesinde normal cilt yaralanması sonrası meydana gelen gerilme kuvvetinden daha hızlı oluşmaktadır (45, 46). Fibroblastlardan meydana gelen kollajen sentezi, barsak ve cilt yaralarında farklı yollar izler (47). Gastrointestinal segmentteki submukoza katmanı; gerilim gücünü sağlayan, anastomoz sonrası dikişleri ve barsak uçlarını bir arada tutan asıl katmandır. Kollajen ve elastik liflerden oluşan submukoza tabakasının yapısında ağırlıklı olarak tip1 kollajen (%68) olmakla birlikte, %20 oranında tip3 kollajen ve %12 oranında tip5 kollajen bulunmaktadır (37).

Gastrointestinal sistemde yapılan anastomozların iyileşme safhaları, temel olarak yara iyileşmesinin safhaları ile örtüşür. Bu safhalar başta hemostaz ve vazokonstriksiyon, daha sonra vazodilatasyon ve kapiller permeabilite artışıdır (37). Anastomozda ilk 72 saatte inflamasyon ve ödem hâkimiyeti mevcuttur. Anastomoz sırasında invajine edilmiş barsak kısmı 24-48 saat sonra inflamasyon sonucu nekroze olur ve lümeneye düşer. İnvajine edilen kısım ne kadar küçükse primer iyileşmede o kadar sağlam olur. Bu bulgu; anastomoz sırasında barsak uçlarının aşırı invajine ya da everte edilmemesi gerektiğini, barsak uçlarının mümkün olduğunda karşı karşıya getirilmesi gerektiğini gösterir. Anastomoz yapılacak barsak uçlarının seroza tabakalarının karşı karşıya getirilmesi, kaçak riskini azaltan etkenlerden bir tanesidir (48, 49).

Anastomoz yapılan alanda 72. saatin sonuna doğru granülasyon dokusu oldukça yoğunlaşır ve artık 3. ila 5. günlerde kollajenolitik aktivite artışı görülür. Artık kollajen yapımının artışına bağlı olarak birikim belirginleşmeye başlar ve bu birikim ile birlikte

yapılan anastomozun gerilim kuvveti artmaya başlar (50). Anastomozun dayanıklılığı ve kaçak riski bu dönemde konulan dikişlere ve submukozanın bu dikişlerin yarattığı gerilime dayanabilme kuvvetine bağlıdır (32, 51).

Anastomoz yapıldıktan itibaren beşinci gün sonunda yara kuvveti hızla artmaya başlar ve kollajen sentez uyarımı artmıştır. Esas olarak yapılan anastomozda meydana gelecek komplikasyonlar, kollajen sentez ve yıkım arasındaki hassas dengeye bağlıdır. Anastomoz gerilim kuvveti ameliyat sonrası 7. günde normal bir barsağın %50'sine, ameliyat sonrası 10. günde ise %100'üne ulaşır. Anastomozun birinci haftasında anjiogenezis yanında mukoza epitel proliferasyonu izlenir (52). Hücrelerin düzenli olarak sıralandığı, normal dokuların ve düz kas hücrelerin sentezlendiği dönem ise remodelling dönemidir.

2.4.2. Anastomoz İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Gastrointestinal sistemde yapılan anastomozların iyileşmesinde sistemik ve lokal faktörlerin etkisi vardır (Tablo 2.1). Bu faktörler içinde anastomoz tekniği, yara iyileşmesinin safhalarının sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi, anabolizan etkili mekanizmaların eksiksiz bir şekilde ilerlemesi, anastomoz gerginliği ve doku kanlanması yeterli düzeyde olması mutlak suretle sağlanmalıdır(53, 54). Bu faktörlerden Tablo 2.1'de kısaca bahsedilmiştir.

Tablo 2.1. Anastomoz iyileşmesine etki eden faktörler

LOKAL FAKTÖRLER	SİSTEMİK FAKTÖRLER
Yeterli kanlanma	Enfeksiyon
Anastomozda gerginlik olmaması	Şok, sepsis, asidoz
Sağlıklı doku uçları	Hipovolemi
Bakteriyel kontaminasyon	İlaç tedavisi (Steroidler, NSAİİ)
Distal obstrüksiyon	İmmün yetmezlik
Radyasyon hasarı	Obezite,alkolizm,malnütrisyon
Barsak hazırlığı ve antibiyotik kullanımı	Üremi
Mekanik travmalar	Karaciğer hastalığı, yetmezliği
Cerrahi teknik ve dikiş materyali	Malign hastalıklar
Lokal enfeksiyon	Yaş
Hematom	Ağır anemi
Yabancı cisimler	Vitamin ve mineral eksiklikleri

Kolonun anastomozu sırasında yapılan ani ve kaba hareketler, koterizasyonun gereğinden fazla yapılması, barsak segmentlerine konulan klemplerin dolaşımı engelleyecek kadar sıkı olması ve uzun süreli kullanımı, kullanılan dikişlerin ve staplerin damarları hasarlaması dokuda iskemi meydana getirebilir (55). Anastomozun gergin olması halinde, anastomoz hattındaki perfüzyonda azalma meydana gelir ve bunun sonucunda inflamatuvar hücre infiltrasyonu artar. Gastrointestinal sistemde lokal mikrosirkülasyonun en az tolere edildiği alan kolondur (56). Ayrıca anastomoz sırasında kullanılan teknik anastomoz iyileşmesinde önemli rol oynar. Anastomoz iyileşmesi sürecinde dokuda homojen şekilde dağılmış yeterli oksijen konantrasyonu olmalıdır. Ancak bu sayede kollajen sentezi sırasında yeterli prolin ve lizin hidroksilasyonu meydana gelir. Aksi takdirde dokularda yetersiz oksijenasyon sonucunda enfeksiyon oranında anlamlı artış ve iyileşme kalitesinde azalma meydana gelir. Örnek verilecek olursa; 55 mmHg altındaki oksijen basıncının olduğu dokulardaki kaçak oranı %10 iken 25 mmHg atındaki oksijen basıncının olduğu dokularda iyileşme görülmemektedir (57, 58).

Radyoterapi, gastrointestinal sistemde meydana getirdiği çeşitli etkilere sekonder olarak (striktür formasyonu, endarteritis obliterans v.b.) fibrozis oluşturur (37). Yapılan çalışmaların bir kısmı, kolon ameliyatlarına hazırlık aşamasında yapılan mekanik barsak temizliğinin ve antibiyotik kullanımının, anastomoz kaçak oranlarını belirgin ölçüde azalttığını desteklemektedir (59, 60). Mekanik barsak temizliği yapılmayan acil vakalarda yapılan iliekolik anastomozun daha güvenli olduğunu, bunun yanında obstruktif kolon ameliyatlarında mekanik barsak temizliği yapılmadan yapılan kolon anastomozlarının güvenli olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (61, 62). Anastomoz sırasında konulan dikişler kenarlardan uygun uzaklıkta olmalı ve iskemi yaratacak ya da boşluk bırakacak şekilde bağlanmamalıdır (63). Anastomoz dikişleri konulduktan sonra lümenin genişliği ve açıklığı kontrol edilmeli, anastomoz distalinde tıkanıklık, gerilim gibi anastomoz kaçağı yaratacak faktörler varsa ortadan kaldırılmalıdır. Anastomoz sırasında eversiyon yapılması kaçak riskini artırır ve adezyon meydana getirirken iskemi riskini azaltır. Dikişlerin iki kat konulması, dokuda kullanılan iplik miktarında artış ve invert edilmiş dokuda oluşan iskemi nedeni ile inflamatuvar cevapta artış meydana getirir. İnflamatuvar cevabın sonucu oluşan kollajen dokudaki yıkım, anastomozda zayıflık meydana getirir. Anastomoz sırasında tek kat dikiş konulmasını savunanların görüşleri de bu yöndedir (48).

Anastomoz sırasında kullanılan dikiş materyali, dokuda en az reaksiyonu oluşturmalı, enfeksiyona yol açmamalı ve anastomoz bütünlüğü ile birlikte yeterli gerilim kuvveti kazanılincaya kadar anastomozu destek olmalıdır. Geçmişte, kullanılan yöntem ve

dikiş materyallerinin birbirine göre avantajları ve dezavantajları yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (64). Deney hayvalarında yapılan kolon anastomoz teknikleri arasında; anastomozun tek kat yapılmasının teknik açıdan daha kolay olduğu, anastomozda daha az daralmaya yol açtığı ve ilk birkaç günde iyileşmenin meydana geldiği belirtilmiştir (29). Anastomoz kaçaklarına yol açan önemli faktörlerden birisi de lokal enfeksiyonlardır. Ameliyat sırasında sterilizasyona riayet edilmemesi sonucu dış etkenlerden oluşan kontaminasyonlar ve kolon florasının çeşitliliğinin fazla olması lokal enfeksiyona yol açabilirler (65). Enfeksiyon sonucunda ise kollejenaz aktivitesi artarak kollajen miktarında azalma meydana gelir (66). Ameliyat sırasında drenaj amaçlı konulan kateterlerin çeşitli avantaj ve dezavantajları vardır. Ameliyat sonrası intraperitoneal alanda enfeksiyona yol açma potansiyeli olan serbest sıvıyı dışarı taşıyan drenler, bununla birlikte dış ortamdan peritoneal kaviteye enfeksiyöz ajanlar için potansiyel bir yol görevi görürler. Ayrıca mekanik etki sonucu ağrı, adezyon ve travmaya yol açabilir (37). Bu konu ile köpeklerde yapılan bir çalışmada ameliyat sırasında konulan drenaj kateterinin, ameliyat sonrası dönemde anastomoz kaçak insidansını %15'ten %55'e çıkardığı tespit edilmiştir (67). Ameliyat sırasında intraabdominal sepsis tespit edildiğinde anastomoz yapmaktan kaçınmak gereklidir (37). Sepsis varlığında kollajen sentez miktarı belirgin ölçüde azalır (68). Ameliyat öncesi dönemde ve/veya ameliyat sonrası erken dönemde verilen kemoterapi tedavisi, fibroblast proliferasyon inhibisyonu ve doğrudan olarak kollajen sentez inhibisyonu yapar. Kan tablosunda görülen nötropeni, yara iyileşmesi sırasında inflamatuvar fazı uzatır ve yara yeri enfeksiyonuna sebep olabilir (69). İmmüsuprese kişilerde yara iyileşmesi sırasında inflamatuvar fazda polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) yokluğu, yara yeri enfeksiyonuna neden olarak yara iyileşmesinde gecikme meydana gelir. Antiinflamatuvar etki gösteren kortikosteroidler aynı zamanda hücresel fonksiyonlarda da baskılanmaya neden olurlar. Malnutrisyonun belirgin olduğu durumlarda, cilt yaralarında iyileşmede gecikme ve gerilim kuvvetinde azalma meydana gelir. C ve E vitaminleri, demir, çinko eksikliklerinde yara iyileşmesinde bozulma meydana gelir (69). Beslenmenin yanında hipovolemi de doku perfüzyonunda olumsuz etki yaratarak iyileşme sürecini uzatır (69). Hipotansiyonun anastomoz üzerine olan olumsuz etkisi Schrock, Deveney ve Dunphy tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir (3).

Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü (EGF) v.s.) fibroblast sentez uyarımına neden olarak kollajen sentezine ve dolayısı ile yara iyileşmesine katkıda bulunur (70). Diyabet hastalığı multifaktöriyel olarak yara iyileşmesini engellemektedir. Bunlar; nötrofil, makrofaj ve lenfosit fonksiyonunda bozulma, fibroblast proliferasyonunda azalma

ve mikrovasküler dolaşım bozukluğu nedeni ile kan akımında azalma meydana gelmesidir. Malign hastalıklar, ileri yaş katabolik etkileri nedeni ile yara iyileşmesini geciktirir (71). Karaciğer yetmezliği ve böbrek yetmezliği gibi hastalıkların sonucu olan protein sentez bozukluğu, sarılık ve üremi, anastomoz iyileşmesini geciktirir (37, 72).

2.4.3. Anastomoz İyileşmesinin Değerlendirilmesi

Anastomoz iyileşmesinin değerlendirilmesi mekanik, biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle yapılır. Mekanik ve biyokimyasal yöntemlerde genelde kantitatif değerler kullanılırken, doku düzeyinde iyileşmenin kalitatif olarak değerlendirilmesinde histolojik yöntemler önemli bir yer tutar (48).

Mekanik Değerlendirme Yöntemleri

Patlama Basıncı: Anastomoz yapılan intestinal segmentin, sıvı ya da gaz ile artış gösteren intralüminal basınca karşı gösterdiği intestinal duvar direncinin kantitatif karşılığıdır (48). Genel olarak anastomoz sonrası 3-4. günlerde en düşük değerde görülür ve bu nedenle anastomoz kaçakları en sık dördüncü günde görülür. Öte yandan yedinci günde direnç, ameliyat öncesindeki seviyeye yükselir ve genel olarak patlama anastomoz dışındaki bir intestinal segmentte meydana gelir (37).

Kopma Direnci: Anastomoz hattını içine alan intestinal segmentinin longitudinal olarak kesilerek, standart olarak hazırlanmış bir şeridin iki ucuna karşıt yönlerde kuvvet uygulanırken kopma anındaki kuvvetin kantitatif karşılığıdır. Genelde anastomoz sonrası ikinci haftaya kadar olan dönemde uygulanan bir değerlendirme yöntemidir (37).

Biyokimyasal Değerlendirme Yöntemleri

Anastomoz iyileşmesinin biyokimyasal olarak değerlendirilen karşığı doku kollajen miktar tayinidir ve doku kollajen miktarı hidroksiprolin aminoasit düzeyinin ölçümü ile saptanır (37).

Histolojik Değerlendirme Yöntemleri

Anastomoz yapılan intestinal segmentin ışık mikroskobu altında değerlendirilerek vaskülarizasyon, fibrozis, inflamasyon, nekroz ve epitelizasyon değerlendirilmesi yapılır (37).

2.5. Kök Hücre

Uzun yıllar boyunca araştırmacılar, hasarlanan hücre, doku veya organların kaybettiği biyolojik işlevleri tekrar kazandırmak ve hasarı tamir etmek amacı ile birçok

çalışma yapmışlardır. Bu tip işlev kaybına yol açacak hastalıklar arasında tip1 diyabet hastalığı, Parkinson hastalığı, Alzheimer, Multiple skleroz yer alır. Çalışmalar sonunda özellikleri belirlenmiş ve çeşitli yöntemler kullanılarak izole edilmiş ve kök hücre olarak adlandırılan özel hücreler kullanılarak amaca ulaşılabilceği gösterilmiştir (73). Kök hücre; aldıkları biyokimyasal sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilen hücredir.

İn vivo plastisite kavramı, ilk kez 1983 yılında allojenik hemopoetik kök hücre nakli sonrası komplikasyon olarak, yaygın akciğer kemikleşmesine bağlı olarak solunum yetmezliği gelişmesi sonrasında Sale tarafından tanımlanmıştır (74). Daha sonra yapılan çalışmalar ile birlikte, en başta kemik iliğindeki kök hücrelerin in vitro ve in vivo koşullarda sadece köken aldıkları doku ve organların hücrelerini değil, vücudun diğer hücrelerine de dönüşebildikleri (plastisite) gösterilmiştir. Başta kemik iliği kaynaklı kök hücreleri (KİKKH) olmak üzere, farklı kaynaklardan elde edilen erişkin kök hücreleri, bazı hastalıkların tedavilerinde önemli kaynak olmuşlardır (73).

Kök hücreler buldukları dokuya göre iki genel gruba ayrılırlar. Bunlar; embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücrelerdir. Ayrıca farklılaşma potansiyellerine göre de alt gruplara ayrılırlar (73). Bunlar;

- Totipotent hücre: Döllenme meydana geldiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahip olan hücredir.

- Pluripotent hücre: Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmasına rağmen, tek başlarına artık tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildir (73).

- Multipotent hücre: Birbirine yakın hücre gruplarını oluşturabilen kök hücrelerdir. Örneğin, kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilir.

- Oligopotent hücre: Lenfoid ve myeloid hücrelerde olduğu üzere sadece birkaç hücre grubunu oluşturan kök hücrelerdir.

- Unipotent hücre: Kas ana hücresinde olduğu üzere bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir (75).

Kök hücreler yukarıda da bahsedildiği gibi birden fazla hücre tipine farklılaşma özelliğine sahiptirler. Bunun en belirgin örneği totipotent hücre olan döllenmiş yumurta hücresi ya da zigotla birlikte başlayan farklılaşmanın tüm organizmayı oluşturabilecek kabiliyete sahip olmasıdır. Embriyonel kök hücreler yüksek seviyede telomeraz aktivitesi içerir. Hücre çoğalmasının aktivasyonda azalmaya yol açmaması nedeni ile limitsiz çoğalma

kapasitesine sahiptirler. Embriyonel kök hücreler tüm somatik dokuları ayrı ayrı oluşturabilmesine rağmen, tam bir yeni kişi oluşturamazlar (76-78).

Erişkin kök hücreleri totipotent değil, pluripotent hücrelerdir. Bir doku ya da organdaki farklılaşmamış hücreler olan erişkin kök hücreleri, kendisini yenileyebilir, bunun yanında içinde bulunduğu doku ya da organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Bu özelliklerinden dolayı esas görevleri buldukları dokuyu tamir etmek ve devamlılıklarını sağlamaktır. Yapılan çalışmalar neticesinde erişkin kök hücrelerinin vücutta birçok dokudan elde edilebildiği gösterilmiştir (79). Bazı bilim adamları, erişkin kök hücresi yerine ‘somatik kök hücresi’ terimini kullanmayı tercih etmişlerdir (80).

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kendini yenileyebildiğini, çeşitli bağ doku elemanlarına farklılaşabildiğini ve yapılarının fibroblastlarla benzerlik gösterdiğini ilk kez 1976 yılında Friedenstein göstermiştir (81). Yine 1980 yılında tavşan kemik iliği stromal hücrelerini izole edip, başka hayvanlarda intraperitoneal implantasyon yapan Ashton ve arkadaşları, implantasyon yapılan alanda kemik ve kartilaj oluşumunu göstermişlerdir (80).

Erişkin kök hücrelerinin gösterilmiş olduğu alanlar içinde; kemik iliği, periferik kan, arteriyel ve venöz yapılar, çizgili kaslar, diş dokusu, miyokardium dokusu, karaciğer, gastrointestinal sistem, over epiteli, testis, akciğer, meme dokusu, adipoz doku, deri, merkezi sinir sistemi, tükrük bezleri ve paratiroid bezler gösterilmiştir. Bu dokular içindeki kök hücreler bölünmeye hazır halde beklemekte, bölünme sinyalini aldıktan sonra harekete geçerek bölünmeye başlamaktadır (80).

Erişkin kök hücresi hakkında yapılan çalışmaların ilerlemesiyle, kan hücrelerinin kökeni olan hematopoetik kök hücrelerinin farklı embriyonik kökenli (ektoderm ve endoderm) hücrelere kaynak olabileceği ortaya çıkmış ve çalışmalar bu yönde hız kazanmıştır.

