

T.C  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**İTERPOLASYON FLEPLERİNDE NEOVASKÜLARİZASYONU  
HIZLANDIRMAK İÇİN RAT ADİPOZ DOKU KÖKENLİ  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KULLANILMASI**

Dr. Hakkı İZMİRLİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Uzmanlık Tezi

2011

T.C  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**İTERPOLASYON FLEPLERİNDE NEOVASKÜLARİZASYONU  
HIZLANDIRMAK İÇİN RAT ADİPOZ DOKU KÖKENLİ  
MEZENKİMAL KÖK HÜCREKULLANIMI**

Dr. Hakkı İZMİRLİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Şahin ALAGÖZ

Anabilim Dalı Başkanı  
Doç. Dr. Tonguç İŞKEN

ETİK KURUL ONAYI: 07/07/2009-HADYEK 12/1

2011

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında klinik ve cerrahi deneyimi yanı sıra, plastik ve rekonstrüktif cerrahi etik ve kültürünü bizlere yansıtan, Anabilim Dalı Başkanımız **Sayın Doç. Dr. Tonguç İşken' e,**

Tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan ve mesleki birlikteliğimiz boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım **Sayın Doç. Dr. Şahin Alagöz'e,**

Benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen **Sayın Doç. Dr. Hakan Ağır, Doç. Dr. Cenk Şen ve Yrd. Doç. Dr. Çiğdem Ünal'a,**

Tez çalışmamda verdiği katkılardan ötürü, kök hücre konusunda ülkemizin önde gelen bilim adamlarından Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM) Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre A.D. Bşk.' ı **Sayın Prof. Dr. Erdal Karaöz'e,**

Tezimin ilerleyen safhalarında sintigrafik incelemeler bölümünü gerçekleştirmemi sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen **Sayın Doç. Dr. Serkan İşören'e,**

Tezimin histopatolojik incelemeler bölümüne özenli çalışmalarıyla katkıda bulunan **Sayın Prof. Dr. Bahar Müezzinoğlu'na,**

Tüm öğrenim hayatım boyunca benden desteklerini ve sevgilerini eksik etmeyen **aileme,**

Deneysel çalışmamın cerrahi işlemleri safhasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşım **Dr. Hüseyin Gerçek'e** ve altı yıl süren uzmanlık eğitimim sırasında birlikte dostluk ve dayanışma içinde çalıştığımız anabilim dalımızdaki değerli araştırma görevlisi arkadaşlarıma, teşekkürü borç bilirim.

Saygılarımla

Dr. Hakkı H. İZMİRLİ

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. AMAÇ VE KAPSAM</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....  | <b>3</b>  |
| 2.1. FLEP CERRAHİSİ.....  | 3         |
| 2.1.1. TARİHÇE .....  | 3         |
| 2.2. FLEPLERİN SINIFLANDIRILMASI.....   | 4         |
| 2.2.1. DERİ FLEPLERİNİN VASKÜLER ANATOMİYE GÖRE SINIFLANDIRILMASI.....                  | 4         |
| 2.2.2. DERİ FLEPLERİNİN HAREKETLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI.....                       | 4         |
| 2.3. İNTERPOLASYON FLEBİ.....   | 6         |
| 2.3.1. PLASTİK CERRAHİDE SIK KULLANILAN İNTERPOLASYON FLEPLERİ.....                     | 9         |
| 2.4. FLEP FİZYOLOJİSİ VE YAŞAYAN FLEP ALANINI ARTIRMAYA YÖNELİK KULLANILAN İLAÇLAR..... | 11        |
| 2.4.1. CİLT AKIMININ SİSTEMİK KONTROLÜ.....   | 11        |
| 2.4.2. LOKAL KONTROL.....   | 12        |
| 2.4.3. CİLT FLEBİ KALDIRILDIĞINDA GÖZLENEN FİZYOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER.....            | 12        |
| 2.5. İNTERPOLASYON FLEPLERİNİN REVASKÜLARİZASYONU.....                                  | 14        |
| 2.6. İNTERPOLASYON FLEPLERİNİN ERKEN AYRILMASINA YÖNELİK YAPILAN GİRİŞİMLER.....        | 14        |
| 2.7. FLEP NEOVASKÜLARİZASYONUNDA ROL ALAN ANJİYOGENİK MOLEKÜLER.....                    | 15        |
| 2.8. KÖK HÜCRELER.....  | 19        |
| 2.8.1. GENEL BİLGİLER.....  | 19        |
| 2.8.2. KÖK HÜCRELERİN SINIFLANDIRILMASI.....  | 22        |
| 2.8.3. MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELER.....   | 23        |
| 2.8.4. KÖK HÜCRELERİN POTANSİYEL KULLANIM ALANLARI.....                                 | 25        |
| 2.8.5. KÖK HÜCRE KAYNAĞI OLARAK ADİPOZ DOKU.....  | 26        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....   | <b>28</b> |
| 3.1. DENEKLER .....   | 28        |
| 3.2. GRUPLAR .....  | 28        |
| 3.3. ANESTEZİ VE AMELİYAT.....  | 30        |
| 3.4. sAD-MKH'LERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRE HAZIRLANMASI.....                              | 34        |
| 3.4.1. sAD-MKH'LERİN KARAKTERİZASYONU.....  | 35        |
| 3.4.2. İMMÜN FENOTİPLEME.....   | 35        |
| 3.4.3. İMMÜNHİSTOKİMYASAL İŞARETLEME .....  | 36        |
| 3.4.4. İMMÜNFLORESAN İŞARETLEME.....  | 37        |
| 3.4.5. MKH'LERİN GFP İLE İŞARETLENMESİ.....   | 37        |
| 3.5. DEĞERLENDİRME .....  | 39        |
| 3.5.1. MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME.....   | 39        |
| 3.5.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....  | 40        |
| 3.5.3. MİKROANJİYOGRAFIK DEĞERLENDİRME.....   | 40        |
| 3.5.4. TC-99M (MIBI) SİNTİGRAFIK DEĞERLENDİRME .....                                    | 41        |
| 3.5.5. GFP İŞARETLİ KÖK HÜCRELERİN İZLENMESİ İLE DEĞERLENDİRME .....                    | 42        |
| <b>4. BULGULAR</b> .....  | <b>43</b> |
| 4.1. MAKROSKOPİK BULGULAR.....  | 43        |
| 4.2. MİKROANJİYOGRAFIK BULGULAR .....   | 50        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3. TC-99M (MIBI) SİNTİGRAFİ SONUÇLARI.....          | 51        |
| 4.4. GFP İŞARETLİ KÖK HÜCRE AÇISINDAN BULGULAR.....   | 54        |
| 4.4.1. SAD-MKH'LERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ.....       | 54        |
| 4.4.2. SAD-MKH'LERİN İMMUNFENOTİPİK ÖZELLİKLERİ ..... | 55        |
| 4.5. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR .....                    | 58        |
| 4.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME .....                | 63        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                              | <b>66</b> |
| <b>6. SONUÇ .....</b>                                 | <b>73</b> |
| <b>7. ÖZET .....</b>                                  | <b>74</b> |
| <b>8. ABSTRACT .....</b>                              | <b>76</b> |
| <b>9. KAYNAKLAR .....</b>                             | <b>79</b> |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- b-FGF** : Basik fibroblast büyüme faktörü  
**VEGF** : Vasküler endotelial büyüme faktörü  
**FGF** : Fibroblast büyüme faktörü  
**PIGF** : Plasenta büyüme faktörü  
**GFP** : Yeşil floresans protein (green flouresans protein)  
**PI3K** : Fosfatidilinositol 3-Kinaz  
**PGI<sub>2</sub>** : Prostaglandin I<sub>2</sub>  
**TA<sub>2</sub>** : Tromboksan A<sub>2</sub>  
**IL<sub>1</sub>** : İnterlökin I  
**TNF** : Tümör Nekroz Faktör  
**TGF** : Transforme edici Büyüme Faktörü  
**PDGF** : Platelet Kökenli Büyüme Faktörü  
**sAD-MKH**: sıçan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre

- “**L1**” : Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 5. gün ayrılan grup.  
“**L2**” : Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan grup.  
“**L3**” : Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 11. gün ayrılan grup.  
“**L4**” : Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 14. gün ayrılan grup.  
“**K1**” : YD-MKH uygulanan, pedikülü 5. gün ayrılan grup.  
“**K2**” : YD-MKH uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan grup.  
“**K3**” : YD-MKH uygulanan, pedikülü 11. gün ayrılan grup.  
“**K4**” : YD-MKH uygulanan, pedikülü 14. gün ayrılan grup

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 1:</b> Rotasyon flebi şematik çizimi.....  | 4  |
| <b>Şekil 2:</b> V-Y iletme flebi şematik çizimi.....  | 5  |
| <b>Şekil 3:</b> Transpozisyon flebi şematik çizimi.....   | 5  |
| <b>Şekil 4:</b> İnterpolasyon flebi şematik çizimi.....   | 6  |
| <b>Şekil 5:</b> Tagliacozzi bandajı.....  | 7  |
| <b>Şekil 6:</b> Alın flebi şematik çizimi.....  | 9  |
| <b>Şekil 7:</b> Cross finger flebi şematik çizimi.....  | 10 |
| <b>Şekil 8:</b> Kasık flebi şematik çizimi.....   | 10 |
| <b>Şekil 9:</b> Postauriküler flep şematik çizimi.....  | 11 |
| <b>Şekil 10:</b> Neovaskülarizasyonda rol alan anjiogenik moleküllerin şematik görünümü.....                                      | 18 |
| <b>Şekil 11:</b> Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri şematik çizimi.....  | 20 |
| <b>Şekil 12:</b> Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması.....   | 23 |
| <b>Şekil 13:</b> Planlanan interpolasyon flebi.....   | 30 |
| <b>Şekil 14:</b> Flebin kaldırılması fotoğrafı.....   | 31 |
| <b>Şekil 15:</b> Flep donör alanın kapatılması ve flebin defekte adapte edilmiş halinin fotoğrafı.....                            | 32 |
| <b>Şekil 16:</b> Yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre (YD-MKH) süspansiyonunun flebe enjekte edilmesi.....                       | 32 |
| <b>Şekil 17:</b> Flep proksimal pedikülünün kesilmesi ve flebin tekrar adapte edilmesi .....                                      | 33 |
| <b>Şekil 18:</b> Proksimal pedikülü ayrılan fleplerin pedikülü ayrıldıktan 7 gün sonraki görüntüsü ve grafikleştirilmiş hali..... | 33 |
| <b>Şekil 19:</b> sAD-MKH içeren solüsyon.....   | 38 |
| <b>Şekil 20:</b> Flep yaşam oranlarının ölçümü .....  | 39 |
| <b>Şekil 21:</b> Flep yaşam oranlarının ölçümünün grafikleştirilmiş görüntüsü.....  | 40 |
| <b>Şekil 22:</b> Sıçan penil veninden (MIBI) enjekte edilmesi fotoğrafı.....  | 41 |
| <b>Şekil 23:</b> Deneklerin eşit mesafeden çekilen dijital fotoğraflarının bilgisayar ortamında grafikleştirilmiş görüntüsü.....  | 45 |
| <b>Şekil 24:</b> Fleplerin yaşayan alanlarındaki damar dağılımı fotoğrafı.....  | 45 |
| <b>Şekil 25:</b> Grupların ortalama yaşayan flep alanlarının grafikte gösterilmesi.....   | 46 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 26:</b> Grupların ortalama % yaşayan flep alanlarının grafikte gösterilmesi.....   | 47 |
| <b>Şekil 27:</b> Gruplardaki deneklerde ölçülen flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi.....  | 48 |
| <b>Şekil 28:</b> Gruplardaki deneklerde ölçülen % flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi.....  | 49 |
| <b>Şekil 29:</b> 14. gün deneklerin mikroanjiyografik görüntüsü.....  | 50 |
| <b>Şekil 30:</b> kontrol ve deney grubu fleplerinin sintigrafik görüntüleri.....  | 51 |
| <b>Şekil 31:</b> Grupların ortalama yaşayan flep alanlarının sintigrafik olarak grafikte gösterilmesi....   | 52 |
| <b>Şekil 32:</b> Gruplardaki deneklerde sintigrafik açıdan ölçülen flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi.....                                   | 53 |
| <b>Şekil 33:</b> Deneklerin faz-kontrast mikroskopik görünümünün fotoğrafı.....   | 54 |
| <b>Şekil 34:</b> sAD-MKH'lerin akım sitometri verileri görüntüsü.....   | 55 |
| <b>Şekil 35:</b> Kontrol grubu hayvanlardan elde edilmiş parafin kesitlere GFP (A) ve GFP+Vimentin (B) immunboyaması uygulandıktan sonraki mikroskopik görünümünün fotoğrafı..... | 56 |
| <b>Şekil 36:</b> GFP+ sAD-MKH'ler uygulanmış deneklerin flep doku kesitlerinde farklı bölgelerde yerleşik GFP+ hücrelerin fotoğrafı.....  | 57 |
| <b>Şekil 37:</b> Deney grubuna ait elde edilmiş kesite GFP+Vimentin immunboyaması uygulandıktan sonraki mikroskopik görünüm.....  | 57 |
| <b>Şekil 38:</b> Grupların histopatolojik açıdan kapiller dansitelerinin grafikte gösterilmesi.....   | 58 |
| <b>Şekil 39:</b> Grupların histopatolojik açıdan kapiller dansitelerinin günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi .....   | 59 |
| <b>Şekil 40:</b> Flep ve normal doku birleşim bölgesine ait histopatolojik inceleme fotoğrafı.....  | 60 |
| <b>Şekil 41:</b> Kontrol grubuna ait histopatolojik inceleme fotoğrafı.....   | 60 |
| <b>Şekil 42:</b> Deney grubuna ait histopatolojik inceleme fotoğrafı.....   | 60 |
| <b>Şekil 43:</b> Deney grubunun günlere göre makroskobik, grafiksel, sintigrafik ve histopatolojik inceleme görüntülerinin topluca gösterilmesi .....                             | 61 |
| <b>Şekil 44:</b> Kontrol grubunun günlere göre makroskobik, grafiksel, sintigrafik ve histopatolojik inceleme görüntülerinin topluca gösterilmesi.....                            | 62 |
| <b>Şekil 45:</b> Deneklerin günlere göre ortalama % yaşayan flep alanlarının grafikte gösterilmesi.....   | 63 |
| <b>Şekil 46:</b> Deneklerin günlere göre ortalama yaşayan flep alanlarının grafikte gösterilmesi.....   | 64 |
| <b>Şekil 47:</b> Deneklerin sintigrafik açıdan yaşayan flep alanlarının günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi.....   | 64 |
| <b>Şekil 48:</b> Deneklerin kapiller dansitelerinin günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi.....   | 65 |



## TABLULAR DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Tablo 1:</b> Alt gruplar ve yapılan işlemler.....  | 29 |
| <b>Tablo 2:</b> IF/IHC antikor paneli.....  | 36 |
| <b>Tablo 3:</b> Gruplardaki deneklerde ölçülen flep yaşayan alan verileri .....                           | 44 |
| <b>Tablo 4:</b> Deneklerin ortalama yaşayan flep alanları.....  | 46 |
| <b>Tablo 5:</b> Deneklerin ortalama % yaşayan flep alanları.....  | 47 |
| <b>Tablo 6:</b> Deneklerin ortalama flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımı.....                   | 48 |
| <b>Tablo 7:</b> Deneklerin ortalama % yaşayan flep alanlarının günlere göre dağılımı.....                 | 49 |
| <b>Tablo 8 :</b> Sintigrafik açıdan deney ve kontrol gruplarının ortalama yaşayan flep alanları.....      | 52 |
| <b>Tablo 9:</b> Deneklerin sintigrafik açıdan ölçülen flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımı..... | 53 |
| <b>Tablo 10:</b> sKİ-MKH'lerin immünohistokimyasal özellikleri.....                                       | 56 |
| <b>Tablo 11:</b> Grupların histopatolojik açıdan kapiller dansitelerinin karşılaştırılması.....           | 58 |
| <b>Tablo 12:</b> Deneklerin histopatolojik açıdan kapiller dansitelerinin günlere göre dağılımı.....      | 59 |

## 1. AMAÇ VE KAPSAM

Form ve fonksiyon oluşturmak amacıyla, kanlanması orijinal yerinden ayrılmadan ya da aktarıldığı yerde devam edecek şekilde başka bir vücut bölgesine aktarılan doku parçalarına, flep adı verilir. Flep terimi 16. yüzyılda Almanca bir sözcük olan “geniş ve gevşekçe asılmış, sadece tek tarafından bağlı” anlamına gelen “flappe” kelimesinden köken almıştır. Flep cerrahisinin geçmişi İ.Ö. 600’lü yıllarda Sushruta Samita’nın tanımladığı nazal defektleri onarmak için kullandığı yanak fleplerine kadar uzanmaktadır. Bazı kaynaklar flep cerrahisinin İsa öncesi dönemlerde de yapıldığını bildirmektedir.

İnterpolasyon cilt flepleri plastik ve rekonstrüktif cerrahide travma, konjenital defektler, tümör eksizyonu sonrası gibi nedenlerle oluşan ve komşu dokuların rekonstrüksiyon için kullanımlarının uygun olmadığı geniş ve derin defektlerin kapatılması için sıklıkla kullanılan cilt flepleridir.<sup>1</sup> İnterpolasyon fleplerinin uygulanması için iki aşama gerekmektedir. Birinci aşama flebin kendi vasküler pedikülü üzerinden defekte taşınması, ikinci aşama da flep alıcı yataktan inoskölasyon ve neovaskülerizasyon aracılığı ile kendi proksimal pedikülünden bağımsız beslenmeye başlayınca proksimal pedikülün ayrılması aşamalarıdır. İki aşamalı bir süreç olması nedeniyle hasta postoperatif dönemden flep ayrılmasına kadar geçen süre içerisinde ağrı, eklem donukluğu, fonksiyon kayıpları gibi morbiditelere maruz kalabilir. Ancak erken dönemde pedikül ayrılması ile fonksiyon ve zaman kayıpları önlenir.

Bugüne kadar interpolasyon flep yaşayabilirliğini arttırmaya ve erken pedikül ayrılmasına yönelik birçok mekanik ve kimyasal girişim denenmiştir. Üzerinde en çok yoğunlaşılacak girişim ise band turnike ve klempleme araçlarından faydalanılarak yapılan flebin iskemik önkoşullanması olmuştur. Hiperbarik oksijen tedavisi uygulanması,<sup>2</sup> flep pedikülünün aşamalı olarak kesilmesi,<sup>3</sup> epinefrin içerikli lokal anestezi uygulanması,<sup>4</sup> yara kenarlarının iskemik tutularak anjiyogenezin stimülasyonu,<sup>5,6</sup> lokal bFGF uygulaması<sup>7</sup> ile anjiyogenezin stimülasyonu denenmiş diğer yöntemlerdir.

Kök hücreler, son yıllarda tüm tıp camiasının en çok üzerinde durduğu ve her yıl yüzlerce yeni çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir. Sunduğu ve sunacağı muhtemel tedavi olanakları düşünüldüğünde, halen tedavisi mümkün olmayan pek çok hastalığa çare olması beklenmektedir. Kök hücreler plastik cerrahide de çeşitli kullanım alanlarında rol oynamış olup, son zamanlarda, kök hücrelerin flep yaşayabilirliğini artırdığına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Deneysel çalışmalar kök hücrelerin vaskülogenezi arttırdığı ve bu tedavinin klinik kullanım potansiyeli olduğunu vurgulamıştır.<sup>8</sup>

Biz de yaptığımız bu çalışmada kök hücrelerin anjiogenik potansiyelinden yola çıkarak bunların selektif olarak neovaskülarizasyonu hızlandırıp interpolasyon cilt fleplerinin viabilitesini arttırması ve erken dönemde pedikül ayrılabilmesi amaçlanmıştır.

Sıçanlarda gerçekleştirilen bu çalışmada, interpolasyon cilt flebinin yaşayabilirliğinin artırılması ve flep pedikülünün ayrılma süresinin kısaltılması amacıyla yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulamasının etkinliği araştırıldı. Fleplerde oluşan etki; makroskopik, anjiyografik, histolojik, sintigrafik ve GFP işaretli kök hücrelerin izlenmesini içeren parametrelerle değerlendirildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 FLEP CERRAHİSİ

#### 2.1.1 TARİHÇE

Flep cerrahisinin tarihi, Sushruta Samita'nın nazal rekonstrüksiyon için yanak flebini tanımladığı M.Ö. 600 yıllara dayanmaktadır. Bazı kaynaklara göre flep cerrahisinin İsa'dan önce yapıldığını bildirmektedir.<sup>9</sup> İlk yıllarda tanımlanan cerrahi prosedürler, pedikül etrafında, cildi komşu bir alana taşıyan pivotal fleplerdi. Cildi komşu alana rotasyon yapmadan transferini sağlayan ilerletme flepleri ise ilk Fransızlar tanımlamıştır. Dokuyu uzağa taşıyan uzak pediküllü fleplerin, İtalyan literatüründe Rönesans döneminde kullanıldığı rapor edilmiştir. 1500.lü yıllarda Tagliacozzi tarafından bulunan ve burun rekonstrüksiyonu için koldan hazırlanan random patternli cilt flebi, flep cerrahisi tarihçesinin temel taşlarından biri olmuştur.<sup>9</sup>

1818'de von Graefe, 1843'de Mutter, 1845'de Dieffenbach, 1887'de de Gersuny Cilt fleplerinin gelişimine katkıları olan diğer önemli çalışmacılardır. 1900'lü yılların başlarında Gilles ve Fillatov tüp pediküllü flepleri tanımlamışlardır. Blair'in 1921 yılında geciktirme yöntemini tarif ederek flepte boy/en oranının arttırılabileceğini ortaya koyana kadar flepler yüz bölgesi için 5:1, alt ekstremité için 1:1 oranında sınırlandırılmıştı.<sup>10</sup>

Flep cerrahisinin daha sonraki gelişimi aşamalar halinde olmuştur. Birinci ve ikinci dünya savaşları boyunca, pediküllü flepler yaygın olarak kullanılmışlardır. McGregor ve Morgan'ın flepleri random ve aksiyel olarak sınıflandırmaları ile flep cerrahisine önemli bir yol kat edilmiştir. 1970'li ve 1980'li yıllar arasındaki dönemde birçok yeni flep tanımlanmış kas ve kas-deri flepleri kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Flep cerrahisindeki bu hızlı gelişmeye ek olarak, ameliyat mikroskobunun kullanılmaya başlanması ile birlikte serbest doku aktarımları gündeme gelmiş ve cerrahide yeni bir çağ açılmıştır. Buncke, Harii, Taylor, Daniel ve diğerleri öncülüğünde mikrovasküler serbest doku aktarımları gerçekleştirilmiştir.<sup>11</sup>

## 2.2 FLEP SINIFLANDIRILMASI

### 2.2.1 DERİ FLEPLERİNİN VASKÜLER ANATOMİYE GÖRE SINIFLANDIRILMASI

McGregor ve Morgan<sup>12</sup> cilt fleplerini random veya aksiyel patternli olarak sınıflandırmışlardır. Buna göre random flepler direkt kutanöz, muskulokutanöz veya fasyokutanöz damarlardan kaynaklanan arterioller tarafından perfüze edilen subdermal pleksus tarafından beslenirler. Aksiyel flepler ise segmental ya da müküler damarların fasya ve üzerindeki deriyi beslemek üzere kaslar arasındaki fasyayı geçmeden önce verdikleri septokutanöz arterler tarafından beslenirler.

Nakajima<sup>13</sup> ise cilt fleplerini vaskülarizasyonlarına göre: kutanöz, fasyokutanöz, adipofasyal, septokutan ve mükülokutan olmak üzere 5 tipe ayırmıştır.

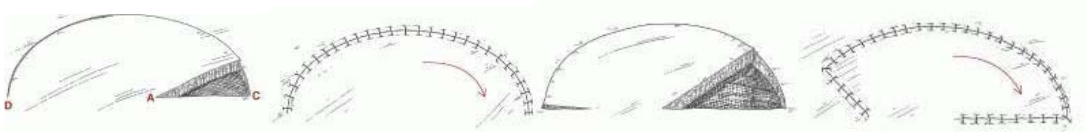
### 2.2.2 DERİ FLEPLERİNİN HAREKETLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI

#### 2.2.2.1 LOKAL FLEPLER

Donör alana komşu olan defektlerin kapatılmasında kullanılır. Lokal flepler fleplerin hareketine göre şöyle sınıflanabilir:

#### 1) Rotasyon flebi:

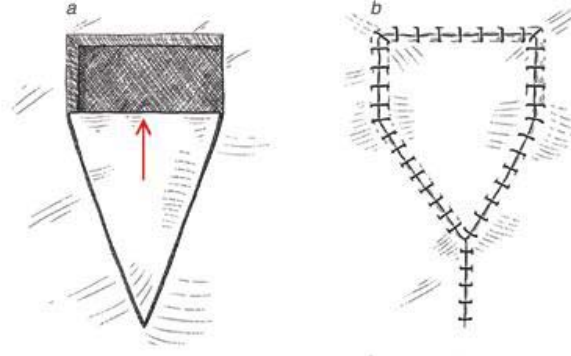
Flep dairesel hareketle rotasyon yaparak, primer defekt ile bir yarım daire oluşturacak şekilde hazırlanır. Yarım dairenin diğer kısmı kaldırılarak defekte ilerletilir Donör alan deri grefti veya primer onarım ile kapatılır. (Şekil1)<sup>88</sup>



Şekil 1: rotasyon flebi

#### 2) İlerletme flepleri:

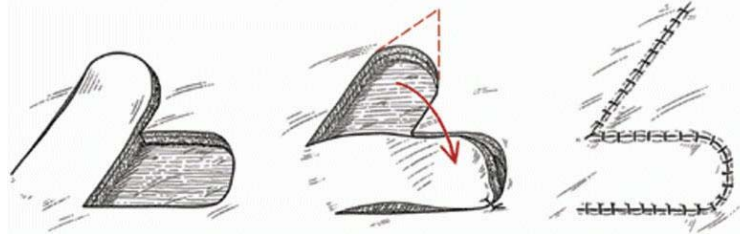
V- Y ilerletme flebi, rektangüler veya bipediküllü şekillerde kullanılmaktadır. (Şekil 2)<sup>89</sup>



Şekil 2: V-Y ilerletme flebi

### 3) Transpozisyon flebi:

Defekt kenarında dil şeklinde bir flep hazırlanır ve genellikle 90 derece çevrilerek defekt üzerine dikilir. Bu uygulamada, flep verici bölgesinde sekonder doku defekti oluşur. Bu defekt kenarlar yaklaştırılarak primer kapatılmaya çalışılır. Kapanmayan kısım olursa burası deri grefti ile örtülür. (Şekil 3)<sup>90</sup>



Şekil 3: Transpozisyon flebi

### 4) İnterpolasyon flebi:

Flep, defekt yakınındaki bir eksen etrafında normal doku üzerinden atlatılarak çevrilir. Ancak flep defekte bitişik değildir. Deltopektoral flep (Bakamjian flebi), nörovasküler dijital pulpa flebi (Littler flebi) ve nazal rekonstrüksiyon için kullanılan alın flebi örnek olarak verilebilir.

