



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı

ADİPOZ DOKU KÖKENLİ KÖK HÜCRE NAKLİNİN
ABDOMİNOPLASTİ SONRASI TRANSVERS REKTUS ABDOMİNİS
KAS-DERİ (TRAM) FLEBİ YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE
ETKİLERİ: DENEYSEL ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erhan Coşkun

ANKARA, 2015



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı

ADİPOZ DOKU KÖKENLİ KÖK HÜCRE NAKLİNİN
ABDOMİNOPLASTİ SONRASI TRANSVERS REKTUS ABDOMİNİS
KAS-DERİ (TRAM) FLEBİ YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE
ETKİLERİ: DENEYSEL ÇALIŞMA

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erhan Coşkun

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hüseyin Borman

ANKARA, 2015

TEŞEKKÜR

Derin bilgi ve deneyimlerini bizlerden hiçbir zaman esirgemeyen, ahlaki ve insani değerleri, duruşu ve olaylara yaklaşımı ile kendime örnek aldığım, yanında eğitim almaktan gurur duyduğum, tezimin hazırlanmasında sabır ve hoşgörü ile bana her aşamada yardımcı olan, değerli fikirlerini benimle paylaşan, yol gösteren saygıdeğer hocam Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Hüseyin Borman'a;

Değerli bilgilerini ve tecrübelerini bizlere her zaman sabır ile aktarmaya çalışan, çok kıymetli öğütlerini hiçbir zaman unutmayacağım değerli hocam Prof. Dr. Nilgün Markal Ertaş'a;

Sabırlı ve özverili yaklaşımı ile cerrahi eğitimimde çok büyük katkıları olan, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan sayın hocam Doç. Dr. Ahmet Çağrı Uysal'a;

Farklı bakış açısı ve yaklaşımları ile cerrahi eğitimimde çok değerli katkılarından dolayı sayın Yrd. Doç. Dr. Harun Çöloğlu'na;

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte dostluk ve dayanışma içinde çalıştığımız sevgili arkadaşlarım Dr. Burak Özkan, Dr. Atilla Adnan Eyüboğlu, Dr. Azer Zeynalov ve Dr. Abbas Albayati'ye;

Güler yüzü ve çalışkanlığı ile hatırlayacağım, bana her zaman yardımcı olan Plastik Cerrahi Poliklinik hemşiremiz sayın Endercan Zeyrek'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma;

Tezimin histopatolojik incelemelerinde özenli çalışmalarıyla katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Ayşen Terzi'ye; biyokimyasal incelemelerinde katkılarından dolayı Prof. Dr. E. Suna Türkoğlu ve Dr. H. Eda Özturan Özer'e; istatistiksel analizlerinde katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Ayşe Canan Yazıcı ve Dr. Mustafa Agah Tekindal'a;

Tüm öğrenim hayatım boyunca her zaman yanımda olan çok sevgili annem, babam ve abime; hayatımı paylaştığım ve desteğini her zaman hissettiğim canım eşime en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Erhan Coşkun

ÖZET

Adipoz Doku Kökenli Kök Hücre Naklinin Abdominoplasti Sonrası Transvers Rektus Abdominis Kas-Deri (TRAM) Flebi Yaşayabilirliği Üzerine Etkileri: DeneySEL Çalışma

Abdominoplastinin, TRAM flep cilt adası beslenmesini sağlayan perforatör arterleri kalıcı olarak zedelediği bilinmektedir. Bu hasarı azaltmak ve damarlanmayı arttırarak flep yaşayabilirliğini arttırmak adına cerrahi geciktirme yöntemleri, vaskülogenezi tetikleyici büyüme faktörleri, farmakolojik ajanlar ve gen tedavileri denenmiştir. Abdominoplasti sırasında lokal olarak uygulanan adipoz doku kökenli kök hücrelerin daha sonra yapılması olası TRAM flebin yaşayabilirliği üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Çalışmada toplam 7 grup oluşturuldu. Grup 1’de sadece TRAM flep uygulandı. Grup 2, 3 ve 4’te sırası ile abdominoplastiden 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta sonra TRAM flepler hazırlandı. Aynı işlemlerin aynı süreler ile uygulandığı grup 5, 6 ve 7’de ise abdominoplasti sırasında adipoz doku kökenli kök hücre (ADKKH) enjeksiyonları yapıldı. Tüm gruplarda TRAM flepler kaldırılıp yerine dikildikten 7 gün sonra flep canlı alanı hesaplamaları gerçekleştirildi. Her gruptan 1 sıçanın flebinin anjiyografik görüntüleri alındı. Bu aşamada abdominoplasti sırasında kesilen rektus abdominis muskulokutan perforatör arterlerin yeniden oluşup oluşmadığının gösterilmesi ve sayılması işlemi gerçekleştirildi. TRAM flep dokuları histopatolojik inceleme amacı ile alındı. Histopatolojik incelemede; kapiller dansite ve flebin kas komponentinde meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek için fibroz gradient ölçümleri yapıldı. Diİ ile işaretli ADKKH’lerin dokuda takibi için floresan mikroskopta inceleme yapıldı. Abdominoplastilerin yapıldığı gün, TRAM fleplerin kaldırıldığı gün ve hayvanların sakrifiye edildiği günlerde kanda VEGF düzeyleri çalışıldı.

Grup 1’in ortalama canlı flep alanı $\% 82,90 \pm 7,59$ olarak bulundu. Grup 2, grup 3 ve grup 4’ün ortalama canlı flep alanları sırası ile $\% 2,24 \pm 3,71$, $\% 3,31 \pm 3,29$, $\% 9,40 \pm 6,18$ bulundu. Grup 5, grup 6 ve grup 7’nin ortalama canlı flep alanları sırası ile $\% 15,83 \pm 6,41$, $\% 31,92 \pm 9,29$, $\% 64,98 \pm 10,95$ bulundu. Grup 5, 6 ve 7’nin canlı flep alanı yüzdeleri sırası ile grup 2, 3 ve 4’ten anlamlı şekilde yüksek bulundu. Grup 7 canlı flep alanı grup

6'dan, grup 6'nın canlı flep alanı grup 5'ten anlamlı şekilde yüksek bulundu. Abdominoplasti sırasında sayılan, her iki rektus abdominis kasından çıkan muskulokutan perforatör arter sayıları $7,98 \pm 1,10$ adet bulundu. Gruplar yeni oluşan muskulokutan perforatör arterler açısından incelendi. Grup 2 ve grup 3'te hiçbir sıçanda yeni oluşan muskulokutan perforatör gösterilemedi. Grup 4'te $0,29 \pm 0,49$, grup 5'de $0,43 \pm 0,53$, grup 6'da $1,14 \pm 0,69$ ve grup 7'de $2 \pm 0,82$ adet yeni oluşan muskulokutan perforatör arter gösterildi. Tüm gruplarda abdominoplasti sonrası sayılan perforatör arter sayıları, abdominoplasti öncesi sayılan değerlerden anlamlı olarak düşük bulundu. Grup 7'nin abdominoplasti sonrası sayılan perforatör arter sayısı diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek bulundu. Grup 1'de kapiller dansite ortalaması $6,86 \pm 0,50$, grup 2'de $0,36 \pm 0,05$, grup 3'te $0,67 \pm 0,13$, grup 4'te $2,79 \pm 0,53$, grup 5'te $2,46 \pm 0,58$, grup 6'da $3,71 \pm 0,47$, grup 7'de $7,01 \pm 0,70$ olarak bulundu. Grup 5, 6 ve 7'nin kapiller dansite ortalamaları sırası ile grup 2, 3 ve 4'ten anlamlı şekilde yüksek bulundu. Grup 7'nin kapiller dansite ortalaması grup 5'ten anlamlı olarak yüksek bulundu. Fibröz gradient ortalamaları açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Floresan mikroskobu altında yapılan immünohistokimyasal inceleme sonucunda DiI işaretli ADKKH'lerin damar duvarına endotel hücresi olarak katıldığı gösterildi. Grup 5, 6 ve 7'nin bazal VEGF değerleri (0. gün) ile 2. kan değerleri arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; ADKKH'ler, lokal uygulama ile abdominoplasti sonrası TRAM flep yaşayabilirliğini arttırmıştır. Ayrıca abdominoplasti sonrası geçen sürenin de flep yaşayabilirliği üzerine etkili olan bir değişken olduğu gösterilmiştir. Flep yaşayabilirliğindeki artış dokuda meydana gelen damarlanma artışı ve muskulokutan perforatör arterlerin yeniden oluşması ile ortaya çıkmıştır. ADKKH'lerin kan VEGF düzeylerini arttırarak ve direkt olarak endotel hücrelerine dönüşerek damarlanmada artışa neden olduğu gösterilmiştir. Deneysel araştırmalarda flep yaşayabilirliğini arttırmak adına ADKKH uygulamaları ile başarılı sonuçlar elde edilmektedir. İleride klinikte flep yaşayabilirliğinin riskli olduğu durumlarda ADKKH'lerin kullanıma girebileceğini ve başarılı sonuçların elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: TRAM flep, abdominoplasti, adipoz doku kökenli kök hücre, vaskülarizasyon.

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Effect of Adipose Tissue Derived Stem Cell (ADSC) on Transvers Rectus Abdominis Musculocutaneous (TRAM) Flap Viability After Abdominoplasty: Experimental Study

It is known that abdominoplasty permanently damage the nutritional musculocutaneous perforator arteries of the TRAM flap skin island. In order to reduce the damage caused by abdominoplasty and to increase vascularity of the TRAM flap, surgical delay procedures, vasculogenic growth factors, pharmacological agents and gene therapies have been studied. No study investigating the impact of locally administered ADSC on TRAM flap viability after abdominoplasty have been found in the literature.

A total of 7 groups were formed. In group 1 only TRAM flaps were prepared. In groups 2, 3 and 4 TRAM flaps were elevated, 1 week, 2 weeks and 4 weeks after abdominoplasty. In group 5, 6 and 7 same surgeries were performed at the same days and ADSC injections were administered during abdominoplasty. 7 days after TRAM flap elevation the assesment of flap live area percentage was performed. Microangiographic image of one rat's flap from each group were taken. At this point we dissected the TRAM flaps to show and count if any newly formed musculocutaneous perforator arteries were developed. The TRAM flap tissues were taken for histopatological examination. On the histopatological examination; capillary density and fibrosis gradient was measured. ADSCs marked with DiI were examined under fluorescent microscope to track them in the tissues. Plasma levels of VEGF were studied at the days of abdominoplasmy, TRAM flap elevation and sacrifice.

The average viable flap area was $82,90 \pm 7,59$ % in group 1. The average viable flap areas were $2,24 \pm 3,71$ %, $3,31 \pm 3,29$ %, $9,40 \pm 6,18$ % in groups 2, 3 and 4 respectively. The average viable flap areas were $15,83 \pm 6,41$ %, $31,92 \pm 9,29$ %, $64,98 \pm 10,95$ % in groups 5, 6 and 7 respectively. The viable flap area percentages of groups 5, 6 and 7 were statistically higher than groups 2, 3 and 4 respectively. The viable flap areas of group 7 and group 6 were statistically higher than groups 6 and group 5 respectively. 7.98 ± 1.10 musculocutaneous perforator arteries were counted arising from both of the rectus

abdominis muscles. The groups were examined in terms of the newly formed musculocutaneous perforating arteries. We couldn't show any newly formed musculocutaneous perforating arteries in groups 2 and 3. The number of newly formed musculocutaneous perforating arteries were $0,29 \pm 0,49$, $0,43 \pm 0,53$, $1,14 \pm 0,69$, $2 \pm 0,82$ for groups 4, 5, 6 and 7 respectively. The number of perforating arteries counted after abdominoplasty was statistically significantly lower than the number of perforating arteries counted before abdominoplasty in all groups. The number of newly formed perforating arteries after abdominoplasty in group 7 was statistically significantly higher than the other groups. Mean capillary density was $6,86 \pm 0,50$; $0,36 \pm 0,05$; $0,67 \pm 0,13$; $2,79 \pm 0,53$; $2,46 \pm 0,58$; $3,71 \pm 0,47$; $7,01 \pm 0,70$ in groups 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 respectively. Mean capillary density of groups 5, 6 and 7 were statistically higher than groups 2, 3 and 4 respectively. Mean capillary density of group 7 was statistically higher than group 5. The difference between the groups in terms of fibrosis gradients were not statistically significant. It was shown that ADSCs marked with DiI, participated in the vessel wall structure as endothelial cells by immunohistochemical examination under fluorescence microscopy. There were statistically significant increase between the baseline VEGF values and the second VEGF values in groups 5, 6 and 7.

The results of this experimental study showed that local injection of ADSC increases TRAM flap viability after abdominoplasty. It has also been shown that the time passed after abdominoplasty was another variable affecting the flap viability. The increase in tissue vascularization and formation of new musculocutaneous perforator arteries emerged the increase in the viability of TRAM flap. It is shown that ADSCs increase tissue vascularization via increasing plasma VEGF levels and also by transformation into endothelial cells. Successful results are obtained in experimental research with ADSC applications in order to increase flap viability. We believe that in the future ADSCs may be used successfully in the clinics where there is risk for flap viability.

Key words: TRAM flap, abdominoplasty, adipose derived stem cell, vascularization.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Flepler	3
2.1.1. Flep Tanımı	3
2.1.2. Flep Fizyolojisi	3
2.1.3. Flep Kaybı	7
2.1.4. Flep Beslenmesini Arttırmaya Yönelik Girişimler.....	11
2.2. Meme Rekonstrüksiyonu	17
2.2.1. Doku Genişleticiler/İmplant ile Rekonstrüksiyon	18
2.2.2. Otolog Doku ile Meme Rekonstrüksiyonu	20
2.2.3. Sıçanda TRAM Flep Modeli	24
2.3. Abdominoplasti	26
2.3.1. Abdominoplastinin Tarihi Gelişimi	26
2.3.2. Cerrahi Bölge Anatomisi	26
2.3.3. Hastaların Geliş Şekilleri ve Hasta Seçimi	27
2.3.4. Cerrahi Teknik	28
2.3.5. Abdominoplasti Komplikasyonları	29
2.3.6. Sıçanda Abdominoplasti Modeli	30
2.4. Kök Hücreler	32
2.4.1. Genel Bilgiler	32
2.4.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	33
2.4.3. Rejeneratif Tıbbın Kısa Tarihçesi.....	34
2.4.4. Embriyonik Kök Hücreler	36
2.4.5. Yetişkin Kök Hücreler	37
2.4.6. Kök Hücrelerin Dokularda Takibi	41

2.4.7. Somatik Çekirdek Hücre Transferi.....	42
2.4.8. Dokuya Özel Kök Hücreler	43
2.4.9. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler.....	43
2.4.10. Kök Hücrelerin Flep Yaşayabilirliği ve Vaskülogenez Üzerine Etkileri	43
2.4.11 Doku Mühendisliği	44
2.5. Anjiyogenez ve Vaskülogenez	45
2.5.1. Vaskülogenez	45
2.5.2. Anjiyogenez.....	51
3. GEREÇ ve YÖNTEM	55
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı	61
3.2. Deneylerde Kullanılan Malzemeler.....	61
3.3. Cerrahi İşlemlere Hazırlık	63
3.4. Eksizyon ile Adipoz Doku Elde Edilmesi	63
3.5. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Elde Edilmesi ve MKH'lerin 1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI) ile İşaretlenmesi.....	65
3.5.1. MKH Elde Edilmesi	65
3.5.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin DiI ile İşaretlenmesi.....	68
3.6. Abdominoplasti Modeli.....	70
3.7. Abdominoplasti Sırasında PBS ve ADKKH İçeren PBS Enjeksiyonlarının Yapılması.....	74
3.8. Karın Ön Duvarı Derisini Besleyen Rektus Abdominis Kası Muskulokutan Perforatörlerinin Gösterilmesi	75
3.9. TRAM Flep Modeli	76
3.10. Kanda VEGF Seviyesinin Ölçülmesi	82
3.11. Yüzey Alan Ölçümleri.....	83
3.12. Mikroanjiyografi Çekilmesi	85
3.13. Mikroanjiyografi Görüntülerinin Değerlendirilmesi	88
3.14. Abdominoplasti Sonrası Yeniden Oluşan Rektus Abdominis Kası Muskulokutan Perforetörlerinin Gösterilmesi	89
3.15. Histopatolojik Değerlendirme	91
3.16. DiI İşaretli Kök Hücrelerin Takibi	92
3.17. İstatistiksel Analiz	92
4. BULGULAR	94

4.1. Flep Canlılığı	94
4.2. Rektus Abdominis Kasından Çıkan Muskulokutan Perforatörlerin Sayımı.....	99
4.3. Yeni Oluşan Rektus Abdominis Muskulokutan Perforatörlerinin Gösterilmesi ve Sayılması	101
4.4. TRAM Fleplerin Mikroanjiyografi İle Değerlendirilmesi	106
4.5. Histopatolojik Değerlendirme	109
4.5.1. Kapiller Dansite	109
4.5.2. Kas Dokuda Hasarlanma Derecesi (Fibroz Gradient)	113
4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular	116
4.7. Kanda VEGF Düzeyleri.....	116
5. TARTIŞMA.....	119
6. SONUÇ.....	128
7. KAYNAKLAR.....	130

KISALTMALAR

Abd.:	Abdominoplasti
ADKKH:	Adipoz doku kökenli kök hücre
ASIS:	Anterior süperior iliak spine
bFGF:	Bazik fibroblast büyüme faktörü
BMI:	Vücut kitle endeksi (Body mass index)
CD:	Cluster of differentiation
CFSE:	Karboksifloresein diasetat süksinimidil ester
Dhh:	Desert hedgehog
DIEP:	Derin inferior epigastrik arter perforatör
DiI:	1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EG-VEGF:	Endokrine bez VEGF'ü (Endocrine gland VEGF)
FACS:	Floresan yardımcı hücre sayımı
FBS:	Fetal bovine serum
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor)
G:	Gauge
GFP:	Yeşil floresan proteini (Green fluorescent protein)
HIF:	Hipoksi-inducible faktör
HS:	İnsan serumu (Human serum)
IA:	Intussusceptive anjiyogenez
IAR:	Intussusceptive arborization
IBR:	Intussusceptive branch remodeling
Ihh:	Indian hedgehog
IMG:	Intussusceptive microvascular growth
ip:	İntraperitoneal
ISCT:	Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği (The International Society for Cellular Therapy)
MAG:	Mikroanjiyografi
MKH:	Mezenkimal kök hücre
Mkpa:	Muskulokutan perforatör arter
MS:	Muscle sparing (Kas koruyucu)
NO:	Nitrik oksit

Ort.:	Ortalama
PBS:	Phosphate buffered saline (Fosfat tamponlu serum fizyolojik)
PDGF:	Platelet kökenli büyüme faktörü (Platelet derived growth factor)
PIGF:	Plasental büyüme faktörü (Placental growth factor)
SIEA:	Süperfisyal inferior epigastrik arter
SD:	Standart deviasyon (Standard deviation)
Shh:	Sonik hedgehog
TRAM:	Transvers rektus abdominis muskulokutan
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)

ŞEKİLLER

- Şekil 2.1. Septokutanöz ve muskulokutanöz perforatör arterler
- Şekil 2.2. Choke anastomozlar ve gerçek anastomozlar
- Şekil 2.3. İskemi oluşması ve takip eden reperfüzyon safhasında oksijen radikallerinin oluşumu
- Şekil 2.4. Hücre hasarı ile membran fosfolipidlerinden araşidonik asitlerin ve araşidonik asit metabolitlerinin oluşturulması
- Şekil 2.5. TRAM flep perfüzyon zonları
- Şekil 2.6. Sıçan TRAM flep modeli çizimi ve perfüzyon zonları
- Şekil 2.7. Alt karın bölgesinde kas dokusu ile cilt arasında tutunmayı ve stabilizasyonu sağlayan fasyal bağlantı zonları
- Şekil 2.8. Ratlarda abdominoplasti çizimi; insizyon yeri, diseksiyon sahası ve cilt eksizyonu alanının gösterilmesi
- Şekil 2.9. Kök hücrelerin farklılaşma özellikleri ve plastisitelerine göre sınıflandırılması
- Şekil 2.10. Vaskülogenez
- Şekil 2.11. VEGF reseptörleri ve ligandları
- Şekil 3.1. Eksizyon ile adipoz doku eldesi için karın ön duvarından inguinal bölgelere uzanan ters Y insizyonun çizimi
- Şekil 3.2. Sağ inguinal bölge yağ yastıkçığının diseksiyonu
- Şekil 3.3. Sağ inguinal yağ yastıkçığı eksizyonu sonrası görünüm
- Şekil 3.4. Sıçan inguinal bölgelerinden elde edilen yağ dokuları
- Şekil 3.5. Petri kabına alınan dokuların doku makası yardımı ile mekanik olarak parçalanarak küçük parçalara ayrılması
- Şekil 3.6a ve b. Hassas tartı ile 0,3mg kollajenazın hazırlanması ve konik santrifüj tüpündeki yağ doku süspansiyonlarına eklenmesi
- Şekil 3.7. Kollajenazın nötralize edilmesi için kontrol medium eklenen tüplerin karıştırılması
- Şekil 3.8. Kollajenaz nötralizasyonu sonrası homojenize hale gelmiş ve hücre süzgecinden geçirilmiş tüplerin içeriklerinin görünümü

- Şekil 3.9a. Santrifüj işlemi sonrası dibe çöken hücrelerin görünümü
- Şekil 3.9b. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonraki hücrelerin görünümü
- Şekil 3.10. Metilen mavisi ile boyanan hücrelerin Thoma lamında ışık mikroskobu altında sayılması
- Şekil 3.11. 4 °C’de DiI ile karıştırılan ve inkübasyona bırakılan kök hücreler
- Şekil 3.12. PBS eklenerek solüsyon haline getirilmiş DiI işaretli kök hücrelerin insülin enjektörlerine çekilmiş görüntüsü
- Şekil 3.13. Sıçanda abdominoplasti modeli
- Şekil 3.14. Abdominoplasti insizyonu yapılarak rektus kas fasyası seviyesinden diseksiyona başlanması
- Şekil 3.15. Karın ön duvarı cildinin çizime uygun olarak rektus abdoministen çıkan muskulokutan perforatörler korunarak diseke edilmesi
- Şekil 3.16. Rektus abdominis kasından çıkan muskulokutan perforatörlerin bipolar koter ile ligasyonu
- Şekil 3.17. Abdominoplastinin simülasyonu için 5 cm’lik insizyon hattından 4 mm’lik cilt sahasının eksizyonu
- Şekil 3.18. Rektus fasyasından ince bir şeridin eksize edilmesi
- Şekil 3.19. Abdominoplasti sonrası 4-0 ipek sütürler ile insizyon onarımı
- Şekil 3.20. Sağ rektus abdominis kası içerisine adipoz kökenli kök hücre enjeksiyonu
- Şekil 3.21. Abdominoplasti sonrası karın ön duvarı cildinin cilt altına adipoz kökenli kök hücre enjeksiyonları
- Şekil 3.22. Karın ön duvarı beslenmesinden görevli rektus muskulokutan perforatörlerinin diseksiyonu ve işaretlenmesi
- Şekil 3.23. Rektus muskulokutan perforatörlerinin bipolar elektrokoter ile kaagülasyonu
- Şekil 3.24. Perforatörlerin kaagülasyonu sonrası karın ön duvarı cilt altı ve perforatör anjiozomlarının görünümü
- Şekil 3.25. Sağ inferior epigastik arter pediküllü TRAM flep planlanması
- Şekil 3.26. TRAM flep cilt adası insizyonları
- Şekil 3.27. Zon III diseksiyonu
- Şekil 3.28. Zon II ve IV’ün diseksiyonu

- Şekil 3.29. Sağ rektus abdominis kasını dominant olarak besleyen sağ süperior epigastrik arterin diseksiyonu
- Şekil 3.30. Sağ süperior epigastrik arterin elektrokoterizasyon ile ligasyonu
- Şekil 3.31. Sağ inferior epigastrik arter pediküllü TRAM flep elevasyonu
- Şekil 3.32. Sağ inferior epigastrik arter pediküllü sağ TRAM flebin elevasyonu
- Şekil 3.33. Karın ön duvarına silikon yaprağın yerleştirilmesi
- Şekil 3.34. Sağ rektus abdominis kasının yerine 4-0 vikryl dikişler ile sütüre edilmesi
- Şekil 3.35. TRAM flep cilt adasının 4-0 ipek dikişler ile yerine sütüre edilmesi
- Şekil 3.36. Sıçanın kuyruk veninden 22 gauge damaryolu ile kan alınması
- Şekil 3.37. ImageJ 1.48v programında fotoğraf açıldıktan sonra ‘freehand selections’ seçeneği ile flep canlı alanının sınırlarının çizimi
- Şekil 3.38. ‘Analyze’ sekmesinden ‘Measure’ seçeneğinin seçilerek flep canlı alanının seçilmesi
- Şekil 3.39. ImageJ 1.48v programında ‘Analyze’ ve ‘Measure’ sekmeleri ile flep canlı alanı ve flep total alanındaki pixel sayımlarının yapılması
- Şekil 3.40. Sol göğüs kafesinin ekspozite olmasını sağlamak amacı ile sol göğüs ön duvarı cilt ve cilt altı dokusunun eksizyonu
- Şekil 3.41. Sol kostaların açılması ve kalbe ulaşılması
- Şekil 3.42. 60 cc %25 oranında hazırlanan baryum çözeltisinin enjektör ile sol karıncık içerisine enjekte edilmesi
- Şekil 3.43. Baryum solüsyonunun enjeksiyonu sırasında koroner damarlarda ve karaciğerde meydana gelen değişiklikler
- Şekil 3.44. Mamografi cihazı ile sıçan TRAM flep parçalarının anjiyografik görüntülerinin alınması
- Şekil 3.45. Flebin uzun eksenini kesen 50 adet karenin görüntüye yerleştirilmesi ve bu kareler yardımı ile damarlanmanın ölçülmesi
- Şekil 3.46. Yeni oluşan muskulokutan perforatörlerin gösterilmesi
- Şekil 3.47. Muskulokutan perforatörün rektus abdominis kasından çıkışı ve TRAM flep cilt adasına girerek dağılması
- Şekil 3.48. Cerrahi mikroskop ile muskulokutan perforatörün ve lümeninin görülmesi

- Şekil 4.1. Grup 1 (sadece TRAM flep) 7. gün TRAM flep görünümüleri
- Şekil 4.2. Abdominoplasti'den 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta sonra TRAM flepler eleve edilen grupların (Grup 2, grup 3, grup 4) sırası ile 7. gün TRAM flep görünümüleri
- Şekil 4.3. Abdominoplasti ile ADKKH enjeksiyonu yapılan ve 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta beklenildikten sonra TRAM flepler eleve edilen grupların (Grup 5, grup 6, grup 7) sırası ile 7. gün TRAM flep görünümüleri
- Şekil 4.4. Canlı flep alanı yüzdelilerinin gruplara göre ortalama değerleri ve standart sapmalarının grafik üzerinde gösterilmesi
- Şekil 4.5. Abdominoplasti sırasında her iki rektus abdominis kasından çıkan ve cilde giren muskulokutan perforatörlerin gösterilmesi ve sayılması
- Şekil 4.6. Muskulokutan perforatör arter sayılarının gruplara göre dağılımı
- Şekil 4.7. Yeni oluşan muskulokutan perforatörlerin gösterilmesi
- Şekil 4.8. Abdominoplasti öncesi ve sonrası perforatör arter sayılarının karşılaştırılması
- Şekil 4.9. Sadece TRAM flep yapılan gruptan seçilen bir sıçanın TRAM flebinin mikroanjiyografik görüntüsü
- Şekil 4.10. Grup 2, 3 ve grup 4'ten seçilen birer sıçanın TRAM fleplerinin mikroanjiyografi görüntüleri
- Şekil 4.11. ADKKH yapılan grup 5, grup 6 ve grup 7'den seçilen birer sıçanın TRAM fleplerinin mikroanjiyografi görüntüleri
- Şekil 4.12. H&E boyalı kesitlerde kapiller sayımının yapıldığı alanın 40x büyütme ile gösterilmesi
- Şekil 4.13. Işık mikroskopu altında 400x büyütmede kapillerlerin sayılması
- Şekil 4.14. Kapiller dansite değerlerinin gruplara göre dağılımları
- Şekil 4.15. Fibröz gradient derecelendirme skalasında yer alan 4 farklı dereceyi gösteren gruplardan seçilen örnek preparatlar
- Şekil 4.16. TRAM flep kas komponentinde fibröz gradient derecelerinin gruplara göre dağılımı
- Şekil 4.17. Floresan mikroskop altında 565 nm dalga boyunda floresan reaksiyon veren endotel hücreleri
- Şekil 4.18. Gruplara ve günlere göre ortalama kan VEGF değerlerinin grafik ile gösterilmesi

TABLÖLAR

Tablo 2.1.	Flep beslenmesini arttırmaya yönelik girişimler
Tablo 2.2.	Kas koruyucu TRAM flep tipleri
Tablo 2.3.	Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri
Tablo 3.1.	Tüm gruplara farklı zamanlarda yapılan işlemleri ifade eden tablo
Tablo 3.2.	Anestezi, cerrahi ve sakrifikasyonda kullanılan farmakolojik maddeler
Tablo 3.3.	Kök hücre elde edilmesinde kullanılan kimyasal maddeler
Tablo 3.4.	Deneylerde kullanılan malzemeler
Tablo 4.1.	Canlı flep alanı yüzdelerinin gruplara göre dağılımı
Tablo 4.2.	Flep canlı alan yüzdelerinin gruplar arası karşılaştırması
Tablo 4.3.	Muskulokutan perforatörlerin sayımı
Tablo 4.4.	Yeni oluşan rektus abdominis kası muskulokutan perforatör arter sayımı
Tablo 4.5.	Abdominoplasti öncesi ve sonrası sayımları yapılmış muskulokutan perforatör arterlerin karşılaştırılması
Tablo 4.6.	Abdominoplasti sonrası sayımları yapılmış muskulokutan perforatör arter sayılarının gruplar arası karşılaştırılması
Tablo 4.7.	Kapiller dansite değerleri
Tablo 4.8.	Kapiller dansite ölçümlerinin gruplar arası karşılaştırılması
Tablo 4.9.	Kas dokuda fibröz gradient dereceleri
Tablo 4.10.	VEGF kan seviyelerinin gruplara ve günlere göre dağılımı (pg/ml)

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Transvers rektus abdominis muskulokutan (TRAM) flebi 1982 yılında Hartrampf tarafından tanımlandığından beri pek çok meme merkezinde meme rekonstrüksiyonunda sıklıkla kullanılan cerrahi bir yöntem olmuştur (1). Meme rekonstrüksiyonunda otolog doku ile daha doğal görünümlü bir meme elde edilebilmesi ve abdominal konturun da eş zamanlı olarak düzeltilmesi, bu tekniğin en önemli avantajıdır (2, 3). Ancak TRAM flebin yetersiz vaskülarizasyonu, cilt ve yağ dokusu nekrozu gibi komplikasyonlara neden olmaktadır (2-4). Sistemik arteriyel hipertansiyon, diyabet, obezite, vasküler hastalıklar, geçirilmiş radyoterapi, sigara içilmesi ve geçirilmiş abdominal cerrahi gibi risk faktörleri olan hastalarda vaskülarizasyonun iyi olmaması nedeniyle TRAM flep viabilitesi değerlendirilmelidir (4-6). Abdominoplasti sırasında muskulokutan perforan arterler büyük oranda kesilmekte ve TRAM flep ile meme rekonstrüksiyonunda vaskülarizasyonun azalmasına neden olmaktadır (2, 6-8). Abdominoplasti sonrasında uzun süre beklenilmesine rağmen TRAM flep viabilitesinde belirgin bir artış meydana gelmemiştir (6). Ayrıca abdominoplasti sonrası vasküler yapıların zamanla yeniden oluşmaya başladığı ancak flep güvenilirliğinin eski haline dönemediği gösterilmiştir (9).

Abdominoplasti sonrası TRAM flep kullanımının daha güvenilir bir hale getirmek amacı ile abdominoplasti sırasında TRAM flebin bozulmuş olan vaskülaritesini güçlendirmeye yönelik çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar ortaya konmuştur (8,10).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik iliği naklinde, doku mühendisliğinde ve hücre terapisinde kullanılmaktadırlar (11-14). Özellikle kemik iliğinden MKH eldesi ile karşılaştırıldığında adipoz doku kökenli kök hücrelerin (ADKKH) elde edilmesi daha kolay ve daha az invazif bir işlem olarak kabul edilmektedir. Ayrıca yağ dokusunda kemik iliğindeki kadar yoğun olarak MKH bulunduğu gösterilmiştir (15). Yapılan çalışmalarda ADKKH'lerin çok sayıda anjiogenetik büyüme faktörü ve sitokin/kemokinler ortaya çıkarttığı gösterilmiştir. Bu etkileri tedavi amacı ile anjiogenezi artırıcı potansiyelleri olduğunu göstermektedir (16).

Yağ doku içerisinde yetişkin adipositler, preadipositler, vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri, monosit/makrofajlar ve lenfositler yer almaktadır. Yağ dokudan elde edilen yağ doku kaynaklı kök hücreler olarak ifade edilebilen stromal

vasküler fraksiyon yağ dokunun kollajenaz sindirimi sonrası hemen santrifüj edilmesi sonucu elde edilen pluripotent stromal hücrelerden oluşur. Yağ doku kaynaklı kök hücreler minimal bir donör alan morbiditesi ile kolayca yüksek miktarlarda elde edilebilmektedir.

Elde edilmesi kolay ve düşük maliyetli olan ADKKH'lerin, meme rekonstrüksiyonunda çok iyi bir otolog doku seçeneği olan TRAM flebin abdominoplasti sonrası bozulan vaskülaritesine olabilecek olumlu etkilerini araştırmak için yapılmış klinik yada deneysel bir çalışmanın literatürde olmaması nedeniyle bu çalışma planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flepler

2.1.1. Flep Tanımı

Kendi dolaşımı korunarak vücutta bir yerden başka bir yere aktarılan tüm dokulara flep adı verilir. Bu dokunun kendi dolaşımı ile doku defektinin olduğu başka bir yere taşınabiliyor olması bizlere çok çeşitli, büyük defektlerin onarımını pek çok farklı şekilde yapabilme imkanını sunmaktadır. Gergin olmayan kapama, uygun form ve fonksiyon ile flep cerrahisi yapılması iyi sonuçlar için çok önemlidir. Yaptığımız bu cerrahi işlemlerin başarısını belirleyen temel faktör flebin beslenmesinin iyi olmasıdır. Bu nedenle flep beslenmesinin fizyolojisini iyi bilmek başarılı sonuçlara ulaşılması için gereklidir. Flep beslenmesini arttırabilecek yada azaltabilecek etkenler ile çalışmalar yapmak plastik cerrahinin ilgi alanına girmektedir.

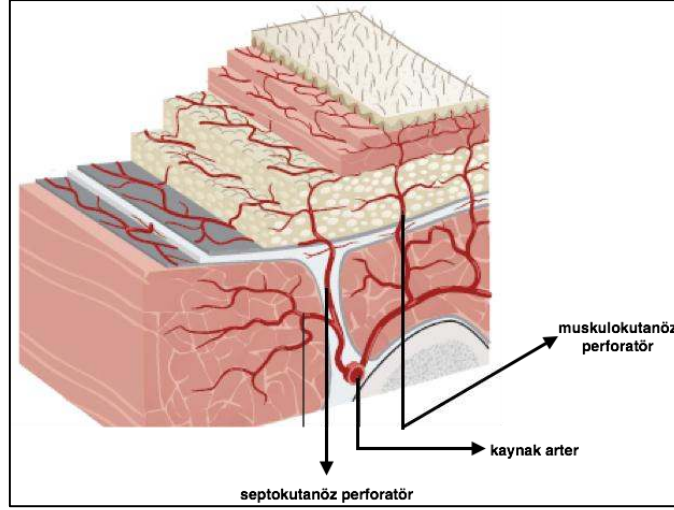
2.1.2. Flep Fizyolojisi

Deri Kan Dolaşımı:

Cilt arterlerinin ve venlerinin anatomik yapılarını bilmek cilt fleplerini başarılı bir şekilde planlayabilmek için çok önemlidir.

Kalpten pompalanan kanı cilde getiren ve kutanöz damarları oluşturan iki ana damar yapısından bahsedilebilir.

- 1- Septokutanöz perforatörler: Kaynak arterden direkt olarak çıkan ve cilde giden damarlar.
- 2- Muskulokutanöz perforatörler: Derin dokularda özellikle de kas dokusunda seyreden kaynak arterin dalından çıkarlar ve cildi beslerler. (Şekil 2.1)

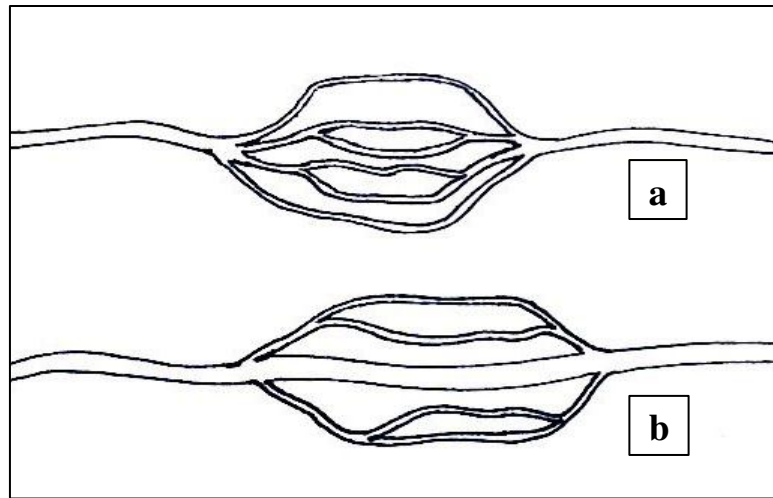


Şekil 2.1. Septokutanöz ve muskulokutanöz perforatör arterler

Şekilde direkt kaynak arterden çıkarak yüzeyleşen septokutanöz perforatör arter ve kası delerek yüzeyleşen indirekt muskulokutanöz perforatör arterler görülmektedir.

Kutanöz damarlar cilt altı derin dokuda dolaşırken derin fasyanın dış tabakası altında bağ doku içerisinde seyrederekler. Perforan dallar ile bu yapıyı delerek geçtikten sonra bir süre de derin fasyanın üzerinde yağ doku altında seyrederekler ve fasyayı besleyen dallar verirler. Cilt altı yağ dokuda seyretmeye devam ederlerken cildi besleyen subdermal pleksusa ulaşırlar (17).

Komşu kutanöz damarlar arasındaki bağlantı iki şekilde gerçekleşebilir; kalibrasyonda değişiklik görülmeyen gerçek anastomozlar ile yada kalibrasyonda azalma görülen anastomozlar (choke anastomozları) ile gerçekleşir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Choke anastomozlar ve gerçek anastomozlar

Komşu arterler arasında kalibrasyonda daralma ile gerçekleşen choke anastomozlar (a) ve kalibrasyonda değişiklik görülmeyen gerçek anastomozların (b) şematik görünümü.

Kalibrasyonda azalma ile ortaya çıkan choke anastomozlar özellikle fleplerin distalinin yaşayabilirliği için kritik önem teşkil etmektedir. Geciktirme yöntemi ile amaçlanan, flep beslenmesinde rolü olmayacak kutanöz damarların bir kısmının kesilmesi ile bu choke anastomozların adaptasyon ile genişlemesini ve gerçek anastomozlar boyutuna gelmesini sağlamaktır (18, 19).

Flep Kan Akımının Düzenlenmesi:

Tüm dokular için geçerli olduğu gibi flepler içinde doku beslenmesinde iki değişkenden bahsedilebilir. Makrosirkülasyon ve mikrosirkülasyon. Bu dolaşım sistemleri organizmanın kendisi tarafından yada dışarıdan gelen uyarılar sonucu daha hızlı çalışma yada daha yavaş çalışma eğilimi gösterirler. Flepleri dolaşımına göre sınıflarken aslında makrosirkülasyonlarına göre sınıflandırmış olmaktadır. Flebin oksijenizasyonunu sağlayan, nütrisyonel desteğin flebe ulaşmasını sağlayan arteriyel ve venöz sistemlerin birleştiği ve çok daha küçük damarsal ağlara dönüştüğü bölgeler ise mikrosirkülasyon olarak adlandırılır. Flep perfüzyonunun büyük kısmı bu seviyede gerçekleşir.

Flep kan akımının nasıl düzenlendiğini anlamak için cilt kan akımının nasıl düzenlendiğini incelemeliyiz. Deri kan akımı lokal ve sistemik olarak kontrol edilir.

1- Sistemik kontrol: Nöral ve hormonal olarak ikiye ayrılır.

1a. Nöral kontrol: Baskın olan kontrol mekanizmasıdır. Arterioller ve arteriovenöz anastomozlar seviyesinde nöral kontrol vasküler düz kaslara etki ederek vazokonstriksiyon ve vazodilatasyon ile kan akımını düzenler. Alfa adrenarjik, serotonerjik reseptörler ve sempatik liflerin etkisi ile vazokonstriksiyon ortaya çıkar. Beta-adrenarjik reseptörler ile vazodilatasyon oluşturulur.

1b. Hormonal kontrol: lokal olarak bulunan epinefrin, norepinefrin, serotonin, tromboksan A₂ ve prostoglandin F₂ α gibi vazoaktif maddelerin etkisi ile vazokonstriksiyon meydana gelir. Prostoglandin E₁, prostoglandin I₂ (prostasiklin), histamine, bradikinin ve lökotrien C₄ ve D₄'ün ise vazodilatatör etkileri mevcuttur.

2. Lokal kontrol: Lokal olarak bir dokuda meydana gelen metabolik olayların direkt damarlar üzerine olan etkileri sonucu vazodilatasyon ve vazokonstrüksiyon meydana gelir. Doku beslenmesi bozulduğu zaman ortaya çıkan hiperkapni, hipoksi, asidoz gibi metabolik etkiler ile vazodilatasyon görülürken lokal hipotermi yada artmış doku perfüzyonu gibi etkiler ile vazokonstrüksiyon ortaya çıkar.

Damar endotelinin, direkt vazoaktif maddeleri salabilmesi yada endotel hasarlanması sonrası beyaz küreler ve palatetler ile etkileşimi sonucu, kan akımının düzenlenmesinde önemli bir rolü mevcuttur (20).

Ayrıca bazı hematolojik durumlarında deri yada flep dolaşımına olan etkileri ortaya konmuştur. Bir çalışmada hafif anemi sonucu kan akışkanlığında artış ile flep kan akımının arttığı ve distal beslenmenin daha iyi olduğu gösterilmiştir (21). Ancak başka bir çalışmada ise anemiye bağlı doku oksijenizasyonundaki bozulma sonucu beslenme adına faydalı bir etkinin gözükmediği ortaya konmuştur (22).

Polisitemi yada orak hücreli anemi hastalarında artmış kan viskozitesi sonucu flep yaşayabilirliği ciddi şekilde olumsuz etkilenmektedir (23).

Kas dokusunun deri gibi termoregülasyonda rolü olmaması nedeniyle ısıнын kas dolaşımı üzerine lokal etkisi neredeyse hiç yoktur. Epinefrinin kas üzerine kaç yada savaş prensibi gereği cildin tam tersi olarak vazodilatatör etkisi mevcuttur.

Flep Cerrahisinin Flep Dolaşımı Üzerine Etkileri:

Bir flebin elevasyonu ile doku kan akımında ani değişimler ve hassas dengeler ile düzenlenen doku perfüzyonunda bozulma ortaya çıkar. Flep kenarlarının kesilmesi ile ani bir sempatik inervasyon kaybı ve buna bağlı spontan nörotransmitter salınımı ile vazokonstrüksiyon ortaya çıkar. Ayrıca pedikül dışında kalan damardan gelen kan akımında kesilmesi ile özellikle flep uç kısımlarında akut bir iskemi ortaya çıkar. Cerrahi insizyonlar sonucu endotelde meydana gelen hasar ile lökosit ve trombositlerin damarda birikmesi ile de iskemi miktarı artar. Bu etkiler sonucu ilk 12-18 saatlik sürede özellikle flep uç kısımda kan akımı belirgin düzeyde azalır. İlk 24 saatte uç kısımların mikrosirkülasyonunda meydana gelen bu değişimler flebin ne kadarının yaşayıp yaşamayacağını belirleyen temel safhadır. Flebin içeriğindeki dokuya göre değişmekle

birlikte doku beslenmesinde 6-12 saati geçen sürekli bir bozulma dokuda nekroza neden olacaktır.

Flep elevasyonu sonrası ortaya çıkan hemodinamik, anatomik ve metabolik değişimler flep cerrahisinin başarısını belirleyecektir. Hemodinamik çalışmalarda flep elevasyonu sonrası ilk 6-12 saatte uç kısımlarda kan akımının normalin %20'sine kadar düştüğü, 2 haftaya kadar %75'ine, 4 haftada ise %100'üne ulaşabildiği gösterilmiştir (24-27).

Uç kısmın dolaşımının normale dönmesinde pedikülden uzunlamasına gelişen neovaskülarizasyonun ve aynı zamanda flebin adapte edildiği yataktan inoskölasyon ve neovaskülarizasyon ile beslenmeye başlamasının etkisi olmaktadır. Bu ikinci durum kalın fleplerden ziyade ince fleplerin beslenmesinde daha çok görülür.

Random paternli deri fleplerinin aksine muskulokutan fleplerin deri adalarının kan dolaşımı flep elevasyonu sonrası sürekli artış halindedir. Bunun nedeni cilt adalarının kastan gelen direkt perforatörler ile beslenmesidir (28).

Flep oksijenizasyonları açısından değerlendirildiğinde muskulokutan fleplerin random paternli deri fleplerine göre flep elevasyonu sonrası erken ve takip eden dönemde daha iyi oksijenizasyon gösterdiği dolayısı ile enfeksiyonun eşlik ettiği yerlerde kas fleplerinin tercih edilmesi gerektiği ortaya konmuştur (29-31).

Flep cerrahisi sonrası sempatik sinirlerin kesilmesi sonrası hemen salınan nörotransmitterler 12-24 saatte tükendikleri için bunlardan kaynaklanan vazokonstriksiyon etkisi ortadan kalkar. Ayrıca 2-3 gün civarında flep yataktan inoskölasyon ile beslenmeye de başlar. Bu etkiler ile flep distalinde bozulmuş olan kan akımı artmaya başlar. Ancak flep distalinde ilk 6-12 saatte ciddi bir iskemi meydana gelmiş ise geri dönen kan akımı iskemi reperfüzyon hasarı oluşturarak dokunun ölmesine neden olacaktır.

2.1.3. Flep Kaybı

Flep cerrahisinin başarısı için en önemli faktör doğru flep dizaynını yapmaktır. Peki doğru tercih edilen bir flepte neden kayıp yaşarız? Bu karmaşık pek çok mekanizmaya bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Önceleri flep distalinde mevcut olan arteriovenöz şantların kanı hızlı bir şekilde sirküle ederek dokunun beslenmesine izin vermemesinin flep kaybında önemli olduğu düşünülmüyordu (32). Daha sonra yapılan çalışmalar ile flep distalinde kayıpların yaşanmasında arteriovenöz şantların sanıldığı kadar önemli olmadığı, pedikülden uzaklaştıkça görülen vazokonstriksiyon ve perfüzyon basıncındaki düşmenin doku beslenmesini bozan asıl neden olduğu ortaya konmuştur (33-35). Flep elevasyonu sonrası, sempatektomiye bağlı gelişen vazokonstriksiyon, katekolaminlerin salınımı ve lokal tepki nedeni ile flebin proksimal kısmının dolaşımında azalma görülür. Flep uç kısmında lokal iskemi sonucu ortaya çıkan vazodilatasyona karşın pedikülden gelen düşük basınç nedeniyle yeterli doku beslenmesi sağlanamayabilir. Bu durumda flep distalindeki iskemiden asıl sorumlu olan yetersiz arteriyel kan akışıdır (26, 27, 33).

Flep beslenmesindeki bozulmalarda arteriyel yetersizliğin mi yoksa venöz yetersizliğin mi daha önemli olduğunu bulmaya yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Yeterli arteriyel beslenme olmasına rağmen yetersiz venöz dönüşün tek başına flep kaybına neden olabildiği gösterilmiştir (36). Serbest flep kayıplarında venöz bozuklukların daha ön planda olduğu görülmektedir. Arteriyel yetersizlik ile venöz yetersizliği karşılaştıran deneysel flep modellerinde venöz yetmezliğin daha zararlı olduğu ortaya konmuştur (37-39).

Flep iskemisine neden olabilecek 3 temel nedenden bahsedilebilir; pedikülünün besleyebileceğinden daha büyük bir flebin dizayn edilmiş olması, arteriyel tromboz gelişmesi, venöz tromboz gelişmesi (40). Bu durumlara yol açabilecek nedenler flebin tipine göre değişiklik göstermektedir. Uygunsuz flep dizaynı, iskemi reperfüzyon hasarı, sigara içilmesi, vazokonstriktör ilaç kullanımı, sepsis, hipotansiyon, flebin uygun olmayan şekilde adaptasyonu, pedikülde dönme yada hematoma gibi mikrovasküler düzeyde yavaş akıma neden olabilecek nedenler random ve aksiyel fleplerde trombozun başlıca nedenleridir.

Serbest fleplerde venöz yada arteriyel trombozun en sık nedeni ise anastomozun uygun olmayan şekilde yapılması sonucu tromboza yatkın olan damar adventisiasının damar duvarında açığa gelmesi ve buraya platelet ve fibrin yapışması sonucu tıkanma olmasıdır.

Flep elevasyonu sonrası flep distalinde çok çeşitli metabolik değişiklikler olmaktadır. İskemik doku oksijen, glukoz ve ATP'nin tükenmesi, karbondioksit ve laktik asitin dokuda

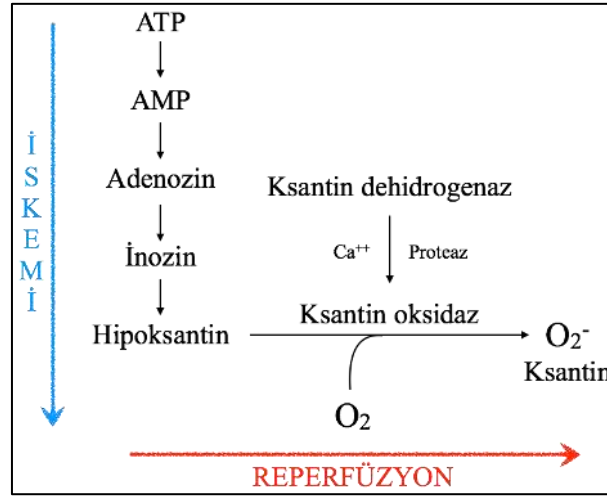
artışı ile anaerobik metabolizmaya geçer. Prostaglandin ve tromboksan düzeylerinde de artış görülür (41). İskemik dokuda anaerobik metabolizmaya dönüş ile oksijen radikallerinde artış başlar (41-44). Oksijen radikalleri direkt sitotoksik etkilerinin yanında endotel hasarı ve lökosit akümülyasyonunu arttırarak mikro dolaşımı bozmaktadırlar. Bir oksijen radikali olan süperoksiti oksijene çevirerek etkisiz hale gelmesini sağlayan süperoksit dismutaz enzimi iskemik flepte fazla kullanıma bağlı azalır (43). Oksijen radikalleri oluştuktan sonra doku hasarı iki farklı şekilde meydana gelebilir. Birincisi oksijen radikallerinin direkt etkisi ile lipid peroksidasyonu, membran proteinlerinin bozulması, artmış hücre geçirgenliği ve sonuç olarak hücre şişmesi ve hücrenin fonksiyonunu yitirmesidir. İkinci mekanizma ise oksijen metabolitlerinin kemotaktik etkileri ile nötrofilleri reperfüzyon olan alana çekmeleri sonucu burada nötrofillerin birikmesine neden olarak doku hasarına yol açmalarıdır. Bu kemotaktik aktivite süperoksit dismutaz ile inhibe edilir (45).

