



T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA VE YAĞ DOKUSU KAYNAKLI
STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

İbrahim SAĞLAM

Ekim-2012

T.C.

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA VE YAĞ DOKUSU KAYNAKLI

STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİ

ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hazırlayan

İbrahim SAĞLAM

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Furkan Erol Karabekmez

Ekim-2012

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA,

İbrahim Sağlam'a ait "Trombositten Zengin Plazma ve Yağ Dokusu Kaynaklı Stromal Vasküler Fraksiyonun Flep Yaşayabilirliği Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir. .../.../2012

Akademik Unvan, Ad, Soyad

İmza

Üye Yrd. Doç. Dr. Furkan E. Karabekmez (Tez Danışmanı)

.....

Üye Prof. Dr. Metin Görgü

.....

Üye Yrd. Doç. Dr. Tayfun Apuhan

.....

Üye Yrd. Doç. Dr. Akcan Akkaya

.....

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Hasan Koçoğlu

Tıp Fakültesi Dekanı

Uzmanlık tezi olarak sunduğum, “Trombositten Zengin Plazma ve Yağ Dokusu Kaynaklı Stromal Vasküler Fraksiyonun Flep Yaşayabilirliği Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı çalışmanın yazılmasında, bilimsel ve etik kurallara uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda afitta bulunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin tamamının ya da bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitede bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim./....../2012

İmza

İbrahim Sağlam

Uzmanlık eğitimim sırasında klinik ve cerrahi deneyimi yanı sıra, plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi etik ve kültürünü bizlere yansıtan, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Metin Görgü'ye,

İyi bir plastik cerrah olabilmem için uzmanlık eğitimim sırasında bilgi, davranış ve tecrübeleri ile büyük emek veren hocalarım, Yrd. Doç. Dr. Furkan E. Karabekmez, Doç. Dr. Kaan Gideroğlu, Doç. Dr. Şükrü Yazar ve Doç. Dr. Dilek Şenen'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım Dr. Ali Gökkaya, Dr. F. Burak Efeoğlu, Dr. Şerif Yavuz, Dr. İstemihan Öztürk'e ve diğer anabilim dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin deney kısımlarını gerçekleştirdiğim AİBÜ Deneysel Hayvan Araştırmaları Laboratuvarı, Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı ve Embriyoloji ve Histoloji Anabilim Dalı hoca, asistan ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde emeği ve desteği ile yanımda olan, benim için endişelenip duran sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Her zaman sevgisini ve desteğini yanımda hissettiğim değerli eşim Elvan Sağlam'a,

TEŞEKKÜR EDERİM

ÖZET

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA VE YAĞ DOKUSU KAYNAKLI STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

İbrahim Sağlam

Uzmanlık Tezi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Furkan E. Karabekmez

Bolu, Ekim 2012.

Flep cerrahisi plastik cerrahide defekt kapamada en sık kullanılan doku onarım tekniklerindendir. Flep cerrahisinin başarısı flep yaşayabilirliği ile paralel seyretmektedir. Bu nedenle birçok çalışmada flep yaşayabilirliğini arttıran ajanlar ve yöntemler denenmiştir. Plateletten zengin plazma ve adipoz doku kaynaklı stromal vasküler fraksiyon da içeriklerindeki çok sayıda büyüme faktörü ve pluripotent hücreler nedeni ile tıbbın her alanında olduğu gibi plastik cerrahide de giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır. Bu çalışmada amacımız flep yaşayabilirliğini arttırmada, ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında, PRP ve SVF'nin random paternli deri flepleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve karşılaştırmaktır.

Bu amaçla 24 adet 250-350 gr. dişi sıçan rastgele 4 guruba ayrıldı. Donör olarak seçilen 10 adet başka sıçandan PRP ve SVF hazırlanması amacı ile tüm vücut kanları ve bilateral inguinal yağ yastıkları toplandı. Alınan dokulardan hazırlanan ürünler flep yapılması planlanan alanlara deri altına enjekte edildi (Grup I:Kontrol, GrupII:PRP, GrupIII:SVF, GrupIV:PRP+SVF). Değerlendirme amacı ile postoperatif 3. günde ve 7. günde doku örnekleri toplandı. Ayrıca flep alanları fotoğraflanarak nekroza giden alanlar hesaplandı.

Tüm denekler prosedürleri iyi tolere etti. Tüm tedavi gruplarında flep yaşayan oranları, nötrofil invazyonu, yeni oluşan damar sayısı, VEGF ve bFGF ekspresyonu düzeyleri bakımından kontrol gurubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi. Tedavi gruplarının arasında ise anlamlı fark bulunamadı.

PRP ve SVF kolay elde edilen, yan etki profilleri düşük otolog ürünlerdir. Etkilerini içerdikleri büyüme faktörleri ve proaktif hücreler yolu ile gösterirler. Çalışmamızda, bu iki ürünün flep yaşayabilirliğini anlamlı derecede arttırdığını gösterdik. İki ürünün flep yaşamını arttırmada birbirlerine üstünlüğünü saptayamadık. İki ürün birlikte kullanıldığında ise yaşayabilen flep oranında artış olsa da bu artış istatistiki olarak anlamlı bulunamadı. Yapılacak daha ileri araştırmalar ile kolay elde edilebilen bu iki otolog ürünün flep yaşayabilirliğini arttırmada daha güvenle kullanılabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler : Flep yaşayabilirliği,Plateletten zengin plazma, Stromal vasküler fraksiyon

ABSTRACT

EVALUATION OF EFFECTS OF PLATELET RICH PLASMA AND ADIPOSE TISSUE DERIVED STROMAL VASCULAR FRACTION ON FLAP VIABILITY

Flap surgery is main tissue reconstruction technique in plastic surgery and its success is parallel to flap viability. There are numerous study in literature aimed to enhance flap viability. Due to their rich growth factor and pluripotent cell contents, platelet rich plasma (PRP) and adipose tissue derived stromal vascular fraction (SVF) are being used increasingly in all areas of medicine as well as plastic surgery. In this study, we aimed to evaluate and compare the effects of PRP and SVF on flap viability when used separately and together.

Twenty-four, 250-350 gr weighted female rat were divided into 4 groups randomly. For preparation of PRP and SVF whole body blood and bilateral ingunal fat pads were collected from 10 donor rats. Prepared products were injected subcutaneously to the flap area (Group I: Control, GroupII:PRP, GroupIII:SVF, GroupIV:PRP+SVF). For evaluation tissue samples were collected at 3. and 7. postoperative days. Digital photos were taken at postoperative 7. day.

All subjects were well tolerated the surgical procedures. In all treatment groups, there were statistically significant difference compared to the control group, according to viable flap areas, neutrophil invasion, neoangiogenesis, VEGF and bFGF expressions. There was no statistically significant difference between treatment groups.

PRP and SVF are autolog prducts with easy preparation and low side effect profiles and show their effects with growth factors and proactive cells. In this study we showed that these two product enhanced flap viability significantly. There was no advantage of thisproducts when compared to the other. We think that, with further investigations, PRP and SVF will be used safely in enhancing flap viability.

Keywords: Flap viability, Platelet Rich Plasm, Stromal Vascular Fraction

İçindekiler

ÖZET	VI
ABSTRACT	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
RESİMLER DİZİNİ	XIII
TABLOLAR DİZİNİ.....	XIV
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Derinin Yapısı	3
2.2. Derinin Kanlanması.....	4
2.3. Flepler.....	8
2.3.1. Deri Fleplerinin Sınıflandırılması.....	10
2.3.2. Modifiye McFarlane Flebi	14
2.4. Flep Fizyolojisi	15
2.5. Deri Kan Akımının Regülasyonu	16
2.6. Geciktirme (Delay) Fenomeni	19
2.7. Flep Nekrozu	20
2.8.1. Fiziksel Faktörler.....	24
2.8.2. Farmakolojik Faktörler	25
2.9. Trombositten Zengin Plazma	31
2.9.1. Trombositlerin Yapısı ve İçerikleri	31

2.9.2. Büyüme Faktörleri	33
2.9.3. Trombositten Zengin Plazma (PRP = TZP = trombosit jel = büyüme faktörlerinden zengin plazma)	41
2.10. Kök Hücreler.....	44
2.10.1. Genel Bilgiler	44
2.10.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	47
2.10.3. Mezenkimal Kök Hücreler	48
2.10.4. Kök Hücrelerin Potansiyel Kullanım Alanları	50
2.10.5. Adipoz Doku	52
2.10.6. Kök Hücre Kaynağı Olarak Adipoz Doku.....	53
2.10.7. Stromal Vasküler Fraksiyon	54
3. GEREÇ ve YÖNTEM	57
3.1. İşlemler:	57
3.1.1. PRP'nin Hazırlanması	57
3.1.2. SVF'nin Hazırlanması.....	59
3.1.3. Anestezi.....	61
3.1.4. Enjeksiyonlar	61
3.1.5. Cerrahi.....	63
3.2. Değerlendirme	64
3.2.1. Genel Değerlendirme.....	64
3.2.2. Flep Nekroz Alanlarının Değerlendirilmesi.....	64

3.2.3. Histolojik Değerlendirme	64
3.2.4. VEGF ve bFGF Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	65
3.2.5. İstatistiki Değerlendirme.....	66
4. Bulgular	66
4.1. Genel Değerlendirme	66
4.2. Flep Nekroz Alanlarının Değerlendirilmesi	67
4.2.3. Histolojik Değerlendirme	69
4.2.4. VEGF ve bFGF Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	71
5. Tartışma.....	74
6. Sonuç.....	81
KAYNAKLAR	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 1 - Dermisin yapısı	3
ŞEKİL 2 - Dermisin kanlanması	4
ŞEKİL 3 - Deri fleplerinin vasküler anatomiye göre sınıflaması	11
ŞEKİL 4 - Reperfüzyon sırasında direkt olarak hücresel hasar oluşturabilen toksik oksijen radikallerinin oluşumu	23
ŞEKİL 5 - Trombosit yapısı	31
ŞEKİL 6 - Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması	48

RESİMLER DİZİNİ

RESİM 1	55
RESİM 2	58
RESİM 3.....	58
RESİM 4	60
RESİM 5	61
RESİM 6	62
RESİM 7	63
RESİM 8	64
RESİM 9	64
RESİM 10	67
RESİM 11	68
RESİM 12	70

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO 4-1	69
TABLO 4-2	71
TABLO 4-3	72
TABLO 4-4	73
TABLO 4-5	74

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Plastik ve rekonstrüktif cerrahide yaygın olarak kullanılan, flep cerrahisinin başarısı flep yaşayabilirliği ile paralel gitmektedir ve bu nedenle kısmi ya da tam kayıplar halen plastik cerrahinin önemli bir problemi olmaya devam etmektedir. Bu istenmeyen kayıpları azaltabilmek amacıyla hastanın, defektin, verici bölgenin durumları ve cerrahi şartlar ideale getirilmeye çalışılmıştır. Birçok çalışmada farmakolojik ajanlar, lazerler ve çeşitli büyüme faktörleri flep yaşayabilirliğini arttırmak için kullanılmıştır.

Trombositten zengin plazma (Platelet Rich Plasm, PRP); Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), Transforming Büyüme Faktörü α ve β (TGF α ve β), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) vb. büyüme faktörlerini içeren ve kanın farklı iki frekansta santrifüj edilmesiyle oluşan bir maddedir. Bu ürüne trombin ilavesiyle trombositlerin α - granüllerinden çok sayıda mediatör salınır. Bunların hemen hepsi yara ve kemik iyileşmesinde görev alan ve angiogenez üzerinde de etkili olan mediatörlerdir. Bunun yanında otolog olarak üretilebiliyor olması son yıllarda özellikle kemik iyileşmesinde ve zor iyileşen yaraların tedavisinde klinik kullanım alanı bulmasına sebep olmuştur. Yapılan klinik çalışmalarda yara ve kemik iyileşmesini hızlandırdığı; şişliği, ağrıyı, enfeksiyonu ve skarı azalttığı, kanama kontrolü sağladığı iddia edilmektedir.

Son yıllarda, tıbbın başka alanlarında olduğu gibi, plastik ve rekonstrüktif cerrahide de hücresel tedaviler ilgi görmektedir. Adipoz doku kaynaklı stromal vasküler fraksiyon (SVF), içerisinde adipoz doku kaynaklı kök hücreler, progenitör endotel hücreleri, hematopoetik öncü hücreler, T hücreleri ve anti-inflamatuar hücreler içeren heterojen

bir otolog üründür. Esas etkisi içeriğindeki adipöz kaynaklı kök hücelere bağlıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin anjiogenez ve anti-apoptoz ile ilişkili çeşitli büyüme faktörleri salgıladıkları ve hem in vivo hem de in vitro olarak endotel hücrelerine dönüşebildikleri gösterilmiştir. Kök hücre tedavilerinin aksine SVF'nin elde edilmesi oldukça kolay ve hızlıdır. Ayrıca SVF'nin lokal olarak uygulandığında, VEGF ve bFGF gibi proanjiogenetik faktörler aracılığı ile flep yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir.

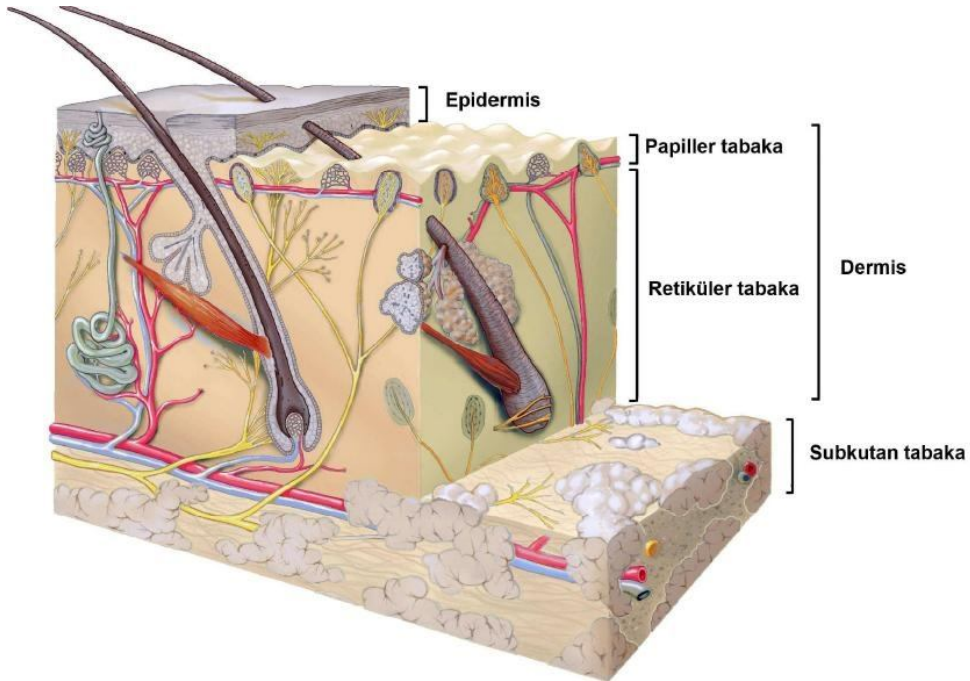
Hem PRP hem SVF, etkinlikleri kanıtlanmış, bol miktarlarda elde edilebilen otolog ürünler olduğu için, hücresel tedavilerde giderek artan sayıda çalışmaya konu olmaktadır. Buna rağmen literatürde, bu iki ürünün flep yaşayabilirliğini arttırmadaki rolü üzerine yeterli sayıda çalışma yoktur.

Bu çalışmada rat dorsal derisinde kaldırılan McFarlane flebinde, lokal olarak uygulanan PRP ve SVF'nin, flep yaşayabilirliğine olan etkisini araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Yapısı

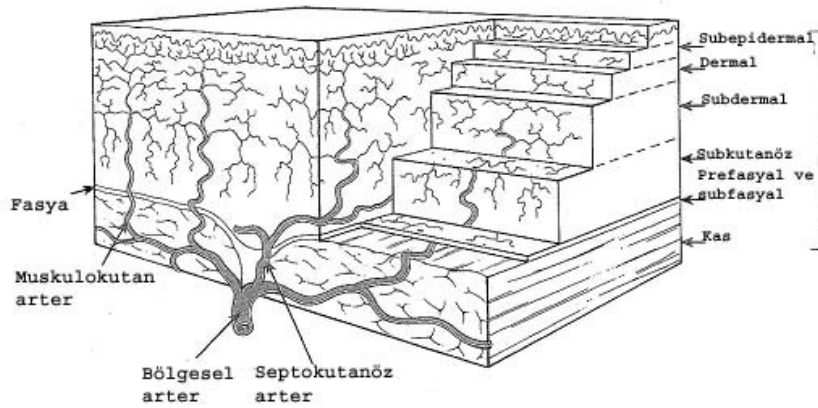
İnsan vücudunu kaplayan en geniş yüzeyli organ olan deri vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını teşkil eder. Ektoderm ve mezodermden köken alan deri esas olarak epidermis ve dermis adı verilen iki tabakadan oluşur. Derinin kalınlığı 1,5-4 mm arasında değişirken epidermis kalınlığı göz kapağında 0,04 mm; ayak tabanında ise 1,4 mm olmak üzere değişir. Dermis ve epidermis birleşme yeri düzensizdir ve papilla denilen uzantılar bulunur. Dermiste non-sellüler bağ doku elemanları ve arasında sinirler, kan damarları, lenfatikler, kas üniteleri, pilosebace, erkin ve apokrin üniteleri bulunur. Dermisin altında ise içinde yağ hücreleri bulunduran gevşek bağ dokusu bulunur (Şekil 1).



Şekil 1: Dermisin yapısı

2.2. Derinin Kanlanması

Cildin mikrovasküler çatısını arterioller, terminal arterioller, postkapiller venüller, kolektör venüller ve musküler venüller içermektedir (1). Arterioller direkt veya indirekt olarak cildin arteriyel dallarından köken almaktadır. Derinin kanlanması deriye sadece oksijen sağlamaz, bunun yanında, bu kan akımı sayesinde, termoregülatuar ve immünolojik bir dizi işlev yerine getirilmiş olur. Derinin damarsal ağı bölgeden bölgeye farklılık gösterir. Cormack ve Lamberty deri fleplerinin arteriyel anatomisini, fasyokutanöz arterler, muskulokutanöz perforatör arterler ve direk kutanöz arterler şeklinde sınıflamıştır (2). İnsanda derinin kanlanması muskulokutanöz arterler ve septokutanöz arterler aracılığı ile olur. Muskulokutanöz arterler random patern fleplerin kaldırılabilmesine olanak tanırken septokutanöz arterler, aksiyel patern fleplerin oluşmasını sağlarlar. Deri, kan desteğini üç farklı anatomik seviyede bulunan beş ayrı katmanın birbiri ile köprü oluşturması ile meydana getirdiği damar ağı ile sağlar (2). Bu anatomik seviyeleri fasya, subkutan yağ dokusu ve deri oluştururken, damar ağı ise, fasyal pleksus, subkutanöz pleksus, subdermal pleksus, dermal pleksus ve subepidermal pleksustan oluşur (Şekil 2).



Şekil 2: Dermisin kanlanması

Fasyal pleksus: Kaynak arterden gelen damarlar derin fasya seviyesinden geçerek pleksus oluştururlar. Bu nedenle flep cerrahisi sırasında derin fasyanın flebe dâhil edilmesi flep yaşamı açısından güvenlidir. Fasyal pleksus iki şekildedir. Bunlar, fasyanın altında yer alan subfasyal pleksus ve fasyanın üstünde yer alan prefasyal pleksustur. Subfasyal pleksus ise nispeten minör karakterdedir. Flebin yaşamını temin etme kabiliyetinden yoksundur. Prefasyal pleksus baskın dağılım sistemidir. Fasyokutan, muskulokutan ve septokutan arterlerden beslenir(3). Vücudun değişik bölgelerinde bunların katkı oranlar değişmektedir. Örneğin ekstremitelerde septokutan sistem ağırlıktayken, gövdede muskulokutaneal sistem dominant olmaktadır.

Subkutan pleksus: Subkutan yağ dokusu içinde yer alan, derin ve yüzeysel olmak üzere subkutan yağ dokusunu ikiye bölen, yüzeysel fasya içinde bulunan arterlerden ve venlerden oluşmuş horizontal ve lineer yerleşimli bir vasküler pleksustur.

Subdermal pleksus: Derinin primer kan akımını sağlar. Subkutan pleksustan uzanan dallar retiküler dermisle alttaki subkutan yağ dokusu arasında bu pleksusu oluşturur. Buradan çıkan dallar altta ve üstte uzanarak deri, adipoz doku ve deri eklerini besler. Dermal pleksusa verdiği dallar arasında bulunan yaygın anastomozlar kanlanmayı olağanüstü artırmaktadır. Bu pleksusun ana görevi en üstte bulunan iki pleksusun beslenmesidir. Venöz dolaşım ağına da sahip olmasına karşın hakim olan vasküler yapı arterlerdir.

Dermal ve subepidermal pleksuslar: Bu pleksuslar gerçek deri kan dolaşımını sağlarlar. Dermal papiller çıkıntılarının alt sınırından dermo-epidermal bölgeye kadar mevcuttur. Dermal pleksusta hakim olan yapı arteriyollerdir. Bunlar izole kas alanlarına sahiptirler ve termoregülasyon primer fonksiyonlarıdır. Subepidermal pleksusta hakim olan vasküler yapı ise kapiller damarlardır ve bunların ana görevleri beslenmedir (3).

Segmental damarlar derin dokulardan yüzeyel dokulara doğru ilerlerken her biri vücudun belirli bölgesini besleyen damarlar verirler. Bu damarlar kaslar arasındaki fibröz septaları izleyerek, bazıları direkt olarak deriye, çoğu ise kas içine giden dallara ayrılırlar.

Direkt olarak deriye giden dallara septokutan damarlar, kaslar içinden geçerek deriye ulaşan damarlara muskulokutan damarlar adı verilir. Septokutan damarların bir kısmı deri altında yüzeyel olarak seyrederek, direkt olarak deriyi besleyen bu damarlar, direkt kutanöz damarlar olarak adlandırılırlar. Deride derin pleksus, subkutanöz doku ile derin dermis arasında bulunur. Yüzeyel pleksus, papiller ve retiküler dermis birleşiminde bulunur. Mikrodolaşım, kan akımının lokal kontrolünü ve dokuların beslenmesini sağlayan damarlardan oluşur (4). Derinin normal total kan akımı 20 ml/100 gr/dk' dır. Kan akımı, ısı artışı ve akut sempatik blokajla artar. Artmış kan akımı, kapillerleri atlayarak arteriyovenöz anastomozlar yoluyla deriye ulaşır (5).

Mikrodolaşım, 300µ'dan küçük arteriollerle baslar ve terminal arterioller, prekapiller sfinkterler, kapiller, postkapiller venüller, toplayıcı venüller ve musküler venüllerle devam eder (1, 6).

Dermis ve subkutan doku bileşkesinde yer alan mikrodolaşım sistemini yüzeyel, orta ve derin olmak üzere üç damar pleksusu oluşturur. Yüzeyel ve derin pleksusta arterler ve venler, orta pleksusta ise esas olarak venler bulunur. Yüzeyel pleksus ısı değişimi ve beslenme, orta pleksus ısı değişimi ve savunma mekanizmaları, derin pleksus ısı korunması ve şant mekanizması fonksiyonlarına sahiptir (1).

Arterioller; direkt kutanöz, fasyokutan ve muskulokutan sistemin terminal damarlarından köken alır. Subkutan dokuda ilerleyerek lümen içi çapları 30µ' a düşer. Dallanarak, çapları 10-30µ olan terminal arterioller ve subdermal pleksusu oluştururlar.