Kök hücre kullanımında iki önemli özelliğe dikkat etmek gerekir. Bunlardan bir tanesi kök hücrelerin kolay yoldan ve çok miktarda elde edilebilmesi, diğeri ile istenilen dokulara kolaylıkla ve yüksek oranda farklılaşabilmesidir.

Erişkin kök hücrelerinin diğeri bir çeşidi de adipoz doku kökenli kök hücrelerdir (ADKKH). Bu tip kök hücreler lipoaspirasyon sonrasında veya abdominal ciltlatı yolla alınmış yağ dokusundan ayrıştırılma yöntemi ile edilen ve in vitro şartlarda farklılaşmadan büyüme özelliğine sahip hücrelerdir. İlk kez insanda 2001 yılında Zuk ve arkadaşları (82, 83) tarafından ayrıştırılarak tanımlanan ADKKH, diğeri kök hücre kaynaklarına nazaran donörde düşük mortalite ile birlikte yüksek miktarda elde edilebilmesi ile kök hücre uygulamalarında cazip bir kaynak haline gelmiştir. Bu alanda yapılan birçok çalışmada

uygun şartlarda elde edilen ADKHH'in mezoderm kaynaklı kemik, kıkırdak, kas, fibroblast ve endotel hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir (82-85).

2.5.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Erişkin kök hücre tiplerinden olan mezenkimal kök hücreler (MKH), stromal kökenli olmaları nedeni ile genel anlamda 'destek hücresi' özelliği taşırlar. Bu özellikleri, onları tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşıır hale getirmiştir. MKH, birçok dokudan elde edilebilir, dayanıklı ve sayıca çoğaltmaya elverişli hücrelerdir. Ayrıca MKH osteoblastlar, kondroblastlar, fibroblastlar, adipositler, iskelet kas lifleri, kardiyomiyositler ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tipine farklılık gösterebilme kabiliyetini göstermiştir (86). Bu özelliğim, yara yerinde iyileşme ve anjiyojenezin çoğaltılmasında rol oynadığı gösterilmiştir (87). 1960'lı yıllardan bu yana Kemik iliği hücreleri kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman, stromal hücrelerin hızla plastik kültür kabına yapıştıkları, hematopoetik hücrelerin ise yapışmadıkları bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise genellikle stromal hücre sistemi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Örnek verecek olursak ilk zamanlarda kemik iliği kökenli stromal hücreler sadece hematopoezi indüklemek için kullanılırken, zaman geçtikçe in vivo ve in vitro çalışmalarda karaciğer, kalp, adipoz doku, böbrek, kas, kıkırdak, sinir, kemik, akciğer ve barsaklarında aralarında olduğu çeşitli hematopoetik olmayan dokulardan parankim hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir. (88-90).

MKH'lerin yüksek klinik kullanım potansiyeli olması sayesinde, hücresel tedaviler, doku mühendisliği, bağışıklık baskılayıcı tedaviler ve gen tedavileri konusunda ilgi odağı haline gelmiştir (91). Son yapılan çalışmalarda MKH'lerin kardiyak rejenerasyonda, iskemik kalp hastalıklarında ventriküler fonksiyonların düzenlenmesinde olumlu etkiler meydana getirdiği anlaşılmıştır (92). Bu etkilerin sağlanmasında faktörler ise; apoptozis direncinde artış, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılanmasında artış, hücresel düzeyde kan akımında artış, mikrovasküler yapıda artış şeklinde sıralanabilir (92-94).

Kemik iliği, organizmanın en zengin kök hücre kaynağı olarak MKH'lerinde ana kaynağı olarak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezoderm kaynaklı hematopoetik, endotel ve mezenkimal kaynaklı kök hücreler bulunmaktadır. MKH sadece kemik iliğinden değil, periost, kas dokusu, diş pulpası, maksillofasiyal dokular, lipoaspirasyon materyalleri, karaciğer, kordon kanı, kordon stroması, amniyon sıvısı, plasenta, sinovial sıvı ve hatta

periferik kandan adezyon özellikleri nedeni ile ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür (95, 96).

MKH'ler birçok çeşitli dokuda bulunmasına rağmen, buldukları dokuda çok az miktarda bulunurlar. Bunun yanında yapışma özellikleri nedeni ile yeterli sayıda elde edilmesinde zorluklar yaşanır. Çalışmalarda kullanmak üzere yeterli sayıda hücreye ulaşmak için, elde edilen MKH'lerin in vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir. Işık mikroskobu veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde MKH'lerin morfolojisinin iğ şeklinde olduğu ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları dikkati çekmektedir. Bu hücreler, düşük yoğunlukta kültür edildiklerinde koloni oluşturmaya meyil ederken, daha yüksek hücre yoğunluğunda ise yan yana dizilmiş hücre grupları halinde çoğaldıkları gözlenmiştir (86).

MKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğalmasını sağlamak için çok spesifik ortam ve koşullar gerekmemektedir. %10 Fetal Buzağı Serum (FBS) içeren kültür ortamında plastik tabanına yapışmış olan hücreler, fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedirler (97).

Farklılaşmanın sağlanmak istenildiği çalışmalarda, hedeflenen farklılaşmanın olup olmadığını göstermek amacı ile histokimyasal, immünohistokimyasal veya immünofloresan yöntemler kullanılarak spesifik belirteçler incelenir (80).

2.5.2. Kök Hücrelerin Potansiyel Kullanım Alanları

Son yıllarda tıp dünyasında yapılan çalışmalar içinde kök hücreler önemli bir yer tutmakla beraber, her yıl bu çalışmalara yenileri eklenmeye devam etmektedir. Kök hücre kaynaklı yapılan çalışmaların bir tanesinde, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin, de novo miyokard oluşturduğu gösterilmiştir. Bu sayede miyokard enfarktüsü ve koroner arter hastalıklarında, intrakoroner kök hücre infüzyonunu takiben kalp kasında rejenerasyon meydana geldiği gösterilmiştir (98, 99). Yapılan bir başka çalışmada ise göz içine korneal kök hücre transplantasyonu takiben görme kabiliyetinde iyileşme olduğu gösterilmiştir (100). Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklarda spinal kordaki hasarlı bölgeye verilen kök hücrenin nöral hücre serisine farklılaşarak, ablatif sinir hücrelerini rejenere ettiği ve lökomotor fonksiyonların geri döndüğü gösterilmiştir (101). Tip 1 diyabet hastalarında pankreastaki insülin salgılayan beta hücrelerindeki hasar mekanizmasının, moleküler düzeyde anlaşılması ve restorasyonu amacı ile yapılan kök hücre çalışmaları da umut vaat etmektedir (102).

Ichioka ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, flep cerrahisinde, kök hücrenin terapötik anjiogenez yapıcı etkisinden yararlanılmıştır (103). Sıçanlarda yapılan çalışma neticesinde kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin dorsal cilt fleplerindeki damarlanma üzerinde etkileri araştırılmış ve kapiller dansitede iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı yönde belirgin artış tespit edilmiştir. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda kök hücrenin terapötik anjiogenez etkisi gösterilmiştir (104-107).

MKH'lerin bilinen özelliklerinden bir tanesi vasküler endotelial hücrelere farklılaşabilmeleridir. VEGF ve MKH'lerin birlikte iskemik fleplerde neovaskularizasyonu arttırdığı Zheng ve ark.'nın yaptıkları çalışmada gösterilmiştir (93). Ayrıca Uysal Ç. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçan dorsal cilt fleplerinde iskemi reperfüzyon hasarının ADKKH uygulaması ve bir takım büyüme faktörlerinin regüle edilmesi sonucu önenebileceği gösterilmiştir (108).

2.5.3. Kök Hücre Kaynağı Olarak Adipoz Doku

Kök hücre ile ilgili yapılan çalışmalarda ilk başlarda mezenkimal kök hücre kaynağı olarak çoğunlukla kemik iliği kullanılmış olsa da zaman içinde yeni kaynaklar keşfedilmiştir. Zuk ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, adipoz dokunun mezenkimal doku bakımından oldukça zengin olduğu gösterilmiştir (82). Adipoz dokudan kök hücre temininin, kemik iliğine göre avantajlarını; izolasyon sırasında daha az acı verici olması, lipoaspirasyon yöntemi ile kolayca elde edilebilmeleri şeklinde sayabiliriz. Ayrıca, yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin kimyasal yöntemlerle ayrıştırılması kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden daha kolay ve daha güvenlidir (17). Yine 2010 yılında yapılan bir çalışmada adipoz dokuda, kemik iliğine nazaran daha fazla kök hücre elde edilebildiği gösterilmiştir (109).

Yağ dokusunun kök hücre bakımından zengin bir doku olduğunu gösteren çalışmalardan bir tanesi Poznanski ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır (110). Kemik iliğine göre adipoz doku santimetre küp başına 100 ila 1000 kat daha fazla pluripotent hücre içermektedir (111, 112).

Yağ dokusu da kemik iliğine benzer bir şekilde embriyonik mezodermden oluşur ve stroma içerir. Lipoaspirasyon eldesine kısa süre ile kollajenaz tatbiki sonrasında santrifüj edilerek elde edilen ürüne 'processed lipoaspirate = işlenmiş lipoaspirat' (PLA) denilmektedir. PLA'lar uyarınların çeşidine bağlı olarak osteojenik, adipojenik, myojenik, kondrojenik hücrelere farklılaşarak o diziye özel gen ve proteinleri içerirler (97). Aspiratla

elde edilen PLA fraksiyonu, endotelial hücreler, fibroblastik hücreler, makrofaj ve düz kas hücreleri gibi heterojen bir hücre grubu içerir ve seri pasajlarla MKH'lere benzeyen homojen fibroblastik bir popülasyon kalır. Uzun süreli kültürlerle PLA'ların büyüme kinetikleri ve farklılaşma kapasitelerinde değişim görülmez.

Adipositlerden oluşan gevşek bağ dokuya adipoz doku denir. Asıl rolü yağ formunda enerji depolamak ve yağda eriyen vitaminleri depolamak olan adipoz doku, lipoblastlardan oluşmaktadır. Adipoz doku enerji depolamanın yanı sıra, vücudun destek ve ısı yalıtımında da rol oynar. Ayrıca leptin, rezistin ve Tümör Nekroz Faktör alfa (TNF α) salgılayarak önemli bir endokrin organ görevi görür. Adipositlerden ve adipoz stromal hücrelerden köken alan proteinlerin otokrin, parakrin ve endokrin etkileri ile hem sistemik hem de lokal etkileri olduğu gösterilmiştir. Adipositlerden salgılanan sitokinlerin immün yanıtta, hemostazda, steroid metabolizmasında ve vazoregülasyonda rol oynadıkları da bilinmektedir (113).

2.5.4. Kök Hücrelerin Dokularda Takibi

MKH'leri ile ilgili yapılan çalışmalar sırasında, sadece dokuya implantasyon değil, implantasyon sonrasındaki durumu, hasarlı dokuya göçü, yerleşim özellikleri, çoğalmaları, farklılaşma özellikleri detaylı bir şekilde incelenmelidir. Bu incelemelerin yapılması ve hücrelerin takibi için çeşitli işaretleyicilere ihtiyaç vardır. Yeşil floresan protein'in (GFP) hücrelere transfekte edilmesi sonrasında dokuların bu yöntem ile takibi yaygın olarak kullanılmaktadır (114, 115). Genelde kalıcı işaretleme yapılması istenildiği zamanlarda genetik işaretleme yöntemleri tercih edilirken, kısa süreli deneysel çalışmalarda karboksifloresin diasetat süksinimidil ester (CFSE), 1,1'-Dioktadesi-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI) gibi floresan işaretleme yöntemleri de kullanılabilir.

2.6. Solid Organ Transplantasyonu ve İmmünesupresyon

Transplantasyon terimi, tıbbi anlamda; hücre, doku veya organların bir yerden, başka bir yere aktarımı anlamına gelir. Organ transplantasyonu ise cerrahi bir işlemdir ve hasta organın fonksiyonel organlarla yer değiştirilmesidir. Solid organ transplantasyonu, organ yetmezlikli hastalarda yaşam kalitesini geliştiren ve mortalite riskini azaltan bir tedavi şeklidir. Özellikle 20. yüzyılın ikinci yarısından sonra solid organ transplantasyonu alanında gelişmeler hız kazanmıştır. Şu anda dünya genelinde böbrek, karaciğer, pankreas, barsak, kalp ve akciğer nakli uygun endikasyonların varlığı halinde güncel bir tedavi şekli olarak

uygulanmaktadır. Ülkemizde 3 Kasım 1975'te ilk kez canlı donörden böbrek naklini gerçekleştiren Haberal ve ekibi daha sonra sırasıyla 10 Ekim 1978'de Türkiye'de ilk kez kadavradan böbrek naklini, 8 Aralık 1988'de Türkiye'de ve bölgede ilk başarılı karaciğer naklini, 15 Mart 1990'da Türkiye, Avrupa ve bölgede bir ilk olan çocuklarda canlıdan kısmi karaciğer naklini gerçekleştirdi. Hemen akabinde aynı ekip 27 Nisan 1992'de Dünya'da ilk kez erişkinde canlıdan kısmi karaciğer naklini gerçekleştirdi. Günümüzde Türkiye, 39 karaciğer nakli merkezi ve 71 böbrek nakli merkezi ile dünyanın lider ülkeleri arasındadır (116-119).

Transplantasyon; genetik olarak aynı olmayan insanlar arasında yapıldığında, gerekli önlemler alınmadığı takdirde alıcı immün sistemi, yabancı organı tanımakta ve rejeksiyon gerçekleşmektedir. Bu süreçten sorumlu antijenler majör histokompatibilite kompleks (MHC) molekülleridir. İnsanda bu antijenler insan lökosit antijen sistemi (HLA) tarafından oluşturulmaktadır. Yapı, fonksiyon ve dokuda dağılımlarına göre HLA antijenleri iki ana sınıfa ayrılır. Sınıf I antijenler (HLA-A, HLA-B, HLA-C) tüm çekirdekli hücrelerde sentezlenirken, sınıf II antijenler sadece antijen sunan hücrelerde (APC hücreleri, B lenfositler, dendritik hücreler, makrofajlar ve diğer fagositik hücrelerde) sentezlenir (36). HLA moleküllerinin esas fonksiyonu yabancı protein parçalarını T lenfositlere sunmaktır. Böylelikle yabancı maddelerin tanınmasına ve elimine edilmesinde önemli bir rol oynar. Bu rolünden dolayı HLA molekülleri transplantasyon immünolojisinde çok önemli bir yere sahiptir. HLA molekülleri iki farklı mekanizma ile transplantasyon rejeksiyonunu tetkikleyebilir. Donör HLA moleküllerinin alıcı T lenfositleri ile karşılaşması neticesinde hücresel düzeyde rejeksiyonun aktivasyon ve proliferasyon safhası başlar. Diğer bir mekanizma ise humoral rejeksiyondur. Bu rejeksiyon modelinde ise donör HLA moleküllerine karşı transplantasyon öncesi yada sonrası oluşmuş, kanda bulunan antikorlar nedeni ile bir yıkım meydana gelir. Antikorların HLA moleküllerine bağlanmasını takiben kompleman sistem aktivasyonu ile birlikte hücresel yıkım meydana gelir (36).

Alıcı T hücrelerinin donör HLA hücreleri ile karşılaşması direkt ya da indirekt şekilde olabilir. İndirek yolda; antijen sunan hücreler (APC)i donörden gelen yabancı antijenleri işledikten sonra T hücrelerine sunarlar. HLA molekülleri ile T hücre reseptör/CD3 kompleksinin karşılaşması sonucu T hücre aktivasyonu başlar. Bu etkileşim, hücre içine bir sinyal olarak yansıtılır ve bu sinyal sistemine sinyal 1 yolağı denir. T hücre aktivasyonunun tam olarak gerçekleşebilmesi için sinyal 2 yolağı denen ikinci bir sinyal sistemine ihtiyaç vardır. CD40/CD154 ve B7/CD28 yolakları sinyal 2 yolağının iyi tanımlanmış olanlarıdır. Sinyal 1 ve sinyal 2 nin hücre çekirdeğine iletilmesi ile birlikte çok

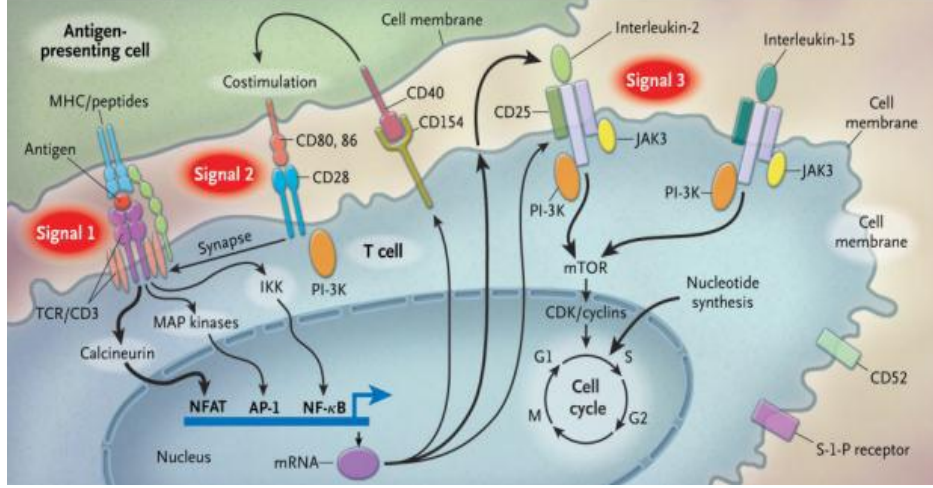
sayıda sitokin transkripsiyonu artır. T hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan interlökin-2 (IL-2) de bu aşamada aktive olan sitokinlerden bir tanesidir. İşte rejeksiyon hadisesi bu aktive edilmiş T hücrelerin nakledilen organa saldırması sonucu gerçekleşir. Bu esas mekanizmanın yanında, yabancı HLA antijenleri ile karşılaşan B hücrelerinin, T hücreleri ile etkileşime girmesi sonucu antikor sentezlemesiyle birlikte B hücreleri de rejeksiyona katkıda bulunmuş olur. Rejeksiyonlar; patogenez ve zamanlamasına göre hiperakut, akut ve kronik olarak üç gruba ayrılır (36).

Transplantasyonun başarılı olması, alıcının immun sistemi ile donör allogrefti arasındaki dengeye ve farmakolojik immunsupresyona bağlıdır. Başka bir deyişle; solid organ transplantasyonu yapılmış hastalarda immunsupresif tedavi planının uygun şekilde ayarlanması, hasta ve greft yaşam süresi bakımından önem arz etmektedir. Yoğun immunsupresif tedavi sonucunda fırsatçı enfeksiyonlar ve malignite gelişme riski artarken; immunsupresyonun yetersiz kalması halinde ise organ reddi tehlikesi baş göstermektedir. Greftin fonksiyonun başarılı şekilde sürdürülmesinde, immunsupresif tedavi anahtar rol oynar (8).

İmmunsupresyon iki aşamadan oluşur. İndüksiyon tedavisi; rejeksiyon riskinin en yüksek olduğu transplantasyondan hemen sonra başlanır. İdame tedavisi ise transplantasyondan sonraki günlerde başlanıp, alıcı ya da greft ömrünün sonuna kadar devam eder(8).

