



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONTRÜKTİF ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

**RATLARDA YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN
STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN II. DERECE
DERİN YANIKLARIN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. SİBEL ATALAY

KAYSERİ 2011



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONTRÜKTİF ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

**RATLARDA YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN
STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN II. DERECE
DERİN YANIKLARIN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. SİBEL ATALAY

Danışman

Prof. Dr. ATILLA ÇORUH

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TSU-10-2991 kodlu proje ile desteklenmiştir**

Kayseri 2010

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 TARİHÇE	3
2.1.1 Yanık Tedavisi Tarihçesi	3
2.1.2 Stromal Vasküler Fraksiyon Tarihçesi	5
2.2 DERİ	5
2.2.1 Derinin Yapısı	5
2.2.2 Derinin Görevleri	8
2.3 YANIK.....	8
2.3.1 Yanık Derinliği.....	8
2.3.2 Yanık Zonları	9
2.3.3 Yanık Patofizyolojisi	10
2.3.4 Yanık Yarasının İyileşmesi ve Tedavisi	11
2.4 YAĞ DOKUSU	12
2.4.1 Stromal vasküler Fraksiyon	13
2.4.2 Yağ Doku kaynaklı Kök Hücreler.....	15

3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1 Denekler	19
3.2 Anestezi ve analjezi.....	20
3.3 Stromal vasküler fraksiyonun hazırlanması	20
3.4.Yanık oluşturulması	24
3.5 Doku örneklerinin alınması.....	25
3.6 Değerlendirme.....	25
3.6.1 Histopatolojik değerlendirme yöntemi.....	25
3.6.2 İmmünohistokimyasal boyama yöntemi	26
3.6.3 PCNA indeksi değerlendirmesi	26
3.6.4 VEGF Ekspresyon skoru değerlendirmesi	27
3.6.5 İstatistiksel değerlendirme	27
4. BULGULAR	28
4.1 Histopatolojik bulgular	28
4.1.1 Enflamasyon.....	28
4.1.2 Damarlanma	30
4.1.3 Fibroblastik aktivite	31
4.2 VEGF ekspresyon skoru	32
4.3 PCNA indeksi	33
5. TARTIŞMA	34
6 SONUÇ.....	40
KAYNAKLAR	42
TEZ ONAY	48

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca mesleki bilgi ve becerilerinden yararlandığım, ilkeli ve dürüst bir insan olma ruhunu örnek aldığım sayın hocam Prof Dr.Galip Kemali Günay’a, nEğitimimde ve tezimin oluşturulmasında bana bilgi ve deneyimlerini aktaran, asistanı olmaktan onur duyduğum değerli hocam Doç. Dr. Atilla Çoruh’a ,

Yetişmemde büyük emeği olan, bizlerden esirgemediği bilgi ve tecrübelerini ömrüm boyunca taşıyacağım değerli hocalarım , Doç. Dr. İrfan Özyazgan’a, Doç. Dr. Teoman Eskitaşçıoğlu’na şükranlarımı sunarım. İhtisas süresi boyunca bana verdiği manevi destek, göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan dolayı değerli eşim Mesut Atalay’a ve çocuklarım Berjan ve Selin’e teşekkür ederim.

KISALTMALAR

SVF:	Stromal vasküler fraksiyon
ADSC:	Yağ doku kaynaklı kök hücre (Adipose derived stem cell)
TGF-β :	Farklılaştırıcı büyüme Faktörü β (Transforming growth factor β)
PGE2 :	Prostaglandin E 2
GM-CSF:	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
VEGF:	Damar endoteli büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte growth factor)
b-FGF:	Temel fibroblast büyüme faktörü (Basic-Fibroblast growth factor)
TGF- β:	Farklılaştırıcı büyüme faktörü- β (Transforming growth factor)
KGF:	Keratinosit büyüme faktörü (Keratinocyte Growth Factor)
PLA:	İşlenmiş Lipoaspirat Hücreleri (Processed Lipoaspirate Cells)
PDGF:	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet-derived growth factor)

PIGF :	Plasental büyüme faktörü (Placental growth factor)
PCNA:	Çoğalan hücre çekirdek antijeni (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
PBS:	Fosfat buffer solüsyon
DAP:	Diaminbenzidin

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Farklı derinlikteki yanıkların klinik özellikleri.....	9
Tablo 2: VEGF ekspresyonunun skorlanması.....	27
Tablo 3: Kontrol ve deney grubu enflamasyon düzeylerinin karşılaştırması.....	29
Tablo 4: Kontrol ve deney grubu damarlanma düzeylerinin karşılaştırması	30
Tablo 5: Kontrol ve deney grubu fibroblastik aktivite düzeylerinin karşılaştırması.....	31
Tablo 6: Kontrol ve deney grubu VEGF değerlerinin karşılaştırması	32
Tablo 7: Kontrol ve deney grubu PCNA indeksi karşılaştırması.....	33

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Deri anatomisi	6
Şekil 2: Yanık zonları	10
Şekil 3: Fraksiyonlarına ayrılmış yağ dokusu	14
Şekil 4: Kök hücre	15
Şekil 5: Kök hücre tipleri.....	16
Şekil 6: İnguinal bölgesi traşlanmış sıçan	21
Şekil 7: Povidon iyot ile temizlik	21
Şekil 8: İnguinal insizyon	21
Şekil 9: İnguinal insizyonun kapatılması.....	21
Şekil 10: Çıkarılan inguinal yağ dokusu.....	22
Şekil 11: Yağların ince doku makası ile parçalanması	22
Şekil 12: Çalkalamalı su banyosu.....	22
Şekil 13: Çalkalamalı su banyosuna koyma	22
Şekil 14 : Çalkalamalı su banyosundaki tüpler	22
Şekil 15: Santrifüj aleti	23
Şekil 16: Santrifüje konan tüpler	23
Şekil 17: Santrifüj edilmiş süspansiyon.....	23
Şekil 18: Süzme işlemi	23
Şekil 19: Yanık oluşturulan alan	24
Şekil 20: Yanık oluşturulması	24
Şekil 21: Kontrol ve deney grubu enflamasyon düzeyleri.....	29
Şekil 22: Kontrol ve deney grubu damarlanma düzeyleri	30

Şekil 23: Kontrol ve deney grubu fibroblastik aktivite düzeyleri	31
Şekil 24: Kontrol ve deney grubu VEGF ekspresyon skoru	32
Şekil 25: Kontrol ve deney grubu PCNA indeksi.....	33

RATLARDA YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN II. DERECE DERİN YANIKLARIN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Derin ikinci derece yanıkların tedavisinde yağ dokudan elde edilen stromal vasküler fraksiyonun iyileşme üzerine etkilerinin araştırılması.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada yirmi 20 adet Wistar-Albino rat üzerinde yapıldı. Ratların hepsinin bilateral inguinal yağ dokuları eksize edildi. Ratların sırtında 70°C sıcak su ile derin ikinci derece yanık oluşturulduktan sonra her biri 10 rattan oluşan iki gruba ayrıldı. Tedavi grubundaki ratların yanık alanına intradermal olarak stromal vasküler fraksiyon, kontrol grubuna ise serum fizyolojik verildi. Yanık alanlarından 3, 7, 10. ve 14. günlerde biyopsi alındı. Histopatolojik incelemede; enflamatuvar hücre yoğunluğu, fibroblastik aktivite ve damar yoğunluğu değerlendirildi. İmmünohistokimyasal analizde damar endoteli büyüme faktörü (VEGF) ve çoğalan hücre çekirdek antijeni (PCNA) araştırıldı.

Bulgular: Stromal vasküler fraksiyon damar endoteli büyüme faktörünü ve çoğalan hücre çekirdek antijeni indeksini daha erken dönemde arttırmaya başlamakta ve daha yüksek seviyelerde devam ettirmektedir. Stromal vasküler fraksiyon uygulanan grupta enflamasyon 3. günden sonra kontrol altına alınmakta ve 7. günden sonra düşüşe geçmekte iken kontrol grubunda artış 10. güne kadar devam etmektedir. Damarlanma ve fibroblastik aktivite stromal vasküler fraksiyon uygulanan grupta 3. günde görülmeye başlarken diğer grupta 7.günden sonra görülmektedir. Damarlanma ve fibroblastik aktivite stromal vasküler fraksiyon uygulanan grupta daha yüksek düzeylerde seyretmektedir.

Sonuç: Stromal vasküler fraksiyon yanık yarasında hücre çoğalmasını ve damarlanmayı arttırmakta, enflamasyonu daha erken dönemde azaltmakta ve

fibroblastik aktiviteyi arttırmaktadır. Yanık yarasının rejenerasyonunu hızlandırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Derin 2. derece yanık, stromal vasküler fraksiyon, yağ doku kaynaklı kök hücre.

THE EFFECT OF ADIPOSE TISSUE DERIVED STROMAL VASCULAR FRACTION ON HEALING OF DEEP SECOND DEGREE BURN WOUND

ABSTRACT

Aim: This experimental study was performed to determine the effect of adipose tissue derived stromal vascular fraction on deep second degree burn wound.

Material and Methods: Twenty Wistar-Albino rats were used in this study. Bilateral inguinal fat tissues of all rats were excised. Stromal vascular fractions of fat tissues were separated. Deep second degree burn wounds were created on the back of rats with 70°C hot water. Rats were randomly divided into two groups. Burn wounds were treated by intradermal injection of stromal vascular fraction in experimental group and saline solution in control group. Tissue samples were obtained at particular time intervals after burn injury (3, 7, 10. and 14. days). Tissue samples were taken for histological and immunohistochemical studies. Inflammatory reaction, vascularisation and fibroblastic activity examined histologically. Proliferating cell nuclear antigen antibody (PCNA) and vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody detected immunohistochemically.

Results: Stromal vascular fraction, increases vascular endothelial growth factor and proliferating cell nuclear antigen antibody index much earlier. Vascular endothelial growth factor and proliferating cell nuclear antigen antibody continue at higher levels in stromal vascular fraction applied group. Inflammation was taken under control at 3rd day and decreased after 7th day in stromal vascular fraction applied group, while the increase continued until 10th day in control group. Vascularization and fibroblastic activity in stromal vascular fraction applied group started at 3rd day while in control group at 7th day. Vascularization and fibroblastic activity continued at higher levels in stromal vascular fraction applied group.

Conclusion: Stromal vascular fraction increases cell proliferation and vascularization of burn wound, while reducing inflammation at an earlier period and increasing fibroblastic activity. Stromal vascular fraction accelerates regeneration of burn wound.

Keywords: Deep second degree burn, stromal vascular fraction, adipose derived stem cell

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Yanık, bir insanın yaşayacağı en yıkıcı tecrübelerden biridir. Yanık tedavisi Plastik Cerrahinin temel konuları arasındadır. Yanıklar çok çeşitli nedenlerle meydana gelebilmektedir. Alev yanıkları ve sıcak sıvı yanıkları, sivil toplumda görülen en sık yanık sebepleridir. Sıcak sıvı yangının derinliği; sıvının ısı derecesine, etkene maruz kalma süresine ve sıvının yoğunluğuna bağlıdır. Termal yaralanma; epidermisi, dermisin bir kısmını veya tamamını, hatta derialtı dokuyu etkileyebilir. Yanık derinliğinin artması yara iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Birinci derece (Yüzeyel) yanık; sadece epidermisin etkilendiği yanık olup bazal tabaka korunduğu için 3-5 gün içerisinde epidermis yenilenerek iyileşir. İkinci derece (kısmi kalınlıktaki) yanık epidermisin tamamının ve dermisin bir kısmının etkilendiği yanıktır. Etkilenen dermis derinliğine göre yüzeyel ve derin olmak üzere ikiye ayrılır. Yüzeyel 2.derece yanıkta hasar papiller dermis ve üst retiküler dermis seviyesindedir. 7-14 gün içerisinde kendiliğinden iyileşir ve genellikle gözle görülebilen bir iz bırakmaz. Derin 2.derece yanıkta hasar, retiküler dermisin derinlerine kadar uzanır, eğer enfeksiyondan korunursa 3-8 hafta arasında kendiliğinden iyileşme şansına sahiptir. Ancak bu spontan iyileşme; tipik olarak skar oluşumu ve kontraktür ile birlikte gerçekleşir. Derin 2.derece yanıkların tedavisinde altın standart olan tedavi yöntemi ölü dokuların erken cerrahi eksizyonu ve greftlemedir. Üçüncü derece yanıkta epidermisin ve dermisin tamamında nekroz vardır. En uygun tedavi ölü dokuların uzaklaştırılması ve oluşan defektlerin greft ve fleple onarımıdır (1,2).

Stromal vasküler Fraksiyon (SVF) yağ dokudan elde edilen bir üründür. Yağ dokuda bulunan hücrelerin yaklaşık üçte ikisi adipositlerdir. Diğer hücreler; çeşitli kan hücreleri, endotel hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve çeşitli farklılaşma evresinde olan öncü hücrelerdir. Yağ dokusu kollajenazla muamele edilip santrifüj edildiğinde üç kısma ayrılmaktadır; parçalanmış olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserit, olgun yağ hücreleri ve SVF (3). Stromal vasküler Fraksiyon ve içerisinde yer alan yağ doku kaynaklı kök hücreler (ADSC) üzerine yapılan çalışmalarda bu hücrelerin birçok büyüme faktörü salgıladığı (4), yeni damar oluşumunu arttırdığı (5,6), anti-apoptotik etkilerinin olduğu(5), antioksidan etkili olduğu(7), yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği (4,8), anti-enflamatuar etkili olduğu (9) ve fibroblastlardan kollajen sentezini arttırdığı (10) gösterilmiştir.

