



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN RADYOTERAPİ VERİLEN
RATLARDA KOLON ANASTOMOZUNUN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

(DENEYSEL ÇALIŞMA)

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kübra TOPUK

ANKARA - 2023



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN RADYOTERAPİ VERİLEN
RATLARDA KOLON ANASTOMOZUNUN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

(DENEYSEL ÇALIŞMA)

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kübra TOPUK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. H. Onur AYDIN

ANKARA - 2023

TEŞEKKÜRLER

Genel Cerrahi asistanlık eğitimi süresince mesleki bilgi, beceri, tecrübe ve deneyimlerini paylaştığım, başta saygıdeğer hocamız Prof. Dr. Mehmet HABERAL olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Gökhan MORAY, Prof. Dr. Sedat YILDIRIM, Doç. Dr. Cem AYDOĞAN'a, eğitim süresinde bilgi ve tecrübesiyle kılavuz olduğu gibi tez çalışmalarım da katkıları olan danışman hocam Doç. Dr. H. Onur AYDIN'a, Doç. Dr. Murathan ERKENT'e, Doç. Dr. Emre KARAKAYA'ya, Uzm. Dr. Afig GOCAYEV'e, asistanlık eğitimim süresince birlikte çalışma şansına eriştiğim arkadaşlarım Dr. Adem ŞAFAK, Dr. Berna YILDIZ, Dr. Hasan TÜRKOĞLU ve Dr. Samra KAMİLOVA'ya ve bütün genel cerrahi hemşirelerine ve diğer çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin tamamlanmasında desteklerini esirgemeyen Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Cem ÜNAL ve Prof. Dr. Güler YAVAŞ'a, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahisi Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Çağrı UYSAL'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Suna TÜRKOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Eda ÖZTURAN ÖZER'e, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Caner İNCEKAŞ'a, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Pelin BAYIK'a, veteriner hekim Didem ARPACI'ya, Sinem ŞENTÜRK'e, Şevval TARHAN'a, veteriner teknisyen Haydar GÜLER ve Yusuf ÇINAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştirip bugünlere gelmemde büyük katkıları olan anneme, babama ve kardeşlerim Uzm. Dr. Sırmagül TOPUK, Dt. Nisa Sinem ÖZKAN ve fahri kardeşim Uzm. Dr. Buğra ÖZKAN'a sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Kübra TOPUK

ÖZET

Kolorektal kanserler dünya genelinde 3. sıklıkta görülmektedir. Rektum kanseri cerrahisinden önce tedaviye neoadjuvan radyoterapi (nRT) eklenmesinin daha iyi lokal kontrol sağladığı ve hastalıksız sağ kalıma olumlu katkı sağladığı bildirilmiştir.

Kolorektal cerrahi sonrası anastomoz kaçağı riski hastaya ait faktörler ile birlikte tümörün evresi, uygulanan neoadjuvan kemoterapi ve radyoterapi tedavisi, cerrahi teknik ve rekonstrüksiyon tipi gibi çeşitli sebeplerden etkilenmektedir. Radyoterapi uygulanması akut toksisiteye, fibrozise ve yara iyileşmesinde gecikmeye neden olabilmektedir. Bu etkilerine bağlı olarak da anastomoz kaçağı riskini arttırmaktadır ve bu durum artmış morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu nedenden dolayı kaçakların azaltılması ve yönetimine yönelik uzun yıllardan beri bir çok çalışma yapılmaktadır.

Kök hücre, işlevsel olarak farklılaşmamış, yani vücudun herhangi bir organ ya da dokusunda özel bir görev yapabilmek için tam olarak özelleşmemiş, karmaşık bir yapısı olan öncül bir hücredir. Bu öncül hücre bedenin başka hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Erişkin kökenli kök hücreleri insan vücudunda bulunan birçok dokudan elde edilebilmekte ve bu hücreler yara iyileşmesini hızlandırmakta, uygun ortamdaki gerekli hücrelere transformasyon gösterebilmekte ve anastomoz iyileşmesine olumlu katkıda bulunmadır.

Bu çalışmamızda kök hücre tedavisinin anastomoz hattı üzerindeki olumlu etkileri ile radyoterapiye bağlı oluşan negatif etkileri azaltmayı ve anastomoz güvenliğini arttırmayı amaçladık.

Çalışmamızda 55 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Ratlar randomize olarak 12 sıçan bulunan 4 gruba ayrıldı. Grup 1: Kontrol, Grup 2: Radyoterapi, Grup 3: Radyoterapi+lokal kök hücre, Grup 4: Radyoterapi+ lokal+ intraperitoneal kök hücre. 7 adet sıçan kök hücre eldesi için kullanıldı. 4 ana gruptan 2., 3. ve 4. gruba laparotomiden 5 gün önce tek doz radyoterapi uygulandı. Tüm gruplardaki sıçanlar inen kolon tam kat kesildikten sonra anastomoz yapıldı. Anastomoz esnasında 3. gruba lokal subserozal, 4. gruba hem lokal subserozal hem intraperitoneal kök hücre enjeksiyonu yapıldı. Tüm gruplar iki alt gruba ayrıldı, altı tanesi 3. gün, kalanları 7. gün sakrifiye edildi. Tüm gruplarda vücut ağırlık kaybı, barsak patlama basıncı (BPB), doku hidroksiprolin (Hyp) düzeyi ölçümü, Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) düzeyi ölçümü ve histopatolojik değerlendirme yapıldı. İmmunohistokimyasal olarak; çalışma grubunda Dil (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-

tetramethylindocarbocyanine perchlorate) ile işaretli adipoz kökenli kök hücrelerin takibi için floresan mikroskopta inceleme yapıldı.

Deney sonucunda radyoterapi almış olan gruplarda başlangıç kiloları ile ameliyat öncesi kiloları arasında anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0,05$). Araştırma sonucunda, 4 grupta da ameliyat sonrası 3. gün ve 7. günde sakrifiye edilen hayvanlarda başlangıç kilosuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldü ($p<0,05$). Grup 3 ve grup 4 ile grup 2 karşılaştırıldığında kilo kaybında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Grup 2’de BPB ölçümü diğer gruplara göre çok daha düşük gözlemlense de bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Grup 3 ve 4’te ameliyat sonrası 3. günde ölçülen BPB’ları (39 (18-140) ve 33 (20-56)) grup 1 ve 2’de ameliyat sonrası 3. günde ölçülen BPB’larına (23,5 (10-40) ve 18,5 (10-37)) kıyasla yüksek bulunmakla beraber anlamlı bulunmadı. Yine grup 3 ve 4’ün ameliyat sonrası 7. günde ölçülen BPB’ları (181,5 (153-210) ve 181 (154-253)) grup 1 ve 2’de ameliyat sonrası 7. günde ölçülen BPB’larına (157,5 (121-171) ve 125 (14-161)) kıyasla yüksek saptanmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Grup 2’de ameliyat sonrası 7. günde patlama basınçlarının geniş bir aralıkta dağılımının nedeni, bazı sıçanlarda anastomoz hattında iyileşmenin kötü olduğu, anastomozun ayrık olduğu görüldü. Diğer gruplarda 7. günde anastomozda gross olarak ayrışma görülmedi. Grup 1, 2, 3 ve 4 arasında Hyp ve MMP-2 düzeyi kıyaslandığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,608/ p=0,086$). Gruplar arasında histopatolojik değişiklikleri akut ve kronik olarak sınıflandırılıp kıyaslandığında anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($p>0,05$). Grup 3 ve 4 anastomoz hattı immunfloresan mikroskop altında incelendiğinde anastomoz bölgesinde farklılaşmış kök hücrenin varlığı görüldü.

Mezenkimal kök hücre tedavisinin radyoterapi uygulanmış sıçanlarda yapılan kolon anastomozunun iyileşmesine olumlu etkisi olmakta, anastomoz güvenliğini arttırmaktadır. İlerleyen çalışmalarda radyoterapi almış hastalarda yapılan anastomozlarda adipoz doku kaynaklı kök hücre uygulaması uygun bir yöntem olabilir.

Anahtar Kelime: radyoterapi, kök hücre, anastomoz

ABSTRACT

Effects of Mesenchymal Stem Cells on Healing of Colon Anastomosis in Rats Given Radiotherapy

Colorectal cancers are the 3rd most common worldwide. It has been reported that adding neoadjuvant radiotherapy (nRT) to treatment before rectal cancer surgery provides better local control and contributes positively to disease-free survival.

The risk of anastomotic leakage after colorectal surgery is affected by various factors such as the stage of the tumor, the neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy treatment applied, the surgical technique and the type of reconstruction, together with the patient's factors. Radiotherapy may cause acute toxicity, fibrosis and delay in wound healing. Depending on these effects, it increases the risk of anastomotic leakage and this situation causes increased morbidity and mortality. For this reason, many studies have been carried out for many years for the reduction and management of leaks.

A stem cell is a functionally undifferentiated progenitor cell with a complex structure that is not fully specialized to perform a specific task in any organ or tissue of the body. However, this precursor cell has the ability to transform into other cells of the body. Adult stem cells can be obtained from many tissues in the human body and these cells accelerate wound healing, can transform into necessary cells in the appropriate environment and contribute positively to anastomosis healing.

In this study, we aimed to reduce the positive effects of stem cell therapy on the anastomosis line and to reduce the negative effects of radiotherapy and to increase the safety of anastomosis.

In our study, 55 male Wistar Albino rats were used. Rats were randomly divided into 4 groups of 12 rats. Group 1: Control, Group 2: Radiotherapy, Group 3: Radiotherapy + local stem cell, Group 4: Radiotherapy + local + intraperitoneal stem cell. 7 rats were used to obtain stem cells. A single dose of radiotherapy was applied to the 2nd, 3rd and 4th groups of 4 main groups 5 days before the laparotomy. The rats in all groups underwent anastomosis after the descending colon was completely cut. During the anastomosis, local subserosal stem cell injection was applied to the 3rd group, and both local and intraperitoneal stem cell injection to the 4th group. All groups were divided into two subgroups, six were sacrificed on the 3rd day and the rest on the 7th day. Body weight loss, anastomotic burst pressure, tissue hydroxyproline level measurement, MMP-2 level measurement and histopathological

evaluation were performed in all groups. Immunohistochemically; in the study group, fluorescent microscope examination was performed for the follow-up of Dil-marked adipose-derived stem cells.

As a result of the experiment, a significant decrease was observed between the initial weight and preoperative weight in the groups that received radiotherapy. ($p < 0.05$) As a result of the study, a statistically significant decrease was observed in animals sacrificed on the 3rd and 7th postoperative days in all 4 groups compared to the initial weight. ($p < 0.05$) When group 3 and group 4 and group 2 were compared, no statistically significant difference was found in weight loss ($p > 0.05$). Although BPB measurement was observed much lower in Group 2 compared to the other groups, this difference was not statistically significant ($p > 0.05$). The BPBs measured on the 3rd postoperative day in groups 3 and 4 (39 (18-140) and 33 (20-56)) were compared to the BPBs measured on the 3rd postoperative day in groups 1 and 2 (23.5 (10-40) and 18.5 (10-37)) although it was not significant. Again, the BPBs of groups 3 and 4 measured on the 7th postoperative day (181.5 (153-210) and 181 (154-253)) were compared to the BPBs measured on the 7th postoperative day in groups 1 and 2 (157.5 (121-171) and 125 (14-161)), although it was not statistically significant ($p > 0.05$). In Group 2, on the 7th postoperative day, the reason for the wide distribution of burst pressures was that the healing of the anastomotic line was poor in some rats and the anastomosis was split. In the other groups, gross separation of the anastomosis was not observed on the 7th day. When Hyp and MMP-2 levels were compared between groups 1, 2, 3 and 4, no significant difference was found between the groups ($p = 0.608$ / $p = 0.086$). When the histopathological changes between the groups were classified as acute and chronic and compared, no significant difference was observed ($p > 0.05$). When group 3 and 4 anastomosis lines were examined under an immunofluorescent microscope, the presence of differentiated stem cells was observed in the anastomosis area.

Mesenchymal stem cell therapy has a positive effect on the healing of colon anastomosis in rats that have received radiotherapy and increases anastomosis safety. In future studies, adipose tissue-derived stem cell application may be an appropriate method in anastomoses performed in patients who have received radiotherapy.

Keywords: radiotherapy, stem cell, anastomosis

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
TABLO DİZİNİ.....	ix
ŞEKİL DİZİNİ.....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Kolonun Anatomisi ve Histolojisi.....	2
2.1.1 Kolon anatomisi.....	2
2.1.2 Ratlarda kolon anatomisi.....	4
2.1.3 Kolon histolojisi.....	4
2.2 Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi ve Kolon Anastomozu.....	5
2.2.1 Yara iyileşmesi.....	5
2.2.2 Gastrointestinal sistemde yara iyileşmesi.....	6
2.2.3 Anastomoz iyileşmesini etkileyen faktörler.....	7
2.2.4 Anastomoz iyileşmesinin değerlendirilmesi.....	8
2.3 Radyoterapi.....	9
2.3.1 Hücre üzerinde biyolojik etkileri.....	10
2.3.2 Dokular üzerindeki etkisi.....	10
2.3.3 Neoadjuvan radyoterapi.....	11
2.4 Kök Hücre.....	12
2.4.1 Mezenkimal kök hücreler.....	12
2.4.2 Kök hücre kaynağı olarak adipoz doku.....	13
2.4.3 Kök hücrelerin dokularda takibi.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	13
3.1 Gruplar.....	14
3.2 Anestezi.....	15
3.3 Radyoterapi.....	15

3.4 Cerrahi İşlem.....	16
3.5 Adipoz Doku Temini.....	17
3.6 Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması.....	18
3.7 Kök Hücrelerin İncelenmesi.....	19
3.8 Patlama Basıncı Ölçümü.....	19
3.9 Biyokimyasal Değerlendirme.....	20
3.9.1 Doku hidroksiprolin analizi.....	20
3.9.2 Doku Matriks Metalloproteinaz-2 analizleri.....	21
3.10 Histopatolojik İnceleme.....	21
3.11 İstatistiksel Analiz.....	22
4. BULGULAR.....	22
4.1 Fiziksel Değerlendirme.....	22
4.2 Biyokimyasal Değerlendirme.....	25
4.3 Histopatolojik Değerlendirme.....	26
4.4 Dil ile İşaretlenmiş Kök Hücrelerin Görüntülenmesi.....	27
5. TARTIŞMA.....	28
6. SONUÇ	31
7. KAYNAKLAR.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

nRT:neoadjuvan radyoterapi

TGF β : doku büyüme faktörü β

VEGF: vasküler endotelyal büyüme faktörü

TNF- α : tümör nekroz faktör alfa

IFN- γ : interferon gama

IL-1: interlökin-1

IL-8: interlökin-8

SMA: süperior mezenterik arter

IMA: inferior mezenterik arter

PGE2: Prostaglandin E2

PGI2: Prostaglandin I2

PDGF: platelet kaynaklı büyüme faktörü

VEGF:vasküler endotelyal büyüme faktörü

EGF: endotel kaynaklı büyüme faktörü

β FGF:beta fibroblast büyüme faktörü

CCL-2:kemokin ligand 2

NSAİ: non-steroid antiinflamatuvar

MMP: Matrix metalloproteinaz

Hyp: Hidroksiprolin

NO: nitrik oksit

MPO: myeloperoksidaz

Gy: Gray

CFSE:diasetat süksinimidil ester

DiI:1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate

GFP:yeşil floresan protein

PBS: fosfat tamponlu salin

FBS: fetal bovin serumu

PB/BPB: patlama basıncı/barsak patlama basıncı

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.....	21
Tablo 2.....	23
Tablo 3.....	23
Tablo 4.....	24
Tablo 5.....	25
Tablo 6.....	26

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.....	2
Şekil 2.....	3
Şekil 3.....	4
Şekil 4.....	4



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.....	15
Resim 2.....	15
Resim 3.....	16
Resim 4.....	16
Resim 5.....	17
Resim 6.....	18
Resim 7.....	18
Resim 8.....	19
Resim 9.....	19
Resim 10.....	26
Resim 11.....	27



1. GİRİŞ

Kolorektal kanserler dünya genelinde 3. sıklıkla görülmektedir. Ülkemizde Türkiye İstatistik Kurumu 2020 yılı verilerine göre % 9 ile en sık görülen üçüncü kanser türüdür. Kolorektal kanserlerin biyolojik yapısı kolondaki yerleşim yerine göre farklılık gösterebilir [1]. Rektum tümörlerinin kolon tümörlerine göre daha sık lenf nodu metastazı yapması ve rektum cerrahisi sonrası anastomoz kaçağı gibi komplikasyonların daha sık görülmesi nedeniyle kolon ve rektum kanserlerinin iki ayrı grupta incelenmesi önerilmektedir [2, 3]. Rektum tümörlerinin cerrahi tedavisi öncesinde neoadjuvant radyoterapi (nRT) uygulanmasının daha iyi lokal kontrol sağladığı ve hastalısız sağ kalıma olumlu katkı sağladığı bilinmektedir [4].

