

TC
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA, RADYOTERAPİ SONRASI
KALDIRILAN TORAKS ARKASI FASYOKUTAN
FLEPLERİNİN VASKÜLER STROMAL FRAKSİYON İLE
YAŞAYABİLİRLİĞİNİN ARTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. SELÇUK YÜCE

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. B. İNCİ GÖKALAN KARA

DENİZLİ-2015

TC
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA, RADYOTERAPİ SONRASI
KALDIRILAN TORAKS ARKASI FASYOKUTAN
FLEPLERİNİN VASKÜLER STROMAL FRAKSİYON İLE
YAŞAYABİLİRLİĞİNİN ARTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. SELÇUK YÜCE

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. B. İNCİ GÖKALAN KARA

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 24.03.2015 tarih ve 2015TPF013 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2015

Prof. Dr. B. İnci Gökalan Kara danışmanlığında Dr. SELÇUK YÜCE tarafından yapılan “Sıçanlarda, radyoterapi sonrası kaldırılan toraks arkası fasyokutan fleplerin Vasküler Stromal Fraksiyon ile yaşayabilirliğinin artırılması” başlıklı tez çalışması 15/09/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr B. İnci Gökalan Kara

ÜYE: Prof. Dr Mustafa Asım Aydın

ÜYE: Yrd. Doc. Dr. Ramazan Hakan Özcan

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI

TEŐEKKÖR

Uzmanlık eğitimim sırasında klinik ve cerrahi deneyimi yanı sıra, plastik, rekonströktif ve estetik cerrahi etik ve kÖltÖrÖnÖ bizlere yansıtan, Tez Hocam Prof. Dr. İnci GÖkalan KARA' ya, iyi bir plastik cerrah olabilmem için uzmanlık eğitimim sırasında bilgi, davranıŐ ve tecrÖbeleri ile bÖyÖk emek veren hocalarım, Yrd. Doç. Dr. Ramazan Hakan Özcan, Yrd. Doç. Dr. Adem Özkan, Yrd. Doç. Dr. Adem Topkara'ya,

Tezimin deney kısımlarını gerçekleŐtirdięim PAÖ Deneysel Hayvan AraŐtırmaları Laboratuvarı alıŐanlarına, Embriyoloji ve Histoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. GÖlin Mete Abban, asistan ve çalıŐanlarına; Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. NeŐe allı Demirkan, asistan ve çalıŐanlarına teŐekkÖr ederim.

Hayatımın her dÖneminde emeiği ve desteği ile yanımda olan, benden emeiğini ve Özenini esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeŐlerime,

Her zaman sevgisini ve desteğini yanımda hissettiğim değerli eŐim Elçin YÖce'ye ve sabrından dolayı sevgili kızım Nil YÖce'ye TEŐEKKÖR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	IX
TABLOLAR DİZİNİ.....	XI
ÖZET	XII
SUMMARY	XIV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
RADYOTERAPİ	3
Radyobiolojinin Teknik ve Tarihçesi	3
Radyoterapinin Deri Üzerindeki Etkileri	4
Radyoterapi Uygulamaları	4
FLEPLERİN TANIMLANMASI VE SINIFLANDIRILMASI	5
Flep Tanımı Ve Tarihçesi	5
Fleplerin Sınıflandırılması.....	6
Flep Fizyolojisi.....	7
Flep Kan Akımının Ayarlanması.....	10
Flep Kaybı Ve İskemi Reperfüzyon Hasarı	11
Hayvan Modeli Ve Toraks Arkası Deri Flebi.....	16
KÖK HÜCRE	17
Kök hücre tanımı ve türleri.....	17
Kök hücrelerin sınıflandırılması.....	17
Mezenkimal Kök Hücreler	19
VASKULER STROMAL FRAKSİYON	20
Yağ Dokusu	20
Vaskular Stromal Fraksiyon (VSF).....	21
GEREÇ VE YÖNTEM	25
ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI BÖLÜMLER	25
RADYASYON UYGULAMALARI	25
Işınlama Planı	26
Sıçanların Işınlanması.....	26
CERRAHİ İŞLEM	29

Sağ Toraks Arkası Cilt Flebinin Kaldırılması.....	29
Yağ Greftinin Alınması.....	33
Vaskuler Stromal Fraksiyon'un Elde Edilmesi.....	33
GRUPLAR.....	35
SAKRİFİKASYON PROTOKOLÜ.....	40
DEĞERLENDİRMELER	40
Yüzey Alan değerlendirilmesi	40
Histopatolojik değerlendirme.....	41
İstatistiksel Değerlendirme.....	42
BULGULAR.....	43
Genel Değerlendirme Sonuçları.....	43
Yüzey Alan Değerlendirme Sonuçları.....	43
Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	45
TARTIŞMA.....	52
SONUÇ	66
KAYNAKLAR.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADAS	: Erişkin Yağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücre (Adipose Derived Adult Stem Cells)
AMP	: Adenozin-Mono-Fosfat
ATP	: Adenozin-Tri-Fosfat
BAP	: Bilimsel Araştırma Projesi
b-FGF	: Bazik-Fibroblast Büyüme Faktörü
Ca	: Kalsiyum
CFU-S	: Colony Forming Unit-Spleen
Cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
CTGF	: Konnektif Doku Büyüme Faktörü (Connective Tissue Growth Factor)
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FGF2	: Fibroblast Growth Faktör-2
GM-CSF	: Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
GSH- Px	: Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (Insulin-Like Growth Factor 1)
ISCT	: International Society For Cellular Therapy (Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği)
IL-1	: Interlökin-1
IL-1 β	: Interlökin-1 β
IL-3	: Interlökin-3
IL-6	: Interlökin-6
IL-7	: Interlökin-7
IL-11	: Interlökin-11
KAT	: Katalaz

KGf	: Keratinosit Büyüme Faktörü
KDH	: Ksantin Dehidrojenaz
KO	: Ksantin Oksidaz
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MU	: Monitor Unit
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
Na-K-ATPaz	: Sodyumpotasyum ATPaz
NO	: Nitrik Oksit
OH-	: Hidroksi Molekülü
PAÜTF	: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
PBS	: Fosfat Buffer Solüsyon
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE1	: Prostaglandin E1
PGF2a	: Prostaglandin F2a
PLA	: Lipoaspirat
PNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
RT	: Radyoterapi
SSD	: Kaynak Cilt Mesafesi
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Süperoksit Radikalleri
TGF- β	: Transforming Growth Faktör - β
TXA2	: Tromboksan A2
VEGF	: Damar Endoteli Büyüme Faktörü
VSF	: Vasküler Stromal Fraksiyon

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Derinin Kan Dolaşımı. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles And Physiology Of Skin Flap Surgery	8
Şekil 2: Derinin Mikrodolaşımı.....	9
Şekil 3: Reperfüzyon Sırasında Direkt Olarak Hücresel Hasar Oluşturabilen Toksik Oksijen Radikallerinin Oluşumu.....	13
Şekil 4: Lateral Torasik Arter Pediküllü Aksiyel Paternli Deri Flebi	17
Şekil 5: Kök Hücrelerin Farklılaşma Özelliklerine Göre Sınıflandırılması.....	19
Resim 1: Vasküler Stromal Fraksiyon	21
Resim 2: Bolus Materyali.....	26
Resim 3: Sıçanların Radyoterapi Cihazına Yerleştirilmesi	27
Resim 4: Işın Alanı: 30x4 Cm ² ; SSD:98,5 Cm.....	28
Resim 5: Verilen Işının Monitörden Takibi	28
Resim 6: Sıçanların Kameradan Takibi.....	28
Resim 7: Radyoterapi Almış Sıçanda Cilt Görüntüsü.....	30
Resim 8: Radyoterapi Almamış Sıçanda Cilt Görüntüsü.....	30
Resim 9: Flebin Planlanması	31
Resim 10: Povidan İyot İle Temizlenmiş Cerrahi Saha	31
Resim 11: Lateral Torasik Arter Ve Dalları	32
Resim 12: Sütürasyon Sonrası Flebin Pozisyonu.....	32
Resim 13: Sol İnguinal Yağ Yastıkçığı.....	33
Resim 14: VSF; Tabanda Kalan Pallet.....	34
Resim 15: VSF'de Hücre Sayımı.....	35
Resim 16: Grup 1'de Lateral Torasik Arter Görünümü.....	36
Resim 17: Grup 1 Işınlama Yapılmamış-Sağ Toraks Arkası Cilt Flebinin Etrafındaki Sağlam Dokuyla Eksize Edilerek Köpük Üzerine İğnelerle Tespiti.....	37
Resim 18: Grup 2 Işınlama Yapılmış - Sağ Lateral Torasik Arter (Ok İle İşaretli) Flep Tabanında Yaygın Fibrozis	37
Resim 19: Grup 2 Işınlama Yapılmış Ve Sağ Lateral Torasik Arter Etrafına 1 cc %0,9 NaCl Sıvısı İnfiltrasyonundan 7 Gün Sonra Cilt Flebinin Etrafındaki Sağlam Dokuyla Eksize Edilmiş Ve Köpük Üzerine Tespit Edilmiş Hali	38
Resim 20: Grup 3 Işınlama Yapılmış - Sağ Lateral Torasik Arter Etrafına 1cc VSF Enjeksiyonu	38
Resim 21: Sütürasyon Sonrası Flep Görütüsü.....	39
Resim 22: Grup 3 Işınlama Yapılmış Ve Sağ Lateral Torasik Arter Etrafına 1cc VSF İnfiltrasyonundan 7 Gün Sonra Cilt Flebinin Eksizyonu.....	39

Resim 23: Adobe Photoshop CS4 İle Flep Yüzey Alan Ölçümü.....	40
Resim 24: Grup 1’de Histopatolojik Kesit Görüntüsü	46
Resim 25: Grup 2’de Histopatolojik Kesit Görüntüsü (Yoğun Kollagenizasyon Ve Nötrofil İnfiltrasyonu Görülmektedir.).....	46
Resim 26: Grup 3’de Histopatolojik Kesit Görüntüsü (VSF İnfiltrasyonu Sonrası Kollagenizasyonda Ve Nötrofil İnfiltrasyonunda Ciddi Azalma Mevcut.).	47
Resim 27: Grup 3’de Kollagenizasyonun Skorlamada İkinci Seviyeye Düştüğünün Histopatolojik Görüntüsü	47

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Deri Flebinin Dolaşıma Göre Sınıflandırılması	6
Tablo 2: Deri Flebinin Dolaşıma Göre Sınıflandırılması	7
Tablo 3: Kas, Kas-Deri Flebinin Dolaşıma Göre Sınıflandırılması.....	7
Tablo 4: Histopatolojik Skorlama.....	41
Tablo 5: Gruplarda Flep Nekroz Oranları.....	44
Tablo 6: Grupların Flep Nekroz Oranlarının Karşılaştırmaları	45
Tablo 7: Gruplarının Neovaskularizasyon Oranlarının Karşılaştırılması	45
Tablo 8: Gruplarının Histopatolojik İnceleme Skorları.....	48
Tablo 9: Grupların Nötrofil Yoğunluğuna Göre Karşılaştırılması	43
Tablo 10: Grupların Nötrofil Yoğunluğuna Göre Karşılaştırılması	49
Tablo 11: Grupların Kollagenizasyon Yoğunluğuna Göre Karşılaştırılması ..	50
Tablo 12: Grupların Kollagenizasyon Yoğunluğuna Göre Karşılaştırılması ..	51

ÖZET

Sıçanlarda, radyoterapi sonrası kaldırılan toraks arkası fasyokutan fleplerin VSF(vasküler stromal fraksiyon) ile yaşayabilirliğinin artırılması

Dr Selçuk YÜCE

Radyoterapi sonrası radyoterapili alanda yapılacak cerrahi girişim hipovaskülarizasyon ve yetersiz kollajen üretimi nedeniyle yara iyileşmesini geciktirerek komplikasyonlara yol açmaktadır. Radyasyonun bu ağır etkileri nedeniyle birçok malignitenin tedavisinde cerrahi girişim öncesi radyoterapi tercih edilmemektedir. Bu durumda radyoterapi alımı rekonstrüksiyon zamanının gecikmesine veya radyoterapili sahada flep ile rekonstrüksiyondan kaçınılmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle birçok çalışmada flep yaşayabilirliğini arttıran ajanlar ve yöntemler denenmiştir. Adipoz doku kaynaklı stromal vasküler fraksiyon içeriklerindeki çok sayıda büyüme faktörü ve pluripotent hücreler nedeni ile tıbbın her alanında olduğu gibi plastik cerrahide de giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır. Alternatif olarak radyoterapili alandan aksiyal paternli fasyokutan flep kaldırılarak ve flep pedikül etrafına VSF infiltrasyonu yapılarak neovaskülarizasyon arttırılabilir. Bu da radyoterapiye bağlı komplikasyonların tedavisinde daha basit, daha kullanışlı ve daha başarılı yöntemler ortaya koyarak rekonstrüksiyonda başarı şansını arttırır.

Bu amaçla her grupta 250-300 gramlık wistar sıçanlardan oluşmak üzere dokuzarlı 3 grup oluşturuldu. Grup dışında tutulacak on sıçanın her iki taraf inguinal yağ yastıkçıkları yağ grefti olarak alınarak vaskular stromal fraksiyon oluşturmak için kullanıldı ve bu işlem sonrası sıçanlar sakrifiye edildi. 2. ve 3. grupta yer alan sıçanların sağ toraks cildine insandaki dozun karşılığı olan, düşük doz tekrarlayan seanslara eş değer gelecek, tek seans 20 Gray (2000 cGy) radyoterapi uygulandı ve 7 gün süreyle beklendi. Her 3 grupta 4 x7 cm boyutlarında ‘Lateral Torasik Arter pediküllü fasyokutan flepler kaldırıldı. 3. grupta yer alan fleplerin pedikül etrafına subdermal cerrahi sırasında 1 cc vaskular stromal fraksiyon uygulandı. Flepler, nekrotik alanın tüm flep alanına oranı fotoğraflanarak değerlendirildi.

transillüminasyonda kapiller damarlanmada artış değerlendirilmesi ve flep etraflarında yer alan cilt ile birlikte total olarak eksiz edilecek ve histopatolojik olarak flep nekrozu makroskobik ve mikroskobik olarak incelendi.

Sonuç olarak 20 Gy radyoterapi uygulanan ciltte VSF'nin etkisini araştıran bu çalışmada fleplerde saptanan ortalama nekroz oranları, grup 1' de %7.17, grup 2'de %28.45, grup 3'te %9.59 olarak bulundu. Bu da bize VSF'nin endotelyal hücreler üzerine mitojenik etkisiyle, sıçan aksiyel patern deri flepleri üzerine radyasyonun neden olduğu nekroz artışını engellediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Sıçanlarda Toraks Arkası Fasyokutan Flepler, Radyasyon Hasarı, VSF (Vasküler Stromal Fraksiyon)

ABSTRACT

Enhancement of Flap Viability in Rat Dorsal Thoracic Fasciocutaneous Flaps After Radiotherapy by Using Vascular Stromal Fraction (VSF)

Selçuk YÜCE M.D.

After radiotherapy, surgical intervention in irradiated area lead to complications of hipovascularization and inadequate collagen production causes delay in wound healing. Radiotherapy is not preferred before the surgery in the treatment of many malignancies due to the severe effects of radiation on wound healing. In this case, radiotherapy could be given after surgery or reconstruction could be done after radiotherapy with limited usage of flaps from the irradiated area. For solving this problem, several agents and methods have been tried to increase the flap viability in many studies. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction (VGF) increasingly used in plastic surgery as well as in all areas of the medicine because it contains number of growth factors and pluripotent cells. Alternatively, neovascularization production can be increased by elevation of axial-pattern fasciocutaneous flap from the irradiated area and by giving VSF around the flap pedicul. This provides us simple, useful and practical method for treatment of complications depend on radiotherapy and this increases the chances of success in the reconstruction. For this purpose this experimental study is planned by 3 groups of rats including 9 wistar rats in each group. For preparation of VSF bilateral ingunal fat pads were collected from 10 donor rats out of these groups and after this operation the rats were all sacrificed. For the rats in 2nd and 3rd groups one séance of 20 Gray (2000 cGy) radiotherapy, which correspond to human dosage and equivalent value of less dosage repetition, were applied to the rats' right thorax skin, and 7 days waited. For each groups, 'Lateral Thoracic Artery Pediculled Fasciocutaneous Flaps' were elevated in 4x7 cm dimension. For the rats in 3rd Group prepared VSF products were injected subcutaneously to the flap area. Flaps were evaluated with the ratio of the entire flap area to the necrotic areas by computer based photographic evaluation.

Increased capillary vascularization is also evaluated by observing transillumination. Flaps were totally excised with the surrounding skin and flap necrosis evaluated in histopathologic means macroscopically and microscopically.

As a result, the effect of VSF at 20 Gy irradiated skin was evaluated statistically important in decreasing average necrosis rates such as %7.17 for 1st group, %28.45 for 2nd group and %9.59 for 3rd group. In histopathologic evaluation, the mitogenic effect of VSF on endothelial cells was shown effective in preventing radiation caused necrosis on axial-pattern skin flaps.

Keywords: Radiation Injury, VSF (Vascular Stromal Fraction), Rat Dorsal Thoracic Fasciocutaneous Flap

GİRİŞ

Radyoterapi, sıklıkla malign tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Yüksek enerjili parçacıklar veya elektromanyetik dalgalar sayesinde tümör hücreleri üzerinde DNA hasarı oluşturmak amaçlanmaktadır (1). Ancak tümör olmayan dokuların da etkilenmesi sonucunda deride de radyasyona bağlı olumsuzluklar sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (2). Radyasyon, deride akut doku inflamasyonuna (ödem, vazodilatasyon ve lökosit infiltrasyonu) ve bunu takiben progresif kan damarlarının kaybına ve intersitisyel alanda fibrosizasyon yol açar (3,4). Radyasyonlu sahada endarteritis obliterans, aşırı fibrozis, azalmış vaskülarite, kan akımı, nütrisyonla ilgili yetersiz sellüler turnover izlenir (5). Damarlar üzerindeki etkisi sonucu hipovasküler ve hiposellüler bir ortam oluşturmaktadır. İskemik ve sağlıksız bu yara yatakları rekonstrüksiyon yapan cerrahları tedirgin etmektedir. Radyasyonun bu ağır etkileri nedeniyle birçok malignitenin tedavisinde cerrahi girişim öncesi radyoterapi tercih edilmemektedir (6).

Vücudun en büyük organlarından biri olan yağ dokusu, elde edilmesi en kolay dokulardan da birisidir. Stromal vasküler fraksiyon yağ dokudan özel tekniklerle elde edilen bir üründür (7). Yağ dokusu küçük parçalara bölündükten sonra kollajenazla muamele edilerek hücrelerarası bağlantılar kırılır. Oluşan süspansiyon santrifüj edildiğinde üç kısma ayrılır; üstte olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserit, ortada olgun yağ hücreleri ve en altta VSF yer alır (8). Vasküler stromal fraksiyon içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler bulunmaktadır (9). Vasküler stromal fraksiyonun, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), bazik-fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), ve transforming growth faktör - β (TGF- β) gibi anjiogenik ve antiapoptotik sitokinleri üretme potansiyeli vardır (10,11). Hipoksik ortamda stromal vasküler fraksiyondan VEGF salınımının belirgin derecede artmaktadır. Stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan preadipositler adipojenik öncü hücre olmalarının yanı sıra mikrovasküler endotelial hücrelerle parakrin etkileşim göstermektedir. Preadipositler tarafından salınan 'monobutylin' bir anjiogenik faktör olup endotelial hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (12). Flep, kan dolaşımı korunarak alıcı

alandan verici alana aktarılabilen doku birimidir. Aksiyel paternli flepler, flebin içinde uzunlamasına seyreden ve flebin tabanının ötesine uzanan anatomik olarak tanımlanmış vasküler adası olan güvenilir bir pediküle sahiptir (13). Bir defekte yerleştirilen aksiyel paternli dokunun hacmi ve güvenilirliği herhangi bir random dolaşıma sahip flepten belirgin olarak daha fazladır. Aksiyel fleplerin rekonstrüktif cerrahide belirgin etkileri olmuş ve birden fazla dokuyu içeren geniş defektlerin tedavisinde devrim yaratmıştır (14). Mevcut araştırmalar cilt iskemik tolerans süresinin 6-13 saat arasında değiştiğini ve sıçan, tavşan, domuz ve insanda benzer olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda radyoterapi uygulamasını takiben radyoterapi sahasında yapılacak fasyokutan veya muskulokutan fleplerin iyileşme oranlarını gösteren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Radyasyonun flepler üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılması veya önlenmesi amacıyla radyoterapi sahasında flep cerrahisine eş zamanlı vasküler stromal fraksiyon kullanımı rekonstrüksiyon seçeneklerini daha basite indirgeyebilecektir. Vasküler stromal fraksiyonun flepler üzerine olan olumlu etkileri göz önüne alınarak, neovaskülarizasyon sonucunda radyoterapi verilmiş alandaki flep dolaşımında ve dayanıklılığında artış olacaktır (15,16). Bu artışın, radyasyonun flep dolaşımı üzerindeki olumsuz etkilerini düzeltereği hipoteziyle bu çalışma planlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

RADYOTERAPİ

Radyobiyolojinin Teknik ve Tarihçesi

1895 yılında Alman fizikçi Wilhelm Konrad Roentgen, bir gaz deşarj tüpünden yayılan ve ışık geçirmez bir kılıf içindeki fotoğraf filmini karartan yeni bir ışın keşfetti ve o zamanlarda nitelikleri bilinmediği için bunlara X ışınları adı verildi. Bu keşifle hemen hemen aynı zamanda, 1896 ve 1898 yıllarında sırası ile, Antonie Becquerel ve Marie Curie uranyum ve radyumun radyoaktif özelliklerini buldular. Bunlar X ışınlarına çok benzeyen y ışınlar yayan doğal radyoaktif izotoplardı (1,3,17). Becquerel, dalgınlıkla yelek cebine bir radyum preparatı koyarak bir süre taşıdıktan sonra, derisinde o bölgede bir yaranın oluşturduğu etkiyi ilk kez görmüştür. Daha sonra Pierre Curie bu olayı yeniden denemek amacıyla kolunun üstüne bir radyum parçası koydu ve bir süre sonra onun derisinde de bir kızarıklık ve yara oluştu. 1906 yılında Bergonie ve Tribondeau'nun sıçan testisleri ile yaptıkları çalışmalar sonucunda, hızlı bölünen farklılaşmamış hücrelerin radyasyona duyarlılıklarının, yavaş bölünen farklılaşmış hücrelerden daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Fizik, kimya ve biyolojide kaydedilen gelişmeler, 1920'lerden başlayarak kantitatif radyobiyoloji dönemini başlatmıştır (1,3,17). Değişik radyasyon dozları uygulandıktan sonra, canlı kalabilen hücrelerin sayısını gösteren sağ kalım eğrilerinin ilk defa 1956 yılında Puck Marcus tarafından elde edilmesi ve bu eğrilerin istatistik analizi ile, radyasyonun etki mekanizması hakkında bazı sonuçlara varmak, kantitatif radyobiyoloji yardımı ile mümkün olmuştur (17).

Radyobiyolojinin bu tarihsel gelişim süreci içinde 1946 ve 1947 yılları, önemli bir dönüm noktasını oluşturmaktadır. O yıllarda sırası ile yayınlanan Lea ve Timofeeff- Ressonovsky ve Zimmer'in kitapları radyobiyoloji ilk kez bağımsız bir bilim dalı olarak kuran eserlerdir. Bu kitaplar II. Dünya Savaşı ile çağdaş oldukları için o günlerde büyük ilgi çekmişlerdir. Bu tarihten sonra, radyobiyoloji artık bağımsız bir bilim dalı olarak hızla gelişmiştir (1,3,17).