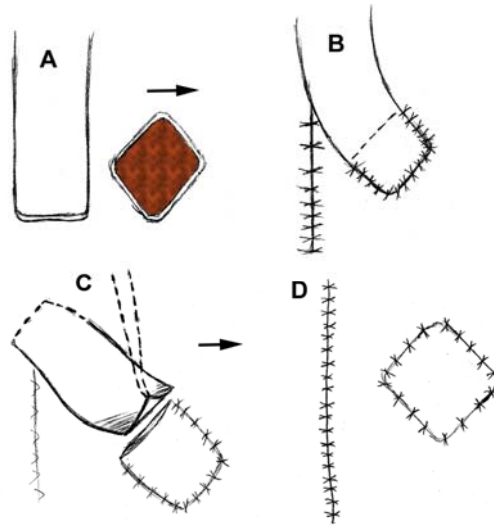
### 2.2.2.2 UZAK FLEPLER

Alıcı alana uzak bir bölgeden hazırlanan fleplerdir.

- 1) Direkt
- 2) İndirekt
- 3) Serbest flepler olarak sayılabilir.

## 2.3 İNTERPOLASYON FLEBİ

Cerrahi bir defekt etrafındaki dokuların primer kapatma veya lokal fleplerle rekonstrüksiyon için uygun özellikte yada yeterli mobilitede olmadığı durumlarda kullanılabilen iki aşamalı bir cilt flebidir. İnterpolasyon flepleri transpozisyon flepleriyle benzerlik göstermelerine rağmen, flebin normal cilt üzerinden atlatılarak defekte adapte edilmesi yönünden birbiriyle ayrılırlar. Transpozisyon flebinin bazisi defekte komşu iken, interpolasyon flebinde belli bir uzaklıktadır. Bu nedenle, flep ile defekt arasında, yeterli vaskülarite oluşuktan sonra ikinci bir seansta ayrılmayı bekleyen bir doku köprüsü veya pedikül oluşur. (Şekil 4)<sup>91</sup>



Şekil 4: İnterpolasyon flebi

Kullanımı nerdeyse 3500 yıl öncesine dayanan interpolasyon flepleri günümüzde iki aşamalı bir süreç olmasının getirdiği dezavantajlara rağmen mikrocerrahinin mümkün olmadığı ya da riskli olduğu durumlarda halen güvenli olarak kullanılabilen bir flep seçeneğidir.<sup>2,14</sup> Klinikte sıklıkla kullanılan önemli bazı interpolasyon fleplerinin tarihçesine baktığımızda;

Alın flebinin ilk M.Ö. 700 yıllarında Hintli cerrahlar tarafından, ampute edilmiş burun onarımlarında kullanıldığına inanılır. Koldan kaldırdığı distal bazlı flep ile kayıp bir burnu restore eden ilk Avrupalı cerrah ise 15. yüzyılda Antonio Branca olmuştur. Antonio Branca ayrıca birçok dudak ve kulak defektlerinin onarımını da başarmıştır. Daha sonraları, 16. yüzyıl başlarında Viena adlı aile de benzer burun rekonstrüksiyonu operasyonları yapmakta ancak operasyon detaylar çok yaygın olarak bilinmemekte idi. En önemli dönüm noktası ise 1597 yılında Gaspare Tagliacozzi'nin<sup>9,15</sup> burun rekonstrüksiyonu ameliyatlarını geliştirmesi ve yayınladığı meşhur 704 sayfalık "Chirurgia Curtorum" adlı kitabında bu metotları detaylı olarak anlatması olmuştur. (Şekil 5)<sup>92</sup>



**Şekil 5: Tagliacozzi bandajı. (Tagliacozzi G: De Curtorum Chirurgia per Insitionem. Venice, Gaspare Bindoni, 1597.)**

1719 yılında Renaulme de la Garanne kol flebinin granülasyon oluşması beklenmeden taze cerrahi bir defekte adapte edilebileceğini vurguladı. Metodun daha farklı bir modifikasyonunu ise Hamilton 1840 yılında 3 aşamalı olarak "thumb to nose flap" olarak uygulamıştır.<sup>9</sup>



İlk cross-leg flebi 1854 yılında Buffalo'dan Frank Hastings Hamilton tarafından başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Hamilton ilk cross-leg flebi tanımlamakla kalmayıp ayrıca ilk kez bir flepte cerrahi geciktirmeyi de uygulamış oldu.<sup>9</sup>

Diğer önemli bir teknik ise 1891 yılında George Frederick Shrady'in gerçekleştirdiği, koldan kaldırıp kontralateral işaret parmağına taşıdığı "open jump flep" olmuştur. Bundan dokuz yıl sonra ise ikinci önemli jump flebi Steintal, pektoral bölgeden kaldırdığı, kostal kartilaj da içeren cilt altı dokuyu el bileği ve buruna taşıyarak gerçekleştirmiştir. William Stewart Halsted'in 1896 yılında ilk kez bir flebi aşamalı olarak boyun bölgesine kadar taşımayı başarması ile cerrahide ilk kez "waltzed" flep terimi de kullanılmış oldu.<sup>9</sup>

Eylül 1916 yılında Fillatov insanda, ilk tüp pediküllü flebi kaldırmış ve yedi hafta sonra tüp pedikülü ayırıp gözkapağı rekonstrüksiyonunu başarılı olarak gerçekleştirmiştir. 1917 yılında Sidcup'ta Gilles de tüp pediküllü flebi Fillatov'dan ayrı olarak keşfetmişti. Ciddi yanık hastalarında tüp flepleri kullanmış ve sol el pedikülünü postoperatif on üçüncü günde; sağ el pedikülünü ise yirmi dokuzuncu günde ayırmıştır. Sonrasında Gilles birçok tüp pediküllü flepler kaldırmış ve tekniğini dünyadaki birçok cerraha öğretmiştir.<sup>9</sup>

1960 yıllarından bu yana interpolasyon fleplerinde birçok ilerleme kaydedilmiştir. Bunların arasında Menick'in supratroklear arter bazlı dar pediküllü paramedian alın flebi sayılabilir. Menick yaptığı modifikasyon ile daha fazla flep mobilitesine izin vererek alındaki donör saha defektinin daha kolay şekilde kapanabilmesine imkân sağlamıştır.<sup>15</sup>

Yine önemli bir interpolasyon flebi olan yanak interpolasyon flebinin M.Ö. 600'lü yıllarda Hindistan'da burun rekonstrüksiyonlarında kullanıldığına inanılmaktadır. Buna karşın iki aşamalı postauriküler helikal flep ise daha güncel bir teknik olup 1950 yılında Lewin<sup>16</sup> tarafından tanımlanmıştır.

### 2.3.1 PLASTİK CERRAHİDE SIK KULLANILAN İNTERPOLASYON FLEPLERİ

#### 2.3.1.1 ALIN FLEBİ

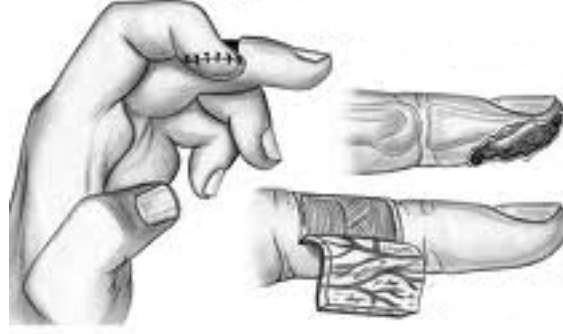
Burnun üç boyutlu bir organ olması ve dolayısıyla rekonstrüksiyonunun iki veya daha çok aşama gerektirmesi nedeniyle alın flebi burun rekonstrüksiyonunda sıklıkla kullanılan bir interpolasyon flebidir. Supratroklear arter bazlı olarak kaldırılır. Burnun hem iç hem de dış yüzünün restorasyonu için oldukça uygundur. Ancak iki ya da üç aşamalı bir operasyon gerektirmesi, pedikül ayrılması için beklenen süre yöntemin bir dezavantajdır.<sup>17</sup> (Şekil 6)<sup>17</sup>



Şekil 6: Alın flebi

#### 2.3.1.2 CROSS FİNGER FLEBİ

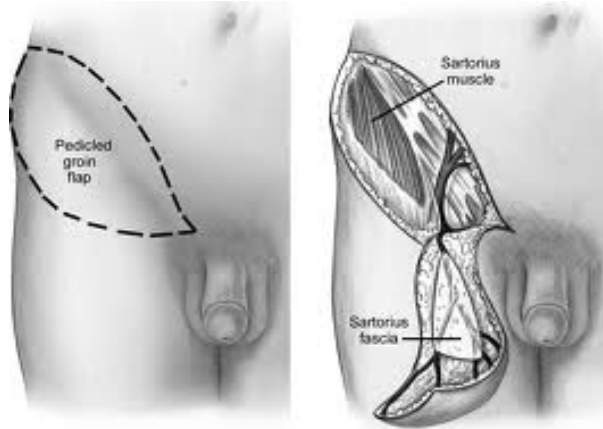
Parmakların palmar yüzeylerinin amputasyonlarında kullanılan yöntemlerden biridir. Hem çok iyi bir subkutanöz doku sağlar hem de cilt greftlerine göre duyunun restorasyonu daha iyidir. Palmar parmak defekti komşu parmağın ekstansör yüzeyinden kaldırılan flep ile kapatılır. Flebin kan desteği randomdur, genelde subdermal dokudan beslenir. Flep genelde defektin boyuna göre ayarlanır. Pedikül ayrılması için beklenen süre, bir dezavantajdır. (Şekil 7)<sup>93</sup>



**Şekil 7: Cross finger flebi**

### 2.3.1.3 KASIK FLEBİ

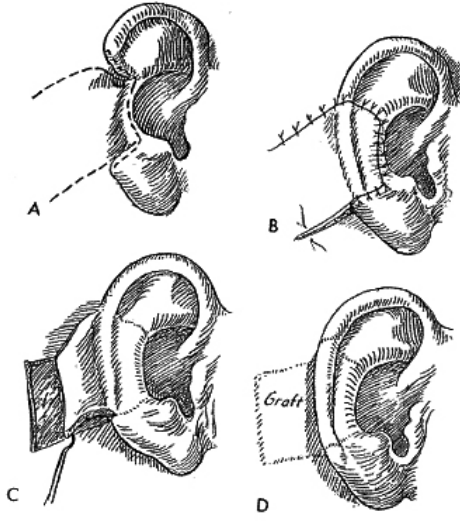
İlk olarak McGregor ve Jackson tarafından tanımlanan bu flep, daha sonraları Daniel ve Taylor tarafından mikrovasküler flep olarak kullanılmıştır. Üst ekstremitenin el, bilek, kol bölgelerinde yumuşak doku rekonstrüksiyonun da kullanılmaktadır. Bu flebin avantajları; bölgenin kılsızlığı ve pedikülünün uzun olmasıdır. Flep pedikülü ayrılması için üç hafta beklenir. (Şekil 8)<sup>94</sup>



**Şekil 8: Kasık flebi**

### 2.3.1.4 POSTAURİKÜLER FLEP

Postauriküler flep heliks ve komşu antihelikste orta ve büyük defektlerin onarımında kullanılabilen güvenilir bir fleptir. (Şekil 9)<sup>16</sup>



**Şekil 9: Postauriküler flep.**

**A, defekt ve flebin çizimi. B, flebin defekte ilerletilmesi. C, D, ikinci aşamada flep pedikülünün ayrılması ve flebin aurikülün posteromedialine adapte edilmesi. Donör sahanın deri grefti ile kapatılması**

## **2.4 FLEP FİZYOLOJİSİ VE YAŞAYAN FLEP ALANINI ARTIRMAYA YÖNELİK KULLANILAN İLAÇLAR**

Arteriolar şebekenin görevi primer olarak doku kan akımını dengelemektir. Sempatik innervasyon, arterioller, prekapiller sfinkterleri ve arteriovenöz anastomozları direkt etkiler. Kapillerlerin çapı 4-10  $\mu\text{m}$  ve kutanöz mikrodamarların çapı 2-3  $\mu\text{m}$ ' dır. <sup>18</sup>

Cildin normal kan akımı 20 ml/100 gr' dır. Bu akım sıcaklık ya da sempatik blokajla büyük oranda artar. Cilt flebi hemodinamiğinde, cilt kan akımını etkileyen düzenleyici faktörler çok önemlidir. <sup>18</sup>

Kan akımının düzenlenmesinin sistemik ve lokal seviyeleri vardır. Cildin primer görevi ısı regülasyonudur ve sempatik sinir sistemi tarafından düzenlenir. Lokal kontrol cilt kan akımında daha az rol oynar. <sup>18</sup>

### **2.4.1 CİLT KAN AKIMININ SİSTEMİK KONTROLÜ**

#### **2.4.1.1 NÖRAL KONTROL**

Dominant olarak vazokonstriktif fibriller, birçok tip reseptörlerle damar duvarında sonlanırlar. En çok  $\alpha$ -adrenerjik reseptörler vardır ve vazokonstriksiyon yaparlar.  $\beta$ -adrenerjikler vazodilatasyon, serotonin reseptörleri vazokonstriktif etkiyi lokal olarak arteriovenöz anastomozlarda gösterirler. <sup>18</sup>

#### **2.4.1.2 HUMORAL KONTROL**

Epinefrin ve norepinefrin  $\alpha$ -reseptörler üzerinden vazokonstriktif etki gösterirler. Serotonin vazokonstriktör, histamin ve bradikinin vazodilatatördür. Birçok araşidonik asit metaboliti, prostaglandinler ve tromboksanlar mikro dolaşım üzerinde birbirlerine zıt etki gösterirler. TA2 potent vazokonstriktör etkili, PGE1 vazodilatatör etkili, PGI2 vazodilatatör ve trombosit agregasyon inhibitörüdür. Lökotrienler (LTC4, LTD4) cilt mikro dolaşımını artırıcı etki yaparlar.<sup>18</sup>

#### **2.4.2 LOKAL KONTROL**

##### **2.4.2.1 METABOLİK REGÜLASYON**

Metabolik faktörler; hiperkapni, hipoksi ve asidoz genellikle vazodilatasyona yol açarlar.<sup>18</sup>

##### **2.4.2.2 FİZİKSEL KONTROL**

Perfüzyon basıncının artması damar duvarında gerilmeye bu da vazokonstriksiyona yol açar. Lokal hipotermi kan akımının azalmasına neden olur. Vizkosite artması iskemiye neden olur.<sup>18</sup>

#### **2.4.3 CİLT FLEBİ KALDIRILDIĞINDA GÖZLENEN FİZYOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER**

Cilt flebi kaldırıldığında, kan akımının kontrolü tamamen karışır, flep vasküler dengesizliğe girer. Başlangıç safhasında sempatik kontrolün fonksiyonel kaybı ile iskemi gelişir. Cilt hemodinamik dengeyi tekrar kurmak için humoral, metabolik ve fiziksel mekanizmaları kullanır. Flebin yaşaması için yeterli besleyici kan dolaşımı sağlanmalıdır ve bu ameliyat sonrası ilk 8-12 saatte başarılı aks halde hasar geri dönüşümsüz hale gelir.<sup>18</sup>

##### **2.4.3.1 ANATOMİK DEĞİŞİKLİKLER**

Flep kaldırıldıktan sonra, kaldırılmadan önce var olan ancak aktif olmayan anastomozlar çalışmaya başlar. Flep proksimalinde yeni damarların gelişimi ilk dört-beş günde olur. Daha sonra flep kaldırılmadan önce bulunan damarlarla anastomozu gerçekleştirir. Geciktirmeli ya da geciktirmesiz fleplerde otonomik innervasyon değişiklikleri incelenmiş ve katekolaminlerin cerrahi insizyondan onsekiz saat sonra kaybolmaya başladığı ve otuz saatte tamamen yok olduğu, reinnervasyon ve

katekolaminlerin tekrar toplanmasının ise ameliyat sonrası sekizinci haftada başladığı gösterilmiştir.

#### 2.4.3.2 HEMODİNAMİK DEĞİŞİKLİKLER

Flep proksimalinde akım %100 kalırken distalde ameliyat sonrası ilk günde %18' e düşer, ilk haftada %65' e, ikinci haftada %75-90' a ulaşır. <sup>18</sup>

#### 2.4.3.3 METABOLİK DEĞİŞİKLİKLER

Flep kaldırılması sonucu iskemik durum lokal metabolik seviyeye zarar verir. Dokuya yeterli oksijen gelmemesi anaerobik metabolizmaya neden olur, flep distalinde oksijen, glukoz, ATP azalırken, karbondioksit ve laktat artar. Flep distalinde glukoz tüketimi maksimum üçüncü günde olur, yedinci günde normale döner. Laktat üretimi hızla artar, glukoz ve glukojen azalır. <sup>18</sup>

Ada, serbest ya da geciktirmeli fleplerde, iskemik kısımda anaerobik metabolizma artar ve toksik süperoksit radikaller yükselir. Bu radikaller ksantin metabolizması ürünleridir ve flep yaşamına zarar verirler. Süperoksit dismutaz her iki tip flepte de yaşamsal rol oynar. Geciktirmeli flepler de süperoksit dismutaz seviyesi normal kalırken akut fleplerde distalde süperoksit dismutaz seviyesinin azaldığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bu olay dışardan allopurinol ya da süperoksit dismutaz verilmesi ile önlenabilir. <sup>18</sup>

Cilt fleplerinin yaşayan alanlarını artırmak için birçok farmakolojik ajan denenmiştir. Bunlardan bir kısmı klinik kullanıma olanağı bulmuştur. Kısaca özetlersek;

-Akson Blokerler: Rezerpin, dopamin, guanetidin,

-Reseptör Blokerler: Fenoksibenzamin, fentolamin, propranolol, isoksuprin, klorpromazin.

-Direkt Düz Kas Gevşeticiler: Hidralazin, nitrogliserin, dimetil sülfoksit, kalsiyum kanal blokerleri,

-İskemiye Toleransın Artırılması: Steroid, süperoksit radikal önleyiciler (allopurinol, desferroksamin) , hiperbarik oksijen sayılabilir. <sup>18</sup>

## 2.5 İNTERPOLASYON FLEPLERİNİN REVASKÜLARİZASYONU

Yapılan hayvan deneylerinde revaskülarizasyon prosesinde yara kenarlarının ve alıcı yatağın her ikisinin de önemli rol oynadığını göstermiştir.<sup>19</sup> Bu nedenle alıcı yatağın son derece sağlıklı olması gerekir. Flep alıcı yataktan ilk 2–3 günde inoskölasyon ve neovaskülarizasyon aracılığı ile beslenmeye başlar. Bu sürecin başlayabilmesi için iskeminin kritik bir faktör olduğu görülmektedir.<sup>20</sup> Deneysel çalışmalar göstermiştir ki; revaskülarizasyon, ilk olarak flebin en hipoksik olduğu en distalde başlamaktadır.<sup>21</sup> İnoskölasyonun tamamlandığı 14 gün sonrasında ise flep yeni dolaşım kaynağından beslenerek transfer edilebilir.<sup>22-24</sup> Bu süreci hızlandırmak için anjiyogenez ve arteriogenезin indüklenmesi gerektiği bir gerçektir. Anjiyogenez süreci, alıcı yatak ile flep arasındaki damarlanmada mikro anastomozlar oluşturması açısından son derece önemlidir.<sup>25</sup>

Neovaskülarizasyonu anjiogenik faktörler aracılığıyla arttırarak distal flep bölgesinin beslenmesini arttırmaya yönelik çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda tromboksan inhibitörleri, vazodilatatörler, serbest radikal temizleyicileri, Transforme edici Büyüme Faktörü (TGF), basık fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktör cDNA'sının flep distalinde perfüzyonu iyileştirdiği ve nekrozu önlediği gösterilmiştir.<sup>26-30</sup>

Son yıllarda kök hücrelerinde flep yaşayabilirliğini arttırdığına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Deneysel çalışmalar yağ kaynaklı kök hücrelerin vaskülogenezi arttırdığı ve bu tedavinin klinik kullanım potansiyeli olduğunu vurgulamıştır.<sup>8,31</sup> Biz de çalışmamızda kök hücrelerin vaskülogenezi arttırıcı özelliğinden faydalanarak interpolasyon cilt flebinin yaşayabilirliğinin artırılması ve flep pedikülünün ayrılma süresinin kısaltılmasını amaçladık.

## 2.6 İNTERPOLASYON FLEPLERİNİN ERKEN AYRILMASINA YÖNELİK YAPILAN GİRİŞİMLER

İnterpolasyon fleplerinin güvenli olarak ayrılması ve distal pedikülün yaşayabilirliğinin başarısı alıcı yataktan gelişecek olan neovaskülarizasyona bağlıdır. Yapılan deneysel çalışmalar çevre dokudan flep içine doğru olan vaskülogenezin

postoperatif 4-5. günlerde başladığını ortaya koysa da, klinikte alışlagelmiş olan uygulama pedikül ayrılmadan önce genelde 10 gün – 3 hafta beklemektir.<sup>32</sup> Bu bekleme süresi, alıcı yataktan yeterli neovaskülarizasyonun gelişmesi ile flebin artık kendi proksimal pedikülüne bağlı olmadan yeni oluşmuş distal pedikülünden beslenmesini sağlamaktır.

Bugüne kadar interpolasyon flep yaşayabilirliğini arttırmaya ve erken pedikül ayrılmasına yönelik birçok mekanik ve kimyasal girişim denenmiştir. Üzerinde en çok yoğunlaşılacak girişim ise band turnike ve klempleme<sup>14,33,34,35</sup> araçlarından faydalanılarak yapılan flebin iskemik önkoşullanması olmuştur. Hiperbarik oksijen tedavisi uygulanması,<sup>2</sup> flep pedikülünün aşamalı olarak kesilmesi,<sup>3</sup> epinefrin içerikli lokal anestetik uygulanması,<sup>4</sup> yara kenarlarının iskemik tutularak anjiyogenezin stimülasyonu,<sup>5,6</sup> lokal bFGF uygulaması<sup>7</sup> ile anjiyogenezin stimülasyonu denenmiş diğer yöntemlerdir.

## **2.7 FLEP NEOVASKÜLARİZASYONUNDA ROL ALAN ANJİYOGENİK MOLEKÜLLER**

Neovaskülarizasyon (yeni damar oluşumu); Anjiyogenez, vaskülogenez ve arteriyogenez olarak üç mekanizma ile gerçekleşir.

Vaskülogenez; embriyogenezis boyunca endotel öncü hücrelerin (progenitör) vaskülarizasyon alanına göçü, endotelial hücrelere farklılaşması ve böylece yeni kan damarı oluşturmaları mekanizmasıdır.

Anjiyogenez; mevcut olan kan damarlarından yeni kapillerlerin oluşumudur. Primer vasküler sistemin oluşumundan sonra matür damar ağı önceden var olan damarların yeniden oluşumu (remodeling) ile şekillenir. Erişkinde genellikle bazı patolojik durumlar (yara iyileşmesi, diyabetik retinopati, romatoid artrit, kardiyak iskemi, psoriyazis, tümör büyümesi gibi) ve kadınlardaki menstrüel sıklusa spesifik fizyolojik olaylar (ovulasyon, endometrial büyüme, implantasyon, plasentasyon) dışında aktif değildir.<sup>36,37</sup>

Kan damarları oluşur oluşmaz endotelial hücreler organlar farklılaşırken dokuya özgün değişikliklere uğrayıp fonksiyonel olarak farklı çok sayıda damar

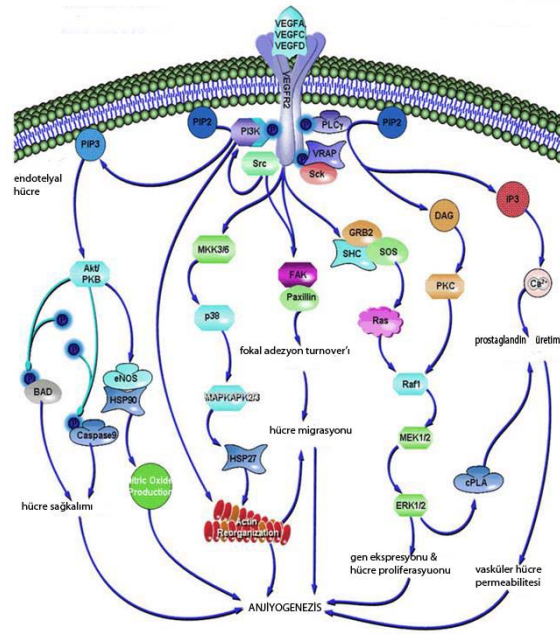


oluştururlar. Bu süreçler endotelial hücrelerin diferansiasyon ve büyümeden sorumlu reseptörleri aktive eden çeşitli ekstrasellüler sinyallere cevap vermelerini gerektirir.<sup>38</sup>

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Anjiopietin ve Efrin anjiyogenezin vasküler endotelial hücrelerdeki VEGFR (VEGFR reseptör), TIE ve Efrin aktivasyonu yolu ile düzenlenmesinde anahtar molekülerdir.<sup>39</sup> VEGF sinyalleşmesi endotelial hücre soyunun diferansiasyon ve proliferasyonunun teşvik edilmesinde gelişimin en erken aşamalarında önemli rol oynarken Anjiopietin/TIE2 yolu damar stabilizasyonu ve destek hücrelerin toplanmasını daha sonra yapar. Ancak, gelişmekte olan damarların oldukça kompleks yolları TGF-Beta (Transforming Growth Factor- Beta), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), ve Delta-Notch yolu gibi diğer sinyalleşme yolları komponentleri için spesifik damarsal roller gerektirir.<sup>40</sup>

VEGF, endotelial spesifik reseptör tirozin kinaz, VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (KDR/Flk1), ve VEGFR3 (Flt4) yolu ile etkisini gösteren heparin bağlayıcı homodimerik bir glikoproteindir.<sup>38</sup> Aynı zamanda, VEGFA'dan başka VEGF ailesinin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PIGF) adı verilen altı üyeden meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca son zamanlarda yeni VEGF benzeri heparin bağlayıcı proteinler yılan zehrinden izole edilmiştir. VEGF veya VEGF ailesinin üç reseptöründen herhangi birisini kodlayan genlerde aksama olacak olursa kan damarı gelişimi mümkün olmayacaktır ve embriyonel letalite gerçekleşecektir. VEGFR2, endotelial hücrelerin anjiyogenez ve mitogenezi için en önemli ana sinyal dönüştürücü VEGF reseptörüdür. Reseptör dimerizasyonu ve otofosforilasyon sonrası, birçok SH2 alanı içeren sinyal dönüştürücü moleküller ya PLC-gamma, VRAP (VEGF Receptor-Associated Protein), ve Sck gibi direk mekanizma ile ya da Src ve PI3K (Fosfatidilinositol 3-Kinaz) gibi indirekt mekanizmalarla aktive olurlar. PKC (Protein Kinaz-C)'nin aktivasyonu, Raf1-MEK-ERK yolu ile VEGFA mitojenik sinyalleşmesinde oldukça önemli rol oynar. Hücre yaşam sinyali asıl Akt/PKB (Protein Kinase-B)'nin PI3K aracılı aktivasyonu ile sağlanır. PI3K 'nın aktivasyonu, membran hedefleme ve Akt/PKB'ün fosforilasyonuna kendi PH (Pleckstrin Homology) alanına bağlanarak aracılık edecek olan PIP3