Kolorektal cerrahi sonrası anastomoz kaçağı riskini yaş, cinsiyet, obezite, hipertansiyon, diabetes mellitus, koroner arter hastalığı ve kronik obstruktif akciğer hastalığı gibi hastaya ait faktörler etkilemektedir. Bunula beraber tümörün evresi, uygulanan neoadjuvant tedavi, cerrahi teknik ve rekonstrüksiyon tipi gibi diğer çeşitli sebepler anastomoz kaçak riskini arttırmaktadır. Literatürde kolorektal cerrahi sonrası anastomoz kaçağı %2.4 ile %20.6 arası bildirilmekteyken, neoadjuvan kemoradyoterapi uygulaması ile bu oran %69'a kadar yükselmektedir [5]. Anastomoz kaçağına bağlı morbidite ve mortalite ise sırasıyla %20- %30, %7-%12 arasında bildirilmektedir [6].

Ameliyat öncesinde kısa dönem radyoterapinin uygulanması %26'ya varan akut toksisiteye neden olmakta ve bu durum çoğunlukla düşük dereceli toksisite olup sadece minör şikayetlere neden olmaktadır [7, 8]. Radyoterapi uygulaması sonrası salınan doku büyüme faktörü beta (TGF β), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) ve proinflamatuvar sitokinlerden interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-8 (IL-8) gibi proinflamatuvar sitokinler radyoterapi sonrası kontrolsüz fibrozise yol açarak yara iyileşmesinde bozulmaya yol açmaktadır [9, 10].

Kendi kendini yenileyebilen kan hücrelerinin varlığı ilk kez 1950'li yıllarda gösterilmiştir ve kök hücrenin tanımı 1961 yılında yapılmıştır [10]. Kök hücre, işlevsel olarak farklılaşmamış, yani vücudun herhangi bir organ ya da dokusunda özel bir görev yapabilmek için tam olarak özelleşmemiş, karmaşık bir yapısı olan öncül bir hücredir. Bununla birlikte bu öncül hücre bedenin başka hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Kök hücreleri, kabaca embriyolojik kaynaklı veya erişkin insan bedeninden elde edilen türler olarak iki temel kısımda incelenir. Erişkin kökenli kök hücreleri insan vücudunda bulunan birçok dokudan elde edilebilmektedir ve yara iyileşmesini hızlandırmak, uygun ortamdaki

gerekli hücrelere transformasyon göstermek ve anastomoz iyileşmesine olumlu katkıda bulunmak gibi birçok özelliğe sahiptirler [11, 12].

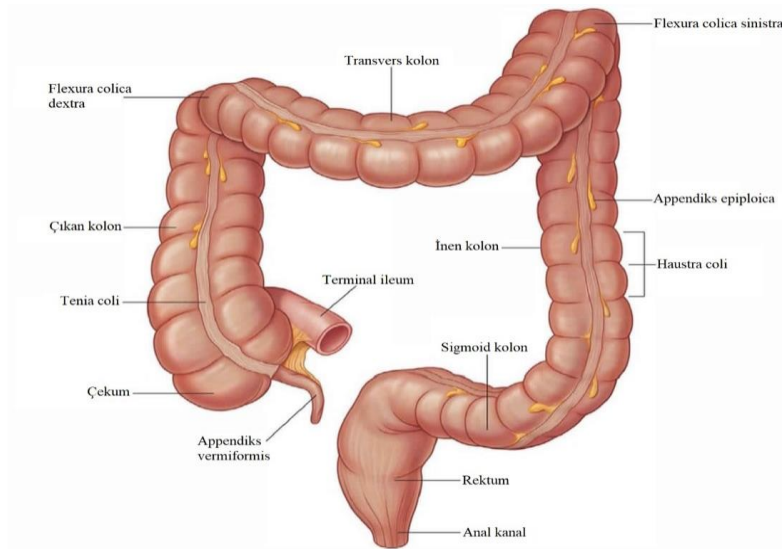
Rektum kanseri tedavisinde kullanılan neoadjuvan radyoterapinin hastalıksız sağkalımı arttırdığı ve lokal rekürrensi azalttığı bilinmektedir. Radyoterapi akut toksisite, fibrozis ve yara iyileşmesinde gecikmeye neden olabilmektedir. Bu etkilerine bağlı olarak anastomoz kaçağı riskini arttırmaktadır. Bu çalışmamızda kök hücre tedavisinin anastomoz hattı üzerindeki olumlu etkileri ile radyoterapiye bağlı oluşan negatif etkileri azaltmayı ve anastomoz güvenliğini arttırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kolon Anatomisi ve Histolojisi

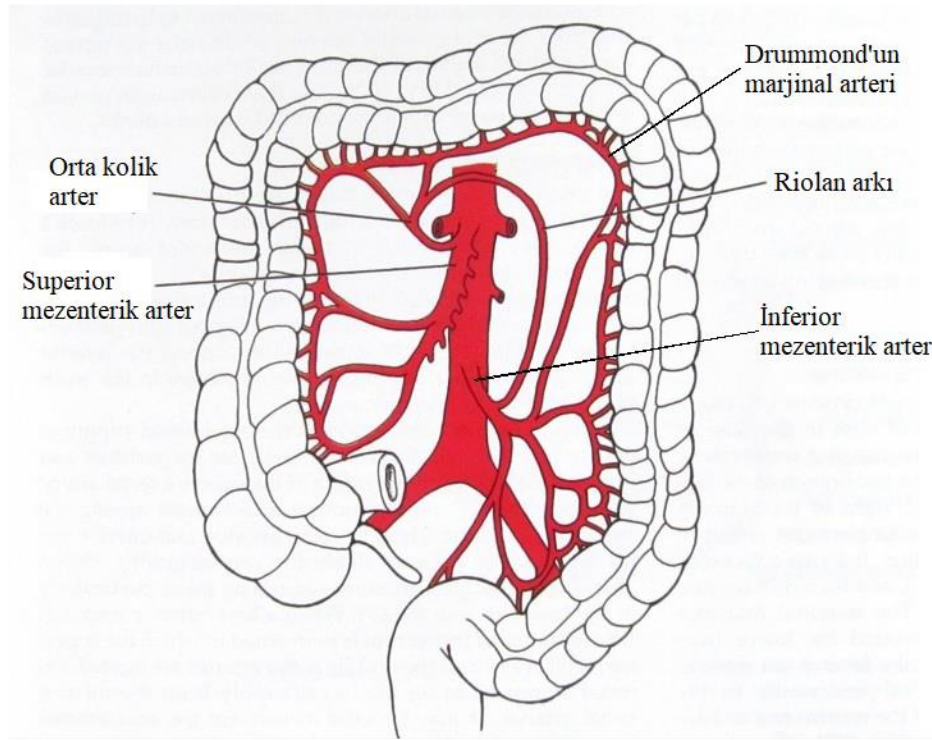
2.1.1 Kolon anatomisi

İleumun bitiminden anüse kadar uzanan kısım kolon olarak adlandırılır ve ortalama erişkin bir insanda 120- 200 cm uzunluğundadır. Kolon, gastrointestinal sistemin yaklaşık %20' lik kısmını oluşturmaktadır. Makroskopik olarak kolon, incebarsaklardan haustra coli, apendiks epiploica ve longitudinal kas liflerinin birleşmesiyle oluşan tenia coli'ler ile ayrılır. Kalın barsak çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon, sigmoid kolon ve rektumdan oluşur [13, 14] (Şekil- 1).



Şekil 1. Kolon Anatomisi

Terminal ileumun ileoçekal valv ile bağlandığı çekum, kolonun ilk parçasıdır, uzunluğu 6 cm, genişliği 7.5 cm'dir. İnferiorunda apendiks vermiformis yer alır, teniaların başlangıcı buradır. Süperiorundan itibaren çıkan kolon olarak devam eder ve hepatik flexurada transvers kolon başlar, 15- 20 cm uzunluktadır. Transvers kolon splenik flexuraya kadar devam eder, 35- 50 cm uzunluğunda kolonun en uzun ve en mobil kısmıdır. Sol iliak fossaya kadar 20-30 cm'lik kısım inen kolon olarak adlandırılır ve pelvik girime yakın 'S' harfi oluşturan sigmoid kolon ile devam eder, üçüncü sakral vertebra hizasında rektum başlar, ortalama uzunluğu 30 cm'dir. Anal kanala kadar olan kısım rektumdur, 12-15 cm'lik kısımdır, 2/3'ü anteriordan peritonla örtülüdür, kolonun diğer kısımları gibi haustra, epiploik çıkıntı ve tenia bulunmamaktadır [15, 16].

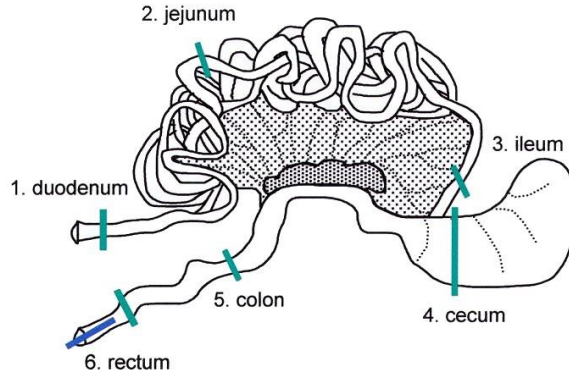


Şekil 2. Kolonun Arteriyel Beslenmesi

Kolonun arteriyel beslenmesi süperior mezenterik arter (SMA) ve inferior mezenterik arterden (İMA) sağlanır. Splenik flexuraya kadar olan bölge SMA'nın dalı olan sırayla ileokolik arter, sağ kolik arter, orta kolik arter tarafından kanlanır. Splenik flexura distalinden itibaren İMA'nın dalı olan sol kolik arter, sigmoid arter ve süperior rektal arter tarafından beslenir. Rektumun distal 2/3'ü ve anal kanal kanlanması internal iliak arterin orta rektal arter, pudental arterin inferior rektal arter dalı ve aorttan direk köken alan orta sakral arter tarafından sağlanır. Sol kolik arter % 14 oranında splenik flexura düzeyinde

Drummod'un marjinal arteri ile birleşmektedir, bu ark kolonun mezenter sınır boyunca paralel olarak uzanır. Ayrıca İMA'nın dalı olan sol kolik arter ile SMA'nın dalı olan orta kolik arter arasında mezenter köke yakın %7 oranında Riolan arkı ile bağlantı mevcuttur [17-19] (Şekil- 2). Kolonun venleri de arteriyel dallara paralel olarak seyredip aynı isimlere sahiptir.

2.1.2 Ratlarda kolon anatomisi

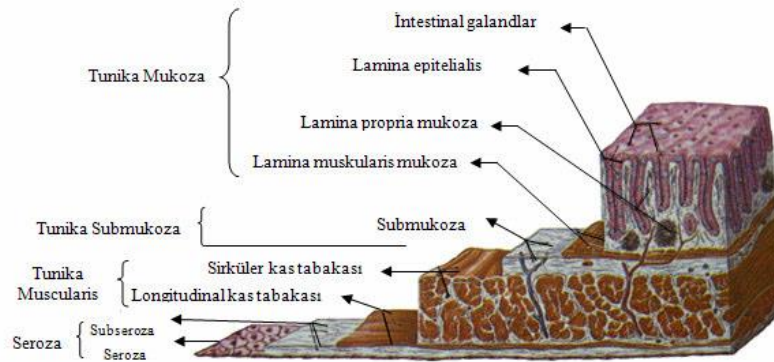


Şekil 3. Ratlarda intestinal sistem anatomisi

Ratlarda ince barsaklardan sonra büyük bir çekum bulunmaktadır. Çekumun ardından kolon ve rektum gelmektedir. Kolon; çıkan kolon, transvers kolon ve inen kolon olmak üzere üç bölümden oluşur. Mukozal katlantılar çıkan kolonda oblik, transvers kolon ve inen kolonda longitudinal uzanım göstermektedir. Kolonun distalinde pelvik kanal içine yerleşmiş olan rektum bulunmaktadır [20] (Şekil- 3).

2.1.3 Kolon histolojisi

Histopatolojik olarak kolon içten dışa tunika mukoza, tunika submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza tabakarından oluşmaktadır (Şekil- 4).



Şekil 4. Kolonun histolojik katmanları

Tunika mukoza intestinal glandlar, lamina epitelialis, lamina propria ve lamina muskularisten oluşmaktadır, yüzeyi basit kolumnar veya küboidal epitel ile örtülüdür. Epitelyal hücreler arasında T hücreleri bulunmaktadır, lamina propriada ise fibroblast, damar, sinir, düz kas hücreleri ve inflamatuvar hücreler (lenfositler, plazma hücreleri, mast hücreleri vs.) bulunmaktadır.

Tunika submukozada bulunan Meissner ve derin submukozal plexusu kolonun peristaltizminden sorumludur. Ayrıca arteriyoller, venüller ve lenfatik kanallar bu tabakada bulunur.

Tunika muskularis içte sirküler, dışta longitudinal kas lifleri ve Auerbach pleksusundan oluşmaktadır.

Tunika seroza visseral peritondur, çekum, transvers kolon, sigmoid kolonu tam olarak sarar(intraperitoneal) [21].

2.2 Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi ve Kolon Anastomozu

2.2.1 Yara iyileşmesi

Yara, canlı dokunun yapısal bütünlüğü ve işlevsel özelliğinin bozulmasıdır. Yara iyileşmesi, yaranın oluşması anında başlayan bir takım hücresel ve biyokimyasal olaylar zinciridir. Başlıca 3 evreden oluşur

- Hemostaz ve inflamasyon (1-4gün)
- Proliferasyon (4-7gün)
- Maturasyon ve remodelling (7-21gün ve sonrası)

Travma hücresel yapıyı bozar ve kanamaya neden olur, hemostaz sürecinde salınan katekolaminler sayesinde vazokonstriksiyon gerçekleşir, trombosit endotel altı kollojen ile teması sonrası koagülasyon kaskadı aktivasyonu başlar, trombin, fibronektin, trombosit- α granüllerinden sitokinler ve büyüme faktörlerinin salınımıyla fibrinojen fibrine dönüşmesi ile sonuçlanır.

Hemostaz sağlandıktan sonra endotel ve mast hücrelerinden PGE2, PGI2, VEGF salgılanır. Vasküler permeabilite artar ve vazodilatasyon gerçekleşir. IL-1, TNF- α , TNF- β gibi kemotaktik sitokinler lökositlerin yara yerine gelmesini sağlar. 24 saatin sonunda olay yerindeki dominant hücre makrofajlar olmaktadır, bu sayede fagositoz, yara debridmanı,

fibroblastların proliferasyonu, matrix sentezinin hızlanması ve anjiyogenez gerçekleşir [22, 23].

Proliferasyon fazında trombosit ve makrofajlardan salınan sitokinler ve başta PDGF ile EGF olmak üzere salınan tüm büyüme faktörleri etkisiyle çevre dokudan fibroblast ve endotel hücresi gelişmeye başlar. Fibroblastik aktivite TGF- β ve IL-1 ile indüklenmektedir. Yara matrixinde temel madde kollojendir. Yara iyileşmesinde en önemli tip 1 ve tip 3 kollojendir. Tip 1 kollojen deri extraselüler matrixin temel birleşenidir, tip 3 ise onarım sürecinde etkindir. Kollojen hidroksiprolin ve hidroksilizinin hidroksilasyonu sonucu gelişir ve deneysel çalışmalarda yara iyileşmesi ve kollojen sentez durumunun değerlendirilmesi, hidroksiprolinin in vitro koşullarda ölçümü ile sağlanır [24].

Maturasyon ve remodelling fazı, fibroblastik evrede başlar, bu evrede kollojen yapım ve yıkımı denge içindedir. Bu dengede baş rol oynayan kollojen yıkımını sağlayan MMP'dır. Bu evrede kollojen miktarı aynı kalmasına karşın doku sağlamlığının artması birkaç ay daha devam eder. Remodelling fazı 1 yıla kadar uzayabilir. Oluşan bu yeni doku avasküler, aselüler skar dokusudur, hiçbir zaman yaralanmamış doku kadar sağlam değildir [25].

2.2.2 Gastrointestinal sistemde yara iyileşmesi

Gastrointestinal sistemde oluşan tam kat defektlerde yara iyileşmesi olabilmesi için dokuların cerrahi olarak biraraya getirilmesi gerekir. Yeterli iyileşme sağlanamadığı durumlarda intestinal kaçak ve fistül gelişerek yüksek mortalite ve morbiditeye sebep olabilmektedir. İyileşmenin kontrolsüz olduğu durumlarda ise anastomozda darlık, striktür, obstrüksiyon olabilmektedir [14].

Barsak anastomozlarında oluşan gerilme kuvveti cilt yaralanması sonrası oluşan gerilme kuvvetinden daha hızlı oluşmaktadır. Bunun başlıca sebebi, kollajen sentezinde fibroblastların yanı sıra düz kas hücrelerinin de etkili olmasıdır.

Gastrointestinal sistemde doku iyileşmeleri normal yara iyileşmesi evrelerine benzer olmakla birlikte bazı farklılıklar taşımaktadır. Anastomozun ilk 72. saatinde inflamasyon ve ödem mevcuttur. Mukozal bileşen, yara granülasyon dokusunu çevreleyen, epitelyal hücrelerin migrasyonu ve hiperplazisi ile onarılır. 24-48 saatler arası invajine olan mukoza ve submukozada yaygın inflamatuvar süreç gelişmiş olur ve bu kısım nekroze olarak lümene

düşer. Eğer cerrahi olarak barsaklar uç uca getirilmişse 72. saatte mukozal defekt kapatılarak intestinal içeriğe karşı bariyer oluşturulmuş olur. Mukozal eversiyon veya inversiyon bu süreci geciktirebilir [26, 27].

Barsak anastomozlarında anastomozun sağlamlığını sağlayan, süturleri tutan ve barsak uçlarının birarada durmasını sağlayan esas tabaka submukozadır. Ağırlıklı olarak %68 oranında tip 1, %20 oranında tip 3 ve %12 oranında tip 5 kollojen bulunmaktadır.

Anastomoz yapımından 72 saat sonra dokudaki granülasyon dokusu oldukça yoğun haldedir ve 3-5. gün kollajenolitik aktivite başlar. Kollojen yapım ve yıkım arasındaki denge anastomoz sağlamlığını belirler. Anastomozda kaçak riski bu dönemde en fazladır ve submukozanın dikişlerin oluşturduğu gerilim kuvvetine dayanabilmesine bağlıdır. Anastomoz sonrası 5. günde anastomoz sağlamlığı hızla artmaya başlar. 7. günde normal gerilim kuvvetinin %50'sine, 10. günde %100'üne ulaşır. Remodelling aşaması 180 güne kadar uzayabilir [28, 29].

2.2.3 Anastomoz iyileşmesini etkileyen faktörler

Anastomoz iyileşme süresini olumlu veya olumsuz etkileyen faktörler lokal ve sistemik olarak 2 grupta inceleyebiliriz.

Lokal faktörler; anastomoz esnasında kullanılan barsak klempleri sıklığı, barsakların uzun süre klempli kalması, kanama kontrolü için koterizasyonun fazla kullanılması, anastomozda kullanılan süturun aşırı sıkı ve sık aralıklarla atılması, anastomoz yapılacak segmentin fazla diseksiyon sonrası devaskülarizasyonu sonucu oluşan iskemi yara iyileşmesini bozabilir. Anastomoz yapılacak iki ucun serbestlenmemesi nedeniyle oluşan gerginlik mekanik olarak ve kanlanmanın bozulmasını sağlayarak kaçak riskini artırır [30]. Radyoterapi uygulanması, proinflatuar ve profibrotik sitokinleri aktive ederek endarteritis obliterans (arteriyol ve küçük arterlerin intimasında kalınlaşma yaratarak tıkanması) ve kök hücre hasarı gibi durumlar oluşturarak zayıf oksijenizasyona yol açar, vasküler atrofinin sonucu olarak kollojen birikimi ile skar oluşturarak iyileşen dokuda striktür formasyonu gözlenir. Lokal enfeksiyonlar, cerrahi esnasında sterilizasyona dikkat edilmemesi, drenaj kateterine sekonder retrograd enfeksiyonlar, intraperitoneal sepsis anastomozu olumsuz etkileyen faktörler içindedir [31].

Jibon ve ark [32], sıçanlarda yaptığı deneysel çalışmada, kolon anastomozlarında devamlı dikiş kullanımının, tek tek dikiş tekniği kullanılmasına oranla daha yüksek anastomoz komplikasyonuna yol açtığı ve kollajen yıkında artış olduğu görülmüştür.

Acil cerrahi girişimlerde hipovolemi, hipoksi, peritoneal sepsisin daha sık görülmesi nedeniyle postoperatif mortalite ve morbidite elektif cerrahi girişimlere göre daha yüksek seyretmektedir. Yaşlı hastalarda iyileşme mekanizmalarında yavaşlık nedeniyle anastomoz kaçağı oranı yüksektir [33].

Beslenme yetersizliği, malnütrisyon, vitamin, mineral ve protein eksiklikleri, kronik alkol kullanımı anastomoz kaçak riskini artırır. Bu hastalarda erken dönemde enteral beslenmenin başlaması, bu süreye kadar parenteral beslenme ile hastanın desteklenmesi önerilmektedir [34]. Sistemik hastalıklar, organ yetmezlikleri, sigara kullanımı, immun sistem yetmezlikleri, kullanılan NSAİ ve steroidler yara iyileşmesini bozmaktadır [14].

2.2.4 Anastomoz iyileşmesinin değerlendirilmesi

Anastomoz iyileşmesinin değerlendirilmesinde mekanik, biyokimyasal ve histolojik yöntemler kullanılabilir.

i. Mekanik yöntemler

i.i. Anastomoz patlama basıncı: Anastomoz yapılan barsak segmentinde sıvı veya gaz distansiyonu ile oluşan intralüminal basınca barsak duvarının karşı koyabileceği maksimum basınç değeridir. Anastomoz sonrası 3-5. günler en düşük değerde olup 7. günlerde normal değerine ulaşmaktadır [35].

i.ii. Anastomoz kopma direnci: Anastomoz yapılan segmentin longitudinal kesilerek her iki ucundan zıt yönlerde kuvvetle çekilmesi sonucu anastomozun kopmadan maksimum dayanabildiği değerdir. Patlama basıncından daha yavaş olarak geri kazanıldığı için yara iyileşmesinin geç dönem belirticidir. Bu yöntem, uygulanan kuvvetin tüm duvara eşit dağıtılmasının mümkün olmayacağı varsayılarak birçok araştırmacı tarafından eleştirilmiş ve güvenilir kabul edilmemiştir [36, 37].

ii. Biyokimyasal Yöntemler

Anastomoz iyileşmesinin göstergesi olarak kollajen miktarının belirlenmesi kullanılmaktadır. Doku kollajen miktarı hidroksiprolin (Hyp) düzeyi ölçümü ile

saptanır. Ayrıca NO, MPO, TNF- α , VEGF değerleri ile de yara iyileşmesinin durumu ve inflamasyon hakkında bilgi sahibi olunabilir [27].

iii. Histopatolojik Yöntemler

Anastomoz yapılan segment ışık mikroskobu altında incelenerek vaskülarizasyon, fibrozis, inflamasyon, nekroz ve epitelizasyonun duruma göre kalitatif olarak değerlendirilir. Nekroz ve inflamasyonun az olması, vaskülarizasyonun ve kollojen miktarının fazla olması, reepitelizasyonun ileri düzeyde olması anastomoz iyileşmesinin iyi olduğunu göstermektedir [27]. Elektron mikroskobuyla kollajen lif diziliş şekilleri ve normali göre oluşan farklılaşmalar gözlemlenebilir.

2.3 Radyoterapi

1895 yılında X ışınlarının Wilhelm Conrad Roentgen tarafından bulunmasının ardından 1898 yılında Marie ve Pierre Curie radyumu keşfetmişlerdir. İyonizan radyasyonun hücreler üzerinde etkisi bulunması üzerine 1899 yılında ilk defa kanserli bir hastada radyoterapiye bağlı kür bildirilmiştir [38]. 1951 yılında radyoaktif kobalt (Co-60) ile tedavi dönemi başlamış ve yüksek enerjili (megavoltaj) ışın üreten lineer akselatörler geliştirilmiş. Bu sayede batin ve toraks içi derin dokulardaki malignitede başarı sağlanmıştır [39].

İyonizan radyasyon, dokular tarafından absorbe edildiğinde atomlardan elektronlar ayrılarak iyonizasyona neden olan radyasyon olup, iki gruba ayrılır. İlki, elektromanyetik dalgalar denilen α ve γ gibi foton denilen enerji yığınlarından meydana gelir. Partiküler radyasyon ise elektronlar, beta partikülleri, pozitronlar, alfa tanecikleri, nötronlar ve yüksek enerjili ağır iyonlardır.

Radyoterapi external radyoterapi ve brakiterapi olarak iki şekilde uygulama yöntemi mevcut. External radyoterapide hasta ile cihaz arasında birkaç cm ile metre arasında değişen aralık mevcuttur. Brakiterapide ise radyasyon kaynağı tel, iğne, plak şeklinde direk dokunun içine veya intrakaviter olarak yerleştirilir. Brakiterapinin avantajı komşu normal dokulara fazla zarar vermeden tümör dokusuna daha kısa zamanda daha yüksek doz radyasyon verilebilmesidir.

İyonize radyasyon birimi Gray'dir. Bir Gray (Gy) dokunun birim ünitesi tarafından absorbe edilen enerji miktarıdır. 1 Gy=100 cGy (centigray), 1 cGy=1 rad'dır [40].

2.3.1 Radyasyonun hücre üzerinde biyolojik etkileri

Radyasyon bir moleküle isabet ettiğinde, molekülün dış yüzeyindeki elektronları ayırarak molekülü iyonlaştırır. Yüksek dozda ise DNA üzerinde onarılması mümkün olmayan kırıklar oluşturup hücre ölümüne yol açar. Letal dozun altında ise hücre bölünmesi duraklar. Doz düşükse bir süre sonra bölünme tekrar başlar. Doz arttıkça bölünmeye başlama zamanı uzar, mitoz sayısı azalır, anormal mitoz şekilleri ve dejenere hücreler ortaya çıkmaya başlar, gen mutasyonları oluşur [40].

Radyasyon hücreleri iki şekilde etkiler, ilki hücredeki su moleküllerinin iyonizasyonu ile serbest radikallerin ortaya çıkması sonucu oluşan hidrojen peroksitin DNA zincirinde yol açtığı parçalanmadır. İkincisi, iyonizan partiküller direk DNA molekülüne çarparak kopmalar meydana getirmesidir. Radyasyonun etkisi hücre siklus fazına göre değişkenlik gösterir, mitoz (M) ve ikinci dinlenme fazı (G2) radyosensitif iken, birinci dinlenme (G1) ve sentez (S) fazı radyorezistandır [41].

2.3.2 Radyasyonun dokular üzerindeki etkisi

Radyasyonun dokularda ilk aşamada endarterit ve fibröz doku reaksiyonu oluşturan hücre ölümü ile subletal hücre hasar sonrası hipovasküler-hiposelüler-hipoksik doku kompleksi oluşturur. Endotelde hasara yol açan kapiller ve arteriollerde oluşan fibrin trombüsler radyasyon hasarının temelinde yatan patolojidir [42].

Radyoterapinin dokular üzerindeki etkileri erken ve geç dönem olarak ikiye ayrılır. Erken dönem etkileri gastrointestinal sistem mukoza, kemik iliği, testis germinatif hücreler gibi hızlı çoğalan dokularda proliferasyona olumsuz etkileridir. Uygulama sonrası saatler veya günler içinde ortaya çıkar.

Geç dönem etkileri ise 6 ay ile 6 yıllık dönemde ortaya çıkar ve ilerleyicidir. 3 grupta incelenebilir; epitelyal ve parankimal değişiklikler (atrofi, iskemik nekroz, metaplazi, atipi, displazi, neoplazi), stromal değişiklikler (fibrozis, atipik fibroblast, fibrinöz eksuda, nekroz) ve vasküler değişikliklerdir. Kapiller ve sinüzoidlerin esasını endotel oluşturduğu için en radyosensitif yapıdır.

Radyasyona maruz kalan dokularda yapılan cerrahi işlemler sonrası yara iyileşmesi komplikasyonlarına sık rastlanabilir. Radyasyon, intestinal mikrosirkülasyonu bozarak anastomoz kaçak oranının artışına neden olmaktadır.

Pelvik radyoterapi sonrası gelişebilecek komplikasyonlar; proktit, rektal ülser, striktür, rektovajinal fistül, fibrozis, kolit, ileit, ileal obstrüksiyon, sistit, üretra striktürü, vulvittir.