İmmunsupresif idame tedavisi olarak hastaya genel olarak kortikosteroid, antiproliferatif ajan (mikofenolat mofetil, mikofenolk asit, azatiopirin) ve kalsinörin inhibitörleri (siklosporin ve takrolimus) ile kombine edilmiş üçlü, ikili veya tekli immunsupresif tedavi protokolü uygulanır. Bu protokollerin amacı immun yanıtı baskılayacak birçok hedefe ulaşmak ve daha az toksisite sağlamaktır (36).

Kalsinörin inhibitörleri, sinyal 1 yolağını inhibe ederek güçlü immunsupresyon oluşturur. (Şekil 2.3). Bu immunsupresyon sırasında uzun dönemde nefrotoksisite, hipertansiyon ve elektrolit bozuklukları gibi ciddi yan etkiler meydana gelebilmektedir (8). Özellikle kronik allograft nefropatisi ve kronik kalsinörin inhibitör toksisitesi, fonksiyonel greft süresini kısıtlayan sorunların başında gelir (9, 10). Bu komplikasyonları azaltmak amacı ile hastalarda farklı immunsupresyon rejimleri denenmektedir. Bunlardan biri de mTOR inhibitörleri ile (sirolimus, everolimus) immunsupresyonun idame tedavisinin sağlanmasıdır.



Şekil 2.3. T lenfosit aktivasyonu için tanımlanan üçlü sinyal modeli

2.7. Everolimus

2.7.1. Tanımı ve Tarihçesi

İmmüno-supresif ve antikanser etkiye sahip bir ilaç olan everolimus (rapamisin'in 40-O-(2-hidroksietil) türevi), oral yoldan kullanılan selektif mTOR (Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) inhibitörüdür ve selektif olarak mTOR-raptor sinyal iletim kompleksi 1'i (mTORC1) hedef almaktadır. Rapamisin (sirolimus), 1975 yılında, Paskalya Adası'nın orijinal adı olan Rapa Nui'de, bir toprak bakterisi olan *Streptomyces hygroscopicus*'tan izole edilmiştir ve adını da Rapa Nui'den almıştır (120). Bu makrolakton (makrolid) yapıdaki maddenin, antifungal etkiye sahip olduğu görülmüştür. Rapamisin'in keşfi ile birlikte dünya, TOR'u (Target of Rapamycin) öğrenmiştir. TOR, 1991 yılında, mantarların tedavisi için kullanılan rapamisin'in, mantarı öldürme mekanizması üzerinde çalışılırken bir mayada keşfedilmiştir. TOR'un memeli analogu ise mTOR olarak tanımlanmıştır (121-124). Rapamisin ilk başlarda, immüno-supresif özelliklere sahip antifungal bir ajan olarak kullanılmıştır. 1980'li yıllarda, Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından antikanser aktivitesi yönünden analiz edilmiş ve antikanser aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (125). Antikanser ajanlar olarak mTOR inhibitörlerinin ortaya çıkışı, ana molekülden daha ziyade rapamisin analogları ile başlamıştır. 1990'lı yıllardan itibaren geliştirilmeye başlanan analoglar sırasıyla; temsirolimus, everolimus, ridaforolimus ve deferolimustan oluşmaktadır (122, 123, 126, 127).

Everolimus, immüno-supresif bir ajan olarak solid organ transplantasyonunda 1996 yılından bu yana klinik olarak geliştirilmektedir. Kalp ve böbrek nakli yapılmış hastalarda

greft reddini önlemek için immüno-supresif ajan olarak kullanımı, 2003 yılında Avrupa’da Certican® (0,25 mg ve 0,75 mg) ticari ismiyle onaylanmıştır. Düşük veya orta dereceli immünolojik riske sahip böbrek nakli yapılmış hastalarda greft reddinin önlenmesinde kullanımı için 2010 yılında Amerika’da Zortress® ticari ismiyle onay almıştır. Onkolojide, everolimusun, çeşitli hematolojik ve hematolojik olmayan kanserlere sahip hastalarda tek başına ve diğer antitümör ajanlarla birlikte kullanımı için 2002 yılından bu yana klinik geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Bu malign hastalıklar; metastatik renal hücreli karsinom, menopoz sonrası kadınlarda görülen ilerlemiş ER+/HER2- meme kanseri, gastroenteropankreatik nöroendokrin tümörler, mantle hücreli lenfoma, difüz büyük B hücreli lenfoma, hepatoselüler kanser, mide kanseri, kolorektal kanser ve akciğer kanseridir. Everolimusun, subependimal dev hücreli astrositoma (SEGA; Subependymal Giant Cell Astrocytoma) ve anjiyomiyolipomada kullanımı da klinik araştırma aşamasındadır. Everolimus, renal hücreli karsinomada kullanımı için Afinitor® (5 mg ve 10 mg) ticari ismiyle onay almıştır (127-130).

2.7.2. Etki Mekanizması

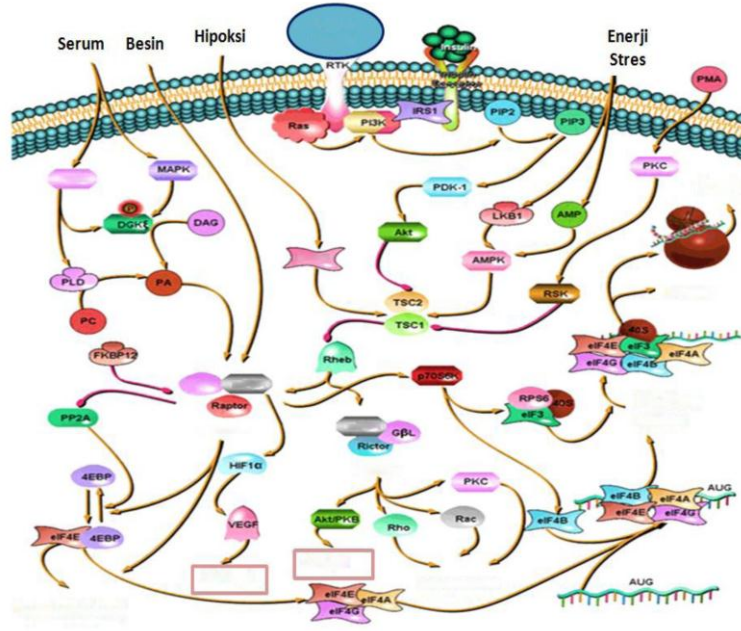
Everolimus, selektif mTOR inhibitörüdür ve spesifik olarak mTORC1’i hedef almaktadır. mTOR, Fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K)/ Protein kinaz B (PI3K sinyalizasyon yolağının bir bileşeni) (AKT)/mTOR sinyal yolağının akış aşağı aktivasyonunda anahtar bir serin-treonin kinazdır; hücre büyümesi, proliferasyonu ve sağkalımında önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.4). mTORC1 sinyalizasyonunun düzenlenmesi karmaşıktır; mitojenler, büyüme faktörleri, enerji ve besin varlığı ile modüle edilmektedir. mTOR; mitojenler, büyüme faktörleri, enerji ve besin düzeylerinin bir sensörü olarak işlev görmekte, uygun büyüme koşullarında, hücre döngüsündeki G1 fazından S fazına geçişi kolaylaştırmaktadır. mTOR, ökaryotik başlatıcı faktör 4E bağlayıcı proteinleri (eIF4EBP) inaktive ederek ve 40S ribozomal S6 kinazları aktive ederek (örn. P70S6K1) tümör hücre proliferasyonu ve anjiyogenez için önemli olan proteinlerin sentezini düzenlemektedir. mTOR yolağının aktivasyonu; tümörde pro-anjiyojenik faktörlerin (örn. VEGF) üretimini artmasına; tümör hücresi, endotelial hücre ve düz kas hücre büyümesi ve proliferasyonunda artışa neden olmaktadır. mTOR, pleiotropik etkinlik göstermektedir ve hücre tipine göre everolimusun aktivitesi değişebilmektedir (122, 127, 129, 131, 132).

Bu sinyalizasyon yolağı sıklıkla kanserde bozulur ve bu yüzden de mTOR, antitümör etki için önemli bir hedeftir. Everolimus, mTOR yolağı üzerindeki aktivitesini, hücre içi

reseptör protein FK506 bağlayıcı protein 12 (FKBP12)'ye yüksek afinite ile bağlanarak gösterir. FKBP12/everolimus kompleksi, mTORC1'e bağlanarak onun sinyalizasyon kapasitesini inhibe eder. mTORC1, normal koşullarda, akış aşağı yöndeki efektör moleküllerden translasyonel düzenleyiciler olan S6 ribozomal protein kinaz (S6K1) ve ökaryotik uzama faktörü 4E-bağlayıcı proteinini (4E-BP) fosforilleyerek etki gösterir. mTORC1 kompleksinin inhibisyonuna bağlı olarak, S6K1 ve 4E-BP fonksiyonlarındaki bozulma, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, glikolizde ve düşük oksijen koşullarına (hipoksi) adaptasyonda rol oynayan önemli proteinleri kodlayan mRNA'ların translasyonunu engellemektedir. Bu da tümör gelişmesini ve hipoksi ile indüklenebilir proteinlerin (HIF-1 transkripsiyon faktörleri) ekspresyonunu inhibe eder; ki ikinci durum, tümörün anjiyojenik süreçlerini potansiyelize eden faktörlerin (VEGF) ekspresyonlarının azalmasına neden olur. Everolimus; tümör hücrelerinde, endotelial hücrelerde, fibroblastlarda ve vasküler düz kas hücrelerinde, büyüme ve proliferasyonun potent bir inhibitörüdür. mTORC1'in merkezi düzenleyici rolü ile uyumlu şekilde, in vivo solid tümörlerde everolimusun hücre proliferasyonunu, glikolizi ve anjiyojenezi azalttığı gösterilmiştir. Sonuç olarak everolimus tümör gelişmesinin inhibisyonunu iki bağımsız mekanizma ile gerçekleştirmektedir: direkt antitümör hücre aktivitesi ve tümör stromal kompartmanın inhibisyonu (129, 132-135). mTOR yolağının aşırı aktivasyonu, meme kanserinde endokrin tedavi ajanlarına karşı dirençte katkıda bulunan kritik bir adaptif değişikliktir. Endokrin tedavi ajanlarının etkilerinden kaçınmak üzere çeşitli sinyal ileti yolları aktive olur. Bu yollardan biri PI3K/AKT/mTOR yolağı olup esas olarak aromataz inhibitörlerine dirençli ve uzun süreli östrojenden yoksun meme kanseri hücrelerinde aktive olur. Meme kanseri hücrelerinde AKT aktivasyonuna bağlı olarak aromataz inhibitörlerine direnç, eş zamanlı everolimus uygulaması ile tersine çevrilebilir. İn vitro çalışmalar, östrojene bağımlı ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörleri 2 (HER2)+ meme kanseri hücrelerinin, everolimusun inhibitör etkilerine duyarlı olduklarını ve everolimus ile AKT, HER2 ya da aromataz inhibitörleri ile kombine tedavinin, everolimusun antitümör aktivitesini sinerjistik bir biçimde arttırdığını göstermiştir (122, 136)

Antitümör etkisinin keşfinden önce selektif immünösüpresif bir ilaç olarak bilinen proliferasyon sinyal inhibitörü everolimus, bu etkisini, T-hücrelerine spesifik interlökinler (IL-2 ve IL-15) tarafından yönlendirilen, antijen etkisiyle aktive edilen T hücrelerinin çoğalmasını ve dolayısıyla da klonlanmasını inhibe ederek gösterir. Everolimus, söz konusu T hücresi büyüme faktörlerinin kendi reseptörlerine bağlanmasıyla harekete geçen ve normal

olarak hücre çoğalmasına neden olan hücre içi sinyal yolunu inhibe etmektedir. Bu sinyalin everolimus tarafından bloke edilmesi, T hücresi proliferasyonunun; hücre siklusunun G1 evresinde durmasıyla sonuçlanır. Everolimus, moleküler düzeyde, sitoplazmadaki FKBP-12 proteiniyle kompleks oluşturur. Bu kompleks mTORC1'i inhibe eder. Böylece everolimusun varlığında P70 S6 kinaz adlı enzimin, büyüme faktörlerinin uyarması sonucu fosforillenmesi inhibe olur (122, 136)



Şekil 2.4. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı

2.7.3. Yan Etkileri

Bulaşıcı olmayan pnömoni, everolimus ve diğer rapamisin türevlerinin bilinen bir etkisidir ve everolimus kullanan hastaların %12'sinde tanımlanmıştır. Bazı vakalar şiddetli olup, nadir durumlarda ölümcül bir sonuç gözlenmiştir. Everolimusun immünosupresif özellikleri olduğundan hastaları, bakteriyel, fungal, viral veya protozoal enfeksiyona (fırsatçı patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar da dahil) daha yatkın hale getirebilir. Everolimus tedavisi uygulanan hastalarda, pnömoni, diğer bakteriyel enfeksiyonlar ve invazif fungal enfeksiyonlar (aspergillozis veya kandidiyazis), Pneumocystis jirovecii (carinii) pnömonisi ve Hepatit B virüsünün reaktivasyonu da dahil olan viral enfeksiyonlar gibi lokalize ve sistemik enfeksiyonlar gözlenmiştir. Bu enfeksiyonların bazıları şiddetlidir (örn. sepsis, solunum veya karaciğer yetmezliğine neden olmaktadır) ve nadiren ölüme yol açabilmektedir.

Everolimus kullanımında, anafilaksi, dispne, yüzde ve boyunda ani kızarıklık, göğüs ağrısı ve anjiyoödem (örn. solunum fonksiyon bozukluğu ile veya solunum fonksiyon bozukluğu olmaksızın hava yollarının veya dilin şişmesi) içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan semptomlarla kendini gösteren aşırı duyarlılık reaksiyonları gözlenmiştir. Eş zamanlı olarak ACE inhibitörü (örn. ramipril) tedavisi alan hastalar anjiyoödem açısından daha yüksek risk altında olabilirler. Everolimus ile tedavi edilen hastalarda, pulmoner emboli bildirilmiş ve acil bir güvenlik izlemi olarak değerlendirilmiştir. Everolimus kullanan hastalarda serum kreatinin düzeylerinde genellikle hafif şiddette yükselme ve proteinüri; hiperglisemi, hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi; hemoglobin, lenfosit, nötrofil ve trombosit düzeylerinde azalma bildirilmiştir. Everolimus tedavisi başlatılmadan önce ya da başlatıldıktan sonra düzenli olarak kan üre azotu (BUN), üriner protein ya da serum kreatinin düzeyi ölçümleri de dahil olmak üzere böbrek fonksiyonunun takibi, açlık serum glikoz düzeyinin takibi, kan kolesterolü ve trigliseridlerinin takibi, tam kan sayımı takibi önerilmektedir. Everolimusun kadın ve erkek hastalarda infertiliteye sebebiyet verme potansiyeli bilinmemektedir ancak kadın hastalarda adet düzensizlikleri, sekonder amenore ve hormon oran dengesizliği gözlenmiştir. Klinik olmayan bulgulara göre, everolimus ile yapılan tedavi erkek ve dişi fertilitasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir (129).

Yara iyileşmesinde bozulma everolimus ve diğer mTOR inhibitörlerine ait bir etkidir. Ameliyat tarihine yakın bir dönemde everolimus kullanımı konusunda dikkatli olunmalıdır. mTOR, diğer immunsupresan ajanların yanında protein sentezi ve hücre proliferasyonunu düzenleyen bir protein kinazdır (137). Özellikle mTOR inhibitörlerinin kutanöz yara iyileşmesini bozmakla kalmayıp aynı zamanda diğer dokularda da iyileşme üzerinde yan etkileri olduğu gösterilmiştir (138, 139). Yara iyileştirmesini geciktirici etkisi temelde iki mekanizma yoluyla meydana gelir. İlk mekanizma mTOR inhibisyonu üzerine kuruludur. Hücre döngüsündeki G1 fazından S fazına geçişi kolaylatan mTOR'un inhibisyonu hücre proliferasyonunda, dolayısı ile de endotelial hücre ve düz kas hücre büyümesi ve proliferasyonunda azalmaya neden olur. Ayrıca yine mTOR inhibisyonu ile birlikte yara iyileşmesinde görev alan VEGF gibi faktörlerinde üretiminin azalmasına neden olur. İkinci mekanizma ise T hücre proliferasyonunu inhibe etmesi ile ilişkilidir. Yara iyileşmesinin inflamasyon evresinde aktif rol alan T lenfositlerin inhibisyonu, iyileşme üzerinde olumsuz etki meydana getirir (140, 141). Bu etkiler solid organ transplantasyonundan hemen sonra ameliyat sonrası dönemde mTOR inhibitörlerinin kullanımını sınırlar ve aynı zamanda cerrahları elektif cerrahiden önce immünoşüpresif ilaçları mTOR inhibitörlerinden, başka bir mTOR inhibitör içermeyen rejime geçmeye

zorlarlar. Son zamanlarda, everolimus'un bağırsak yara iyileşmesi üzerine negatif etkilerinin, yara iyileştirme kaskadının inflamatuvar fazının uzaması ile karakterize edildiği gösterilmiştir (142). Bu uzatma, yara iyileştirme kaskadının proliferasyon fazının gecikmiş bir şekilde başlatılmasına ve dolayısıyla anastomozların mekanik stabilitesinin azalmasına neden olmaktadır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Gerçekleştirmiş olduğumuz deneysel çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'nda değerlendirildi ve DA 17/04 proje numarası ile onaylandı. Deneysel hayvanı olarak kullanılan sıçanlar Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deneysel çalışmalar Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Ünitesi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu çalışmada everolimus ile immunsuprese edilmiş sıçanlarda yapılan kolon anastomozunda, anastomozun subserozal olarak enjekte edilen kök hücrenin, anastomoz üzerine etkileri araştırıldı.

Çalışmada ağırlığı 460-315 gram (ortalama 368 gram) olan 60 adet erkek Sprague Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Her ana grupta 14 adet sıçan olacak şekilde 4 ana grup oluşturuldu ve her ana grup iki eşit alt gruba ayrıldı. Kalan 4 sıçan ise kök hücre temini için kullanıldı.

Grup 1A (Kontrol grubu-1, n=7): İnen kolon tam kat kesildikten sonra 7/0 prolene ile tek sıra devamlı dikişle anastomoz edildi. 4. gün sonunda patlama basıncı ölçüldü. Daha sonra örnekler anastomozu içerecek şekilde longitudinal olarak ikiye bölünerek bir kısmı -86°C'de muhafaza edilip Tıbbi Biyokimya A.D. tarafından doku hidroksiprolin tayini yapıldı. Diğer kısmı ise Patoloji A.D. tarafından hematoksil-eozin ve trikrom ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.

Grup 1B (Kontrol grubu-2, n=7): İnen kolon tam kat kesildikten sonra 7/0 prolene ile tek sıra devamlı dikişle anastomoz edildi. 7. gün sonunda patlama basıncı ölçüldü. Daha sonra örnekler anastomozu içerecek şekilde longitudinal olarak ikiye bölünerek bir kısmı -86°C'de muhafaza edilip Tıbbi Biyokimya A.D. tarafından doku hidroksiprolin tayini yapıldı. Diğer kısmı ise Patoloji A.D. tarafından hematoksil-eozin ve trikrom ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.