Prekapiller sfinkterde damar içi çapları 30 μ 'dan 10 μ 'a düşer. Burası, kan akımı kontrolünün sona erdiği bölgedir ve damar duvarı innerve düz kas içerir. Kapillerler 3-7 μ çapa sahiptir ve endotel, bazal lamina ve perisitleri içerir. Kapillerlerden sonra çapları 8'den 30 μ ' a değişen postkapiller venüller baslar. Bunlar birleşerek çapları 50 μ olan toplayıcı venülleri oluşturur (2, 5). Arterioller, prekapiller sfinkterler ve arteriyovenöz anastomozlarda sempatik innervasyon bulunur. arteriyovenöz anastomozlar, 50 μ çapında arteryel ve venöz dolaşımı birleştiren şantlardır. Sinirsel veya kimyasal uyarana cevap verme yeteneğine sahip zengin bir sinir ağı ile çevrilidir. Bu şantlar yoluyla kan akımı kapiller yatağı atlar ve bir kapillerden 600 kat fazla kan akımına sahiptir (2, 6). Deri ve subkutan dokuların venöz drenajı iki sistemle gerçekleşir; birincisi geniş kapasitesi olan yüzeysel subdermal venöz sistem, ikincisi ise kutanöz arterlere eşlik eden vena komitanteslerdir (7). Derinin venöz drenajı, vena kominikanlar ve vena komitanteslerden oluşan perforatör venler aracılığı ile derin venlere doğru yönlendirilir. Kominikan venler subkutanöz venöz pleksusu derin venlere bağlayan büyük venlerdir. Beraberinde kutanöz arter eşlik edebilir. Vena komitantesler subkutanöz yağ dokunun derin kısmını drene eder, direkt veya indirekt yollarla derin venlere dökülürler. Deri kapiller yoğunluğu 16-55/mm²'dir. (Bu oran iskelet kasında 1000-2000/mm²'dir). Subdermal pleksus derinin primer kan kaynağı sayılmaktadır (8). Lenfatik sistem; lenfatik kapiller, toplayıcı lenfatikler ve lenf kanallarından oluşur ve mikrodolaşımın bir alt yapısıdır. Flep kaldırıldığında bu lenfatik kanallar hasara uğrayarak flepte ödem gelişimine yol açabilirler. Flep kaldırılması ile hücre içi ve dışı basınçlardaki değişiklikler sonucu oluşan ödem, hücrelerin beslenmesi için gerekli diffüzyonu ve dolaşımı zorlaştırır.

Deri dolaşımının sistemik kontrolü: En önemli etken sinir sistemidir. Hipotalamus tarafından kontrol edilir. Damar duvarlarındaki alfa-adrenerjik ve seratoninerjik reseptörler vazokonstriksiyon, beta-adrenerjik reseptörler ise vazodilatasyona yol açarlar. Sempatik tonusun azalması, özellikle arteriovenöz anastomozlarda belirgin vazodilatasyona, artması da vazokonstriksiyona neden olur. Humoral düzenleme sistemi içerisinde adrenalin ve noreadrenalin doğrudan alfa-adrenerjik reseptörleri etkileyerek vazokonstriksiyona neden olurlar. Serotonin vazokonstriktör, histamin ve bradikinin ise vazodilatör etki gösterir. Araşidonik asit metabolitlerinden tromboksan A2 ve PGF2-alfa güçlü vazokonstriktör, PGE1 vazodilatör etkilidir. Prostosiklin güçlü bir vazodilatör ve trombosit agregasyon inhibitörüdür. Lökotrienlerin deri dolaşımını artırdıkları gösterilmiştir (5).

Deri dolaşımının lokal kontrolü: Metabolik düzenlemede deride fazla olmamakla birlikte; hiperkapni, hipoksi, asidoz ve interstisyel potasyum artışı vazodilatasyona neden olur. Fiziksel düzenlemede perfüzyon basıncının artışı damarlarda gerilmeye yol açarak vazokonstriksiyonu tetikler. Bu, miyojenik refleks sayesinde kapiller akım arter basıncından etkilenmeksizin sabit bir düzeyde tutulur. Lokal hipotermi kan akımını azaltır, bu da vazodilatasyonu uyarır. Viskozite ise kan akımını sadece ciddi iskemi durumlarında etkilemektedir (9).

2.3. Flepler

Fleplerin rekonstrüktif cerrahide kullanımları M.O. 600'lu yıllara dayanır. İlk kayıtlı flep kullanımı, Sushruta Samhita'nın nazal rekonstrüksiyon amaçlı pediküllü flepleri kullandığını işaret etmektedir. Başlarda baş boyun ve alt ekstremitelerde yara iyileşmesinde zorluklarla karşılaşıldığı için, bu bölgelerde random flepler denenmiştir

(10). Tagliacozzi iki aşamalı olarak distal bazlı kol fleplerini kullanmıştır. Venice 1557 yılında onun çalışmalarını yayınlamıştır.

19. yy'a kadar bir süreçte bu bilgilerin hepsi unutulmuş, durağan süreç başlamıştır. Carpue alın fleplerini başarılı bir şekilde kullanması ile 20. yy'da yeniden ilerleme dönemine girilmiş ve ilk kez random tüp flepler kullanılmaya başlanmıştır. Yine bu dönemde fleplerde delay ile flep yaşamını arttırma prosedürü yapılmaya başlanmıştır. Carl Manchot, bir Alman anatomist, 1889'da deride kanlanmayı sağlayan anatomik bölgeleri tanımlamıştır (11). Tansini 1906'da latissimus dorsi muskulokutan flebi tanımlamıştır (12).

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

1977'de Ger Atlanta'da ilk kez kas ve kas-deri fleplerini, 1981'de Ponten fasyo-kutan flepleri tarif etmiştir. 1981'de Mathes ve Nahai kas fleplerini vasküler anatomiye göre sınıflamışlardır (13). 1987 de Taylor anjiozomları tarif etmiştir (14). Deri fleplerini greftlerden ayıran en önemli fark fleplerin perfüzyonlarını sağlayacak kendilerine ait kan damarları olmasıdır. Flebin kanlanmayı sağlayan bölümüne flebin pedikülü denilir. Deriye kan sağlayan vasküler sistemde direk kutanöz arterler, fasyokutan arterler, muskulokutan arterler yer alır. Flepler genel olarak alıcı sahada yetersiz kanlanma olan bölgelerde gereklidirler. Tam kat göz kapağı, dudak, kulak, burun ve yanaklarda, vücudun çıkıntılarında bulunan defektler bu bölgelere örnektir. Spesifik doku olarak kanlanması olmayan alanlar ise periosteumsuz kemik, perikondriumsuz kıkırdak,

paratenonsuz tendondur. Bu bölgelerde de, greftin difüzyonla gerçekleşen beslenmesi sağlanamadığından, fleple rekonstrüksiyonu gerekli kılar (15, 16).

2.3.1. Deri Fleplerinin Sınıflandırılması

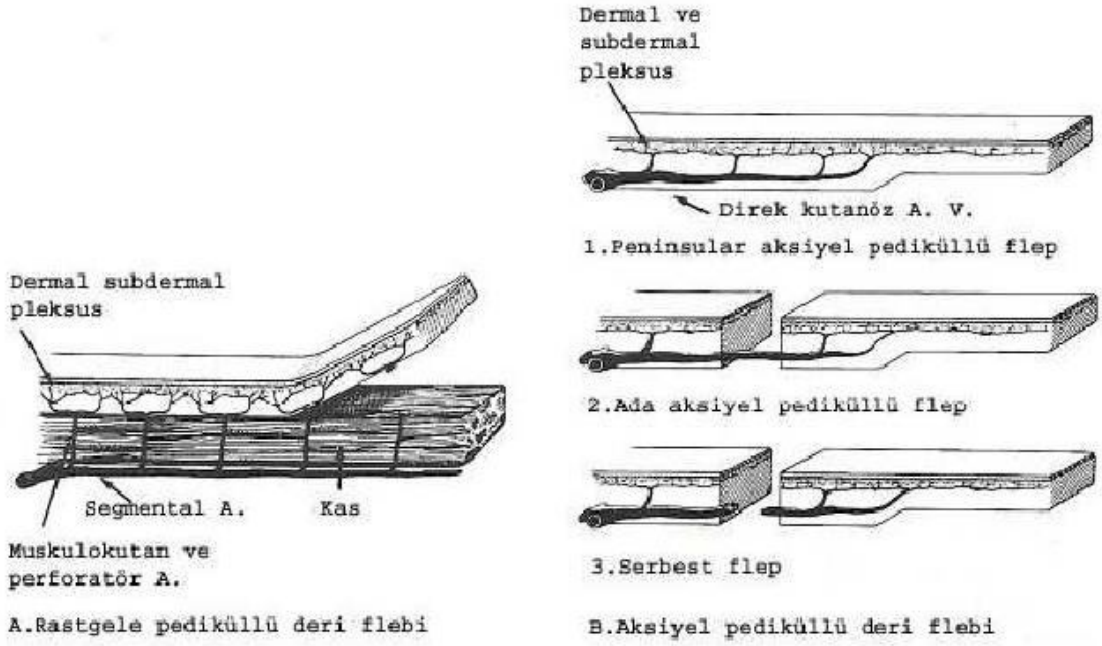
2.3.1.1. Vasküler Anatomiye Göre Sınıflandırılması

2.3.1.1.1. Random Paternli Flepler

Random vasküler pediküllü dizayn edilen fleplerdir. Lokal kutanöz flepler olarak da bilinen random paternli deri flepleri, muskulokutan veya perforatör arterlerin dallarının oluşturduğu subkutan pleksuslar ile beslenirler. Pedikülünden spesifik bir arter ve ven geçmez. Vücudun herhangi bir bölgesinden hazırlanabilir. Uzunluk ile genişlik arası oran alt ekstremitede yaklaşık 2:1 iken bu oran bas boyunda 4:1 olmalıdır. Bu flep oranları genişletilecekse delay işlemi uygulanmalıdır (15-17).

2.3.1.1.2. Aksiyel Tasarımli (Arteriyel) Flepler

Angiozomu belli deri lokalizasyonlarından dizayn edilirler. Arterleri ismi ile bilinen arterlerdir, pedikülden flebe arter ve ven girer ve bu arterler boyunca kaldırılırlar. Random paternli fleplere göre daha sağlam ve uzun fleplerdir. Flebin genişliği ve uzunluğu arasındaki oran 1:5-6'ya kadar çıkabilir. Bu fleplerin proksimali direk kutanöz arter ile beslenirken distali random flepler gibi dermal subdermal pleksusla beslenirler. Proksimalde direk kutanöz arter fasya altında seyrettiği için daha kalınlaşırlar. Direk kutanöz arter ve ven pedikülüne sahipse, yarım ada flep “Peninsular axial pattern flap”, pedikülünde vasküler sistem ve etrafındaki yumuşak doku kalacak şekilde kaldırılmış ise ada flep “Island axial patern flap” ve pedikülü donör alandan ayrılıp alıcı sahadaki vasküler sisteme anastomoz yapıldı ise serbest flep “Free flap” adını alırlar (Şekil 3). Derin ve yüzeysel venlerle drene olurlar (15-17).



Şekil 3: Deri fleplerinin vasküler anatomiye göre sınıflaması

2.3.1.2. Hareketlerine göre Sınıflandırılması

2.3.1.2.1. Lokal Flepler

Defekt alanına en benzer alanlarla onarım en uygun olandır. En çok defekt alanına benzeyen ise defekte komsu bölgelerdir. Lokal fleplerde bu komsu bölgeler kullanılır. Lokal deri flepleri ikiye ayrılırlar. Bir pivot nokta etrafında dönen flepler (rotasyon, transpozisyon ve interpolasyon flepleri) ve ilerletme flepleri (tek pediküllü ilerletme flepleri, V-Y ilerletme flepleri Y-V ilerletme flepleri ve çift pediküllü ilerletme flepleri). Yashılarda lokal flepleri uygulamak ve yeni yerlerine adapte etmek genç hastalara göre daha kolaydır.

Döner ve transpoze olan fleplerde en fazla gerim kuvveti, pivot nokta ile flebin en distal parçası arasında oluşur. Planlama yapılırken bu gerim hattına dikkat edilmeli ve flep uzunluğu yeterli planlanmalıdır (16).

2.3.1.2.1.1. Rotasyon Flebi

Rotasyon flepleri derinin ve subkutan dokunun “semisirküler flepler”dir. Bir pivot nokta etrafında defekt noktasına doğru dönerler. Donör alan deri grefti ile primer olarak kapatılabilir. Flep eğer çok gergin ise pivot nokta bölgesine “back-cut” kesi yapılır. Böylece gerilim noktaları olan pivot bölge ve flep en distali arasındaki mesafe uzatılmış, bu noktalar arasındaki gerim kuvveti azaltılmış olur. Bu işlem yapılırken pedikül alanı da daraltıldığından işlemin miktarı sınırlıdır. Ayrıca skalpte aponevrotik galea gibi kalın subkutanöz dokular var ise bu durumda da flebin “back cut” noktasından ilerlemesi zor olabilir. Bu gibi durumlarda pivot noktadan bir üçgen doku eksize edilir. Bu işlemde eksize edilen doku parçasına “Burow triangle” denir. Bilobe fleplerde bu gruptadır (15-17).

2.3.1.2.1.2. Transpozisyon Flebi

Deri ve deri altı dokunun kare yada dikdörtgen şeklinde hazırlanıp hemen yanındaki defekt alanına çevrilmesi ile elde edilirler. Flep planlanırken gerimi azaltmak için defekt alanı uzunluğundan bir miktar daha uzun olarak planlanır. Bu da yetmezse “back cut” yapılabilir. Verici alan deri grefti, primer onarım veya sekonder flep ile kapatılabilir. “Z plasty”, “Limberg”, “Dufourmentel”, interpolasyon flepleri bu gruptadırlar (18).

2.3.1.2.1.3. İnterpolasyon Flebi

Bu flepler raket şeklinde planlanan transpozisyon fleplerine benzeyen fleplerdir. Farkları hemen defekt alanı yanından planlanmazlar. Defekt ile aralarında köprü olan sağlam deri dokusu bulunur. Bu köprü dokunun altından ya da üstünden pedikül geçirilir. pedikül flep vaskülarizasyonu sonrasında flepten ayrılabilir. “Monk’s eye lid flap” süperfisyal temporal arter bazlı bir alın flebidir. subkutanöz olarak tünelize edilip alt göz kapağına gelecek şekilde tünelden çıkarılır. Delto-pektoral (Bakamjian) flep,

Littler nörovasküler parmak pulpa flebi gibi ada flepleri ve subkutan pediküllü flepler diğer flep örnekleridir. Bu tur flepler genelde kompozit ada flebi olarak bilinirler (18).

2.3.1.2.1.4. İlerletme Flepleri

Bütün ilerletme flepleri, laterale hareket etmeden, rotasyon hareketi yapmadan direk olarak defekte yönelip ilerlerler. Modifikasyonları tek pediküllü ilerletme flebi ve V-Y ilerletme flepleridir. Tek pediküllü ilerletme flepleri dikdörtgen veya kare olarak dizayn edilirler. subkutanöz dokunun ve derinin gerilmesi ile ilerlerler. Pedikülün her iki yanından Burow's üçgenleri çıkarılarak ilerleme içi gerekli hareket alanı sağlanabilir. V-Y ilerletme fleplerinde deriye V-seklinde insizyon uygulanır. V'nin her iki tarafından defekte doğru flep ilerletilir. Arkada kalan insizyon kapatılır. Nazal kolumella oluşturulması, dudakta küçük çentiklerin düzeltilmesi, deri fleplerinin donör alanlarının kapatılmasında sıklıkla kullanılırlar (15, 16).

2.3.1.2.2. Uzak Flepler

Alıcı alana uzak bir bölgeden hazırlanan fleplerdir.

2.3.1.2.2.1. Direkt Flepler

Üst ekstremité rekonstrüksiyonlarında hala sıklıkla kullanılan fleplerdir. Genelde “random flap”lardır. “cross finger flap”, “thenar flap”, “cross leg flap” bu fleplere birer örnektir ancak serbest flepler bu fleplere alternatif olarak kullanıma girmiştir. Üst ekstremité rekonstrüksiyonlarında “groin flap” McGregor ve Jackson tarafından tanımlanmıştır (19). Bu flep el rekonstrüksiyonlarında sıklıkla kullanılan bir fleptir. 3 hafta kadar bir süre pedikül yardımı ile alıcı sahada revaskülarize olan flep pedikülü ayrılır. Sadece alıcı sahadan perfüze olabilecek hale gelir.

2.3.1.2.2.2. İndirekt Flepler

Vasıtalı flepler olarak da bilinirler. Tüp pedikülü vardır ve aşamalı olarak defekt alanına transfer olurlar. Flep eleve edildikten sonra, eleve edilen kısım tüp hale getirilerek kola nakledilir. Üç hafta sonra pedikülü ayrılarak, kesilen uç defekt alanına aktarılır. Üç hafta sonra flebin kola aktarılan kısmı kesilir ve tamamen defekt alanına aktarılır. Günümüzde çok nadir kullanılan fleplerdir.

2.3.1.2.2.3. Serbest Flepler

Uygun fleplerin besleyici vasküler veya nörovasküler pedikülü ile birlikte verici alandan alınıp, uzaktaki alıcı alan nörovasküler sistemine mikrocerrahi teknikle taşınması prensibine dayanır.

2.3.2. Modifiye McFarlane Flebi

Deneyisel araştırmalarda uygulanmak üzere tanımlanmış birçok flep modeli vardır. Ancak bunlardan bir kısmı uygulama ve takip zorluğu diğer bir kısmı ise güvenilirlik nedeni ile fazla rağbet görmemiştir. McFarlane flebi plastik ve rekonstrüktif cerrahide, flep yaşayabilirliğini araştırmada iyi tanımlanmış, kolay uygulanabilen, güvenilir ve sık kullanılan bir flep modeli olduğu için biz de çalışmamıza bu flep modelini tercih ettik. Flep, rat dorsal cildinde pannikulus karnosus kasını da içerecek şekilde, 1965'te McFarlane ve arkadaşlarının tanımladığı orijinal tekniğin, 1986'da Khouri ve arkadaşlarının modifiye ettiği teknik ile kaldırılmıştır(20, 21). Flep yaşayabilirliği deneyleri için uluslar arası kabul görmüş bir yöntem olduğu için çalışmada kullanılmıştır.

2.4. Flep Fizyolojisi

Pek çok flep random pediküllü olarak dizayn edilir ve dizayn edilirken uzunluk ve genişlik arasındaki denge ampirik olarak belirlenir. Baş ve boyun fleplerinde bu oran 4:1, 5:1 iken alt ekstremité fleplerinde güvenli oran 1:1, 1:2'dir. Derinin beslenme alanları ile ilgili topografik tasvir çalışmaları ilk olarak bir Alman anatomist Manchot tarafından 1889'da kadavralar üzerinde yapılmıştır . Sonraki dönemlerde Fransız cerrah-anatomist Salmon 1936'da geliştirmiştir. Kadavralarda intraarteriyel radyografik madde enjeksiyonları yaparak deride arteriyel sisteme ait detayları elde etmiştir. 1983'de Spalteholz kaslar ve sonrasında fasyal septalar arasından deriye ulaşan arteriyel sistemleri tanımlamıştır (9). Bu çalışma da fasyakutanöz ve muskulokutanöz fleplerin temelini oluşturmuştur. Bu çalışmalar anatomik temelde açıklayıcı, ancak potansiyel bölgesel vasküler perfüzyon hakkında yetersizdi.

Periferik vasküler topografik çalışmaları Manchot ve Salmon, Taylor ve arkadaşları yapmışlar ve anjiyozom konseptini tanımlamışlardır. Kompozit doku bloklarında bölgesel perfüzyonu sağlamada arter ve ona ait ven sisteminin birlikte perfüzyonu sağladığını göstermişlerdir. Anjiyozom kavramı dinamik bir kavramdır. Her anjiyozom alt tiplerine arteriyozom ve venozomlarına ayrılırlar. Her anjiyozom yanındaki anjiyozom ile ya bağlantı halindedir ve anastomoz yapar buna "true anastomoses" denir. Ya da kalibrasyonu inceleyerek diğer anastomoz ile bağlantı kurar, buna da "choke anastomoses" adı verilir. Flep "delay" prosedürü uygulandığında "choke anastomoses", "true anastomoses" kalibrasyonuna dilate olurlar. Bir sonraki aşamada Taylor ve Minabe vasküler bölgeleri tam olarak tanımlayabilmek için Salmon'un "retiform anastomoses" kavramını "choke anastomoses" kavramı ile birleştirmişlerdir. Arteriyel sisteme eşlik eden venöz bağlantıların ("oscillating veins") olduğunu söylemişlerdir. Bu

venlerin kapaksız venler olduğu ve her iki yönde kan akımına olanak sağladığı belirtilmiştir. Bu sayede ters akımlı flepler dizayn edilmiş ve fizyolojileri açıklanabilmiştir (17, 18).

2.5. Deri Kan Akımının Regülasyonu

Kutanöz kan akımı iki aşamada regüle edilir. Sistemik kontrol nöral ve humoral regülasyonun kontrolü altındadır. Bunlardan nöral regülasyon predominanttır ve primer olarak sempatik fiberler ile α -adrenerjik reseptörler üzerinden vazokonstriksiyon yaparak; β -adrenerjik reseptörler üzerinden vazodilatasyon yaparak etki ederler. Ek olarak seratonerjik reseptörler arteriyovenöz anastomozlar üzerinde bulunurlar ve vazokonstriksiyon yaparlar.

Bu mekanizma sayesinde, arteriyol ve arteriyovenöz anastomozlarda bulunan düz kasların tonusu değiştirilerek regülasyon sağlanır (17). Humoral regülasyonda sistemik vazoaktif maddeler spesifik reseptörleri üzerinden etkilidirler. En önemlilerinden epinefrin ve norepinefrin (NE) α -adrenerjik reseptörler üzerine etkir ve vazokonstriksiyon yaparlar. Diğer önemli vasokonstrüktörler serotonin, tromboksan A2 (TXA2), prostoglandin F2 α (PGF2 α) iken; vasodilatatörler prostoglandin E1 (PGE1) prostoglandin I2 (prostosiklin), histamin, bradikinin, lökotrien C4 ve D4'dur. Kan akımının lokal kontrolü başka deyişle otoresülasyonu, vücudun pek çok bölgesinde kontrol mekanizmasıdır. Özellikle metabolik hızın yüksek olduğu kas iskelet sistemi bu şekilde idare olunur. Hiperkapni, hipoksi, asidozis gibi metabolik faktörler vazodilatasyon nedenidirler. Ek olarak fiziksel faktörlerin pek çoğu da kan akımı regülasyonunda etkilidir. Artmış doku perfüzyon basıncı “myojenik refleks” i tetikler. Buda vazokonstriksiyon ile sonuçlanır. Lokal hipotermi lokal kan akımını azaltarak direk vasküler düz kaslara vazokonstrüktör etkide bulunur. Hipertermide bunun tersi

etkidedir. Reolojik (akış bilim=maddenin sıvı halini inceleyen bilim dalı) faktörler sadece anormal kondisyonlarda kan akımına etkilerler (17).

Derin anemide reolojik özellikler önem kazanır, kanda hemodilüsyon gerçekleşir. Böylece flep kan akımı artarken distal flep yaşayabilirliği artar . Başka çalışmalarda flep yaşayabilirliğini çok az etkilediğini ya da hiç etkilemediğini söylemektedirler. Çünkü reolojik ilerleme oksijen sunumundaki azalmayı dengelemektedir . Kas dokuda kapiller dansitesi, deriye oranla daha yüksektir. arteriyovenöz şantlar yoktur. Kas dokular yüksek kan akısına ihtiyaç duyarlar. Bu yüzden metabolik hadiselerden daha çok etkilenirler. Kaslar deri gibi termoregülatuar organlar olmadığından ısı değişimleri kaslardaki kan akımını çok az etkilerler. Kan hücreleri ve plateletlerden direk olarak salgılanan vazoaktif maddeler travma sonrası salgılanarak kan akımını regüle ederler. Uygulanan flep operasyonları sonrasında meydana gelen denge değişiklikleri ve bozulmalar kan akımının regülasyonu ile birlikte yavaş yavaş düzelir. Sempatik innervasyondaki ani kayıp spontan olarak vazokonstrüktör nörotransmitterlerin salgınımına neden olur. perfüzyon basıncı düşer. 24 saat içinde flep distalinde mikrosirkülasyon bozularak nekroz gözlenmeye başlar. Banbury ve arkadaşları sempatektomi sonrası periferik mikrosirkulatuar dokunun cevabını cremaster kas fleplerinde tanımlamışlar (22). Anlık akut hiperadrenerjik fazı nonadrenerjik faz takip etmiş. Bu aşamada belirgin vazodilatasyon olmuş. Sonrasında sensitize faz gelmiş ki bu fazda da kapiller perfüzyon artmış vazoaktif maddeler salınmış.

Flep elevasyonu sonrası flep yaşamını belirleyen, elevasyonla birlikte meydana gelen hemodinamik, anatomik, metabolik değişimlerdir. Hemodinamik değişimler özellikle önemlidir. Birçok çalışma, flep ucunda kan akımının, elevasyon sonrası 6-12 saat içinde normal değerlerinin %20'sine düştüğünü gösterir. aşamalı olarak 1-2 hafta içinde

normalin %75'i geri dönerken, % 100'u 3-4 hafta içinde döner. Akım geri dönüşü pedikülden flep iskemik kısmına doğru uzunlamasına doğrultuda gerçekleşir. Diğer taraftan flep yatağından da revaskülarizasyonla yeni başlayan kan akımı da önemlidir. İnce fleplerde yataktan dönüş doğrultusu oldukça önemliyken, kalın fleplerde daha az önemlidir. muskulokutanöz fleplerde kutanöz komponentin perfüzyonu perforatör damarlar aracılığı ile sağlanırlar. muskulokutanöz fleplerde erken dönemde kan akımında devamlı surette artan bir seyir gözlenirken random fleplerde erken dönemde azalma mevcuttur. Random paternli fleplerde oksijen doygunluğu da, muskulokutanöz fleplere göre daha az bulunur. 6. günden sonra oksijen doygunluğu artar. Bu sebeple enfekte bölgelerde oksijen doygunluğu yüksek olan muskulokutanöz fleplerin tercih edilmesi uygun olacaktır. Çünkü oksijen doygunluğu yüksek olan fleplerde bakteriyel öldürme fonksiyonları daha etkilidir. Flepte 1-3 gün sirkülasyonda hiç düzelme yoktur. Longitudinal anastomozların sayısı ve çapı artar, pediküldeki küçük damarların sayısı artar. 3-7 gün içinde dolaşım progresif düzelir. 7. günde plato yapar. 2-3. günlerde görülmeye başlayan flep yatak arasındaki vasküler anastomozlar 5-7. günlerde fonksiyonel hale gelir. Fonksiyonel damarların sayı ve büyüklükleri artar. Damarlar flebin uzun aksı boyunca ilerler. 1. hafta sonrasında flep ile alıcı yatak arasındaki dolaşım düzelmiştir. Pulsatil kan akımı preoperatif seviyelere ulaşır. 7-14 gün içinde vaskülarizasyonda daha fazla dikkate değer artış olmaz. Arteriyel patern normale döner. 3 hafta sonunda vasküler yatak operasyon öncesi duruma yaklaşır. Flep dolaşımının %90'nını elde eder. Pedikülle alıcı saha arasındaki vasküler bağlar tam olarak gelişir. 4 hafta sonunda bütün damarların çapında azalma olur.

2.6. Geciktirme (Delay) Fenomeni

Geciktirme işlemi distal flep canlılığını düzeltmede klinik olarak da uygulanabilen tek güvenilir metottur. Geciktirme prosedürü flebin her iki kenarının insizyonu ve distal kısmının yatağından ayrılmasını takiben, iskemiye yol açan uygun bir bekleme donemi sonrası alıcı yatağa transferidir. Etkinliği kanıtlanmış en önemli yöntemlerden biri olan delay işleminde ya kan akımına paralel olarak deri insize edilir ya da flep altı disseke edilir. Buna karar verirken muskulokutan perforatörlerin veya direk kutanöz arterlerin yoğunluk oranına bakılır.

Muskulokutan damarlar yoğun bölgede disseke edilirken, muskulokutan az ve direk kutanöz arterler fazla ise deri insize edilir. Bu sayede damar genişliğinin, damar sayısının, kan akımının arttığı; damarların flebin uzun aksı boyunca oryante olduğu gösterilmiştir (10). Bu şekilde flep bir defada kaldırılabilen boyundan daha fazla uzunlukta nekroze olmadan hazırlanabilir. Braithwaite 1951’de delay işleminin flep damar sayısını artırmadığını ancak özellikle subdermal venlerin çapında genişleme olduğunu savunmuştur (3). Bu sayede flep yaşamı artırılabilir. Sağlanan bu genişleme geri dönüşümsüzdür ve operasyon sonrası meydana gelen vazokonstriksiyon 3 saate çözülmektedir .

Yapılan bir çalışmada geniş ada deri flepleri abdominal organlardaki defektlerin kapatılmasında ratlarda uygulanmış. Vazodilatatör ajanların bu fleplerdeki etkisi incelenmiş ve cerrahi geciktirme prosedürü ile benzer etkilere rastlanmıştır (23). Myers ve Cherry başarılı bir delay işlemi için flebin aksiyel damarlarının bir kısmının ayrılması ve flebin hafif iskemiye sokulmasının sonraki iskemilere dayanıklılığı artırabileceğini söylemişlerdir. Transvers rektus abdominis (TRAM) fleplerinde random beslenen 4.bölgedeki kan akımı geciktirme işlemi sayesinde artırılabilmiştir (17).

“Ischemic preconditioning” dokunun hafif derecede kısa süreli iskemiye maruz bırakılması işlemidir. Flep yaşamını artırmak amaçlı “mekanik ve farmakolojik preconditioning” işlemi uygulanabilir. Murry bu işlemi ilk olarak sıçan myokardında iskemiye azaltmak amaçlı kullanmıştır. Bu işlem erken ve geç faz olmak üzere iki aşamada etki etmektedir. Erken faz ilk 4 saate koruyuculuk sağlarken geç faz 24-72 saate kadar etkili koruma sağlar . Bazı yazarlar protein fosforilasyonunu sağlayan protein kinaz-c (PKC) aktivasyonu ile “Ischemic preconditioning” olayının gerçekleştiğini iddia etmektedirler ancak tam olarak açıklanabilmiş bir mekanizma yoktur. Protein kinaz-c’nin K-ATP (Potasyum- Adenozintrifosfat) kanal sinyal iletim yoluyla bu etkiyi oluşturduğu tahmin edilmektedir (17). “Preconditioning” ile doku metabolizması, serbest oksijen radikalleri azalmakta, vazodilatasyon gelişmekte ve distal kan akımını düzeltilmektedir. Endotel derive relaksasyon faktörlerinin salınımı da vazokonstriksiyona engel olmaktadır (3).

2.7. Flep Nekrozu

Flepler kompozit dokular içerirler. Doku içeriklerine bağlı olarak da iskemi reperfüzyon dayanıklılıkları değişkendir. Kas fleplerinde kapiller ağ, doku kesitlerinde daha fazla olmasına rağmen iskemi dayanıklılık süresi fasyokutan fleplere göre daha azdır. Fleplerde nekrozun flep distalinde gerçekleşmesinin nedeni, elevasyon sonrası perfüzyon basıncının en düşük olduğu yerin flep distali olmasıdır. Fleplerde distalde arteriyollarda vazokonstriksiyon da bu sürece katkıda bulunmaktadır. Flep yaşamını artırmada en önemli çalışmalar geciktirme fenomeni üzerine kurulmuştur. arteriyovenöz şantlar, oksijen yoğunluğu yüksek kanın flep distaline ulaşmadan, proksimalde şant döngüsüne girmesine neden olur. Arteriyel kan, kendisi ile arasındaki basınç gradyeni yüksek olan venöz kana karışır. Bu da flep distalinde nekroza yol açan

mekanizmalardan biridir. Oysa geciktirme fenomeni uygulanan hastalarda bu şantlar geriler. Kerrigan ve arkadaşları ise çalışmalarında arteriyovenöz şantların etkili olmadığını savunmuşlardır. perfüzyon basıncı ve vazokonstriksiyon fizyopatolojide etken olarak savunulmuştur (17).

Özetle flep elevasyonu sonrası besleyen damarlar ve sempatik sinirler flepten ayrılır. İlk 12-18 saat içinde dramatik olarak flep distalinde kan akımı azalır. Kan akımı azalması sonrasında vazokonstriktör madde salınımları nedeni ile akım daha da azalır. Sempatik nörotransmitterler 12-24 saat içerisinde tükenirler. 2-3 gün sonra da flep yatağından revaskülarizasyon meydana gelir. Flep distalinde bulunan iskemi 6-12 saat boyunca devam ederse dolaşım sağlandığında reperfüzyon yaralanması nedeni ile mikrovasküler kapanma meydana gelir ve genellikle dokularda nekroz gelişir (17).

Kihlabani ve Kerrigan yaptıkları çalışmada iskemi sonrası reperfüzyon yaralanması olayında kas ve deri fleplerinde farklılıklar tespit etmişlerdir. Kas fleplerinde reperfüzyon sonrasında erken hiperemik fazda vazoaaktif maddeler etkisi ile kan akımının arttığını gösterirken, yine bu vazoaaktif maddeler nedeni ile deri fleplerinde vazokonstriksiyon olmaktadır (17, 24).

Arteriyel yetmezlikler flep nekrozunda oldukça önemli olmasına rağmen venöz dönüşte oldukça önemlidir. Serbest doku nakillerinden sonra venöz oklüzyona bağlı flep kayıpları daha ön plana çıkmaktadır (14). Yapılan hayvan çalışmalarda sekonder iskeminin primer iskemiye oranla flep kaybında daha kötü sonuçlar doğurduğu bilinmektedir.

Kerrigan ve arkadaşları flebin herhangi bir yerinde gelişebilecek nekrozda uç teori tanımlamışlardır: Birincisi geniş flep dizayn edilmesine bağlı beslenme yetersizliği, ikincisi arteriyel tromboz, üçüncüsü venöz trombozdur. Random ve aksiyel pediküllü

fleplerde vasküler sistemde tromboz; flep pedikülüne bası, sepsis, hipotansiyon, sigara kullanımı, vazokonstriktörler nedeni olur. Bu sayılan olaylar nedeni ile mikrosirkülasyonda kan akım debisi düşmekte ve göllenme nedeni ile tromboz oluşmaktadır. Serbest fleplerde ise tromboza neden olan anastomoz hattındaki endotel yüzey bozukluklarıdır. Antiplatelet ve antitrombotik tedavi bu sebeple yararlı olabilir (7).

Elevasyon sonrası flepte, hemodinamik, anatomik, metabolik değişimler meydana gelir. Bu değişikliklerden metabolik olanları özellikle flep distalinde daha yoğun yaşanmaktadır. İskemik dokularda karbondioksit (CO₂), laktik asit seviyesi artarken; oksijen (O₂), glukoz ve ATP seviyeleri düşer. Anaerobik metabolizma ile glikolizasyon gerçekleşmeye başlar. PGI₂ ve TX gibi vazokonstriktör madde salınımları ve seviyeleri artar.

Glukoz ve glikojen tüketimi artar; glukoz tüketimi üçüncü günde pik yapar ve yedinci günde normale döner (17). Anaerobik glikolizasyonla birlikte reaktif oksijen radikallerinde (ROS) artış meydana gelir. Artan radikaller direk olarak hücre zarında lipid peroksidasyonuna neden olarak toksik etki gösterirler. Lokal olarak akut inflamasyona, lökositlerin birikimine ve adezyona, sonuçta mikrovasküler kapanmaya yol açacak endotel hasarına neden olurlar. Antioksidan enzimlerden superoksit dismutaz seviyeleri, superoksit oksijen radikalini oksijene çevirerek tüketildiği için flep distalinde oldukça azalır (17, 25).

İskemi reperfüzyon sonrası ATP, yıkımı sonrası, oksijenle birleşerek ksantin oksidaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla sürekli olarak hipoksantine (ksantin oksidaz) dönüşür. Bu oluşan ürün bir superoksit anyonudur. Bu anyon diğer oksijen radikallerinin bir formudur ve onların oluşmasının önünü acar. İskemik süreçte düşen

enerji seviyeleri, iyon konsantrasyonunun bozulmasına neden olur. Sitoplazma içine kalsiyum girişi artar. Kalsiyum sitozolik enzimleri aktive eder. Böylece endotelde bulunan ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür. Bu enzim de normalde, ATP yıkımı sonrasında oluşan hipoksantini redükte edecekken, iskemiye takip eden reperfüzyon ile ortama gelen oksijenle reaksiyona sokarak, okside eder ve oksijen radikalleri oluşur (Şekil 4). Reperfüzyon ile birlikte primeri superoksit radikali olan hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oluşur. İnvitro ortamda oksijen radikalleri veya endotel hipoksisi nötrofillere etki eden kemoatraktanları artırır. Böylece inflamatuvar nötrofil göçü artar.

Şekil 4: Reperfüzyon sırasında direkt olarak hücresel hasar oluşturabilen toksik oksijen radikallerinin oluşumu

İki mekanizma ile hücrel hasar meydana gelir. Endotel membranında bulunan lipidler perokside olurken membran proteinleri parçalanır. Sitoplazma bütünlüğü bozulur. İkinci mekanizma da ise oksijen metabolitleri direkt kendileri kemoatraktandır. Reperfüze alana nötrofil göçü olur. nötrofil bu alanda doku parçalanmasına neden olur (17). İskemi reperfüzyon hasarı infarkt, vasküler hastalık, organ transplantasyonu ve sok gibi hastalıkların patogeneğinde etkindir. Çalışmalarda dokularda bulunan nötrofil kümelenmesi ile doku hasarı arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (26). Dolaşımdaki PMNL (polimorf nüveli lökosit)'ler yok edilerek iskemi sonrası reperfüzyon hasarının azaltıldığı bilinmektedir. Hızlı olarak dolaşımda nötrofil artışı perfüzyonda ani azalmaya neden olmaktadır (26). Nötrofiller intravasküler yoğunlaşarak ya kümeler oluşturmakta ve mikrovasküler oklüzyona neden olmaktadır ya da direkt olarak endotele zarar vermektedirler.

2.8. Flep Yaşamına Etki Eden Ajanlar

En yüksek flep yaşayabilirliğini sağlamak için bilinen en önemli operatif faktörler; flep seçiminin ve dizaynının iyi yapılması, alıcı sahaya dikkatli debridman uygulanması, flebin dikkatli elevasyonu ve yerleştirilmesi post operatif dönemde de flebin takibinde non invaziv monitörizasyon metotlarının uygulanmasıdır (17).

2.8.1. Fiziksel Faktörler

Çevresel fiziksel faktörlerden nemli ortamın yara iyileşmesinde olduğu gibi flep yaşamını da artırıcı etkide olduğu gösterilmiştir. Çünkü nemli ortam iskemik dokunun kurumaya bağlı kaybını azaltmaktadır. Lokal ısı uygulamaları hipotermiye neden olduğu vazokonstriksiyonu, kan viskozitesindeki artışı engelleyerek flep yaşamına olumlu etkide bulunurlar. Diğer taraftan hipotermiye metabolik hızı azaltarak reperfüzyon yaralanmasından koruyucu etkide olduğu da bir gerçektir (3, 17).

Yapılan çalışmalarda hayvanların, vücut ısılarının üzerinde ısıya maruz kaldıklarında stres durumuna geçtikleri ve “ısı şok proteinleri” sentez ettikleri bilinir. Buna “ısı şok cevabı” denilir. Isı şok proteinleri endotele affinitesi yüksek olan proteinlerdir. Isı şok cevabı hipoksi, hipoglisemi ve toksin maruziyeti durumlarında da oluşur. Flep canlılığı bu cevapla artar (3).

Hiperbarik oksijen (HBO) tedavisi ise flep yaşamını artıran diğer bir faktördür. Nemli ortam gibi bu tedavi metodu da yara iyileşmesinde başarı ile uygulanmaktadır. Postkapiller venüllerde nötrofil adezyonunu azaltarak, superoksit dismutaz enzim etkisini artırarak etki eder (3).

2.8.2. Farmakolojik Faktörler

2.8.2.1. Antikoagulanlar

Dekstran bakterilerin sükrozdan sentezlediği bir makromoleküldür. Dekstran flep cerrahisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Dekstran 40 (40000 moleküler ağırlık) ve 70 (70000 moleküler ağırlık) olmak üzere iki formu Rothkopf ve arkadaşları tarafından denenmiştir. Bu özelliği sebebi ile intravasküler sıvı volümünü artırmaktadır. Volüm genişletici olarak da kullanımı vardır. Anafilaksi, pulmoner ödem, aşırı volüm genişlemesi, kanama, karaciğer harabiyeti gibi yan etkileri vardır. Sure ve doz kısıtlı olarak dikkatli kullanılmalıdır. Yaşlı hastalarda rölatif kontrendikedir. Kan viskozitesini azaltır, trombosit agregasyonunu ve adezyonunu engeller, kanama zamanını uzatır, iskemik flepte yararı tartışmalıdır (3, 17).

Hydroxyethyl starch (HES) plazma hacim genişletici olarak kullanılan yeni bir diğer kolloiddir. Dekstrana üstün yanı HES uygun dozlarda verildiğinde kanama komplikasyonu olmamaktadır. Geniş klinik çalışmalarda etkili olduğu gösterilememiştir.

Heparin bir antifibrin ajandır. Antitrombin III'e bağlanarak çalışır. Bu sayede trombin gibi birçok pıhtılaşma faktörü inhibe olur. Anastomoz hatlarında lokal irriye edici olarak ya da sistemik olarak kullanımları mevcuttur. Mikrocerrahide irrigasyonda 100 U/ml dozunda kullanılmaktadır. Kanama ve hematoma neden olabilir. Rumbolo ve arkadaşları mikrovasküler prosedürlerde irriye solüsyonlara eklenen heparin ve ürokinazın etkilerini araştırmışlardır. Güçlü antikoagulan etkilerine rağmen hiçbir ajan serbest fleplerin canlılığında bir fark yaratmamıştır (17).

Geleneksel tedavi metotlarından sülükler de ısırıkları yerde venöz konjesyonu önlemek, buna bağlı dekompresyon yapmak, vazodilatatör etkiler göstermek gibi etkileri ile özellikle serbest fleplerde kullanılmışlardır. Isırıkları yere enjekte ettikleri hirudin antikoagulan etkilere sahiptir ve aktive olmak için heparin gibi anti-trombin III'e ihtiyaç duymaz. Vazodilatatör etkilerini ise hyaluronidaz ile gösterirler. Ayrıca hyaluronidaz bağ dokuda parçalanma sağlar ve heparinin derin venöz dokulara ulaşmasını sağlar. Arteriyel yetmezlikte kontrendikedir. Kanama ve "Aeromonas hydrophila" gibi bakteriyel enfeksiyonlara yol açabilecek komplikasyonlara neden olabilir. Bu etkisini önleyebilmek için ikinci kuşak sefalosporinlerin tedavi sürecinde verilmesi yeterli olacaktır (17).

2.8.2.2. Reseptör ve Akson Blokörleri

Flep elevasyonu ile birlikte cerrahi olarak sempatik sinir blokajı da gerçekleştiğinden katekolamin deşarjı olur. NE, E, serotonin, PGF₂, TXA₂, endotelinler vazokonstriktör olarak salgılanırlar. Alfa adrenerjik sistem sayesinde gerçekleşen bu vazokonstriksiyon flebin en fazla distal kısımlarında iskemiye neden olur (18). Antiadrenerjik ilaçların enjekte edilerek sıçan deri fleplerinin distal, orta ve proksimal bölgelerinde norepinefrin, ATP, c-AMP (siklik adenozin monofosfat) ve laktat düzeyleri ölçülerek

flep canlılığı değerlendirilmiştir. Antiadrenerjik etkilerini nörotransmitter salınımı ya da adrenerjik sinire geri alınımını bozarak gösterirler. Rezerpin ve guanetidin flep canlılığını artırırken norepinefrin düzeyini düşürdüğü, ATP ve c-AMP seviyelerini artırdığı görülmüştür (18, 27). Baş ve boyun fleplerinin yaşayabilirliğine fentolaminin olumlu etkileri bildirilmiştir (27).

Sellüler iskemik yaralanmada ve sonrasında oluşan oksijen radikalleri oluşumunda hücre kalsiyum dengesi patogeneizde sıklıkla tartışılan faktörlerdendir. Verapamilin kalsiyum kanal blokörü etkisi ile oksijen radikallerine karşı özellikle kısa dönemde yaşanan iskemide koruyucu etkisi bildirilmiştir (28).

Nitrik oksit sentez inhibitörleri de McFarlane fleplerinde denenmiş ve elevasyon sonrası 24 saatte ödem ve hiperemiye azaltarak flep yaşamını artırmışlardır (29). Beta adrenerjik reseptör blokörü isoxuprine intraperitoneal olarak elevasyondan bir hafta öncesinde uygulandığında abdominal ada deri fleplerinin yaşayan alanlarını tama yakın artırmıştır (30).

Angel ve arkadaşları klorpromazinin flep yaşayabilirliğinde yararlı etkileri olduğunu bulmuşlardır. Etki mekanizması norepinefrinin vazokonstriktif etkisini azaltarak ve vazodilatasyon yapan alfa adrenerjik blokaj yaparaktır (3).

Cordeiro ve arkadaşları fenilepinefrin ve dopaminin flep yaşamına etki etmediğini, dobutamin ile hem flep kan akımı hem de kardiyak out-putta artış olduğunu açıklamışlardır (3).

Ichioaka ve arkadaşları selektif fosfodiesteraz-3 inhibitörü olan amrinone'nun pozitif inotropik ve vazodilatör etkileri nedeniyle flep mikrosirkülasyonunda artışa neden olduğunu gözlemlemişler (3).

2.8.2.3. Direkt düz Kas Gevşeticiler

Önemli sayıda çalışmada diltiazem, nifedipin, nitrendipin, verapamil gibi damar duvarı kaslarında vazodilatasyona neden olan kalsiyum kanal blokörleri ile tedavi edilen sıçanlarda flep canlılığının arttığını göstermişlerdir. Bu ajanlarda baksa etki mekanizmaları da mevcuttur. Diltiazem damar endotel hücrelerde potent vazodilatördür. Trombositlerin agregasyonunu, prostosiklin salınımını uyardığını bilinmektedir. Jernbeck ve arkadaşları dolaşımı bozulmuş fleplerin tedavisinde intravenöz kalsitonin geniyle ilişkili peptidin klinik uygulamasını tarif etmişlerdir (3). Topikal dimethylsulfoxide (DMSO), 88 hastada mastektomi sonrası flep distalindeki nekrozu azaltmada başarılı bulunmuştur (31).

Antioksidan ve demir şelatörü olan “desferoxamine” sıçanlarda antioksidan etkileri ile flep yaşayabilirliğini artırmıştır (32).

Rand-Luby ve arkadaşları DMSO’nun topikal uygulamasının serbest radikal yakalamayı veya trombosit agregasyonunu azaltarak ve vazodilatasyonla deri iskemisini kontrol ederek insanlarda flep canlılığını artırdığını belirtmişlerdir. DMSO’nun klinik kullanımı için güvenli olduğunu bulmuşlardır (3).

Damar düz kaslarında relaksasyonu inhibe ettiğine inanılan lidokain ve pentobarbitalin topikal etkileri Wadstrom ve Gerdin tarafından çalışılmıştır. Mekanik olarak indüklenen vazospazmda etkili çözülme olmasına rağmen; mikrovasküler tromboz gibi etkilerini de saptamışlardır (3).

Saetzler ve Gala kronik periferel vasküler oblitere edici hastalıkların tedavisinde kullanılan vazoaktif bir ilaç olan “buflomedil” in etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu ilaç eritrositlerin deforme olma özelliğini artırarak, trombosit agregasyonunu azaltarak ve lökosit adezyonunu azaltarak etki etmektedir. Buflomedil’in iskemi-reperfüzyon

hasarına maruz kalan flepleri koruduğunu keşfetmişlerdir. Alfa adrenerjik aktivasyonu inhibe ettiği düşünülmesine rağmen Saetzler buflomedil'in intrasellüler ATP ve c-AMP konsantrasyonlarını artırdığını düşünmektedir. Nieto ve arkadaşları hidralazine üzerine çalışmışlardır. Bu ilacın intrasellüler c-AMP konsantrasyonlarını artırarak arteriyel düz kaslarda relaksasyona neden olduğu bu mekanizma ile flep canlılığını önemli ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir (3).

Vazoaktif ilaçlardan buflomedil hydrochloride "mice" kulaklarındaki saçsız alandan kaldırılan fleplerde denenmiş. Lokal olarak uygulanmış. mikrovasküler perfüzyon flep orta distal ve proksimali de dopler ile incelenmiş. 1.günde flebin tüm bölgelerinde flep yaşamının arttığı gözlenmiştir (33).