İdeal radyoterapi uygulaması, en az komplikasyona neden olacak en etkin dozun belirlenmesi ile sağlanır. Toplam dozun fraksiyone verilmesi, cilt ve mukozalarda kompensatuvar proliferasyona yol açacağı için daha az komplikasyona neden olmaktadır ancak yüksek ancak geniş aralıklı fraksiyonla verilen radyoterapide, önemli akut etki görülmeksizin ciddi geç komplikasyonlar çıkabilir. Radyoterapi ameliyat öncesi, ameliyat esnasında veya ameliyat sonrası uygulanabilir. Diyabet, hipertansiyon, geçirilmiş özellikle alt batin cerrahisi radyasyon hasarını artırır [43].

2.3.3 Neoadjuvan radyoterapi

Neoadjuvan radyoterapi uygulamasındaki amaç; cerrahi rezeksiyon sınırlarında subklinik seyreden hastalığı ortadan kaldırmak ve lokal nüksü önlemek, operasyon esnasında canlı tümör hücrelerini azaltarak implantasyon olasılığı azaltmak, operasyon alanı dışında lenf nodu metastazlarını ortadan kaldırmak, tümörde canlı hücre sayısını azaltarak uzak organ metastazlarını engellemek, tümör rezektabilitesini arttırmak ve hastalıksız sağkalımı uzatmaktır [44, 45].

Ameliyat esnasında tümör hücrelerinin pelvis dışına mekanik yayılması sonucu radyasyon uygulanan alanının dışında tümör hücrelerinin kalması, cerrahi sonrası dokuların hipoksik olması nedeniyle radyorezistans hale gelmesi postoperatif radyoterapi uygulanmasının dezavantajlarını oluşturmaktadır [42].

Neoadjuvan radyoterapideki en büyük dezavantaj, doku iyileşmesindeki problemdir.

Radyasyon enteriti, pelvis veya rektuma yapılan radyasyon sırası veya sonrasında meydana gelen ince veya kalın barsağın fonksiyonel bozukluğudur, abdominal ve pelvik radyoterapinin en korkulan komplikasyonlarından [46]. Fistül, striktür, malabsorbsiyonla sonuçlanan barsak hasarları ciddi anlamda hayatı tehdit eden komplikasyonlardır ve hastanın hayat kalitesini bozar. Radyoterapinin, kemoterapi ile kombine kullanımında enterit insidansına artma gözlenir [47].

Kalın ve ince barsak mukozası iyonize radyasyona duyarlıdır, komplikasyonlar 800-1000cGy arası ortaya çıkar [48]. İlk doz ile 8 hafta arası akut olarak değerlendirilir, bulantı, kusma, abdominal kramp, tenesmus ve sulu diyare şikayetleri olur, zamanla malabsorbsiyon gelişir. Kronik radyasyon enteriti tedavi tamamlanmasından aylar yıllar sonra başlayabilir,

kesilmesinden sonra da devam edebilir. Radyasyon enteritinde tedavi fistül, obstrüksiyon, perforasyon gibi cerrahi müdahale gerektirecek komplikasyonlar gelişmemişse medikal yaklaşım ön plandadır.

2.4 Kök Hücre

Kök hücreler mitoz bölünmeyle çoğalıp kendini yenileyebilen ve farklı doku tiplerine farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Kök hücreler farklılaşma kapasitesine göre sınıflandırılır. Embriyonik dönemde ilk günlerde oluşan 4-8 hücreli zigot tek başına tüm organizmayı oluşturabilecek potansiyeli mevcut olup totipotent hücre olarak adlandırılır. Totipotent hücreler 2-3 bölünme sonrası blastosite dönüşür, pluripotent hücre diye isimlendirilen bu hücreler tüm hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip olup organizma oluşturamaz. Multipotent hücre erişkin dokularda bulunup tüm hücre çeşitlerine farklılaşamaz, özelleşmişlerdir.

Erişkin kök hücreler; osteosit, adiposit, miyosit hücrelerini oluşturan mezenkimal kök hücreler, bütün kan hücrelerini oluşturan hematopoetik kök hücreler ve bulundukları dokuda görev alan unipotent kök hücreler şeklinde sınıflandırılır [49, 50].

2.4.1 Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, sinir sistemi ve deri gibi birçok doku ve organda bulunmaktadır. CD105, CD73, CD29, CD44, CD90 gibi yüzey antijenlerini taşıyan mezenkimal kök hücreler, antijenleri aracılığıyla tanınmasının yanında, bu antijenler vasıtasıyla sitokin, büyüme faktör reseptörü, hücre adezyon molekülü olarak da görev yapar.

Mezenkimal kök hücreleri hasarlı dokuya gitme ve yerleşme eğilimi gösterir. Bunlar TNF- α ve IL-1 gibi sitokinler tarafından düzenlenir. Hasarlı dokuya yerleşen mezenkimal kök hücreler VEGF, IGF-1, β FGF, IL-6, CCL-2 gibi faktörler salgılayarak hücre proliferasyonu ve doku iyileşmesi sağlanır. Anjiyogenezi uyarır ve apoptozisi engelleyerek de iyileşme sürecine katkı sağlar [51].

2.4.2 Kök hücre kaynağı olarak adipoz doku

Yetişkin insanda vücut ağırlığının %10-15'i adipoz dokudur. Adipoz dokunun yarısı ciltaltında olup geri kalanı omentum, mezenterde bulunur. Adipoz doku, yetişkin bireyde enerji kaynağı, yağda çözünen vitamin ve diğer maddelerin depo yeridir. Adipoz doku içinde bulunan multipotent kök hücreleri, kolay izole edilebilmesi, laboratuvar ortamında kolayca çoğaltılabilmesi, yüksek sayıda olmaları ve hızlı elde edilebildikleri için kullanım yönünden avantajlıdır. Ayrıca hematopoetik hücrelere kıyasla immun yanıt oluşturma ihtimali daha az ve kültür koşullarında genetik olarak daha stabildir [52, 53]. Adipoz dokudan elde edilen kök hücreler, adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik ve miyojenik farklılaşma kabiliyeti mevcuttur.

2.4.3 Kök hücrelerin dokularda takibi

Kök hücrelerle yapılan çalışmalarda, hücrelerin takibi için işaretleme yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Yeşil floresan proteininin (GFP) hücrelere transfekte etmesi yöntemiyle takip yapılabildiği gibi kısa süreli çalışmalarda karboksifloresan diasetat süksinimidil ester (CFSE), 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) gibi floresan işaretleme yöntemi kullanılmaktadır [54, 55].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (DA22/01) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi.

Çalışmada, 350-500 gr ağırlıkta, toplam 55 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. 7 adet sıçan kök hücre eldesi için kullanılmış olup 48 hayvan randomize olarak 4 eşit gruba ayrıldı ve altışarlı olarak kafeste tutuldu. Hayvanlar çalışma süresince aynı laboratuvar koşullarında tutuldu, ticari sıçan yemi ve normal musluk suyuyla beslendi.

3.1 Gruplar

Grup 1 (Kontrol grup): Sıçanlar orta hat laparotominin ardından peritoneal refleksiyonun 2 cm proksimalinden, sol kolonun 1 cm'lik segmenti rektosigmoid bileşke düzeyinden eksize edilerek uç uca anastomoz uygulandı. İşlem sonrası sıçanların 6 tanesi üçüncü, 6 tanesi yedinci günde sakrifiye edilerek histopatolojik değerlendirme için anastomoz hattını içerecek şekilde kolon dokusu eksize edildi.

Grup 2 (Radyoterapi ve anastomoz grubu): Belirlenen şekilde radyoterapi uygulanan sıçanlar beşinci günde orta hat laparotominin ardından peritoneal refleksiyonun 2 cm proksimalinden, sol kolonun 1 cm'lik segmenti rektosigmoid bileşke düzeyinden eksize edilerek uç uca anastomoz uygulandı. İşlem sonrası sıçanların 6 tanesi üçüncü, 6 tanesi yedinci günde sakrifiye edilerek histopatolojik değerlendirme için anastomoz hattını içerecek şekilde kolon dokusu eksize edildi.

Grup 3 (Radyoterapi, anastomoz ve lokal kök hücre grubu): Belirlenen şekilde radyoterapi uygulanan sıçanlar beşinci günde orta hat laparotominin ardından peritoneal refleksiyonun 2 cm proksimalinden, sol kolonun 1 cm'lik segmenti rektosigmoid bileşke düzeyinden eksize edilerek uç uca anastomoz uygulandı. Ek olarak sıçanların anastomoz hatlarına elde edilen kök hücreler uygulandı. İşlem sonrası sıçanların 6 tanesi üçüncü, 6 tanesi yedinci günde sakrifiye edilerek histopatolojik değerlendirme için anastomoz hattını içerecek şekilde kolon dokusu eksize edildi.

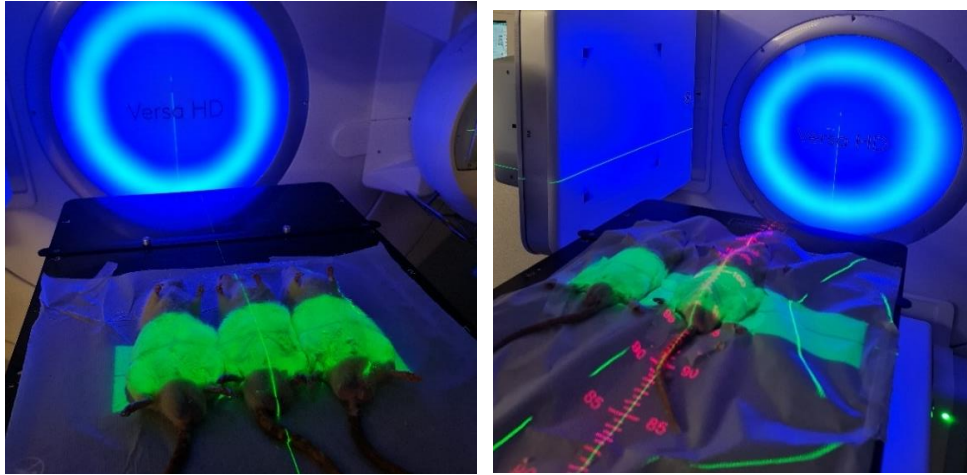
Grup 4 (Radyoterapi, anastomoz, lokal ve sistemik kök hücre grubu): Belirlenen şekilde radyoterapi uygulanan sıçanlar beşinci günde orta hat laparotominin ardından peritoneal refleksiyonun 2 cm proksimalinden, sol kolonun 1 cm'lik segmenti rektosigmoid bileşke düzeyinden eksize edilerek uç uca anastomoz uygulandı. Ek olarak sıçanların anastomoz hatlarına ve eşzamanlı intraperitoneal elde edilen kök hücreler uygulandı. İşlem sonrası sıçanların 6 tanesi üçüncü, 6 tanesi yedinci günde sakrifiye edilerek histopatolojik değerlendirme için anastomoz hattını içerecek şekilde kolon dokusu eksize edildi.

3.2 Anestezi

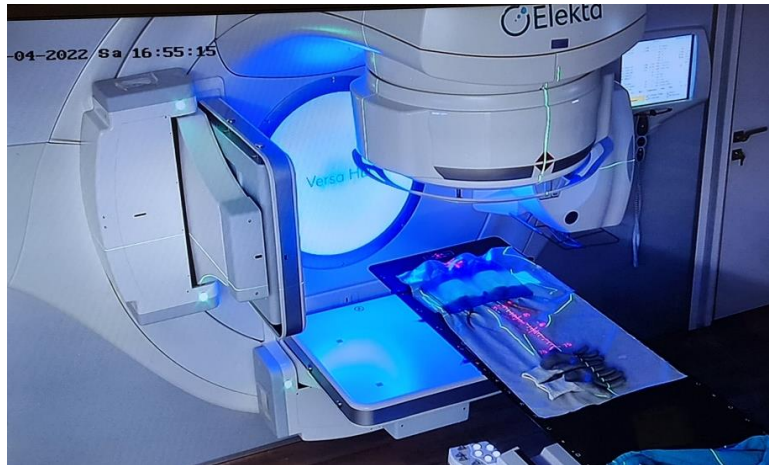
Radyoterapi, ameliyat ve ötenazi işlemlerinde intraperitoneal 60mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer inc) ve 7mg/kg ksilazinhidroklorür (Xylazin Bio %2®, Bioveta inc) uygulandı.

3.3 Radyoterapi

Radyoterapi, Başkent Üniversitesi Hastanesi Radyasyon Onkolojisi ABD'nda, Elekta Versa HD lineer hızlandırıcı cihazıyla verildi. Ameliyattan 5 gün önce, 2, 3 ve 4. gruptaki sıçanlara anestezi altında kaynak eksen mesafesi tekniği ile 6 MV enerjili lineer hızlandırıcı, kaynak eksen mesafesi 100 cm olacak şekilde tek seans olarak 12 Gy RT dozu uygulandı (Resim-1, 2). İşlem sonrası sıçanlar anestezik etkisinden kurtulana kadar yakından takip edildi. İlk 24 saatte sıçanlarda ölüm görülmedi.

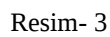


Resim- 1

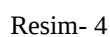


Resim- 2

Sıçanlara ameliyat öncesi açlık ve barsak temizliği verilmedi. İntraperitoneal anesteziyi takiben ekstremiteler refleksiyel anestezi derinliği kontrol edildikten sonra karın bölgeleri traş edildi. Ardından ameliyat masasına sırt üstü yatırılarak dört ekstremiteden flaster yardımıyla tesbitlendi (Resim-3). Karın bölgesi %10 povidon iyot (Batticon® antiseptik solüsyon, Adeka inc) ile temizlendi ve ortası delik steril cerrahi örtü ile örtüldü. Ardından orta hat insizyon ile laparotomi yapıldı.



Batına girildikten sonra inen kolon bulundu, peritoneal refleksiyonun 2 cm proksimalinden, sol kolonun 1 cm'lik segmenti rektosigmoid bileşke düzeyinden eksize edildi. Anastomoz güvenliği açısından proksimal ve distal kolon ansı içinde bulunan gaita sağma yöntemiyle çıkartıldı. Ardından 7/0 polipropilen (Prolen, Ethicon Inc.) ile primer süturle uç uca tek kat kolon anastomozu yapıldı (Resim-4). İşlem sonrası fasya ve cilt devamlı 3/0 ipek ile kapatıldı.



Kolon anastomozundan hemen sonra kök hücre uygulaması yapılacak olan Grup 3 ve 4'te anastomoz hattının distal ve proksimaline lokal subserozal toplam 0,1 ml kök hücre enjekte edildi (Resim- 5). Sistemik kök hücre uygulaması yapılacak olan Grup 4 sıçanlarına lokal uygulamaya ek olarak 0.1 ml kök hücre intraperitoneal verildi.