(fosfatidilinositol-3, 4, 5-Trifosfat)'ün birikimi ile sonuçlanır. Akt/PKB yolu için downstream hedefleri, BAD, FKHR1 (Forkhead Transkripsiyon Faktör -1) gibi proapoptotik proteinleri ve fosforilasyonu ile apoptozu inhibe eden kaspaz-9'u içermektedir. Diğer yandan, VEGFA, endotelial hücre yaşamında da çok önemli role sahip antiapoptotik protein BCL2 ve IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) ailesi üyelerinden XIAP (Xenopus Inhibitor of Apoptosis) ve HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial) hücrelerindeki Survivin ekspresyonlarını indükler.<sup>41</sup> PLC-Gamma'nın PIP2 (fosfatidil inositol-4, 5-Bifosfat)'i hidrolize etmesiyle oluşan IP3 (inositol trifosfat) ve DAG (Diaçilgliserol) PKC'yi aktive eder ve internal kaynaklardan da Ca<sup>2+</sup> salınımını stimüle eder. VEGF-A tarafından uyarılmış Ca<sup>2+</sup> mobilizasyonu kısa süreli nitrik oksit ve Ptg (Prostaglandin) üretimine yol açar. SHC fosforilasyonu, SHC-GRB2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein-2)-SOS kompleksleri oluşumunu sağlayıp HUVEC ve sinüzoidal endotelial hücrelerdeki Raf1-MEK-ERK1/2 yolunu PKC-bağımlı ve Ras-bağımsız olarak indükler.<sup>41</sup> VEGF'nin mitojenik etkilerinin negatif geribeslemesi prostaglandin aktivasyonu ve biyosentezi ile cPLA2 (sitozolik fosfolipaz -A2) tarafından sağlanır. P38 yolağı VEGF sinyalini mikroflamanlara, endotelial hücre migrasyonunu MAPKAPK2/3 (MAP Kinase Activated Protein Kinase-2/3) ve F-Aktin polimerizasyon modülatörü HSP27 (Heat Shock Protein-27) ların aktivasyonunu ayarlayarak regüle eden aktin sitoskeletonun yeniden düzenlenmesini başlatarak nakleder. HUVE hücrelerinde VEGFR2 aracılığıyla VEGFA tarafından FAK (Fokal Adezyon Kinaz) ve Paxillin'in aktivasyonu, VEGFA-indüklü aktin reorganizasyonu için gerekli olan Talin ve Vinkulin gibi aktin sabitleyici proteinlerin fokal adezyon kuvvet plağında toplanmalarına neden olur. VEGFA ayrıca, kemik iliğindeki endotelial hücre alanında FAK-related cytoplasmic tyrosine kinase, PYK2'in (RAFTK da denir, "Related Adhesion Focal Tyrosine Kinase") tirozin fosforilasyonunu stimüle eder.<sup>41</sup> (Şekil 10)<sup>95</sup>



**Şekil 10: Neovaskülarizasyonda rol alan anjiogenik moleküllerin şematik görünümü**

VEGF'in iskemik bacak ve myokarda terapötik anjiyogenez/vaskülarizasyon için çok güçlü bir büyüme faktörü olduğu bilinmesine karşın, ayrıca kapiller endotelial hücrelerin permeabilite ve proliferasyonunu arttırmak gibi etkileri de vardır. Bu etkileri bazen tümör anjiyogenezi, vasküler kaçak, ödem ve inflamasyon gibi istenmeyen yan etkiler de oluşturabilir.<sup>42</sup> VEGFA gibi birçok sitokinin majör vasküler bir tümör olan, sıklıkla HIV1 (Human Immunodeficiency Virus) ve HHV-8 (Human Herpes Virus) ile ilişkili olduğu bilinen Kaposi Sarkomu'nu modüle edebileceği belirtilmiştir.<sup>43,44</sup> Endotelial hücrelerde VEGF-Flk1/KDR sinyal sistemi, PI3K, Akt kinase ve eNOS (endotelial NO Sentaz) efektörlerinin aktivasyonu üzerinden çalışan çok önemli bir NO (Nitrik Oksit) üreticisidir. NO hematopoezisi regüle ederek AML (Akut Myeloid Lösemi) hücre büyümesini modüle eder.<sup>45</sup> VEGF ayrıca, tümör anjiyogenezine olan etkisi üzerinden tümör proliferasyonunu modüle ederek over ve kolon kanseri progresyonunda önemli bir rol oynar. İnsanlardaki anormal endotelial proliferasyon ve anormal neovaskülarizasyon ile ilişkili olan çeşitli hastalıklarda VEGF dayalı tedaviler bulunmaktadır. Bunlar, VEGFA veya VEGFR2'ye karşı nötralizan antikorlar, antisens oligonükleotidler, negatif regülatuar peptidler, solübl reseptörler

ve VEGFR'nin kinaz aktivitesini inhibe edici ATP analogları olarak sayılabilir.<sup>41</sup> Buna rağmen, VEGF fonksiyonunun inhibisyonu korpus luteum fonksiyonunu bloke ederek infertiliteye neden olabilir. Sonuç olarak VEGF sinyal yolağı üzerine etki ederek VEGF fonksiyonunu etkileyen ilaç çalışmaları birçok hastalığın tedavisi için faydalı olabilir.

## 2.8 KÖK HÜCRELER

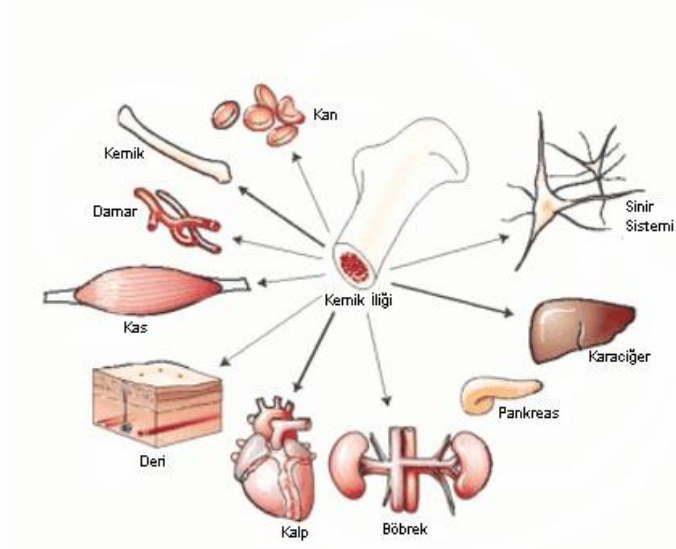
### 2.8.1 GENEL BİLGİLER

Kök hücreler, uygun biyokimyasal sinyallerin varlığında farklı hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip hücrelerdir. Bu gün için tedavisi mümkün görünmeyen hastalıkların birçoğu, yaşam için vazgeçilmez olan bazı hücre-doku ve organların, bir daha asla normal yapı ve işlevlerine döndürülmeyecek şekilde hasarlanmış olması sonucudur. Örneğin; tip 1 diyabet hastalığında pankreasta insülin salgılayan beta hücrelerinin, Parkinson hastalığında beyinde dopamin salgılayan sinir hücrelerin hasarı söz konusudur. İşte, bu tür ve benzeri hastalıkların (Alzheimer, Multiple skleroz, ALS, omurilik zedelenmesi, Purkinje hücre bozunumu- hasarlanması- (PCD), Duchenn's kas distrofisi ve diğer birçok hastalık gibi) kesin tedavisini sağlamak amacıyla araştırmacılar hasar gören hücre-doku veya organların biyolojik işlevlerini yerine koymak (rejeneratif tıp) ya da tamir etmek (reparatif tıp) ile mümkün olabileceğini düşünmektedirler. Bir hedef doku veya organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek kadar sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabilir. Kök hücreler, bu amaca hizmet edebilecek yani hücre tabanlı tedavide kullanılacak başlıca unsur olarak görünüyor.<sup>46</sup>

İkinci Dünya Savaşını takip eden yıllarda bilim dünyası radyasyonun neden olduğu hastalıkların tedavisi için çok ciddi çabalar harcamıştır. Bu çalışmalardan elde edilen ilk gözlemler gösterdi ki; letal dozda radyasyona maruz kalmış hastalarda dalak veya kemik iliği hücrelerinin nakli hücresel iyileşmeye önemli katkılar sağlamıştır.<sup>47</sup> Bu dramatik kavramdan yaklaşık 50 yıl sonra, aslında bu iyileşmelerin kemik iliğimizde var olan ve nadir sayıdaki kök hücrelere bağlı olarak

radasyonu takiben hematopoezin yeniden inşa edilmesinden kaynaklandığını biliyoruz.

1983 yılında Sale<sup>48</sup> tarafından allojenik hematopoetik kök hücre nakli sonrası, yaygın akciğer ossifikasyonların bağı olarak solunum yetmezliğinin tespiti üzerine in vivo plastisite kavramının ilk düşünceleri doğmuştur. Sonraki yıllarda, başta kemik iliğimizde bulunan kök hücrelerin in vitro ve in vivo koşullarda yalnızca kaynaklandıkları doku ve organların hücrelerini değil vücudumuzun diğer işlevsel hücrelerine de dönüşebildiklerini (plastisite) gösteren birçok rapor yayımlanmıştır. Diğer erişkin kök hücre kaynaklarına oranla daha kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle kemik iliği kök hücre (KİKH)'leri öncelikli olmak üzere farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler rejeneratif ve reparatif tıp'ta oldukça önemli bir kaynak olmuşlardır (Şekil 11).<sup>46</sup>



**Şekil 11: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri**

Günümüzde, kök hücre biyolojisindeki en tartışmalı konulardan biri kök hücre plastisitesiyle ilişkilidir. Dokuya özgün kök hücrelerinin, kaynak dokudan daha farklı bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine “erişkin kök hücre plastisitesi” denmektedir. Transdifferensiyasyon terimi ise, kök hücrelerin plastisite potansiyeli anlamında sıklıkla kullanılmaktadır. Transdifferensiyasyon, birkaç özgün türde doğal olarak meydana gelir. Örneğin, semender ve civcivlerde gözün lensi çıkartıldığı zaman, iris hücreleri lens hücrelerine dönüşür.<sup>46</sup>

Şimdiye kadar, birçok laboratuvar kök hücre plastisitesine ilişkin kanıtlar açıkladı. Bu çalışmalar kısaca şu stratejileri kapsamaktadır:

İn Vitro Yöntemler;

1) Kültür koşullarının modifikasyonlarına yönelik girişimler.

2) Genetik modifikasyonlar; genomu değiştirmeye yönelik girişimler.

2a) Hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerin ektopik transfeksiyonu.

2b) RNAi vasıtasıyla farklılaşmanın yönlendirilmesi.

2c) Cre/LoxP sistem.

3) Farklı hücre serileri ya da dokular ile ko-kültür.

İn Vivo Yöntemler;

Genotip (cinsiyet) uyumsuz bireyler arasındaki (XX'den XY'e) organ nakilleri sonrasında, alıcı kökenli(Y+) hücrelerin nakledilen organda izlenmesi.

Genotip uyumsuz bireyler arasındaki (XY'den XX'e) kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı kök hücre nakilleri sonrasında, verici kökenli hücrelerin (Y+) alıcının çeşitli doku ya da organlarında izlenmesi.

İn vitro işaretli (GFP+, LacZ+ gibi) ya da transgenik hayvanlardan (GFP veya LacZ genini eksprese eden) elde edilen erişkin kök hücrelerinin sağlıklı ya da hasar oluşturulmuş alıcılara nakli ve izlenmesi.

Erişkin kök hücrelerin mobilizasyonunun sağlanarak (örneğin, kemik iliği kök hücrelerinin), kaynaklandığı doku/organdan farklı doku/organlardaki plastisitesinin izlenmesi.

İşaretli (GFP ve LacZ gibi) kök hücreler ile kimerik yapılmış deney hayvanlarında bu hücrelerin akıbetinin izlenmesi.

Farklı türler arasında nakil sonrası (insan hücresinin hayvana nakli gibi) verici hücre antijenik yapılarının alıcı doku ve organlarında araştırılması.

Maternal doku ve organlarda genotip uyumsuz fetal hücrelerin izlenmesi.<sup>46</sup>

Bütün bu denemeler, erişkin kök hücrelerinin plastisitesini gösteren önemli kanıtları sağlamıştır. Ancak, diğer bazı bilim adamları, kök hücre plastisitesini açıklayan bu kanıtları yeterli bulmadı ve bu bulgulara oldukça şüpheli yaklaştılar. Onlar, önceki çalışmalarda plastisite ya da transdifferensiyasyon olarak adlandırılan bu olayı “hücre füzyonu” olarak yorumladılar.<sup>47</sup>

## 2.8.2 KÖK HÜCRELERİN SINIFLANDIRILMASI

Kök Hücreler farklılaşma özelliklerine göre:

**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 hücelere her şeyi yapabilen anlamına gelen totipotent hücre denir.<sup>46</sup>

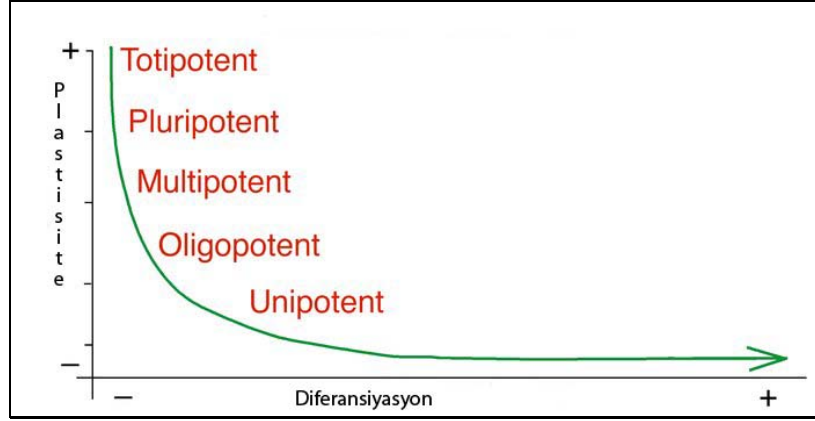
Döllenmeden sonraki ilk 4 gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücredir ve her bir hücre ayrı bir organizmayı oluşturabilecek güce sahiptir.

**Pluripotent Hücre:** Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren meydana gelen hücreler blastosist denilen küresel bir şekil alır. Bu kürenin içindeki hücreler vücuttaki tüm hücelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen, artık tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildirler. İşte bu tür hücelere pluripotent hücre denir. Aşağıda bahsedilecek olan embriyonel kök hücreler, bu küre içindeki hücrelerden oluşturulur ve pluripotent özelliğe sahiptirler.<sup>46</sup>

**Multipotent Hücre:** Birbirine yakın hücre gruplarını oluşturabilen kök hücrelerdir. Kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilir.<sup>46</sup>

**Oligopotent hücre:** Lenfoid ve myeloid hücrelerde olduğu üzere sadece birkaç hücre grubunu oluşturan kök hücrelerdir.<sup>46</sup>

**Unipotent hücre:** Kas ana hücresinde olduğu üzere bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir.<sup>46</sup> (Şekil 12)<sup>96</sup>



Şekil 12: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması

### 2.8.3 MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELER (MSC)

Pek çok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip multipotent kök hücrelerdir. Kemik iliği hücreleri kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman hızla plastik kültür kabına yapışan (adhere olan) hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri olduğu, yapışmayan (non-adherent) hücrelerin ise hematopoetik hücreler olduğu 1966'lı yıllardan beri bilinmektedir. Son yıllarda ise, stromal hücre sistemine duyulan ilgi giderek artmaktadır. Önceleri, kemik iliği kökenli stromal hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler (MKH) hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken daha sonraları in vivo ve in vitro çalışmalarla aralarında kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, adipoz doku, böbrek, akciğer ve bağırsakların da olduğu çeşitli hematopoetik olmayan dokuların parankimal hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir.<sup>97,98,99</sup> MKH'ler, ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlandı.<sup>100</sup> Sonraki in vivo ve in vitro çalışmalar, MKH'leri her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan bir multipotent kök hücre kaynağı olarak belirlemişlerdir. MKH'lerin başta hematopoetik kök hücre (HKH) nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek arttırmaktadır. Önceleri yalnızca kemik iliğinden elde edilebilen MKH'ler



günümüzde vücut sıvılarının da dahil olduğu birçok doku ve organımızdan izole edilebilmektedir. Bu dokuların başlıcaları kas, kemik, kıkırdak ve yağ dokuları, diş pulpası ve periodontal ligament, karaciğer, timus, paratiroid, tonsilla palatina, akciğer, dalak gibi solit organlar, endometriyum, yumurtalık ve testis gibi üremeye ilişkin organlar, amniyon sıvısı, plasenta, kordon kanı ve matriksi gibi fetal doku ve/veya organlardır.<sup>46</sup> Uluslar arası Hücresel Tedavi Birliği (The International Society for Cellular Therapy; ISCT) yakın zamanda yayımlandığı kılavuzda MKH'lerin tanımlanması için 3 kriter önermiştir, 1) plastik hücre kültür kabına yapışabilme özelliği; 2) in vitro koşullarda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşabilme yeteneği ve 3) CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini %95'in üzerinde ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçlerini % 2'den az oranda eksprese etmeleri gerekmektedir. MKH'lerin başta hücresel tedaviler, doku mühendisliği, bağışık baskılayıcı ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek arttırmaktadır.<sup>69</sup> MKH'lerin hayvanlarda ve insanlarda lenfositlerin çoğalmasını engelleyerek bağışıklık yanıtlarını düzenleyici etkileri olduğu bildirilmiştir. HLA özdeş HKH'lerle birlikte nakledildiklerinde akut ve kronik GVHD'nin (Graft Versus Host Disease; Konağın karşı vericinin hücrelerine reaksiyonu) azalmasına neden olmuştur. MKH ile ilgili klinik uygulamalarda son yıllarda dikkat çeken bir konu da kardiyak rejenerasyon çalışmalarıdır. MKH'lerin kardiyak rejenerasyonda iskemik kalp hastalarında ventriküler yeniden düzenlenme ve diyastolik fonksiyonların yeniden düzenlenmesi gibi olumlu etkileri oluşturabileceği rapor edilmektedir.<sup>53</sup>

Bu olaylardan sorumlu olan moleküler mekanizmalar ise; apoptozis direncinde artış, VEGF salgılanmasında artış, hücresel düzeyde kan akımında artış, mikrovasküler yapıda artış, gap junction ilişkisi ve füzyon şeklinde özetlenmektedir.

Son yıllarda, otolog olarak farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler kullanılarak kemik, kıkırdak ve kornea gibi üç boyutlu doku parçacıklarının üretilmesi gerçekleştirilmiş ve bu üretilen doku parçacıklarının (özellikle kemik ve kıkırdak) klinik denemeler kapsamında insanlarda uygulanmasına başlanmıştır.

Mezenkimal kök hücre araştırmalarında gerçekleşen son 10–15 yıldıki gelişmeler birçok hastalıkta hücrenel tedavi ve doku mühendisliği uygulamalarının önemli biyolojik araçları olacağını göstermektedir.

#### 2.8.4 KÖK HÜCRELERİN POTANSİYEL KULLANIM ALANLARI

Kök hücreler son yıllarda tüm tıp dünyasının en çok üzerinde durduğu ve her yıl yüzlerce yeni çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir. Doku mühendisliğindeki kullanımlarına ve hücre bazlı tedavilere ek olarak farklı birçok sistemik ve lokal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Kanser hastalarının malign hücrelerine kemoterapötik ilaçların taşınmasını sağlayan genlerle modifiye edilmiş mezenkimal kök hücrelerle yapılmış başarılı çalışmalar mevcuttur.

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, de novo myokard oluşturduğu ve miyokard enfarktüsü ve koroner arter hastalıklarında intrakoroner kök hücre infüzyonunun kalp kası rejenerasyonunda oldukça efektif olduğunu göstermiştir.<sup>49,50</sup> Bundan başka oftalmolojide de araştırmacılar hasar görmüş göze başarılı bir şekilde korneal kök hücre transplante ederek görme kabiliyetini restore etmişlerdir.<sup>51</sup>

Aynı hücrelerin başka uyarımlarla nöral hücre serisine de dönüşebildikleri gözlenmiş ve amyotrofik lateral skleroz gibi hastalıklarda spinal kordaki hasarlı bölgeye verilen kök hücrelerin ablatif sinir hücrelerini rejenere ettiği ve sonuçta lokomotor fonksiyonun restore olduğu gösterilmiştir.<sup>52</sup>

Yine en önemli metabolik hastalıklardan tip 1 diyabet hastalığında pankreasta insülin salgılayan beta hücrelerindeki hasar mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması ile ilgili yüz güldürücü çalışmalar yapılmıştır.<sup>53,54</sup>

Endotelial progenitör hücre tedavisi ve terapötik vaskülojenin plastik cerrahide çeşitli uygulamaları vardır. Son zamanlarda problemlilerde yeni damar oluşumunu arttırmak için kök hücre transplantasyonu uygulanmaktadır.<sup>55</sup> Sistemik dolaşıma enjekte edildikten sonra endotelial progenitör hücreler seçici bir şekilde iskemik dokulara yerleşir, böylece bu hücreler iskemik flepleri kurtarmada önemli rol oynayabilir. Bu nedenle terapötik anjiyogenezin flep yaşayabilirliğini,

yara iyileşmesini geliştirme, doku çoğalmasını hızlandırma potansiyeli olup tek başına büyüme faktörlerinden daha çok, hücreleri yenileyerek faydalı olabilir.

Kök hücrelerin daha önce terapötik anjiyogenezis yapıcı etkileri birçok çalışmada gösterilmiş olup<sup>56,57, 58,59</sup> flep cerrahisinde kullanımına ait ilk çalışma ise Ichioka ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.<sup>60</sup> Sıçanlarda yaptıkları bu çalışmada, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin dorsal cilt fleplerindeki revaskülarizasyon üzerine etkisi araştırılmış ve kapiller dansitede iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı yönde belirgin artış tespit etmişlerdir.

Mezenkimal hücrelerin vasküler endotelial hücrelere farklılaşma kabiliyetleri olduğu bilinmektedir. Zheng ve arkadaşlarının<sup>61</sup> yaptığı çalışmada VEGF-transduced mezenkimal kök hücrelerin iskemik fleplerde neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir.

Uysal Ç. ve arkadaşlarının<sup>8</sup> sıçanlarda yaptığı başka bir çalışmada adipoz doku kökenli kök hücrelerin random patternli cilt fleplerinin viabilitesini arttırdığını göstermişlerdir. Kemik iliği kökenli kök hücrelerin de sıçan cilt fleplerinde neovaskülarizasyonu arttırıp flep dolaşımına olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir.<sup>62</sup> Yine aynı ekibin başka bir çalışmasında sıçan dorsal cilt fleplerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarının adipoz doku kökenli kök hücre uygulanması ve bir takım büyüme faktörlerinin regüle edilmesi sonucu iskemi reperfüzyon hasarının önlenilebileceği gösterilmiştir.<sup>63</sup>

#### **2.8.5 KÖK HÜCRE KAYNAĞI OLARAK ADİPOZ DOKU**

Bugüne kadar mezenkimal kök hücre kaynağı olarak çoğunlukla kemik iliği kullanılmış ancak son çalışmalara bakıldığında yeni kaynaklar tanımlanmıştır. Zuk ve arkadaşlarının<sup>64</sup> yaptığı çalışmada adipoz dokunun mezenkimal hücrelerden oldukça zengin olduğu gösterilmiştir. Adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerin kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere göre izolasyonlarının daha az acı verici olmaları, lipoaspirasyon yöntemi ile kolayca ve bol miktarda elde edilebilmeleri nedeniyle adipoz dokunun plastik cerrahide son yıllarda kök hücre kaynağı olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır.

Poznanski ve arkadaşları<sup>65</sup> yaptıkları çalışmada yağ dokusunun kök hücre bakımından oldukça zengin bir doku olduğunu göstermiştir. Ayrıca adipoz doku

santimetre kp başına kemik iliğine göre 100 ila 1000 kat daha fazla pluripotent hücre içermektedir.<sup>66,67</sup>

Biz de bu çalışmada daha önce interpolasyon flep cerrahisinde kullanılmamış sAD-MKH (sıçan adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre)'lerin sıçan interpolasyon cilt fleplerinde neovaskülarizasyonu hızlandırmadaki etkisini görmek ve dolayısıyla interpolasyon fleplerinin daha erken ayrılabilmesini sağlamak için bu araştırmayı yaptık. Amacımız ileride klinik uygulamaya ışık tutacağına inandığımız adipoz doku kökenli kök hücrelerin bu konudaki etkileri ile ilgili veri toplamaktı.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Birimi (DETAB) bünyesinde yapıldı. Çalışma için 07.07.2009 tarihinde etik kurul ön onayı (AEK 12/1) alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Deneklerin postoperatif bakımı, takibi, deneklerin sakrifikasyonu, aynı merkezde gerçekleştirilmiştir. Kök hücre ile ilgili analizler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)'de, histopatolojik analiz ve ölçümler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, sintigrafik değerlendirmeler de Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı'nda, gerçekleştirilmiştir. Çalışma Helsinki Bildirgesi'nde deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür.

#### 3.1 DENEKLER

Çalışmaya 32 adet ağırlıkları 200–250 gr. arasında değişen Wistar albino cinsi erkek sıçanlar dahil edildi. Her grupta on altı denek bulunan iki grup oluşturuldu. Tüm hayvanlar standart ret yemi ve şehir suyu verildi ve on iki saat ışık, on iki saat karanlıkta kalacak şekilde Deneysel Tıp Araştırma Birimi bünyesinde standart kafeslerde barındırıldı.

Denekler, sAD-MKH uygulanan (16 adet denek) deney grubu (K) ve kontrol grubu (L) denekleri (16 adet denek) olarak iki gruba ayrıldı. Deneysel çalışmanın sonunda bulguların değerlendirildiği toplam 32 adet denek şu şekilde gruplandı:

#### 3.2 GRUPLAR

**Grup I (kontrol grubu=K) (n=16) :** Kök hücre uygulaması yapılmayan grup. Ayrıca kendi içinde; L1 (Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 5. gün ayrılan alt grup), L2 (Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan grup), L3 (Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 11. gün ayrılan alt grup) ve L4

(Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 14. gün ayrılan alt grup) olmak üzere 5 alt gruba ayrılmaktadır.

**Grup II (deney grubu=L) (n=16)** : Kök hücre uygulaması yapılan grup. Ayrıca kendi içinde; K1 (YD-MKH uygulanan, pedikülü 5. gün ayrılan alt grup), K2 (YD-MKH uygulanan, pedikülü, 8. gün ayrılan grup), K3 (YD-MKH uygulanan, pedikülü 11. gün ayrılan alt grup) ve K4 (YD-MKH uygulanan, pedikülü 14. gün ayrılan alt grup) olmak üzere 5 alt gruba ayrılmaktadır. (Tablo 1)

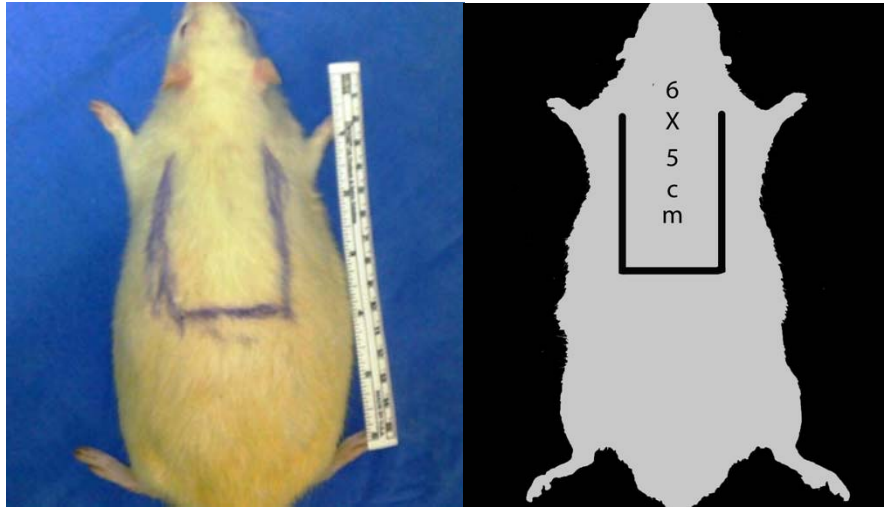
| GRUPLAR  | PEDİKÜL AYRILMA ZAMANI VE YAPILAN İŞLEM              |
|----------|--|
| L1 (n=4) | Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 5. gün ayrılan  |
| L2 (n=4) | Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan  |
| L3 (n=4) | Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 11. gün ayrılan |
| L4 (n=4) | Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 14. gün ayrılan |
| K1 (n=4) | YD-MKH uygulanan, pedikülü 5. gün ayrılan            |
| K2 (n=4) | YD-MKH uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan            |
| K3 (n=4) | YD-MKH uygulanan, pedikülü 11. gün ayrılan           |
| K4 (n=4) | YD-MKH uygulanan, pedikülü 14. gün ayrılan           |

**Tablo 1: Alt gruplar ve yapılan işlemler**

### 3.3 ANESTEZİ VE AMELİYAT

Deneklere, 20 mg/kg ketamin (Ketalar ® ,Parke-Davis) + 5 mg/kg xylazin (Rompun ® ,Bayer) i.p. ile anestezi sağlandı; betadin ile tüyler yıkanarak ameliyat alanları elektrikli tıraş makinesi ile temizlendi ve cerrahi masasına yüzüstü gelecek şekilde dört ekstremiteden flaster ile tespit edildi. Ameliyat alanı %10 povidon-iyot ile temizlendi ve cerrahi boyunca steriliteye gerekli önem gösterildi.