Derin 2.derece yanık tedavisinde yağ dokudan elde edilen SVF'nin intradermal olarak uygulanması planlandı. Günümüzde derin 2.derece yanık tedavisinde altın standart olan erken tanjansiyel eksizyon ve greft uygulamasına alternatif olabilecek, yara iyileşmesini hızlandıracak, yara dönüşümünü engelleyerek nekrozu azaltacak etkin ve ekonomik bir tedavi seçeneği yoktur. Stromal vasküler fraksiyonun; kök hücre kaynağı olduğu, büyüme faktörleri salgıladığı, damarlanmayı arttırdığı, antioksidan etkiyle oksidatif hasarı önlediği, apoptotik hücre ölümünü azalttığı, anti-enflamatuar etki sağladığı ve kollajen sentezini arttırdığı bilinmektedir. Bu etkileri kısmen veya tamamen sağlayarak yanık yarasının iyileşmesini olumlu yönde etkileyeceği düşünüldüğü için bu çalışmanın yapılması planlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 TARİHÇE

2.1.1 Yanık Tedavisi Tarihçesi

Eski çağlara ait mağara resimlerinden elde edilen bulgulara göre yanık tedavisi 3500 yıldan beri yapılmaktadır. Mısırdaki bulunan ve M.Ö. 1500 yılına ait Smith Papirüslerinden elde edilen verilere göre reçine ve bal karışımından oluşan merhemler kullanılmıştır. Çinliler M.Ö.600 yılında çeşitli karışımlar ve çay yapraklarından elde edilen öz suların kullanmasını önermektedir. Yaklaşık iki yüz yıl sonra Hipokrat erimiş yağ ve reçine ile yoğrulmuş pansumanları önermiştir. Daha sonra bu pansumanlara ılık sirke ve meşe ağacı kabuğundan elde edilen solüsyonlar katılmıştır. Celcus, M.S. ilk yüzyılda, sarı sakız reçinesi ve şaraptan hazırlanan ve muhtemelen bakteriostatik özelliğinden faydalanılan bir losyon kullanmıştır. M.S. 130-210 Yılları arasında yaşayan Galen sirke kullanmış ve yaranın açık takibi yöntemini denemiştir. Arabistanlı doktor Rhazes yanık ağrısının azaltılmasında soğuk su uygulanmasını önermiştir. Ambroise Pare (M.S. 1510-1590) ortaçağ simyasına ait kremler önermiş, soğanla etkili bir şekilde yanık tedavi etmiş ve erken yara eksizyonunu tanımlamıştır. Bir Alman cerrah olan Guilihelmus Fabricius Hildanus 1607’de “De Combustionibus”u yayınlarak yanığın patofizyolojisini tartışmış ve kontraktürlerin tedavisi hakkında bilgi vermiştir. Edward Kentish 1797’de yanık ağrılarının azaltılması ve bül oluşumunun önlenmesi için baskılı giysi

kullanımını öneren bir deneme yayınlamıştır. Bu dönemlerde, Marjolin, uzun süre kapanmayan yanık yaralarından yassı hücreli kanser geliştiğini fark etmiştir. Ondokuzuncu yüzyıl başlarında, Dupuytren, 50 yanık hastasının tedavisi ile ilgili bir derleme yayınlamış ve yanık derinliği ile ilgili bugün bile geçerliliğini koruyan sınıflamayı yapmıştır. Yanığa bağlı oluşan gastrik ve duodenal ülserleri de muhtemelen ilk tanımlayan odur ancak bu problem ilk kez 1842 de Londra’da Curling tarafından detaylıca tartışılmıştır. Yanıkta sıvı elektrolit tedavisi Frank P Underhill’in çalışmalarıyla başlamıştır. 1921 yılında Rialto tiyatrosu yangınından sonra yanıklı hastaların bül sıvısının içeriğinin plazmaya benzediğini ve ölüm oranının kaybedilen sıvı miktarı ile ilişkili olduğunu fark etmiştir. Hastalara tuz ve protein içeren sıvılar verilerek sıvı kaybının yerine konması gerektiğini söylemiştir. Boston’da 1946 yılında meydana gelen Coconut Grove Night Club yangınında, Dr. Oliver Cope ve Dr. Francis Moore sıvı tedavisinin miktarı üzerine çalışmalar yaptılar. Hücreler arası boşluğun majör sıvı kaçağı olan alan olduğunu tespit ettiler. Yanan vücut yüzey alanına göre verilmesi gereken sıvı miktarını formüle ettiler. Dr Truman G Blocker yanık tedavisinde multidisipliner ekip çalışmasının önemini ortaya koydu ve 1947’de Texas şehri Limanında amonyum nitrat gübre yüklü iki yük gemisinin çarpışması sonucu ortaya çıkan, 560 kişinin öldüğü, 3000 kişinin yaralandığı felakette ekip çalışmasını uyguladılar. Truman ve Virginia Bloker 9 yıl boyunca 800’den fazla yanıklı hasta takip etti ve birçok yayın yaptılar. Andrew M Muster 1970’lerde ağır yanıklı hastaların yaşam kalitelerini inceledi ve erken eksizyonun mortaliteyi önemli ölçüde düşürdüğünü bildirdi (11). Pigeon J, 1960 yılında, ikinci derece yanıkların tedavisinde amniyon zarı kullanımını denedi ve olumlu sonuçlar aldığını bildirdi (12). Withaker AJ, 1962 yılında, yanık tedavisinde soğuk uygulama, steroidli pomad ve antibiyotikli pomatların etkili olduğunu yayınladı (13). Nekrotik dokuların eksizyonu ve deri grefti uygulaması 1954 yılından beri yanık tedavisinde yerini almıştır. İkinci derece derin yanıklar ve tam kat yanıkların tedavisinde halen altın standart olarak kabul edilen ve ilk 72 saatte yapılan erken tanjansiyel eksizyon ve greftlemeyi ilk olarak 1970 yılında Janzekoviç tanımladı (14). Yanık tedavisinde her ne kadar otogreft altın standart olsa da geniş yanıklarda donör alanın kısıtlı olması bunu zorlaştırmaktadır. Bu sebepten dolayı pek çok doku mühendisliği ürünleri ile deri kaybı geçici veya kalıcı olarak yerine konmaya çalışılmaktadır. Rejeneratif tıptaki ilerlemelere paralel olarak kök hücre kullanımı popülerite kazanmaya başladı. İlk kez 2004 yılında Rasulov F derin yanıklı

hastalarda kemik iliği kaynaklı kök hücreleri kullandı. Kök hücreler yanık yaralarına lokal uygulandığında aktif bir neoanjiogenez ve hızlı bir rejenerasyon olduğu görüldü (16).

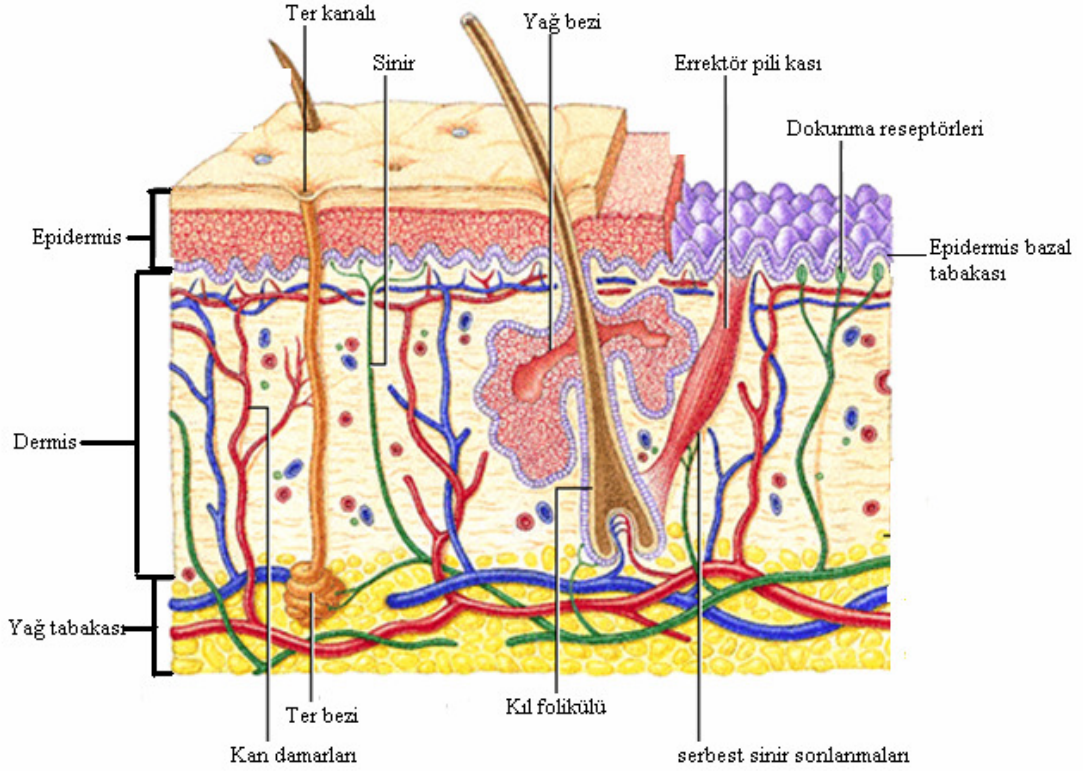
2.1.2 Stromal Vasküler Fraksiyon Tarihçesi

Yağ dokusunun hücreden zengin stromal kısmı ilk kez 1964 yılında Rodbell M tarafından tanımlandı ve “Stromal Vasküler Hücreler” olarak adlandırıldı (17). Daha sonra, 1989 yılında Hauner H, stromal vasküler hücrelerin üzerine yoğunlaşarak bunların progenitör (öncü) hücreler içerdiğini ve bu hücrelerin daha sonra adiposite farklılaştığını gösterdi (18). Ailhaud 1992 yılında yayınladığı çalışmada SVF içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve öncü hücreler bulunduğunu gösterdi (3). Zuk PA tarafından 2001 yılında yapılan çalışmada SVF’nun farklı hücelere dönüşebilme potansiyeline sahip multipotent kök hücreler içerdiği gösterildi (19). Halen SVF ve ADSC’lerle ilgili çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılmaktadır. Plastik cerrahi alanında doku yenilenmesi ve gençleştirmede kişinin kendi kök hücrelerinin kullanımı ile ilgili araştırmalar son yıllarda hız kazanmıştır (20).

2.2 DERİ

2.2.1 Derinin yapısı

Deri, yaşamın devamı için çok önemli fonksiyonları olan ve çift katmandan oluşan bir organdır. Deri vücudun en büyük organıdır (21). Vücudun tüm yüzeyi kaplar ve sindirim, solunum, ve ürogenital sistem epiteli ile devamlılık gösterir. Vücudun en fazla travmaya maruz kalan organıdır. Hayatın devam edebilmesi için çok önemli fonksiyonları olan derinin devamlılığının ve bütünlüğünün korunması gereklidir.



Şekil 1: Deri anatomisi

Deri temel olarak iki katmandan oluşmuştur; epidermis ve dermis.

Epidermis: Derinin dış katmanı olup damarsız bir yapıya sahiptir. Epiderminin temel fonksiyonu ölü hücrelerden oluşan sert bir dış tabaka oluşturarak organizmayı zararlı çevresel etkilerden korumaktır. Epiderminin kalınlığı bulunduğu anatomik bölgeye göre farklılık gösterir. Örneğin göz kapağında 0,04 mm iken avuç içinde 1,6 mm dir.

Epidermis, embriyonal hayatın 3. haftasında oluşmaya başlar ve ektodermden köken alır. Dördüncü haftadan itibaren bazal germinal tabaka ve glikojenden zengin periderm denilen üst tabaka görülür. Gelişim devam ederken tonofilamenlerden oluşan ve birbirine desmozomlarla bağlı bir ara bölge oluşur. Beşinci aydan itibaren bu ara bölgede keratohyalin granülleri oluşur. Altıncı aydan itibaren deri tamamen kornifiye olur ve 5 farklı tabaka meydana gelir. Bunlar; bazal tabaka diğer ismiyle stratum germinatum, stratum spinozum, stratum granülozum, stratum lucidum ve son olarak da stratum korneumdur.

Epidermis 4 farklı hücre tipinden oluşmuştur: Keratinosit, melanosit, Langerhans hücresi ve Merkel hücresi. Keratinositler asıl epitel hücreleridir ve keratin

sentezlerler. Bazal tabakada yer alan keratinositler mitotik aktiviteye sahip genç silindirik hücrelerden oluşur. Bunun üzerinde yer alan stratum spinosum katmanında mitoz gözlenmez, ancak protein sentezi belirgindir. Keratin oluşumunun öne çıktığı katman ise stratum granulosumdur. Hücrelerin çekirdeklerini kaybedip yassılaştıkları kısım stratum lusidum, keratinize ölü hücrelerden oluşmuş en üst katman da stratum korneumdur. Melanositler nöral krest hücrelerinde köken alır ve 8. haftada epidermise ulaşır. Melanositler 5. aydan itibaren melanozom üretmeye başlar ve keratinositlere melanin aktarırlar. Melanositler ultraviyole ışınlarına karşı melanin pigmenti oluştururlar ve bu sayede keranosit çekirdeğini ultraviyolenin zararlı etkilerine karşı korurlar. Langerhans hücrelerinin hemapoetik kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülür ve ilk olarak 6.haftada epidermiste görülür. Langerhans hücreleri derinin immünolojik karakteristiğini belirler. Merkel hücreleri yaklaşık 16. haftada görülür. Merkel hücrelerinin orijinleri hala tartışmalıdır. Nöral krest veya ektodermden köken aldıkları düşünülmektedir. Merkel hücreleri özelleşmiş nörosensorial hücrelerdir, mekanoreseptör olarak görev yaparlar (22,23).

Dermis: Derinin dayanıklılığını sağlayan ve deri eklerini tutan kısımdır. Dermis iki katmandan oluşur; üstte yer alan papiller tabaka ve altında yer alan retiküler tabaka. Papiller dermis düzensiz kollajen lifleri, elastik fibriller, fibrositler ve yoğun bir damarsal ağa sahip hücreler arası maddeden oluşur. Papiller dermisteki yoğun damar ağı metabolik olarak aktif olan ancak damarlanması olmayan epidermisin beslenmesini sağlar. Retiküler dermiste bulunan kalın kollajen bantları deriye gerim kuvveti sağlar. Dermiste kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri, damarlar sinirler ve lenfatikler bulunur. Dermis hücreleri fibroblastlar, mast hücreleri, histiyositler, Langerhans hücreleri, makrofajlar, endotel hücreleri, lenfositler ve nadir görülen eozinofillerdir. Fibroblastlar kollajen ve elastin üretir. Kollajen ve elastin, deriye gerilmeye karşı dayanma ve esneklik kazandırır. Kollajen yara iyileşmesi ve skar oluşumu için gereklidir. Kollajen deri ağırlığının yaklaşık %70'ini oluşturur. Dermiste en fazla tip 1 kollajen bulunur. Retikülin lifleri de denilen tip III kollajen total kollajenin %15'i olup papiller dermiste ve deri ekleri çevresinde bulunur. Tip IV kollajen epidermis ile dermis arasındaki bazal membranın asıl yapısını teşkil eder (22,23).

2.2.2 Derinin görevleri

Koruma: İç organ ve yapıları zararlı dış etmenlere karşı (sürtünme, hava şartları, kimyasallar, radyasyon vb.) korur.

İmmünolojik: İmmün sistemde görevli hücrelere antijen sunmakta yardımcıdır. Deri yüzeyinde bulunan uzun zincirli yağ asitleri antibakteriyel özelliktedir. Deskuamasyon invazif özellikteki bakterilerin penetrasyonuna engel olur.

Homoestaz: Sıvı-elektrolit ve protein kaybını önler ve sekresyon yapma özelliği ile vücut dengesine yardımcı olur.