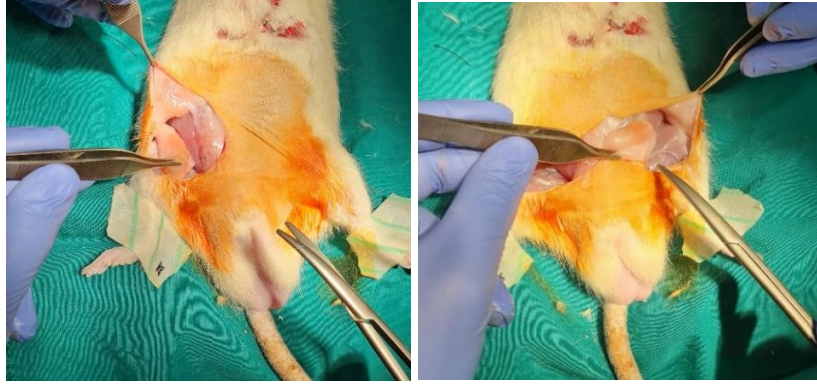


Resim- 5

Tüm gruptaki sıçanların 6'sı ameliyat sonrası üçüncü günde, diğer 6'sı ameliyat sonrası yedinci günde intraperitoneal anestezi ile relapatotomi yapıldı. İnen kolon anastomoz hattı bulundu, anastomoz 2 cm distal ve proksimalinden kolon kesilerek dışarı alındı. Anastomoz patlama basıncı ölçümü yapıldıktan sonra örnekler longitudinal olarak 3'e ayrıldı ve histopatolojik çalışma için formaldehitte, biyokimyasal çalışma için -86°C'de muhafaza edildi.

3.5 Adipoz Doku Temini

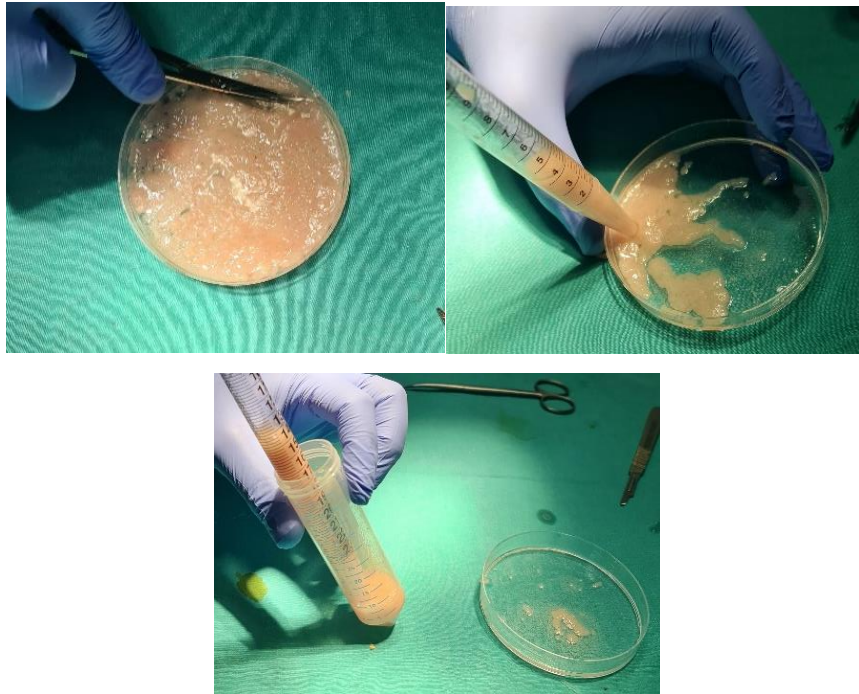
Adipoz doku temini için ayrılan 7 sıçan verilen anestezi sonrası karın bölgeleri traş edildi. Ardından ameliyat masasına sırt üstü yatırılarak dört ekstremiteden flaster yardımıyla tesbitlendi. Karın bölgesi %10 povidon iyot ile temizlendi. İnguinal bölge açılarak ciltaltı diseke edildi, inguinal bölgedeki yağ yastıkçıklarına ulaşıldı, yağ dokuları çıkarıldıktan sonra işlem sonlandırıldı. Toplam 15.8 gr adipoz doku elde edildi (Resim- 6) [56-58].



Resim- 6

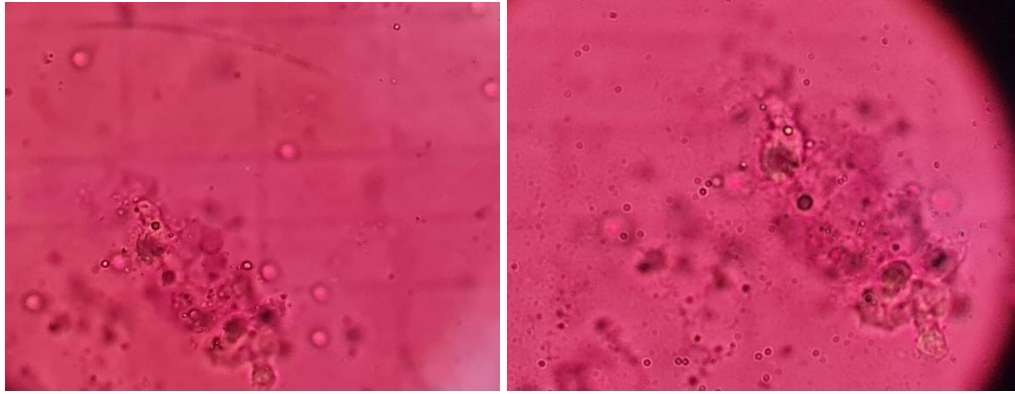
3.6 Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması

Sıçanlardan temin edilen yağ dokuları fosfat tamponlu salin (PBS, İnvitrogen) ile yıkandıktan sonra doku kültür plakalarında forseps ile kavranmayacak hale gelene kadar bistüri ve doku makasıyla parçalandı (Resim-7). Parçalanan doku 5 dakikada 3 kez PBS ile durulandı, daha sonra 50ml falcon tüpüne alındı. %0.15 kollajenaz (Collagenase from *C.histolyticum*, Xiaflex ®, Auxilium Pharmaceuticals, Inc.) enzimatik sindirim için tüpe eklendi.



Resim- 7

Daha sonra 37°C’de 30 dakikalık kuvvetli çalkalama yapıldı. Daha sonra aynı miktarda %10 fetal bovin serumu (FBS, Gibco BRL) eklenerek kollajenaz nötralize edildi. Hücre süspansiyonu 5 dakika 1300rpm’de (260g) santrifüjlendi ve üstteki erimiş halde bulunan yağ dokusu dikkatli bir şekilde aspire edildi. İçinden 0.1 cc süspansiyon alındı ve kök hücre sayımı için metilen mavisi ile boyandı. Çekirdekli ve çekirdeksiz hücreler hemasitometrede (Neubauer Thoma, Almanya) ışık mikroskopunda sayıldı. Her 0.1ml’de 16×10^7 kök hücre saptandı (Resim-8). Geri kalanı Dil etiketlemesi için süspansiyon hazırlandı [59].



Resim- 8

3.7 Kök Hücrelerin İşaretlenmesi

1,1’-Diocadecyl-3,3,3’,3’-tetramethylindocarbocyanine (Dil) (Invitrogen, Medsantek) %25 konsantrasyonda %99 etanol içinde çözüldü ve -20°C’de saklandı. Hücreler üreticinin tavsiyelerine göre floresan Dil ile etiketlendi. Süspansiyondaki hücreler beş dakika süreyle 4°C derecede 2,5 µg/ml konsantrasyonunda Dil ile fosfat tamponlu salin içinde inkübe edildi [60, 61].

3.8 Patlama Basıncı Ölçümü



Resim- 9

Patlama basıncını ölçmek için dosiflow, transducer (Disposet pressure monitoring set-single) ve monitör (GE Transport Pro) temin edildi. Laparotomide anastomoz çevresindeki yapışıklıkların giderilmesi ve manipülasyonu anastomozu zedeleyerek kaçağı arttıracığından anastomoz hattı çevre yapışıklıklar diseke edilmeden proksimal ve distalden mesafe bırakılarak rezeke edildi. Anastomoz hattında abse, anastomozda ayrışma, kaçak varlığı olup olmadığı incelendi. Lümen içinde gaita basınç ölçümünü etkileyeceği için yıkama ile uzaklaştırıldı. Anastomoz hattı distalinde ve proksimaline kateter yerleştirilerek ipek bağlama ile tesbit edildi ve proksimal uçtaki kateter basınç transdüser ile monitöre bağlandı. Perfüzyon pompası ile distalden 50 ml/sa hızla kolon içine sıvı verildi, monitördeki basınçta ani düşme veya anastomozdaki patlama sırasında olan basınç değeri patlama basıncı olarak kaydedildi (Resim- 9).

3.9 Biyokimyasal Değerlendirme

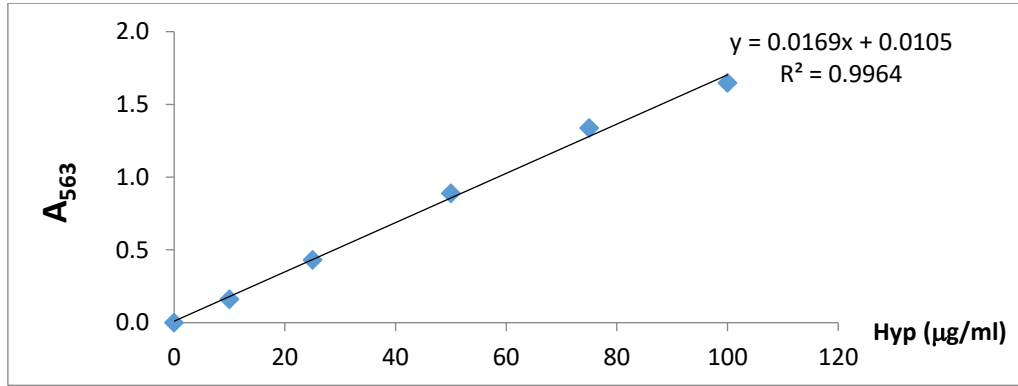
3.9.1 Doku hidroksiprolin analizleri

Doku örneklerinde hidroksiprolin (Hyp) derişimlerinin saptanması Reddy ve Enwemeka'nın yöntemine göre gerçekleştirilmiştir [62]. Yöntem, serbest Hyp'nin kloramin-T ile oksidasyonu sonrası Ehrlich reaktifi ile oluşturduğu renkli bileşiğin spektrofotometrik olarak analizi esasına dayanmaktadır.

Çalışmada doku örnekleri analize kadar -86 °C'de saklanmıştır. Örnekler, salin ile, 1g/10 ml (w/v) olacak şekilde cam-cam homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenatlar ve standart Hyp çözeltileri alkali ortamda (2N NaOH) hidroliz edilmiştir. Nötralizasyon sonrası örneklerin kloramin-T ile oksidasyonu sağlanmış ve Ehrlich reaktifi ile oluşturdukları renkli bileşiğin absorbansı 563 nm'de reaktif körüne karşı spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür (Shimadzu UV-1601).

Hidroksiprolin derişimleri standart eğri kullanılarak hesaplanmıştır. Her örnek çift olarak çalışmaya alınmış ve derişimler ve µg/g doku olarak ifade edilmiştir.

Tablo 1. Hidroksiprolin standart eğrisi



3.9.2 Doku Matriks Metalloproteinaz-2 (MMP-2) analizleri

Doku MMP-2 analizleri BT-Lab (China) marka ticari kit (Katalog no: E0315Ra) kullanılarak ELISA yöntemiyle belirlenmiştir [63].

MMP-2 analizi “sandwich ELISA” yöntemi prensibine dayanmaktadır. Sıçan MMP-2’ye özgü monoklonal antikor kaplı kuyucuklara belirtilen hacimlerde örnek/standart/kontrol, biotinlemiş antikor ve streptavidin-HRP eklenerek 37 °C’de bir saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklara ticari kitte belirtilen yıkama prosedürü uygulanarak bağlanmayan kısımların uzaklaştırılması sağlanmış ve ardından tüm kuyucuklara substrat solüsyonları eklenerek yeniden 37 °C’de on dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon 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 ng/ml olarak ifade edilmiştir. Yöntemin analitik duyarlılığı 0.092 ng/ml’dir.

3.10 Histopatolojik İnceleme

%10’luk formaldehit solüsyonu içinde muhafaza edilen spesmenlerden en az 4 farklı bölgeden tam kat örnekler alındı, parafine bloklar hazırlanarak, 4 µm kalınlığında kesitler halinde hematoxilen&eozen ile boyanıp tek bir patolog tarafından kör olarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Radyasyon kolitinin spesifik bulguları olmadığı için histopatoloji incelemeyi akut ve kronik dönemde enterit/kolitte gösterilen histopatoloji değişiklikler olarak ayrı ayrı incelendi [64]. Akut enterit bulguları olarak ülser (1), ödem(2), vasküler fibrinoid nekroz(3), kript

absesi(4), azalmış mitoz(5), lamina propriyada artmış nötrofil eozinofil miktarı(6), epitelyal düzleşme(7), müsin kaybı(8) olarak 8 parametrede incelendi. Kronik enterit bulguları olarak serozal inflamasyon(1), artmış apopitoz(2), kript distorsiyonu(3), paneth atipisi(4), kript atrofisi(5), reaktif epitelyal atipi(6), hiyalinize arterioller(7), vasküler ektazi(8), atipik fibroblast(9), submukozal nöronal proliferasyon(10), lamina propriyada kronik inflamatuvar hücre artışı(11) olarak 11 parametre belirlendi. Bu parametreler 0 (yok), 1 (hafif), 2 (belirgin) şeklinde derecelendirildi [65, 66].

3.11 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 25.0 programı ile gerçekleştirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu histogram grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen (nonparametrik) değişkenler ikiden fazla grup arasında değerlendirilirken Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar Benferroni Metodu ile belirlendi. Ratların başlangıç, preoperatif, postoperatif 3. gün sakrifiye ve 7. gün sakrifiye kilo ölçümlerinin zamana bağlı değişimini belirlemek amacıyla Friedman Testi kullanıldı. Farklı bulunan ölçümleri belirlemek için Wilcoxon Sıra Sayıları Testi kullanıldı. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışma süresince grup 3 ve 4 içinden üçer sıçan radyoterapi sonrası ameliyat öncesi dönemde öldü. Bu denekler çalışmaya dahil edilmedi. Postmortem lapatomide barsaklarda yaygın tam kat nekroz görüldü.

4.1 Fiziksel Değerlendirme

4.1.1. Vücut ağırlıkları

Hayvanların başlangıç (radyoterapi alacaksa radyoterapi öncesi), ameliyat gününde, ameliyat sonrası 3. ve 7. gününde ağırlıkları kaydedilmiş olup ortalama ağırlıkları tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Zamana bağılı olarak hayvanların kilo değişimi

		Başlangıç kilosu	Operasyon günü kilosu	Ameliyat sonrası D3	Ameliyat sonrası D7	p value
Grup 1	Ort±SS	388.75±44,01	388.92±43,20	370.75±37,88	355.67±30,13	0,002
	Median	366,5 (340-475) ^a	365,5 (342-474) ^a	357 (323-432) ^b	347,5 (333-414) ^b	
Grup 2	Ort±SS	434.67±30,62	374.83±36,39	371.50±34,27	369.17±31,12	0,009
	Median	430 (397-500) ^a	366,5 (329-452) ^b	365,5 (326-425) ^b	363 (332-414) ^b	
Grup 3	Ort±SS	428.78±18,19	368.33±17,33	354.44±22,95	363.20±22,83	0,005
	Median	425 (403-455) ^a	363 (347-395) ^b	355 (320-380) ^c	361 (339-387) ^{b,c}	
Grup 4	Ort±SS	417.44±47,64	355.67±51,92	340.22±46,67	360.80±53,43	0,003
	Median	407 (330-500) ^a	355 (273-445) ^b	344 (269-421) ^c	380 (281-421) ^c	

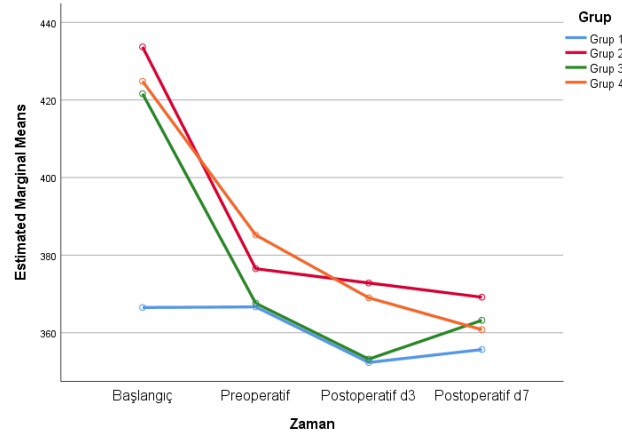
Friedman Testi, Kruskal Wallis Testi, Harfler her bir satırdaki zamana bağılı anlamlı farklılığı gösterir^{a,b,c}.

Her bir grup içerisinde zamana bağılı anlamlı kilo kaybının olup olmadığı araştırıldı. Radyoterapi almamış olan grup 1’de başlangıç kilosu ile operasyon günü arasında anlamlı kilo değişikliği gözlenmedi. Radyoterapi alan grup 2, 3 ve 4’te başlangıç kiloları ile operasyon günü arasında anlamlı bir kilo kaybı olduğu görüldü.

Radyoterapi almayan grup 1’de ameliyat günü kilosu ile ameliyat sonrası 3 ve 7. günde kilo kaybının anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). Radyoterapi uygulamasının ardından anastomoz yapılan grup 2 ve kök hücre uygulanan grup 3 ve 4’te de ameliyat günü ile ameliyat sonrası 3. ve 7. günde istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybı saptandı (Tablo 3).

Her grupta ameliyat sonrası 3 ve 7. gündeki kilo kaybı oranları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Kök hücre verilen grup 3 ve 4’te, kök hücre uygulanmayan gruplara kıyasla ameliyat sonrası 3 ve 7. günde anlamlı bir kilo farkı saptanmadı.

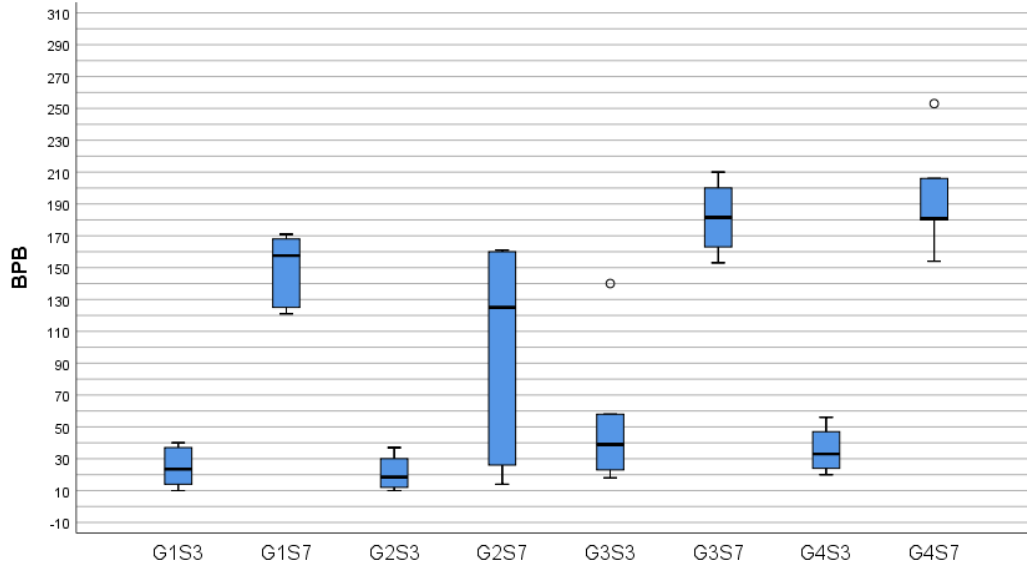
Tablo 3. Grupların kilo ölçümleri karşılaştırmalı grafiği



4.1.2. Barsak patlama basıncı

Ameliyat sonrası 3 ve 7. günde bütün gruptaki sıçanlara laparotomi yapılarak anastomoz hattı rezeke edildikten sonra patlama basınçları ölçüldü (Tablo 4). Tüm deneklerde patlamanın anastomoz hattından olduğu görüldü.

Tablo 4. Her bir grupta ve sakrifiye gününde BPB ölçüm düzeylerinin kutu grafiği
(S3: 3. gün sakrifiye, S7: 7. gün sakrifiye)



Tüm gruplar kendi içinde kıyaslandığında, ameliyat sonrası 3. günde barsak patlama basıncı, ameliyat sonrası 7. güne kıyasla anlamlı şekilde düşük saptandı ($p < 0,05$).

Grup 1 ve 2 kendi arasında kıyaslandığında, ameliyat sonrası 3. günde patlama basınçları arasında bir fark saptanmadı, 7. günde grup 1’de patlama basıncı ortalaması daha yüksek saptanmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).

Grup 3 ve 4’te ameliyat sonrası 3. günde ölçülen BPB’ları (39 (18-140) ve 33 (20-56)) grup 1 ve 2’de ameliyat sonrası 3. günde ölçülen BPB’larına (23,5 (10-40) ve 18,5 (10-37)) kıyasla yüksek bulunmakla beraber anlamlı bulunmadı. Yine grup 3 ve 4’ün ameliyat sonrası 7. günde ölçülen BPB’ları (181,5 (153-210) ve 181 (154-253)) grup 1 ve 2’de ameliyat sonrası 7. günde ölçülen BPB’larına (157,5 (121-171) ve 125 (14-161)) kıyasla yüksek saptanmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).

Grup 2’de ameliyat sonrası 7. günde patlama basınçlarının geniş bir aralıkta dağılımının nedeni olarak, bazı sıçanlarda anastomoz hattında iyileşmenin kötü olduğu, anastomozun ayrık olduğu görüldü (3 sıçanda, %50 oranında). Radyoterapi uygulanmayan ve radyoterapi uygulamasına ek kök hücre uygulanan gruplarda 7. günde anastomozda gross olarak ayrışma görülmeydi.

4.2 Biyokimyasal Değerlendirme

Ameliyat sonrası 3 ve 7.günde laparotomi yapılarak anastomoz hattı rezeke edildikten sonra dokuda Hidroksiprolin ve MMP-2 düzeyi bakıldı. (Tablo 5)

Tablo 5. Hidroksiprolin ve Matrix Metalloproteinaz ölçüm düzeylerinin gruplara göre karşılaştırılması (S3: 3. gün sakrifiye, S7: 7. gün sakrifiye)

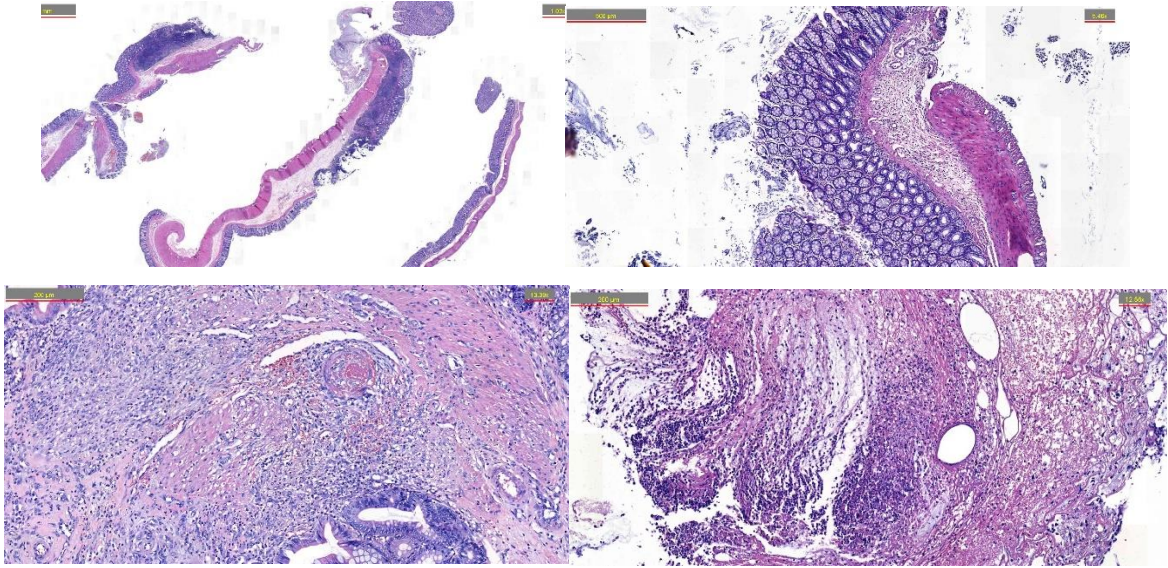
		Hyp(μ g/gdoku)	MMP-2 (ng/ml)
G1S3	Ort $\pm$ SS	132,38 $\pm$ 54,70	85,65 $\pm$ 24,97
	Median	132,1 (61,2-199,1)	82,74 (59,87-123,29)
G1S7	Ort $\pm$ SS	237,28 $\pm$ 94,48	86,01 $\pm$ 20,27
	Median	248,95 (123,4-341,7)	80,22 (65,52-118)
G2S3	Ort $\pm$ SS	179,93 $\pm$ 96,28	63,53 $\pm$ 19,09
	Median	164,8 (66-312,4)	67,44 (35,27-83,62)
G2S7	Ort $\pm$ SS	197,13 $\pm$ 85,34	64,12 $\pm$ 18,83
	Median	194,2 (64,8-308,6)	70,81 (26,43-76,44)
G3S3	Ort $\pm$ SS	174,8 $\pm$ 114,49	66,78 $\pm$ 12,97
	Median	152,4 (70,1-357,7)	67,62 (53,78-87,19)
G3S7	Ort $\pm$ SS	250,65 $\pm$ 41,15	84,6 $\pm$ 31,90
	Median	239,8 (218-305)	89,67 (41,56-117,51)
G4S3	Ort $\pm$ SS	277,65 $\pm$ 76,78	52,79 $\pm$ 13,41
	Median	266,4 (200-377,8)	55,3 (35,04-65,52)
G4S7	Ort $\pm$ SS	203,32 $\pm$ 102,86	72,93 $\pm$ 23,66
	Median	148,2 (117,8-327,8)	66,36 (46,1-106,63)
p value		0,215	0,180

Kruskal Wallis Testi

Gruplar kendi içinde ameliyat sonrası 3 ve 7. günlerdeki değerleri kıyaslandığında, sadece grup 4'te ameliyat sonrası 3. günde Hyp değeri 7. güne kıyasla yüksek bulundu, diğer gruplarda 3.gün değerleri düşük saptandı ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamsız olarak saptandı ($p>0.05$). Gruplar birbiriyle kıyaslandığında, ameliyat sonrası 3 ve ameliyat sonrası 7. günlerde Hyp düzeylerinde gruplar arası anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

MMP-2 düzeyi için gruplar kendi içlerinde ameliyat sonrası 3 ve 7. gün değerleri kıyaslandığında; grup 1 ve 2'de ameliyat sonrası 3 ve 7. günleri arasında fark saptanmaz iken, grup 3 ve 4'te ameliyat sonrası 7. günde 3. güne kıyasla MMP-2 düzeylerinde düşüklük saptandı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gruplar birbiriyle kıyaslandığında, ameliyat sonrası 3 ve ameliyat sonrası 7. Günlerde MMP-2 düzeylerinde gruplar arası anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

4.3 Histopatoloji Değerlendirme



Resim-10: a) Lamina propriyada yoğun lenfosit infiltrasyonu b) Arteriyollerde hyalen nekroz
c) Lamina propriyada ektazik damar yapıları d) Yüzeyel ülserasyon odağı

Histopatolojik değerlendirmede akut değişiklikler içinde sınıflandırılan 8 parametre ve kronik değişiklikler içinde sınıflandırılan 11 parametre incelendi (Resim-10). Her bir parametre 0 ile 2 arasında puanlandırılarak histopatolojik olarak kantitatif şekilde derecelendirildi (Tablo 6).

Tablo 1. Histopatoloji bulgularının 3. ve 7. sakrifiye gruplarına göre karşılaştırılması

		Akut değişiklikler	Kronik değişiklikler	Histopatoloji toplam puan
G1S3	Ort±SS	4,5±3,51	4,5±1,87	9±5,22
	Median	3,5 (2-11)	4 (3-8)	8 (5-19)
G1S7	Ort±SS	3,33±2,07	4,83±2,23	8,17±3,97
	Median	3 (0-6)	5 (2-8)	9 (2-14)
G2S3	Ort±SS	5,5±3,51	3,83±2,40	9,33±2,88
	Median	4,5 (2-11)	4 (1-6)	9 (5-13)
G2S7	Ort±SS	4,5±1,97	6,67±2,34	11,17±3,97
	Median	4 (2-8)	6,5 (3-10)	10,5 (5-16)
G3S3	Ort±SS	4,6±1,52	5,6±1,52	10,2±2,17
	Median	4 (3-7)	5 (4-8)	11 (7-12)
G3S7	Ort±SS	2,5±1,73	5±1,63	7,5±2,38
	Median	2,5 (1-4)	5 (3-7)	6,5 (6-11)
G4S3	Ort±SS	5,5±4,12	6,75±2,36	12,25±5,56
	Median	6 (1-9)	6 (5-10)	12 (6-19)
G4S7	Ort±SS	3,8±2,28	5,4±2,30	9,2±4,55
	Median	3 (1-7)	5 (2-8)	8 (3-15)
p value		0,792	0,441	0,584

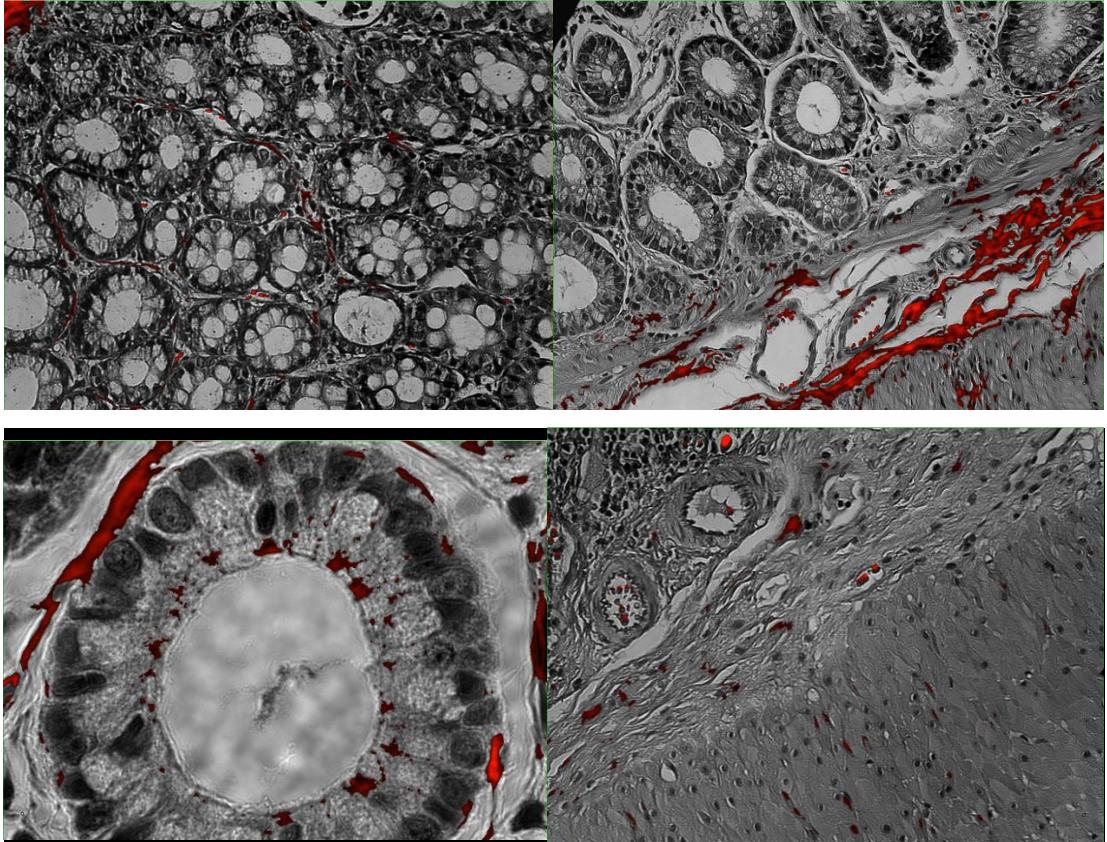
Kruskal Wallis Testi

Her grup kendi içinde değerlendirildiğinde, grup 1, 2, 3 ve 4'te ameliyat sonrası 3. gün olan median akut değişikliklerin ameliyat sonrası 7. güne kıyasla yüksek olduğu gözlenmiş olup istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. Yine kronik değişiklikler kıyaslandığında gruplar kendi içinde ameliyat sonrası 3 ve 7.günde anlamlı bir fark saptanmadı.

Grup 1 ve 2 kıyaslandığında, akut, kronik değişiklikler ve histopatoloji bulguları açısından ameliyat sonrası 3 ve 7. günde bir farklılık saptanmadı. Grup 3 ve 4'ün 3. Gün ve 7. Gün sakrifiye grupları grup 1 ve 2 ile karşılaştırıldığında akut, kronik değişiklikler ve histopatoloji bulguları ölçüm düzeyleri arasında anlamlı farklılık gözlemlenmedi ($p>0,05$)

4.4 Dil ile İşaretlenmiş Kök Hücrelerin Görüntülenmesi

İmmunfloresan mikroskopta incelenen sadece hematoksilen ile boyalı preparatlarda anastomoz bölgesinde kök hücrenin varlığı görüldü. Dijital görüntüleme cihazıyla görüntüler kayıt altına alındı (Resim- 11).



Resim- 11: Endotel ve arteriyol duvarlarda, stromal dokuda sitoplazması Dil ile boyalı kök hücreler

5. TARTIŞMA

Günümüzde kolorektal kanserler, sık görülmesi ve her iki cinsiyet için ölüme sebep olan hastalıklar içinde sayılması nedeniyle önemini korumaktadır. Kolorektal kanserlerin biyolojik davranışı kolondaki yerleşim yerine göre farklılık gösterebilir. Preoperatif evrelemede, cerrahi tekniklerde ve adjuvan tedavilerde günümüzde gözlenen gelişmelere rağmen lokal nüks ve uzak organ metastazı hala önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Nükslerin genelde unrezektabl olması, cerrahi esnasında lenf nodu pozitifliği %20-50, uzak organ metastaz oranının % 24-35 arasında olduğu göz önünde bulundurulursa neoadjuvan tedavinin özellikle de neoadjuvant radyoterapi (nRT) eklenmesinin daha iyi lokal kontrol sağladığı ve hastalıksız sağ kalıma olumlu katkı sağladığı bilinmektedir [67].

Kolorektal tümörlerde neoadjuvan kemoradyoterapinin kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışmalar vardır. Neoadjuvan radyoterapinin lenf nodu oranlarını %60'a kadar düşürdüğü, seviye olarak rektum yerleşimli tümörlerde %86,5 oranında sfinkteri koruyabildikleri, beş yıllık sağkalımda artışın olduğu, uzak organ metastazını azalttığı gösterilmiştir [68, 69]. Radyoterapide ameliyat öncesi uygulamanın avantajı doku oksijenizasyonun daha iyi olması ile etkinliğinin artması, incebarsaklarda daha az striktüre sebep olması, radyasyona bağlı toksisitede azalma, sfinkter koruyucu cerrahi riskini arttırması sayılabilir [70]. Radyoterapinin dezavantajlarından en önemlisi ise yarattığı inflamatuvar süreç ile yara yeri iyileşmesini bozduğu için anastomoz kaçağı riskini arttırmaktır, anastomoz kaçağı riski ise hastalarda yüksek morbidite ve mortaliteye yol açmaktadır [71, 72]. Tek başına radyoterapi uygulanan hastalarda anastomoz iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerini gösteren birçok çalışma [73] bulunmakla beraber yara iyileşmesini bozmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [74, 75].

Anastomoz kaçağı riskini azaltmak ve yara iyileşme sürecini olumlu yönde etkilemek için bir çok çalışmalar yapılmaktadır, bu çalışmaların bir bölümünü de kök hücre tedavisi oluşturmaktadır [76]. Yapılan birçok çalışmada, adipoz kaynaklı kök hücrelerin farklı dokulara dönüşerek yara yeri iyileşmesini olumlu etkilediği gösterilmiştir [55, 56].

Çalışmamızda, mezenkimal kök hücrelerin radyoterapi uygulanmış olan sıçanlarda anastomoz iyileşmesi üzerine etkileri incelendi. Bu inceleme yapılırken sıçanların kilo takibi, anastomoz patlama basıncı, perianastomotik dokuda Hyp ve MMP-2 düzeyi ve histopatolojik olarak da akut ve kronik değişiklikler incelendi.

Ceelen ve arkadaşlarının yaptığı preoperatif yüksek doz radyoterapi uygulanan ratlarda kolon anastomoz iyileşmesinin incelendiği araştırmada radyoterapi almış grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybı olmuş ancak patlama basıncında ve hidroksiprolin düzeyinde anlamlı fark bulunamamıştır [77]. El-Malt ve arkadaşları preoperatif kemoradyoterapi sonrası kolon anastomozu yapılan ratlarda kontrol ve sham grubu arasında belirgin kilo kaybı olduğu gözlenmiş, ancak patlama basıncında değişiklik görülmediği bildirilmiş [78].

Çalışmamızda, radyoterapi uygulanan gruplarda başlangıç kiloları ile operasyon günü kiloları arasında anlamlı bir düşüş görüldü. Çalışmada 4 grupta da ameliyat sonrası 3 ve 7. günde vücut ağırlıklarında belirgin düşme saptanmakta beraber gruplar birbiriyle kıyaslandığında aralarında anlamlı fark bulunmadı. Bu da radyoterapi uygulaması ve cerrahinin birbirinden bağımsız olarak kilo kaybına neden olduğunu, radyoterapinin cerrahiyle birlikteliğinin kilo kaybında artışa sebep olmadığı göz önünde bulundurularak kümülatif etki oluşturmadığı, radyoterapi uygulamasının ardından yapılan cerrahide kök hücre uygulamasının kilo kaybını azaltmadığını gösterdi.

Anastomoz patlama basıncı anastomoz iyileşmesinin ve anastomoz sağlamlığının en önemli parametrelerinden biridir. Temel olarak iyileşme dokusundaki kollojen yoğunluğu ile ilişkilidir. Jong Han Yoo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, iskemik kolon anastomozunun iyileşmesinde kök hücrenin etkisi araştırılmış ve anastomoz patlama basıncı ile kollojen miktarının doğru orantılı olarak arttığı gösterilmiştir [79]. Cronin ve arkadaşlarının yaptığı anastomoz patlama basıncı ölçümlerinde postoperatif üçüncü günden itibaren patlama basıncının giderek arttığı, 7-10.günde maksimuma ulaştığı aynı zamanda hidroksiprolin düzeylerinin ilk 3 günde %40 azaldığı, beşinci günden itibaren normale yaklaştığı, 10-14.günde normalinin üzerine çıktığı belirtilmiştir [80]. Yaptığımız çalışmada, patlama basıncının sadece radyoterapi verip anastomoz yaptığımız grup 2’de grup 1, 3 ve 4’e kıyasla daha düşük değerler elde edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gruplar kendi içinde postoperatif 3 ve 7. gün kıyaslandığında her grup için postoperatif 3. günde patlama basıncı 7. güne kıyasla anlamlı olarak düşük saptandı. Bu bulgular ışığında postoperatif 3. günde iyileşmenin tam olmadığı, bu nedenle tüm gruplarda 7. günde patlama basınçlarının daha yüksek saptandığı görüldü. Grup 2’de ameliyat sonrası 7. günde patlama basınçlarının geniş bir aralıkta dağılımı olduğu, grubun %50’sinde anastomoz hattında iyileşmenin kötü olduğu, anastomozun ayrık olduğu görüldü. Radyoterapi uygulanmayan ve radyoterapi uygulamasına ek kök hücre uygulanan gruplarda

7. günde anastomozda gross olarak ayrışma görülmedi. Bu bulgudan yola çıkarak radyoterapi almış sıçanlarda ameliyat sonrası 7. günde iyileşme, radyoterapi almamış gruba göre daha kötü olmaktadır. Kök hücre verilen gruplarda, grup 2’de görülen anastomoz ayrışması ve patlama basıncındaki geniş dağılımın olmamasının nedeninin kök hücrelerin anastomoz bölgesindeki iyileşmeyi olumlu yönde etkilediği için olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca kök hücre uygulanan grupta 7.günde anastomozda gross ayrışma görülmemesi nedeniyle de kök hücre uygulamasının anastomoz bölgesinde iyileşmeyi olumlu etkilediğini düşünmekteyiz.

Biyokimyasal olarak anastomoz değerlendirilmesinde doku hidroksiprolin düzeyi, anastomoz bölgesindeki kollajen miktarı ile doğru orantılı olup, yara iyileşmesinin en önemli göstergelerinden biridir. Kolon anastomozu iyileşmesi ile ilgili çalışmalarda en sık kullanılan parametrelerdendir. Cronin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hidroksiprolin düzeylerinin ilk 3 günde %40 azaldığı, beşinci günden itibaren normale yaklaştığı, 10-14.günde normalinin üzerine çıktığı belirtilmiştir [80]. Çalışmamızda, gruplar arasında kök hücre gruplarında ortalama hidroksiprolin düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Benzer çalışmalarda kök hücre uygulamasının Hyp üzerinde belirgin artışa sebep olduğu gösterilmiş olup çalışmamızda bu etkiyi gösterememizdeki nedenin neoadjuvan radyoterapinin erken dönemde proinflatuvar sitokin salınımı ve hipoperfüzyon nedeniyle kollajen yapımındaki bozulmanın etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Yang ve arkadaşlarının yapmış olduğu neoadjuvan kemoradyoterapi almış ratlarda MnTE-2-PyP uygulaması sonrası anastomoz iyileşmesinin incelendiği araştırmada, MnTE-2-PyP uygulanan grupta MMP seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı, doku iyileşmesinin arttığı öne sürülmüştür [81]. Agren ve arkadaşlarının yaptığı MMP’lerin anastomoz iyileşmesindeki aktivitesi incelendiği çalışmada postoperatif 3. günde miktar ve aktivitede artış olduğu ve 7. günden sonra miktarının sınırlandığı gözlemlendi. Sınırlanmanın olmaması durumunda anastomoz ayrışmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiş [82]. Yaptığımız çalışmada, MMP-2 düzeylerinde 7. günde 3.güne kıyasla artış olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Kök hücre gruplarındaki MMP-2 düzeyinde diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmadı.

Anastomoz bölgesinde yara iyileşmesini histopatolojik olarak değerlendirmek için çalışmamızda birçok parametre değerlendirildi. Radyoterapi ile oluşturulan radyasyon enteriti bulguları ile anastomozun iyileşme sürecindeki değişiklikleri değerlendirebilmek

için akut ve kronik değişikliklerin olduğu parametreler belirlenip derecelendirildi. Waddell ve ark 'nın inflamatuvar barsak hastalığı olan fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, yedi gün kök hücre verilmesi sonucu yara iyileşmesini kontrol etmeleri sonucunda eozinofil ve monosit seviyelerinin arttığını saptarken nötrofil infiltrasyonu üzerine anlamlı farklılık saptamamışlardır [83]. Gruplar arasında ve grupların kendi içinde ameliyat sonrası 3 ve 7. gününde akut veya kronik histopatolojik değişiklik düzeyleri arasında anlamlı farklılık gösterilemedi. Histopatolojik olarak anastomoz hattına lokal ve lokal ile sistemik kök hücre uygulamasının anastomoz iyileşmesi üzerine olumlu veya olumsuz bir katkısı olup olmadığı gözlenemedi. Radyasyon kolitinin spesifik bulguları olmaması nedeniyle genel yaklaşım olarak kolitin barak duvarında yaptığı akut ve kronik değişiklikler temel alınarak bakılmıştır. Çalışmamızda, anastomoz iyileşmesinin ve bu iyileşmeye kök hücrenin etkisini gösterememizdeki nedenin; çalışmadaki parametreleri anastomoz iyileşmesine spesifik parametrelerle sınırlandırmayıp kolit varlığını göstermek için daha fazla değişkeni dahil etmemiz olduğunu düşündük.

Uysal ve ark yaptığı çalışmada, kemik iliği kökenli ve adipoz doku kökenli kök hücreler karşılaştırılmış ve adipoz doku kökenli kök hücre gruplarında damarlanmanın anlamlı olarak daha fazla olduğu görülmüştür [56]. Çalışmamızda grup 3 ve 4'ten alınan patolojik preparatlar immunfloresan mikroskopisinde incelendiğinde, anastomoz hattında villuslardaki endotelial hücrede, arteriyol duvarında, submukozal mezenkimal hücrelerde sitoplazması Dil ile işaretlenmiş kök hücrenin bulunduğu görüldü.

6. SONUÇ

Neoadjuvan radyoterapi uygulanan ve radyasyon enteriti geliştirilen ratlarda kök hücre tedavisinin anastomoz iyileşmesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bu deneysel çalışmanın sonuçlarına göre; radyoterapi ve cerrahi uygulamanın vücut ağırlıklarında azalmaya yol açmasına rağmen kök hücre uygulamasının vücut ağırlığındaki değişikliğe anlamlı bir fark yaratmadığı gösterildi. Radyoterapi verilen grupta verilmeyen gruba kıyasla patlama basıncı düşük saptandı, ancak anlamlı fark bulunmadı. Kök hücre uygulanan grupta patlama basıncı diğer gruplara göre yüksek çıkmasına karşın anlamlı bulunmadı. . Biyokimyasal parametre olarak MMP-2 ve Hyp düzeylerinde ve histopatolojik olarak yapılan değerlendirmelerde kök hücre gruplarında anlamlı fark saptanmadı.