Hematoma da metabolik olarak flep kaybına neden olmasında serbest radikallerin rolü vardır. Hemoglobin ve demirin katalizörlüğü ile oldukça yıkıcı bir radikal olan hidroksil radikali ortaya çıkar (46).

İskemi Reperfüzyon Hasarı:

Flepte meydana gelen iske mi sonrası düzelen kan dolaşımına bir cevap olarak ortaya çıkan iske mi reperfüzyon hasarı flep kayıplarında önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu hasar bir takım mekanizmaların tetiklenmesi ve oluşan metabolitlerinde başka mekanizmaları tetiklemesi sonucu oldukça karışık bir mekanizma ile ortaya çıkmaktadır.

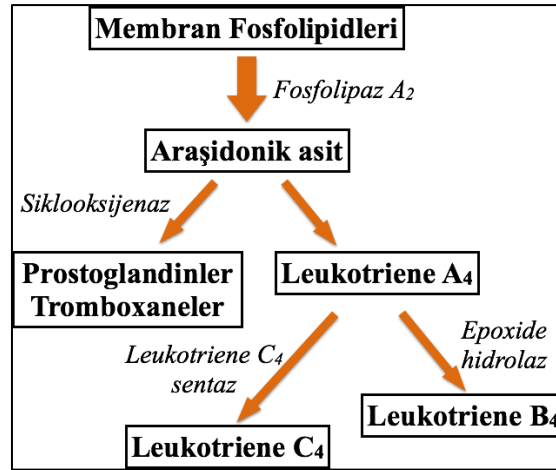
Bu mekanizmalardan biri hücre geçirgenliğindeki bozulma sonucu hücreye giren Ca iyonlarının proteaz enzimini aktive etmesi ile endotelde mevcut olan ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürmesidir. Ksantin oksidaz enzimi, iskemik dokuda tüketilen ATP'nin yıkım ürünü olan hipoksantini, reperfüzyon sırasında ortama gelen oksijenin katalizörlüğünde ksantine dönüştürür ve yan ürün olarak süperoksit radikali ortaya çıkar (47), (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İskemi oluşması ve takip eden reperfüzyon safhasında oksijen radikallerinin oluşumu

Süperoksit radikali başka oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit, hidroksil radikali) oluşmasına neden olarak direkt doku hasarına neden olur. Plazmada biriken oksijen radikalleri endotele direkt etki ederek yada endotelyal hücrelerin hipoksiye maruz kalması, endotelden nötrofilik kemoatraktanların salınımına neden olur (45, 48, 49). Deneysel flep modellerinin iskemik bırakılan uç bölgelerinden alınan doku örneklerinde artmış ksantin oksidaz ve malonil aldehit değerleri gösterilmiştir (50-52).

Bir diğer mekanizma ise, doku hasarı sonucu fosfolipaz A2'nin hücre duvarındaki fosfolipidleri yıkararak araşidonik asitleri oluşturması ile başlar. Lipoksijenaz etkisi ile araşidonik asitlerden güçlü bir kemoatraktan olan lökotrien B4 ortaya çıkartılır. Lökotrien B4 süperoksit iyonlarının oluşmasını ve nötrofillerin degranüle olmasını sağlayarak doku inflamasyonu ve hasarını ortaya çıkarır. Benzer şekilde iskemi sırasında siklooksijenaz araşidonik asitlerin tromboksan ve prostaglandinlere dönüşmesine neden olur (Şekil 2.4). Tromboksan A2 güçlü bir vazokonstrüktör olup plateletlerin bir araya gelmesini sağlar. Prostaglandin I2 ise güçlü bir vazodilatatördür ve plateletlerin bir araya gelip tutunmalarını engeller.



Şekil 2.4. Hücre hasarı ile membran fosfolipidlerinden araşidonik asitlerin ve araşidonik asit metabolitlerinin oluşturulması

İskemi reperfüzyon hasarında nötrofillerin dokuda birikmesi ile doku hasarı arasında direkt bir ilişki olduğu deneysel bir modelde nötrofillerin ortadan kaldırılması ile doku hasarının azaltıldığına gösterilmesi ile ispatlanmıştır (53).

Nötrofillerin reperfüzyon sırasında dokuda birikmesi ile ‘diminishing reflow’ fenomeni ortaya çıkar ve bu iskemi reperfüzyon hasarına maruz kalan dokuya olan kan akımını hızla azaltan mekanizmadır (54).

2.1.4. Flep Beslenmesini Arttırmaya Yönelik Girişimler

Flep beslenmesini arttırmak için dikkat edilmesi gerekenler ve uygulanabilecek tedaviler tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Flep beslenmesini arttırmaya yönelik girişimler

1. Flep dizaynı ve mikrovasküler anastomozun kusursuz olması, uygun ven ve arterin seçilmesi
2. Hastanın medikal durumunun düzenlenmesi
3. Flep pozisyonu, pansuman, sütürler ve postoperatif pozisyona dikkat edilmesi
4. Sülük uygulanması
5. Sıcaklık ayarlanması
6. Medikal tedaviler
6a. Steroidler
6b. Oksijen radikali oluşumunu önlemeye yönelik ajanlar
6c. Dekstran
6d. Aspirin
6e. Heparin
6f. Nitrik oksit (NO)
7. Hiperbarik oksijen tedavisi
8. Flep geciktirilmesi

1. İyi planlama ve mükemmel cerrahi teknik:

Flep yaşıyabilirliğini arttırmaya yönelik onca çalışma ve ümit veren sonuçlara rağmen halen eskiden olduğu gibi flep beslenmesinde en önemli etken doğru bir planlama ile uygun boyutta bir flebin uygun bir defekt için seçilmesidir. Aksiyel yada random paternli flepler için dokuya saygı göstererek diseksiyon yapmak ve serbest flepler içinde mükemmel cerrahi teknik ile mikrovasküler anastomozları yapmak çok önemlidir. Anastomozun kusursuzluğu ile ilgili en ufak bir şüphe varsa ameliyat bitmeden mutlaka gerekli önlemler alınmalıdır. Ameliyat sonrasında dikkatli monitorizasyon yapılması, hematoma, anastomoz hattında tromboz, pedikülün bükülmesi gibi durumların erken fark edilerek flebin kurtarılabilmesini sağlayacaktır.

2. Hastanın genel durumunun hazırlanması:

Elektif olarak yapılacak flep cerrahisinden önce hastanın kullandığı vazodilatör ilaçlar sorgulanmalı, sepsis, tansiyon hastalığı gibi hemodinamiyi bozabilecek hastalıkların tedavisi gerçekleştirilmelidir. Sigaranın sistemik vazodilatör etkisi ile flep yaşıyabilirliğini azalttığı bilinmektedir (55, 56). Bu nedenle hastaların flep cerrahisinden haftalar önce sigarayı tamamen bırakması ve ameliyat sonrası birkaç hafta boyunca da kullanmaması gerekmektedir (57).

3. Uygun flep pozisyonu, pansuman ve postoperatif pozisyon:

Flebin yerine uygun şekilde gerginlik yaratmadan dikilmesi, flebin üzerine uygun bir pansuman yapılması, postoperatif hastaya ve flebin olduğu bölgeye verilen pozisyon dolaşım problemlerinin önlenmesi için oldukça önem teşkil etmektedir.

4. Sülük uygulanması (Hirudo medicinalis):

Çok eski bir yöntem olan sülük uygulaması venöz sorun yaşayan fleplerde işlevselliğini kanıtlamıştır (58, 59). Etkisini dokuya yapıştıktan sonra fibrinin fibrinojene dönüştürülmesini güçlü bir şekilde engelleyen, vazodilatasyon etki yapan hirudini salgılayarak yapar. Aynı zamanda hirudinin dokuda yayılmasını sağlayan hyaluronidazı da doku içine verir. Mekanik olarak birikmiş venöz kanı dokudan uzaklaştırır. Sülük tedavisine bağlı gelişebilecek aeromonas hydrophila enfeksiyonuna yönelik profilaktik tedavi verilmelidir. Bu tedavi ile istenemeyen fazla kanamalar görülebilir.

5. Sıcaklık ayarlanması:

Derinin fizyolojik tepkilerinden bildiğimiz üzere hipotermi vazokonstrüksiyona neden olarak doku beslenmesinde bozulmaya neden olabilir. Bunun yanında hipoterminin dokuların metabolik ihtiyaçlarını azalttığı ve iskemiye olan dayanma süresini uzatabildiği de bilinmektedir (60). Özellikle hafif hipoterminin reperfüzyon safhasında nötrofil akümülyasyonunu azalttığı ve perfüzyona olumlu katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle özellikle belli bir iskemi süresi yaşamış bir serbest flep uygulaması sonrası reperfüzyon safhasında flebin biraz soğutulması dolaşımı olumlu yönde etkileyebilmektedir (61).

6. Medikal tedaviler:

6a. Steroidler:

Non-spesifik antienflamatuvar etkileri olduğu bilinen steroidlerle ilgili yapılan deneysel çalışmalarda flep dolaşımı üzerine birbirinden farklı sonuçlar çıkmıştır (62-64). Ayrıca steroidlerin potansiyel enfeksiyon riskleri kullanılmalarını sınırlandırmaktadır.

6b. Oksijen radikali oluşumunu önlemeye yönelik ajanlar:

Süperoksit dismutazın deneysel bir modelde random paternli fleplerin yaşayabilirliğini anlamlı şekilde arttırdığı gösterilmiştir (65). Bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol ve serbest radikal temizleyici olarak görev yapan deferoksamin ile yapılan çalışmalarda da olumlu sonuçlar alınmıştır (46, 52, 66-70).

6c. Araşidonik asit metabolitleri:

Güçlü bir vazodilatör ve platelet agregasyonu inhibitörü olan prostasiklin ve prostasiklin analogu olan iloprostun deneysel ve klinik çalışmalarda flep yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir (71, 72). Vazokonstrüktör ve agregan etkilere neden olduğu bilenen tromboksan sentezinden sorumlu tromboksan sentaz inhibitörleri ile de başarılı deneysel modeller ortaya konmuştur (73, 74). Deneysel olarak oldukça başarılı sonuçlar ortaya koyan bu etken maddeler henüz klinikte geniş kullanım alanı bulamamışlardır.

6d. Dekstran:

Kanın viskozitesini azaltma, plateletlerin tutunmasını ve kümelenmesini azaltma ve volüm ekspansiyonu etkileri olan bakteriler tarafından sukrozdan sentezlenen bir polisakkarittir (75). 70000 yada 40000 moleküler büyüklükte iki formu vardır ve flep cerrahisi sırasında

ve ameliyat sonrası birkaç gün iv infüzyon olarak uygulanır. Allerjik reaksiyonlar, anafilaksi, fazla volüm yüklenmesi ve özellikle yaşlılarda akciğer ödemi gibi istenmeyen etkiler görülebilir.

6e. Aspirin:

Aspirin düşük dozda verildiğinde platelet kaynaklı siklooksijenazı inhibe ederek tromboksan oluşumunu engeller. Böylece tromboksanın vazokonstrüksiyon ve platelet agregasyonu etkilerini engellenmiş olur. Yüksek dozlarda ise endothelyal siklooksijenazıda inhibe ederek güçlü bir vazodilatatör ve antiagregan olan prostasiklin üretimini engeller. Bu nedenle aspirinden istediğimiz etkileri elde edebilmemiz için ideal doz 50-100mg arasındadır (76). Kanın akışkanlığını ve intravasküler volümü artırarak distal flep perfüzyonuna etki etmesi beklenen dekstran uygulamasının aksine viskozite üzerine etkisi bulunmayan aspirin daha çok mikrovasküler anastomoz yapılmış fleplerde antitrombotik etki amacı ile kullanılmaktadır.

6f. Heparin:

Antitrombin III'e bağlanarak pıhtılaşma kaskadında bir dizi basamağı engelleyerek etki eden ve klinikte en sık kullanılan antitrombotiktir. Deneysel mikrovasküler cerrahi modellerinde antitrombotik etki ile damar açıklığının sağlanmasına olumlu etkisi olduğu ortaya konmuştur (77). Klinikte ise flep cerrahisinde hem intravenöz hem de topikal olarak kullanılmaktadır. İntravenöz kullanımı sonrası kanama görülebileceğinden daha çok mikrovasküler anastomoz sırasında tromboz meydana gelmiş ve müdahale edilerek açılmış vakalarda önerilmektedir. İntraoperatif olarak anastomoz içerisinde yıkama amaçlı kullanımı klinikte kabul görmüş bir uygulamadır (78). Ancak geniş bir seri ile farklı antitrombotik tedavilerin karşılaştırıldığı çalışmada yalnızca subkutan uygulanan heparinin anlamlı olarak olumlu sonuçlara neden olduğu gösterilmiştir (79).

6g. NO:

Nitrik oksit çok uçucu bir gaz olduğu için çalışmalarda bir öncü molekül olan L-arginin kullanılmıştır (80). Nötrofil adezyonunu engelleyici etkisi bilinene NO ile yapılan iskemi reperfüzyon hasarı çalışmalarında doku hasarını azaltıcı etkisi gösterilmiştir (81-83). Deneysel iskemik flep modellerinde de nitrik oksit ve prekürsörleri kullanılmış ve reperfüzyon hasarını nötrofil birikimini engelleyerek azalttığı gösterilmiştir (84-88).

7. Hiperbarik oksijen tedavisi:

Hiperbarik oksijen tedavisi yara tedavisinde, greft yada flep cerrahisi sonrası dolaşım problemi yaşanan durumlarda sıklıkla kullanılmakta ve oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır. Ancak etki mekanizmaları çok iyi bilinmemektedir. Muhtemel etkilerinin inflamasyonu düzenleme, anjiyogenezi arttırma ve bakterisit etkilere bağlı olduğu düşünülmektedir (89-93).

8. Geciktirme fenomeni (delay fenomeni) ve iskemik ön koşullandırma:

Flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik olarak flep kaldırılmadan bir süre önce flep kaldırılmasının kısmen yapılması ve dokunun iskemiye alıştırılması olarak tarif edilebilir. Böylece flep kaldırıldığında flebin uç kısmında iskemi sonucu nekroza gitmesi beklenen bölgenin kurtarılması amaçlanır.

Tarihte bilinen ilk geciktirmeli flep 15. yüzyılda İtalyan Antonius Branca tarafından önkolun cildi kullanılarak burun rekonstrüksiyonunu için gerçekleştirilmiştir (94). Kullanımına yüzyıllar öncesinden başlanmış olmasına rağmen geciktirme fenomeni ancak 20. yüzyılın başlarından itibaren kavranmaya başlanmış ve sıklıkla kullanılır hale gelmiştir. Yirminci yüzyılın ilk yarısında delay fenomenini anlamaya yönelik yapılan çalışmalarda flebin uzunlamasına eksenini boyunca dermal pleksusta kan damarlarının sayıca arttığı ayrıca mevcut damarların çaplarının da arttığı ortaya konmuştur (95). Geciktirme yöntemi ile fleplerde meydana gelen morfolojik değişimlerin fizyolojik nedenleri halen araştırılmaktadır. Yapılan bir çalışmada ilk morfolojik değişimin yeni damar oluşumu değil mevcut damarların genişlemesi olduğu gösterilmiştir. İlk saatlerde gerçekleşen geçici bir vazokonstrüksiyon sonrası 2. ve 3. günlerde maksimum düzeye ulaşan kalıcı bir vazodilatasyon meydana gelmektedir. Bu vazodilatasyonun damar duvarındaki hücrelerde hipertrofi ve hiperplazi sonucu oluştuğu gösterilmiştir (18). Taylor ise yaptığı morfolojik çalışma ile delay uygulanan fleplerde mevcut damarların genişlemesinin yanında flebin uzunlamasına ekseninde en az bir yeni damar ağının oluştuğunu göstermiştir (96).

Geleneksel delay işleminde flebin her iki yanına insizyon yapılarak yatağı ile ilişkisi kesilir, flebin sadece tabanı ve distali korunur. İki, üç hafta beklendikten sonra flep distali kaldırılarak flebin transferi sağlanır.

Yakın zamanda araştırmalar iskemik ön koşullandırma (iskemik preconditioning) yöntemi üzerine yoğunlaşmıştır. İskemik ön koşullandırmada dokunun hayatiyetini bozmayacak sürede iskemi yaratılması ile gerçekleştirilir. Bu şekilde dokunun daha sonra maruz kalacağı daha uzun süreli iskemi süresinde hasara direnç geliştirmesi sağlanır. İlk kez Murry tarafından köpeklerin sirkumfleks damarlarına tekrarlayan kereler kısa süreli oklüzyonlar uygulanarak iskemik ön koşullandırma gerçekleştirilmiştir. Böylece daha sonra uzun süreli oklüzyon gerçekleştirildiğinde miyokard hasarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az gerçekleştiği görölmüştür (97). Bu yöntemin deneysel olarak kas ve muskulokutan fleplerin yaşayabilirliğini de arttırdığı gösterilmiştir (98, 99).

İskemik ön koşullandırmanın yol açtığı olumlu sonuçların altında yatan fizyolojik değişimler tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan bir çalışmada iskemik ön koşullandırma ile iskemi reperfüzyon hasarında flep distalinde görölen nötrofil birikiminin azaltıldığı ve böylece dolaşımın korunabildiği gösterilmiştir (100). Gösterilmiş başka bir mekanizma ise iskemik ön koşullandırmanın neden olduğu protein kinaz C'nin aktivasyonu ile K-ATP kanallarının fosforilasyonunun koruyucu olduğu yönündedir (101-103).

Moleküler düzeydeki bu mekanizmalar ortaya konduka iskemik ön koşullandırmayı farmakolojik olarak yapmak akıllara gelmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda adenosin verildiğinde iskemik ön koşullandırmayı taklit eden sonuçlar görölmüştür. Aynı zamanda adenosin antagonistlerinin de iskemik ön koşullandırmanın koruyucu etkilerini engellediği gösterilmiştir (104, 105). Farmakolojik ön koşullandırmada kullanılan bir diğer molekül olan monofosforil lipid A'nın iskemik ön koşullandırmanın geç safhasını taklit ettiği bilinmektedir. Deneysel olarak random paternli cilt fleplerinde ve pediküllü kas fleplerinde kullanılmış ve iskemik ön koşullandırmayı taklit ettiği görölmüştür (106). Deneysel modellerde oldukça başarılı sonuçlar alınmış olsa da bu moleküllerin olası yan etkileri kullanımlarını sınırlandırmaktadır.

Tanımlanmış bir diğer iskemik ön koşullandırma yöntemi ise 'uzak (remote) iskemik ön koşullandırma' olarak adlandırılmaktadır. Bu yöntem başka bir organda meydana getirilen iskemik ön koşullandırmanın sonraki aşamada vücudun başka bir yerinde iskemiye maruz kalan dokunun iskemiye olan direncinin arttırılmasıdır (107).

2.2. Meme Rekonstrüksiyonu

Cilt kanserlerini göz ardı edersek kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Akciğer kanserinden sonra kanser ölümlerinin ikinci en sık nedenidir. Her sekiz kadından biri yaşadığı süre içerisinde meme kanserine yakalanacaktır. 2009 yılı verilerine göre Amerika Birleşik devletlerinde 2,9 milyon meme kanseri geçirmiş kadın bulunmaktadır (108).

Meme Kanseri Etyolojisi:

Yaşın tek başına en önemli belirleyici faktör olduğu meme kanserinde endojen ve eksojen pek çok farklı etyolojik nedenin hastalık ile ilişkisi ortaya konmuştur. Aile hikayesinde; ailede etkilenen kişilerin sayısı ve yakınlık dereceleri, menstrüel hikayeleri ve bilateral kanser varlığı önem teşkil etmektedir (109). BRCA gen mutasyonu ile ilişkili ailesel meme kanseri tüm meme kanserlerinin %5-10 kadarını teşkil etmektedir. BRCA 1 yada BRCA 2 gen mutasyonu olan bireylerde 70 yaşına kadar meme kanseri görülme olasılığı sırası ile %65 ve %45'tir (110). Pek çok epidemiyolojik çalışma erken menarş, geç menepozun ve 30 yaşın üstünde ilk tam gebeliğin yaşanmasının meme kanseri ile ilişkisini ortaya koymuştur (111, 112). Ayrıca benign meme patolojisi varlığı da meme kanseri riskini arttıran bir diğer değişkendir (113).

Meme Kanseri Cerrahi Tedavisinde Görülen Gelişmeler:

20. yüzyılın başında Halsted tarafından geliştirilen radikal mastektomi yöntemi 1950'li yıllara kadar tüm meme kanserlerinin tedavisinde kabul görmüş agresif bir yöntemdi (114). Bu yöntem memenin tamamının çıkarılmasını, pektoral kasın ve aksiller lenf nodlarının alınmasını kapsıyordu. Ancak bu yöntem ile tedavi edilmiş 30 yıl takipli geniş bir serinin sonuçlarına göre hastaların yalnızca %13'ü hastalıksız olarak hayatlarına devam edebilmişlerdir (115). Bir grup cerrah lokal kontrolün daha da iyi olması gerektiğini düşünerek ameliyata bir modifikasyon getirerek, internal mamarian lenf nodlarında eksize edilmesi gerektiğini söylemişlerdir. Ancak yapılan çalışmalarda 'genişletilmiş (extended) radikal mastektominin' hastalara bir katkı sağlamadığı ortaya konmuştur (116, 117). Daha sonraları daha iyi estetik ve fonksiyonel sonuçları olan pektoral kasın korunduğu ve aksillar diseksiyonun ise daha selektif yapıldığı modifiye radikal mastektomi meme kanserinde tercih edilen cerrahi tedavi olmuştur. Günümüzde ileri evre hastalıkta dahi radikal mastektomi nadiren uygulanmakta bunun yerine daha az invazif cerrahi ile neoadjuvan kemoterapi tedavisi tercih edilmektedir. 1980'lerden sonra erken evre meme

kanseri olan hastalarda sentinel lenf nodu biyopsisinin de kullanıma girmesi ile meme koruyucu cerrahi yöntemler kullanılabilir hale gelmiştir. Ayrıca eşzamanlı rekonstrüksiyon yöntemlerinin de kullanıma girmesi ile daha iyi estetik sonuçlar için meme cildinin tamamen korunduğu, sadece meme parankiminin eksize edildiği cilt koruyucu mastektomi de kullanılmaya başlanmıştır (118). Yapılan prospektif ve retrospektif çalışmaların sonuçları, cilt koruyucu mastektomi ile standart mastektomi arasında lokal rekürrens açısından anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir (119-121). Daha yakın zamanlarda belirli kriterleri taşıyan hastalar için meme cildinin korunmasının yanında nipple-areola kompleksinde korunduğu meme koruyucu mastektomi yöntemi gündeme gelmiştir (122, 123).

Meme kanseri cerrahisi sonrası meme rekonstrüksiyonu isteyen hastaların sayısı giderek artmaktadır (124). Meme rekonstrüksiyonunun hastaların yaşam kalitelerine ve psikolojilerine yaptığı olumlu katkılar araştırmalar ile ortaya konmaktadır (125). Hastaların rekonstrüksiyonun zamanlaması açısından mastektomi ile eşzamanlı rekonstrüksiyonu tercih ettikleri bilinmektedir. Ancak inflamatuvar meme kanseri ve lokal ilerlemiş meme kanserlerinde halen geç rekonstrüksiyon önerilmektedir (126). Rekonstrüksiyon seçenekleri arasında teknik olarak daha basit ve daha hızlı iyileşme süreci olan implant ile rekonstrüksiyon yöntemleri yada daha doğal ve tatmin edici estetik sonuçları ile pediküllü yada serbest flepler ile otolog doku rekonstrüksiyonları yer almaktadır (127, 128).

2.2.1. Doku Genişleticiler/İmplant ile Rekonstrüksiyon

Alloplastik rekonstrüksiyon ile otolog doku transferlerinde karşılaşılan donör saha morbiditesini görmeden ve ek skar oluşturmada daha az invazif bir cerrahi ile oldukça tatmin edici bir meme şekli elde etmek mümkün olmaktadır. Alloplastik rekonstrüksiyon özellikle simetri sağlamanın daha kolay olacağı bilateral rekonstrüksiyon ihtiyacı olan nisbeten küçük memeli hastalar için daha iyi bir tercih olabilmektedir (129, 130).

İmplant ile doku rekonstrüksiyonuna 1960’larda meme implantlarının kullanıma girmesi ile başlanmıştır. 1980’lerde doku genişleticilerin de kullanıma girmesi ile meme rekonstrüksiyonunda implantların kullanımı yaygınlaşmıştır (131).

Alloplastik rekonstrüksiyon tek aşamalı yada iki aşamalı olarak yapılabilir. Yapılan mastektomi sonrası cildin korunabildiği özellikle küçük göğüslü kadınlar tek aşamalı implant ile rekonstrüksiyon için uygun adaylardır. Mastektomi sırasında yerleştirilen implant ihtiyaç halinde şişirebilir portlu bir implant da olabilir. Bu durumda istenilen ölçülere şişirme işlemi sonrası ulaşılır ve port çekilerek çıkarılır. Mastektomi sonrası yeterli cildi kalmamış hastalarda tek aşamalı implant ile rekonstrüksiyonu düşünmemek gerekir.

Cilt eksikliği olan hastalarda alloplastik materyal ile rekonstrüksiyon düşünülüyor ise tercih doku genişletici yönünde olmalıdır. Şişirme işlemi sonrası istenilen hacimde cilt zarfı elde edildikten sonra kalıcı implant yerleştirilebilir.

Rekonstrüksiyon amacı ile yerleştirilecek olan alloplastik materyalin mastektomi sırasında oldukça inceltirilmiş olan meme cildinin altına direkt olarak konması uygun olmamaktadır. Bu nedenle implant mutlaka kas dokusu ile örtülmelidir. Bunun için geleneksel olarak implantın süperomedialini kapatacak şekilde pektoralis major kasının total diseksiyonu, açıkta kalan inferolateral bölge için de serratus anterior kas diseksiyonu uygulanmaktadır. Günümüzde serratus kasının kaldırılması yerine dermal matriks eşdeğerlerinin kullanımı popülerleşmektedir.

Modern doku genişleticiler ve implantlar daha az kapsüler kontraksiyon ve migrasyona neden olan pütürlü yüzey ile üretilmektedirler. Doku genişleticiler yerleştirildikten ortalama iki hafta sonra şişirme işlemine başlanır ve doku genişleticinin maksimum volümünün biraz üzerine kadar şişirmeye çalışılır. Kalıcı implant şişirme işlemi yada adjuvan tedavinin bitiminden en az 4 hafta sonra yerleştirilmelidir.

Meme kanseri tedavisinde ki gelişmeler ile cerrahiye ek olarak sıklıkla adjuvan kemoterapi ve radyoterapi verilmeye başlanmıştır. Bu da giderek daha fazla rekonstrüksiyon yapılan hastaya radyoterapi yapılacağı anlamına gelmektedir (132). Yapılan çalışmalar radyoterapinin implant ile rekonstrüksiyon yapılmış hastalarda komplikasyon riskini arttırdığını ancak genel hasta memnuniyetinin yine de yüksek olduğunu ortaya koymaktadır (132). Özellikle genç yaşta rekonstrüksiyon ihtiyacı oluşmuş hastalara, silikon implantların zaman içinde klinik bulgu vermeksizin yırtılma yada uzun dönemde

kapsül kontraksiyonu geliştirme riski taşıdığı ve bu istenmeyen durumların tedavisinin yeniden cerrahi ile implantın değiştirilmesi ve/veya kapsülektomi olduğu hatırlatılmalıdır.

2.2.2. Otolog Doku ile Meme Rekonstrüksiyonu

Otolog meme rekonstrüksiyonunda tarihsel olarak en büyük gelişme halen meme rekonstrüksiyonunda en çok tercih edilen flep olarak kabul edilen TRAM flebin Hartrampf tarafından 1982 yılında tanımlanmasıdır (1). Otolog rekonstrüksiyonda en sık kullanılan flepler; pediküllü yada serbest TRAM flep, latissimus dorsi kas-deri flebi, derin inferior epigastrik arter perforatör (DIEP) flebi ve Rubens flebidir.

Otolog meme rekonstrüksiyonu halen alloplastik materyaller ile yapılan rekonstrüksiyonların sayıca gerisinde olmasına rağmen hastanın kendi dokusunun kullanılmasına bağlı önemli avantajlar sunmaktadırlar. Otolog meme rekonstrüksiyonu ile benzer doku benzer doku ile onarılmış ve daha iyi bir kozmetik sonuç ve hasta tatmini sağlanmış olur (133). TRAM flep gibi abdominal sahadan doku transferi gerektiren flepler abdominoplastinin getirdiği estetik artıları ile hastalar tarafından daha çok tercih edilebilmektedir. Alloplastik materyallere karşı uzun dönemde ortaya çıkabilecek yan etkilerin (kapsüler kontraksiyon, yabancı cisim reaksiyonu) otolog doku rekonstrüksiyonlarında görülmemesi genç hastalarda otolog doku rekonstrüksiyonun seçilmesinde ayrı bir nedendir.

TRAM Flep:

TRAM flep Hartrampf tarafından tanımlandığından beri, taşıdığı cilt kapasitesi, sağladığı volüm, özellikle pitotik olabilen diğer meme ile sağladığı simetri, doku uyumu ve yumuşaklığı açısından halen benzeri tanımlanmamış bir fleptir.

TRAM Flep Tipleri:

İki ana gruba ayrılabilir; pediküllü ve serbest flepler. Pediküllü flep, süperior epigastrik arterin rektus kasına girmesi ve alt abdominal dokulara kastan direkt çıkan perforatörler vermesi ile beslenir. Serbest flepler ise derin inferior epigastrik arter sisteminden ve süperfisyal inferior epigastrik sistemden beslenirler.

Abdominal duvar bütünlüğünün daha az bozulduğu ve donör alan riskini azalttığı teorisi üzerine kurulu rektus kasının lateral ve/veya medial perforatörlerinin korunmasının amaçlandığı kas koruyucu TRAM flep tipleri tanımlanmıştır. Kas koruyucu TRAM flepler kas korunma ve diseksiyon oranlarına göre 4 gruba ayrılırlar (Tablo 2.2), (134).

Tablo 2.2. Kas koruyucu TRAM flep tipleri (134)

MS: Muscle sparing (Kas koruyucu), DIEP: Derin inferior epigastrik arter perforatör, SIEA: Süperfisyal inferior epigastrik arter

MS-0: Tam kalınlıkta ancak kısmi uzunlukta kas dokusu flebe dahil edilir.

MS-1 ve MS-2: sırası ile daha az kas dokusu flebe dahil edilir.

MS-3 (DIEP): Hiç kas dokusu içermez ancak kısmi kas diseksiyonu ve interkostal sinir harabiyeti ile sonuçlanır.

MS-4 (SIEA): Hiç kas dokusu içermediği gibi kas diseksiyonuna da gerek yoktur.

Hangi TRAM Flep Seçilmeli:

Burada en önemli etken cerrahın hangi tekniğe daha çok alışık olduğudur. Mikrocerrahi ameliyatlarını sıklıkla yapmayan bir cerrah pediküllü flebi tercih edebilir. On paket/yıldan fazla sigara tüketenler, fazla kilolu yada obez hastalar yüksek riskli kabul edilmekte ve bu hastalar için daha fazla flep perfüzyonu sağlayan ve rektus kasına daha az zarar veren serbest flep seçenekleri uygun olabilir (135).

Pediküllü TRAM Flep:

Meme rekonstrüksiyonunda serbest abdominal flepler özellikle de DIEP flep giderek popülerleşmesine rağmen pediküllü TRAM flep halen pek çok rekonstrüktif cerrah için tercih edilen TRAM flep tipidir. Pediküllü TRAM flebin tercih edilen bir flep olmasının nedenleri arasında flebin güvenilirliği, varyasyon göstermeyen pedikül varlığı, kolay ve hızlı diseksiyon yapılabilmesi, mikrovasküler cerrahi gerektirmemesi gibi özellikler sayılabilir.

TRAM Flep Avantajları ve Dezavantajları:

Pediküllü yada serbest TRAM flepler mastektomi ile eş zamanlı (immediate) yada geç rekonstrüksiyonlarda diğer pitotik meme ile simetri sağlanmak istendiği durumlarda güvenle tercih edilebilir. Alloplastik materyallere kıyasla çok daha uyumlu, yumuşak ve

uzun dönemde estetik açıdan olumlu sonuçlanan bir rekonstrüksiyon seçeneği sunarlar ve yaşlanması da diğer meme ile benzer olmaktadır.

Basit ancak geniş bir alanın diseksiyonunu gerektirmesi, özellikle adaptasyon sırasında modifikasyonlar gerektirmesi ameliyat süresini prostetik seçeneklere göre daha uzun kılmaktadır. Ayrıca donör sahada meydana gelebilen; abdominal duvarda güçsüzlük, fıtıklaşma yada şişkinlikler yada abdominal skarın estetik cerrahidekilerden daha süperiorde konumlanması dezavantajları arasında sayılabilir. TRAM flep elevasyonu sırasında daha çok kas korunması ile daha az abdominal duvar gevşekliği ve fıtıklaşma görülmektedir (136). Daha çok kas korunma şansı olan serbest TRAM tekniklerinin pediküllü TRAM tekniklerine bu açıdan bir avantaj sağladığı düşünülmektedir. Bu bulgulara rağmen pedikül flep tercih edilen hastaların rahatlıkla günlük aktivitelerine eskisi gibi dönebildikleri görülmektedir (137). Doğru endikasyonlar ile doğru hastalarda tercih edildiği takdirde pediküllü TRAM fleplerin hiç kas hasarı yapılmadan eleve edilen serbest fleplere göre abdominal herni yada şişlik oluşması açısından farklı sonuçları olmadığı ortaya konmuştur (138).

Yağ nekrozları, parsiyel yada total flep kaybı pediküllü yada serbest TRAM fleplerde görülebilmektedir. Eski sigara içicileri yada cerrahi öncesinde ve sonrasında içmeye devam eden hastalar, çok kilolu yada obez hastalar flep morbiditesi açısından riskli hastalardır.

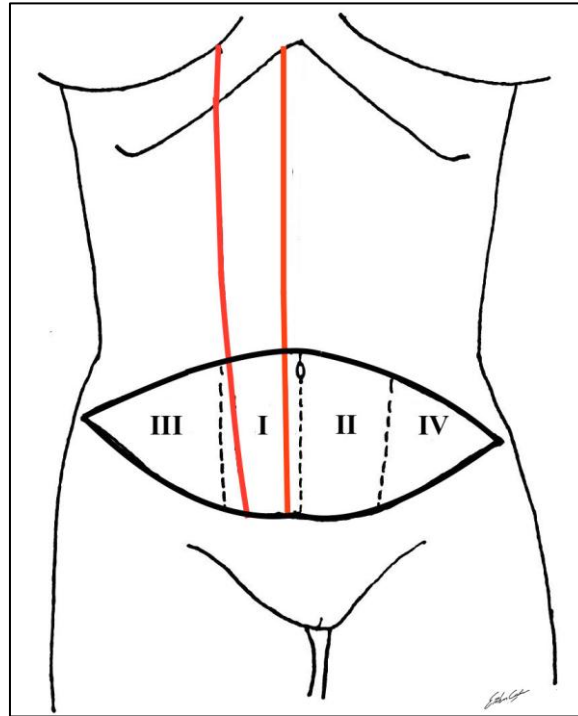
TRAM Flep Anatomisi:

Rektus abdominis kası simfizis pubis ve pubik krestten başlar ve 5, 6 ve 7. kosta kartilaj ve ksifoide yapışır. Kasın supraumbilikal kısmı düzenli olarak tendinöz yapılarla transverse planda kesintiye uğrar. Bu bölgelerde anterior rektus kılıfının fasyası sıkıca kasa yapışmıştır. Bu tendinöz yapılar embriyolojik gelişim sırasındaki miyotomların segmental dağılımına karşılık gelir ve genellikle 3 tanedir. Rektus abdominis kasının fasyası, kasın başlangıcında daha sert ve fibroz yapıdadır ve arkuat hat düzeyinde giderek inceler. Arkuat hattın altında posterior rektus kılıfı yoktur. Anterior rektus kılıfı, spina iliaka anterior süperior düzeyinin üzerinde 3 kasın aponevrozlarının birleşmesi ile oluşur. Arka tarafta kılıf yoktur ve kas doğrudan fasya transversalisin üzerindedir. Bu yüzden kas arkuat hattın altında peritoneal boşluktan, fasya transversalis, periton ve değişik miktarda ekstraperitoneal yağ dokusu ile ayrılır. Rektus kası ve kılıfının bir kısmının transpozisyonundan sonra karın duvarı defektini onarabilmek için bu anatomik ayrıntıların iyi bilinmesi gerekir.

Rektus kasının arka yüzeyinde boydan boya seyreden süperior ve inferior apigastrik damarlar beslenmeyi sağlarlar ve paraumblikal bölgede ince kollateraller yardımıyla anastomoz yaparlar. Paraumblikal pleksustan çıkan perforan arterler cilde doğrudan kan akımı sağlarlar. Dokunun infraumblikal kıvrımına asıl kan akımını sağlayan süperior değil inferior epigastrik damarlardır.

Tek Pediküllü TRAM Flepte Perfüzyon Zonları:

Tek pediküllü TRAM flebin cilt adası 4 perfüzyon zonuna ayrılır. Zon I flep ile eleve edilen kasın hemen üzerine konumlanan cilt zonunu, zon II ise diğer rektus kasının üzerindeki cilt zonunu ifade eder. Zon III, zon I'e komşu olan lateral zonu, zon IV ise zon II'ye komşu olan lateral zonu ifade eder (Şekil 2.5). Dolayısı ile özellikle zon I ve zon II beslenme açısından en güvenilir bölgelerdir. TRAM flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik pek çok çalışma beslenme sorunlarının yaşanabildiği zon III ve zon IV'ün güvenilirliğini arttırmaya yönelik yapılmaktadır.



Şekil 2.5. TRAM flep perfüzyon zonları

2.2.3. Sıçanda TRAM Flep Modeli

Sıçanlarda rektus abdominis kas ve deri flebi modelleri 1993 yılında 2 farklı ekip tarafından tarif edilmiştir (139,140).

Basit omurgalı gevşek derili hayvanların cilt vasküler dağılımları insanlardan oldukça farklı olduğu için bu hayvanlarda geliştirilen flep modelleri ile alınan sonuçların insanlara uyarlanması hep tartışma konusu olmuştur. Ancak yine de bu hayvanlar üretimlerinin kolay ve hızlı oluşu ve düşük maliyetleri nedeniyle halen pek çok araştırmada ilk tercih olmaktadır.

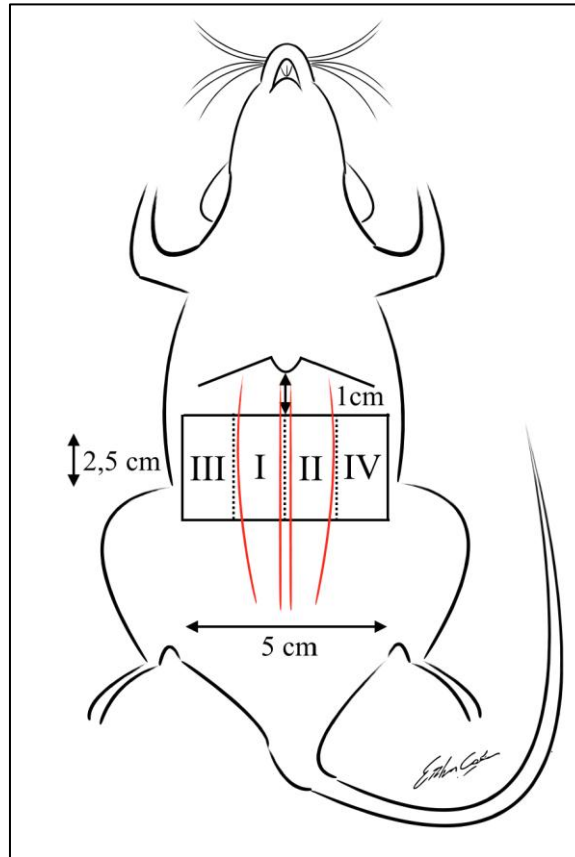
Yapılan anatomik çalışmalarda, rat rektus abdominis kasının beslenme paterninin ve cilt zonlarının perforatörlerle besleme şeklinin ortaya konması bu flebin gerçek bir muskulokutan flep olduğunu göstermiştir. Bu özellikleri ile insan rektus abdominis kası ve cilt adası ile oldukça fazla benzerlik göstermektedir (141).

Sıçanlarda rektus kasları iki adet olmak üzere kranialde birinci kostaya, klavikulanın medial 1/3'üne ve sternuma, kaudalde ise pubik simfisize tutunarak tüm abdominal duvarı kat etmiş olur. İnsandakine benzer şekilde süperior ve inferior epigastrik arterlerin kas fasyası altında flow-through anastomozlar yapması ile beslenir. 0,45 ve 0,5 mm çaplarındaki süperior epigastrik arter ve ven inferior epigastrik arter ve vene göre insan anatomisinin tam tersi olarak daha dominanttır (139). Her bir rektus abdominis kasından 3 ile 5 arasında gerçek muskulokutan perforatör arter çıkarak üzerindeki cilt sahasını besler (141).

Zhang ve arkadaşları deneysel mikrovasküler bir kas ve muskulokutan flep tarif edebilmek amacı ile süperior epigastrik arter bazlı rektus kas flebini ve rektus muskulokutan flebini kullanmışlardır. Muskulokutan flebin cilt adası 3,5 cm'e 1,2 cm olarak tasarlanmıştır. Serbest flep olarak tasarlanan flepler (kas ve muskulokutan) kasık bölgesine anastomoz edilmiş ve kas fleplerinin %100'ü muskulokutan fleplerin %67'si yaşamıştır (139). Dunn ve arkadaşları ise aynı yıl ilk kez ratlarda inferior epigastrik arter bazlı rektus muskulokutan flebi modelini tanımlamışlardır. Karşılaştırmalı olarak yaptıkları çalışmada süperior epigastrik bazlı muskulokutan flebin cilt adasının %97 oranında yaşadığını inferior epigastrik bazlı muskulokutan flebin ise cilt adasının %77 yaşadığını ortaya koymuşlardır (140). Zhang ayrıca metilen mavisi kullanarak rektus kasından cilde

gelen muskulokutan perforatörlerin vertikal planda kostal hattan başlayarak 3 cm kadar kaudele uzandığını, horizontal planda ise her iki tarafta klavikular çizgiyi 5mm geçtiğini göstermiştir. Bu bilgi ratlarda rektus muskulokutan flebinin cilt zonunun belirlenmesini sağlamıştır (139).

1994 yılında Özgentaş ve arkadaşları ratlarda tanımlanmış olan rektus muskulokutan flebini insanlardaki TRAM flebe uyarlamak için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada farklı gruplar oluşturularak süperior ve inferior pediküller üzerinden 10x3cm boyutlarında cilt adası içeren rektus muskulokutan flepler kaldırılmıştır. Ayrıca 5 cm eninde planlanan tüm fleplerin laterallerde bir miktar cilt nekrozu gösterdiği ortaya konmuştur. Sefalik yerleştirilmiş inferior epigastrik arter pediküllü fleplerde en fazla cilt nekrozu görmüşler ve bu nedenle TRAM flep çalışmalarında kullanılması için en uygun dizaynın bu olduğunu öne sürmüşlerdir (142). Daha sonra rat TRAM flep modeli ile yapılan pekçok çalışmada bu bilgi dikkate alınarak muskulokutan flep cilt üst sınırı ksifoidin 1 cm altında olacak şekilde cilt adası vertikal olarak 2,5 cm, horizontal olarak 5 cm olacak şekilde dizayn edilmiştir (8, 143, 144), (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Sıçan TRAM flep modeli çizimi ve perfüzyon zonları

2.3. Abdominoplasti

2.3.1. Abdominoplastinin Tarihi Gelişimi

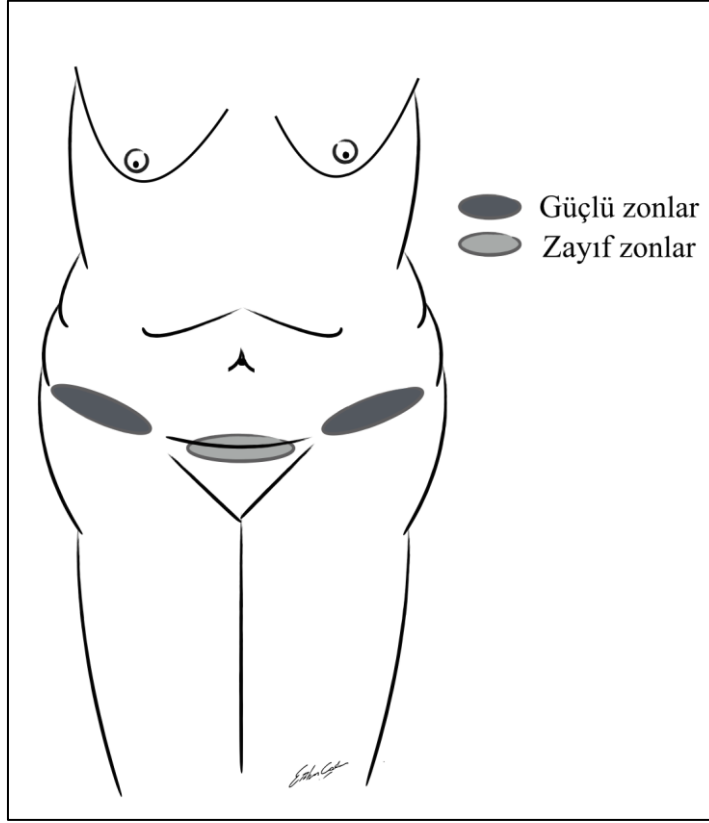
Yirminci yüzyılın başlarında başlanan bu prosedürlerin o zamanki amacı sarkık abdominal pannikulusları cerrahi olarak almaktı. Bu işlemlerde estetik kaygılara önem verilmezdi. 1950'lerden sonra abdominoplastide meydana gelen gelişmeler ile skarın yeri ayarlanmaya, abdominal duvar plikasyonlarına ve umblikusun yeniden pozisyonlanmasına başlandı.

2.3.2. Cerrahi Bölge Anatomisi

Karın ön duvarı yağları süperfisyal bir fasya (skarpa fasyası) ile ayrılan, süperfisyal ve derin yağ tabakalarından oluşur.

Karın ön duvarının vasküler beslenmesi ana olarak rektus kasını besleyen süperior ve inferior epigastrik arter sistemlerinden kası perfore ederek cilde uzanan arterler ile olmaktadır. Abdominoplasti ameliyatlarında bu perforatör arterler flep elevasyonu sırasında koparılır ve karın ön duvarının beslenmesi ikincil öneme sahip olan lateral interkostal, subkostal ve lumbar damarlar ile sağlanır.

Alt karın bölgesinde kas dokusu ile cilt arasında tutunmayı ve stabilizasyonu sağlayan fasyal bağlantılar mevcuttur. Bu bağlantılar sayesinde bu bölgedeki cilt, alttaki kas dokusuna sıkıca tutunur ve cildin şekli korunmaya çalışılır. Önde, ortada ve laterallerde 3 adet tutunma zonu mevcuttur. Ortada olan mons pubisin hemen üstüne denk gelen zon gevşek bir tutunma sağlarken her iki inguinal bölgeden anterior süperior iliak spinelara kadar olan bölgede mevcut 2 adet lateral tutunma zonları daha sıkı bir tutunma sağlar (Şekil 2.7). Bu üç tutunma zonu abdominoplasti insizyon skarının son halini almasında önemlidir. Bu zonlara denk getirilen skar daha az yukarıya yer değiştirecek ve iç çamaşırı çizgisini geçmeyecektir.



Şekil 2.7. Alt karın bölgesinde kas dokusu ile cilt arasında tutunmayı ve stabilizasyonu sağlayan fasyal bağlantı zonları

2.3.3. Hastaların Geliş Şekilleri ve Hasta Seçimi

Abdominoplasti isteği ile başvuran hastalar minimal yağ fazlalığından gövdeyi çepeçevre saran yağlanmaya kadar cilt ve fasya gevşekliğinin de eşlik ettiği farklı derecelerde problemler ile gelebilirler.

Hastaların bizlere başvurusu anında değerlendirilmesi gereken 3 önemli nokta mevcuttur. Birincisi vücut kitle indeksidir. İkinci değişken yağlanma şeklidir. Yağlanma şekillerini genetik faktörler belirlemektedir. Kadınlarda yağlanma genellikle infraumblikal, bacak lateral, kalça ve bacak iç yüz bölgelerinde olmaktadır. Erkeklerde ise daha sıklıkla yağlanma bel, infraumblikal, ve intraabdominal bölgelerde olmaktadır. Üçüncü önemli nokta ise cilt kalitesi ve sarkıklık derecesidir. Orta düzeyde yağlanma ve abdominal duvarda karın cildinde gevşeklik olmayan hastalarda abdominoplasti yerine sadece liposakşın uygun bir tercih olacaktır. İnfraumblikal bölgede yağlanma ve karın duvarında ve ciltte gevşeklik olan hastalar mini abdominoplasti için uygun hastalardır. Karın ön

duvarında hem infraumblikal hem de supraumblikal bölgelerde yağlanma, cilt ve karın ön duvarında sarkıklık ve gevşeklik olan hastalar standart abdominoplasti ameliyatından faydalananak hasta tipleridir.

Abdominoplasti ameliyatı uzun ve büyük bir sahanın diseksiyonunu gerektiren bir ameliyattır. Kalp, akciğer hastalıkları yada diyabet gibi sistemik hastalıkları olan hastalara ameliyattan önce gerekli değerlendirilmeler yapılmalı ve önlemler alınmalıdır. Ciddi sigara içiciliği ameliyatın doğası gereği bozulmuş olan abdominal cilt flebi dolaşımını daha da kötüleştirerek ciddi doku nekrozlarına neden olabilir.

Karın ön duvarında istenilen düzleşmenin sağlanamayacağı intra abdominal yağlanmanın çok olduğu hastalarda abdominoplasti iyi bir seçenek olmayabilir.

2.3.4. Cerrahi Teknik

Çizim ameliyat öncesi hasta ayakta iken yapılır. Öncelikle alt insizyon orta hattı doğal suprapubik katlantıya gelecek şekilde çizilir ve insizyon çizimi laterallere doğru uzatılır. Kimi cerrahlar lateral insizyonları biraz yukarı doğru anteor superior iliak spinelara (ASIS) doğru uzatırlarken kimileri daha düz bir şekilde laterallere doğru uzatırlar. Genel olarak bu çizimi ASIS'in ilerisine taşırmamaya özen gösterilir ancak burada daha da önemli olan köpek kulağı oluşumunu engellemektir. Bu nedenle gerekirse insizyon uzatılmalıdır. Alt insizyon çizildikten sonra hastanın öne doğru eğilmesi istenerek fazla karın cildi sıkılarak üst insizyonun geleceği mesafe belirlenmeye çalışılır.