Grup 2A (İmmunsuprese edilmeden yapılan kolon anastomozuna kök hücre enjeksiyonu yapılan grup-1, n=7): İnen kolon tam kat kesildikten sonra 7/0 prolene ile tek sıra devamlı dikişle anastomoz edildi. Anastomoz sonrası subserozal olarak anastomozun distal ve proksimal kesimine eşit şekilde, toplamda 0,2 ml subserozal olarak ADKHH enjeksiyonu yapıldı. 4. gün sonunda patlama basıncı ölçüldü. Daha sonra örnekler anastomozu içerecek şekilde longitudinal olarak ikiye bölünerek bir kısmı -86°C'de muhafaza edilip Tıbbi Biyokimya A.D. tarafından doku hidroksiprolin tayini yapıldı. Diğer kısmı ise Patoloji A.D. tarafından hematoksil-eozin, trikrom ve sadece hematoksil ile

boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi. Sadece hematoksilen ile boyanan örneklerde ise floresan mikroskop altında kök hücre değerlendirilmesi yapıldı.

Grup 2B (immunsuprese edilmeden yapılan kolon anastomozuna kök hücre enjeksiyonu yapılan grup-2, n=7): İnen kolon tam kat kesildikten sonra 7/0 prolene ile tek sıra devamlı dikişle anastomoz edildi. Anastomoz sonrası subserozal olarak anastomozun distal ve proksimal kesimine eşit şekilde, toplamda 0,2 ml subserozal olarak ADKKH enjeksiyonu yapıldı. 7. gün sonunda patlama basıncı ölçüldü. Daha sonra örnekler anastomozu içerecek şekilde longitudinal olarak ikiye bölünerek bir kısmı -86°C'de muhafaza edilip Tıbbi Biyokimya A.D. tarafından doku hidroksiprolin tayini yapıldı. Diğer kısmı ise Patoloji A.D. tarafından hematoksilen-eozin, trikrom ve sadece hematoksilen ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi. Sadece hematoksilen ile boyanan örneklerde ise floresan mikroskop altında kök hücre değerlendirilmesi yapıldı.

Grup 3A (immunsuprese edildikten sonra kolon anastomozu yapılan grup-1 , n=7): Cerrahi işlemden 7 gün önce sıçanlara oral gavaj yoluyla 2,5mgr/kg/gün everolimus (Certican® 0,25mgr suda çözünür tablet, Novartis Inc.) verilerek immunsupresyona başlandı ve sakrifikasyon gününe kadar devam edildi. 7. gün sonunda inen kolon tam kat kesildikten sonra 7/0 prolene ile tek sıra devamlı dikişle anastomoz edildi. 4. gün sonunda patlama basıncı ölçüldü. Daha sonra örnekler anastomozu içerecek şekilde longitudinal olarak ikiye bölünerek bir kısmı -86°C'de muhafaza edilip Tıbbi Biyokimya A.D. tarafından doku hidroksiprolin tayini yapıldı. Diğer kısmı ise Patoloji A.D. tarafından hematoksilen-eozin ve trikrom ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.

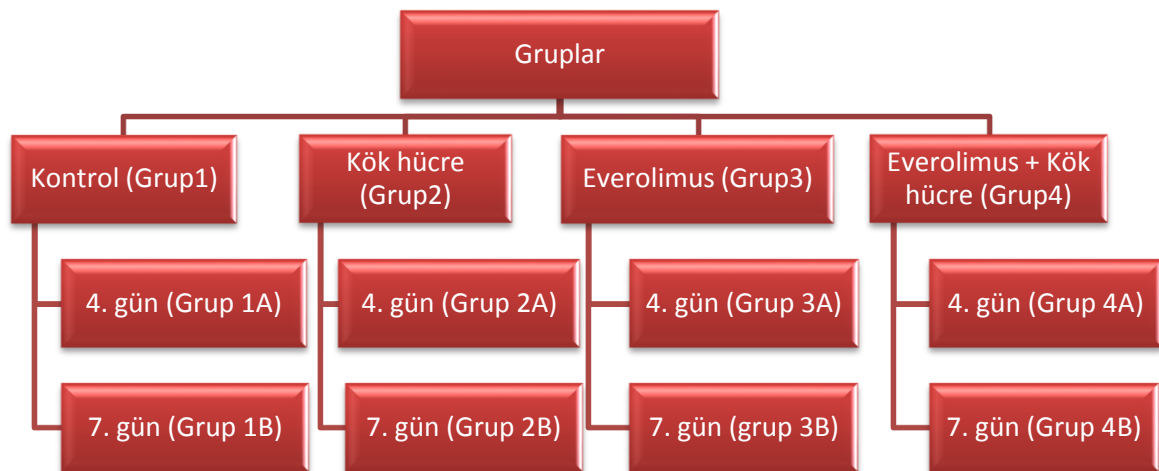
Grup 3B (immunsuprese edildikten sonra kolon anastomozu yapılan grup-2, n=7): Cerrahi işlemden 7 gün önce sıçanlara oral gavaj yoluyla 2,5mgr/kg/gün everolimus verilerek immunsupresyona başlandı ve sakrifikasyon gününe kadar devam edildi. 7. gün sonunda inen kolon tam kat kesildikten sonra 7/0 prolene ile tek sıra devamlı dikişle anastomoz edildi. 7. gün sonunda patlama basıncı ölçüldü. Daha sonra örnekler anastomozu içerecek şekilde longitudinal olarak ikiye bölünerek bir kısmı -86°C'de muhafaza edilip Tıbbi Biyokimya A.D. tarafından doku hidroksiprolin tayini yapıldı. Diğer kısmı ise Patoloji A.D. tarafından hematoksilen-eozin ve trikrom ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.

Grup 4A (immunsuprese edildikten sonra yapılan kolon anastomozuna kök hücre enjeksiyonu yapılan grup-1 , n=7): Cerrahi işlemden 7 gün önce sıçanlara oral gavaj yoluyla 2,5mgr/kg/gün everolimus verilerek immunsupresyona başlandı ve sakrifikasyon gününe kadar devam edildi. İnen kolon tam kat kesildikten sonra 7/0 prolene ile tek sıra

devamlı dikişle anastomoz edildi. Anastomoz sonrası subserozal olarak anastomozun distal ve proksimal kesimine eşit şekilde, toplamda 0,2 ml subserozal olarak ADKHH enjeksiyonu yapıldı. 4. gün sonunda patlama basıncı ölçüldü. Daha sonra örnekler anastomozu içerecek şekilde longitudinal olarak ikiye bölünerek bir kısmı -86°C’de muhafaza edilip Tıbbi Biyokimya A.D. tarafından doku hidroksiprolin tayini yapıldı. Diğer kısmı ise Patoloji A.D. tarafından hematoksil-eozin, trikrom ve sadece hematoksil ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi. Sadece hematoksil ile boyanan örneklerde ise floresan mikroskop altında kök hücre değerlendirilmesi yapıldı.

Grup 4B (immüsuprese edildikten sonra yapılan kolon anastomozuna kök hücre enjeksiyonu yapılan grup-1 , n=7): Cerrahi işlemden 7 gün önce sıçanlara oral gavaj yoluyla 2,5mgr/kg/gün everolimus verilerek immüsupresyona başlandı ve sakrifikasyon gününe kadar devam edildi. İnen kolon tam kat kesildikten sonra 7/0 prolene ile tek sıra devamlı dikişle anastomoz edildi. Anastomoz sonrası subserozal olarak anastomozun distal ve proksimal kesimine eşit şekilde, toplamda 0,2 ml subserozal olarak ADKHH enjeksiyonu yapıldı. 7. gün sonunda patlama basıncı ölçüldü. Daha sonra örnekler anastomozu içerecek şekilde longitudinal olarak ikiye bölünerek bir kısmı -86°C’de muhafaza edilip Tıbbi Biyokimya A.D. tarafından doku hidroksiprolin tayini yapıldı. Diğer kısmı ise Patoloji A.D. tarafından hematoksil-eozin, trikrom ve sadece hematoksil ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi. Sadece hematoksil ile boyanan örneklerde ise floresan mikroskop altında kök hücre değerlendirilmesi yapıldı. (Tablo 3.1)

Tablo 3.1. Sıçanların gruplandırılması



ADKKH eldesi amaçlı 4 adet sıçan kullanıldı. Sıçanların inguinal bölgelerinden eksize edilen adipoz dokular uygun işlemlerden geçirilerek MKH izolasyonu ve hazırlanması tamamlandı. Çalışma grubundaki sıçanların bir kısmına, hazırlanan kök hücreler uygulandı. Adipoz doku eldesi sonrası bu amaçla kullanılan 4 sıçan 150 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer inc) intraperitoneal verilmesi ile sakrifiye edildi.

Diİ ile işaretli ADKKH'lerin endotelial hücrelere dönüşümünü göstermek için floresan mikroskopta inceleme yapıldı.

Denek sayıları ve çalışma süresi belirlenirken literatürde daha önce kolon anastomozu üzerine yapılan çalışmalar örnek alındı (17, 138). Denek sayısı, Başkent Üniversitesi Biyoistatistik A.D. tarafından yapılan power analiz sonucunda %95 güvenilirlik sağlanacak şekilde belirlendi. Çalışma süresi belirlenirken, literatürde daha önce yapılan çalışmalar örnek alındı. Yapılan ön analizlerin sonucunda da her ana grup ondört denekten oluşturulmuştur ve çalışma süresi 4. ve 7. günler olarak ikiye ayrılmıştır (17).

3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı

Tüm deney hayvanlarına, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde standart oda şartları sağlandı. Hayvanlar bir hafta önceden araştırma merkezine getirilerek adaptasyonları sağlandı. Oda ısısı 18-20 °C arasında sabitlendi. Sıçanlar yem ve musluk suyu ile beslendi. Hipotermi oluşmasını engellemek için sıçanlar ışık kaynağı altında ameliyat edildi ve uyanma esnasında da bu uygulamaya devam edildi.

Çalışma süresi toplam 14 gün ve toplam 60 sıçanla çalışıldığından, hayvanların barındırıldığı kafeslerin üzerine hangi grup olduğu yazılmasına rağmen, grupların birbirine karışmaması için her gruptaki deneklerin kuyruklarına farklı renklerde numaralar verilerek işaretlenmiştir. İmmüsuprese edilecek gruplar belirlendikten sonra, cerrahi işlemde 7 gün önce oral gavaj yoluyla immüsupresyona başlanmış ve immüsupresyon sakrifikasyona kadar devam ettirilmiştir. Tüm hayvanlara cerrahi sonrası dönemde cilt altı 0.02 mg/kg fentanil (Sufenta® 5 mcg, Janssen Cilag Inc. Turkey) ile analjezi uygulandı. Çalışma sonunda tüm sıçanlar, periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür enjekte edilerek sakrifiye edildi.

3.2. Deney Hayvanlarının İmmüsupresyonu

İmmüsuprese edilecek gruptaki sıçanlara cerrahi işlemde 7 gün öncesinden başlamak üzere, sakrifikasyona kadar günde bir kez, tek seferde oral gavaj yoluyla

2,5mgr/kg/gün everolimus (Certican 0,25mgr suda çözünür tablet, Novartis Inc.) verildi. Ratlarda immunsupresyona cerrahi işlemden 7 gün önce başlarken, doz ve zaman hesaplamasını daha önce bu konuda yapılan çalışmaları ve everolimusun ratlardaki farmakokinetiğini inceledik (143-146). Çalışma için özellikle suda çözünür tablet tercih edildi ve musluk suyu içinde homojen bir çözelti oluşturulmasını takiben hayvanlara oral gavaj yoluyla verildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sıçanlara oral gavaj yoluyla everolimus verilmesi

3.3. Cerrahi İşlem

Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer inc), 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer inc) uygulanarak anestezi verildi. Anestezi derinliği ekstremite çekme yanıtı ile değerlendirildi. Hayvanlar uyuduktan sonra ameliyat alanları elektrikli tıraş makinesi ile temizlendi ve cerrahi masaya sırtüstü gelecek şekilde dört ekstremiteden flaster ile tespit edildi. Ameliyat alanı %10 povidon-iodin (Batticon® antiseptik solüsyon, Adeka Ltd. Türkiye) ile temizlendi ve cerrahi boyunca sterilite koşulları sağlandı (Şekil 3.2). Cerrahi işlemlerin tümü aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Ameliyat bölgesinin traşlanmış ve steril edilmiş hali

Tüm gruplarda sıçanlara anestezi verilmesini takiben, ksifoidin 1 cm altı ile pubisin 1 cm üzeri olacak şekilde insizyonla cilt-cilt altı ve fasya geçilip laparotomi yapıldı. İnen kolon dışarı alındı ve tam kat transekte edildi. Daha sonra 1 adet 7/0 prolon devamlı dikişle uç uca tek sıra kolon anastomozu yapıldı. İşlem sonrası sıçanların fasyaları 3/0 vicryl ile ve ciltleri 3/0 ipek dikişlerle devamlı olarak kapatıldı.

Kontrol grubunda anastomoz yapıldıktan sonra fasya ve cilt kapatıldı. İmmüsuprese edilen gruplarda laparotomiden yedi gün önce oral gavaj yoluyla, her gün tek seferde 2.5mg/kg uygulandı (147). Yedinci günün sonunda ise laparotomi yapılarak bir grupta sadece anastomoz yapılırken, diğer grupta anastomoz sonrası, anastomoz bölgesinin distal ve proksimaline 0,1 ml subserozal ADKH enjeksiyonu yapıldı. Sadece kök hücre enjeksiyonu yapılan grupta ise laparotomi sonrası anastomozu takiben yine aynı şekilde subserozal kök hücre enjeksiyonu yapılarak fasya ve cilt kapatılarak ameliyat sonlandırıldı.

Her dört ana gruptaki sıçanlar eşit sayıda iki alt gruba ayrıldı. Alt gruplardan bir tanesi ameliyat sonrası dördüncü günde, diğeri ise ameliyat sonrası 7. günde periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür enjekte edilerek sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası laparotomi yapılarak anastomoz edilmiş inen kolon bulundu. Karın içi yapışıklıklar değerlendirildi. Karın içi yapışıklıkların değerlendirilmesinde Houston ve ark. (148) kullandığının değerlendirme yöntemi kullanıldı ve hafif dereceli yapışıklık (Şekil 3.3), orta

dereceli yapışıklık (Şekil 3.4) ve ileri dereceli yapışıklık (Şekil 3.5) olarak üç gruba ayrıldı. (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Laparotomi sonrası yapışıklık derecelendirilmesi

1	Hafif dereceli yapışıklık (Omentum ile anastomoz arasındaki yapışıklığı ifade eder)
2	Orta dereceli yapışıklık (Omentum ile anastomoz arasındaki ya da ince barsağın bir segmenti ile anastomoz arasındaki ya da anastomoz ile karın duvarı arasındaki yapışıklığı ifade eder)
3	İleri dereceli yapışıklık (İnce barsağın birden fazla segmenti ile anastomoz arasındaki yapışıklığı ya da ince barsak, omentum, karın duvarı ve anastomoz birlikteliği olan yapışıklığı ifade eder.)



Şekil 3.3. Hafif dereceli yapışıklık (pamuklu çubuk anastomoz bölgesini işaret etmekte)



Şekil 3.4. Orta dereceli yapışıklık (pamuklu çubuk anastomoz bölgesini işaret etmekte)



Şekil 3.5. İleri dereceli yapışıklık (pamuklu çubuk anastomoz bölgesini işaret etmekte)

Anastomozun 3 cm proksimali ile 3 cm distali rezeke edilerek patlama basıncı ölçüldü. Basıncı ölçümü sonrası örnekler longitudinal olarak bistüri yardımı ile iki eşit parçaya ayrıldı. Parçalardan bir tanesi biyokimyasal değerlendirme için, diğeri ise patolojik değerlendirme için uygun koşullarda muhafaza edildi. (Şekil 3.6)



Şekil 3.6. Rezeke edilen, anastomoz bölgesini içeren kolon segmentinin patlama basıncı ölçümü sonrası patolojik ve biyokimyasal değerlendirme amacı ile longitudinal olarak iki eşit parçaya bölünmüş görünümü. (Anastomoz hattı ok ile işaretlenmiştir.)

3.4. Adipoz Doku Temini

Adipoz doku temini için ayrılan sıçanlara anestezi verilmesini takiben abdominal ve inguinal bölgeleri anestezi sonrası tıraş edildi ve sırtüstü pozisyonda cerrahi masaya tespitleri yapıldı. İnsizyon ksifoidin yaklaşık 1 cm altından başlatıldı ve karın orta hat boyunca vertikal ekseninde devam edildi. Median insizyonun tamamlanmasını takiben,

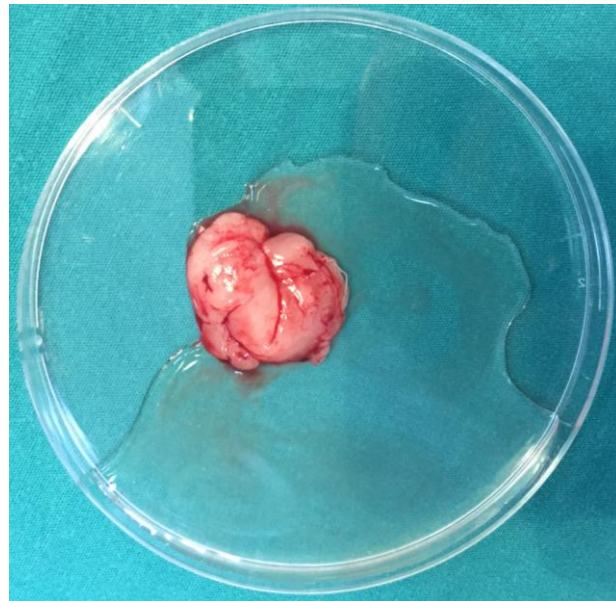
pubisin yaklaşık 1 cm süperior seviyesinde, insizyon bilateral inguinal bölgelere doğru uzatıldı.