Biyokimyasal ve histopatolojik olarak mezenkimal kök hücre uygulamasının neoadjuvan radyoterapi uygulanan sıçanlarda anastomoz iyileşmesi üzerine etkisini gösterememekle birlikte, klinik olarak kök hücre verilen grupta anastomozda gross ayrışmanın olmaması, patlama basınçlarının daha yüksek saptanması nedeniyle olumlu etki yaptığı kanaatindeyiz. Sonuç olarak; mezenkimal kök hücre uygulaması, neoadjuvan radyoterapi almış bireylerde anastomoz hattı iyileşmesine destek olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S et al: Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004, 10(12 Pt 1):4015-4021.
2. Wang H, Wei XZ, Fu CG, Zhao RH, Cao FA: Patterns of lymph node metastasis are different in colon and rectal carcinomas. *World J Gastroenterol* 2010, 16(42):5375-5379.
3. Pommergaard HC, Gessler B, Burcharth J, Angenete E, Haglind E, Rosenberg J: Preoperative risk factors for anastomotic leakage after resection for colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis* 2014, 16(9):662-671.
4. Camma C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxi A, Cottone M: Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA* 2000, 284(8):1008-1015.
5. Kruschewski M, Rieger H, Pohlen U, Hotz HG, Buhr HJ: Risk factors for clinical anastomotic leakage and postoperative mortality in elective surgery for rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007, 22(8):919-927.
6. Telem DA, Chin EH, Nguyen SQ, Divino CM: Risk factors for anastomotic leak following colorectal surgery: a case-control study. *Arch Surg* 2010, 145(4):371-376; discussion 376.
7. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH et al: Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001, 345(9):638-646.
8. Marijnen CA, Kapiteijn E, van de Velde CJ, Martijn H, Steup WH, Wiggers T, Kranenburg EK, Leer JW, Cooperative Investigators of the Dutch Colorectal Cancer G: Acute side effects and complications after short-term preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 2002, 20(3):817-825.
9. Tibbs MK: Wound healing following radiation therapy: a review. *Radiother Oncol* 1997, 42(2):99-106.
10. Emma-Louise Dormand, Paul E Banwell, Timothy EE Goodacre, Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J.* 2005 Jun; 2(2): 112–127.
11. 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* 2001, 7(2):211-228.
12. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002, 13(12):4279-4295.
13. Bugra D. Kolon, Rektum, Anal Bölge Anatomisi. *Türkiye Klinikleri. J Surgery.* 2004; 9: 1-11.
14. Schwartz's Principles of Surgery, F.C.Brunicaardi, 10th ed. Pp:1175-1236, USA 2014
15. Skandalakis EJ. Colonandrectum. *Surgical Anatomyand Tecnique.* Ed:Skandalakis, 1995; 13: 401-70.
16. Sayek I. Temel Cerrahi 3. Baskı Ankara Güneş Kitabevi, 2004; 1243-51 .
17. Sakorafas GH, Zouros E, Peros G. Applied vascular anatomy of the colon and rectum: Clinical implications for the surgical oncologist. *Surgicaloncology*, 2006; 15(4): 243-55.

18. J.L. R. Embryology and anatomy of the colon, Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 1996.
19. Skandalakis JE. Skandalakis Cerrahi Anatomi Modern Cerrahinin Embriyolojik ve Anatomik Temelleri. A. B, editor 2008.
20. Patrick E. Sharp, Marie C. La Regina, "The Laboratory Rat", CRC Press 1998: 6.
21. J. R. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 8 ed. J. R, St. Louis. Editors 1996: 729-799.
22. Thorne CH, Beasley RW, Aston SJ, Bartlett SP, Gurtner GC, Spear SL, Wound Healing: Normal and Abnormal. Grabband Smith's Plastic Surgery 2007;1(2):15-22.
23. Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. Surg Clin North Am. 2003;83(3):483-507.
24. Townsend, C.M.: Wound Healing In: Sabiston Textbook of Surgery, Section I, Chapter 7, 16th Edition. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto, 2001, 131-141.
25. F. Charles Brunicaudi DA, Timothy Billiar, David Dunn, John G. Hunter, Jeffrey Matthews, Raphael E. Pollock. Schwartz's Principles of Surgery. 10 ed. F. Charles Brunicaudi M, FACS, editor. 10. United States: McGraw Hill, 2014: 241-71.
26. Lunstedt B, Debus S, Thiede A. [Healing of the anastomosis in various suture techniques in the gastrointestinal tract. Physiology, experimental and clinical results]. Zentralblatt für Chirurgie, 1993; 118(1): 1-7.
27. Thornton, F.J., Barbul, A.: Healing in the Gastrointestinal Tract. Surg. Clin. North Am. 77, 1997:549-573.
28. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. American journal of surgery, 1980;139(3):406-13.
29. Mast BA. Healing in other tissues. The Surgical clinics of North America, 1997; 77(3): 529-47.
30. Testini M, Margari A, Amoroso M, Lissidini G, Bonomo GM. [The dehiscence of colorectal anastomoses: the risk factors]. Annali italiani di chirurgia, 2000; 71(4): 433-40.
31. Ahrendt GM, Tantry US, Barbul A. Intra-abdominal sepsis impairs colonic reparative collagen synthesis. American journal of surgery, 1996; 171(1): 102-7.
32. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses: III. Collagen metabolism in the colon after left colon resection. Am J Surg 1980; 139:398-405
33. Göksoy E, Sarıbeyoğlu K. Genel bilgiler. Çev. Ed: E Göksoy. Acil Karın Cerrahisi. Ed: Jones PF, Krukowski ZH, Youngson GG. Emergency Abdominal Surgery, 3. edition. Yüce Yayın, İstanbul, 2002; 1-35.
34. Gökpınar İ, Gürleyik E, Pehlivan M, et al. Erken enteral ve glutaminli enteral beslenmenin kolon anastomoz iyileşmesi üzerine etkisi: Deneysel çalışma. Ulus Travma Derg 2006; 12:17-21.
35. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses: parameters for repair. Dis Colon Rectum, 1990; 33(10): 891-901.
36. Koruda, M.J., Rolandelli, R.H.: Experimental Studies on the Healing of Colonic Anastomoses. J. Surg. Research. 1990, 48: 504-515.
37. Manson, P., Zhang X.W., Jeppson, B., Thorlacius, H.: Anastomotic Healing in the Rat Colon: Comparison Between a Radiological Method, Breaking Strength and Bursting Pressure. Int. J. Colorectal Dis. 2002, 17:420-425.

38. Hall, EJ., Cox, JD. Physical and biologic of radiatin therapy. In: Moss, WT., Cox, JD., eds. *Radiation Oncology: Radionale, Technique, Results*. 6th ed. St.Louis: The C.V. Mosby Company, 1998; 1-57.
39. Prudy, JA., Glasgow, GP., Lightfoot, DA. Principles of radiologic physic, dosymetri and treatment planning. In: Perez, CA., Brady, LW., eds. *Principles and practice of radiation oncology* 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company 1992.
40. Withers, RH. Biologic basis of radiation therapy. *Principles and practice of radiation oncology*. Perez, C, Brady, L, ed. Lippincott Co. Philadelphia, 1992;64-98.
41. Marx, ER., Ehler, JW., Tayapongask, P. Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. *Am.J.Surg.*, 1990;160:519-524.
42. Nakada, T., Kutoba, Y., Sasagawa, I., Therapeutic experience of hiperbaric oxygenation in radiation coliti. Report of case. *Dis. Colon&Rectum*, 1993; 36:962-965.
43. Picolo, EV., Shellito, CP. Surgery for radiation injury to the large intestine. *Dis. ColonRectum*, 1994; 37:675-84.
44. Whiting JF, Howes A, Osteen RT. Preoperative radiation for unresectable carcinoma of the rectum. *Surg. Gyncol. Obstet.* 1993; 176:203-207.
45. Staffan W, Hasse Ji Bengt Z. Preoperative radiation and colonic healing. *Eur. J.Surg.* 1994;160:47-51.
46. Nguyen, NP., Antoine, JE., Dutta, S. Current concepts in radiation enteritis and implications for future clinical trials. *Cancer*, 2002;95(5):1151-63.
47. Ooi, BS., Tjandra, JJ., Green, MD: Morbidities of adjevant chemotherapy and radiotherapy for resectable rectal cancer. An overview. *Dis. Col. Rectum.*, 1999; 42:403-418.
48. Perez, CA., Brady, LW. *Principles and practise of radiation oncology*. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven publisher, 1998.
49. Barrilleaux, B.,Phinney, DG., Prockop, DJ. andO'Connor, KC. Exvivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Engineering*, 2006; 12: 3007-19.
50. F. Şahin GS, S. Omay. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. Şahin F, 2005.
51. Lindroos, B.,Suuronen, R., Miettinen, S., The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine, *Stem Cell Reviews and Reports*, 2011; 7: 269–91.
52. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*;7(2):211-28. 2001.
53. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell transplantation*;19(3):279-89. 2010
54. Baran Y, Ural AU, Avcu F, Sarper M, Elci P, Pekel A. Optimization of transfection of green fluorescent protein in pursuing mesenchymal stem cells in vivo. *Turkish journal of haematology: official journal of Turkish Society of Haematology*, 2008;25(4):172-5.
55. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plastic and reconstructive surgery*;124(3):804-15. 2009.
56. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Annals of plastic surgery*;65(2):237-44. 2010

57. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2008;121 (January):50–8.
58. Ataman MG, Uysal CA, Ertas NM, Bayraktar N, Terzi A, Borman H. The effect of adipose stromal vascular fraction on transverse rectus abdominis musculocutaneous flap: an experimental study. *J Plast Surg Hand Surg* 2016;50(October (5)):272–80.
59. Eyuboglu AA, Uysal CA, Ozgun G, Coskun E, Ertas NM, Haberal M. The effect of adipose derived stromal vascular fraction on stasis zone in an experimental burn model. *Burns* Vol 44, Issue 2, March 2018, Pages 386-396.
60. Pavlidis M, Stupp T, Naskar R, Cengiz C, Thanos S. Retinal ganglion cells resistant to advanced glaucoma: a postmortem study of human retinas with the carbocyanine dye Dil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5196–205.
61. FluoProbes. Lipophilic carbocyanine fluorescent dyes for membrane labeling (FT-46804A) (product manual).Fluoprobes/Interchim; 2015.
62. Reddy GK, Enwemeka SK. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical Biochemistry* 29:225-229, 1996.
63. Corcoran ML, Hewitt RE, Kleiner Jr DE, Stetler-Stevenson WG. MMP-2: expression, activation and inhibition. *Enzyme Protein* 1996;49:7–19.
64. Bonetti LR, Leoncini G, Daperno M, Principi MB, Baronchelli C, Manenti S, Caprioli F, Armuzzi A, Caputo A, Parente P, Cadei M, Villanacci V, Histopathology of non-IBD colitis practical recommendations from pathologists of IG-IBD Group. *Dig Liver Dis.* 2021 Aug;53(8):950-957.
65. Leupin N , Curshmann J , Kranzbuler H , et al. Acute radiation colitis in patients treated with short-term preoperative radiotherapy for rectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2002;26:498–504 .
66. Haagen Nielsen O , Vainer B , Rask-Madsen J . Non-IBD and noninfectious colitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2008;5:28–39 .
67. Petrelli, Fausto MD, Trevisan, Francesca MD, Cabiddu, Mary MD, Sgroi, Giovanni MD, Bruschi, Lorenza MD, Rausa, Emanuele MD, Ghidini, Michele MD, Turati, Luca MD, Total Neoadjuvant Therapy in Rectal Cancer A Systematic Review and Meta-analysis of Treatment Outcomes. *Annals of Surgery* 271(3):p 440-448, March 2020.
68. Glimelius B, Radiotherapy in rectal cancer. *British Medical Bulletin*, Volume 64, Issue 1, December 2002, Pages 141–157.
69. Wilkinson N, Management of Rectal Cancer. *Surg Clin North Am.* 2020 Jun;100(3):615-628.
70. Popek S, Tsikitis VL, Neoadjuvant vs adjuvant pelvic radiotherapy for locally advanced rectal cancer: Which is superior? *World J Gastroenterol.* 2011 Feb 21;17(7):848-54.
71. G. Brisinda et al. Colonic anastomotic leak: risk factors, diagnosis, and treatment. *J. Am. Coll. Surg.* 2009.
72. D.M. Hayden et al. Patient factors may predict anastomotic complications after rectal cancer surgery: anastomotic complications in rectal cancer, *Ann. Med. Surg.* 2015.
73. Sarcher T, Dupont B , Alves A, Menahem B, Anterior resection syndrome: What should we tell practitioners and patients in 2018? *J Visc Surg.* 2018 Oct;155(5):383-391.
74. Chambers WM, Mortensen NJ. Postoperative leakage and abscess formation after colorectal surgery. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:865–880.

75. Vignali A, Fazio VW, Lavery IC, et al. Factors associated with the occurrence of leaks in stapled rectal anastomoses: a review of 1,014 patients. *J Am Coll Surg* 1997;185:105–113.
76. Caziuc A, Calin Dindelegan G, Pall E, Mironiuc A. Stem cells improve the quality of colonic anastomoses - A systematic review. *Journal of BUON: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 2015; 20(6): 1624-9.
77. Ceelen W, El-Malt M, Cardon A, Berrovoet F, Neve WD, Pattyn P: Influence of preoperative high-dose radiotherapy on postoperative outcome and colonic anastomotic healing: experimental study in the rat. *Dis Colon Rectum*, 44:717-721, 2001.
78. El-Malt M, Ceelen W, De Meerleer G, Verstraete A, Boterberg T, Van Belle S, de Hemptinne B, De Neve W, Pattyn P, Influence of preoperative combined radiochemotherapy on surgical outcome and colonic anastomotic healing: experimental study in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Jul 15;50(4):1073-8.
79. Yoo JH, Shin JH, An MS, Ha TK, Kim KH, Bae KB, et al. Adipose-tissue-derived Stem Cells Enhance the Healing of Ischemic Colonic Anastomoses: An Experimental Study in Rats. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*. 2012; 28(3): 132-9.
80. Cronin K, Jackson D S, Dunphy J. E. Specific activity of hydroxyproline tritium in the healing colon. *Surg Gyn Obst*, 1968; 1260: 1061-65.
81. Yang Y, Wang Q, Luo J, Jiang Y, Zhou R, Tong S, Superoxide Dismutase Mimic, MnTE-2-PyP Enhances Rectal Anastomotic Strength in Rats after Preoperative Chemoradiotherapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Apr 13;2020:3509859.
82. Ågren MS, Andersen TL, Mirastschijski U, Syk I, Schiødt CB, Surve V et al, Action of matrix metalloproteinases at restricted sites in colon anastomosis repair: an immunohistochemical and biochemical study. (2006) *Surgery* 140:72–82.
83. Waddell A, Ahrens R, Steinbrecher K. et al. Colonic eosinophilic inflammation in experimental colitis is mediated by Ly6Chigh CCR2+ inflammator monocyte/macrophage-derived CCL11. *J Immunol*. 2011 May 15; 186(10): 5993-6003.