Nörosensoriyal: Dokunma, acı, sıcak, soğuk gibi çevresel uyaranları algılar.

Termoreglatuvar: Deri ısı kaybını önlediği gibi sıcak havalarda ter salgılar ve evoperasyon ile soğumaya yardımcı olur.

Metabolik: Vitamin-D metabolizmasında görevlidir.

Sosyal-İletişim: Cinsel kimlik ve çekicilik ile kişiler arası iletişim sağlar (24).

2.3 YANIK

Yanık yaralanması dokuların tammül edebildiğinden fazla miktarda ısıнын deriye transferiyle oluşan, protein denatürasyonu ve hücre harabiyetine neden olan bir travmadır. Temel hasar mekanizmaları; ısıya bağlı doku ölümü, enflamatuar mediatörlere bağlı oluşan hasar ve ısıнын etkisi ile tromboze olan damarların yol açtığı iskemik hasardır. Yanığın derinliği; ısıнын derecesine, temas süresine, ortama (hava-sıvı) ve o bölgedeki deri kalınlığına göre değişir. Küçük yüzeyli yanıklar bölgesel doku hasarı yaparken geniş vücut yüzeyini kaplayan yanıklarda deri hasarı ile birlikte sistemik yanıt da oluşur.²⁵

2.3.1 Yanık Derinliği

Yanıkta tedavi yanığın derinliği ve kapladığı vücut alanının belirlenmesi ile başlar. Bu nedenle yaralanmanın derinlik ve alan olarak belirlenmesi tedavinin planlanması için çok önemlidir (26). Oluşan doku hasarı etkene, temas süresine, ortama ve etkilenen vücut kısmına göre değişebilir. Yanığın derinliğini erken dönemde belirlemek her zaman mümkün olamamaktadır. Yanık derinliğini belirlemek için ultrasound incelemesi, intravenöz floresan verilmesi gibi yöntemler tanımlanmış

olsada en güvenilir yöntem seri klinik gözlemdir (Tablo 1). Yaralanmanın derinliği genellikle 48 ila 72 saat sonra net olarak belirginleşir.

Tablo1 : Farklı derinlikteki yanıkların klinik özellikleri (15).

Yanık Derinliği	Görünüm	Bül	Kapiller Dolum	His
Epidermal	Kırmızı, parlak	Yok	Canlı	Ağrılı
Yüzeyel dermal	Açık pembe	Küçük	Canlı	Ağrılı
Derin dermal	Kuru, yamalı kırmızı renk	Bulunabilir	Yok	Az veya yok
Tam kat	Kuru, beyaz yada siyah	Yok	Yok	yok

Birinci derece (Yüzeyel) (Epidermal) yanık; hasar epidermiste sınırlıdır,

İkinci derece (Dermal) yanık; epidermis ve dermisin bir kısmında hasar vardır. Yüzeyel 2.derece yanıklarda epidermis ve dermisin 1/3 üst kısmı hasarlı iken, derin 2.derece yanıklarda dermisin derinlerine kadar uzanan hasar vardır.

Üçüncü derece (Tam Kat) Yanık; derinin her iki katmanının da tamamen etkilendiği yanıktır (15).

Isının derecesi ve temas süresi doku hasarının esas belirleyicisidir. Ayrıca ısının etkisi vücudun değişik kısımlarında da farklılık gösterir. Derisi kalın olduğu avuç iç ve ayak tabanı gibi bölgeler yanık hasarına daha dirençli iken göz kapağı veya el sırtı gibi derinin ince olduğu yerler daha hassastır. Çocukların ve yaşlıların derileri erişkinlere göre daha ince olduğu için tam kat yanıklar daha fazla oranda görülür.

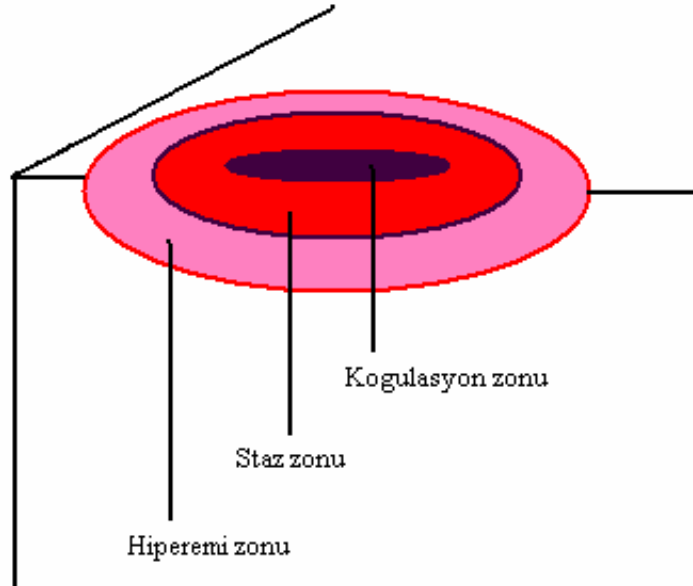
2.3.2 Yanık Zonları

Yüksek ısı temas noktasından çevreye doğru yayılan bölgesel doku hasarına neden olur. Temas alanında hücre ölümü meydana gelirken çevre dokuda protein denaturasyonu oluşur (25). Yanık zonları ilk kez 1952 yılında Jackson tarafından tanımlanmış olup bu tanımlama halen geçerliliğini korumaktadır. Bu tanımlamaya göre;

Koagulasyon Zonu (Nekroz zonu): Isı transferinin en yoğun olduğu alanda görülen, protein denaturasyonu ve koagulasyonla karakterize, tam hücre nekrozunun olduğu alandır.

Staz Zonu (Hasar Zonu): Koagulasyon zonunun derinlerinde ve periferinde yer alan, daha az hasarın olduğu ve başlarda çoğu hücrelerin canlı olduğu alandır.

Hiperemi Zonu: Staz zonunun altında ve kenarlarında yer alan zondur. Çevre dokuların enflamasyonu sonucu salınan mediatörlerin indüklediği vazodilatasyonla karakterize alandır. Hücresel hasar azdır ve enfeksiyon veya derin doku inflamasyonu oluşmadığı sürece tamamen iyileşmesi beklenir (28).



Şekil 2: Yanık zonları

2.3.3 Yanık Patofizyolojisi

Isının deriye aktarılmasıyla hücresel düzeyde ortaya çıkan ilk etki hücre duvarı bütünlüğünün kaybı ve protein denatürasyonudur. Kısa bir süre sonra toksik enflamatuar mediatörler ortama salınır. Özellikle nekroz alanı çevresindeki doku hasarının çoğu yanıkla aktive olan toksik enflamasyon mediatörlerine bağlı gelişmektedir. Yara iyileşmesi için enflamasyon gereklidir ancak yanıkta oksidanlar ve proteazlar gibi enflamatuar mediatörlerin aşırı salınımı damar endoteli ve deri hücrelerinin hasarını artırır. İnflamasyon büyüme faktörlerinin de fonksiyonunu

bozar. İnflamasyon esnasında ortamdaki oksijenin nötrofiller tarafından kullanılması doku hipoksisini arttırır. Isının hücre hasarı yaptığı alanda damar trombozları da meydana gelir ama ilk yaralanmanın oluşumunda iskeminin etkisi yoktur. Hücrelerin bir kısmının canlı olduğu alanlarda ısı ve mediatörlerin etkisiyle kapiller trombozun ilerlemesi iskemiye neden olarak doku nekrozunu arttırır. Ölü dokular ve bakteriel kolonizasyona bağlı olarak ortamdaki nötrofiller artar. Nötrofillerden salınan proteazlar ve oksidan ajanlar canlı dokulara da zarar verir (29,30).

Bir dokudaki hücre ölümü temel olarak iki mekanizmayla meydana gelir; apopitoz ve nekroz. Apopitoz intrinsik veya extrinsik yolla oluşur. Her iki yolun sonunda da hücre içi proteazlar aktive olur ve hücre ölümü gerçekleşir. Gravante G ve ark. derin kısmi kalınlıktaki yanıklarda apopitotik hücre ölümü olup olmadığını araştırmak için bir çalışma yaptılar. Termal yaralanmanın apopitozu uyardığını, staz zonundaki hücrelerin yarıya yakının apopitotik olduğunu, apopitozun yanıktan sonra en az 20 gün devam ettiğini ve derin kısmi kalınlıktaki yanıklarda, yüzeysel yanık ve tam kat yanıklara oranla çok daha fazla apopitotik hücre bulunduğunu gösterdiler (31,32).

Yara dönüşüm Teorisi: Yanıklar ilk birkaç gün dinamik bir süreç izlerler. Yoğun enflamasyon, vasokontrüksiyon ve enfeksiyon, nekroz alanın çevresindeki hasarlı ancak canlılığını koruyan hücrelerin de yıkımına neden olur. Bunun sonucunda yanığın derinliği ve genişliği artar. Yara dönüşümünde etkili olan faktörler şunlardır: bozulmuş kan akımı, artmış enflamasyon, yüzey kuruluğu, enfeksiyon, metabolik bozukluk (glukoz uptakenin azalması, artmış metabolik ihtiyaç vs.), apopitoz ve hastanın genel sağlık durumudur (yaş, ek hastalıklar vs.) (31,33).

2.3.4 Yanık Yarasının İyileşmesi ve Tedavisi

İyileşme'nin birçok anlamı vardır. En geniş tanımıyla ele alacak olursak hasarlı bir durumun tekrar eski haline dönmesi diyebiliriz. Bunu yara iyileşmesine uyguladığımızda hasarlı dokunun aynı doku elemanları ile onarılması şeklinde tanımlayabiliriz. Yanık yarasının iyileşmesi temel yara iyileşme basamakları üzerinde seyretmektedir. Bu kabaca 4 basamakta oluşmaktadır; ilk olarak yara yerine kan akımı durdurularak hasarlı doku sınırlandırılır. İkinci basamakta kan akımı arttırılarak yara yerine enflamasyonda görevli hücreler taşınır, bunda amaç ölü dokuların ortamdaki uzaklaştırılması ve kurtarılabilecek dokuların mikroorganizmalardan korunmasıdır. Üçüncü basamak proliferasyon fazıdır. Kan

damarları yeniden oluşturulur, fibroblastlar fibröz iskeleti kurar, yara kenarlarından ve derin epidermal eklerden epitel hücreleri çoğalır. Yara yeri epitel ile kapatıldıktan sonra en uzun aşama olan yeniden şekillendirme safhası başlar. Fibröz doku farklılaşarak skar dokusu oluşturulur (30).

Yanık yarasının iyileşmesinde çevre dokuların yanı sıra kemik iliği kaynaklı hücrelerde etkin rol oynamaktadır. Rea S ve ark. tarafından yapılan çalışmada farelerde radyasyon ile kemik iliği kurutulduktan sonra işaretli kemik iliği hücreleri periferik vene verildi ve hayvanlarda tam kat yanık oluşturuldu. Yanık yaraları incelendiğinde erken evrede enflamatuvar hücrelerin tamamının, geç evrede fibroblastların yarısının ve keratinositlerin ufak bir kısmının kemik iliği kaynaklı hücrelerden oluştuğu gösterildi (34).

Yanık tedavisinin konservatif mi yoksa cerrahi mi olacağını belirlemede temel unsur yanığın derinliğidir. Birinci derece yanıklar ve 2.derece yüzeysel yanıklar canlı kalan kıl folikülleri, ter ve yağ bezlerinin epitelinin yüzeye ilerlemesiyle 2-3 haftada kendiliğinden iyileşir. İkinci derece derin yanıklarda primer epitelizasyonu sağlayacak deri eki miktarı daha azdır. Ayrıca yüzeydeki ölü dokuların ortamdan uzaklaştırılması gereklidir. Kendi haline bırakıldığında yara iyileşmesi uzun zaman alır, enfeksiyon riski yüksektir, hipertrofik skar gelişme oranı yüksektir. İyileşme süresini kısaltmak için cerrahi tedavi gereklidir. İkinci derece derin yanıklar ve tam kat yanıkların tedavisinde altın standart otogreft kullanımıdır (27).

2.4 YAĞ DOKUSU

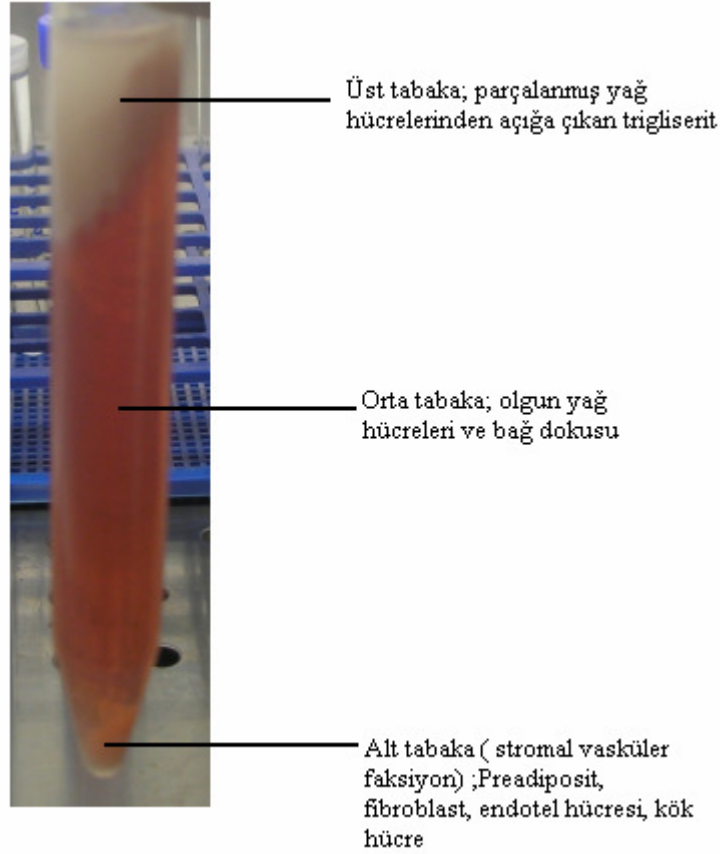
Yağ dokusu, baskın hücre tipi yağ hücreleri (adiposit) olan bağ dokusunun özel bir tipi olup mezenkimal kökenlidir. Adipositler bağ dokusunda tek başına olabilecekleri gibi küçük gruplar halinde de bulunabilir. Yağ dokusu, zengin bir vasküler yatak ve sinir ağına sahip bir bağ dokusu ile tam olmayan 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 öncü hücrelerdir (3).