Ameliyata başlandığında umblikus çevresine yuvarlak bir insizyon yapılır ve kas fasyasına kadar diseksiyon yapılarak umblikus ciltten ayrılır. Alt insizyon yapılarak ortada ksifoid laterallerde kostal sınırlara kadar karın duvarı elevasyonu yapılır. Flep klasik olarak kas fasyası seviyesinden gidilerek kaldırılrsa da pek çok plastik cerrah biraz daha yüzeysel bir seviye olan skarpa fasyası üzerinden flebi eleve etmektedir. Bunun amacı seroma oluşmasının azaltılmasıdır. Bununla ilgili ispat edilmiş bir mekanizma gösterilememiş olmasına rağmen subskarpal yağ dokusunda sağlam olan lenfatiklerin seromayı daha çabuk abzorbe edebildiği öne sürülmektedir. Ayrıca flep cilt altı yağının fasya üzerinde bırakılan bu yağ tabakasına daha çabuk tutunduğu düşünülmektedir. Abdoinal flep kraniale doğru ne kadar çok diseke edilir ise o kadar çok fazla cilt eksize edilerek flep suprapubik bölgeye

ilerletilebilir. Ancak bu özellikle ön abdominal duvar beslenmesinde önemli olan süperior epigastrik arter perforatörlerinin çoğunun kesilmesi sonucu dolaşımın sadece lateral interkostal, subkostal ve lumbar damarlardan gelen kan akımına bağımlı olacağı anlamına gelir. Bunu önlemek adına bazı cerrahlar ksifoid seviyesinde geniş bir diseksiyon yerine sadece rektus plikasyonuna izin verecek kadar bir diseksiyon yapmayı tercih etmektedirler. Flep elevasyonu yeterli rektus plikasyonuna ve yeterli flep ilerletilmesine izin verecek kadar yapılmalı ve daha fazla gereksiz elevasyondan kaçınılmalıdır. Son olarak hastanın gövdesi fleksiyona getirilerek abdominal flep suprapubik bölgeye yaklaştırılır, umblikusun yeni yeri belirlenerek yapılan insizyon içine alınır ve sütüre edilir. Abdominal insizyon kapatılırken en önemli tabaka olan skarpa fasyası seviyesine ilk sütürler konularak kademeli bir onarım yapılır. Drenler yerleştirilir ve karın ön duvarına kompresyon yapan bir korse giydirilir.

2.3.5. Abdominoplasti Komplikasyonları

Abdominoplasti sonrası görülebilen en sık komplikasyonlar yüzeysel yara iyileşmesi problemleridir. Bunun yanında özellikle fasya seviyesine konan sütürlerin gevşemesine bağlı yara ayrılması görülebilir. Bunu önlemek adına hastalara 5-7 gün süre boyunca gövdeyi fleksiyonda tutacak şekilde mobilizasyon önerilmektedir. Sonraki 7 günlük sürede normal dik gövde pozisyonuna kademeli olarak geçilmelidir.

Yine sık görülen başka bir komplikasyon ise seroma oluşmasıdır. Yüksek vücut kitle indeksi (Body Mass Index-BMI) ile başvuran hastalarda seroma oluşma riski biraz daha yüksektir. Dren yerleştirilmesi, kompresyon uygulayan korselerin giydirilmesi ve karın flebini fasyaya tespitleyen sütürlerin konması seroma oluşmasını azaltabilir. Yine de oluşur ise seri aspirasyonlar ile tedavisi gerekebilir (145).

Ciltte nadiren görülen basit selülitin en sık nedeni seroma oluşumudur. Yakın takip ve uygun antibiyotik kullanımı ile tedavi edilebilir. Abdominoplasti sonrası özellikle flebin en uç noktası olan inferomedialinde bozulmuş doku dolaşımına bağlı doku nekrozu oluşabilir. Flep adaptasyonu sırasında fazla gerginlik oluşması, abdominal flebin fazla inceltilmesi, agresif liposakşın yapılması, lateral kan dolaşımını bozan kolesistektomi insizyonu gibi durumların varlığı dolaşım bozukluğuna neden olabilecek nedenler arasında sayılabilir.

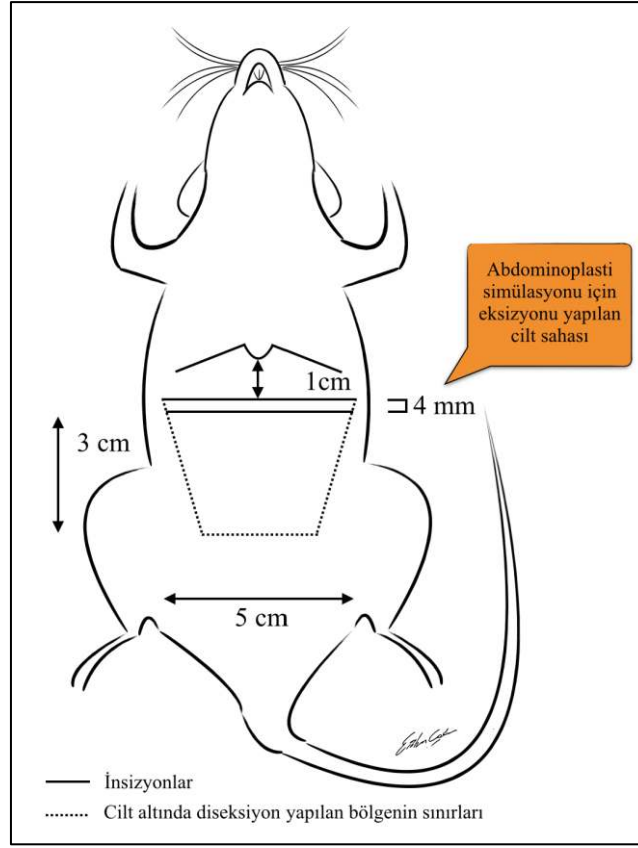
Nekroz oluştuğu takdirde konservatif tedavi uygulanmalı hasta yakın takip edilerek sekonder iyileşme sağlanmalıdır. Daha sonra skar revizyonu yapılması gerekebilir.

Karın ön duvarı plikasyonu ve cildin gergin bir şekilde kapatılması karın içi basıncını arttırmakta dolayısı ile alt ekstremitte venöz basıncını da arttırmaktadır. Kanın yavaş hareket etmesinin alt ekstremitede muhtemel derin ven trombozuna yada pulmoner emboliye neden olabileceği varsayılmaktadır. Bu durumun oluşmasını engellemek için hastalara varis çoraplarının giydirilmesi ve hastaların erken harekete geçirilmesi önemlidir. Bazı cerrahlar ameliyata başlamadan önce hastalara profilaktik olarak düşük molekül ağırlıklı heparin uygulaması yapmaktadırlar.

2.3.6. Sıçanda Abdominoplasti Modeli

Hallock abdominoplasti sonrası TRAM flep yaşayabilirliğini araştırdığı deneyesel model ile ilk kez ratlarda abdominoplasti modelini tarif etmiştir. Bu modelde abdominoplasti insanda olduğu gibi kaudalden kraniale doğru yapılmıştır. Ardından süperior pediküllü kaldırılan TRAM fleplerin yaşayabilirliği sorgulanmıştır (6).

İnsanda pediküllü TRAM flep her zaman daha zayıf olan süperior epigastrik arter üzerinden eleve edilir. Sıçanlarda ise TRAM flep modelinde süperior pedikülün dominant olduğu, süperior pediküllü olarak kaldırılan TRAM fleplerin cilt adasının çok yüksek oranda yaşayabildiği bilinmektedir (140). Bu nedenle biz çalışmamızda insanlardaki bu durumu simüle edebilmeyi ve aynı zamanda TRAM flep cilt zonunun bir kısmının nekroza gitmesini istediğimiz için sıçanlarda inferior epigastrik arter pediküllü TRAM flep yapmayı planladık. TRAM flep öncesinde yapılacak olan abdominoplasti modeli de orjinalinde olduğunun tam tersi yönde, kranialden kaudale doğru dizayn edilmiştir (144). Bu modelde sternal notch işaretlendikten sonra 1 cm kaudale inilerek 5 cm'lik horizontal bir çizim yapılır. Bu çizgiden kaudale 3 cm daha inilerek 2 cm uzunluğunda bir çizim yapılarak, bu çizimler laterallerde oblik çizimler ile birleştirilir. İnsizyonlar ve karın ön duvarının kaldırılması bu çizimlere uygun olarak gerçekleştirilir. Son olarak abdominoplastinin simülasyonu için 5 cm'lik insizyon hattından 4 mm'lik bir cilt elipsi eksize edilir (şekil 2.8).



Şekil 2.8. Ratlarda abdominoplasti çizimi; insizyon yeri, diseksiyon sahası ve cilt eksizyonu alanının gösterilmesi

2.4. Kök Hücreler

2.4.1. Genel Bilgiler

Kök hücreler, köken aldıkları dokuya ve differansiye olma kapasitelerine göre sınıflandırılan kendini yenileme, farklı hücre tiplerine dönüşebilme kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu özelliklerinden ötürü iyileştirici tıpta sınırsız kullanım potansiyelleri mevcuttur.

Günümüzde tedavisi yapılamayan hastalıkların çoğu, bazı hücre, doku ve organların geri dönüşümsüz olarak yapısal ve işlevsel hasarlar görmüş olmasından kaynaklanmaktadır. Bu tarzda hastalıkları (Tip 1 diyabet, multiple skleroz, alzheimer, amyotrofik lateral skleroz, omirilik hasarı, duchenn musküler distrofisi gibi) iyileştirmek adına hasar gören hücre, doku veya organların biyolojik işlevlerini yerine koymayı (rejeneratif tıp) ya da tamir etmeyi (reparatif tıp) mümkün kılacak yöntemler araştırılmaktadır.

Vücudun kendini yenileme ve/veya hastalanmış doku yada organları kendi keline onarabilme potansiyeli iyileştirici tıp alanında yapılan çalışmalar ile anlaşılmaya başlamıştır.

Kök hücre biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve kök hücrelerin dokudaki etkilerinin daha iyi kontrol edilmeye başlanması ile pek çok hastalıkta kök hücre tedavilerinin etkili kullanımları mümkün olabilir.

Kök hücre çalışmalarının tarihsel gelişimine bakıldığında zaman ilk çalışmalar hücre düzeyinde olmayıp embriyolar üzerinde yapılmıştır (146-149). Farklı embriyoların bir araya getirilerek melez bir embriyo oluşturulması yada blastokist safhasındaki hücrelerden alınan tek bir hücre ile yeni bir embriyo üretilerek deneylerde kullanılması ve bu işlemlerin insan embriyolarına da uygulanmak istenmesi pek çok etik sorunu beraberinde getirmiştir (150). Halen çözülmemiş etik sorunları ile kök hücre araştırmaları pek çok ülkede tartışma konusu olmaktadır. Daha yakın zamanda yeni bir embriyo oluşturma özelliği taşımayan (totipotent) ancak pek çok farklı hücre tipine dönüşebilen (multipotent) yetişkin kök hücrelerin keşfi ile bu etik sorunların üstesinden gelinebilmiş ve araştırmalar genel olarak bu alanda ilerletilmeye başlamıştır.

2.4.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Farklı ancak aynı zamanda iç içe geçmiş sınıflamalar mevcuttur. Sınıflandırma sistemleri sürekli yeni buluşların gerçekleştiği kök hücre çalışmalarında yetersiz kalmaktadır. Genel olarak farklı hücrelere dönüşebilme potansiyellerine (plastisite) göre sınıflandırmak mümkün olmaktadır.

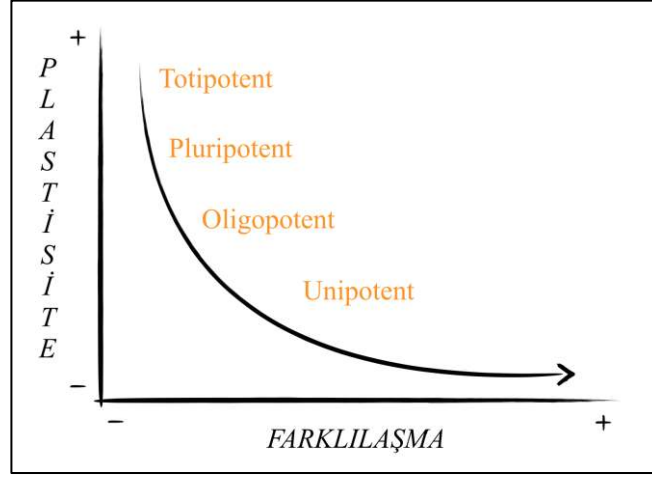
Totipotent Kök Hücreler: Fertilizasyon sonucu oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek fizyolojik güce sahiptir. Döllenmeden sonraki ilk 4 gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücrelerdir ve her bir hücre ayrı bir organizmayı oluşturabilecek güce sahiptir. Embriyonik kök hücreler, somatik çekirdek hücre transferi ile oluşturulan kök hücreler bu sınıfa dahil edilebilir.

Pluripotent Kök Hücreler: Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren meydana gelen hücreler küresel bir şekil alarak blastokisti oluştururlar. Blastokistin iç yüzeyini döşeyen bu hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen tek başlarına organizmayı bir bütün olarak oluşturacak güce sahip değildir. Bu tip hücrelere pluripotent hücreler denilir. Organizmanın differansiye olmuş yetişkin hücrelerinin bazı transkripsiyon faktörlerinin uyarısı ile undifferansiye kök hücrelere dönüştürülmesi ile oluşturulan ‘uyarılmış pluripotent kök hücreler’ de bu sınıfa dahil edilebilir.

Multipotent Kök Hücreler: Tüm hücre tiplerine dönüşme gücü olmayan ancak benzer pek çok hücre tipine dönüşebilen kök hücreleri ifade eder. Yetişkin kök hücre sınıfına giren mezenkimal kök hücreler multipotenttir. Mezenkimal kök hücrelerin, kemik, adiposit, kondrosit, endotel gibi farklı hücre tiplerine dönüşebildiği gösterilmiştir.

Oligopotent Kök Hücreler: Lenfoid ve myeloid hücrelerde olduğu gibi sadece birkaç hücre grubunu oluşturabilen kök hücrelerdir.

Unipotent Hücre: Genellikle bulunduğu dokuda meydana gelen hasarları düzeltmekle görevli olan tek bir hücre tipine dönüşebilen kök hücrelerdir. Dokuya özel kök hücreler bu sınıfta yer alırlar (Şekil 2.9), (151).



Şekil 2.9. Kök hücrelerin farklılaşma özellikleri ve plastisitelerine göre sınıflandırılması (151)

2.4.3. Rejeneratif Tıbbın Kısa Tarihçesi

Rejenerasyon Fikrinin Doğuşu:

1901 yılında Thomas Morgan rejenerasyon ile ilgili mevcut bilgileri kendi gözlemleri ve yaptığı deneyler ile bir araya getirerek 'Regeneration' isimli kitabını yayınlamıştır (146). Morgan genel olarak çalışmalarını ilkel omurgasızların ve bitkilerin kendilerini rejenere etme kapasiteleri üzerine yoğunlaştırmıştır. Morgan gelişim sürecini açıklamada evrim teorisi üzerine teoriler üreten bilim adamlarına karşı çıkarak teorilere güvenilemeyeceğini ve vücudun kendini iyileştirme yada geliştirme süreçlerinin deneysel olarak izlenmesiyle gelişim sürecinin anlaşılabilirliğini savunmuştur. Kitabında önce organların gelişimsel süreçlerine değinmiş daha sonra greftlerden bahsetmiş, hücre ve dokuların hassas yapılarını incelemiştir (146). Morgan'ın bu çalışmaları günümüz rejeneratif tıbbına öncülük yapması adına değerli bulunmaktadır.

Klonlama:

1938 yılında Spemann daha önce yapılmış doku transplantasyonlarına gönderme yaparak aynı işlemi hücre nükleusu ile yapmayı ilk kez gündeme getirmiştir. O zaman için bu yöntem klonlama olarak adlandırılmasa da daha sonra yapılan klonlama işlemi bu fikre dayanmaktadır (147).

Chimera Üretilmesi:

Charles E. Ford ve arkadaşları 1956 yılında sağlam bir farenin hematopoetik hücrelerini alarak ölümcül dozda radyasyon hasarına uğratılmış bir fareye enjekte etmişlerdir. Radyasyona maruz kalmış olan fare normalde mümkün gözükmeyen bir şekilde hayatta kalabilmiştir. Bu durum ‘normal bir canlıdan alınan belirli hücreler, başka bir canlıda yaşayabilir, yapısına katılabilir ve hatta işlevini yitirmiş dokularda yeniden işlev kazanabilir’ fikrini ortaya çıkarmıştır (148).

Mintz 1964 yılında, iki farklı fare embriyosundan blastomer safhasında alınan hücrelerin bir araya getirilerek, iki farenin de özelliklerini taşıyan yeni bir farenin üretildiği çalışmasını yayınlamıştır (149).

O dönemde bu çalışma biyoetik kurullarının çok fazla dikkatini çekmemiştir. Ancak iki farklı insan embriyosundan alınan hücrelerin bir araya getirilerek ikisinin de özelliklerini taşıyan yeni bir insan embriyosu üretilmesi fikri pek çok etik sorunu beraberinde getirmiştir (150).

Kök Hücreler:

Kök hücre konsepti ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında bitkiler ile yapılan çalışmalarda ortaya atılmıştır. Daha sonra 20. yüzyılın ortalarında hayvanlarda da benzer hücrelerin olduğu ortaya konmuştur (147). 1960’lardan sonra özellikle de kemik iliğinden alınan hematopoetik hücrelerin hasarlanmış dokularda iyileştirici etkilerinin ortaya konması ile bu tarzdaki hücrelere büyük bir ilgi duyulmaya başlanmıştır (148, 152). Farklılaşmamış hematopoetik hücrelerin gerekli olduğu ortamda farklılaşarak başka hücrelere dönüşebildiğinin anlaşılması üzerine araştırmacılar vücutta hasarlanan dokuların onarımından sorumlu olabilecek başka farklılaşmamış hücreleri araştırmaya başlamışlardır.

1950’lerde bir tütün şirketinin finanse ettiği sigaranın zararlı etkilerini araştırma amacı ile yürütülen çalışmalar sırasında şans eseri olarak fare embriyonel hücrelerinde pluripotent özellikler olduğu ortaya konmuştur. Stevens uzun yıllar süren çalışmasında fare blastokistinin iç tabaka hücrelerinden alınan hücreleri erişkin farelerin testislerine yerleştirmiş ve bu hücrelerin pekçok farklı hücre tipi içeren teratomlara dönüştüğünü göstermiştir (153). Beatrice Mintz ve Karl Illmense Stevens’in çalışmalarını bir ileriye taşıyarak embriyonik kök hücrelerin uygun koşullar altında sadece teratokarsinomlara

değil tamamen normal yeni bir embriyoya dönüşebildiğini göstermişlerdir (154). İn vivo ortamlarda gerçekleştirilen bu çalışmalardan sonra ilk kez 1981 yılında in vitro ortamda fare pluripotent kök hücreleri üretilenmiştir (155). İlerleyen yıllarda kök hücreler üzerine yapılan çalışmalar oldukça hız kazanmış ve özellikle genetik yapının kök hücreler üzerine olan düzenleyici etkileri ortaya konmaya başlanmıştır.

2.4.4. Embriyonik Kök Hücreler

Sperm ile ovumun birleşerek fertilizasyonun gerçekleşmesi ile meydana gelen organizmayı oluşturabilme yetisine sahip (totipotent) tek hücreye zigot adı verilir. Döllenmeyi takip eden ilk 4-5 gün boyunca bölünerek çoğalmaya başlayan hücrelerin tümü aynı güce sahiptir. Yaklaşık 5 gün sonra oluşan hücre kitlesine blastokist adı verilir. İşte bu safhadan itibaren blastokistin iç tabakasını oluşturan hücreler artık embriyoyu tek başına oluşturabilme kapasitesini yitirir (156). Embriyonik kök hücreler adı verilen blastokistin iç tabakasında bulunan bu hücreler organizmayı tek başlarına oluşturacak güce sahip değildir ancak vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilme (pluripotent) gücüne sahiptirler (157).

İnsan ve farelerin embriyolojik kök hücrelerinin başarılı izlasyonları sonrası in vitro ortamlarda uygun büyüme faktörleri varlığında kardiyomiyositlere, pankreatik hücrelere, hematopoetik hücrelere, nöron hücrelerine, kas hücrelerine, adipositlere, endothelial hücrelere, osteositler ve kondrositlere dönüşebilme kapasiteleri ortaya konmuştur (158-161).

Embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenileyebilme ve her türlü farklı dokuya dönüşebilme kapasiteleri hücre yenileme yada yapım çalışmaları için çok çekici olduğu gibi aynı özelliklerin regüle edilemeyen diferansiyasyon sonucunda teratom ve teratokarsinomlara neden olduğu bilinmektedir (162). Bir diğer sorun yaratan konu ise embriyonik kök hücrelerin kültüre edildikleri in vitro ortamlarda kullanılan destek hücrelerden kaynaklanan ve üretilen dokulara geçen immünojenik kalıntılardır (163). Bu teknik zorlukların dışında embriyonik kök hücre çalışmalarını en çok sınırlandıran unsur ise politik ve etik engellerdir.

Karşılaşılan bu engeller neticesinde embriyonik kök hücreler ile yapılan çalışmalarda gelişmeler oldukça yavaş ilerlemektedir. Bu nedenle, hücre bazlı rejeneratif tıp alanında yeni çalışmalar yapılabilmesi için alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur.

2.4.5. Yetişkin Kök Hücreler

Blastokist oluşumu ve embriyonik kök hücrelerin ortaya çıkışı sonrasında organizma gelişir ve natal dönem sona erer. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda postnatal dönemde de organizmada neredeyse tüm dokularda yenilenmeyi ve onarımı sağlayan hücrelerin varlığı ortaya konmuştur. Postnatal dönemde organizmanın uğradığı hasarları onarmak, belli dokularda yaşlanma sonucu yıpranmış hücrelerin yenilerini üretmek gibi amaçları olan kök hücrelere yetişkin kök hücreler denilmektedir.

Yetişkin kök hücrelerin en azından bulundukları dokuyu oluşturan hücrelere yada başka pek çok hücre tipine dönüşebilme yeteneği (multipotent) mevcuttur ancak tüm hücre tiplerini yada bir organizmayı tek başlarına oluşturacak güce sahip değildirler (156). Ayrıca yetişkin kök hücreler, yetişkin bireylerin farklı dokularından toplanabildikleri için embriyonik kök hücrelerin toplanmasında karşılaşılan embriyoya zarar verme riskini taşımazlar. Bu nedenle embriyonik kök hücrelerde olduğu gibi fetal hücrelerin kullanılmasına karşı olan etik sorunlar yetişkin kök hücrelerle yapılan çalışmalarda sorun oluşturmamaktadır.

Erişkin kök hücrelerin kemik iliğinde, periferik kanda, kan damarlarında, iskelet kasında, diş etki mukozasında, miyokartta, karaciğerde, gastrointestinal sistemde, over epitelinde, testislerde, akciğerlerde, adipoz dokuda, meme dokusunda, beyinde, medulla spinaliste, tükürük bezlerinde ve paratiroid bezlerde varlığı gösterilmiştir. Erişkin kök hücreler vücutta neredeyse tüm dokular içinde bulunmakta, uyku modunda (dormant) beklemekte ve gerekli hallerde aldıkları uyaranlar ile aktifleşmektedirler (156).

Araştırmacıların erişkin kök hücreleri keşfetmesi ile bu hücrelerin dokulardan izole ederek çoğaltılması, ihtiyaç duyulan hastalık yada doku hasarlanması durumlarında tedavi edici amaç ile kullanılması fikri doğmuştur.

Bur amaçlar ile kullanılacak kök hücrelerde iki önemli özellik aranmaktadır.

- 1) Kök hücrelerin kolay, risksiz yöntemler ve yüksek sayılarda elde edilebilmesi.

- 2) Uygun in vivo ve in vitro ortamlarda istenilen miktarlarda istenilen hücre ve doku yapısına kolay ve efektif şekilde dönüştürülebilmesi.

Adipoz doku kökenli kök hücreler (ADKKH) basit bir işlem olan lipoaspirasyon yöntemi ile lokal anestezi altında elde edilebilmekte ve in vitro ortamlarda kontrollü bir şekilde kolayca çoğaltılabilmektedir. İnsanda ilk kez 2001 yılında Zuk ve arkadaşları tarafından yağ dokusundan ayrıştırılarak elde edilen yağ doku kaynaklı kök hücreler, diğer yetişkin kök hücre kaynakları ile karşılaştırıldığında yüksek oranda ve kolay elde edilebilmesi ve düşük verici alan morbiditesi ile rejeneratif tıp alanında uygun kök hücre kaynağı olarak görülmektedir (164).

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH):

Aslında birer erişkin kök hücre olan ve MKH olarak adlandırılan kök hücreler ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği'nin (The International Society for Cellular Therapy; ISCT) Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi bu hücrelerin özelliklerini üç ana başlıkta toplamıştır (165, 166).

1. İn vitro kültür yapılan plastik kaplara tutunma.
2. İzole edilen MKH'in %95'inde CD105, CD73 ve CD90 hücre markerları bulunurken, %2 yada daha azında CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve HLA class II hücre markerlarının bulunması.
3. İn vitro diferansiyasyon koşulları sağlandığında osteoblast, kondrosit ve adipositlere dönüşebilmeleri.

MKH'ler kemik iliğinden, umbilikal kord kanından ve yağ dokudan izole edilebilmiştir (164, 167-169). Her ne kadar bu dokulardan elde edilen kök hücrelerin diferansiyasyon kapasiteleri, immünolojik özellikleri ve yüzey antijenleri benzerlikler gösterse de bir takım özellikler açısından farklılıklar göstermektedirler. İzolasyon başarısı açısından kemik iliği ve yağ doku kaynaklı kök hücrelerin umbilikal kord kanından izole edilen kök hücrelerden daha başarılı, koloni oluşturma kapasitesi açısından yağ doku kaynaklı kök hücrelerin daha başarılı, proliferasyon kapasitesi açısından kord kanı kaynaklı kök hücrelerin daha başarılı olduğu ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerde ise en az proliferasyon kapasitesi olduğu gösterilmiştir (170).

Yüksek miktarlarda bulunabilmesi ve izole edilebilmesi, çok invazif olmayan yöntemler ile alınabilmesi, kontrollü ve tekrarlanabilir şekilde pek çok hücre tipine dönüştürülebilmesi, kolay ve güvenli şekilde alıcıya transfer edilebilmesi gibi özellikleri ile yağ doku kaynaklı kök hücrelerin rejeneratif tıpta kullanımları dikkat çekmektedir (171). İliak krestten oldukça ağırlı şekilde alınabilen kemik iliği kaynaklı kök hücre ile kıyaslandığında lokal anestezi ile oldukça ağrısız basit bir şekilde liposakşın kanülü ile alınabilen yağ doku kaynaklı kök hücreler bu açıdan oldukça avantajlıdır. Plastik cerrahi bu kaynağı kullanma konusunda ve alınan hücreleri tekrar enjekte edebilmek adına oldukça yeterli donanımına sahip klinik dal haline gelmiştir.

Yağ Doku Kaynaklı Stromal Vasküler Fraksiyon:

Yağ doku vücudumuzda pek çok bölgede cilt altı dokuda kolayca ulaşılabilecek bir konumda depolanmıştır. Yağ doku belirli işlemlerden geçirilerek içerisinde yağ doku kaynaklı kök hücreleri de bulunduran pek çok hücreden oluşan stromal vasküler fraksiyona dönüştürülebilir. Yağ dokuya yapılan liposakşın ile multipotent karakterde kök hücrelerin viabilitesini kaybetmeden elde edilebildiği gösterilmiştir (172). Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin in vitro ortamlarda adipositlere, osteoblastlara ve kondroblastlara dönüşebildikleri gösterilmiştir (164, 173-175). Adiposit kökenli kök hücreler ile yapılan çalışmalarda transfer edilen kök hücrelerin endotel hücrelerine dönüşerek muhtemelen neovaskülarizasyona katkı sağladığı ve anjiogenik büyüme faktörlerinin salınımını sağladığı gösterilmiştir (176-178). Bu bulgular, kanlanması yetersiz bölgelerde iyileşme problemi ile karşılaşılan yaraların tedavisinde yada flep cerrahisinde flep kaybına neden olabilecek dolaşım problemlerinin yaşanmasını önlemede plastik cerrahinin ilgisini çekmektedir.

Yağ doku içerisinde yetişkin adipositler, preadipositler, vasküler düz kas hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri, monosit/makrofajlar ve lenfositler yer almaktadır. Yağ dokudan elde edilen yağ doku kaynaklı kök hücreler olarak ifade edilebilen stromal vasküler fraksiyon yağ dokunun kollajenaz sindirimi sonrası hemen santrifüj edilmesi sonucu elde edilen pluripotent stromal hücrelerden oluşur. Yağ doku kaynaklı kök hücreler minimal bir donör alan morbiditesi ile kolayca yüksek miktarlarda elde edilebilmektedir.

MKH'lerin Fiziksel Özellikleri ve İn Vitro Çoğaltılmaları:

Klinik yada deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere dokulardan yeterli düzeyde MKH eldesi her zaman mümkün olmamaktadır. Bu hücrelerin istenilen miktarlara çıkarılması için in vitro ortamlarda çoğaltılmaları gerekebilir. MKH'lerin genel olarak in vitro ortamlarda bozulmadan ve farklılaşmadan özelliklerini koruyarak çoğaltılabildiği bilinmektedir. Kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler ışık veya faz kontrast mikroskopi ile incelendiğinde hücrelerin iğ şeklinde fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları görülmektedir. Hücreler, düşük konsantrasyonlarda kültür edildiğinde koloni oluşturmaya meyil ederken, yüksek konsantrasyonlarda yan yana dizilmiş hücre grupları halinde çoğaldıkları dikkat çekmektedir (179).

MKH'ler İçin İn Vitro Kültür Şartları:

Hücreler %10 fetal bovine serum (FBS) içeren plastik flaskların tabanına yapışarak fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedir. Telomeraz aktivitesi MKH'lerde yüksektir. Bu da in vitro çoğalma kapasitelerini korumalarını sağlamaktadır. Ancak kültür ortamında pasaj sayıları arttıkça kök hücrelerde yapısal bozulmalar ortaya çıkmakta ve bu hücrelerin in vivo kullanımlarında istenmeyen etkiler görülebilmektedir. Birçok çalışmada ilerleyen pasajlarda MKH'lerde sitogenetik bozukluk ve telomer kısalması geliştiği bildirilmiştir. Hücrelerde bu istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasını önlemek adına MKH'lerin 3. pasaja kadar kullanılması önerilmektedir (180).

MKH'lerin Farklılaşma Potansiyeli:

MKH'lerin farklı hücre tiplerine uygun koşullar altında dönüşebildiği gösterilmiştir. Bu özellikleri ile rejeneratif tıpta oldukça ilgi çeken bir araştırma alanı haline gelmişlerdir. İn vitro koşullarda uygun uyarılar ile osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma gösterebildikleri bilinmektedir. Adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşma özelliklerinin in vitro gösterilmesinin, MKH tanımlaması için şart olduğu bildirilmiştir (180).

MKH karakterizasyonu, kök hücrelerin kaynaklandığı dokudan ayrıştırılmasını takiben, istenilen hücre çeşidine farklılaştırılması ve sadece bu hücre tipinin çoğaltılması işlemidir. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri tablo 2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri

(DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, FBS: Fetal bovine serum (Fetal buzağı serumu), HS: Human serum (İnsan serumu))

Farklılaşma Protokolü	Medya	Serum	İçerik
<i>Adipojenik</i>	DMEM	FBS (%10)	0,5 mM IBMX 1 mikroM deksametazon 10 mikroM indometazin 200 mikroM indometazin %1 antibiyotik/antimikotik
<i>Oseteojenik</i>	DMEM	FBS (%10)	0,1 mikroM deksametazon 50 mikroM askorbat-2-fosfat 10 mM B-gliserofosfat %1 antibiyotik/antimikotik
<i>Kondrojenik</i>	DMEM	FBS (%10)	6,25 mikrog/ml insülin 10 ng/ml TGFB1 50 nM askorbat-2-fosfat %1 antibiyotik/antimikotik
<i>Miyojenik</i>	DMEM	FBS (%10) HS (%5)	50 mikroM hidrokortizon %1 antibiyotik/antimikotik
<i>Nörojenik</i>	DMEM	Yok	5-10 mM β -merkaptotanol

Farklılaşma çalışmalarının sonucunda elde edilen hücrelerin gerçekten de istenilen hücre tipine farklılaşıp farklılaşmadığı histokimyasal, immünohistokimyasal veya immünfloresan yöntemler kullanılarak ortaya konabilir. MKH'lerin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara farklılaşma özelliğine kök hücre plastisitesi denilmektedir (156).

2.4.6. Kök Hücrelerin Dokularda Takibi

Kök hücrelerin eldesinden sonra dokulara verilmesi ile gerçekleştirilen deneysel yada klinik çalışmalarda olumlu sonuçlar elde edilse de, bu çalışmalarda kök hücrelerin durumu, hasarlı dokuya göçü, çoğalmaları, farklılaşma özellikleri gibi fizyolojik değişimleri incelemek güç olmaktadır. Hücrelerin dokularda tespitinde zorluklar yaşanmaktadır. Hücrelerin yeşil floresan proteini (Green fluorescent protein: GFP) ile transfekte edilmesi ve floresan hücrelerin dokularda takibi en sık uygulanan yöntemlerden biridir (211). Bu tip işaretleme kalıcı olması yönünden tercih edilen bir yöntemdir. Kısa süreli deneysel çalışmalarda karboksiflorescein diasetat süksinimidil ester (CFSE), 1,1'-Dioktadesil-

3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI) gibi geçici floresan işaretlemeler de kullanılabilir. Ancak hücrelerin kültürüze edilerek çoğaltıldığı çalışmalarda floresan etkide azalma olacaktır.

Her çeşit hücrenin yüzeyinde o hücreye özgü yüzey reseptörü olduğu gibi kök hücrelerin de yüzeylerinde çeşitli reseptörler mevcuttur. Bu yüzey reseptörlerinin floresan işaretleyicilerle işaretlenerek ardından sayılması (floresan yardımcı hücre sayımı: FACS) ile mevcut kök hücre sayısı belirlenebilmektedir (182). Hücrelerin yüzeyinde yer alan bu belirteçler hücre türüne özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar ve kısaca CD (Cluster of differentiation) olarak adlandırılırlar. Örneğin; mezenkimal kök hücrelere özgün olan belirteçler CD29, CD79, CD105 iken hematopoetik kök hücreler için en yaygın olarak CD33 ve CD45 belirteçleri kullanılmaktadır (182, 183).

2.4.7. Somatik Çekirdek Hücre Transferi

Tedavi amaçlı klonlama olarak da bilinen somatik çekirdek hücre transferi postnatal somatik hücre çekirdeğinin alınarak henüz döllenmemiş bir ovuma aktarılması anlamına gelir. Kültür ortamında bu hücrenin mitotik bölünmeleri sağlanarak blastokist oluşturabilmiştir (184). Bu yöntem ile koyun (Dolly), fare, sığır, kedi, köpek ve domuz üretilmesi ile oldukça ilgi çekici gelişmeler yaşanmıştır (185-190). Bu çalışmalar benzer prosedürler ile insan embriyolarının da üretilebileceğini ve gerekli hücre yada organların tedavi edici anlamda kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak insan embriyosunun bu şekilde üretilerek tıbbi amaçlar ile kullanılması ve fertilize olmamış bir ovumun alınması ahlaki ve etik anlamda pek çok karmaşık sorunu ortaya çıkarmaktadır. Etik ve ahlaki sorunların bu çalışmaları önlemesinden önce yapılan bazı ilk çalışmalar somatik hücre çekirdeklerinin ovumlara aktarılması sonrası ancak %10'luk bir başarı ile embriyoların oluşturulabildiğini göstermiştir (191). Bu alandaki çalışmalar için engel teşkil eden pek çok etik sorun mevcuttur. Ancak bu sorunlar aşılabılırsa, somatik hücre çekirdeklerinin ovumlara aktarılması ile üretilen hücre dizilerinin, tedavi amacı ile yeni hücrelerin yada dokuların üretilmesinde yada bazı tedavi edici ilaçların denenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

2.4.8. Dokuya Özel Kök Hücreler

Embriyonik kök hücrelerin ve MKH'lerin tanımlanmasından sonra vücutta neredeyse tüm organ ve dokularda mevcut olan dokuya özel kök hücrelerin varlığı ortaya konmuştur (192). Bu hücreler bulundukları dokuda, kendini yenileme ve farklılaşma kapasitelerini canlının yaşamı boyunca sürdürebilmekte, dokuyu korumakta ve yenileyebilmektedirler (192, 193). Dokuya özel kök hücreler tarafından sağlanan dengelerde bozulma olması yaşlanma ve tümör oluşumları ile ilişkilendirilmiştir (194). Bu hücrelerin in vivo ortamda aktivasyonları sağlanarak yada dışarıdan ihtiyaç duyulan dokuya verilmesi ile doku tamirinin sağlanması yada dokuların gençleştirilmesi düşünülebilir.

2.4.9. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc gibi spesifik transkripsiyon faktörleri aracılığı ile önce fare ardından insanda diferansiye olmuş hücrelerin yeniden pluripotent hücre safhasına dönüştürülmesi oldukça ilgi çeken bir gelişme olmuştur (195, 196). Somatik hücre çekirdek transferleri uygulaması ile kıyaslandığı zaman uyarılmış pluripotent kök hücre uygulamaları daha kolay ve uygulanabilir gözükmektedir. Bu yöntem ileride embriyonik kök hücrelerin sunduğu tedavi edici imkanları sunabilecek bir alternatif olarak düşünülmektedir (197). Ancak uyarılmış pluripotent kök hücrelerin embriyonik kök hücreler ile aynı olduğunu söyleyebilmek için daha çok çalışma yapılması gerekmektedir. Ayrıca uyarılmış pluripotent kök hücrelerden deneysel ortamlarda elde edilmiş dokularda, embriyonik kök hücrelerden elde edilenlere oranla daha fazla tümör oluşumu gösterilmiştir (198). Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin rejeneratif tıpta kullanılabilmesi için bu yan etkilerin çok iyi ortaya konması ve önlenmesi gerekmektedir.

2.4.10. Kök Hücrelerin Flep Yaşayabilirliği ve Vaskülogenez Üzerine Etkileri

Kök hücreler iyileştirilemeyen hastalıkların tedavisinde, doku hasarının yada doku kaybının eşlik ettiği hastalıklarda ümit vaat eden sonuçları ile tıp dünyasının ilgisini çekmektedir.

Günümüzde plastik cerrahi alanında rekonstrüksiyon seçenekleri olarak otolog dokular, sentetik biyomateryaller yada allojenik dokular kullanılmaktadır. En güvenilir tercih olan otolog doku ile rekonstrüksiyonda özellikle donör alan morbiditesi rekonstrüksiyon seçeneklerini sınırlayan en önemli etkidir. Kök hücrelerin doku mühendisliğinde

kullanımı ile bu çeşitliliği arttırmak mümkün olabilir. Ayrıca flep cerrahisinde yaşanabilen beslenme bozukluklarına bağlı flep kayıplarının önlenmesinde vaskülogenezi artırıcı etkileri ile yada yara iyileşmesine olan olumlu etkileri ile kök hücreler akla gelmektedir.

Kök hücrelerin terapötik anjiyogenez yapıcı etkileri bazı çalışmalarda gösterilmiştir (199-202). Flep cerrahisinde kök hücre kullanılması ile ilgili ilk çalışmalardan biri 2004 yılında kemik iliği kaynaklı kök hücrenin iskemik flep üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmadır. Bu çalışmada sıçanların sırt derisinden kaldırılan random paternli fleplerde iskemi yaratıldıktan sonra kök hücre verilmesinin kapiller dansiteyi artırarak iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (203). Zheng ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, VEGF gen transplantasyonu uygulanan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin iskemik fleplerde neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir (204).

ADKKH'lerin kullanıldığı sıçanlar ile yapılan deneysel bir çalışmada random paternli cilt flebinin yaşayabilirliğinin arttırıldığı gösterilmiştir (205). Ayrıca ADKKH'lerin bir takım büyüme faktörlerini regüle ederek iskemi reperfüzyon hasarı üzerine düzenleyici etkileri de olduğu gösterilmiştir (206).

2.4.11 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği; travma veya hastalıklar nedeniyle geri dönüşümsüz olarak zarar görmüş dokuların in vitro geliştirilen doku ve organlarla değiştirilmesi veya fonksiyonlarının desteklenmesi veya doku tamirinin in vivo yönlendirilmesi olarak tarif edilebilir (207).

Bir doku yada organın oluşturulması için; uygun doku iskeletinin, hücre kaynaklarının ve bu hücrelerin düzenli şekilde büyümesini ve çoğalmasını sağlayacak sinyallerin tanımlanması gereklidir. Doku mühendisliği izole edilmiş hücrelerin (genellikle kök hücreler) in vitro şartlarda üç boyutlu hücre dışı matriks molekülleriyle benzerlik taşıyarak üretilmiş yapı iskeletleri üzerine ekilmesini daha sonra özel şartlar altında yeniden farklılaştırılarak çoğaltılmasını ve oluşan doğal dokuya benzer yeni hibrit yapıların geri nakledilmesini amaçlar.

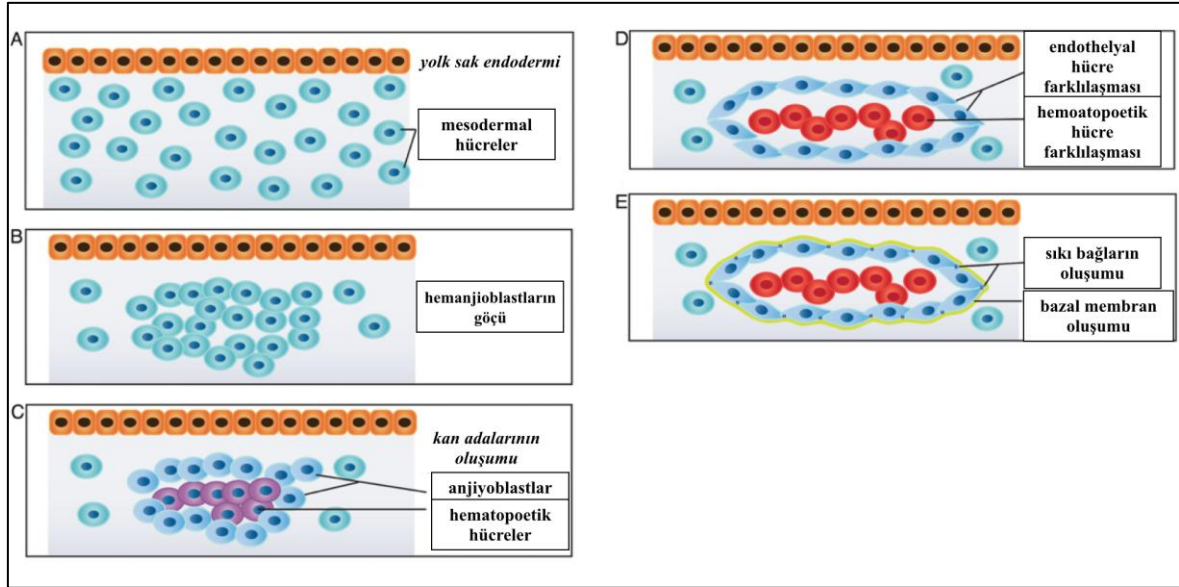
2.5. Anjiyogenez ve Vaskülogenez

Vasküler sistem oksijenizasyon ve nütrisyonun sağlaması gibi oldukça önemli fizyolojik işlevleri yerine getiren özelleşmiş bir yapıya sahiptir. Organizmanın oluşmasında hız sınırlayıcı bir basamak olan vasküler sistemin gelişiminde iki önemli mekanizma mevcuttur, vaskülogenez ve anjiyogenez. Embriyonun gelişiminde ilk damarsal yapıların oluşumunu sağlayan vaskulogenez ve daha sonrasında mevcut vasküler yapılardan yeni damarların oluşumunu yada yeniden düzenlenmesini sağlayan anjiyogenez pekçok farklı hücre tipinin karmaşık bir koordinasyon ile çalışması sonucu gerçekleşir. Damar formasyonunun aktivasyonu ve düzenlenmesi için çok önem teşkil eden uyarıcı mediatörler ve özelleşmiş reseptörler mevcuttur.

2.5.1. Vaskülogenez

Dolaşım sisteminin oluşumu, embriyonel gelişimde blastomerin ‘somit’ adı verilen üç boyutlu yapısına dönüştüğü safhada başlar. Gelişimin bu erken safhasında endotel öncü hücrelerinden damar oluşumunu sağlayan bu mekanizmaya vaskülogenez adı verilir (208). Vaskulogenezi sağlayan vasküler endotelyal öncü hücrelerin kaynağı, embriyonik mesoderm, ekstra-embriyonik yolk sac, allantois ve plasenta şeklinde sıralanabilir (209).

Farelerde yapılan embriyolojik çalışmalarda embriyonun gelişiminin yaklaşık 6. gününde yolk sac'te öncü hücrelerin göç ederek ve farklılaşarak kan adaları denilen hücresel kümeleri oluşturduğu gösterilmiştir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Vaskülogenez

(A) Endodermal ve mesodermal hücreler ile vaskülogenezin başlatılması. (B) Hemanjioblastların göçü ve bir araya gelmeleri. (C) Santralde hematopoetik hücrelerin periferde anjioblastların yer aldığı kan adalarının oluşumu. (D) Anjioblastların endothelial hücrelere, hematopoetik hücrelerinde kan hücrelerine dönüşümü. (E) Bazal membran oluşumu ve endothelial hücreler arasında sıkı bağlar oluşumu ile lümenizasyonun gerçekleştirilmesi. Perisitlerin devreye girmesi bazal membran oluşumunda önemlidir ve damar matürasyonunu göstermektedir (240).

8 inci günde kan adacıkları çevresinde birikmiş anjiyoblast adı verilen hücreler farklılaşarak endotelial hücrelere dönüşürken iç kısımda kalan hücreler ise kan hücrelerini oluşturmak üzere hematopoetik öncü hücrelere dönüşürler (Şekil 2.10). Hemanjiyoblast kan adası öncü hücrelerinin tümüne verilen ortak bir isimdir. Anjiyoblastların farklılaşmasında endodermin de önemli olduğu bilinmektedir (210).

Anjiyoblastlar öncelikle ekstra-embriyonel dokularda ardından endoderm ile ilişkili şekilde embriyonel dokularda ortaya çıkarlar. Ekstra-embriyonel anjiyoblastlar hematopoetik öncü hücrelerin etrafında gelişirken, embriyonel anjiyoblastlar tek başlarına gelişirler (211). Anjiyoblastlar göç ederek ve proliferasyon olarak primitif, tüp şeklinde damarsal yapıları oluştururlar. Damar oluşumu anjiyoblastların birleşmesi ile yada uzak bölgelerden migrasyonu ile meydana gelmektedir.

Anjiyoblastların endotel hücrelerine diferansiyasyon olarak vasküler lümen ve bazal lamina oluşturması ile vasküler gelişim devam eder (Şekil 2.10). Yolk sac'te meydana gelen vaskülogenez ile primitif vasküler pleksus oluşturulurken embriyoda meydana gelen vaskülogenez ile kranium mezenşimi ve endokartta kapillerlerin oluşumu meydana

getirilir. İki somit evresinde iken intraembriyonel ve ekstra-embriyonel vasküler sistemler anastamozlar ile birleşirlerken embriyo halen diffüzyon ile oksijenizasyonunu sağlayabilmektedir (212). Kalp atışı başlamadan hemen önce oluşan vasküler pleksus gelişmekte olan tübüler kalbe bağlanır. Primer vasküler pleksus oluşturulurken vaskülogenez ile karaciğer, akciğer ve dalakta da vaskülarizasyon sağlanır (211, 213).

Vaskülogenezde Sinyalizasyon:

Anjiyogenez ile kıyaslandığı zaman vaskülogenezi düzenleyen moleküler sinyalizasyon sistemi daha az anlaşılabilmiştir. In vivo modeller ile bazı büyüme faktörlerinin sinyalizasyonda önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir.

Fibroblast Büyüme Faktörü:

Fibroblast büyüme faktörleri (FGFs) erken vasküler gelişimde etkilidirler. Memelilerde 18 farklı parakrin ve endokrin etkileri olan FGF ailesi üyesi tespit edilmiştir. Farklı FGF'leri tirozin kinaz reseptörlerini aktive ederek etki gösterirler (214).

Hedgehog Ailesi:

Hedgehog ailesine ait morfojenler, sonik hedgehog (Shh), Indian hedgehog (Ihh) ve desert hedgehog (Dhh) gelişimin çeşitli evrelerinde vasküler sistemin oluşumunda önemli rol almaktadırlar. Farede yolk sac damar gelişiminin ve endotelial tüp formasyonunun düzgün olabilmesi için bu üç hedgehog molekülünden Ihh'nin mutlak olması gerektiği bilinmektedir (215, 216). Ihh bulunmayan farelerin yolk sac anjiogenezinin defektif olduğu gösterilmiştir (217).

Vasküler Endothelial Büyüme Faktörleri (VEGFs) ve VEGF Reseptörleri:

Vasküler endotelial büyüme faktörlerinin vaskülogenez ve anjiyogenezde gerekliliği çok iyi anlaşılmıştır. VEGF protein ailesi çeşitli glikoproteinlerden oluşur: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, endokrine bez VEGF'ü (EG-VEGF), VEGF-E, VEGF-F, VEGF-b ve plasental büyüme faktörü (PIGF). İlk olarak 'vasküler permeability factor' olarak adlandırılan VEGF-A vaskülogenez ve anjiyogenezde etkili olduğu bilinen VEGF ailesinin en çok çalışma yapılmış üyesidir (218). VEGF-B'nin kardiyak gelişimde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (219, 220). VEGF-C ve VEGF-D lenfatik damarların gelişimini düzenlerlerken anjiyogenezde de rol alabilmektedirler (221-224). EG-VEGF endokrin bez

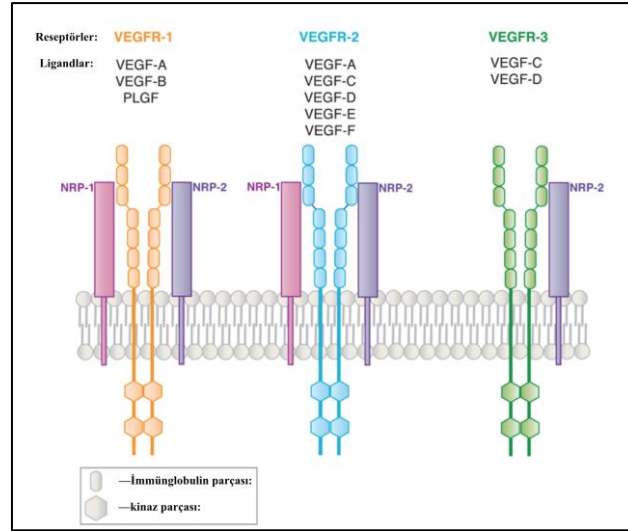
endotel hücrelerine oldukça spesifik etki eden bir izoformdur (225). VEGF-A geninin bir varyantı olan VEGF-b'nin anti-anjiyogenik etkiler gösterdiği bilinmektedir (226, 227). İlk olarak plasentada tespit edilen PIGF'ün az miktarda embriyoda ve yetişkinlerde bulunduğu ve daha çok patolojik durumlarda artış göstererek VEGF-A ile beraber anjiyogenezi stimüle ettiği düşünülmektedir (228).