İnsizyonların tamamlanması ardından cilt flepleri cilt altı planda yapılan disseksiyonla kaldırıldı. İnguinal bölgelerdeki yağ yastıkçıkları ortaya kondu

İnguinal yağ yastıkçıkları çıkarıldı (Şekil 3.7). 4 sıçandan yaklaşık 20 cc kadar yağ doku elde edildi. Eksize edilen yağ dokular, serum fizyolojik ile yıkanarak steril kaplara alındı. (Şekil 3.8)



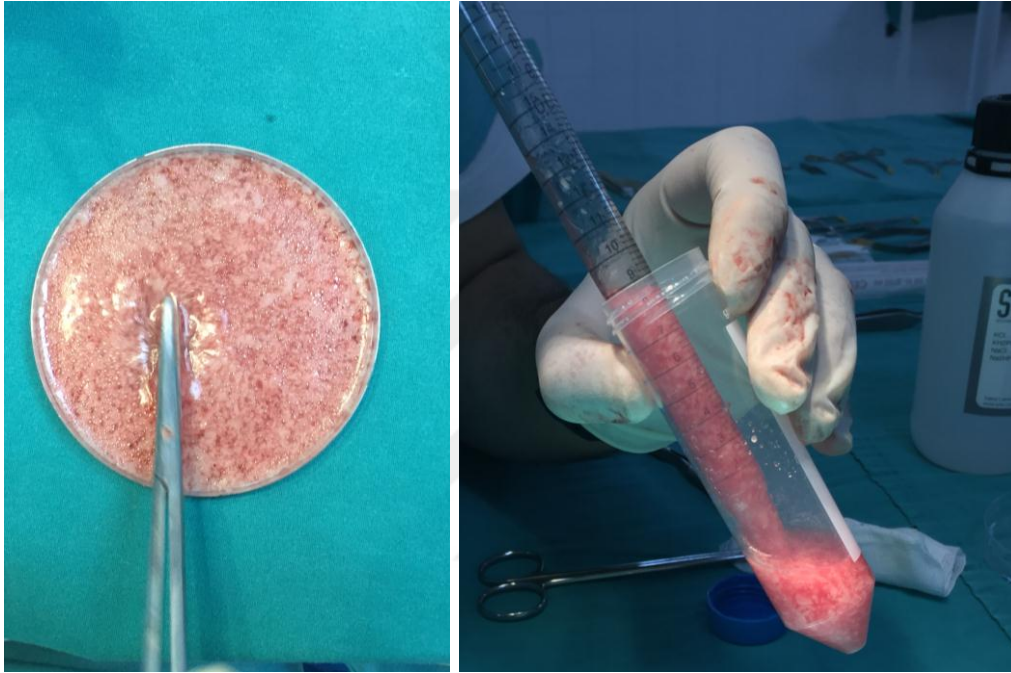
Şekil 3.7. İnguinal yağ yastıkçığı eksizyonu



Şekil 3.8. Serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra steril kaba alınmış yağ dokusu

3.5. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrenin Hazırlanması

Mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, hazırlanması ve işaretlenmesi işlemleri Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı'nda tarafımızca yapıldı. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre elde edilmesinde Ogawa ve ark.'nın yayınlamış oldukları protokol uygulandı (149). Alınan adipoz doku PBS ile yıkandı. Yıkama ardından yağ dokusu içindeki vasküler yapılar mikropenset ve mikromakas yardımıyla temizlendi. Tüm yağ dokusu küçük parçalara ayrılacak şekilde kesildi (Şekil 3.9).



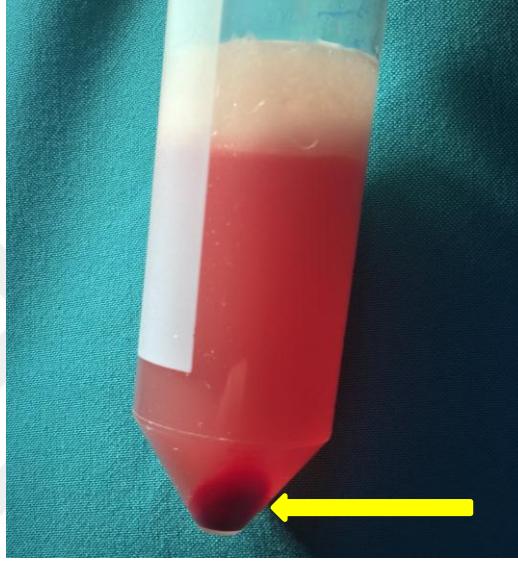
Şekil 3.9. Petri kabında doku makasıyla parçalama işlemi ve pipetle transferi

Yıkama işlemini takiben dokular 50 cc'lik konik santrifüj tüplerine alındı. %0,15 oranında kollajenaz tip I eklendi ve yaklaşık 30 dk vortekste (Biyosan vorteks V-1 Plus) karıştırıldı. Kollajenazın nötralizasyonu için %10 PBS'den oluşan kontrol medium eklendi ve tekrar vortekste karıştırıldı.

Takiben hücre süspansiyonlarını içeren tüpler 260 G'de 5 dakika santrifüj edildi (Şekil 3.10). Santrifüj sonunda tüm tüplerin üst kısmında kalan yağ ve dokular sıvılar ile birlikte uzaklaştırıldı. Santrifüj sonunda tüp dibinde toplanmış hücreden zengin stromal vasküler fraksiyon (SVF) mikropipetle toplandı (Şekil 3.11).

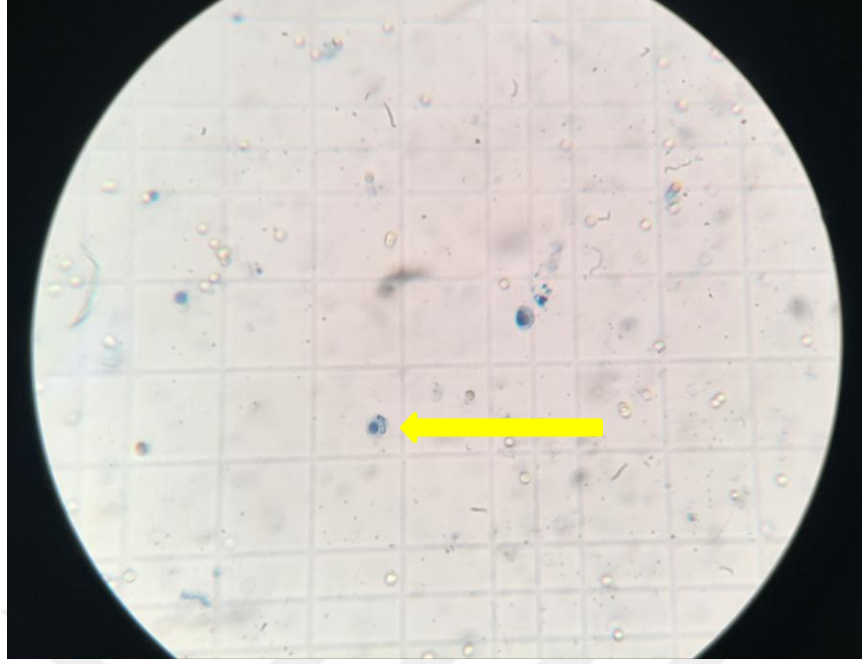


Şekil 3.10. Santrifüj işlemi.



Şekil 3.11. Santrifüj sonrasında tüp üzerindeki serum ve tüp dibindeki SVF'nin görünümü. (SVF ok ile gösterilmiştir.)

Toplanan SVF'ye PBS eklenerek 10cc'ye tamamlandı. Hücre sayımı için mikropipet kullanılarak 0,1 ml alındı metilen mavisiyle boyandı ve Thoma lamı üzerinde yaklaşık 5 hücre sayıldı ve sayılan hücreler 10^7 ile çarpılarak hazırlanan kök hücre sayısı hesaplandı (Şekil 3.12).



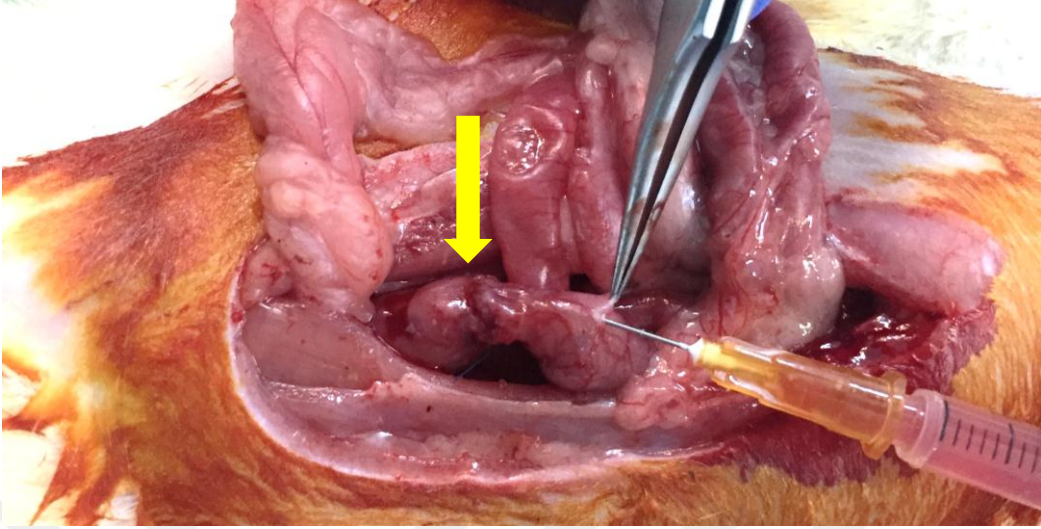
Şekil 3.12. Thoma lamında görülmekte olan büyük nükleuslu büyük sitoplazmalı kök hücreler (Ok ile işaretlenmiştir.)

Hücre sayımını takiben 10 cc'lik hücre süspansiyonu 260 G'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün alt kısmında birikmiş olan kök hücrelerden zengin kısım tüplere alındı.

Kök hücre işaretlemesi için sitoplazmik boya olan 1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI) kullanıldı. DiI %99'luk etanol çözeltisinde çözülerek %25'lik konsantrasyonda solüsyon hazırlandı. Kullanılmadan önce PBS ile 1/100 oranında dilüe edildi. DiI soğuk ortamda sitoplazmaya bağlandığı ve in vivo koşullarda bırakmadığı bilindiği için hazırlanan tüpler buzlu suda bekletildi ve 20 dakika bekleme ardından 200 µl Di eklenecek beklemeye alındı.

İnkübasyon periyodunun sonrasında, DiI sitoplazma bağlantısının fiksasyonu için 7 ml PBS konuldu ve karıştırıldı. Hücre DiI fiksasyonu sağlandıktan sonra bu süspansiyon 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmında kalan süpernatant atıldı, alttaki $2,4 \times 10^7$ adet DiI işaretli kök hücrelerin olduğu pelletin üzerine 5 ml PBS (%1 penisilin/streptomisin içeren) eklendi, karıştırıldı ve tekrar süspansiyon haline getirildi. Elde edilen süspansiyon TZF'e homojenik olarak karıştırıldı. Toplam 28 sıçana verileceğinden 1 sıçana uygulanacak ortalama miktar 8×10^5 hücre olarak belirlendi. Süspansiyon 1cc'lik enjektörlere çekildi. Kök hücre enjeksiyonu yapılması planlanan gruplardaki her anastomozun proksimal ve distaline PPD enjektörü ile 0,1 ml olacak şekilde

tolamda 0,2 ml. subserozal enjeksiyon yapıldı (0,1 mlde 4×10^5 kök hücre mevcut) (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Anastomoz bölgesine subserozal ADKKH enjeksiyonu yapılması (Anastomoz hattı ok ile gösterilmekte)

3.6. Anastomoz Patlama Basıncı Ölçümü

Deney hayvanları, ameliyat sonrası gruplarına uygun günlerde sakrifiye edildikten sonra, laparotomi yapılarak, daha önceden yapılmış olan kolon anastomozunun 3 cm distali, 3 cm proksimali, anastomoz hattını içine alacak şekilde rezeke edildi. Mevcut fekal içerik serum fizyolojik ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra bir ucu infüzyon pompasına bir ucu da monitörün arter yoluna olmak üzere kolon 3/0 ipek dikişlerle bağlandı. İnfüzyon pompasıyla 1,6 ml/dk serum fizyolojik verilerek kolon segmenti şişirildi. (Şekil 3.14) Bu sırada monitörden sistemin basınç takip edildi. Monitörde basıncın çıktığı en yüksek değer tespit edildi ve anastomoz patlama basıncı olarak kaydedildi (2). Ölçümler esnasında Siemens SC 7000 monitor ve JMS BP-100 infüzyon pompası (Şekil 3.15) kullanıldı.



Şekil 3.14. Anastomoz patlama basıncı ölçümü



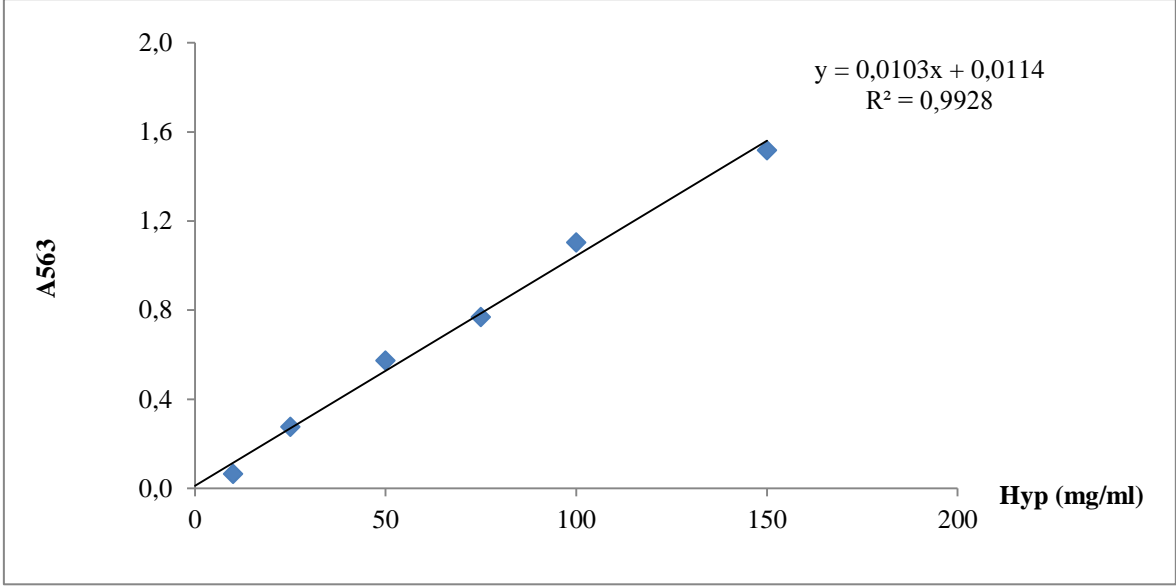
Şekil 3.15.Siemens SC 7000 monitor ve JMS BP-100 infüzyon pompası

3.7. Doku Hidroksiprolin Düzeyi Analizi

Doku örneklerinde hidroksiprolin (Hyp) derişimlerinin saptanması Reddy ve Enwemeka'nın yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (150). Yöntem, serbest Hyp'nin kloramin-T ile oksidasyonu sonrası Ehrlich reaktifi ile oluşturduğu renkli bileşimin spektrofotometrik olarak analizi esasına dayanmaktadır.

Çalışmada doku örnekleri analize kadar $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Örnekler, salin ile $0.2\text{ g}/0.5\text{ ml}$ (w/v) olacak şekilde cam-cam homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenatlar ve standart Hyp çözeltileri alkali ortamda (2N NaOH) hidroliz edilmiştir. Nötralizasyon sonrası örneklerin kloramin-T ile oksidasyonu sağlanmış ve Ehrlich reaktifi ile oluşturdukları renkli bileşimin absorbanansı 563 nm 'de reaktif körüne karşı spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür (Shimadzu UV-1601).

Hidroksiprolin derişimleri standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.16). Her örnek çift olarak çalışmaya alınmış ve derişimler ve $\mu\text{g/g}$ doku olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.16. Hidroksiprolin standart eğrisi

3.8. Patolojik Değerlendirme

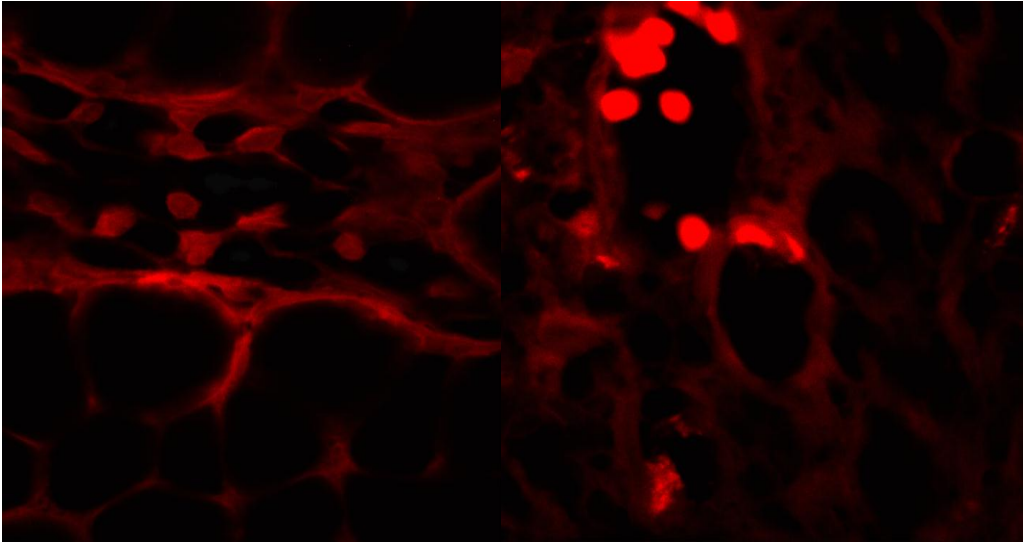
Perianastomotik kolon segmentleri patolojik tarafından gruplar bilinmeksizin, tek kör olacak şekilde hazırlandı. Parafin bloklar halinde hazırlanan doku örnekleri Hematoksilin-Eosin ile boyanarak ışık mikroskobu (Olympus CX 41, Ankara, Türkiye) altında bir patolojik tarafından anastomozdaki mukozal reepitelizasyon, fibrozis, iskemik nekroz, muskuler tabakada bozulma, vasküler proliferasyon ve inflamasyon incelendi.

Histopatolojik değerlendirmede reepitelizasyon olması ve olmaması değerlendirildi. Fibrozis değerlendirilmesinde, fibrozisin olmaması ve fokal ya da diffüz fibrozis gelişmesine bakıldı. Anastomoz hattında iskemik nekroz varlığı ve yokluğu değerlendirildi. Muskuler tabakanın iyileşmesinde bozulma olmaması ve fokal ya da diffüz bozulmaya bakıldı. Vasküler proliferasyon ve inflamasyonun hafif, orta ya da şiddetli olması değerlendirildi.

3.9. İşaretli Kök Hücrelerin Tespiti

Bu değerlendirme sadece DiI işaretli kök hücre çalışma grubu için yapıldı. Parafine gömülü dokulardan 5 µm kalınlıkta uygun kesitler hazırlanarak sadece hematoksilin ile boyandı. Bunun sebebi floresan mikroskopta, eosin boyasındaki kırmızı renk ile DiI işaretli hücrelerdeki kırmızı, mor rengin görüntü açısından karışıklık yaratmasıdır (151). Takip eden kesitlerde hematoksilin-eozin boyamaları da yapıldı. Dolayısıyla immüno floresan mikroskopta hematoksilin boyalı kesitlerde bakılan endotelial hücreler, takip eden

hematoksilin-eozin boyalı kesitlerde teyit edildi. Bu endotelial hücrelerden mezenkimal kök hücre kaynaklı olanların (DiI ile işaretli olanlar) 565 nm dalga boyundaki floresan mikroskopta kırmızı-mor renkte gözükmesi beklenir. Preperatlar tarafımızca Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal incelemeler için Nikon Eclipse E600 floresan mikroskop kullanıldı. Preperatlar 20x, 40x, 60x ve 100x büyütmelemlerde incelendi. Görüntüler, renkli dijital video kamera (Nikon CCD) ile bilgisayar ortamına aktarıldı ve bilgisayar programı olarak Cytovision Genus Software kullanıldı. Çalışmamızda da kök hücrenin hem endotelial hücreye dönüşümü hem de villus komşuluğunda kök hücre varlığı gösterildi. (Şekil 3.17)



Şekil 3.17. Villus komşuluğunda ve endotelde kök hücre (Parlak kırmızı görünümdeki hücreler kök hücreleri temsil etmekte)

3.10. İstatiksel Yöntem

İşlem grubu (4 düzeyli), sakrifiye günü (2 düzeyli) olmak üzere iki faktörden etkilendiği düşünülen bağımlı sürekli sayısal değişkenlerin analizinde parametrik test varsayımlarından normallik varsayımının test edilmesi için Shapiro-Wilk normallik testi; grup varyanslarının homojenliği varsayımının test edilmesi için Levene testi kullanılmıştır.