Yağ dokusu insanlarda ilk olarak embriyonal hayatın üçüncü ayından itibaren vücudun çeşitli bölgelerinde(yanak, boyun, omuzlar, kalça, perirenal) görülmeye başlar. 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 ilişki içinde olduğu görülür. Yağ hücrelerinden salınan spesifik büyüme faktörlerinin (Farklılaştırıcı büyüme faktörü (TGF- β), prostoglandin E2 (PGE2) vs.) anjiogenezisi yönlendirmesi önemli bir konudur (3). Büyüme faktörlerine ek olarak salınan ‘monobutrin’ yağ dokuya spesifik bir anjiogenez faktörüdür (3,35).

Yağ dokusu adipositlerin içerdiği lipid damlacıklarına göre uniloküler (beyaz) ve multiloküler (kahverengi) yağ dokusu olarak sınıflandırılır. Beyaz adipositler sadece büyük bir yağ vakuolüne sahiptir. Yağ asitlerinin depolanması ve kullanılmasından rol alırlar. Kahverengi adipositler multilokülerdir ve hücre içinde bol miktarda mitokondri vardır. Uyarıldıklarında depolanmış kimyasal enerjiyi ısıya dönüştürürler. Yağ dokusunun görevleri şunlardır; Enerji depolama, yağda eriyen vitaminleri depolama, fiziksel koruma, ısı üretimi, adipokin (Adipositokin) salınımıdır. Adipokinler yağ dokudan salınan protein yapısındaki maddeler olup endokrin, parakrin ve otokrin etkilere neden olurlar (36).

2.4.1 Stromal Vasküler Fraksiyon

Stromal vasküler fraksiyon yağ dokudan elde edilen bir üründür. Yağ dokusu küçük parçalara bölündükten sonra kollajenazla muamele edilerek hücreler arası bağlar kopartılır. Oluşan süspansiyon santrifüj edildiğinde üç kısma ayrılır; üstte olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserit, ortada olgun yağ hücreleri ve en altta SVF (Şekil 3).



Şekil 3: Fraksiyonlarına ayrılmış yağ dokusu

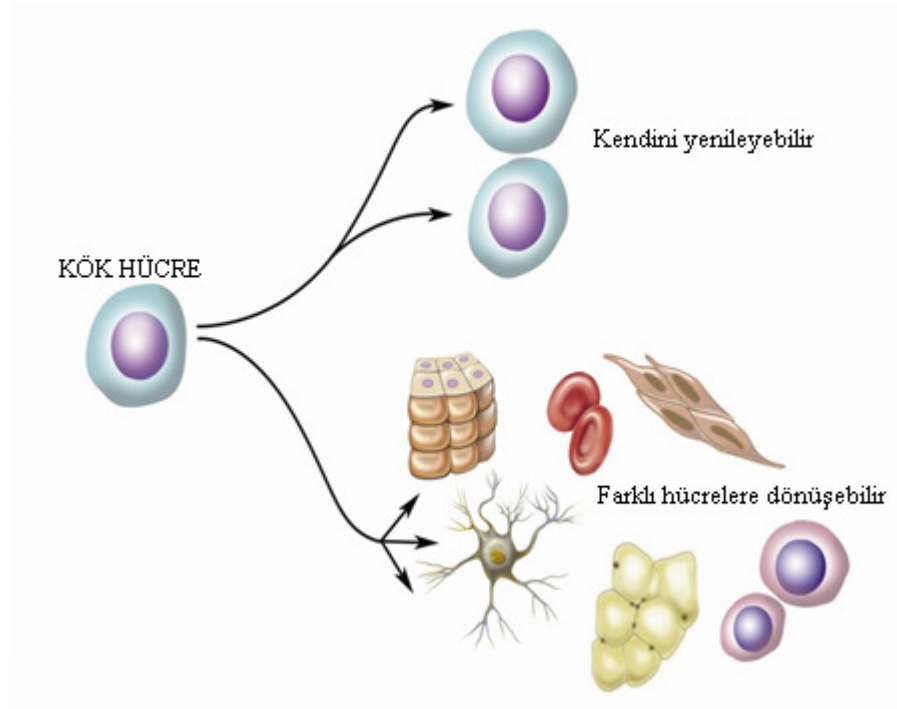
Stromal vasküler fraksiyon içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler bulunmaktadır (3). Stromal vasküler fraksiyon içerisindeki kök hücreler uygun ortamlarda çoğalabilmekte, farklılaşabilmektedir. Bu hücreler tedavi amaçlı doku yenilenmesinde 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 (37-39).

Stromal vasküler fraksiyonun; granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), damar endotel büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), temel fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), ve farklılaştırıcı büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi anjiogenik ve antiapoptotik faktör salgılama potansiyeli vardır. Hipoksik ortamda stromal vasküler fraksiyondan VEGF salınımının belirgin derecede artmaktadır (5). Anjiogenez, yani yeni damar oluşumu, yara iyileşmesinde önemli bir basamaktır. Dokuların işlevlerini yerine getirebilmesi için kendilerine özgü damarlanma yapısına sahip olmaları gereklidir. Damar endotel büyüme faktörü, endotel hücre

büyümesinin güçlü bir uyarandır (40). Stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan preadipositler adipojenik öncü hücre olmalarının yanı sıra mikrovasküler endotelial hücrelerle parakrin etkileşim göstermektedir. Preadipositler tarafından salınan ‘monobutyryn’ bir anjiogenik faktör olup endotelial hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (35,40). 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, farklılaştırıcı büyüme faktörü β (TGF- β) ise fibrozisi ve gerim kuvvetini artırır (1).

2.4.2 Yağ Doku kaynaklı Kök Hücreler

Kök hücreler kendini yenileyebilen, uzun süre canlı kalabilen, özelleşmiş hücrelere dönüşebilen hücrelerdir .



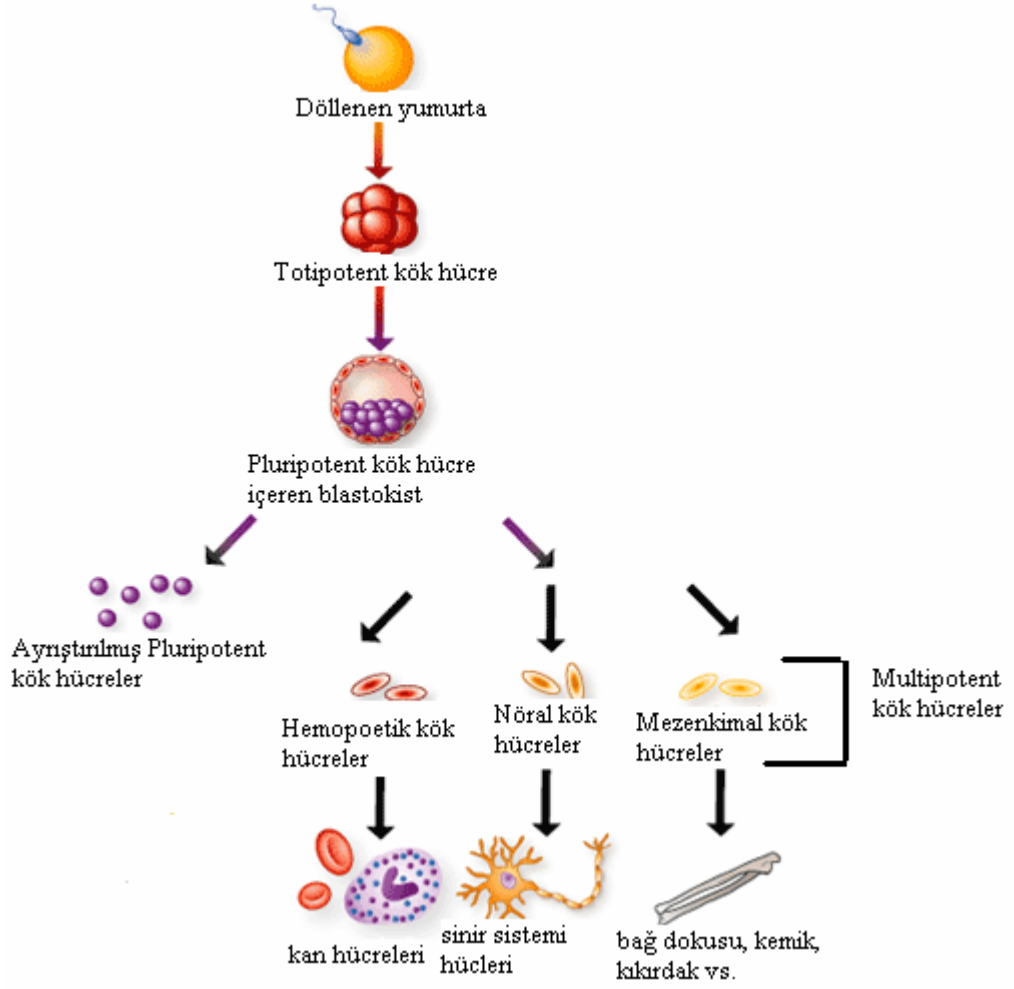
Şekil 4: Kök hücre

Kök hücre tipleri;

Totipotent Kök Hücre: Plasental yapılar dahil vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilen ilk embriyonal hücrelerdir. Yeni bir canlı oluşturabilir.

Pluripotent Kök Hücre: Zigot oluşumunu takip eden 5. günden sonra oluşan ve plasental yapılar hariç her hücre türüne dönüşebilen hücrelerdir. Canlının her hücre tipini oluşturabilir ancak yeni bir canlı oluşturamazlar.

Multipotent Kök hücre: Belirli hücre türlerine dönüşebilen kök hücrelerdir. Örn: multipotent hemapoetik kök hücreler gerektiğinde eritrosit, lökosit veya trombositlere dönüşebilirler.



Şekil 5: Kök hücre tipleri

“Erişkin kök hücresi” bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olup, bu hücre kendini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre türlerine farklılaşabilir. Erişkin kök hücrelerinin yaşayan organizmadaki esas görevi bulundukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. Dokularda bulunan kök hücrelerden salınan anjiyogenik, antiapoptotik ve mitojenik faktörler hasara uğramış dokuların rejenerasyonunu artırır, çoğu dokuda gösterilmiş olan endojen-kök hücrelerin

çoğalması ve farklılaşmasını artırır, inflamasyon ve immün reaksiyonları azaltırlar (41).

Yağ dokusundan elde edilen kök hücreler erişkin kök hücrelere örnektir ve mezenkimal kökenlidir. Zuk P ve ark. 2001 de yaptıkları çalışmada yağ doku aspiratı içerisinde kök hücre içerdiği varsayılan bir grup hücre tanımladılar ve bunları “İşlenmiş Lipoaspirat Hücreleri (PLA)” olarak adlandırdılar. Aynı çalışmacılar 2002 yılında yaptıkları çalışmada PLA hücrelerinin gerçekten kök hücre içerip içermediğini ortaya koymak ve bu hücrelerin farklılaşma potansiyellerini değerlendirmek için bir dizi moleküler ve biyokimyasal tanımlama yaptılar. İşlenmiş lipoaspirat hücrelerinin kemik iliği kaynaklı kök hücrelerle aynı yüzey antijenik özellikleri gösterdikleri, uygun kimyasal uyaranlarla adipojenik, osteojenik, kondrojenik, myojenik ve nörojenik hücreler gibi birçok hücreye farklılaşma kapasitesine sahip olduklarını gösterdiler. Bu hücreleri “Yağ doku kaynaklı kök hücre (ADSC) ” olarak adlandırdılar (19). Kern S ve ark. tarafından yapılan çalışmada kemik iliği kaynaklı kök hücreler, göbek bağı kaynaklı kök hücreler ve yağ doku kaynaklı kök hücreler birbiri ile karşılaştırıldı. Her üç kaynaktan elde edilen kök hücrelerin aynı fibroblastoid morfolojiye sahip olduğu, aynı kolonileri oluşturdukları, aynı multipotansiyel farklılaşma yeteneğine sahip oldukları ve benzer yüzey proteinlerine sahip oldukları gösterildi. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitesinin ADSC’lerde diğer iki gruba göre daha yüksek oranlarda gerçekleştiği görüldü (42). Kim WS ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda; ADSC’lerin fibroblastlardan kollajen sentezini uyarak dermis kalınlığını arttırdığı (4,10), güçlü bir antioksidan aktivite göstererek dermal fibroblastları oksidatif hasardan koruduğu, serbest radikallere bağlı oluşan deri hasarını önlediği gösterildi (7,43). Deneysel hayvan çalışmasında farelerde tam kat yaralar oluşturularak lokal olarak ADSC ile zenginleştirilmiş kollajen jel uygulandı. Bu uygulamanın yara iyileşmesini belirgin derecede hızlandırdığı, granülasyon veya epidermal hiperplazi oluşturmaksızın düzgün bir yara iyileşmesi sağladığı gösterildi (43). Park BS ve ark.’nın ADSC’lerin salgı fonksiyonlarını araştırmak için yaptıkları çalışmada ADSC’lerin platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), plasental büyüme faktörü (PIGF), temel fibroblast büyüme faktörü (basic FGF), keratinosit büyüme faktörü (KGF), farklılaştırıcı büyüme faktörü (TGF B1-B2), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), kollajen ve fibronektin

salgıladıkları gösterildi (44). Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin yağ doku, kemik, kıkırdak, iskelet kası, kalp kası, nöral hücre, hemopoetik hücre, endotel hücresi, epitel hücre ve hepatosite farklılaşabildiği in-vivo ve in-vitro deneylerle gösterildi (19,45). Yağ doku kaynaklı kök hücreler anjiogenik ve antiapoptotik büyüme faktörleri salgılamakta ve bu salgıları hipoksik ortamda daha da fazla olmaktadır. Yağ doku kaynaklı kök hücreler aynı zamanda progenitör hücrelerin endotel hücrelerine farklılaşmasını arttırmaktadır (6). Yara iyileşmesinde dokuları yeniden yapılandırılabilmesi için yeni oluşan damarlar aracılığıyla oksijen ve besin maddelerinin taşınması gereklidir. Damar endoteli büyüme faktörü iyileşmekte olan yarada damarlanmanın temel düzenleyicilerindendir (46). Lu F ve ark. tarafından yapılan çalışmada random patern deri fleplerine lokal olarak ADSC uygulandı ve kan akımında ve flep vitalitesinde belirgin artış olduğu gözlemlendi. Bu artışın hem ADSC'lerin direk olarak endotel hücrelere farklılaşmasına hem de indirek olarak salgıladıkları anjiogenik büyüme faktörlerine bağlı olduğu sonucuna varıldı (47). İskemik dokuların yeniden damarlanması ve fonksiyonlarının tekrar kazanılmasında mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici potansiyelleri ile ilgili kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Uysal CA ve ark. tarafından yapılan çalışmada ADSC'lerin iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği gösterildi (48). Ebrahimian TG ve ark. tarafından yapılan çalışmada yaralara lokal olarak ADSC uygulandı. Yeşil floresan protein ile işaretli ADSC'lerin dermal ve epidermal dokulara yerleştiği ve epidermal marker olan K5 ve K14 sentezlediği gösterildi(8). Rigotti ve ark. tarafından radyonekrozlu dokulara lipoaspirat verildiğinde dokuların yenilendiği ve semptomların düzeldiği gösterildi (49).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSU-10-2991 kodlu proje ile desteklendi. Hayvan çalışması Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığının 10.03.2010 tarih ve 10/29 sayılı izni ile yapıldı.