VEGF-A'nın dört ana izoformu mevcuttur. 121, 165, 189 ve 206 amino asitli bu izoformlar heparan sülfat proteoglikanlara ve nörofiline bağlanabilirlik açısından farklılıklar göstermektedir. VEGF 206 ve VEGF 189 heparan sülfata yüksek afinite ile bağlandığı için ekstraselüler matriks ile sıkı ilişki kurar. En küçük molekülü VEGF 121 izoformunun heparan sülfata olan düşük afinitesi serbestçe diffüzyona uğrayabilmesini ve sekrete olduğu bölgeden çevreye yayılmasını sağlar. VEGF 165, heparan sülfata orta derecede bağlanır (229).

VEGF Reseptörleri:

VEGF ailesi üyeleri üç ana reseptör ile etkileşimde bulunurlar, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (insanlarda KDR, farelerde Flk-1) ve VEGFR-3 (Flt-4). Bu reseptörlerin tümü tirozin kinaz reseptörleridir ve platelet kökenli büyüme faktörü (platelet derived growth factor: PDGF) reseptör ailesinden gelirler. VEGF reseptörlerinin yapısında VEGF'lerin bağlandığı ekstraselüler uzanım gösteren immunoglobulin tekrarları ve intraselüler olarak uzanan tirozin kinaz molekülleri mevcuttur (Şekil 2.11). VEGF-A, VEGF-B ve PIGF, VEGFR-1'e bağlanırlar. VEGF-A, VEGF-C'nin ve VEGF-D'nin bölünmüş formları, VEGF-E, VEGF-F, VEGF-b, VEGFR-2'ye bağlanırlar. VEGF-C ve VEGF-D'nin doğal halleri ise VEGFR-3'e bağlanırlar.

VEGF-A ve onun reseptörleri olan VEGFR-1 ve VEGFR-2 embriyonik gelişimin erken safhalarında görülürler. VEGF-A embriyonel gelişimin 8. gününde ekstra-embriyonik endoderm ve mesodermde ayrıca intra-embriyonel endodermde görülebilir (230). VEGFR-2 endotelial ve hematopoetik öncül hücrelerin erken dönemde markerı olarak kullanılabilir (231, 232).



Şekil 2.11. VEGF reseptörleri ve ligandları

VEGFR-1 (turuncu), VEGFR-2 (mavi) ve VEGFR-3 (yeşil) gösterilmektedir. Bu reseptörleri aktive ettiği bilenen ligandlar her reseptörün üzerinde gösterilmektedir. Ayrıca VEGF reseptörlerinin ko-reseptörleri olan, nöropilin-1 (kırmızı) ve nöropilin-2 (pembe), bağlantılı oldukları reseptörlerin yanlarında şekilde gösterilmektedir (230).

Genetik çalışmalar VEGF ve VEGF reseptörlerinin vaskülogenez için gerekli olduğunu göstermektedir. VEGFR-2'den yoksun embriyolar gelişimin yaklaşık 9. gününde vaskülogenez ve hematopoezisi başlatamadıkları için ölmektedirler (233). VEGF eksikliği olan embriyolarda benzer şekilde ciddi vasküler defektler nedeniyle ölmektedirler. VEGF genlerinde kısmi bir delesyon olması bile embriyoda dorsal aorta ve kan hücrelerinin gelişiminde defektler oluşması ile lethal sonuçlanmaktadır (234, 235). VEGFR-1'i olmayan embriyolarında, endotelial hücrelerinin aşırı büyümesine bağlı anjiyoblastların kan adaları içinde anormal santral yerleşim göstermesi ve vasküler sistemin oluşamaması sonucu, yaşayamadığı bilinmektedir (236). Bu durum VEGFR-1'in vaskülogenezi, VEGF sinyalizasyonunu inhibe ederek düzenlediğini düşündürmektedir. Esas olarak lenfatik damarların gelişiminde fonksiyon gösteren VEGFR-3 embriyonel gelişimin erken safhalarında vaskülogenez ve anjiyogenezde de görev almaktadır. Bu nedenle VEGFR-3 bulunmayan embriyolarda vaskülogenez ve anjiyogenez başlatılabilir ancak bu embriyolar gelişimin 9. gününde major kardiyovasküler defektler ile ölmektedir.

VEGF ligandlarının reseptörlerine bağlanması sonucu reseptörlerde homodimerizasyon yada heterodimerizasyon ile kinaz aktivasyonu, reseptör otofosforilasyonu meydana gelir ve reseptör uyarılmış olur. VEGFR-2'nin uyarılması güçlü bir otofosforilasyona neden olurken VEGFR-1'in uyarılması zayıf bir otofosforilasyona ve sinyalizasyona neden

olur. VEGF'ler ile VEGFR-2'nin ilişkisinin endotel hücre göçü, farklılaşması, proliferasyonu ve sağ kalımı ile ilgili olduğu gösterilmiştir.

Nörofilinler:

VEGF'ler ayrıca, VEGF reseptörlerinin ko-reseptörü olarak fonksiyon gören nörofilinler ile de sinyalizasyona neden olurlar. Nörofilinler transmembran glikoproteinleridir. Tek başlarına sinyalizasyon sağlayabildikleri kesin değildir (237). Endotel hücreleri bulundukları damarlara göre farklı nörofilinleri eksprese ederler. Nörofilin-1 arteriyel endotelde, nörofilin-2 venöz ve lenfatik endotelde bulunur. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-E ve PlGF nörofilin-1'e bağlanarak, VEGFR-1 yada VEGFR-2 ile birleşir. Nörofilin-2 ise VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D ve PlGF ile bağlanarak VEGFR-1, VEGFR-2 yada VEGFR-3 ile birleşir. Nörofilin-1'den yoksun embriyolar ile yapılan çalışmalarda vasküler defektler görülürken nörofilin-2'den yoksun embriyolarda sadece lenfatik sistemde defektler ortaya çıkmıştır (238-240). Yapılan başka bir çalışmada her iki nörofilinden yoksun farelerde yolak sac vaskülogenezinin ve primer vasküler pleksusun oluşmadığı gösterilmiştir (241).

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ve TGF- β Reseptörleri:

TGF- β vaskülogenezde görevli bir sitokindir. TGF- β ailesi; TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, kemik morfogenez proteinleri, aktivinler ve inhibitörlerden oluşur (242). TGF β ailesi üyeleri iki tip reseptöre bağlanırlar, tip I (TGF β RI) ve tip II (TGF β RII) reseptörler. Tip I reseptörlerin yedi farklı tipi mevcuttur (243). Beş farklı tipi olan Tip II reseptörler ise yapısal değişikliklere uğrayarak tip I reseptörleri aktive ederler.

TGF β 'nın endotel hücreleri üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalardan çelişkili sonuçlar alınması TGF β sinyalizasyon sisteminin karmaşık yapısından kaynaklanmaktadır. Yapılan ilk çalışmalar TGF β 'nın endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu inhibe ettiğini göstermiştir (244, 245). Daha sonra yapılan bazı çalışmalar ise TGF β 'nın endotel hücreleri üzerinde mitojenik etkili olduğunu göstermiştir (246-248). TGF β 'nın bu farklı etkileri yüksek dozlarda endotel hücre büyümesini inhibe etmesine, düşük dozlarda ise anjiyogenetik faktörleri aktive etmesine bağlanmıştır (249).

TGF β 1'in selektif delesyonu yapılan fare embriyolarının yarısının gelişimin erken günlerinde yolk sac vaskülogenezinde meydana gelen defektler nedeniyle öldüğü gösterilmiştir (250, 251). TGF β RII'nin hasarlandığı embriyolarında gelişimin 10. gününde yolk sak ve embriyonun vaskülogenezinde meydana gelen defektler nedeniyle öldüğü gösterilmiştir (252, 253).

2.5.2. Anjiyogenez

Anjiyogenez embriyonun oluşumun yaklaşık 9. günü devreye girer ve bu süreden sonra embriyonun vasküler yapısının büyük kısmını oluşturur. Anjiyogenez ayrıca ektoderm ve mesodermden köken alan beyin ve böbrek gibi organların vaskülarizasyonunu gerçekleştirir.

Anjiyogenez endotel hücrelerinin merkezde olduğu koordineli çalışan bir sistem sonucu meydana gelmektedir (254). Anjiyogenik stimuluslara duyarlı olan özelleşmiş endotelial uç hücreler tarafından vasküler tomurcuklar meydana getirilir (255). Anjiyogenez bir damarın bazal membranının yıkılarak perisitlerin ayrışması ile başlar. Uç hücrelerin anjiyogenez uyaranları ile migrasyonu görülür. Endotel hücrelerinin proliferasyonu ve yeniden dizilmesi ile endotelial hücreden bir tüp lümen oluşturulur. Perisit ve/veya düz kas hücrelerinin de gelmesi ile bazal membranın oluşturulması damar stabilizasyonunu sağlar. Intussusceptive anjiyogenez (IA) adı verilen diğer bir anjiyogenez mekanizması ise mevcut damarların içerisine doku bloklarının girmesi ile karmaşık bir yeniden yapılanma sonucu kapiller sistemin genişlemesini ifade eder (230, 256). IA 3 basamaklı bir mekanizma ile çalışmaktadır; Intussusceptive microvascular growth (IMG), intussusceptive arborization (IAR) ve intussusceptive branch remodeling (IBR). IMG safhasında kapiller duvarlardaki karşılıklı endotel hücreleri birbirlerine temas ederek pillar core adı verilen yapısal öncü oluşumları meydana getirirler. Perisit ve miyofibroblastlardan oluşan peri-endotelial hücreler yeni oluşan pillar core içerisine doğru gelişirler ve kollajen lifleri de gelerek bu yapıyı stabilize eder. Bazal membranın oluşması ile bu süreç sona erer (230). IAR daha küçük damarların oluşturulması ile vasküler sistemin genişlemesine katkıda bulunur (257). Son olarak IBR lokal doku beslenmesi ihtiyacına göre damar yapısını ve damarlanma miktarını kontrol eden mekanizmayı gerçekleştirir (258).

Anjiyogenezin Düzenlenmesi:

Anjiyogenezi anlamaya yönelik yapılan çalışmalarda anjiyogenezi düzenleyen birçok protein belirlenmiştir. VEGF protein ailesi ve VEGF reseptörleri vaskülogenezdeki etkilerine benzer etkiler ile anjiyogenezin aktive edilmesinde kritik rol oynamaktadırlar. VEGF ve reseptörleri dışında anjiyogenezde rol oynayan notch sinyal mekanizması, semaforinler, netrinler gibi başka mekanizmalarda tanımlanmıştır.

Notch Sinyal Mekanizması:

Notch reseptör ailesi hem yetişkin hem de embriyonik vasküler gelişimde endotelial hücre çoğalmasında etkili bir mekanizmadır. Memelilerde 4 adet notch reseptör (Notch 1, 2, 3 ve 4) tespit edilmiştir. Notch 1 ve 4 endotelde bulunurken Notch 3 düz kas hücrelerinde görev yapmaktadır (259).

Anjiyogenezde Notch ve VEGF sinyal mekanizmaları çok yakın ilişki içindedirler. VEGF'ün notch sinyal mekanizmasını aktive ettiği gösterilmiştir (260). Aynı şekilde notch sinyal mekanizmalarının da VEGF reseptörlerini aktive ettiği gösterilmiştir (261).

Genetik çalışmalar ile notch sinyal mekanizmasının anjiyogenezin düzenlenmesindeki önemi ortaya konmuştur. Notch 1'in olmadığı farelerin normal primer vasküler yapıyı oluşturabildikleri ancak sonuç olarak damar dejenerasyonu ve anormal damar yenilenmesi nedeniyle embriyonel gelişmenin 11'inci gününde öldüğü görülmüştür (262).

Semaforinler:

Semaforin ailesi serbest yada membrana tutunmuş şekilde bulunan glikoproteinlerden oluşmaktadır (263). Semaforinlerin anjiyogenezi inhibe edici ve aktive edici özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (264, 265).

Netrinler:

Netrinler de anjiyogenezin düzenlenmesinde görev alan proteinlerdendir. Netrin reseptörlerinin olmadığı fare embriyolarının gelişimin erken günlerinde kapiller dallanma gösteremeyerek öldüğü gösterilmiştir (266). Netrin proteinlerinin bir kısmının

proanjiyogenik etkiler ile endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü aktive ettiği, bir kısmının ise kapiller yayılmayı önlediği gösterilmiştir (266, 267).

Damarların Olgunlaşması:

Perisitler ve düz kas hücrelerinin yardımı ile yeni oluşan kapillerlerin stabilizasyonu, doğru fonksiyon gören damarların oluşturulabilmesi için önemlidir. Anjiyogenezin düzenlenmesinde olduğu gibi pek çok büyüme faktörü damar matürasyonunda görev almaktadır.

Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF):

PDGF damar duvarının olgunlaşmasında en etkili faktörlerden biridir. PDGF ailesinin 4 farklı isoformu mevcuttur. PDGFA, PDGFB, PDGFC ve PDGFD. Tirozin kinaz reseptörleri olan PDGFR α ve PDGFR β adı verilen iki adet reseptörleri vardır. Prolifere olan endotel hücrelerinden salınan PDGF'ler undifferansiye mezenkimal hücreler üzerinde bulunan reseptörlerine bağlanarak bu hücrelerin damar duvarına göç etmesini sağlarlar (268).

Anjiyopoetinler ve Tie Reseptörleri:

Tie reseptörlerinin aktive olması ile damar stabilizasyonu artmaktadır. Tie 1 ve Tie 2 tirozin kinaz reseptörleri tüm damar yapılarında mevcut reseptörlerdir. Dört adet farklı glikoproteinden oluşan anjiopoetinler Tie 2 reseptörleri üzerinden etkilerini gösterirler. Anjiopoetin 1 ve 4'in damar matürasyonunu aktive edici anjiopoetin 2 ve 3'ün ise inhibe edici etkileri olduğu düşünülmektedir (269).

Tie 2 reseptörleri bulunmayan fare embriyolarının primer damarsal yapılarını oluşturabildikleri halde damar duvar yapısındaki defektlere sekonder gelişen ödem ve kanama nedeniyle gelişimin erken günlerinde öldükleri gösterilmiştir (270).

Anjiyopoetin-Tie2 sinyal mekanizmasının etkileri VEGF tarafından düzenlenmektedir. VEGF varlığında anjiyopoetin 2 tarafından anjiyogenez stimüle edilirken, VEGF yokluğunda anjiyogenezi inhibe ederler (269).

Hipoksinin Anjiyogenez Üzerine Etkileri:

Primer vasküler sistem oluşturulurken diffüzyon ile beslenen embriyo geliştikçe oksijene olan ihtiyaç artmaktadır ve bu hipoksik ortamın anjiyogenezi hızlandıran bir etki gösterdiği bilinmektedir.

Hipoksi-inducible faktör (HIF) adı verilen bir transkripsiyon faktörü ortamda bulunan oksijen miktarından etkilenerek vaskülogenez üzerine etki göstermektedir. Normoksi ortamında HIF yıkılırken hipoksik ortamda ise birikir. HIF DNA'ya bağlanarak anjiyogenezde etkili olan VEGF, PLGF, Ang1, Ang2 ve PDGF genlerinin transkripsiyonlarını aktive eder (271).

Anjiyogenezi Arttırmaya Yönelik Çalışmalar:

Dışarıdan verilen büyüme faktörleri ile damarlanma çeşitli amaçlar ile arttırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla VEGF, PDGF, bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), TGF- β kullanılmıştır (272-276). Yapılan bu çalışmaların sonuçları damarlanmanın arttırılabildiğini göstermektedir ancak başarı şansı bu tedavilere cevap verecek endotel hücresi sayısı ile sınırlıdır (277).

Mezenkimal kök hücrelerin VEGF sentezini arttırarak anjiyogenezi tetiklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (204-206).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun proje özetini değerlendirmesi ve çalışmayı onaylaması ile çalışma başlatıldı (Proje No: Da 14/16). Deneyler Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Ünitesi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Deney hayvanları Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deney modeli olarak sıçanlara öncelikle Freitas ve arkadaşları tarafından uygulanmış olan abdominoplasti modeli uygulandı (144). ADKKH verilmeyen ve verilen farklı gruplara abdominoplastiden 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta sonra sağ inferior epigastrik arter bazlı, 5x2,5cm boyutlu transvers rektus abdominis kas deri flebi uygulandı (143).

Çalışmada ortalama ağırlıkları 390 gram olan toplam 71 erkek inbred Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 8 sıçan olacak şekilde toplam 7 grup oluşturuldu, kalan 15 sıçan adipoz doku eldesi için kullanıldı. Gruplara farklı zamanlarda yapılan işlemler tablo 3.1'de yer almaktadır.

Bir gruba sadece TRAM flep uygulandı, 3 gruba sırası ile abdominoplastiden 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta sonra TRAM flepler hazırlandı, aynı işlemlerin aynı süreler ile uygulandığı diğer 3 grupta ise abdominoplasti sırasında ADKKH enjeksiyonları yapıldı. Böylece abdominoplasti sonrasında uygulanan ADKKH tedavisi ile TRAM flep güvenilirliğinin araştırılması amaçlandı.

Grup 1 (TRAM, n:8):

Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Sıçanların abdominal bölgeleri elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi. Sıçanlar sırt üstü olacak şekilde dört ekstremitelerinden flasterler ile cerrahi masaya tespitlendi. Bu gruptaki sıçanlara cerrahi olarak sadece sağ inferior epigastrik arter pediküllü 5x2,5cm boyutlarında cilt adası içeren TRAM flep kaldırıldı. Flep kaldırıldıktan sonra rektus kasının ve cilt adasının karın ön duvarı ile ilişkisini kesmek için bir adet silikon tabaka yerleştirildi ve flep yerine tekrar dikildi. 7. günde flep fotoğrafları çekildi, sıçanlar kurban edilmek suretiyle doku örnekleri alındı ve formol solüsyonuna konarak fiksle edildi. 1 sıçanın göğüs ön duvarı açılarak sol karıncık içerisine baryum solüsyonu enjekte

edildi, sakrifiye olan sıçan -20°C’de 24 saat bekletildi ve flep dokusu alınarak mikroanjiyografik görüntülemesi yapıldı.

Grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta, n:8):

Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Sıçanların abdominal bölgeleri elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi. Sıçanlar sırt üstü olacak şekilde dört ekstremitelerinden flasterler ile cerrahi masaya tespitlendi. Sıçanlara daha önce tanımlanan abdominoplasti modeli uygulandı (174). Ksifoid çıkıntı işaretlendikten sonra 1cm kaudale inilerek 5 cm’lik horizontal bir insizyon yapıldı. Her iki rektus abdominis muskulokutan perforatörlerini kesecek şekilde karın ön duvarı cildi kaldırıldı. Sağ rektus abdominis kası içerisine ve hemen üzerindeki cilt altı dokuya phosphate buffered saline (Fosfat tamponlu serum fizyolojik: PBS) enjeksiyonları yapıldı. Sağ rektus abdominis kası fasyasından ince bir şerit eksize edildi. Ardından süperiordan 4 mm’lik bir cilt alanı abdominoplasti simülasyonu için eksize edildi ve karın cildi yukarı çekilerek dikildi. 1 hafta beklendikten sonra grup 1’de tarif edildiği gibi TRAM flepler kaldırıldı ve flepler yerlerine dikilerek 7 gün beklenildi. 7. günde fleplerin fotoğrafları çekildi, perforatör sayımı yapıldı, doku örnekleri alındı ve hayvanlar sakrifiye edildi. Bu gruptaki sıçanlardan 0., 7. ve 14. günlerde kan örnekleri alındı. 1 sıçanın göğüs ön duvarı açılarak sol karıncık içerisine baryum solüsyonu enjekte edildi, sakrifiye olan sıçan -20°C’de 24 saat bekletildi ve flep dokusu alınarak mikroanjiyografik görüntülemesi yapıldı.

Grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta, n:8):

Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Sıçanların abdominal bölgeleri elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi. Sıçanlar sırt üstü olacak şekilde dört ekstremitelerinden flasterler ile cerrahi masaya tespitlendi. Sıçanlara Grup 2’de tarif edilmiş olan abdominoplasti simülasyonu uygulandı. PBS enjeksiyonu yapıldı. Abdominoplastiden sonra 2 hafta beklenildi ve grup 1’de olduğu gibi TRAM flepler kaldırıldı. TRAM flepler yerlerine dikildikten 7 gün sonra flepler fotoğraflandı, perforatör sayımı yapıldı ardından hayvanlar sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. 0., 14. ve 21. günlerde kan örnekleri alındı. 1 sıçanın göğüs ön duvarı açılarak sol karıncık içerisine baryum solüsyonu enjekte edildi, sakrifiye olan sıçan -20°C’de 24 saat bekletildi ve flep dokusu alınarak mikroanjiyografik görüntülemesi yapıldı.

Grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta, n:8):

Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Sıçanların abdominal bölgeleri elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi. Sıçanlar sırt üstü olacak şekilde dört ekstremitelerinden flasterler ile cerrahi masaya tespitlendi. Grup 2’de tarif edilmiş olan abdominoplasti simülasyonu uygulandı. PBS enjeksiyonu yapıldı. 4 hafta beklendikten sonra grup 1’de olduğu gibi TRAM flepler kaldırıldı ve flepler yerine dikilerek 7 gün beklenildi. 7. günde fleplerin fotoğrafları çekildi, perforatör sayımı yapıldı ardından hayvanlar sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. 0., 28. ve 35. günlerde kan örnekleri alındı. Gruptan 1 sıçanın göğüs ön duvarı açılarak sol karıncık içerisine baryum solüsyonu enjekte edildi, sakrifiye olan sıçan -20°C’de 24 saat bekletildi ve flep dokusu alınarak mikroanjiyografik görüntülemesi yapıldı.

Grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta, n:13):

Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Sıçanların abdominal bölgeleri elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi. Sıçanlar sırt üstü olacak şekilde dört ekstremitelerinden flasterler ile cerrahi masaya tespitlendi. Grup 2’de olduğu gibi abdominoplasti modeli uygulandı ardından 5 sıçandan hazırlanmış olan ADKKH’ler PBS içinde cilt kapatılmadan önce rektus kasına 4 sabit noktadan ve cilt altı dokuya enjekte edildi ve ardından cilt dikildi. Abdominoplasti ve ADKKH enjeksiyonundan 1 hafta sonra grup 1’de olduğu gibi TRAM flepler eleve edildi ve flepler yerlerine dikildi. TRAM fleplerin elevasyonu ve yerlerine dikilmesini takip eden 7. günde flepler fotoğraflandı, perforatör sayımı yapıldı, hayvanlar sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. 0., 7. ve 14. günlerde kan örnekleri alındı. Gruptan 1 sıçanın göğüs ön duvarı açılarak sol karıncık içerisine baryum solüsyonu enjekte edildi, sakrifiye olan sıçan -20°C’de 24 saat bekletildi ve flep dokusu alınarak mikroanjiyografik görüntülemesi yapıldı.

Grup 6 (Abdominoplasti ve ADKKH’den 2 hafta sonra TRAM flep, n:13):

Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Sıçanların abdominal bölgeleri elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi. Sıçanlar sırt üstü olacak şekilde dört ekstremitelerinden flasterler ile cerrahi masaya tespitlendi. Grup 2’te olduğu gibi abdominoplasti modeli uygulandı ardından 5

sıçandan hazırlanmış olan ADKKH'ler PBS içinde cilt kapatılmadan önce rektus kasına 4 sabit noktaya ve cilt altı dokuya enjekte edildi ve ardından cilt sütüre edildi. Abdominoplasti ve ADSC enjeksiyonundan 2 hafta sonra grup 1'de olduğu gibi TRAM flepler kaldırıldı ve flepler yerlerine dikildi. TRAM fleplerin elevasyonu ve yerlerine dikilmesini takip eden 7. günde flepler fotoğraflandı, perforatör sayımı yapıldı, hayvanlar sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. 0., 14. ve 21. günlerde kan örnekleri alındı. Gruptan 1 sıçanın göğüs ön duvarı açılarak sol karıncık içerisine baryum solüsyonu enjekte edildi, sakrifiye olan sıçan -20°C'de 24 saat bekletildi ve flep dokusu alınarak mikroanjiyografik görüntülemesi yapıldı.

Grup 7 (Abdominoplasti ve ADKKH'den 4 hafta sonra TRAM flep, n:13):

Sıçanlara, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Sıçanların abdominal bölgeleri elektrikli traş makinesi ile tıraş edildi. Sıçanlar sırt üstü olacak şekilde dört ekstremitelerinden flasterler ile cerrahi masaya tespitlendi. Grup 2'de olduğu gibi abdominoplasti modeli uygulandı ardından diğer 5 rattan hazırlanmış olan ADKKH'ler PBS içinde cilt kapatılmadan önce rektus kasına 4 sabit noktadan ve cilt altı dokuya enjekte edildi ve ardından cilt dikildi. Abdominoplasti ve ADSC enjeksiyonundan 4 hafta sonra grup 1'de olduğu gibi TRAM flepler kaldırıldı ve flepler yerlerine dikildi. TRAM fleplerin kaldırılması ve yerlerine dikilmesini takip eden 7. günde flepler fotoğraflandı, perforatör sayımı yapıldı, hayvanlar sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. 0., 28. ve 35. günlerde kan örnekleri alındı. Gruptan 1 sıçanın göğüs ön duvarı açılarak sol karıncık içerisine baryum solüsyonu enjekte edildi, sakrifiye olan sıçan -20°C'de 24 saat bekletildi ve flep dokusu alınarak mikroanjiyografik görüntülemesi yapıldı.

Grup 2, grup 3 ve grup 4'ün amacı abdominoplastinin süre değişkeni ile TRAM flep yaşayabilirliği üzerine olan etkilerini görmek ve 5, 6 ve 7 ADKKH grupları ile karşılaştırmaktır. TRAM grubu haricinde diğer tüm gruplarda 1. hafta (grup 2, grup 5), 2. hafta (grup 3, grup 6) ve 4. haftalarda (grup 4, grup 7) aynı işlemlerin tekrarlanmasının amacı ADKKH tedavisinin, abdominoplasti sonrası yapılabilecek TRAM flebin güvenilirliğine etki edip etmediğini ve eğer bir etkisi var ise ne kadar süre içinde bu etkiyi ortaya çıkardığını göstermektir.

MKH eldesi amaçlı 15 adet sıçan kullanıldı. Sıçanların inguinal bölgelerinden eksizyon ile alınan adipoz dokular uygun işlemlerden geçirilerek MKH'ler izole edilerek hazırlandı. Grup 4, 5 ve 6'daki sıçanlara hazırlanan kök hücreler abdominoplasti sırasında uygulandı. Adipoz doku elde edilmesi amacı ile kullanılan 15 adet sıçan 150 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc) intraperitoneal (ip) verilmesi ile sakrifiye edildi.

Abdominoplasti uygulanması sırasında rektustan çıkan ve karın ön duvarını besleyen muskulokutan perforatörler tek tek sayıldı ve fotoğraflandı. Deney grupları arasındaki flep canlılığını karşılaştırmak için canlı flep alanı ölçümü yapıldı. Doku örnekleri alınmadan önce TRAM flep cilt adasını besleyen yeni muskulokutan perforatör oluşumları mikroskop ve çıplak göz ile sayıldı ve fotoğraflandı. Alınan doku örneklerinde yeni damar oluşum farklılıklarını belirlemek için histopatolojik olarak kapiller dansite bakıldı. Yeni damar oluşum mekanizmasına ışık tutabilmek için kanda VEGF düzeyi bakıldı. Flebin kas komponentinde meydana gelen değişiklikleri karşılaştırmak için histopatolojik olarak fibroz gradient bakıldı. Diİ ile işaretli ADKKH'lerin endotelial hücrelere dönüşümünü göstermek için floresan mikroskopta inceleme yapıldı.

Denek sayıları ve çalışma süreleri literatürde daha önce yapılmış benzer çalışmalar ve çalışma öncesi yapılan istatistiksel ön değerlendirme sonrası belirlenmiştir (8, 10, 205, 206).

Tablo 3.1. Tüm gruplara farklı zamanlarda yapılan işlemleri ifade eden tablo

Kısaltmalar: TRAM: Trans Rektus Abdominis Muskulokutan, Abd.: Abdominoplasti, MAG: Mikroanjiyografi, mkpa: muskulokutan perforatör arter

GRUP	GRUP 1: <i>Sadece TRAM</i> flep kaldırması	GRUP 2: <i>Abd'den</i> <i>1 hafta</i> sonra TRAM flep kaldırılması	GRUP 3: <i>Abd'den</i> <i>2 hafta</i> sonra TRAM flep kaldırılması	Grup 4: <i>Abd'den</i> <i>4 hafta</i> sonra TRAM flep kaldırılması	Grup 5: <i>Abd ile ADKKH</i> enjeksiyonundan <i>1 hafta</i> sonra TRAM flep kaldırılması	Grup 6: <i>Abd ile ADKKH</i> enjeksiyonundan <i>2 hafta</i> sonra TRAM flep kaldırılması	Grup 7: <i>Abd ile ADKKH</i> enjeksiyonundan <i>4 hafta</i> sonra TRAM flep kaldırılması
ZAMAN							
1. gün	1. TRAM flep hazırlanması 2. 1'er cc kan alınması	1. Abd yapılması 2. mkpa sayımı 3. 1'er cc kan alınması	1. Abd yapılması 2. mkpa sayımı 3. 1'er cc kan alınması	1. Abd yapılması 2. mkpa sayımı 3. 1'er cc kan alınması	1. Abd yapılması 2. ADKKH enj. 3. mkpa sayımı 4. 1'er cc kan alınması	1. Abd yapılması 2. ADKKH enj. 3. mkpa sayımı 4. 1'er cc kan alınması	1. Abd yapılması 2. ADKKH enj. 3. mkpa sayımı 4. 1'er cc kan alınması
7. gün	1. Fleplerin fotoğraflanması 2. TRAM fleplerin eksizyonu 3. 1'er cc kan alınması 4. 1 sıçana MAG yapılması	1. TRAM flep hazırlanması 2. 1'er cc kan alınması			1. TRAM flep hazırlanması 2. 1'er cc kan alınması		
14. gün		1. Fleplerin fotoğraflanması 2. Yeni oluşan mkpa'lerin belirlenmesi 3. TRAM fleplerin eksizyonu 4. 1'er cc kan alınması 5. 1 sıçana MAG yapılması	1. TRAM flep hazırlanması 2. 1'er cc kan alınması		1. Fleplerin fotoğraflanması 2. Yeni oluşan mkpa'lerin belirlenmesi 3. TRAM fleplerin eksizyonu 4. 1'er cc kan alınması 5. 1 sıçana MAG yapılması	1. TRAM flep hazırlanması 2. 1'er cc kan alınması	
21. gün			1. Fleplerin fotoğraflanması 2. Yeni oluşan perforatörlerin belirlenmesi 3. TRAM fleplerin eksizyonu 4. 1'er cc kan alınması 5. 1 sıçana MAG yapılması			1. Fleplerin fotoğraflanması 2. Yeni oluşan mkpa'lerin belirlenmesi 3. TRAM fleplerin eksizyonu 4. 1'er cc kan alınması 5. 1 sıçana MAG yapılması	
28. gün				1. TRAM flep hazırlanması 2. 1'er cc kan alınması			1. TRAM flep hazırlanması 2. 1'er cc kan alınması
35. gün				1. Fleplerin fotoğraflanması 2. Yeni oluşan mkpa'lerin belirlenmesi 3. TRAM fleplerin eksizyonu 4. 1'er cc kan alınması 5. 1 sıçana MAG yapılması			1. Fleplerin fotoğraflanması 2. Yeni oluşan mkpa'lerin belirlenmesi 3. TRAM fleplerin eksizyonu 4. 1'er cc kan alınması 5. 1 sıçana MAG yapılması

3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı

Tüm deney hayvanlarına 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde standart oda şartları sağlandı. Oda ısısı 18-20 °C arasında tutuldu. Dişi hayvanlardaki östrojen siklusu, flep yaşamını, canlı/nekrotik alan oranlarını ve flep kontraksiyonunu etkileyerek sonuçları değiştirebileceğinden tüm deney hayvanları erkek olarak seçildi (278). Sıçanlar yem ve musluk suyu ile beslendi. Hayvanlara operasyon öncesi 24 saat açlık uygulandı. Hipotermi oluşmasını engellemek amacı ile sıçanlar ışık kaynağı altında ameliyat edildi ve uyanma esnasında da bu uygulama sürdürüldü.

Tüm sıçanların kuyruklarına gruplarını belli edecek ve gruplar arası karışma riskini ortadan kaldıracak şekilde işaretleme yapıldı. Otokanibalizasyonu önlemek için elizabeth yakalıkları hazırlanarak her sıçanın boyun bölgesine yerleştirildi (279). Tüm hayvanlara cerrahi sonrası dönemlerde cilt altı 0,02 mg/kg fentanil (Sufenta 5 mcg, Janssen Cilag inc.) ile analjezi uygulandı. Sıçanların birbirine zarar vermesini önlemek amacıyla her kafeste bir adet sıçan barındırıldı. Çalışma sonunda tüm sıçanlar, periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür enjekte edilerek sakrifiye edildi.

3.2. Deneylerde Kullanılan Malzemeler

Kullanılan alet, malzeme ve farmakolojik ajanlar tablo 3.2, 3.3 ve 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Anestezi, cerrahi ve sakrifikasyonda kullanılan farmakolojik maddeler

Farmakolojik ajanlar	Uygulama Yolu	Uygulama Dozu-Amacı
Ketamin hidroklorür	Periton içi	40mg/kg-anestezi 150mg/kg-sakrifikasyon
Ksilazin hidroklorür	Periton içi	5mg/kg-anestezi
Fentanil	Cilt altı	0,02mg/kg-ağrı kesici
Povidon-iodin (%10)	Haricen	%25 çözelti-antisepsi
Pyedif NG deri spreyi	Haricen	1kez püskürtme-antisepsi

Tablo 3.3. Kök hücre elde edilmesinde kullanılan kimyasal maddeler

(*Gibco-invitrogen, **Santa Crus, inc.)

Kök Hücre Elde Edilmesinde Kullanılan Kimyasal Maddeler	Uygulama Amacı
Fetal bovine serum (FBS)*	Kök hücre eldesi
Phosphate buffered saline (PBS)*	Kök hücre eldesi
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*	Kök hücre eldesi
Kollajenaz, tip 1*	Kök hücre eldesi
1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI)**	Kök hücrelerin işaretlenmesi amaçlı

Tablo 3.4. Deneylerde kullanılan malzemeler

Portegu	Tartı
Adson penset	5-10-60 ml'lik enjektörler
Steven's doku makası	İnsülin enjektörleri (1 ml)
No 15 bistüri	22 G damar yolu
Bipolar koter	22 G kelebek set
Steril gazlı bez	Santrifüj cihazı
Steril örtü seti	Hassas mikropipet
Steril eldiven	Cerrahi mikroskop
Çizim kalemi	Thoma lamı ve lamel
Cetvel	Petri kabı
Tıraş makinesi	200 µm'lik hücre süzgeci
İpek dikiş (4/0, 3/0 keskin iğneli)	Vakumlu boş biyokimya tüpü
Vicryl dikiş (3/0, yuvarlak iğneli)	Silikon yaprak
Elizabeth yakalığı	Dijital fotoğraf makinesi (SONY DSLR-A350)
Küvet	Lens (Minolta AF 50 mm, f1,7)

3.3. Cerrahi İşlemlere Hazırlık

Cerrahiye başlamadan önce sıçanların periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer inc.) enjekte edilerek anestezi sağlandı. Anestezi derinliği ekstremitte çekme yanıtı ile değerlendirildi. İdame anestezi başlangıç dozunun %50'si ile sağlandı. Karın ön duvarı tüyleri elektrikli tıraş makinesi yardımı ile kesildi. Kuyruktan 1cc kan alındı. Sıçanlar ameliyat masasına sırt üstü yatırılarak dört ekstremiteden ve kuyruklarından flasterlenerek tespitlendi. Ameliyat sahası %10 povidon-iodin (Batticon antiseptik solüsyon, Adeka ltd) ile temizlendi.

3.4. Eksizyon ile Adipoz Doku Elde Edilmesi

Anestezi sonrası sıçanların inguinal ve abdominal böğeleri tıraş edildi ve sırtüstü pozisyonda cerrahi masaya dört ekstremiteden flasterler ile tespit edildi. Her iki inguinal bölgedeki yağ yastıkçıklarına ulaşabilmek için ters Y insizyon planlandı. İnsizyon ksifoidin yaklaşık 4 cm inferiorundan başlatıldı karın orta hat boyunca vertikal planda kaudale doğru uzatıldı. Pubisin yaklaşık 1 cm süperiorunda sonlandırılan median insizyon bilateral inguinal böğelere uzatıldı (Şekil 3.1).

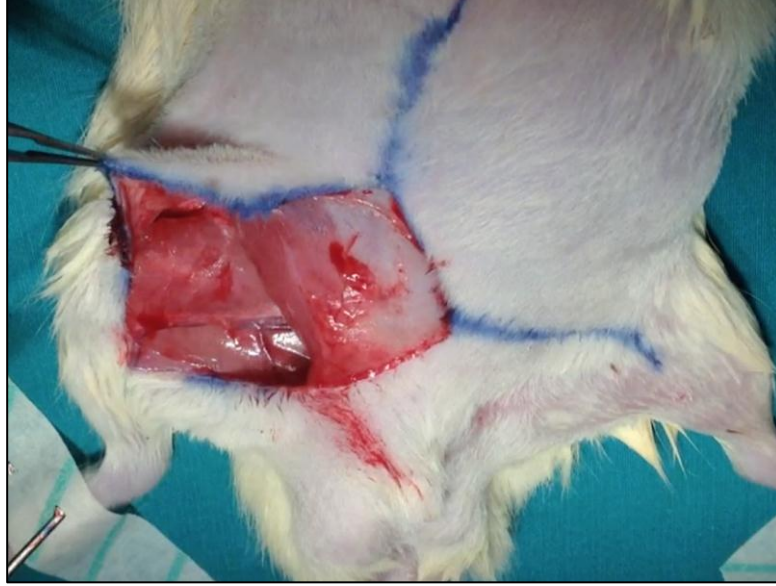


Şekil 3.1. Eksizyon ile adipoz doku eldesi için karın ön duvarından inguinal böğelere uzanan ters Y insizyonun çizimi

İnsizyonların tamamlanmasının ardından cilt flepleri kaldırıldı. Önce sağ inguinal bölgedeki yağ yastıkçıkları ortaya kondu ve eksize edildi (Şekil 3.2, Şekil 3.3).

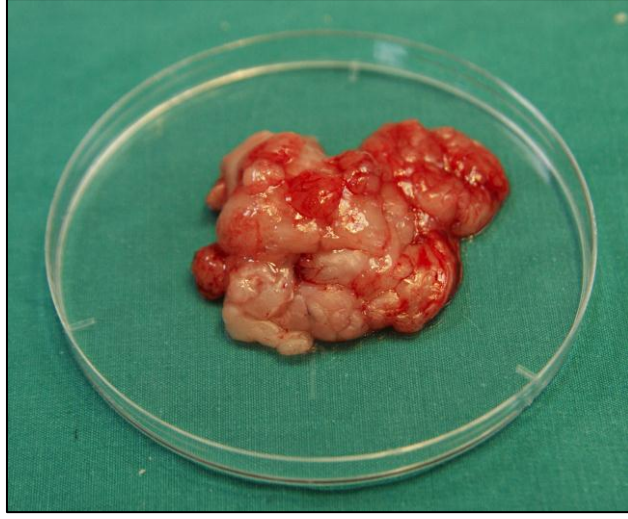


Şekil 3.2. Sağ inguinal bölge yağ yastıkçığının diseksiyonu



Şekil 3.3. Sağ inguinal yağ yastıkçığı eksizyonu sonrası görünüm

15 sıçandan yaklaşık 120 cc kadar yağ doku elde edildi. Eksize edilen yağ dokular, serum fizyolojik ile yıkanarak steril kaplara alındı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Sıçan inguinal bölgelerinden elde edilen yağ dokuları

3.5. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Elde Edilmesi ve MKH'lerin 1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI) ile İşaretlenmesi

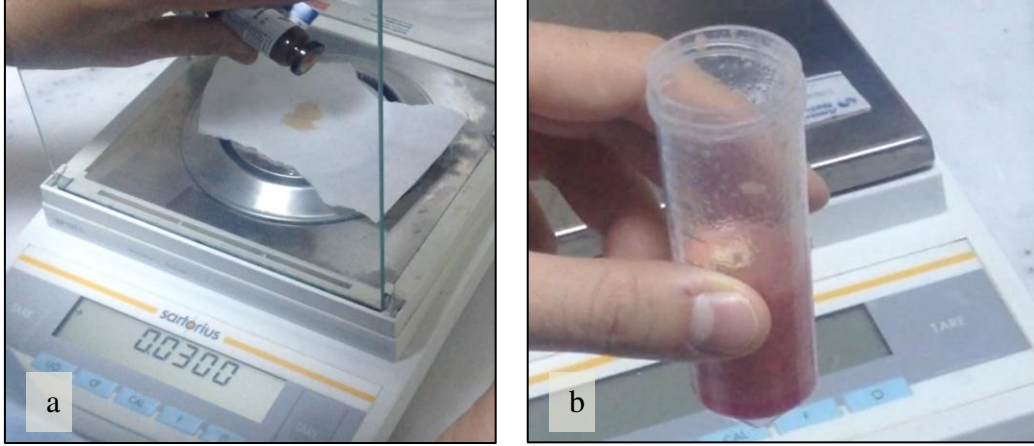
3.5.1. MKH Elde Edilmesi

Adipoz kökenli kök hücrelerin elde edilmesinde Ogawa ve arkadaşlarının tanımlamış olduğu protokol uygulandı (280). Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi ve işaretlenmesi işlemleri Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. 15 adet 10 haftalık Sprague-Dawley cinsi sıçanın inguinal bölgesinden alınan adipoz dokular PBS ile yıkandı. Alınan yağ dokuları 100 mm²'lik petri kaplarına alınarak burada mekanik olarak doku makası yardımıyla küçük parçalara ayrıldı (Şekil 3.5).



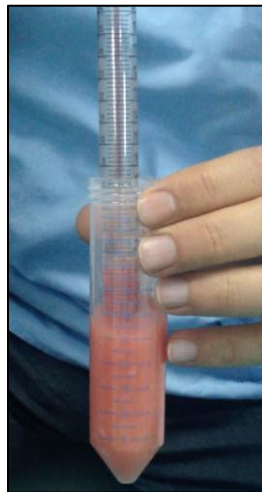
Şekil 3.5. Petri kabına alınan dokuların doku makası yardımı ile mekanik olarak parçalanarak küçük parçalara ayrılması

Bu işlem sırasında vasküler ve fibrotik yapılar ayıklanarak uzaklaştırıldı. Küçük parçalara ayrılan adipoz dokular yeni petri kaplarına alındı. Bu kapların içine 10 cc kontrol medium (DMEM, %10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin)) konarak 1 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında dokular, 3 defa PBS ile 5 dakika boyunca yıkanıp süspansiyon haline getirildi. Yıkama işlemini takiben dokular 50 cc'lik konik santrifüj tüplerine alındı. %0,15 tip 1 kollajenaz eklendi (Şekil 3.6a ve b).



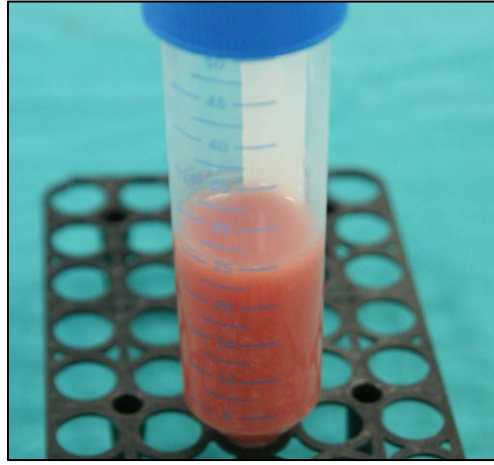
Şekil 3.6a ve b. Hassas tartı ile 0,3mg kollajenazın hazırlanması ve konik santrifüj tüpündeki yağ doku süspansiyonlarına eklenmesi

37 °C'de 30 dakika çalkalamalı su banyosunda bekletildi. 30 dakika sonunda kollajenazın nötralize edilmesi için homojenize olan süspansiyona eşit volümde (20ml) kontrol medium eklendi ve 5-10 dakika kadar karıştırıldı (Şekil 3.7).



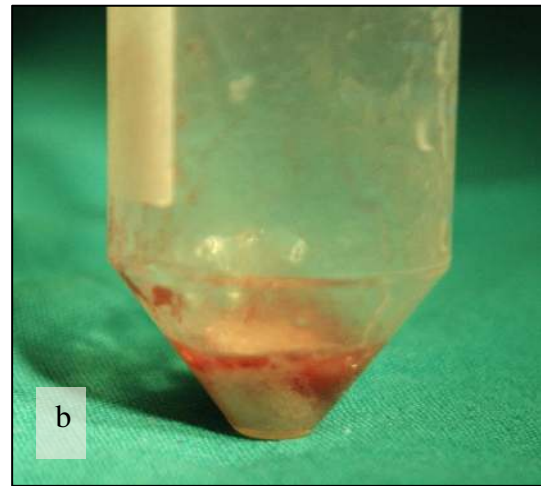
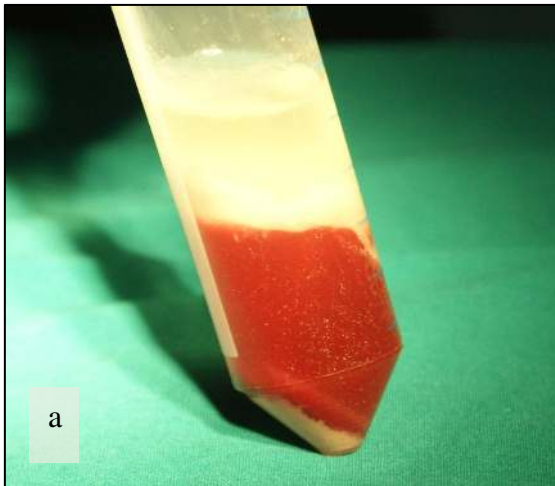
Şekil 3.7. Kollajenazın nötralize edilmesi için kontrol medium eklenen tüplerin karıştırılması

Oluşan süspansiyon 200 µm'lik hücre süzgecinden geçirilerek hücre dışı dokular (örn: bağ doku, fasya, vb.) temizlendi (Şekil 3.8).



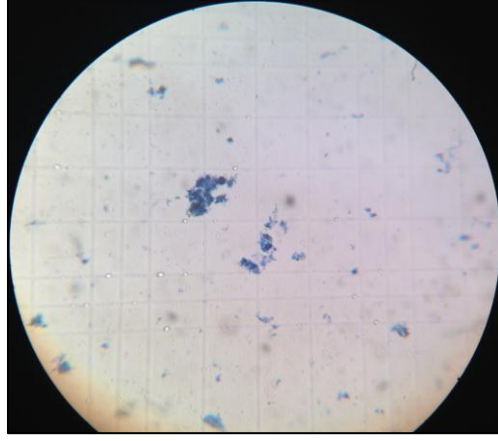
Şekil 3.8. Kollajenaz nötralizasyonu sonrası homojenize hale gelmiş ve hücre süzgecinden geçirilmiş tüplerin içeriklerinin görünümü

Takiben hücre süspansiyonlarını içeren tüpler 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüm tüplerin üst kısmında kalan süpernatantlar atıldı, alttaki birikmiş kök hücrelerin olduğu pelletler dikkatli bir şekilde toplanarak 10cc'lik santrifüj tüpüne konuldu (Şekil 3.9a ve b).



Şekil 3.9a. Santrifüj işlemi sonrası dibe çöken hücrelerin görünümü. 3.9b. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonraki hücrelerin görünümü

Bu 10cc'lik tüp 10cc'ye tamamlanacak şekilde PBS ile dolduruldu ve karışım tekrar süspansiyon haline getirildi. Oluşturulan bu süspansiyondan 0,1 ml alınarak metilen mavisi ile boyandı ve Thoma lamında ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı. Böylece ne kadar miktarda kök hücre elde edildiği hesaplanabildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Metilen mavisi ile boyanan hücrelerin Thoma lamında ışık mikroskobu altında sayılması

24×10^7 adet hücre sayıldı. Hücre sayımını takiben 10 cc'lik hücre süspansiyonu 1300 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan süpernatant atıldı, alt kısımdaki sayımı yapılmış olan kök hücrelerin olduğu pellet korundu.

3.5.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin DiI ile İşaretlenmesi

Bir tür sitoplazmik boya olan 1,1'-Dioktadesil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbosiyanin (DiI), sitoplazmaya bağlandıktan sonra hücrenin transplante edildiği bölgede takibini sağlamaktadır (205, 206, 280-282).

DiI %99'luk etanol çözeltisinde çözülerek %25'lik konsantrasyonda solüsyon hazırlandı ve $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Kullanılmadan önce PBS ile 1/100 oranında dilüe edildi. Bu karışım DiI partiküllerinin ayrılması için 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan süpernatandan 200 μl alındı. Buzlu su kovalarında ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) bekletilen kök hücrelerin bulunduğu tüpe 200 μl DiI eklendi. Karıştırılarak 5 dk inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de DiI ile karıştırılan ve inkübasyona bırakılan kök hücreler

Bu sürede DiI kök hücrelerin sitoplazmik membranlarına bağlandı. İnkübasyon periyodunun sonrasında, DiI sitoplazma bağlantısının fiksasyonu için 7 ml PBS konuldu ve karıştırıldı. Hücre DiI fiksasyonu sağlandıktan sonra bu süspansiyon 1300 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpün üst kısmında kalan süpernatant atıldı, alttaki 24×10^7 adet DiI işaretli kök hücrelerin olduğu pelletin üzerine 6,3 ml PBS (%1 penisilin/streptomisin içeren) eklendi, karıştırıldı ve tekrar süspansiyon haline getirildi. İnsülin enjektörlerine çekilerek kullanıma hazır hale getirildi (Şekil 3.12).