Parametrik test kullanılan durumlarda sayısal bağımlı değişkene ilişkin ortalama±standart sapma; parametrik olmayan test kullanılan durumlarda ise medyan (minimum-maksimum) uygun tanıtıcı istatistik olarak verilmiştir. Parametrik test varsayımlarının sağlandığı durumda “İki Yönlü Varyans Analizi”, sayısal bağımlı değişkenin işlem türünden ve sakrifiye gününden etkilenip etkilenmediğini eşzamanlı incelemek amacıyla %95 güven düzeyinde uygulanmıştır. Ancak, parametrik test varsayımlarının sağlanmadığı durumda I. Tip hata olasılığı üzerinde Bonferroni düzeltmesi

($\alpha^*=0,0083$ –kullanılacak olan düzeltme yapılmış yeni anlamlılık düzeyi) yapılarak sakrifiye günü düzeylerinde işlem türlerinin karşılaştırılması için parametrik test varsayımları sağlandığında “Tek Yönlü Varyans Analizi”, sağlanmadığı durumda “Kruskal-Wallis Varyans Analizi”; işlem türü düzeylerinde sakrifiye günlerinin karşılaştırılması için parametrik test varsayımları sağlandığında “Student t test”, sağlanmadığı durumda “Mann-Whitney U testi” kullanılmıştır.

Kategorik verilerin incelenmesinde ise tanıtıcı istatistik olarak sayı ve yüzdeler verilirken sakrifiye günü ve işlem grubu ile ilgilenilen kategorik değişkenler arasındaki bağımlılık durumu 2×2 boyutlu tablolarda Fisher’in Kesin testi; daha yüksek boyutlu tablolarda ise Fisher-Freeman-Halton Kesin testi ile test edilmiştir. Tüm bağımlılık testleri için I. Tip hata olasılığı $\alpha=0,05$ olarak belirlenmiştir.

İstatistiksel değerlendirme için “SPSS v17.0 (Statistical Package for Social Sciences for Windows version 17.0, Chicago, IL, USA – September 2012 license number:1093910, Baskent University) istatistik paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerin tamamı Başkent Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Deney hayvanlarına immunsupresif tedavi başlanmasından, sakrifikasyonların yapıldığı 14 günlük süre içinde herhangi bir hayvan ölmedi ya da çalışma dışı bırakılmadı.

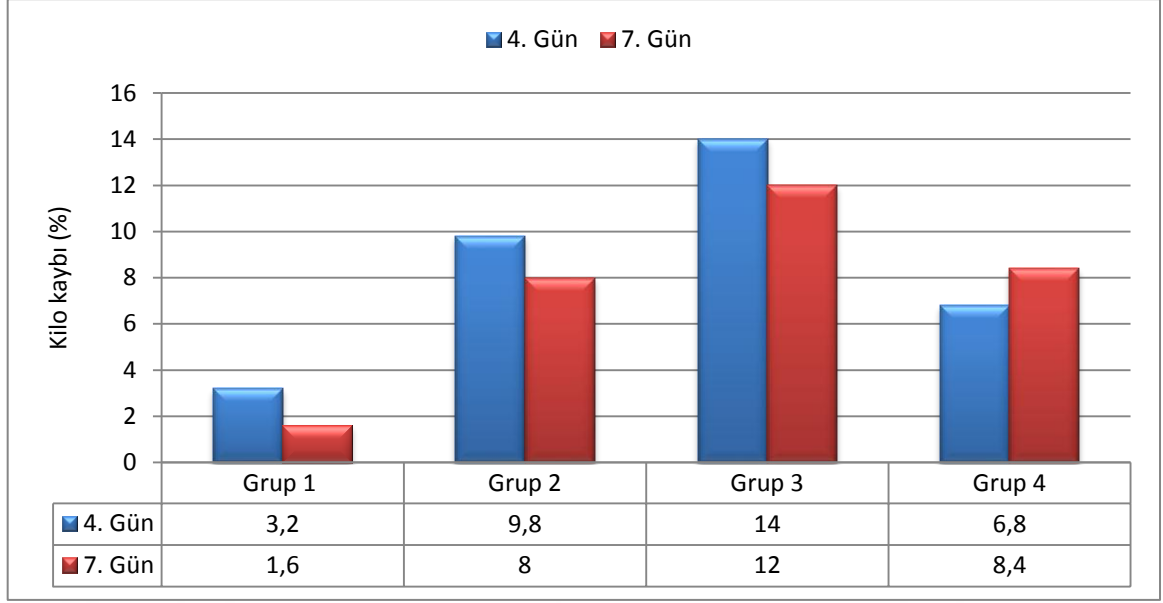
4.1. Kilo Kaybı

Dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanlar dikkate alındığında uygulama grupları arasında kilo kaybı dağılımı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık söz konusu değildir ($p>0.05$). Ancak, Grup 3'te ortalama kilo kaybı yaklaşık %13,5, Grup 1'de ise yaklaşık %5,4 olduğu görüldü (Tablo 4.1). Yedinci günde sakrifiye edilen hayvanlar dikkate alındığında uygulama grupları arasında kilo kaybı dağılımı açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık söz konusudur ($p=0,001$). Grup 3'te ortalama kilo kaybı %13,4 olarak gözlenirken Grup 1'de yaklaşık %1,3 olmuştur ve bu iki grup arasındaki kilo kaybı dağılımı açısından farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p=0,002$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanlarda kilo kaybı dağılımı açısından grupların karşılaştırılması. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Kilo kaybı (%)	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
	4. Gün	5,4	7,9	13,5	6,8
7. Gün	1,3	7,7	13,4	8,4	0,001

Hiçbir grupta dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanların ortalama kilo kaybı ile 7. günde sakrifiye edilen hayvanların ortalama kilo kaybı arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Grupların kilo kaybı (%) dağılımı açısından sakrifiye günlerinin karşılaştırılması (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)($p>0.05$)

4.2. Yapışıklık

Dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanlar dikkate alındığında, uygulanan işlem türü ile yapışıklık arasında istatistiksel olarak önemli bir bağımlılık durumu söz konusudur ($p=0,036$). Grup 2, 3 ve 4, Grup 1 ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında hafif dereceli yapışıklıklarda azalma gözlenirken, orta ve ileri dereceli yapışıklıkların arttığı görüldü. Ancak Grup 3 ile 4 karşılaştırıldığında yapışıklık skoru ve oranın kök hücre verilmesi ile Grup 4’de daha az olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak uygulanan işlem türü dördüncü günde sakrifiye edilen grupların yapışıklık durumunu etkilemektedir (Tablo 4.2).

7. günde sakrifiye edilen hayvanlar dikkate alındığında, uygulanan işlem türü ile yapışıklık arasında istatistiksel olarak önemli bir bağımlılık durumu yoktur ($p=0,349$) (Tablo 4.3). Bununla beraber everolimus uygulanan grup 3 ve 4 de ileri derece yapışıklık hiç gözlenmemiştir.

Tablo 4.2. Dördüncü günde sakrifiye edilen grupların yapışıklık derecelerinin dağılımı. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Grup	Yapışıklık (%)				p
	Hafif	Orta	İleri	Toplam	
1A	71,4	28,6	0,0	100	0,036
2A	57,1	14,3	28,6	100	
3A	0,0	85,7	14,3	100	
4A	57,1	28,6	14,3	100	

Tablo 4.3. Yedinci günde sakrifiye edilen grupların yapışıklık derecelerinin dağılımı. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Grup	Yapışıklık (%)				p
	Hafif	Orta	İleri	Toplam	
1B	71,4	14,3	14,3	100	0,349
2B	28,6	42,9	28,6	100	
3B	71,4	28,6	0,0	100	
4B	85,7	14,3	0,0	100	

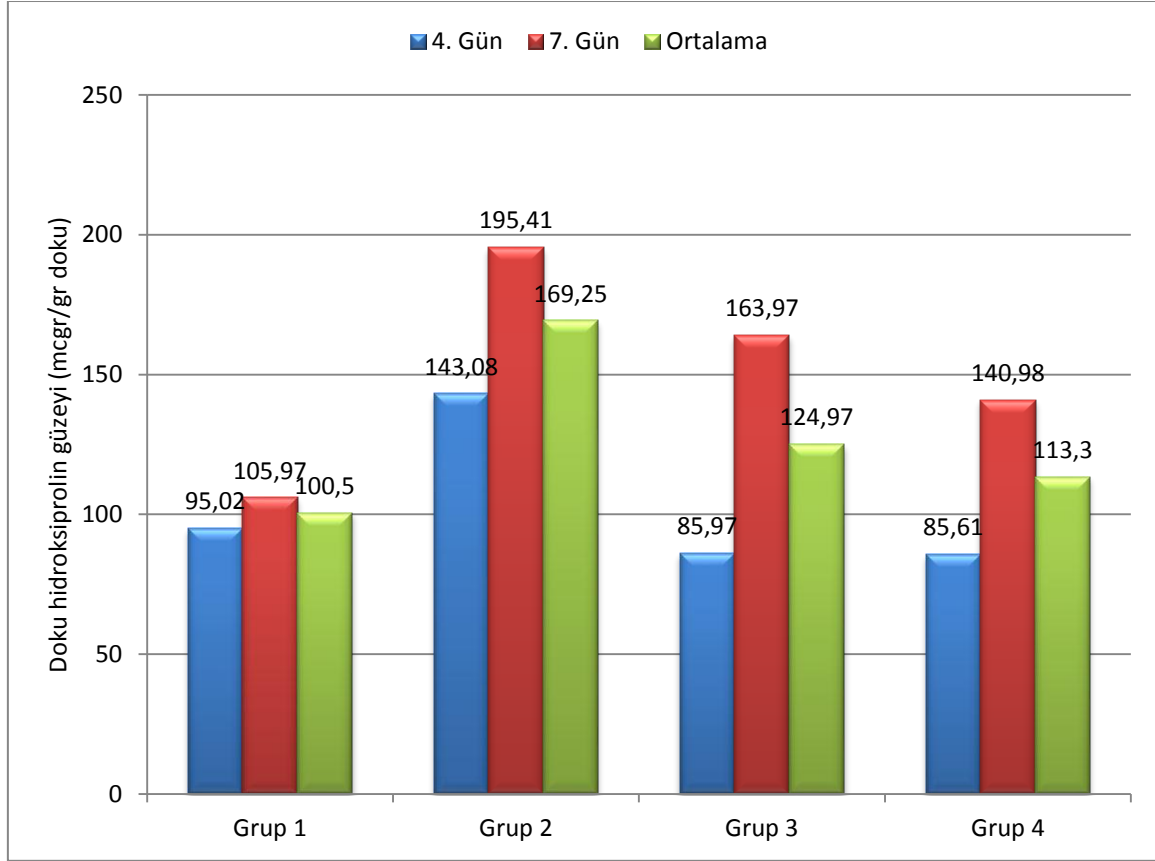
İşlem grupları (Grup 1, 2, 3, 4), kendi içinde sakrifikasyon günlerine göre karşılaştırıldığında, sadece Grup 3'te sakrifiye günü ile yapışıklık arasında istatistiksel olarak önemli bir bağımlılık durumu söz konusudur ($p=0,021$). Diğer gruplarda, sakrifiye günü ile yapışıklık arasında istatistiksel olarak önemli bir bağımlılık durumu yoktur (Tablo 4.4.)

Tablo 4.4. Grupların, sakrifikasyon günü ile yapışıklık arasındaki ilişkisi. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Yapışıklık Derecesi	Grup							
	1A (%)	1B (%)	2A (%)	2B (%)	3A (%)	3B (%)	4A (%)	4B (%)
Hafif	71	71	57	28	0	72	57	85
Orta	28	14	14	42	85	28	28	15
İleri	0	14	28	28	15	0	14	0
p	>0,05		0,790		0,021		0,559	

4.3. Doku Hidroksiprolin Düzeyi

Sakrifiye edilen günün hidroksiprolin düzeyine etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). 7. günde sakrifiye edilen hayvanlara ilişkin ortalamaların dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanlara göre daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.2), (Tablo 4.5).



Şekil 4.2. Hidroksiprolin düzeyinin, gruplar, işlem türü ve sakrifikasyon günü ile ilişkisi ($\mu\text{gr/gr doku}$). (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Gruplar arasında da hidroksiprolin düzeyi ortalamaları açısından farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$) (Tablo 4.5). İstatistiksel olarak anlamlı farklılığın Grup 1 ile Grup 2; Grup 2 ile Grup 3; Grup 2 ile Grup 4 arasında olduğu görüldü (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,014$, $p=0,001$).

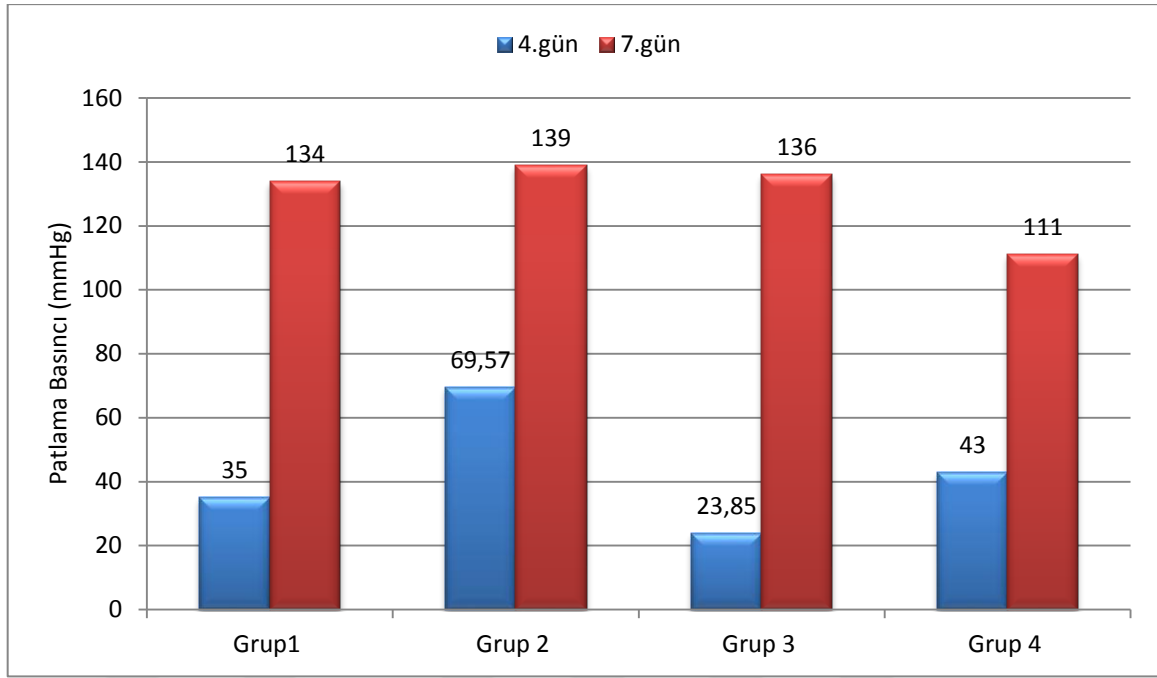
Tablo 4.5. Grupların, sakrifikasyon günü ile doku hidroksiprolin düzeyi arasındaki ilişkisi ($\mu\text{gr}/\text{gr}$ doku). (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
4. Gün	95,02	143,08	85,97	85,61	<0,001
7. Gün	105,97	195,41	163,97	140,98	
Ortalama	100,5	169,25	124,97	113,3	
p	<0,001				

4.4. Patlama Basıncı

Dördüncü günde sakrifiye edilen hayvan gruplarına ilişkin patlama basıncı ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$) (Tablo 4.6). Dördüncü günde sakrifiye edilen hayvanlar ele alındığında, Grup 1 ile Grup 2 ($p=0,002$) ve Grup 2 ile Grup 3 ($p<0,001$) arasında patlama basıncı ortalamaları açısından istatistiksel olarak önemli bir farklılık söz konusudur. Grup 2'nin, Grup 1 ve Grup 3'e göre patlama basıncı ortalaması daha yüksek bulundu (Şekil 4.3).

Yedinci günde sakrifiye edilen hayvanlarda, gruplara ilişkin patlama basıncı dağılımları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,074$). Tüm gruplar, aynı grup içerisinde 4. ve 7. gün sakrifiye edilen alt gruplar arasında patlama basıncı ortalaması açısından istatistiksel olarak değerlendirildi ve tüm gruplarda anlamlı farklılık tespit edildi (Tablo 4.6).



Şekil 4.3. Aynı grup içerisinde 4.ve 7. gün sakrifiye edilen alt gruplar arasında patlama basıncı ortalaması açısından istatistiksel değerlendirme. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Tablo 4.6. Grupların, sakrifikasyon günü ile patlama basıncı arasındaki ilişkisi (mm/Hg). (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	p
4. Gün	35	69,57	23,85	43	<0,001
7. Gün	134	139	136	111	0,074
p	0,001	<0,001	<0,001	0,001	

4.5. Patolojik Değerlendirme

Tüm gruplarda deney hayvan sayılarının, patolojik parametrelere göre dağılımı Tablo 4.7’de özetlenmiştir.

Reepitelizasyon, iskemik nekroz, fibrozis ve muskuler tabakada bozulma analiz sonuçları değerlendirildiğinde dördüncü gün sakrifiye edilen gruplar (Tablo 4.8) arasında ve yedinci gün sakrifiye edilen gruplar (Tablo 4.9) arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Ayrıca grupların kendi içinde sakrifikasyon günü ile reepitelizasyon, iskemik nekroz, fibrozis ve muskuler tabakada bozulma durumu arasındaki bağımlılık durumu istatistiksel açıdan anlamlı saptanmadı (Tablo 4.10).

Tablo 4.7. Gruplar ile patolojik parametreler arasındaki ilişki. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Parametre	Grup								
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Reepitelizasyon	Yok	3	3	2	0	3	4	1	1
	Var	4	4	5	7	4	3	6	6
Fibrozis	Fokal	7	5	6	5	6	3	6	3
	Diffüz	0	2	1	2	1	4	1	4
İskemik Nekroz	Yok	5	7	7	4	6	6	7	7
	Var	2	0	0	3	1	1	0	0
Muskuler Tabakada Bozulma	Fokal	3	5	6	5	2	2	4	1
	Diffüz	4	2	1	2	5	5	3	6
Vasküler Proliferasyon	Hafif	2	0	1	0	5	5	3	1
	Orta	5	3	6	1	2	2	4	1
	Şiddetli	0	4	0	6	0	0	0	5

Tablo 4.8. Dördüncü gün sakrifiye edilen gruplar ile patolojik parametreler arasındaki ilişki. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre).