Bunu takiben bir adet 6x5 cm boyutlarında, cetvel kullanılarak sırtta çizim kalemi ile flep planlandı (Şekil 13).



Şekil 13: :sağ: 6x5 cm boyutlarındaki kranial bazlı olarak planlanan interpolasyon flebi. Sol: flebin grafikleştirilmiş görüntüsü

Çizimden sonra tekrar cetvelle ölçüm yapılarak boyutlar kontrol edildi. Derinin tüm katmanları, cilt altı bağ dokusu ve pannikulus karnozus da flebe dahil edilerek, kranial bazlı 6x5 cm.' lik flep, dorsal santral arter ve ven tabanlı olarak kaldırıldı (Şekil 14).



**Şekil 14: Flebin tabanda pannikulus karnozus tabakası da dahil edilerek kaldırılması**

**Ok: Flebin pedikülü, dorsal santral arter.**

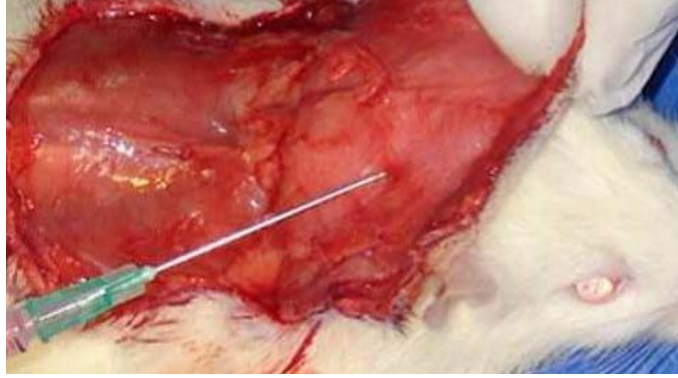
Flebin kaldırıldığı alanın 3x5 cm boyutlarındaki distal kısmı interpolasyon flebinin adapte edileceği defekt alanı (YD-MKH enjeksiyonu yapılan alan) olarak belirlendi. Proksimalde ise flebin tabandan beslenmesinin önlenmesi için flebin altındaki cilt primer kapatıldı (Şekil 15). Deney grubundaki her flebe green fluorescent protein (GFP) işaretli 3x1.000.000 yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre (YD-MKH) içeren 1ml'lik süspansiyon; flep distaline cilt altı planda 2 noktada; alıcı yatakta ve yara kenarlarına 4 noktada diffüz olarak enjekte edildi (Şekil 16).





**Şekil 15: Sol: Flep donör alanın kapatılması. \*: 3x5 cm boyutlarında bırakılan defekt alanı.**

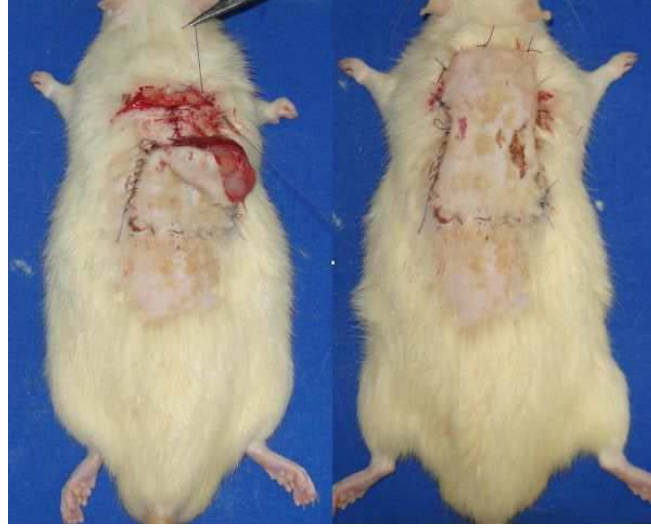
**Sağ: Flebin defekte adapte edilmiş hali.**



**Şekil 16: GFP isaretili 3x10<sup>6</sup> yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre (YD-MKH) içeren 1ml'lik süspansiyonun deney grubunda, flep distaline ve alıcı yatağa enjekte edilmesi.**

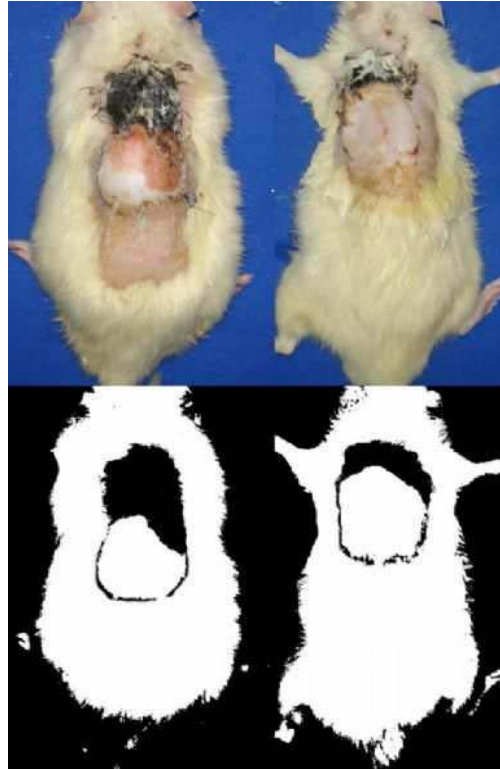
Kontrol grubunda ise deney grubundaki aynı enjeksiyon bölgelerine sadece medium solüsyonu enjekte edildi. Sonrasında flep, açık bırakılan 3x5 cm<sup>2</sup> boyutlarındaki defekt alanına adapte edildi (Şekil 15). Flep kontraksiyonunu önlemek için her flep eşit sayıda olmak üzere 4/0 prolenlerle ile suture edildi (Şekil 17). Cerrahi sonrası hayvanların birbirlerine zarar vermesini engellemek için her birine flepleri koruyucu pansuman yapıldı. Postoperatif 5, 8, 11 ve 14. günlerde her

gruptan 4 adet sıçanın proksimal pedikülü ayrıldı (Şekil 17). Pedikülü ayrılan her flep 7 gün boyunca takip edildi (Şekil 18).



**Şekil 17: Sol: Flep proksimal pedikülünün kesilmesi.**

**Sağ: Flep kontraktürünü engellemek için flep proksimalinin tekrar sağlam cilde gerginliğini koruyacak şekilde adapte edilmesi**



**Şekil 18: Sol: 8. Günde proksimal pedikülleri ayrılan fleplerin pedikülü ayrıldıktan 7 gün sonraki görüntüsü.**

**Sol: Kontrol grubu. Sağ: deney grubu. Sol Alt: kontrol grubu grafik görüntüsü.**

**Sağ Alt: deney grubu grafik görüntüsü. Makroskobik olarak kontrol grubu ile deney grubu arasında flep yasayabilir alanı arasındaki fark görülmekte.**

### 3.4 sAD-MKH'LERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRE HAZIRLANMASI

MKH'lerin izolasyonu için; laboratuara gelen, sıçanın inguinal bölgesinden elde edilen adipoz doku %1 oranında penisilin-streptomisin içeren HBSS ile birkaç kez yıkama işleminden geçirilerek makasla 1cm<sup>3</sup>'lik küçük parçalara ayrıldı. Yıkama işleminden sonra dokular kuru bir petriye alınıp makas yardımıyla mins edilerek ve üzerine Ca ve Mg içermeyen HBSS ile hazırlanmış %0.075'lik tip 1 kollajenaz solüsyonundan 2ml koyularak doku örnekleri 15ml'lik falkonda toplandı. Son volüm kollajenazla 5ml'ye tamamlanıp 37oC çalkalamalı su banyosunda 60dk bekletildi. İnkübasyon sonunda üzerine 5ml HBSS eklenerek 1800rpm'de 10dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atılıp pelet 5ml HBSS ile sulandırılarak 70 µm'lik hücre süzgeci ile süzülerek ve tekrar 1300rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet üzerine 5ml lysing solüsyon eklenip oda ısında 5dk bekletildi. Süre sonunda 5ml HBSS eklenerek 1800rpm'de 10dk santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlanıp süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pelet üzerine %15 oranında FBS ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren α-MEM kültür besiyerinden 1ml eklenip pipetaj yapılarak 25 cm<sup>2</sup> 'lik kültür kabına ekim yapıldı. Gerekli miktarda kültür besiyeri koyulduktan sonra 370C, %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortamda kültüre edildi. 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek yüzen tüm hücreler uzaklaştırıldı. Haftada iki kez besiyeri değişimi tekrarlandı. Flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edilerek bu ilk pasaj (sub-kültür) olarak değerlendirildi. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlandı ve 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışması yapıldı.

### 3.4.1 SAD- MKH'LERİN KARAKTERİZASYONU

Sıçan adipoz dokusundan elde edilen MKH'ler kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edilecek ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelendi. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analiz ve immünsitokimyasal işaretleme (İmmunhistokimyasal İşaretleme (İHK) ve İmmunfloresan İşaretleme (İF)) çalışmaları gerçekleştirildi. Gen ekspresyonları RT-PCR ile belirlendi. Sad-MKH'ler in vitro diferansiasyonu kapasitelerinin belirlenmesi için; adipojenik, osteojenik, kondrojenik nörojenik ve hepatojenik farklılaşmaya alındı.

### 3.4.2 İMMUNFENOTİPLEME

#### 3.4.2.1 AKIM SİTOMETRİK ANALİZ

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1'den P5'e kadar) ve FACS Calibur akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 8x10<sup>6</sup> hücre) PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikorlar (CD45, CD3, CD90, CD29, CD11b, CD44, CD71, CD106, CD73) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek inkübe edildi (oda ısısında-karanlıkta-45 dak.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0,1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edilerek (5dk. 1780rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutulup analizi BD Cell Quest TM software programı ile gerçekleştirildi.

#### 3.4.2.2 İMMUNSİTOKİMYASAL İNCELEME

sAD- ve sKİ-MKH'lerin immünsitokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P3'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture-Chamber- slide-8 well (24/pk)) ekilmiş 2x10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk ile gerçekleştirildi. Tutunmanın sağlanması için bir gece inkübasyonun ardından İHK ve İF teknikleri kullanılarak Tablo 2 'ki antikor paneli çalışıldı.

| Primer Antikor                            | Sekonder Antikor | Reaktivite | Uygulama | Kaynak                   | Katalog # |
|---|------------------|------------|----------|--------------------------|-----------|
| Alfa Smooth Muscle Actin Ab-1 (Clone 1A4) | Mouse            | r          | IF,IHC   | Thermo Scientific        | MS-113-P  |
| Actin (C-2)                               | Mouse            | r          | IF,IHC   | Santa Cruz Biotechnology | sc-8432   |
| CD 34 (C-18)                              | Goat             | r          | IF       | Santa Cruz Biotechnology | sc-7045   |
| CD 45 (H-230)                             | Rabbit           | r          | IF       | Santa Cruz Biotechnology | sc-25590  |
| CD 105 (Endoglin)                         | Goat             | r          | IF       | Santa Cruz Biotechnology | sc-19793  |
| CD146                                     | Rabbit           | r          | IHC      | Abcam                    | ab75769   |
| Fibronectin (EP5)                         | Mouse            | r          | IF,IHC   | Santa Cruz Biotechnology | sc-8422   |
| Nestin R                                  | Mouse            | r          | IF,IHC   | Santa Cruz Biotechnology | sc-33677  |
| Vimentin (C-20)                           | Goat             | r          | IF,IHC   | Santa Cruz Biotechnology | sc-7557   |
| CD 71 (K-20)                              | Goat             | H,r        | IF       | Santa Cruz Biotechnology | sc-7088   |
| Fibronectin (EP5)                         | Mouse            | H,r        | IF,IHC   | Santa Cruz Biotechnology | sc-8422   |

**Tablo 2: IF/IHC antikor paneli**

### 3.4.3 İMMÜNİSTOKİMYASAL İŞARETLEME (İHC)

İmmunhistokimyasal çalışmalarda, Ultravision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent HRP (RTU) ve ABC Staining System (for use goat primary antibodies) immunohistokimya kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler PBS'le yıkandıktan sonra metanolle 20 dk. fikse edildi. PBS (İnvitrogen) ile yıkandıktan sonra, %1,5 normal blok (Normal Sera) serum içeren PBS' de 30dk. inkübe edilerek verilen uygun dilüsyon oranlarında hazırlanan primer antikorlar eklenip oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkama işleminden sonra immunohistokimyasal kit prosedürü aynen uygulanıp son aşamada AEC kromojenle (AEC (RED) Substrat Kit) enzim kompleksi görünür hale getirilerek, Hematoxylin Gill's Formulation 2 ile çekirdek zıt boyaması gerçekleştirilip kurutulan preparatlar Crystal Mounting Medium ile kapatıldı, Leica DMI 4000 Microsystems ışık mikroskopunda analiz edilip görüntülendi (Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır).

### 3.4.4 İMMUNFLORESAN İŞARETLEME (İF)

Hücreler metanolle fiske edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1,5 normal blok serum içeren PBS' de 30dk. inkübe edilerek ve Antibody Diluent ile uygun oranlarında dilue edilen primer antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3X2dk yıkama işleminden sonra immunfluoresans çalışmaları için uygun floresans (FITC, TR) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30dk. inkübe edilip, son aşama nükleer boya içeren kapatma medyumu (Ultra Cruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

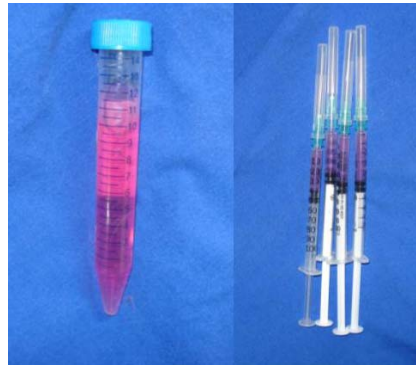
### 3.4.5 MKH'LERİN GFP İLE İŞARETLENMESİ

#### 3.4.5.1 PLAZMİD DNA İZOLASYONU

Yüksek kalitede plazmid DNA izolasyonu, ayırma ve saflaştırma işlemleri sonrasında E.coli 'den toksik lipopolysakkaritler gelmemesi için EndoFree Plazmid Maxi Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Seçici katı besi ortamından yeni çoğalmış tek bir koloni alındı ve 2–5 ml uygun antibiyotik içeren LB broth (Luria Bertani) sıvı besi ortamına ekilerek 8 saat boyunca 300 dak/dev ve 37 °C 'de çoğaltıldı. 250 ml seçici LB ortamı 1 ml içerisinde bakteri çoğalmış ortam ile inoküle edildi ve aynı koşullarda 12–16 saat bekletildi. Hücreler 6000xg hızda 15 dakika boyunca 4 °C 'de döndürülerek toplandı ve 10 ml P1 tampon çözeltisi içerisinde homojen hale getirip oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmeden önce 10 ml Tampon P2 eklenip sertçe 4–6 kez ters çevrilerek karıştırıldı. 10 ml buzda soğutulmuş P3 tamponu eklenerek 4–6 kez ters çevrilip karışım QIAfilter şırıngasına aktarıldı, 10 dakika bekletildikten sonra filtreden geçirilerek 50 ml tüp içerisine aktarılıp 2,5 ml ER tamponu eklendi ve 30 dk buzda bekletildi. 10 ml QBT tampon çözeltisi ile önceden dengelenmiş QIAGEN-tip 500 kolonuna karışım eklenip süzülmesi beklenildi. 2 kez kolon 30 ml QC tamponu ile yıkandı ve 15 ml QN tamponu içerisinde DNA çözünüldü. Plazmid DNA 'sı 10,5 ml izopropanol eklenerek 4 °C 'de, 30 dakika boyunca asgari 15,000xg hızla çöktürülüp, DNA 5 ml endotoksin içermeyen %70 etanol içerisinde yıkandıktan sonra 10 dk asgari 15,000xg hızla çöktürüldü. Yıkanmış plazmid DNA 'sı oda sıcaklığında 5–10 dakika kurutulup endotoksin içermeyen TE tamponu içerisinde istenilen hacimde çözüldü.

### 3.4.5.2 GFP GEN TRANSFORMASYONU

Gen aktarımı elektroporasyon yöntemini temel alan Neon Transfection Sistemi, 10 µl Neon Kit ve 100 µl Neon Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Yüksek kalitede (endotoksin içermeyen) plazmid DNA 'sı 1-5 µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlandı, MKH'ler ise deneyin olacağı günde % 70-90 konfluente ulaşacak şekilde (transfeksiyon başına 0,5-1 × 10<sup>6</sup> hücre) çoğaltıldı. Deney gününde hücreler kültür kabından kaldırıldı ve Ca<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> içermeyen PBS'le yıkayıp, 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek "Resuspension Buffer R" tampon çözeltisi ile son hücre yoğunluğu 1 ml başına 1,0 × 10<sup>7</sup> hücre olacak şekilde hazırlandı. 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine 2 ml serum içeren, seçici antibiyotik içermeyen (penisilin içerebilir, eğer seçici değil ise) uygun besiyeri eklenip ve 37°C 'de 5% CO<sub>2</sub> sirkülasyonu olan nemli ortamda inkübe edildi ( Transfeksiyon parametreleri daha önceden optimize edildiği değerlere ayarlandı). Steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine transfeksiyon başına 2- 4 µg plazmid DNA 'sı ve plazmid DNA 'sı bulunan tüp içerisine transfeksiyon başına DNA ile birlikte 10 µl olacak miktarda hücre aktarılıp Neon™ Pipeti ile yavaşça tip içerisine 10 µl DNA-hücre süspansiyonu çekildi ve ucundaki hücre-DNA karışımı ile birlikte Neon™ Pipet İstasyonu içerisnde bulunan ve 3 ml elektrolit tamponu eklenmiş tüpe yerleştirildi. Belirtilen ayarlarda sistem elektrik akımı (atımını/şokunu) uygulanıp, gen aktarılmış hücreler hemen önceden ısıtılmış serum içeren ama seçici antibiyotik içermeyen besi ortamına aktarıldı, hücreler 37°C 'de nemlendirilmiş CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi. Transformasyon sonrası 3. günde (tranzient/geçici ekspresyon) ortam değiştirilerek besi ortamı tazelandı, ancak bu noktadan itibaren seçici antibiyotik (pGFP için G418, Kat. No. 11811-098) eklendi (Şekil 19).

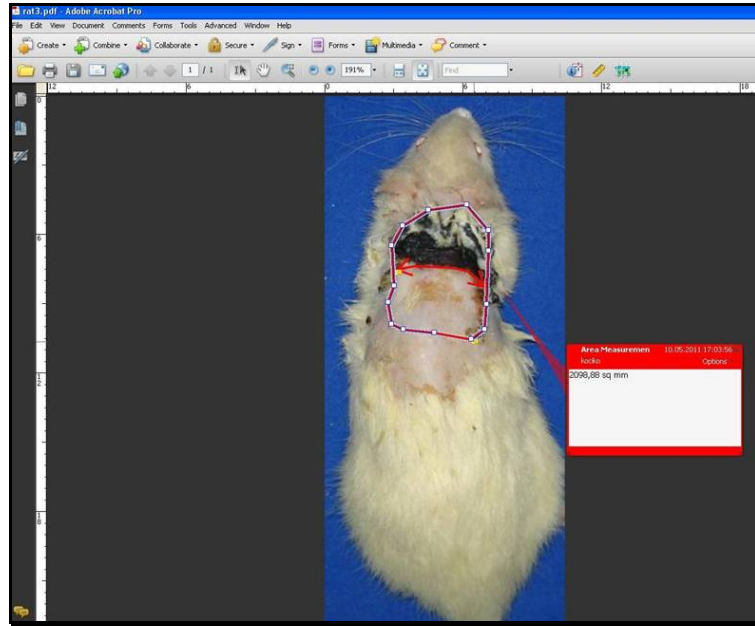


**Şekil 19: Sol: sAD-MKH içeren solüsyon. Sağ: solüsyonun insülin enjektörlerinde çekilmiş görüntüsü**

### 3.5 DEĞERLENDİRME

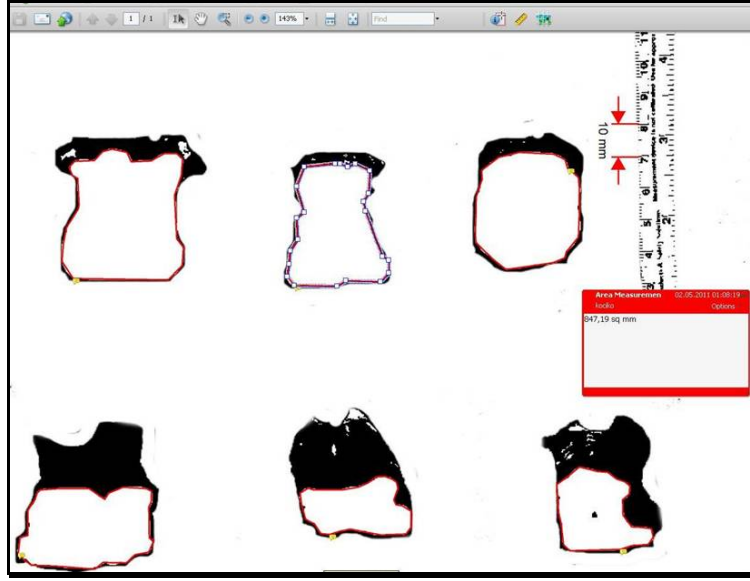
#### 3.5.1 MAKROSKOPİK DEĞERLENDİRME

Flep kaldırıldıktan sonra bir haftalık takip süresi sonunda tüm gruplarda ölçümler cerrahi sonrası 1.hafta da yapıldı.1.hafta sonunda tekrar anestezi verilen ve cerrahi masasına yüz üstü yatırılan hayvanlar dört ekstremiteden uygun şekilde panoya tespit edildi ve yanlarına cetvel konarak uygun ışıkta dijital fotoğraf makinesi flepler fotoğraflandı. Bu fotoğraflar tek tek Adobe Acrobat 9 Pro Version 9.0.0 (Adobe Systems) programına aktarıldı. Fotoğrafta kullanılan cetvel yardımı ile program her sıçan fotoğrafında kalibre edilerek fleplerin yaşayan alanları milimetrekare olarak ölçüldü ve canlı flep alanı/tüm flep alanı olan bölümleri yüzdelik (%) olarak belirlendi (Şekil 20, 21). Genel olarak flepler bir miktar kontrakte olsa da yaşam/nekroz oranlarının yüzdelik hesaba uygun yapılması standardize sonuçlar elde etmemizi sağladı. 1.haftanın sonunda, yara kontraksiyonu nedeniyle başlangıç alanına göre daha düşük boyutta olmaktadır. Bu durum başlangıç değerleri temel alındığında nekroz ve canlılık oranlarının ayrı ayrı ölçülüp başlangıç alanına göre hesaplanması yanlış sonuçlar verecektir. Bu durumu ekarte etmek amacıyla flepler 1.haftanın sonunda (yaşayan alan/ nekrotik + yaşayan alan) oranları şeklinde hesaplanmıştır. Ayrıca çıplak gözle flep damarlanmasındaki artış değerlendirildi (Şekil 24).



Şekil 20: Flep yaşam oranlarının ölçümü





**Şekil 21: kontrol grubu ile deney grubu flep yaşam oranlarının ölçümünün grafikleştirilmiş görüntüsü**

### 3.5.2 HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Fotoğraflama işlemi bittikten sonra her sıçanın flebi total olarak ve distal pedikülün sütür hattından 1 cm. uzaklıktaki sağlam dokuyu da içerecek şekilde cilt biyopsileri alındı. %10' luk formol içerisinde 24 saat bekletilen flepler patoloji laboratuvarına götürüldü, uygun kesitler hazırlanarak Hemotoksilen-Eosin ile boyandı. Bu biyopsilerin histopatolojik incelemeleri Fakültemiz Patoloji A.D.' da aynı patolog tarafından örneklerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin kapiller dansite artışı açısından 40x büyütme altında değerlendirildi. Bu kritere göre her preparatda 10 farklı alandaki kapillerler sayılarak sonuçlar univariate varyans analizi testi ile değerlendirilip p değerleri bulundu.

### 3.5.3 MİKROANJİYOĞRAFİK DEĞERLENDİRME

Flep ayrıldıktan 7 gün sonra her gruptan 2 sıçan seçilerek anjiyografi yapıldı. Toraks duvarı sternum üzerinden torakotomi ile açıldı. Sıçanın anestezisi 35 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar®) i.p. ve 5 mg/kg xylazin (Rompun®) i.p. ile sağlandıktan sonra çalışma tahtası üzerine sırtüstü pozisyonda sabitlendi. Sol ventriküle ulaşıldı ve 22 numara (22G) intraket ile intraventriküler kanülizasyon sağlandı. Yıkama solüsyonu ve kontrast maddenin venöz sistemden geri dönüşünü görmek için sıçanın her iki taraf juguler veni açıldı ve ayrıca kuyruğu ½ orta

seviyeden ampüte edildi. Vasküler yatak 100 cc % 2'lik heparin sülfat solüsyonu ile yıkandı. Juguler venden ve kuyruktan solüsyonun geldiği görülene kadar yıkamaya devam edildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra 100 cc, %30'luk baryum sülfat solüsyonu kateterden 15 dakikada düşük basınçta verildi. Uygulamaya juguler venden ve kuyruktan baryum solüsyonunun geldiği görülene kadar devam edildi. Sonrasında tüm sıçanlar +4 C derecede buzdolabında 12 saat süreyle bekletildi. Sıçandan flep eksize edildikten sonra mamografi cihazında 26 kV ve 21 mAs ayarlarında görüntüleme yapıldı.

#### 3.5.4 Tc-99m (MIBI) SİNTİGRAFİK DEĞERLENDİRME

Bu çalışmaya her bir gruptan 4'er adet sıçan dahil edildi. Her iki gruptaki flepler pedikül ayrıldıktan 7 gün sonra sıçanlar anestezi altında iken nükleer tıp sintigrafi odasında 30 G PPD enjektörü ile sıçan penil veninden her flep için 250  $\mu$ Ci Tc-99m (MIBI) enjekte edildi (Şekil 22). Enjeksiyon sırasında radyonüklid materyalin damar dışına çıkmamasına ve kontaminasyon olmamasına özen gösterildi. Enjeksiyondan 2 saat sonra deri flepleri tespit edildiği sınırı da içerecek şekilde dış ortama alındı. Gama kamera altında fleplerden 10 dakikalık statik görüntüler alındı. Tüm gruplardan alınan görüntülerden sayısal değerlendirmeler yapıp sonuçları birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırıldı.



Şekil 22: Sıçan penil veninden 250  $\mu$ Ci Tc-99m (MIBI) enjekte edilmesi

### 3.5.5 GFP İŞARETLİ KÖK HÜCRELERİN İZLENMESİ İLE DEĞERLENDİRME

Patoloji laboratuvarına götürülen fleplerden uygun kesitler hazırlanarak herhangi bir boyama işlemine tabi tutulmadan kök hücre laboratuvarına götürüldü. Nakledilen GFP işaretli YD-MKH' lerin alıcının dokularında izlenebilmesi amacıyla doku kesitlerine GFP ve vimentin ikili (double) immün boyaması yapıldı. İmmün boyama sonrası doku kesitleri Leica DMI 4000B Floresans atamanlı inverted mikroskopta incelemeye alındı ve fotoğrafları çekildi. Vimentin ve GFP ikili immün boyanmış kesitler sırasıyla çekirdek boyanması için DAPI, GFP ve vimentin için uygun filtreler seçilerek ( sırasıyla A, GFP ve TR-Texas Red) görüntülendi ve software yardımıyla bu üç ayrı görüntü üst üste (overlay) getirildi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, kök hücre uygulanmış grupların subdermal dokularında hem GFP pozitif hem de bir kök hücre belirteci olan vimentin pozitif hücreler naklettiğimiz kök hücreler olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1 MAKROSKOPİK BULGULAR

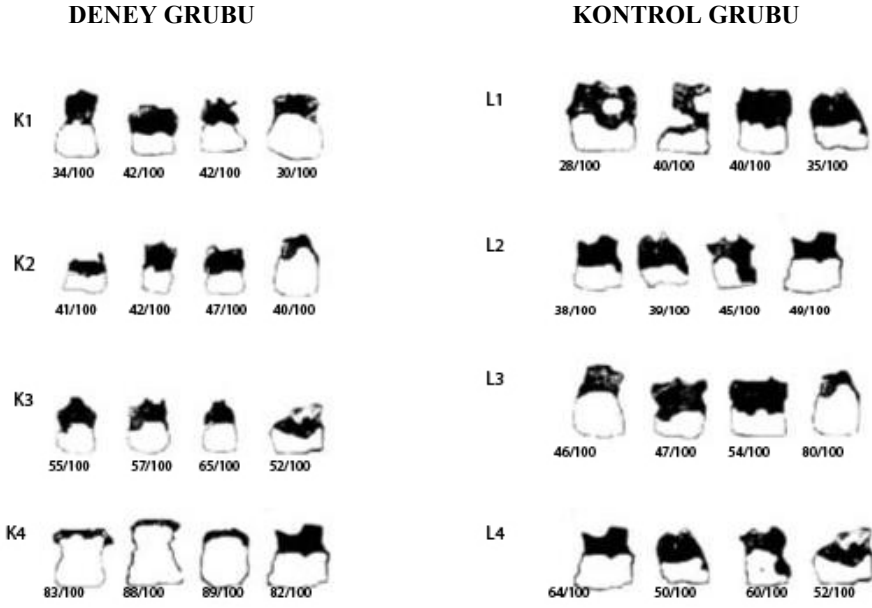
Postoperatif 7. gün yapılan yaşayabilirlik değerlendirmesinde deney grubu ile kontrol grubu arasında flep yaşayan alanları karşılaştırıldığında deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla yaşayan alan hesaplanmıştır. YD-MKH deney grubunda flep yaşayan alanına anlamlı ölçüde olumlu katkıda bulunmuş, kontrol grubunda ortalama flep yaşayan alanı 5. gün için %29 iken deney grubunda %37 bulunmuştur. Yine ilerleyen günlere baktığımızda, 8. günde kontrol grubundaki ortalama flep yaşayan alanı %33 iken deney grubunda %42,5 bulunmuş; 11. günde kontrol grubu %48 iken deney grubunda bu oran %57'ye yükselmiştir. Pedikülü 14. gün ayrılan kontrol grubunda ortalama flep yaşayan alanı % 47 iken deney grubunda bu oran %85'e yükselmiştir. YD-MKH tedavisi ile iki grup arasında flep yaşayan alanında belirgin bir artış gözlenmiştir (Tablo 3).

Çalışma sonunda gruplardaki deneklerden seçilen birer fotoğrafta flep yaşayan alanları görülmektedir (Şekil 23).

Tablo 3’de, gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşayan alanları mm<sup>2</sup> ve % olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması, standart deviasyon ve standart hatalar da tabloda belirtilmiştir.

| RAT                                | K1                |    | K2                |      | K3                 |    | K4                  |    | L1                 |    | L2                 |    | L3                 |    | L4                 |    |
|------------------------------------|-------------------|----|-------------------|------|--------------------|----|---------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------|----|
|                                    | mm <sup>2</sup>   | %  | mm <sup>2</sup>   | %    | mm <sup>2</sup>    | %  | mm <sup>2</sup>     | %  | mm <sup>2</sup>    | %  | mm <sup>2</sup>    | %  | mm <sup>2</sup>    | %  | mm <sup>2</sup>    | %  |
| <b>1</b>                           | 450,17/<br>1337,5 | 34 | 558,34/<br>1364,4 | 41   | 827,85/<br>1493,24 | 55 | 1207,68/<br>1449,02 | 83 | 376,87/<br>1305,54 | 28 | 359,06/<br>947,39  | 38 | 512,14/<br>1105,23 | 46 | 933,62/<br>1458,57 | 64 |
| <b>2</b>                           | 512,24/<br>1214,6 | 42 | 643,33/<br>1537,6 | 42   | 846,09/<br>1476,27 | 57 | 847,19/<br>960,01   | 88 | 411,45/<br>1024,67 | 40 | 457,08/<br>1168,19 | 39 | 561,65/<br>1188,93 | 47 | 523,75/<br>1058,03 | 50 |
| <b>3</b>                           | 702,57/<br>1681,5 | 42 | 557,54/<br>1179,8 | 47   | 787,97/<br>1214,89 | 65 | 995,65/<br>1112,82  | 89 | 486,75/<br>1210,39 | 40 | 397,58/<br>874,93  | 45 | 579,57/<br>1073,99 | 54 | 601,52/<br>1004,50 | 60 |
| <b>4</b>                           | 412,56/<br>1363,2 | 30 | 499,67/<br>1243,5 | 40   | 650,45/<br>1248,12 | 52 | 939,56/<br>1140,15  | 82 | 401,06/<br>1144,07 | 35 | 735,54/<br>1505,62 | 49 | 937,68/<br>1170,10 | 80 | 578,15/<br>1104,57 | 52 |
| <b>Ortalama flep yaşayan alanı</b> | 519,38            | 37 | 564,72            | 42,5 | 778,09             | 57 | 997,52              | 85 | 344,03             | 29 | 387,13             | 33 | 547,76             | 48 | 559,26             | 47 |
| <b>Standart Deviasyon</b>          | 128,8             |    | 59,1              |      | 88,5               |    | 152,8               |    | 59,58              |    | 170,3              |    | 195,3              |    | 185,7              |    |
| <b>Standart Hata</b>               | 64,4              |    | 29,5              |      | 44,2               |    | 76,4                |    | 29,7               |    | 85,1               |    | 97,6               |    | 92,8               |    |

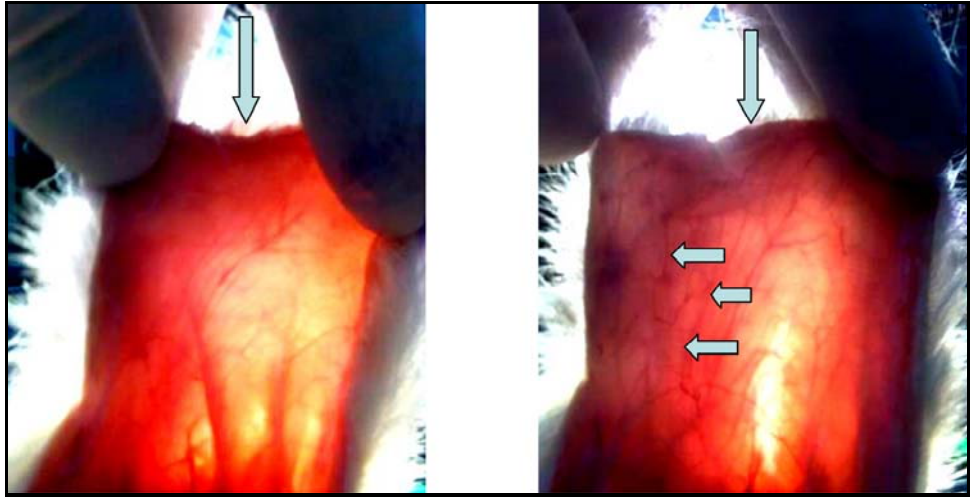
**Tablo 3: Gruplardaki deneklerde ölçülen flep yaşayan alan verileri.**



Şekil 23: Grupların fleplerindeki nekroz ve yaşayan alanlarının, eşit mesafeden çekilen dijital fotoğraflarının bilgisayar ortamında grafikleştirilmiş şekli.

Kontrol grubu (n=16)

Deney grubu (n=16)

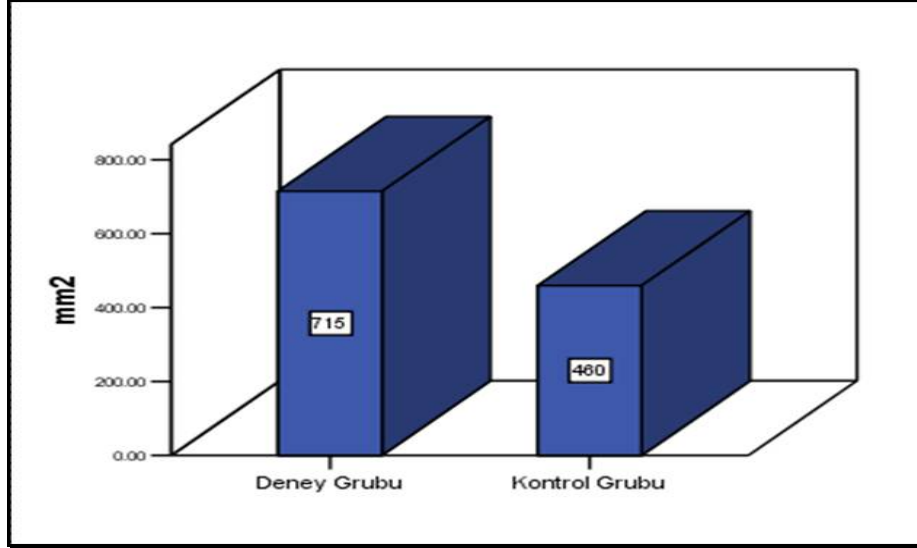


Şekil 24: Fleplerin yaşayan alanlarındaki damar dağılımı çıplak gözle incelendi. Kontrol grubunda (sol) bariz damarlanma gözlenmezken deney grubunda (sağ) enjeksiyon bölgesi etrafında neovaskülarize olmuş kapillerler gözlemlendi (küçük oklar yeni oluşmuş kapillerleri, büyük oklar flep distalini göstermekte).

Gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşayan alanları değerlendirildiğinde kontrol grubunda ortalama flep yaşayan alanı  $459,59 \pm 175,28 \text{ mm}^2$  iken deney grubunda  $714,93 \pm 220,99 \text{ mm}^2$  bulunmuştur. Tabloda, gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşayan alanları  $\text{mm}^2$  olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması, standart deviasyon ve standart hata tabloda belirtilmiştir. (Tablo 4, Şekil 25)

| Grup          | Ortalama flep yaşayan alanı $\text{mm}^2$ | N  | Standart Deviasyon | Standart Hata |
|---------------|---|----|--------------------|---------------|
| Deney Grubu   | 714,93                                    | 16 | 220,99             | 55,2          |
| Kontrol Grubu | 459,59                                    | 16 | 175,28             | 43,8          |

Tablo 4: Deney ve kontrol gruplarının ortalama yaşayan flep alanları ( $\text{mm}^2$ )

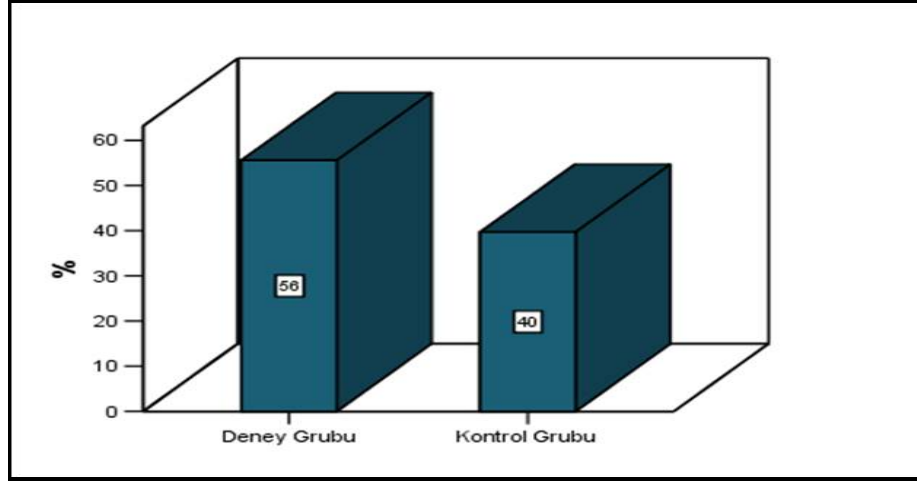


Şekil 25: Grupların ortalama yaşayan flep alanlarının grafikte gösterilmesi

Kontrol grubunda ortalama flep yaşıyan alanı  $39,7 \pm 12,37$  iken deney grubunda  $55,6 \pm 19,87$  bulunmuştur. YD-MKH tedavisi ile iki grup arasında flep yaşıyan alanında %16 oranında artış gözlenmiştir. Tabloda, gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşıyan alanları % olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması, standart deviasyon ve standart hata tabloda belirtilmiştir (Tablo 5, Şekil 26).

| Grup          | Ortalama flep yaşıyan alanı (%) | N  | Standart Deviasyon | Standart Hata |
|---------------|---------------------------------|----|--------------------|---------------|
| Deney Grubu   | 55,6                            | 16 | 19,87              | 4,968         |
| Kontrol Grubu | 39,7                            | 16 | 12,37              | 3,093         |
|               |                                 |    |                    |               |

**Tablo 5: Deney ve kontrol gruplarının ortalama yaşıyan flep alanları (%)**



**Şekil 26: Grupların ortalama % yaşıyan flep alanlarının grafikte gösterilmesi**

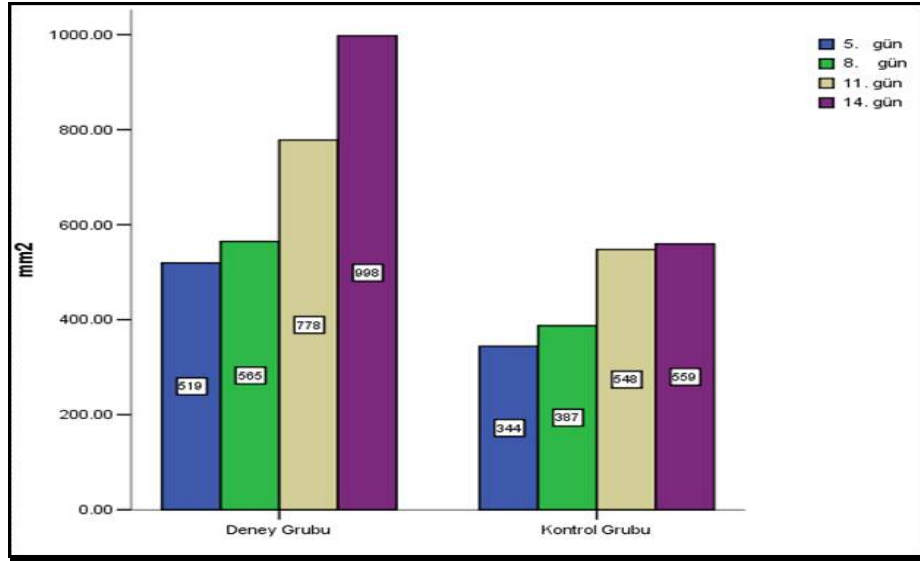
Gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşıyan alanları değerlendirildiğinde sırasıyla 5. gün için kontrol grubunda  $344,03 \pm 59,58 \text{ mm}^2$  iken deney grubunda  $519,38 \pm 128,85 \text{ mm}^2$ ; 8. gün kontrol grubu



387,13±170,32 mm<sup>2</sup>, deney grubu 564,72±59,17 mm<sup>2</sup>; 11. gün kontrol grubu 547,76±195,37 mm<sup>2</sup>, deney grubu 778,09±88,48 mm<sup>2</sup> ve 14. gün kontrol grubu 559,26±185,78 mm<sup>2</sup>, deney grubu 997,52±152,89 mm<sup>2</sup> bulunmuştur. Tabloda, gruptaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşayan alanları mm<sup>2</sup> olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması, standart deviasyon tabloda belirtilmiştir (Tablo 6, Şekil 27).

| Flep yaşayan alanı (mm <sup>2</sup> ) | Deney Grubu (mm <sup>2</sup> ) | Kontrol Grubu (mm <sup>2</sup> ) |
|---------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 5 gün                                 | 519,38±128,85                  | 344,03±59,58                     |
| 8. gün                                | 564,72±59,17                   | 387,13±170,32                    |
| 11. gün                               | 778,09±88,48                   | 547,76±195,37                    |
| 14.gün                                | 997,52±152,89                  | 559,26±185,78                    |

**Tablo 6: Gruptaki deneklerde ölçülen flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımı (mm<sup>2</sup>)**

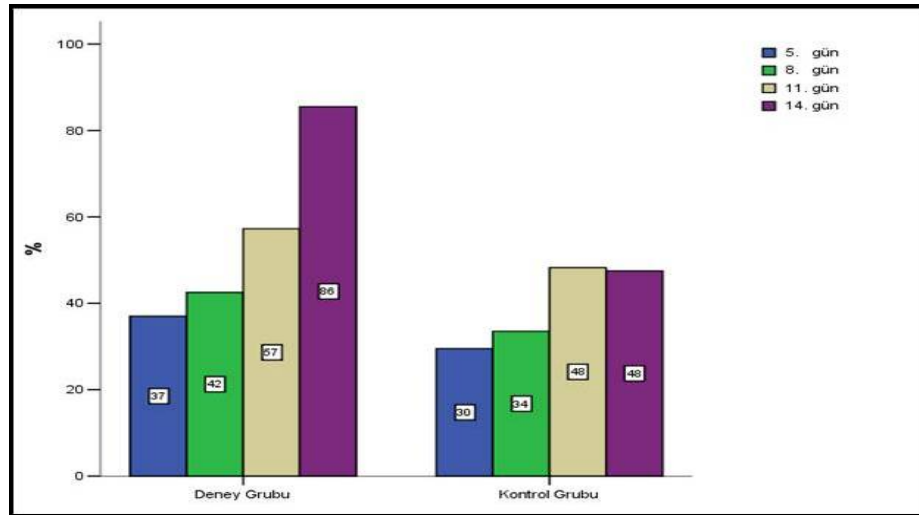


**Şekil 27: Gruptaki deneklerde ölçülen flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi**

Gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen % flep yaşayan alanları değerlendirildiğinde sırasıyla 5. gün kontrol grubunda  $29,5 \pm 6,028$  iken deney grubunda  $37,0 \pm 6,000$ ; 8. gün kontrol grubu,  $33,50 \pm 6,351$  deney grubu  $42,50 \pm 3,109$ ; 11. gün kontrol grubu  $48,25 \pm 16,194$  deney grubu  $57,25 \pm 5,560$  ve 14. gün kontrol grubu  $47,50 \pm 7,594$  deney grubu  $85,50 \pm 3,512$  bulunmuştur. Tabloda, gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşayan alanları % olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması, standart deviasyon tabloda belirtilmiştir (Tablo 7, Şekil 28).

| Flep yaşayan alan boyut/total boyut (%) | Deney Grubu (%)   | Kontrol Grubu (%)  |
|---|-------------------|--------------------|
| 5 gün                                   | $37,0 \pm 6,000$  | $29,5 \pm 6,028$   |
| 8. gün                                  | $42,50 \pm 3,109$ | $33,50 \pm 6,351$  |
| 11. gün                                 | $57,25 \pm 5,560$ | $48,25 \pm 16,194$ |
| 14.gün                                  | $85,50 \pm 3,512$ | $47,50 \pm 7,594$  |

**Tablo 7: Gruplardaki deneklerde ölçülen % flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımı (%).**

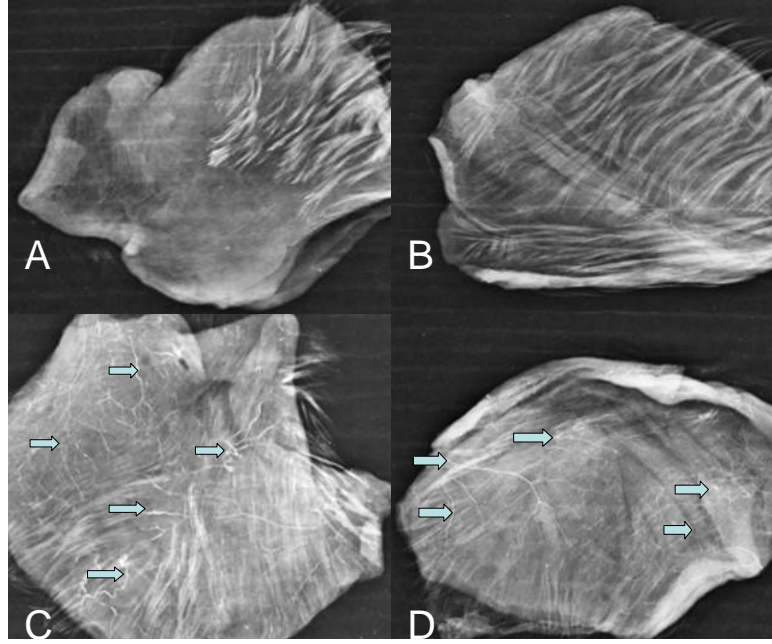


**Şekil 28: Gruplardaki deneklerde ölçülen % flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi**

## 4.2 MİKROANJİYOĞRAFİK BULGULAR

Kontrol grubu ve deney grubu 14. gün mikroanjiyografik görüntüleri karşılaştırıldığında deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde vaskülarite artışı saptandı.

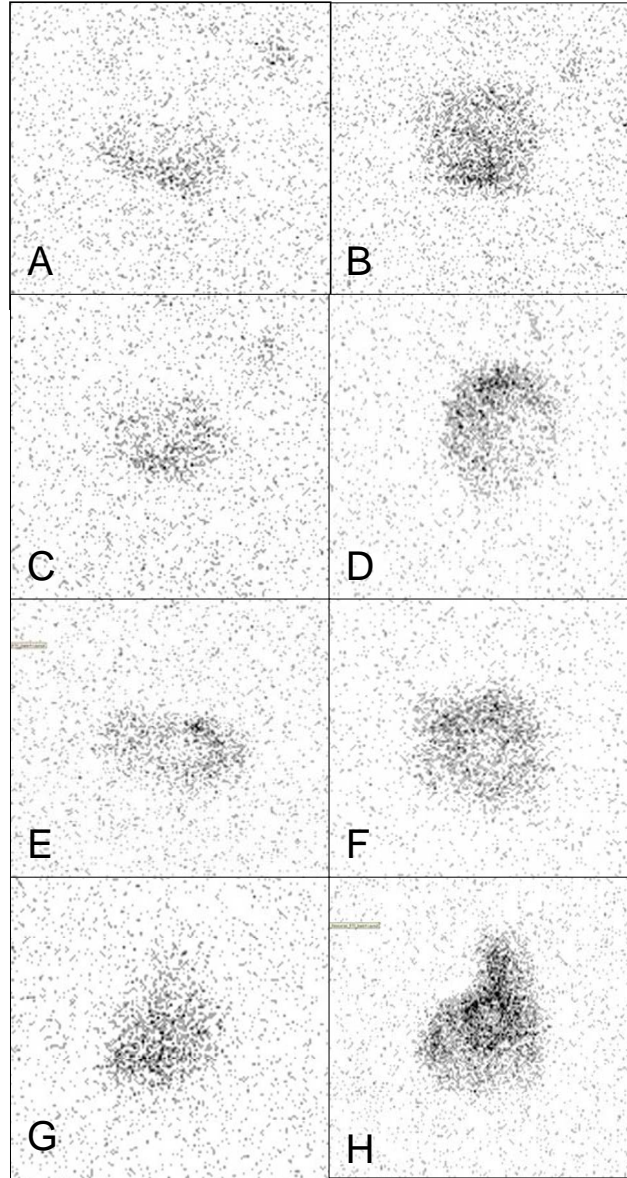
Deney grubunda alıcı yatakla flep arasında mikroanastomozlarla neovaskülarizasyon sonucu meydana gelmiş yeni vasküler yapıların sayısının arttığı izleniyor (Şekil 29).



Şekil 29: 14. gün kontrol (A ve B) ve deney (C ve D) grubu fleplerinin mikroanjiyografik görüntüsü. Oklar vaskülarizasyonun arttığını göstermekte.

### 4.3 Tc-99m (MIBI) SİNTİGRAFI SONUÇLARI

Bu çalışmaya dahil edilen her sıçandan toplam 32 adet flebin tümünde verilen radyoaktif maddenin flepte tutulduğu gözlemlendi. Bu bulgular fleplerin neovaskülarizasyonla meydana gelmiş vasküler yapıların sayısının artışı lehine yorumlandı (Şekil 30).

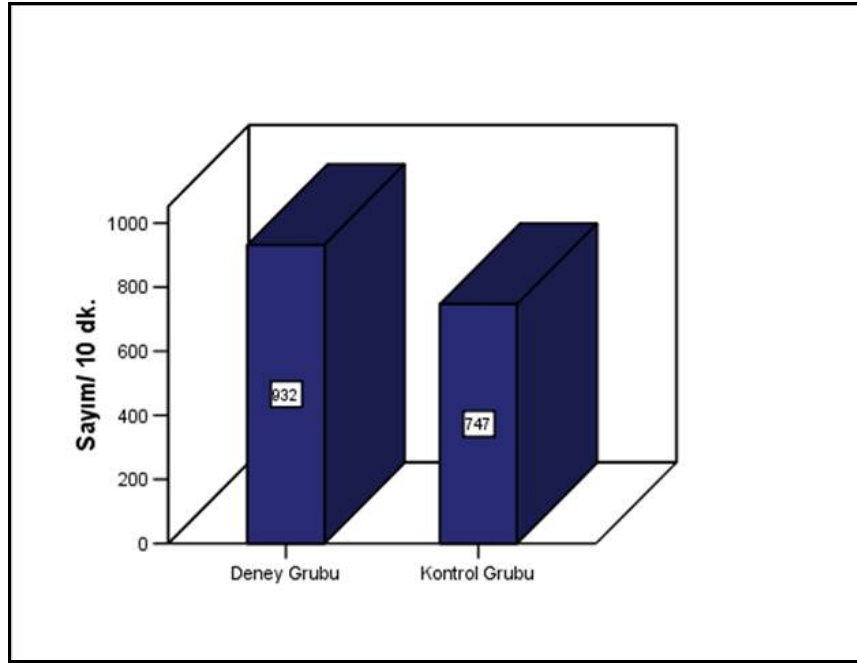


Şekil 30: 5. gün kontrol (A) ve deney (B), 8. gün kontrol (C) ve deney (D), 11. gün kontrol (E) ve deney (F), 14. gün kontrol (G) ve deney (H) gruplarındaki fleplerin sintigrafik görüntüleri izlenmektedir.

Sintigrafik açıdan flep yaşayan alanları değerlendirildiğinde YD-MKH deney grubunda flep yaşayan alanına anlamlı ölçüde olumlu katkıda bulunmuş, kontrol grubunda ortalama 746,69 sayım/10 dk iken deney grubunda 931,63 sayım/10 dk bulunmuştur. YD-MKH tedavisi ile iki grup arasında flep yaşayan alanında % 24,7 oranında artış gözlenmiştir. Tabloda, gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşayan alanları sayım/10 dk olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması, standart deviasyon ve standart hata tabloda belirtilmiştir (Tablo 8, Şekil 31).

| grup    | Ortalama sayım/10dk | N  | Standart Deviasyon | Standart Hata |
|---------|---------------------|----|--------------------|---------------|
| kök     | 931,63              | 16 | 268,228            | 67,057        |
| kontrol | 746,69              | 16 | 240,707            | 60,177        |

**Tablo 8: Sintigrafik açıdan deney ve kontrol gruplarının ortalama yaşayan flep alanları**



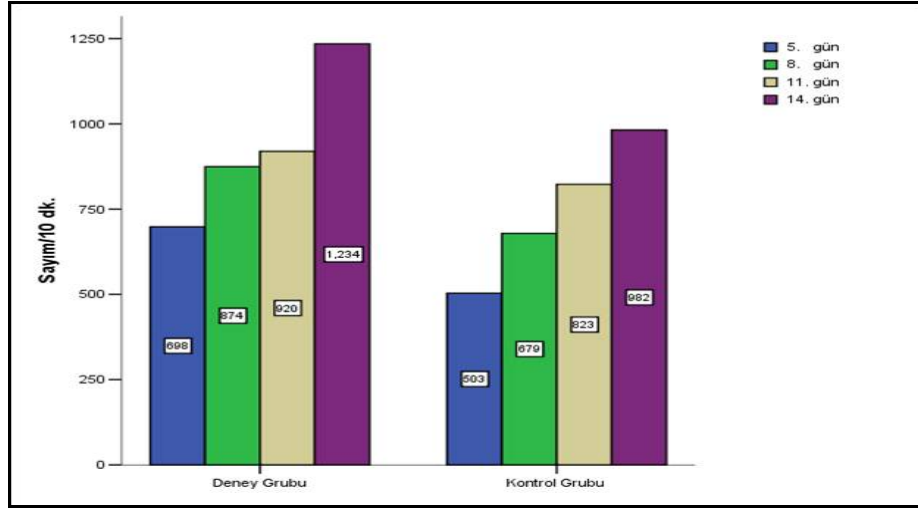
**Şekil 31: Grupların ortalama yaşayan flep alanlarının sintigrafik olarak grafik görüntüsü**

Gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda sintigrafik açıdan ölçülen flep yaşayan alanları değerlendirildiğinde sırasıyla 5. gün kontrol grubunda

503,25±72,73 iken deney grubunda 698,00±154,22; 8. gün kontrol grubu 678,75±180,67, deney grubu 874,50±191,41; 11. gün kontrol grubu 822,75±192,67 deney grubu 919,50±282,62 ve 14. gün kontrol grubu 982,00±218,92 deney grubu 1234,50±140,70 bulunmuştur. Tabloda, gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ölçülen flep yaşayan alanları sayım/10 dk. olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması ve standart deviasyon tabloda belirtilmiştir (Tablo 9, Şekil 32).

| Sintigrafi<br>(sayım/10dk) | Kök hücre<br>(ort. sayım/10dk) | Kontrol<br>(ort. sayım/10dk) |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 5 gün                      | 698,00±154,22                  | 503,25±72,73                 |
| 8. gün                     | 874,50±191,41                  | 678,75±180,67                |
| 11. gün                    | 919,50±282,62                  | 822,75±192,67                |
| 14.gün                     | 1234,50±140,70                 | 982,00±218,92                |

**Tablo 9: Gruplardaki deneklerde sintigrafik açıdan ölçülen flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımı**

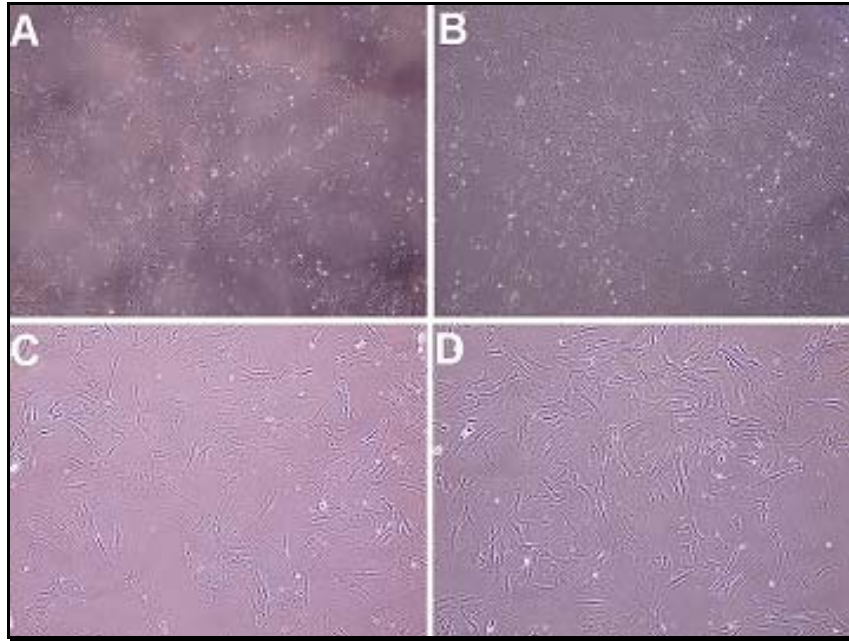


**Şekil 32: Gruplardaki deneklerde sintigrafik açıdan ölçülen flep yaşayan alanlarının günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi**

## 4.4 GFP İŞARETLİ KÖK HÜCRE AÇISINDAN BULGULAR

### 4.4.1 sAD-MKH'LERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ

Sıçan adipoz dokusundan izole edilen ve kültür kabının tabanına yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri, çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelenmiştir. Birincil (primer) kültürün ilk günlerinde gözlenen iğ şeklinde ve fibroblast benzeri hücrelerin, sonraki günlerde koloniler oluşturmaya başladığı gözlenmiştir (Şekil 33.A-B). Yaklaşık 16-18'nci günlerde T25 kültür kabının yüzeyinin, %70–80 oranında hücrelerce doldurulduğu (konfluent hale geldiği) gözlenmiştir. Alt-kültürlüme işlemlerinden sonra, T75 kültür kaplarına ekilen hücreler (yaklaşık 1300–2000 hücre/ cm<sup>2</sup>) 3–4 gün içerisinde kültür kabının yüzeyini %70–80 oranında doldurmuştur (yaklaşık 10-12x10<sup>3</sup> hücre/ cm<sup>2</sup>)(Şekil 33.C ve D). İn-vitro koşullarda sAD-MKH' lerin bu özelliklerini kaybetmeden en az 15 kez çoğalabildikleri gözlenmiştir.

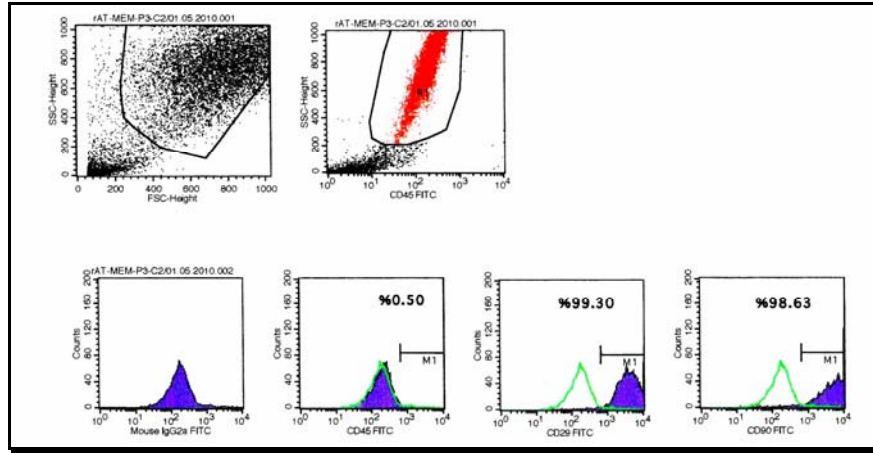


Şekil 33: Sıçan AD-MKH'lerin P0–4. gün (A), P0–5.gün (B), P2–4. gün (C) ve P3–4. günde ki faz-kontrast mikroskopik görüntüleri (Orijinal büyütme, A-B:X40; C-D:X200).



#### 4.4.2 SAD-MKH'LERİN İMMUNFENOTİPİK ÖZELLİKLERİ

Her alt kültürleme işleminden sonra ayrılan yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücre ile gerçekleştirilen akış sitometri incelemeleri (P1'den P5'e kadar) sonucunda, sAD-MKH'lerin ilk alt kültür işleminden itibaren hematopoetik hücre belirtecini (CD45) eksprese etmedikleri, buna karşın MKH'ler için sıklıkla kullanılan CD29 ve CD90 için yüksek düzeylerde pozitif oldukları tespit edilmiştir (Şekil 34). SAD-MKH yüzey antijenlerinin ekspresyonu, sıçan MKH'lerle ilgili daha önce yapılan çalışmalarda ile uyumlu bulunup, bizim çalışmamızda kullandığımız MKH'lerin önceki çalışmalarda ile aynı özellikleri içerdiği gösterildi<sup>68</sup>; <sup>69</sup>



Şekil 34: Pasaj 3'deki sAD-MKH'lerin akış sitometri verileri.

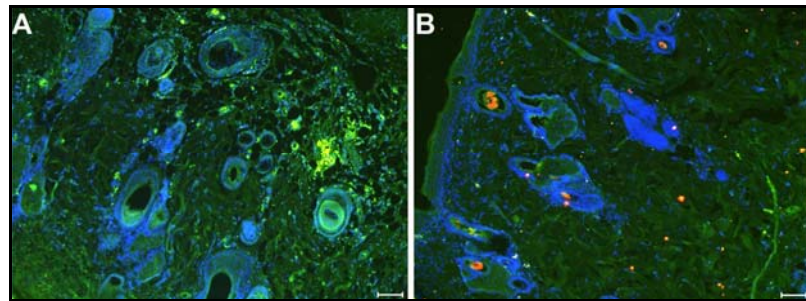
P3'deki sAD-MKH kültürünün MKH'ler açısından daha homojen olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, İHK ve İF çalışmalarının çoğu ve farklılaştırma çalışmaları bu pasajdaki hücrelerle gerçekleştirilmiştir. Tablo 10'da P3'deki sAD-MKH'lerin immunofenotipik özelliklerini gösteren immunohistokimyasal sonuçları görülmektedir.



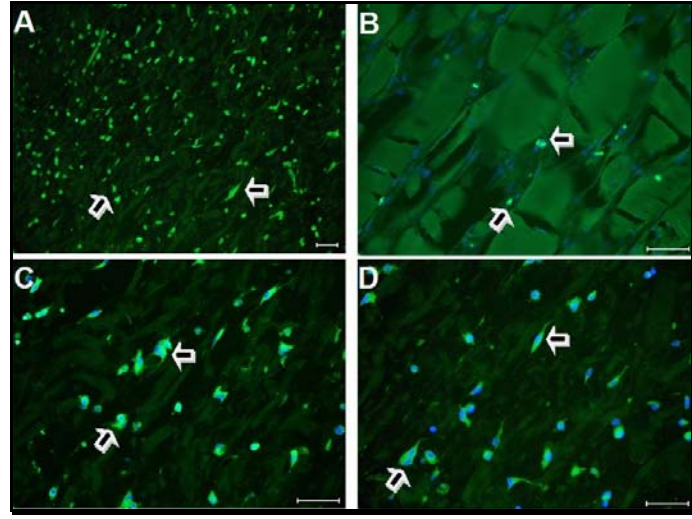
| Antikor/Belirteç      | Dilüsyon | Kaynak                      | sAD-MKH<br>Pasaj 3 |
|-----------------------|----------|-----------------------------|--------------------|
|                       |          |                             | Ekspresyon         |
| CD 34 (C-18)          | 1 : 150  | Santa Cruz<br>Biotechnology | ∅                  |
| CD 45 (H-230)         | 1 : 150  | Santa Cruz<br>Biotechnology | ∅                  |
| CD 71 (K-20)          | 1 : 150  | Santa Cruz<br>Biotechnology | ∅                  |
| CD105/Endoglin (M-20) | 1:100    | Santa Cruz<br>Biotechnology | +                  |
| CD 146                | 1 : 250  | Abcam                       | +                  |
| Nestin (Rat-401)      | 1 : 50   | Santa Cruz<br>Biotechnology | +                  |
| Vimentin (C-20)       | 1 : 100  | Santa Cruz<br>Biotechnology | +                  |
| Fibronektin (EP5)     | 1 : 100  | Santa Cruz<br>Biotechnology | +                  |
| α-Düz Kas Aktin Ab-1  | 1 : 800  | Thermo Scientific           | +                  |
| Aktin (C-2)           | 1 : 50   | Santa Cruz<br>Biotechnology | +                  |

+ = Pozitif ekspresyon; ∅ = negative ekspresyon

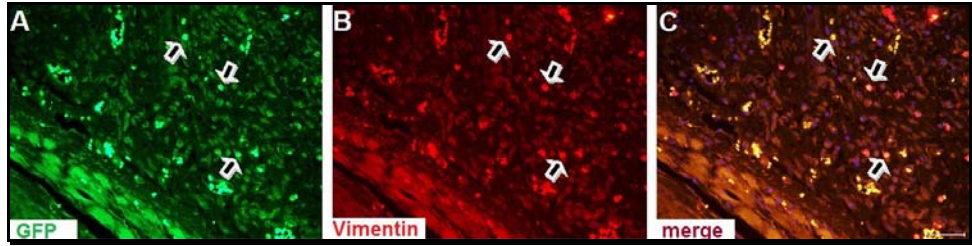
**Tablo 10: sKİ-MKH'lerin immünohistokimyasal özellikleri**



**Şekil 35: Kontrol grubu hayvanlardan elde edilmiş parafin kesitlere GFP (A) ve GFP+Vimentin (B) immunboyasması uygulandıktan sonraki mikroskopik görüntüleri. Otofluoresans veren damar içi/dışı eritrositler dışında GFP ısıması (yeşil) izlenmemektedir (Bar çubuğu:70 mikron).**



Şekil 36. İnterpolasyon flep oluşturulmuş ve GFP+ sAD-MKH'ler uygulanmış hayvanların flep doku kesitlerinde farklı bölgelerde yerleşik GFP+ hücreler izlenmektedir (oklar) (Bar çubuğu: 50 mikron).



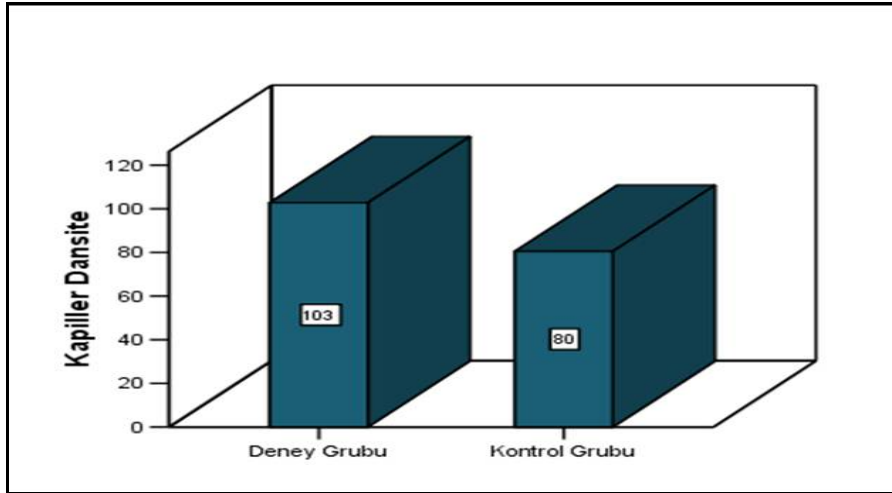
Şekil 37. Deney grubuna ait elde edilmiş kesite GFP+Vimentin immunboyaması uygulandıktan sonraki mikroskopik görünüm. A'da GFP+ hücrelerin (oklar) B'de vimentin içinde pozitif reaksiyon

#### 4.5 HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Çalışmamızda sAD-MKH tedavisi uygulanan grupta kontrol grubuna göre flepte vasküler yapılarda artışın olması gerekenden daha erken safhada olduğu, sAD-MKH tedavisinin neovaskülarizasyonu olumlu yönde etkilediği ve bunun istatistiksel olarak anlamı olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda ortalama kapiller dansite  $80,5 \pm 13,27$  iken, deney grubunda  $102,81 \pm 13,09$  bulunmuştur. YD-MKH tedavisi ile iki grup arasında kapiller dansitede %27,7 oranında artış gözlenmiştir. Tabloda, gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda sayılan kapiller dansite artışları damar sayısı olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması, standart deviasyon ve standart hata tabloda belirtilmiştir (Tablo 11, Şekil 38).

| Grup          | Ortalama Kapiller dansite | N  | Standart Deviasyon | Standart Hata |
|---------------|---------------------------|----|--------------------|---------------|
| Deney Grubu   | 102,81                    | 16 | 13,09              | 3,27          |
| Kontrol Grubu | 80,5                      | 16 | 13,27              | 3,31          |

Tablo 11: Grupların histopatolojik açıdan kapiller dansitelerinin karşılaştırılması.

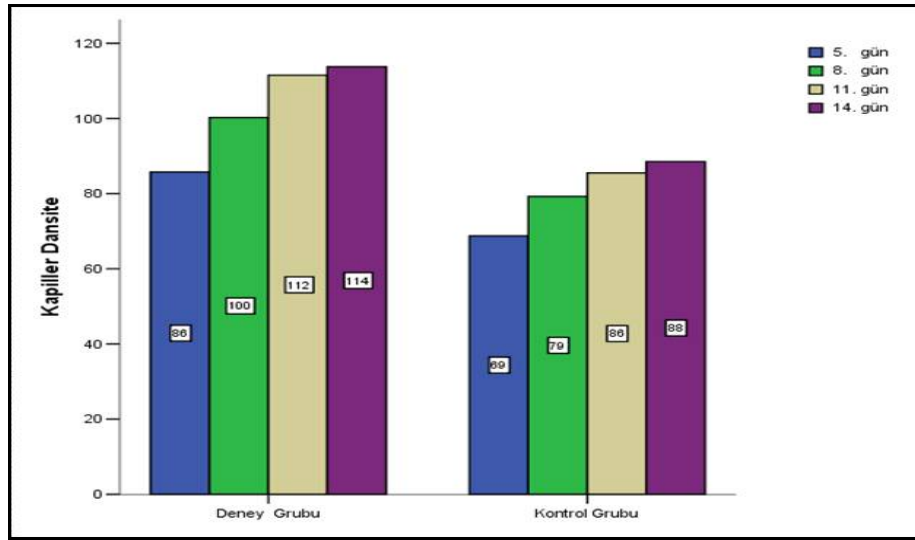


Şekil 38: Grupların histopatolojik açıdan kapiller dansitelerinin karşılaştırılmasının grafikte gösterilmesi

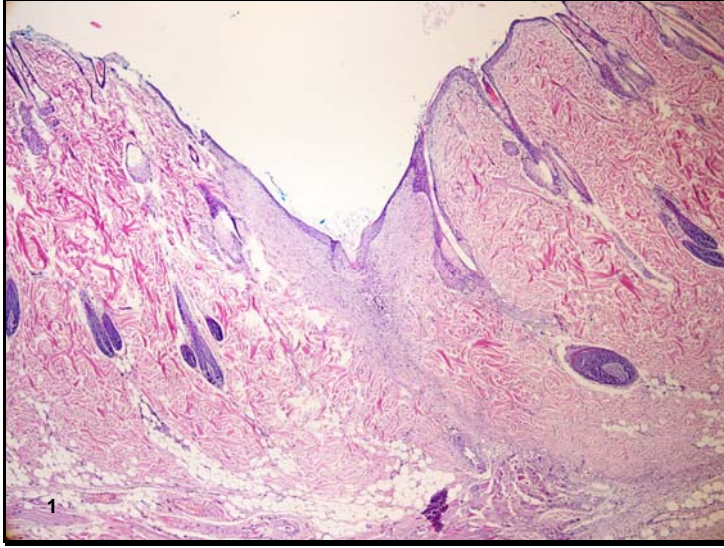
Gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda ortalama kapiller dansite değerlendirildiğinde sırasıyla 5. gün kontrol grubunda  $68,75 \pm 19,25$  iken deney grubunda  $85,75 \pm 4,34$ ; 8. gün kontrol grubu  $79,25 \pm 9,91$ , deney grubu  $100,25 \pm 6,84$ ; 11. gün kontrol grubu  $85,5 \pm 9,03$  deney grubu  $111,5 \pm 7,54$  ve 14. gün kontrol grubu  $88,5 \pm 5,06$  deney grubu  $113,75 \pm 8,77$  bulunmuştur. Tabloda, gruplardaki deneklerin ameliyat sonrası bir hafta sonunda sayılan kapiller dansite artışları damar sayısı olarak verilmiştir. Her grubun ortalaması ve standart deviasyon tabloda belirtilmiştir (Tablo 12, Şekil 39).

| Histopatoloji (Flep damar sayısı) | Kök hücre (kapiller dansite) | Kontrol (kapiller dansite) |
|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 5 gün                             | $85,75 \pm 4,34$             | $68,75 \pm 19,25$          |
| 8. gün                            | $100,25 \pm 6,84$            | $79,25 \pm 9,91$           |
| 11. gün                           | $111,5 \pm 7,54$             | $85,5 \pm 9,03$            |
| 14.gün                            | $113,75 \pm 8,77$            | $88,5 \pm 5,06$            |

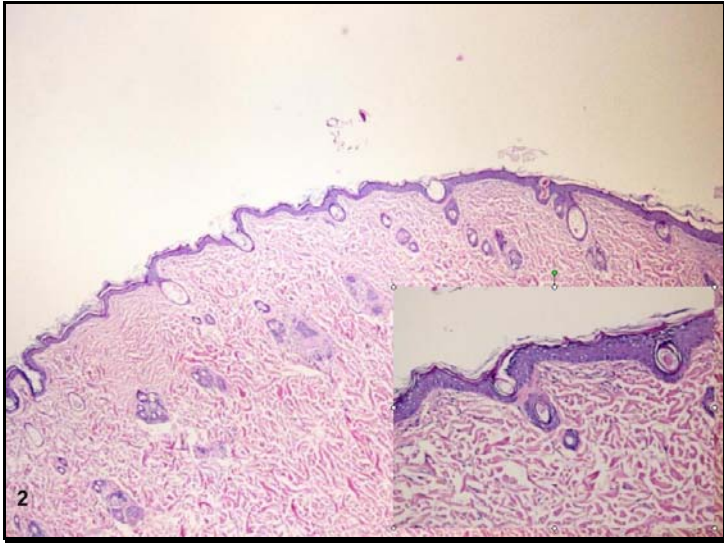
Tablo 12: Grupların histopatolojik açıdan kapiller dansitelerinin günlere göre dağılımı



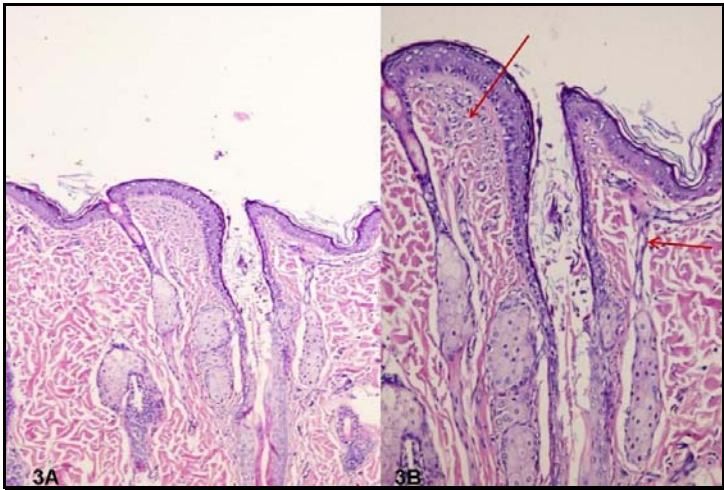
Şekil 39: Grupların histopatolojik açıdan kapiller dansitelerinin günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi



**Şekil 40: Flep ve normal doku birleşim bölgesine ait bağ dokusu artışı ve yangısal infiltrasyon içeren tamir dokusu (H&E x40)**



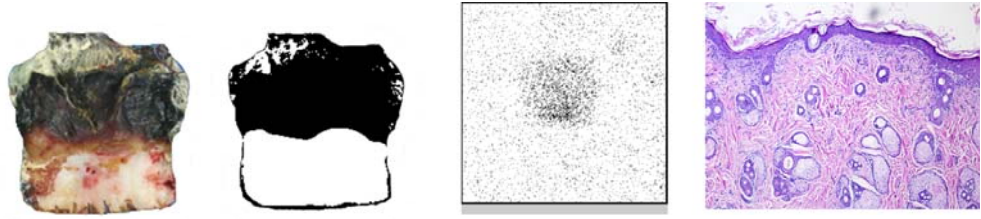
**Şekil 41: Kontrol grubuna ait ve damarlanma artışı göstermeyen flep dokusu(H&E x40, iç resim H&Ex200)**



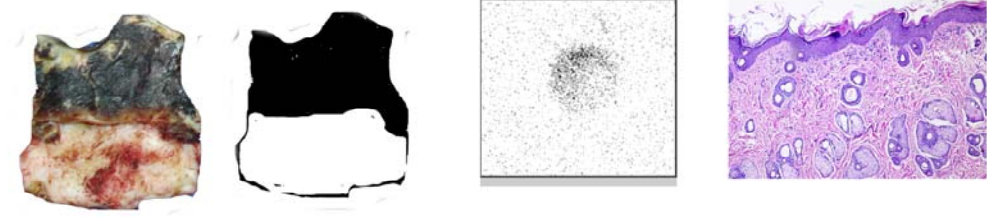
**Şekil 42: Deney grubuna ait ve dermiste damarlanma artışı gösteren flep dokusu (H&E x40)  
3B: Oklar artmış damar yapılarını göstermektedir (H&Ex200)**



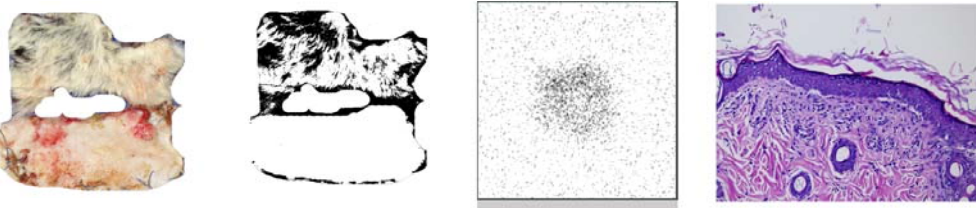
**A**



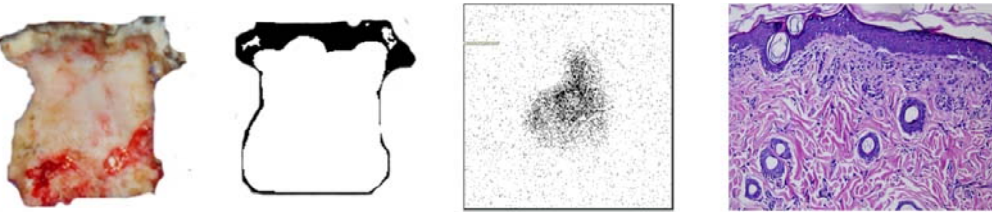
**B**



**C**



**D**



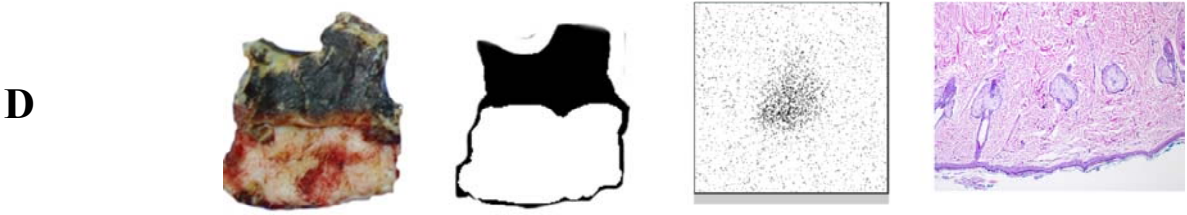
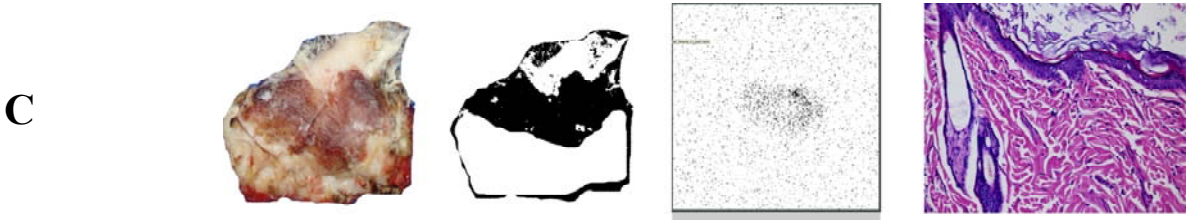
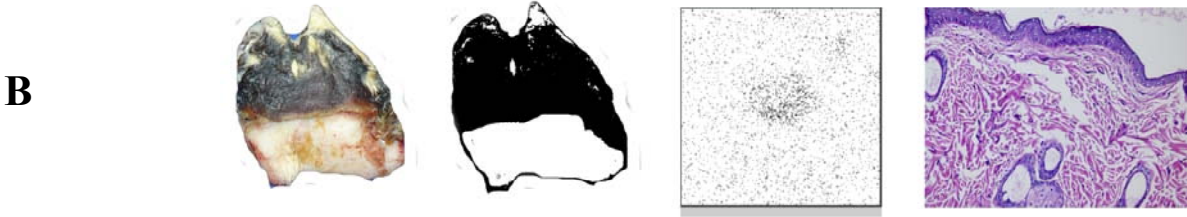
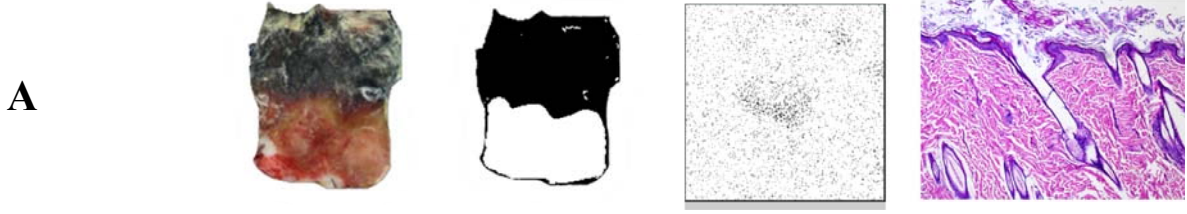
**Şekil 43:**

**A:** 5. gün deney grubunun (K1) sırasıyla soldan sağa flep fotoğrafı, flebin grafikleştirilmiş görüntüsü, sintigrafik ve histopatolojik görüntüsü

**B:** 8. gün deney grubunun (K2) sırasıyla soldan sağa flep fotoğrafı, flebin grafikleştirilmiş görüntüsü, sintigrafik ve histopatolojik görüntüsü

**C:** 11. gün deney grubunun (K3) sırasıyla soldan sağa flep fotoğrafı, flebin grafikleştirilmiş görüntüsü, sintigrafik ve histopatolojik görüntüsü

**D:** 14. gün deney grubunun (K4) sırasıyla soldan sağa flep fotoğrafı, flebin grafikleştirilmiş görüntüsü, sintigrafik ve histopatolojik görüntüsü



**Şekil 44:**

**A:** 5. gün kontrol grubunun (L1) sırasıyla soldan sağa flep fotoğrafı, flebin grafikleştirilmiş görüntüsü, sintigrafik ve histopatolojik görüntüsü

**B:** 8. gün kontrol grubunun (L2) sırasıyla soldan sağa flep fotoğrafı, flebin grafikleştirilmiş görüntüsü, sintigrafik ve histopatolojik görüntüsü

**C:** 11. gün kontrol grubunun (L3) sırasıyla soldan sağa flep fotoğrafı, flebin grafikleştirilmiş görüntüsü, sintigrafik ve histopatolojik görüntüsü

**D:** 14. gün kontrol grubunun (L4) sırasıyla soldan sağa flep fotoğrafı, flebin grafikleştirilmiş görüntüsü, sintigrafik ve histopatolojik görüntüsü

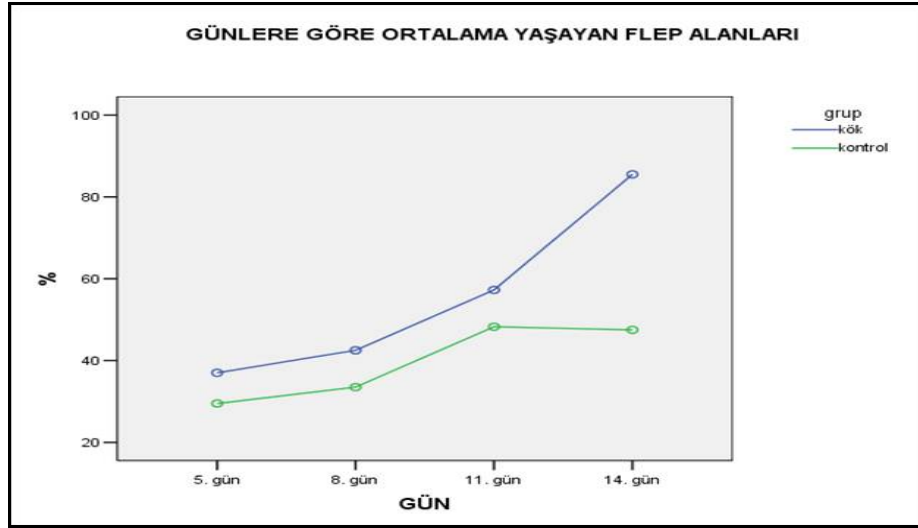
## 4.6 İSTATİSTİK

Verilerin normal dağılımını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Tüm deneklerin yaşayan flep alanları, yaşayan flep yüzdesi, kapiller dansite, sintigrafi bakımından istatistiksel değerlendirme yapıldı.

Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS v.13 istatistik programı ile yapıldı.

Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin yanı sıra gruplar arası ve günlere göre değişimin değerlendirilmesinde “univariate varyans analizi” testleri kullanıldı,  $p < 0.05$  değerleri anlamlı kabul edildi.

Flep % yaşayan alanları açısından gruplar ve alt grupların kendi içinde yapılan karşılaştırılmada  $p < 0,001$  olup istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Deney grubunun alt gruplarının kendi aralarındaki karşılaştırılmasında ise post hoc değerlendirme (Tukey testi) kullanılmıştır Post Hoc çoklu karşılaştırma analizine baktığımızda; 5. gün ile 8. gün arasında ortalama % flep yaşayan alanları arasında anlamlı bir fark görülmezken ( $p=0,621$ ), 8. gün ile 11.gün ( $p < 0,005$ ) ve 11.gün ile 14. gün arasında ( $p < 0,009$ ) istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü (Şekil 45).

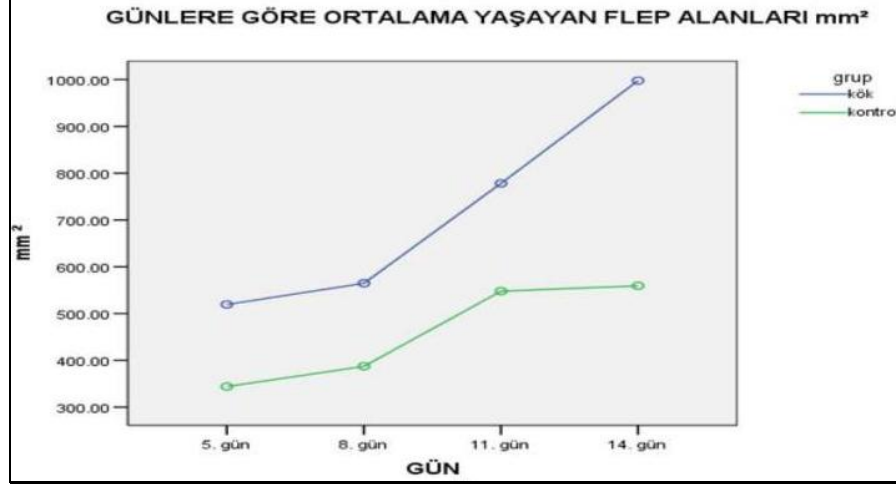


R kare= 0,858; df=3; F=1,786;  $p < 0,001$

Şekil 45: Deney ve kontrol grubunda günlere göre ortalama % yaşayan flep alanlarının grafikte gösterilmesi



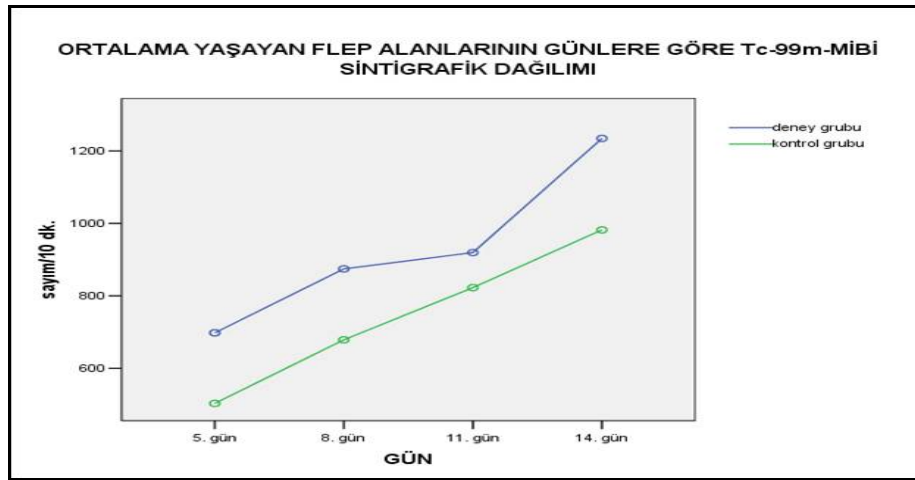
Flep ( $\text{mm}^2$ ) yaşayan alanları açısından gruplar ve alt grupların kendi içinde yapılan karşılaştırılmasında  $p < 0,005$  olup istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 46).



R kare= 0,726; df=3; F=1,586;  $p < 0,005$

Şekil 46: Deney ve kontrol grubunda günlere göre ortalama yaşayan flep alanlarının grafikte gösterilmesi

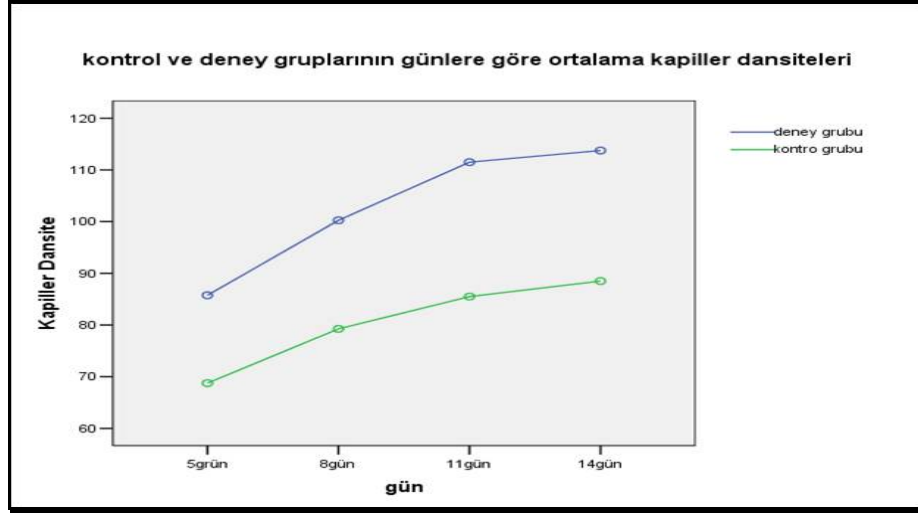
Sintigrafik açıdan gruplar arasında ve alt grupların kendi arasında yapılan istatistiksel değerlendirmesinde  $p < 0,010$  anlamlı bulunmuştur. Grup zaman ilişkisine bakıldığında ise  $p = 0,870$  olup istatistiksel farklılık gözlenmemiştir (Şekil 47).



R kare= 0,618; df=3; F=10,116;  $p < 0,010$

Şekil 47: Deney ve kontrol grubunda sintigrafik açıdan yaşayan flep alanlarının günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi

Histopatolojik açıdan gruplar arasında ve alt grupların kendi arasında yapılan istatistiksel değerlendirmesinde  $p < 0,001$  anlamlı bulunmuştur. Grup zaman ilişkisine bakıldığında ise  $p = 0,783$  olup istatistiksel farklılık gözlenmemiştir (Şekil 48).



R kare=0,747; df=3; F=0,358; p=0,783

Şekil 48: Deney ve kontrol grubunda kapiller dansitelerin günlere göre dağılımının grafikte gösterilmesi

## 5. TARTIŞMA

İnterpolasyon cilt flepleri plastik ve rekonstrüktif cerrahide travma, konjenital defektler, tümör eksizyonu sonrası gibi nedenlerle oluşan ve komşu dokuların rekonstrüksiyon için kullanımlarının uygun olmadığı geniş ve derin defektlerin kapatılması için sıklıkla kullanılırlar. Bu fleplerin kendi kan dolaşimleri olduğu için ekspoze kemik ya da kartilaj ile uygun şekilde adapte edildiğinde tam kat defektlerin üzerinde yaşamaları beklenir. İnterpolasyon fleplerinin uygulanması için iki aşama gerekmektedir. Birinci aşama flebin kendi vasküler pedikülü üzerinden defekte taşınması, ikinci aşama da flep alıcı yataktan inoskülasyon ve neovaskülarizasyon aracılığı ile kendi proksimal pedikülünden bağımsız beslenmeye başlayınca proksimal pedikülün ayrılması aşamalarıdır.<sup>1</sup> Ancak iki aşamalı bir süreç olması nedeniyle hasta postoperatif dönemden flep ayrılmasına kadar geçen süre içerisinde ağrı, eklem donukluğu, fonksiyon kayıpları, infeksiyon gibi morbiditelere maruz kalabilir. Bu durum hem hasta hem de cerrah açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır.

Kullanımı nerdeyse 3500 yıl öncesine dayanan interpolasyon flepleri günümüzde mikrocerrahinin mümkün olmadığı ya da riskli olduğu durumlarda halen güvenli olarak kullanılabilen bir flep seçeneğidir.<sup>2,14,70,71</sup> Rekonstrüksiyon amacıyla yapılacak bir ameliyat ve bunun sonuçlarının da hem hastayı hem hekimi tatmin etmesi gerekli olduğundan, birçok yazarın ifade ettiği gibi postoperatif dönemden flep ayrılmasına kadar geçen sürenin uzunluğunun sonuçları olumsuz etkilemesi, bu konunun ameliyat öncesinde üzerinde önemle durulması gerekmektedir.

1891 yılında George Frederick Shradıy'ın ilk kez tanımladığı ve koldan kaldırıp kontralateral işaret parmağına taşıdığı "jump" flepler veya "waltzed" flepler cerrahi tekniğin nispeten kolay olması, gerektiğinde lokal anestezi altında yapılabilmesi, zengin bir kan dolaşımına sahip olması, bölgeye göre renk ve doku uyumunun iyi olması gibi avantajları olmasına rağmen, aşamalı transferlerin uzun sürmesi en önemli dezavantajdır. Her transferde vaskülarizasyonun tamamlanması

için 2-3 hafta beklemek gerektiği düşünüldüğünde, total sürecin aylar sürmesi muhtemeldir. Diğer bir dezavantaj ise kaçınılmaz olan uzun süreli immobilizasyonun neden olduğu eklem donukluğudur. Genç hastalarda bu pedikül ayrılması sonrasında nispeten düzelme görülse de, özellikle yaşlı hasta grubunda eklemlerdeki limitasyonlar kalıcı olabilmektedir. Bu fleplerle ilgili diğer bir sorun ise, uzak bir bölgeye aşamalı olarak uç-uca transferi söz konusu olduğundan, bu aşamalar süresince flebin tamamının yaşatılması gerekliliğidir.<sup>72</sup> Biz çalışmamızda bu süreyi kısaltabilmek ve interpolasyon flebinin bu süre zarfında alıcı yataktan ne kadarının besleneceğini saptamak amacıyla neovaskülarizasyonu hızlandıracak kök hücre uyguladık.

Neovaskülarizasyon, birçok plastik cerrahi girişimin başarısında oldukça önemli bir rol oynamaktadır. İnterpolasyon fleplerinin pediküllerinin ayrılması da alıcı yataktan gelişecek olan neovaskülarizasyona bağlıdır.<sup>19,21</sup> Neovaskülarizasyon karmaşık ve geniş bir anjiogenik faktör yelpazesi ile düzenlenen bir süreçtir.<sup>73</sup> Bu anjiogenik faktörlerin çoğunun neovaskülarizasyonu in vitro ve in vivo stimüle ettiği tanımlanmış ve gösterilmiştir.<sup>74,75</sup>

Klinikte aşamalı flep transferlerinde, yeterli neovaskülarizasyonun oluşması için pedikül ayrılmasından önce en azından 10–14 gün beklenmesi önerilir. Sıklıkla sıkıntılı pozisyonlarda immobilizasyonun zorunlu olduğu bu süre nedeniyle bu yöntemlerin rekonstrüksiyon seçeneği olarak itibardan düşmesine neden olmuştur. Ancak, egsojen olarak anjiogenik faktörlerin verilmesi neovaskülarizasyon prosesini hızlandırıp aşamalı rekonstrüksiyon serbest doku aktarımına önemli bir alternatif olabilir.

Çalışmadaki gruplar oluşturulurken pedikülün en erken kaçınıcı gün ayrılabilmesinin ve alıcı yataktan flebimizin bu süre içerisinde ne kadarının beslenebileceğinin tespiti amaçlanmış ve ortaya iki ana grup ve dörder alt grupluk bir çalışma protokolü çıkarılmıştır. Deney grupları ile hasta gruplarını eşleştirerek incelemek gerekirse;

“K1” : YD-MKH uygulanan, pedikülü 5. gün ayrılan grup.

“K2” : YD-MKH uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan grup.

“K3” : YD-MKH uygulanan, pedikülü 11. gün ayrılan grup.

- “K4” : YD-MKH uygulanan, pedikülü 14. gün ayrılan grup.
- “L1” : Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 5. gün ayrılan grup.
- “L2” : Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan grup.
- “L3” : Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan grup.
- “L4” : Medium solüsyonu uygulanan, pedikülü 8. gün ayrılan grup.

Denek sayıları belirlenirken literatürde daha önce flep pedikül ayrılması ile ilgili yapılmış çalışmalara uygunluk ve anestezi ile cerrahinin etkisi de göz önüne alınarak çalışma sonunda elde bulunan denek sayılarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinin sağlıklı yapılabilmesi için her grup on altı denekten oluşturulmuştur. <sup>2,33, 30</sup>

Çalışma süresi toplam dört hafta ve toplam otuz iki sıçanla çalışıldığından, hayvanların barındırıldığı kafeslerin üzerine hangi grup olduğu yazılmasına rağmen, tüm deney süresince gerek pedikül ayrılması gerek enjeksiyonlar sırasında ve gerekse kafes temizliği yapılırken grupların birbirine karışmaması için her gruptaki deneklerin kuyruklarına denek adı verilerek işaretlenmiştir.

Çalışmamızda retlere kök hücre uygulama seçeneklerini araştırırken literatürde kabul görmüş, efektif olan yöntemleri kullandık. Dolayısıyla hem flep distaline hem neovaskülarizasyonun gelişeceği flep alıcı yatağına kök hücre uygulandı. <sup>8,60,62</sup>

Aşamalı flep transferinde, flep alıcı yatak birleşim yerinde, alıcı yatakta yeni damarların oluşması ve flep tabanı ile mikro anastomozlar yapması flep matürasyonunda en önemli rolü oynamaktadır. Bugüne kadar interpolasyon flep yaşayabilirliğini arttırmaya ve erken pedikül ayrılmasına yönelik birçok girişim denenmiştir. Üzerinde en çok yoğunlaşılan girişim ise band turnike ve çok çeşitli klempleme araçlarından faydalanılarak yapılan flebin iskemik önkoşullanması olmuştur. <sup>14,34,35,76,77</sup> Ancak bunların çoğunun klinik çalışmalar olduğu bilinmektedir. Edward A. Ve arkadaşları <sup>3</sup> yaptığı klinik çalışmada pedikülü lokal anestezi altında her gün bir kısmını keserek aşamalı olarak ayırmayı amaçlamışlar ancak enfeksiyon ya da hematoma gibi komplikasyonlar oluşabileceğini ve bunun da pedikül ayrılmasını 4–6 hafta kadar geciktireceğini belirtmişlerdir. Park ve arkadaşlarının

yaptığı bir klinik çalışmada, interpolasyon fleplerinde yaratılan iskeminin anjiyogenezi stimüle ederek daha iskemik olan distal pediküllerin viabilitesini %26 oranında arttırdığı, belirtilmiş. Yine Stark ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmada yeni damarlanmanın flebin en hipoksik olduğu distal kısmında başladığını ve proksimale doğru ilerlediğini ifade etmektedir.<sup>6,5</sup>

Gatti sıçanlarda yaptığı deneysel çalışmada klempleme tekniği ile neovaskülarizasyonu ve pedikül ayrılmasının zamanını değerlendirmiş; alıcı yataktan flebe neovaskülarizasyonun ilk birkaç gün içerisinde başladığını, postoperatif 4. günden sonra pedikülün güvenle ayrılabilirliğini belirtmiştir. Yine klinik olarak beş hastada ( dördü çapraz bacak, biri kasık flebi) aralıklı klempleme yöntemi ile flepleri dördüncü gün başarılı bir şekilde ayırmıştır.<sup>33</sup> 1933'de German ve arkadaşları köpeklerde yaptıkları çalışmada interpolasyon fleplerinin postoperatif yedinci gün ayırmayı başarmışlardır.

Yapılan çalışmalar içinde belki de en ilginç olanı Klingenstrom ve Nylen'in<sup>32</sup> 1966'da kendilerinde yaptıkları interpolasyon fleplerini postoperatif yedinci günde başarılı olarak pedikülü ayırdıkları çalışmadır. Bu tecrübe ile tüm flepleri yedi ila 14. gün arasında rutin olarak ayırmaya başlamışlardır. Yapılan deneysel çalışmalar flebin distal kısmının nerdeyse çok kısa sürede damar rekanülizasyonunun başladığını göstermiştir. Bir çalışmaya göre sıçanda alıcı yatak ile flep arasındaki vasküler kanalların ikinci gün oluşmaya başlayabileceği ifade edilmiştir.<sup>78</sup> Ayrıca insanda da alıcı yatak ile flep arasında yedinci gün itibariyle oluşan vasküler devamlılığın flep pedikülünün ayrıldıktan sonra yaşayabilmesi için yeterli olduğunu gösteren çalışmalar vardır.<sup>79</sup> Bizim çalışmamızda ise, distal pedikülün kontrol grubunda 11. gün, deney grubunda ise 9. gün itibariyle güvenle ayrılabilirliği saptandı. Richards ve arkadaşları<sup>2</sup> sıçanda yaptıkları deneysel çalışmada hiperbarik oksijen tedavisi uygulanan interpolasyon fleplerinde pedikül ayrılması öncesinde anjiyogenezin uyarıldığını böylece pedikül ayrılması sonrasında flebin iskemiye olan toleransının arttığını göstermiştir.

Günümüze kadar, flep vaskülaritesini bozan iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı veya direkt vaskülarizasyonu artırıcı yönde birçok çalışma yapılmıştır.<sup>30 80,62</sup> Yapılan deneysel çalışmalarda Tromboksan inhibitörleri, vazodilatatörler, serbest

radikal temizleyicileri, Transforme edici Büyüme Faktörü (TGF), basık fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktör cDNA sının flep distalinde perfüzyonu iyileştirdiği ve nekrozu önlediği gösterilmiştir.<sup>81,27,28,29,30</sup> Khouri ve arkadaşlarının<sup>7</sup> sıçanlarda yaptıkları deneysel çalışmada, anjiogenik madde olarak fleplere bFGF verip flouometri ile dört gün boyunca takip ettiklerinde bFGF verilen grupta kontrol grubuna göre flep yaşayan alanında %12,8 oranında bir artış sağlandığını göstermişlerdir.

Kök hücrelerinin farklı hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı, bu hücreleri doku rejenerasyonunda kullanmak yönünde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğunda kök hücrelerin özellikle iskemik myokard dokusu ve iskelet kasında yaptığı rejenerasyon araştırılmış ve klinik uygulamada büyük önem kazanmıştır.<sup>56,82,83,59,84</sup> Kök hücre ve flep canlılığı incelendiğinde; kök hücrelerin flep yasayabilirliğini artırdığına yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Deneysel çalışmalar yağ kaynaklı kök hücrelerin vaskülogenezi arttırdığı ve bu tedavinin klinik kullanım potansiyeli olduğunu vurgulamıştır.

Zhang ve arkadaşlarının<sup>85</sup> sıçanlarda yaptıkları çalışmada, tüp flep modelinde VEGF kullanmışlar ve flep ile alıcı yatak arasındaki vaskülarizasyonu arttırdığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan VEGF'nin kısa yarı ömrü ve potansiyel yan etkileri nedeni ile klinik kullanımı zordur. Ayrıca, seçilen flep modeli vaskülarizasyonu değerlendirmek açısından yetersizdir. Bizim kullandığımız interpolasyon flep modelinde YD-MKH uygulaması sonucu, alıcı yatakta oluşan yeni damarlar ile flep arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Ayrıca hangi boy-genişlikteki flebin bu oluşan yeni damarlar tarafından beslenebileceği değerlendirilmiştir.