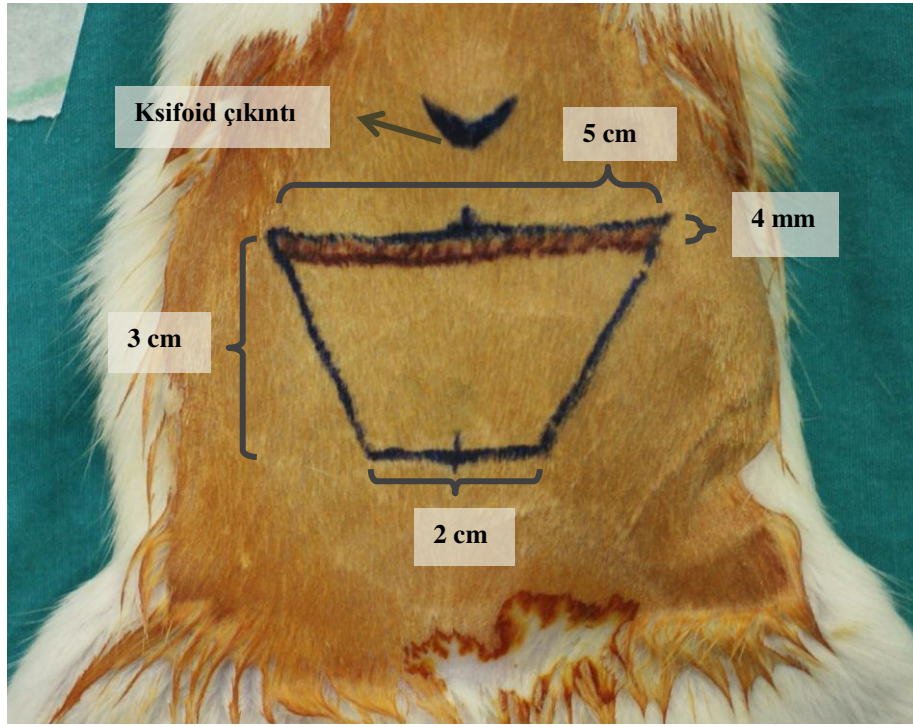
Şekil 3.12. PBS eklenerek solüsyon haline getirilmiş DiI işaretli kök hücrelerin insülin enjektörlerine çekilmiş görüntüsü

Toplamda 24×10^7 adet hücre içeren 6,3ml’lik süspansiyon.

Elde edilen hücreler toplamda 24 sıçana verileceği için 1 sıçana verilecek miktar yaklaşık 0,27 ml (1×10^7 adet hücre) olarak hesaplandı.

3.6. Abdominoplasti Modeli

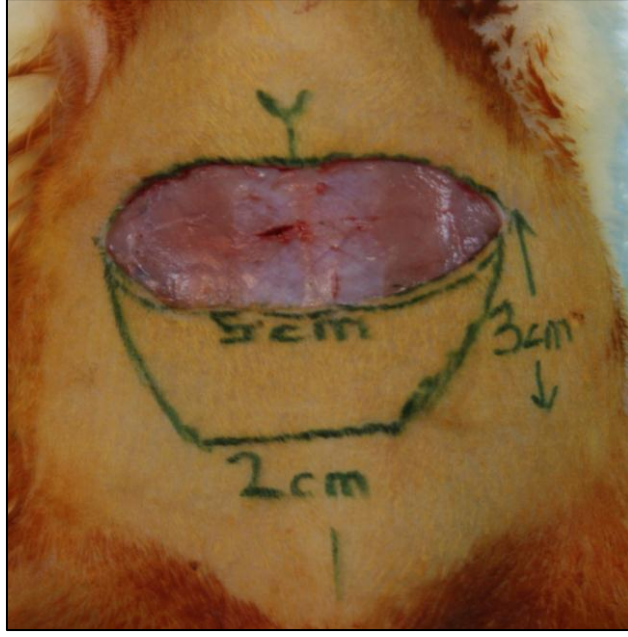
Daha önce tanımlanan abdominoplasti modeli uygulandı (144). Ksifoid çıkıntı işaretlendikten sonra 1 cm kaudale inilerek 5 cm'lik horizontal bir çizim yapıldı. Bu çizgiden kaudale 3 cm daha inilerek 2 cm uzunluğunda bir çizim yapıldı, bu çizimler laterallerde oblik çizimler ile birleştirildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Sığanda abdominoplasti modeli

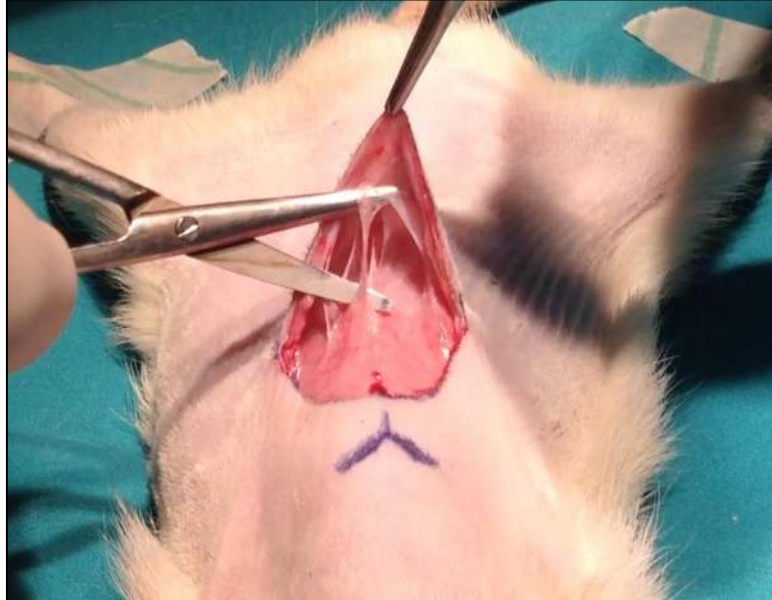
Abdominoplasti modeli çizimi; ksifoid process işaretlendikten sonra 1 cm kaudale inerek 5 cm'lik horizontal insizyon çizimi, 3 cm kaudale 2 cm'lik diseksiyon sınırının çizimi, her iki laterelde çizimlerin oblik olarak birleştirilmesi. Cilt eksizyonu için 4 mm'lik cilt sahasının belirlenmesi. 5 cm'lik insizyon hattı daha sonra yapılacak TRAM flep insizyonunun kranialı ile kesişmekte.

Kranialdeki ilk yapılan 5 cm'lik çizim insize edilerek rektus fasyası seviyesinde karın ön duvarına inildi (Şekil 3.14).

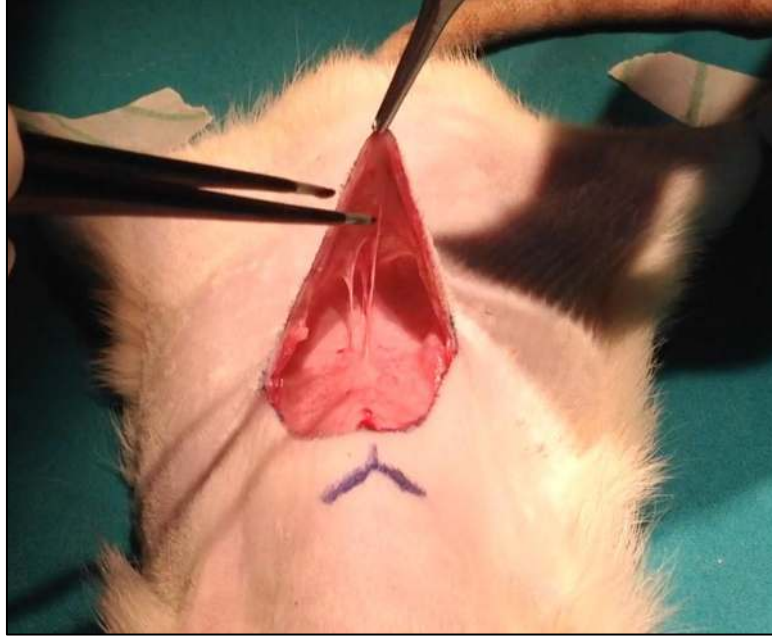


Şekil 3.14. Abdominoplasti insizyonu yapılarak rektus kas fasyası seviyesinden diseksiyona başlanması

Karın ön duvarı, çizime uygun şekilde rektus fasyası üzerinden ilerlenerek ve tüm rektus muskulokutan perforatörleri korunarak diseke edildi (Şekil 3.15). Perforatör sayımları yapıldıktan sonra tüm perforatörler bipolar koter ile koagüle edildi (Şekil 3.16).

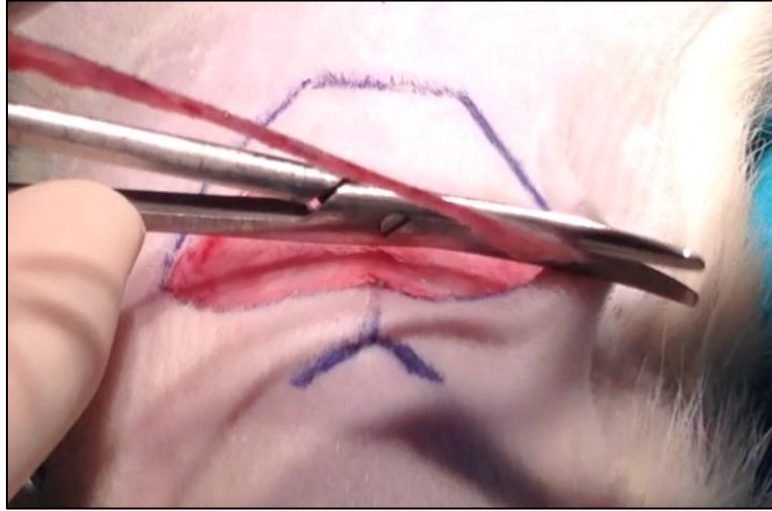


Şekil 3.15. Karın ön duvarı cildinin çizime uygun olarak rektus abdoministen çıkan muskulokutan perforatörler korunarak diseke edilmesi



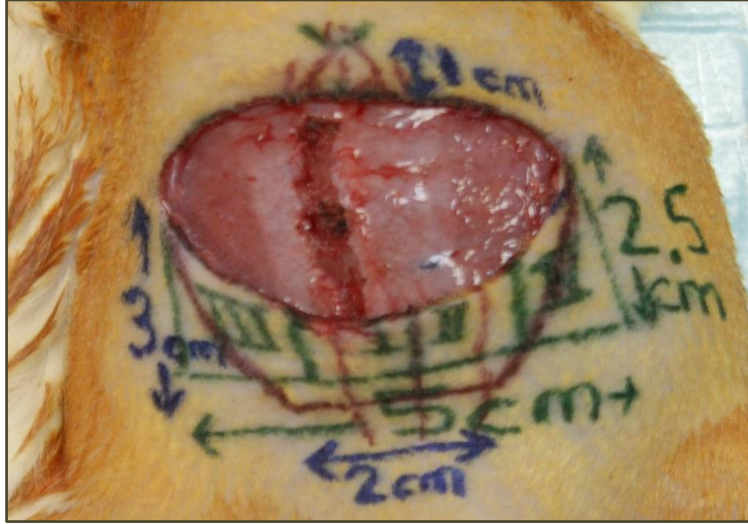
Şekil 3.16. Rektus abdominis kasından çıkan muskulokutan perforatörlerin bipolar koter ile ligasyonu

Abdominoplastinin simülasyonu için 5 cm'lik insizyon hattından 4 mm'lik bir cilt elipsi eksize edildi (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Abdominoplastinin simülasyonu için 5 cm'lik insizyon hattından 4 mm'lik cilt sahasının eksizyonu

Rektus abdominis kası ile karın ön duvarı cildi arasında neovaskülarizasyonun başlamasına yardımcı olmak için rektus fasyasından ince bir şeridin eksize edilmesi (8, 144), (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Rektus fasyasından ince bir şeridin eksizye edilmesi

Karın ön duvarı cildi kraniale doğru çekilerek 4-0 ipek dikiş ile sütüre edildi (Şekil 3.19).

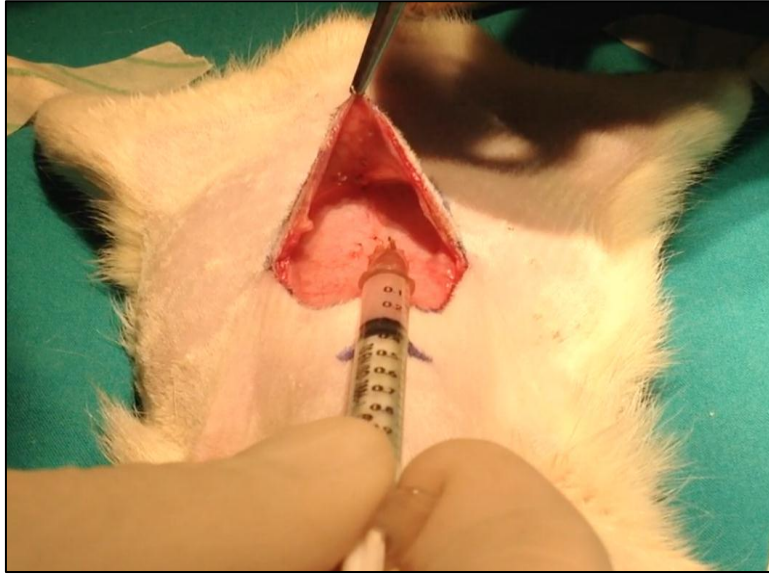


Şekil 3.19. Abdominoplasti sonrası 4-0 ipek sütürler ile insizyon onarımı

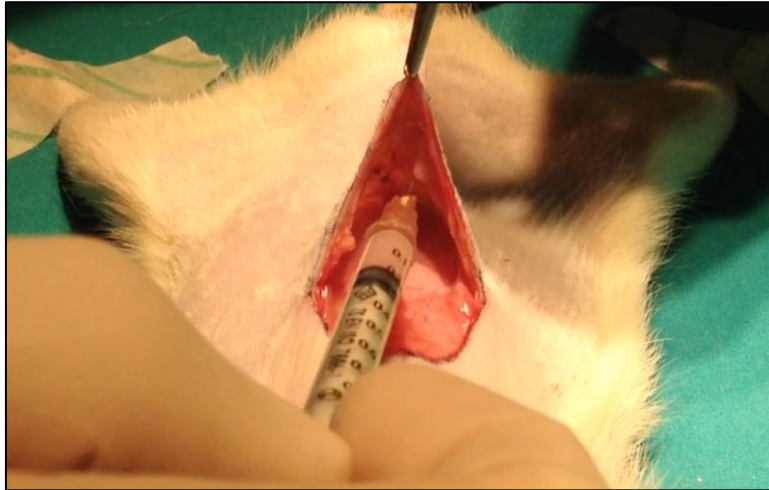
Cilt kapaması yapılmadan önce sağ rektus kası içine ve kas üstüne denk gelen cilt sahasında subkutan plana grup 2, 3 ve 4’de PBS, grup 5, 6 ve 7’de ise ADKKH içeren PBS enjeksiyonları yapıldı.

3.7. Abdominoplasti Sırasında PBS ve ADKKH İçeren PBS Enjeksiyonlarının Yapılması

Abdominoplasti için karın ön duvarı diseke edilerek kaldırıldıktan sonra grup 2, grup3 ve grup 4'deki sıçanların rektus abdominis kasları içine ve karın cildinin cilt altı bölgesine kök hücre içermeyen 0,3 ml PBS enjekte edildi. Grup 5, grup 6 ve grup 7'deki sıçanların aynı bölgelerine 1×10^7 adet adipoz kökenli kök hücre yaklaşık 0,3 ml PBS içinde enjekte edildi (Şekil 3.20, Şekil 3.21).



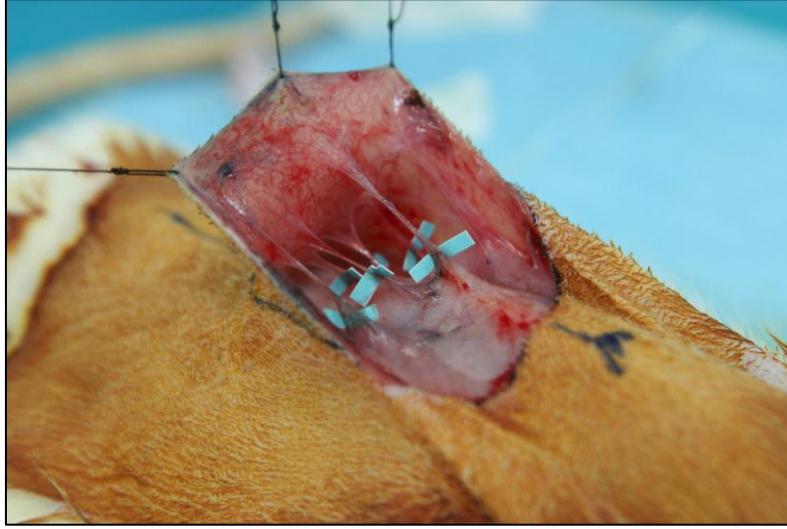
Şekil 3.20. Sağ rektus abdominis kası içerisine adipoz kökenli kök hücre enjeksiyonu



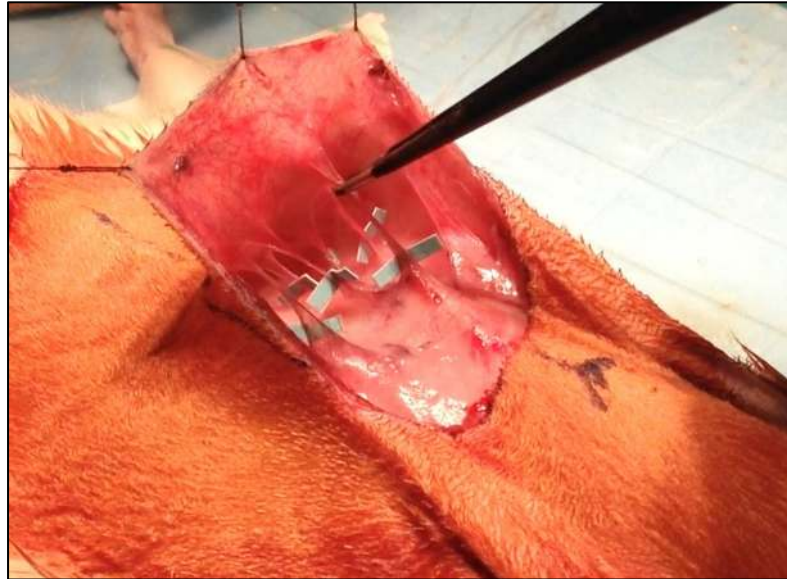
Şekil 3.21. Abdominoplasti sonrası karın ön duvarı cildinin cilt altına adipoz kökenli kök hücre enjeksiyonları

3.8. Karın Ön Duvarı Derisini Besleyen Rektus Abdominis Kası Muskulokutan Perforatörlerinin Gösterilmesi

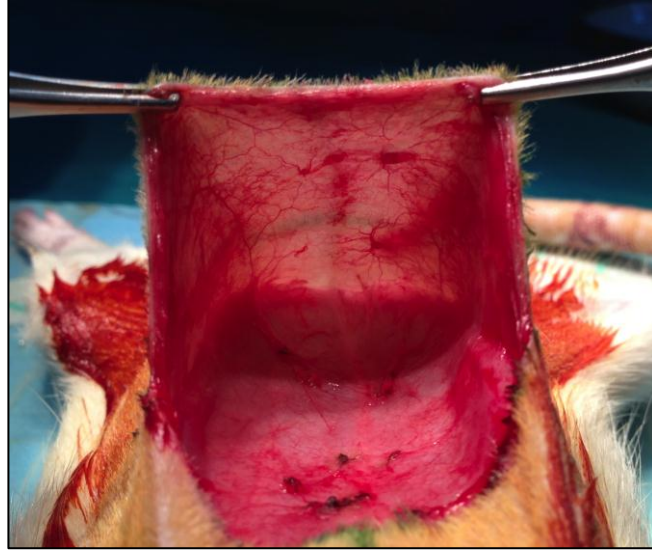
Sternal çıkıntının 1 cm kaudalinden yapılan 5 cm'lik insizyondan girilerek rektus fasyası üzerinden hassas bir Steven's doku makası kullanılarak daha önce tarif edildiği şekilde diseksiyon yapıldı ve rektus muskulokutan perforatörleri ortaya kondu. Her bir perforatör renkli ayıraçlar ile işaretlendi (Şekil 3.22). Sayımları yapıldı. Bipolar elektrokoterizasyon ile perforatörler kesildi ve hemostaz sağlandı (Şekil 3.23, Şekil 3.24).



Şekil 3.22. Karın ön duvarı beslenmesinden görevli rektus muskulokutan perforatörlerinin diseksiyonu ve işaretlenmesi



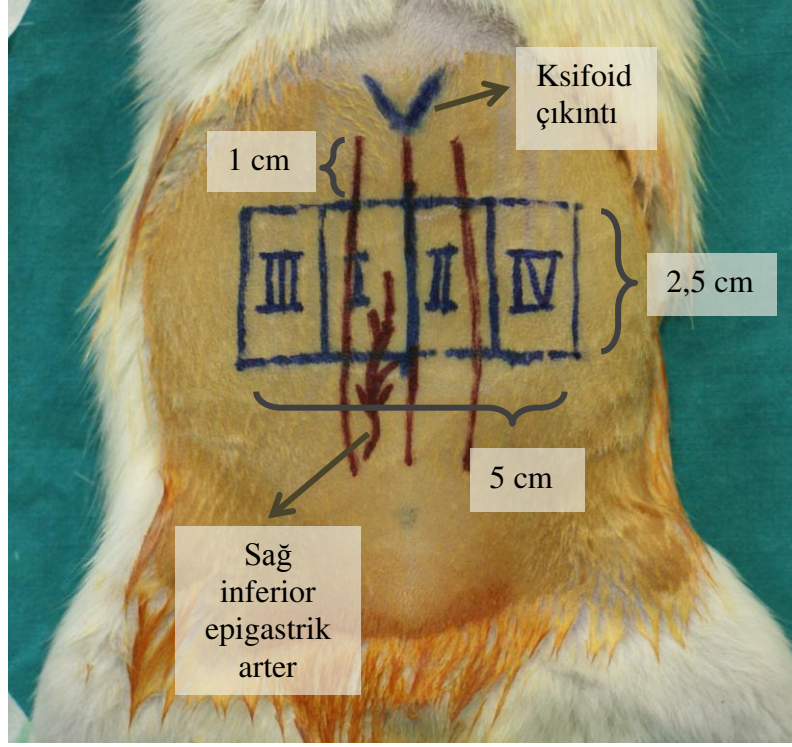
Şekil 3.23. Rektus muskulokutan perforatörlerinin bipolar elektrokoter ile kaagülasyonu



Şekil 3.24. Perforatörlerin koagülasyonu sonrası karın ön duvarı cilt altı ve perforatör anjiozomlarının görünümü

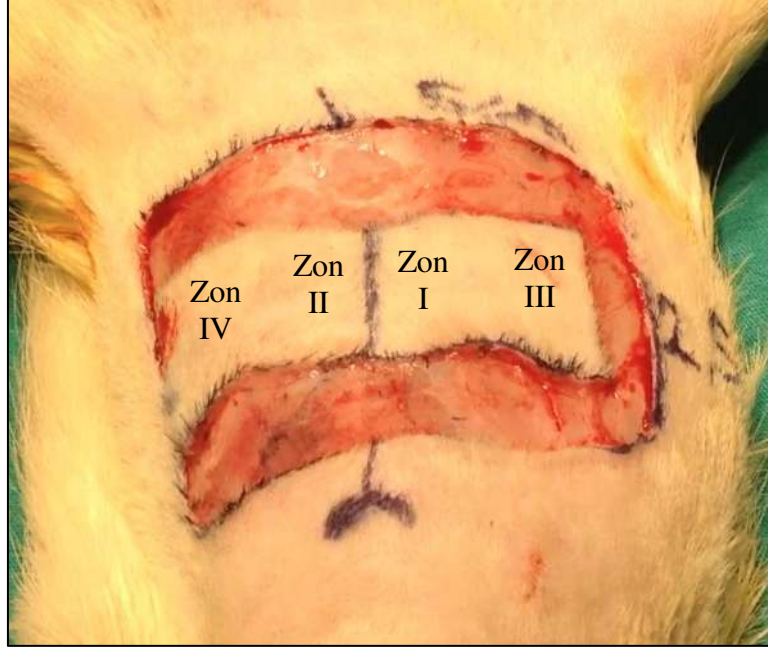
3.9. TRAM Flep Modeli

İnsanda TRAM flep beslenmesinde inferior epigastrik arterin süperior epigastrik arter sistemine göre dominant olduğu bilinmektedir. Bu durumu simüle edebilmek için sıçanda insandakinin tam tersi olan TRAM flep beslenmesinde dominant olan süperior epigastik arter sistemi bağlanarak, inferior epigastrik arter pediküllü TRAM flep planlanmıştır. Anestezi sonrası sıçanlar dört ekstremitelerinden tespitlendi. Flep cilt adasının boyutları 5x2,5cm; rektangüler olacak şekilde çizildi. Bu cilt adasının süperior sınırı ksifoidin 1cm altı, inferior sınırı ise süperior sınıra 2,5 cm mesafede olacak şekilde planlandı (Şekil 3.25).



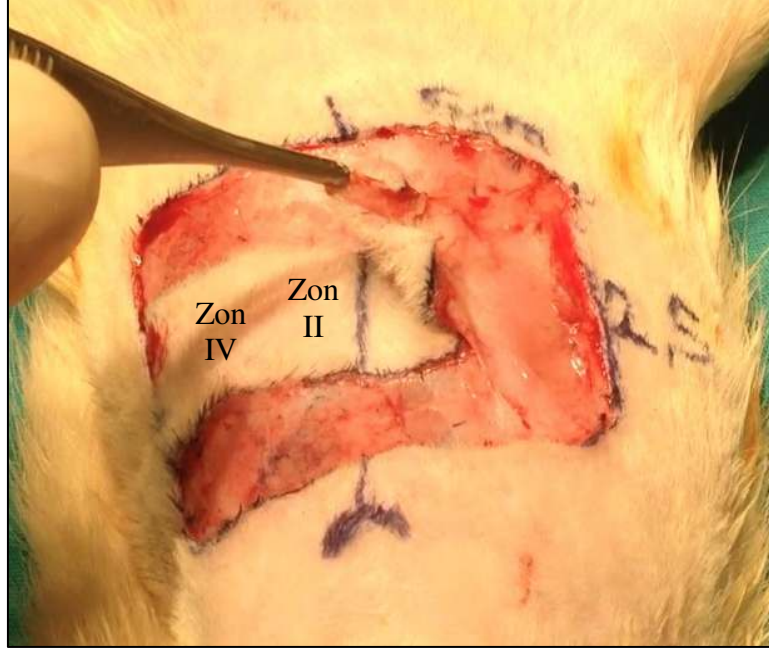
Şekil 3.25. Sağ inferior epigastrik arter pediküllü TRAM flep planlanması

Çizime uygun olarak TRAM flep cilt adası sınırları insizyonu yapıldı (Şekil 3.26).

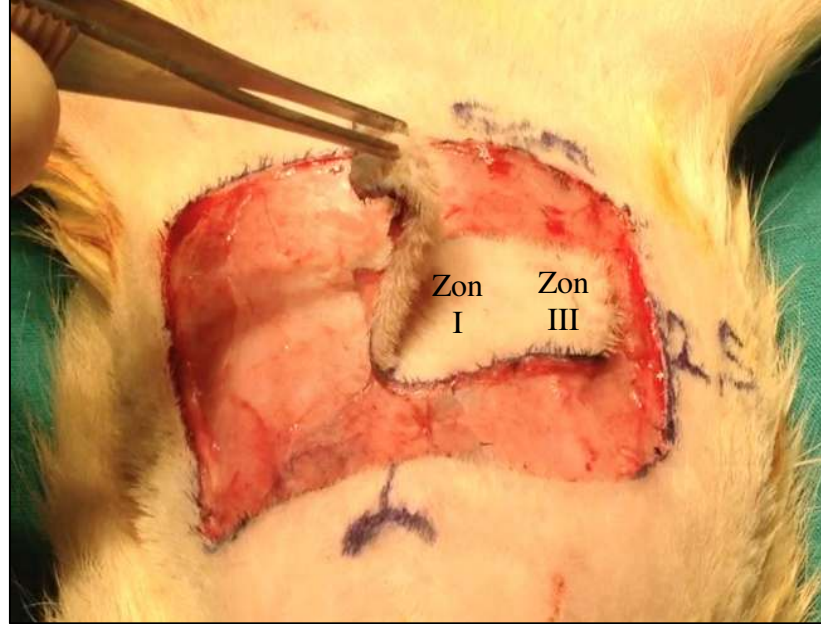


Şekil 3.26. TRAM flep cilt adası insizyonları

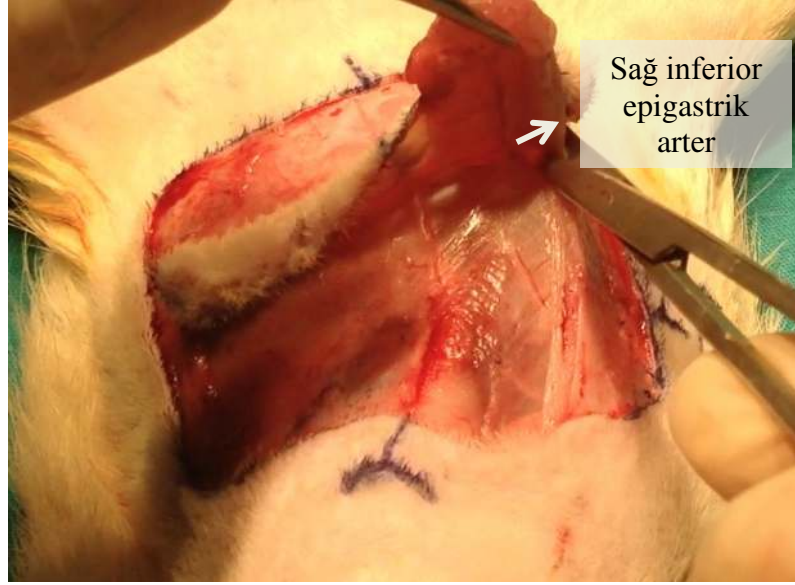
Aynı insandaki TRAM flep elevasyonunda olduğu gibi flep sağ tarafta zon III bölgesi rektus abdominis kasının lateral sınırına kadar, flep sol tarafında zon II ve zon IV ise pannikulus karnozus altındaki gevşek doku planında linea albaya kadar diseke edildi. (Şekil 3.27, Şekil 3.28)



Şekil 3.27. Zon III diseksiyonu

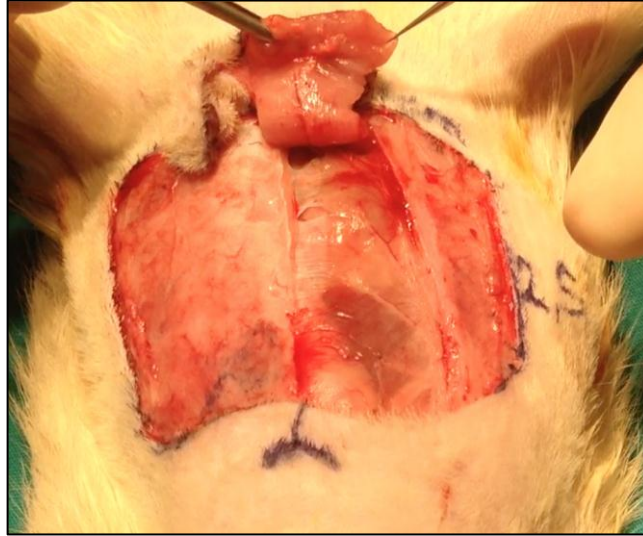


Şekil 3.28. Zon II ve IV'ün diseksiyonu



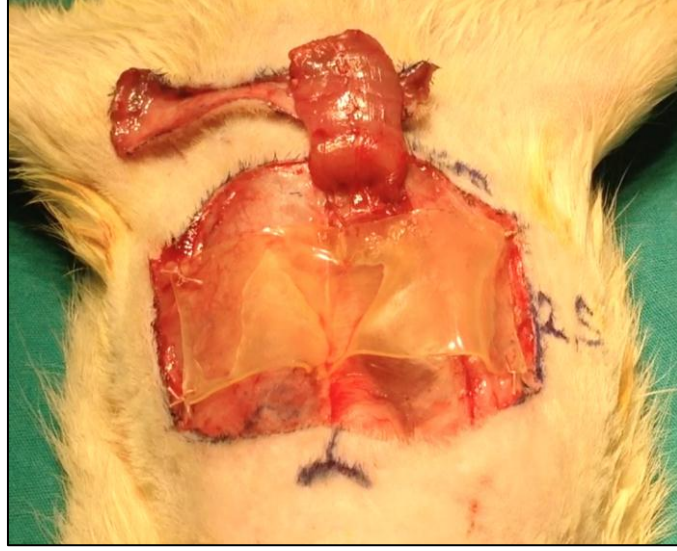
Şekil 3.31. Sağ inferior epigastrik arter pediküllü TRAM flep elevasyonu
Abdominal duvar bütünlüğünü korumak için kas posterior fasyası korunarak diseksiyonlar yapıldı.

Sağ inferior epigastrik arter pediküllü sağ TRAM flep kaldırılması tamamlandı (Şekil 3.32).



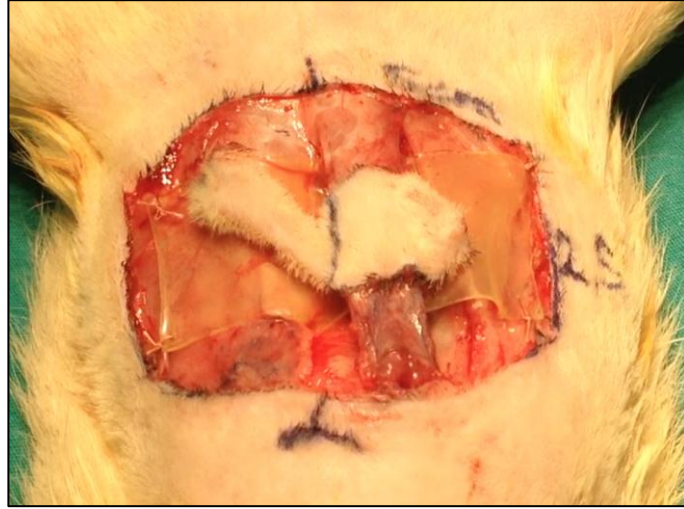
Şekil 3.32. Sağ inferior epigastrik arter pediküllü sağ TRAM flebin elevasyonu

TRAM flep yerine iade edilmeden önce tabandan revaskülarizasyonun önlenmesi için flep alanı ile aynı boyutta (5x2,5 cm) silikon yaprak muskulokutan flep ile karın ön duvarı arasına yerleştirildi (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. Karın ön duvarına silikon yaprağın yerleştirilmesi

Silikon blok yerleştirildikten sonra sağ rektus abdominis kası 4-0 vikryl dikişler ile yerine suture edildi (Şekil 3.34).



Şekil 3.34. Sağ rektus abdominis kasının yerine 4-0 vikryl dikişler ile suture edilmesi

TRAM flep cilt adası kendi yerine 4-0 ipek dikişler (Doğsan ltd) ile suture edildi (Şekil 3.35).



Şekil 3.35. TRAM flep cilt adasının 4-0 ipek dikişler ile yerine suture edilmesi

3.10. Kanda VEGF Seviyesinin Ölçülmesi

Tüm gruplardan kanda VEGF bazal değerlerinin belirlenmesi için ilk cerrahi işlemten hemen önce bir kez kan alındı. Daha sonra gruplara göre değişen sürelerde beklendikten sonra TRAM fleplerin kaldırılmasından hemen önce ve doku örnekleri alınarak çalışmanın sonlandırılacağı son gün de bir kez olmak üzere toplam iki kez daha kan örnekleri alındı. Grup 1’den TRAM flep kaldırılmadan hemen önce, 4. günde ve doku örneklerinin alınarak hayvanların sakrifiye edileceği 7. günde VEGF çalışılabilmesi için kan alındı.

Tüm sıçanlar 12-16 saat öncesinden aç bırakıldı. Cerrahi için verilen 40mg/kg ketamin hidroklorür, 5mg/kg ksilazin hidroklorür sonrasında sıçanın kuyruk proksimalinin ventral yüzü, %10 povidon-iodin ile temizlendi. Kuyruk venine 22 gauge (G) damaryolu yerleştirilerek, 1 ml kan tüpe alındı (Şekil 3.36).



Şekil 3.36. Sıçanın kuyruk veninden 22 gauge damaryolu ile kan alınması

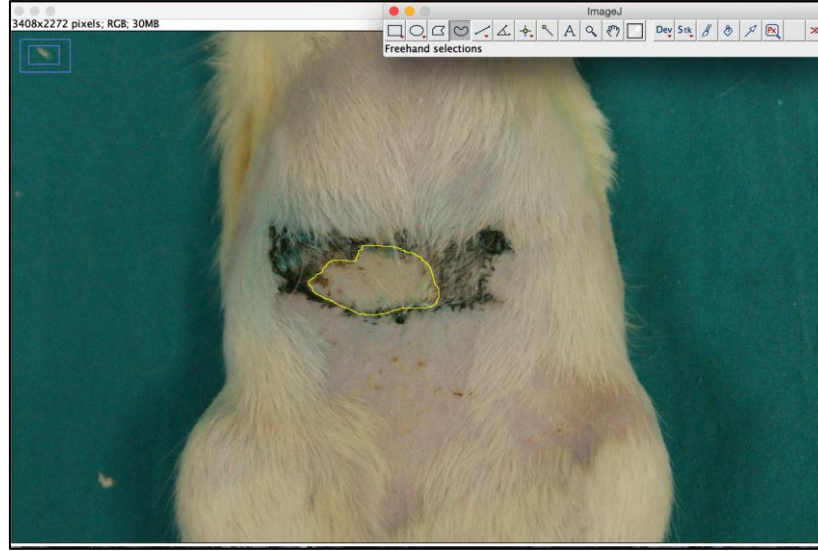
Kan örnekleri, 4000 rpm/dk hızında, 10 dakika santrifüj edildikten sonra mikropipet yardımı ile serumu ayırıldı. Serum örnekleri analiz gününe kadar (30 gün) -20 °C’de saklandı.

Serum VEGF derişimleri R&D Systems (USA& Canada) marka ticari kit (Katalog no: RRV00) kullanılarak ELISA yöntemiyle belirlenmiştir.

VEGF analizi “sandwich ELISA” yöntemi prensibine dayanmaktadır. VEGF’e özgü monoklonal antikor kaplı kuyucuklara belirtilen hacimlerde örnek/standart/kontrol eklenerek oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 2 saat bekletilen kuyucuklara ticari kitte belirtilen yıkama prosedürü uygulanarak bağlanmayan kısımların uzaklaştırılması sağlanmış ve ardından tüm kuyucuklara konjugat eklenerek yeniden oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda, kit prosedürüne uygun olarak yıkama işlemi uygulanmış ve kuyucuklara substrat eklenmesini takiben 30 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan mavi renk stop çözeltisinin eklenmesiyle sarıya dönüşmüş ve tepkime durdurulmuştur. Oluşan rengin absorbansı ELISA okuyucusunda 450 nm’de ölçülmüş ve standart eğri kullanılarak örnek derişimleri hesaplanmıştır. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edilmiştir. Yöntemin analitik duyarlılığı 8,4 pg/ml ‘dir.

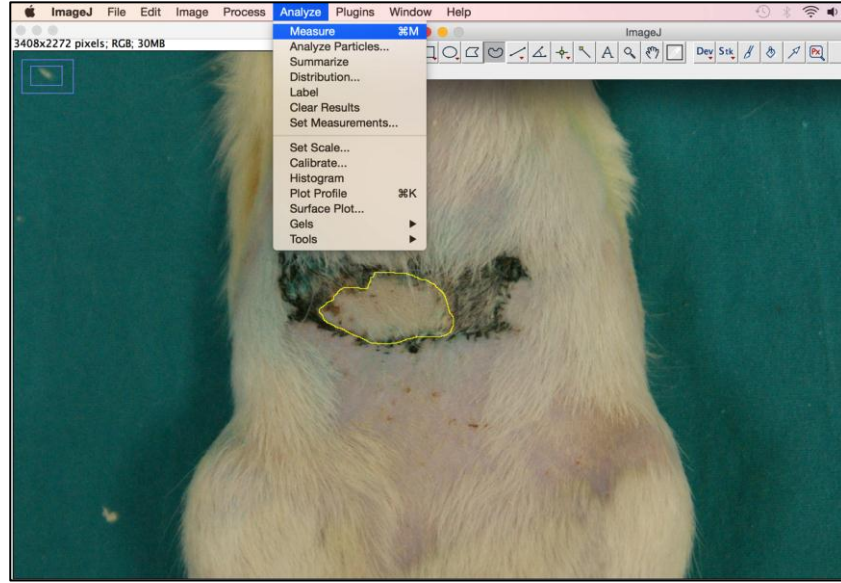
3.11. Yüzey Alan Ölçümleri

TRAM flep kaldırılmasından 7 gün sonra flep canlı ve nekrotik alanlarının ölçülebilmesi için tüm sıçanların flepleri fotoğraflandı. Bu işlem için periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Hayvanlar cerrahi masaya sırtüstü gelecek şekilde dört ekstremiteden flaster ile tespit edildi. Fotoğraflar fleplerin yanlarına cetvel konarak sabit ışık altında ve sabit mesafeden (50cm) dijital fotoğraf makinesi (SONY®, DSLR-A350) ile 50 mm’lik sabit lens (Minolta AF 50mm, f1,7) kullanılarak çekildi. Çekilen tüm fotoğraflarda canlı ve nekrotik alanların hesaplanması için ImageJ 1.48v; Java 1.6.0_65(Image Processing and Analysis in Java) programı kullanıldı. Önce flebin canlı alanının sınırları ‘freehand selections’ seçeneği ile çizildi (Şekil 3.37).



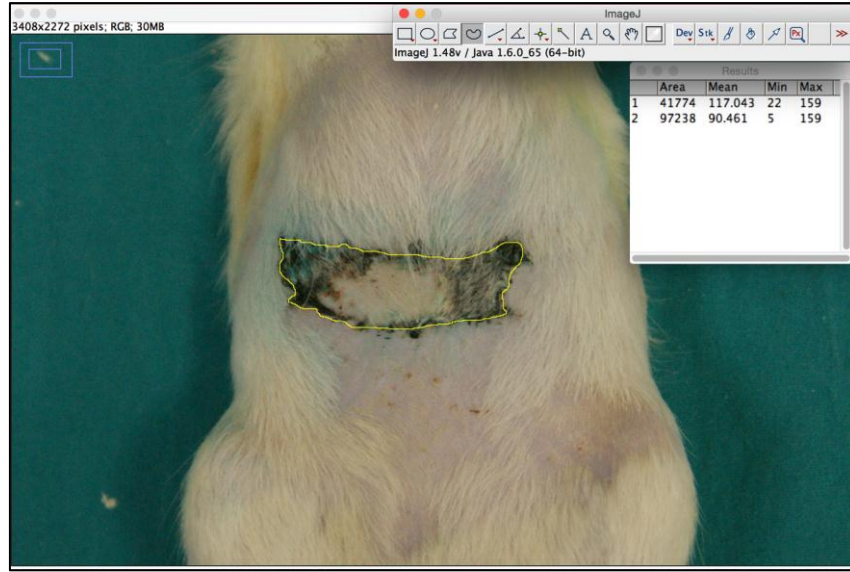
Şekil 3.37. ImageJ 1.48v programında fotoğraf açıldıktan sonra ‘freehand selections’ seçeneği ile flep canlı alanının sınırlarının çizimi

‘Analyze’ sekmesinde ‘Measure’ seçeneği seçildi ve canlı flep alanındaki pixel sayımı yapıldı (Şekil 3.38).



Şekil 3.38. ‘Analyze’ sekmesinden ‘Measure’ seçeneğinin seçilerek flep canlı alınının seçilmesi

Ardından aynı işlemler sırası ile tüm flep alanı için yapıldı. Böylece flebin canlı alanındaki pixel sayısı ve flebin tüm alanındaki piksel sayısı hesaplanabilmiş oldu (Şekil 3.39).



Şekil 3.39. ImageJ 1.48v programında ‘Analyze’ ve ‘Measure’ sekmeleri ile flep canlı alanı ve flep total alanındaki pixel sayımlarının yapılması

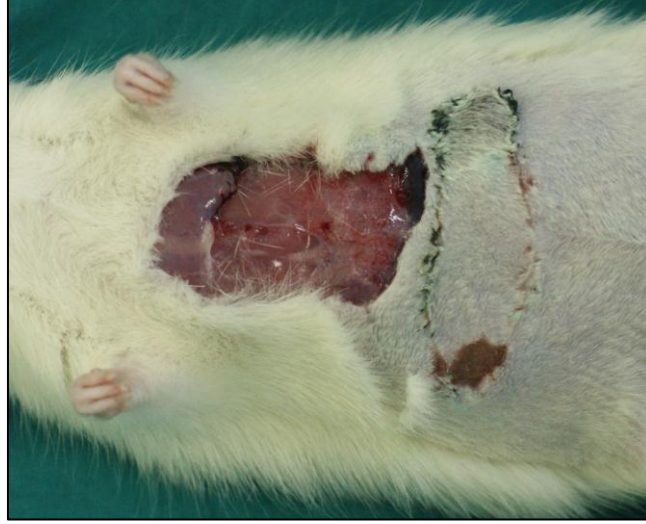
Elde edilen ölçümler birbirleri ile oranlanarak canlı alan yüzdesi hesaplandı. Canlı alan yüzdesi şu formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Canlı alan yüzdesi} = (\text{canlı flep alanı pixel sayısı} / \text{tüm flep alanı pixel sayısı}) \times 100$$

Flep fotoğraflarının çekilmesinin ardından sıçanların 7. gündeki TRAM fleplerinin cilt adası eleve edildi ve yeni oluşan perforatör olup olmadığı ve varsa sayısının hesaplanması için diseksiyon ile perforatörler ortaya kondu. Her gruptan seçilen birer sıçana mikroanjiyografi yapılması için intrakardiyak olarak %25’lik 60cc baryum çözeltisi enjeksiyonu yapıldı. Diğer sıçanlardan rektus kası ile birlikte TRAM flepler histopatolojik inceleme amacı ile eksize edildi. Sıçanlar periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür verilerek sakrifiye edildi.

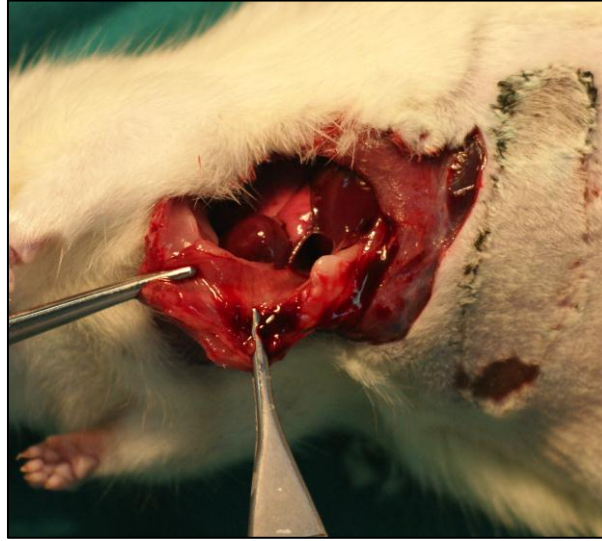
3.12. Mikroanjiyografi Çekilmesi

TRAM fleplerin kaldırılmasının 7. gününde her gruptan birer sıçan mikroanjiyografi demonstrasyonu için seçildi. Sıçanlar anestezinin ardından cerrahi masaya sırtüstü yerleştirilerek dört ekstremiteden flasterler ile sabitlendi. Sol tarafta, subkostal çizgide kesi yapıldı ve cilt altı bölgeye girildi. Göğüs ön duvarı sol tarafta 4x3cm’lik alan cilt ve cilt altı doku eksize edildi (Şekil 3.40).



Şekil 3.40. Sol göğüs kafesinin ekspozе olmasını sağlamak amacı ile sol göğüs ön duvarı cilt ve cilt altı dokusunun eksizyonu

Sol göğüs ön duvarını oluşturulan kostalar sternal bileşkeye uygulanan kesi ile açılarak kalbe ulaşıldı (Şekil 3.41).



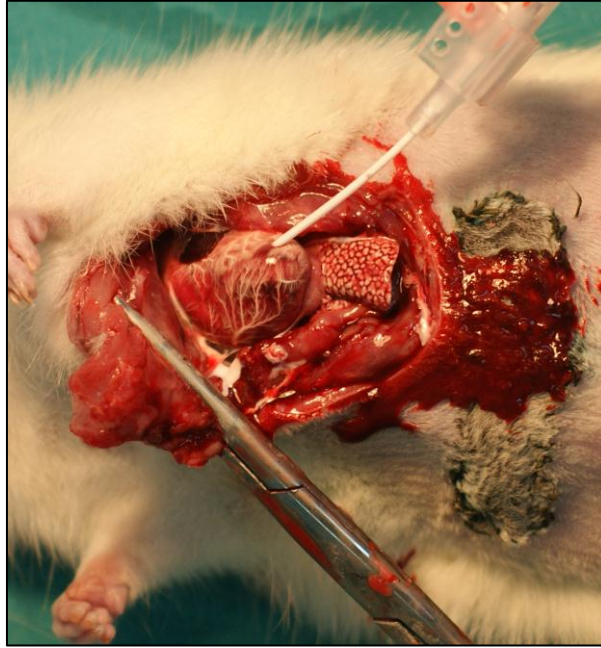
Şekil 3.41. Sol kostaların açılması ve kalbe ulaşılması

15 cc baryum (R-X baryum solüsyon %100, 240 ml, Yenişehir Lab Ltd.) ve 45 cc SF bir kaba boşaltıldı ve %25'lik 60 cc baryum çözeltisi elde edildi. Çözelti 50 cc'lik enjektörlere çekildi. Kalbin sol karıncığı, 22 gauge intraket ile kanülize edildi ve 60 cc'lik %25 oranında baryum içeren çözelti düşük basınç ile enjekte edildi (Şekil 3.42).



Şekil 3.42. 60 cc %25 oranında hazırlanan baryum çözeltisinin enjektör ile sol karıncık içerisine enjekte edilmesi

Baryum çözeltisi enjekte edildikçe öncelikle koroner damarların beyazlaştığı ardından karaciğerin şişerek beyaz beneklenme gösterdiği izlendi (Şekil 3.43).



Şekil 3.43. Baryum solüsyonunun enjeksiyonu sırasında koroner damarlarda ve karaciğerde meydana gelen değişiklikler

İşlem başlangıcından 60-90 saniye sonra baryum çözeltisinin sıçanın tüm dolaşım sistemine yayılması sebebiyle deney hayvanı sakrifiye oldu. Kateter geri çekildi.

Eksizyon hattına yaklaştırma sütürleri kondu. Sıçan plastik torba içinde düz bir zeminde yatırılarak -20°C’de bir gün bekletildi.

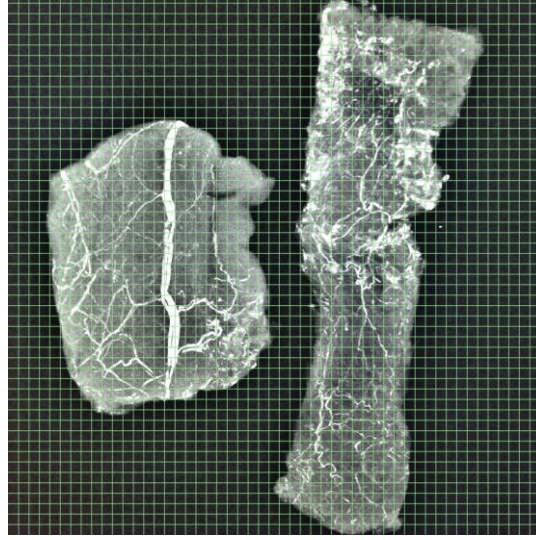
24 saat sonra oda sıcaklığına çıkarılan sıçanın TRAM flebi total olarak eksize edildi. Cilt adası ve rektus abdominis kas dokusu birbirinden ayrıldı. Naylon parçaları arasında mamografi cihazına (Hologic®, Selenia Dimensions) yerleştirilen flep kas ve deri adalarının anjiyografik görüntüleri alındı (şekil 3.44).