2.8.2.4. Kanın Reolojik özelliğini Değiştiren Ajanlar

Kanın reolojik özelliğini değiştiren ajanlardan fluorokarbonlar kanın oksijen taşıma kapasitesini artırıp, kan viskozitesini azaltarak mikrosirkulasyonu düzeltirler. Bazı yazarlar %20 fluosal-DA (Fluosol) verilen sıçanlarda, flep canlılığının arttığını göstermişlerdir. Diğer bazı araştırmacılar ise fluosol uygulaması ile flep canlılığının artmadığını belirtmişlerdir. Pentoksifilin ise başka bir hemorajik ajandır. Eritrositlerin deforme olma özelliğini artırarak kan akımı özelliğini değiştirir. Pentoksifilin kan viskozitesinde azalmayla sonuçlanan fibrinojen seviyelerinde azalmaya neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda oral verilen pentoksifilinin flep canlılığını artırdığı görülmüştür. Eritrositlerin damar endoteline yapışmasını azaltan ve eritrositlerin deforme olma özelliğini artıran piracetam verilerek sıçan deri fleplerinde doza bağımlı olarak distal nekrozun azaldığı görülmüştür (3).

2.8.2.5. İskemiye Toleransı Artıran Ajanlar

Steroidler iskemi toleransını artırmada kullanılmışlardır. Onları etkileri membran stabilizasyonunu artırmaktır. Non-spesifik anti inflamatuvar etki gösterirler. Erken dönemde antinötrofilik mekanizma ile bunu sağlarlar. Ayrıca doku ödemi azaltırlar. Enfeksiyon riskini artırmaları ve sistemik yan etkileri nedeni ile dikkatli kullanılmalıdır (17). Birçok yazar prednizolonun, allopurinol ile birlikte kullanımının tek kullanımına göre flep canlılığını daha fazla artırdığını tespit etmişlerdir. Prednizolon daha etkili olması için operasyon öncesi başlanması gerekmektedir. Steroide en az operasyon sonrası 48 saat devam edilmesi gerektiğini ve prednizolonun random paternlilere göre aksiyel paternli fleplerde daha etkili olduğunu savunmuşlardır.(3)

Deksametazonun da flep yaşamını artırdığına dair çalışmalar vardır (3, 13). Kargı ve arkadaşlarının çalışmasında deksametazon ile karnitinin birlikte kullanımı ile flep yaşamını artırmada sinerjistik etki elde edildiği bildirilmiştir (34).

Hoşnuter ve arkadaşları lokal deksametazon uygulaması ve “ischemic preconditioning” metodunu birlikte uygulamışlar ve sadece deksametazon uygulanan ve sadece pedikülü klemplenen gruplara göre anlamlı düzeyde flep yaşayabilirliğinde artış tespit etmişlerdir (35). Desferroksamin serbest radikalleri bağlama ve demir tutma özelliklerine sahiptir. Bu ajanın da flep yaşayabilirliğini artırdığı tespit edilmiştir (3).

Total venöz oklüzyon yapılarak nekroz oluşturulan deri fleplerinde mannitolun ve anisodaminin etkileri araştırılmıştır. Atropin analogu etkileri nedeni ile sıçan modellerinde, toksik oksijen radikallerine bağlı hasarı önledikleri ve kapiller reperfüzyonu artırdıkları tespit edilmiştir (3).

Bazı yazarlar sıçan modellerinde antioksidan olarak bilinen koenzim-Q-on ‘nun iskemiye bağlı reperfüzyon hasarından dokuyu koruduğunu göstermişlerdir. Çeşitli

araştırmacılar ise iskemik hasarlı deri flepleri için operasyon sonrası fosfokreatinin infüzyonu ile deri flebi yaşayabilirliğini artırdıklarını ileri sürmüşlerdir (3).

Granülositlerin flep nekrozunun gelişiminde kapiller kapanmaya neden oldukları, superoksit radikalleri sentezledikleri pek çok çalışmada gösterilmiştir. Adenozin ise iskemik hücrelerden salgılanarak granülositik superoksit radikallerin sentezini bloklar. Bu verilerden hareketle “5-Aminoimidazole-4-carboxamide” ise adenozinin iskemik hücrelerden salınımını sağlayarak indirekt olarak radikallerin sentezini bloklar. Yüksek dozlarda bu pürin analogunun flep distalinde nekrozu azalttığı gösterilmiştir (36).

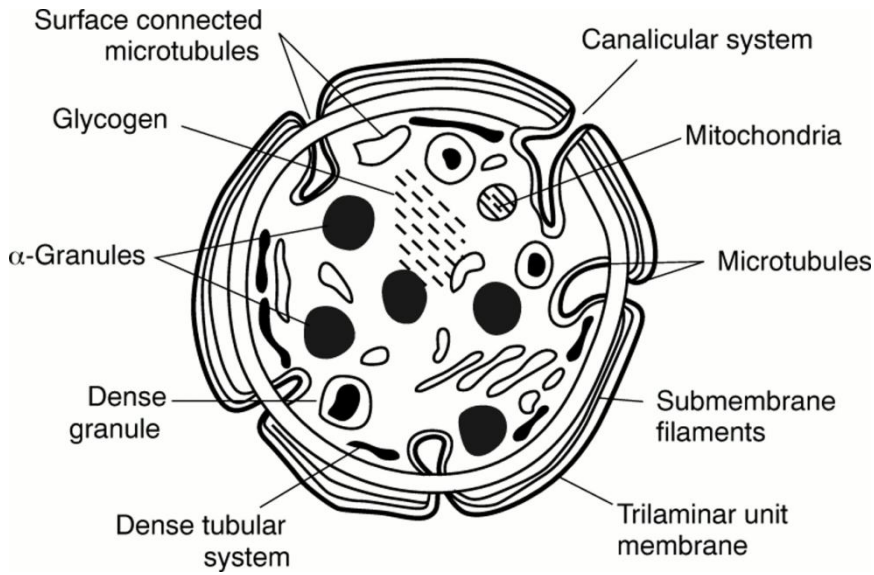
Multi ajan tedavilerde flep yaşamını artırmak için denenmiştir. Antioksidan allopürinolle vazodilatatör nitrogliserin hayvan deri fleplerinde çalışılmıştır. Transdermal olarak uygulanan nitrogliserin, flep yaşamını artırmada allopurinol ile additif olarak etkileşmiştir.

2.9. Trombositten Zengin Plazma

2.9.1. Trombositlerin Yapısı ve İçerikleri

Trombositler kemik iliğindeki megakaryositler tarafından üretilen 2-4 µm çapında, mitokondri ve mRNA içermesine rağmen çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Dinlenme halinde tipik olarak disk şeklinde olmalarına rağmen aktive olduklarında 5 µm'ye kadar ulaşabilen psödopodlar içeren globüler bir şekil alırlar. Vücutta herhangi bir zamanda dalakta lokalize olarak bulunur ve periferik dolaşıma geçtikten sonra ortalama 8-10 gün yaşarlar. Periferik yaymada kümeler halinde gözlenen trombositler tek tek incelendiğinde açık mavi boyanan periferik “hyalomere”, mor granüller ve mitokondrilerden oluşan santral “granülomer” kısımlarından oluştuğu görülür. Hem hücre zarlarının sitoplazma içine parmak şeklinde girmesi sonucu oluşan

ve yüzeye açılan “açık kanaliküler sistem” olarak adlandırılan bir kanalikül sistemine, hem de hyalomer bölgesinde trombosit aktivasyonu için gerekli olan kalsiyum iyonlarını depolayan “yoğun tübüler sistem” adı verilen ikinci bir kanalikül sistemine sahiptirler. Yüzeylerinde bulunan reseptörleri, trombin, kollajen vb. moleküllerin uyarılmasıyla aktif hale geçen trombositler, sitoplazmalarındaki aktif molekülleri içeren granülleri “açık kanaliküler sistem” yoluyla dışarı atarlar (Şekil 5).



Şekil 5: Trombosit yapısı

Yoğunluk ve içeriklerine göre üç değişik granül tanımlenmiştir: (37)

1. Delta Granüller (Yoğun Cisimler): 250-300 nm çapında kalsiyum, pirofosfat, ADP, ATP gibi molekülleri içerip, serotonin deposu olarak görev yapan granüllerdir.

2. Lambda Granüller (Lizozomlar): 175-250 nm çapında olup içinde asit hidrolazlar gibi lizozomal enzimler olan granüllerdir. Bakterisidal etkisi olan glikozidaz, proteaz gibi proteinleri de içerirler.
3. Alfa Granüller: 200-400 nm çapında tek kat membranlı büyük organeller olup sayısal olarak trombositlerin majör granülleridir. Bu granüllerin koyu renkli boyanan alanlarında proteoglikanlar, açık renkli bölümlerinde vWF, albümin gibi proteinler ve tübüler yapılar vardır. Alfa granüllerin hemostaz, inflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein ve büyüme faktörünü içermesi, trombositlerin yoğunlaştırılarak klinikte yara, kemik iyileşmesi gibi alanlarda kullanımının gündeme gelmesine neden olmuştur.

Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan büyüme faktörlerinin yanı sıra, salınan ADP ve Tromboksan A₂ gibi moleküller diğer trombositleri aktive ederek, vWF (von Willebrand Faktörü) trombositlerin birbirine yapışmasını sağlayarak pıhtılaşma mekanizmasında görev alırlar (37).

2.9.2. Büyüme Faktörleri

Anjiogenezi terimi ilk kez plasentadaki yeni damar oluşumunu tarif etmek için 1935'te kullanıma girmiş ve daha sonra tüm yeni damar oluşumları için kullanılır olmuştur. Dokuların normal büyüme ve gelişmesi için damar proliferasyonu gerekli bir işlem olmasına rağmen erişkinlerde anjiogenezi nadir olarak gözlenir. Üreme sisteminde folikül ve korpus luteumda, hamilelik sonrası plasentada, yara ve kemik iyileşmesinde normal olarak gerçekleşirken; tümörlerde, diyabetik retinopati gibi durumlarda kontrolsüz ve patolojiktir. Bu nedenle anjiogenezi uyaran ve durduran bir takım faktörlerin araştırılıp bulunması vücudun normal ve patolojik işleyiş mekanizmalarının kısmen de olsa aydınlanmasını sağlamıştır. (38).

Anjiogenez çeşitli anjiogenik faktörler tarafından doğrudan ya da dolaylı olarak başlatılıp yönlendirildiği bilinen kompleks bir mekanizmadır(39). Son yıllarda büyüme faktörlerinin yara iyileşmesini ve anjiogenezi olumlu yönde etkilediğinin saptanıp etki mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması, araştırmacıların kemik, yara, tendon, sinir iyileşmesine yönelik deneysel ve klinik uygulamalarında bu faktörleri daha büyük ilgi ile kullanmalarına neden olmuştur(40). Büyüme faktörleri polipeptid sitokinlerdir ve tüm vücutta kendilerine özgü reseptörler üzerinden etkilerini göstermektedirler (41). Dolaşımda bulunan trombositlerin α -granüllerinde VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF β 1 ve β 2 (Transforming Growth Factor- β 1 ve β 2), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) gibi pek çok büyüme faktörü depolanmış durumdadır. Çeşitli uyarılara karşı trombosit aktivasyonu olduğunda bu maddeler granüllerden salınırlar(42-45).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): Fibroblast ve düz kas hücreleri üzerinde mitojendir ve yara iyileşmesinin erken dönemlerinde ilk saptanan moleküllerden birisidir. AA, AB ve BB şeklinde üç izoformu olan PDGF molekülü hücre membranındaki reseptörlere bağlanınca sitoplazmadaki yüksek enerjili fosfat bağı içeren bir sinyal proteini aktive olur ve bu sinyal iyileşmede görevli hücrelerin çoğalmasına, anjiogeneze, kollajen, fibronektin, hyaluronik asit üretilmesine, diğer büyüme faktörleri ve hücrelerin fonksiyonlarının artmasına aracılık eder. Böylece fibroblastik ve osteoblastik faaliyetler artar, hücreler farklılaşır, büyüme faktörlerinin makrofaj gibi hücreler üzerindeki etkileri hızlanmış olur(46). PDGF insan mezenkimal hücreleri için de primer mitojen olan bir büyüme faktörüdür. Bu etki plazmada diğer büyüme faktörlerinin bulunmasına bağlı olup interferon- γ sayesinde daha da artar(42, 47, 48). PDGF'nin nötrofil, monosit, makrofaj ve fibroblastlar için kemotaktik

olmasının diğ er büyüme faktörlerinin varlığından bağımsız olmasının yanı sıra, yara iyileşmesinin ileri safhalarında kollajenaz aktivasyonu yaparak ‘remodelling’e katkıda bulunması gibi bir özelliğı de vardır(47, 49-51). PDGF ve TGF- β yara iyileşmesinde rol oynayan faktörler olup genellikle sinerjistik etki gösterir. Kollajen miktarını arttıran bu iki proteinin de kemik, periodontium, tendon, sinir ve deri iyileşmesini stimüle ettiğı, yara kuvvetini arttırdığı gösterilmiştir(44, 49, 52, 53).

Deneyssel hayvan çalışmalarında tendon, ligament ve kıkırdak yaralanmalarında tamiri uyarıcı etkisi gösterilmiştir(40, 54-56). Kalvaryal kemik defektlerine metilselüloz içinde tek doz uygulanmasının kemik ilerlemesini, mineralize dokuyu, kemik iliğı miktarını, yani kemikleşmeyi arttırdığı saptanmıştır(57). Brown sıçan epigastrik ada fleplerinin pedik llerinde 3-4 mm’lik defektler yaratıp bu alana PDGF vermiş ve aradaki bölgede 3 hafta içinde yeni bir damar olduğ nu görmüştür. Flep periferinde yeni damar oluşumlarının arttığını da gözlemlemesinin  zerine PDGF’nin flep alanına verilmesinin erken pedikül ayırmaya izin verdiğini belirtmiştir(58). Kas fleplerine uygulandığında da flep sağıkalımını arttırdığı anlaşılmıştır(59). Hayvanlardaki deneyssel yara iyileşmesi çalışmalarında granülasyon dokusunun ve ekstraselüler matriksin arttığını, iyileşmenin hızlandığı gösterilmiştir(51). Yine diyabetik hale getirilen sıçanlarda yapılmış olan bir çalışmada, bozulmuş olan yara iyileşmesini PDGF uygulamasının normalde olması gereken hale getirdiğı, inflamatuvar cevabı arttırmadığı, erken safhada DNA sentezi ve kollajen miktarını arttırmasına rağımen 20. gün civarında bu değışimlerin normale döndüğü saptanmıştır(47).

Klinikte diyabet ya da iskemi kaynaklı kronik deri ülserlerinde yara iyileşmesini arttırmak için, maksillofasiyal cerrahide kemik grefti yerleştirilen bölgede, oral ve nazal fistüllerin cerrahi onarımında, kemik-integre implantlara destek olarak kullanılmıştır(50,

60). Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmiş olan PDGF (becaplerin 0,01 %-Regranex OMP, Raritan, NJ) ile kronik yaralarda yapılmış olan iyileşme çalışmaları da ümit vaat eden sonuçlar sunmaktadır(50).

“Transforming” büyüme faktörü (TGF- β): TGF- β fibroblast çoğalmasını uyaran plasenta kaynaklı bir madde olarak 1983 yılında keşfedilmiştir. Fakat daha sonra tüm vücutta yaygın olarak bulunduğu, hücre siklusu regülasyonu, embriyogenez, organ gelişimi gibi pek çok biyolojik aktivitede görev aldığı fark edilip çeşitli araştırmalarda odak noktası olmuştur.

Üç farklı izoformundan TGF- β 1 ve β 2 trombositlerde bulunduğu ispatlanmış olan, bağ dokusu iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda görev alan, TGF’ün en sık görülen alt gruplarıdır. Hücre büyümesi, extraselüler matriks üretimi, angiogenезin uyarılması, yara iyileşmesi ve farklılaşması gibi çeşitli biyolojik olaylarda rol alırlar(44, 48, 52). Fibroblastları prokollajen üretimi için aktive ederek yarada kollajen depolanmasına neden olurlar(44). TGF- β lar parakrin olarak etkilerini fibroblast, kemik iliği kök hücresi ve preosteoblast gibi hücreler üzerinde gösterebilirler ve bu hedef hücreler de yine TGF- β salgılayabilirler. Böylece TGF- β yalnızca yumuşak doku ve kemik rejenerasyonunu başlatmakla kalmayıp remodelling aşamaları ve kemik grefti olgunlaşmasında da etkili olur(60). Sıçanlarda yapılan çalışmada insizyonların altına tek doz TGF- β uygulanmasının ardından yara gerim kuvvetini %51 arttırdığı gösterilmiştir(61). Rekombinant TGF- β uygulaması da benzer sonuçlar vermiştir(41).

Çeşitli çalışmalarda epidermal rejenerasyonu, angiogenезi, tendon ve ligament iyileşmesini hızlandırdığı da gösterilmiştir(49, 50, 54). TGF- β ile transfekte edilmiş adenovirüslerin sıçan epigastrik fleplerine enjeksiyonu sonucu flep yaşayabilirliğinin,

damar yoğunluğu ve çaplarının arttığı saptanmış ve gen terapisinin iskemide kullanılabileceğinin göstergesi olmuştur(62).

Aşırı ve düzensiz kollajen depolanmasına neden olarak fibrozis ve skar formasyonunun oluşumunda önemli rol oynayan bir sitokin olması, uygulandığı bölgelerde hipertrofik skar yaratabileceği yönünde endişelerin gelişmesine neden olmuştur; fakat TGF- β ailesinin üyelerinden olan BMP (Bone Morphogenetic Protein) ler ortopedik cerrahide önçalışma niteliğinde kullanıma girmiş durumdadır(50).

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF): Fibroblast büyüme faktörleri mitojenik polipeptid ailesidirler. İçlerinde en çok incelenmiş olan altgrup bFGF; fibroblastlar, endotel hücreleri, osteoblastlar, kondrositler ve keratinositler üzerinde mitozu arttırıcı etki gösterir, anjiogenez ve endotelial hücre göçünde rol oynar, TGF- β 'nın dağılımını arttırıcı etki yapar(48). VEGF ve TNF- α ile birlikte olduğunda maksimum anjiogenez etkisini gösterir. Yara iyileşmesinde özellikle keratinositlerin proliferasyon ve göçüne neden olur. Anjiogenezin başlaması için gerekli olan fibroblastlardan kollajenaz üretimi ve kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar(63, 64). Granülasyon dokusu oluşumunu başlatmaya da yardımcı olur(47). Bazik fibroblast büyüme faktörü ve sucrose octasulfate (sucrafate)' in ayrı ayrı gastrik ülserler üzerine olumlu etkisi olduğu bilinmektedir(65). Rashid ve arkadaşları bu iki maddeyi birlikte kullanarak sıçan dorsal fleplerinde yaşayabilirliği arttırdığını, bunun da anjiogenez sayesinde olduğunu saptamışlardır(65). Khouri fleplerin altına bFGF, Uhl ise rekombinant bFGF uyguladığında neovaskülarizasyonun ve flep sağkalımının arttığını rapor etmiştir(33, 66). Fakat Hayward bFGF verdikten sonra opere ettiği fleplerin sağkalımında anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır(67). Yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini anlayabilmek için McGee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada rekombinant bFGF'nin kollajen miktar,

organizasyon ve maturasyonunu arttırdığını, buna sebep olan faktörün kollajen ve fibroblastların yara yerinde daha erken birikmesi ve kollajen lifleri arasında daha çok çapraz bağ oluşması olabileceğini düşünmüşlerdir(68). Diyabetik, iskemik ve protein eksikliği olan yaraların iyileşmesini arttırdığı ve tendon iyileşme modellerinde de başarısı gösterilmiştir(48, 50). Kardiak enfarktüs sonrası kollateral oluşumunu arttırmak için bFGF ile çalışmalar devam etmektedir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I): İnsan proinsülinine benzerliği nedeniyle bu ismi alan IGF-I, fibroblast, kondrosit, keratinosit, osteoblast, mezangial eritroid progenitör hücreler gibi pek çok hücre tipinin çoğalmasını arttırarak büyümeyi uyarır. PDGF ile birlikte olduğunda daha iyi bir etki gösterir. Dolaşımdaki IGF-1'in protein sentezini, periferel glukoz alımını, glikojen sentezini, sinir sağkalımını, miyelin sentezini, kemik oluşumunu arttıran anabolik etkileri arttırdığı, kaslardaki protein yıkımı gibi katabolik etkileri azalttığı bilinmektedir. Aşıl tendonunda travma oluşturarak yapılan çalışmada düzeyinin arttığı görülüp tendon iyileşmesinde muhtemelen mitozu arttırarak etki gösterdiği düşünülmüştür.

Egzojen olarak verilen IGF-1'in DNA, kollajen ve proteoglikanı arttırdığı gösterilmiştir(42, 43, 50). IGF'ün proteoglikan sentez ve yıkımını dengeleyerek kırıkta homeostazında önemli rol oynadığı öne sürülmüş ve atlarda yapılan kırıkta defekti modelinde fibrin pıhtıya IGF ilave edilerek bu defekte uygulandığında onarılan dokunun kalite ve miktarını arttırdığı gözlenmiştir(56, 69).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF): VEGF'ün, tümör hücrelerinden salgılanan, damar geçirgenliğini arttırarak asit oluşumuna katkıda bulunan bir madde olduğu düşünülmüş ve bu nedenle 1983'te "vascular permeability factor" olarak

isimlendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar doğrultusunda VEGF olarak ismi değiştirilmiş, en kuvvetli fizyolojik ve patolojik anjiogenezis uyarıcısıdır(39, 48, 55, 70). Beş adet izoformu bulunan VEGF kendi salınımından sonra diğer proteoglikan-bağlı salınımı olan büyüme faktörlerinin (bFGF) de salınımını uyarır ve bFGF ile sinerjistik anjiojenik etkisi gösterilmiştir(63, 69).

Anjiogenezin ilk basamaklarında vasküler bazal membranların yıkılması için gerekli olan kollajenaz ve jelatinazın indüksiyonuna, daha sonra yine anjiogenez için gerekli olan α integrinlerin ekspresyonuna neden olarak iyileşen dokuda anjiogenezi başlatır. Diğer büyüme faktörleri ile kıyaslandığında mitojenik etkisinin endotelial hücrelerle sınırlı olması teorik olarak VEGF'in vasküler yetmezliklerde terapötik anjiogenez sağlamak için avantajlı olduğunu düşündürmektedir(39, 63). Doğrudan mitotik etkisinin yanında, VEGF bir taraftan kısmen nitrik oksit sentezini uyararak vazodilatasyona neden olurken, diğer taraftan hücre göçünü ve apoptozu inhibe eder(71). Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast, inflamatuvar ve endotelial hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir ve vasküler geçirgenliği artırır(43, 69). Tümörlerde kompresyon ve iskemiye bağlı gelişen lokal hipoksiye yanıt olarak VEGF düzeylerinde artış olduğu Shweiki tarafından gösterilmiş ve Stavri kalpte iskemiye takiben aterosklerotik plaklarda yeni damar oluşumlarının uyarılmasında hipoksiye bağlı VEGF artışının rol oynayabileceği tezini savunmuştur. Deneysel modellerde ekstremitte iskemisinde egzojen verilen VEGF'in anjiogenezi başlatarak vasküler kaynağı, bazı çalışmalarda da vasküler yaralanmanın ardından uygulandığında yeniden endotel oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir(50, 63). Zhang ve arkadaşlarıysa sıçan TRAM flep modelinde subkutan VEGF uygulamasında flep yaşayabilirliğinde ve anjiogeneziste anlamlı artış saptamışlar; cerrahi geciktirme yapılan sıçan TRAM

fleplerinde sitokin düzeylerine baktıklarında TGF- β ve PDGF ekspresyonu değişmezken bFGF ve VEGF ekspresyonlarının anlamlı miktarda arttığını belirleyerek önceki çalışmalarını desteklemiş ve farmakolojik olarak geciktirme etkisi yaratmak için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada da dışarıdan uygulanan VEGF'in iskemik yaralarda anjiyogenezi uyardığı ve tensil gücü arttırdığını göstermişlerdir(71). Kryger ve arkadaşları hem kas fleplerinde hem de muskulokütan fleplerde VEGF uygulamasının hem subdermal/subfasyal hem de intravasküler olduğunda flep yaşayabilirliği üzerinde olumlu etkileri olduğunu yayınlamışlardır(39). Machens sıçan epigastrik fleplerinin altına VEGF uygulayıp, flep yaşayabilirliğinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptayarak diğer araştırmacıların sonuçlarıyla kısmen çelişmiştir(72).

Petersen ve arkadaşları da 2002'de tendon anjiogenezinin ana belirleyicisinin VEGF olduğunu bulmuşlardır(55).

Epidermal büyüme faktörü (EGF): Epidermal büyüme faktörü, yara iyileşmesinin erken safhalarında fibronektin gibi proteinlerin üretimini ve epitel hücre göçünü uyarır. Kollajen üretimini arttırmadan fibroblastların çoğalmasını sağladığı düşünülmüş olmasına rağmen Brown ve arkadaşları sıçanlarda insizyon bölgelerine biyosentetik EGF uygulamalarının ardından yaptıkları elektron mikroskopik incelemede artmış kollajen oluşumu göstermişler ve 7-14 gün sonra yara gerim kuvvetinin % 200 arttığını bildirmişlerdir(61, 72). İn vivo olarak anjiogenezi uyardığı bilinen EGF ile yapılan klinik çalışmalarda gümüş sülfadiazin içine koyularak kronik yaralara uygulandığında epitelizasyonu arttırdığı saptanmıştır(73).

Büyüme faktörlerine ilave olarak α -granüllerinden trombin, tromboksan A2 ve ADP salınımı olur. Bu maddeler oluşan pıhtıya daha çok trombositin gelmesine ve hemostatik cevabın artmasına neden olurlar(49).

2.9.3. Trombositten Zengin Plazma (PRP = TZP = trombosit jel = büyüme faktörlerinden zengin plazma)

Trombositlerin çeşitli yöntemlerle, antikoagülan ilave edilmiş venöz kandan santrifüj edilerek ayrıştırılıp, fibrinojen de içeren az miktar plazma içerisinde süspansiyon haline getirilmesiyle TZP elde edilir. İleri teknoloji aletler kullanılsa da mantık olarak minimum 45-60 cc kan, antikoagülan solüsyon içine alındıktan sonra seri santrifüj işlemlerinden geçirilip, kırmızı kan hücreleri, fibrin yapıştırıcı (trombosit fakir plazma) ve trombosit konsantresi (TZP) olarak ayrıştırılabilmektedir. Trombosit sayısı kandaki normal değerinin 3-8 katına kadar konsantre edilebilir(52, 74) (60). Trombin ve kalsiyum ilave edilerek TZP aktif hale getirilir, pıhtılaşarak jel halini alan bu maddedeki trombositlerin α -granüllerindeki büyüme hormonları ortama salınır(45, 74). Trombosit zengin plazma ile fibrin yapıştırıcının farkı TZP’de trombosit konsantrasyonunun fazla, fibrinojen konsantrasyonunun az olmasıdır. Daha az fibrinojen içerdiği için çok katı bir fibrin pıhtı oluşmadığı, bu nedenle yara iyileşmesini engellemeyip, bilakis içindeki büyüme faktörleri sayesinde bu olayı hızlandırdığı düşünülmüştür(45, 52).

Yeterli deneysel çalışmaları yapılmadan önce kullanıma giren TZP’nin genelde kontrol gruplarının olmaması deneysel çalışmalara olan ihtiyacı beraberinde getirmiştir. Yapılmış az sayıdaki deneysel çalışmalardan birisi olan Partsafas’ın çalışmasında FY veya TZP’nin serbest flep modelinde olumlu ya da olumsuz etkisi saptanmamıştır(75). Yara bölgelerine TZP uygulayarak yapılan çalışmalarda amaç, yara iyileşmesinin başlatıcıları olan büyüme faktörlerini konsantre şekilde yara bölgesine vererek iyileşme

sürecini hızlandırmaktır. Çünkü klinik olarak ciddi birer problem olan kronik yaralarda, bu faktörlerin miktarlarının azaldığı gösterilmiştir. Bu durum, üretimde veya salınımında azalma, yıkımda artma ya da hepsine birden bağlı olabilir. Venöz ülserler, diyabetik yaralar vb. kronik durumlarda kullandıklarında TZP'nin faydalı olduğunu rapor etmiş olan pek çok araştırmacı vardır(76, 77). Yara iyileşmesini arttıran proteinlerin yanında bakterisidal proteinleri de içermesi, enfeksiyonların kontrol altına alınmasına ve hastanede yatış sürelerinin kısılmasına, ağrı ve şişlikte azalmaya neden olmuştur(78).

Marx tek başına kemik grefti uygulaması ile kemik grefti + TZP uygulamasını karşılaştırdığında ikili uygulamada kemik dansitesinde, kemik biçimlenmesinin hız ve derecesinde daha çok artış saptamış ve bunun PDGF ve TGF- β sayesinde olduğunu belirtmiştir(60). Anitua da diş çekimi sonrası oluşan boşluğa TZP uygulamış ve hem epitelizasyon hem de kemik dansitesinde artış rapor etmiştir. Trombosit zengin plazma invitro ortamda fetal osteoblast benzeri hücrelerin rejenerasyon ve fonksiyonelliğini arttırıp, mezenkimal kök hücrelerin ortama göçünü sağlamaktadır(42). Gruber de trombositlerin periost kaynaklı hücrelere kemotaktik olduğunu göstermiştir(79). Aghaloo ve ark. ise kemik greftleriyle yaptıkları deneysel hayvan çalışmalarında TZP'nin üstünlüğünü gösterememişlerdir(80). Fakat oral ve maksillofasiyal cerrahide, osteointegrasyon için kullanılan otojen greftlere kemik doku ilerlemesini hızlandırıdığını bildiren araştırmacılar mevcuttur ve maksiller antroplastide kemik greftleriyle birlikte kullanımında başarılı sonuçlar bildirilmiştir(74). Trombositlerin içerdiği büyüme faktörlerinin hem periost ve osteoblastlar, hem de osteoblast benzeri hücreler üzerinde mitojenik etkisi olduğu ve TZP'nin poröz hidroksiapatit içine kemik ilerlemesini arttırdığı gösterilmiştir(81).

Kemikleşmeye ve yara iyileşmesine katkıları nedeniyle lumbal spinal füzyon hastalarında otogreft ve hidroksiapatit ile birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar yanında olumsuz sonuçlar da rapor edilmiştir(42).

Kawase ve Okuda'nın 2003 yılında TZP'nin periodontal ligamentte kollajen sentezini ve in vitro osteoblastik aktiviteyi arttırdığını göstermelerinden sonra Huang ve arkadaşları gingival çekilmelerde koronal ilerletme flebine TZP uygulaması yapmışlar fakat istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme artışı saptayamamışlardır(43, 82). Daha önceden Siebrecht ile birlikte TZP'nin poröz hidroksiapatit içine kemik ilerlemesini ve kemik oluşumunu arttırdığını gösteren Aspenberg, sıçan aşıl tendonunda TZP uygulanan tendon defektinin tendon kopma kuvvetinde ve tendon kallusunda artış saptamıştır. Ligamanlar üzerinde de benzer etkileri saptanmış ve artroskopik cerrahide kullanımı önerilmiştir.

Oftalmolojik cerrahide maküler deliklerin kapatılmasında başarılı sonuçlar bildirilmiş, tavşanlarda yapılan deneysel bir çalışmada da retinal yaralanmalarda hücresel cevabı arttırdığı gösterilmiştir(42).

Man, hem TZP hem de fibrin yapıştırıcıyı yüz germe, boyun germe, meme küçültme gibi ameliyatlarda kullanmış ve operasyon süresinde kısalma, dren koyma ihtiyacında, baskılı pansuman kullanımında, seroma oluşumunda, hastanın postoperatif şişlik ve ağrı şikayetlerinde azalma rapor etmiştir(45).

Teknolojik ilerlemeler sayesinde bazı cihazlar yardımıyla tüm kan hücrelerini, dolayısıyla trombositleri de steril şartlar altında izole ve konsantre etmek mümkündür. Çelişkili sonuçlar yeterli kontrollü çalışmalarla aydınlatıldığı takdirde, bireyin kendi kanından elde edildiği için immün reaksiyon gözlenmemesi, herhangi bir yan etki

oluşmaması, ve gerektiğinde aynı hastadan herhangi bir sorun çıkmadan tekrar elde edilebilmesi, otolog olarak elde edildiği için hastalık bulaştırma riski olmaması kullanımının yaygınlaşmasını sağlayacak en önemli faktörlerdendir.

2.10. Kök Hücreler

2.10.1. Genel Bilgiler

Kök hücreler, uygun biyokimyasal sinyallerin varlığında farklı hücre tiplerine dönüşebilme özelliğine sahip hücrelerdir. Bugün için tedavisi mümkün görünmeyen hastalıkların birçoğu, yaşam için vazgeçilmez olan bazı hücre-doku ve organların, bir daha asla normal yapı ve işlevlerine döndürülmeyecek şekilde hasarlanmış olması sonucudur. Örneğin; tip 1 diyabet hastalığında pankreasta İnsülin salgılayan beta hücrelerinin, Parkinson hastalığında beyinde dopamin salgılayan sinir hücrelerin hasarı söz konusudur. İşte, bu tür ve benzeri hastalıkların (Alzheimer, Multiple skleroz, ALS, omurilik zedelenmesi, Purkinje hücre bozunumu hasarlanması- (PCD), Duchenn kas distrofisi ve diğer birçok hastalık gibi) kesin tedavisini sağlamak amacıyla araştırmacılar hasar gören hücre-doku veya organların biyolojik işlevlerini yerine koymak (rejeneratif tıp) ya da tamir etmek (reparatif tıp) ile mümkün olabileceğini düşünmektedirler. Bir hedef doku veya organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek kadar sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabilir. Kök hücreler, bu amaca hizmet edebilecek yani hücre tabanlı tedavide kullanılabilecek başlıca unsur olarak görünüyor(83).

İkinci Dünya Savaşını takip eden yıllarda bilim dünyası radyasyonun neden olduğu hastalıkların tedavisi için çok ciddi çabalar harcamıştır. Bu çalışmalardan elde edilen ilk gözlemler gösterdi ki; letal dozda radyasyona maruz kalmış hastalarda dalak veya

kemik iliği hücrelerinin nakli hücrel iyileşmeye önemli katkılar sağlamıştır(84). Bu dramatik kavramdan yaklaşık 50 yıl sonra, aslında bu iyileşmelerin kemik iliğimizde var olan ve nadir sayıdaki kök hücrelere bağlı olarak radyasyonu takiben hematopoezin yeniden inşa edilmesinden kaynaklandığını biliyoruz.

1983 yılında Sale tarafından allojenik hematopoetik kök hücre nakli sonrası, yaygın akciğer ossifikasyonların bağlı olarak solunum yetmezliğinin tespiti üzerine in vivo plastisite kavramının ilk düşünceleri doğmuştur(85). Sonraki yıllarda, başta kemik iliğimizde bulunan kök hücrelerin in vitro ve in vivo koşullarda yalnızca kaynaklandıkları doku ve organların hücrelerini değil vücudumuzun diğer işlevsel hücrelerine de dönüşebildiklerini (plastisite) gösteren birçok rapor yayımlanmıştır. Diğer erişkin kök hücre kaynaklarına oranla daha kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle kemik iliği kök hücre (KİKH)'leri öncelikli olmak üzere farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler rejeneratif ve reparatif tıp'ta oldukça önemli bir kaynak olmuşlardır (83). Günümüzde, kök hücre biyolojisindeki en tartışmalı konulardan biri kök hücre plastisitesiyle ilişkilidir. Dokuya özgün kök hücrelerinin, kaynak dokudan daha farklı bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine “erişkin kök hücre plastisitesi” denmektedir. Transdifferensiasyon terimi ise, kök hücrelerin plastisite potansiyeli anlamında sıklıkla kullanılmaktadır. Transdifferensiasyon, birkaç özgün türde doğa olarak meydana gelir. Örneğin, semender ve civcivlerde gözün lensi çıkartıldığı zaman, iris hücreleri lens hücrelerine dönüşür(83).

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

İn Vitro Yöntemler;

1) Kültür koşullarının modifikasyonlarına yönelik girişimler.

2) Genetik modifikasyonlar; genomu değiştirmeye yönelik girişimler.

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

2b) RNAi vasıtasıyla farklılaşmanın yönlendirilmesi.

2c) Cre/LoxP sistem.

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

İn Vivo Yöntemler;

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

İn vitro işaretli (GFP+, LacZ+ gibi) ya da transgenik hayvanlardan (GFP veya LacZ genini eksprese eden) elde edilen erişkin kök hücrelerinin sağlıklı ya da hasar oluşturulmuş alıcılara nakli ve izlenmesi. Erişkin kök hücrelerin mobilizasyonunun sağlanarak (örneğin, kemik iliği kök hücrelerinin), kaynaklandığı doku/organdan farklı doku/organlardaki plastisitesinin izlenmesi.

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

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

Maternal doku ve organlarda genotip uyumsuz fetal hücrelerin izlenmesi(83).

Bütün bu denemeler, erişkin kök hücrelerinin plastisitesini gösteren önemli kanıtları sağlamıştır. Ancak, diğer bazı bilim adamları, kök hücre plastisitesini açıklayan bu

kanıtları yeterli bulmadı ve bu bulgulara oldukça şüpheli yaklaştılar. Onlar, önceki çalışmalarda plastisite ya da transdifferensiasyon olarak adlandırılan bu olayı “hücre füzyonu” olarak yorumladılar(84).

2.10.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök Hücreler farklılaşma özelliklerine göre:

Totipotent Hücre: Erkeğin spermi ile kadının yumurtası birleştiğinde yani döllenme meydana geldiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu hücelere her şeyi yapabilen anlamına gelen totipotent hücre denir(83).

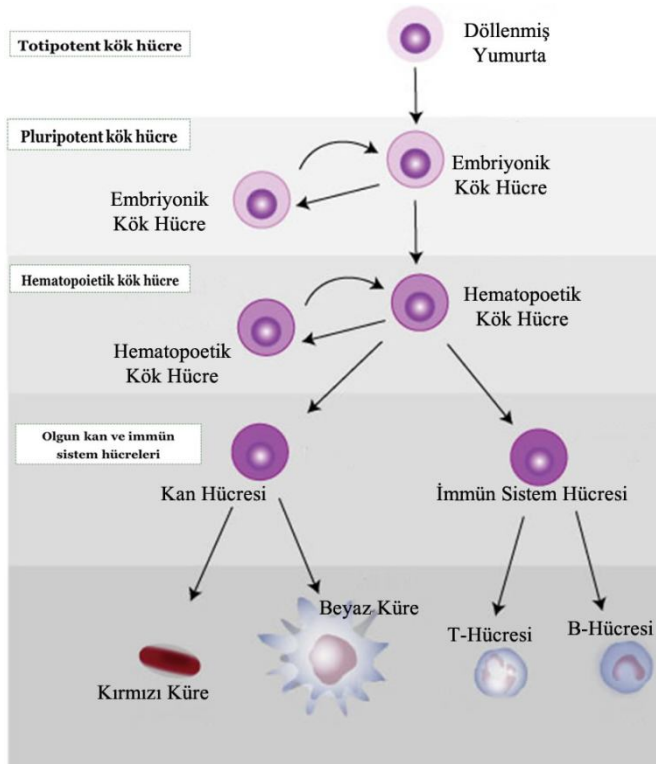
Döllenmeden sonraki ilk 4 gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücredir ve her bir hücre ayrı bir organizmayı oluşturabilecek güce sahiptir.

Pluripotent Hücre: Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren meydana gelen hücreler blastosist denilen küresel bir şekil alır. Bu kürenin içindeki hücreler vücuttaki tüm hücelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen, artık tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildirler. İşte bu tür hücelere pluripotent hücre denir. Aşağıda bahsedilecek olan embriyonel kök hücreler, bu küre içindeki hücrelerden oluşturulur ve pluripotent özelliğe sahiptirler(83).

Multipotent Hücre: Birbirine yakın hücre gruplarını oluşturabilen kök hücrelerdir. Kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilir(83).

Oligopotent hücre: Lenfoid ve myeloid hücrelerde olduğu üzere sadece birkaç hücre grubunu oluşturan kök hücrelerdir(83).

Unipotent hücre: Kas ana hücresinde olduğu üzere bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir(83). (Şekil 6)



Şekil 6: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması

2.10.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Pek çok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip multipotent kök hücrelerdir. Kemik iliği hücreleri kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman hızla plastik kültür kabına yapışan (adhere olan) hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri olduğu, yapışmayan (non-adherent) hücrelerin ise hematopoietik hücreler olduğu 1966'lı yıllardan beri bilinmektedir. Son yıllarda ise, stromal hücre sistemine duyulan ilgi giderek artmaktadır. Önceleri, kemik iliği kökenli stromal hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler (MKH) hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken daha sonraları in vivo ve in vitro çalışmalarla aralarında kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, adipoz doku, böbrek, akciğer ve bağırsakların da olduğu çeşitli hematopoietik olmayan dokuların parankimal hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir(86). MKH'ler,

ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlandı(87). Sonraki in vivo ve in vitro çalışmalar, MKH' leri her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan bir multipotent kök hücre kaynağı olarak belirlemişlerdir. MKH' lerin başta hematopoetik kök hücre (HKH) nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek arttırmaktadır. Önceleri yalnızca kemik iliğinden elde edilebilen MKH' ler günümüzde vücut sıvılarının da dahil olduğu birçok doku ve organizmaktan izole edilebilmektedir. Bu dokuların başlıcaları kas, kemik, kıkırdak ve yağ dokuları, diş pulpası ve periodontal ligament, karaciğer, timus, paratiroid, tonsilla palatina akciğer, dalak gibi solit organlar, endometriyum, yumurtalık ve testis gibi üremeye ilişkin organlar, amniyon sıvısı, plasenta, kordon kanı ve matriksi gibi fetal doku ve/veya organlardır(83). Uluslar arası Hücresel Tedavi Birliği (The International Society for Cellular Therapy; ISCT) yakın zamanda yayımlandığı kılavuzda MKH' lerin tanımlanması için 3 kriter önermiştir, 1) plastik hücre kültür kabına yapışabilme özelliği; 2) in vitro koşullarda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşabilme yeteneği ve 3) CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerini %95'in üzerinde ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçlerini % 2'den az oranda eksprese etmeleri gerekmektedir. MKH' lerin başta hücresel tedaviler, doku mühendisliği, bağışık baskılayıcı ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyeli olması bu hücrelere olan ilgiyi giderek arttırmaktadır(88). MKH' lerin hayvanlarda ve insanlarda lenfositlerin çoğalmasını engelleyerek bağışıklık yanıtlarını düzenleyici etkileri olduğu bildirilmiştir. HLA özdeş HKH' lerle birlikte nakledildiklerinde akut ve kronik GVHD'

nin (Graft Versus Host Disease; Konağın karşı vericinin hücrelerine reaksiyonu) azalmasına neden olmuştur. MKH ile ilgili klinik uygulamalarda son yıllarda dikkat çeken bir konu da kardiyak rejenerasyon çalışmalarıdır. MKH'lerin kardiyak rejenerasyonda iskemik kalp hastalarında ventriküler yeniden düzenlenme ve diyastolik fonksiyonların yeniden düzenlenmesi gibi olumlu etkileri oluşturabileceği rapor edilmektedir(89).

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

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

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

2.10.4. Kök Hücrelerin Potansiyel Kullanım Alanları

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

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, de novo myokard oluşturduğu ve miyokard enfarktüsü ve koroner arter hastalıklarında intrakoroner kök hücre infüzyonunun kalp kası rejenerasyonunda oldukça efektif olduğunu göstermiştir(90). Bundan başka oftalmolojide de araştırmacılar hasar görmüş göze başarılı bir şekilde korneal kök hücre transplante ederek görme kabiliyetini restore etmişlerdir(91).

Aynı hücrelerin başka uyaranlarla nöral hücre serisine de dönüşebildikleri gözlenmiş ve amyotrofik lateral skleroz gibi hastalıklarda spinal kordaki hasarlı bölgeye verilen kök hücrelerin ablatif sinir hücrelerini rejenere ettiği ve sonuçta lokomotor fonksiyonun restore olduğu gösterilmiştir(92). Yine en önemli metabolik hastalıklardan tip 1 diyabet hastalığında pankreasta insülin salgılayan beta hücrelerindeki hasar mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması ile ilgili yüz güldürücü çalışmalar yapılmıştır(89).

Endotelyal progenitör hücre tedavisi ve terapötik vaskülogenezin plastik cerrahide çeşitli uygulamaları vardır. Son zamanlarda problemlili bölgelerde yeni damar oluşumunu arttırmak için kök hücre transplantasyonu uygulanmaktadır(93).

Sistemik dolaşıma enjekte edildikten sonra endotelyal progenitör hücreler seçici bir şekilde iskemik dokulara yerleşir, böylece bu hücreler iskemik flepleri kurtarmada önemli rol oynayabilir. Bu nedenle terapötik anjiyogenezin flep yaşayabilirliğini, yara iyileşmesini geliştirme, doku çoğalmasını hızlandırma potansiyeli olup tek başına büyüme faktörlerinden daha çok, hücreleri yenileyerek faydalı olabilir.

Kök hücrelerin daha önce terapötik anjiyogenezis yapıcı etkileri birçok çalışmada gösterilmiş olup flep cerrahisinde kullanımına ait ilk çalışma ise Ichioka ve arkadaşları tarafından yapılmıştır(94). Sıçanlarda yaptıkları bu çalışmada, kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin dorsal cilt fleplerindeki revaskülarizasyon üzerine etkisi araştırılmış ve

kapiller dansitede iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı yönde belirgin artış tespit etmişlerdir.

Mezenkimal hücrelerin vasküler endotelyal hücrelere farklılaşma kabiliyetleri olduğu bilinmektedir. Zheng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VEGF-transduced mezenkimal kök hücrelerin iskemik fleplerde neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir(95).

Uysal Ç. ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı başka bir çalışmada adipoz doku kökenli kök hücrelerin random patternli cilt fleplerinin viabilitesini arttırdığını göstermişlerdir(96). Kemik iliği kökenli kök hücrelerin de sıçan cilt fleplerinde neovaskülarizasyonu arttırıp flep dolaşımına olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir(97).

Yine aynı ekibin başka bir çalışmasında sıçan dorsal cilt fleplerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarının adipoz doku kökenli kök hücre uygulanması ve bir takım büyüme faktörlerinin regüle edilmesi sonucu iskemi reperfüzyon hasarının önlenileceği gösterilmiştir(96).

2.10.5. Adipoz Doku

Yağ dokusu, baskın hücre tipi yağ hücreleri (adiposit) olan bağ dokusunun özel bir tipi olup mezenkimal kökenlidir. Adipositler bağ dokusunda tek başına olabilecekleri gibi küçük gruplar halinde de bulunabilir. Yağ dokusu, zengin bir vasküler yatak ve sinir ağına sahip bir bağ dokusu ile tam olmayan lobüllere bölünmüştür. Adipositler, retiküler liflerden zengin ince ve ağ şeklinde bir yapı ile desteklenerek birbirlerine bağlanırlar. Yağ dokusunda bulunan hücrelerin yaklaşık üçte ikisi adipositlerdir.

Diğer hücreler; çeşitli kan hücreleri, endotel hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve çeşitli farklılaşma evrelerinde olan öncül hücrelerdir(98).

Yağ dokusu insanlarda ilk olarak embriyonel hayatın üçüncü ayından itibaren vücudun çeşitli bölgelerinde (yanak, boyun, omuzlar, kalça, perirenal) görülmeye baslar. İlk olarak içinde yağ bulundurmeyen yoğun mezenkimal hücre kümeleri oluşur ve bunlar organize damar ağıyla sarılır. Kapillerlerin çevresinde yoğun yağ içeren öncü yağ hücresi kümeleri oluşur. Yağ dokusu gelişiminin son aşamasında yağ hücrelerinin boyutu artarken bunları çevreleyen septalar oluşur. Embriyogenez esnasında yağ dokusu oluşumu ile damar ağı oluşumunun sıkı bir iliksi içinde olduğu görülür. Yağ hücrelerinden salınan spesifik büyüme faktörlerinin anjiogenezi yönlendirmesi önemli bir konudur. Büyüme faktörlerine ek olarak salınan ‘monobutylin’ yağ dokuya spesifik bir anjiogenezi faktörüdür (98).

Yağ dokusu adipositlerin içerdiği lipid damlacıklarına göre uniloküler (beyaz) ve multiloküler (kahverengi) yağ dokusu olarak sınıflandırılır. Beyaz adipositler sadece büyük bir yağ vakuölüne sahiptir. Yağ asitlerinin depolanması ve kullanılmasından rol alırlar. Kahverengi adipositler multilokülerdir ve hücre içinde bol miktarda mitokondri vardır. Uyarıldıklarında depolanmış kimyasal enerjiyi ısıya dönüştürürler.

Yağ dokusunun görevleri şunlardır; Enerji depolama, yağda eriyen vitaminleri depolama, fiziksel koruma, ısı üretimi, adipokin (adipositokin) salınımıdır. Adipokinler yağ dokudan salınan protein yapısındaki maddeler olup endokrin, parakrin ve otokrin etkilere neden olurlar.

2.10.6. Kök Hücre Kaynağı Olarak Adipoz Doku

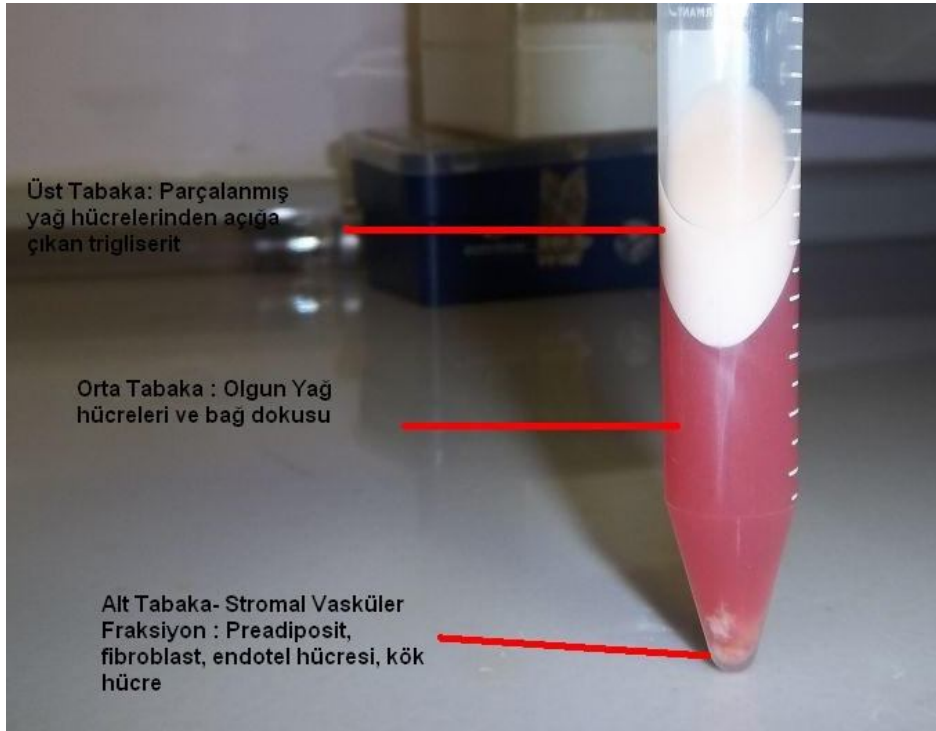
Bugüne kadar mezenkimal kök hücre kaynağı olarak çoğunlukla kemik iliği kullanılmış ancak son çalışmalara bakıldığında yeni kaynaklar tanımlanmıştır. Zuk ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada adipoz dokunun mezenkimal hücrelerden oldukça

zengin olduğu gösterilmiştir(99). Adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerin kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere göre izolasyonlarının daha az acı verici olmaları, lipoaspirasyon yöntemi ile kolayca ve bol miktarda elde edilebilmeleri nedeniyle adipoz dokunun plastik cerrahide son yıllarda kök hücre kaynağı olarak kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır.

Poznanski ve arkadaşları yaptıkları çalışmada yağ dokusunun kök hücre bakımından oldukça zengin bir doku olduğunu göstermiştir(100). Ayrıca adipoz doku santimetre kp başına kemik iliğine göre 100 ila 1000 kat daha fazla pluripotent hücre içermektedir(101).

2.10.7. Stromal Vasküler Fraksiyon

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



Resim 1: Fraksiyonlarına ayrılmış yağ dokusu

Stromal vasküler fraksiyon içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler bulunmaktadır(98). Stromal vasküler fraksiyon içerisindeki kök hücreler uygun ortamlarda çoğalabilmekte, farklılaşabilmektedir. Bu hücreler tedavi amaçlı doku yenilenmesinde büyük bir potansiyel oluşturmaktadır. Yağ dokudan elde edilen kök hücreler, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerle aynı işleve sahiptir. Yağ dokunun avantajı daha kolay bir yöntemle elde edilebilmesidir (102).

Stromal vasküler fraksiyonun, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), ve transforming growth faktör - β (TGF- β) gibi anjiogenik ve antiapoptotik sitokinleri üretme potansiyeli vardır. Hipoksik ortamda stromal vasküler fraksiyondan VEGF salınımının belirgin derecede artmaktadır (103).

Anjiogenez, yani yeni damar oluşumu, yara iyileşmesinde önemli bir basamaktır. Dokuların işlevlerini yerine getirebilmesi için kendilerine özgü damarlanma yapısına sahip olmaları gereklidir. Damar endoteli büyüme faktörü, endotel hücre büyümesinin güçlü bir uyarandır (104). Stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan preadipositler adipojenik öncü hücre olmalarının yanı sıra mikrovasküler endotelyal hücrelerle parakrin etkileşim göstermektedir. Preadipositler tarafından salınan ‘monobutylin’ bir anjiogenik faktör olup endotelyal hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (36,41). Stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan bir diğer hücre grubu fibroblastlardır. Fibroblastların ana metabolik fonksiyonları, kollajen, proteoglikan ve elastin sentezidir. Fibroblastlardan salınan keratinosit büyüme faktörü (KGF) epidermal hücre büyümesini uyarır, TGF- β ise fibrozisi ve gerilim kuvvetini artırır, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) nötrofil, makrofaj, endotel hücrelerin çoğalmasını ve kemotaksisini uyarır (105).

Plastik cerrahide en önemli problemlerden biri büyük cilt defektlerinin kapatılmasıdır. Büyük defektleri kapatmada kullanılan ve kendilerine ait bir damar yatağına sahip olan fleplerin, boyu uzadıkça flep yaşayabilen kısmında azalma olmaktadır. Bu durumda flep distalinde nekroz alanları oluşmaktadır. Fleplerin yaşayabilen kısımlarını arttırmak için çok sayıda kimyasal, fiziksel ve cerrahi modifikasyon yapılmıştır. Trombositten zengin plazma (PRP) ve stromal vasküler fraksiyon (SVF), tıpta geniş kullanım alanları olan, etkinlikleri kanıtlanmış, otolog kaynaklı hücresel tedavi ürünleridir. Buna rağmen literatürde, bu iki ürünün flep yaşayabilirliğini arttırmadaki rolü üzerine yeterli sayıda çalışma yoktur. Bu çalışmada bizim amacımız, rat dorsal derisinde kaldırılan McFarlane flebinde, lokal olarak uygulanan PRP ve SVF’nin, flep yaşayabilirliğine olan etkisini araştırmaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı.

Çalışmada deney hayvanı olarak ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen 24 adet Sprague-Dawley cinsi erişkin dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar uygun kafeslerde, 22±20 C sıcaklıkta ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanların beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı. Sıçanlar basit rastgele örnekleme yöntemiyle her biri 6'şar adetten oluşan dört gruba ayrıldı.

Gruplar:

Grup I: Flep alanına cerrahiden 1 hafta önce izotonik NaCl enjeksiyonu yapılan grup

Grup II: Flep alanına cerrahiden 1 hafta önce PRP enjeksiyonu yapılan grup

Grup III: Flep alanına cerrahiden 2 gün önce SVF enjeksiyonu yapılan grup

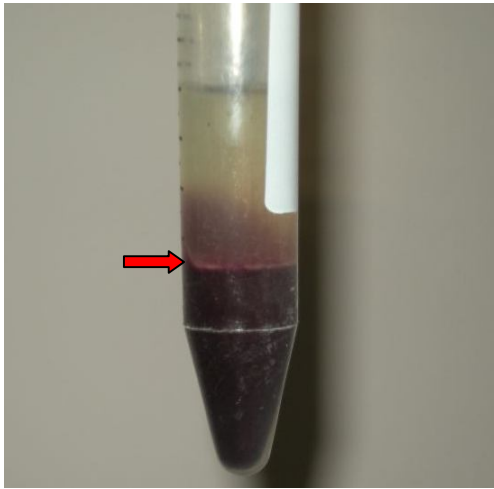
Grup IV: Flep alanına cerrahiden 1 hafta önce PRP + SVF enjeksiyonu yapılan grup

3.1. İşlemler:

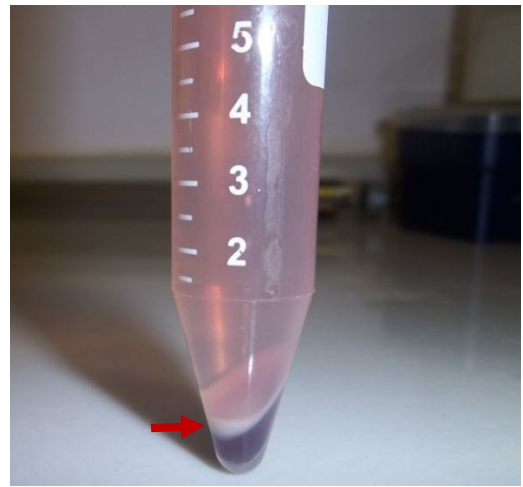
3.1.1. PRP'nin Hazırlanması

Trombositlerin diğer kan elemanlarından ayrılıp bir miktar plazma ilave edilerek TZP haline getirilebilmesi için gerekli olan kan, donör olarak seçilen 10 adet sıçandan, Ketamine HCl (Alfamine®-IM) ve Ksilazin HCl (Rompun®-IM) karışımı ile sağlanan anestezi altında intrakardiyak kanülizasyon ile tüm vücut kanları alınarak elde edildi.

Elde edilen 150 ml kan, pıhtılaşmasını engellemek için sitrat-fosfat-dekstroz (CPD) solüsyonu ile, 5 ml kan/1 ml CPD oranında karıştırılarak santrifüj işlemi için uygun olan dört plastik tüp içerisinde toplandı. Bizim kullandığımız CPD solüsyonu kan merkezlerindeki üçlü kan torbaları (Baxter Healthcare Corp, USA) içerisinde elde edildi. Toplanan kan 220C sıcaklıkta ve 200 g devirde santrifüj cihazında 20 dakika boyunca santrifüje tabi tutuldu. Üstte toplanan açık sarı renkli plazma ile en alttaki kırmızı tabaka arasında ince bir ara tabaka (buffy coat) izlendi (Resim 2). Üzerindeki plazmayla beraber bu ara tabaka ayrı bir tüpe alındı. Bu tüp ikinci kez 480 g devirde 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonunda trombositten fakir plazmanın en üstte toplandığı görüldü (Resim 3).



Resim 2: İlk santrifüj sonrası plazma ve kırmızı kan hücreleri arasında trombosit ve lökositlerin oluşturduğu ince tabaka (ok)



Resim 3: İkinci santrifüj sonrası iki tabaka arasında yer alan trombosit konsantresi (ok)

Oluşan trombosit konsantresi ve trombosit fakir plazma (= fibrin yapıştırıcı= FY) ayrıştırılıp farklı tüplere alındı. Trombosit konsantresi $1,5 \times 10^{12}$ trombosit/lt olacak

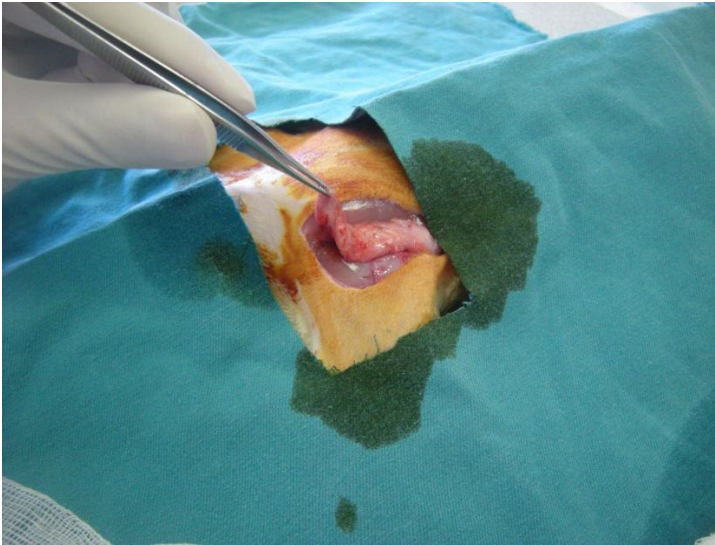
şekilde FY ile seyreltildi. Yapılan analizle trombositlerin üç kat konsantre edildiği saptandı ($0,3-0,8 \times 10^{12}$ / $1,5 \times 10^{12}$ trombosit/lt).

Trombosit zengin plazma, sığır kaynaklı trombin preparatı (Thrombin, Sigma-Aldrich, Almanya) ile aktive edildi. 1000 ünite toz halinde trombin içeren ürün, 10 ml %10'luk kalsiyum klorür ile karıştırılarak 100 ünite/ml oranında trombin solüsyonu elde edildi.

Çalışma sırasında TZP'nin 1 ml'sine 10ü trombin solüsyonu ilave edilerek aktif hale geçmesi ve ortama büyüme faktörlerinin salınımı sağlandı(106). Elde edilen PRP maksimum etki için flep kaldırılması planlanan alana cerrahiden 1 hafta önce enjekte edildi(107). Akraba ratlarda kan gurubu uyumu aranmadığı için farklı ratlardan hazırlanan PRP'nin lokal uygulamasında herhangi bir ret reaksiyonu görülmedi.

3.1.2. SVF'nin Hazırlanması

Donör olarak hazırlanan anestezi altındaki 10 ratın inguinal bölgeleri traşlandı. Steril %10 povidon iyot (Poviodeks, Kim-Pa İlaç Lab. Tic. Ltd. Şti. İstanbul) ile temizlendi. Her iki inguinal krize paralel olarak yapılan insizyon ile girilerek inguinal yağ yastıkçıkları eksize edildi (Resim 4). İnsizyon alanları 3/0 ipek ile dikildi.



Resim 4: İnguinal yağ yastıkçıklarının alınması

Çıkarılan yağ dokuları birkaç kez fosfat buffer solüsyonu ile yıkandı. İnce doku makası ile küçük parçalara bölündü. Dokular %0.1 kollajenazla (Collagenase from Clostridium histolyticum C0130, Sigma) muamele edilerek yavaş çalkalamalı su banyosunda 37°C de 60 dakika bekletildi. Fosfat buffer solüsyonla (PBS, Sigma) seyreltilerek kollajenaz uzaklaştırıldı.

Hücre süspansiyonu 1300 rpm (260G) de iki kez beser dakika santrifüj edildi. Üstte matür adipositlerden oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Dibe çöken pellet kısım filtreden süzülerek 'stromal vasküler fraksiyon' olarak kullanıldı (Resim 5).



Resim 5: Stromal Vasküler Fraksiyon (ok)

Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin non-immünojenik profile sahip olmalarından dolayı SVF hazırlanırken tüm ratlardan toplanan yağ dokuları birlikte işleme alındı(108).

Elde ettiğimiz stromal vasküler fraksiyon içerisindeki canlı hücrelerin sayımı için 100 mikrolitre (µl) SVF eppendorf tüpüne kondu, üzerine 100 mikrolitre (µl) Trypan Blue ilave edilerek pipetaj yapıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine kondu ve lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesinin üzerine lamel kapatıldı. Thoma laminin her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında, lamelin lam ile birleştiği noktaya hazırladığımız süspansiyondan 50 µl pipetlendi. Daha sonra thoma lamı mikroskobun tablasına yerleştirildi. Hücreler tek tek sayılarak not edildi. Yaklaşık olarak 4×10^6 /ml canlı hücre tespit edildi.

Elde edilen SVF flep kaldırılması planlanan alana literatürdeki veriler baz alınarak cerrahiden 2 gün önce enjekte edildi(109).

3.1.3. Anestezi

Anestezi, 35 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar®, Eczacıbaşı-Türkiye) i.m. ve 5 mg/kg ksilozin hidroklorid (Rompun®, Bayer-Türkiye) i.m. ile sağlandı. Anestezi derinliği çene ve iskelet kas tonusuyla izlendi.

3.1.4. Enjeksiyonlar

Gurup I: Kontrol gurubundaki deney hayvanlarına flep cerrahisinden 1 hafta önce, flep yapılması planlanan alana, panniculus carnosus dokusu altına 2,5 ml serum fizyolojik (SF) 21G enjektörlerle infiltre edildi.

Gurup II: PRP tedavi gurubundaki deney hayvanlarına flep cerrahisinden 1 hafta önce, flep yapılması planlanan alana, panniculus carnosus dokusu altına 2,5 ml PRP 21G enjektörlerle infiltre edildi (Resim 6).



Resim 6: Flep alanına PRP uygulanması

Gurup III: SVF tedavi gurubundaki deney hayvanlarına flep cerrahisinden 2 gün önce, flep yapılması planlanan alana, panniculus carnosus dokusu altına SVF enjekte edildi (Resim 7).



Resim 7: Flep alanına SVF uygulanması

Gurup IV: PRP+SVF tedavi gurubundaki deney hayvanlarına flep cerrahisinden 1 hafta önce, flep yapılması planlanan alana, panniculus carnosus dokusu altına 2,5 ml PRP ve SVF enjekte edildi.

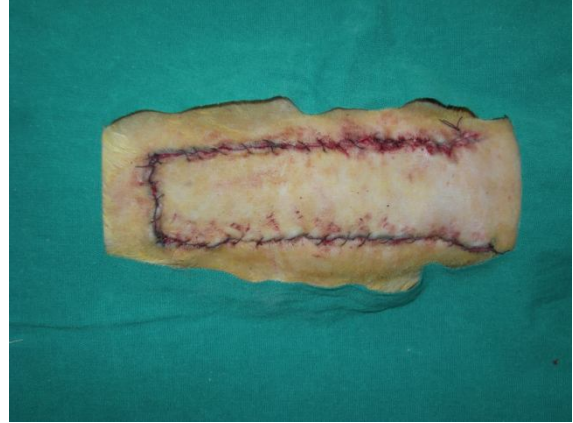
Tüm guruplarda enjeksiyonlar flepte nekroza gitmesi en muhtemel kısım olan distalden başlanarak flebin distal 2/3'ünün tamamına uygulandı.

3.1.5. Cerrahi

Anestezi altındaki deney hayvanının dorsal cilt derisi elektrikli tıraş makinesi ile tıraş edildi ve %10 povidon iyot (Poviiodeks, Kim-Pa İlaç Lab. Tic. Ltd. Şti. İstanbul) ile temizlendi. Tüm cerrahi işlemler boyunca lokal steril şartlara dikkat edildi. Dorsal ciltten 3x10 cm boyutlarında, kaudal tabanlı derinin tüm katmanlarını ve panniculus carnosusu da içeren, Khouri'nin modifiye ettiği McFarlane flebi kaldırıldı (Resim 8). Kanama kontrolünü takiben, flep, 3-0 polipropilen suture ile devamlı olarak yerine yeniden dikildi (Resim 9).



Resim 8: McFarlane flebinin elevasyonu



Resim 9: Flebin yerine iade edilmiş hali

3.2. Değerlendirme

3.2.1. Genel Değerlendirme

Çalışmaya dahil edilen hayvanlarda deney süresince oluşan genel değişiklikler her gün gözlemlendi. Postoperatif dönemde ağrıları olmaması için 2 gün boyunca flunixin (1,1 mg/kg - Fluvil®-IM) enjeksiyonları yapıldı. Sıçanların birbirlerine zarar vermelerini önlemek için her biri ayrı kafeslerde barındırıldı. Yara yerlerine postoperatif iki gün boyunca günde iki kez olacak şekilde %10'luk povidon iodine solüsyonu ile pansuman yapıldı.

3.2.2. Flep Nekroz Alanlarının Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda cerrahiden sonraki 7. günde nekroz alanları değerlendirildi. Bunun için tüm hayvanlar sakrifiye edilerek supin pozisyonda sabitlendi. Daha sonra, standart yöntem kullanılarak dijital fotoğraf makinesi (Coolpix P50, Nikon Inc, Japonya) aracılığıyla fleplerin fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra Image Tool 3.0 programı yardımıyla, tüm flep alanı, nekroz alanı ve sağ kalan flep alanı ölçüldü. Yara iyileşmesi ve nekrozla beraber görülen flep kontraksiyonu nedeniyle nekroz alanı, toplam flep alanının yüzdesi olarak değerlendirmeye alındı.

3.2.3. Histolojik Değerlendirme

Tüm gruplarda, cerrahiden sonraki 3. günde, anestezi altında, flep orta noktasından 3 mm çapında tam kat punch biyopsi örnekleri alındı. Alınan dokular %10'luk formaldehit solüsyonuna konularak tespit edildi. Dört mikron kalınlığında alınan kesitler, rutin protokole uygun olarak doku takip işlemine tabi tutuldu. Daha sonra,

dokular rutin mikroskopik inceleme için Hematoksilen Eozin (HE) ile boyandı. Boyama sonrasında, dokular ışık mikroskobu altında spesimenlerin hangi gruplara ait olduğunu bilmeyen aynı histolog tarafından incelendi ve her örnek için 40x'lik büyütmede 5 sahadaki nötrofil sayısı hesaplandı.

Cerrahiden sonraki 7. günde tüm gruplarda tüm deneklerin flep orta bölgesinden alınan 1cm²'lik tam kat biyopsiler 48 saat % 10'luk formaldehit içinde bekletildikten sonra yeni oluşan damar sayıları açısından immunohistokimyasal yöntem kullanılarak Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında incelendi.

Rutin immunohistokimyasal işlemler sonrasında VEGF antikoru kullanılarak 40x büyütme ile mikroskopta 20 alanda yeni oluşan damarlar sayıldı.

Kesitlerde yeni oluşmaya başlayan damar yapılarının lümensiz ya da kısmen lümenli ve kahverengi ağırlıkta boyanan epitel adacıkları şeklinde belirdiği gözlemlendi. Her gruptan yapılan kesitlerin tamamında en fazla boya tutan 5 alan sayıldıktan sonra ortalamaları alınarak yeni oluşan damar sayıları saptandı.

3.2.4. VEGF ve bFGF Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Cerrahiden sonraki 7. günde flep orta noktasından, daha önce yapılan punch biopsi alanının distalinden alınan 1 gr. ağırlığındaki doku örnekleri, soğuk serum fizyolojik ile yıkanıp -80 derecede bekletildi. Uygun tampon ile homojenize edildi. Homojenize tamponun santrifüjü sonrasında süpernatant kısmından VEGF ve bFGF ekspresyonunun değerlendirilmesi amacı ile enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) uygulandı.

3.2.5. İstatistiki Değerlendirme

Elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 18.0 paket programına girilerek analiz edildi. Gruplar arasında verilerin değerlendirilmesinde anlamlı fark olup olmadığını bulmak için varyans analizi (One Way ANOVA) yapıldı. Anlamlı farkı oluşturan gurubun bulunabilmesi amacıyla guruplar arası karşılaştırmada post hoc Tukey HSD testi yapıldı. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.

4. Bulgular

4.1. Genel Değerlendirme

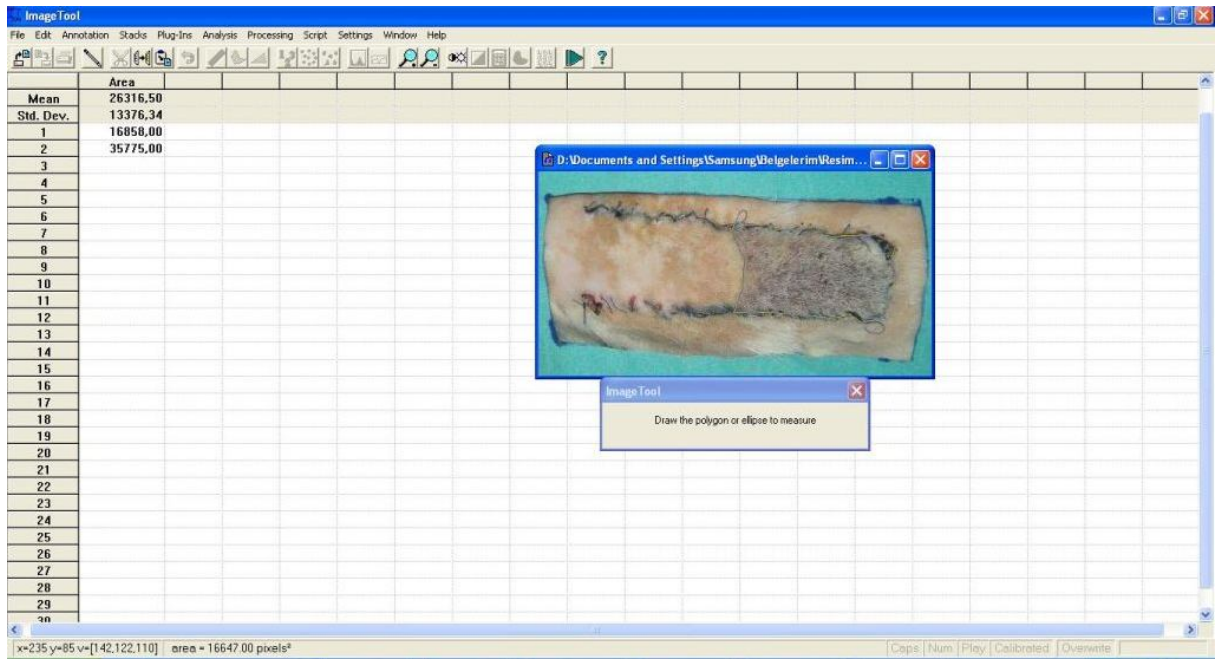
Tüm denekler enjeksiyon ve cerrahi işlemleri herhangi bir komplikasyon gelişmeden iyi tolere etti. Cerrahi sonrasındaki yedinci güne kadar gözlemlenen hayvanlarda abse formasyonu, seroma, total nekroz gibi istenmeyen bulgulara rastlanmadı. Cerrahi sonrası üçüncü günde fleplerin distalinde konjesyon gelişti. Cerrahi sonrası yedinci günde ise nekrotik ve yaşayan flep alanları arasında demarkasyon hattı belirgin şekilde gözlemlendi. Yaşayabilen flep alanları pembe-beyaz, hafif gergin ve normal doku yapısında iken nekroza uğrayan alanlar kahverengi-siyah, sert ve krutlu görünümde idi (Resim10).



Resim 10: Nekroza uğrayan ve yaşayabilen alanlar arasındaki demarkasyon hattı

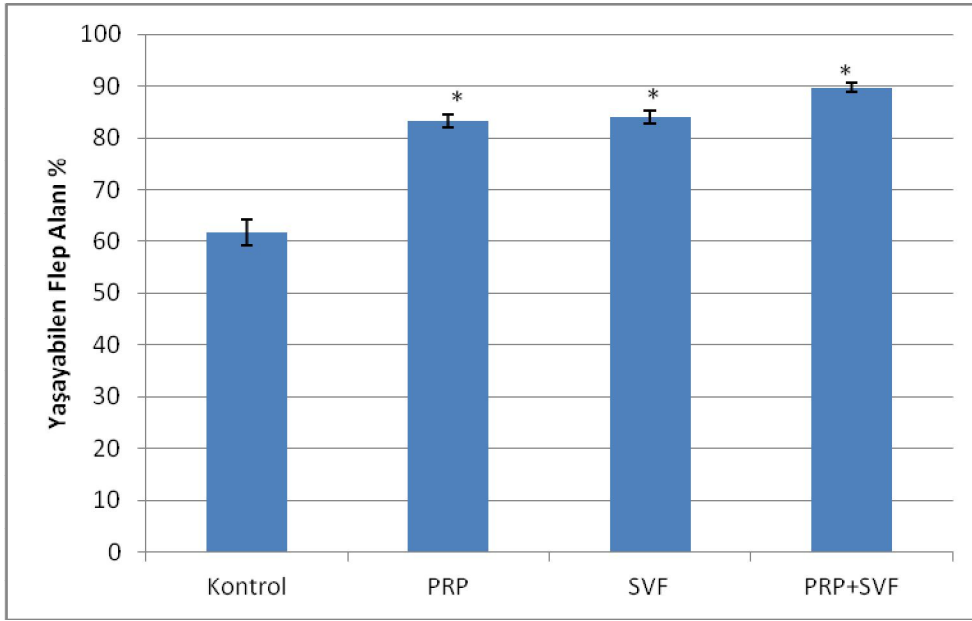
4.2. Flep Nekroz Alanlarının Değerlendirilmesi

Nekroz alanının hesaplanmasında Image Tool versiyon 3.00 programı kullanıldı (Resim11). Fleplerde nekroz alan total alana bölünerek grup içinde ortalama nekroz olan alan yüzdesi hesaplandı.



Resim 11: Image Tool 3.0 programı kullanılarak flep yaşayabilen oranlarının hesaplanması

Kontrol gurubunda ortalama yaşayabilen flep alanı $\% 61,70 \pm 6,16$ idi ($\% 69,68-54,64$). Sadece PRP enjeksiyonu yapılan grupta ortalama yaşayabilen flep alanı $\% 83,23 \pm 3,20$ ($\% 78,85-87,29$) iken , sadece SVF enjeksiyonu yapılan grupta $\% 83,96 \pm 2,81$ ($\% 79,51-87,01$), hem SVF hem PRP enjeksiyonu yapılan grupta ise $\% 89,68 \pm 2,02$ ($\% 86,59-91,42$) idi (Tablo 1).



Tablo 4-1: Guruplardaki ortalama yaşayabilen flep alanları (* İşaretili guruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p<0,05$))

Yaşayabilen flep alanı oranları üç tedavi gurubunda da (Gurup II, III ve IV) kontrol gurubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede artmış bulundu ($p<0.05$). Tedavi gurupları arasında, yaşayabilen flep alanı oranı bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Resim 12).



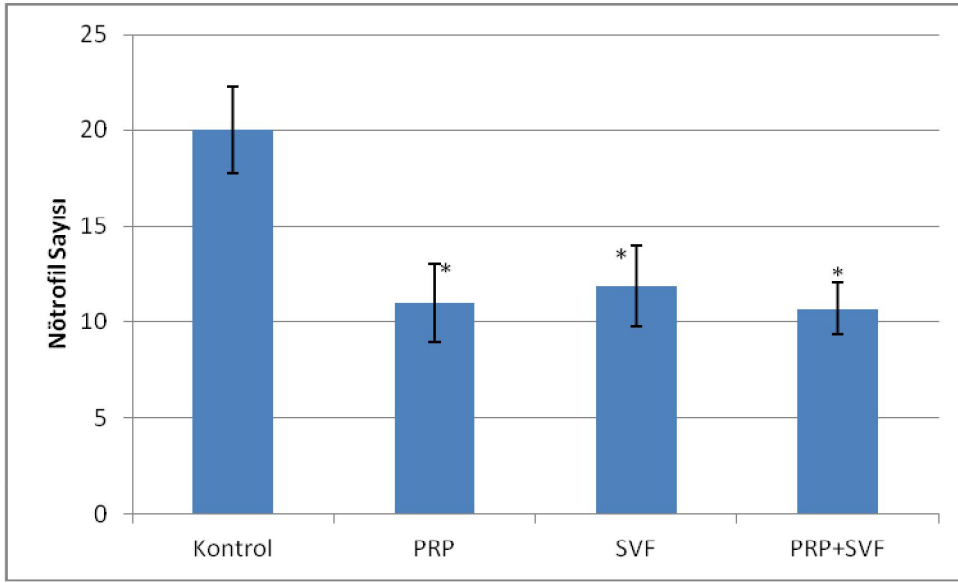
Resim 12: Postoperatif 7. günde yaşayabilen flep alanlarının görünümü (a: Kontrol grubu b: PRP tedavi grubu c: SVF tedavi grubu d: PRP+SVF tedavi grubu)

4.2.3. Histolojik Değerlendirme

4.2.3.1. Nötrofil Sayısı

Flep cerrahisi sonrası nötrofil invazyonunun en yüksek olması beklenen 3. günde fleplerin orta kısmından 3 mm'lik tam kalınlıkta punch biyopsi materyalleri alındı. Örneklerde yapılan histolojik inceleme ile nötrofil sayımı yapıldı.

Kontrol grubunda ortalama nötrofil sayısı $20,00 \pm 2,28$ (16-22) idi. Sadece PRP enjeksiyonu yapılan grupta nötrofil sayısı $11,00 \pm 2,09$ (9-14) iken, sadece SVF enjeksiyonu yapılan grupta $11,83 \pm 2,13$ (10-15), hem SVF hem PRP enjeksiyonu yapılan grupta ise $10,66 \pm 1,36$ (9-12) idi (Tablo 2).

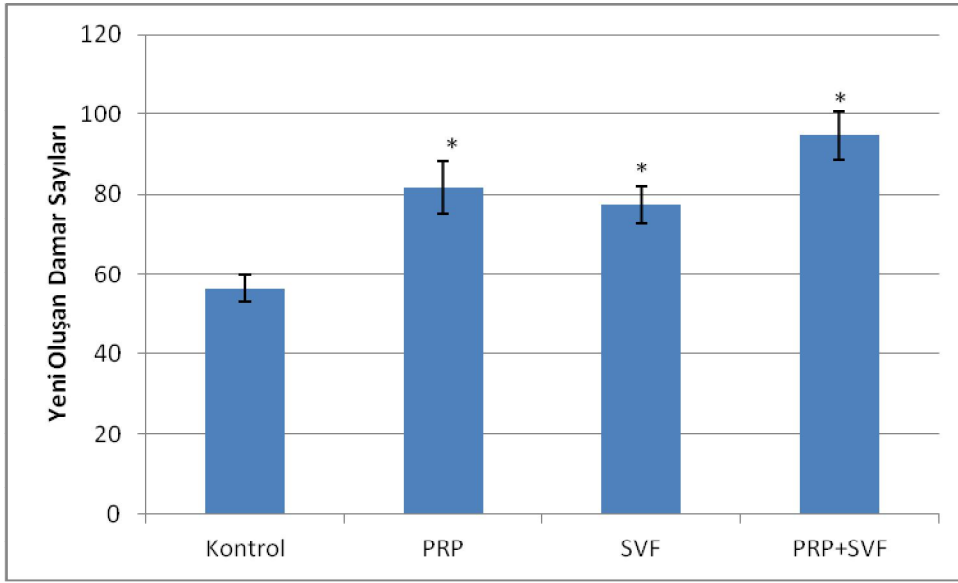


Tablo 4-2: Guruplara göre hesaplanan ortalama nötrofil sayıları (* İşaretli guruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p < 0,05$))

Nötrofil sayıları üç tedavi gurubunda da (Gurup II, III ve IV) kontrol gurubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede artmış bulundu ($p < 0.05$). Tedavi gurupları arasında, nötrofil sayıları bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

4.2.3.2 Yeni Oluşan Damar Sayısı

Kontrol grubunda yeni oluşan damar sayısı ortalama $56,33 \pm 8,28$ (45-68) idi. Sadece PRP enjeksiyonu yapılan grupta damar sayısı ortalama $81,66 \pm 16,13$ (64-102) iken , sadece SVF enjeksiyonu yapılan grupta $77,33 \pm 11,27$ (63-93), hem SVF hem PRP enjeksiyonu yapılan grupta ise $94,66 \pm 14,65$ (45-118) idi (Tablo 3).

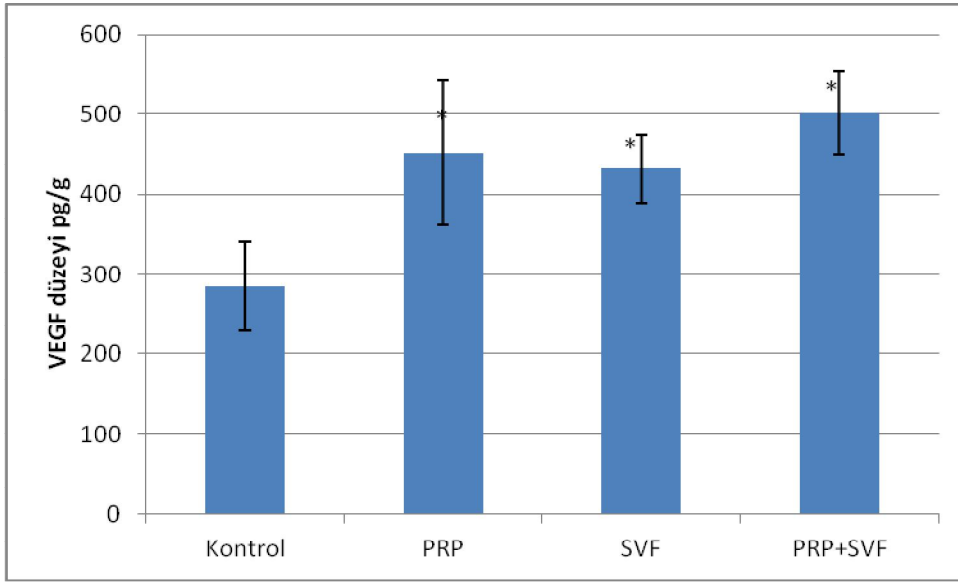


Tablo 4-3: Yeni oluşan damarların guruplara göre dağılımı (* İşaretli guruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p < 0,05$))

Damar sayısı üç tedavi gurubunda da (Gurup II, III ve IV) kontrol gurubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede artmış bulundu ($p < 0,05$). Tedavi gurupları arasında, damar sayısı bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

4.2.4. VEGF ve bFGF Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

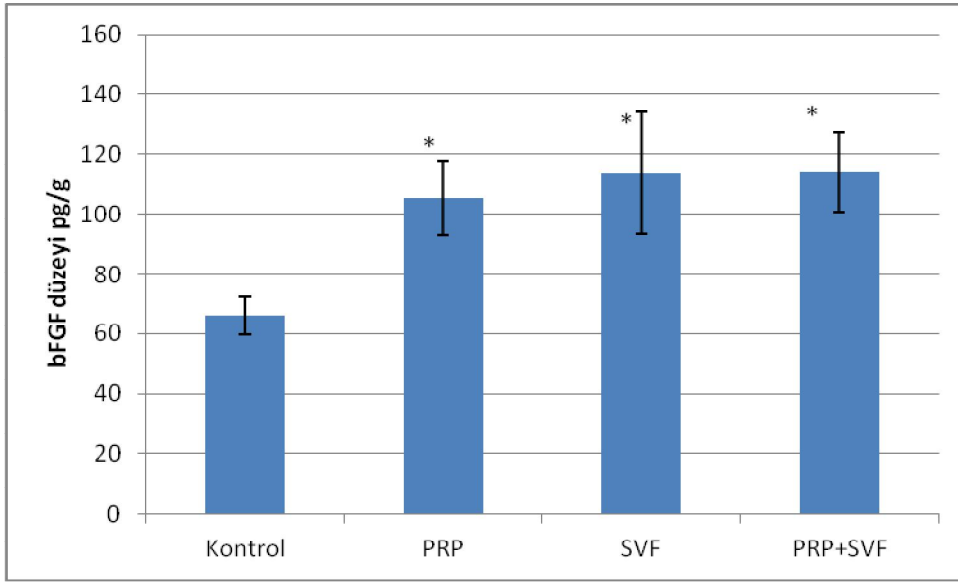
Kontrol grubunda ortalama VEGF düzeyi $284,60 \pm 55,87$ (211,30-367,40) idi. Sadece PRP enjeksiyonu yapılan grupta VEGF düzeyi ortalama $451,86 \pm 90,82$ (365,20-576,10) iken , sadece SVF enjeksiyonu yapılan grupta $431,30 \pm 42,87$ (386,50-501,10), hem SVF hem PRP enjeksiyonu yapılan grupta ise $501,20 \pm 51,85$ (417,40-571,00) idi (Tablo 4).



Tablo 4-4: VEGF düzeylerinin gruplara göre dağılımı (* İşaretli gruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p<0,05$))

VEGF düzeyleri üç tedavi gurubunda da (Gurup II, III ve IV) kontrol gurubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede artmış bulundu ($p<0,05$). Tedavi grupları arasında, VEGF düzeyleri bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).

Kontrol grubunda ortalama bFGF düzeyi $66,11\pm6,53$ (58,00-75,50) idi. Sadece PRP enjeksiyonu yapılan grupta bFGF düzeyi ortalama $105,60\pm12,38$ (93,30-126,50) iken , sadece SVF enjeksiyonu yapılan grupta $113,65\pm20,16$ (92,20-140,70), hem SVF hem PRP enjeksiyonu yapılan grupta ise $113,81\pm13,24$ (102,10-136,40) idi (Tablo 5).



Tablo 4-5: bFGF düzeylerinin gruplara göre dağılımı (* İşaretli gruplar ile kontrol gurubu arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p < 0,05$))

bFGF düzeyleri üç tedavi gurubunda da (Grup II, III ve IV) kontrol gurubuna göre istatistiki olarak anlamlı derecede artmış bulundu ($p < 0.05$). Tedavi grupları arasında, bFGF düzeyleri bakımından istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

5. Tartışma

Random paternli cilt flepleri, plastik cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle uzun fleplerin distalinde görülen iskemiye bağlı nekroz, hastanede kalma süresini dolayısıyla da tedavi maliyetini arttıran önemli bir sorundur. Yeterli kan akımına sahip olmak, bu tur fleplerin yaşayabilmesinde çok önemlidir. Flep vaskülaritesini bozan bir yaralanma ve iskemi/reperfüzyon hasarı, flepte tam veya kısmi kayıplara neden olabilmektedir. Riskli hastalarda bu fleplerin yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla yoğun bir şekilde araştırmalar devam etmektedir. Bu çalışmalarda flep vaskülaritesini arttıran ya da flebin hipoksiye direncini arttıran çok sayıda ajan ve yöntem denenmiştir (23, 34, 35). Ancak bu ajanların neredeyse hiçbiri klinik kullanım alanı bulamamıştır. Bunun durumun başlıca nedenleri arasında kullanılacak ajanın maliyetinin fazla olması, elde edilmesinin zor olması, yan etkilerinin fazla olması, donör morbiditesinin fazla olması, uygulama zorluğu ve etkinliğinin az olmasıdır (110). Buradan hareketle flep yaşayabilirliğini arttırmada kullanılacak olan bir ajanın ideal özellikleri; “ucuz olması, kolay elde edilebilmesi, yan etkilerinin az olması ya da hiç olmaması, donör morbiditesi yaratmaması, kolay uygulanabilmesi ve kullanıldığı bölgede etkinliğinin yüksek olması” olarak sayılabilir (110).

Hücresele tedaviler, özellikle de kök hücre tedavileri, son yıllarda tüm tıp camiasının en çok üzerinde durduğu ve her yıl yüzlerce yeni çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir. Sunduğu ve sunacağı muhtemel tedavi olanakları düşünüldüğünde, halen tedavisi mümkün olmayan pek çok hastalığa çare olması beklenmektedir. Plastik cerrahide de çeşitli kullanım alanları bulan hücresele tedaviler, son zamanlarda, flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik çeşitli çalışmalarda denenmektedir. Bu tip tedaviler

arasında Plateletten Zengin Plazma (PRP) ve yağ doku kaynaklı Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) gelecek vadeden iki otolog üründür. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar bu iki ürünün yeni damar oluşumunu arttırdığını ve yara iyileşmesini hızlandırdığını vurgulamıştır(111, 112).

Neovaskülarizasyon karmaşık ve geniş bir anjiogenik faktör yelpazesi ile düzenlenen bir süreçtir. Bu anjiogenik faktörlerin çoğunun neovaskülarizasyonu in vitro ve in vivo stimüle ettiği tanımlanmış ve gösterilmiştir(113). Hem PRP hem de SVF'nin bu anjiogenetik faktörler yönünden oldukça zengin olduğu düşünülürse, bu iki ürünün flep yaşayabilirliğini arttırabileceği hipotezi oldukça tutarlıdır. Bunun yanında iki ürünün de antienflamatuar etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (114, 115).

Biz de bu çalışmayı, PRP ve SVF'nin anjiogenik potansiyelinden yola çıkarak bunların ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında neovaskülarizasyonu hızlandırarak ve antienflamatuar etki göstererek random paternli cilt fleplerinin yaşayabilirliğini arttıracağı hipotezi ile planladık. Yaptığımız literatür taramasında, PRP ve SVF'nin bu amaçla kullanıldığı ve etkilerinin karşılaştırıldığı ya da birlikte kullanıldıklarında ne gibi etkilerinin olduğunu araştıran herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Anjiyogenez, yeni kapiller oluşumu için endotel hücrelerinin harekete geçmesi, göç etmesi ve çoğalmasını gerektiren, normal şartlarda erişkinlerde nadir gözlenmesine rağmen tümör oluşumu, romatoid artrit ve diyabetik retinopati gibi patolojik durumlarda kontrolsüz olarak işleyen biyolojik bir mekanizmadır. Yakın zamanda araştırmacılar bazı büyüme faktörlerinin doğrudan veya dolaylı olarak anjiyogenezi uyardığını saptamışlardır. Büyüme faktörleri, kendilerine özgü hücrelerin biyolojik aktiviteleri üzerinde reseptörler yoluyla etkilerini gösteren, küçük proteinler veya glikoproteinlerin oluşturduğu sitokinlerdir. Tek başlarına etki gösterebildikleri gibi bazılarının sinerjistik

etkileşimleri olduğu da anlaşılmıştır. Bu büyüme faktörleri arasında, “basic fibroblast growth factor” (bFGF), “platelet-derived growth factor” (PDGF), “transforming growth factor- β ” (TGF- β) ve “vascular endothelial growth factor” (VEGF) en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılanlardır. Bunlar arasında VEGF en güçlü anjiyojenik etki gösterendir ve hipoksinin VEGF salınımını uyardığı saptanmıştır(39, 48).

Daha önce yapılan çalışmalarda SVF’nin yara iyileşmesinde damarlanmayı belirgin olarak arttırdığı gösterilmiştir. Damarlanmadaki artış hem histolojik incelemede direk tubüler damar yapılarındaki artışın gösterilmesi ile hem de immünohistokimyasal analizde VEGF düzeyinin artışı ile gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda stromal hücrelerin anjiyojenik etkisinin endotel hücrelerin çoğalmasına, apoptozun azaltılmasına ve VEGF salınımının artışına bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (103). Koh ve ark. yaptığı bir çalışmada SVF’nun sebep olduğu VEGF artışının doku hasarına cevap olarak gelişen mekanizmadan ziyade, SVF’nun içeriğindeki kanın endotel kaynaklı hücrelerinden ileri geldiği belirtilmiştir (112). SVF uygulanan dokulardaki bFGF artışı da aynı mekanizma ile açıklanabilir. bFGF tek başına anjiogenezi uyarabildiği gibi VEGF ve TNF- α ile birlikte olduğunda maksimum anjiyojenik etkisini gösterir. Kollajenaz enzim salınımı ve kapiller endotelyal hücre proliferasyonunu arttırarak anjiogenezi başlatır(63, 64, 116). Khouri ve Uhl bFGF’nin tek başına flep sağkalımına etkilerini araştırmak için kullanmış ve başarılı sonuçlar bildirmişlerdir(33, 66). Kısacası SVF içeriğindeki hücresel komponentlerin barındırdığı başta VEGF olmak üzere, bFGF ve bezeri diğer büyüme faktörlerinin etkisi ile yeni damar oluşumunu belirgin ve hızlı bir şekilde arttırmaktadır (112). Bizim çalışmamızda da SVF tedavisi uygulanan guruplarda (III ve IV) yeni damar oluşumu kontrol gurubuna göre fazla idi.

PRP ile fibrin yapıştırıcısının farkı PRP’de trombosit konsantrasyonunun fazla, fibrinojen konsantrasyonunun az olmasıdır. Daha az fibrinojen içerdiği için çok katı bir fibrin pıhtı oluşmadığı, bu nedenle yara iyileşmesini engellemeyip, bilakis içindeki büyüme faktörleri sayesinde bu olayı hızlandırdığı düşünülmüştür (117). PRP’nin içeriğindeki trombositler aktive olduğunda alfa granüllerdeki bioaktif moleküller ve büyüme faktörleri salınarak rejenerasyon ve revaskülarizasyon sürecini başlatmaktadırlar. bFGF ve VEGF bu granüllerdeki en önemli büyüme faktörleri arasında yer almaktadır. Yapılan deneysel çalışmalarda lokal olarak uygulanan PRP’nin random paternli deri fleplerinin yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir(107).

Sonuçlarımız yukarıda bildirilen çalışmalar ile uyumlu idi. Üç tedavi grubunda da bFGF ve VEGF düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derece yüksekti. Bu sonuçların, her iki ürünün de içeriğinde bulunan büyüme faktörlerinin, yeni damar oluşumu üzerine olan dolaylı ve doğrudan etkilerden kaynaklandığını düşünüyoruz. Takikawa ve ark. yaptığı bir çalışmada PRP’nin içeriğindeki büyüme faktörlerinin sadece yeni damar oluşumunu arttırarak değil, aynı zamanda adipoz doku kaynaklı hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonunu da arttırarak etkilerini gösterdiğini bildirmişlerdir(107). Cervelli ve ark. PRP ve SVF karışımını post travmatik alt ekstremité yaralanması olan hastalarda denemiş ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir ancak adipoz doku kaynaklı hücrelerin PRP’nin içeriğindeki büyüme faktörleri tarafından aktive edildiğini gösteren yeterli çalışma yoktur(118).

Bizim çalışmamızda PRP ve SVF’nin birlikte uygulandığı grup IV’te hem fleplerin yaşayabilen oranları, hem yeni oluşan damar sayıları, hem de VEGF ve bFGF oranı diğer tüm gruplara göre yüksekti. Her ne kadar bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildiyse de SVF içeriğindeki pluripotent hücrelerin PRP içeriğindeki büyüme

faktörleri tarafından aktive edildiğinin bir göstergesi olabilir. Bu nedenle Takikawa ve arkadaşlarının bulgularını destekleyecek yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Literatürde iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi amacı ile tanımlanmış çok sayıda yayın mevcuttur. İskemi reperfüzyon sonrası oluşan hasardan primer olarak nötrofiller ve onların oluşturduğu serbest radikaller sorumlu tutulmuştur(119). Postiskemik dokuların çok sayıda enflamatuvar hücre tuttuğu çok iyi bilinmektedir. Özellikle nötrofiller reperfüzyon hasarının primer mediatörü olarak kabul edilmektedir. Aktif haldeki nötrofiller araşidonik asit metabolitleri salgılayarak, yumaklaşan trombositler ve eritrositler ile birlikte reperfüzyon sonrası kapillerlerin obstrüksiyonuna yol açarlar. Bütün bu hücrel metabolik olaylar sonucu vasküler oklüzyon ve sonrasında flep nekrozu gelişir. Hücreler arasındaki ilişkiler tam olarak bilinmemesine rağmen birçok çalışmada polimorfonükleer lökositlerin yüzeyinde ve vasküler endotel hücrelerin yüzeyindeki hücre adhezyon moleküllerinin birbirleri ile ilişkiye geçmeleri sonucu damar geçirgenliğin artarak doku ödemeine yol açtığı gösterilmiştir. Bundan dolayı son çalışmalar özellikle nötrofillerin fonksiyonları üzerinedir. Yapılan birçok çalışmada dokularda nötrofil sayısını azaltan ajanların flep yaşayabilirliğini de arttırdığı gösterilmiştir(119, 120).

Bu araştırmacılarından Rehman ve Kim yağ doku stromal hücrelerinin çeşitli sitokinler salgılayarak anti-apoptotik etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur(103, 114). Gonzales ve ark. tarafından yapılan çalışmada adipoz doku kaynaklı hücrelerin otoimmün yanıtı ve enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Lokal olarak enjekte edilen bu hücreler çeşitli enflamatuvar sitokin ve kemokinlerin sentezini azaltmakta aynı zamanda antienflamatuvar sitokin olan interlökin-10'nun salınımını arttırmaktadır (115). Kim WS tarafından yapılan başka bir çalışmada ise tam kat eksizyonel yara modeli iyileşmesinde dermisteki

inflamatuvar hücre yoğunluğunun ADSC uygulanan grupta daha az olduğu gösterilmiştir (114). Yine kronik iskemik myokardlı deneklerde yapılan başka bir çalışmada adipoz kaynaklı SVF uygulananlarda neoanjiogenezin yanı sıra antienflamatuvar etkinin de arttığı gösterilmiştir (112).

PRP'nin içeriğindeki birçok kemoatraktan sitokin ve büyüme faktörü nedeni ile inflamatuvar hücre sayısında artışa yol açması beklenmektedir. Ancak Weiwei ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PRP enjekte edilen deney gurubunda inflamatuvar hücre sayısı kontrol gurubuna göre azalmış bulunmuştur. Yazarlar bu durumu PRP'nin içeriğinde bulunan ve fibroblast aktivasyonu ile epidermal rejenerasyonu hızlandırarak, yara iyileşmesinin inflamatuvar fazını kısaltan Epidermal Büyüme Faktörünün (EGF) etkisine bağlamışlardır (121).

Biz de çalışmamızda tüm tedavi gruplarındaki nötrofil sayısını, kontrol gurubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük bulduk. Bu etkinin SVF uyguladığımız grup III ve grup IV'te SVF'nin anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar etkisine, PRP uyguladığımız grup II'de ise PRP'nin içeriğinde bulunan ve inflamatuvar fazı hızlandırarak nötrofil göçünü sınırlandıran EGF'ye bağlı olduğunu düşünüyoruz. SVF'nin anti-apoptotik etkisi son yıllarda giderek artan bir şekilde çalışılmışsa da PRP'nin bu etkisini kanıtlamak için daha çok kontrollü deneye ihtiyaç olduğunu düşünüyoruz.

Yukarıda tartışılan faydalı etkilerinin yanı sıra SVF ve PRP'nin üzerinde durulması gereken diğer bir önemli özellikleri ise elde edilmelerindeki kolaylıktır.

Saflaştırılmış yağ doku kaynaklı kök hücrelerinin etkinliği heterojen hücre karışımından oluşan SVF ile karşılaştırıldığında in-vitro farklılaşma potansiyeli daha fazladır. Ancak SVF den ADSC izolasyonunda daha fazla teknik ekipmana ihtiyaç duyulmakta, daha uzun zaman gerektirmekte ve tedavi maliyetini yükseltmektedir. Kemik iliğinden kök

hücre elde edilmesi de yağ dokuya göre daha zor bir işlemdir. Yağ doku kaynaklı kök hücreler kolay elde edilebilen zengin bir otogreft kaynağıdır (122). Aynı şekilde PRP de hastanın kendi kanının bir takım santrifüj ve aktivasyon işlemlerinden geçirilmesi ile elde edilen bir otolog üründür. Her iki üründe de herhangi bir immün reaksiyon ya da hastalık bulaşma riski söz konusu değildir. Bu özellikleri nedeni ile her iki üründe Rochrich'in tanımladığı "ideal ajan" tanımına oldukça yakındırlar. İki ürünün de ilerleyen yıllarda tıbbın her alanında olduğu gibi plastik cerrahide de giderek artan bir şekilde kullanıma gireceğini düşünmekteyiz. Ancak klinik kullanımlarından önce yeterli güvenilirlik ve etkinliklerinin olup olmadığının çok sayıda çalışma ile değerlendirilmesi gerekmektedir.

6. Sonuç

Çalışmamızda, PRP ve SVF'nin ayrı ayrı ve birlikte kullanıldığında random paternli deri fleplerinin yaşayabilen kısmını arttırdığını ve bu etkilerini içeriklerindeki büyüme faktörleri ve proaktif hücrelerle hem neoanjiogenezi arttırarak hem de inflamatuvar hücre birikimini azaltarak gerçekleştirdiklerini gösterdik. Bu iki ürün kolay elde edilmeleri, ucuz olmaları, otolog olduklarından güvenli olmaları nedeni ile gelecekte çok geniş kullanım alanı bulacaktır. Ancak bu ürünlerin etki mekanizması ve uzun dönem sonuçları ile ilgili daha çok sayıda denek içeren deneysel çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Cormack GC, Lamberty BGH. The arterial anatomy of skin flaps. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1986.
2. Cormack GC, Lamberty BGH. The arterial anatomy of skin flaps. 2 ed. London: Churchill Livingstone; 1994.
3. Kayser MRMD. Surgical flaps. Selected Readings in Plastic Surgery. 1999;9(2).
4. Taylor GI. The blood supply of skin. In: Aston SJ BR, Thorne CHM, editor. Plastic Surgery (Chapter 5). Philadelphia: Lippincott - Raven; 1997.
5. Daniel R, Kerrigan C. Principles and physiology of skin flap surgery. In: JG MC, editor. Plastic Surgery Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1990. p. 275-328.
6. Lamberty B, Healy C. Flaps: Physiology, principles of design, and pitfalls. In: Cohen M, editor. Mastery of Plastic and Reconstructive Surgery. Boston: Little, Brown and Company; 1994. p. 56-70.
7. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. Plast Reconstr Surg. 1983 Dec;72(6):766-77.
8. Taylor G, Palmer J, D. M. The vascular territories of the body (angiosome) and their clinical applications. In: McCarthy J, May J, Litter J, editors. Mathes Plastic Surgery. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p. 353-5.
9. Spalteholz W. Vertheilung der Blutgefasse in der Haut. Arch Anat Entwcklngs-Gesch. 1983(1):54.
10. Çağdaş A, Akın Y, Gürler T. Estetik Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 2003.
11. Manchot C. Die Hautarterien des menschlichen Körpers. Leipzig 1889.
12. Tansini I. Sopra il mio nuovo processo di amputazione della mammella. Gazz Med Ital. 1906(57):141.
13. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. Plast Reconstr Surg. 1981 Feb;67(2):177-87.
14. Smith JD, Pribaz JJ. Flaps. Eriksson E, editor: Mosby; 2000.

15. Brown DL, Borschel GH. Flaps. Brown GH, editor. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004.
16. Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM. Basic Techniques and Principles in Plastic Surgery. Aston SJ, editor. Philadelphia: Lippincott Raven; 1997.
17. Mathes SJ. Flap Physiology. In: Hentz VR, editor. Mathes Plastic Surgery. Philadelphia 2006. p. 483-506.
18. Achauer BM, Ericson E, Guyuron B, Coleman JJ, Russell RC, Vander-Kolk CA. Flaps. Achauer BM, Ericson E, editors. Philadelphia: Lippincott - Raven; 2000.
19. McGregor IA, Jackson IT. The groin flap. Br J Plast Surg. 1972 Jan;25(1):3-16.
20. Khouri RK, Angel MF, L.E. E. Standardizing the dorsal rat flap. Plast Surg. 1986(37):590-1.
21. McFarlane RM, Deyoung G, Henry RA. The Design of a Pedicle Flap in the Rat to Study Necrosis and Its Prevention. Plast Reconstr Surg. 1965 Feb;35:177-82.
22. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Zins JE. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. Plast Reconstr Surg. 1999 Sep;104(3):730-7.
23. Finseth F, Adelberg MG. Prevention of skin flap necrosis by a course of treatment with vasodilator drugs. Plast Reconstr Surg. 1978 May;61(5):738-43.
24. Khiabani KT, Kerrigan CL. Differing flow patterns between ischemically challenged flap skin and flap skeletal muscle: implications for salvage regimens. Plast Reconstr Surg. 2002 Jan;109(1):220-7.
25. Kaneko S, Okumura K, Numaguchi Y, Matsui H, Murase K, Mokuno S, et al. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. Life Sci. 2000;67(2):101-12.
26. 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. 1983 May;67(5):1016-23.
27. Toomey JM, Conoyer JM, Ogura JH. Vasodilating agents in augmentation of skin flap survival. Otolaryngol Head Neck Surg (1979). 1979 Nov-Dec;87(6):757-62.

28. Stein HJ, Fayman MS, Oosthuizen MM, Hinder RA. Verapamil improves survival of rat hyperemic island skin flaps. *Surgery*. 1989 Oct;106(4):617-22; discussion 22-3.
29. Knox LK, Stewart AG, Hayward PG, Morrison WA. Nitric oxide synthase inhibitors improve skin flap survival in the rat. *Microsurgery*. 1994;15(10):708-11.
30. Finseth F, Adelberg MG. Experimental work with isoxuprine for prevention of skin flap necrosis and for treatment of the failing flap. *Plast Reconstr Surg*. 1979 Jan;63(1):94-100.
31. Celen O, Yildirim E, Berberoglu U. Prevention of wound edge necrosis by local application of dimethylsulfoxide. *Acta Chir Belg*. 2005 May-Jun;105(3):287-90.
32. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, Ramasastry SS, Kuhns DB, Basford RE, et al. Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischaemic flap surgery. *Br J Plast Surg*. 1986 Oct;39(4):469-72.
33. Uhl E, Rosken F, Curri SB, Menger MD, Messmer K. Reduction of skin flap necrosis by transdermal application of buflomedil bound to liposomes. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Oct;102(5):1598-604.
34. Kargi E, Deren O, Babuccu O, Hosnuter M, Erdogan B. Dual synergistic effect: the effect of dexamethasone plus carnitine on skin flap survival. *Ann Plast Surg*. 2004 Nov;53(5):488-91.
35. Hosnuter M, Babuccu O, Kargi E, Altinyazar C. Dual preconditioning: effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival. *Ann Plast Surg*. 2003 Apr;50(4):398-402.
36. Salerno GM, McBride DM, Bleicher JN. The use of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICA riboside) to improve random skin flap viability in the rat model. *Ann Plast Surg*. 1991 Jun;26(6):544-50.
37. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001 Aug;12(5):261-73.
38. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389-95.

39. Gurunluoglu R, Ozer K, Skugor B, Lubiatowski P, Carnevale K, Siemionow M. Effect of transfection time on the survival of epigastric skin flaps pretreated with adenovirus encoding the VEGF gene. *Ann Plast Surg.* 2002 Aug;49(2):161-9.
40. Weiler A, Forster C, Hunt P, Falk R, Jung T, Unterhauser FN, et al. The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med.* 2004 Jun;32(4):881-91.
41. McGee GS, Broadley KN, Buckley A, Aquino A, Woodward SC, Demetriou AA, et al. Recombinant transforming growth factor beta accelerates incisional wound healing. *Curr Surg.* 1989 Mar-Apr;46(2):103-6.
42. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004 Jan;91(1):4-15.
43. Huang LH, Neiva RE, Soehren SE, Giannobile WV, Wang HL. The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: a pilot human trial. *J Periodontol.* 2005 Oct;76(10):1768-77.
44. Ksander GA, Sawamura SJ, Ogawa Y, Sundsmo J, McPherson JM. The effect of platelet releasate on wound healing in animal models. *J Am Acad Dermatol.* 1990 May;22(5 Pt 1):781-91.
45. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Jan;107(1):229-37; discussion 38-9.
46. Snyder EL, Calhoun BC. Topical platelet growth factor therapy: of lotions and potions. *Transfusion.* 2001 Oct;41(10):1186-9.
47. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK. Stimulation of granulation tissue formation by platelet-derived growth factor in normal and diabetic rats. *J Clin Invest.* 1985 Dec;76(6):2323-9.
48. O'Toole G, MacKenzie D, Buckley MF, Lindeman R, Poole M. A review of therapeutic angiogenesis and consideration of its potential applications to plastic and reconstructive surgery. *Br J Plast Surg.* 2001 Jan;54(1):1-7.
49. Green DM, Klink B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Apr;101(4):1161-2.

50. Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am.* 2004 Jul;29(4):551-63.
51. Pierce GF, Mustoe TA, Altmann BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem.* 1991 Apr;45(4):319-26.
52. Altmann J, Hansen E, Bonnländer GL, Horch RE, Jeschke MG. Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *J Surg Res.* 2004 Apr;117(2):202-7.
53. Oya T, Zhao YL, Takagawa K, Kawaguchi M, Shirakawa K, Yamauchi T, et al. Platelet-derived growth factor-b expression induced after rat peripheral nerve injuries. *Glia.* 2002 Jun;38(4):303-12.
54. Kondo E, Yasuda K, Yamanaka M, Minami A, Tohyama H. Effects of administration of exogenous growth factors on biomechanical properties of the elongation-type anterior cruciate ligament injury with partial laceration. *Am J Sports Med.* 2005 Feb;33(2):188-96.
55. Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Mentlein R. Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2003 Nov;123(9):485-8.
56. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 May;14(5):403-12.
57. Vikjaer D, Blom S, Hjorting-Hansen E, Pinholt EM. Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci.* 1997 Feb;105(1):59-66.
58. Brown DM, Hong SP, Farrell CL, Pierce GF, Khouri RK. Platelet-derived growth factor BB induces functional vascular anastomoses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jun 20;92(13):5920-4.
59. Carroll CM, Carroll SM, Schuschke DA, Barker JH. Augmentation of skeletal muscle flap survival using platelet derived growth factor. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Aug;102(2):407-15.

60. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 Jun;85(6):638-46.
61. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF-beta. *Ann Surg.* 1988 Dec;208(6):788-94.
62. Huemer GM, Shafighi M, Meirer R, Debagge P, Piza-Katzer H, Gurunluoglu R. Adenovirus-mediated transforming growth factor-beta ameliorates ischemic necrosis of epigastric skin flaps in a rat model. *J Surg Res.* 2004 Sep;121(1):101-7.
63. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol.* 2000 Nov;35(5):227-31.
64. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Nov;108(6):1713-26.
65. Rashid MA, Akita S, Razzaque MS, Yoshimoto H, Ishihara H, Fujii T, et al. Coadministration of basic fibroblast growth factor and sucrose octasulfate (sucrafate) facilitates the rat dorsal flap survival and viability. *Plast Reconstr Surg.* 1999 Mar;103(3):941-8.
66. Khouri RK, Brown DM, Leal-Khouri SM, Tark KC, Shaw WW. The effect of basic fibroblast growth factor on the neovascularisation process: skin flap survival and staged flap transfers. *Br J Plast Surg.* 1991 Nov-Dec;44(8):585-8.
67. Hayward PG, Alison WE, Jr., Carp SS, Hui PS, Robson MC. Local infiltration of an angiogenic growth factor does not stimulate the delay phenomenon. *Br J Plast Surg.* 1991 Oct;44(7):526-9.
68. McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, et al. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res.* 1988 Jul;45(1):145-53.
69. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular control of angiogenesis. *Int Rev Immunol.* 2002 Jan-Feb;21(1):33-49.
70. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial

- growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994 Feb;93(2):662-70.
71. Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. *Br J Plast Surg*. 2003 Oct;56(7):653-9.
 72. Machens HG, Salehi J, Weich H, Munch S, Siemers F, Krapohl BD, et al. Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGFR-1 (sFLT-1) in a rat flap model. *J Surg Res*. 2003 May 1;111(1):136-42.
 73. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewicz MJ, Nahai F, Schultz G. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plast Reconstr Surg*. 1991 Aug;88(2):189-94; discussion 95-6.
 74. Babbush CA, Kevy SV, Jacobson MS. An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent*. 2003;12(1):24-34.
 75. Partsafas AW, Bascom DA, Jorgensen SA, Wax MK. Effects of Tisseel and FloSeal on primary ischemic time in a rat fasciocutaneous free flap model. *Laryngoscope*. 2004 Feb;114(2):301-4.
 76. Croveti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci*. 2004 Apr;30(2):145-51.
 77. Mazzucco L, Medici D, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, et al. The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion*. 2004 Jul;44(7):1013-8.
 78. Valbonesi M, Giannini G, Migliori F, Dalla Costa R, Galli A. The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: a preliminary report. *Int J Artif Organs*. 2002 Apr;25(4):334-8.
 79. Gruber R, Karreth F, Frommlet F, Fischer MB, Watzek G. Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. *J Orthop Res*. 2003 Sep;21(5):941-8.
 80. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Oct;60(10):1176-81.

81. Siebrecht MA, De Rooij PP, Arm DM, Olsson ML, Aspenberg P. Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite. *Orthopedics*. 2002 Feb;25(2):169-72.
82. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*. 2003 Jun;74(6):858-64.
83. Karaöz E, Ovalı E. Kök Hücreler. Karaöz E, Ovalı E, editors. Trabzon: Derya Kitabevi; 2004.
84. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956 Mar 10;177(4506):452-4.
85. Sale GE, Storb R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 1983 Nov;11(10):961-6.
86. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulson R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol*. 2003 Apr;56(2):86-96.
87. Fridenshtein A. [Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment]. *Arkh Patol*. 1982;44(10):3-11.
88. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*. 2009 Nov;132(5):533-46.
89. Karaoz E, Ayhan S, Gacar G, Aksoy A, Duruksu G, Okcu A, et al. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy*. 2010 May;12(3):288-302.
90. Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M. Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Minerva Cardioangiol*. 2009 Apr;57(2):249-67.
91. Graham-Rowe D. Fetal tissue graft restores lost sight. *New Sci*. 2004 Oct 30-Nov 5;184(2471):16-7.
92. Vastag B. Stem cells step closer to the clinic: paralysis partially reversed in rats with ALS-like disease. *JAMA*. 2001 Apr 4;285(13):1691-3.

93. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):4665-78.
94. Ichioka S, Kudo S, Shibata M, Ando J, Sekiya N, Nakatsuka T. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg*. 2004 Apr;52(4):414-8.
95. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, et al. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Jan;121(1):59-69.
96. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg*. 2009 Sep;124(3):804-15.
97. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. *Ann Plast Surg*. 2005 May;54(5):546-52.
98. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:207-33.
99. 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 Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.
100. Poznanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab Invest*. 1973 Nov;29(5):570-6.
101. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005 Sep;54(3):132-41.
102. De Francesco F, Tirino V, Desiderio V, Ferraro G, D'Andrea F, Giuliano M, et al. Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One*. 2009;4(8):e6537.
103. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1292-8.

104. Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem*. 1992 Aug 15;267(23):16317-22.
105. Lorenz PH, Longaker MT. Wound healing: Repair biology and wound and scar treatment. In: Mathes SJ, editor. *Plastic Surgery*. California: Saunders Elsevier; 2006. p. 212.
106. Arıkan F., Özçaka Ö., N. B. Trombositten Zengin Plazma ve Kemik Grefti ile Kombinasyonunun Dar Kemik İçi Defektlerde Başarısının Karşılaştırılması. *EÜ Dışhek Fak Derg*. 2007(28):151-61.
107. Takikawa M, Sumi Y, Ishihara M, Kishimoto S, Nakamura S, Yanagibayashi S, et al. PRP&F/P MPs improved survival of dorsal paired pedicle skin flaps in rats. *J Surg Res*. 2011 Sep;170(1):e189-96.
108. McIntosh KR, Lopez MJ, Borneman JN, Spencer ND, Anderson PA, Gimble JM. Immunogenicity of allogeneic adipose-derived stem cells in a rat spinal fusion model. *Tissue Eng Part A*. 2009 Sep;15(9):2677-86.
109. Lingling S, Mei Y, Hua L, Zijing D, Yiai Y, Qingfeng L. Transplantation of adipose stromal cells promotes neovascularization of random skin flaps. *Tohoku J Exp Med*. 2011(224):229-34.
110. Rohrich R, Cherry G, Spira M. Enhancement of skin flap survival using nitroglycerin ointment. *Plast Reconstr Surg* 1984;6(73):943-8.
111. 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 Jan;121(1):50-8.
112. Koh YJ, Koh BI, Kim H, Joo HJ, Jin HK, Jeon J, et al. Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 May;31(5):1141-50.
113. Hunt TK. Can repair processes be stimulated by modulators (cell growth factors, angiogenic factors, etc.) without adversely affecting normal processes? *J Trauma*. 1984 Sep;24(9 Suppl):S39-49.

114. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2007 Oct;48(1):15-24.
115. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum*. 2009 Apr;60(4):1006-19.
116. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1991;53:217-39.
117. Gosain AK, Lyon VB. The current status of tissue glues: part II. For adhesion of soft tissues. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Nov;110(6):1581-4.
118. Cervelli V, Gentile P, De Angelis B, Calabrese C, Di Stefani A, Scioli MG, et al. Application of enhanced stromal vascular fraction and fat grafting mixed with PRP in post-traumatic lower extremity ulcers. *Stem Cell Res*. 2011 Mar;6(2):103-11.
119. Lee C, Kerrigan CL, Picard-Ami LA, Jr. Cyclophosphamide-induced neutropenia: effect on postischemic skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg*. 1992 Jun;89(6):1092-7.
120. Ioculano M, Squadrito F, Altavilla D, Canale P, Campo GM, Bussolino F, et al. Protective effects of L-659,989, a platelet-activating factor receptor antagonist, in myocardial ischemia and reperfusion in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994 Jan;23(1):7-12.
121. Li W, Enomoto M, Ukegawa M, Hirai T, Sotome S, Wakabayashi Y, et al. Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Apr;129(4):858-66.
122. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res*. 2005 Aug 15;308(2):283-90.