3.1 Denekler

Çalışmada ortalama ağırlıkları 297,05gr olan(187-380gr arası) 20 adet Wistar – Albino tipi sıçan kullanıldı. Hayvanlar pleksiglas kafeslerde muhafaza edildi ve her kafese en fazla 3 hayvan konularak bakımları yapıldı. Hayvanlar penceresiz odalarda sıcaklık (22 ± 2 °C) ve ışık (07.00-21.00 arasında 14 saat aydınlık ve 21.00-07.00 arasında 10 saat karanlık periyodu) ortamında takibi yapılarak tutuldu. Tüm sıçanlar deney öncesi ve deney süresince standart laboratuvar yemi ile beslendiler.

Sıçanların inguinal bölge deri altı yağ dokularında kök hücre bulunduğu ve bu hücrelerin farklı uyarılarla osteosit, kondrosit, düz kas hücresi, nöral hücre vs. dönüşebildiği bilinmektedir (50). Sıçanların hepsinin inguinal yağ dokuları çıkarıldı ve bu yağ dokuları ayrıştırılarak stromal vasküler fraksiyon elde edildi. Sıçanların sırtında derin 2.derece yanık oluşturuldu. Sıçanlar rasgele olarak seçilerek kontrol (n:10) ve deney grubuna (n:10) ayrıldı.

Kontrol Grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanların yanık alanlarına intradermal olarak yaklaşık 1 cc serum fizyolojik insülin enjektörü ile 6 ayrı noktadan enjekte edildi.

Deney Grubu (n=10): Bu gruptaki sıçanların yanık alanlarına intradermal olarak yaklaşık 1 cc SVF insülin enjektörü ile 6 ayrı noktadan enjekte edildi.

3.2 Anestezi ve Analjezi

Sıçanların inguinal yağ dokuları çıkarılırken, yanık oluşturulurken ve doku örnekleri alınırken intraperitoneal olarak ketamine hidrokloride (Ketalar , Pfizer-İstanbul) (50 mg/kg) ve xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer-İstanbul) (5 mg/kg) verilerek anestezi sağlandı. Cerrahi işlem ve yanık oluşturulmasından sonraki 5 gün içme sularına parasetamol 2mg/ml(Calpol, Glaxo Smith Kline- İstanbul) katılarak analjezi sağlandı (51).

3.3 Stromal Vasküler Fraksiyonun Hazırlanması

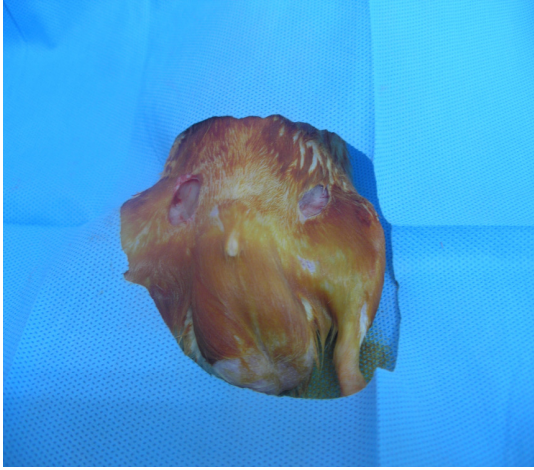
Anestezi altındaki sıçanların inguinal bölgeleri traşlandı(Şekil 6) steril %10 povidon iyot (İsosol, merkez Laboratuar- İstanbul) ile temizlendi (Şekil 7). Her iki inguinal krize paralel olarak yapılan insizyon ile girilerek inguinal yağ yastıkçıklarından 2 adet 1x1x1 cm (1 cm³) büyüklüğünde yağ dokusu eksize edildi (Şekil 8). İnsizyon alanları 3/0 İpek ile dikildi (Şekil 9).



Şekil 6: İnguinal bölgesi traşlanmış sıçan



Şekil 7: Povidon iyot ile temizlik

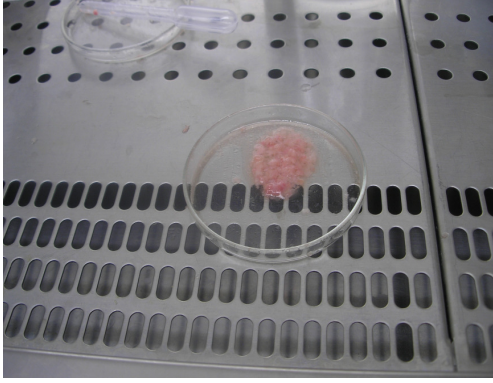


Şekil 8:İnguinal insizyon

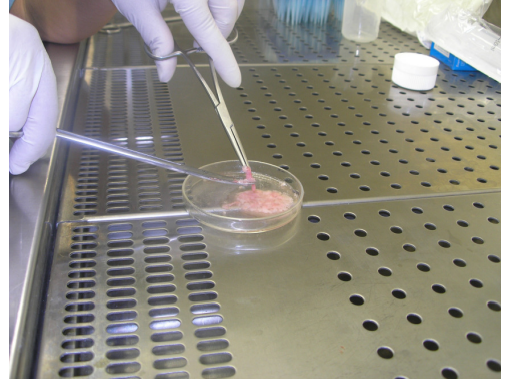


Şekil 9: İnguinal insizyonun kapatılması

Çıkarılan yağ dokuları birkaç kez fosfat buffer solüsyonu ile yıkandı (Şekil 10). İnce doku makası ile küçük parçalara bölündü (Şekil 11). Dokular %0.1 kollajenazla (Collagenase from *Clostridium histolyticum* C0130 , Sigma, İstanbul) muamele edilerek yavaş çalkalamalı su banyosunda 37 °C de 60 dakika bekletildi (Şekil 12,13,14) Fosfat buffer solüsyonla (PBS, Sigma, İstanbul) seyreltilerek kollajenaz uzaklaştırıldı.



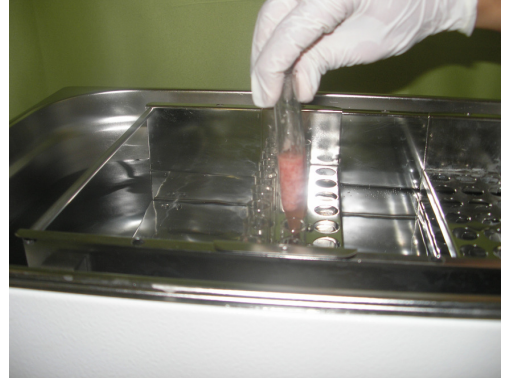
Şekil 10: Çıkarılan inguinal yağ dokusu parçalanması



Şekil 11: Yağların ince doku makası ile parçalanması



Şekil12: Çalkalamalı su banyosu koyma

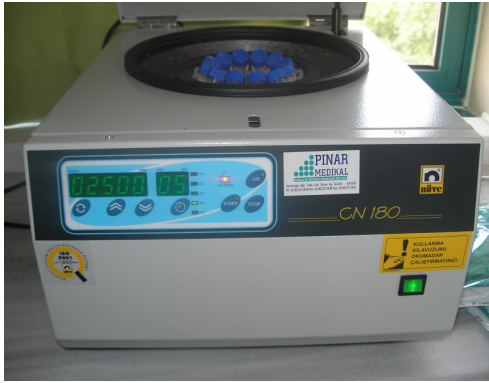


Şekil 13: Çalkalamalı su banyosuna

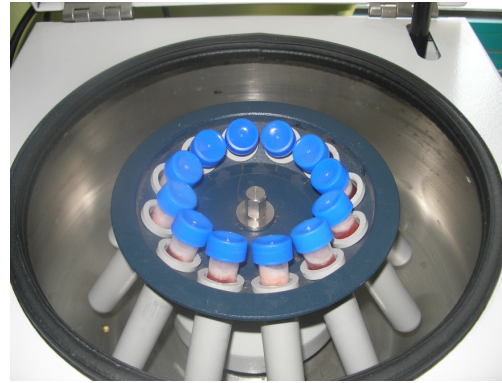


Şekil 14 : Çalkalamalı su banyosundaki tüpler

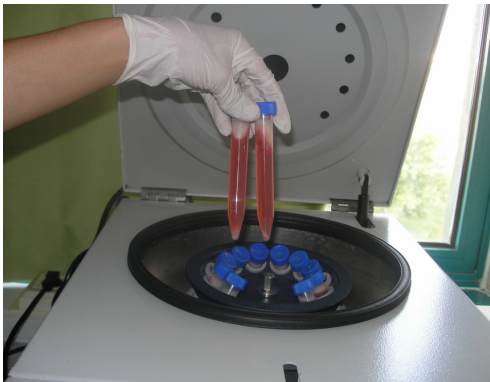
Hücre süspansiyonu 1,300 rpm (260 G) de iki kez beşer dakika santrifüj edildi (Şekil 15,16,17). Üstte matür adipositlerden oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Dibe çöken pellet kısım filtreden süzülerek ‘stromal vasküler fraksiyon’ olarak kullanıldı (Şekil 18) (45,50).



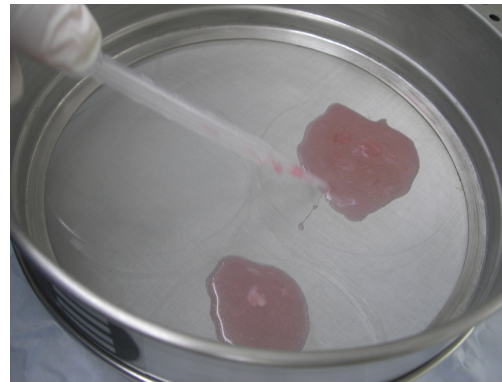
Şekil 15: Santrifüj aleti



Şekil 16: Santrifüje konan tüpler



Şekil 17: Santrifüj edilmiş süspansiyon



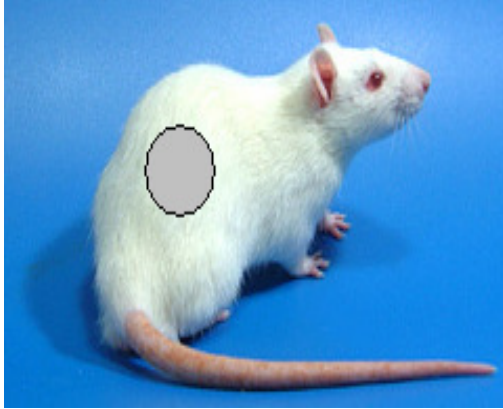
Şekil 18: Süzme işlemi

SVF hazırlanırken tüm ratlardan toplanan yağ dokuları birlikte işleme alındı. Yağ doku kaynaklı kök hücreler non-immünojenik profile sahip olduklarından dolayı allojenik kullanımları mümkündür (52).

Elde ettiğimiz stromal vasküler fraksiyon içerisindeki canlı hücrelerin sayımı için 100 mikro litre (μ l) SVF eppendorf tüpüne kondu, üzerine 100 mikro litre (μ l) Trypan Blue ilave edilerek pipetaj yapıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine kondu ve lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesinin üzerine lamel kapatıldı. Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında lamelin lam ile birleştiği noktaya pipetin ucunu dayayarak tam orta noktasından yavaşça hücre solusyonu sayım alanına pipetlendi (hazırladığımız süspansiyondan 50 μ l alarak). Daha sonra thoma lamı mikroskobun tablasına yerleştirildi. Hücreler tek tek sayılarak not edildi (53). Yaklaşık olarak 4×10^6 /ml canlı hücre tespit edildi.

3.4 Yanık Oluşturulması

Ratların sırtı traşlandı. Ağız açıklığı yaklaşık 7 cm² olan pet şişeye 70°C sıcak su dolduruldu. Bu şişe sıçanın sırtında ters çevrilerek kenarlardan sızdırılmadan 30 sn süreyle sıçanın sırtına temas ettirildi (Şekil 19,20) (54). Daha önce yapılan pilot çalışmada bu sıcaklık ve sürede derin 2.derece yanık elde edildiği görülmüştü.



Şekil 19: Yanık oluşturulan alan



Şekil 20: Yanık oluşturulması

Yanık alanı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$SA = k \times W^{2/3}$$

(SA: Yüzey alanı, k sabiti: 9,46, W: ağırlık)

Bu f rm le göre hesaplandığında sıçanların vücut alanının yaklaşık %2 lik kısmının yanmış olduğu görüldü. Yanık alanının takibinde seri biyopsiler alınacağı için en az bu büyüklükte bir yanık alanına ihtiyaç vardı. Daha geniş bir yanıkta sıvı canlandırma protokolüne ihtiyaç olacağı ve ayrıca daha fazla sistemik enflamatuar yanıt oluşacağı için daha büyük bir yanık oluşturulmadı.

3.5 Doku  rneklerinin Alınması

Sıçanların yanık alanlarından anestezi altında 3, 7, 10. ve 14. günlerde yaklaşık 5x10mm boyutunda insizyonel biyopsiler alındı.    nc  gün enflamasyonun en yoğun olacağı gün olarak düşünüldüğü için biyopsi almaya bu günde başlandı. Yedinci gün enflamasyonun seyri ve hücre çoğalmasının başlayıp başlamad ğının belirlenmesi için tercih edildi. Onuncu gün enflamasyonun takibi, hücre çoğalmasının değerlendirilmesi ve damarlanmanın başlayıp başlamad ğının tespiti için biyopsi alındı. Ondördüncü gün ise hem önceki olayların takibi hem de doku yenilenmesinin gerçekleşip gerçekleşmediğinin gözlenmesi için biyopsiler alındı. Alınan doku örnekleri % 10'luk formol solüsyonuna konuldu.

3.6 Değerlendirme

3.6.1 Histopatolojik Değerlendirme Yöntemi

Yüzde onluk formol içinde saklanan deri örnekleri histopatolojik takibe alındı. Parafin bloklara gömülen örneklerden beş mikron kalınlığında kesitler alınarak hemotoksilen-eozin boyası ile boyandı. Boyanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Tüm histopatolojik değerlendirmelerde bakılan preparatın hangi gruba ait olduğu patolog tarafından bilinmemekteydi. Histopatolojik incelemede enflamatuar hücre yoğunluğu (nötrofiller, monositler, lenfositler vs.), damarlanma, fibroblastik hücre yoğunluğu değerlendirildi (56).