şekil 3.44. Mamografi cihazı ile sıçan TRAM flep parçalarının anjiyografik görüntülerinin alınması

3.13. Mikroanjiyografi Görüntülerinin Değerlendirilmesi

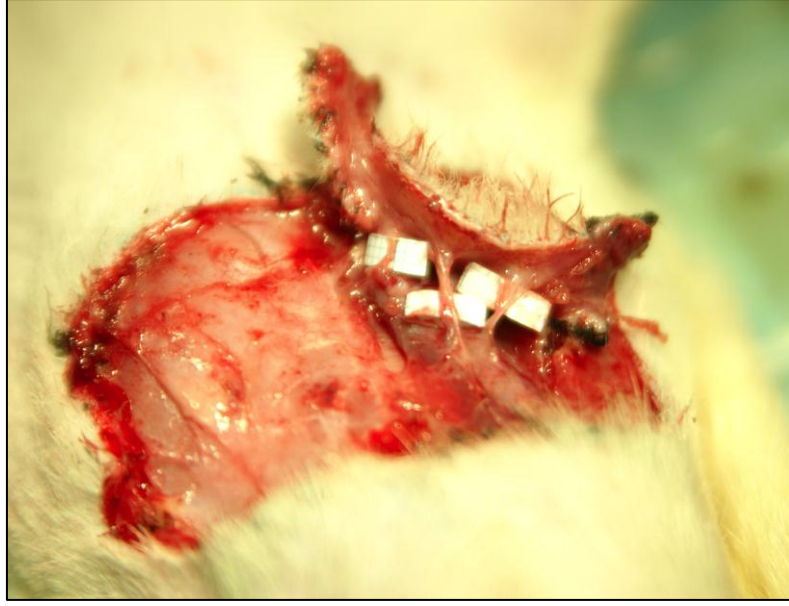
Tüm gruplardan birer sıçan seçilerek intrakardiyak baryum enjeksiyonu yapıldı. Bir gün beklenildikten sonra TRAM flepler alındı ve mamografi cihazı ile bu dokuların mikroanjiyografik görüntüleri çekildi. Alınan görüntülerin içerdikleri damar miktarı daha önce tanımlanmış olan yönteme getirilen ufak modifikasyonlar ile sayıldı (206). Tüm görüntülerde fleplerin boyunu vertikal düzlemde kat eden 50 adet küçük kare çizildi. Baryum solüsyonu ile perfüze edilen ve görüntüleri alınan bu dokuların içerdikleri damarsal yapıların kat ettikleri her kare sayıldı ve her görüntü için toplam bir değer elde edildi (şekil 3.45).



Şekil 3.45. Flebin uzun eksenini kesen 50 adet karenin görüntüye yerleştirilmesi ve bu kareler yardımı ile damarlanmanın ölçülmesi

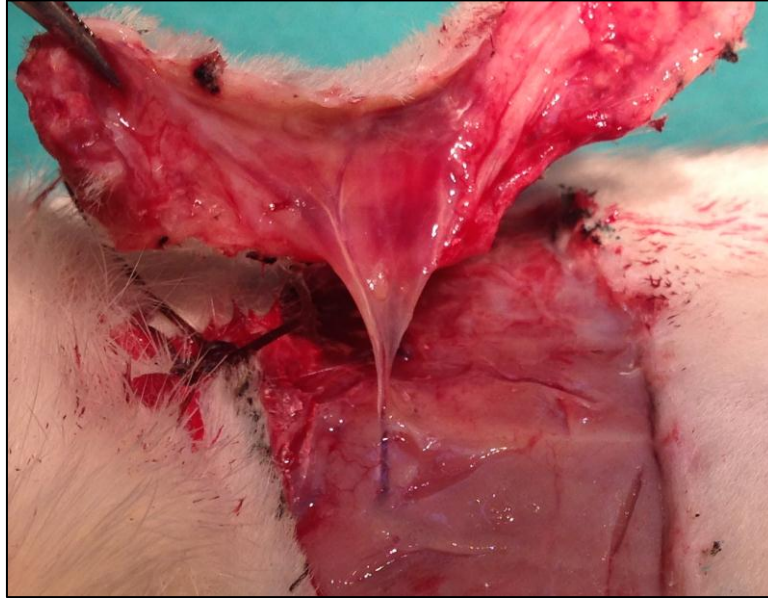
3.14. Abdominoplasti Sonrası Yeniden Oluşan Rektus Abdominis Kası Muskulokutan Perforetörlerinin Gösterilmesi

Grup 1 dışında tüm gruplarda tüm sıçanların TRAM flep kaldırıldıktan sonraki 7. günde TRAM flepleri doku incelemesi amacı ile alınmadan önce yeni oluşan muskulokutan perforatörlerin gösterilmesi işlemi yapıldı. Bu işlem için periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür, 5 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulanarak anestezi verildi. Hayvanlar cerrahi masaya sırtüstü gelecek şekilde dört ekstremiteden flaster ile tespit edildi. TRAM flep cilt adası sütüre edilmiş olan insizyon sınırından yeniden insize edildi. Diseksiyon ile zon II, IV ve III sırası ile eleve edildi. Rektus abdominis kası kranialinden ekspozе edildi. Mikro makas ve mikro penset ile zon I'e ince diseksiyon yapıldı. Perforatör oluşabilmiş gruplarda perforatörler diseksiyon yapılarak ortaya kondu (Şekil 3.46, 3.47). Ardından cerrahi mikroskop ile ortaya konan dokuların damar oldukları teyit edildi (Şekil 3.48). İşaretlenerek sayımları yapıldı. Rektus kası karın ön duvarına tespitlendiği kranial ucundan başlanarak kaudale doğru eleve edildi ve TRAM flepler histopatolojik inceleme amacı ile total olarak eksize edildi. Formol solüsyonu içine alındı. Sıçanlar periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür verilerek sakrifiye edildi.

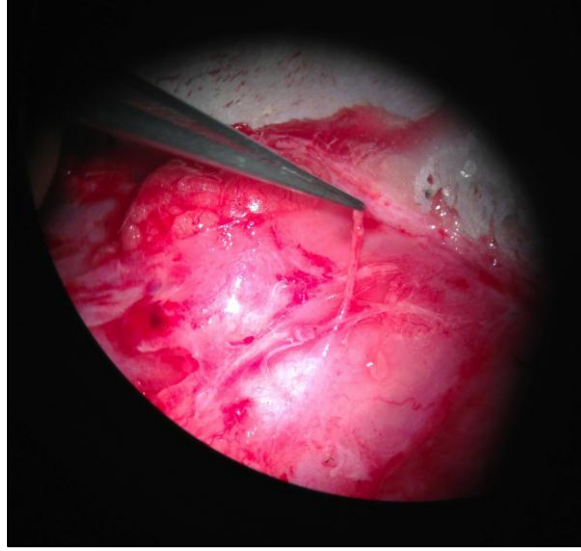


Şekil 3.46. Yeni oluşan muskulokutan perforatörlerin gösterilmesi

Abdominoplasti ile kök hücre enjeksiyonu ve bekleme süresi sonrası TRAM flep kaldırılırken ortaya konan yeni oluşmuş rektus abdominis kası muskulokutan perforatörleri



Şekil 3.47. Muskulokutan perforatürün rektus abdominis kasından çıkışı ve TRAM flep cilt adasına girerek dağılması



Şekil 3.48. Cerrahi mikroskop ile muskulokutan perforatörün ve lümeninin görülmesi

3.15. Histopatolojik Değerlendirme

Tüm gruplardaki sıçanların TRAM flep kaldırılmasını takip eden 7. günlerinde histopatolojik inceleme amacı ile flepleri total olarak alındı. Biyopsi materyalleri %10'luk nötral formaldehid solüsyonları içerisinde fikse edildi ve oda 4°C'de 24 saat bekletildi. Formaldehid solüsyonu içinde fikse olan materyaller patoloji departmanına götürüldü. Her doku örneğinden TRAM flep zonlarının tümünü ve rektus kasını aynı anda içerecek şekilde bir adet enine kesit uygulandı ve doku takibine alındı.

Parafin bloğa gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Massom Trikrom ile boyandı. Bu kesitler ışık mikroskobu altında vasküler dansite ve kas fibroz gradienti derecelendirmesi açısından incelendi ve fotoğraflandı. Örneklerin histopatolojik incelemesi Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.'da aynı patolog tarafından, örneklerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin yapıldı. H&E ile boyalı kesitler 400 büyütme altında özellikle zon 1 ve çevresi taranarak 10 farklı alan değerlendirildi ve vasküler dansite ölçümü yapıldı. Massom Trikrom ile boyalı kesitlerde, rektus abdominis kası hasarlanması miktarı fibrozis derecelendirilmesi ile değerlendirildi.

3.16. DiI İşaretli Kök Hücrelerin Takibi

Abdominoplasti sırasında DiI ile işaretli kök hücrelerin verildiği grup 5,6 ve 7'den alınan doku örneklerinin parafin bloğa gömülmesini takiben bu bloklardan 5 µm kalınlıkta kesitler hazırlanarak sadece hematoksilin ile boyandı. DiI ile işaretli hücreler floresan mikroskopta kırmızı, mor renkte gözükmetedir. Bu nedenle bu kesitlerin boyanmasında aynı renklerde boyanmaya neden olan Eosin boyası kullanılmamaktadır (282). Aynı doku örneklerinden alınan takip eden kesitler H&E ile boyandı. Böylece Hematoksilin ile boyanmış kesitlerde görülen işaretli kök hücrelerin, H&E ile boyanan takip eden kesitlerde dokuda nerede yer aldığı, endotel hücrelerine dönüşüp dönüşmediği değerlendirilebildi (281, 282). Preparatlar Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal incelemeler için Nikon Eclipse E600 floresan mikroskop kullanıldı. Preperatlar 200, 400 600 ve 1000 büyütmelede incelendi. Görüntüler renkli video kamera (Nikon CCD) ile bilgisayar ortamına aktarıldı ve bilgisayar programı olarak Cytovision Genus Software kullanıldı.

3.17. İstatistiksel Analiz

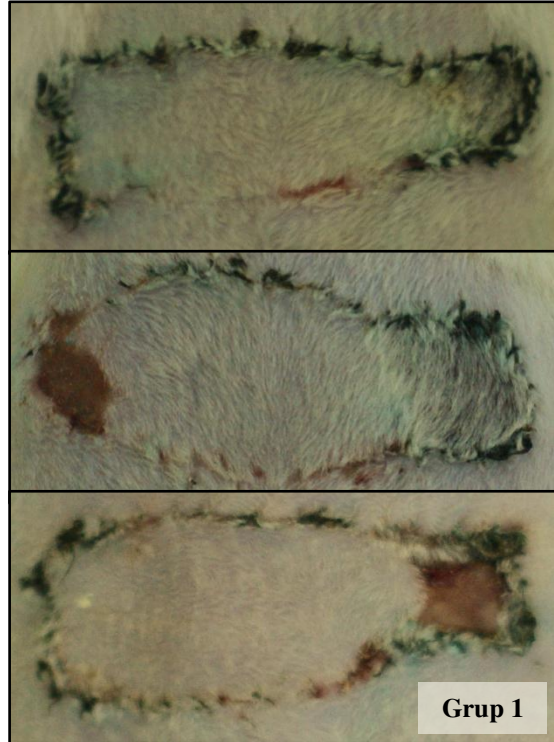
Canlı flep alanı yüzdeleri, abdominoplasti öncesi mevcut muskulokutan perforatör arter sayıları, abdominoplasti sonrası yeni oluşan muskulokutan perforatör arter sayıları, kapiller damar sayıları, flebin kas komponentindeki hasarlanma dereceleri ve günlere göre kan VEGF düzeyleri açısından gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak değerlendirildi. Elde edilen veriler, istatistik paket programı (SPSS) (Version 17, Chicago IL, USA) kullanılarak analiz edildi. Çalışmada kategorik ve sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, ortanca değer, minimum, maksimum, sayı ve yüzdelik dilim) verildi. Ayrıca parametrik testlerin ön şartlarından varyansların homojenliği Levene testi ile kontrol edildi. Normallik varsayımına ise Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. İki grup arasındaki farklılıklar değerlendirilmek istendiğinde parametrik test ön şartlarını sağladığı durumda Student's t Test; sağlamadığında ise Mann Whitney-U testi kullanıldı. Üç ve daha fazla grup arasındaki farklılıklar değerlendirilmek istendiğinde parametrik test ön şartlarının sağlandığı durumda Tek Yönlü Varyans Analizi; sağlanmadığı durumda ise Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Üç grup ve daha fazla grup

arasında anlamlı çıkan sonuçları değerlendirmek amacıyla çoklu karşılaştırma testlerinden Dunn Testi kullanıldı. Günler ile gruplar arasında değerlendirme yapıldığında tekrarlanan ölçümler varyans analizine uygunluğu Mauchy's Küresellik Testi ve Box-M Varyansların Homojenliği Testi ile değerlendirilmiştir. Ortalamaların karşılaştırmaları için faktöriyel düzende faktörlerden biri tekrarlanan ölçümler varyans analizi kullanılmıştır. Eğer parametrik testlerin (faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümler varyans analizi) ön şartlarını sağlamıyorsa serbestlik derecesi düzeltmeli Greenhouse-Geisser (1959), ya da Huynh-Feldt (1976) testlerinden biri kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar ise Düzeltilmiş Bonferroni Testi ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

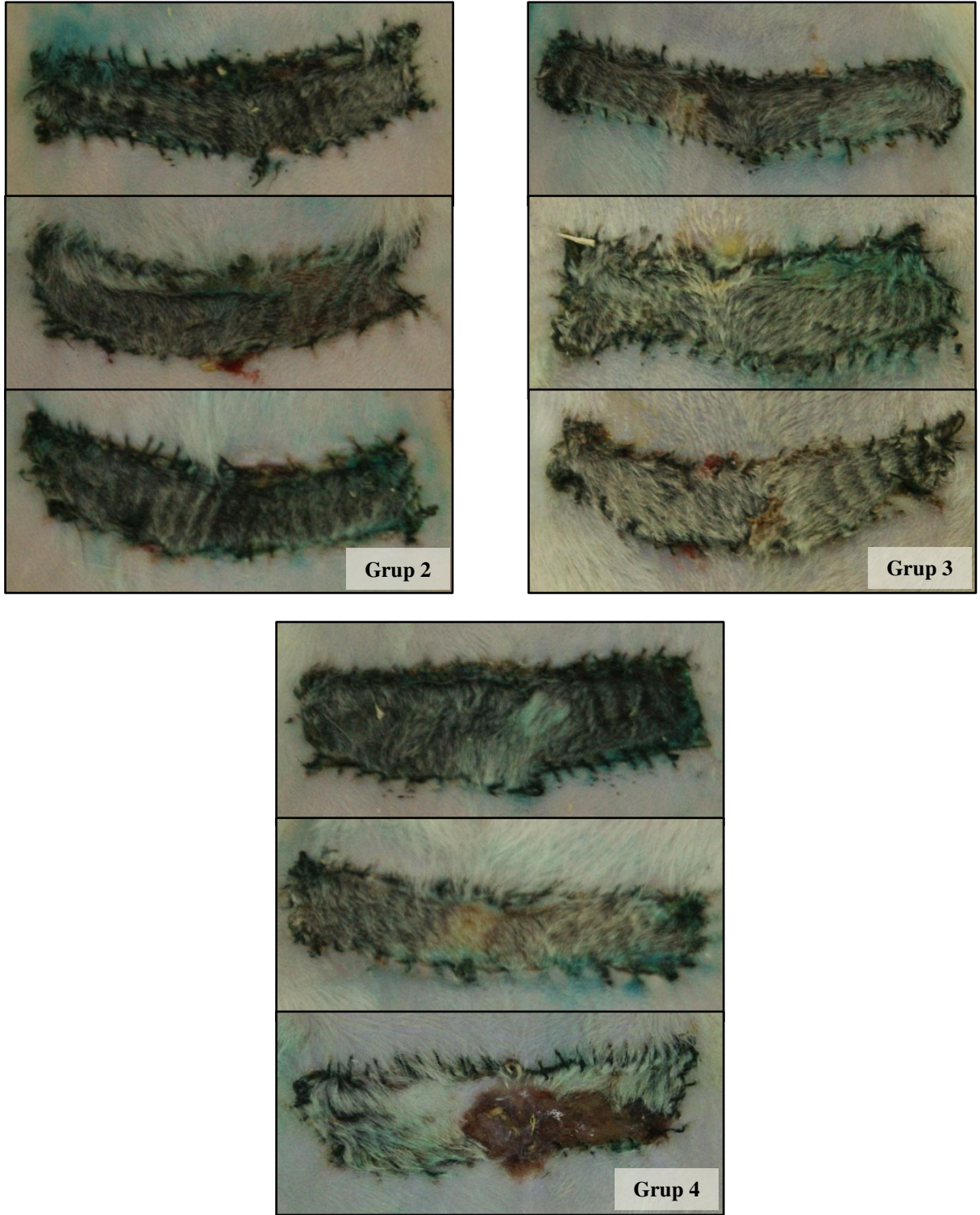
4. BULGULAR

4.1. Flep Canlılığı

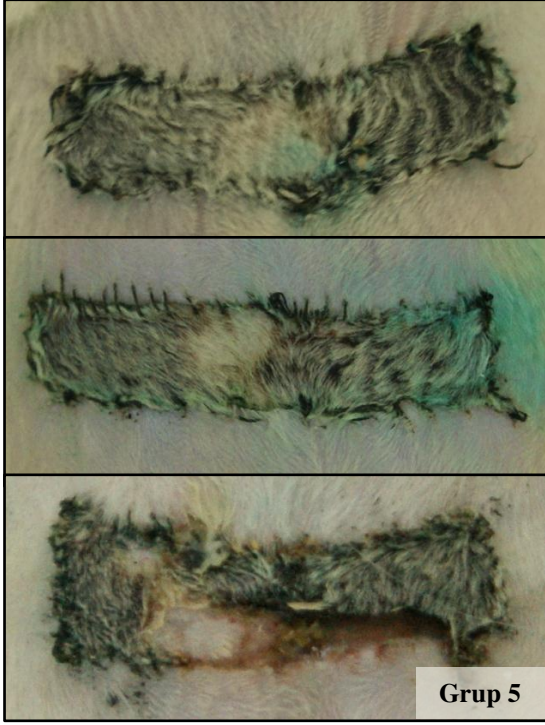
Sıçanların abdominal bölgelerinden kaldırılan sağ inferior epigastrik arter pediküllü, 5 x 2,5 cm boyutlu deri adası içeren TRAM flepleri yerine dikildikten 7 gün sonra makroskopik olarak incelendi. Sadece TRAM flep yapılan grup 1 (TRAM)'de genel olarak flebin zon 4'üne sınırlı olacak şekilde diğer gruplar ile görsel olarak karşılaştırıldığında en az miktarda nekroz ile karşılaşıldı (Şekil 4.1). Abdominoplastiden sonrası ile 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta sonra TRAM flep yapılan grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta), grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta) ve grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta)'te tüm zonlara hakim yaygın nekrozlar görüldü (Şekil 4.2). Abdominoplasti ile ADKKH enjeksiyonu yapılan ve sonrası ile 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta sonra TRAM flep kaldırılan grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta), grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta) ve grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta)'de giderek azalan nekroz miktarları ile karşılaşıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. Grup 1 (sadece TRAM flep) 7. gün TRAM flep görünümüleri



Şekil 4.2. Abdominoplasti'den 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta sonra TRAM flepler eleve edilen grupların (Grup 2, grup 3, grup 4) sırası ile 7. gün TRAM flep görünüşleri



Şekil 4.3. Abdominoplasti ile ADKKH enjeksiyonu yapılan ve 1 hafta, 2 hafta ve 4 hafta beklenildikten sonra TRAM flepler eleve edilen grupların (Grup 5, grup 6, grup 7) sırası ile 7. gün TRAM flep görünüşleri

Grup 1 (TRAM)'in ortalama canlı flep alanı % $82,90 \pm 7,59$ olarak bulundu. Diğer grupların ortalama canlı flep alanları incelendiğinde; grup 2'nin (Abdominoplasti 1 hafta) % $2,24 \pm 3,71$, grup 3'ün (Abdominoplasti 2 hafta) % $3,31 \pm 3,29$, ve grup 4'ün (Abdominoplasti 4 hafta) % $9,40 \pm 6,18$, grup 5'in (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta) % $15,83 \pm 6,41$, grup 6'nın (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta) % $31,92 \pm 9,29$, ve grup 7'nin (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta) % $64,98 \pm 10,95$ bulundu (Tablo 4.1, şekil 4.4).

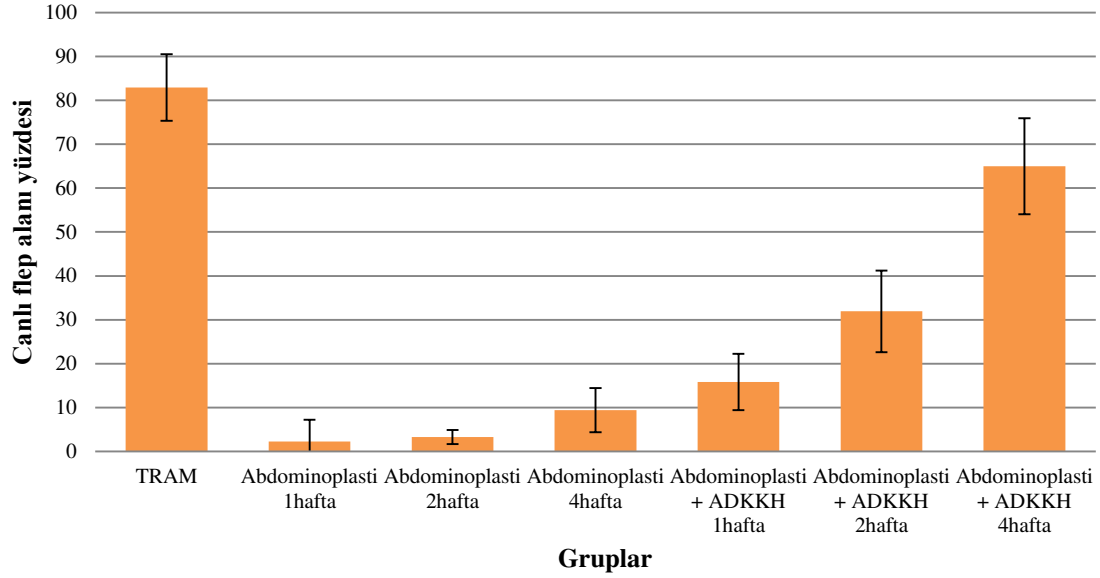
Tablo 4.1. Canlı flep alanı yüzdelерinin gruplara göre dağılımı

Ort.: Ortalama, SD: Standart sapma (Standard deviation)

Sıçan No	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
1	89,59	2,62	5,63	4,52	4,59	20,64	46,72
2	74,58	2,10	3,92	11,26	19,68	30,31	67,11
3	72,89	0	0	6,16	17,19	24,13	75,37
4	86,58	0	0	18,40	15,01	31,04	63,97
5	85,10	0	7,79	12,88	10,70	30,87	60,25
6	92,71	0	5,80	12,57	20,25	37,36	80,32
7	78,82	10,97	0	0	23,39	49,12	61,11
Grup ort. $\pm$	82,90 $\pm$	2,24 $\pm$	3,31 $\pm$	9,40 $\pm$	15,83 $\pm$	31,92 $\pm$	64,98 $\pm$
SD	7,59	3,71	3,29	6,18	6,41	9,29	10,95

Grup 1 (TRAM)'in canlı flep alanı yüzdesi diğer tüm grupların ortalama canlı flep alanlarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta)'ün canlı flep alanı grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta) ve grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta)'ten yüksek bulunsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).



Şekil 4.4. Canlı flep alanı yüzdelерinin gruplara göre ortalama değерleri ve standart sapmalarının grafik üzerinde gösterilmesi

Grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)'in canlı flep alanı ortalaması, grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta)'nin canlı flep alanı ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,051$).

Grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta)'nın canlı flep alanı ortalaması, grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta)'ün canlı flep alanı ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,004$).

Grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta)'nin canlı flep alanı ortalaması, grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta)'ün canlı flep alanı ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,003$).

Grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta)'nın canlı flep alanı ortalaması, grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)'in canlı flep alanı ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,009$).

Grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta)'nin canlı flep alanı ortalaması, grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta) ve grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)'in canlı flep alanı ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$).

Tablo 4.2’de flep canlı alan yüzdelерinin gruplar arası istatistiksel olarak karşılaştırılması özet olarak verilmiştir.

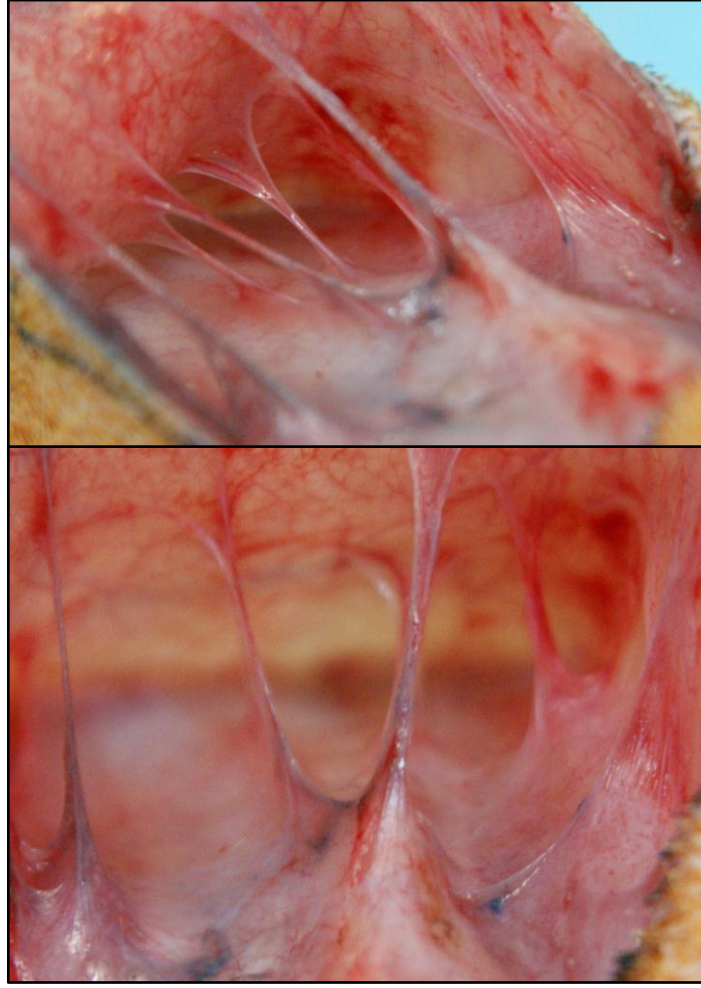
Tablo 4.2. Flep canlı alan yüzdelерinin gruplar arası karşılaştırması

TRAM: Transvers rektus abdominis muskulokutan, Abd.: Abdominoplasti, ADKKH: Adipoz doku kökenli kök hücre

Karşılaştırılan Gruplar	Karşılaştırma	p değeri
Grup 1(TRAM) ve grup 2-7	Grup 1 > Grup 2-7	< 0,05
Grup 4(Abd. 4 hafta), grup 3(Abd. 2 hafta) ve grup 2(Abd. 1 hafta)	Grup 4 = Grup 3 = Grup 2	> 0,05
Grup 5(Abd.+ADKKH 1 hafta) ve grup 2(Abd. 1 hafta)	Grup 5 > Grup 2	0,051
Grup 6(Abd.+ADKKH 2 hafta) ve grup 3(Abd. 2 hafta)	Grup 6 > Grup 3	0,004
Grup 7(Abd.+ADKKH 4 hafta) ve grup 4(Abd. 4 hafta)	Grup 7 > Grup 4	0,003
Grup 7(Abd.+ADKKH 4 hafta), Grup 6(Abd.+ADKKH 2 hafta) ve grup 5(Abd. + ADKKH 1 hafta)	Grup 7 > Grup 6 > Grup 5	< 0,05

4.2. Rektus Abdominis Kasından Çıkan Muskulokutan Perforatörlerin Sayımı

Abdominoplasti yapılan tüm sıçanların (n: 42) karın ön duvarı cildi eleve edilirken tüm rektus abdominis kası muskulokutan perforatörleri korunarak hassas diseksiyon ile ortaya kondu ve her sıçanda tek tek sayıldı (Şekil 4.5). Her iki rektus abdominis kasından çıkan 6 ile 10 arası ($7,98 \pm 1,10$) muskulokutan perforatör sayıldı (Tablo 4.3). Sayımları yapılan damarlar elektrokoter yardımı ile yakıldı ve abdominoplasti tamamlandı.



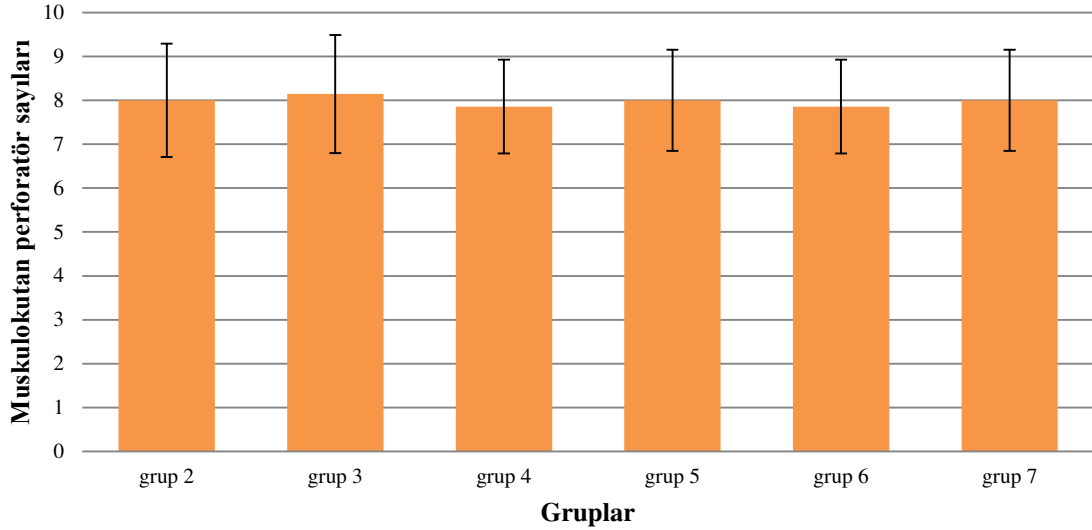
Şekil 4.5. Abdominoplasti sırasında her iki rektus abdominis kasından çıkan ve cilde giren muskulokutan perforatörlerin gösterilmesi ve sayılması

Tablo 4.3. Muskulokutan perforatörlerin sayımı

Her iki rektus abdominis kasından çıkarak karın ön duvarı cildine doğru giden muskulokutan perforatör arterlerin sayılması.

Ort.: Ortalama, SD: Standart sapma (Standard Deviation)

Sıçan no	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
1	8	10	7	7	9	6
2	10	8	8	9	6	9
3	7	6	8	6	8	9
4	6	9	9	8	8	8
5	9	9	6	8	7	7
6	8	8	9	9	8	8
7	8	7	8	9	9	9
Grup Ort. $\pm$ SD	8 $\pm$ 1,29	8,14 $\pm$ 1,35	7,86 $\pm$ 1,07	8 $\pm$ 1,15	7,86 $\pm$ 1,07	8 $\pm$ 1,15
Genel ort. $\pm$ SD	7,98 $\pm$ 1,12					



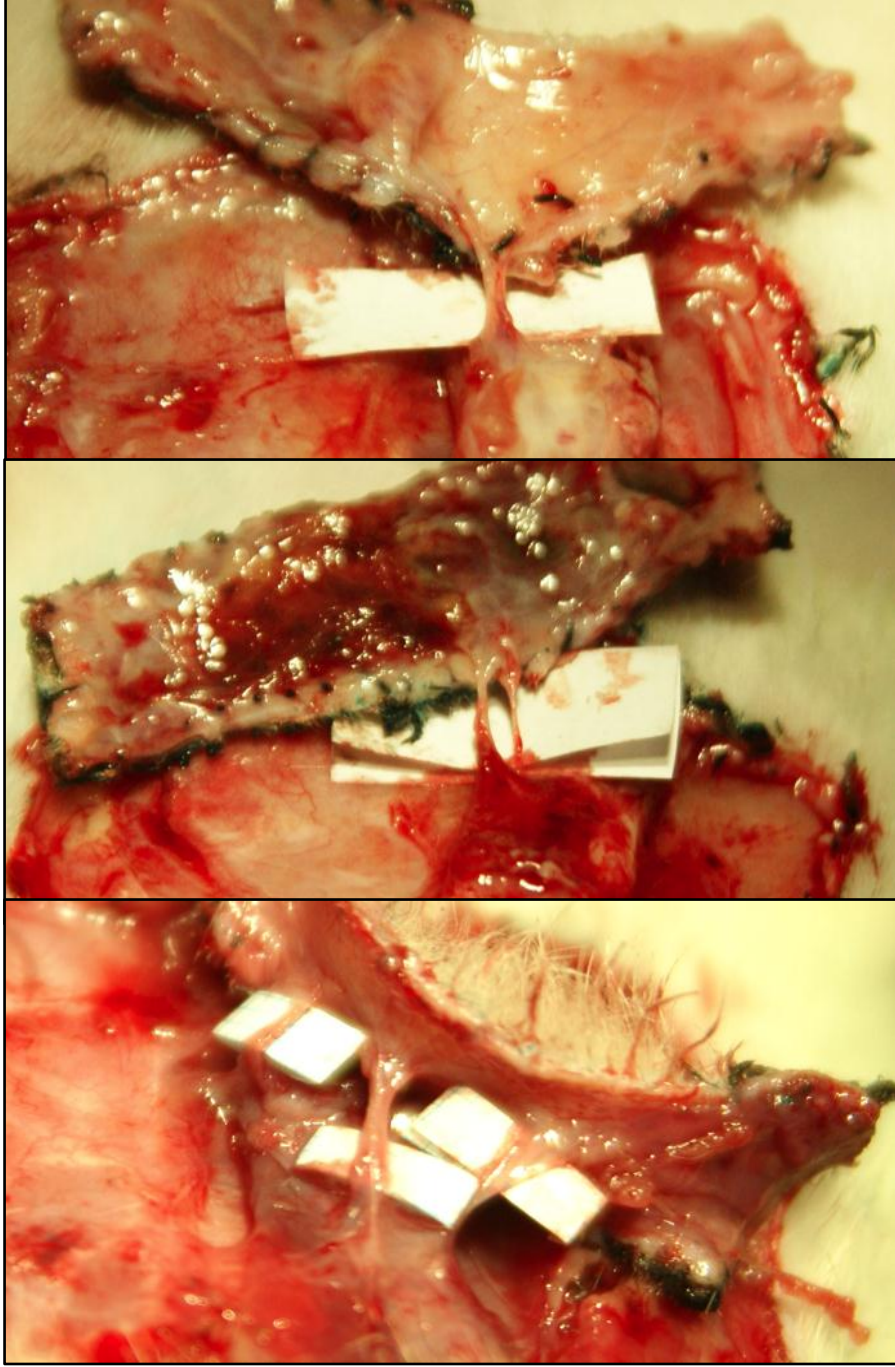
Şekil 4.6. Muskulokutan perforatör arter sayılarının gruplara göre dağılımı

Yapılan istatistiksel analizde her iki rektus abdominis kasından çıkan muskulokutan perforatör arter sayıları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$).

4.3. Yeni Oluşan Rektus Abdominis Muskulokutan Perforatörlerinin Gösterilmesi ve Sayılması

Grup 1 dışında kalan diğer gruplarda önceden yapılan abdominoplasti sırasında TRAM flep cilt adasını besleyen tüm rektus abdominis kası muskulokutan perforatörleri bağlanmıştı. Bu gruplarda TRAM flep cilt adasını besleyen muskulokutan perforatörlerin yeniden oluşup oluşmadığını görmek amacı ile, TRAM flepler doku incelemesi amacı ile alınmadan hemen önce bu işlem gerçekleştirildi.

TRAM flep cilt adası sütüre edilmiş olan insizyon sınırından yeniden insize edildi. Diseksiyon ile zon II, IV ve III sırası ile eleve edildi. Sağ rektus abdominis kası kranialinden ekspozite edildi. Mikro makas ve mikro penset ile zon I'e ince diseksiyon yapıldı. Perforatör oluşabilmiş gruplarda perforatörler diseksiyon yapılarak ortaya kondu (Şekil 4.7). Cerrahi mikroskop ile ortaya konan yapıların damar oldukları teyit edildi.



Şekil 4.7. Yeni oluşan muskulokutan perforatörlerin gösterilmesi

Grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta) ve grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta)'te hiçbir sıçanda yeni oluşan muskulokutan perforatör gösterilemedi.

Grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta)'te $0,29 \pm 0,49$, grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)'de $0,43 \pm 0,53$ ve grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta)'da $1,14 \pm 0,69$, grup

7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta)'de $2 \pm 0,82$ adet yeni oluşan muskulokutan perforatör gösterildi (Tablo 4.4).

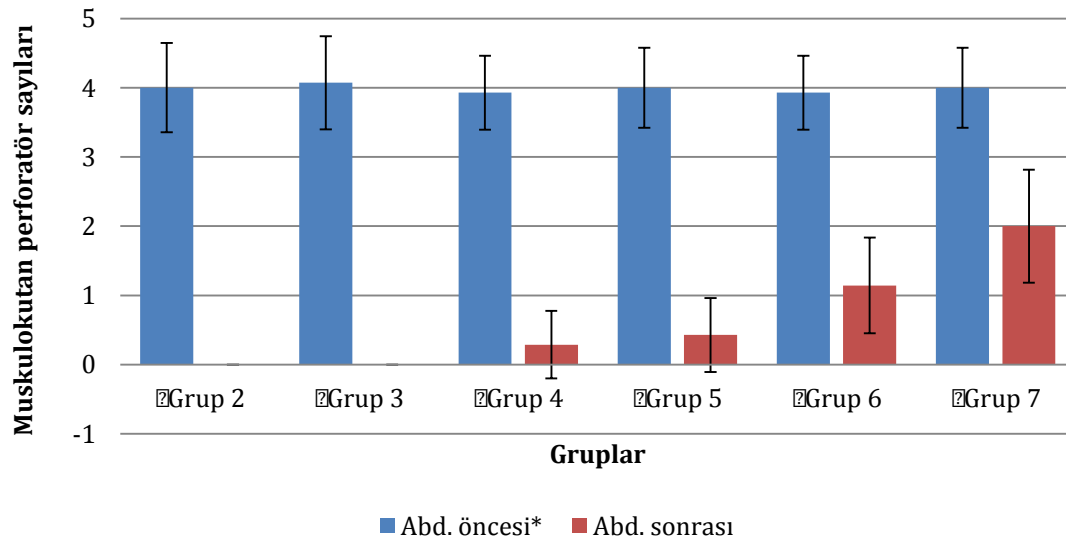
Tablo 4.4. Yeni oluşan rektus abdominis kası muskulokutan perforatör arter sayısı

TRAM flepler sağ rektus abdominis kası üzerinden eleve edildikleri için bu sayımda sadece sağ rektus abdominis kası ile TRAM flep cilt adası arasında oluşan yeni perforatör arterler sayılmıştır.

Ort.: Ortalama, SD: Standart Sapma (Standard Deviation)

Sıçan no	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
1	0	0	0	0	1	1
2	0	0	1	1	0	2
3	0	0	0	1	2	2
4	0	0	0	0	1	1
5	0	0	0	0	1	3
6	0	0	1	0	2	3
7	0	0	0	1	1	2
Grup Ort. $\pm$ SD	0	0	$0,29 \pm 0,49$	$0,43 \pm 0,53$	$1,14 \pm 0,69$	$2 \pm 0,82$

Abdominoplasti öncesi ve abdominoplasti sonrası sayımları yapılmış rektus abdominis muskulokutan perforatör arter sayımları istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Şekil 4.8, tablo 4.5).



Şekil 4.8. Abdominoplasti öncesi ve sonrası perforatör arter sayılarının karşılaştırılması

Abdominoplasti öncesi tüm sıçanlarda sayımları yapılarak ortaya konan rektus abdominis kası muskulokutan perforatör sayısı ve abdominoplasti sonrası yeni oluşan muskulokutan perforatör arter sayılarının gruplara göre dağılımını ifade eden grafik.

*Abdominoplasti öncesi ve sonrası muskulokutan perforatör arter sayılarının kıyaslama yapılabilmesi için abdominoplasti öncesi her iki rektus abdominis kasından çıkan perforatörlerin sayılması ile elde edilen değerler ikiye bölünerek tek rektus abdominis kasından çıkan perforatör arter sayısı elde edilmiştir.

Abd.: Abdominoplasti

Muskulokutan perforatör arter sayımları yapılan tüm grupların (grup 2-7) abdominoplasti sonrası sayılan rektus abdominis kası muskulokutan perforatör arter sayıları, abdominoplasti öncesi sayılan değerlerden anlamlı olarak düşük bulundu ($p < 0,05$), (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Abdominoplasti öncesi ve sonrası sayımları yapılmış muskulokutan perforatör arterlerin karşılaştırılması

Karşılaştırılan Gruplar	Karşılaştırma	p değeri
Grup 2 abd. öncesi ve sonrası	Grup 2 abd. öncesi > sonrası	< 0,001
Grup 3 abd. öncesi ve sonrası	Grup 3 abd. öncesi > sonrası	< 0,001
Grup 4 abd. öncesi ve sonrası	Grup 4 abd. öncesi > sonrası	< 0,001
Grup 5 abd. öncesi ve sonrası	Grup 5 abd. öncesi > sonrası	< 0,001
Grup 6 abd. öncesi ve sonrası	Grup 6 abd. öncesi > sonrası	< 0,001
Grup 7 abd. öncesi ve sonrası	Grup 7 abd. öncesi > sonrası	0,001

Grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta) ve grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)'ın abdominoplasti sonrası sayılan perforatör arter sayıları arasında bir farklılık olsada bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p = 0,137$), (tablo 4.6)..

Grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta) ve grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta)'nın abdominoplasti sonrası sayılan perforatör arter sayıları arasında mevcut olan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$), (tablo 4.6)..

Grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta) ve grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta)'nın abdominoplasti sonrası sayılan perforatör arter sayıları arasında ortalama değerler açısından mevcut olan farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0,016$), (tablo 4.6).

Grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta) ve grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta)'nın abdominoplasti sonrası sayılan perforatör arter sayıları arasında mevcut olan farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0,004$), (tablo 4.6).

Grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta) ve grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)'ın abdominoplasti sonrası sayılan perforatör arter sayıları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$), (tablo 4.6).

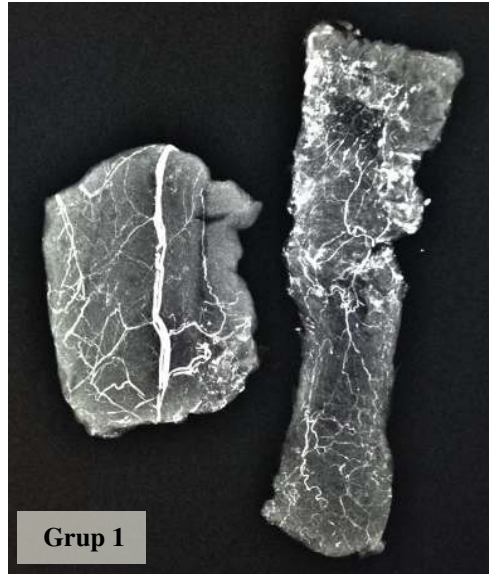
Grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta) ve grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta)'ün abdominoplasti sonrası sayılan perforatör arter sayıları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$), (tablo 4.6).

Tablo 4.6. Abdominoplasti sonrası sayımları yapılmış muskulokutan perforatör arter sayılarının gruplar arası karşılaştırılması

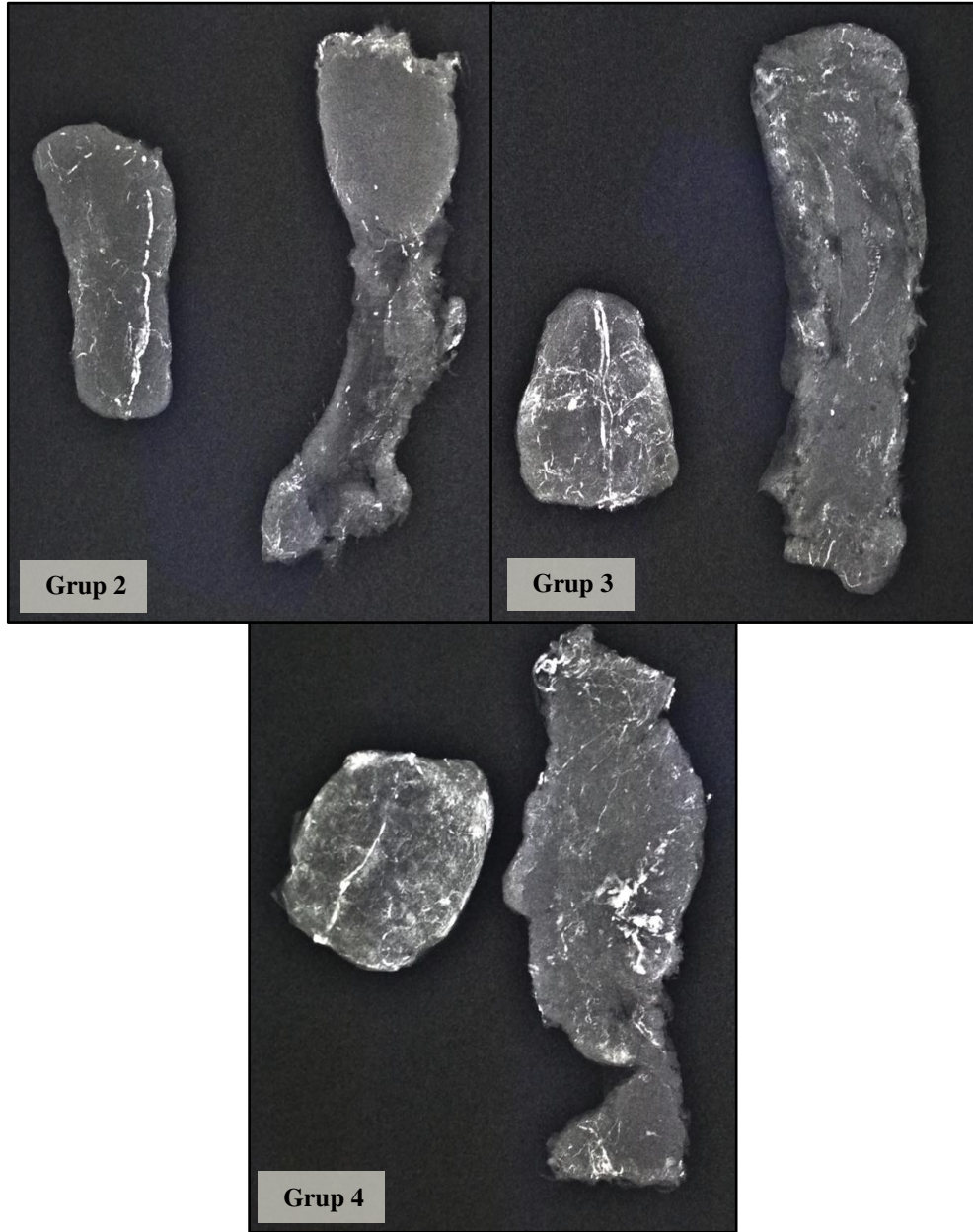
Karşılaştırılan Gruplar	Karşılaştırma	p değeri
Grup 2 (Abd. 1 hafta) ve grup 5 (Abd. + ADKKH 1 hafta)	Grup 5 = Grup 6	0,137
Grup 3 (Abd. 2 hafta) ve grup 6 (Abd. + ADKKH 2 hafta)	Grup 3 < Grup 6	< 0,001
Grup 5 (Abd. + ADKKH 1 hafta) ve grup 6 (Abd. + ADKKH 2 hafta)	Grup 5 < Grup 6	0,016
Grup 7 (Abd. + ADKKH 4 hafta) ve grup 6 (Abd. + ADKKH 2 hafta)	Grup 7 > Grup 6	0,004
Grup 7 (Abd. + ADKKH 4 hafta) ve grup 5 (Abd. + ADKKH 1 hafta)	Grup 7 > Grup 5	< 0,001
Grup 7 (Abd. + ADKKH 4 hafta) ve grup 4 (Abd. 4 hafta)	Grup 7 > Grup 4	< 0,001

4.4. TRAM Fleplerin Mikroanjiyografi İle Değerlendirilmesi

ADKKH verilen ve 4 hafta sonra TRAM flep yapılan Grup 7'den ve sadece TRAM flep yapılan grup 1'den seçilen sıçanın mikroanjiyografik görüntülerinde diğer gruplardan belirgin şekilde fazla miktarda damarlanma dikkati çekti (Grup 7: 104 kare, grup 1: 129 kare), (Şekil 4.9, 4.11). Grup 2, 3 ve 4'ten seçilen birer sıçana yapılan mikroanjiyografi sonucunda TRAM fleplerden alınan görüntülerde makroskopik olarak belirgin bir damarlanma görülemedi (Sırası ile 11, 15, 36 kare), (Şekil 4.10). ADKKH verilen ve abdominoplastiden 2 hafta sonra TRAM flep yapılan ve 4 hafta sonra TRAM flep yapılan grup 5 ve 6'da ise grup 2 ve 3'e göre daha fazla damarlanma olduğu görüldü (Grup 5: 20 kare, grup 6: 51 kare). Grup 4'te sayılan 36 kareye karşı aynı işlemlerin aynı sürede yapıldığı ancak ADKKH enjeksiyonu yapılan grup 7'de ise 104 kare sayıldı. En büyük fark bu iki grup arasında oluştu. Her gruptan sadece birer adet sıçana mikroanjiyografi görüntülemesi yapıldığı için elde edilen veriler istatistiksel olarak yorumlanmadı.

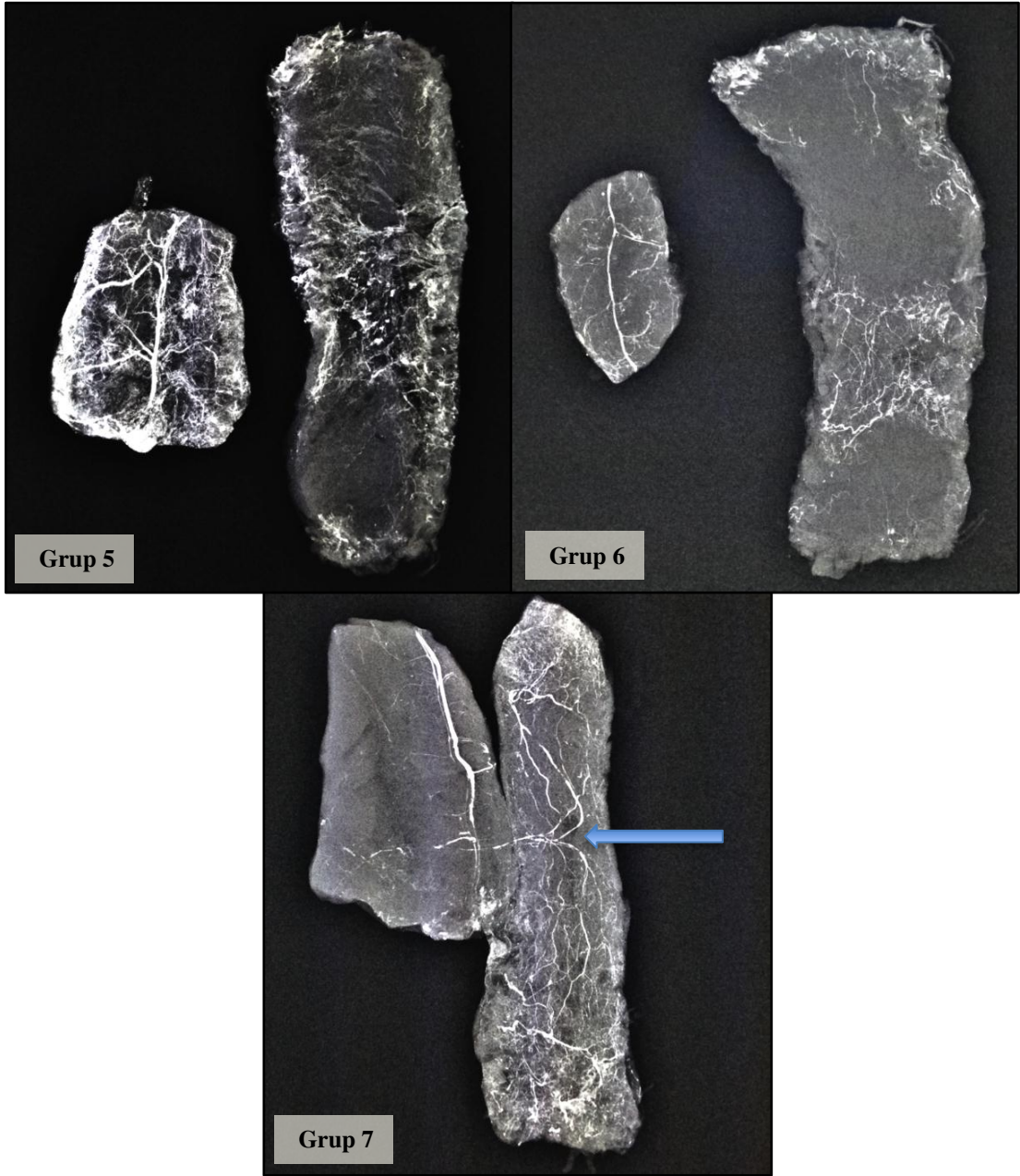


Şekil 4.9. Sadece TRAM flep yapılan gruptan seçilen bir sıçanın TRAM flebinin mikroanjiyografik görüntüsü



Şekil 4.10. Grup 2, 3 ve grup 4'ten seçilen birer sıçanın TRAM fleplerinin mikroanjiyografi görüntüleri

Grup 2, 3 ve 4 mikroanjiyografi görüntülerinde belirgin bir damarlanma dikkati çekmedi.



Şekil 4.11. ADKKH yapılan grup 5, grup 6 ve grup 7’den seçilen birer sıçanın TRAM fleplerinin mikroanjiyografi görüntüleri

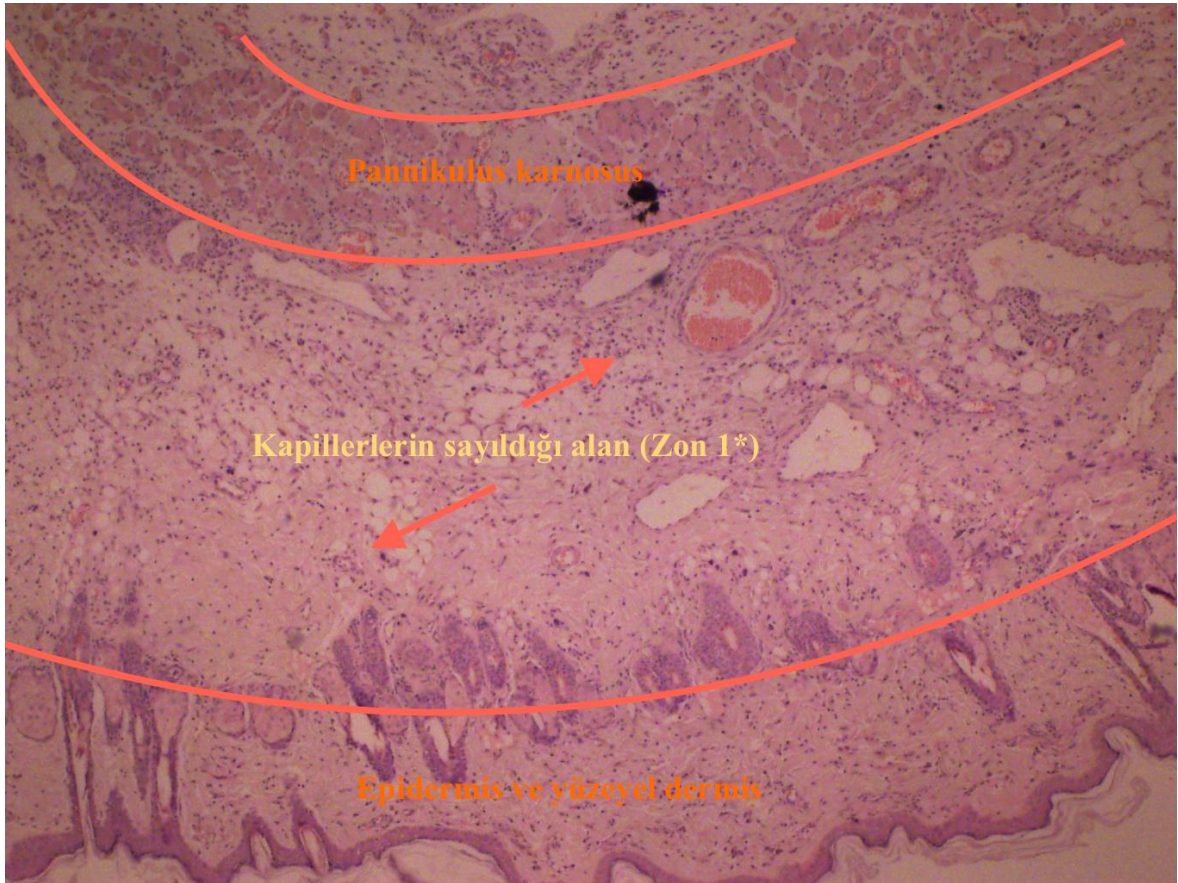
Alttağı şekilde rektus abdominis kası içinde seyreden süperfisyal epigastrik arterden çıkan ve TRAM flep cilt adasına girererek dokuya dağılan perforatör ok ile gösterilmektedir

4.5. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik olarak TRAM flep cilt adalarında kapiller dansite tayini için damar sayımı ve rektus abdominis kasında hasarlanma derecesi tayini için fibroz gradient miktarı ölçümleri yapıldı.

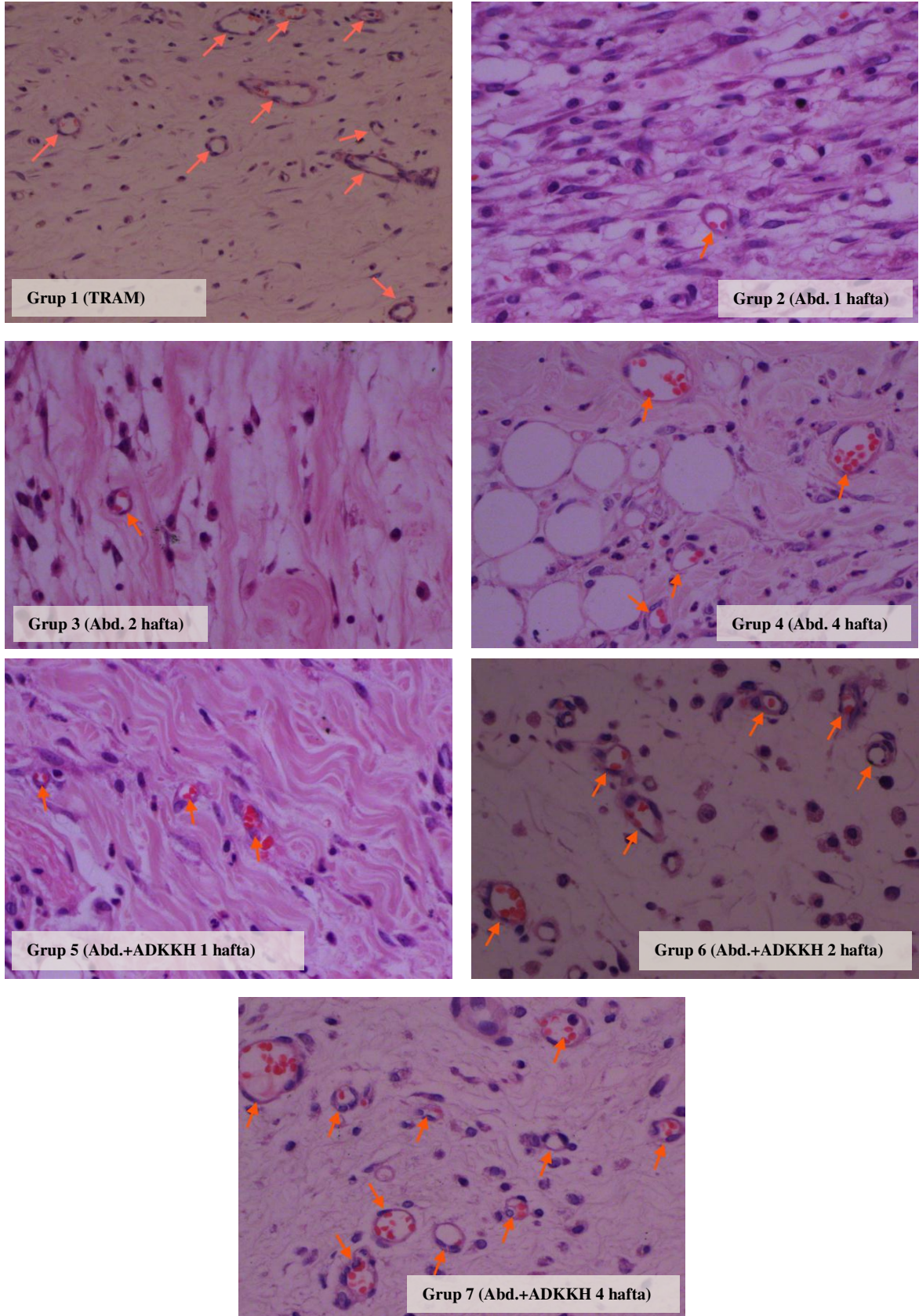
4.5.1. Kapiller Dansite

Kapiller dansite tayini için TRAM fleplerden alınan kesitler H&E boyalı kesitlerde incelendi. Tüm fleplerde zon 1 bölgesi ve çevresinde epidermis ile pannikulus karnosus arasında kalan dermal alanda kapiller sayım gerçekleştirildi (Şekil 4.12). 400x büyütmede, 10 alanda sayılan kapillerlerin ortalaması alınarak her sıçan için ortalama kapiller sayısı hesaplandı (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. H&E boyalı kesitlerde kapiller sayımının yapıldığı alanın 40x büyütme ile gösterilmesi

*Standardizasyonun sağlanabilmesi için tüm TRAM flep cilt alanlarında mikroskop altında zon 1 ve yakın çevresinde kapiller sayımı yapıldı.



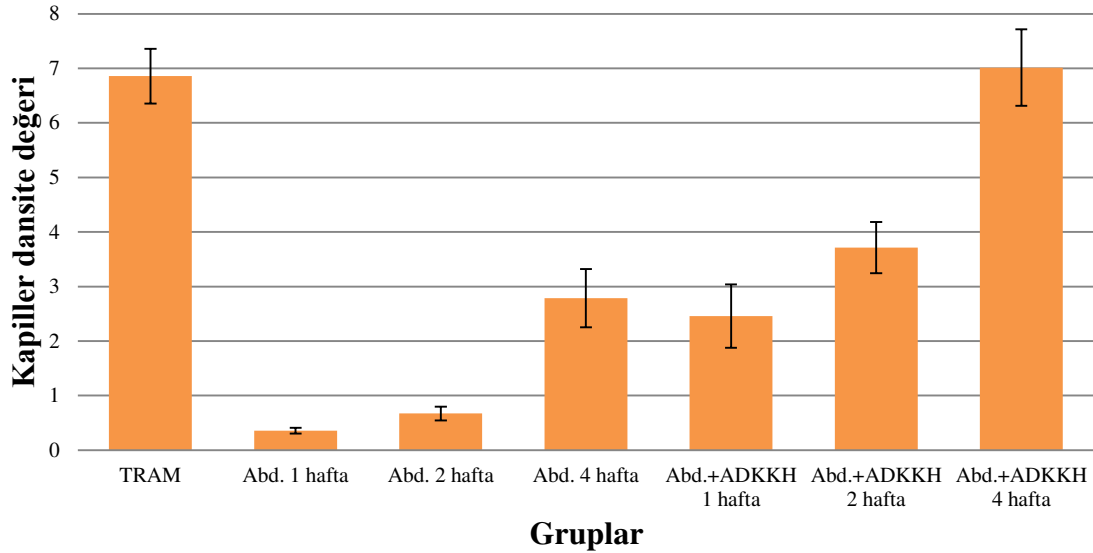
Şekil 4.13. Işık mikroskopu altında 400x büyütmede kapillerlerin sayılması

Grup 1’de (TRAM) kapiller dansite ortalaması $6,86 \pm 0,50$, grup 2’de (Abdominoplasti 1 hafta) $0,36 \pm 0,05$, grup 3’te (Abdominoplasti 2 hafta) $0,67 \pm 0,13$, grup 4’te (Abdominoplasti 4 hafta) $2,79 \pm 0,53$, grup 5’te (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta) $2,46 \pm 0,58$, grup 6’da (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta) $3,71 \pm 0,47$, grup 7’de (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta) $7,01 \pm 0,70$ olarak bulundu (Tablo 4.7, şekil 4.14).

Tablo 4.7. Kapiller dansite değerleri

Ort.: Ortalama, SD: Standart sapma (Standard deviation)

Sıçan No	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
1	7,7	0,3	0,9	3,3	1,6	3,9	6,8
2	7	0,3	0,7	2,8	2,1	4,4	6,6
3	6,3	0,4	0,7	2,4	2,7	3,4	7,3
4	7	0,4	0,6	2,9	2,8	3,5	7,6
5	7	0,3	0,5	3,3	2	3,7	8,1
6	6,8	0,4	0,6	3	3,3	4,1	6,7
7	6,2	0,4	0,7	1,8	2,7	3	6
Grup ort. $\pm$	6,86 $\pm$	0,36 $\pm$	0,67 $\pm$	2,79 $\pm$	2,46 $\pm$	3,71 $\pm$	7,01 $\pm$
SD	0,50	0,05	0,13	0,53	0,58	0,47	0,70



Şekil 4.14. Kapiller dansite değerlerinin gruplara göre dağılımları

TRAM (Grup 1), Abd. 1 hafta (Grup 2), Abd. 2 hafta (Grup 3), Abd. 4 hafta (Grup 4), Abd.+ADKKH 1 hafta (Grup 5), Abd.+ADKKH 2 hafta (Grup 6), Abd.+ADKKH 4 hafta (Grup 7).

TRAM: Transverse rektus abdominis muskulokutan, Abd.:Abdominoplasti, ADKKH.: Adipoz doku kökenli kök hücre.

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.8). Grup 1 (TRAM) kapiller dansite ortalaması, grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta), grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta), grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta) ve grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)'ın kapiller dansite ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). Ancak grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta) ile grup 1 (TRAM) ve grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta) ile grup 1 (TRAM) arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (sırası ile $p=0,155$, $p=0,970$).

Grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta)'ün kapiller dansite ortalaması, grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta)'nin ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,012$). Grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta) ile anlamlı bir farklılık ortaya çıkmadı ($p=0,107$).

Grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)'ın kapiller dansite ortalaması, grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta)'nin kapiller dansite ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,034$).

Grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta)'nın kapiller dansite ortalaması, grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta)'ün ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,007$).

Grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta)'nin kapiller dansite ortalaması grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta)'ün ortalamasından anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p=0,011$).

ADKKH verilen grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta) ile grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta) arasında ve grup 6 ile grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta) arasında kapiller dansite ölçümlerinde mevcut olan farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Ancak grup 7 ile grup 5 arasındaki fark anlamlı bulundu ($p=0,003$).

Tablo 4.8. Kapiller dansite ölçümlerinin gruplar arası karşılaştırılması

TRAM: Transvers rektus abdominis muskulokutan, Abd.: Abdominoplasti, ADKKH: Adipoz doku kökenli kök hücre.

Karşılaştırılan Gruplar	Karşılaştırma	p değeri
Grup 1(TRAM) ile grup 2(Abd. 1 hafta)	Grup 1 > Grup 2	< 0,001
Grup 1(TRAM) ile grup 3(Abd. 2 hafta)	Grup 1 > Grup 3	< 0,001
Grup 1(TRAM) ile grup 4(Abd. 4 hafta)	Grup 1 > Grup 4	0,012
Grup 1(TRAM) ile grup 5(Abd. + ADKKH 1 hafta)	Grup 1 > Grup 5	0,004
Grup 1(TRAM) ile grup 6(Abd. + ADKKH 2 hafta)	Grup 1 = Grup 6	0,155
Grup 1(TRAM) ile grup 7(Abd. + ADKKH 4 hafta)	Grup 1 = Grup 7	0,970
Grup 4(Abd. 4 hafta) ile grup 2(Abd. 1 hafta)	Grup 4 > Grup 2	0,012
Grup 4(Abd. 4 hafta) ile grup 3(Abd. 2 hafta)	Grup 4 = Grup 3	0,107
Grup 5(Abd. + ADKKH 1 hafta) ile grup 2(Abd. 1 hafta)	Grup 5 > Grup 2	0,034
Grup 6(Abd. + ADKKH 2 hafta) ile grup 3(Abd. 2 hafta)	Grup 6 > Grup 3	0,007
Grup 7(Abd. + ADKKH 4 hafta) ile grup 4(Abd. 4 hafta)	Grup 7 > Grup 4	0,011
Grup 5(Abd. + ADKKH 1 hafta) ile Grup 6(Abd. ADKKH 2 hafta)	Grup 5 = Grup 6	0,139
Grup 6(Abd. + ADKKH 2 hafta) ile Grup 7(Abd. ADKKH 4 hafta)	Grup 6 = Grup 7	0,144
Grup 7(Abd. + ADKKH 4 hafta) ile Grup 5(Abd. ADKKH 1 hafta)	Grup 7 > Grup 5	0,003

4.5.2. Kas Dokuda Hasarlanma Derecesi (Fibroz Gradient)

TRAM flep kaldırılırken sağ superior epigastrik arter pedikülü bağlanan ve inferior pedikül ile beslenmesi devam ettirilen sağ rektus abdominis kasının hasarlanma derecesi, fibrozis şiddeti (fibroz gradient) bakılarak değerlendirildi. Masson Trikrom ile boyalı kesitlerde, fibroblastik aktivite artışı ile fibrozis düzeyinde artış, kollajen miktarındaki artış, miyosit dejenerasyonu varlığı incelendi. Tüm preparatlar değerlendirilerek en çok dejenerasyon gösterenlere en yüksek skor (3) en az dejenerasyon gösteren preparatlara ise en düşük skor (0) verilerek bir skala oluşturuldu.

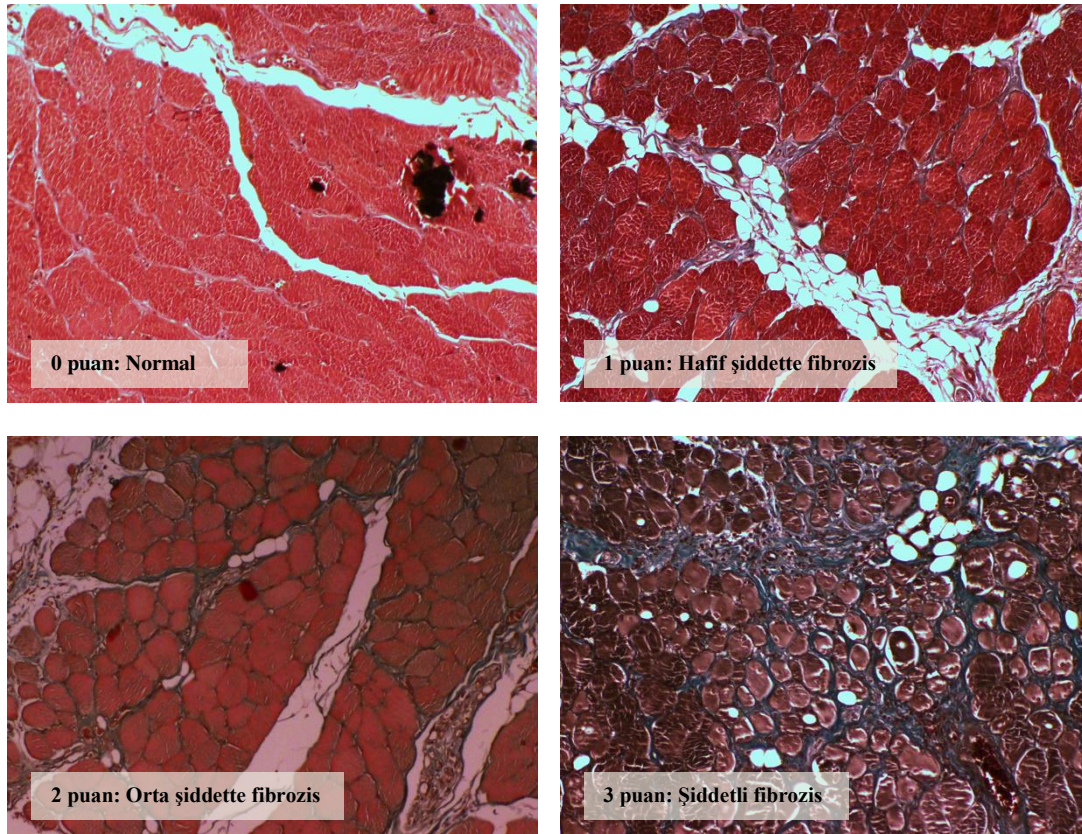
Fibroz gradient derecelendirme skalası (Şekil 4.15):

0: Normal

1: Hafif şiddette fibrozis

2: Orta şiddette fibrozis

3: Şiddetli fibrozis



Şekil 4.15. Fibroz gradient derecelendirme skalasında yer alan 4 farklı dereceyi gösteren gruplardan seçilen örnek preparatlar

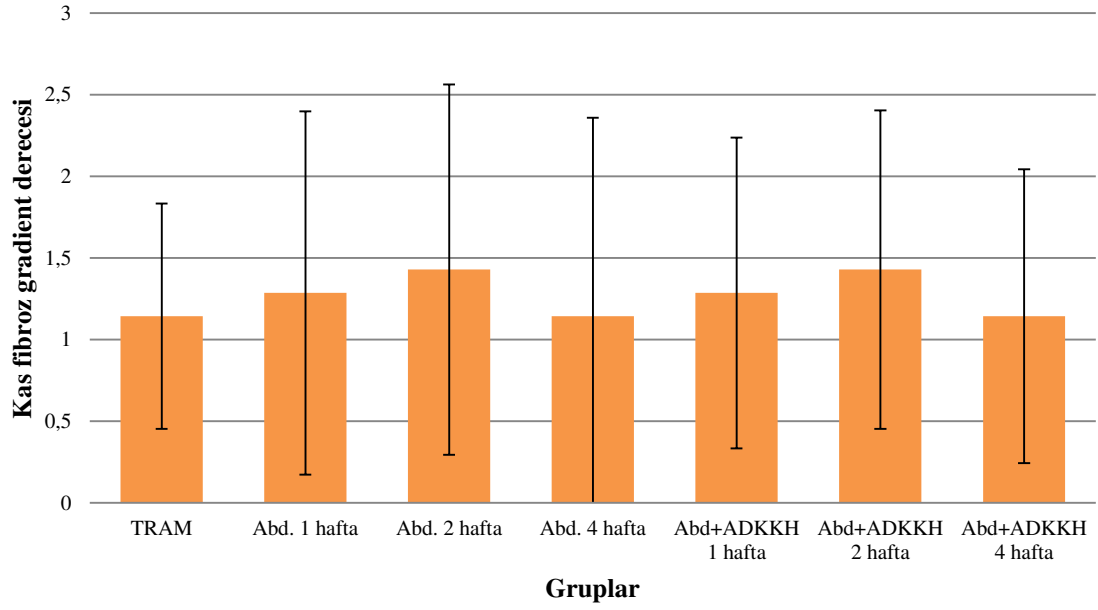
Her preparat ayrı ayrı incelenerek puanlama gerçekleştirildi ve grup ortalama değerleri elde edildi. Grup 1 (TRAM)’de fibroz gradient ortalaması $1,14 \pm 0,69$, grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta)’de $1,29 \pm 1,11$, grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta)’te $1,43 \pm 1,13$, grup 4 (Abdominoplasti 4 hafta)’te $1,14 \pm 1,21$, grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta)’te $1,29 \pm 0,95$, grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta)’da $1,43 \pm 0,98$, grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta)’de $1,14 \pm 0,90$ olarak hesaplandı (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Kas dokuda fibroz gradient dereceleri

Ort.: Ortalama, SD: Standart sapma (Standard deviation)

Sıçan No	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
1	2	0	1	1	1	1	0
2	1	3	0	0	2	0	2
3	2	2	1	0	2	2	2
4	1	0	1	2	0	3	1
5	0	1	1	0	2	1	0
6	1	1	3	3	2	2	2
7	1	2	3	2	0	1	1
Grup ort. $\pm$	$1,14 \pm$	$1,29 \pm$	$1,43 \pm$	$1,14 \pm$	$1,29 \pm$	$1,43 \pm$	$1,14 \pm$
SD	0,69	1,11	1,13	1,21	0,95	0,98	0,90

Elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Şekil 4.16).

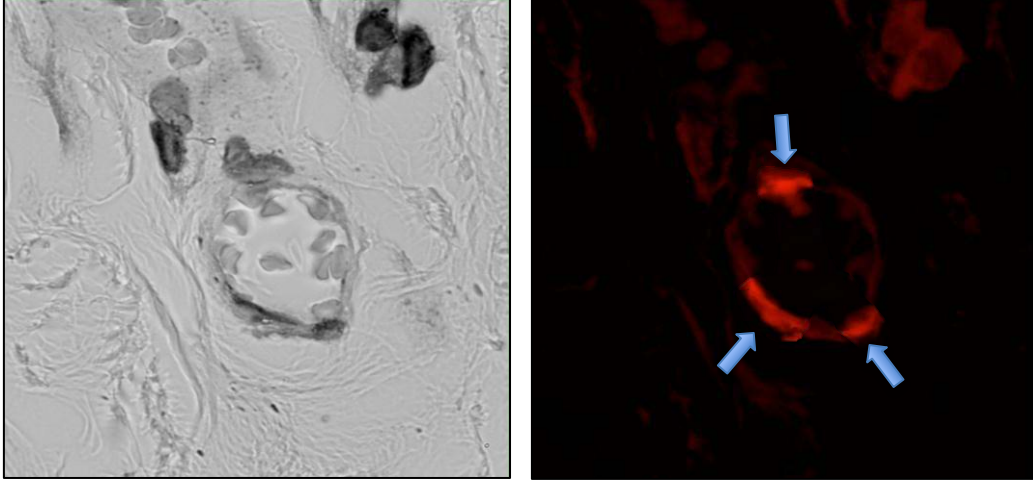


Şekil 4.16. TRAM flep kas komponentinde fibroz gradient derecelerinin gruplara göre dağılımı

Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p = 0,994$).

4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal olarak, DiI ile işaretli adipoz doku kaynaklı kök hücrelerden gelişen endotel hücreleri, floresan mikroskop altında 565 nm dalga boyunda incelendi. Adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin endotel hücrelerine dönüşümü gösterildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Floresan mikroskop altında 565 nm dalga boyunda floresan reaksiyon veren endotel hücreleri

Oklar ile işaretli.

4.7. Kanda VEGF Düzeyleri

Sadece TRAM flep kaldırılan grup haricinde tüm gruplarda değişen günlerde olmak üzere serumda VEGF düzeyleri çalışıldı. Grup 2 ve grup 5'te abdominoplasti yapılmadan hemen önce (0. gün), TRAM flep kaldırılmadan hemen önce (7. gün) ve TRAM flepler doku incelemesi için alınmadan hemen önce (14. gün) olacak şekilde 3 kez VEGF düzey çalışılması için kan alındı. Grup 3 ve grup 6'da abdominoplasti yapılmadan hemen önce (0. gün), TRAM flep kaldırılmadan hemen önce (14. gün) ve TRAM flepler doku incelemesi için alınmadan hemen önce (21. gün) olacak şekilde 3 kez VEGF düzey çalışılması için kan alındı. Grup 4 ve grup 7'de abdominoplasti yapılmadan hemen önce (0. gün), TRAM flep kaldırılmadan hemen önce (28. gün) ve TRAM flepler doku incelemesi için alınmadan hemen önce (35. gün) olacak şekilde 3 kez VEGF düzey çalışılması için kan alındı.

VEGF kan düzeyleri incelendiğinde grup 2 (Abdominoplasti 1 hafta) ortalamaları 0. gün $14,41 \pm 9,81$, 7. gün $17,49 \pm 19,27$, 14. gün $23,97 \pm 14,07$, grup 3 (Abdominoplasti 2 hafta) ortalamaları 0. gün $15,39 \pm 6,94$, 14. gün $24,53 \pm 9,25$, 21. gün $13,57 \pm 11,20$, grup

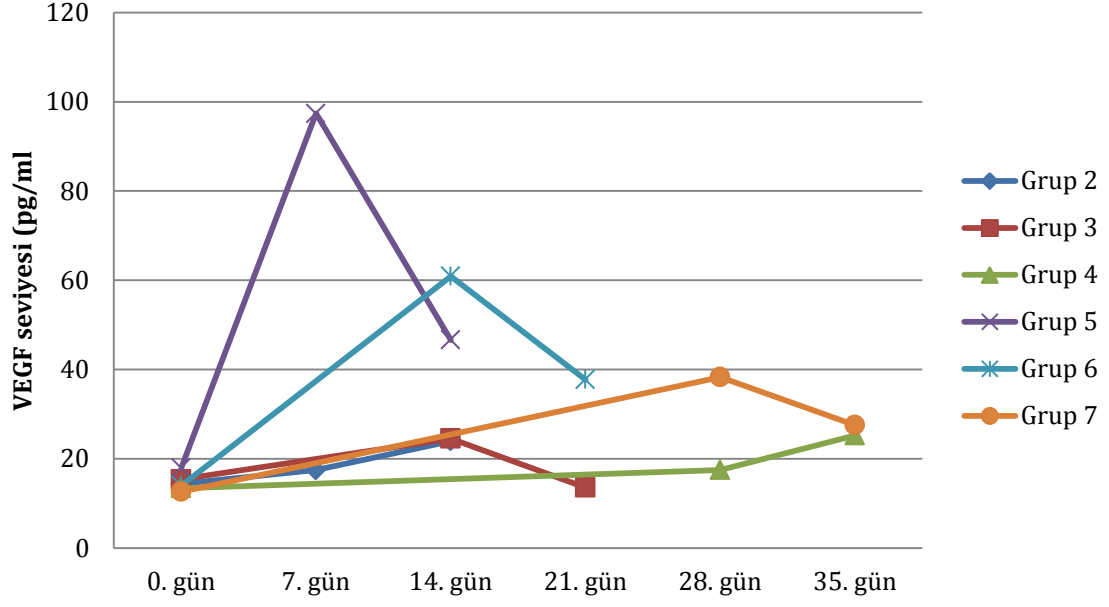
4 (Abdominoplasti 4 hafta) ortalamaları 0. gün $13,43 \pm 2,97$, 28. gün $17,50 \pm 13,79$, 35. gün $25,27 \pm 23,91$, grup 5 (Abdominoplasti + ADKKH 1 hafta) ortalamaları 0. gün $17,98 \pm 7,51$, 7. gün $97,36 \pm 70,71$, 14. gün $46,62 \pm 25,88$, grup 6 (Abdominoplasti + ADKKH 2 hafta) ortalamaları 0. gün $14,00 \pm 3,87$, 14. gün $60,89 \pm 26,50$, 21. gün $37,74 \pm 32,51$, grup 7 (Abdominoplasti + ADKKH 4 hafta) ortalamaları 0. gün $12,63 \pm 8,20$, 28. gün $38,32 \pm 12,35$, 35. gün $27,56 \pm 12,24$ pg/ml olarak bulundu (Tablo 4.10, şekil 4.18).

Tablo 4.10. VEGF kan seviyelerinin gruplara ve günlere göre dağılımı (pg/ml)

Abd. : Abdominoplasti, ADKKH: Adipoz doku kökenli kök hücre

Günler	Grup 2 (Abd. 1 hafta)	Grup 3 (Abd. 2 hafta)	Grup 4 (Abd. 4 hafta)	Grup 5 (Abd+ADKKH 1 hafta)	Grup 6 (Abd+ADKKH 2 hafta)	Grup 7 (Abd+ADKKH 4 hafta)
0	14,41±9,81	15,39±6,94	13,43±2,97	17,98±7,51	14,00±3,87	12,63±8,20
7	17,49±19,27	-	-	97,36±70,71	-	-
14	23,97±14,07	24,53±9,25	-	46,62±25,88	60,89±26,50	-
21	-	13,57±11,20	-	-	37,74±32,51	-
28	-	-	17,50±13,79	-	-	38,32±12,35
35	-	-	25,27±23,91	-	-	27,56±12,24

Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Grupların bazal kan VEGF değerleri (0. gün) ile 2. ve 3. kan değerleri karşılaştırıldığı zaman grup 2, grup 3 ve grup 4 değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü (p değerleri > 0,05). Grup 5, grup 6 ve grup 7'nin bazal değerleri (0. gün) ile 2. kan değerleri arasındaki artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p değerleri < 0,05). Grup 5, grup 6 ve grup 7'nin 1. ve 3. kan değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p değerleri > 0,05).



Şekil 4.18. Gruplara ve günlere göre ortalama kan VEGF değerlerinin grafik ile gösterilmesi

5. TARTIŞMA

TRAM flep halen otolog meme rekonstrüksiyonu için standart seçenek olarak kabul edilmektedir. Tamamen normal kabul edilen hastalarda dahi konvansiyonel pediküllü TRAM fleplerin özellikle cilt adasında sıklıkla kısmi nekrozlar görülebilmektedir. Sigara içen yada daha önce geçirilmiş abdominal cerrahi öyküsü olan yüksek riskli hastalarda ise TRAM flep kaldırılması rekonstrüksiyon cerrahisinde oldukça zorlayıcı bir seçenektir. Bu tarz komplikasyonları azaltabilmek için pek çok medikal ve cerrahi tedavi yöntemi araştırılmaktadır. Hartrampf TRAM flep yapılacak hastaların cerrahi riskini belirlemek adına bir skrolama sistemi geliştirmiştir (4). Bu skrolama sistemine göre 5 üzerinde puan alan hastalar TRAM flep için riskli hasta grubuna girmektedirler. Abdominoplasti sırasında abdominal karın duvarını ve ayrıca TRAM flep cilt adasını besleyen muskulokutan perforatör arterlerin kesildiği gösterilmiştir (283). Bu nedenle abdominoplasti öyküsü olan hastalara Hartrampf'ın skrolama sistemine göre 10 puan verilmekte ve bu da TRAM flep cerrahisinde abdominoplasti öyküsü varlığını bir kontrendikasyon haline getirmektedir (7).

Bu kabul edilmiş bilgilere rağmen literatürde abdominoplasti sonrası TRAM flep cerrahisinde başarılı sonuçların elde edildiği nadir çalışmalar mevcuttur. Sozer ve arkadaşları abdominoplastiden en az 10 yıl sonra bipediküllü TRAM flep yapılan ve postoperatif komplikasyon görülmeyen başarılı vakaları sunmuşlardır (284).

Ribuffo ve arkadaşları abdominoplasti sonrası abdominal perforatörlerin reperfüzyonunu araştırdıkları çalışmada 10 hastanın perforatör arterlerini abdominoplasti öncesi ve abdominoplasti sonrası 1. hafta, 3. ay ve 6. ayda doppler ultrason cihazı ile ölçmüşlerdir. Rektus kasından çıkan yeni oluşan perforatör arterlerin 1. aydan itibaren reperfüze olabildiğini ancak oluşan bu yeni damarların 6. ayda dahi orijinal boyutlarının ancak %40'ına ulaşabildiğini göstermişlerdir (9). Bu veriler ışığında abdominoplasti öyküsü olan hastada karın dokusu ile otolog rekonstrüksiyon düşünülüyor ise TRAM yerine VRAM (Vertikal rektus abdominis muscle) flep tercih edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Ancak meme rekonstrüksiyonunda seçilen yöntemin güvenilirliği kadar estetik sonuçları da önem teşkil etmektedir. TRAM flebin bu açıdan VRAM flebe bir üstünlüğü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik yapılan çalışmalarda genellikle TRAM flep üzerinde durulmaktadır (6, 285-288).

Çalışmamızda ADKKH tedavisinin abdominoplasti sonrası uygulanan TRAM flep üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Aynı zamanda kısa dönem (1 hafta), orta dönem (2 hafta) ve uzun dönem (4 hafta) sonuçların araştırılması amacı ile aynı işlemler farklı sürelerde tekrarlanmıştır. Flep canlılığını arttırmaya yönelik olarak yapılan benzer çalışmalar göz önüne alınarak bu süreler belirlenmiştir (6, 8, 144). Ayrıca ratlar için 1 ayın insan yaşamında yaklaşık 1,1 yıla denk olduğu kabul edilmektedir (6). Çalışma için belirlediğimiz bu süreler ile insanda abdominoplasti sonrası yaklaşık 3. ay, 6. ay ve 1 yıllık dönemlerde ADKKH tedavisi sonrası TRAM flep güvenilirliğinin sorgulanması amaçlanmıştır. Yaptığımız çalışmada canlı flep alanı, yeni oluşan perforatör arter sayıları, fleplerin mikroanjiyografik görünümeleri, kapiller dansite, flep kas komponentinde fibroz gradient, DiI işaretli kök hücrelerin endotelial hücrelere dönüşümü ve günlere göre kan VEGF seviyeleri değerlendirilmiştir.

Kök hücrelerin farklı hücre tiplerine dönüşebilme kapasitelerinden dolayı, bu hücreleri doku rejenerasyonunda kullanma fikrine dayanan pek çok çalışma yapılmıştır. Bu yönde yapılan çalışmaların ilkleri genellikle kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kardiyovasküler sistem üzerine etkilerini araştırmaya yönelik olarak gerçekleştirilmiştir (289, 290). İlerleyen dönemlerde kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler gibi etkileri olduğu ortaya konan ve daha kolay elde edilebilen yağ doku kaynaklı kök hücreler ile çalışmalar sürdürülmüştür (173). Ayrıca adipoz dokunun kemik iliğine göre çok daha yoğun şekilde pluripotent hücre içerdiği ve en az kemik iliği kadar farklı hücrelere farklılaşabilme kapasitelerinin oldukları gösterilmiştir (291, 292)

Daha önce yapılan benzer çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda ADKKH'ler cerrahi bölgeye lokal enjeksiyonlar ile uygulanmıştır (203-206, 281, 293-296). Burada öncelikli amaç etki beklenen dokuda hücre yoğunluğunun fazla olmasını sağlamaktır. Ayrıca sıçan gibi deney hayvanlarında sistemik enjeksiyonların belirli teknik zorlukları mevcuttur. Lokal enjeksiyonlar oldukça hızlı ve teknik açıdan kolay bir şekilde yapılabilir.

Hallock ve Rice ratlarda geliştirdikleri abdominoplasti modeli ile abdominoplasti sonrası 30 gün ve 10 ay sonra kaldırılan TRAM fleplerin sonuçlarını incelemişlerdir. Bu çalışmada TRAM flebin cilt adasını neredeyse tüm abdominal ön duvar cildini içerecek şekilde her iki anterior superior iliak spinel seviyesinden ksifoid çıkıntıya kadar olacak şekilde planlamışlardır. Sağ superior pediküllü rektus abdominis kası eleve edilmiştir.

Abdominoplastiden hem 1 ay sonra hem de 10 ay sonra oldukça yüksek oranda nekroz ile karşılaşmışlardır (Kısa dönem grupta ortalama canlı cilt alanı % 2,2, uzun dönem grubunda ortalama canlı alan % 13,7). Ancak yine de 10 ay beklenen grupta sonuçlar biraz daha iyi olarak ortaya çıkmıştır. Uzun dönemde artış gösteren flep canlı alanının, abdominoplasti sırasında kesilemeyen bir perforatör yada ilk ameliyat sonrası oluşan seroma yada kanamanın uzun süre beklenmesi ile ortadan kalkması sonucu gelişmiş olabileceğini de tartışmışlardır (6). Bu sonuçlar insanlarda abdominoplastiden uzun süreler geçtikten sonra yapılan başarılı TRAM flep sonuçlarını kısmen açıklamaktadır (284). Hallock ve Rice'ın yaptığı bu deneysel çalışmada insanlarda yapılan başarılı TRAM flep örneğinde olduğu gibi çift kas kullanılarak çift pedikül ile TRAM flep eleve edilmiş olsa idi daha çok canlı flep alanı ile karşılaşılması beklenebilirdi (284).

Özkan ve arkadaşları abdominoplasti sonrası cerrahi geciktirme yönteminin TRAM flep yaşayabilirliği üzerine olan etkilerini ratlarda yaptıkları deneysel çalışmada araştırmışlardır. Abdominoplasti sonrası cerrahi geciktirme yapmadan TRAM flep kaldırdıkları ve cerrahi geciktirme sonrası TRAM flep kaldırdıkları kısa (1 ay) ve uzun dönem (6 ay) grupları birbirleri ile karşılaştırmışlardır. Cerrahi geciktirme uygulanmayan gruplarda abdominoplastiden 1 ay sonra kaldırılan süperior pediküllü TRAM flepte %2,33, 6 ay sonra ise % 13,33 oranında canlı alan görülmüştür. Cerrahi geciktirme uyguladıkları gruplarda ise kısa dönem grupta %24,17, uzun dönem grupta ise %60 canlı flep alanı ile karşılaşmıştır. Cerrahi geciktirmenin abdominoplasti sonrası yapılan TRAM flep sonuçlarını olumlu etkilediği görülmüştür. Çalışmanın sonuçlarını değerlendirirken TRAM flep ile abdominoplasti arasında geçen sürenin sonuçlarını etkileyen en önemli bulgu olduğunu vurgulamışlardır (10).

Neovaskülarizasyon pek çok plastik cerrahi ameliyatının başarısında en önemli noktayı teşkil etmektedir. Flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik yapılan pek çok klinik ve deneysel çalışmada asıl amaç vaskülarizasyonu arttırmaktır (8, 287, 288, 297). Günümüzde neovaskülarizasyonun farklı pek çok mediatörün etkisi altında olduğu anlaşılmıştır (298). Polipeptid yapısında büyüme faktörlerinden (VEGF, PDGF gibi) oluşan bir grup molekülün patolojik ve doğal anjiyogenezden sorumlu olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur (298-300).

Seify ve arkadaşları rekombinan VEGF'ün abdominoplasti sonrası yapılan TRAM flep üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada Hallock ve Rice tarafından tanımlanan abdominoplasti modeli uygulanmış ardından 20 gün (Kısa dönem) ve 40 gün (Uzun dönem) sonra inferior pediküllü TRAM flep kaldırılmıştır. İntramusküler olarak VEGF verilen ve verilmeyen toplam dört grubun sonuçlarının karşılaştırıldığı çalışmada VEGF verilmeyen kısa dönem ve uzun dönem gruplarda sırası ile % 6,7 ve % 14,2 canlı flep alanı ile karşılaşmıştır. VEGF verilen kısa dönem ve uzun dönem gruplarında ise sırası ile % 70 ve % 72,5 canlı flep alanı görülmüştür (8).

Çalışmada 1993 yılında Dunn ve arkadaşları tarafından tanımlanan ve 1995 yılında Özgentaş tarafından cilt adası sınırları belirlenerek çalışmalarda kullanılmak üzere standardize edilen TRAM flep modeli kullanılmıştır (140, 142). Basit omurgalı gevşek derili hayvanların cilt vasküler dağılımları insanlardan oldukça farklı olduğu için tanımlanan rat TRAM flep modeli insan modelinin tam bir analogu olamaz. Ancak yine de bu hayvanlar üretimlerinin kolay ve hızlı oluşu, düşük maliyetleri ve kullanıldıkları çalışmalarda alınan geçerli ve mantıklı sonuçlar nedeniyle halen pek çok araştırmada ilk tercih olmaktadır (142, 286, 301). Yapılan anatomik çalışmalarda, rat rektus abdominis kasının beslenme paterninin ve cilt zonlarının perforatörlerle besleme şeklinin ortaya konması bu flebin muskulokutan perforatör arter ile beslenen gerçek bir muskulokutan flep olduğunu göstermiştir. Bu özellikleri ile insan rektus abdominis kası ve cilt adası ile oldukça fazla benzerlik göstermektedir (141). İnsanda pediküllü TRAM flepler dominant olmayan süperior pedikülleri üzerinden eleve edilmektedir. Bu nedenle biz de daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi bu durumu daha iyi simüle edebilmek için sıçanlarda TRAM flep modelimizi dominant olmayan inferior pedikül üzerinden planladık (8, 140, 301).

Çalışmada daha önce Hallock ve Rice tarafından tanımlanmış olan abdominoplasti modeline bir kaç modifikasyon getirilen abdominoplasti modeli uygulandı (6). Abdominoplasti sırasında sağ rektus abdominis kası üzerinden küçük bir kas fasyası neovaskülarizasyonun başlatılabilmesi için daha önce yapılmış benzer çalışmalarda olduğu gibi eksize edildi (8). Abdominoplasti modelimizde orjinalinden farklı olarak insizyonu kraniale yaparak diseksiyonu kraniokaudal yönde ilerlettik. Böylece sıçanda dominant olan süperior epigastrik artere yakın bir insizyon yaparak rektus abdominis kasından daha kranialde çıkan muskulokutan perforatörlerin kesildiğinden emin olundu (142). Ayrıca

abdominoplasti insizyonu insanda olduğu gibi TRAM flep cilt adasının inferioruna yerleştirilmiş oldu. İnsanda her bir rektus kasından 6 ile 8 arası muskulokutan perforatör arter cilde doğru çıkmaktadır. Bu arterler daha çok periumblikal bölgede lokalize olmuşlardır (302). Sıçanlarda ise rektus abdominis kasından çıkan perforatörler birbirlerine neredeyse eşit uzaklıklarda kraniokaudal düzlemde yerleşim gösterirler ve daha çok derin süperior epigastrik arterden köken alırlar (301). Ayrıca insanlardan farklı olarak ratlarda bu muskulokutan perforatörler uzun kıvrımlar yaparak indirekt olarak cilde giderler (142, 301). Bu nedenle sıçanda abdominoplasti sırasında bu damarlar bağlanırken dikkatli olunmaz ise bazılarının gözden kaçırılabilceği ve çalışma sonuçlarını etkileyebileceği akılda tutulmalıdır.

Literatürde yer alan çalışmalarda flep nekroz alanı belirlenmesi cerrahi sonrası 2 ile 7. günler arasında gerçekleştirilmiştir (288, 303). Clugston ve arkadaşlarına göre postoperatif doku nekrozunun oluştuğu ikinci günde flep canlılığı değerlendirilmeye başlanabilir. Takip eden günlerde dokuda sadece renk değişikliği ve böylece oluşan nekrotik dokunun çevre sağlıklı dokudan daha kolay ayırt edilebileceği vurgulanmaktadır. Postoperatif 7. günden sonrasına bırakılan değerlendirmelerde nekrotik dokularda ayrılmalar ve veya kontraksiyonlar ortaya çıkabilir (303). Bu çalışmada daha önce yapılmış benzer çalışmalarda olduğu gibi flep canlı alanı değerlendirilmesi ve takip eden diğer değerlendirme yöntemleri postoperatif 7. günde gerçekleştirilmiştir (10, 288).

TRAM fleplerin canlı alan ortalamalarında gruplar arasında anlamlı farklılıklar ortaya çıktı. ADKKH enjeksiyonu yapılan üç grup ile ADKKH enjeksiyonu yapılmaksızın sadece abdominoplasti ve ardından TRAM flep elevasyonu yapılan gruplar arasında anlamlı farklılıklar ortaya çıktı. Fakat tüm gruplar abdominoplasti yapılmaksızın sadece TRAM flep yapılan grubun canlı flep alanından düşük canlı flep alanı ortaya koydu. Bunun nedeni abdominoplasti yapılırken TRAM cilt adasını besleyen perforatörlerin kesilmiş olması olarak öngörüldü. Benzer sonuçlar yapılan benzer çalışmalarda da ortaya konmuştur (6, 8, 10, 144).

Abdominoplastiden 1 hafta ve 2 hafta sonra TRAM flep elevasyonu yapılan grup 2 ve grup 3'te neredeyse tama yakın (canlı alan yüzdeleri sırası ile % 2,24 ve % 3.31) nekroz miktarı dikkati çekti. Abdominoplastiden 4 hafta sonra TRAM flep elevasyonu yapılan grup 4'te ise grup 2 ve 3'e göre daha yüksek canlı alan görüldü ancak bu fark istatistiksel olarak

anlamli bulunmadı (Grup 4 canlı flep alanı %9,40). 4 hafta beklenen grupta canlı alan sadece TRAM flep yapılan grup 1'e göre anlamli şekilde düşüktü. Daha önce yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuca benzer şekilde abdominoplasti sonrası geçen sürenin TRAM flep yaşayabilirliği üzerine etkili olduğu görüldü (6, 8, 10).

Kök hücre verilen gruplar olan grup 5, grup 6 ve grup 7'nin flep canlı alan yüzdeleri verilmeyen grup 2, grup 3 ve grup 4'ün canlı alan yüzdelerinden anlamli olarak yüksek bulundu. ADKKH verilen gruplar arasında da anlamli farklılıklar oluştu. Abdominoplasti sırasında ADKKH verilen ve 2 hafta sonra TRAM flep yapılan grubun canlı flep alanı anlamli şekilde 1 hafta sonra TRAM flep yapılan grup 5'ten yüksek bulundu. Abdominoplasti sırasında ADKKH verilen ve 4 hafta sonra TRAM flep yapılan grup 7'nin canlı flep alanı ortalaması, grup 5 ve grup 6'nın canlı flep ortalamasından anlamli şekilde daha yüksekti. ADKKH tedavisi ile flep yaşayabilirliği arttırılabildi ancak ADKKH verilmesine karşın abdominoplasti sonrası geçen sürenin halen TRAM flep yaşayabilirliği üzerine etkili olduğu görüldü.

Sadece TRAM flep yapılan grup 1'in canlı flep alanı ise abdominoplasti sonrası TRAM flep yapılan kök hücre verilen yada verilmeyen diğer tüm gruplardan anlamli şekilde daha yüksek bulundu. Daha önce VEGF etkisinin araştırıldığı benzer çalışmada sadece TRAM grubu ile abdominoplasti ve VEGF gen terapi yapılan, 30 gün sonra TRAM flep kaldırılan grup arasında anlamli fark ortaya çıkmamıştır (144). ADKKH'lerin iskemik dokularda VEGF seviyelerini daha fazla yükselttiği ve yeni damar oluşumunu daha çok etkilediği gösterilmiştir (304). Bu çalışmada abdominoplasti sırasında karın ön duvarını besleyen muskulokutan perforatörler kesilmiş olsada karın ön duvarı cildinin beslenmesi kritik bir iskekiye uğramadan lateral torasik yada kostal arterler aracılığı ile devam edebilmiştir. ADKKH verilmesi ile flep canlı alanında belirgin bir yükselme sağlanabilmiştir. Yinede sadece TRAM flep yapılan gruptaki canlı flep alanından daha düşük bir canlı flep alanı ortaya çıkmıştır. VEGF verildiği dokuda iskemi olsada olmasada direkt vaskülarizasyonu arttırıcı etki ortaya çıkarmaktadır. Bu durum ADKKH'lerin abdominoplasti sonrası TRAM flep yaşayabilirliğini arttırmak için kullanılmasında bir dezavantaj olarak düşünülebilir.

Abdominoplasti yapılan tüm gruplarda (Grup 2, 3, 4, 5, 6, 7) abdominoplasti sırasında diseksiyon ile ortaya konan her iki rektus abdominis kasından çıkan muskulokutan perforatör arterlerin sayımı yapılmış ve ardından koterize edilmiştir. Elde edilen değerler

ikiye bölünerek tek rektus abdomis kasından çıkan arter sayısı elde edilmiştir. Bu gruplarda daha sonra yapılan TRAM fleplerin doku incelemesi amacı ile alındığı postoperatif 7. günde daha önce kesilmiş olan ve cilt adasını besleyen yeni perforatörlerin oluşup oluşmadığı araştırılmıştır. TRAM fleplerin cilt adaları diseksiyon ile kaldırılırken yeni oluşan perforatör arterler gösterilmiştir. Grup 2 ve 3 de hiç perforatör oluşumu gösterilememiştir. Grup 4'te ortalama olarak 0,29 adet yeni oluşmuş perforatör gösterilebilmiştir. Grup 2, 3 ve 4'te bazı sıçanlarda %10'lar civarında canlı flep alanı olmasına karşın hiç perforatör gösterilememesinin nedeni yapılan hassas diseksiyonlara karşın yeni oluşan perforatörlerin çok ince olması ve çok çabuk zedelenmesi sonucu sayılamaması olabilir. ADKHH verilen gruplarda ise verilmeyen gruplara göre anlamlı şekilde daha fazla miktarda perforatör arter gösterilebilmiştir. Abdominoplasti yapılırken ADKHH verilen ve 4 hafta sonra TRAM flep kaldırılan grup 7'de ortalama 2 adet yeni perforatör olduğu gösterilmiştir. Bu sayı diğer tüm grupların abdominoplasti sonrası oluşturduğu perforatör arter sayılarından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Tüm gruplarda, abdominoplasti sonrası yeni oluşan perforatör arter sayılarının abdominoplasti öncesi hesaplanan sayılardan anlamlı şekilde az olduğu görülmüştür. Abdominoplasti ile ortadan kaldırılan perforatörlerin yeniden oluşmasında zaman faktörünün önemi ortaya konmuştur. Yeni oluşan perforatörlerin çok ince ve hassas yapıda oldukları dikkati çekmiştir. Abdominoplasti ile TRAM flep elevasyonu arasındaki sürenin 4 haftadan daha uzun tutulması perforatör sayılarını arttırabilir yada oluşmuş olan perforatörlerin gelişmesine katkıda bulunabilir. Yapılacak yeni bir çalışmada bu durum araştırılabilir.

Çalışmamızda ayrıca TRAM flep dokuları alınarak ışık mikroskopu altında incelendi. Kapiller dansite açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar ortaya çıktı. Abdominoplasti sırasında ADKHH verilen ve 4 hafta sonra TRAM flep kaldırılan grup 7 ve sadece TRAM flep yapılan grup 1'in kapiller dansiteleri anlamlı olarak diğer tüm gruplardan yüksek bulundu. Ancak bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Abdominoplasti sonrası 4 hafta sonra TRAM flep yapılan grup 4'ün kapiller dansitesi 1 hafta sonra TRAM flep yapılan grup 2'den anlamlı olarak yüksek bulundu. ADKHH verilerek iki hafta sonra TRAM flep kaldırılan grup 6'nın damar sayısı aynı koşulların oluşturulduğu ancak bir hafta sonra TRAM flep kaldırılan grup 5'in kapiller dansitesinden yüksek bulunsada bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Abdominoplasti sonrası TRAM flep yapılmadan önce geçen sürenin vasküler dansiteyi tek başına etkileyen bir değişken olduğu görüldü. ADKHH'lerin vasküler dansiteyi arttırdığı

daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (205, 206) Bizim çalışmamızda da ADKKH verilmesinin dokudaki damar sayısını arttırdığı ancak süre ile bu miktarın değişiklik gösterdiği görüldü.

Sadece TRAM flep yapılan grup 1'in canlı flep alanı yüzdesi ADKKH verildikten dört hafta sonra TRAM flep yapılan grup 7'den yüksek olsa da kapiller dansiteleri açısından anlamlı bir fark ortaya çıkmadı. ADKKH verilmesi ile dokuda kapiller miktarı arttırılmış olsa da daha önce yapılan abdominoplasti sırasında kesilen ve yeniden oluşan perforatör arterlerin yapısal olarak daha güçsüz olması canlı flep alanı açısından grup 7 ile grup 1 arasındaki farkın nedeni olabilir. Çalışmamızda bu yeni oluşan kapillerlerin çaplarının ölçümü yapılmadı.

Çalışmada kas dokuda meydana gelen değişiklikler değerlendirilmek üzere histopatolojik kesitler Massom Trikrom boyası ile boyandı. Bu preparatlar mikroskop altında incelenerek rektus abdominis kasında fibroz gradient ölçümleri yapıldı. Gruplar arasında fibroz gradient değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmadı. Ratlarda rektus abdominis kasının dominant pedikülü süperior epigastrik arterdir (140). Daha önce sıçanlarda yapılan modelleme çalışmalarında rektus abdominis muskulokutan fleplerinin cilt adalarında pedikül (Dominant yada dominant olmayan) seçimine göre farklı yüzdelerde flep canlı alanları olduğu gösterilmiştir. Ancak aynı çalışmalarda fleplerin kas komponentlerinin hem süperior epigastrik arterden hem de inferior epigastrik arterden tam olarak beslenebildiği ve her iki pedikül ile de canlılıklarını %100 koruyabildikleri gösterilmiştir (139, 140, 142). Çalışmamızda inferior epigastrik pedikülü ile eleve ettiğimiz TRAM flebin kas komponentinin tüm gruplarda bu pedikülden tam olarak beslenebildiğini ve bu nedenle fibroz gradient açısından farklılık oluşmadığını düşünmekteyiz.

Grup 1 dışında tüm diğer gruplarda belirli günlerde kanda bakılan VEGF değerleri arasında anlamlı farklılıklar mevcuttu. ADKKH verilen grup 5, 6 ve 7'nin serum VEGF değerleri, ADKKH verilmeyen grup 2, 3 ve 4'ün değerleri ile kıyaslandığı zaman anlamlı olarak yüksek bulundu. VEGF seviyesindeki artışın ADKKH verilen ve abdominoplastiden 1 hafta sonra TRAM flep kaldırılırken VEGF değeri ölçümü için kan alınan grup 5'te en yüksek seviyede olduğu dikkat çekti. VEGF değerleri tüm gruplarda bazal değer için 0. günde ve cerrahi yapılan günlerde ölçüldü. ADKKH verilen gruplarda abdominoplasti sonrası geçen süre arttıkça VEGF seviyelerinde bir düşüş dikkati çekmiştir.

Abdominoplasti sonrası geçen süre arttıkça yara iyileşmesinin tamamlanması sonucu verilen kök hücrelerin etkisinin azaldığı ve dolayısı ile kan VEGF değerlerinde bir düşüş olduğu düşünülebilir.

İleri çalışmalarda rektus abdominis kasının üzerinden eksize edilerek yara iyileşmesini stimüle etme girişimi uygulanmadan benzer çalışmalar yapılabilir (8). Böylece bu modifikasyonun etkileri araştırılabilir. Çalışma süresinin biraz daha uzun tutulması ile ADKKH etkisi ile oluşan perforatörlerin sayıca ve boyut olarak arttırılması söz konusu olabilir.

Çalışmada ADKKH elde edilmesi için inbred hayvanlar kullanılmıştır. Böylece dokulara enjekte edilen ADKKH'lere karşı greft versus host reaksiyonu ile karşılaşılmamıştır. İnbred hayvanlardan elde edilen ADKKH'lerin verildikleri dokuda immünolojik redde uğramadan farklılaşabildiği ve doku rejenerasyonu yapabildiği gösterilmiştir (305).

ADKKH'lerin doku rejenerasyonuna olan olumlu etkilerini ortaya koyan pekçok çalışma yapılmaktadır. Ancak bu etkileri nasıl ortaya koyduklarını açıklayabilen çalışmalar oldukça azdır. Bu nedenle çalışmaların bu mekanizmaları açıklamaya yönelik ilerletilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. ADKKH hazırlanması ve uygulanması oldukça kolay ve uygulanabilir bir yöntemdir. Abdominoplasti yapılan hastalara daha sonra meme kanseri geçireceklerini öngörerek ADKKH enjeksiyonu yapılması çok uygulanabilir bir yöntem olarak görülmesi de ADKKH'lerin yara iyileşmesine olan olumlu katkıları düşünülerek bu işlem uygulanabilir. TRAM flebin bozulan perforatör arterlerini yeniden oluşturmak için ADKKH verilmesi uygulanabilecek bir işlem olmakla birlikte abdominoplasti sonrası kısmi bir iskemi yaşayan karın cildinin kök hücreler ile vaskülerize edilmesi direkt VEGF verilmesi kadar etkili olmayabilir. Yapılacak yeni bir çalışma ile ADKKH ve VEGF tedavilerinin etkileri karşılaştırılabilir. Yada kök hücre tedavisi ile birlikte VEGF gen tedavileri birlikte uygulanabilir. Deneysel araştırmalarda flep yaşayabilirliğini arttırmak adına ADKKH uygulamaları ile başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Yaptığımız deneysel çalışmada abdominoplasti sonrası yapılan TRAM flebin viabilitesi ADKKH verilerek arttırılabilmektedir.

6. SONUÇ

Halen otolog meme rekonstrüksiyonu için standart seçenek olarak kabul ilen TRAM flebin cilt adasında tamamen normal bireylerde dahi sıklıkla kısmi nekrozlar görülebilmektedir. Geçirilmiş abdominal cerrahi öyküsü olan hastalarda bu komplikasyonların görülme ihtimali oldukça artmaktadır. Bu tarz komplikasyonları azaltabilmek için pek çok medikal ve cerrahi tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Yara iyileşmesi ve neovaskülarizasyon üzerine olan olumlu etkileri ortaya konan kök hücre tedavilerinin flep yaşayabilirliği üzerine etkileri araştırmalarda değerlendirilmektedir. Çalışmamızda abdominoplasti sırasında dokuya lokal olarak verilen ADKKH'lerin daha sonra yapılacak olan pediküllü TRAM flep üzerine olan etkileri incelenmiştir.

Cerrahi geciktirme yöntemlerinin, büyüme faktörlerinin yada anjiyogenik potansiyeli olan farmakolojik ajanların abdominoplasti sonrası TRAM flep yaşayabilirliği üzerine etkilerini araştıran az sayıda deneysel ve klinik çalışmalar mevcuttur. Ancak literatürde ADKKH'lerin abdominoplasti sonrası TRAM flep yaşayabilirliği üzerine etkilerini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Ratlarda gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda; ADKKH'lerin abdominoplasti sırasında uygulanması ile daha sonra yapılan TRAM flebin cilt adası yaşayabilirliği arttırılmıştır. Ayrıca abdominoplasti sonrası geçen sürenin de tek başına flep yaşayabilirliği üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Flep yaşayabilirliğindeki artış dokuda meydana gelen damarlanma artışı ve muskulokutan perforatör arterlerin yeniden oluşması ile ortaya çıkmıştır. Damarlanma artışında hem sürenin hem ADKKH'lerin ayrı ayrı etkileri olduğu gösterilmiştir. ADKKH'lerin kan VEGF düzeylerini arttırarak ve direkt olarak endotel hücrelerine dönüşerek damarlanmada artışa neden olduğu gösterilmiştir. Dominant olmayan inferior epigastrik arterin tüm gruplarda kası yeterli düzeyde besleyebilmesi sonucu fleplerin kas komponentlerinde hasarlanma derecesi (Fibroz gradient) açısından farklılık ortaya çıkmamıştır.

ADKKH elde edilmesi, hazırlanması ve uygunlaması kolay, güvenilir endojen bir anjiyogenik mediatördür. Bu etkileri ile flep yaşayabilirliğinin riskli olduğu durumlarda kullanılması arzu edilen bir durumdur. İleride klinikte flep yaşayabilirliğinin riskli olduğu

durumlarda ADKKH'lerin rutin olarak kullanıma girebileceğini ve başarılı sonuçların elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

.

7. KAYNAKLAR

1. Hartrampf CR, Scheflan M, Black PW. Breast reconstruction with a transverse abdominal island flap. *Plast Reconstr Surg* 69: 216–224, 1982.
2. Hartrampf CR, Bennett GK. Autogenous tissue reconstruction in the mastectomy patient. *Ann Surg* 205: 508–519, 1987.
3. Kroll SS, Gherardini G, Martin JE, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, Robb GL, Wang BG. Fat necrosis inf ree and pedicled TRAM flaps. *Plast Reconstr Surg* 102: 1502–1507, 1998.
4. Hartrampf CR. The transverse abdominal island flap for breast reconstruction. *Clin Plast Surg* 15: 703–716, 1988.
5. Codner MA, Bostwick J III. The delayed TRAM flap. *Clin Plast Surg* 25: 183–189, 1998.
6. Hallock GG, Rice BS. Fate of the TRAM flap after abdominoplasty in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 101: 1828–1835, 1998.
7. Hartrampf CR, Beckenstein MS. The use of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap after abdominoplasty (Discussion). *Ann Plast Surg* 35: 411–412, 1995.
8. Seify H, Bilkay U, Jones G. Effect of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis on TRAM flap harvesting after abdominoplasty. *Plast Reconstr Surg* 111: 1212–1216, 2003.
9. Ribuffo D, Marcellino M, Barnett GR, Houseman ND, Scuderi N. Breast reconstruction with abdominal flaps after abdominoplasties. *Plast Reconstr Surg* 108: 1604–1608, 2001.
10. Ozkan O, Coskunfirat OK, Ozgentas HE, Yildirim I, Dikici MB. Is it possible to increase the survival of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap following previous abdominoplasty using a delay procedure? An experimental study in the rat. *Plast Reconstr Surg* 116: 1945–1952, 2005.
11. Thomas ED. Bone marrow transplantation: prospects for leukemia and other conditions. *Proc Inst Med Chic* 30: 256-258, 1975.
12. Bacigalupo A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 17: 387-399, 2004.
13. Kan I, Melamed E, Offen D. Integral therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Curr Drug Targets* 6: 31-41, 2005.
14. Shyu KG, Wang BW, Hung HF, Chang CC, Shih DT. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci* 13: 47-58, 2006.

15. Bieback K, Kern S, Kocaomer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 18: 71-76, 2008.
16. Murohara T, Shintani S, Kondo K. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des* 15: 2784-2790, 2009.
17. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg* 40: 113-141, 1987.
18. Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plast Reconstr Surg* 104: 2079-2091, 1999.
19. Morris SF, Taylor GI. The time sequence of the delay phenomenon: when is a surgical delay effective? An experimental study. *Plast Reconstr Surg* 95(3): 526-533, 1995.
20. Burnstock G, Ralevic V. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *Br J Plast Surg* 47: 527-43, 1994.
21. Gatti JE, LaRossa D, Neff SR, Silverman DG. Altered skin flap survival and fluorescein kinetics with hemodilution. *Surgery* 92: 200-205, 1982.
22. Kim KZ, Thompson DH, George TF 2nd, McQuillan PM, Kao TC. Effect of anemia on survival of myocutaneous flaps in the pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111: 509-512, 1994.
23. Platt AJ, Robertson A, Batchelor AG. Successful free flap transfer and salvage in sickle cell trait. *Br J Plast Surg* 53: 707-708, 2000.
24. Palmer B, Jurell G, Norberg KA. The blood flow in experimental skin flaps in rats studied by means of the 133 xenon clearance method. *Scand J Plast Reconstr Surg* 6: 6-12, 1972.
25. Nathanson SE, Jackson RT. Blood flow measurements in skin flaps. *Arch Otolaryngol* 101: 354-357, 1975.
26. Kerrigan CL, Daniel RK. Monitoring acute skin-flap failure. *Plast Reconstr Surg* 71: 519-524, 1983.
27. Kerrigan CL, Daniel RK. Skin flap research: a candid view. *Ann Plast Surg* 13: 383-387, 1984.
28. Gottrup F, Oredsson S, Price DC, Mathes SJ, Hohn DC. A comparative study of skin blood flow in musculocutaneous and random pattern flaps. *J Surg Res* 37: 443-447, 1984.
29. Gottrup F, Firmin R, Hunt TK, Mathes SJ. The dynamic properties of tissue oxygen in healing flaps. *Surgery* 95: 527-536, 1984.
30. Calderon W, Chang N, Mathes SJ. Comparison of the effect of bacterial inoculation in musculocutaneous and fasciocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 77: 785-794, 1986.

31. Eshima I, Mathes SJ, Paty P. Comparison of the intracellular bacterial killing activity of leukocytes in musculocutaneous and random-pattern flaps. *Plast Reconstr Surg* 86: 541-547, 1990.
32. Reinisch JF. The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 54: 585-598, 1974.
33. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 72: 766-777, 1983.
34. Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 65: 152-158, 1980.
35. Pang CY, Neligan PC, Forrest CR, Nakatsuka T, Sasaki GH. Hemodynamics and vascular sensitivity to circulating norepinephrine in normal skin and delayed and acute random skin flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 78: 75-84, 1986.
36. Fujino T. Contribution of the axial and perforator vasculature to circulation in flaps. *Plast Reconstr Surg* 39: 125-137, 1967.
37. Hjortdal VE, Hauge E, Hansen ES. Differential effects of venous stasis and arterial insufficiency on tissue oxygenation in myocutaneous island flaps: an experimental study in pigs. *Plast Reconstr Surg* 89: 521-529, 1992.
38. Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Arterial ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg* 93: 375-385, 1994.
39. Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Venous ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg* 93: 366-374, 1994.
40. Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg* 93: 1485-95; 1496-1497, 1994.
41. Im MJ, Su CT, Hoopes JE, Anthenelli RM. Skin-flap metabolism in rats: oxygen consumption and lactate production. *Plast Reconstr Surg* 71: 685-688, 1983.
42. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg* 198: 87-90, 1983.
43. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 201: 357-359, 1985.
44. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 79: 990-997, 1987.
45. Perez HD, Weksler BB, Goldstein IM. Generation of a chemotactic lipid from a arachidonic acid by exposure to a superoxide-generating system. *Inflammation* 4: 313-328, 1980.

46. Angel MF, Haddad J Jr, Abramson M. A free radical scavenger reduces hematoma-induced flap necrosis in Fischer rats. *Otolaryngol Head Neck Surg* 96: 96-98, 1987.
47. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
48. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 46: 2402-2406, 1987.
49. Farber HW, Center DM, Rounds S. Effect of ambient oxygen on cultured endothelial cells from different vascular beds. *Am J Physiol* 253: 878-883, 1987.
50. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Narayanan K, Kuhns DB, Basford RE, Futrell JW. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. *Plast Reconstr Surg* 81: 233-239, 1988.
51. Wilkins EG, Rees RS, Smith D, Cashmer B, Punch J, Till GO, Smith DJ Jr. Identification of xanthine oxidase activity following reperfusion in human tissue. *Ann Plast Surg* 31: 60-65, 1993.
52. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, Ramasastry SS, Kuhns DB, Basford RE, Futrell JW. Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischaemic flap surgery. *Br J Plast Surg* 39: 469-472, 1986.
53. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67: 1016-1023, 1983.
54. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM. Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2643-2646, 1990.
55. Rees TD, Liverett DM, Guy CL. The effect of cigarette smoking on skin-flap survival in the face lift patient. *Plast Reconstr Surg* 73: 911-915, 1984.
56. Chang LD, Buncke G, Slezak S, Buncke HJ. Cigarette smoking, plastic surgery, and microsurgery. *J Reconstr Microsurg* 12: 467-474, 1996.
57. Chang DW, Reece GP, Wang B, Robb GL, Miller MJ, Evans GR, Langstein HN, Kroll SS. Effect of smoking on complications in patients undergoing free TRAM flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 105: 2374-2380, 2000.
58. Lee C, Mehran RJ, Lessard ML, Kerrigan CL. Leeches: controlled trial in venous compromised rat epigastric flaps. *Br J Plast Surg* 45: 235-238, 1992.
59. Batchelor AG, Davison P, Sully L. The salvage of congested skin flaps by the application of leeches. *Br J Plast Surg* 37: 358-360, 1984.
60. Eckert P, Schnackerz K. Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Ann Plast Surg* 26: 77-84, 1991.

61. Cornejo CJ1, Kierney PC, Vedder NB, Winn RK. Mild hypothermia during reperfusion reduces injury following ischemia of the rabbit ear. *Shock* 9: 116-120, 1998.
62. Mes LG. Improving flap survival by sustaining cell metabolism within ischemic cells: a study using rabbits. *Plast Reconstr Surg* 65: 56-65, 1980.
63. Nancarrow JD. Augmentation of island flaps by pre-operative cell membrane stabilisation: an experimental study in rats. *Br J Plast Surg* 34: 212-214, 1981.
64. Nakatsuka T, Pang CY, Neligan P, Lindsay WK, Zuker RM. Effect of glucocorticoid treatment on skin capillary blood flow and viability in cutaneous and myocutaneous flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 76: 374-385, 1985.
65. Manson PN, Narayan KK, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. Improved survival in free skin flap transfers in rats. *Surgery* 99: 211-215, 1986.
66. Suárez Nieto C, Suárez García MJ, Barthe García P. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg* 45: 113-116, 1992.
67. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Narayanan K, Basford RE, Futrell JW. Augmentation of skin flap survival with allopurinol. *Ann Plast Surg* 18: 494-498, 1987.
68. Tamir G, Yaffe B, Pri-Chen S, Hauben DJ, Tsur H. The effect of allopurinol on experimental island skin flap survival under prolonged periods of arterial ischaemia. *Br J Plast Surg* 47: 155-157, 1994.
69. Price MA, Pearl RM. Multiagent pharmacotherapy to enhance skin flap survival: lack of additive effect of nitroglycerin and allopurinol. *Ann Plast Surg* 33: 52-56, 1994.
70. Im MJ, Shen WH, Pak CJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effect of allopurinol on the survival of hyperemic island skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 73(2): 276-278, 1984.
71. Senderoff DM, Israeli D, Zhang WX, Urken ML, Weinberg H. Iloprost improves survival of ischemic experimental skin flaps. *Ann Plast Surg* 32: 490-495, 1994.
72. Renaud F, Succo E, Alessi MC, Legre R, Juhan-Vague I. Iloprost and salvage of a free flap. *Br J Plast Surg* 49: 245-248, 1996.
73. Sasaki GH, Pang CY. Experimental evidence for involvement of prostaglandins in viability and acute skin flaps: effects on viability and mode of action. *Plast Reconstr Surg* 67: 335-340, 1981.
74. Mellow CG, Knight KR, Angel MF, O'Brien BM. The effect of thromboxane synthetase inhibition on tolerance of skin flaps to secondary ischemia caused by venous obstruction. *Plast Reconstr Surg* 86: 329-334, 1990.
75. Rothkopf DM, Chu B, Bern S, May JW Jr. The effect of dextran on microvascular thrombosis in an experimental rabbit model. *Plast Reconstr Surg* 92: 511-515, 1993.

76. Weksler BB, Pett SB, Alonso D, Richter RC, Stelzer P, Subramanian V, Tack-Goldman K, Gay WA Jr. Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med* 308: 800-805, 1983.
77. Greenberg BM, Masem M, May JW Jr. Therapeutic value of intravenous heparin in microvascular surgery: an experimental vascular thrombosis study. *Plast Reconstr Surg* 82: 463-472, 1988.
78. Das SK, Miller JH. Current status of topical antithrombotic agents in microvascular surgery. *Microsurgery* 15: 630-632, 1994.
79. Khouri RK, Cooley BC, Kunselman AR, Landis JR, Yeramian P, Ingram D, Natarajan N, Benes CO, Wallemark C. A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. *Plast Reconstr Surg* 102: 711-721, 1998.
80. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
81. Payne D, Kubes P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 265: 189-195, 1993.
82. Linas S, Whittenburg D, Repine JE. Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol* 272: 48-54, 1997.
83. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 86:279-288, 1992.
84. Pang CY, Chiu C, Zhong A, Xu N. Pharmacologic intervention of skin vasospasm and ischemic necrosis in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: 163-171, 1993.
85. Cordeiro PG, Mastorakos DP, Hu QY, Kirschner RE. The protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 100: 1227-1233, 1997.
86. Cordeiro PG, Santamaria E, Hu QY. Use of a nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 102: 2040-2048; discussion 2049-2051, 1998.
87. Khiabani KT, Kerrigan CL. The effects of the nitric oxide donor SIN-1 on ischemia-reperfused cutaneous and myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 110: 169-176, 2002.
88. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, Kim BM, Tanaka T, Hiai H, Nishimura Y. Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap. *Plast Reconstr Surg* 101: 785-792, 1998.
89. Larson JV, Steensma EA, Flikkema RM, Norman EM. The application of hyperbaric oxygen therapy in the management of compromised flaps. *Undersea Hyperb Med* 40: 499-504, 2013.

90. Qi Z, Gao CJ, Wang YB, Ma XM, Zhao L, Liu FJ, Liu XH, Sun XJ, Wang XJ. Effects of hyperbaric oxygen preconditioning on ischemia-reperfusion inflammation and skin flap survival. *Chin Med J (Engl)* 126: 3904-3909, 2013.
91. Liu X, Liang F, Yang J, Li Z, Hou X, Wang Y, Gao C. Effects of stromal cell derived factor-1 and CXCR4 on the promotion of neovascularization by hyperbaric oxygen treatment in skin flaps. *Mol Med Rep* 8: 1118-1124, 2013.
92. Baynosa RC, Zamboni WA. The effect of hyperbaric oxygen on compromised grafts and flaps. *Undersea Hyperb Med* 39: 857-865, 2012.
93. Eskes A, Ubbink DT, Lubbers M, Lucas C, Vermeulen H. Hyperbaric oxygen therapy for treating acute surgical and traumatic wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD008059, 2010.
94. Prochno T. Principles of rhinoplasty. The "Indian" and "Italian" method. *HNO* 42: 730-733, 1994.
95. Braithwaite F. Some observations on the vascular channels in tubed pedicles. II. *Br J Plast Surg* 4: 28-37, 1951.
96. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG. An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 89: 408-16; discussion 417-8, 1992.
97. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136, 1986.
98. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 107: 549-552, 1992.
99. Zahir KS, Syed SA, Zink JR, Restifo RJ, Thomson JG. Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flaps in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 102: 140-150; discussion 151-152, 1998.
100. Rees R, Punch J, Shaheen K, Cashmer B, Guice K, Smith DJ Jr. The stress response in skin: the role of neutrophil products in preconditioning. *Plast Reconstr Surg* 92: 110-117; discussion 118-119, 1993.
101. Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 26: 661-668, 1994.
102. Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 76: 73-81, 1995.
103. Strasser RH, Braun-Dullaeus R, Walendzik H, Marquetant R. Alpha 1-receptor-independent activation of protein kinase C in acute myocardial ischemia. Mechanisms for sensitization of the adenylyl cyclase system. *Circ Res* 70: 1304-1312, 1992.

104. Liu GS, Richards SC, Olsson RA, Mullane K, Walsh RS, Downey JM. Evidence that the adenosine A3 receptor may mediate the protection afforded by preconditioning in the isolated rabbit heart. *Cardiovasc Res* 28: 1057-1061, 1994.
105. Matsumura H, Yoshizawa N, Vedder NB, Watanabe K. Preconditioning of the distal portion of a rat random-pattern skin flap. *Br J Plast Surg* 54: 58-61, 2001.
106. Maldonado C, Stadelmann WK, Ramirez S, Quan EE, Barker JH. Preconditioning of latissimus dorsi muscle flaps with monophosphoryl lipid a. *Plast Reconstr Surg* 111: 267-274, 2003.
107. Verdouw PD, Gho BC, Koning MM, Schoemaker RG, Duncker DJ. Cardioprotection by ischemic and nonischemic myocardial stress and ischemia in remote organs. Implications for the concept of ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 793: 27-42, 1996.
108. De Angelis R, Tavilla A, Verdecchia A, Scoppa S, Hachey M, Feuer EJ, Mariotto AB. Breast cancer survivors in the United States: geographic variability and time trends, 2005-2015. *Cancer* 115(9): 1954-1966, 2009.
109. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 81: 1879-1886, 1989.
110. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72: 1117-1130, 2003.
111. Kampert JB, Whittemore AS, Paffenbarger RS Jr. Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 128: 962-979, 1988.
112. White E. Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delayed childbearing. *Am J Public Health* 77: 495-497, 1987.
113. Dupont WD, Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 312: 146-151, 1985.
114. Halsted WS. I. The Results of radical operations for the cure of carcinoma of the breast. *Ann Surg* 46: 1-19, 1907.
115. Adair F, Berg J, Joubert L, Robbins GF. Long-term followup of breast cancer patients: the 30-year report. *Cancer* 33: 1145-1150, 1974.
116. Veronesi U, Valagussa P. Inefficacy of internal mammary nodes dissection in breast cancer surgery. *Cancer* 47: 170-175, 1981.

117. Veronesi U, Marubini E, Mariani L, Valagussa P, Zucali R. The dissection of internal mammary nodes does not improve the survival of breast cancer patients. 30-year results of a randomised trial. *Eur J Cancer* 35: 1320-1325, 1999.
118. Simmons RM, Adamovich TL. Skin-sparing mastectomy. *Surg Clin North Am* 83: 885-899, 2003.
119. Simmons RM, Fish SK, Gayle L, La Trenta GS, Swistel A, Christos P, Osborne MP. Local and distant recurrence rates in skin-sparing mastectomies compared with non-skin-sparing mastectomies. *Ann Surg Oncol* 6: 676-681, 1999.
120. Slavin SA, Schnitt SJ, Duda RB, Houlihan MJ, Koufman CN, Morris DJ, Troyan SL, Goldwyn RM. Skin-sparing mastectomy and immediate reconstruction: oncologic risks and aesthetic results in patients with early-stage breast cancer. *Plast Reconstr Surg* 102: 49-62, 1998.
121. Foster RD, Esserman LJ, Anthony JP, Hwang ES, Do H. Skin-sparing mastectomy and immediate breast reconstruction: a prospective cohort study for the treatment of advanced stages of breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* 9: 462-466, 2002.
122. Sacchini V, Pinotti JA, Barros AC, Luini A, Pluchinotta A, Pinotti M, Boratto MG, Ricci MD, Ruiz CA, Nisida AC, Veronesi P, Petit J, Arnone P, Bassi F, Disa JJ, Garcia-Etienne CA, Borgen PI. Nipple-sparing mastectomy for breast cancer and risk reduction: oncologic or technical problem? *J Am Coll Surg* 203: 704-714, 2006.
123. Chung AP, Sacchini V. Nipple-sparing mastectomy: where are we now? *Surg Oncol* 17: 261-266, 2008.
124. Brandberg Y, Malm M, Blomqvist L. A prospective and randomized study, "SVEA," comparing effects of three methods for delayed breast reconstruction on quality of life, patient-defined problem areas of life, and cosmetic result. *Plast Reconstr Surg* 105: 66-74; discussion 75-6, 2000.
125. Alderman AK, Wei Y, Birkmeyer JD. Use of breast reconstruction after mastectomy following the Women's Health and Cancer Rights Act. *JAMA* 295: 387-388, 2006.
126. Al-Ghazal SK, Sully L, Fallowfield L, Blamey RW. The psychological impact of immediate rather than delayed breast reconstruction. *Eur J Surg Oncol* 26: 17-19, 2000.
127. Alderman AK, Kuhn LE, Lowery JC, Wilkins EG. Does patient satisfaction with breast reconstruction change over time? Two-year results of the Michigan Breast Reconstruction Outcomes Study. *J Am Coll Surg* 204: 7-12, 2007.
128. Kroll SS, Baldwin B. A comparison of outcomes using three different methods of breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 90: 455-462, 1992.
129. Nahabedian MY. Breast reconstruction: a review and rationale for patient selection. *Plast Reconstr Surg* 124: 55-62, 2009.
130. Cordeiro PG, McCarthy CM. A single surgeon's 12-year experience with tissue expander/implant breast reconstruction: part II. An analysis of long-term complications,

aesthetic outcomes, and patient satisfaction. *Plast Reconstr Surg* 118: 832-839, 2006.

131. Collis N, Sharpe DT. Breast reconstruction by tissue expansion. A retrospective technical review of 197 two-stage delayed reconstructions following mastectomy for malignant breast disease in 189 patients. *Br J Plast Surg* 53: 37-41, 2000.

132. Pomahac B, Recht A, May JW, Hergrueter CA, Slavin SA. New trends in breast cancer management: is the era of immediate breast reconstruction changing? *Ann Surg* 244: 282-288, 2006.

133. Tønseth KA, Hokland BM, Tindholdt TT, Abyholm FE, Stavem K. Quality of life, patient satisfaction and cosmetic outcome after breast reconstruction using DIEP flap or expandable breast implant. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 61: 1188-1194, 2008.

134. Nahabedian MY, Momen B, Galdino G, Manson PN. Breast Reconstruction with the free TRAM or DIEP flap: patient selection, choice of flap, and outcome. *Plast Reconstr Surg* 110: 466-475; discussion 476-7, 2002.

135. Serletti JM. Breast reconstruction with the TRAM flap: pedicled and free. *J Surg Oncol* 94: 532-537, 2006.

136. Selber JC, Nelson J, Fosnot J, Goldstein J, Bergey M, Sonnad SS, Serletti JM. A prospective study comparing the functional impact of SIEA, DIEP, and muscle-sparing free TRAM flaps on the abdominal wall: part I. unilateral reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 126: 1142-1153, 2010.

137. Mizgala CL, Hartrampf CR Jr, Bennett GK. Assessment of the abdominal wall after pedicled TRAM flap surgery: 5- to 7-year follow-up of 150 consecutive patients. *Plast Reconstr Surg* 93: 988-1002; discussion 1003-1004, 1994.

138. Chun YS, Sinha I, Turko A, Yueh JH, Lipsitz S, Pribaz JJ, Lee BT. Comparison of morbidity, functional outcome, and satisfaction following bilateral TRAM versus bilateral DIEP flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 126: 1133-1141, 2010.

139. Zhang F, Lineaweaver WC, Kao S, Tonken H, Degnan K, Newlin L, Buncke HJ. Microvascular transfer of the rectus abdominis muscle and myocutaneous flap in rats. *Microsurgery* 14: 420-423, 1993.

140. Dunn RM, Huff W, Mancoll J. The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg* 31: 352-357, 1993.

141. Hallock GG, Rice DC. Cranial epigastric perforator flap: a rat model of a true perforator flap. *Ann Plast Surg* 50: 393-397, 2003.

142. Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M. Development of a TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg* 94: 1012-7; 1025-6 discussion, 1994.

143. Wong MS, Erdmann D, Sweis R, Pöllmann C, Farrar M, Georgiade GS, Levin LS, Olbrich KC, Klitzman B. Basic fibroblast growth factor expression following surgical

delay of rat transverse rectus abdominis myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 113: 2030-2036, 2004.

144. de Freitas AL, Gomes HC, Lisboa BC, Arias V, Han SW, Ferreira LM. Effect of gene therapy with vascular endothelial growth factor after abdominoplasty on TRAM flap viability in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 125: 1343-1351, 2010.

145. Pollock H, Pollock T. Reducing abdominoplasty complications. *Aesthet Surg J* 22: 475-476, 2002.

146. Morgan TH, *Regeneration*. Macmillan, New York, 1901.

147. Maienschein J. Regenerative medicine's historical roots in regeneration, transplantation, and translation. *Dev Biol* 358: 278-284, 2011.

148. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 177: 452-454, 1956.

149. Mintz B. Formation of genetically mosaic mouse embryos, and early development of 'lethal (T12/T12)-normal' mosaics. *J Exp Zool* 157: 273-292, 1964.

150. Robert JS, Baylis F. Crossing species boundaries. *Am J Bioeth* 3:1-13, 2003.

151. Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest* 115: 5-12, 2005.

152. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197: 452-454, 1963.

153. Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 21: 364-382, 1970.

154. Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3585-3589, 1975.

155. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156, 1981.

156. Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi* 1: 48-56, 2005.

157. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19: 193-204, 2001.

158. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46, 2004.

159. Noguchi H, Kaneto H, Weir GC, Bonner-Weir S. PDX-1 protein containing its own antennapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells. *Diabetes* 52: 1732-1737, 2003.

160. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7999-8004, 2000.
161. Alison M. Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* 10: 710-715, 1998.
162. Wu DC, Boyd AS, Wood KJ. Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. *Front Biosci* 12: 4525-4535, 2007.
163. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 11: 228-232, 2005.
164. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JJ, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295, 2002.
165. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317, 2006.
166. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395, 2005.
167. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20: 530-541, 2002.
168. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116: 1827-1835, 2003.
169. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103: 1669-1675, 2004.
170. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301, 2006.
171. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 3: 705-713, 2003.
172. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-247, 1968.

173. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228, 2001.
174. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5: 362-369, 2003.
175. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206: 229-237, 2006.
176. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109: 656-663, 2004.
177. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110: 349-355, 2004.
178. Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* 17: 279-290, 2006.
179. Çetinkaya DU. Mezenkimal kök hücreler. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar (Kansu E, ed) Türkiye Bilimler Akademisi Raporları. Ankara, Yalçın Matbaacılık, 53-62, 2009.
180. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2: 115-120, 2008.
181. Tomiyama K, Murase N, Stolz DB, Toyokawa H, O'Donnell DR, Smith DM, Dudas JR, Rubin JP, Marra KG. Characterization of transplanted green fluorescent protein+ bone marrow cells into adipose tissue. *Stem Cells* 26: 330-338, 2008.
182. Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic stem cell markers. *Molecules* 17: 6196-6236, 2012.
183. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 37: 97-110, 2004.
184. Pomerantz J, Blau HM. Nuclear reprogramming: a key to stem cell function in regenerative medicine. *Nat Cell Biol* 6: 810-816, 2004.
185. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415: 859, 2002.

186. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90, 2000.
187. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098, 1998.
188. Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436: 641, 2005.
189. Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374, 1998.
190. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813, 1997.
191. Perry AC. Progress in human somatic-cell nuclear transfer. *N Engl J Med* 353: 87-88, 2005.
192. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 82: 252-264, 2007.
193. Mimeault M, Batra SK. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev* 4: 27-49, 2008.
194. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 132: 681-696, 2008.
195. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676, 2006.
196. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
197. Pera MF. Stem cells. A new year and a new era. *Nature* 451: 135-136, 2008.
198. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317, 2007.
199. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997.
200. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103:634-637, 2001.

201. Heintz-Green A, Radke PW, Munkong FM, Frass O, Zhu J, Vincent K, Geddes DM, Alton EW. The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 26: 1327-1332, 2005.
202. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp Physiol* 90: 315-326, 2005.
203. 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* 52: 414-418, 2004.
204. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, Guo S. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 121: 59-69, 2008.
205. 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* 121: 50-58, 2008.
206. 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* 124: 804-815, 2009.
207. Langer R, Vacanti JP, Vacanti CA, Atala A, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineering: biomedical applications. *Tissue Eng* 1: 151-161, 1995.
208. Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102: 471-478, 1988.
209. Caprioli A, Minko K, Drevon C, Eichmann A, Dieterlen-Lièvre F, Jaffredo T. Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects. *Dev Biol* 238:64-78, 2001.
210. Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55: 353-363, 2011.
211. Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 105: 473-485, 1989.
212. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91, 1995.
213. Ribatti D, Nico B, Crivellato E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12: 101-111, 2009.
214. Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8: 235-253, 2009.

215. Dyer MA, Farrington SM, Mohn D, Munday JR, Baron MH. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development* 128: 1717-1730, 2001.
216. Vokes SA, Yatskievych TA, Heimark RL, McMahon J, McMahon AP, Antin PB, Krieg PA. Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development* 131: 4371-4380, 2004.
217. Byrd N, Becker S, Maye P, Narasimhaiah R, St-Jacques B, Zhang X, McMahon J, McMahon A, Grabel L. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development* 129: 361-372, 2002.
218. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 50: 1774-1778, 1990.
219. Aase K, von Euler G, Li X, Pontén A, Thorén P, Cao R, Cao Y, Olofsson B, Gebre-Medhin S, Pekny M, Alitalo K, Betsholtz C, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 104: 358-364, 2001.
220. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 4;86: 29-35, 2000.
221. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5: 74-80, 2004.
222. Tammela T, Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 140: 460-476, 2010.
223. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65: 550-563, 2005.
224. Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi JH, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14389-14394, 1998.
225. LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412: 877-884, 2001.
226. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 4123-4131, 2002.

227. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waine E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, Bates DO. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 64: 7822-7835, 2004.
228. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7: 575-583, 2001.
229. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N.J. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *Biol Chem* 271: 7788-7795, 1996.
230. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 50: 1-15, 2000.
231. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125: 725-732, 1998.
232. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118: 489-498, 1993.
233. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, 1995.
234. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439, 1996.
235. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442, 1996.
236. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70, 1995.
237. Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, Bose D, Zhou Y, Gray MJ, Dallas NA, Fan F, Xia L, Lu J, Ellis LM. Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 15: 6763-6770, 2009.

238. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126: 4895-4902, 1999.
239. Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Skarnes WC, Chédotal A, Tessier-Lavigne M. Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25: 43-56, 2000.
240. Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levengood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M. Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25: 29-41, 2000.
241. Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F, Niwa H, Miyazaki Ji J, Hirota S, Kitamura Y, Kitsukawa T, Fujisawa H, Klagsbrun M, Hori M. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3657-3662, 2002.
242. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 11: 790-811, 2012.
243. Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N, Massagué J. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 12: 2144-2152, 1998.
244. Baird A, Durkin T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type beta-transforming growth factor: interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 138: 476-482, 1986.
245. Fräter-Schröder M, Müller G, Birchmeier W, Böhlen P. Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 295-302, 1986.
246. Iruela-Arispe ML, Sage EH. Endothelial cells exhibiting angiogenesis in vitro proliferate in response to TGF-beta 1. *J Cell Biochem* 52: 414-430, 1993.
247. RayChaudhury A, D'Amore PA. Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta. *J Cell Biochem* 47: 224-229, 1991.
248. Sutton AB, Canfield AE, Schor SL, Grant ME, Schor AM. The response of endothelial cells to TGF beta-1 is dependent upon cell shape, proliferative state and the nature of the substratum. *J Cell Sci* 99: 777-787, 1991.
249. Hofer E, Schweighofer B. Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb Haemost* 97: 355-363, 2007.
250. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121: 1845-1854, 1995.

251. Goumans MJ, Mummery C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44: 253-265, 2000.
252. Larsson J, Goumans MJ, Sjöstrand LJ, van Rooijen MA, Ward D, Levéen P, Xu X, ten Dijke P, Mummery CL, Karlsson S. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *Embo J* 20:1663-1673, 2001.
253. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179: 297-302, 1996.
254. Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73: 751-762, 2008.
255. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161: 1163-1177, 2003.
256. Makanya AN, Hlushchuk R, Djonov VG. Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* 12: 113-123, 2009.
257. Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res* 86: 286-292, 2000.
258. Djonov VG, Kurz H, Burri PH. Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn* 224: 391-402, 2002.
259. Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H. VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans* 37: 1233-1236, 2009.
260. Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, Fairman RM, Velazquez OC, Herlyn M. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 14-25, 2003.
261. Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Bréant C, Duarte A, Eichmann A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3225-3230, 2007.
262. Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev* 18: 2469-2473, 2004.
263. Capparuccia L, Tamagnone L. Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. *J Cell Sci* 122: 1723-1736, 2009.
264. Guttmann-Raviv N, Shraga-Heled N, Varshavsky A, Guimaraes-Sternberg C, Kessler O, Neufeld G. Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J Biol Chem* 282: 26294-26305, 2007.

265. Banu N, Teichman J, Dunlap-Brown M, Villegas G, Tufro A. Semaphorin 3C regulates endothelial cell function by increasing integrin activity. *FASEB J* 20: 2150-2152, 2006.
266. Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, Bréant C, Claes F, De Smet F, Thomas JL, Autiero M, Carmeliet P, Tessier-Lavigne M, Eichmann A. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432: 179-186, 2004.
267. Wilson BD, Ii M, Park KW, Suli A, Sorensen LK, Larrieu-Lahargue F, Urness LD, Suh W, Asai J, Kock GA, Thorne T, Silver M, Thomas KR, Chien CB, Losordo DW, Li DY. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science* 313: 640-644, 2006.
268. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126: 3047-3055, 1999.
269. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60, 1997.
270. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 8: 1897-1909, 1994.
271. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 93: 1074-1081, 2003.
272. Li QF, Reis ED, Zhang WX, Silver L, Fallon JT, Weinberg H. Accelerated flap prefabrication with vascular endothelial growth factor. *J Reconstr Microsurg* 16: 45-49, 2000.
273. Gurunluoglu R, Meirer R, Shafighi M, Huemer GM, Yilmaz B, Piza-Katzer H. Gene therapy with adenovirus-mediated VEGF enhances skin flap prefabrication. *Microsurgery* 25: 433-441, 2005.
274. Haws MJ, Erdman D, Bayati S, Brown RE, Russell RC. Basic fibroblast growth factor induced angiogenesis and prefabricated flap survival. *J Reconstr Microsurg* 17: 39-42; discussion 43-44, 2001.
275. Hickey MJ, Wilson Y, Hurley JV, Morrison WA. Mode of vascularization of control and basic fibroblast growth factor-stimulated prefabricated skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 101: 1296-1304; discussion 1305-1306, 1998.

276. Iwasawa M. Accelerated maturation in prefabricated flaps by transforming growth factor-beta: an experimental study in the rabbit. *Ann Plast Surg* 31: 72-75, 1993.
277. Park S, Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Baharestani S, Kleinman ME, Pelo CR, Levine JP, Gurtner GC. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg* 113: 284-293, 2004.
278. Bayramiçli M. Deneysel Flep Modelleri. *Deri Flepleri. Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri* (Bayramiçli M, ed). İstanbul, Argos, 445-488, 2005.
279. Bayramiçli M. Rektus Abdominis Kas ve Kas-Deri Flepleri. *Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri* (Bayramiçli M, ed). İstanbul, Argos, 512-519, 2005.
280. Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Shimada T, Hyakusok. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 871-877, 2004.
281. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Ann Plast Surg* 65: 237-244, 2010.
282. Ogawa R. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 1: 13-20, 2006.
283. Huger WE Jr. The anatomic rationale for abdominal lipectomy. *Am Surg* 45: 612-617, 1979.
284. Sozer SO, Cronin ED, Biggs TM, Gallegos ML. The use of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap after abdominoplasty. *Ann Plast Surg* 35: 409-411, discussion 411-412, 1995.
285. Hallock GG, Rice DC. Evidence for the efficacy of TRAM flap delay in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 96: 1351-1357, 1995.
286. Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M. Study of the delay phenomenon in the rat TRAM flap model. *Plast Reconstr Surg* 94: 1018-1024; discussion 1025-1026, 1994.
287. Seify H, Bilkay U, Jones G. Improvement of TRAM flap viability using human VEGF-induced angiogenesis: a comparative study of delay techniques. *Plast Reconstr Surg* 112: 1032-1039, 2003.
288. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W, Buncke HJ, Lineaweaver WC. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg* 46: 314-319, 2001.

289. Kawamoto A, Murayama T, Kusano K, Ii M, Tkebuchava T, Shintani S, Iwakura A, Johnson I, von Samson P, Hanley A, Gavin M, Curry C, Silver M, Ma H, Kearney M, Losordo DW. Synergistic effect of bone marrow mobilization and vascular endothelial growth factor-2 gene therapy in myocardial ischemia. *Circulation* 110: 1398-1405, 2004.
290. Forrester JS, Price MJ, Makkar RR. Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. *Circulation* 108: 1139-1145, 2003.
291. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54: 132-141, 2005.
292. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 6: 7-14, 2004.
293. 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* 54: 546-552, 2005.
294. Zan T, Li Q, Dong J, Zheng S, Xie Y, Yu D, Zheng D, Gu B. Transplanted endothelial progenitor cells increase neo-vascularisation of rat pre-fabricated flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63: 474-481, 2010.
295. Yi C, Xia W, Zheng Y, Zhang L, Shu M, Liang J, Han Y, Guo S. Transplantation of endothelial progenitor cells transferred by vascular endothelial growth factor gene for vascular regeneration of ischemic flaps. *J Surg Res* 135: 100-106, 2006.
296. Li H, Zan T, Li Y, Weng R, Yang M, Du Z, Zhong S, Li Q. Transplantation of adipose-derived stem cells promotes formation of prefabricated flap in a rat model. *Tohoku J Exp Med* 222: 131-140, 2010.
297. Restifo RJ, Ahmed SS, Isenberg JS, Thomson JG. Timing, magnitude, and utility of surgical delay in the TRAM flap: I. Animal studies. *Plast Reconstr Surg* 99: 1211-1216, 1997.
298. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res* 31: 158-175, 2010.
299. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 90:II 228-234, 1994.
300. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 93: 662-670, 1994.

301. Hallock GG, Rice DC. Physiologic superiority of the anatomic dominant pedicle of the TRAM flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 96: 111-118, 1995.
302. Boyd JB, Taylor GI, Corlett R. The vascular territories of the superior epigastric and the deep inferior epigastric systems. *Plast Reconstr Surg* 73: 1-16, 1984.
303. Clugston PA, Perry LC, Fisher J, Maxwell GP. A rat transverse rectus abdominis musculocutaneous flap model: effects of pharmacological manipulation. *Ann Plast Surg* 34: 154-161, 1995.
304. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292-1298, 2004.
305. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008 14: 945-953.