1953 yılında Gray ve arkadaşlarının oksijenin canlıları radyasyona karşı duyarlı hale getirici etkisini saptamaları, 1959 yılında Elkind ve Sutton'un radyasyon

etkisi ile meydana gelen subletal hasarlar ve bunların onarımı ile ilgili bulguları da radyobiyojide yeni ufukların açılmasını sağlamıştır. Günümüzde meme, kolorektal, baş-boyun ve jinekolojik kanserler başta olmak üzere birçok malignitenin tedavisinde, ekstremitte koruyucu cerrahilerde ve palyatif tedavide radyoterapi multidisipliner prensipler doğrultusunda uygulanmaktadır. Radyasyon miktarı, uygulandığı dokunun ağırlık başına absorbe ettiği enerjiye göre belirlenir. Buna göre 1 kg dokuya 1 jul enerji veren radyasyon miktarı 1 Gray (Gy)'dir. 1 Gray'da 100 rad radyasyon dozu olarak tanımlanır (1,3,17).

Radyoterapinin Deri Üzerindeki Etkileri

Deri, dışta epidermis içte bağ dokusu ile; kıl, tırnak, ter ve yağ bezleri ve duyu reseptörlerinden oluşan birleşik bir organdır. Derinin ışınlanması durumunda oluşacak reaksiyonlara bu yapıların tümü çeşitli derecelerde katkıda bulunur. Kıl kökleri çok duyarlıdır ve duyarlılık derecelerinin kıl büyüme hızı ile doğru orantılı olduğu da saptanmıştır. 4-5 Gy civarındaki ışınlamalardan sonraki birkaç hafta içinde saç ve sakallarda dökülme meydana gelir. Bu dozlarda, dökülen saçlar 1-2 ay sonra tekrar çıkar. Ancak 7 Gy ve üstündeki dozlarda depilasyon sürekli dir. Deri bezleri de kıl kökleri gibi duyarlıdır. Ancak bunlardaki hasarların onarımı daha uzun zaman alır (3,4). Epidermis tabakası bir hücre yenileme sistemi içerir ve yenilenme oranı günde yaklaşık %2'dir. Bu sebeple radyasyona karşı duyarlıdır. Derinin radyasyona cevapları ile bunların dereceleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunların fiziksel ve biyolojik olmak üzere başlıca iki gruba ayırmak mümkündür. Doz, doz hızı, fraksiyon ve uygulanan radyasyonun kalitesi gibi kriterler fiziksel faktörleri, radyasyon uygulanan derinin vücuttaki lokalizasyonu ile yaş gibi kriterler ise biyolojik faktörleri oluştururlar. Bu faktörlere bağlı olarak, deride minimum düzeyde değişiklikler ile total nekrozlar arasındaki çeşitli derecelerde hasarlar oluşur ve bu hasarların derecesine göre, onarım olayları da hızlı ve tam olarak gerçekleşir ya da mümkün olamaz (3,4).

Radyoterapi Uygulamaları

Radyoterapi eksternal, internal ve brakiterapi olmak üzere üç yoldan uygulanabilir. Eksternal tedavide kaynak ile hasta cildi arasındaki uzaklık 5-350 cm.'dir. X-ışınları, Co-60 (Kobalt-60), y ışınları ve parçacık şeklindeki (genellikle elektronlar) radyasyonlar kullanılır. Radyoaktif maddelerin, cilt üzerine, doku arasına

veya doku boşluklarına yerleştirilerek uygulanmasına brakiterapi adı verilir. İnternal tedavi ise P parçacıkları ve y ışınları veren açık kaynakların sıvı ve kolloidal radyoizotoplar vücuda uygulanmasıdır.

Günümüzde en yaygın kullanılan eksternal tedavi cihazları lineer hızlandırıcılarıdır. Lineer hızlandırıcılar, doğrusal bir tüp sayesinde elektronlar gibi yüksek enerji yüklü parçacıkları hızlandırmak için yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardan yararlanan cihazlardır. Yüksek enerjili elektron demetinin kendisi yüzeysel tümörlerin tedavisi için kullanılabilirken, bir hedefe çarptırılmaları sonucu elde edilen yüksek enerjili X ışınları ile derin yerleşimli tümörlerin tedavisinde de kullanılabilir.

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

FLEPLERİN TANIMLANMASI VE SINIFLANDIRILMASI

Flep Tanımı Ve Tarihçesi

Flepler, doku eksikliklerinin onarımı için hazırlanan, tabanı veya pedikülünden giren arter ve venlerle dolaşımı sağlanan deri, deri altı, fasya, kas, kemik ya da bu dokuların kombinasyonunu içerebilen doku parçalarıdır.

Fleplerin rekonstrüktif cerrahide kullanımları M.O. 600'lu yıllara dayanır. İlk kayıtlı flep kullanımı, Sushruta Samhita'nın nazal rekonstrüksiyon amaçlı pediküllü flepleri kullandığını işaret etmektedir. Vücudun çeşitli yerlerinde yara iyileşmesinde zorluklarla karşılaşıldığı için, bu bölgelerde random flepler denenmiştir (18) .

19. yy'a kadar bir süreçte bu bilgilerin hepsi unutulmuş, durağan süreç başlamıştır. Carpué alın fleplerini başarılı bir şekilde kullanması ile 20. yy'da yeniden ilerleme dönemine girilmiş ve ilk kez random tüp flepler kullanılmaya başlanmıştır. Yine bu dönemde fleplerde delay ile flep yaşamını arttırma prosedürü yapılmaya başlanmıştır. Carl Manchot, bir Alman anatomist, 1889'da deride kanlanmayı sağlayan anatomik bölgeleri tanımlamıştır (19). Tansini 1906'da latissimus dorsi muskulokutan flebi tanımlamıştır (20).

1950-1975 yılları arasında dönemin en önemli gelişmesi McGregor ve Morgan tarafından random ve aksiyel paternli flep kavramlarının ortaya atılması ve tam olarak açıklayamasalar dahi aralarında bazı farkların olduğunu belirtmeleridir. Fasya-deri ve kas-deri fleplerindeki hızlı gelişmeye ek olarak ameliyat mikroskobunun kullanıma girmesiyle birlikte serbest doku aktarımları gündeme gelmiştir (21).

1977'de Ger Atlanta'da ilk kez kas ve kas-deri fleplerini, 1981'de Ponten fasyokutan flepleri tarif etmiştir. 1981'de Mathes ve Nahai kas fleplerini vasküler anatomiye göre sınıflamışlardır (22) . 1987 de Taylor anjiozomları tarif etmiştir (23).

Fleplerin Sınıflandırılması

Flepler; taşınma şekli ya da hareket kabiliyetine göre, dolaşım şekline göre ve içerdiği dokuya göre tiplendirilirler (18,21,24,25).

Fleplerin taşınma ilkesine göre sınıflandırılması

Flepler taşınma şekline göre lokal ve uzak flepler olarak ikiye ayrılır.

Lokal fleplere; iletme flepleri, transpozisyon flepleri, rotasyon flepleri, interpolasyon flepleri örnek olarak gösterilebilir. Serbest flepler ve uzak pediküllü flepler uzak flepler sınıfına girer.

Fleplerin içerdiği doku tipine göre sınıflandırılması

Cilt flepleri, fasya, fasya-cilt flepleri, adipofasyal flepler, kas ve kas-cilt flepleri, kemik dokusu içeren flepler, üç farklı dokuyu beraber içeren flepler olarak isimlendirilirler.

Fleplerin dolaşımına göre sınıflandırılması

Deri flepleri McGregor ve Morgan tarafından dolaşımına göre random paternli flepler ve aksiyel paternli flepler olarak ikiye ayrılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1: Deri flebinin dolaşıma göre sınıflandırılması

Random paternli flep	Flep dolaşımını besleyen dominant, belirgin bir pedikül yoktur. Flep, dermal subdermal pleksus tarafından beslenir.
Aksiyel paternli flep	Flebin içinde boylu boyunca seyreden spesifik direkt kutanöz arter yani tanımlanmış anatomik arteriyel-venöz damarlar içerirler.

Fasya-cilt flepleri, flebi besleyen perforatör damarların kaynağına göre iki sınıflandırma yöntemiyle üçe ayrılır (Tablo 2).

Tablo 2: Deri flebinin dolaşıma göre sınıflandırılması

Cormack-Lamberty Sınıflaması	Nahai- Mathes Sınıflaması
Tip A: Birden çok perforatörden beslenir.	Tip A: Direkt deri perforatöründen beslenir.
Tip B: Tek bir perforatörden beslenir	Tip B: Septokutanöz perforatörlerden beslenir.
Tip C: Segmental perfotörlerden beslenir.	Tip C: Muskulokutanöz perforatörlerden beslenir.

Kas, kas-deri flepleri ise Nahai- Mathes sınıflamasına göre 5 tipe ayrılır (Tablo 3).

Tablo 3: Kas, kas-deri flebinin dolaşıma göre sınıflandırılması

Tip 1	Tek vasküler pedikül: Kasa tek bir vasküler pedikül girer. Örnek: M. Vastus lateralis, m. Abductor digiti minimi, m.anconeus
Tip 2	Dominant vasküler pedikül(ler) ve minör vasküler pedikül(ler): Bu flebin kullanılabilmesi için dominant pedikülün korunması ve minör pediküllerin bir kısmı veya tamamının kesilmesi gerekir. Örnek: M.gracilis, m.brachioradialis
Tip 3	Dominant pediküller: Geniş iki pedikül vardır ve her biri tek başına kası besleyebilir. Örnek: G. maksimumus, m.orbicularis oris
Tip 4	Segmental vasküler pediküller: Kas boyunca giren genellikle eşit büyüklükte segmental pediküller vardır. Her segmental pedikül kasın bir segmentini besler. Örnek: M.sartorius, m.tibialis anterior
Tip 5	Dominant vasküler pedikül ve sekonder segmental vasküler pediküller: Kasın geniş bir pedikülü vardır ve pedikül kası besler. Örnek: M.latissimusdorsi, m.pectoralis major

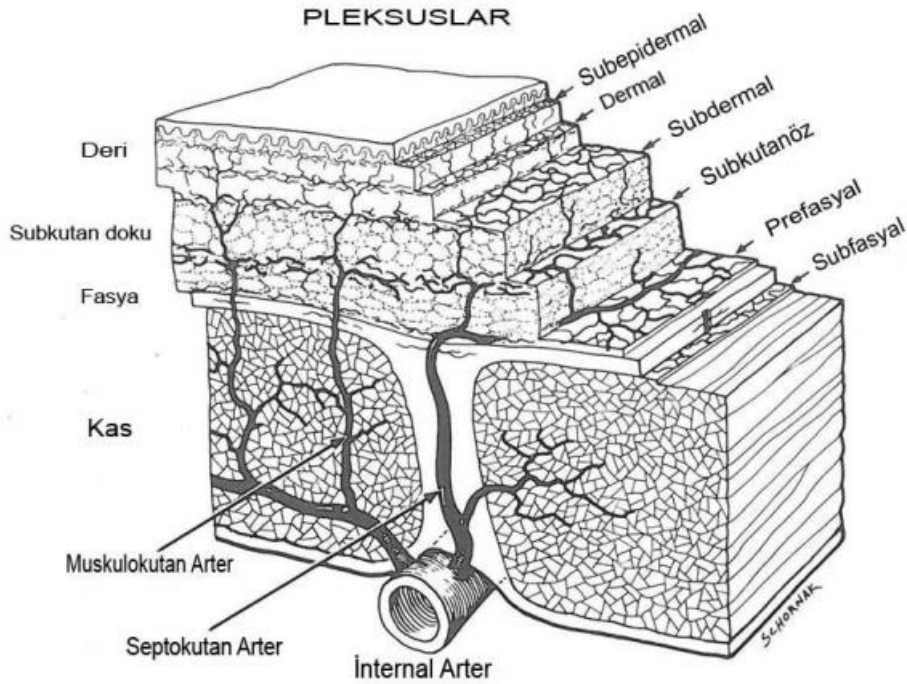
Flep Fizyolojisi

Flepleri greftlerden ayıran en önemli özellik intrinsek dolaşımlarının olmasıdır, bu nedenle flepler kritik doku kayıplarının rekonstrüksiyonunda kullanılmaktadır. Flep dolaşımının iyi bilinmesi cerrahi başarıyı arttırmak açısından büyük önem taşır.

Fleplerin de diğer dokular gibi makro ve mikro dolaşımları mevcuttur. Makrodolaşım flebi besleyen ana arter ve venler sayesinde sağlanır. Makrodolaşımın anatomisi flebin tanımlanmasında ve tasarımında kullanılır. Flebin ana arteriyal

akımı ve venöz geri dönüşü mikrodolaşım yatağı tarafından oluşturulur, böylece flebin beslenmesi ve oksijen ihtiyacı karşılanırken karbondioksit ve metabolik atıkların flepten uzaklaştırılması sağlanmış olur. Bu mikrodolaşım düzeyi arterioller, venüller, kapiller damarlar ile arteriovenoz anastomozlar seviyesindedir ve perfüzyon kontrolünün en fazla olduğu, asıl metabolik değişimin gerçekleştiği yerdir (26,27).

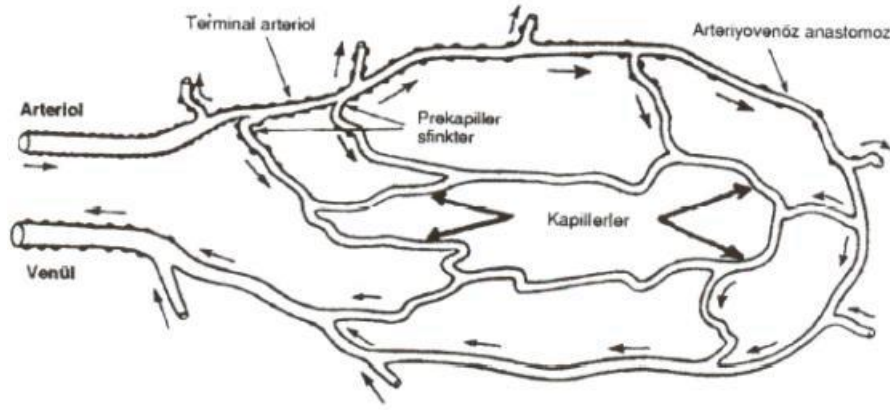
Derinin beslenme alanları ile ilgili topografik tasvir çalışmaları ilk olarak bir Alman anatomist Manchot tarafından 1889'da kadavrular üzerinde yapılmıştır. 1983'de Spalteholz kaslar ve sonrasında fasyal septalar arasından deriye ulanan arteriyel sistemleri tanımlamıştır (28). Bu çalışma da fasyokutanöz ve muskulokutanöz fleplerin temelini oluşturmuştur. Bu çalışmalar anatomik temelde açıklayıcı, ancak potansiyel bölgesel vasküler perfüzyon hakkında yetersizdi. Periferik vasküler topografik çalışmaları Manchot ve Salmon, Taylor ve arkadaşları yapmışlar ve anjiyozom konseptini tanımlamışlardır (23) (Şekil 1).



Şekil 1: Derinin kan dolaşımı. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and Physiology of Skin Flap Surgery. In: McCharty JG, Saunders WB. Plastic surgery. Philadelphia: 1990: 282

Cilt mikrodolaşımı yüzeysel, derin ve orta pleksus olmak üzere üç pleksus ile sağlanır (29). Yüzeysel pleksusda arteriyel ve venöz yapılar bulunur, doku beslenmesi

bu tabakadan sağlanır. Arteriyo-venöz şantlar (AV şantlar) derin pleksus seviyesinde bulunur. İki pleksus arasında bulunan ve orta pleksus adını verebileceğimiz pleksusda ise venöz komponent ağırlıklıdır. Deriye gelen kan akımının kontrolü arteriyoller düzeyindedir. Sempatik sistem arteriyoller ve AV şantlardaki düz kas tonusunu düzenleyerek etki gösterir. Her üç pleksusun en önemli görevlerinden biri ısı regülasyonu diğeri ise yara iyileşmesine yeni damar oluşumunu sağlayarak katkıda bulunmalarıdır. Yaşlanma, radyasyon, sigara ve yanıklar mikrodolaşımı olumsuz etkilerler. Mikrodolaşımın olumsuz etkilendiği her durum flep yaşayabilirliğini azaltacaktır (Şekil 2).



Şekil 2: Derinin Mikrodolaşımı

Deri ve derin dokuları besleyen bir ana arterin oluşturduğu alan “anjiozom kavramı” olarak tanımlanır. Anjiozom olarak adlandırılan 3 boyutlu anatomik vasküler alanlar deri ve kemik arasında uzanan bir kaynak arter (segmental veya dağıtıcı) ve buna eşlik eden ven(ler) tarafından beslenir. Her anjiozom eşleşen arterizom (arteryel alanlar) ve venozom (venöz alanlar) alt gruplarına ayrılabilir. Anatomik çalışmalar vücutta yaklaşık 374 ana perforatörün olduğunu dolayısıyla henüz tanımlanmamış pek çok potansiyel deri flebi alanının olduğunu göstermektedir. Anjiyozom kavramı dinamik bir kavramdır. Her anjiyozom yanındaki anjiyozom ile ya bağlantı halindedir ve anastomoz yapar buna “true anastomoses” denir ya da kalibrasyonu incelererek diğeri anastomoz ile bağlantı kurar, buna da “choke anastomoses” adı verilir. Flep “delay” prosedürü uygulandığında “choke anastomoses”, “true anastomoses” kalibrasyonuna dilate olurlar. Bir sonraki

aşamada Taylor ve Minabe vasküler bölgeleri tam olarak tanımlayabilmek için Salmon'un "retiform anastomoses" kavramını "choke anastomoses" kavramı ile birleştirmişlerdir. Arteriyel sisteme eşlik eden venöz bağlantıların ("oscillating veins") olduğunu söylemişlerdir. Bu venlerin kapaksız venler olduğu ve her iki yönde kan akımına olanak sağladığı belirtilmiştir. Bu sayede ters akımlı flepler dizayn edilmiş ve fizyolojileri açıklanabilmiştir (30) .

Deri kan akımının ana düzenlenmesi arteriolar düzeydedir. Sempatik tonus, prekapiller sfinkterler, arterioller ve arteriovenöz anastomozlardaki akımı düzenler. Lokal ya da sistemik sempatik tonusa cevap olarak prekapiller sfinkterlerin kontraksiyonu, kan akımının kapiller yatağı arteriovenöz anastomozlar aracılığıyla by-pass etmesine neden olur. Bunun dışında flep kan akımı; sistemik santral kan basıncı ve mikrodolaşımdaki endotel, trombosit, kan hücreleri gibi hücrel faktörlerden de etkilenir.

Flep Kan Akımının Ayarlanması

Deri kan akımı sistemik ve lokal etki mekanizmaları ile kontrol edildir. Sistemik kontrol nöral ve humoral regülasyonun kontrolü altındadır. Nöral regülasyon predominanttır ve primer olarak sempatik fiberler ile a-adrenerjik reseptörler üzerinden vazokonstriksiyon yaparak; β -adrenerjik reseptörler üzerinden vazodilatasyon yaparak etki ederler. Ek olarak a-adrenerjik reseptörler arteriovenöz anastomozlar üzerinde bulunurlar ve vazokonstriksiyon yaparlar. Bu mekanizma sayesinde, arteriyol ve arteriovenöz anastomozlarda bulunan düz kasların tonusu değiştirilerek regülasyon sağlanır (31).

Humoral regülasyonda sistemik vazoaktif maddeler spesifik reseptörleri üzerinden etkilidirler. En önemlilerinden epinefrin ve norepinefrin (NE) a-adrenerjik reseptörler üzerine etkir ve vazokonstriksiyon yaparlar. Kortizol ise bu yolları dolaylı olarak etkileyerek görevini yapar (31).

Endojen vazoaktif maddeler ise kendilerine spesifik reseptörler üzerinden etki gösterir. Serotonin, tromboksan A2 (TXA2), prostoglandin F2a (PGF2a) vazokonstriksiyon yaparken; prostoglandin E1 (PGE1) prostoglandin I2 (prostosiklin), histamin, bradikinin, lökotrien C4 ve D4 vazodilatasyona neden olmaktadır (31).

Kan akımının lokal kontrolü başka deyişle otheregölasyonu, vücudun pek çok bölgesinde kontrol mekanizmasıdır. Özellikle metabolik hızın yüksek olduğu kas iskelet sistemi bu şekilde idare olunur. Hiperkapni, hipoksi, asidozis gibi metabolik faktörler vazodilatasyon nedenidirler. Ek olarak fiziksel faktörlerin pek çoğu da kan akımı regölasyonunda etkilidir. Artmış doku perfüzyon basıncı “myojenik refleks” i tetikler. Bu da vazokonstriksiyon ile sonuçlanır. Lokal hipotermi lokal kan akımını azaltarak direk vasküler düz kaslara vazokonstriktör etkide bulunur. Hipertermide bunun tersi etkidedir. Reolojik (akış bilim=maddenin sıvı halini inceleyen bilim dalı) faktörler sadece anormal kondisyonlarda kan akımına etkilerler (27,31).

Flep Kaybı Ve İskemi Reperfüzyon Hasarı

Fleplerin bazılarında distal veya periferal nekroz oluşması, bazılarında ise flepte total sağ kalımın sağlanması fleplerin doğal kan akımlarına ve iskemi toleransına bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Fleplerde nekrozun flep distalinde gerçekleşmesinin nedeni, elevasyon sonrası perfüzyon basıncının en düşük olduğu yerin flep distali olmasıdır. Fleplerde distalde arteriyollarda vazokonstriksiyon da bu sürece katkıda bulunmaktadır. Flep elevasyonu sonrası besleyen damarlar ve sempatik sinirler flepten ayrılır. İlk 12-18 saat içinde dramatik olarak flep distalinde kan akımı azalır. Kan akımı azalması sonrasında vazokonstriktör madde salınımları nedeni ile akım daha da azalır. Sempatik nörotransmitterler 12-24 saat içerisinde tükenirler. 2-3 gün sonra da flep yatağından revaskülarizasyon meydana gelir. Flep distalinde bulunan iskemi 6-12 saat boyunca devam ederse dolaşım sağlandığında reperfüzyon yaralanması nedeni ile mikrovasküler kapanma meydana gelir ve genellikle dokularda nekroz gelişir (30).

Kihiabani ve Kerrigan yaptıkları çalışmada iskemi sonrası reperfüzyon yaralanması olayında kas ve deri fleplerinde farklılıklar tespit etmişlerdir. Kas fleplerinde reperfüzyon sonrasında erken hiperemik fazda vazoaktif maddeler etkisi ile kan akımının arttığını gösterirken, yine bu vazoaktif maddeler nedeni ile deri fleplerinde vazokonstriksiyon olmaktadır (32,33).

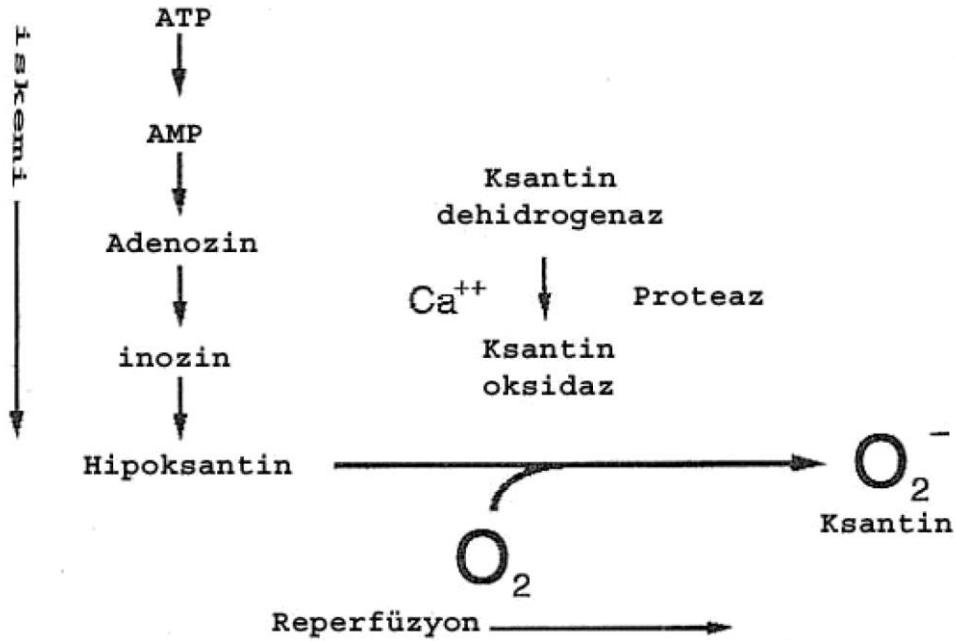
Arteriyel yetmezlikler flep nekrozunda oldukça önemli olmasına rağmen venöz dönüşte oldukça önemlidir. Serbest doku nakillerinden sonra venöz oklüzyona bağlı flep kayıpları daha ön plana çıkmaktadır (34). Yapılan hayvan çalışmalarda sekonder iskeminin primer iskemiye oranla flep kaybında daha kötü sonuçlar doğurduğu bilinmektedir.

Kerrigan ve ark.'ları, üç durumda flebin tamamının nekroza gideceğini bildirmişlerdir. Bunlar; intrinsik kan akımından daha geniş hazırlanmış flepler, arteriyel tromboz ve venöz tromboz olarak sıralanmaktadır. Random ya da aksiyel tasarımlı pediküllü fleplerde tromboz genellikle hatalı flep planlaması sonucunda mikrodolaşımda düşük akım paterninin gelişmesine, iskemi reperfüzyon hasarına, mikrodolaşımı etkileyen sistemik faktörlere (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstriktörler) ya da flebin fiziksel kompresyonuna (uygun olmayan adaptasyon, king, hematoma) sekonder olarak ortaya çıkar (33).

Flebin kaldırılmasından sonra özellikle flebin iskemik distal kısmında çok sayıda ve ileri derecede metabolik değişiklikler ortaya çıkar. İskemik dokularda oksijen düşüşü ile anaerobik metabolizma hızlanır, glikoz ve Adenozin-Tri-Fosfat (ATP) seviyelerinde hızlı düşüş, buna karşın karbondioksit ve laktik asit seviyelerinde artış meydana gelir. Prostaglandin ve tromboksan düzeyleri ciddi şekilde yükselir. Glikoz ve glikojen tüketimi flebin iskemik ancak yaşayan bölümlerinde, iskeminin derecesine göre artış gösterir. Glikoz tüketimi 3. günde pik yapar ve 7. günde normale döner (30).

İskemik kalan dokuda oksijen yetersizliği nedeniyle aerobik solunumun yerini anaerobik solunum alır, hücresel oksidatif fosforilasyon durur ve buna bağlı olarak ATP ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır (35). Dokuda hücresel yaşamın devamı için gereken enerjiyi sağlamak için çok daha fazla substrat kullanılmaya başlar buna sekonder olarak da dokuda karbondioksit (CO₂) ve laktik asit gibi hücresel atıklar birikir. Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan sodyumpotasyum ATPaz (Na-K-ATPaz) pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde sodyum (Na) ve kalsiyum (Ca) konsantrasyonları artar (36). Hücre içinde Ca konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir (37). Bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile ve hücre zarındaki fosfolipidlerin

katabolizmasının başlaması nedeniyle proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış oluşur. İskemi döneminde ATP üretimi anaerobik yolla oldukça azalarak devam ettiği halde hücrel kullanımı devam ettiği için ATP'nin yıkım ürünleri olan AMP (adenozin-mono-fosfat) ve adenozin miktarı artar. Adenozin ise hücre dışında inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP ve fosfokeratin) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine hücre içinde inaktif durumda olan proteazların aktive olarak ksantin dehidrojenazın (KDH), ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar (38). Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle KDH, KO'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır. Sonuç olarak toksik süperoksit radikallerinin oluşumu da artar (39) (Şekil 3).



Şekil 3: Reperfüzyon sırasında direkt olarak hücrel hasar oluşturabilen toksik oksijen radikallerinin oluşumu

İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir.

İskemi reperfüzyon hasarını oluşturan dört ana bileşen:

1. Serbest oksijen radikalleri,
2. Polimorf nüveli lökositler (PNL),
3. Kompleman sistemi,
4. Endotel hücreleridir.

Serbest oksijen radikalleri

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar bir atom veya molekülde birbirlerini eşleyecek miktarda buldukları için atom veya molekül stabildir; ancak moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı oluşması molekülü reaktif hale getirir. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve hücrel mekanizmalarla olası zararlı etkileri önlenir. Hücrelerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranıdır (40).

Solunumla alınan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i de serbest radikallere dönüşmektedir . Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H₂O₂)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir. H₂O₂, katalaz (KAT) veya glutatyon peroksidaz (GSH- Px) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür veya Fenton reaksiyonu sonrası hücre için çok toksik olan hidroksi (OH⁻) molekülü oluşur. Hidroksil radikali negatif yüklü olması nedeni ile DNA, 21 protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Membran lipitlerinin peroksidasyonu ve hücre zarının sekonder olarak permeabilitesinde artma, hücrel proteinlerde çapraz bağ oluşumu ile proteinlerin yapı ve fonksiyonunun bozulması, DNA'nın yapısında bulunan timin

ile reaksiyona girerek sarmal yapının kırılması serbest radikallerin hücre içinde oluşturduğu etkilerdir. Süperoksit radikalleri (SOR) aynı zamanda PNLler için kemotaktik özellik gösterir (41).

Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde endotel hücrelerinde NO oluşumu azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF α gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur (41).

Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik yapılan çalışmalar, reperfüzyonda vasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir (42,43). İ-R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit adezyonu meydana gelir (44). İskemi reperfüzyon hasarında PNLlerin rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (42,43). Bunlar:

- 1) Mikrovasküler oklüzyon,
- 2) SOR salınması,
- 3) Sitotoksik enzim salınması,
- 4) Vasküler permeabilite artışı,
- 5) Sitokin salınmasında artış,
- 6) Apoptozun tetiklenmesi.

Yapılan son çalışmalarda, nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur (45). PNLler damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktive olmuş trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya neden olurlar (46). İskemi arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Sonuç olarak dokuya tekrar kan akımı sağlansa bile bu tıkaçlar dolaşımın hücrelere

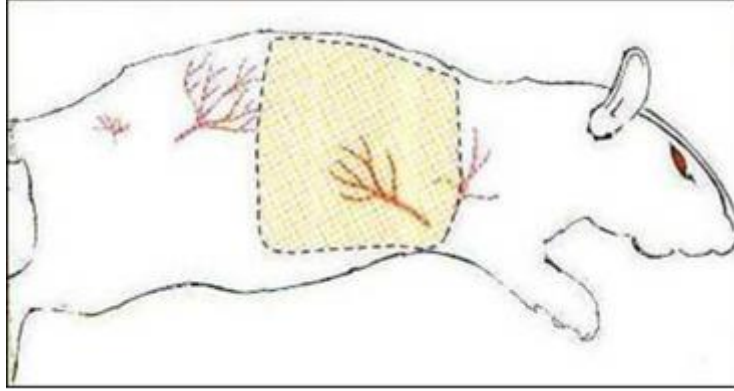
ulaşmasını engelleyebilirler (46). Serbest radikallerin oluşumunda ve İ-R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerirler(47,48). Bu enzimler oksidatif doku hasarında önemli roller üstlenir. PNLlerin aktivasyonu ile PNL sekonder granüllerden salınan apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (47,48) . Bu da kısır döngünün bir parçasıdır.

Hayvan Modeli Ve Toraks Arkası Deri Flebi

Şıçan sırtından hazırlanan flep modeli, ilk olarak 1965 yılında Robert McFarlane ve ark.' ları tarafından tanımlanan kranial tabanlı yarımada şekilli sıçan sırt deri flebidir. O yılların gözde konularından biri olan “geciktirme kavramını” araştırmak üzere geliştirilmiş olan bu model “random” dolaşım paternine sahip kabul edilmiş ve sonraki yıllarda çeşitli araştırmalarda kabul görmüştür. Flep beslenmesinin özellikle flep geciktirme kavramının araştırıldığı modellerde standart bir nekroz alanının bulunması ve kolay hazırlanması nedeniyle bu flep sıkça tercih edilmiştir. Fleplerin vasküler temelinin daha iyi anlaşılması ile random tasarımı fleplerin rekonstrüktif cerrahide kullanımı azalmış, yerine aksiyel tasarımı deri fleplerinin kullanımı artmıştır.

Toraks arkası flebi, Shamsuddin Syed ve arkadaşları tarafından 1992 yılında tanımlanmıştır. Sıçanlarda yaptıkları çalışmada, damar içine boya vererek kutanöz maksimus kası üzerinde bulunan daha geniş bir deri bölgesinin lateral torasik arterden kan alabildiğini göstermişlerdir. Lateral torasik-ortak torasik- aksiler damar sisteminden kan alan bölge toraks sınırlarını biraz aşmakla birlikte bu flep daha küçük planlanır. Flebin süperior kısmı skapula ucu, aşağıda toraks alt kenarı, medialde sırt orta çizgisi, lateralde ise ön koltuk altı çizgisi arasında kalan kabaca dikdörtgen biçimli bir alandır. Flebin kranial, kaudal ve medial kenarları kesilip derin kaslar üzerindeki gevşek plandan disseksiyon yapılıncaya flebin alt yüzünde bulunan lateral torasik arter dallarının dağılımı görülür. Bunları izleyerek aksillaya doğru pedikül güvence altına alınarak disseksiyona devam edilir. Bu bilgiler ışığında

çalışmamızda lateral torasik arter pediküllü aksiyel paternli deri flebi kullanılmıştır (49) (Şekil 4).



Şekil 4: Lateral torasik arter pediküllü aksiyel paternli deri flebi

KÖK HÜCRE

Kök hücre tanımı ve türleri

Kök hücreler, uygun biyokimyasal sinyallerin varlığında farklı hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip hücrelerdir. İlk kök hücre izolasyonu Evans ve ark. tarafından 1981 yılında gerçekleştirildi (50). Kök hücre tanımı bugünkü anlayışımıza 1961 yılında Till ve Mc Culloch'un irradiye edilmiş farelere sinjeneik türden kemik iliği verdiği zaman fare dalakları üzerinde oluşan kolonileri tanımlamaları ile gelmiştir. Kemik iliği nakli yapılan farelerin dalaklarında mikroskopik olarak belirlenmiş eritroid, miyeloid ve megakaryositik serilere farklılaşabilen kolonilerin varlığının gösterilmesi, bu kolonilerin multipotansiyel kök hücreyi ifade edebileceği görüşünden hareketle bu kolonilere Colony Forming Unit-Spleen (CFU-S) adı verilerek multipotansiyel kök hücrenin tanımı yapılmıştır (51).

Kök hücrelerin sınıflandırılması

Kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerine göre hiyerarşileri vardır; totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olarak adlandırılabilir. Bu hücreler embriyo, embriyo-sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo-dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanır (52,53).

Totipotent Hücre: Erkeğin spermi ile kadının yumurtası birleştiğinde yani döllenme meydana geldiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu hücrelere her şeyi

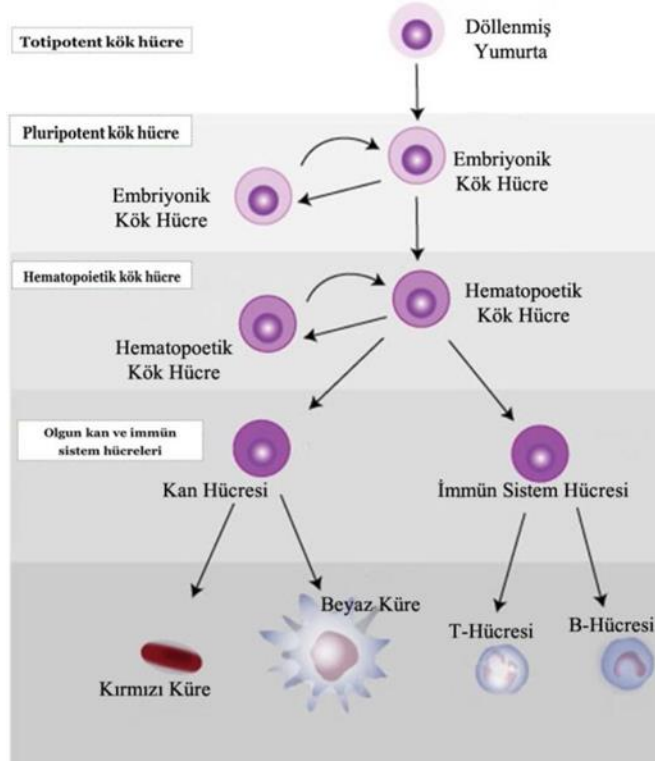
yapabilen anlamına gelen totipotent hücre denir. Döllenen sonraki ilk 4 gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücredir ve sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir (52).

Pluripotent Hücre: Fertilizasyonun yaklaşık beşinci gününde, yaklaşık 150 hücreden oluşan ve içi sıvı ile dolmaya başlayan kistik bir yapı oluşur. Bu yapı blastokist olarak adlandırılır. Blastokisti oluşturan bu hücreler mezoderm, endoderm ve ektodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine dönüşebilme potansiyelindedir. Bu özelliğe sahip hücrelere de pluripotent hücreler denir. Vücuttaki bütün dokuları ve trofoblastları oluşturabilir ancak bir bireyi meydana getiremez (54).

Multipotent Hücre: Hayatın ilerleyen dönemlerinde yerleştikleri dokunun hücre tipini üreten daha özelleşmiş olan bu tip kök hücreler multipotent yetişkin tip kök hücreler olarak adlandırılır. Yetişkin kök hücre bir doku ya da organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olup kendisini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku ya da organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir (52,53).

Oligopotent hücre: Lenfoid ve myeloid hücrelerde olduğu üzere sadece birkaç hücre grubunu oluşturan kök hücrelerdir (52).

Unipotent hücre: Kemik iliği, Kas ana hücrelerinde olduğu üzere bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir (52). Erişkin kök hücreler olarak da isimlendirilirler. Doğumdan sonra dokulardan elde edilen, kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Kemik iliği, kan, beyin, yağ, kas, karaciğer, pankreas, diş, umbilikal kord kanından elde edilebilirler (54). Bu kök hücreler, kaynak dokusunda bulunan hücre topluluğunun çok az bir kısmını oluştururlar (Şekil 5).



Şekil 5: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması

Mezenkimal Kök Hücreler

Köken aldığı doku dışında pek çok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip multipotent kök hücrelerdir. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) ilk olarak Friedenstein ve Petrakova tarafından tanımlanmışlardır (55). MKH henüz diferansiye olmamış multipotent hücreler olup en çok çalışılan MKH'ler kemik iliği kaynaklı olanlardır. Kemik iliği yanı sıra cilt, amniyotik sıvı, sinovyal sıvı, umbilikal kord kanı veya yağ kaynaklı MKH'ler de mevcuttur. MKH'ler kemik, kıkırdak, kas, kemik iliği stroması, tendon, ligament, yağ ve diğer bağ doku elemanlarına dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir (56,57). MKH'ler, kültürde izolasyon ve ekspansiyonlarının kolay olması, multipotent özellikleri, migrasyon özellikleri, immünmodülatuar etkileri ve tedavi amacıyla kolayca çoğaltılabilmesi sebebiyle ciddi araştırma ve kullanım alanı bulmaya başlamıştır.

MKH'lerin gönderildiği ortamdaki hücrelere dönüşebilme kabiliyeti sonrası iki adet kavram ortaya çıkmıştır. Dokuya özgün kök hücrelerinin, kaynak dokudan daha farklı bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine "erişkin kök hücre plastisitesi" denir. Transdifferensiyasyon ise, kök hücrelerin plastisite potansiyeli anlamında

kullanılan bir fenomendir. MKH'lerin plastisite yeteneği şimdiki kadar yapılan pek çok çalışmada kanıtlanmıştır (57,58).

MKH'lar tarafından salgılanan anjiogenik, antiapoptotik ve mitojenik faktörler hasara uğramış dokuların rejenerasyonu sağlar, yara iyileşmesini aktive eder, vaskularizasyonu artırır. Transforming growth faktör- β (TGF- β), hepatosit growth faktör, IL-1, IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, IL-11 bunlara örnek olarak gösterilebilir (59).

Mezenkimal kök hücre araştırmalarında gerçekleşen son 10-15 yıldaki gelişmeler birçok hastalıkta hücresel tedavi ve doku mühendisliği uygulamalarının önemli biyolojik araçları olacağını göstermektedir.

VASKULER STROMAL FRAKSİYON

Yağ Dokusu

Yağ dokusu, baskın hücre tipi yağ hücreleri (adiposit) olan bağ dokusunun özel bir tipi olup mezenkimal kökenlidir. Adipositler bağ dokusunda tek başına olabilecekleri gibi küçük gruplar halinde de bulunabilir (7). Yağ dokusu, zengin bir vasküler yatak ve sinir ağına sahip bir bağ dokusu ile tam olmayan lobüllere bölünmüştür. Adipositler, retiküler liflerden zengin ince ve ağ şeklinde bir yapı ile desteklenerek birbirlerine bağlanırlar. Yağ dokusunda bulunan hücrelerin yaklaşık üçte ikisi adipositlerdir. Diğer hücreler; çeşitli kan hücreleri, endotel hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve çeşitli farklılaşma evrelerinde olan öncül hücrelerdir (60). Yağ dokusu insanlarda ilk olarak embriyonal hayatın üçüncü ayından itibaren vücudun çeşitli bölgelerinde (yanak, boyun, omuzlar, kalça, perirenal) görülmeye başlar. İlk olarak içinde yağ bulundurmayan yoğun mezenkimal hücre kümeleri oluşur ve bunlar organize damar ağıyla sarılır. Kapillerlerin çevresinde yoğun yağ içeren öncü yağ hücresi kümeleri oluşur. Yağ dokusu gelişiminin son aşamasında yağ hücrelerinin boyutu artarken bunları çevreleyen septalar oluşur. Embriyogenez esnasında yağ dokusu oluşumu ile damar ağı oluşumunun sıkı bir ilişki içinde olduğu görülür. Yağ hücrelerinden salınan spesifik büyüme faktörlerinin anjiogenezi yönlendirmesi önemli bir konudur (7). Büyüme faktörlerine ek olarak salınan 'monobutyrim' yağ dokuya spesifik bir anjiogenez faktörüdür (12,61). Yağ dokusu adipositlerin içerdiği lipid damlacıklarına göre uniloküler (beyaz) ve multiloküler (kahverengi) yağ dokusu olarak sınıflandırılır. Beyaz adipositler sadece büyük bir

yağ vakuolüne sahiptir. Yağ asitlerinin depolanması ve kullanılmasından rol alırlar. Kahverengi adipositler multilokülerdir ve hücre içinde bol miktarda mitokondri vardır. Uyarıldıklarında depolanmış kimyasal enerjiyi ısıya dönüştürürler. Yağ dokusunun görevleri şunlardır; enerji depolama, yağda eriyen vitaminleri depolama, fiziksel koruma, ısı üretimi, adipokin (adipositokin) salınımıdır. Adipokinler yağ dokudan salınan protein yapısındaki maddeler olup endokrin, parakrin ve otokrin etkilere neden olurlar (7).

Vaskular Stromal Fraksiyon (VSF)

Vasküler stromal fraksiyon yağ dokudan özel tekniklerle elde edilen bir üründür. Yağ dokusu küçük parçalara bölündükten sonra kollajenazla muamele edilerek hücreler arası bağlantılar kırılır. Oluşan süspansiyon santrifüj edildiğinde üç kısma ayrılır; üstte olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserit, ortada olgun yağ hücreleri ve en altta VSF yer alır (Resim 1).



Resim 1: Vaskuler Stromal Fraksiyon

Vasküler stromal fraksiyon içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler bulunmaktadır (3). Vasküler stromal fraksiyon içerisindeki kök hücreler uygun ortamlarda çoğalabilmekte, farklılaşabilmektedir. Bu hücreler tedavi amaçlı doku yenilenmesinde büyük bir potansiyel oluşturmaktadır. Yağ dokudan elde edilen kök hücreler, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerle aynı işleve sahiptir. Yağ dokunun avantajı daha kolay bir yöntemle elde edilebilmesidir (38-40). Vasküler stromal fraksiyonun, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), ve transforming growth faktör - β (TGF- β) gibi anjiogenik ve antiapoptotik sitokinleri üretme potansiyeli vardır. Hipoksik ortamda vasküler stromal fraksiyondan VEGF salınımının belirgin derecede artmaktadır (5). Anjiogenez, yani yeni damar oluşumu, yara iyileşmesinde önemli bir basamaktır. Dokuların işlevlerini yerine getirebilmesi için kendilerine özgü damarlanma yapısına sahip olmaları gereklidir. Damar endoteli büyüme faktörü, endotel hücre büyümesinin güçlü bir uyarandır (41). Vasküler stromal fraksiyon içerisinde bulunan preadipositler adipojenik öncü hücre olmalarının yanı sıra mikrovasküler endotel hücrelerle parakrin etkileşim göstermektedir. Preadipositler tarafından salınan ‘monobutyrim’ bir anjiogenik faktör olup endotel hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (36,41). Vasküler stromal fraksiyon içerisinde bulunan bir diğer hücre grubu fibroblastlardır. Fibroblastların ana metabolik fonksiyonları, kollajen, proteoglikan ve elastin sentezidir. Fibroblastlardan salınan keratinosit büyüme faktörü (KGF) epidermal hücre büyümesini uyarır, TGF- β ise fibrozisi ve gerilim kuvvetini artırır, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) nötrofil, makrofaj, endotel hücrelerin çoğalmasını ve kemotaksisini uyarır (42).

Patricia A. Zuk çalışmalarında kullandığı liposakşın materyallerine İşlenmiş Lipoaspirat (PLA) adını vermiş ve tanım olarak VSF’den ayırmıştır. VSF içerisinde bulunan stromal progenitör hücreler, uygun şartlar ve mikroçevre altında adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik ve nörojenik farklılaşmaya uğrayabilmektedir. Mezoderm kökenli yağ dokusunda bulunan bu kök hücrelerin transdiferansiasyon özelliği, bu hücrelerin pluripotent olabileceğini düşündürmüştür (62).

Zuk ve ark. VSF'dan elde edilen ve çok yönlü (multi-lineage) farklılaşma yeteneğine sahip bu hücre grubuna erişkin yağ dokusu kaynaklı kök hücre (ADAS) adını vermişlerdir. Yapılan çalışmalarda PLA veya VSF'dan elde edilebilecek MKH sayısı, kemik iliğinden elde edilen MKH sayısı ile karşılaştırılmıştır. Kemik iliğinde MKH oranı 1/10.000-1/100.000 oranları arasında iken Zuk ve ark.ları yaptıkları çalışmada 300 ml PLA içerisinde 2-8 x 10⁸ kadar MKH çıkabileceğini tespit etmişlerdir (62,63).

Yine Brian ve ark. yaptıkları çalışmada yağ dokusunda bulunan her 100 nükleer hücrenin %1-2'si veya gram yağ dokusu başına yaklaşık 5000 hücrenin MKH olduğunu tespit etmişlerdir. Donör saha probleminin kemik iliğine göre minimal olması, işlemin kolay ve elde edilen MKH sayısının kemik iliği kaynaklı MKH miktarına göre çok daha verimli olması, yağ dokusunu değerli, verimli ve en popüler MKH kaynağı haline getirmiştir (64).

Stashower ve ark. yaptıkları çalışmada VSF ve PLA'tan elde edilen hücreleri karşılaştırmıştır. VSF içerisinde bulunan hücresel yoğunluk PLA'a göre daha fazla bulunmuştur. Bu hücresel yoğunluk mezenşimal progenitör hücrelerin membran belirteci olan CD34 ile tespit edilmiştir (65).

Eto ve ark.'ları da VSF ve PLA içerisinde bulunan hücrelerin miktarını ve yaşayabilirliğini karşılaştırmıştır. Aspirasyon yöntemi ile alınan yağ hücrelerinin travmaya bağlı olarak daha fazla hasarlandığı ve total hücre sayısının ölü hücre sayısına oranının daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (66).

Yani VSF, PLA'a göre daha yoğun MKH içermektedir. Bu da VSF'u klinik ve deneysel kullanımda kök hücre miktarı olarak daha değerli bir kaynak yapmaktadır. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler ile aynı morfolojik ve farklılaşma yeteneğine sahip olan yağ dokusu kaynaklı MKH'ler, birçok deneysel çalışmada da kullanılarak rejeneratif tıp içerisindeki yeri sağlamlaştırılmaya çalışılmıştır.

VSF'nin dokuda rejenerasyon, neovaskularizasyon gibi olumlu sonuçlarının olması flep sağkalımı üzerine de etkilerinin olacağını göstermektedir. Bununla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Sheng ve ark. yaptığı çalışmada sıçanların sırtından kaldırılan Mc Farlene flep modelinde VSF'nin flep sağkalımını artırdığı ortaya

konmuştur (8). Yine aynı şekilde Nan Xu ve ark. tavşan kulağından kaldırdıkları cilt flebinde venöz konjesyonun flepte yaptığı nekrozu VSF enjeksiyonu ile azalttıklarını ortaya koymuşlardır (67). In-Su Park ve ark. yaptığı çalışmada ışık-yayan diyot fototerapi (light-emitting diode phototherapy) ile adiposit kaynaklı stromal hücrelerin kombine ve tek tek kullanımında cilt flebi sağkalımını artırdığı üzerine yaptıkları çalışmada, stromal hücrelerin olumlu sonuçlarını görmüşlerdir (68).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 16/01/2015 tarih ve 60758568-020/2622 sayılı yazısı ile onay alınması sonrası çalışmanın yürütülmesi amacıyla Pamukkale Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'nden destek alındı.

Çalışma 40 adet 250-300 g ağırlığında Wistar suşu sıçanlar üzerinde yapıldı. PAÜTF Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanan hayvanlar yine aynı laboratuvarda 'PAÜTF Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş Esasları' doğrultusunda bakım ve değerlendirmeye alındı.

Sıçanlar uygun kafeslerde, 22 ± 20 C sıcaklıkta ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanların beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı. Sıçanlar basit rastgele örnekleme yöntemiyle her biri 9'ar adetten oluşan 3 gruba ayrıldı. Değerlendirme gruplarına dahil edilmeyerek istatistiksel değerlendirme dışında tutulacak sıçanlar, her iki taraf inguinal yağ yastıkçıkları yağ grefti olarak alınarak aynı kaptaki karıştırılarak vasküler stromal fraksiyon oluşturmak için kullanıldı.

ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI BÖLÜMLER

Tüm cerrahi işlemler steril koşullar esasları göz önüne alınarak PAÜTF Deneysel Hayvanlar Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Sıçanların radyoterapi planlaması PAÜTF Radyasyon Onkoloji Anabilim Dalı'nda planlanmış ve radyoterapi aynı merkezde uygulanmış; VSF elde edilmesi, hücre sayımı yapılması PAÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda ve materyallerin histomorfolojik ve immunhistokimyasal incelemeleri PAÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

RADYASYON UYGULAMALARI

PAÜTF Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda sıçanlara radyasyon verildi. Radyasyon verilmeden önce Tedavi Planlama Sistemi sayesinde sıçanların sağ toraks cildine verilmek istenen doz, Tıbbi Radyofizik Uzmanı tarafından planlandı.

Işınlama Planı

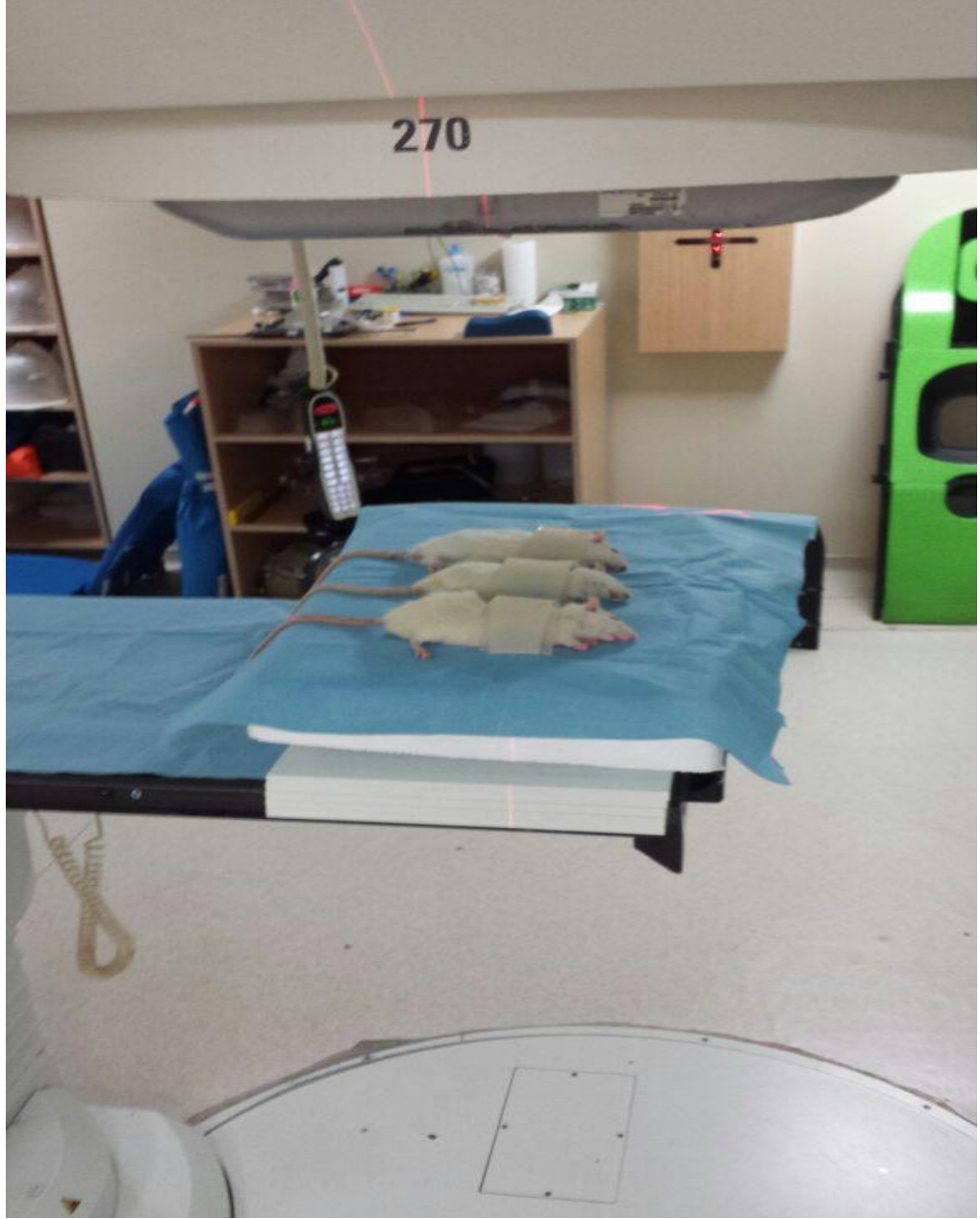
Tek fraksiyonda ve aynı anda 3 adet sıçanın ışınlanması planlandı. Sıçanlar, doz dağılımına olumsuz etki yansımayan bir köpük üzerinde ışınlandı. X- ışınlarının masadan geri saçılmasını engellemek amacıyla köpük altında 5 cm kalınlıkta dokuya eşdeğer fantom kullanıldı. Işın alanı, 30x4 cm² olacak şekilde açıldı. Radyasyon dozunu cilt üzerinde yoğunlaştırmak ve iç organlara ulaşan dozu azaltmak amacıyla 1,5 cm kalınlıkta dokuya eşdeğer 'Bolus' materyali kullanıldı (Resim 2). Bolus materyali sıçanların sağ toraks cildi üzerine gelecek şekilde yerleştirildi (Resim 3).



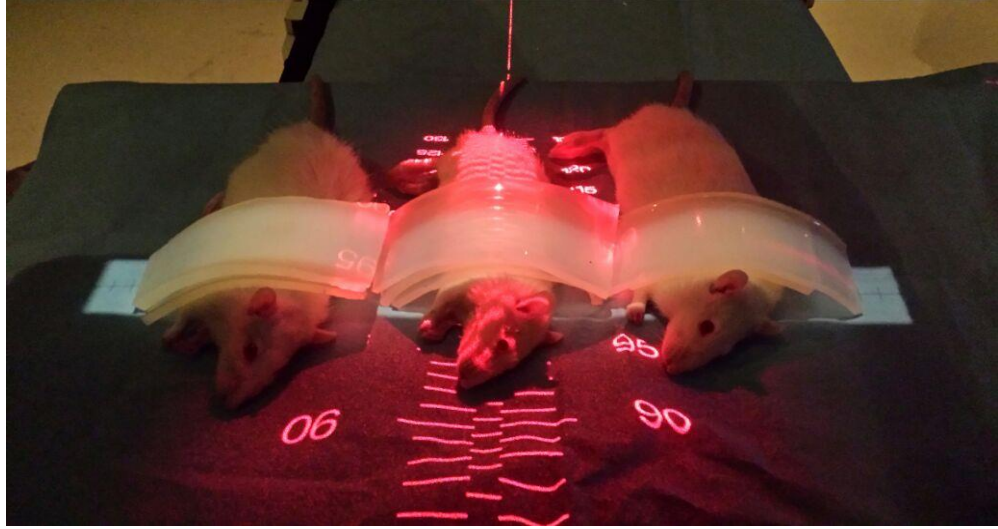
Resim 2: Bolus materyali

Sıçanların Işınlanması

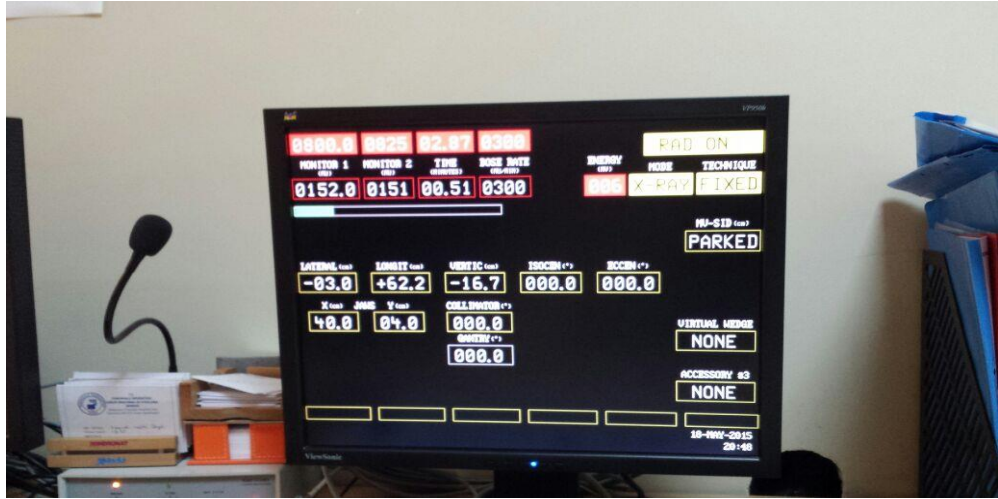
Anestezi altındaki sıçanlar, Siemens ARTİSTE lineer hızlandırıcı cihazın tedavi masasına yerleştirildi ve sıçanların üzerine 1,5 cm kalınlığındaki Bolus materyali koyuldu (Resim 3). Kaynak-cilt mesafesi (SSD), 98,5 cm olacak şekilde masa yüksekliği ayarlandı (Resim 4). Işın alanı izosentrda 30x4 cm² olacak şekilde açıldı ve sıçanların ışınlama pozisyonları ayarlandı. Lineer hızlandırıcı, 6 MV enerjili X-ışınlan ile planlama sonucu 2000 cGy'e karşılık gelen 1900 MU (Monitor Unit) verecek şekilde ayarlandı (Resim 5). Anestezi etkisinin azalmasına bağlı hareket etme riski olan sıçanlar bu süre içinde kameradan takip edildi (Resim 6). Tıraşlanma nedeniyle vücut ısıları düşen sıçanlar, anestezi süresi geçene kadar (yaklaşık 4 saat) ışık kaynağı altında ısıtılarak hipotermiden korundu. Anestezi etkisinin geçmesi ardından sıçanlar laboratuardaki ortamlarına yerleştirildi.



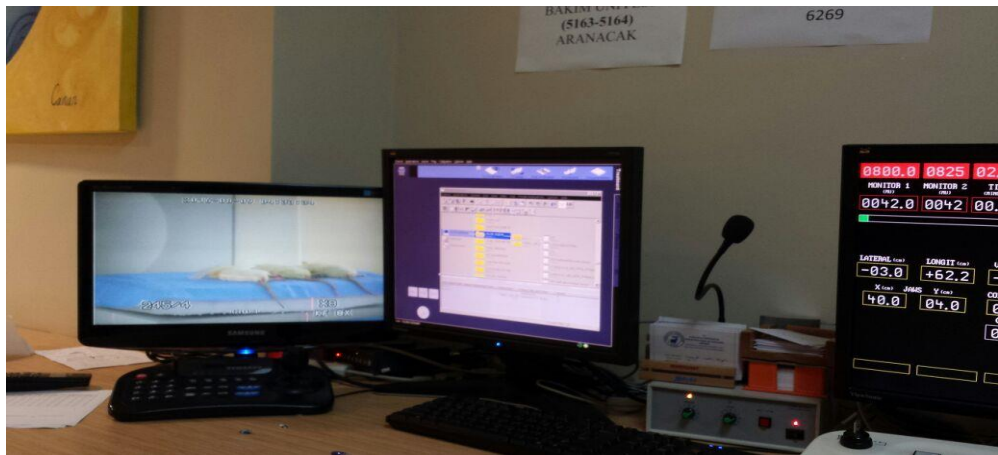
Resim 3: Sıçanların radyoterapi cihazına yerleştirilmesi



Resim 4: Işın alanı: 30x4 cm²; SSD:98,5 cm



Resim 5: Verilen ışının monitörden takibi



Resim 6: Sıçanların kameradan takibi

CERRAHİ İŞLEM

Cerrahi işlemler steril koşullarda PAÜTF Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Sıçanlar, hipotermiden korunmak amacıyla cerrahi işlemler sonrası anestezi etkisi azalana kadar ışık kaynağı altında ısıtılarak hipotermiden korundu.

Sağ Toraks Arkası Cilt Flebinin Kaldırılması

Tüm cerrahi işlemler, radyoterapili gruplarda ışınlamadan 7 gün sonra gerçekleştirildi. Sıçanlara 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi yapıldı. Anestezi altında sıçanların sağ toraks ve sırt bölgeleri traşlanarak cerrahi yapılacak saha ortaya çıkarıldı (Resim 7-8). Cilt kalemi ile süperior kısmı skapula alt ucu, aşağıda toraks alt kenarı, medialde sırt orta çizgisi, lateralde ön koltuk altı çizgisi arasında yer alan 4x7 cm'lik insizyon hattı işaretlendi (Resim 9). Cerrahi yapılacak alanda Polyvinylpyrolidone iod (batticon solüsyon) ile lokal saha temizliği yapıldı (resim 10). Flebin kranial, kaudal ve medial kenarları kesilip, deri ve pannikulus karnosusu içerecek şekilde 4x7 cm'lik sahaya künt diseksiyon yapıldı. Flebin alt yüzünde bulunan lateral torasik arter dallarının dağılımı görüldü (Resim 11). Grup 1'de kaldırılan cilt flepleri tekrar aynı sahaya 5/0 vicril ve 5/0 ipekle suture edildi (Resim 12). Grup 2'de (20 Gy radyoterapi almış) kaldırılan cilt fleplerinin tabanında yer alan lateral torasik arter dallarının etrafına 1 cc %0,9 NaCl (Sodyum Klorür) sıvısı infiltrasyonu yapıldı. Sonrasında flepler aynı sahaya 5/0 vicril ve 5/0 ipekle kontinyu suture edildi. Grup 3'de (20 Gy radyoterapi almış) kaldırılan cilt fleplerinin tabanında yer alan lateral torasik arter dallarının etrafına 1 cc VSF infiltrasyonu yapıldı. Sonrasında flepler aynı sahaya 5/0 vicril ve 5/0 ipekle suture edildi. Cerrahinin 7. günü tüm sıçanların flepleri suturasyon hattının etrafından total olarak eksize edildi.



Resim 7: Radyoterapi almış sıçanda cilt görüntüsü



Resim 8: Radyoterapi almamış sıçanda cilt görüntüsü



Resim 9: Flebin planlanması



Resim 10: Povidan iyot ile temizlenmiş cerrahi saha



Resim 11: Lateral torasik arter ve dalları



Resim 12: Sütürasyon sonrası flebin pozisyonu

Yağ Greftinin Alınması

Sıçanlara 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi yapıldı. Donör olarak hazırlanan anestezi altındaki 10 sıçanın inguinal bölgeleri traşlandı. Steril Polyvinylpyrolidone iod (batticon solüsyon) ile temizlendi. Sıçanlar sırt üstü yatırılarak alt ekstremiteleri traksiyona alındı. Rektus abdominalis kaslarının lateralleri belirlenerek her iki inguinal krize paralel olarak yapılan insizyon ile girilerek inguinal yağ yastıkçıkları eksize edildi (Resim 13). İnguinal yağ yastıkçığı içeren doku fosfat buffer solüsyonu içerisine koyuldu. Cilt 5/0 ipek ile sütüre edildi. Aynı işlem diğer inguinal bölgeye de uygulandı.



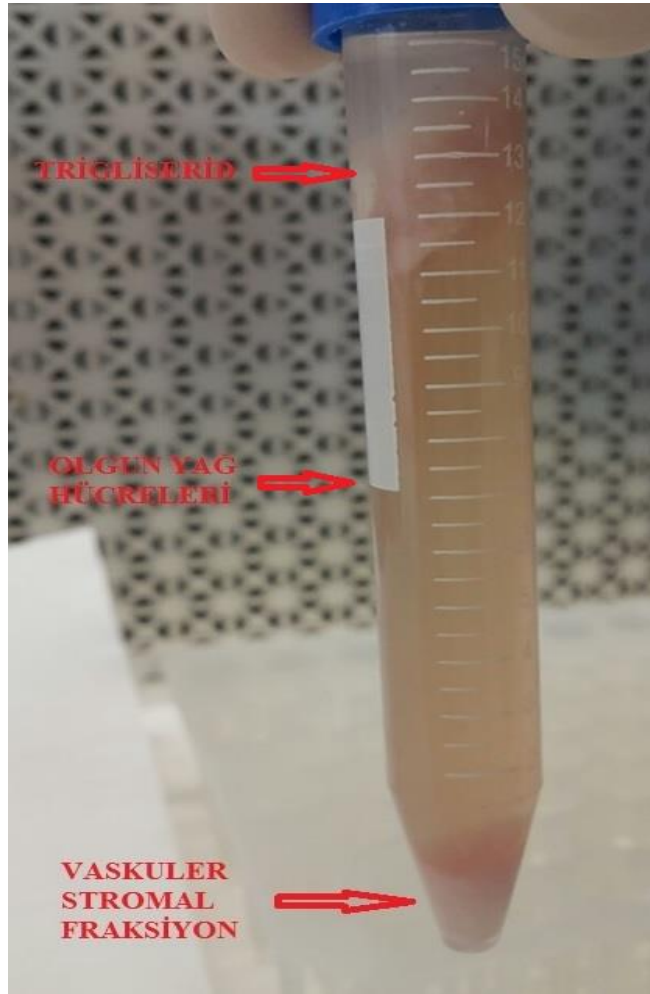
Resim 13: Sol inguinal yağ yastıkçığı

Vasküler Stromal Fraksiyon'un Elde Edilmesi

Elde edilen tüm yağ greftleri birkaç kez fosfat buffer solüsyon ile yıkandı. Yıkama sonrası yağ grefti, steril petri kabına konarak 20 nolu bistüri ve steril ince doku makası yardımı ile ince parçalara bölündü. Parçalanmış dokular, Fosfat buffer solüsyon (PBS, Sigma) içinde %0.1 olarak eritilen kollajenaz (Collagenase from Clostridium histolyticum C0130, Sigma) süspansiyonunun içine 1/1 (kollajenaz/yağ doku oranı ile) muamele edildi. Elde edilen karışım yavaş çalkalamalı su banyosunda 37°C de 60 dakika bekletildi. Fosfat buffer solüsyonla (PBS, Sigma) seyreltilerek kollajenaz uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonu 1800 rpm de on dakika santrifüj edildi.

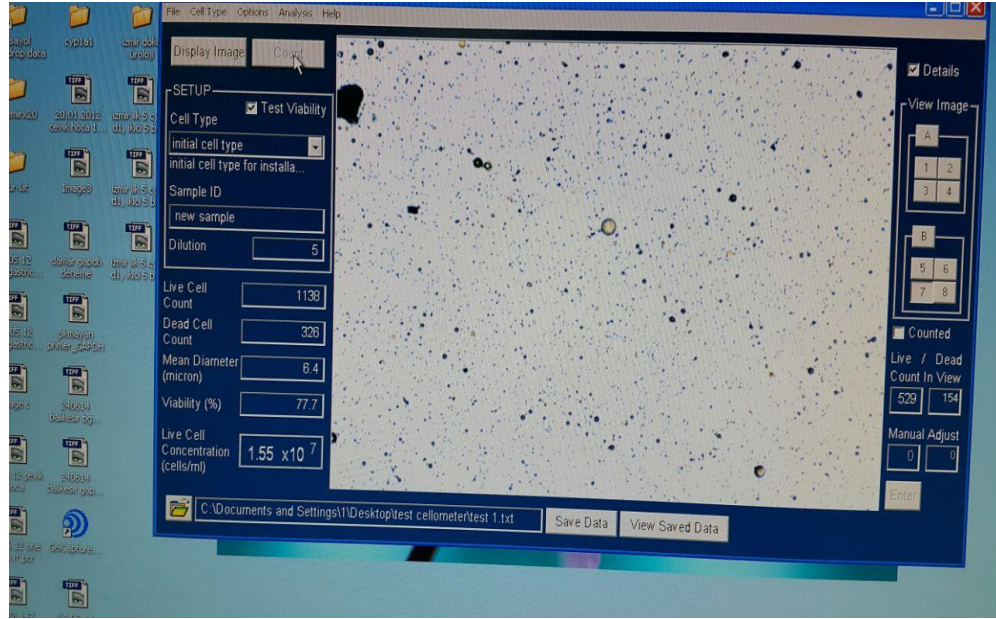
Altta kalan pallet kısmı bırakılıp üstteki doku artıkları aspire edilmesi sonrası palleti üstüne 10 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) konuldu. Oluşan yeni süspansiyon tekrar 1800 rpm de on dakika santrifüj edildi. Aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Toplamda 3 kez santrifüj işlem yapılmış oldu. Üstte matür adipositlerden oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonu önce 40 µm, sonra 100 µm çapa sahip hücre süzgeçlerinden geçirilerek büyük partiküller uzaklaştırılması sağlandı. Dibe çöken pellet kısmı filtreden süzülerek 'stromal vasküler fraksiyon' olarak kullanıldı (Resim 14).

Elde ettiğimiz VSF'de hücre sayımı için; 100 mikrolitre (µl) VSF, 400 µl PBS ve 1 µl tripan blue konularak çalkalandı. Oluşan karışımdan 20µl alınıp cellmetre lamına konulup hücre sayımı yapıldı. Yaklaşık olarak %77.7 canlılık oranı ile 1.55×10^7 cells/ml canlı hücre tespit edildi (Resim 15).



Resim 14: VSF; Tabanda kalan pallet

Elde edilen VSF, 3. Grupta bulunan her bir sıçanın lateral torasik arter etrafına 30 G' lik iğne ile 1 cc olacak şekilde nejektelerde edildi.



Resim 15: VSF'de hücre sayımı

GRUPLAR

Dokuz adet 250-300 g ağırlığında Wistar sıçanlardan oluşmuştur. Grup 1' de yer alan sıçanlar, sağ toraks arkası cilt flebinde yer alan değişikliklerin gösterilmesi ve grup 2 ve grup 3 ile kıyaslanması amacıyla dahil edilmiştir. Grup 2 ve 3' de yer alan sıçanlar 3-3-2-2 şeklinde gruplanarak Siemens ARTISTE lineer hızlandırıcının tedavi masasına yerleştirilerek planlamaya uygun olarak daha önce belirtildiği şekilde ve dozlarda radyoterapi uygulandı. Işınlanmış sıçanlar 7 gün süreyle takip edildi. 7 günlük sürenin sonunda tüm sıçanlara planlamaya uygun olarak lateral torasik arter ortaya konacak şekilde sağ toraks arkası cilt flebi cerrahi işlem prosedürü uygulandı.