Yoğunluğu hiç tespit edilmeyenler (0), zayıf olarak tespit edilenler (1), orta derecede tespit edilenler (2) ve güçlü olarak tespit edilenler (3) olarak skorlandı.

3.6.2 İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Damar endotel büyüme faktörü ve çoğalan hücre çekirdek antijeni belirlenmesi için immünohistokimyasal boyama kullanıldı. Belirlenen günlerde alınan biyopsiler %10'luk formaldehit solüsyonunda tesbit edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra sırayla %60, 70, 80, 90 ve 100'lük etanol solüsyonlarından geçirilerek dehidrate edildi. 90 dk ksilol solüsyonunda bekletildi ve 60°C'de parafine yerleştirildi. Beş mikron kalınlığında kesitler lizin kaplı lamlara alındı. Etüvde 60°C de bir saat bekletilerek parafin eritildi. Etüvden çıkarılan lamalar 15 dk ksilol dolu kapta bekletildi. Sırasıyla %99'luk, %96'lık ve %70'lik alkol solüsyonlarında beşer dakika bekletildi. Preparatlar alkol solüsyonlarından sonra distile suda 5 dk bekletildi. %10'luk etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, Thermoscientific/Lab Vision, Germany) I solüsyonuna konulan camlar mikrodalga fırında %50 güçle 20 dk tutuldu. Endojen hidrojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için dokuların üzerine %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı ve 10 dk inkübe edildi. Camlar distile suya alınarak 5 dakika yıkandı. Camlar fosfat buffer solüsyonda (PBS, Thermoscientific/Lab Vision, Germany) 10 dk bekletildi. Damar endoteli büyüme faktörü antikoru ile boyanacak camlara 1/25 oranında seyreltilmiş VEGF antikor (VEGF Ab-1, Thermoscientific/Lab Vision, Germany) damlatılarak 20 saat inkübe edildi. PCNA (PCNA Ab-1, Thermoscientific/Lab Vision, Germany) antikor ile boyanacak camlara 1/100 oranında dilue edilmiş antikor damlatılarak 2 saat inkübe edildi. Antijen antikor bağlanmasını göstermek için camlara biotinylated anti-rabbit antikor damlatılarak 10dk bekletildi, PBS içinde 10 dk yıkandı, streptavidin ABC-HRP damlatılarak 10 dk bekletildi, 10 dk PBS ile yıkandı, diaminobenzidin (DAP) kromojen damlatılarak 10 dk bekletildi, distile su ile 10 dk yıkandı. Zıt boyama işlemi için Mayer hematoksilen damlatılarak 2 dk beklendi, distile suda 2 kez beşer dk yıkandı. Dokular sırasıyla %70'lik, %96'lık ve %99'luk alkol solüsyonlarında beşer dakika ve ksilol solüsyonunda 15 dk bekletildi. Lamaların üzerine balsam damlatılarak lamel ile kapatıldı (57).

3.6.3 PCNA İndeksi Değerlendirmesi

PCNA, replikasyon ve onarım mekanizmaları esnasında nükleik asit metabolizmasında rol alan protein yapıdır (58). Çoğalan hücre nükleer antijen antikoru ile işaretlenen doku kesitlerinde hücrelerde nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Hücre proliferasyonu maximum boyanma gösteren alanlardaki

hücrelerin sayılması ile skorlandı. Büyük büyütme sahasında (X400) pozitif ve negatif boyanan hücreler sayıldı. Her preparatta 100 hücre sayılıp pozitif boyanan hücrelerin sayısı PCNA indeksi olarak belirlendi (57).

3.6.4 VEGF Ekspresyon Skoru değerlendirmesi

Kesitlerde, VEGF ekspresyonu, hücrelerin boyanma yoğunlukları ve pozitif boyanan hücrelerin oranına göre skorlandı (59). Skorlama şu şekilde yapıldı;

Tablo 2. VEGF ekspresyonun skorlanması

Parametre	Skor
(a) Boyanma Şiddeti	
Zayıf	1
Orta	2
Kuvvetli	3
(b) Pozitif hücrelerin oranı	
< 1/3 yanık alanı	1
1/3-2/3 yanık alanı	2
> 2/3 yanık alanı	3
(a) ve (b) skorları toplamı değerlendirmeye alındı	

3.6.5 İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmanın istatistik analizleri SPSS 15.0 ve Sigmatat 3,5 paket programlarıyla %95 güven seviyesinde yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Bağımsız ikili grup karşılaştırmasında Mann-Whitney U testinden faydalanıldı. Bağımlı değişkenlerin karşılaştırılmasında ‘ Tekrarlı ölçümlerde varyans analizi’ ve Freidman analizinden faydalanıldı. $P < 0,05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

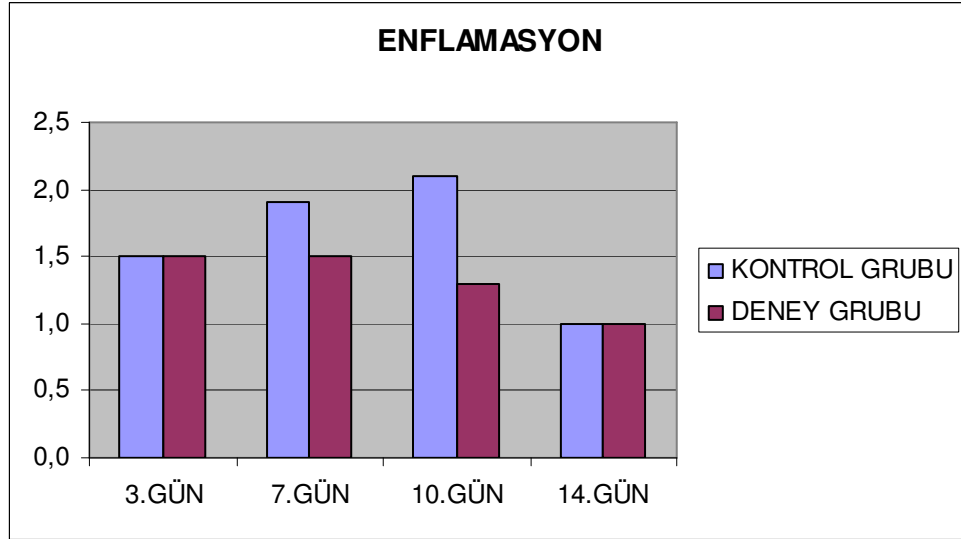
4. BULGULAR

4.1 Histopatolojik bulgular

Histopatolojik incelemede alınan doku örneklerinin iyileşme sürecini takip etmek için enflamasyon, damarlanma ve fibroblastik aktivite değerlendirildi. Her bir parametre için kontrol ve tedavi grupları karşılaştırıldı.

4.1.1 Enflamasyon

İncelenen doku örneklerinde 3 gündeki enflamasyon düzeyi her iki grupta hemen hemen eşit olarak gözlemlendi. Yedinci gün enflamasyon düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ancak kontrol grubunda artma eğilimi gözlenirken deney grubunda azalma eğiliminde olduğu görüldü. Onuncu günde kontrol grubunda enflamasyon belirgin olarak artarken deney grubunda düşük seviyelerde idi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ondördüncü günde kontrol grubu enflamasyon düzeyi azalarak deney grubu ile aynı seviyelere ulaştı.



Şekil 21: Histopatolojik olarak gözlenen enflamasyon düzeyleri

Enflamasyonun düzeylerinin günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında;

Kontrol grubunda enflamasyon düzeyleri 3. günden itibaren 10. güne kadar artış eğiliminde seyretti ancak bu günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. Onuncu günden sonra istatistiksel olarak anlamlı düşüş oldu.

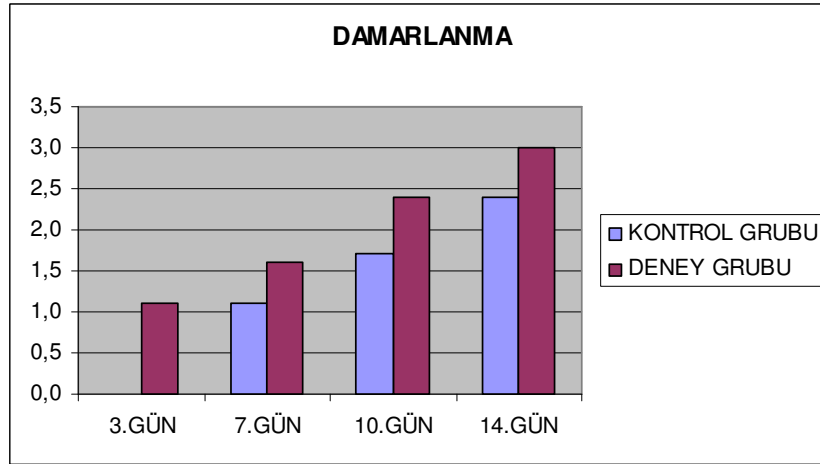
Deney grubunda enflamasyon düzeyinin en yüksek olduğu günler 3. gün ve 7. gün idi. Yedinci günden sonra enflamasyon gerilemeye başladı. İstatistiksel olarak günler arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 3: Kontrol ve deney grubu enflamasyon düzeylerinin karşılaştırması

	3. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ $Ort(\%25 p - \%75 p)$	7. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ $Ort(\%25 p - \%75 p)$	10. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ $Ort(\%25 p - \%75 p)$	14. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ $Ort(\%25 p - \%75 p)$
Kontrol Grubu	1.50±0.84 1.00(1.00-2.25)	1.90±0.73 2.00(1.00-2.25)	2.10±0.73 2.00(1.75-3.00)	1.00±0.47 1.00(1.00-1.00)
Tedavi Grubu	1.50±0.70 1.00(1.00-2.00)	1.50±0.52 1.50(1.00-2.00)	1.30±0.48 1.00(1.00-2.00)	1.00±0.00 1.00(1.00-1.00)
P	P>0,05 (p=0.82)	P>0,05 (p=0.21)	P<0,05 (p=0.02)	P>0,05 (p=1.00)

4.1.2 Damarlanma

Histopatolojik olarak damarlanmanın değerlendirilmesinde kontrol grubu ile deney grubu arasında 3.gün, 10.gün ve 14.gün anlamlı farklılık tespit edildi. Ancak 7.gün de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Damarlanma kontrol grubunda 7. günden sonra ortaya çıkarken, deney grubunda 3. günden sonra ortaya çıkmaktadır ve daha yüksek seviyelerde seyretmektedir.



Şekil 22 : Kontrol ve deney grubu damarlanma düzeyleri

Damarlanmanın günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında;

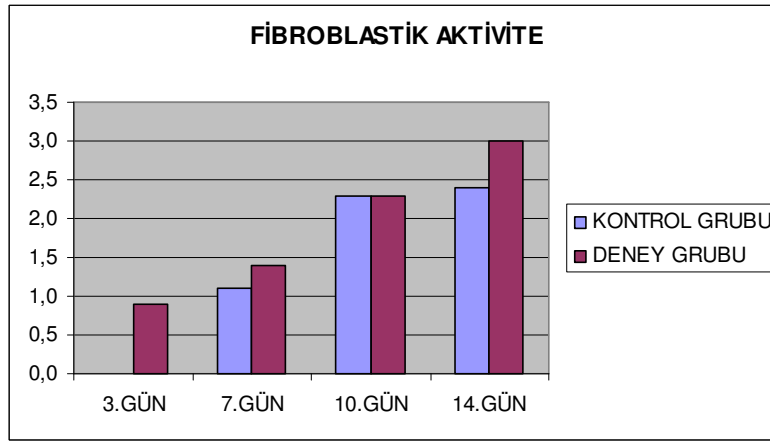
Kontrol grubunda ve deney grubunda tüm günler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü.

Tablo 4: Kontrol ve deney grubu damarlanma düzeylerinin karşılaştırması

	3. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	7. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	10. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	14. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>
Kontrol Grubu	Tüm değerler sıfır	1.10±0.73 1.00(0.75-2.00)	1.70±0.67 2.00(1.00-2.00)	2.40±0.70 2.50(2.00-3.00)
Deney Grubu	1.1±0.73 1.00(0.75-2.00)	1.60±0.52 2.00(1.00-2.00)	2.40±0.52 2.00(2.00-3.00)	3.00±0 3.00(3.00-3.00)
P	P<0,05 (p=0.02)	P>0,05 (p=1.12)	P<0,05 (p=0.02)	P<0,05 (p=0.01)

4.1.3 Fibroblastik aktivite

Histopatolojik olarak fibroblastik aktivitenin değerlendirilmesinde gruplar arasında 3.gün ve 14.gün anlamlı fark bulunurken, 7.gün ve 10.gün anlamlı bir fark tespit edilmedi. Fibroblastik aktivite deney grubunda 3. gün başlarken kontrol grubunda aynı gün hiç bir aktivite gözlenmedi. Yedinci gün kontrol grubunda fibroblastik aktivitenin başlamış olduğu gözlenirken deney grubunda artarak devam etti. Onuncu günde her iki grubunda fibroblastik aktiviteleri eşit olarak gözlemlendi. Ondördüncü gün kontrol grubunda hafif bir artış izlenirken deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü.



Şekil 23: Kontrol ve deney grubu fibroblastik aktivite düzeyleri

Fibroblastik aktivitenin günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında;

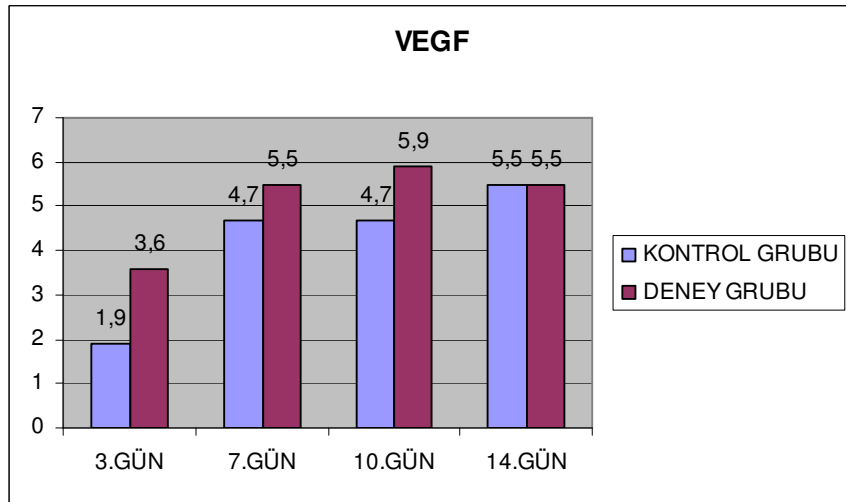
Kontrol grubunda 3, 7. ve 10. günler arasında fark varken, 14.gün de fark olmadığı görüldü. Deney grubunda tüm günler arasında farklılık olduğu görüldü.