Parametre	Grup					P
		1A	2A	3A	4A	
Reepitelizasyon	Yok	3	2	3	1	0,812
	Var	4	5	4	6	
Fibrozis	Fokal	7	6	6	6	>0,05
	Diffüz	0	1	1	1	
İskemik Nekroz	Yok	5	7	6	7	0,581
	Var	2	0	1	0	
Muskuler Tabakada Bozulma	Fokal	3	6	2	4	0,242
	Diffüz	4	1	5	3	
Vasküler Proliferasyon	Hafif	2	1	5	3	0,226
	Orta	5	6	2	4	
	Şiddetli	0	0	0	0	

Tablo 4.9. Yedinci gün sakrifiye edilen gruplar ile patolojik parametreler arasındaki ilişki. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Parametre	Grup				P	
		1B	2B	3B		4B
Reepitelizasyon	Yok	3	0	4	1	0,106
	Var	4	7	3	6	
Fibrozis	Fokal	5	5	3	3	0,596
	Diffüz	2	2	4	4	
İskemik Nekroz	Yok	7	4	6	7	0,150
	Var	0	3	1	0	
Muskuler Tabakada Bozulma	Fokal	5	5	2	1	0,092
	Diffüz	2	2	5	6	
Vasküler Proliferasyon	Hafif	0	0	5	1	0,003
	Orta	3	1	2	1	
	Şiddetli	4	6	0	5	

Tablo 4.10. Tüm gruplar ile patolojik parametreler arasındaki ilişkisi. (Grup 1: Kontrol, Grup 2: Kök hücre, Grup 3: Everolimus, Grup 4: Everolimus + Kök hücre)

Grup	Parametre										
	Reepitelizasyon		Fibrozis		İskemik Nekroz		Muskuler Tabakada Bozulma		Vasküler Proliferasyon		
	Yok	Var	Fokal	Diffüz	Yok	Var	Fokal	Diffüz	Hafif	Orta	Şiddetli
1A	3	4	7	0	5	2	3	4	2	5	0
1B	3	4	5	2	7	0	5	2	0	3	4
p	>0,05		0,462		0,462		0,592		>0,05		
2A	2	5	6	1	7	0	6	1	1	6	1
2B	0	7	5	2	4	3	5	2	0	1	6
p	0,462		>0,05		0,192		>0,05		0,005		
3A	3	4	6	1	6	1	2	5	5	2	0
3B	4	3	3	4	6	1	2	5	5	2	0
p	>0,05		0,266		>0,05		>0,05		>0,05		
4A	1	6	6	1	7	0	4	3	3	4	0
4B	1	6	3	4	7	0	1	6	1	1	5
p	>0,05		0,266		NS		0,266		0,038		

Vasküler proliferasyon analiz sonuçları değerlendirildiğinde. dördüncü gün sakrifiye edilen gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmazken ($p=0,226$), yedinci gün sakrifiye edilen gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı ($p=0,003$) (Tablo 4.9). ADKHH enjeksiyonu yapılan gruplarda şiddetli vasküler proliferasyonun daha fazla olduğu saptandı. Ayrıca yine ADKHH enjeksiyonu yapılan ikinci grup ($p=0,005$) ve dördüncü grupta ($p=0,038$). da kendi içinde sakrifikasyon günü ile vasküler proliferasyon durumu arasındaki bağımlılık durumu istatistiksel açıdan anlamlı saptandı ve yedinci günde şiddetli vasküler proliferasyon oranı daha fazla olduğu görüldü (Tablo 4.10).

5. TARTIŞMA

Gastrointestinal sistem ameliyatları, genel cerrahi ameliyatlarının önemli bir kısmını oluştururken, bu ameliyatlar sonrasında meydana gelebilecek anastomoz kaçakları gibi komplikasyonlar önemli oranda mortaliteye ve morbiditeye neden olabilmektedir (3). Anastomoz bölgesindeki yara iyileşme sürecine etki eden birçok faktör mevcuttur. mTOR inhibitörü olan everolimus, yara iyileşmesini hücre döngüsünü etkileyerek ve T lenfosit proliferasyonunu inhibe ederek olumsuz yönde etkiler (138). Gastrointestinal sistemdeki yara iyileşmesinin kalitesini ve anastomoz dayanıklılığını arttırmak için yapılan çalışmaların bir bölümünü kök hücre tedavisi oluşturur (17). Özellikle ADKHH'lerin kolay elde edilebilmesi ve birçok dokuya farklılaşabilmesi nedeni ile gastrointestinal sistemde yara iyileşmesi ile ilgili birçok çalışmada kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (17). KİKKH ve ADKHH'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada, damarlanmanın adipoz kökenli MKH grubunda anlamlı derece fazla olduğu görülmüş (109). Ayrıca adipoz dokunun kemik iliğine göre santimetre başına 100 ila 1000 kat daha fazla pluripotent hücre içerdiği ve en az kemik iliği kaynaklı kök hücreler kadar değişik hücrelere farklılaşabildikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (111, 112). Daha önce yapılan çalışmaların değerlendirilmesi neticesinde, çalışmamızda kemik iliği kaynaklı kök hücre kullanımı yerine adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kullanmayı tercih ettik.

Gastrointestinal sistem ameliyatlarından sonra, ameliyat veya ameliyat komplikasyonları neticesinde katabolik faz ortaya çıkmakta ve vücut kitlesinde ameliyata bağlı olarak kayıp görülmektedir (152, 153). Çalışmamızda bütün gruplarda ameliyat öncesi durumlarına göre 4.ve 7. günde kilo kaybı olduğunu gözlemledik. Fakat dördüncü gündeki bu kayıp istatistiksel olarak anlamlı değilken, everolimus ile immunsuprese edilen Grup 3'teki sıçanların, diğer gruplara göre daha fazla kilo kaybettiği görüldü. Yedinci günde ise bu kayıp istatistiksel olarak da anlamlıydı. Grup 3'te artmış olan bu kilo kaybının, bazı çalışmalarda belirtildiği gibi mTOR inhibitörlerinin hücre popülasyonları üzerinde antiproliferatif ve antimitotik etki göstermesine ve düz kas hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerinin çoğalmasını inhibe etmesine bağlı olduğu düşünmekteyiz (154). Ayrıca immunsuprese gruplarda kök hücre uygulaması sonucunda, kilo kaybının daha az olduğu görüldü. Bu da immunsüpresyonun vücut kitlesindeki negatif etkisinin diğer çalışmalarda belirtildiği gibi kök hücre uygulamasının anabolizan etkisiyle düzeltilebileceğini göstermiştir (155, 156). Yinede bu durumu açıklamak için ek çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Karın içi ameliyatlarından sonra görülen yapışıklıklar; barsak tıkanıklıklarına, barsak iskemisine ve bunların neticesinde de tekrarlayan ameliyatlara neden olmaktadır (157). Wagner ve ark. yaptığı çalışmada, sirolimus verilen grupta karın içi yapışıklıkların kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermediği saptanmıştır (158). Bizim çalışmamızda, dördüncü günde tüm gruplarda, kontrol grubuna göre orta ve ileri derece yapışıklık düzeyinin daha fazla olduğu görüldü. Hatta Grup 3(everolimus), orta derece yapışıklığın en fazla görüldüğü grup olmuştur. Bununla beraber Grup 3(everolimus) ile Grup 4(everolimus+kökhücre) karşılaştırıldığı zaman yapışıklık oranının ve derecesinin kök hücre verilmesi ile birlikte Grup 4'te azaldığı gözlemlendi. Yedinci günde ise yapılan işlemlerin yapışıklık derecesini anlamlı şekilde etkilemediği görülmekle beraber, Grup 3(everolimus) ile Grup 4(everolimus+kökhücre)'te hiç ileri derece yapışıklık görülmemiştir. Pascual ve ark. yaptığı çalışmada kök hücre uygulamasının bizim çalışmamızdaki bulgular gibi yapışıklık oluşumunu önemli ölçüde azalttığını gözlemlemiştir (159).

Hidroksiprolin, kollajenin bir öncüsü olarak hareket ederken, mTOR inhibitörleri, protein sentezini azaltarak, doku hidroksiprolin düzeyinde, dolayısı ile yara mukavemetinde azalmaya yol açar (142). Sıçanlarda iyileşen kolon anastomozlarındaki hidroksiprolin içeriğinin, everolimus tedavisinden sonra anlamlı şekilde azaldığını gösterilmiştir (138, 160). Caziuc ve ark. yaptığı çalışmada da kök hücre verilen gruplarda hidroksiprolin düzeyinin anlamlı şekilde yüksek olduğu belirtilmiştir (17). Çalışmamızda yedinci günde sakrifiye edilen sıçanlarda hidroksiprolin düzeyinin, dördüncü günde sakrifiye edilen sıçanlara göre daha yüksek olduğu görüldü. Bununla beraber, 4. ve 7. günde kök hücre uygulaması, immunsuprese edilmeyen Grup 2'de Grup 1'e göre doku hidroksiprolin seviyesinde artmaya neden olurken, immunsuprese edilen grup 3'te aynı etkiye neden olmamıştır. Everolimus ile immunsupresyon, sıçanlarda dördüncü günde doku hidroksiprolin seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Bu bulgular everolimusun hidroksiprolin sentezini özellikle erken dönemde inhibe ettiğini düşündürmektedir. Öte yandan kök hücrenin anabolizan etkileri ve yara yerini iyileştirmesini hızlandırıcı etki mekanizması, kök hücre verilen gruplarda hidroksiprolin düzeyinin yüksek olmasını açıklar (108). Grup 4'te kök hücre enjeksiyonunun, Grup 3'e göre hidroksiprolin düzeyini arttırmamış olmasını; mTOR inhibitörü ile kök hücrenin hidroksiprolin sentezi üzerine etki mekanizmalarının farklı yollar üzerinden olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Patlama basıncı; barsakta anastomoz iyileşmesini gösteren en önemli parametrelerden biridir ve ağırlıklı olarak kollajen yoğunluğunun bir göstergesidir. Jong

Han Yoo ve ark. çalışmasında; ADKHH'nin iskemik kolon anastomozunun iyileşmesi üzerine etkisi araştırılmış ve bu çalışmada patlama basıncı ile kollajen miktarının doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiştir (161). Martine C. ve ark çalışmasında sıçanlarda barsak ve fasyada deneysel yaralanmalara karşı everolimusun kalıcı etkileri incelenmiş ve 144 sıçan üzerinde yapılan incelemelerde 7. gündeki gruplarda kollajen miktarının istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği, patlama basıncının ise everolimus dozu ile bağımlı olduğu gösterilmiştir (162). Bizim çalışmamızda da patlama basıncı dördüncü günde Grup 2(kök hücre)'de istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek ve Grup 3(everolimus)'te düşük iken, 7. günde bu farkın gruplar arasında anlamlı olmadığını gördük. Grup 4(everolimus+kök hücre)'te kök hücre verilmesine rağmen hidroksiprolin düzeyinin azalırken, patlama basıncının artması, kök hücre tedavisinin anastomoz sağlamlığını artırıcı etkisininin hidroksiprolin düzeyi haricinde farklı parametrelere bağlı geliştiğini düşündürmektedir.

Yapılan histopatolojik değerlendirmemizde, gruplar arasında reepitelizasyon, fibrozis, iskemik nekroz ve muskuler tabakada bozulma açısından anlamlı farklılık saptanmadı. Bunun nedenini, immunsupresyon ve/veya kök hücre enjeksiyonunun, onarımın mukozal hücre proliferasyon kısmını etkilemediği hipotezine bağlıyoruz (158). Bizim çalışmamızda 7. günde sakrifiye edilen ve kök hücre verilen Grup 2(kök hücre) ve Grup 4(everolimus+kök hücre)'te vasküler proliferasyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca Grup 2A-2B ve Grup 4A-4B arasında vasküler proliferasyon düzeylerinde anlamlı derecede farklılık tespit edilmiş olup 7. günde daha belirgin vasküler proliferasyon görülmüştür. Grup 3(Everolimus)'te dört ve yedinci günde hiç şiddetli vasküler proliferasyon görülmemiştir. Vasküler proliferasyonun kök hücre gruplarında artışının nedenini; Cazius ve arkadaşlarının bulguları gibi kök hücrenin VEGF düzeylerinde artışa yol açmasına ve kök hücrenin endotel hücresi gibi hücrelere farklılaşabilmesine bağlı olduğunu düşünüyoruz (17).

Bizim çalışmamızın kısıtlılığının; doku kollajen düzey tayini yapılmaması ve kök hücre enjeksiyonu sonrası yapılan değerlendirilmelerde moleküler parametrelerin ölçümünün yapılmaması olduğunu düşünüyoruz.

6. SONUÇ

Biz çalışmamızda; everolimus ile immunosuprese edilmiş sıçanlarda yaptığımız kolon anastomozuna subserozal olarak ADKKH enjeksiyonu yaparak, everolimusun daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiş yara iyileştirmesini geciktirici etkisini önlemeye çalıştık. Çalışmamızın neticesinde; everolimus ile immunosuprese edilen sıçanlarda kök hücre uygulamasının anastomozun sağlamlığını ve anastomoz bölgesinde vasküler proliferasyonu arttırdığını gördük. Bu sonuçlara göre mTOR inhibitörü kullanan hastalarda yapılacak ve özellikle anastomoz gerektirecek acil ya da elektif cerrahi girişimlerde, immunosupresif rejimini değiştirmeye ya da bırakmaya gerek kalmadan, anastomoz bölgesine lokal ADKKH enjeksiyonu yeni bir tedavi yöntemi olabilir. Bu konuda yeni çalışmalar yapıldığı takdirde, kalsinörin inhibitörlerine göre daha az nefrotoksik ve daha güçlü immunosupresan olan mTOR inhibitörleri, transplantasyon sırasında anastomoz alanlarına lokal ADKKH enjeksiyonu yapılarak erken dönemde güvenle kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Kirchoff P, Clavien PA, Hahnloser D. Complications in colorectal surgery: risk factors and preventive strategies. *Patient safety in surgery*;4(1):5. 2010.
2. C. K. İskemi Reperfüzyon Modelleri. Z C, İ. S, editors. Ankara2005.
3. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factor contributing to leakage of colonic anastomoses. *Annals of surgery*;177(5):513-8. 1973.
4. Peeters KC, Tollenaar RA, Marijnen CA, Klein Kranenbarg E, Steup WH, Wiggers T, et al. Risk factors for anastomotic failure after total mesorectal excision of rectal cancer. *The British journal of surgery*;92(2):211-6. 2005.
5. Shogan BD, Carlisle EM, Alverdy JC, Umanskiy K. Do we really know why colorectal anastomoses leak? *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*;17(9):1698-707. 2013.
6. Blumetti J, Chaudhry V, Cintron JR, Park JJ, Marecik S, Harrison JL, et al. Management of anastomotic leak: lessons learned from a large colon and rectal surgery training program. *World journal of surgery*;38(4):985-91. 2014.
7. Alves A, Panis Y, Trancart D, Regimbeau JM, Pocard M, Valleur P. Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World journal of surgery*;26(4):499-502. 2002.
8. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England journal of medicine*;351(26):2715-29. 2004.
9. Fischereder M, Graeb C, Kruger B, Kammerl MC, Zulke C, Jauch KW, et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus in patients with chronic renal allograft dysfunction. *Transplantation proceedings*;38(5):1295-7. 2006.
10. Mulay AV, Cockfield S, Stryker R, Fergusson D, Knoll GA. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus for chronic renal allograft dysfunction: a systematic review of the evidence. *Transplantation*;82(9):1153-62. 2006.
11. Hong JC, Kahan BD. Sirolimus-induced thrombocytopenia and leukopenia in renal transplant recipients: risk factors, incidence, progression, and management. *Transplantation*;69(10):2085-90. 2000.
12. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*;149(2):274-93. 2012.
13. Kahan BD, Napoli KL, Kelly PA, Podbielski J, Hussein I, Urbauer DL, et al. Therapeutic drug monitoring of sirolimus: correlations with efficacy and toxicity. *Clinical transplantation*;14(2):97-109. 2000.
14. Ueno P, Felipe C, Ferreira A, Cristelli M, Viana L, Mansur J, et al. Wound Healing Complications in Kidney Transplant Recipients Receiving Everolimus. *Transplantation*;101(4):844-50. 2017.
15. Sandrini S, Setti G, Bossini N, Maffei C, Iovinella L, Tognazzi N, et al. Steroid withdrawal five days after renal transplantation allows for the prevention of wound-healing complications associated with sirolimus therapy. *Clinical transplantation*;23(1):16-22. 2009.
16. Dean PG, Lund WJ, Larson TS, Prieto M, Nyberg SL, Ishitani MB, et al. Wound-healing complications after kidney transplantation: a prospective, randomized comparison of sirolimus and tacrolimus. *Transplantation*;77(10):1555-61. 2004.
17. Caziuc A, Calin Dindelegan G, Pall E, Mironiuc A. Stem cells improve the quality of colonic anastomoses - A systematic review. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*;20(6):1624-9. 2015.

18. Adas G, Kemik O, Eryasar B, Okcu A, Adas M, Arıkan S, et al. Treatment of ischemic colonic anastomoses with systemic transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells. *European review for medical and pharmacological sciences*;17(17):2275-85. 2013.
19. Gong W, Guo M, Han Z, Wang Y, Yang P, Xu C, et al. Mesenchymal stem cells stimulate intestinal stem cells to repair radiation-induced intestinal injury. *Cell death & disease*;7(9):e2387. 2016.
20. Newton CA. An overview of the large intestine: anatomy, physiology and normal function. *Nursing*;3(21):770-2. 1987.
21. Skandalakis JE. *Skandalakis Cerrahi Anatomi Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri*. A. B, editor2008.
22. Hollinshead WH. Embryology and surgical anatomy of the colon. *Diseases of the colon and rectum*;5:23-7. 1962.
23. Zinner MJ, Ashley SW. *Maingot's Abdominal Operations*. 11 ed 2006.
24. Sakorafas GH, Zouros E, Peros G. Applied vascular anatomy of the colon and rectum: clinical implications for the surgical oncologist. *Surgical oncology*;15(4):243-55. 2006.
25. J.L. R. Embryology and anatomy of the colon, Shackelford's Surgery of alimentary Tract1996.
26. J. R. In Ackerman's Surgical Pathology. 8 ed. J. R, St.Louis., editors1996.
27. T. K. *Kolorektal Cerrahide İlkeler, İnsizyonlar, Anastomoz teknikleri, Drenler. Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları*. K. A, T. A, D. B, editors2004.
28. Weilbaecher DA, Stirling CT, Mathieu FJ. Nonsuture intestinal anastomosis. *Bulletin de la Societe internationale de chirurgie*;25(2):125-36. 1966.
29. Orr NW. A single-layer intestinal anastomosis. *The British journal of surgery*;56(10):771-4. 1969.
30. Khoury GA, Waxman BP. Large bowel anastomoses. I. The healing process and sutured anastomoses. A review. *The British journal of surgery*;70(2):61-3. 1983.
31. Templeton JL, McKelvey ST. Low colorectal anastomoses. An experimental assessment of two sutured and two stapled techniques. *Diseases of the colon and rectum*;28(1):38-41. 1985.
32. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. *American journal of surgery*;139(3):406-13. 1980.
33. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *The Surgical clinics of North America*;77(3):509-28. 1997.
34. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*;117(7 Suppl):12s-34s. 2006.
35. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z. Physiology of wound healing. *Advances in skin & wound care*;13(2 Suppl):6-11. 2000.
36. F. Charles Brunnicardi DA, Timothy Billiar, David Dunn, John G. Hunter, Jeffrey Matthews, Raphael E. Pollock. *Schwartz Principles of Surgery*. 10 ed. F. Charles Brunnicardi M, FACS, editor. 10. United States: MC GRAW HILL; 2014.
37. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *The Surgical clinics of North America*;77(3):549-73. 1997.
38. Ortolan EV, Spadella CT, Caramori C, Machado JL, Gregorio EA, Rabello K. Microscopic, morphometric and ultrastructural analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*;116(4):198-202. 2008.

39. Xiong M, Elson G, Legarda D, Leibovich SJ. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *The American journal of pathology*;153(2):587-98. 1998.
40. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*;18(1):4-25. 1997.
41. Pricolo VE, Caldwell MD, Mastrofrancesco B, Mills CD. Modulatory activities of wound fluid on fibroblast proliferation and collagen synthesis. *The Journal of surgical research*;48(6):534-8. 1990.
42. Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Oates JF, 3rd, Berard CW, Rosen H. THE HEALING OF RAT SKIN WOUNDS. *Annals of surgery*;161:293-308. 1965.
43. Woodley DT, Bachmann PM, O'Keefe EJ. The role of matrix components in human keratinocyte re-epithelialization. *Progress in clinical and biological research*;365:129-40. 1991.
44. Clinical and experimental approaches to dermal and epidermal repair--normal and chronic wounds. *Proceedings of the Third International Symposium on Tissue Repair*. Miami, Florida, January 10-14, 1990. *Progress in clinical and biological research*;365:1-497. 1991.
45. Cronin K, Jackson DS, Dunphy JE. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. *Surgery, gynecology & obstetrics*;126(4):747-53. 1968.
46. Graham MF, Drucker DE, Diegelmann RF, Elson CO. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. *Gastroenterology*;92(2):400-5. 1987.
47. Martens MF, Huyben CM, Hendriks T. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. *Gut*;33(12):1664-70. 1992.
48. Ellison GW. Wound healing in the gastrointestinal tract. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*;4(4):287-93. 1989.
49. Lunstedt B, Debus S, Thiede A. [Healing of the anastomosis in various suture techniques in the gastrointestinal tract. Physiology, experimental and clinical results]. *Zentralblatt fur Chirurgie*;118(1):1-7. 1993.
50. Mast BA. Healing in other tissues. *The Surgical clinics of North America*;77(3):529-47. 1997.
51. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK, Dunphy JE. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. *The British journal of surgery*;57(12):896-900. 1970.
52. Herrmann JB, Woodward SC, Pulaski EJ. HEALING OF COLONIC ANASTOMOSES IN THE RAT. *Surgery, gynecology & obstetrics*;119:269-75. 1964.
53. Zaharie F, Mocan L, Tomus C, Mocan T, Zaharie R, Bartos D, et al. [Risk factors for anastomotic leakage following colorectal resection for cancer]. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)*;107(1):27-32. 2012.
54. Kingham TP, Pachter HL. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis, and treatment. *Journal of the American College of Surgeons*;208(2):269-78. 2009.
55. Chung RS. Blood flow in colonic anastomoses. Effect of stapling and suturing. *Annals of surgery*;206(3):335-9. 1987.
56. Shikata J, Shida T. Effects of tension on local blood flow in experimental intestinal anastomoses. *The Journal of surgical research*;40(2):105-11. 1986.
57. Sheridan WG, Lowndes RH, Young HL. Tissue oxygen tension as a predictor of colonic anastomotic healing. *Diseases of the colon and rectum*;30(11):867-71. 1987.
58. Testini M, Margari A, Amoruso M, Lissidini G, Bonomo GM. [The dehiscence of colorectal anastomoses: the risk factors]. *Annali italiani di chirurgia*;71(4):433-40. 2000.

59. Checa Ceballos J. [Antibiotic prophylaxis in colorectal surgery]. *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*;81(1):34-42. 1992.
60. Schein M, Assalia A, Eldar S, Wittmann DH. Is mechanical bowel preparation necessary before primary colonic anastomosis? An experimental study. *Diseases of the colon and rectum*;38(7):749-52; discussion 52-4. 1995.
61. Torralba JA, Robles R, Parrilla P, Lujan JA, Liron R, Pinero A, et al. Subtotal colectomy vs. intraoperative colonic irrigation in the management of obstructed left colon carcinoma. *Diseases of the colon and rectum*;41(1):18-22. 1998.
62. Naraynsingh V, Rampaul R, Maharaj D, Kuruvilla T, Ramcharan K, Pouchet B. Prospective study of primary anastomosis without colonic lavage for patients with an obstructed left colon. *The British journal of surgery*;86(10):1341-3. 1999.
63. Waninger J, Kauffmann GW, Shah IA, Farthmann EH. Influence of the distance between interrupted sutures and the tension of sutures on the healing of experimental colonic anastomoses. *American journal of surgery*;163(3):319-23. 1992.
64. Sliker JC, Daams F, Mulder IM, Jeekel J, Lange JF. Systematic review of the technique of colorectal anastomosis. *JAMA surgery*;148(2):190-201. 2013.
65. Hunt TK, Hawley PR. Surgical judgment and colonic anastomoses. *Diseases of the colon and rectum*;12(3):167-71. 1969.
66. Irvin TT. Collagen metabolism in infected colonic anastomoses. *Surgery, gynecology & obstetrics*;143(2):220-4. 1976.
67. Berliner SD, Burson LC, Lear PE. USE AND ABUSE OF INTRAPERITONEAL DRAINS IN COLON SURGERY. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*;89:686-9. 1964.
68. Ahrendt GM, Tantry US, Barbul A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. *American journal of surgery*;171(1):102-7; discussion 7-8. 1996.
69. Carrico TJ, Mehrhof AI, Jr., Cohen IK. Biology of wound healing. *The Surgical clinics of North America*;64(4):721-33. 1984.
70. Pikula M, Langa P, Kosikowska P, Trzonkowski P. [Stem cells and growth factors in wound healing]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*;69:874-85. 2015.
71. Kim CS, Buchmiller TL, Fonkalsrud EW, Phillips JD. The effect of anabolic steroids on ameliorating the adverse effects of chronic corticosteroids on intestinal anastomotic healing in rabbits. *Surgery, gynecology & obstetrics*;176(1):73-9. 1993.
72. Schilling JA. Wound healing. *The Surgical clinics of North America*;56(4):859-74. 1976.
73. E K. Kök Hücreler. E K, E O, editors2004.
74. Sale GE, Storb R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*;11(10):961-6. 1983.
75. Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *The Journal of clinical investigation*;115(1):5-12. 2005.
76. 3314106S036 TSP. İnsan kök hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma aşamalarında yapısal protein dinamiğinin belirlenmesi. In: A C, S K, Ö Ç, E E, H Ö, editors. p.: 2008.
77. Ural A. Embriyonel ve mezodermal kök hücreler. Ural A, editor.
78. Karaöz E. Nedir bu kök hücreler? 18(884)2004.
79. E. Kansu BÇ. Erişkin ve hematopoetik kök hücreler. 2009.
80. F. Şahin GS, S. Omay. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. Şahin F, editor2005.

81. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*;4(5):267-74. 1976.
82. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*;7(2):211-28. 2001.
83. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell transplantation*;19(3):279-89. 2010.
84. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*;87(1):125-8. 2005.
85. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*;32(6):370-3. 2004.
86. DU Ç. Mezenkimal kök hücreler. 2009.
87. Joo HH, Jo HJ, Jung TD, Ahn MS, Bae KB, Hong KH, et al. Adipose-derived stem cells on the healing of ischemic colitis: a therapeutic effect by angiogenesis. *International journal of colorectal disease*;27(11):1437-43. 2012.
88. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulson R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Molecular pathology : MP*;56(2):86-96. 2003.
89. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells (Dayton, Ohio)*;19(3):180-92. 2001.
90. Hawley RG, Sobieski DA. Stem cell bouillabaisse-potpourri. *Stem cells (Dayton, Ohio)*;20(5):360-3. 2002.
91. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology*;132(5):533-46. 2009.
92. Karaoz E, Ayhan S, Gacar G, Aksoy A, Duruksu G, Okcu A, et al. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy*;12(3):288-302. 2010.
93. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, et al. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plastic and reconstructive surgery*;121(1):59-69. 2008.
94. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. *Annals of plastic surgery*;54(5):546-52. 2005.
95. M. B. Kök hücre kaynağı olarak kordon kanı. 2009.
96. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of inflammation (London, England)*;2:8. 2005.
97. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods (San Diego, Calif)*;45(2):115-20. 2008.
98. Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M. Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Minerva cardioangiologica*;57(2):249-67. 2009.

99. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem cells (Dayton, Ohio)*;23(3):355-64. 2005.
100. Graham-Rowe D. Fetal tissue graft restores lost sight. *New scientist (1971)*;184(2471):16-7. 2004.
101. Vastag B. Stem cells step closer to the clinic: paralysis partially reversed in rats with ALS-like disease. *Jama*;285(13):1691-3. 2001.
102. Karaoz E, Okcu A, Saglam O, Genc ZS, Ayhan S, Kasap M. Pancreatic islet derived stem cells can express co-stimulatory molecules of antigen-presenting cells. *Transplantation proceedings*;42(9):3663-70. 2010.
103. Ichioka S, Kudo S, Shibata M, Ando J, Sekiya N, Nakatsuka T. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. *Annals of plastic surgery*;52(4):414-8. 2004.
104. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, NY)*;275(5302):964-7. 1997.
105. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*;103(5):634-7. 2001.
106. Heintz-Green A, Radke PW, Munkonge FM, Frass O, Zhu J, Vincent K, et al. The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *European heart journal*;26(13):1327-32. 2005.
107. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Experimental physiology*;90(3):315-26. 2005.
108. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plastic and reconstructive surgery*;124(3):804-15. 2009.
109. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Annals of plastic surgery*;65(2):237-44. 2010.
110. Poznanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*;29(5):570-6. 1973.
111. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio journal of medicine*;54(3):132-41. 2005.
112. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*;6(1):7-14. 2004.
113. Cannon B, Nedergaard J. Developmental biology: Neither fat nor flesh. *Nature*;454(7207):947-8. 2008.
114. Tomiyama K, Murase N, Stolz DB, Toyokawa H, O'Donnell DR, Smith DM, et al. Characterization of transplanted green fluorescent protein+ bone marrow cells into adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)*;26(2):330-8. 2008.
115. Baran Y, Ural AU, Avcu F, Sarper M, Elci P, Pekel A. Optimization of transfection of green fluorescent protein in pursuing mesenchymal stem cells in vivo. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*;25(4):172-5. 2008.
116. Haberal M, Gulay H, Buyukpamukcu N, Telatar H, Bilgin N, Ozdemir A, et al. Liver transplantation in Turkey. *Transplantation proceedings*;23(5):2563-5. 1991.

117. Haberal M, Bilgin N, Gulay H, Sert S, Arslan G, Karamehmetoglu M. Living-related donor kidney transplantation. *Transplantation proceedings*;21(1 Pt 2):2194-5. 1989.
118. Haberal M, Sert S, Gulay H, Aybasti N, Gokce O, Hamaloglu E, et al. Living unrelated donor kidney transplantation. *Transplantation proceedings*;20(5):805. 1988.
119. Haberal M, Sert S, Aybasti N, Gulay H, Gokce O, Arslan G, et al. Living donor kidney transplantation. *Transplantation proceedings*;20(1 Suppl 1):353-5. 1988.
120. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics*;28(10):727-32. 1975.
121. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science (New York, NY)*;253(5022):905-9. 1991.
122. Wysocki PJ. mTOR in renal cell cancer: modulator of tumor biology and therapeutic target. *Expert review of molecular diagnostics*;9(3):231-41. 2009.
123. Klumpen HJ, Beijnen JH, Gurney H, Schellens JH. Inhibitors of mTOR. *The oncologist*;15(12):1262-9. 2010.
124. Chiarini F, Evangelisti C, McCubrey JA, Martelli AM. Current treatment strategies for inhibiting mTOR in cancer. *Trends in pharmacological sciences*;36(2):124-35. 2015.
125. Douros J, Suffness M. New antitumor substances of natural origin. *Cancer treatment reviews*;8(1):63-87. 1981.
126. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature reviews Drug discovery*;5(8):671-88. 2006.
127. Fasolo A, Sessa C. mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Expert opinion on investigational drugs*;17(11):1717-34. 2008.
128. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *International journal of molecular sciences*;13(2):1886-918. 2012.
129. Lebwohl D, Anak O, Sahmoud T, Klimovsky J, Elmroth I, Haas T, et al. Development of everolimus, a novel oral mTOR inhibitor, across a spectrum of diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*;1291:14-32. 2013.
130. Polivka J, Jr., Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacology & therapeutics*;142(2):164-75. 2014.
131. Wan X, Helman LJ. The biology behind mTOR inhibition in sarcoma. *The oncologist*;12(8):1007-18. 2007.
132. Lane HA, Wood JM, McSheehy PM, Allegrini PR, Boulay A, Brueggen J, et al. mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*;15(5):1612-22. 2009.
133. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*;18(16):1926-45. 2004.
134. Boulay A, Lane HA. The mammalian target of rapamycin kinase and tumor growth inhibition. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*;172:99-124. 2007.
135. Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulidakos PI, Hensley HH, et al. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*;13(14):4261-70. 2007.
136. Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Seminars in oncology*;36 Suppl 3:S3-s17. 2009.

137. Flechner SM, Zhou L, Derweesh I, Mastroianni B, Savas K, Goldfarb D, et al. The impact of sirolimus, mycophenolate mofetil, cyclosporine, azathioprine, and steroids on wound healing in 513 kidney-transplant recipients. *Transplantation*;76(12):1729-34. 2003.
138. van der Vliet JA, Willems MC, de Man BM, Lomme RM, Hendriks T. Everolimus interferes with healing of experimental intestinal anastomoses. *Transplantation*;82(11):1477-83. 2006.
139. Ekici Y, Emiroglu R, Ozdemir H, Aldemir D, Karakayali H, Haberal M. Effect of rapamycin on wound healing: an experimental study. *Transplantation proceedings*;39(4):1201-3. 2007.
140. Cooper M, Wiseman AC, Zibari G, McCague K, Kim Y, Geissler F, et al. Wound events in kidney transplant patients receiving de novo everolimus: a pooled analysis of three randomized controlled trials. *Clinical transplantation*;27(6):E625-35. 2013.
141. Albano L, Berthoux F, Moal MC, Rostaing L, Legendre C, Genin R, et al. Incidence of delayed graft function and wound healing complications after deceased-donor kidney transplantation is not affected by de novo everolimus. *Transplantation*;88(1):69-76. 2009.
142. Kuper MA, Scholzl N, Traub F, Mayer P, Weinreich J, Coerper S, et al. Everolimus interferes with the inflammatory phase of healing in experimental colonic anastomoses. *The Journal of surgical research*;167(1):158-65. 2011.
143. Kneissel M, Luong-Nguyen NH, Baptist M, Cortesi R, Zumstein-Mecker S, Kossida S, et al. Everolimus suppresses cancellous bone loss, bone resorption, and cathepsin K expression by osteoclasts. *Bone*;35(5):1144-56. 2004.
144. Daniel C, Renders L, Amann K, Schulze-Lohoff E, Hauser IA, Hugo C. Mechanisms of everolimus-induced glomerulosclerosis after glomerular injury in the rat. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*;5(12):2849-61. 2005.
145. Vogelbacher R, Wittmann S, Braun A, Daniel C, Hugo C. The mTOR inhibitor everolimus induces proteinuria and renal deterioration in the remnant kidney model in the rat. *Transplantation*;84(11):1492-9. 2007.
146. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clinical pharmacokinetics*;43(2):83-95. 2004.
147. Pinto A, Jahn A, Immohr MB, Jenke A, Dohrn L, Kornfeld M, et al. Modulation of Immunologic Response by Preventive Everolimus Application in a Rat CPB Model. *Inflammation*;39(5):1771-82. 2016.
148. Houston KA, Rotstein OD. Fibrin sealant in high-risk colonic anastomoses. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*;123(2):230-4. 1988.
149. Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, Watanabe A, Migita M, Shimada T. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*;71(4):240-1. 2004.
150. Reddy GK, Enwemeka CS. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical biochemistry*;29(3):225-9. 1996.
151. Ogawa R. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Current stem cell research & therapy*;1(1):13-20. 2006.
152. Ryan NT. Metabolic adaptations for energy production during trauma and sepsis. *The Surgical clinics of North America*;56(5):1073-90. 1976.
153. Border JR. Metabolic response to short-term starvation, sepsis, and trauma. *Surgery annual*;2(0):11-34. 1970.

154. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplantation proceedings*;35(3 Suppl):7s-14s. 2003.
155. Zeng Q, Li X, Beck G, Balian G, Shen FH. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro. *Bone*;40(2):374-81. 2007.
156. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*;332(2):370-9. 2005.
157. Stommel MW, Ten Broek RP, Strik C, Slooter GD, Verhoef C, Grunhagen DJ, et al. Multicenter Observational Study of Adhesion Formation after Open-and Laparoscopic Surgery for Colorectal Cancer. *Annals of surgery*. 2017.
158. Wagner OJ, Inglin RA, Bisch-Knaden S, Mettler D, Borner M, Candinas D, et al. Sirolimus and intraoperative hyperthermic peritoneal chemoperfusion with mitomycin-C do not impair healing of bowel anastomoses. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*;21(6):554-63. 2008.
159. Pascual I, de Miguel GF, Gomez-Pinedo UA, de Miguel F, Arranz MG, Garcia-Olmo D. Adipose-derived mesenchymal stem cells in biosutures do not improve healing of experimental colonic anastomoses. *The British journal of surgery*;95(9):1180-4. 2008.
160. Kuper MA, Trutschel S, Weinreich J, Konigsrainer A, Beckert S. Growth hormone abolishes the negative effects of everolimus on intestinal wound healing. *World journal of gastroenterology*;22(17):4321-9. 2016.
161. Yoo JH, Shin JH, An MS, Ha TK, Kim KH, Bae KB, et al. Adipose-tissue-derived Stem Cells Enhance the Healing of Ischemic Colonic Anastomoses: An Experimental Study in Rats. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*;28(3):132-9. 2012.
162. Willems MC, van der Vliet JA, de Man BM, van der Laak JA, Lomme RM, Hendriks T. Persistent effects of everolimus on strength of experimental wounds in intestine and fascia. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*;18(1):98-104. 2010.