Grup 1' de kaldırılan sağ toraks arkası cilt fleplerinin tümü herhangi bir işleme tabi tutulmadan tekrar aynı sahaya 5/0 vikril ve 5/0 ipekle suture edildi (Resim 16).

Grup 2' de bulunan sıçanların flep iç yüzüne, sağ lateral torasik arter ve dalları etrafına 30 G enjektör ile 1cc %0,9 NaCl (Sodyum Klorür) sıvısı infiltrasyonu; grup 3' de bulunan sıçanlara ise 1 cc VSF (Vaskuler Stromal Fraksiyon) infiltrasyonu

uygulandı (Resim 17-18). Uygulama sonrası flepler kaldırıldıkları sahaya 5/0 vikril ve 5/0 ipekle suture edildi (Resim 19).

Cerrahinin 7. günü tüm sıçanların cilt flepleri suturasyon hattının etrafından total olarak eksize edildi (Resim 20-21-22). Flep eksizyonlarının tamamlanması sonrası sıçanların tümü sakrifiye edildi.



Resim 16: Grup 1'de Lateral Torasik Arter Görünümü



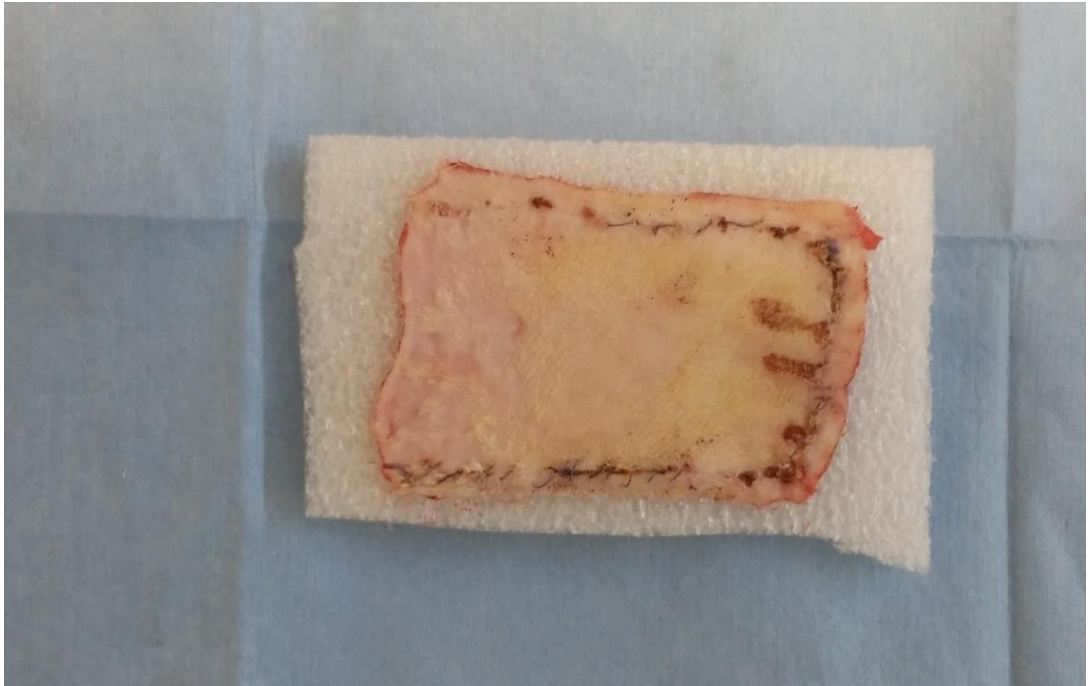
Resim 17: Grup 2 ışınlama yapılmış - sağ lateral torasik arter (ok ile işaretli)
Flep tabanında yaygın fibrozis



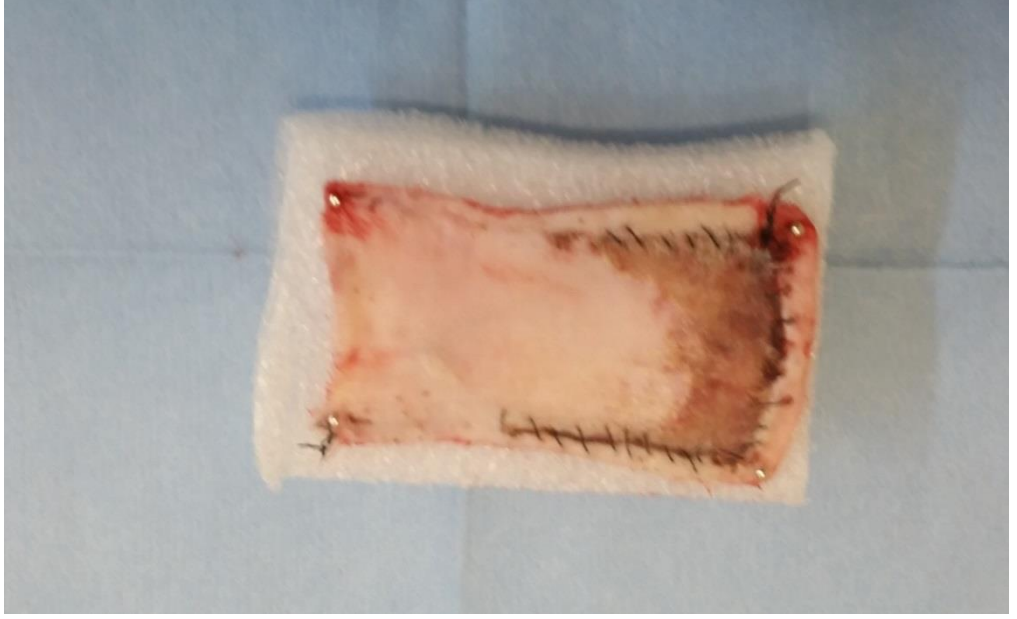
Resim 18: Grup 3 ışınlama yapılmış - sağ lateral torasik arter etrafına 1cc VSF
enjeksiyonu



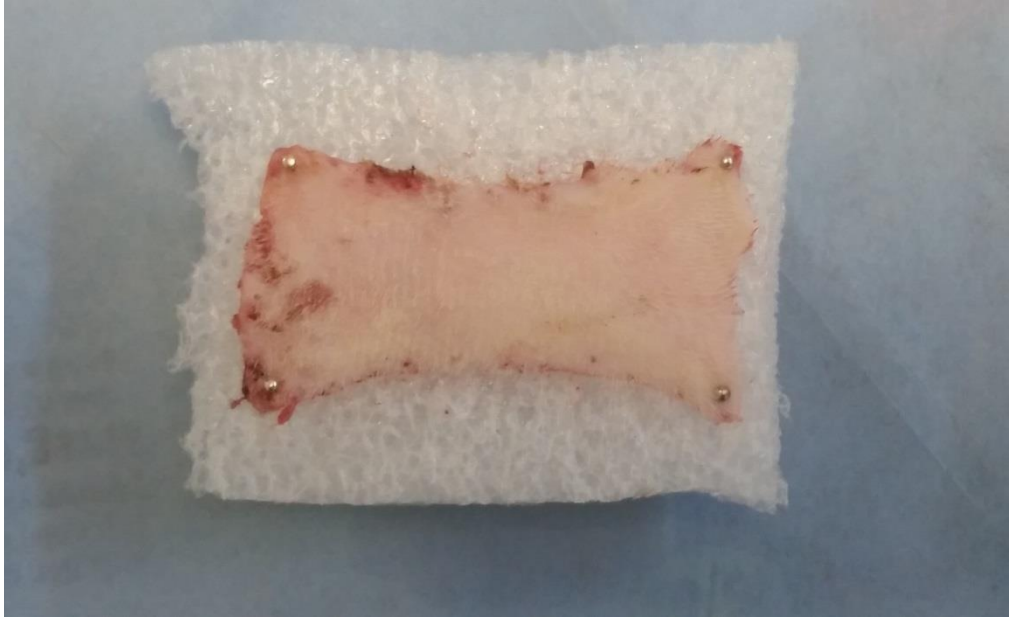
Resim 19: Sütürasyon sonrası flep görüntüsü



Resim 20: Grup 1 Işınlama yapılmamış - sağ toraks arkası cilt flebinin etrafındaki sağlam dokuyla eksize edilerek köpük üzerine iğnelerle tespiti



Resim 21: Grup 2 ışınlama yapılmış ve sağ lateral torasik arter etrafına 1 cc %0,9 NaCl sıvısı infiltrasyonundan 7 gün sonra cilt flebinin etrafındaki sağlam dokuyla eksize edilmiş ve köpük üzerine tespit edilmiş hali



Resim 22: Grup 3 ışınlama yapılmış ve sağ lateral torasik arter etrafına 1cc VSF infiltrasyonundan 7 gün sonra cilt flebinin eksizyonu

SAKRİFİKASYON PROTOKOLÜ

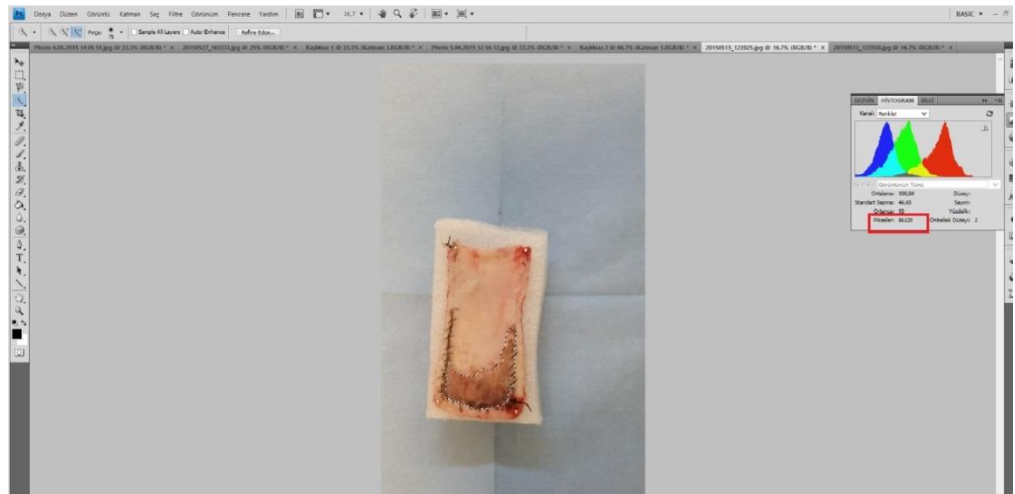
Flep cerrahinin 7. günü tüm sıçanların cilt flepleri suturasyon hattının etrafından histopatolojik değerlendirme için total olarak eksize edildi. Flep eksizyonlarının tamamlanması sonrası sıçanların tümü servikal dislokasyonla sakrifiye edildi

DEĞERLENDİRMELER

Nekrotik yüzey alanının total flep alanına oranları ve histopatolojik olarak nötrofil sayısı, kollajen miktarı ve neovaskularizasyon ölçümsel olarak değerlendirildi.

Yüzey Alan değerlendirilmesi

20 Gy radyoterapi uygulanan alandan kaldırılan 4x7 cm'lik aksiyel paternli flepte VSF(Vaskuler Stromal Fraksiyon) etkisini araştıran bu çalışmada flep nekroz oranlarını belirleme amaçlı cilt flepleri, etraflarında yer alan 1 cm'lik sağlam dokuyla birlikte postoperatif 7. günün sonunda total olarak eksize edildi. Alınan bu flepler köpük bloklar üzerine iğnelenerek sabitlendikten sonra eşit mesafeden Nikon D3100 (Nikon Corp., JAPAN) digital fotoğraf makinası ile fotoğraflama yapıldı. Fotoğraflar Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems. USA) ve Windows 8 (Microsoft Corporation. USA) programı kullanılarak grafikleştirildi. Photoshop programında, önce nekrotik alan çizimi sonra tüm flebin alan çizimi yapılarak piksel sayıları kaydedildi. Değerler birbirine oranlandı ve yüzde alan olarak ifade edildi. Fleplerde şüpheli olarak görülen alanlar nekrotik olarak değerlendirildi (resim 23).



Resim 23: Adobe photoshop CS4 ile flep yüzey alan ölçümü

Histopatolojik değerlendirme

Fleplerin histopatolojik değerlendirmesi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bir patoloji uzmanı tarafından, değerlendirilen materyalin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin yapıldı.

Postoperatif yedinci günde flep nekroz-normal doku geçiş zonundan alınan doku örneklerinde nötrofil yoğunluğu, kollojen yoğunluğu ve neovaskularizasyon değerlendirildi. Kıl shaftı çevresi yangı tipi bölgeler, enfeksiyon abses odakları, granulomatöz tip reaksiyon bölgeleri değerlendirmeye alınmadı.

Gruplardan yedinci günde flep nekrotik ile sağlam doku arasındaki geçiş zonundan alınan doku biopsileri %10'luk formalinde tespit edildikten sonra parafin bloklara gömüldüler. Mikrotomla 4 mikronluk kesitler alındı. Kesitler hematoxilen eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

Örneklere 10x büyütmede nötrofil miktarı, neovaskularizasyon, kollagen yoğunluğu ve homojenizasyon olmak üzere üç adet parametre göz önüne alındı. Patolojik değerlendirmeler yapılırken skorlama uygulandı (Tablo 4). Skorlama yapılırken; nötrofil miktarı için 10x büyütmede nekrotik olmayan alandaki nötrofil odağı yoğunluğu, fibrozis değerlendirilmesi için 10x büyütmede randomize alanlardaki kollagen yoğunluğu, neovaskularizasyon için nekrozdaki uzak bölgede subkutan alanda randomize 10x büyütmede damar sayımı yapıldı.

Tablo 4: Histopatolojik Skorlama

	yok	fokal	Diffüz-Yüzeyel	Diffüz-Tam Kat
Nötrofil miktarı	0	1 (1-3 arası odak)	2 (Dermisde diffüz tutulum)	3 (dermiş+hipodermis+çizgili kasta tutulum)
Kollagen artışı ve homojenizasyon	0	1 (1-3 arası odak)	2 (Dermisde diffüz tutulum)	3 (dermiş+hipodermis+çizgili kasta tutulum)
neovaskularizasyon	10x büyütmede, nekrozdaki uzak bölgede subkutan alanda randomize damar sayısı			

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen tüm veriler SPSS paket programıyla analiz edildi. Gruplar için sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, medyan (min –maks. değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Ki-Kare testi ve Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Ki-Kare testi için $p<0,001$; Kruskal Wallis Varyans Analizi için $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Genel Değerlendirme Sonuçları

Fleplerin durumları günlük olarak izlendi. Cerrahi sonrasındaki yedinci güne kadar gözlemlenen hayvanlarda enfeksiyon, abse, seroma, total nekroz gibi istenmeyen bulgulara rastlanmadı. Tüm gruplarda ameliyat sonrası ikinci günde flep distallerinde renk değişikliği ve soğukluk saptandı. Beşinci günde beslenme bozukluğu olan flep distallerinde nekroz gelişimi ve demarkasyon hatları belirginleşmeye başladı. Yedinci günde fleplerde oturmuş olan nekroz alanları görüldü. Yaşayan alan ile nekroze gitmiş alan arasında demarkasyon hattı belirgin şekilde izlendi.

Grup 3'ü Grup 1 ile kıyasladığımızda, ışınli sahada sağ toraks arkası cilt flebinin disseksiyon işlemi esnasında pannikulus karnosusun tabanında yaygın fibrotik dokular sebebiyle flep disseksiyonu esnasında güçlükle karşılaşıldı.

Flebin alt yüzünde bulunan lateral torasik arter dallarının grup 1 ile kıyaslandığında sklerotik ve frajil olduğu görüldü.

Grup 2'yi Grup 1 ile kıyasladığımızda, ışınli sahada sağ toraks arkası ciltin kalitesinin bozulduğu, ciltte atrofik değişiklikler olduğu görüldü. Flebinin disseksiyon işlemi sırasında pannikulus karnosusun tabanında yaygın fibrozis olduğu görüldü (Bkz. Resim 19).

Flebin alt yüzünde bulunan lateral torasik arter dallarının grup 1 ile kıyaslandığında sklerotik ve frajil olduğu, flep distaline ilerledikçe dallanmanın seyrekleştiği görüldü.

Yüzey Alan Değerlendirme Sonuçları

Fleplerde saptanan ortalama nekroz oranları, grup 1' de $17,36 \pm 11,18$, grup 2'de $26,18 \pm 7,04$, grup 3'te $5,94 \pm 2,3$ olarak bulundu (Tablo 5).

Tablo 5: Gruplarda flep nekroz oranları

Gruplar ve Denekler		Yüzde(%)
GRUP-1		
Kontrol	1	46,75
	2	15,41
	3	16,75
	4	9,73
	5	13,85
	6	13,49
	7	14,09
	8	12,96
	9	13,23
GRUP-2		
Radyoterapi+SF	1	20,62
	2	32,89
	3	35,9
	4	20,7
	5	36,01
	6	21,84
	7	18,13
	8	27,2
	9	22,35
GRUP-3		
Radyoterapi+VSF	1	7,54
	2	5,58
	3	7,26
	4	9,23
	5	6,82
	6	3,4
	7	4,7
	8	7,1
	9	1,81

Flep nekroz yüzdeleri değerlendirilmesinde 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0,0001$). İkili olarak incelendiğinde, kontrol grubu - radyoterapi+VSF grupları arasında ve radyoterapi+SF - radyoterapi+VSF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Radyoterapi+VSF grubunun değerleri kontrol grubuna göre ve radyoterapi+SF grubuna göre anlamlı şekilde düşük çıkmıştır (Tablo 6).

Tablo 6: Grupların flep nekroz oranlarının karşılaştırmaları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	
	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	p
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
flep nekroz (%)	17,36 \pm 11,18	26,18 \pm 7,04	5,94 \pm 2,3	0,0001*
	13,85 (9,73 - 46,75)	22,35 (18,13 - 36,01)	6,82 (1,81 - 9,23)	

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; Kruskal Wallis Varyans Analizi

Bu sonuçlara göre, preoperatif dönemde radyoterapi uygulanan grup 2’de radyoterapi uygulanmayan grup 1 ve grup 3’e göre nekroz alanı ortalaması daha yüksek olduğu görüldü. Hem radyoterapi hemde VSF uygulanan grup 3’ te, grup 1 ve grup 2’ ye kıyasla nekroz alanı ortalamasında anlamlı azalma izlendi. Grup 3’teki bu azalma VSF’nin flep üzerine koruyucu etkisine bağlandı.

Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Postoperatif yedinci günde flep nekroz-normal doku geçiş zonundan alınan doku örneklerinde nötrofil yoğunluğu, kollojen yoğunluğu ve neovaskularizasyon ile ilgili sonuçlar sıfırdan üçe kadar skorlanarak Tablo 8’de gösterilmiştir.

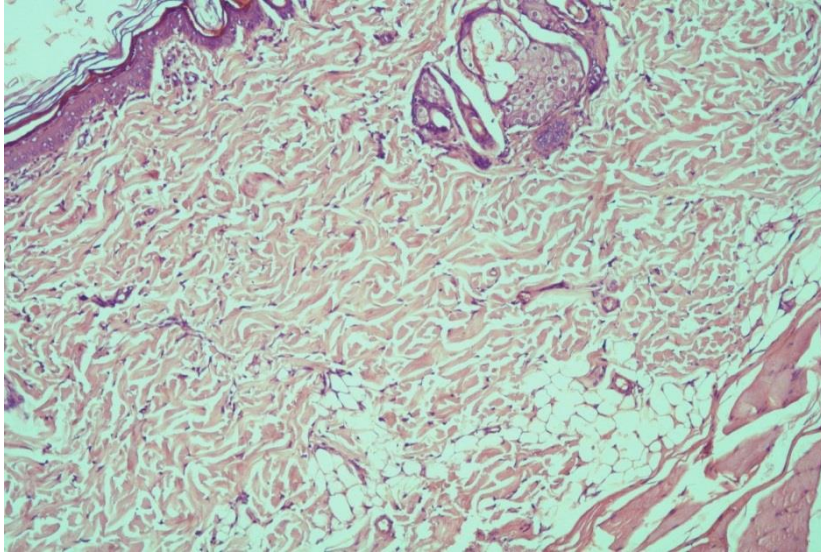
Neovaskularizasyon değerlendirilmesinde de 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür(p=0,005). İkili olarak incelendiğinde, kontrol grubu - radyoterapi+VSF grupları arasında ve radyoterapi+SF - radyoterapi+VSF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Radyoterapi+VSF grubunun değerleri kontrol grubuna göre ve radyoterapi+SF grubuna göre anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır (Tablo 7).

Tablo 7: Grupların neovaskularizasyon oranlarının karşılaştırmaları

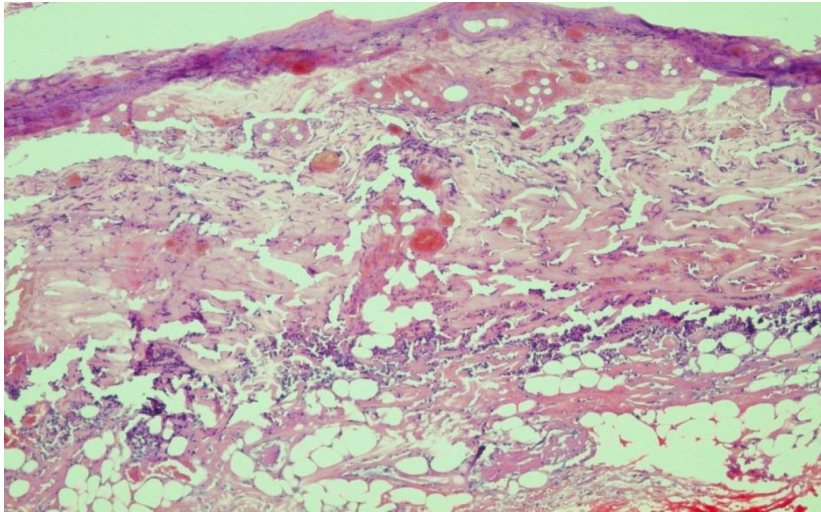
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	
	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	p
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
neovaskularizasyon	18,00 \pm 4,77	16,11 \pm 4,99	24,67 \pm 4,8	0,005*
	17 (10 - 25)	17 (8 - 25)	23 (20 - 34)	

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; Kruskal Wallis Varyans Analizi

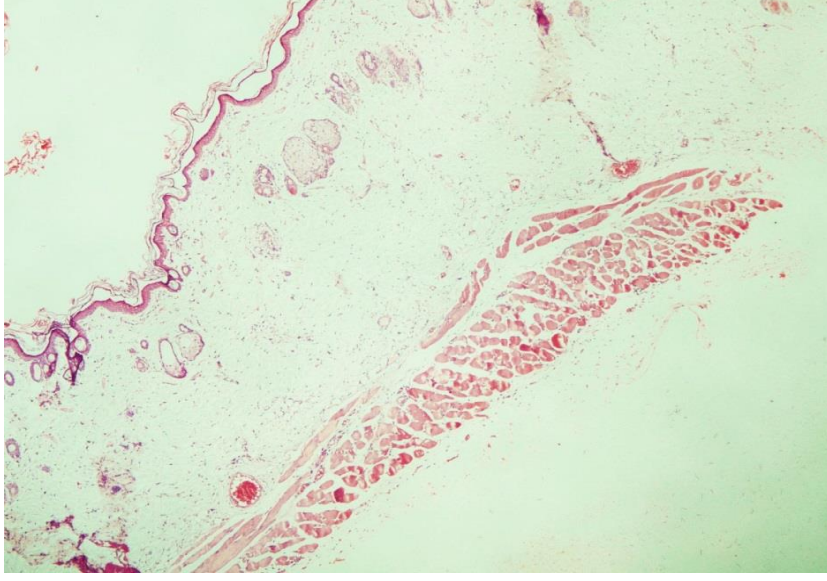
Resim 24’de grup 1’den örnek histopatolojik kesit verildi. Bu grupta kollejen yapısının normal formasyonda olduğu, ciddi PMNL infiltrasyonu olmadığı görülmektedir. Resim 25’de Grup 2’den alınan örnek histopatolojik kesit görüntüsünde yoğun kollagenizasyon ve nötrofil infiltrasyonu görülmektedir. Resim 26 ve 27’de Grup 3’den örnek histopatolojik kesit görüntülerinde VSF infiltrasyonu sonrası kollagenizasyonda ve nötrofil infiltrasyonunda ciddi azalma görülmektedir.



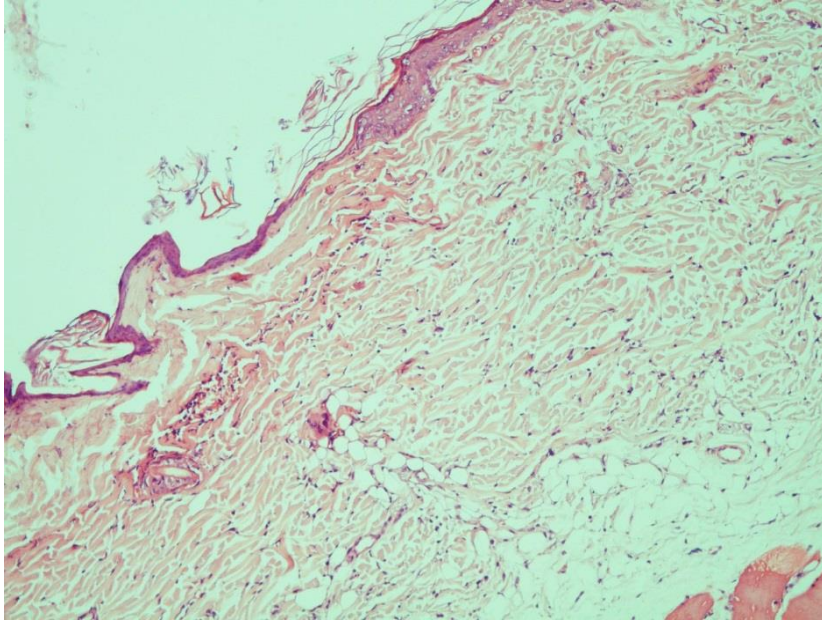
Resim 24: Grup 1’de histopatolojik kesit görüntüsü



Resim 25: Grup 2’de histopatolojik kesit görüntüsü (yoğun kollagenizasyon ve nötrofil infiltrasyonu görülmektedir.)



Resim 26: Grup 3’de histopatolojik kesit görüntüsü (VSF infiltrasyonu sonrası kollagenizasyonda ve nötrofil infiltrasyonunda ciddi azalma mevcut. Skorlamada sıfıra karşılık gelmektedir.)



Resim 27: Grup 3’de kollagenizasyonun skorlamada ikinci seviyeye düştüğünün histopatolojik görüntüsü

Sonuçlar değerlendirme amaçlı birbirleri ile karşılaştırıldı (Tablo 8).

Tablo 8: Gruplarının histopatolojik inceleme skorları

Gruplar ve Denekler	Nötrofil yoğunluğu	neovaskularizasyon	Fibrosis yoğunluğu	
GRUP-1				
Kontrol	1	0	16	0
	2	0	20	0
	3	1	24	2
	4	0	20	0
	5	1	16	1
	6	0	14	0
	7	1	25	0
	8	1	10	1
	9	0	17	0
GRUP-2				
Radyoterapi+SF	1	3	16	3
	2	3	17	2
	3	2	17	3
	4	3	18	2
	5	3	20	3
	6	3	8	3
	7	3	12	3
	8	3	12	3
	9	3	25	3
GRUP-3				
Radyoterapi+VSF	1	2	29	1
	2	1	21	2
	3	1	28	1
	4	0	20	1
	5	0	25	1
	6	2	34	2
	7	1	20	1
	8	2	23	1
	9	1	22	1

Nötrofil yoğunluğu açısından değerlendirme yapıldığında grup 1’de grup 2 ve 3 e nazaran nötrofil yoğunluğunun daha düşük olduğunu görmekteyiz. Grup 2 de ise ciddi nötrofil yoğunluğu mevcuttur (Bkz. Resim 25). Grup 3 e baktığımızda ise nötrofil yoğunluğu yüzdesi ağırlıklı olarak histopatolojik skorlamaya göre (Bkz. Tablo 4) fokal nötrofil yoğunlaşması olduğu bulundu (Bkz. Resim 26-27) (Tablo 9).

Histopatolojik skorlamaya göre nötrofil yoğunluğu açısından 0(Nötrofil yokluğu) ve 1 (fokal nötrofil) ‘i bir grupta 2 (yüzeysel yaygın nörofil) ve 3(tam kat yaygın nötrofil)’ü bir grupta toplayarak istatistiksel değerlendirmeye aldığımızda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0,0001$) (Tablo 10). İkili olarak incelendiğinde, kontrol grubunda nötrofil yoğunluğunun

düşük olduğu görüldü. Radyoterapi+SF grubunda radyasyon etkisine bağlı ciddi nötrofil yoğunluğu görülmekte iken radyoterapi+VSF grubunda nötrofil yoğunluğunun azaldığı görüldü. Radyoterapi+SF-Radyoterapi+VSF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Radyoterapi+VSF grubunun değerleri radyoterapi+SF grubuna göre anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır (Tablo 10).

Tablo 9: Grupların nötrofil yoğunluğuna göre karşılaştırılması

			Nötrofil yoğunluğu				Toplam
			0	1,00	2,00	3,00	
grup	kontrol	n	5	4	0	0	9
		%	55,6%	44,4%	0,0%	0,0%	100,0%
	Radyoterapi+SF	n	0	0	1	8	9
		%	0,0%	0,0%	11,1%	88,9%	100,0%
	Radyoterapi+VSF	n	2	4	3	0	9
		%	22,2%	44,4%	33,3%	0,0%	100,0%
Toplam		n	7	8	4	8	27
		%	25,9%	29,6%	14,8%	29,6%	100,0%

Ki-Kare testi Analizi

Tablo 10: Grupların nötrofil yoğunluğuna göre karşılaştırılması

			Nötrofil yoğunluğu		Total
			0 ve 1 grubu	2 ve 3 grubu	
grup	Grup 1	adet	9	0	9
		% (grup içi)	100,0%	0,0%	100,0%
		% (totale göre)	60,0%	0,0%	33,3%
	Grup 2	adet	0	9	9
		% (grup içi)	0,0%	100,0%	100,0%
		% (totale göre)	0,0%	75,0%	33,3%
	Grup 3	adet	6	3	9
		% (grup içi)	66,7%	33,3%	100,0%
		% (totale göre)	40,0%	25,0%	33,3%
Total		adet	15	12	27
		% (grup içi)	55,6%	44,4%	100,0%
		% (totale göre)	100,0%	100,0%	100,0%

*p<0,0001 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; Ki-Kare Test Analizi

Grupları kollagenizasyon, yani radyoterapi etkisine bağlı fibrozis artışı (kollagenizasyon) açısından değerlendirecek olursak; grup 2 de kollagenizasyon artışı ciddi olarak diffüz-tam kat yayılım göstermiş olup grup 3 de kollagen artışında ciddi azalma görülmüş, kollagenizasyonun %77,8'nin fokal yayılım yapmış olduğunu tespit edildi (Resim 26-27) (Tablo 11).

Histopatolojik skorlamaya göre kollagenizasyon yoğunluğu açısından 0(Nötrofil yokluğu) ve 1(fokal fibrozis) 'i bir grupta 2(yüzeysel yaygın fibrozis) ve 3(tam kat yaygın fibrozis)'ü bir grupta toplayarak istatistiksel değerlendirmeye aldığımızda, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p=0,0001) (Tablo 12). İkili olarak incelendiğinde, beklendiği üzere kontrol grubunda kollagenizasyon yoğunluğunun düşük olduğu görüldü. Radyoterapi+SF grubunda radyasyon etkisine bağlı ciddi kollagenizasyon yoğunluğu görülmekte iken radyoterapi+VSF grubunda kollagenizasyon yoğunluğunun azaldığı görüldü. Radyoterapi+SF-Radyoterapi+VSF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir. Radyoterapi+VSF grubunun değerleri radyoterapi+SF grubuna göre anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır (Tablo 12).

Tablo 11: Grupların kollagenizasyon artışına göre karşılaştırılması

			kollagen artışı fibrozis(kollagenizasyon)				Toplam
			0	1,00	2,00	3,00	
grup	kontrol	n	6	2	1	0	9
		%	66,7%	22,2%	11,1%	0,0%	100,0%
	radyoterapi + SF	n	0	0	2	7	9
		%	0,0%	0,0%	22,2%	77,8%	100,0%
	radyoterapi +VSF	n	0	7	2	0	9
		%	0,0%	77,8%	22,2%	0,0%	100,0%
Toplam		n	6	9	5	7	27
		%	22,2%	33,3%	18,5%	25,9%	100,0%

Ki-Kare testi Analizi

Tablo 12: Grupların kollagenizasyon artışına göre karşılaştırılması

			kollagenizasyon		Total
			0 ve 1 grubu	2 ve 3 grubu	
grup	Grup 1	adet	8	1	9
		% (grup içi)	88,9%	11,1%	100,0%
		% (totale göre)	53,3%	8,3%	33,3%
	Grup 2	adet	0	9	9
		% (grup içi)	0,0%	100,0%	100,0%
		% (totale göre)	0,0%	75,0%	33,3%
	Grup 3	adet	7	2	9
		% (grup içi)	77,8%	22,2%	100,0%
		% (totale göre)	46,7%	16,7%	33,3%
Total	adet	15	12	27	
	% (grup içi)	55,6%	44,4%	100,0%	
	% (totale göre)	100,0%	100,0%	100,0%	

*p<0,0001 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; Ki-Kare Test Analizi

TARTIŞMA

Travma, tümör eksizyonu ya da doğumsal anomali gibi çeşitli nedenlerle oluşmuş doku eksikliklerinde veya deformasyonlarında tekrar form ve fonksiyon kazandırmak Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahinin ana hedefidir. Özellikle vücutta oluşan tam kat deri kayıplarında primer kapama yapılamadığında deri fleplerinin kullanılmasıyla defekt onarılır. İşlevsel ve anatomik açıdan başarılı bir onarım iyi planlanmış flep uygulamalarıyla mümkündür. Günümüzde farklı vücut bölgelerinde derinin kanlanma paternini bilmek aksiyel paternli deri fleplerin kullanılmasını olanaklı hale getirmiştir. Çoğunlukla aksiyel paternli fleplerde flep sağkalımında sıkıntı beklenilmese de flep distalinde oluşacak kritik iskemi ve sonrasında reperfüzyon hasarı ile doku hasarının daha da yaygınlaşması sonucu doku ölümü, flep distalinde nekroz kaçınılmaz hale gelmektedir. Nekroz oluşunca ek cerrahi girişimler, hastanede kalış süresinde artış, artan tedavi masrafları gibi istenmeyen sonuçlar meydana gelmektedir. Bu bağlamda fleplerin distal kısmında gelişen hasarı azaltarak flebin yaşayabilir kısmını arttırmak, klinik olarak önemli bir hedefdir (69). Flep cerrahisinde oluşan nekrozların sebepleri intrinsek ya da ekstrinsek olmak üzere iki grupta toplanabilir. Yetersiz kan akımı ana intrinsek faktör olarak kabul edilmekte ve en sık flep kaybına neden olan sebep olarak göze çarpmaktadır (70). Ekstrinsek nedenler ise sistemik, çevresel ve teknik olarak üç grupta toplanabilir, sistemik nedenler arasında hipotansiyon, arteriyopati ve enfeksiyon, çevresel nedenler arasında sıcaklık, kompresyon ve gerginlik, teknik nedenler arasında ise planlama ve uygulama hatalarını sayabiliriz (70). Tüm bu nedenler flep kaybına neden olabilmektedir. Flebin elevasyonu ile birlikte flebin distalinde inkomplet bir iskemi, yani yetersiz bir kan akımı olmaktadır. İskemik dokuda ise önce ATP düzeyleri azalmakta, sonrasında anaerobik metabolizmaya geçilmekte ve laktik asit birikimi olmaktadır. Bir yandan laktik asit birikimi doku pH'ını azaltırken, bir yandan da hücre membranı bütünlüğünü sağlayan Na:K ATP'az pompası çalışamaz duruma gelir ve bunun sonucunda da hücre içi kalsiyum ve sodyum değerleri artar. Dokuların iskekiye olan toleransı boyutunda süreç uzadığında doku nekrozu kaçınılmaz hale gelmektedir (71). Bu durumda reperfüzyonun en kısa zamanda gerçekleşmesi iskemik doku nekrozunun sınırlanması için temel gereklilik haline gelmektedir. Paradoksal olarak, uzamış iskemi süresinde dokuda biriken

metabolitlerin de etkisiyle, reperfüzyon gerçekleşince temel olarak mitokondrilerin ürettikleri reaktif oksijen metabolitleri vasıtasıyla doku hasarı daha da artabilmektedir (71). Hatta reperfüzyonun iskemiyeye göre daha çok doku hasarına sebep olduğu öne sürülmektedir. Yukarıda da belirtildiği gibi bir deri flebi kaldırıldığında flebin distalinde başlangıçta kan akımı ciddi biçimde azalmaktadır ancak 24 saat sonra ciddi bir şekilde tekrar artmaktadır (72). Başlangıçtaki flep distalindeki iskemi, inkomplet bir iskemi özelliğindedir. Hücresel düzeyde ise, bu inkomplet iskemi sırasında nötrofillerin aktivasyonuna bağlı olarak inflamatuvar yanıt ve ödem gelişimi, endotel disfonksiyonu, trombosit aktivasyonu ve sonucunda lümen içi trombus oluşumu da hasardan sorumlu temel etkenlerdir (73). Komplet iskemi ile total doku hasarının oluştuğu düşünülürse, inkomplet iskemik alanda iskemik hasarın azaltılması ve reperfüzyon hasarına girilmeden normal reperfüzyon fazına girilerek doku sağkalımının artırılması oldukça önemli bir hedefdir. Bu doğrultuda, iskemik doku hasarı sonrası gelişen reperfüzyon hasarında ilk 24 saatte dokuların iskemiyeye olan toleransını arttırmanın flep sağkalımını önemli ölçüde olumlu etkileyeceği düşünülerek bu yönde farklı mekanizmalar üzerinden etkili olabilecek maddelerle ve yöntemlerle birçok çalışma yürütülmüştür. Yöntemler arasında cerrahi veya farmakolojik geciktirme yöntemleri sayılabilir. Farmakolojik ajanlar arasında vazodilatörler, Na:K ATP'az inhibitörü, fosfodiesteraz inhibitörleri, neovaskülarizasyon yapan ajanlar, büyüme faktörleri, prostaglandin inhibitörleri, kalsiyum kanal blokörleri, antikoagülanlar ve serbest radikalleri ortadan kaldıran antioksidanlar farmakolojik ajanlar başlığı altında sayılabilir (74,75) . Yine yöntem olarak elektroşok dalgası, lazer ve trombosit zengin plazmanın deri fleplerindeki etkileri üzerine yapılmış çalışmalar da mevcuttur (76,77) .

Yapılan deneysel çalışmalarda, deri fleplerinde iskemi toleransının en az olduğu bölge flebin distal kısmıdır. Bu bölge, kutanöz kan akımının en az olduğu bölgedir. Flep kaldırılmasından ancak 24 saat sonra bu bölgede kan akımı belirgin olarak artmaktadır. İskemiye takiben revaskülarizasyondaki yetersizlik 'no-reflow fenomen'i olarak tanımlanmaktadır. Cilt fleplerinde bu durum, doku nekrozundan önceki mikrovasküler tıkanma (hücresel ödem, adrenerjik kökenli vazokonstriksiyon), lümen obstruksiyonu (trombosit tıkaçları), lökositlerin infiltrasyonu ve aktivasyonu veya bunların kombinasyonları ile olur. Flep

sağkalımında tüm bu basamaklar göz önünde bulundurularak geliştirilen ve geliştirilmekte olan maddelerin bu mekanizmaların bir veya birkaçını etkileyebilecek potansiyelde olması amaçlanmış ve flep sağ kalımını attırmak için çok sayıda çalışma yapılmıştır (78).

Rohrich ve ark. flep yaşayabilirliğini artırmaya yönelik kullanılacak ilaç veya uygulama için; kolay uygulanabilir olmalı, güvenilir olmalı, postoperatif olarak kullanılabilmesi, ucuz olmalı, etki mekanizması tam olarak bilinmeli, elde edilebilir olmalı ve flep nekrozunda koruyucu olmalı şeklinde özetlemiştir (79).

Flep cerrahisinde komplikasyonlardan kaçınmak için doğru flep seçim ve planlaması ile doğru cerrahi teknik şarttır. Buna ek olarak radyoterapili sahada flep kaldırma zorunluluğu flep nekroz riskini daha da artırmaktadır. Plastik ve rekonstrüktif cerrahinin sıkça yaptığı malign sebepli baş-boyun cerrahisi operasyonları sonrasında tümörün sınır pozitifliğinin (devamlılığı) veya lokal nükslerinin önüne geçmek için cerrahi yaranın iyileşmesini takiben radyasyon onkolojisi tarafından cerrahi alana radyoterapi uygulanması tercih edilmektedir. Radyoterapinin etkilerine veya lokal tümör nükslerine bağlı cerrahi sahada kronik yaralar gelişebilmektedir. Bu durumda açık yaraların kapatılması amacıyla basit, kullanışlı, uygulanabilirliği kolay lokal fasyokutan flepler planlanabilir. Fakat radyoterapi sahasında sağlam dokular da hasar görmektedir. Bu da yapılacak lokal fasyokutan flep cerrahisini engellemekte veya güvenirliliğini azaltmaktadır. Çünkü iyonize radyasyon endotel hücre hasarına neden olur ve dokularda ilerleyici obliterasyon, kapiller sayısında azalma meydana gelir (80).

Radyasyon 1900'ü yılların başından beri malignite tedavisinde kullanılmaktadır. Radyasyonun malign hücre üzerindeki etkileri ortaya konması ile birlikte, son yıllarda malignite tedavisi protokolündeki yeri sağlamlaşmıştır. Bu sebeple, radyasyonun canlı sistemler üzerindeki etkilerinin anlaşılması büyük önem taşır. 1900'ü yılların başından itibaren değişik radyasyon dozları uygulamaları ve canlı kalabilen hücrelerin sayısını gösteren sağ kalım eğrileri, radyasyonun etki mekanizması hakkında fikir sahibi olmamızı sağlamış günümüz tedavilerinin planlamasına temel oluşturmuştur. Radyoterapi uygulamaları kanser cerrahisi sonrası adjuvan olarak uygulandığı gibi yumuşak doku sarkomlarında tümör miktarını

küçültmek amaçlı neoadjuvan olarak veya hastalarda tümör yükünü azaltmak amaçlı palyatif tedavi olarak da kullanılmaktadır. Özellikle yumuşak doku sarkomlarında ekstremitte koruyucu yaklaşım amacıyla operasyon öncesi radyasyon uygulamaları, radyasyonun yara iyileşmesi ile ilgili yan etkilerini düşünmemiz gerçeğini bize hatırlatmıştır (81). Lokal rekkürens riskinin azalması ve uzun dönemde fonksiyonel kazançların artması nedenleri ile yumuşak doku sarkomlarının tedavisinde preoperatif RT tercih edilmektedir. Ancak yara iyileşmesindeki sorunlar postoperatif RT uygulamasına göre daha sık görülmektedir. RT sonrası bu komplikasyonları azaltacak uygun cerrahi zaman belli değildir (82). Preoperatif RT sonrasında gelişen yara iyileşme sorunları %34-45 arasında iken operasyon sonrasında radyoterapi uygulanan hastalarda bu oran %17'lere kadar düşmektedir (83).

Plastik rekonstruktif ve estetik cerrahi ile radyoterapi arasındaki ilişkiye baktığımızda baş boyun malignitesi ve meme kanseri ik akla gelen maligniteler olarak göze çarpmaktadır. Baş boyun malignitesi ve meme kanseri sebebiyle uygulanan radyoterapi sonrası cilt ve ciltaltı yağ dokunun etkilenmesi pek çok plastik cerrah tarafından sık karşılaşılan bir durumdur (84). Dahası radyasyon ülseri görmek nadir bir durum olmaktan çıkmıştır. Derinin ışınlanması durumunda, oluşacak reaksiyonlara bu yapıların tümü çeşitli derecelerde katkıda bulunur. Kıl kökleri çok duyarlıdır ve duyarlılık derecelerinin kıl büyüme hızı ile doğru orantılı olduğu da saptanmıştır. 4-5 Gy civarındaki ışınlamalardan sonraki birkaç hafta içinde saç ve sakallarda dökülme meydana gelir. Bu dozlarda, dökülen saçlar 1-2 ay sonra tekrar çıkar. Ancak 7 Gy ve üstündeki dozlarda depilasyon sürekli dir. Deri bezleri de kıl kökleri gibi duyarlıdır. Ancak bunlardaki hasarların onarımı daha uzun zaman alır(3,4). Epidermis tabakası bir hücre yenileme sistemi içerir ve yenilenme oranı günde yaklaşık %2 'dir. Bu sebeple radyasyona karşı ciddi anlamda duyarlıdır ve etkilenmesi kaçınılmazdır. Bu bölgelerde cerrahi işlem yapmak, lokal flepler uygulamaları sonrası, dahası primer sütür iyileşmesinde bile sorunlar görmek mümkündür (85). Bu da bizleri vaskularize fleplere yönlendirmektedir. Fakat aksiyel paternli fleplerin de radyoterapili alanda, sağkalımı risk altında olup yara iyileşmesi sorunları ve flepte parsiyel nekroz görülme riski mevcuttur.

Radyoterapinin bu kadar geniş bir sahada kullanım alanı bulması, yan etkileri gibi önemli bir soruna zemin hazırlamaktadır. Cerrahi sonrası uygulanan

radoterapiden en sık etkilenen vücut alanlarından biri de cilttir. İntraoperatif radyoterapi hariç, tüm radyasyon tedavileri sırasında radyasyon yaralanmalarına varan sonuçlar doğurduğu için, radyoterapi deriyi ilgilendirmektedir.

İyonize radyasyonun dokularda oluşturduğu biyolojik etkiler rad veya Gray ile ölçülür. Rad, 1 gram dokuya 100 erg enerji taşıyan ışınım miktarıdır. 1 Gray 100 rad'a eşittir. Lineer hızlandırıcıların radyoterapi uygulamalarına girmesi, radyasyonun yüzeysel bölgelere planlanan dozda uygulanabilme imkanı sağlamıştır (86). Bu cihazlar, BT ile görüntüleme ardından planlama yapılarak yüzeyden 6 cm. derinliğe kadar yerleşmiş malignitelerin tedavisinde istenilen dozda radyasyon verme imkânı sağlamıştır. Bizim çalışmamızda da aynı prensip göz önüne alınarak BT görüntüleri üzerinden Prowess Panther 5.1 Tedavi Planlama Sistemi ile üç boyutlu doz dağılımı oluşturuldu. 6 MV'lik X-ışını altında 1,5 cm kalınlığında Bolus üzerinde Kaynak-Cilt mesafesi (SSD), 98.5 cm iken sıçanların sağ toraks cildinde 2000 cGy doz oluşturan bir plan elde edildi. 6 MV'lik X-ışını üreten Siemens marka ARTİSTE model lineer hızlandırıcı ile ışınlama yapıldı. Bu sayede sağlam dokuların etkilenmesi azaltılsa da yine de radyoterapi sahasının etkilenmesi kaçınılmazdır.

Derinin radyasyona cevapları ile bunların dereceleri çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunların fiziksel ve biyolojik olmak üzere başlıca iki gruba ayırmak mümkündür. Doz, doz hızı, fraksiyonasyon ve uygulanan radyasyonun kalitesi gibi kriterler fiziksel faktörleri, radyasyon uygulanan derinin vücuttaki lokalizasyonu ile yaş gibi kriterler ise biyolojik faktörleri oluştururlar. Bu faktörlere bağlı olarak, deride minimum düzeyde değişiklikler ile total nekrozlar arasındaki çeşitli derecelerde hasarlar oluşur ve bu hasarların derecesine göre, onarım olayları da hızlı ve tam olarak gerçekleşir ya da mümkün olamaz. Hasar boyutu bölünmüş doz miktarıyla orantılıdır. 200 cGy üzerindeki dozlarda fibrozis ve atrofi görülebilir. Tam doz radyasyon ile endotel hücreleri mezenkimal hücreler ve epitel hücrelerinin çoğalma yeteneği kaybolur. Geç devrede epidermal-dermal atrofi, vaskülarizasyonda azalma, fibrozis ve hatta doku yıkımı ile nekroz oluşabilir (80).

Preoperatif dönemde radyasyon uygulanması postoperatif dönemde yara iyileşmesini ve flep sağkalımını olumsuz yönde etkileyerek yara yeri enfeksiyonlarına, insizyon hattında ayrılmalara, yara iyileşmesinde gecikmelere,

flepte parsiyel nekrozlara neden olmaktadır (85,87). Radyasyon sonrası bu tarz komplikasyonların oluşmasının temel nedenlerinden biri fibroblastların etkilenmesidir (88,89). Dermal fibroblastların etkilenmesi ve fibroblastların proliferasyonunun ve migrasyonunun azalması sonucunda yeterli ve efektif kollajen üretilmemekte, kollajen gen ekspresyonu azalmakta, kollajen matürasyonu gecikmekte ve fibroblastlardan TGF- β , FGF, IGF-1 ve CTGF gibi büyüme faktörlerinin salınımı azalmaktadır. (90,91). Bizim çalışmamızda radyoterapi alan sıçanların ışınli bölgesinde sağ toraks arkası cilt flebinin disseksiyon işleminde esnasında pannikulus karnosusun tabanında yaygın fibrotik dokular sebebiyle flep disseksiyonu esnasında güçlkle karşılaşıldı. Flebin alt yüzünde bulunan lateral torasik arter dallarının sklerotik ve frajil olduğu görüldü. Işınli sahada sağ toraks arkası ciltin kalitesinin bozulduğu, ciltte atrofik değişiklikler oluştuğu görüldü. Flebin alt yüzünde bulunan lateral torasik arter dallarının sklerotik ve frajil olduğu, flep distaline ilerledikçe dallanmanın seyrekleştiği görüldü. Radyoterapili sahaların histopatolojik değerlendirilmesinde cildin fizyolojik kollajen yapısının bozulduğu, fibrotik bir yapıya dönüştüğü kollajenizasyonun arttığı görüldü. VSF uygulanan cilt flebinde anlamlı derecede kollajenizasyonda düzelme tespit edildi.

Hem flep sağkalımını artırmak hemde radyasyonun negatif etkilerini en aza indirmeye yönelik büyüme faktör etkili pekçok çalışma yapılmıştır. Flep sağkalımı üzerine ve radyasyonun etkilerini azaltmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Patrick ve ark. tarafından 2011 yılında ratların karın bölgesine 5 seansta toplam 40 Gy radyoterapi uygulandı, 28 günlük takip sonrası ışınlama alanından inferior epigastrik arter pediküllü fasyakutan flepler kaldırmışlardır. Çalışma grubuna topikal VEGF pDNA 165-aa rekombinant ile fibrin dolgu, kontrol grubuna sadece fibrin dolgu uygulamışlardır. Her iki grupta yer alan ratların yarısında 7. ve 14. günlerde pedikül hasarı oluşturmuşlardır. VEGF pDNA 165-aa rekombinantın etkilerini, radyoterapi uygulanmış ve iskemik hasarlı fleplerin revaskularizasyon oranlarını değerlendirmişlerdir. Bu çalışmayla radyoterapi alanında VEGF pDNA uygulanmasının flep revaskularizasyonun ve yaşayabilirliğinin arttırıldığını gösterilmiştir (16).

Dr. Sağlam'ın 2012 yılında, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda "Trombositten Zengin

Plazma ve Yağ Dokusu Kaynaklı Stromal Vasküler Fraksiyonun Flep Yaşayabilirliği Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” isimli tez çalışmasında sıçanların yağ dokularından hazırlanan Vasküler Stromal Fraksiyon(VSF) ile yine ratların kanından elde edilen Trombositten Zengin Plazma’nın random paternli fleplerin sağkalımı üzerine olan etkilerini incelemiştir. VSF’nin neovaskülarizasyonu ve reepitelizasyonu hızlandırdığını flep yaşayabilirliğini artırdığını tespit etmişlerdir.

Gorodetsky ve ark. X-ışını kaynağı kullanarak sıçanlara 18 Gy tek doz fraksiyone radyasyon uygulaması ardından fibroblast kültürünün yara iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak intradermal fibroblast kültürü enjekte edilen sıçanlarda insizyon skarında yara gerim kuvvetinde belirgin derecede artış saptamışlardır. Fibroblastların enjeksiyon öncesinde ışınlanmasında ise bu artışın gözlenmemesi radyasyonun fibroblast fonksiyonunu etkilediğini gösteren bir bulgu olmuştur (91). Ferguson ve ark.’ları da radyoterapi verilmiş sıçan cildine otolog intradermal fibroblast enjekte etmişler ve aynı sonucu bularak yara iyileşmesini artırdığını tespit etmişlerdir (92). Dantzer ve ark. radyoterapi uygulanmış sıçan sırtlarına intradermal uyguladıkları fibroblast ve stromal hücre uygulama ile yaptıkları çalışmada her ikisinde de kontrol grubuna göre anlamlı derecede yara iyileşmesinde artış ve pozitif yönde iyileşme görmüşlerdir (93). Xie ve ark. yaptığı çalışmada eriyebilir fibrin mikro çubukları üzerine yayılmış kemik iliği kökenli stromal hücrelerin fibroblast aktivitesini artırarak yara iyileşmesini sağladığı ortaya konmuştur (94).

Yara iyileşmesi ve flep sağkalımı üzerine ciddi etkilerinin olduğu gösterilmiş bir diğer ajan da TGF- β ’dir (95-97). TGF- β , hücre olgunlaşması, hücre farklılaşması, neovaskularizasyon, angiogeneze artış sağlaması gibi özellikleri vardır (98,99). Fibroblastlar için kemotaktik olan TGF- β aynı zamanda pozitif geri dönüşüm mekanizmasıyla fibroblastlardan TGF- β salınımını arttırmaktadır. Agnes ve ark. radyoterapili sahadan kaldırılan deri fleplerinde yara iyileşmesi ve flep sağkalımını araştırmışlardır ve TGF- β nın hem yara gerim kuvvetini artırdığını hemde flep sağkalımını arttırdığını tespit etmişlerdir (100). Yine Huemer ve ark. yaptığı çalışmada adenovirus aracılı transforming growth faktör- β gen terapisinin epigastrik deri flebinde flep sağkalımını artırdığını tespit etmişlerdir (101). Georg ve ark. sıçanlarda epigastrik deri flebinde TGF- β ile ekstrakorporal şok dalga terapisini flep

sağkalımı üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada, TGF- β nın sadece neoangiogenesisi arttırarak değil, aynı zamanda kolljenizasyonu artırıp yara iyileşmesini hızlandırdığı için ve iskemi reperfüzyon hasarını önlediği için flep sağkalımını arttırdığını belirtmişlerdir (102). TGF- β 1'in, radyasyon sonucu oluşan yaralardan izole edilen insan fibroblastlarından in-vitro koşullarda anjiogenik büyüme faktörü olan VEGF sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (103).

Fibroblast growth faktör-2(FGF2), diğer adıyla bFGF; çok sayıda hücre, doku ve organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür (104, 105). Kök hücre diferansiyasyonundan, anjiogeneze, fibroblast olgunlaşmasından, T lenfosit ve makrofaj ekspresyonuna kadar çok geniş skalada etki göstermektedir (106,107). Deride; melanojenez, doku tamiri, keratinosit morfojenizi sağlar. Vasküler sistemde; damar gelişimi (anjiogeneze), düz kas hücre çoğalması, atherogeneze, kan basınç kontrolü sağlamaktadır (108). Endotel hücre çoğalması, göç etmesi ve yeni kan damarı oluşumunun uyarılması bFGF'nin en iyi karakterize edilen fonksiyonlarıdır (109). bFGF, öncelikle fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır. bFGF dokuların rejenerasyonunda etkilidir. Yara iyileşmesi üzerine ciddi etkileri vardır (110). Hücre migrasyonu, granulosit formasyonu, reepitelizasyon, angiogeneze tetikleyerek yara iyileşmesini hızlandırır (111). Bu özellikleri sebebiyle bFGF nin flep sağkalım üzerine etkisini gösteren çok sayıda çalışma vardır (112). Khouri, Im ve Rashid in bFGF nin flep sağ kalımı üzerine yaptığı çalışmalarda izole bFGF nin dahi flep sağkalımını ciddi oranda arttırdığını göstermişlerdir (113,114). Park ve ark. yaptığı çalışmada kontrol grubu bile kullanmaya gerek duymamış ve bFGF nin flep sağkalımına olan etkisini Fosfat buffer saline-bFGF ile Heparin konjuge fibrin-bFGF yi karşılaştırmıştır. Bu çalışmada kontrol grubu dahi konulmaması bFGF nin flep yaşayabilirliği üzerine olan etkisinin kabul gördüğünü göstermektedir (115). Yine benzer bir çalışmada Guo ve ark. yaptığı şimerik adenoviral vektör aracılı bFGF gen terapisinin tavşan kulağında iskemik kronik yara iyileşmesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada vasküler endotelial hücre ve fibroblast aktivitesini artırarak iyileşmeyi hızlandırdığını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da VSF içerisinde ihtiva eden bFGF sayesinde grup 3 de grup 2 ye göre hem flep dokularında histopatolojik

incelemede fibrozisde ciddi azalma ve neovaskularizasyonda anlamlı artış tespit edilmiştir (116).

Anjiogenik etkili olan major büyüme faktör proteinlerinden biri vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF). Vasküler endotelial büyüme faktörü homodimerik, heparin-binding glikoproteindir (45 kDA) (117). Fibroblastların da bulunduğu birçok hücre tarafından üretilir. Endotelial hücreler üzerine güçlü mitojenik etkisi vardır ve vasküler permeabiliteyi artırır. Endotelial hücrelerde nitrik oksit sentaz stimülasyonu ile vazodilatasyonu, hücre migrasyonunu artırır ve apoptozu inhibe eder (118,119). Radyasyon sonrası karşımıza sıklıkla çıkan radyoterapiye bağlı kronik yaraların temel nedenlerinden biri fibroblastların etkilenmesidir. Dermal fibroblastların etkilenmesi ve fibroblastların proliferasyonunun ve migrasyonunun azalması sonucunda yeterli ve efektif kollajen üretilmemekte, kollajen gen ekspresyonu azalmakta, kollajen matürasyonu gecikmekte ve fibroblastlardan VEGF salınımı yetersiz olmaktadır (93). VEGF'nin yara iyileşmesi ve flep sağkalımı üzerine olumlu etkisi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Daha önce yapılan çalışmalarda VSF'nin yara iyileşmesinde damarlanmayı belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir (63). Damarlanmadaki artış hem histolojik incelemede direk neovaskularizasyonun artışın gösterilmesi ile hem de immünohistokimyasal analizde VEGF düzeyinin artışı ile gösterilmiştir (8). Yapılan çalışmalarda stromal hücrelerin anjiogenik etkisinin endotel hücrelerin çoğalmasına, apoptozun azaltılmasına ve VEGF salınımının artmasına bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (8,120). Hasdemir v ark. sıçanlarda radyoterapili sahada kaldırılan random paternli fleplere adiposit kaynaklı stromal hücre uygulaması sonrası fleplerde VEGF artışını immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir (120). Bizim çalışmamızda VSF nin, VEGF ile birlikte pekçok büyüme faktörü de ihtiva ettiği için VEGF ile yapılan çalışmalardakine benzer şekilde neovaskularizasyonu artırmıştır. Grup 3 de, hem grup 2 den hemde grup 1 e göre neovaskularizasyonda anlamlı artış olmuştur.

Kokai ve ark. VSF'nin klinik kullanım alanı, doku onarımı ve rejenerasyonu üzerine yaptığı çalışmada; VSF yukarıda da belirttiğimiz sitokin ve büyüme faktörleri içermesi sayesinde yara iyileşmesinden flep sağkalımına kadar pek çok

pozitif etkileri olduğu ortada olup bizim çalışmamız da bunu desteklemektedir (121).

Aksiyel paternli flepler, plastik ve rekonstrüktif cerrahide oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Random tasarımı fleplerin aksine flebin içinde boylu boyunca seyreden ve flebin arteriyle dolaşımını sağlayan spesifik direkt kutanöz arter yani tanımlanmış anatomik arteryel-venöz damarlar içerirler. Bu durum random paternli fleplerin aksine aksiyel fleplerinin güvenilirliğini arttırmıştır. Herhangi bir nedenle flep dolaşımı olumsuz etkilendiği zaman flepte kısmen veya total nekrozlar gelişebilmekte, bu durum hem hasta hem de cerrah açısından yeni sorun ve revizyon cerrahi prosedür gerekliliğini oluşturmaktadır. Bu tür fleplerin yaşayabilirliğinde en önemli etken flebin pedikülünün korunmasıdır. Flep dolaşımının bozulduğu durumlarda doku oksijen seviyesinin düşmesine bağlı olarak, hücre içi metabolizma aerobikten anaerobiğe döner. Bu, membran transport mekanizmasını bozacak olan laktat birikimine, hücredeki pH seviyesinin düşmesine ve iyonik pompalardaki ATP depolarının boşalmasına neden olur. Dolaşım normale dönüp dokuya tekrar oksijen girmesi ile birlikte serbest oksijen radikali oluşumu meydana gelir. Serbest oksijen radikallerinin protein, karbonhidrat ve yağ içeren bütün hücre yapılarına toksik etkileri vardır. Daha da önemlisi, meydana gelecek endotelial hasar, trombosit ve nötrofillerin damar duvarına yapışmasına yol açacak, bu da pıhtılaşma sürecini başlatacaktır (122).

Flep sağkalımına yönelik yapılan çalışmalara sıklıkla random paternli flepler üzerinde yapılmaktadır. Lu ve ark.'ın yaptığı VSF nin flep üzerine etkisi çalışması, Zhang ve ark.'larının VEGF nin flep üzerine yaptığı çalışma, yine Sheng ve ark.'larının çalışması buna örnektir(123-125). Radyasyonun ciltte oluşturduğu hipovasküler ve hiposellüler ortam göz önüne alındığında aksiyel tasarımı fleplerde de dolaşım problemi olabileceği akla gelmektedir. Flep sağkalımında tüm bu basamaklar göz önüne alındığında, kullanılacak olan ajanın bu mekanizmaların bir veya birkaçını etkileyebilecek potansiyelde olması gerekir.

Literatürde iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi amacı ile tanımlanmış çok sayıda yayın mevcuttur. İskemi reperfüzyon sonrası oluşan hasardan primer olarak nötrofiller ve onların oluşturduğu serbest radikaller sorumludur. nötrofiller

reperfüzyon hasarının primer mediatörü olarak kabul edilmektedir. Aktif haldeki nötrofiller araşidonik asit metabolitleri salgılayarak, yumaklaşan trombositler ve eritrositler ile birlikte reperfüzyon sonrası kapillerlerin obstrüksiyonuna yol açarlar. Bütün bu hücrel metabolik olaylar sonucu vasküler oklüzyon ve sonrasında flep nekrozu gelişir. Yapılan son çalışmalarda, nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur (45). PNL'ler damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktive olmuş trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya neden olurlar (46). İskemi arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Sonuç olarak dokuya tekrar kan akımı sağlansa bile bu tıkaçlar dolaşımın hücrelere ulaşmasını engelleyebilirler (46). Serbest radikallerin oluşumunda ve İ-R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerirler (47,48). Bu enzimler oksidatif doku hasarında önemli roller üstlenir. PNL'lerin aktivasyonu ile PNL sekonder granüllerden salınan apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (47,48). Bu da kısır döngünün bir parçasıdır. Bundan dolayı son çalışmalar özellikle nötrofillerin fonksiyonları üzerinedir. Yapılan birçok çalışmada dokularda nötrofil sayısını azaltan ajanların flep yaşayabilirliğini de arttırdığı gösterilmiştir. Lee ve ark. iskemik myokutan fleplerde nötrofil sayısını azaltan antineoplastik ajan olan siklosporin kullanarak flep sağkalımını arttırmıştır (126). Askar ve ark. farklı antineoplastik ajanları kullanarak uygun düşük doz da nötropeni yapan antineoplastik ajan araştırmışlardır (48).

Bu araştırmacılardan Salgado ve Killroy yağ doku stromal hücrelerinin çeşitli sitokinler salgılayarak anti-apoptotik etkinlik gösterdiğini ve adipoz doku kaynaklı hücrelerin otoimmün yanıtı ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (127,128).

Vasküler stromal fraksiyon, İnterlökin 10 ve Prostaglandin E2 (PGE2) sekresyonu sağlayarak immünsupresyon ve nötropeni sağlamaktadır (129,130).

Yine kronik iskemik myokardlı deneklerde yapılan çalışmalarda adipoz kaynaklı VSF uygulananlarda cardiomyositlere diferansiasyon, neoanjiogenezin yanı sıra antienflamatuar etkinin de arttığı gösterilmiştir (131,132).

Biz çalışmamızda yukarıdaki makalelere paralel olarak tüm tedavi guruplarındaki nötrofil sayısını, radyoterapi almış gurup II'ye göre anlamlı düzeyde daha düşük bulduk. Bu etkinin VSF uyguladığımız gurup III'de VSF'nin anti-apoptotik ve anti-inflamatuar etkisine bağlı oluştuğunu düşünüyoruz.

Yetişkin kök hücreler, non-embryonik kök hücre grubunda yer alır. Bu hücreler morfolojilerine, yüzeyel işaretleyicilerine diferansiyasyon potansiyellerine göre mezenkimal kök hücre, hematopoetik kök hücre ve endotelial progenitör hücre gibi alt guruplara ayrılırlar. Yetişkin kök hücrelerin temel görevi buldukları ortamda oluşacak hasarlardan sonra dokuyu tamir etmek ve doku bütünlüğünün devamını sağlamaktır. Bu hücrelerin farklı hücrelere diferansiye olabilme ve sonsuz bölünebilme özellikleri vücudumuzda bulunan somatik hücrelerden temel farklarıdır. MKH'ler, birçok dokuda bulunurlar ve uygun sinyal oluşuncaya kadar farklılaşma göstermezler (133,134). Ayrıca MKH'lerin hepatosit, fibroblast, kas, sinir ve epitel hücresi gibi farklı germ tabakasından köken alan hücrelere dönüşebilme özelliklerine 'trans-diferansiyasyon' adı verilmiştir (57,58,135,136). CTGF kullanılarak insan MKH'lerinin fibroblasta diferansiye olabileceği sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmada gösterilmiştir (137). Rea S ve ark. yaptığı çalışmada kemik iliği kaynaklı kök hücreleri kullandı ve kök hücrelerin yanık yarasında inflammatuar hücrelere, fibroblastlara, keratinositlere farklılaştığını göstermiştir (138).

Kemik iliği (Kİ) kökenli MKH'lerin klinikte kullanım amacıyla düşünüldüğünde elde edilmesi için invaziv ve ağırlı bir girişim olan kemik iliği biyopsisi yapılması gerekmektedir. Vücutta bol miktarda bulunan yağ dokusundan liposakşın gibi daha az invaziv yöntem sonucunda elde edilmesi ve doku başına düşen MKH sayısının fazla olması kök hücre tedavilerinde kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre ADAS'ları avantajlı kılmaktadır. Taze yağ dokusundaki nükleuslu hücrelerin %27'si kök hücredir. Kİ'nde bu oran %0,001-0,004 arasındadır (139).

Yağ doku kaynaklı kök hücreler kolay elde edilebilen zengin bir otogreft kaynağıdır (139). Saflastırılmış yağ doku kaynaklı kök hücrelerinin etkinliği heterojen hücre karışımından oluşan VSF ile karşılaştırıldığında in-vitro farklılaşma potansiyeli daha fazladır (140). Ancak VSF'den ADAS izolasyonunda daha fazla teknik ekipmana ihtiyaç duyulmakta, daha uzun zaman gerektirmekte ve tedavi maliyetini yükseltmektedir. Bizim çalışmamızda da VSF kullanılmış olup yukarıda bahsedilen çalışmalar ışığında VSF içerisinde ADAS olduğu kabul edilerek çalışma tamamlanmıştır. Sonuçlarımız buna paralel olarak bulunmuştur.

Yağ dokusunun küçük parçalara ayrılması ve enzimatik sindirime maruz bırakılması sonucu elde edilen VSF; fibroblast, endotel hücreleri, perisitler, preadipositler ve çeşitli stromal progenitör hücreler içermektedir. VSF içerisinde bulunan stromal progenitör hücreler, uygun şartlar ve mikroçevre altında adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik ve nörojenik farklılaşmaya uğrayabilmektedir. VSF içinde bulunan ve erken vasküler öncü hücresi olarak görev yapan hücreler mevcuttur. Kültüre edilmiş ADAS'lar ile karşılaştırıldığında VSF homojen hücre yapısına sahip değildir ve fakat kök hücre içerdiği çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (121). Tanaka ve ark. yaptığı manuel VSF hazırlanması ile otomatik izolasyon sistemleri ile VSF hazırlanması arasındaki ADAS miktarının benzer olduğu çalışması da VSF de kök hücre bulunduğunu göstermektedir (141). Bizim çalışmamızda kök hücre bulundurması kanıtlanmamış olsa da sonuçlarımız varlığını diğer çalışmalarda olduğu gibi teyit etmektedir.

Stromal vasküler fraksiyon'un flep sağkalımı zerine olan etkisini belirlemek amaçlı VSF, per operatif lateral torasik arter çevresine ve flebin iade edileceği cilt çevresine uygulanmıştır. Flep sağkalımında, yara iyileşmesinde ve neovaskularizasyonda olumlu yönde değişiklik saptanmıştır. Sheng'in yaptığı çalışmada operasyondan iki gün önce VSF uygulaması yapıldığını görmekteyiz. Lu ve ark. ise bizim çalışmamıza benzer şekilde flep elevasyonu ile aynı zamanda VSF uygulaması yapmıştır ve olumlu sonuçlar almıştır. Yağ doku kişinin kendisinden elde edilir ve çeşitli muameleler sonrası VSF elde edilip yine aynı kişiye uygulanır. Bizim flep elevasyonu ile aynı seansta VSF uygulaması yapmamızdaki amacımız, aynı kişiden elde edilecek olan yağ doku kaynaklı VSF yi ikinci bir cerrahi prosedüre

gerek kalmadan tek seansta uygulama yolunun örnekleme ve Lu'nun çalışmasına paralel olarak olumlu sonuçlar aldığımızı söyleyebiliriz (125).

Örnek alınan deneysel çalışma modelleriyle uyumlu olmak üzere bizim çalışmamız da VSF vericisi olarak ayrılan sıçanlardan alınan yağ örnekleri kullanılmıştır (125,142,143). Oysa klinikte yağ dokusu kişinin kendisinden elde edildiği için immün reaksiyon oluşması beklenmez ve etik bir sorun oluşturmaz (144). VSF nun yağ emme yöntemiyle elde edilmesi kolay ve morbiditeyi çok fazla arttırmayan bir yöntemdir. Radyasyon, deride akut doku inflamasyonu sonrası progresif kan damarlarının kaybına ve intersitisyel alanda fibrosize yol açmaktadır (145,146). Radyasyon uygulanmış bölgelerden kaldırılan fasyokutan flepleri bu olumsuz etkilerden korumak amacıyla vasküler stromal fraksiyon'un etkilerinden yararlanılabilir. Cerrahi öncesi dönemde veya cerrahiyle eş zamanlı olarak VSF uygulanması anjiogenezis ve neovaskülarizasyon sağlayarak, ciltte nötrofil yoğunluğunu azaltıp iskemi reperfüzyon hasarını engelleyerek, radyoterapiye bağlı fibrozisi önleyip kollejen onarımını artırarak flep cerrahisinde cilt kritik iskemi süresinde avantaj sağlayabilir. Bizim çalışmamızla birlikte yapılan mevcut çalışmalar bunu destekler niteliktedir. Bu çalışmanın, ileri deneysel ve klinik çalışmalara ve sonrasında yapılabilecek cerrahi uygulamalara yol gösterici olacağını umuyoruz.

SONUÇ

Flep sağkalımında yaşanan sorunlar ve çözmeye yönelik uygulamalar plastik ve rekonstruktif cerrahinin temel konularından biridir. Flep yaşayabilirliğin arttırmaya yönelik yıllardır çeşitli çalışmalar yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Baş boyun cerrahisi ve meme cerrahisinde özellikle onkolojik cerrahi açısından radyoterapi uygulanmış alanlarda rekonstrüksiyon, günümüzde sık rastlanan bir durumdur. Radyoterapinin deri dolaşımı ve yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkileri göz önüne alındığında rekonstrüksiyonun zorluğu önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Son yıllarda doku yenileme ve rejenerasyonu üzerine yapılan çalışmalar kök hücre üzerine yoğunlaşmıştır. Vasküler Stromal Fraksiyon da bu çalışmanın bir ürünüdür. Emme yöntemi ile minimal morbidite bırakılarak elde edilen yağ doku kaynaklı bu ürün kişinin kendisinden elde edildiği için immün reaksiyon oluşması beklenmez ve etik bir sorun oluşturmaz. Uygulandığı alanda fibroblastik aktiviteyi artırır, neovaskularizasyonu sağlar, doku rejenerasyonunu hızlandırır.

Çalışmamızda, VSF'nin, radyoterapi uygulanmış sahadan kaldırılan aksiyel paternli deri fleplerinin yaşayabilen kısmını arttırdığını flep yüzey alan ölçümü ile gösterdik. Aynı zamanda VSF'nin içeriklerindeki büyüme faktörleri ve proaktif hücreler sayesinde flep sahasında neoanjiogenezi arttırdığını, flep sağkalımına negatif etkisi olan inflamatuvar hücre birikimini azalttığını ve fibroblastik aktiviteyi artırarak radyoterapiye bağlı oluşan kollagenizasyonu azalttığını gösterdik.

Bu ürün kolay elde edilmesi, ucuz olması, otoplast olduğundan güvenli olması, ameliyat sırasında uygulanabilmesi nedeni ile doku rejenerasyonunda ve rekonstrüksiyonunda çok geniş kullanım alanı bulacaktır. Bu deneysel çalışmanın benzer konularda yapılacak klinik çalışmalara öncü olacağını ve VSF nin benzer sorunların düzeltilmesi için pratik uygulamalarda kullanılmasına katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Özalpan A. *Temel Radyobioloji*. basım, editor. İstanbul: Haliç Üniv.; 2001.
2. Beyzadeoglu M, Ozyigit G, Ebruli C. *Clinical Radiation Oncology*: Springer; 2010.
3. COŞKUN Ö. İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri.
4. Siemionow M, Mee J, Porvasnik S, Krapohl BD, Ozer K, Piza P, et al. Effects of 8-Gy radiation on the microcirculation of muscle flaps in the rat. *Plastic and reconstructive surgery*. 1999;104(5):1372-8.
5. Sonstevold T, Johannessen AC, Stuhr L. A rat model of radiation injury in the mandibular area. *Radiation oncology*. 2015;10(1):129.
6. Salama JK, Chmura SJ. Surgery or ablative radiotherapy for breast cancer oligometastases. *American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO American Society of Clinical Oncology Meeting*. 2015;35:e8-e15.
7. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual review of nutrition*. 1992;12(1):207-33.
8. Sheng L, Yang M, Li H, Du Z, Yang Y, Li Q. Transplantation of adipose stromal cells promotes neovascularization of random skin flaps. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2011;224(3):229-34.
9. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.
10. 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*. 2001;7(2):211-28.
11. Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T, Nagai R. Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life sciences*. 2007;80(6):559-65.
12. Wilkison W, Choy L, Spiegelman B. Biosynthetic regulation of monobutyrin, an adipocyte-secreted lipid with angiogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(25):16886-91.
13. Cormack G, Lamberty B. A classification of fascio-cutaneous flaps according to their patterns of vascularisation. *British Journal of Plastic Surgery*. 1984;37(1):80-7.
14. Mathes SJ, Nahai F. *Reconstructive surgery: principles, anatomy & technique*: Churchill Livingstone; 1997.
15. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;121(1):50-8.
16. Angelos PC, Winn SR, Kaurin DS, Holland J, Wax MK. Evaluating revascularization and flap survival using vascular endothelial growth factor in an irradiated rat model. *Archives of facial plastic surgery*. 2011;13(3):185-9.

17. Perez CA, Brady LW. Overview in Principles and Practice of Radiation Oncology:second edition. JB Lippincott Company Philadelphia, New York, London. 1992; 1-63
18. Hallock GG. Direct and indirect perforator flaps: The history and the controversy. *Plastic and reconstructive surgery*. 2003;111(2):855-66.
19. Manchot C. *Die Hautarterien des menschlichen Körpers*: Vogel; 1889.
20. Tansini I. Sopra il mio nuovo processo di amputazione della mammella. *Gazz Med Ital*. 1906;57:141.
21. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *British Journal of Plastic Surgery*. 1973;26(3):202-13.
22. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. *Plastic and reconstructive surgery*. 1981;67(2):177-87.
23. Taylor GI, Palmer J. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *British journal of plastic surgery*. 1987;40(2):113-41.
24. Gaboriau HP, Murakami CS. Skin anatomy and flap physiology. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2001;34(3):555-69.
25. Blondeel PN, Morris SF, Hallock GG, Neligan PC. *Perforator flaps: anatomy, technique, & clinical applications*: CRC Press; 2013.
26. Sloan G, Reinisch J. Flap physiology and the prediction of flap viability. *Hand clinics*. 1985;1(4):609-19.
27. Vedder N. Flap physiology. *Plastic surgery*. 2006;1:483-506.
28. Spalteholz W, Spanner R. *Atlas Anatomi Manusia*. EGC, Jakarta. 1987.
29. Chu E, Byrne P, Goding G. *Skin flap physiology and wound healing*. Cummings otolaryngology: head and neck surgery Elsevier, Philadelphia. 2010.
30. Mathes SJ, Hentz VR. *Plastic surgery*: Saunders; 2006.
31. Daniel R. Principles and physiology of skin flap surgery. *Plastic surgery*. 1990;1:275-328.
32. Khiabani KT, Kerrigan CL. Differing flow patterns between ischemically challenged flap skin and flap skeletal muscle: implications for salvage regimens. *Plastic and reconstructive surgery*. 2002;109(1):220-7.
33. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plastic and reconstructive surgery*. 1983;72(6):766-74.
34. Smith J, Pribaz J. Flaps. Achauer BM. *Plastic Surgery Indications, Operations and Outcomes*.2:261-90.
35. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual review of medicine*. 1991;42(1):225-46.
36. Green C, Gower J, Healing G, Cotterill L, Fuller B, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radical Research*. 1989;7(3-6):255-64.
37. Onténiente B, Rasika S, Benchoua A, Guégan C. Molecular pathways in cerebral ischemia. *Molecular neurobiology*. 2003;27(1):33-72.
38. Mccord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical biochemistry*. 1993;26(5):351-7.
39. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1988;254(5):G768-G74.

40. Dundar Y, Aslan R. Hekimlikte oksidatif stress ve antioksidanlar. 112 pages. TC Afyon Kocatepe Universitesi Yayın. 2000(29).
41. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya. 1995;1.
42. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circulation Research*. 1990;66(5):1436-44.
43. Lee C, Kerrigan CL. Neutrophil localization following reperfusion of ischemic skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(5):910-5.
44. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1989;257(5):G683-G8.
45. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis RJ. Inflammatory responses to ischemia, and reperfusion in skeletal muscle. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;179(1-2):169-87.
46. Zamboni WA, Stephenson LL, Roth AC, Suchy H, Russell RC. Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: CD18-dependent neutrophil-endothelial adhesion and arteriolar vasoconstriction. *Plastic and reconstructive surgery*. 1997;99(7):2002-7.
47. Cetin C, Kose AA, Aral E, Colak O, Ercel C, Karabagli Y, et al. Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Annals of plastic surgery*. 2001;47(5):540-6.
48. Askar Im, Oktay MF, Gurlek A, Bac BI. Protective effects of some antineoplastic agents on ischemia-reperfusion injury in epigastric island skin flaps. *Microsurgery*. 2006;26(3):193-9.
49. Bayramiçli M. Deneysel mikrocerrahi: Temel araştırma, doku ve organ nakli modelleri. İstanbul: Ofset Matbaacılık; 2005.
50. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*. 1981;292(5819):154-6.
51. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*. 1961;14(2):213-22.
52. Ahsan T, Doyle A, Nerem R. Stem cell research. *Principles of Regenerative Medicine*. 2009:28-47.
53. Karaöz E, Ovalı E. Kök hücreler. Derya Kitabevi, Trabzon. 2004.
54. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Experimental cell research*. 2008;314(9):1937-44.
55. Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1966;16(3):381-90.
56. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;56(3):283-94.
57. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(25):14482-6.

58. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000;288(5471):1660-3.
59. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of cellular biochemistry*. 2003;89(6):1235-49.
60. Neels JG, Thinnis T, Loskutoff DJ. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *The FASEB journal*. 2004;18(9):983-5.
61. Fu S, Luan J, Xin M, Wang Q, Xiao R, Gao Y. Fate of adipose-derived stromal vascular fraction cells after co-implantation with fat grafts: evidence of cell survival and differentiation in ischemic adipose tissue. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013;132(2):363-73.
62. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95.
63. Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem cells translational medicine*. 2012;1(3):230-6.
64. You H-J, Han S-K. Cell therapy for wound healing. *Journal of Korean medical science*. 2014;29(3):311-9.
65. Stashower M, Smith K, Williams J, Skelton H. Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 1999;25(12):945-9.
66. Eto H, Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(4):1087-97.
67. Xu N, Guo S, Wang Y, Sun Q, Wang C. Transplantation of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Promotes the Survival of Venous-Congested Skin Flaps in Rabbit Ear. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015;71(2):557-63.
68. Park I-S, Mondal A, Chung P-S, Ahn JC. Prevention of skin flap necrosis by use of adipose-derived stromal cells with light-emitting diode phototherapy. *Cytherapy*. 2015;17(3):283-92.
69. Brewer MB, Stump AL, Holton LH, Janes LE, Silverman RP, Singh DP. Effects of systemic tadalafil on skin flap survival in rats. *Eplasty*. 2012;12:e45.
70. de Lima Silva JJ, Guimaraes SB, da Silveira ER, de Vasconcelos PR, Lima GG, Torres SM, et al. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg*. 2009;33(1):104-9.
71. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128(6):685e-92e.
72. Suzuki S, Miyachi Y, Niwa Y, Isshiki N. Significance of reactive oxygen species in distal flap necrosis and its salvage with liposomal SOD. *Br J Plast Surg*. 1989;42(5):559-64.
73. Aydogan H, Gurlek A, Parlakpınar H, Askar I, Bay-Karabulut A, Aydogan N, et al. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*. 2007;60(5):563-8.

74. Gumus N, Odemis Y, Yilmaz S, Tuncer E. Effect of topically applied minoxidil on the survival of rat dorsal skin flap. *Aesthetic Plast Surg.* 2012;36(6):1382-6.
75. Gideroglu K, Yilmaz F, Aksoy F, Bugdayci G, Saglam I, Yimaz F. Montelukast protects axial pattern rat skin flaps against ischemia/reperfusion injury. *The Journal of surgical research.* 2009;157(2):181-6.
76. Cury V, Bossini PS, Fangel R, Crusca Jde S, Renno AC, Parizotto NA. The effects of 660 nm and 780 nm laser irradiation on viability of random skin flap in rats. *Photomedicine and laser surgery.* 2009;27(5):721-4.
77. Li W, Enomoto M, Ukegawa M, Hirai T, Sotome S, Wakabayashi Y, et al. Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(4):858-66.
78. Kapur B, Stal S, Spira M, Gherardini G. *Plastik Cerrahinin Sırları*, Weinzweig J, Ed. İstanbul. 2007.
79. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. *Plastic and reconstructive surgery.* 1984;73(6):943-8.
80. Dantzer D, Ferguson P, Hill RP, Keating A, Kandel RA, Wunder JS, et al. Effect of radiation and cell implantation on wound healing in a rat model. *Journal of surgical oncology.* 2003;83(3):185-90.
81. Sheplan LJ, Juliano JJ. Use of radiation therapy for patients with soft-tissue and bone sarcomas. *Cleveland Clinic journal of medicine.* 2010;77(Suppl 1):S27-S9.
82. Al-Absi E, Farrokhyar F, Sharma R, Whelan K, Corbett T, Patel M, et al. A systematic review and meta-analysis of oncologic outcomes of pre-versus postoperative radiation in localized resectable soft-tissue sarcoma. *Annals of surgical oncology.* 2010;17(5):1367-74.
83. Kunisada T, Ngan S, Powell G, Choong P. Wound complications following pre-operative radiotherapy for soft tissue sarcoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO).* 2002;28(1):75-9.
84. Dean N, Sweeny L, Harari P, Bonner J, Jones V, Clemons L, et al. Wound healing following combined radiation and cetuximab therapy in head and neck cancer patients. *Journal of wound care.* 2011;20(4):166.
85. Tibbs MK. Wound healing following radiation therapy: a review. *Radiotherapy and Oncology.* 1997;42(2):99-106.
86. Gorodetsky R, Mou X, Fisher DR, Taylor JM, Withers HR. Radiation effect in mouse skin: dose fractionation and wound healing. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics.* 1990;18(5):1077-81.
87. Bujko K, Suit H, Springfield D, Convery K. Wound healing after preoperative radiation for sarcoma of soft tissues. *Surgery, gynecology & obstetrics.* 1993;176(2):124-34.
88. De Loecker W, Van der Schueren E, Stas M, Doms D. The effects of x-irradiation on collagen metabolism in rat skin. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine.* 1976;29(4):351-8.
89. Krueger W, Goepfert H, Romsdahl M, Herson J, Withers R, Jesse R. Fibroblast implantation enhances wound healing as indicated by breaking strength determinations. *Otolaryngology.* 1977;86(5):ORL-804-11.

90. Krueger W, Jesse R, Goepfert H, Herson J, Romsdahl M, Walker W, editors. Wound healing enhancement: fibroblast implantation to increase breaking strength in normal and irradiated skin. *Surgical forum*; 1978.
91. Gorodetsky R, McBride WH, Withers HR, Miller GG. Effect of fibroblast implants on wound healing of irradiated skin: assay of wound strength and quantitative immunohistology of collagen. *Radiation research*. 1991;125(2):181-6.
92. Ferguson PC, Boynton EL, Wunder JS, Hill RP, O'Sullivan B, Sandhu JS, et al. Intradermal injection of autologous dermal fibroblasts improves wound healing in irradiated skin. *Journal of Surgical Research*. 1999;85(2):331-8.
93. Dantzer D, Ferguson P, Hill RP, Keating A, Kandel RA, Wunder JS, et al. Effect of radiation and cell implantation on wound healing in a rat model. *J Surg Oncol*. 2003;83(3):185-90.
94. Xie MW, Gorodetsky R, Micewicz ED, Mackenzie NC, Gaberman E, Leviansky L, et al. Marrow-derived stromal cell delivery on fibrin microbeads can correct radiation-induced wound-healing deficits. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(2):553-61.
95. Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science*. 1987;237(4820):1333-6.
96. Bernstein EF, Harisiadis L, Salomon G, Norton J, Sollberg S, Uitto J, et al. Transforming growth factor- β improves healing of radiation-impaired wounds. *Journal of investigative dermatology*. 1991;97(3):430-4.
97. Cromack DT, Porras-Reyes B, Purdy JA, Pierce GF, Mustoe TA. Acceleration of tissue repair by transforming growth factor beta 1: identification of in vivo mechanism of action with radiotherapy-induced specific healing deficits. *Surgery*. 1993;113(1):36-42.
98. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine & growth factor reviews*. 1997;8(1):21-43.
99. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. TGF- β 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2003;284(5):H1612-H7.
100. Nall AV, Brownlee RE, Colvin CP, Schultz G, Fein D, Cassisi NJ, et al. Transforming growth factor β 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*. 1996;122(2):171-7.
101. Huemer GM, Shafiqhi M, Meirer R, Debagge P, Piza-Katzer H, Gurunluoglu R. Adenovirus-mediated transforming growth factor-beta ameliorates ischemic necrosis of epigastric skin flaps in a rat model. *The Journal of surgical research*. 2004;121(1):101-7.
102. Huemer GM, Meirer R, Gurunluoglu R, Kamelger FS, Dunst KM, Wanner S, et al. Comparison of the effectiveness of gene therapy with transforming growth factor- β or extracorporeal shock wave therapy to reduce ischemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats. *Wound repair and regeneration*. 2005;13(3):262-8.
103. Riedel K, Koellensperger E, Ryssel H, Riedel F, Goessler U, Germann G, et al. Abrogation of TGF- β by antisense oligonucleotides modulates expression of VEGF and increases angiogenic potential in isolated fibroblasts from radiated skin. *International journal of molecular medicine*. 2008;22(4):473-80.

104. Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2000;32(3):263-7.
105. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2 1. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):26-45.
106. Wang X, Yan D, Liu Y. [The effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on neovascularization and prefabricated flap survival]. *Zhonghua zheng xing wai ke za zhi= Zhonghua zhengxing waikē zazhi= Chinese journal of plastic surgery*. 2002;18(5):278-9.
107. Park HJ, Lee S, Kang KH, Heo CY, Kim JH, Yang HS, et al. Enhanced random skin flap survival by sustained delivery of fibroblast growth factor 2 in rats. *ANZ journal of surgery*. 2013;83(5):354-8.
108. Asami T, Soejima K, Kashimura T, Kazama T, Matsumoto T, Morioka K, et al. Effects of combination therapy using basic fibroblast growth factor and mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on skin graft revascularisation. *Journal of plastic surgery and hand surgery*. 2015(0):1-5.
109. Çetin M, Çapan Y. bFGF (bazik fibroblast büyüme faktörü) ve formülasyonlarında yeni yaklaşımlar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2004;24(2):107-24.
110. Tattini C, Manchio J, Zaporozhan V, Carderelli G, Bonassar L, Spangenberg A, et al. Role of TGF- β and FGF in the Treatment of Radiation-Impaired Wounds Using a Novel Drug Delivery System. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;122(4):1036-45.
111. Matsumine H. Treatment of Skin Avulsion Injuries with Basic Fibroblast Growth Factor. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*. 2015;3(4).
112. Haws MJ, Erdman D, Bayati S, Brown RE, Russell RC. Basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and prefabricated flap survival. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2001;17(1):39-42; discussion 3-4.
113. Khouri RK, Brown DM, Leal-Khouri SM, Tark KC, Shaw WW. The effect of basic fibroblast growth factor on the neovascularisation process: skin flap survival and staged flap transfers. *British journal of plastic surgery*. 1991;44(8):585-8.
114. Rashid MA, Akita S, Razzaque MS, Yoshimoto H, Ishihara H, Fujii T, et al. Coadministration of basic fibroblast growth factor and sucrose octasulfate (sucrafate) facilitates the rat dorsal flap survival and viability. *Plastic and reconstructive surgery*. 1999;103(3):941-8.
115. Park HJ, Lee S, Kang KH, Heo CY, Kim JH, Yang HS, et al. Enhanced random skin flap survival by sustained delivery of fibroblast growth factor 2 in rats. *ANZ journal of surgery*. 2013;83(5):354-8.
116. Guo L, Li X, Yang S, Xu Y, Tao R, Wulan H, et al. A highly infectious chimeric adenovirus expressing basic fibroblast growth factor exerts potent targeted therapy for rabbit ear chronic ischemic wounds. *Plast Reconstr Surg*. 2014;134(2):248e-56e.
117. Houck KA, Leung D, Rowland A, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(36):26031-7.
118. Akimoto M, Takeda A, Matsushita O, Inoue J, Sakamoto K, Hattori M, et al. Effects of CB-VEGF-A injection in rat flap models for improved survival. *Plastic and reconstructive surgery*. 2013;131(4):717-25.

119. Richter GT, Fan CY, Ozgursoy O, McCoy J, Vural E. Effect of vascular endothelial growth factor on skin graft survival in Sprague-Dawley rats. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2006;132(6):637-41.
120. Hasdemir M, Agir H, Eren GG, Aksu MG, Alagoz MS, Duruksu G, et al. Adipose-Derived Stem Cells Improve Survival of Random Pattern Cutaneous Flaps in Radiation Damaged Skin. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2015.
121. Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Translational Research*. 2014;163(4):399-408.
122. Birnbaum Y, Leor J, Kloner RA. Pathobiology and clinical impact of reperfusion injury. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 1997;4(2):185-95.
123. Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. *Br J Plast Surg*. 2003;56(7):653-9.
124. Sheng L, Yang M, Li H, Du Z, Yang Y, Li Q. Transplantation of adipose stromal cells promotes neovascularization of random skin flaps. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2011;224(3):229-34.
125. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(1):50-8.
126. Lee C, Kerrigan CL, Picard-Ami Jr LA. Cyclophosphamide-induced neutropenia: effect on postischemic skin-flap survival. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992;89(6):1092-7.
127. J Salgado A, L Reis R, Sousa N, M Gimble J. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current stem cell research & therapy*. 2010;5(2):103-10.
128. Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *Journal of cellular physiology*. 2007;212(3):702-9.
129. Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, Cao Y. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue engineering*. 2007;13(6):1185-95.
130. McIntosh KR, Frazier T, Rowan BG, Gimble JM. Evolution and future prospects of adipose-derived immunomodulatory cell therapeutics. *Expert review of clinical immunology*. 2013;9(2):175-84.
131. Badimon L, Oñate B, Vilahur G. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2015.
132. Koh YJ, Koh BI, Kim H, Joo HJ, Jin HK, Jeon J, et al. Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(5):1141-50.
133. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis res ther*. 2007;9(1):204.
134. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2010;37(2):75-83.

135. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105(3):369-77.
136. Ong S-G, Lee WH, Kodo K, Wu JC. MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. *Advanced drug delivery reviews*. 2015.
137. Lee CH, Shah B, Moioli EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(9):3340-9.
138. Rea S, Giles NL, Webb S, Adcroft KF, Evill LM, Strickland DH, et al. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound--more than just inflammation. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2009;35(3):356-64.
139. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Peault B, Rubin JP, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010;77(1):22-30.
140. Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T, Lucconi G, Marazzi M, Tosca MC, et al. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2010;16(6):1515-21.
141. Tanaka S, Iida H, Eto H, Kato H, Aoi N, Kuno S, et al. Stromal vascular fraction isolated from lipo-aspirates using an automated processing system: bench and bed analysis. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2013;7(11):864-70.
142. Suartz CV, Gaiba S, Franca JP, Aloise AC, Ferreira LM. Adipose-derived stem cells (ADSC) in the viability of random skin flap in rats. *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*. 2014;29 Suppl 2:6-9.
143. Gündeşlioğlu AÖ, İnan İ, Tezcan Y, Toy H, Emlik D, Aktan M, et al. Trombositten Zengin Plazma ile Kombine Edilmiş Yağ Doku Kökenli Stromal Vasküler Fraksiyonun Silikon İmplantlar Çevresinde Radyasyonun İndüklediği Kapsül Kontraktürü Üzerine Etkileri. *Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turk Plast Surg)*. 2014;22(1):6-12.
144. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grolleau JL, et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 2014;16(2):245-57.
145. Siemionow M, Mee J, Porvasnik S, Krapohl BD, Ozer K, Piza P, et al. Effects of 8-Gy radiation on the microcirculation of muscle flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(5):1372-8.
146. They A, Blery P, Malard O, Pilet P, Sourice S, Corre P, et al. Role of the stromal vascular fraction from adipose tissue in association with a phosphocalcic scaffold in bone regeneration in an irradiated area. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2015.