Bugüne kadar mezenkimal kök hücre kaynağı olarak çoğunlukla kemik iliği kullanılmış ancak son çalışmalara bakıldığında yeni kaynaklar tanımlanmıştır. Zuk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada adipoz dokunun mezenkimal hücrelerden oldukça zengin olduğu gösterilmiş ve kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere göre izolasyonlarının daha az acı verici olmaları, lipoaspirasyon yöntemi ile kolayca ve bol miktarda elde edilebilmeleri nedeniyle son yıllarda kök hücre kaynağı olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Ayrıca adipoz dokunun santimetre kemik iliğine

göre küp başına 100 ila 1000 kat daha fazla pluripotent hücre içerdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>66,67</sup>

Yaptığımız çalışmada YD-MKH verilen “K” grupla kontrol grubu “L” arasında flep yaşayan alanları arasında anlamlı farklar olduğu gözlenmiştir. “K” grubunda ortalama flep yaşayan alanı %56 iken “L” grubunda %40 bulunmuştur. Flebe YD-MKH uygulamak, ortalama flep yaşayan alanında %16 oranında artışa neden olmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunun muhtemel nedenleri:

1. Bu hücreler tarafından sentezlenen büyüme faktörlerinin direkt vazodilatasyon yaparak flep dolaşımı üzerine olumlu etkileri, 2. Büyüme faktörlerinin anjiyogenik etkiyle yeni damar oluşumunu artırmaları, 3. Endotelial öncü hücrelerin direkt olarak yeni damar oluşumuna neden olmalarıdır.

Neovaskülarizasyonla ilgili mekanizmalara baktığımızda; Vaskülojen ve anjiyogen olmak üzere iki mekanizma görmektediriz. Vaskülojen endotel öncü hücrelerin (progenitör) vaskülarizasyon alanına göçü, endotelial hücrelere farklılaşması ve böylece yeni kan damarı oluşturmaları mekanizmasıdır. Anjiyogen; mevcut olan kan damarlarından yeni kapillerlerin oluşumudur.

Bizim çalışmamızda da flepte YD-MKH enjeksiyonu yapılan bölgelerdeki artmış kapiller dansite çıplak gözle görülebilir düzeyde olup histopatolojik değerlendirmelerde de ayrıca ispatlandı. Bu artmış kapiller dansitenin flep yaşayabilirliğini direkt olarak etkilediği düşünülebilir.

Bu kapillerlerin önceden var olan kapillerler mi yoksa anjiyogen ve vaskülojen mekanizmalarıyla yeni oluşmuş kapillerler olup olmadıklarını netleştirmek gerektiğini düşündük. Deneyde, YD-MKH’lerin tespiti için hücreler GFP ile işaretlendi ve alınan histopatolojik kesitler floresan mikroskopta incelendiğinde deney grubundaki endotelial örneklerinin GFP pozitif oldukları tespit edildi. Böylece bu endotelial hücrelerin egsojen olarak transplante ettiğimiz YD-MKH’lerinden geliştiği sonucuna vardık.

Rehman’ın yaptığı<sup>86</sup> deneyde YD-MKH’lerin iskemik alanlarda VEGF gibi neovaskülarizasyon prosesini başlatan ve kapiller dansiteyi arttıran anjiyogenik



büyüme faktörlerinin üretimini uyardığı gösterilmiş olup bizim çalışmamızda da aynı etki ile bunu yaptığını düşündük.

Literatürdeki çalışmalarda intravenöz uygulanmış endotelial progenitör hücrelerin iskemik dokularda neovaskülarizasyon sürecine katıldığı gösterilmiştir.<sup>56</sup> Folkman'ın yaptığı çalışmada belirtildiği üzere lokal uygulamanın infüzyona göre bazı avantajları vardır. Birincisi; hedef dokudaki YD-MKH'lerin lokal dansitesi artırılabilir, ikincisi ise hücrelerin sistemik yan etkilerinden (anjiogenik hastalıklardan kanser, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi hastalıkların<sup>87</sup> ortaya çıkmasını kolaylaştırıcı etkilerinden) korunmuş olur. Biz de çalışmamızda bu nedenlerden dolayı lokal enjeksiyon yöntemini kullandık.

Sonuç olarak, interpolasyon fleplerinde neovaskülarizasyonun hızlandırılması amacıyla mezenkimal kök hücre uygulanmasının, güvenli ve kolay bir yöntem olarak klinik uygulamaya girebileceği düşünülmektedir. Bu yöntemle, interpolasyon fleplerinin daha erken ayrılabilmesi sağlanarak hastaların maruz kaldığı morbiditeler ve hastanede yatış sürelerinin kısılması ile sosyal ve ekonomik yönden olumlu sonuçlara yol açacağına inanmaktayız.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada interpolasyon cilt flebinin yaşayabilirliğinin artırılması ve flep pedikülünün ayrılma süresinin kısaltılması amacıyla yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulamasının etkinliği araştırıldı. Pedikülü erken ayırmaya yönelik bugüne kadar birçok yöntem ve anjiogenik potansiyeli olan madde denenmiş ve olumlu etkileri saptanmakla birlikte pratik uygulama alanı bulanların sayısı çok az olmuştur. Çalışmamızda bu maddeler arasında mezenkimal kök hücrenin seçilmesi ise günümüzde birçok hastalıkta da tedavide kullanılıyor olması, yan etkilerinin çok az olması ve etkinliğinin yüksek olması sebepleri ile rahatlıkla pratikte kullanım kolaylığı nedeniyledir.

Çalışma sonunda; Plastik ve Rekonstrüktif cerrahide oldukça sık kullanılan interpolasyon fleplerinin neovaskülarizasyonunu hızlandırmada ve pedikül ayırma süresini kısaltmada adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre enjeksiyonunun faydalı olduğu tespit edildi.

Klinikte uygulamada da postoperatif dönemden flep ayrılmasına kadar geçen süre içerisinde hastaların maruz kaldığı ağrı, eklem donukluğu, fonksiyon kayıpları gibi morbiditelerin ve hastanede kalış süresinin kök hücre tedavisi ile azaltılabileceği dolayısıyla flep canlılığına olumlu katkısı olabileceği gösterilmiştir.

## 7. ÖZET

### İTERPOLASYON FLEPLERİNDE NEOVASKÜLARİZASYONU HIZLANDIRMAK İÇİN RAT ADİPOZ DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KULLANILMASI

**AMAÇ:** Plastik cerrahide geniş ve derin defektlerin kapatılması için interpolasyon cilt flepleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat fleplerin pedikül ayrılması için 2–3 hafta beklenmesi hala ciddi bir problem olup tedavi ve hastanede kalma süresini ve dolayısıyla hastane masraflarını artırmaktadır. Bu sorunu çözmek amacıyla, kök hücrelerin anjiogenik potansiyelinden yola çıkarak bunların selektif olarak neovaskülarizasyonu hızlandırıp interpolasyon cilt fleplerinin viabilitesini arttırması ve erken dönemde pedikül ayrılmasını amaçladık.

**YÖNTEM-GEREÇLER:** Planladığımız çalışmada gruplar oluşturulurken pedikülün en erken kaçınıcı gün ayrılabilceğinin ve alıcı yataktan flebimizin bu süre içersinde ne kadarının beslenebileceğinin tespiti amaçlanmış ve ortaya iki ana grup ve dörder alt grupluk bir çalışma protokolü çıkarılmıştır. Her sıçanın sırtından 1 adet 6x5 cm boyutlarında, derinin tüm katmanlarını ve pannikulus karnozusu da içeren flep, dorsal santral arter ve ven tabanlı olarak kaldırıldı. Deney grubuna (n=16) ait her flebe green fluorescent protein (GFP) işaretli  $3 \times 10^6$  yağ doku kökenli mezenkimal kök hücre (YD-MKH) içeren toplam 1ml'lik süspansiyon; flep distaline cilt altı planda 2 noktada; alıcı yatakta ve yara kenarlarına 4 noktada diffüz olarak enjekte edildi. Kontrol grubunda (n=16) ise deney grubundaki aynı enjeksiyon bölgelerine sadece medium solüsyonu enjekte edildi.

Flebin kaldırıldığı alanın distal kısmında 3x5 cm boyutlarındaki bölge dışındaki alan primer kapatıldı. Flep, açık bırakılan bu alana adapte edildi. Postoperatif 5, 8, 11 ve 14. günlerde her gruptan 4 adet sıçanın proksimal pedikülü ayrıldı. Pedikülü ayrılan her flep 7 gün boyunca takip edildi.

Her flebin belirtilen günlerde (5, 8, 11, 14) ayrıldıktan 7 gün sonra fotoğrafları çekildi. Fotoğraflar Adobe Acrobat 9 Pro Version 9.0.0 (Adobe Systems) programında flep yasayabilir alanı milimetrik olarak ölçülerek gruplar karşılaştırıldı.

Flep belirtilen günlerde (5, 8, 11, 14) ayrıldıktan 7 gün sonra, penil venlerinden 250 µCi Tc-99m (MIBI) enjekte edildi. Enjeksiyondan 2 saat sonra deri flepleri tespit edildiği sınırı da içerecek şekilde dış ortama alındı. Gama kamera altında fleplerden 10 dakikalık statik görüntüler alındı. Tüm gruplardan alınan görüntülerden sayısal değerlendirmeler yapıp sonuçları birbirleriyle istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Alınan flepler histolojik olarak incelenerek, yeni oluşan damarlar sayısal olarak karşılaştırıldı. Neovaskülarizasyon ayrıca mikroanjiyografik yöntemle de değerlendirildi. Radyografik görüntüler mamografi cihazı ile alındı ve kantitatif olarak değerlendirildi.

**BULGULAR:** İstatistik sonuçlar değerlendirildiğinde, kök hücre tedavisi gören grubun flep yaşayan alanlarında kontrol grubuna oranla anlamlı derecede artma olduğu görüldü. Sintigrafik incelemelere baktığımızda kök hücre uygulaması yapılan grupta kontrol grubuna göre radyoaktif madde tutulumunun anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi. Sintigrafik sonucun flep yaşayan alan yüzdesi ile körele olduğu görüldü. Histopatolojik incelemede kök hücre grubundaki kapiller dansite kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Ayrıca, deneyde adipoz doku kökenli kök hücreleri işaretlemek için GFP kullanıldı. Yapılan immunoflouresans boyamalar sonucunda, kontrol hayvanlarının endotelial örneklerinde GFP (+) hücre izlenmezken, deney grubu hayvanlarının tümünde GFP (+) hücreler izlendi. Kontrol grubu ve deney grubu mikroanjiyografik görüntüleri karşılaştırıldığında deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde vaskülarite artışı saptandı.

**TARTIŞMA:** Mevcut çalışmada; interpolasyon fleplerinin neovaskülarizasyonunu hızlandırmada ve pedikül ayırma süresini kısaltmada adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre enjeksiyonunun faydalı olduğu tespit edildi. Uygun doz ve süre mezenkimal kök hücre tedavisi ile interpolasyon cilt fleplerinin morbiditelerinin en aza indirilmesi mümkün görünmektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** İnterpolasyon flebi, kök hücre, neovaskülarizasyon

## 8. ABSTRACT

### USE OF RAT ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL TO ACCELERATE THE NEOVASCULARIZATION OF INTERPOLATION FLAP IN A RAT MODEL

**PURPOSE:** Interpolation flaps are widely used in Plastic surgery for reconstruction of large or deep defects. However waiting 2–3 weeks for the pedicle division is still a challenging problem that increases the cost of treatment and the duration of hospital stay. In order to solve this problem, based on angiogenic potential of stem cells accelerating neovascularization and improving flap survival of interpolation flaps, our aim was to divide the pedicle earlier.

**MATERIALS AND METHOD:** Our study groups was designed to determine the most appropriate time for division of an interpolation flap, the minimal amount of time necessary for the development of new vascular channels between the recipient bed and our flap and to assess the surviving area of flap in this period of time. We studied in two main groups and four subgroups of rats. Each animal underwent creation of identical cranially based skin flaps measuring 6x5 cm. The flap included full-thickness skin, including the panniculus carnosus, and was based on the dorsal central artery and vein. Under each flap of the experimental group (n=16) green fluorescent protein (GFP) labeled adipose derived stem cells which were suspended in medium at a concentration of  $3 \times 10^6$  cells in 1 cc, was injected into the flap's distal portion at two points; into the subcutaneous fascial layer of the recipient bed and into the wound margins at four points via a 25 G needle. In the control group (n=16), we injected 1 cc of medium solution into both the flap's distal portion, into subcutaneous fascial layer of the recipient bed and into the wound margins in the same fashion.

The distal 3x5 cm part of the flap sutured back to the recipient bed and the proximal 3x5 cm part under flap closed primary to separate the flap and avoid neovascularization from recipient bed. At a postoperative interval of 5, 8, 11 and 14

days, each proximal pedicle of four rats from each group was divided. At 7 days after the operation, flap survival was measured by millimetric analysis.

After 7 days, depending upon the time (5, 8, 11, 14) of division of the pedicles, each flap was photographed by a camera and scanned onto a computer. The survival area of each flap was measured by millimetric analysis, calculated by the Adobe Acrobat 9 Pro Version 9.0.0 (Adobe Systems) program and groups were compared.

After 7 days, depending upon the time (5, 8, 11, 14) of division of the pedicles, 250  $\mu\text{Ci}$  Tc-99m (MIBI) was injected through the penil vein with a 27-gauge needle. Two-hours after of the injection, under gamma camera 10-minute static images were taken. Total activity count of each flap was compared with percentage of the viable flap area of the same flap. Quantitative assessments were made from images taken from all groups. The results were statistically compared with each other. Skin biopsies taken from flaps were examined histologically and the number of new capillaries compared with each other. Additionally, neovascularization were evaluated using microangiography. Radiographic images were taken on a mammography film and evaluated quantitatively.

**RESULTS:** According to statistical evaluation, stem cell-treated group showed a significant increase in flap viability compared to the control group. The ratio of the scintigraphic activity obtained by flaps at stem cell group were found to be significantly higher than the control group. A significant correlation was seen between the scintigraphic activity count of the flaps and the percentage of viable flap surface area . There were obvious differences in the capillary density in between the groups. The capillary density in the flap tissue was clearly increased in stem cell-treated group, when compared with the control group. However in the experiment, we used GFP to label the adipose-derived stem cells. Immunoflouresans staining revealed that all endothelium samples in experimental group were GFP (+) (all of those in the control group were negative), indicating that these endothelial cells were differentiated from the administered adipose-derived stem cells. Microangiographic view of the flaps when compared, stem cell-treated group showed a significant increase in flap vascularity compared to the control group.

**DISCUSSION:** In this study; adipose tissue-derived mesenchymal stem cell administration were found to be useful in accelerating the neovascularization and shortening the pedicle division time of interpolation flaps. It seems that with an appropriate mesenchymal stem cell dosage and treatment period, it will be possible to reduce the morbidities of interpolation skin flaps.

**KEY WORDS:** Interpolation flap, stem cell, neovascularization

## 9. KAYNAKLAR

1. Mellette JR, Ho DQ. Interpolation flaps. *Dermatol Clin* 2005; **23(1)**:87–112, vi.
2. Richards L, Lineaweaver WC, Stile F, Zhang J, Zhang F. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the tubed pedicle flap survival in a rat model. *Ann Plast Surg* 2003; **50(1)**:51-6.
3. Kitlowski EA. A simple method for gradual occlusion of circulation in tubed pedicle flaps. *Plast Reconstr Surg* (1946) 1954; **13(3)**:162-6.
4. Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, Zienowicz RJ. Chemical delay: an alternative to surgical delay experimental study. *Ann Plast Surg* 2002; **49(1)**:73–80; discussion 82–1.
5. Stark GB, Hong C, Futrell JW. Enhanced neovascularization of rat tubed pedicle flaps with low perfusion of the wound margin. *Plast Reconstr Surg* 1987; **80(6)**:814–24.
6. Park SS, Rodeheaver GT, Levine PA. Role of ischemic gradient in neovascularization of interpolated skin flaps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; **122(8)**:886-9.
7. 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. *Br J Plast Surg* 1991; **44(8)**:585–8.
8. 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.
9. Wallace AF. The early development of pedicle flaps. *J R Soc Med* 1978; **71(11)**:834–8.
10. Mathes SJ, Hansen SL, Flap Classification and Applications, Mathes SJ: Plastic Surgery, Philadelphia: Saunders, 2006: 365–482.
11. Taylor GI, Ives A, Dhar S, Vascular Territories. Mathes SJ: Plastic Surgery, Philadelphia: Saunders, 2006: 317–64.
12. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *Br J Plast Surg*



- 1973; **26(3)**:202–13.
13. Nakajima H, Fujino T, Adachi S. A new concept of vascular supply to the skin and classification of skin flaps according to their vascularization. *Ann Plast Surg* 1986; **16(1)**:1–19.
  14. Cheng MH, Chen HC, Wei FC, See LC, Lee HY, Wang CJ. Combined ischemic preconditioning and laser Doppler measurement for early division of pedicled groin flap. *J Trauma* 1999; **47(1)**:89–95.
  15. Menick FJ. Aesthetic refinements in use of forehead for nasal reconstruction: the paramedian forehead flap. *Clin Plast Surg* 1990; **17(4)**:607–22.
  16. Lewin ML. Formation of the helix with a postauricular flap. *Plast Reconstr Surg* (1946) 1950; **5(5)**:432–40.
  17. Alagoz MS, Isken T, Sen C, Onyedi M, Izmirli H, Yucel E. Three-dimensional nasal reconstruction using a prefabricated forehead flap: case report. *Aesthetic Plast Surg* 2008; **32(1)**:166–71.
  18. Vedder NB, Flap Physiology, Mathes SJ: Plastic Surgery, Philadelphia: Saunders, 2006: 483–506.
  19. Tsur H, Daniller A, Strauch B. Neovascularization of skin flaps: route and timing. *Plast Reconstr Surg* 1980; **66(1)**:85–90.
  20. Myers MB, Cherry G. Augmentation of survival in pedicle skin flaps by the chemical production of ischemia. *Surg Forum* 1971; **22**:485–6.
  21. Young CM. The revascularization of pedicle skin flaps in pigs: a functional and morphologic study. *Plast Reconstr Surg* 1982; **70(4)**:455–64.
  22. Kerrigan CL, Daniel RK. Monitoring acute skin-flap failure. *Plast Reconstr Surg* 1983; **71(4)**:519–24.
  23. Kerrigan CL, Zelt RG, Daniel RK. Secondary critical ischemia time of experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1984; **74(4)**:522–6.
  24. Nathanson SE, Jackson RT. Blood flow measurements in skin flaps. *Arch Otolaryngol* 1975; **101(6)**:354–7.
  25. Fujihara Y, Koyama H, Nishiyama N, Eguchi T, Takato T. Gene transfer of bFGF to recipient bed improves survival of ischemic skin flap. *Br J Plast Surg* 2005; **58(4)**:511–7.
  26. Stins MF, Shen Y, Huang SH, Gilles F, Kalra VK, Kim KS. Gp120 activates

- children's brain endothelial cells via CD4. *J Neurovirol* 2001; **7(2)**:125–34.
27. Neumeister MW, Song YH, Mowlavi A, Suchy H, Mathur A. Effects of liposome-mediated gene transfer of VEGF in ischemic rat gracilis muscle. *Microsurgery* 2001; **21(2)**:58–62.
28. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX *et al.* Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1998; **102(6)**:2033–9.
29. Wong MS, Erdmann D, Sweis R *et al.* Basic fibroblast growth factor expression following surgical delay of rat transverse rectus abdominis myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 2004; **113(7)**:2030–6.
30. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E *et al.* Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg* 2001; **46(3)**:314–9.
31. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; **9(6)**:702–12.
32. Klingenstrom P, Nylen B. Timing of transfer of tubed pedicles and cross-flaps. *Plast Reconstr Surg* 1966; **37(1)**:1–12.
33. Gatti JE, LaRossa D, Brousseau DA, Silverman DG. Assessment of neovascularization and timing of flap division. *Plast Reconstr Surg* 1984; **73(3)**:396–402.
34. Furnas DW, Lamb RC, Achauer BM, Turpin IM, Black KS. A pair of five-day flaps: early division of distant pedicles after serial cross-clamping and observation with oximetry and fluorometry. *Ann Plast Surg* 1985; **15(3)**:262–7.
35. George A, Cunha-Gomes D, Thatte RL. Early division of pedicled flaps using a simple device: a new technique. *Br J Plast Surg* 1996; **49(2)**:119–22.
36. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97(20)**:10972–7.
37. Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; **290(2)**:L209–21.

38. Shida A, Fujioka S, Ishibashi Y *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in gastric carcinoma. *World J Surg* 2005; **29(12)**:1600–7.
39. Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J Biol Chem* 2002; **277(26)**:23747–54.
40. Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, Kitajewski J. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98(10)**:5643–8.
41. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001; 2001(**112**):re21.
42. Chae JK, Kim I, Lim ST *et al.* Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20(12)**:2573–8.
43. Ganju RK, Munshi N, Nair BC, Liu ZY, Gill P, Groopman JE. Human immunodeficiency virus tat modulates the Flk-1/KDR receptor, mitogen-activated protein kinases, and components of focal adhesion in Kaposi's sarcoma cells. *J Virol* 1998; **72(7)**:6131–7.
44. Rusnati M, Urbinati C, Musulin B *et al.* Activation of endothelial cell mitogen activated protein kinase ERK(1/2) by extracellular HIV-1 Tat protein. *Endothelium* 2001; **8(1)**:65–74.
45. Koistinen P, Siitonen T, Mantymaa P *et al.* Regulation of the acute myeloid leukemia cell line OCI/AML-2 by endothelial nitric oxide synthase under the control of a vascular endothelial growth factor signaling system. *Leukemia* 2001; **15(9)**:1433–41.
46. Karaöz E, Ovalı E, *Kök Hücreler*, Trabzon: Derya Kitabevi, 2004.
47. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 1956; **177(4506)**:452–4.
48. Sale GE, Storb R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 1983; **11(10)**:961–6.

49. Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M. Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Minerva Cardioangiol* 2009; **57(2)**:249–67.
50. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H *et al.* Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 2005; **23(3)**:355–64.
51. Graham-Rowe D. Fetal tissue graft restores lost sight. *New Sci* 2004; **184(2471)**:16–7.
52. Vastag B. Stem cells step closer to the clinic: paralysis partially reversed in rats with ALS-like disease. *JAMA* 2001; **285(13)**:1691–3.
53. Karaoz E, Ayhan S, Gacar G *et al.* Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy* 2010; **12(3)**:288–302.
54. Karaoz E, Okcu A, Saglam O, Genc ZS, Ayhan S, Kasap M. Pancreatic islet derived stem cells can express co-stimulatory molecules of antigen-presenting cells. *Transplant Proc* 2010; **42(9)**:3663–70.
55. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood* 1997; **90(12)**:4665–78.
56. Asahara T, Murohara T, Sullivan A *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275(5302)**:964–7.
57. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H *et al.* Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; **103(5)**:634–7.
58. Heintz-Green A, Radke PW, Munkonge FM *et al.* The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 2005; **26(13)**:1327–32.
59. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* 2005; **90(3)**:315–26.
60. Ichioka S, Kudo S, Shibata M, Ando J, Sekiya N, Nakatsuka T. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg* 2004; **52(4)**:414–8.
61. Zheng Y, Yi C, Xia W *et al.* Mesenchymal stem cells transduced by vascular

- endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 2008; **121(1)**:59–69.
62. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. *Ann Plast Surg* 2005; **54(5)**:546–52.
  63. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg* 2009; **124(3)**:804–15.
  64. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H *et al*. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; **7(2)**:211–28.
  65. Poznanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab Invest* 1973; **29(5)**:570–6.
  66. Strem BM, Hicok KC, Zhu M *et al*. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; **54(3)**:132–41.
  67. Aust L, Devlin B, Foster SJ *et al*. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 2004; **6(1)**:7–14.
  68. Yu Y, Yao AH, Chen N *et al*. Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regeneration. *Mol Ther* 2007; **15(7)**:1382–9.
  69. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol* 2009; **132(5)**:533–46.
  70. Dickinson JC, Roberts AH. Fascio-cutaneous cross-arm flaps in hand reconstruction. *J Hand Surg Br* 1986; **11(3)**:394–8.
  71. Lineaweaver WC, Hui K, Yim K *et al*. The role of the plastic surgeon in the management of surgical infection. *Plast Reconstr Surg* 1999; **103(6)**:1553–60.
  72. McGregor AD, McGregor IA, *Fundamental Techniques of Plastic Surgery: And Their Surgical Applications*, China: Elsevier, 2007.
  73. Folkman J. Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery.

- Perspect Biol Med* 1985; **29(1)**:10–36.
74. Hunt TK. Can repair processes be stimulated by modulators (cell growth factors, angiogenic factors, etc.) without adversely affecting normal processes? *J Trauma* 1984; **24(9 Suppl)**:S39–49.
75. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; **235(4787)**:442–7.
76. Kislov R, Kelly AP Jr. Cross-finger flaps in digital injuries, with notes on Kirschner wire fixation. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* 1960; **25**:312–22.
77. Govila A. Extracorporeal tissue transfer for intra-oral reconstructions. *Br J Plast Surg* 1992; **45(5)**:388–90.
78. Nakajima T. How soon do venous drainage channels develop at the periphery of a free flap? A study in rats. *Br J Plast Surg* 1978; **31(4)**:300–8.
79. Douglas B, Buchholz RR. The blood circulation in pedicle flaps: an accurate test for determining its efficiency. *Ann Surg* 1943; **117(5)**:692–709.
80. Pang CY, Forrest CR, Morris SF. Pharmacological augmentation of skin flap viability: a hypothesis to mimic the surgical delay phenomenon or a wishful thought. *Ann Plast Surg* 1989; **22(4)**:293–306.
81. Huang N, Khan A, Ashrafpour H *et al.* Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; **291(1)**:H127–37.
82. Kawamoto A, Murayama T, Kusano K *et al.* Synergistic effect of bone marrow mobilization and vascular endothelial growth factor-2 gene therapy in myocardial ischemia. *Circulation* 2004; **110(11)**:1398–405.
83. Forrester JS, Price MJ, Makkar RR. Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. *Circulation* 2003; **108(9)**:1139–45.
84. Bush RL, Pevec WC, Ndoeye A, Cheung AT, Sasse J, Pearson DN. Regulation of new blood vessel growth into ischemic skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1998; **28(5)**:919–28.
85. Zhang F, Richards L, Angel MF *et al.* Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. *Br J Plast Surg* 2002; **55(1)**:59–63.

86. Rehman J, Traktuev D, Li J *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; **109(10)**:1292–8.
87. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; **1(1)**:27–31.
88. [http://74.205.62.209/bcdecker/figures/acs/part03\\_ch03\\_fig9.gif](http://74.205.62.209/bcdecker/figures/acs/part03_ch03_fig9.gif)
  
89. <http://129.49.170.167/Volumes/ACSCD+Summer+2008/ACSCD/figures/F320795.gif>
  
90. <http://129.49.170.167/Volumes/ACS+Oct+2010/ACSCD/figures/f03c0307.gif>
  
91. [http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/plastic\\_surgery/1271089-1284474-218.jpg](http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/plastic_surgery/1271089-1284474-218.jpg)
  
92. <http://www.indiana.edu/~liblilly/images/patient.jpg>
  
93. [http://t0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcR5Ungitwo9HD9V2lYkOjG7BEBm0pdl2ktFzkvU9bJyQQsfF7r\\_&t=1](http://t0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcR5Ungitwo9HD9V2lYkOjG7BEBm0pdl2ktFzkvU9bJyQQsfF7r_&t=1)
  
94. [http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRmE50og\\_qTSSYX\\_Cnw2O41pKAiUZgOvWybN-iZCmM3-ZzumBm0&t=1](http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRmE50og_qTSSYX_Cnw2O41pKAiUZgOvWybN-iZCmM3-ZzumBm0&t=1)
  
95. <http://www.sabiosciences.com/>
  
96. Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest* 2005; **115(1)**:5–12.

97. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ *et al.* The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol* 2003; **56**:86–96
98. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001 **19(3)**: 180–92
99. Hawley RG, Sobieski DA. Stem cell bouillabaisse-potpourri. *Stem Cells* 2002 **20**:360–363
100. Fridenshtein A. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Pathol* 1982 **44**:3–11