Tablo 5: Kontrol ve deney grubu fibroblastik aktivite düzeylerinin karşılaştırması

	3. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	7. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	10. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	14. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>
Kontrol Grubu	Tüm değerler sıfır	1.10±0.57 1.00(1.00-1.25)	2.30±0.94 3.00(1.00-3.00)	2.40±0.84 3.00(1.75-3.00)
Deney Grubu	0.90±0.57 1.00(1.00-1.00)	1.40±0.52 1.00(1.00-2.00)	2.30±0.48 2.00(2.00-3.00)	3.00±0 3.00(3.00-3.00)
P	P<0,05 (p=0.00)	P>0,05 (p=0.24)	P>0,05 (p=0.71)	P<0,05 (p=0.03)

4.2 VEGF Ekspresyon skoru

Biyopsi alınan her gün için deney ve kontrol grubu verileri birbiri ile kıyaslandı. Kontrol ve deney grubu VEGF değerlerinin karşılaştırmasında 3.gün ve 10. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Deney grubunda 3. gün VEGF ekspresyon skoru kontrol grubunun neredeyse 2 katı seviyede idi. Onuncu güne kadar VEGF ekspresyon skoru deney grubunda daha yüksek seviyelerde devam etti. Ondördüncü gün her iki grubunda VEGF ekspresyon skoru düzeylerinin eşitlenmiş olduğu görüldü.



Şekil 24: Kontrol ve deney grubu VEGF ekspresyon skoru

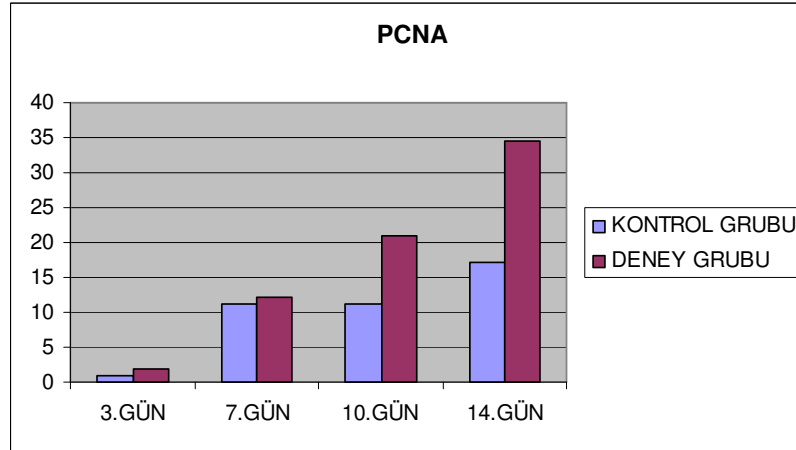
VEGF ekspresyon skorunun günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında hem kontrol grubunda hem deney grubunda 3. gün ile diğer günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü.

Tablo 6: Kontrol ve deney grubu VEGF değerlerinin karşılaştırması

	3. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort (%25 p – %75 p)</i>	7.GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort (%25 p – %75 p)</i>	10. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort (%25 p – %75 p)</i>	14. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort (%25 p – %75 p)</i>
Kontrol Grubu	1.90±1.60 2.00 (.00-3.0)	4.70±1.15 5.00(3.50-5.00)	4.70±.82 4.50(4.00-5.25)	5.50±.71 6.00(5.00-6.00)
Deney Grubu	4.00±1.25 4.00(3.50-5.00)	5.50±.71 6.00(6.00-6.00)	5.90±.32 6.00(6.00-6.00)	5.50±.53 5.50(5.00-6.00)
P	P<0,05 (p=0.009)	P>0,05 (p=0.098)	P<0,05 (p=0.003)	P>0,005 (p=0,830)

4.3 PCNA indeksi

Kontrol ve deney grubu PCNA Değerlerinin karşılaştırmasında 3, 10. ve 14. günlerde istatistiksel anlamlı bir fark olduğu görüldü. Her iki grupta da PCNA indeksinin 7. günde belirgin olarak yüksek olduğu görüldü. Onuncu günde ve 14. günde kontrol grubu ile deney grubu arasında belirgin bir farklılık vardı. Özellikle 14. günde deney grubu PCNA indeksinin belirgin derecede artmış olduğu görüldü.



Şekil 25: Kontrol ve deney grubu PCNA indeksi

PCNA değerlerinin günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında;

Kontrol grubunda 3. gün ile diğer günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Diğer günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi. Deney grubunda ise tüm günler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı.

Tablo 7: Kontrol ve deney grubu PCNA indeksi karşılaştırması

	3. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	7.GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	10. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>	14. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p – %75 p)</i>
Kontrol Grubu	1.00±0.00 1.00(1.00-1.00)	11.20±7.80 10.00(3.75-7.50)	11.10±10.90 11.00(1.00-5.75)	17.20±8.33 15.50(10.75-20.50)
Deney Grubu	1.80±1.13 1.00(1.00-3.00)	12.10±4.95 11.50(7.00-16.50)	21.00±10.24 20.00(16.00-24.50)	34.60±9.74 35.00(25.75-41.25)
P	P<0,05 (p=0.03)	P>0,05 (p=0.67)	P<0,05 (p=0.05)	P<0,05 (p=0.002)

5. TARTIŞMA

Yanık tedavisi Plastik Cerrahinin temel konuları arasındadır. Yanıklar birçok nedene bağlı meydana gelse de alev ve sıcak sıvılar günümüzde en sık görülen yanık sebepleridir (1). Bu nedenle çalışmamızda sıcak su ile oluşturulan yanık modeli kullanıldı. Sıcak sıvılarla oluşan yanıkta, yanık derinliği sıvının ısısına, yoğunluğuna, temas süresine, etkilenen bölgedeki deri kalınlığına, hastanın yaşına vs. bağlı olarak değişebilir. Sıcak sıvılar ve yağlar genellikle derin 2.derece ve hatta 3.derece yanıklara neden olmaktadır. Derin 2.derece yanıkların spontan iyileşme süreci 3-8 haftadır Normal deri bariyerinin kaybıyla yanığa bağlı komplikasyonlar gelişmeye başlar. Bunlar enfeksiyon, sıvı kaybı, ısı kaybı, insanlar arası iletişimi sağlayan görünüm ve dokunma gibi duyu kayıplarıdır. Geç dönemde ise fonksiyon kısıtlılığı yapabilen büzülmeler, çekilmeler ve skarlar görülebilir.(29). İkinci derece yanıklarda tedavi sürecini kısaltmak ve komplikasyonları azaltmak için nekrotik dokuların erken tanjansiyel eksizyonu ve greft ile deri bariyerinin oluşturulması günümüzde en geçerli tedavi metotudur (15,27,30). Derin 2.derece yanıkların spontan epitelizasyonunu hızlandıracak, doku elemanlarının yenilenmesini sağlayacak etkili ve ekonomik bir tedavi seçeneği henüz yoktur.

Rejeneratif tıp, hasarlı dokuların yenilenmesinde vücudun kendi kök hücrelerinin ve büyüme faktörlerinin kullanılması esasına dayanan alternatif bir tedavi stratejisi oluşturmaktadır (4,6,8,9,20,44,53). Yağ dokusu, hücreler arası bağları yıkılıp santrüfuj edildiğinde fraksiyonlarına ayrılmaktadır (3). Hücreden zengin stromal

vasküler fraksiyon kısmının rejeneratif tedavide kullanılabilirliği ve faydalarını araştırmaya yönelik çalışmalar son yıllarda hız kazandı. Plastik cerrahi ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda stromal vasküler fraksiyonun ve içerisinde yer alan kök hücrelerin; yara iyileşmesinde (4), kırışıklıkların azaltılmasında (4,10), damarlanmanın artırılmasında ve iskeminin azaltılmasında (5), hücrelerin oksidatif hasardan korunmasında (7), flep canlılığının artırılmasında (47), iskemi-reperfüzyon hasarının azaltılmasında (48), radyonekrozlu dokuların iyileşmesinde (49), dokulara kök hücre desteği sağlamada (53) ve yağ grefti yaşamını arttırmada (60) olumlu etkileri olduğu görüldü. Çalışmamız SVF'nun yanık yarasındaki etkilerinin araştırılması için planlandı. Stromal vasküler fraksiyonun bilinen etkileri ışığında yanık iyileşmesini olumlu yönde etkileyeceği düşünüldü.

Kolay elde edilebilen cilt altı yağ dokusu stromal hücrelerinin güçlü anjiogenik ve antiapoptotik potansiyeli Rehman ve ark. larının yaptığı çalışmada gösterildi. Bu çalışmada SVF'nun GM-CSF, VEGF, HGF, bFGF ve TGF gibi büyüme faktörleri salgıladığı gösterildi. Hipoksik ortamın büyüme faktörleri üretimindeki etkisi araştırıldığında düşük oksijenli ortamda VEGF salınımının yaklaşık 5 kat artmış olduğu görüldü. Damarlanmanın artabilmesi için endotel hücrelerinin çoğalması ve canlı kalabilmesi gerekmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SVF'li kültür ortamının endotel hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı, bu artışın düşük oksijenli ortamda daha yüksek olduğu ve hücrelerin apoptoz oranlarının da düşük olduğu gözlemlendi. Stromal vasküler fraksiyon hücrelerinin canlı dokuda yaşayıp yaşamadığını anlamak için farelerde iskemik arka bacak modelinde çalışma yapıldı. Yeşil florasan işaretli SVF hücreleri farelerin bacaklarına enjekte edildi. 1 hafta sonra kesitler alındığında işaretli SVF hücrelerinin büyük kısmının canlı olduğu görüldü. Onuncu günün sonunda SVF uygulanan farelerde bacağın canlı olduğu, diğer grupta ise tamamen nekroze olduğu görüldü (4). Yanık yarasında damarlarda mikrotrombüsler oluşur. Ayrıca hasarlı dokudan ortama salınan toksik inflamasyon mediatörleri kapiller endotel hasarı oluşturmaktadır. Bunların sonucunda yanık yarasında hipoksik bir ortam oluşur (15). Hipoksik, yoğun inflamasyonun eşlik ettiği ve nekrotik dokuların bulunduğu bir ortamda damarlanma artışı ile hasarlı ve canlı hücrelerin beslenmesinin sağlanması, apoptozun azaltılması ve ortamda bulunan büyüme faktörlerinin artırılmasının derinin kendini yenilemesine olumlu katkı sağlayacağı düşünüldü. Yaptığımız çalışmada SVF uygulanan grupta damarlanmanın daha erken

başladığı ve daha yüksek seviyelerde seyrettiği görüldü. Bu bulgu daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu bulundu.

Dermal fibroblastlar hücreler arası matriks proteini, glikoproteinler, yapıştırıcı moleküller, bazı sitokinler ve kollajen sentezlerler. Ayrıca fibroblastlar keratinositlerle ve endotel hücreleri ile sürekli etkileşim halindedirler. Ultraviyole-B ışınları kollajen yıkımını arttırarak ciltte kırışıklıklara neden olur. Kim ve ark. tarafından yapılan çalışmada farelere ultraviyole-B ışınları uygulanarak kırışıklıklar oluşturuldu. Daha sonra cilt altına ADSC enjekte edildi. Deri kalınlığı ve kollajen miktarının arttığı, kırışıklıkların anlamlı düzeyde azaldığı, fibroblastların çoğaldığı ve fibroblastlardaki apoptotik hücre ölümünün azalmış olduğu görüldü (10). Bu bulguların yanıklı derinin yenilenmesinde faydalı olacağı muhakkaktır. Derin 2. derece yanıklarda dermisin derinlerinde canlı kalan fibroblastların korunması, çoğalmasının sağlanması, kollajen ve hücreler arası madde sentezlerinin artması ve deri kalınlığının arttırılması deri yenilenmesini hızlandıracaktır. Bizim çalışmamızda da fibroblastik aktivitenin SVF uygulanan grupta daha erken dönemde başladığı ve daha yüksek düzeylerde seyrettiği görüldü. Elde ettiğimiz veriler SVF'nun dermis hücrelerinin yenilenmesinde olumlu etkilerinin olduğunu gösterdi.

Yanık yaralanması staz zonundaki ve hiperemi zonundaki hücrelerde apoptozu uyarmaktadır (31,32). Apoptoza programlanmış hücrelerin kurtarılması doku hasarını azaltır. Stromal vasküler fraksiyonun anti-apoptotik etkinliği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (5). Bizim çalışmamızda direk olarak apoptozu değerlendirmeye yönelik bir veri yoktur bu nedenle SVF'nun yanık yarasındaki apoptoza olan etkisi net olarak ortaya konamamıştır ancak önceki çalışmaların verisi ışığında olumlu etkileri olduğu düşünülmektedir.

Stromal vasküler fraksiyon içerisinde kök hücrelerin yanı sıra endotel hücreleri ve perisitler de bulunmaktadır. Rubina ve ark. tarafından yapılan çalışmada SVF içerisinde bulunan perisitlerin endotel hücreleri ile direk etkileşime girerek oluşan yeni damarların stabilizasyonunu sağladığı görüldü. Aynı çalışmada önceki çalışmalara paralel olarak SVF hücrelerinin anjiogenik ve anti-apoptotik büyüme faktörleri salgıladığı, bu salgıların hipoksik ortamda belirgin düzeyde arttığı gösterildi (6). Yara iyileşmesinde oluşan yeni damarların stabilizasyonun sağlanması sağlıklı doku oluşumu için gereklidir. Yaptığımız çalışmada endotel hücreleri ve

perisitler direk olarak incelenmedi ancak SVF uygulanan grupta gözlenen damarlanma artışına katkı sağladıkları düşünülmektedir.

Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin antioksidan etkileri vardır ve dermal fibroblastları oksidatif hasardan korumaktadırlar. Kim ve ark. tarafından yapılan çalışmada fibroblastlar ADSC'ler ile birlikte kültüre edilerek süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzim düzeyleri ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ADSC'lerle birlikte kültüre edilen ortamlarda antioksidan enzim düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca ADSC'lerin fibroblastların canlı kalma oranını arttırdığı, oksidatif stresten koruduğu ve apoptoz oranını azalttığı gösterildi (7). Oksidatif hasar yanık yarasında da görülmektedir. Bu hasarın azaltılmasına yardımcı olan faktörler sayesinde dokudaki canlı hücreler korunabilir.

Yanık yarasında nekroz alanı çevresindeki doku hasarının çoğu yanıkla aktive olan toksik enflamasyon mediatörlerine bağlı gelişmektedir. Yara iyileşmesi için enflamasyon gereklidir ancak yanıkta oksidanlar ve proteazlar gibi enflamatuar mediatörlerin aşırı salınımı damar endoteli ve deri hücrelerinin hasarını artırır. Enflamasyon büyüme faktörlerinin de fonksiyonunu bozar. Enflamasyon esnasında ortamdaki oksijenin nötrofiller tarafından kullanılması doku hipoksisini artırır (15). Gonzales ve ark. tarafından yapılan çalışmada ADSC'lerin otoimmün yanıtı ve enflamasyonu azalttığı gösterildi. Lokal olarak enjekte edilen ADSC'ler çeşitli enflamatuar sitokin ve kemokinlerin sentezini azaltmakta aynı zamanda antienflamatuar sitokin olan interlökin-10'nun salınımını arttırmaktadır (9). Bizim çalışmamızda SVF'nun antienflamatuar etkinliğini gösteren bulgular elde edildi. Stromal vasküler fraksiyon uygulanan yanık yaralarında enflamasyonun üçüncü günden sonra artmadığı kontrol grubunda ise artışın onuncu güne kadar devam ettiği görüldü.

Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin yara iyileşmesindeki etkileri hem fizyolojik hem de patolojik yara modellerinde çalışıldı. Ebrahim ve ark. tarafından yapılan çalışmada radyasyon uygulanan ve uygulanmayan farelerde oluşturulan yara modellerinde SVF yara çevresine lokal olarak enjekte edildi. Oluşturulan açık yaraların çalışma grubunda, kontrol grubuna oranla daha kısa sürede kapandığı ve derinin daha elastik olduğu görüldü. Stromal vasküler fraksiyonun doku rejenerasyonundaki akibetini araştırmak için yeşil flüoresan işaretli stromal hücreler

yaraya uygulandı. Bunların bir kısmının keratinositlere dönüştüğü görüldü. ADSC'lerin yüksek oranda keratinosit büyüme faktörü salgıladığı ve damarlanmayı arttırdığı gözlemlendi (8). SVF 'nin yanık yarasında, fibroblastları ve damarlanmayı arttırdığı bizim yaptığımız çalışmada da gösterildi. Ancak bunun kök hücre farklılaşmasıyla mı oluştuğu yoksa kök hücrelerden salınan büyüme faktörlerine mi bağlı olarak ortaya çıktığı net değildir. Yeşil floresan işaretli SVF hücrelerin yanık yarasındaki akibeti ve kök hücrelerin hangi hücrelere farklılaştığının ortaya konması için ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

Yanık yarasının iyileşmesi esnasında dolaşımda yer alan kök hücrelerin buraya göç ettiği, çeşitli hücrelere farklılaştığı ve yeni oluşan dokunun yapısına katıldığı bilinmektedir (34). Yaptığımız çalışmada stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan kök hücreleri direk olarak dermise verdik. Bu hücrelerin parakrin etkiyle iyileşme esnasında gerekli hücre tiplerine farklılaştığı düşünülmektedir. Stromal vasküler fraksiyon içerisindeki ADSC'lerin hangi doku elemanlarına farklılaştığını ortaya koymak için ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

Yağ doku kaynaklı kök hücreler klinik olarak kolay elde edilebilen zengin bir otogreft kaynağıdır. Yağ doku kişinin kendisinden elde edildiği için immün reaksiyon oluşması beklenmez ve etik bir sorun oluşturmaz (41). Derin 2. derece yanıkların tedavisinde altın standart otolog deri grefti uygulamasıdır. Ancak geniş yanıklarda deri grefti almak için yeterli alan bulunamamaktadır. SVF nun yağ emme yöntemiyle elde edilmesi kolay ve morbiditeyi çok fazla arttırmayan bir yöntemdir. 2. Derece derin yanıklarda deri grefti uygulanmadan önce yanık alanlarına intradermal olarak SVF uygulanması doku onarımını hızlandırabilir ve greftlenmesi gereken alanı azaltabilir.

Saflaştırılmış yağ doku kaynaklı kök hücrelerinin etkinliği heterojen hücre karışımından oluşan SVF ile karşılaştırıldığında in-vitro farklılaşma potansiyeli daha fazladır (53). Ancak SVF den ADSC izolasyonunda daha fazla teknik ekipmana ihtiyaç duyulmakta, daha uzun zaman gerektirmekte ve tedavi maliyetini yükseltmektedir. Yanık gibi acil müdahale gerektiren yaralanmalarda taze elde edilen SVF kullanılması daha uygun olacaktır.

Geniş yanıklarda greft alınabilecek sağlam deri miktarı ciddi oranda azalır. Nekrotik yanık alanları uzaklaştırıldıktan sonra oluşan defektlerden sıvı kaybı devam eder

ayrıca bu alanlarda derinin koruyucu özelliği ortadan kalktığı için enfeksiyon gelişimi sıktır. Erken dönemde stromal vasküler fraksiyon uygulanarak hasarlı hücreler kurtarılabilir ve ölü dokuların yeniden yapılandırılması sağlanabilir. Böylece hem uzaklaştırılması gereken doku miktarı azaltılır hem de greftlenmesi gereken alan küçültülmüş olur.

Yanık yarasının iyileşmesinde epitelizasyon elbetteki çok önemlidir. Ancak sadece epitel oluşumu ile değil, doku elemanlarının yenilenmesi ile oluşan iyileşme çok daha önemlidir. Zira rejenerasyon ile derinin yerine getireceği fonksiyonları artacak, skar dokusu oluşumu ve buna bağlı olarak ortaya çıkan olumsuzluklar azalacaktır. Çalışmamızda SVF'un yanık yarasında damarlanmayı, fibroblastik aktiviteyi ve hücre çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir. Bunların tümü göz önüne alındığında rejenerasyonun olumlu yönde etkilendiği görülmektedir.

Bizim çalışmamızda yara iyileşmesi 14. güne kadar değerlendirilmiştir. 14. günde yapılan epitelizasyon değerlendirmesinde hem deney grubunda hem kontrol grubunda yeterli düzeyde epitel oluşmadığı görülmüştür. Epitel oluşumunun değerlendirilmesi için daha uzun süreli takiplere ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Stromal vasküler fraksiyon yanık yarasındaki yoğun enflamasyonun kontrol altına alınmasında etkilidir. Stromal vasküler fraksiyon enflamasyonun artmasını engellemekte ve daha erken dönemde kontrol altına alınmasını sağlamaktadır. Günlere göre dağılımına bakıldığında enflamasyon kontrol grubunda 10. güne kadar yükselmekte sonra düşüş göstermektedir. Deney grubunda ise enflamasyon 3. günden sonra artış göstermemekte ve 7. günden sonra düşmeye başlamaktadır.

Stromal vasküler fraksiyon damarlanmanın daha erken başlamasını sağlamak ve daha yüksek düzeylerde devam ettirmektedir. Histopatolojik olarak damarlanmanın değerlendirilmesinde gruplar arasında 3.gün, 10.gün ve 14.gün anlamlı farklılık tespit edildi. Ancak 7.gün de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. . Damarlanma deney grubunda 3. günden sonra ortaya çıkarken, kontrol grubunda 7. günden gözlenmektedir ve deney grubunda daha yüksek seviyelerde seyretmektedir.

Stromal vasküler fraksiyon fibroblastik aktiviteyi daha erken dönemde başlatmakta daha yüksek seviyelerde devam ettirmektedir. Histopatolojik olarak fibroblastik aktivitenin değerlendirilmesinde gruplar arasında 3.gün ve 14.gün anlamlı fark varken, 7.gün ve 10.gün anlamlı bir fark tespit edilmedi. Fibroblastik aktivite deney grubunda 3. günde gözlenmeye başlarken kontrol grubunda 7. günden sonra ortaya çıkmaktadır. Ondördüncü gün ise deney grubunda fibroblastik aktivite kontrol grubuna göre yüksek olarak gözlenmektedir.

Stromal vasküler fraksiyon, VEGF salınımını attırmaktadır. Deney grubunda VEGF salınımı daha erken dönemde yükselmekte ve 10. güne kadar daha yüksek düzeylerde devam etmektedir. Deney grubunda 3. günde VEGF antikor salınımı artarken, kontrol grubunda 7. günden sonra artış olduğu görüldü.

SVF uygulanan grupta PCNA indexi daha erken dönemde artmakta ve daha yüksek düzeylerde seyretmektedir. Deney grubunda PCNA indexinin 3. günden itibaren yüksek olduğu görüldü. Kontrol grubunda bu yükselme 7. günden sonra oldu. Onuncu ve 14. günlerde de deney grubunda PCNA indexi kontrol grubuna göre daha yüksek idi.

Bu bulgular ışığında SVF'nun yanık yarası rejenerasyonunda olumlu etkileri olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Herndon DN. Total Burn Care (3rd ed), Saunders Elsevier, Texas, 2007,pp.120-124.
2. Mathes SJ. Plastic Surgery (2nd ed). Saunders Elsevier, California, 2006,Vol.1, p. 815-816
3. Ailhaud G, Grimaldi P, Négrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr.* 1992;12:207-33.
4. Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007;48(1):15-24.
5. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004;109(10):1292-8.
6. Rubina K, Kalinina N, Efimenko A, et al. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Eng art A.* 2009;15(8):2039-50.
7. Kim WS, Park BS, Kim HK, et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci.* 2008;49(2):133-42.
8. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et al. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):503-10.
9. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1006-19.
10. Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *J Dermatol Sci.* 2009;53(2):96-102.

11. Baro RE, Herndon DN. Total Burn Care. In: Herndon DN (Edt) History of treatment of burns (3rd ed) Saunders Elsevier, Texas, 2007,pp.1-6.
12. Pigeon J. Treatment of second-degree burns with amniotic membranes. Can Med Assoc J. 1960;83:844-5.
13. Whitaker AJ. Treatment of First and Second Degree Burns. J Coll Gen Pract.1962;5(2):325-8.
14. Janzekovic Z. Early surgical treatment of the burned surface. Panminerva Med. 1972;14(7-8):228-32.
15. Enoch S, Roshan A, Shah M. Emergency and early management of burns and scalds. BMJ. 2009;338:937-41.
16. Rasulov MF, Vasilchenkov AV, Onishchenko NA, et all. First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns. Bull Exp Biol Med. 2005;139(1):141-4.
17. Rodbell M. Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. J Biol Chem. 1964;239:753-5.
18. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, et all. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. J Clin Invest. 1989;84(5):1663-70.
19. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et all. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002;13(12):4279-95.
20. Sterodimas A, De Faria J, Correa WE, Pitanguy I. Tissue engineering in plastic surgery: an up-to-date review of the current literature. Ann Plast Surg. 2009;62(1):97-103.
21. Thorne CH. Grabbs and Smith's Plastic Surgery (6 ed).Lippincott Williams & Wilkins, New York,2010;p.105.
22. Achauer BM, Erksso E. Plastic Surgery (1 ed), Mosby, Missouri, 2000, p.23-26.
23. Mathes SJ. Plastic Surgery (2nd ed). Saunders Elsevier, California, 2006,Vol.1,p.294-297.

24. Hansen SL, Mathes SJ, Young DM. Schwartz's Principles of Surgery (8th ed). The McGraw-Hill Copany Inc, New York, 2005, p.429-52.
25. Mathes SJ. Plastic Surgery (2nd ed). Saunders Elsevier, USA, 2006, Vol.1, pp. 815-816.
26. Kassira W, Namias N. Outpatient management of pediatric burns. J Craniofac Surg. 2008;19(4):1007-9.
27. Kamolz LP, Kitzinger HB, Andel H, Frey M. The surgical treatment of acute burns. Eur Surg 2000;38(6):417-423.
28. Jackson DM. The diagnosis of the depth of burning. Br J Surg. 1953;40(164):588-96.
29. Keck M, Herndon DH, Kamolz LP, Frey M, Jeschke MG. Pathophysiology of burns. Wien Med Wochenschr. 2009;159(13-14):327-36.
30. Shakespeare P. Burn wound healing and skin substitutes. Burns. 2001 ;27(5):517-22.
31. Gravante G, Palmieri MB, Esposito G et al. Apoptotic cells are present in ischemic zones of deep partial-thickness burns. J Burn Care Res. 2006;27(5):688-93.
32. Gravante G, Palmieri MB, Esposito G et al. Apoptotic death in deep partial thickness burns vs. normal skin of burned patients. J Surg Res. 2007;141(2):141-5.
33. Singh V, Devgan L, Bhat S, Milner SM. The pathogenesis of burn wound conversion. Ann Plast Surg. 2007;59(1):109-15.
34. Rea S, Giles NL, Webb S et al. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound--more than just inflammation. Burns. 2009;35(3):356-64.
35. Wilkison WO, Choy L, Spiegelman BM. Biosynthetic regulation of monobutylin, an adipocyte-secreted lipid with angiogenic activity. J Biol Chem. 1991;266(25):16886-91.
36. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280(6):827-47.

37. Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell*. 2005;16(3):1131-41.
38. Dicker A, Le Blanc K, Aström G et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res*. 2005;308(2):283-90.
39. De Francesco F, Tirino V, Desiderio V 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):6537.
40. Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor.Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem*. 1992;267(23):16317-22.
41. Karaöz E. , Ovalı E. Kök Hücreler (1 ed), Derya Kitapevi , 2004, sf.64
42. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.*Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
43. Kim WS, Park BS, Sung JH. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Arch Dermatol Res*. 2009;301(5):329-36.
44. Park BS, Jang KA, Sung JH, Park JS, Kwon YH, Kim KJ, Kim WS. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging.*Dermatol Surg*. 2008;34(10):1323-6.
45. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45(2):115-20.
46. Wilgus TA, Matthies AM, Radek KA. Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. *Am J Pathol*. 2005;167(5):1257-66.
47. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121(1):50-8.

48. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(3):804-15.
49. Rigotti G, Marchi A, Galiè M et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119(5):1409-22.
50. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S et al. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci*. 2007;48(1):43-52.
51. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LF. Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(1):103-11.
52. 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;15(9):2677-86.
53. Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T et al. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(6):1515-21.
54. Dokumcu Z, Ergun O, Celik HA et al. Clostridial collagenase aggravates the systemic inflammatory response in rats with partial-thickness burns. *Burns*. 2008;34(7):935-41.
55. Gilpin DA. Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size. *Burns*. 1996;22(8):607-11.
56. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S et al. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns*. 2001;27(8):817-27.
57. Chu Y, Yu D, Wang P, Xu J, Li D, Ding M. Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound Repair Regen*. 2010;18(5):499-505.
58. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*. 1997;14(6):629-40.

- 59.** Li R, Younes M, Wheeler TM et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate*. 2004 1;58(2):193-9.
- 60.** Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2008;32(1):48-55.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Sibel ATALAY'a ait **“RATLARDA YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN II. DERECE DERİN YANIKLARIN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI”** adlı çalışma, jürimiz tarafından Plastik Rekonstrüktif Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:

İmza

Başkan:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye: