

T. C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

YANIKLI DOKUDA MİKROCERRAHİNİN
UYGULANABİLİRLİĞİ ve KÖK HÜCRE
UYGULAMASININ ETKİSİ

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Ersin GÜR

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ecmel SONGÜR

İZMİR - 2015

TEŞEKKÜR

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi kliniğindeki uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum, her türlü desteği ve birikimini esirgemeyen , yetişmemde emeği geçen, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ecmel SONGÜR başta olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Yalçın AKIN' a, Sayın Prof. Dr. Tahir GÜRLER' e, Sayın Prof. Dr. Mehmet ALPER' e, Sayın Prof. Dr. Z. Cüneyt ÖZEK'e, Sayın Prof. Dr. Ufuk BİLKAY'a, Sayın Doç. Dr. Yiğit Özer TİFTİKCİOĞLU' na ve Sayın Op. Dr. Ahmet BİÇER' e; birlikte çalıştığım ve hiç bir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Çağır Meriç ERENOĞLU'na, Dr. Şenol DURUKAN'a, Dr. Burak Sercan ERÇİN'e, Dr. Mehmet Emre YEĞİN'e, Dr. Mehmet ERDEM'e, Dr. Yakup IŞIK'a ve tüm klinik hemşire, teknisyen ve personeline içten teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin bilimsel içeriğinin hazırlanmasındaki desteklerinden ve yardımlarından ötürü Sayın Prof. Dr. Ecmel SONGÜR'e ve Sayın Doç. Dr. Yiğit Özer TİFTİKCİOĞLU'na ; biyokimsyasal değerlendirmeleri gerçekleştiren Sayın Prof. Dr. Gülinaz ERCAN ve ekibine, histopatolojik değerlendirmeleri gerçekleştiren Sayın Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER ve ekibine, deney aşamasındaki yardımlarından dolayı tüm ARGEFAR çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Yetişmemde hiç bir zorluk ve fedakarlıktan çekinmeyen değerli anneme, sevgili ablama sonsuz sevgi, saygı ve minnetlerimi sunarım.

Dr. Ersin GÜR
2015, Bornova

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. GİRİŞ ve AMAÇ	4
3. GENEL BİLGİLER	7
3.1 Yanık	7
3.2 Epidemiyoloji	7
3.3 Etiyoloji	7
3.4 Deri ve Tabakaları	11
3.5 Yanık Yüzdesinin Hesaplanması	12
3.6 Yanık Dereceleri	16
3.6.1 1.derece yanık	16
3.6.2 2.derece yanık	16
3.6.3 3.derece yanık	17
3.6.4 4.derece yanık	17
3.7 Yanık Fizyopatolojisi	19
3.7.1 Lokal Cevap	19
3.7.2 Sistemik Cevap	21
3.7.2.1 Kardiyovasküler Cevap	21
3.7.2.2 Pulmoner Cevap	22
3.7.2.3 Renal Cevap	22
3.7.2.4 İmmün Cevap	22
3.7.2.5 Gastrointestinal Cevap	25
3.7.2.6 Kas ve İskelet Sistemi	25
3.7.2.7 Hematopoetik Sistem	25
3.8 Elektrik Yanıkları	26
3.9 Kimyasal Yanıklar	28
3.10 İnhalasyon Yanıkları	29
3.11 Yara İyileşmesi	30
3.11.1 İnflamatuvar Aşama	30
3.11.2 Proliferatif Aşama	31
3.11.3 Yeniden Şekillendirme Aşaması	31
3.12 Yanık Tedavisi	32
3.12.1 İntravenöz Yol	34

3.12.2	Eskarotomi	34
3.12.3	Topikal Yara Ajanları	34
3.12.3.1	Gümüş Sülfadiyazin	34
3.12.3.2	Mafenide	35
3.12.4	Sıvı Resüsitasyonu	35
3.12.5	Sistemik Antibiyotik Tedavisi	36
3.12.6	Cerrahi Yöntem	36
3.12.6.1	Erken Eksizyon	36
3.12.6.2	Serbest Flepler	37
3.13	Kök Hücre Uygulaması	39
3.14	VEGF	40
4.	GEREÇ ve YÖNTEM	42
4.1	Etik Kurul Onayı	42
4.2	Adipijenik Kök Hücre Eldesi ve Kültürü	42
4.3	Adipojenik Kök Hücre Karakterizasyonu	42
4.4	Deney Hayvanları ve Deneyin Yapıldığı Ortam	44
4.5	Yanık Modelinin Oluşturulması	45
4.6	Deney Grupları	50
4.7	Cerrahi Modeller	50
4.7.1	Kontrol Grubu	50
4.7.2	Yanık ve Yanık + Kök Hücre Grubu	54
4.8	Biyokimyasal Yöntem	59
4.9	Histolojik Yöntem	62
5.	DEĞERLENDİRME	67
5.1	Kontrol Grubu	67
5.2	Yanık Grubu	70
5.3	Yanık + Kök Hücre Grubu	73
5.4	Anastomoz Başarılarının İstatistiksel Değerlendirilmesi	75
5.5	Biyokimyasal Değerlendirme ve İstatistiksel Analiz	76
5.6	Histolojik Değerlendirme	79
6.	TARTIŞMA	84
7.	SONUÇ	88
8.	KAYNAKLAR	89
9.	ABSTRACT	97

KISALTMALAR

PDGF	:	Platelet-Derived Growth Factor
FGF	:	Fibroblast Growth Factor
TGF	:	Transforming Growth Factor
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor
HGF	:	Hepatocyte Growth Factor
ATIII	:	Anti-trombin III
TVYA	:	Total Vücut Yüzey Alanı
IL	:	İnterlökin
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör
IFN	:	İnterferon
NO	:	Nitrik Oksit
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
SO	:	Süperoksit
DIC	:	Disseminated Intravascular Coagulation
İV	:	İntravenöz
GİS	:	Gastrointestinal Sistem
MDA	:	Malondialdehit
SF	:	Serum Fizyolojik
TBA	:	Tiyobarbitürik Asit
SOD	:	Süperoksit Dismutaz
H-E	:	Hematoksilen – Eozin
PBS	:	Phosphate- Buffer Saline

1. ÖZET

Yanık, çeşitli etiyolojik faktörler ile deri, kas veya kemik üzerinde meydana gelen bir travma , yaralanma çeşidi¹ olmakla birlikte karşılaşılabilen en ağır travmalardan biridir ².

Gelişmiş ülkelerde elde edilen faydalar nedeniyle , özellikle ciddi yanıklarda erken tanjansiyel eksizyon standart tedavi algoritması içerisine girmiştir ⁶⁻⁷. Erken tanjansiyel eksizyon ve greftleme; mortalite ve morbiditede azalma, enfeksiyon gelişme riskinde azalma ve hastanede kalma süresinde kısaltmaya neden olmakla birlikte ek olarak eskarın erken eksizyonu ile hipertrofik skar gelişme riski ve ortama salınan inflamatuvar mediatör salınımı azalmaktadır ⁷⁻⁸⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹.

Yanık nedenli yapılan erken debridman sonrasında eğer uygun, iyi vaskülarize yara yatağı mevcutsa ilk basamak olarak deri grefti uygulamaları yapılmakta , uygun yara yatağının olmadığı durumlarda ise diğer bir seçenek olarak lokal flep uygulamaları yapılmaktadır ¹³. Bununla birlikte yanıklı hastalarda genellikle hasara bağlı olarak yanık çevresindeki dokulardan lokal flep kaldırılması özellikle ekstremitelerde çoğu zaman mümkün olmamaktadır ve bu durumda en uygun seçenek serbest flep uygulamalarıdır ¹³.

Günümüzde yapılan erken debridman ve serbest flep ile yara rekonstrüksiyonu uygulamalarında vasküler anastomozlar için yanık hasarı içermeyen salim alanlar seçilmekte ve anastomozlar bu alan altında yapılmaktadır. Yapılan literatür araştırması da bunu destekler niteliktedir. Bununla birlikte yanık merkezlerine yönlendirilen bazı vakalarda; özellikle ekstremitelerde, değişen derecelerde tüm yüzeylerde yanık izlenebilmekte ve bu nedenle serbest flepler için yanık hasarının olmadığı salim doku olmayabilmektedir. Literatürde bu tür klinik vakalarda serbest flep uygulanabilirliği ile ilgili bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Yanıkta birçok sistemik ve lokal faktör etkileşime girmektedir. Bu vakalarda serbest flep gerekliliği durumunda yanıklı zemin altında damar anastomozu gerekmesi halinde bunun yanığın lokal etkilerinden nasıl etkilendiği merak konusudur ve bu konuyla ilgili deneysel veya klinik bir çalışma mevcut değildir.

Adiposit kaynaklı kök hücrelerin PDGF, FGF, TGF beta gibi büyüme mediatörleri salgılayarak re-epitelizasyonun hızlanması; VEGF-A, HGF (hepatik growth faktör), FGF-2 gibi mediatörlerin salınımlarını arttırmakla yeni damar oluşumu, yaranın iyileşmesinin hızlanması, keratinosit ve dermal fibroblast proliferasyonunun artması gibi yara iyileşmesi üzerine bir çok olumlu etkilerinin ²²⁻²³⁻²⁴⁻²⁵⁻²⁶ yanında rekonstrüktif flep cerrahisinde iskemi sonrası görülen iskemi-reperfüzyon hasarını azaltarak flep survisine olumlu katkıları olduğu gösterilmiştir ²⁷.

Bu amaçla yanıklı doku altında, damarların yanıktan doğrudan etkilenmediği fakat üzerini yanıklı dokunun örttüğü, yanığın lokal etkilerinin etkili olduğu bir ortamda , damar anastomozu başarısı ve kök hücre uygulamasının buna etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla denekler (21 adet ortalama 300 gram ağılığında wistar – albino rat) kontrol, yanık ve yanık + kök hücre grubu olmak üzere üçe ayrılmış, ilk grupta sadece modele uygun olarak femoral arter anastomozu yapılmış, ikinci grupta deneklerin sol ingüinal alanları yakılarak yanık altında femoral arter anastomozu yapılmış ve son grupta yanık sonrası yapılan anastomoz hattına kök hücre uygulaması yapılmıştır. Bütün deneklerin operasyondan sonra 3. günde anastomoz patensleri değerlendirilmiş, biyokimyasal ve histolojik çalışmalar için örnekler alınarak denekler kurban edilmiştir.

Kontrol grubunda bir sıçan ölmüş ve yanık grubunda bir denekte yara açılması ve yara yerinde çok miktarda yabancı cisim tespit edilmiş bu nedenle bu denekler çalışma dışı bırakılmıştır.

Deney sonunda kontrol grubunda 6 femoral arter anastomozundan 1 tanesi, yanık grubundan 6 femoral arter anastomozundan 3 tanesi ve yanık + kök hücre grubundan 7 femoral arter anastomozundan 3 tanesi tromboz ile sonuçlanmıştır. Bu veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve gruplar arasında istatistiksel analiz sonrasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

VEGF angiogenezi ve endotel iyileşmesini arttıran bir mediyatördür. Yine yanık sonrası tromboza olan yatkınlık sebeplerinden biri ATIII'te meydana gelen azalmadır. Çalışmada bu iki parametre her üç grupta incelenmiş , kök hücre uygulaması sonucu bu mediyatörlerin nasıl değiştiği araştırılmıştır. İstatistiksel olarak ve histopatolojik olarak bu üç grupta VEGF ve ATIII düzeylerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamakla birlik kök hücre uygulanan deneklerin oksidatif strese daha iyi cevap verildiği gözlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında yanık yarası debridmanından sonra serbest flep endikasyonu gerektiren yaralarda, yara komşuluğunda ; serbest flepleri besleyecek vasküler yapıların seçiminde, salim doku olmasa bile vaskülerin yapıların doğrudan etkilenmediği fakat yanıklı doku altında bulunan damarsal yapıların kaynak olarak kullanılabilceğı ve bu hastalarda serbest flep kullanımının uygulanabilir olduğı sonucu ortaya çıkmıştır.

Hastaların erken ve uygun tedavisi için serbest flep gerektiren durumlarda ; ekstremiteler başta olmak üzere geniş yüzey alanını içeren yanıklarda vasküler yapılar yanıklı doku zemininde olsa dahi serbest flep uygulamasından kaçınılmaması gerektiğı ve konu ile ilgili deneysel ve klinik ek çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.



2. GİRİŞ ve AMAÇ

Yanık, çeşitli etiyolojik faktörler ile deri kas veya kemik üzerinde meydana gelen bir travma , yaralanma çeşidi ¹ olmakla birlikte karşılaşılabilen en ağır travmalardan biridir ².

Ülkemizde kapsamlı bir istatistiki veri olmamakla birlikte; Amerikan kaynaklarına göre her yıl yarım milyon kişi akut termal yanıktan etkilenmekte, bunlardan yaklaşık 40.000 ' i hastanede tedavi görmekte ve yaklaşık 3.400 kişi hayatını kaybetmektedir ³.

1999-2008 yılları arasında Amerika 'da ,toplam 79 hastanede 127.016 tane hospitalize edilmiş hasta ile yapılan retrospektif çalışmada etken ; %42 alev, %30 haşlanma, %9 sıcak bir cisim ile temas, %4 elektrik , %3 kimyasal yanık ve %12 diğer sebepler olarak saptanmıştır ⁴.

Yanık yarasına cerrahi yaklaşımda erken yara eksizyonunun önemi aşikardır ⁵.

Gelişmiş ülkelerde elde edilen faydalar nedeniyle , özellikle ciddi yanıklarda erken tanjansiyel eksizyon standart tedavi algoritması içerisinde ⁶⁻⁷. Erken tanjansiyel eksizyon ve greftleme; mortalite ve morbiditede azalma, enfeksiyon hızında azalma ve hastanede kalma süresinde kısaltmaya neden olmakta ek olarak eskarın erken eksizyonu ile hipertrofik skar gelişme riski azalmakta ve ortama salınan inflamatuvar mediatör salınımı azalmaktadır ⁷⁻⁸⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹.

Yanık alanın büyüklüğüne, yanık derinliğine, ölü dokunun var olup olmaması ve yapılacak erken eksizyon sonrası yara yatağının mevcut durumuna, altta kalan dokunun tipine göre yara; sekonder iyileşme, çeşitli pansuman malzemeleri ile müdahale, greftleme, pediküllü veya serbest flepler ile rekonstrükte edilerek kapatılabilir.

Serbest flepler; vücudun herhangi bir yerinde gelişen doku defekti rekonstrüksiyonları amacıyla, bu defektif alana uzak, vücudun uygun başka bir yerinden alınan dokulardır ¹². Flep , kendisini besleyen arter ve ven (pedikül) ile birlikte diseke edilip kaldırılır; arter ve ven , taşınacağı bölgedeki uygun alıcı arter ve ven' e mikrocerrahi yöntemle anastomoz yapılır ¹².

Serbest doku nakilleri vücuttaki geniş doku defektlerini rekonstrükte etmek için kullanılır ¹³. Genellikle kanser cerrahisi (baş boyun tümörleri) sonrasında veya travmaya bağlı olarak gelişen (alt ve üst ekstremiteler, meme kanseri sonrası meme rekonstrüksiyonları vs.) doku kayıplarında kullanılmakla birlikte, uygun seçilmiş hastalarda serbest flep kullanımının önemli rol oynadığı durumlardan biri de yanıklardır ¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷.

Mikrocerrahinin gelişmesi ve ile birlikte yanık hastalarında serbest flep kullanımı; önceleri yanığa bağlı kontraktürlerin açılması gibi ikincil rekonstrüktif operasyonlar için kullanılmakta iken günümüzde derin yanıklar sonucunda açıkta kalan kemik, sinir, tendon ve damar gibi yapıların üzerinin kapamasında daha sık kullanılmaktadır ¹³⁻¹⁴⁻¹⁸⁻¹⁹.

Akut yanık sonrası yapılan debridman sonrasında eğer uygun iyi vaskülarize yara yatağı mevcut ise ilk basamak olarak deri grefti uygulamaları yapılmakta uygun yara yatağının olmadığı durumlarda ise diğer bir seçenek olarak lokal flep uygulamaları yapılmaktadır ¹³. Bununla birlikte yanıklı hastalarda genellikle hasara bağlı olarak yanık çevresindeki dokulardan lokal flep kaldırılması özellikle ekstremitelerde çoğu zaman mümkün olmamaktadır ve bu durumda en uygun seçenek serbest flep uygulamalarıdır ¹³.

Ekstremiteler başta olmak üzere; anatomik olarak kemik, damar, tendon ve nörovasküler yapıların yoğun olarak bulunduğu, bu yapıların üzerlerinin kapatılmasında deri grefti uygulamalarının sınırlı olduğu ve lokal flep kullanımının uygun olmadığı defektlerde serbest flepler önem arzeder ²⁰. Özellikle distal 1/3 alt ekstremitte defektlerinin rekonstrüksiyonlarında serbest flep uygulamaları altın standart yöntemlerdir ²¹.

Kök hücreler farklılaşmamış fakat bir çok hücre tipine farklılaşabilme özelliğine sahip hücrelerdir. Adiposit kaynaklı kök hücrelerin PDGF, FGF, TGF-beta gibi büyüme mediatörleri salgılayarak re-epitelizasyonun hızlanması; VEGF-A, HGF (hepatik growth faktör), FGF-2 gibi mediatörler ile yeni damar oluşumunu ve yaranın iyileşmesinin hızlanması, keratinosit ve dermal fibroblast proliferasyonunu artırması gibi yara iyileşmesi üzerine bir çok olumlu etkilerinin ²²⁻²³⁻²⁴⁻²⁵⁻²⁶ yanında rekonstrüktif flep cerrahisinde iskemi sonrası görülen iskemi-reperfüzyon hasarını azaltarak flep survisine olumlu katkıları olduğu saptanmıştır ²⁷.

Günümüzde yapılan erken debridman ve serbest flep ile yara rekonstrüksiyonu uygulamalarında vasküler anastomozlar için yanık hasarı içermeyen salim alanlar seçilmekte ve anastomozlar bu alan altında yapılmaktadır. Yapılan literatür araştırması da bunun destekler niteliktedir. Bununla birlikte yanık merkezlerine yönlendirilen bazı vakalarda; özellikle ekstremitelerde değişen derecelerde tüm yüzeylerde yanık izlenebilmekte bu nedenle serbest

flepler için yanık hasarının olmadığı salim doku olmayabilmektedir. Literatürde bu durumda serbest flep uygulanabilirliği ile ilgili bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Biz bu çalışmamızda yanık zemini altında damar anastomozu patensini, anastomoz başarısının yanığın neden olduğu lokal faktörlerden nasıl etkilendiğini ve yara iyileşmesinde bir çok olumlu etkileri olan kök hücre uygulamasının anastomoz patensine olan etkilerini araştırdık.



3. GENEL BİLGİLER

3.1 Yanık

Yanık, çeşitli etiyolojik faktörler ile deri, kas veya kemik üzerinde meydana gelen bir travma , yaralanma çeşidi ¹ ve karşılaşılabilen en ağır travmalardan biridir ².

3.2 Epidemiyoloji

Yanık her iki cinsiyeti ve bütün yaş grubundan insanları etkileyerek ; gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli fiziksel ve psikolojik sorunları barındırmakla birlikte ²⁸ , her yıl birkaç bin kişi yanık ve komplikasyonları nedeni hayatını kaybetmektedir ²⁹⁻³⁰ . Anne ve çocukta morbitide ve mortaliteye neden olması sebebiyle, hamilelik periyodunda yanık ayrıca önem arz etmektedir ³¹ .

Ülkemizde kapsamlı bir istatistiki veri olmamakla birlikte; Amerikan kaynaklarına göre her yıl yarım milyon kişi akut termal yanıktan etkilenmekte, bunlardan yaklaşık 40.000' i hastanede tedavi görmekte ve yaklaşık 3.400 kişi hayatını kaybetmektedir ³.

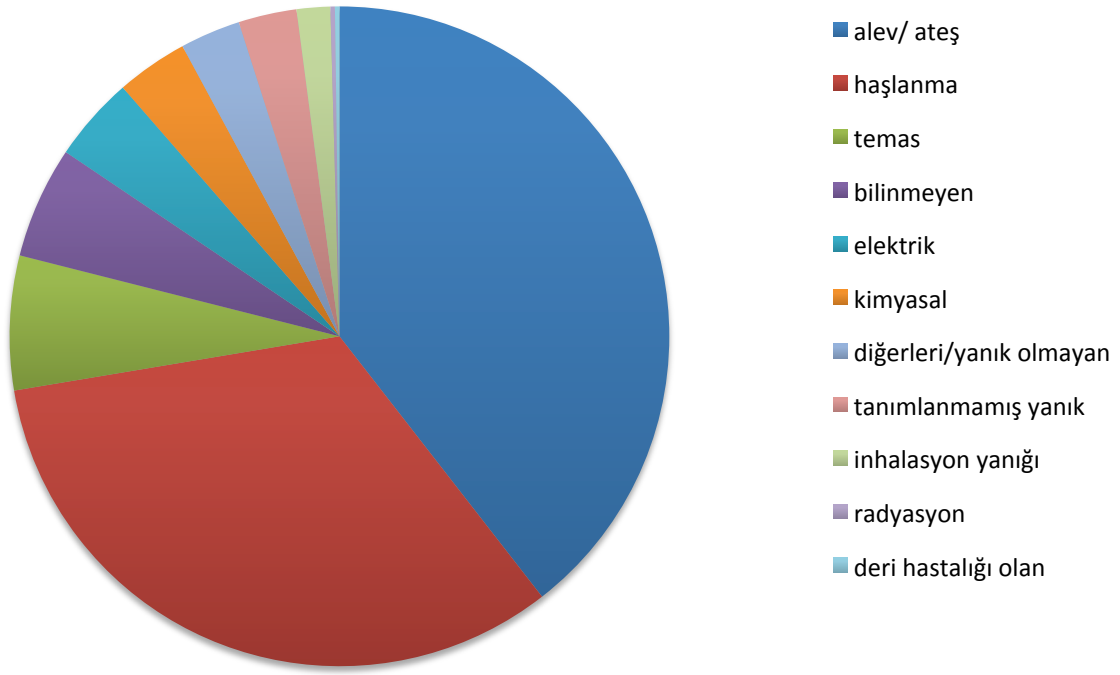
3.3 Etiyoloji

Yanığa neden olan etiyolojik faktörler çeşitli gruplar halinde sınıflandırılabilmele beraber kabaca bu etkenleri; termal yanıklar (haşlanma, alev, kontakt), elektrik yanıkları, kimyasal yanıklar ve diğerleri olarak sınıflamak mümkündür ³².

Yanıklı çocuk hastalarda %70 oranında etken genellikle sıcak su veya sıvı ile meydana gelen haşlanma yanığı iken erişkin yanıklı hastalarda yanık sebebi yaklaşık %50 oranında alev yanığıdır ve bir çok yanık ünitesince elektrik yanığı oranı yaklaşık olarak %3-4 civarındadır ³².

1999-2008 yılları arasında Amerika' da, toplam 79 hastanede 127.016 tane hospitalize edilmiş hasta ile yapılan retrospektif çalışmada etken ; %42 alev, %30 haşlanma, %9 sıcak bir cisim ile temas, %4 elektrik , %3 kimyasal yanık ve %12 diğer sebepler olarak saptanmıştır ⁴.

Amerikan yanık derneği' nin 2013 yılında çok merkezli araştırmasında, 2003-2012 tarihleri arasında yanığın etyolojik nedenleri, yaşlara göre dağılımları grafik-1, grafik-2, tablo-1 ve tablo-2' de özetlenmiştir ³³.

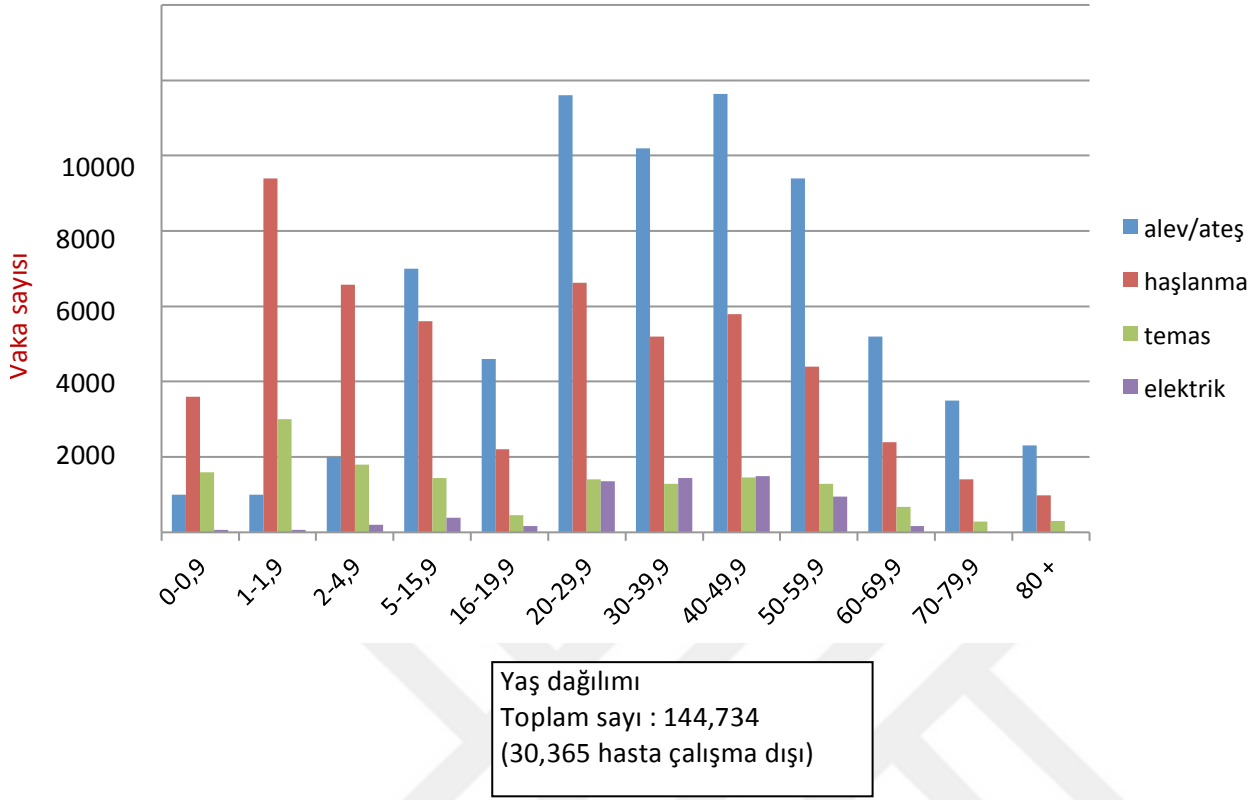


Grafik 1. Yanıkta etiyolojik nedenler ³³

Etyoloji	Vaka sayısı	Yüzde
Alev/ ateş	69,913	43,2
Haşlanma	54,198	33,5
Temas	14,417	8,9
Elektrik	6,206	3,8
Kimyasal	5,211	3,2
Diğer/ Yanık olmayan	4,315	2,7
Tanımlanmamış yanık	4,225	2,6
İnhalasyon yanığı	2,461	1,5
Deri hastalığı olan	359	0,2
Radyasyon	425	0,3
Bilinmeyen	13,369	
Toplam	175,099	

Tablo-1 175,009 sayılı çalışmada etiyolojik nedenler ve vaka sayıları ³³

Alev / ateş, haşlanma, sıcak bir cisim ile temas ve elektrik yanıklarının yaşlara göre görülme sıklığı ³³



Grafik -2 , Etiyolojik nedenlerin yaşlara göre dağılımları ³³

yaş dağılımları	toplam		cinsiyet			
	sayı	yüzde	kadın		erkek	
	sayı	yüzde	sayı	yüzde	sayı	yüzde
0-0,9	8,288	4,7	3,142	5,7	5,146	4,3
1-1,9	14,662	8,4	5,826	10,6	8,836	7,4
2-4,9	12,248	7	5,322	9,7	6,926	5,8
5-15,9	16,88	9,6	5,625	10,2	11,255	9,4
16-19,9	8960	5,1	2,224	4	6,736	5,6
20-29,9	25,688	14,7	6,269	11,4	19,419	16,2
30-39,9	22,163	12,7	5,654	10,3	16,509	13,8
40-49,9	24,873	14,2	6,791	12,3	18,082	15,1
50-59,9	19510	11,1	5,606	10,2	13,904	11,6
60-69,9	10,772	6,2	3,614	6,6	7,157	6
70-79,9	6,455	3,7	2,659	4,8	3,796	3,2
80 +	4600	2,6	2,335	4,2	2,265	1,9
toplam	175,099	100	55,068	100	120,031	100

Tablo-2 Cinsiyete göre yaş dağılımları ³³

3.4 Deri ve Tabakaları

Vücuttaki en büyük organ olan derinin çok sayıda fonksiyonu vardır. Büyüklüğü yenidoğanda yaklaşık 0,2-0,3 m² iken , erişkinde yaklaşık 1,5-2 m² kadardır ¹. Derinin kalınlığı vücutta değişkenlik göstermekle birlikte, genel olarak erkeklerde kadınlara oranla daha kalındır ¹. Vücudu uç sıcaklıklardan, buharlaşma kayıplarından, küçük travmalardan ve mikroorganizmaların invazyonundan korumak suretiyle dış dünyaya karşı bir bariyer teşkil etmekle beraber, duyu fonksiyonu da vardır ³⁴.

Temel olarak ektoderm ve endodermden köken alır. Epidermis, pilosebace ve apokrin üniteler, ekrin ter bezleri ve tırnaklar ektodermden köken alırken; melanositler, sinirler ve özelleşmiş duyu reseptörleri nöroektodermden köken almaktadır. Langerhans hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri, Merkel hücreleri, fibroblastlar, kan damarları, lenf damarları ve yağ hücreleri mezodermden köken almaktadır ³⁴.

Deri iki temel tabaka olan epidermis ve dermis' ten oluşur (Figür-1). Dış tabaka olan epidermis, dermisten daha incedir ve keratinositler, melanositler, Langerhans ve Merkel hücrelerini içinde barındırır.

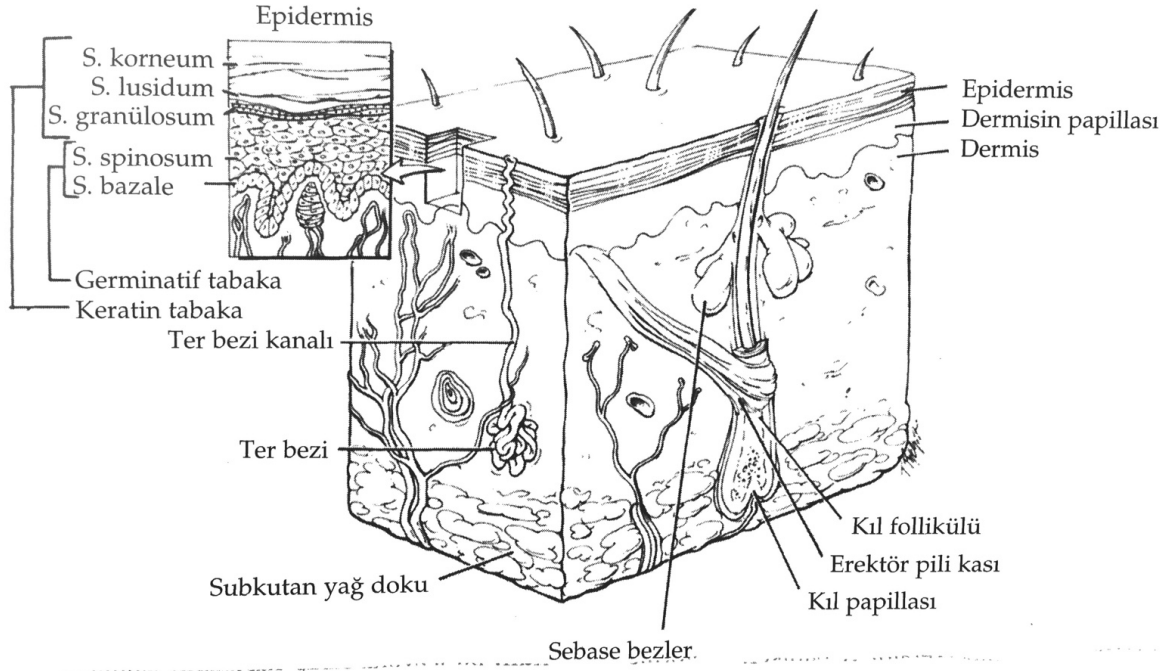
Çok katlı yassı epitel ;

- **stratum korneum,**
- **stratum lüsidum,**
- **stratum granülosum,**
- **stratum spinosum**
- **stratum bazale**

adı verilen beş tabakadan oluşur.

Altındaki dermis tabakasında kollajen, elastin, sinirler, kan damarları, lenfatikler, kas lifleri, pilosebace üniteler, apokrin ve ekrin üniteler yer almaktadır.

Dermis, papiller ve retiküler dermis olarak iki tabakaya ayrılmaktadır ³⁴.

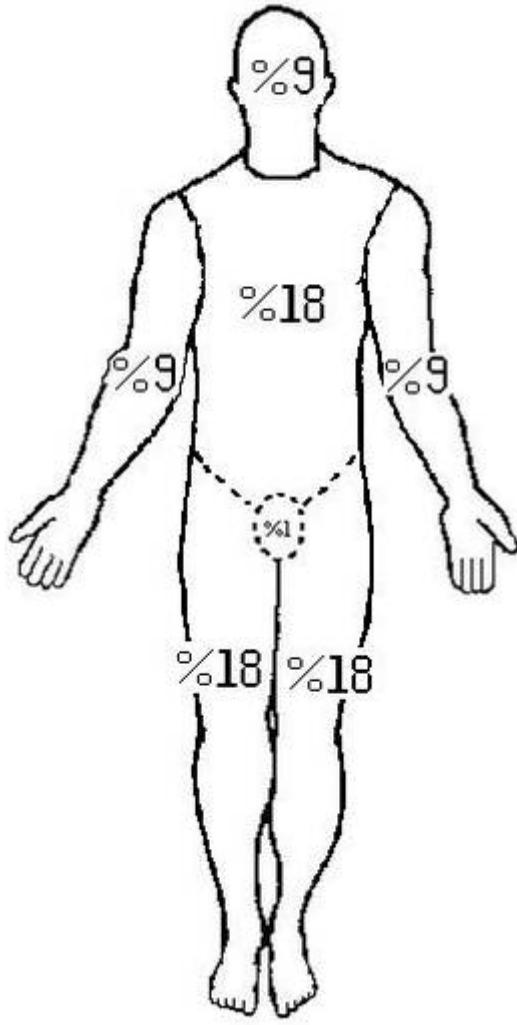


Figür-1 Derinin tabakaları ³⁴

3.5 Yanık Yüzdesi ve Hesaplanması

Yanık hastasının prognozunu, klinik durumun ciddiyetini belirlemek ve tedavi protokolünün oluşturulması için yanık bölgesinin alanının ve derinliğinin hesaplanması gerekir ¹. Yanıklı alanın genişliği, yapılacak sıvı resüsitasyonu, nütrisyonel destek ve cerrahi tedaviyi direk olarak etkilemektedir. Bu yüzdenin hesaplanması için tüm vücut yüzey alanının (TVYA) yüzde kaçının etkilendiği 9' lar kuralı ile belirlenmektedir ¹.

Buna kurala göre baş %9, kollar %9, gözde ön yüz %18, arka yüz %18, bacaklar %18 ve genital alan %1 olarak hesaplanmaktadır ³⁴ (Figür-2).



9 ' lar Kuralı :

Baş : %9

Kol : %9

Gövde ön yüz : %18

Gövde arka yüz : %18

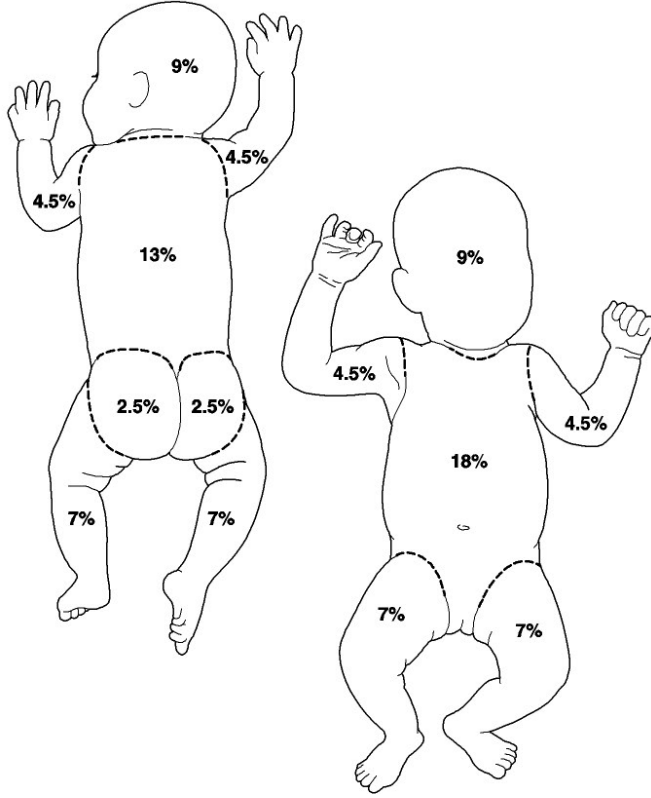
Bacak : %18

Genital bölge : %1

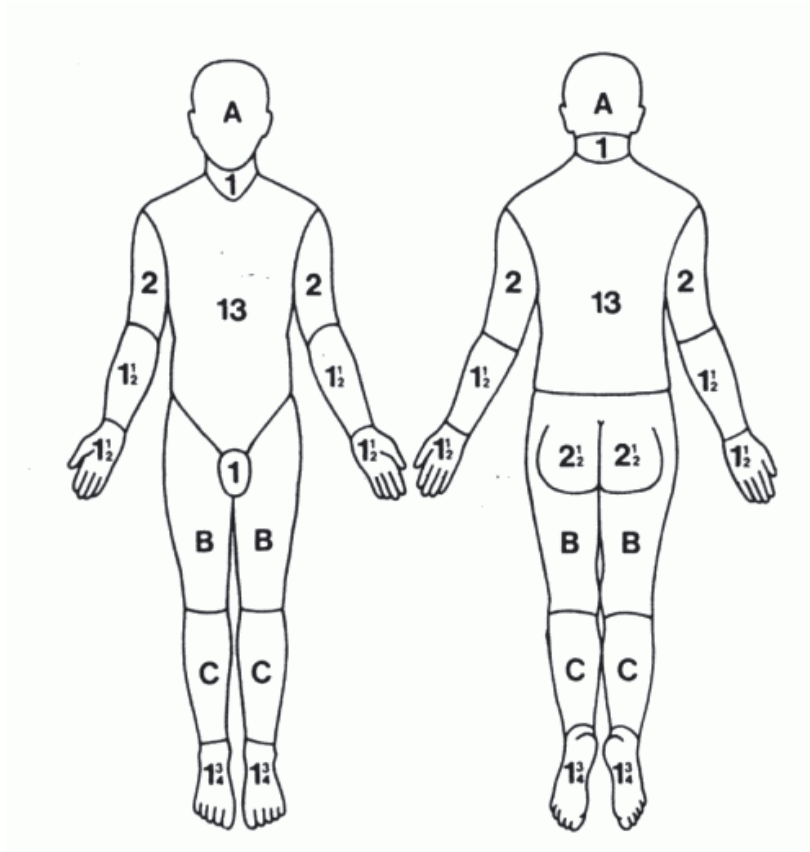
Figür -2, TVYA' ya göre 9' lar kuralı

Çocuk hastalarda baş bölgesinin, toplam vücut alanına oranı daha fazladır aynı zamanda ekstremiteler oranları erişkinlerden farklılık göstermesi nedeniyle 9' lar kuralı farklılık göstermektedir (Figür-3).

Erişkin hastalarda bu kuralın uygulanabilirliği ve sonuçların daha doğru hesaplanması olanaklı iken, yaşla beraber büyüyen çocukta vücut oranları değişiklik göstermektedir. Bu sebeple, büyüme halindeki çocuk hastalarda daha doğru sonuçların elde edilmesi için Lund ve Browder' in geliştirmiş oldukları formülden faydalanılır¹⁻³⁵ (Figür-4).



Figür- 3, Çocuklarda yanık yüzdesinin hesaplanması



Figür-4 Lund- Browder Şeması

Lund- Browder Şeması

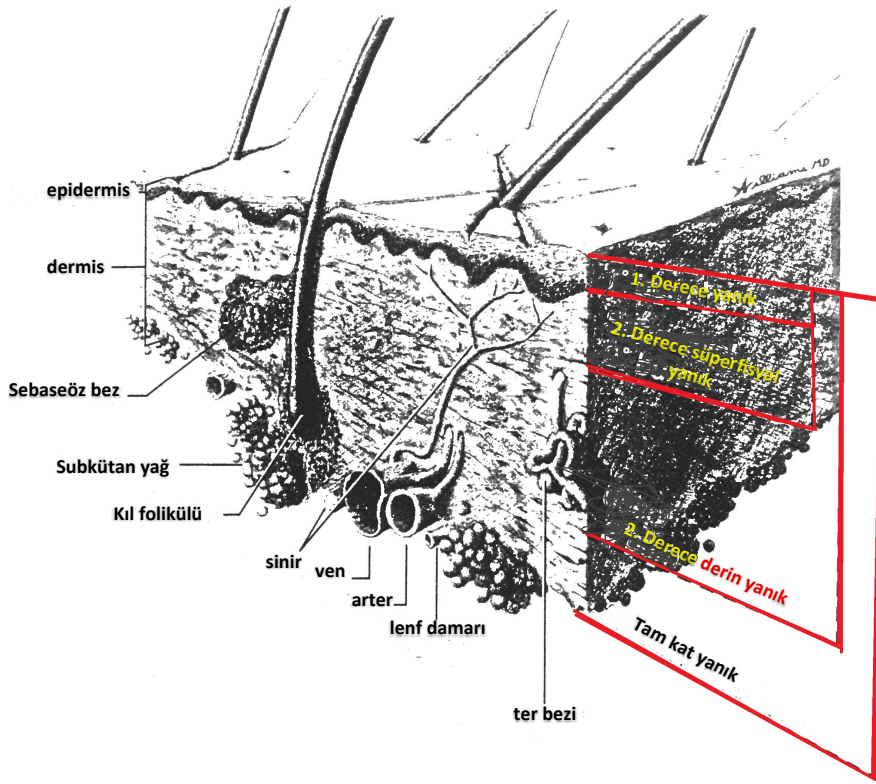
Yaş	0	1	5	10	15	Erişkin
A: Başın yarısı	9 1/2	8 1/2	6 1/2	5 1/2	4 1/2	3 1/2
B: Uyluğun yarısı	2 3/4	3 1/4	4	4 1/4	4 1/2	4 3/4
C: Bacağın yarısı	2 1/2	2 1/2	2 3/4	3	3 1/4	3 1/2

Tablo 3: Yaşlara göre büyümeden etkilenen alanların yüzdeleri

3.6 Yanığın Derecesi

Yanığın derecesi ve derinliğinin tayini, klinik tedavi protokolünü direk etkilemesi nedeniyle önemlidir ³⁶⁻³⁷. Yanık derinliğinin ölçülmesi ile ilgili bazı kriterler olsa da, yanık sonrası gelişen dinamik değişikliklerin etkisi ile net bir sonuç almak her zaman mümkün olmayabilmektedir ³⁷.

3.6.1 1. Derece Yanık : Birinci derece yanık derinin sadece epidermis tabakasını tutar. Meydana gelen vazodilatasyon nedeniyle deride eritem meydana gelir ve tipik örneği güneş yanığıdır ³⁸. Skarsız 7 gün içerisinde iyileşme görülmektedir ¹.



Figür-5. Yanık Dereceleri ³⁸

3.6.2 2. Derece Yanık : İkinci derece yanık epidermis ve dermisin bir kısmını etkilemektedir. Yüzeyel ve derin olmak üzere iki kısımda incelenir ³⁸.

Yüzeyel ikinci derece yanıklarda epidermis tamamen tutulmuş olup dermisin yüzeyel tabakası etkilenmiştir. Sinir sonlanmaları etkilenmediği için oldukça ağrılı yanıklardır ¹. Bül oluşumu

hemen her zaman mevcuttur. İyileşme hızlı olmakla birlikte epitelizasyon; derinde yerleşimli kıl folikülleri ve sebasöz bezler etrafındaki epitel hücrelerinin yüzeye göçü ile yaklaşık iki hafta içinde gerçekleşmektedir ³⁹.

Derin ikinci derece yanıklar tam kat gibi düşünülerek tedavi edilmektedir ¹. Dermisin büyük bir çoğunluğu harap olmuştur sadece en altta kalan kısmi dermis elemanları korunmuştur ¹⁻³⁸. Bununla birlikte sinir sonlanmaları da hasar görmüştür. Bu yaralarda hücre göçü için yeterli hücrenin bulunamaması ve katedilmesi gereken mesafenin fazla olması nedeniyle reepitelizasyon çoğunlukla geri kalmıştır ¹⁻³⁸. Özellikle geniş derin yaralanmalarda kendiliğinden iyileşme aylarca sürebilmektedir ³⁸.

3.6.3 3. Derece Yanık : Üçüncü derece yanıkta epidermis ve dermisin tam kat tutulumu mevcuttur, subkütan yağ dokusunda etkilenmiştir. Yara rengi beyaz ve sinir sonlanmaları tutulumuna bağlı olarak yara ağrısızdır ¹. Genellikle yara tedavisi cerrahi müdahaleyi gerektirir.

3.6.4 4. Derece Yanık : Bu yanıklarda deri ile birlikte kas, tendon ve kemik hasarı mevcuttur. Radikal debridman ve cerrahi tedavi ile birlikte bazen amputasyon ile sonuçlanabilmektedir ¹.

Derinlik	Epidermal	Yüzeyel Dermal	Derin dermal	Tam kat
Renk	Kırmızı	Soluk Pembe	Lekli Kırmızı	Beyaz
Bül	+	+	+/-	-
Kapiller Refil	+	+	-	-
Duyu	+	Ağrılı	-	-
İyileşme	+	+	-	-

Tablo-4. Yanık derecelerine göre bulgular ⁴⁰.

Yanıklar ciddiyetlerine göre minör, orta veya majör yanık olarak sınıflandırılabilir ¹.

Minör Yanık:

% 15 TVYA veya daha az olan erişkin hastalar,

% 10 TVYA' dan daha az olan çocuk veya yaşlı hastalar,

% 2 TVYA veya daha az tam kat yanık olan erişkin veya çocuk hastalar (Göz, kulak, yüz, el, ayak ve perineumda kozmetik veya fonksiyonel kaybı olmayan).

Orta Şiddette Yanık:

%15- 25 TVYA ve tam kat yanık yüzdesi %10' dan az erişkin hastalar,

%10-20 TVYA parsiyel kalınlıkta yanıklı 10 yaş altı çocuklar ve 40 yaş üstü erişkinler; tam kat yanık yüzdesi %10' dan az,

%10 TVYA ve daha az tam kat yanıklı çocuk veya erişkin hastalar (Fonsiyonel veya kozmetik göz, kulak, yüz, el, ayak ve perine hasarı olmayan).

Majör Yanık :

- %25 TVYA veya daha fazla yanık,
- %20 veya daha fazla yanığı olan 10 yaş altı çocuklar veya 40 yaş üstü erişkinler,
- %10 TVYA veya daha fazla tam kat yanık,
- Kozmetik veya fonksiyonel hasara neden olabilecek göz, kulak, yüz, el, ayak ve perine bölgesini etkileyen tüm yanıklar,
- Tüm yüksek voltajlı elektrik yanıkları,
- Majör travma veya inhalasyon yanığının eşlik ettiği tüm yanıklar,

3.7 Yanık Fizyopatolojisi

Etkili bir yanık yönetimi için yanık fizyopatolojisinin anlaşılması önemlidir ³². Yanığın lokal etkilerinin yanında, toplam vücut yüzey alanının %20' si veya üzerindeki yanıklarda, yanığa bağlı şok adıyla da bilinen akut sistemik cevap oluşmaktadır ⁴¹.

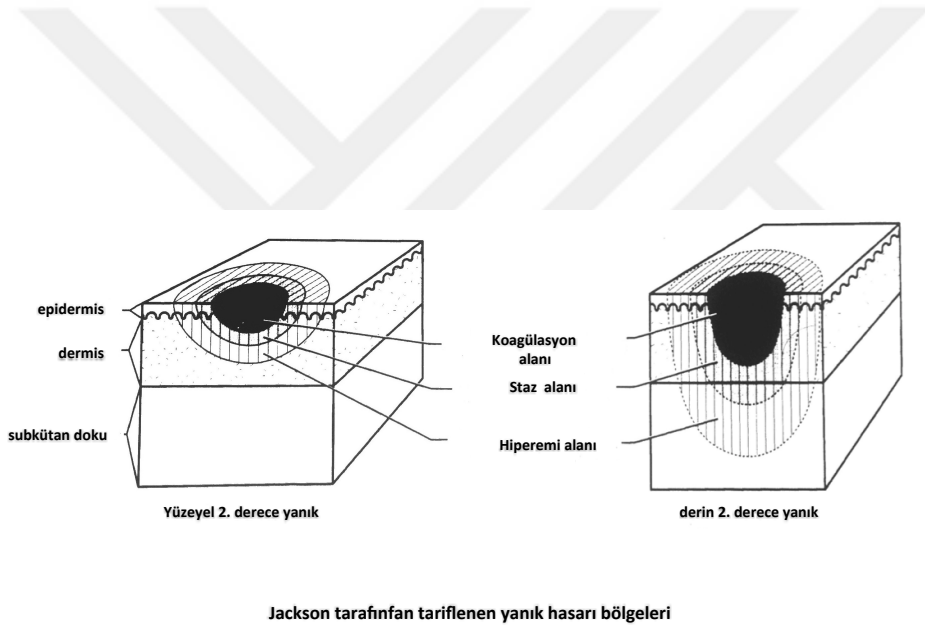
Bu durum genel olarak ; kapiller geçirgenlik artışı, intertisyel alana protein kaybı, sistemik vasküler rezistans, düşük kardiyak output, hipovolemi ve sıvı resüsitasyonu ihtiyacı şeklinde özetlenebilir ⁴²⁻⁴³.

3.7.1 Lokal Cevap : Yanık sonrası interstisyel alandaki bu ödem formu ilk 8 saatle akut bir şekilde oluşurken, 18. saate kadar yavaş bir şekilde devam edebilmektedir ⁴⁴.

Termal yaralanmalarda sıcaklık ve maruz kalınan zaman ile hücrelerde görülen hasar ilişkisi, Moritz ve Henriquez tarafından yapılan çalışma ile ortaya konmuştur ³⁸. Buna göre devam eden 40 ile 44 C⁰ arasındaki maruziyet durumunda bir çok enzim sisteminde disfonksiyon ve erken protein denatürasyonu başlamaktadır ¹⁻⁴⁵. Bir çok hücresel mekanizma ile birlikte membrandaki NA⁺ pompası hasarına bağlı olarak hücre içi Na⁺ konsantrasyonu artmaktadır. Sıcaklığın 44 C⁰ ye ulaşması ile birlikte uygun sürede maruziyet ile hücresel tamir mekanizmaları hasar görür ve durum doku nekrozu ile sonuçlanmaktadır ¹. Hücre membran hasarı ve geri dönüşümsüz hasar sonucunda doku nekrozunun görülmesi , 45 C⁰ ye 1 saat maruziyet sonrasında görülmüştür ⁴⁶. Sıcaklığın artması ile birlikte, proteinlerin denatüre olma hızı ve miktarı artmaktadır. Protein denatürasyonu ile birlikte, proteinin yapısında değişiklikler oluşmakta ve 'koagülasyon' adı verilen tablo meydana gelmektedir ¹. Bu fenomen protein yapıtaşlarındaki tüm aşamalarda destrüksiyon meydana gelmesi anlamına gelmektedir. Bu durum kısa süreli yüksek sıcaklığa veya uzun süreli düşük sıcaklığa maruz kalan alanlarda görülmektedir. Doku nekrozunun olduğu bu form ısı enerjisine direk maruz kalan en yüzeyel kısımda en hızlı oluşmaktadır ¹. 'Koagülasyon bölgesi' denilen bu bölge , 1947 yılında Jackson tarafından tanımlanan yanık yaralanmasının 3 bölgesinden ilkinin oluşturmaktadır ¹⁻³²⁻⁴⁷⁻⁴⁸ ve başlangıç yanık eskarını da içermektedir (Figür-6).

Bu alanın altında ve periferal bölgesinde, daha az hasara maruz kalan ve başlangıçta canlı hücreler içeren alana staz bölgesi denir ¹. Bu alan içerisindeki iskemi varlığının devam etmesi ile başlangıçta canlı olan dokular etkilenmektedir. Başlangıç uygun yara bakımı ile hasar geridönüşümlü olabilmekle ⁴⁹ beraber, iskeminin devamı, hipoperfüzyon, ödem ve enfeksiyon gibi tablolar ile staz alanı, doku nekrozu ile sonuçlanabilmektedir ⁴⁸. Bu yüzden yanıkla uğraşan kimselerin bu durumlara hazırlıklı olması ve özen göstermesi gerekmektedir.

Staz alanında yetersiz doku perfüzyonu ile birlikte mikrovasküler alanda bir takım değişiklikler aynı anda başlamaktadır. Eritrosit form değişiklikleri, trombosit mikrotrombüsleri, damar duvarlarına nötrofil adezyonu, fibrin depolanması, endotelial hasar ve vazokonstriksiyon bunlardan bazılarıdır ¹⁻⁵⁰.



Figür-6. Yanık hasarı bölgeleri

Yukarda bahsedildiği üzere, uygun yara bakımı ile birlikte staz bölgesindeki hasar geri dönüşümlü olabilmekte ve yaklaşık 1 hafta içerisinde iyileşme görülebilmektedir fakat bu olsa bile epiteliyal hücre kayıpları mevcuttur ¹.

Yaranın kuru olmayan pansumanlar ile kapatılması, topikal antibiyotikler, yeterli ve dikkatli sıvı resüsitasyonu ve uygun yara bakımı esastır. Robson ve arkadaşları tarafından, yanık yarasının progresif iskemisi ve patofizyolojisi tanımlanmıştır ¹. Bu çalışmada iskemiden

vasoaktif mediatörlerin rollerinin olduğu anlaşılmıştır ve bunların başında Tromboksan A₂ ve Prostaglandin F₂ gelmektedir ⁵¹. Tromboksan inhibitörleri kullanımı ile dermal perfüzyonun düzelebileceği ve doku nekrozunun azaltılabileceği gösterilmiştir ¹.

Staz alanının periferinde kalan alana , ‘hiperemi’ alanı adı verilir ¹. Bu alanda; inflamatuvar cevabın etkisiyle salınan vazoaktif mediyatörler nedeniyle vazodilatasyon hakimdir ve hücrel hasar minimaldir ¹. Travma ve enfeksiyon gibi komplikasyonlar görülebilmekle beraber genellikle hücrel iyileşme sorunsuzdur ¹.

3.7.2 Sistemik Cevap

Yanık alanının %30 TVYA’ya ulaşması halinde, yanık alanından salgılanan sitokin ve inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle sistemik yanıt oluşur ³² ve bu yaklaşık olarak yanık sonrası 5 ile 7. günlerde pik yapar ⁵².

Sistemik yanıtın kontrol altına alınamadığı durumlarda, oluşan yanık toksinleri ve serbest oksijen radikallerinin peroksidasyonu sonucu lokal ve uzak doku hasarı ile sonuçlanabilmektedir ⁵².

3.7.2.1 Kardiyovasküler Cevap

Yanığa sistemik kardiyovasküler cevap iki faza ayrılır. Bunlardan ilki akut fazdır, kan volümünün düşmesi ve organ perfüzyonunun azalmasına bağlı gelişir ve travmadan hemen sonra görülmeye başlar. Salgılanan vazoaktif mediyatörler , kapiller geçirgenliğin artışı, vücut sıvısının damar dışına çıkarak hücreler arası boşluğa geçişi ve kan volümünün azalması, viskozitede artma ve hipovolemi gözlenmektedir ⁵². Buna bağlı dakikalar içinde kardiyak output düşer ve sistemik vasküler rezistans oluşur ⁵².

Akut faz yaklaşık 48 saat içinde sonlanarak devamında hipermetabolik faza geçilir. Bu dönemde organ ve dokulara giden kan akımı yükselir, hızlı ödem formasyonu ve hipoproteinemik gözlenir ¹⁻⁴⁸⁻⁵²⁻⁵³. Bu dönemden katekolaminlerin üretimi ve salgılanması sorumludur. Adrenerjik stimülasyon ile birlikte end-diastolik volümün artması ile birlikte , sağ ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda düşme gözlenir ve miyokardiyal disfonksiyon gelişir ⁴⁸⁻⁵²⁻⁵³.

3.7.2.2 Pulmoner Cevap

Yanık sonrası ölümlere neden olan sebeplerden birisi de respiratuvar sisitem yetersizliğidir ve durumun sigara kullanımı ile olan ilişkisi bir çok çalışma ile gösterilmiştir ⁵⁴⁻⁵⁵. Yanık sonrası ortama salınan serbest radikaller ve oksidatif ürünler sonrası lipid peroksidasyonu ve akciğerlerde inflamasyon gelişir ⁵². Artmış oksidatif toksinlerle birlikte, akciğerlerin bunlarla mücadele etme gücü de eş zamanlı immün sistemdeki zayıflık nedeni ile azalmıştır ⁵². Tüm bu kompleks etkilerin sonucunda yanıklı hastada bronkospazm, pulmoner arter hipertansiyonu ve azalmış pulmoner kompliyans gelişmektedir ⁵².

3.7.2.3 Renal Cevap:

Akut yanık sonrası renal yetmezliğin gelişmesinde en önemli sebep gelişen hipovolemi ve miyokardiyal disfonksiyondur. Hipovolemi ve eşlik eden miyokardiyal disfonksiyon ile böbrek perfüzyonunda bozulma, iskemi, hücre ölüm, serbest radikallerde artış, tübüler hücrelerde hasar ve glomerüler filtrasyonda azalma meydana gelmektedir ¹.

Hipermetabolik faza geçildiğinde organ perfüzyonu ve glomerüler filtrasyon normale dönse bile, var olan tübüler hasar geri döndürülememektedir ⁵².

Yanık sonrası böbrek fonksiyonlarında azalma ve hasar önemli mortalite sebepleri arasındadır ve önlenmesi için erken ve uygun resüsitasyon gereklidir ¹.

3.7.2.4 İmmün Cevap

Yanık sonrası gelişen vücutta gelişen immünolojik değişiklikler, immün sistem disfonksiyonu ile sonuçlanabilir ve bu da sepsis ve çoklu organ yetmezliğine neden olabilir ⁵⁶.

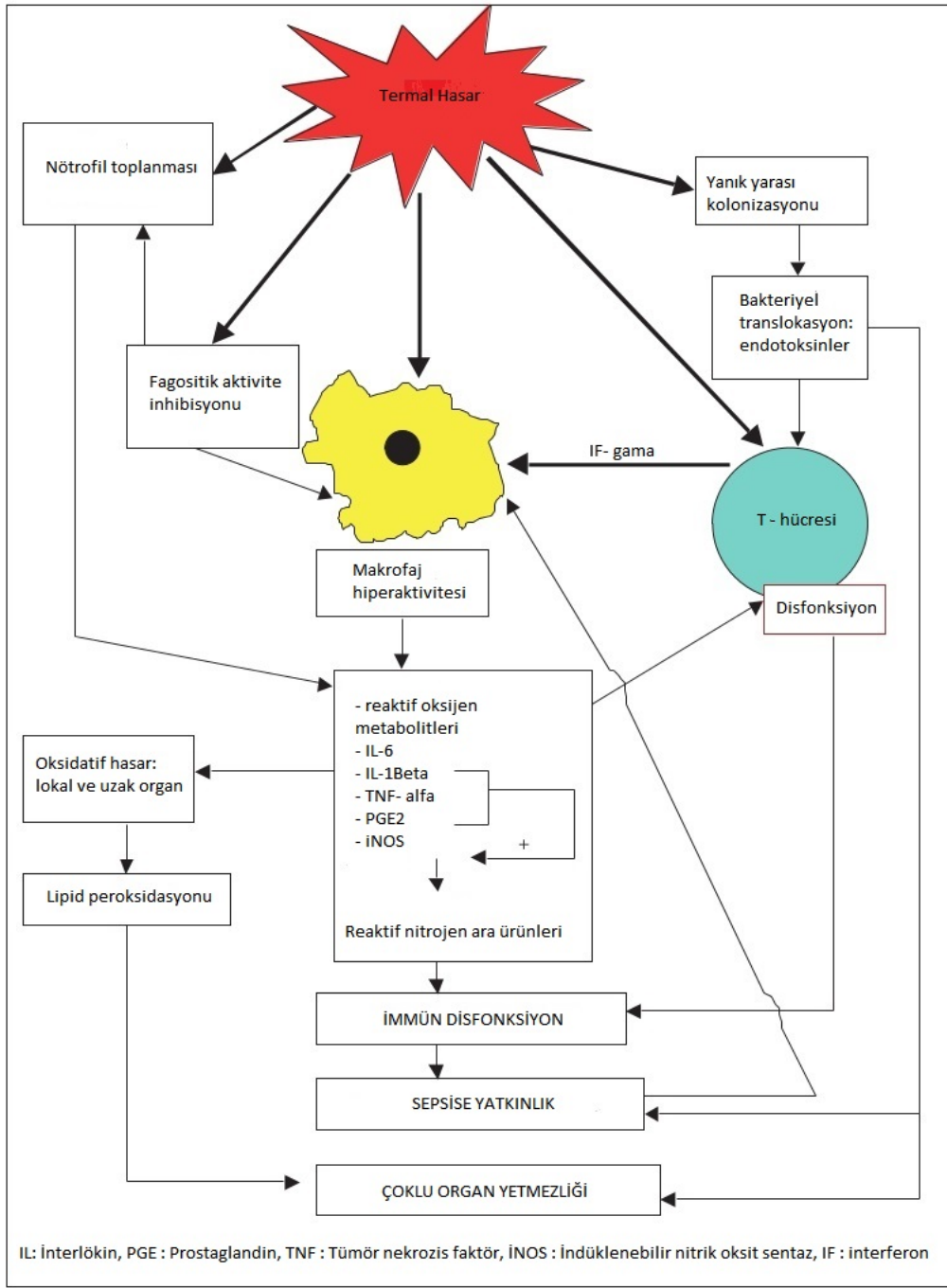
Yanık sonrası doku nekrozu ve iskemisi, deri bütünlüğünün ve bariyerinin bozulması sonucu ortamın enfeksiyona açık hale gelmesi , nötrofil kümelenmesi ve sonucunda ortama salınan inflamatuvar mediatör ve oksidatif ürünler immün cevabın gelişmesinde önemli rol oynamaktadır ¹.

Yapılan çalışmalar pro-inflamatuvar kaskadın aktive edilmesinin, yanık sonrası oluşabilecek komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynadığını ve buradaki en önemli yapılardan birinin makrofajlar ve bunlar tarafından salgılanan çeşitli mediyatörler (prostaglandin E₂, reaktif nitrojen metabolitleri, IL-6, TNF-alfa vs.) olduğunu göstermiştir ⁵²⁻⁵⁷.

İmmünolojik değişiklikler kompleks ve karışık olmakla birlikte yanık sonrası özellikle IL-1b, IL- 6 ve TNF-alfa pro-inflamatuvar mediyatörlerin seviyelerinde artış olmaktadır ⁵²⁻⁵⁷⁻⁵⁸.

IL-6 bloke edildiğinde, makrofaj aktivitesini arttıran IFN- gama seviyelerinde azalma görülmüştür ⁵⁹. IFN- gama çeşitli yollar ile makrofaj aktivitesini arttırarak, fagositler içindeki NO, H₂O₂ ve SO gibi metabolitlerin yapımını hızlandırmaktadır ⁶⁰. Kontrolsüz bir şekilde üretilen ve ortama salınan bu metabolitler lipid peroksidasyonu ve sonucunda lokal ve uzak organ hasarı ve yetmezliği yapmaktadırlar ⁵². Deitch tarafından tanımlanan ‘Çift-Vuruş’ fenomenine göre yanık travması ile ilk vuruş oluşmakta, gelişen inflamatuvar cevap, immün disfonksiyon , sepsis ve benzeri olayların tabloya eklenmesi ve sonucunda gelişen organ yetmezliği ikinci vuruş olarak anılmaktadır ¹⁻⁵²⁻⁶¹.

IL-10 , anti-inflamatuvar bir mediyatör olup gelişen abartılı inflamatuvar cevaba sekonder olarak salınır ¹. Aşırı salgılanan IL-10 düzeyleri immün disfonksiyona neden olabilmektedir ¹ ve yapılan çalışmalarda yanık sonrası IL-10’ un aşırı aktivitesi saptanmıştır ⁶¹⁻⁶². Yanık sonrası immün cevap şekil-1’ de özetlenmiştir.



Şekil -1. Yanığa sistemik immün cevap⁵²

3.7.2.5 Gastrointestinal Cevap

İntestinal peristaltizmin kaybolması ve ileus, gastrik dilatasyon, mezenterik kan akımında azalma, gastrik sekresyon artışı ve ülser, gastrik hemoraji yanık sonrası görülebilen gastrointestinal bulgulardır ⁵². Bununla beraber kalsiyum, aminoasit, vitamin gibi vücut için gerekli olan maddelerin gastrointestinal yolla emiliminde bozulma mevcuttur.

Yanık sonrası, yanığın büyüklüğüne göre değişen oranlarda hepatik hasar meydana gelmektedir ¹. Akut dönemde ilk bulgulardan biri karaciğerde gelişen ödem formasyonudur ve bu yaklaşık 2.-7. günler arasında daha fazla görülmekle birlikte yapılan çalışmalarda karaciğer ağırlığında artma gösterilmiştir. Bu ödem sonucu karaciğer hücre hasarı ve hepatik enzimlerde artış görülmektedir ¹. Hasarın devam etmesi, sepsis gibi klinik tabloların eklenmesi ile birlikte hepatik disfonksiyon gelişmekte buna bağlı olarak intrahepatik kolestaz ve enerji metabolizması, pıhtılaşma faktörleri üretimi, vitamin metabolizması gibi bir çok metabolik süreç etkilenmektedir ¹.

3.7.2.6 İskelet ve Kas Sistemi

Yanık sonrası oluşan inflamatuvar ve hormonal cevap ile kas ve iskelet sistemi etkilenmektedir. Kemik hücrelerinde apoptozis ve kemik rezorpsiyonu, kas katabolizması yanık sonrası görülebilen durumlardandır ¹⁻⁶³.

3.7.2.7 Hematopoetik Sistem Cevabı

TVYA' ya göre %10 ve üzeri yanıklarda sıklıkla anemi görülmektedir ⁶⁴⁻⁶⁵. Aneminin büyüklüğü yanık hasarına göre değişir. %15-40 arası büyüklükte tam kat yanığı olan hastalar ilk 6 saat içinde eritrositlerinin yaklaşık %12' sini, ilk 24 saat içinde yaklaşık % 18' ini kaybetmektedir ¹. Bunun sebebi travmanın direk etkisi ile birlikte , özellikle ciddi yanıklardan sonra arteriyol, venül ve kapiller damarlarda meydana gelen trombüs gelişimidir. Bununla birlikte akut fazla görülen anemiye rağmen, ödem formasyonu ve intravasküler sıvının hücreler arası boşluğa doğru yer değiştirmesi ile birlikte hematokrit seviyeleri yüksektir.

Yanık hastalarında pıhtılaşma yollarındaki bozukluk nedeniyle, gelişebilecek organ yetmezliğine de etkisi olan hiperkoagülasyon durumuna yatkınlık ve mikrosirküler trombüs oluşumu mevcuttur ⁶⁶. Bu tablodan trombosit matürasyonu ve fonksiyonunda bozulma, koagülasyon kaskadı proteinlerinin yapısında değişme gibi anormal durumlar sorumludur ¹. Bununla beraber aşırı yapılan sıvı resüsitasyonu da dilüsyonel etkiyle trombositopeni benzeri tabloya yol açabilmektedir. Akut fazda sıvı resüsitasyonu ve trombositlerin kapiller mikrosirkülasyonda kaybedilmesi ile birlikte görülen trombositopeni durumu yaklaşık 1 hafta sürmektedir ¹. 2-3. haftalarda yapım nedeniyle bu değerler normal haline ulaşır veya aşırı yapım sebebiyle trombositozis durumu gelişebilir ¹. Bununla birlikte bazı yanık hastalarında trombosit yıkımı ve trombositopeni durumunda düzelme olmayabilir ve bu kötü prognoz işaretidir ⁶⁷.

Yanık hastalarında trombositlerle birlikte pıhtılaşma faktörleri ve proteinlerinin de yapıları ve sayıları değiştiği için trombotik- antitrombotik denge bozulmuş durumdadır. Yapılan çalışmalarda yanık hastalarında koagülasyon faktörlerindeki artışa ilaveten, antitrombin III, protein S ve protein C gibi antitrombotik proteinlerin miktarında da düşüşün olduğu gösterilmiştir ⁶⁷⁻⁶⁸⁻⁶⁹. Bu durum damar içindeki dengenin hiperkoagülasyon yönüne kaymasına neden olmaktadır.

Antitrombin III bir serin-proteaz inhibitörüdür, hemostazı dengeler ve anti-inflamatuvar etkileri mevcuttur ⁷⁰. Hayvan modellerine dışardan antitrombin III verilerek, trombüse olan meyilin kırılması ve mortalitenin azaltılması gibi faydaları gösterilmiştir ⁷⁰⁻⁷¹.

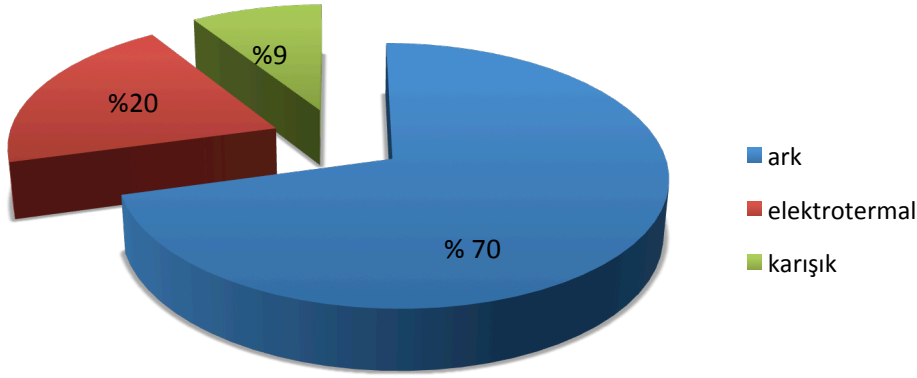
Doku plazminojen aktivatör protein miktarında artma ve fibrinolitik yol aktivasyonu, tromboza yatkınlık, doku faktörü ve doku fosfolipidlerinin salınımı, kompleman kaskadı aktivasyonu, doku iskemisi ve duruma sepsis gibi predispozan faktörlerinde eklenmesi ile klinik tablo DIC ile sonuçlanabilmektedir ¹. DIC tablosunda aktive intravasküler koagülasyon ve fibrin formasyonu, vasküler trombosit ve sonucunda organ yetmezliği görülmektedir ¹. Post-mortem çalışmalarda ciddi yanık sonrası % 30 oranında DIC ile uyumlu bulgular görülmüştür ¹.

3.8 Elektrik Yanıkları

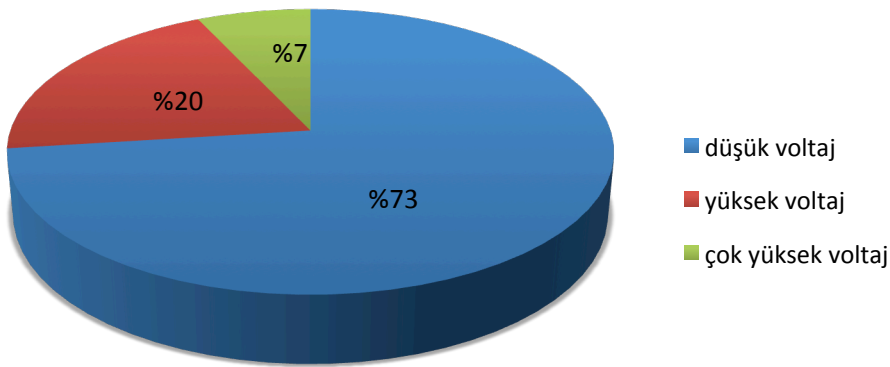
Elektrik yanıkları etiyolojik neden olarak daha az bir orana sahip olmasının yanında , insanda bıraktığı hasarın büyüklüğü nedeniyle önemli bir mortalite ve morbidite oranına sahiptir ⁷².

Hastanede kalış süresi uzunluğu ve yapılacak cerrahi prosedürlerin çokluğu nedeniyle aynı zamanda önemli bir mali yükü içinde barındırır ⁷³.

Elektrik yanıkları erkek işçilerde daha sık görülmektedir. 1000 volt altındaki yaralanmalar düşük, 1000- 50.000 volt arasında yüksek, 50.000 volt üzerindeki yaralanmalar çok yüksek voltajlı yaralanmalar denir ⁷⁴. Yaralanma akımın doğrudan etkisi şeklinde, ark yaralanması, flaş yaralanması ve bunların karışımları şeklinde olabilmektedir ¹. 1996-2005 yılları arasında yapılan 311 hasta üzerindeki çalışmaya göre voltaja ve yaralanma şekline göre sınıflama aşağıda özetlenmiştir ⁷⁴.



Grafik- 3. Elektrik yanıklarının sınıflaması ⁷⁴



Grafik-4. Voltajlarına göre elektrik yanıkları ⁷⁴

Elektrik yanığı, vücutta hasarı iki şekilde yapmaktadır, bunlardan biri vücutta yarattığı termal hasarken, diğeri hücresel düzeyde yaptığı elektrotravmadır ⁷⁵. Bu travma sonucu deride ve derin yapılarda nekroz, nekroz sonucu özellikle ekstremitelerde fonksiyon kaybı veya total kayıp ve bununla beraber böbrek yetmezliği ve sepsis gibi hayatı tehdit edecek klinik durumlar ortaya çıkmaktadır ⁷⁵.

Dokularda oluşan hasar kendi rezistansları ile de doğrudan ilişkilidir ¹.

$$\text{Güç (joule)} = I^2 (\text{akım}) \times R (\text{rezistans})^1$$

Dokuların rezistans oranları küçükten büyüğe doğru ; sinir, damar, kas, deri, tendon, yağ ve kemik olarak sayılabilir ¹. Buna göre derindeki yapılar, özellikle peri-osseöz yapılar , (tibia-fibula, radius- ulna arasında) daha fazla etkilenmektedir ve eşlik eden mikro ve makro vasküler yapıların hasarı ile birlikte hasar çoğu zaman geri döndürülemez olmaktadır ¹. Hasar daha çok ekstremitelerde ve özellikle el ve ayak bileğinde görülmektedir ¹.

Özellikle yaşanan klinik durumlardan biri de kalpte görülen ventriküler fibrilasyondur ¹. Kas hasarına bağlı artan myoglobülin seviyeleri nedeniyle myoglobülinüri, tübüler obstrüksiyon ve buna sekonder böbrek yetmezliği görülebilmektedir ¹. Kas hasarı sonucu oluşan ödem ve hacimde genişleme, fasyalar altında kasın sıkışması dolaşımının bozulması ve sonucunda kompartman sendromuna neden olabilmektedir ¹.

3.9 Kimyasal Yanıklar

Kimyasal yanıklar etiyolojik olarak % 3 gibi bir orana sahipken, yanık nedenli ölümlerin yaklaşık %30 ‘ u kimyasal yanık nedenlidir ¹. Genel olarak bütün yanıklardaki temel sorun olan protein denatürasyonu , kimyasal yanıklar içinde geçerlidir. Kimyasal maddeler ortamın pH değerini ve moleküller arasındaki hidrojen bağlarını bozarak, aynı zamanda kimyasal metabolitlerin ve toksinlerin kana karışması ile etki gösterirler. Genel olarak 6 şekilde etki görülmektedir ¹.

Redüksiyon : Dokulardan serbest elektron yakalayıcısı olarak etki ederler. Hidroklorik asit ve nitrik oksit yanığı vs.

Oksidasyon : Temas halindeki ve etrafındaki dokuyu okside ederek hasar verirler. Sodyum hipoklorit, potasyum permanganat vs.

Koroziv ajanlar: Temas halindeki dokularda protein denatürasyonu yaparlar. Eskar formasyonu ve ülser geliştirirler. Fenoller, sodyum metalleri vs.

Protoplazmik Zehirler : Dokunun vital fonksiyonları için gerekli olan Ca^{++} ve benzeri iyon kanallarına bağlanarak veya inhibe ederek etki gösterirler. Alkali asitler, asetik asit, formik asit, hidroflorik asit vs..

Zehirli Gazlar : İskemi yaratarak anoksik nekroza neden olurlar. Dimetil sülfoksit vs.

Kurutucu Etkili Olanlar: Dokuda dehidratasyon yaratarak, aynı zamanda ekzotermik reaksiyon ile ısı üreterek dokuya zarar verirler. Sülfürik asit vs.

Asit yanıkları dokuda koagülasyon nekrozuna neden olurken, alkali yanıklar likefaksiyon yanıklarına neden olurlar. Alkali yanıkları daha derin dokulara penetre olma ve hasar verme özelliğinde oldukları için, asit yanıklarına göre tahrip etme güçleri daha yüksektir ⁷⁶.

Kimyasal yanıklı hastada, hasta ajandan uzaklaştırılmalı, nötralizan madde kullanılmamalı, ağrı kesilinceye kadar yanık alanı bol su ile irrige edilmelidir.

3.10 İnhalasyon Yanıkları

İnhalasyon yanıkları; nadiren görülen akciğerlerin direk termal hasarı yerine daha çok yanık ürünleri ve buharlarının solunması şeklinde olmaktadır. Yanıkla birlikte inhalasyon yanığı mevcudiyeti mortalite oranını arttırmaktadır ³⁴. Bu yaralanma şekli daha çok kapalı alanda yanık travması maruziyeti sonrasında oluşmakta iken açık alanda yaşanan yanık travmalarında inhalasyon yanığı birlikteliği daha azdır ³⁴.

Karbonmonoksit gazının hemoglobine bağlanması ve oksijen taşınmasını olumsuz etkilemesi nedeniyle, karbonmonoksit inhalasyonu klinik olarak daha ciddi seyredebilmektedir ³⁴.

Tanıda fizik muayene, arteriyel kan gazı ve karboksihemoglobin düzeylerinin değerlendirilmesi gerekir ³⁴.

İnhalasyon yanıkları üst havayolları hasarı, alt hava yolları hasarı, akciğerlerin parankimal hasarı ve sistemik toksisite olarak 4 grupta incelenebilir ¹.

Tedavi genellikle destek tedavisi şeklindedir. Steroidler tedavide faydalı değildir ve profilaktik antibiyoterapi kullanımından sakınılmalıdır ³⁴.

3.11 Yara İyileşmesi

Yara, deri ve altındaki yumuşak dokunun bütünlüğünün, yapısının ve fonksiyonunun bozulması sonucunda gelişmektedir ⁷⁷ ve buna sebep olan etmenlerden bir tanesi de yanık travmasıdır. Normal bir yarada izlenen fizyolojik değişiklikler ve aşamalar inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillendirme fazlarıdır ³⁴. Bu fazları birbirlerinden keskin bir biçimde ayırmak zordur, başlangıç ve bitiş zamanları bir birleri üzerine binmektedir.

3.11.1 İnflamatuvar Aşama

Bu aşama yaralanmadan hemen sonra başlamaktadır. Yırtılmış kan damarları içerisindeki trombositler damar içinden yara yerine çıkarak kümeleşir ve hemostaz gelişir. Bu aşamada trombositler degranüle olarak ortama PDGF ve TGF- beta gibi büyüme faktörleri salarlar ³⁴⁻³⁸.

Kompleman sistemi ürünleri, ortama salınan büyüme faktörleri ve mevcut bakteriyel degradasyon ürünleri sonucunda yara yerine inflamatuvar hücre göçü gerçekleşir. Yaklaşık ilk iki gün içinde yara yerine nötrofil akını olmaktadır ve burada amaç fagositoz ile ölü dokuların ortamdaki uzaklaştırılması ve enfeksiyon ile mücadeledir ³⁴⁻³⁸.

48-72 saat içinde yara yerine monosit / makrofaj göçü başlar ve bu hücreler yara iyileşmesinin kilit hücreleridir ³⁴. Debris ve ölü dokuların fagositozu, enfeksiyon ile mücadele, ekstraselüler matriks yapımı için büyüme faktörlerinin üretimi, angiogenezis gibi bir çok olaydan bu hücreler sorumlu ve yardımcıdır ³⁴.

Yara yerinde monosit/ makrofaj eksikliği sonucunda yara iyileşmesi olumsuz bir şekilde etkilenmektedir ⁷⁸.

Lenfositler bölgeye en son gelen hücrelerdir ve yara yerine 5-7 gün sonra gelirler ³⁴.

CD4 ve CD8 lenfositlerin yara iyileşmesinin ileriki aşamalarının düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir ⁷⁹.

3.11.2 Proliferatif Aşama :

Proliferatif fazın yaralanmayı takiben 4- 21. günlerde ortaya çıktığı düşünülmektedir ³⁴.

Geçici fibrin matriksi, yeni bir migrasyon platformuyla kademeli olarak yer değiştirerek granülasyon dokusunu meydana getirmektedir bu doku fibroblast, makrofajlar ve endotelyal hücrelerden oluşmaktadır ³⁴. Makrofajlar tarafından bir çok büyüme faktörü ortama salınarak kollajen ve yeni damar oluşumu düzenlenmektedir ³⁴.

Granülasyon dokusu yaralanmayı takiben 4. günde ortaya çıkar ve bu süre zarfında fibroblastlar ekstraselüler matriks yaparak keratinosit migrasyonu için ortam hazırlarlar ³⁴.

Bu matriks içinde sonradan Tip-1 kollajen ile yer değiştirecek olan Tip-3 kollajen üretimi yapılmaktadır ³⁴⁻⁸⁰.

3.11.3 Yeniden Şekillendirme Aşaması

Yara iyileşmesinin en uzun bölümüdür ve insanlarda 21 gün ile 1 yıl arasında sürdüğüne inanılır. Yaranın granülasyon tabakası ile dolmasının ardından keratinosit göçü ve üzerinde re-epitelizasyon gerçekleştiğinde yeniden şekillendirme aşaması başlamaktadır ³⁴.

Bu aşamanın karakteristik özelliği yara kontraksiyonu ve kollajen matürasyonudur. Yara kontraksiyonu myofibroblastlar tarafından gerçekleştirilir ³⁴⁻³⁸.

Başlangıçta üretilen ve yaraya döşenen Tip -3 kollajen ; makrofajlar, fibroblastlar ve endotelyal hücrelerin salgıladığı metalloproteinazlar tarafından muamele görerek, matür kollajen formu olan Tip-1 kollajen ile yer değiştirir ³⁴⁻³⁸.

3.12 Yanık Tedavisi

Yanık travmasının değerlendirilmesi diğer travmalara yaklaşımla aynıdır ve ilk olarak havayolu, solunum ve dolaşım kontrolü ile başlanır.

Hastaların havayollarının açık olup olmadığı değerlendirilmelidir. Endotrakeal entübyasyon yapılacak ise erkenden durumun tahmin edilebilmesi ve ödem formasyonu gelişmeden bu kararın alınması önemlidir ¹.

Hastanın primer yaşamsal fonksiyonları değerlendirilmeli; havayolu, solunum ve dolaşım değerlendirilerek hastanın inhalasyon yanığı mevcudiyeti sorgulanmalı ve not edilmelidir ¹.

Hastalar baştan ayaklara kadar hasta fiziksel olarak değerlendirilerek yanık yüzdesi ve yanık derinliği hesaplanmalı, İV yol, diürez monitörizasyonu, özellikle elektrik yanıklarında kardiyak monitörizasyon, sedasyon veya analjezi, gerekli ise trakeal entübyasyon ve nazogastrik tüp uygulaması ve yara temizliği yapılmalı ¹, hastaların yanık merkezine sevk kriterleri sorgulanmalıdır.

Tablo -5 . Hastaların yanık merkezine yönlendirilme kriterleri ³⁴

% 10 TVYA ‘ dan fazla, 2. ve 3. derece yanıklı 10 yaşından küçük, 50 yaşından büyük hastalar.

% 20 TVYA ‘ dan fazla 2. ve 3. derece yanığı olan diğer gruplar.

Yüz, eller, ayaklar, genital bölge, perine ve büyük eklemlerde fonksiyonel ve kozmetik bozulmanın ciddi tehdit ettiği 2. ve 3. derece yanıklar.

% 5 TVYA ‘dan fazla 3. derece yanığı olan herhangi bir grup.

Alev yanığı da içeren elektrik yanıkları.

Kozmetik veya fonksiyonel bozulmayı ciddi tehdit eden kimyasal yanıklar.

İnhalasyon yanıkları.

Çepeçevre olan yanıklar.

Daha önceden var olan diğer tıbbi hastalıkları bulunan hastalar.

Ek travması olan hastalar.

Çocuk bakımı için gerekli kalifiye elamanı olmayan hastaneler mevcudiyetinde bunları yapabilecek yanık merkezine sevk uygundur.

3.12.1 İntravenöz Yol

İntravenöz yol; sıvı resüsitasyonu ve analjezi sağlanması için çok önemlidir, %30' dan daha az yanığı olan hastalarda iki periferik İV yol, daha büyük yanığı olan ve inhalasyon yanığı olan hastalarda ek olarak santral venöz katater uygulanmalıdır ³⁴.

3.12.2 Eskarotomi

Ekstremitelerdeki tam kat çepeçevre yanıklarda ve göğüs kafesini saran tam kat yanıklarda ventilasyon yetersizliği ve dolaşım bozukluğu gerçekleştiğinde endikedir ³⁴.

3.12.3 Topikal Yara Ajanları

Yanık merkezine ulaşan hastaların yaraları hemen su ve sabunla temizlenmelidir. Yanık alanındaki vücut kılları traş edilmeli, pansuman veya banyo odasında günlük su ve sabunla yara temizliği yapılmalıdır ³⁴.

Pansuman vücudu enfeksiyonlara karşı korumakla birlikte buharlaşma yolu ile kaybolan sıvı miktarını da azaltmaktadır. İdeal pansuman malzemesi; pahalı olmamalı, kolay uygulanabilir olmalı, uzun süre etkinliğini koruyabilmeli ve hasta için konforlu olmalıdır ³⁴.

Yüzeyel yanıklarda, epitelyal iyileşmeyi hızlandırıcı losyonlar ; yüzeyel kısmi kalınlıkta yanıklarda, mikrobiyal koruma sağlayan ve yarayı nemli tutan ajanlar; derin kısmi kalınlıkta yanıklarda, eskarı mikrobiyal kolonizasyondan koruyan ajanlar (eskarın kaldırılmasından sonra spontan epitelizasyon için vazelinli antibiyotik pomad emdirilmiş gazlı bezler vs.), tam kat yanıklarda yine debridman yapıncaya kadar topikal antibiyotiklerin kullanılmasında fayda vardır ³⁴.

3.12.3.1 Gümüş Sülfadiyazin : En sık kullanılan ajandır, Gram (+) bakterilere karşı oldukça etkili olmakla birlikte eskara penetre olmaz ³⁴. En önemli komplikasyonu lökopeni oluşturmaktadır ³⁴.

3.12.3.2 Mafenide: Diğer sık kullanılan ajanlardandır, gümüş sülfadiyazın gibi hem gram (+), hemde gram (-) bakterilere karşı etkili olmakla birlikte eskara penetre olabilir ¹⁰. Metabolik asidoza ve ağrıya neden olabilmesi istenmeyen etkileridir ³⁴.

3.12.4 Sıvı Resüsitasyonu

Sıvı resüsitasyonu formülleri % 15 ile % 20 TVYA' dan büyük yanığı olan hastalara uygulanmalıdır, % 20 TVYA' dan az yanığı olan uyanık ve bilinci açık hastaların oral alımına izin verilmelidir ³⁴. Yanıktaki sıvı resüsitasyonu; deri kaybı sonucu buharlaşma yoluyla sıvı kaybı ile birlikte, sistemik yanıt sonrası hasarsız alanlarda dahi kapiller geçirgenliğin artması sonucunda sıvının damar içinden interstisyuma geçerek doku perfüzyonlarının bozulmasını engellemek adına oldukça önemlidir ³⁴.

20. yüzyılın ilk yarısında yanık travması sonrasında sıvı resüsitasyonunun önemi anlaşılmış ve çeşitli formüller geliştirilerek verilecek sıvı miktarı formülize edilmeye çalışılmıştır. Şu an bir çok merkezde kullanılan formül Parkland Formülüdür ve buna göre verilecek sıvı miktarı ;

$$4 \text{ ml (Ringer Laktat) } \times \text{ kg } \times \% \text{ yanık }^{34}$$

şeklindedir. Hesaplanan sıvının yarısı ilk 8 , geri kalanı 16 saatte verilir ve idamesi yapılır.

Hangi formül kullanılırsa kullanılsın her hasta kendi içinde ayrı değerlendirilmelidir ve bu amaçla hastaya verilen sıvı miktarının yeterli olup olmadığının anlaşılması için idrar çıkışı önemli bir parametredir.

Erişkinlerde 30 ml / saat, çocuklarda 1 ml / kg / saat idrar çıkışı sağlanması organ perfüzyonu için önemlidir. Hastanın idrar çıkışına göre verilen sıvı miktarı arttırılıp azaltılabilir. Elektrik yanıklarında myoglobinüri mevcudiyetinde idrar çıkışı 100 ml / saat olacak şekilde, verilecek sıvı miktarı idrar temizlenene kadar arttırılabilir.

Protein solüsyonları (kolloidler) , uzun süre yanık tedavisinde kullanılmışlar (Evans ve Brooke fomülleri) fakat uzun yıllar tartışma konusu olarak kalmışlardır ³⁴. Burada amaç damar içindeki onkotik basıncın arttırılması ve buna bağlı kapiller sızmada azalmanın sağlanması şeklindedir. Fakat erken dönemde kapiller geçirgenlikte artışın olması ile birlikte interstisyel alana kolloid sızması ve doku ödeminin artması görülebilmektedir ve bu sebeple ilk 12-24 saat kolloid kullanılması genellikle önerilmemektedir ³⁴.

3.12.5 Sistemik Antibiyotik Tedavisi

Yanık sonrası hasar gören deride bakteri kolonizasyonu hızlanır. Bu bakteriler hastanın kendi endojen deri , GİS ve respiratuvar sistem florasındaki bakterilerdir.

Yanık yarasında en sık kolonize olan gram (+) mikroorganizmalar arasında ; S. Aureus , MRSA ve Gram (-) mikroorganizmalar arasında P.aeruginosa ve E.coli sayılabilir ⁸¹.

Profilaktik sistemik antibiyotik kullanımının yara yeri enfeksiyonu oluşmasını azaltmadığını aksine dirençli organizmalar ile enfeksiyonunun daha fazla meydana geldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur ⁸¹.

3.12.6 Cerrahi Yöntem

Yanık alanın büyüklüğüne, yanık derinliğine, ölü dokunun var olup olmaması ve yapılacak erken eksizyon sonrası yara yatağının mevcut durumuna, altta kalan dokunun tipine göre yara; sekonder iyileşme, çeşitli pansuman malzemeleri ile müdahale, greftleme, pediküllü veya serbest flep ile rekonstrükte edilerek kapatılabilir.

3.12.6.1 Erken Eksizyon

Yanık yarasına cerrahi yaklaşımda erken yara eksizyonunun önemi aşıkardır ⁵. İlk erken tanjansiyel yanık yara eksizyonu ve greft ile rekonstrüksiyon başarılı bir şekilde Janzekovic tarafından uygulanarak popülerize edilmiştir ⁸².

Gelişmiş ülkelerde elde edilen faydalar nedeniyle , özellikle ciddi yanıklarda erken tanjansiyel eksizyon standart tedavi algoritması içerisinde ⁶⁻⁷. Erken tanjansiyel eksizyon ve greftleme ; mortalite ve morbiditede azalma, enfeksiyon hızında azalma ve hastanede kalma süresinde kısaltmaya neden olmakta ve ek olarak eskarın erken eksizyonu ile hipertrofik skar gelişme riski azalmakta ve ortama salınan inflamatuvar mediatör salınımı azalmaktadır ⁷⁻⁸⁻⁹⁻¹⁰⁻¹¹.

Yapılacak erken eksizyon için zamanlama konusunda literatürde değişik bilgiler mevcutken ilk 24 saatlik periyottan 6. güne kadar yapılabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur ⁷⁻⁸³.

3.12.6.2 Serbest Flepler

Serbest flepler; vücudun herhangi bir yerinde gelişen doku defekti rekonstrüksiyonları amacıyla, bu defektif alana uzak, vücudun uygun başka bir yerden alınan dokulardır ¹². Flep , kendisini besleyen arter ve ven (pedikül) ile birlikte diseke edilip kaldırılır; arter ve ven , taşınacağı bölgedeki uygun alıcı arter ve ven'e mikrocerrahi yöntemle anastomoz yapılır ¹².

Mikrocerrahi yöntemle yayınlanmış ilk serbest flep, 1973 yılında Daniel ve Taylor tarafından uygulanan kasık flebidir ⁸⁴.

Serbest doku nakilleri vücuttaki geniş doku defektlerini rekonstrükte etmek için kullanılır ¹³. Genellikle kanser cerrahisi (baş boyun tümörleri) sonrasında veya travmaya bağlı olarak gelişen (alt ve üst ekstremiteler, meme kanseri sonrası meme rekonstrüksiyonları vs.) doku kayıplarında kullanılmakla birlikte, uygun seçilmiş hastalarda serbest flep kullanımının önemli rol oynadığı durumlardan biri de yanıklardır ¹³⁻¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷.

Mikrocerrahinin gelişmesi ve ile birlikte yanık hastalarında serbest flep kullanımı; önceleri yanığa bağlı kontraktürlerin açılması gibi ikincil rekonstrüktif operasyonlar için kullanılmakta iken günümüzde derin yanıklar sonucunda açıkta kalan kemik, sinir, tendon ve damar gibi yapıların üzerlerinin kapamasında daha sık kullanılmaktadır ¹³⁻¹⁴⁻¹⁸⁻¹⁹.

Akut yanık sonrası yapılan debridman sonrasında eğer uygun iyi vaskülarize yara yatağı mevcut ise ilk basamak olarak deri grefti uygulamaları yapılmakta uygun yara yatağının olmadığı durumlarda ise diğer bir seçenek olarak lokal flep uygulamaları yapılmaktadır ¹³. Bununla birlikte yanıklı hastalarda genellikle hasara bağlı olarak yanık çevresindeki dokulardan lokal flep kaldırılması özellikle ekstremitelerde çoğu zaman mümkün olmamaktadır ve bu durumda en uygun seçenek serbest flep uygulamalarıdır ¹³.

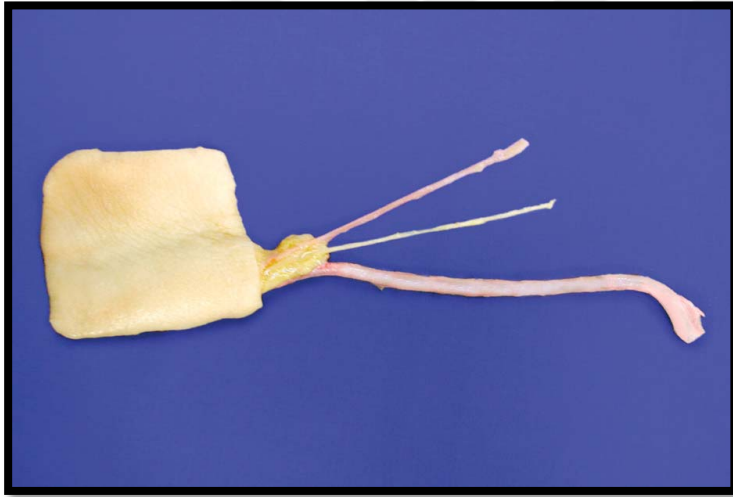
Flebin hasarsız bölgeden kaldırılması ve iyi vaskülarize olması; kemik, deri, kas, sinir ve bunların kombinasyonları ile birlikte kompozit olarak kaldırılabilmesi ve kompleks defektlerin rekonstrüksiyonlarına cevap olabilmesi, hastanede kalış süresini kısaltması, yaranın erken kapanmasına olanak sağlaması, komplikasyonları azaltması ve böylece hastaların kısa sürede taburcu edilebilmesi serbest fleplerin avantajlarından bazılarıdır ve serbest flep uygulamaları bazı durumlarda ekstremitte kurtarıcı uygulamalardır ¹³⁻¹⁴.

Ekstremiteler başta olmak üzere; anatomik olarak kemik, damar, tendon ve nörovasküler yapıların yoğun olarak bulunduğu, bu yapıların üzerlerinin kapatılmasında deri grefti uygulamalarının sınırlı olduğu ve lokal flep kullanımının uygun olmadığı defektlerde serbest

flepler önem arzeder²⁰. Özellikle distal 1/3 alt ekstremité defektlerinin rekonstrüksiyonlarında serbest flep uygulamaları altın standart yöntemlerdir²¹.

Serbest flep uygulamasının ne zaman yapılacağıının belirlenmesi önemli olup bu zamanla ilgili literatürde tam bir fikir birliği malesef sağlanamamıştır¹³.

Yapılan bir çok çalışmada ilk 1-10 gün içerisinde yapılan serbest fleplerde yüksek başarı oranları sağlanmışken; yine bazı çalışmalarda 5 ile 21. günlerde yapılan serbest fleplerde , 5. gün öncesinde ve 21. gün sonrasında yapılanlara göre çok daha düşük başarı oranları saptanmıştır¹³.



Resim -1. Yukardan aşağıya yüzeyel ven, radyal sinirin yüzeyel dalı ve flebin pedikülü ile birlikte radial önkol flebi⁸⁵

3.1.3 Kök Hücre Uygulaması

Kök hücreler farklılaşmamış fakat bir çok hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Farklılaşabilme potansiyellerine göre totipotent (omnipotent), pluripotent, multipotent ve unipotent olarak ayrılabilir ⁸⁶.

Genel olarak totipotent hücreler embriyonik her hücre türüne, pluripotent hücreler her üç germ yaprağı hücrelerine (ektoderm, mezoderm, endoderm), multipotent hücreler tek germ yaprağı hücrelerine (sonradan yapılan bazı çalışmalar ile pluripotent hücreler gibi diğer germ yaprağı hücrelerine dönüşebildikleri de gösterilmiştir) , dönüşme kapasitesi kısıtlı olan unipotent hücreler de tek hücre tipine farklılaşabilmektedir ⁸⁶. Orijinlerine göre kök hücreleri; memelilerde yaygın olarak erişilebilen , embriyonik ve erişkin kök hücreleri ⁸⁶⁻⁸⁷, fetüs organlarında bulunan fetal kök hücreleri ve uyarılmış pluripotent kök hücreler olarak ayırmak mümkündür ⁸⁶.

Embriyonik kök hücreler, blastokistin en iç hücre kümesinden köken alan pluripotent özellikte hücrelerdir ⁸⁸. İn-vitro olarak iskelet kası, endotel hücreleri, kontrosit veya myokardiyositlere dönüştürülebilirler ⁸⁹⁻⁹⁰. Bazı ülkelerde , çeşitli sosyal ve etik faktörler nedeniyle embriyonik kök hücrelerin elde edilmeleri, kültüre edilmeleri ve üzerinde çalışma yapılması kısıtlanmıştır ⁹¹.

Yamanaka ve arkadaşları tarafından; yetişkin fibroplastlar üzerinde çalışılmış , Oct3/4, Sox2, c-Myc ve Klf4 gibi transkripsiyon faktörleri kullanılarak ilk defa uyarılmış kök hücreler elde edilmiştir ⁹²⁻⁹³. Bu çalışma ile matür somatik hücrelerin dahi çeşitli uygulamalar ile pluripotent özellikte hücreler gibi değişik germ yaprağına ait hücrelere farklılaşabilme özelliğinin olduğu gösterilmiş ve çalışma 2012 yılı Nobel Ödülü' nü kazanmıştır ⁹²⁻⁹³.

Kök hücre kaynaklarından biri insan yetişkin kök hücreleridir. Bu kök hücreler mezenkimal hücrelerden elde edilmekte olup organ spesifiktir ve elde edildiği organa göre kemik iliği, adipoz doku, umbilikal kord kanı, periost, tendon, kas, muköz membranlar ve deri kaynaklı olabilmektedirler ²²⁻⁸⁶⁻⁹⁴.

2003 yılında ilk defa Shumakov ve arkadaşları tarafından kemik iliği kaynaklı kök hücreler, ratlarda deneysel yanık yarası tedavisinde kullanılmış; anjiyogenez ve granülasyon dokusu oluşumunun hızlanması gibi çeşitli etkileri görülmüştür ⁹⁵. Sonrasında Rasulov ve arkadaşları

tarafından kemik iliği kaynaklı kök hücre uygulaması ilk defa yanıklı bir insan üzerinde uygulanmış ve uygulamanın yara iyileşmesini hızlandırdığı vurgulanmıştır ⁹⁶.

Yağ dokusu insanda genel olarak deri altında (subkütan), iç organların etrafında, sarı kemik iliğinde ve memede bulunan; vücut indeksinin en azından %4'ünü oluşturan konnektif bir doku çeşididir ⁸⁷. Kolay elde edilebilir olması (liposakşın) ve düşük donör saha morbiditesi nedeniyle kök hücre eldesi için uygun ve sık tercih edilen bir kaynaktır. Çeşitli işlevlerine ek olarak ; bazı polipeptid, hormon ve sitokinler salgılayarak aynı zamanda endokrin bir organ gibi görev yapar ⁸⁷. Adiposit kaynaklı kök hücreler uygun stimuluslar ile adipojenik, kondrojenik, myojenik ve osteojenik olarak farklılaşabilmektedirler ⁹⁷⁻⁹⁸.

Adiposit kaynaklı kök hücrelerin PDGF, FGF, TGF beta gibi büyüme mediatörleri salgılayarak re-epitelizasyonun hızlanması; VEGF-A, HGF (hepatik growth faktör), FGF-2 gibi mediatörlerin salınımlarını arttırmakla yeni damar oluşumu, yaranın iyileşmesinin hızlanması, keratinosit ve dermal fibroblast proliferasyonunun artması gibi yara iyileşmesi üzerine bir çok olumlu etkilerinin ²²⁻²³⁻²⁴⁻²⁵⁻²⁶ yanında rekonstrüktif flep cerrahisinde iskemi sonrası görülen iskemi-reperfüzyon hasarını azaltarak flep survisine olumlu katkıları olduğu gösterilmiştir ²⁷.

3.1.4 Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF)

VEGF endotelyal hücreler başta olmak üzere vücutta bir çok hücre tarafından salgılanan büyüme faktörüdür. Bir çok görevinin yanında endotelyal hücreler için mitojen olarak görev yapar, anjiogenezis ve vaskülogenezisi indükler ⁹⁹⁻¹⁰⁰.

İlk olarak tümör dokusuna bağlı assit sıvısı içinde saptandığı için önceleri vasküler geçirgenlik faktörü olarak tanımlanmıştır ¹⁰¹. VEGF bir süper-ailedir ve VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasental Büyüme Faktörü şeklinde alt tipleri mevcuttur ¹⁰².

Yara iyileşmesi sırasında trombositlerden bir çok sitokin ile birlikte VEGF salınımı da artmakta, VEGF kemotaktik faktör olarak monosit ve nötrofillerin yara alanına göçünü sağlamak ve bu hücrelerde aynı zamanda endotelyal hücrelerle birlikte VEGF salgılamaktadır ¹⁰². Böylece vasküler geçirgenlikte artma , granülasyon dokusunun gelişmesi, endotelyal hücrelerin rejenerasyonunda artma ve anjiogenezis başlamaktadır ¹⁰².

Vasküler travma, mikrovasküler transplantasyon veya rekonstrüktif cerrahi ile alakalı replantasyon durumlarına sekonder gelişen entodel kaybı ; tromboz ve düz kas hücre proliferasyonunda artışa neden olarak stenoz ve damar oklüzyonuna neden olmaktadır ¹⁰³.

Mikrovasküler anastomoz hattındaki endotelyal tabakanın hızlı ve sorunsuz iyileşmesi; hattın tromboza uğramaması veya tıkanmaması; mikrocerrahi yöntem ile taşınan dokunun yaşamının devamı için önemlidir ¹⁰³.

Ratlarda yapılan deneysel mikrovasküler anastomoz sonrası intraluminal olarak VEGF verilmiş, buna bağlı olarak mikrovasküler anastomoz hattında re-endotelizasyonun hızlandığı ve hattın iyileşme hızının arttığı saptanmıştır ¹⁰³.



4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1 Etik Kurul Onayı

Çalışma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (77.637.435-18 sayılı onay belgesi) onayı ile yapılmıştır.

Kök hücre eldesi ve hazırlanması Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiş, çalışmanın yanık modeli oluşturulması ve deney aşamaları Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulamaları ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

4.2 Adipojenik Kök Hücre Eldesi ve kültürü

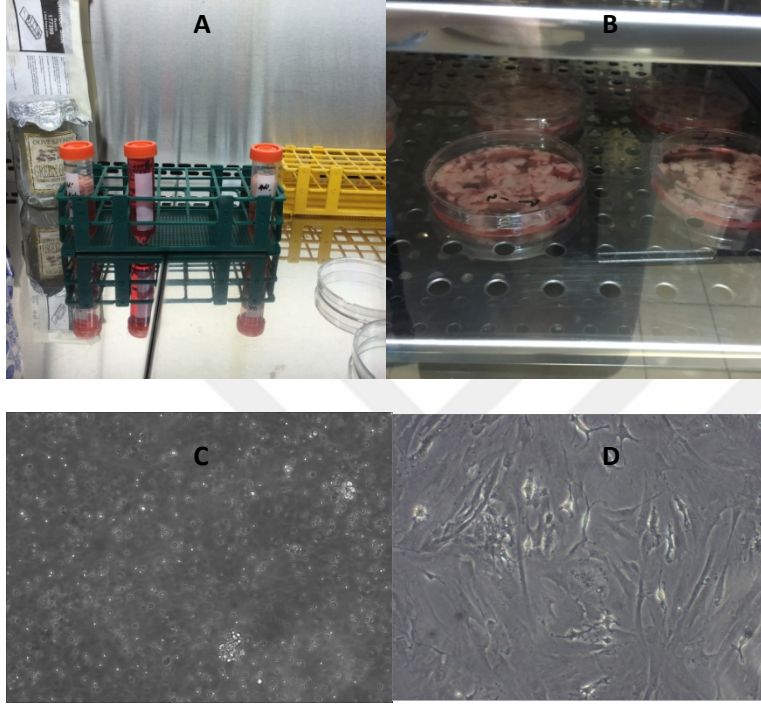
Adipoz Kökenli Mezenşimal kök hücre eldesi için 5 adet Wistar Albino 200-250 gr ağırlığında erişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır. Erkek sıçanlar intraperitoneal ketamin (50 mg/kg)/ksilazin (15 mg/kg) anestezi ile uyutulduktan sonra, servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Adipoz Kökenli Mezenşimal kök hücrelerin eldesi için inguinal yağ dokusu alınmıştır.

Adipoz dokular eksizyondan sonra PBS ve %5 penisilin-streptomisin ile yıkandıktan sonra bistüri ile dissosiye edilip, %0.075 kollejenaz tip 1 'in olduğu α -MEM 37 0C %5 CO2 hava ortamında 30 dakika inkübe edildikten sonra kültür vasatına (α -MEM, %20 FBS, %1 L-glutamin) alınarak en az 2 santirüjasyon işleminden sonra kültür kabına alınarak kültüre edilmiştir. Hücreler 2 hafta kültüre edilerek kök hücrelerin çoğalması sağlanmıştır.

4.3 Adipojenik Kök Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

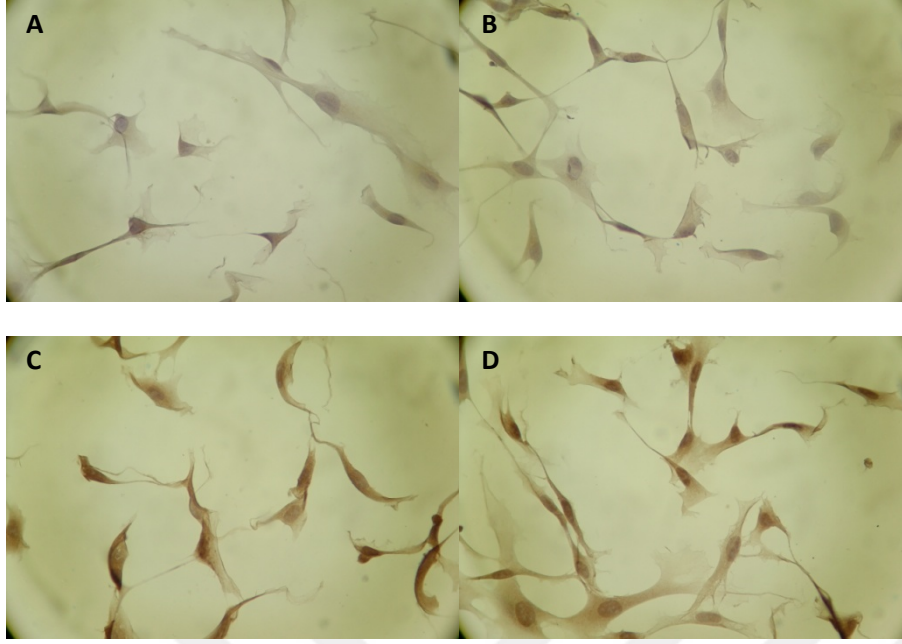
Adipojenik kök hücreler denekten elde edildikten sonra 50 ml lik tüplere steril olarak toplandı (Resim 2A). Daha sonra mekanik siddeksiyon işlemine takiben kollejenaz ile muamale edildi ve inkübatörde bekletildi (Resim 2B). Santrifüj işleminden sonra hücreler 25 cm lik hücre kültür flasklarına alındı (Resim 2C) ve inkübasyona bırakıldı. İlk alındıklarında hücrelerin yüzmekte olduğu, yuvarlak parlak olarak hücrelerin varlığı saptandı (Resim 2C). Eritrositlerinde kültür ortamında olduğu gözlemlendi. Kültüre devam edildiğinde adipojenik kök hücrelerin kültür kabına yapıştığı ve çoğaldığı saptandı (Resim 2D).

Olgun adipojenik hücrelerin çok az olduğu ve kültüre devam edilmesi ile bu hücrelerin sayıca azaldığı tespit edildi (Resim 2D).



Resim 2: Adipojenik kök hücrelerin eldesi (A) ve kültürü (B). Kültürün 1. günü (C) ile 1. haftasındaki (D) hücreler. X200.

Adipojenik kök hücrelerin karakterizasyonları için CD-34 ve CD-44 dağılımlarına immunohistokimyasal olarak bakıldı. Hematopoetik kök hücre belirteci olan CD-34' ün adipojenik kök hücrelerde negatif olmasının, mezenkimal kök hücre belirteci olan CD-44' ünde adipojenik kök hücrelerde pozitif olmasının karakterizasyon için yeterli olduğu düşünüldü. Kültürün 1. Haftasında yapılan immunoperoksidaz analizi sonrasında kültüre edilen hücrelerin CD34 (-) ve CD44 (+) olduğu saptandı (Resim 3).



Resim 3: Adipojenik kök hücrelerin CD34 (A,B) ve CD44 (C, D) immunohistokimyasal dağılımları. X200.

4.4 Deney Hayvanları ve Deneyin Yapıldığı Ortam

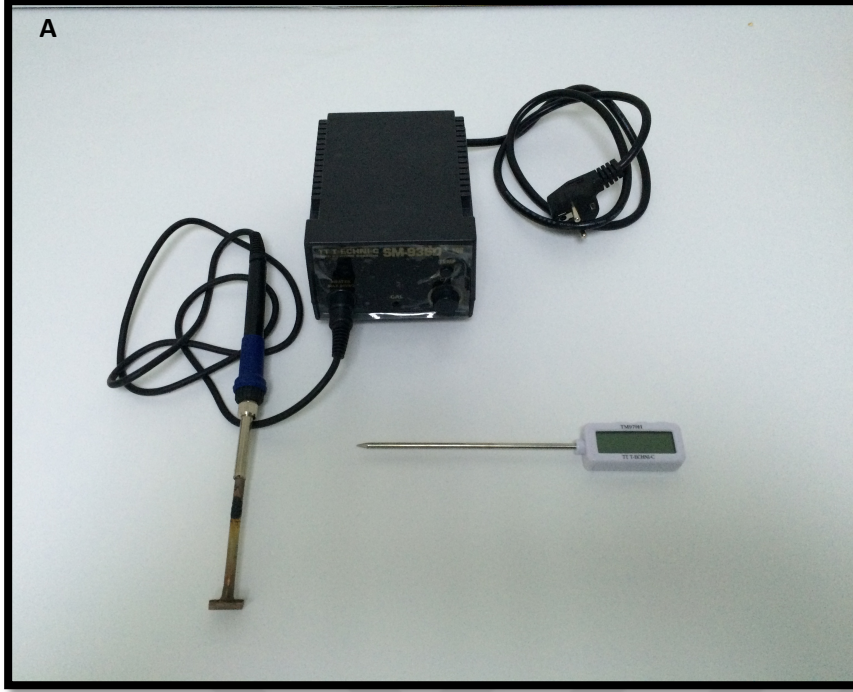
Çalışma süresince 24 adet, ortalama 300 gram ağırlığında erkek Wistar-Albino tipi sıçan kullanıldı. Çalışma süresince hayvanlar; 24 ± 1 °C ‘de oda sıcaklığında, 12 saatlik aydınlık/karanlık siklusu olacak şekilde uygun ışık alan ortamda , günde bir kez temizlenen kafeslerde tekli gruplar halinde barındırıldı. Yem ve suları ad-libitum olarak verildi ve altlık olarak talaş kullanıldı. Çalışmadan önceki 12 saatte yem kesilerek sadece su verilerek hayvanların kontrol ve bakımları düzen olarak yapıldı.

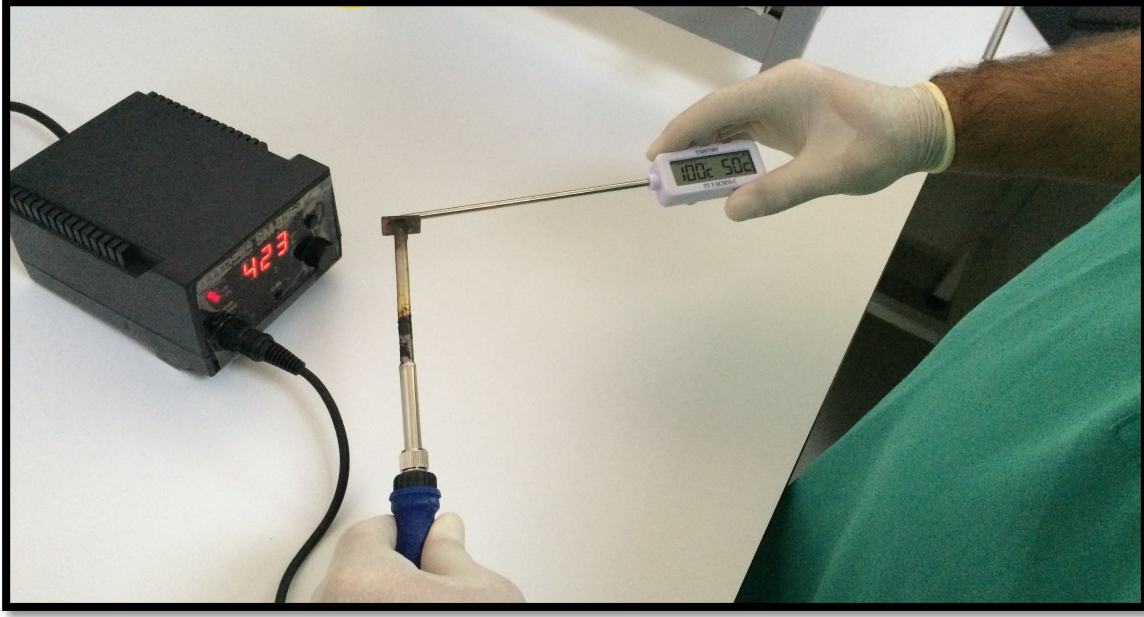
Anestezi için intraperitoneal 50 mg/kg Ketamin (Pfizer - Ketalar ®) ; analjezi ve sedasyon için ise 15 mg/kg Xylazine (Alfasan – Alfazyne ®) kombine olarak kullanıldı. Femoral arter anastomozları ; 10/0, 75 mikron sütürler ile standart mikrocerrahi tekniğe uygun olarak tek cerrah tarafından yapıldı.

4.5 Yanık Modelinin Oluşturulması

Çalışmada, kontrol grubu dışındaki diğerk gruplarda standart derin ikinci derece yanık oluşturulması hedeflendi. Bu amaçla elektrik enerjisi ile çalışan 1x1 cm' lik bakırdan bir uca sahip , sabit 100 °C sıcaklıkta tutulabilen bir havya düzeneğıne sahip cihaz kullanılmıştır ¹⁰⁴. Cihaz, 18 cm uzunluğunda , bakırdan yapılmış ve ucunda 1x1 cm boyutlarında damgası olan bir uzantıya sahiptir ¹⁰⁴. Sap kısmında kendine ait bir termometresi vardır ve cihazın ürettiğı sıcaklık buradan ölçölerek dijital ekranda gösterilmektedir ¹⁰⁴. Bakır damganın ucunda ise hassas termometre ile ölçölün sıcaklık konveksiyon ile ısı enerjisinin kaybından dolayı daha düşük ölçömektedir ¹⁰⁴. Fakat tekrarlayan ölçömlerde bakır damgada hassas termometre ile 100 °C ± 5 °C sıcaklıkları elde edilmiştir ¹⁰⁴. Her yanık modeli uygulamasından sonra sıcaklığı düşen damga tekrar 100 °C ' ye yükseltilerek yanık modelinin standardize tutulması amaçlanmıştır ¹⁰⁴.

Resim - 4A yanık modeli oluşturma cihazı , 4B termometre , bakır uç 4C

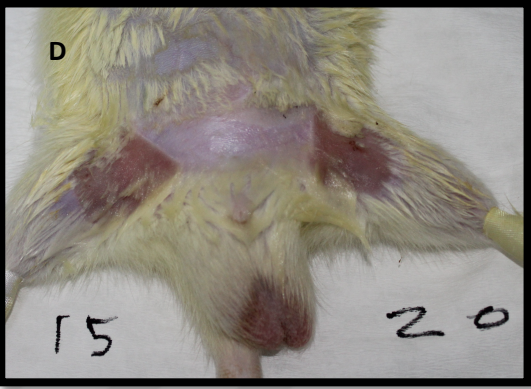
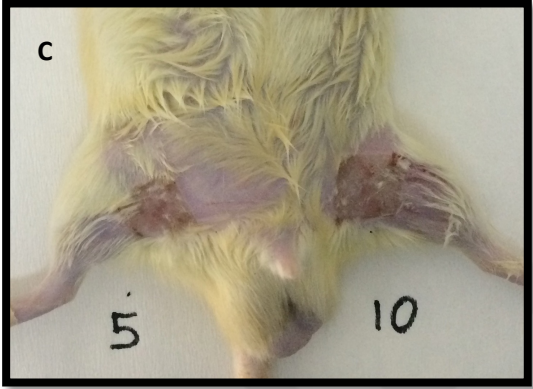




Resim 5. Bakır ucun 100 dereceye getirilmesi ve ölçümünü gösteren resim.

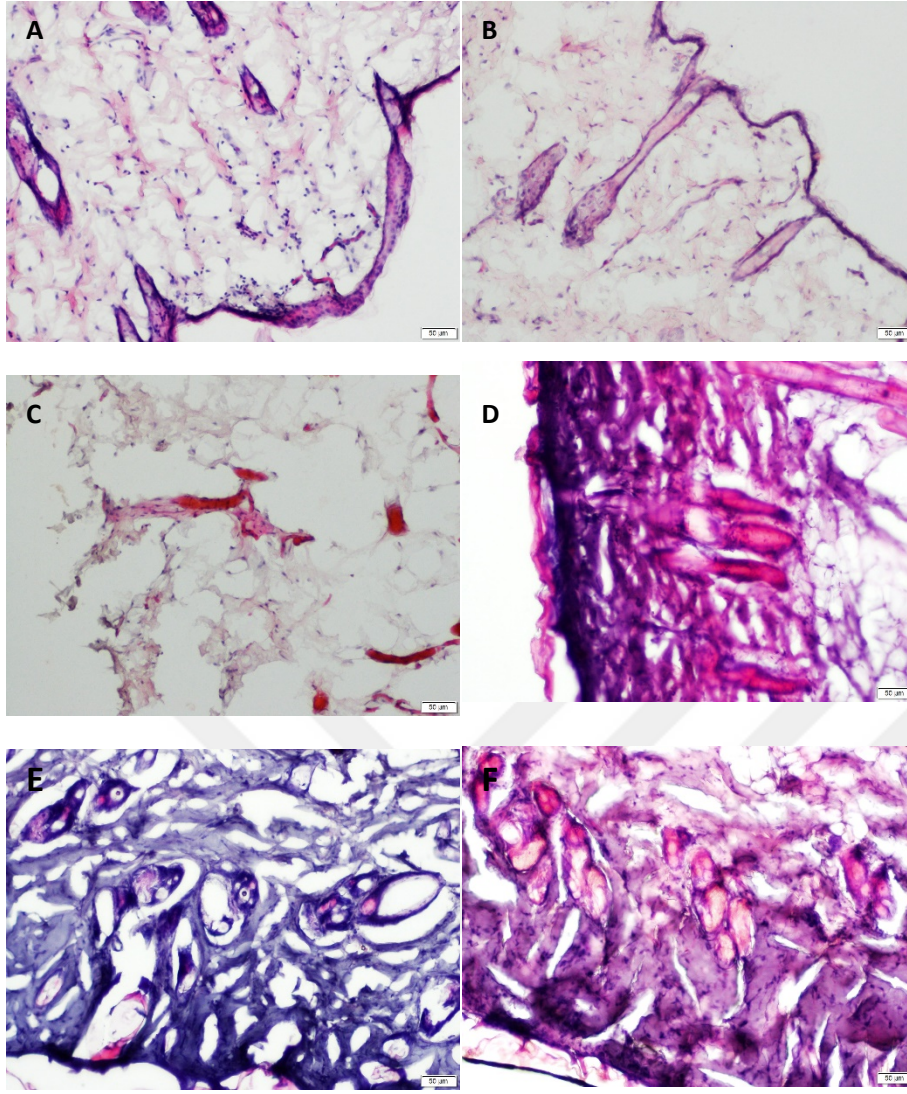
Sıçanlar üzerinde yapılmış deneysel yanık çalışmaları genellikle sırt derisinde uygulanmış ve literatür taramasında ingüinal bölgede yapılan bir yanık modeline rastlanılamamıştır. Sırt derisi ve ingüinal bölgedeki deri kalınlıkları farklı olduğu için cihaz ile öncelikle ingüinal bölgede bir yanık modeli oluşturulması amaçlanmıştır.

3 adet sıçanın intraperitoneal 50 mg/kg Ketamin ve 15 mg/kg Xylasin ile kombine anestezi-analjezi sağlandıktan sonra sırayla sol ve sağ ingüinal alanları traşlandıktan sonra bakır damga 100 °C olacak şekilde ısıtılarak yakıldı ve sırası ile bakır uç dokuya basılarak 1, 3, 5, 10, 15 ve 20 saniye tutuldu. Damar anastomozunun yapılabilmesi için damarların yanıktan doğrudan etkilenmemesi (yanmaması) amaçlanmış bu nedenle yanık derecesinin derin ikinci derece olması uygun görüldü.



Resim 6. İnguinal alanda yanık modeli oluşturulması. A- bakır ucun basılması, B- 1-3 saniye, C- 5 – 10 saniye ve D- 15- 20 saniye süre ile beklenen denekler.

Her alandan doku biyopsileri alınmış ve histolojik olarak hangi sürede derin 2. Derece derin yanık oluşturulduğu saptanmıştır.



Resim 7: Yanık modeli oluşturma aşamasında 1 sn (A), 3 sn (B), 5 sn (C), 10 sn (D), 15 sn (E) ve 20 sn (F) uygulama sonrası hematoksilen-eozin boyaması. Scale Bars: 20 µm.

Elde edilen histolojik sonuçlar neticesinde gerekli süre 10 saniye olarak görülmüş ve çalışma gruplarında bu süre standart alınmıştır.

4.6 Deney Grupları

21 adet sıçan randomize olarak kontrol, yanık ve yanık + kök hücre grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

Kontrol grubu (n=7) : Sıçanların sol femoral arterleri kesilerek tekrar anastomoz yapıldı. Operasyon sonrası 3. gün anastomoz patensine bakılarak histolojik ve biyokimyasal örnekler alındı.

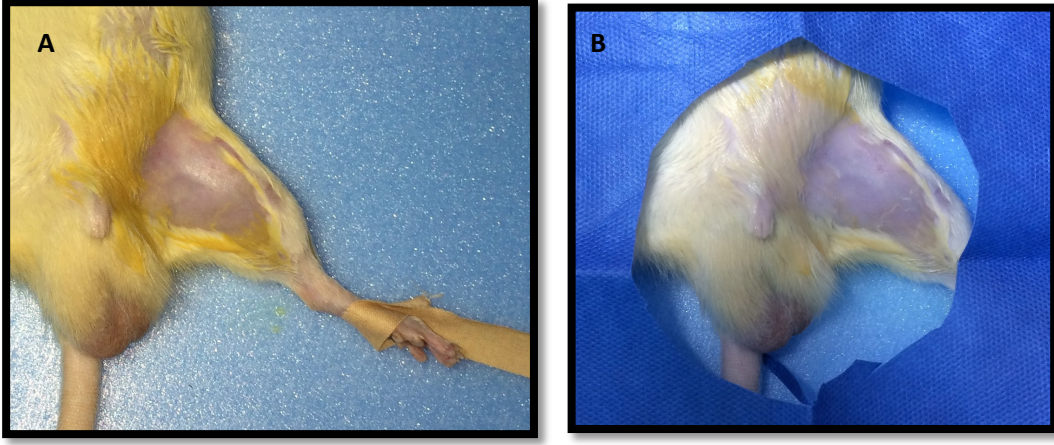
Yanık grubu (n=7) : Sıçanların sol ingüinal bölgeleri yukarıda anlatıldığı üzere yakıldı. Sonrasında yanık zemini altında kalan femoral arter kesilerek tekrar anastomoz yapıldı. Operasyon sonrası 3. gün anastomoz patensine bakılarak histolojik ve biyokimyasal örnekler alındı.

Yanık + Kök Hücre Grubu (n=7) : Sıçanların son ingüinal bölgeleri yakılarak yanık altında kalan femoral arter kesilip tekrar anastomoz yapıldı. Anastomoz hattına 1×10^5 hücre/ml kök hücre verildi. Operasyon sonrası 3. gün anastomoz patensine bakılarak histolojik ve biyokimyasal örnekler alındı.

4.7 Cerrahi Modeller

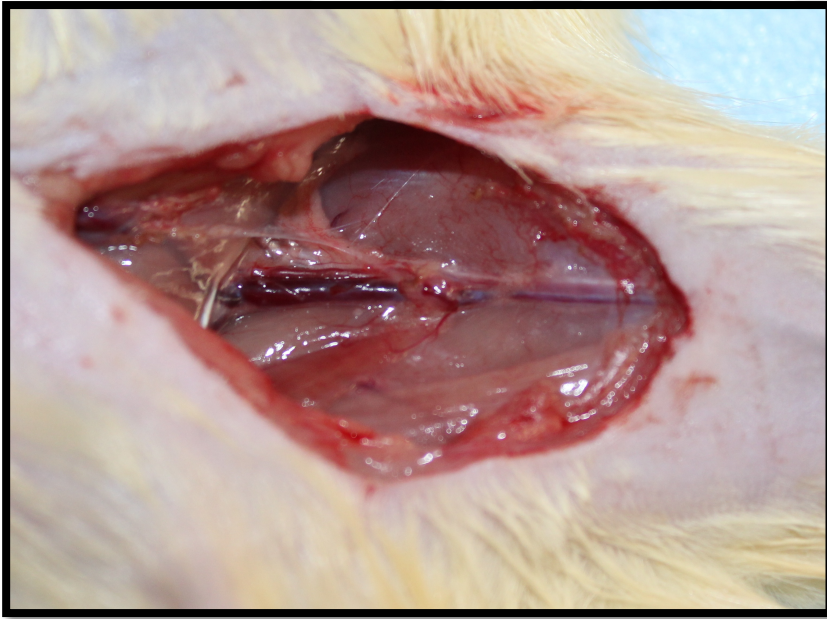
4.7.1 Kontrol Grubu

Sıçanlara intraperitoneal 50 mg/kg Ketamin ve 15 mg/kg Xylasin ile kombine anestezi- analjezi sağlandıktan sonra standart olarak sol ingüinal bölge çevresel olarak traş edildi. Sıçanlar cerrahi alan batikon ile silinerek supin pozisyonda, alt ekstremitte ekstansiyonda olacak şekilde flaster yardımıyla operasyon masasına sabitlendi.



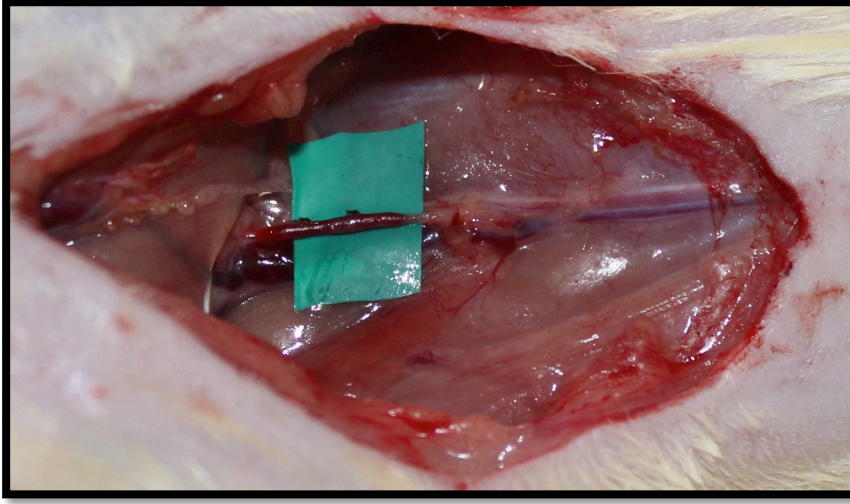
Resim 8. A-B Deneklerin traşlanması ve sabitlenmesi

Sol oblik deri insizyonunun ardından, mikroskop altında ingüinal yağ paketi geçilerek damar sinir paketine ulaşıldı.



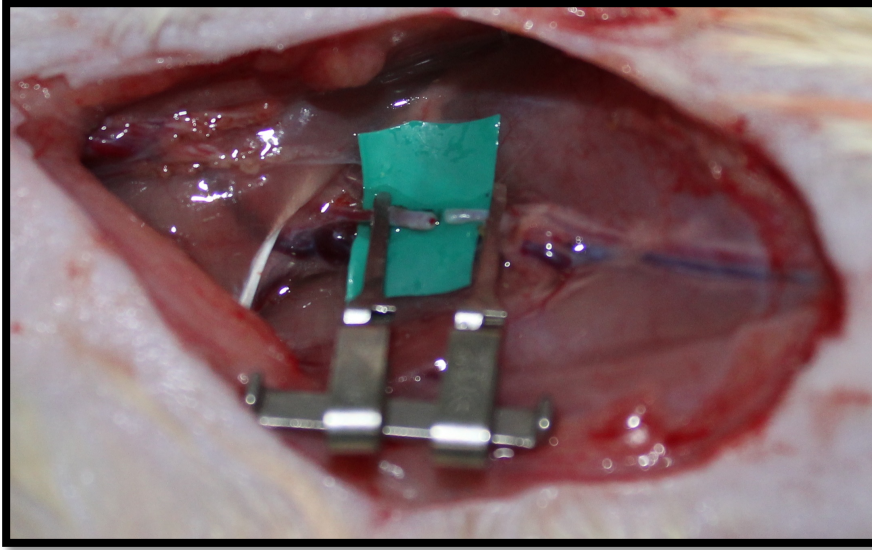
Resim 9. Sol femoral damar sinir paketi

Femoral arter damar sinir paketinden sıyrıldı ve ingüinal ligamana en yakın dallarından (Murphy Dalı) ayrılarak serbestleştirildi.



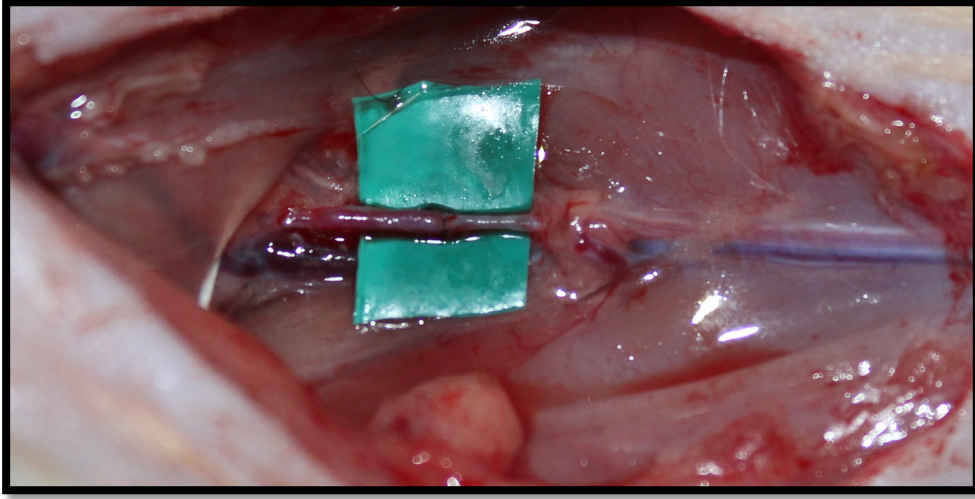
Resim10. Femoral arterin çevre dokulardan izole edilmesi

Mikroskop eşliğinde femoral artere aproksimatör yerleştirilmesinin ardından femoral arter kesildi ve anastomoz hattına giren adventisya tabakası mikromakas yardımıyla eksize edilerek arter lümenleri heparinize serum (10U/cc) ile yıkandı



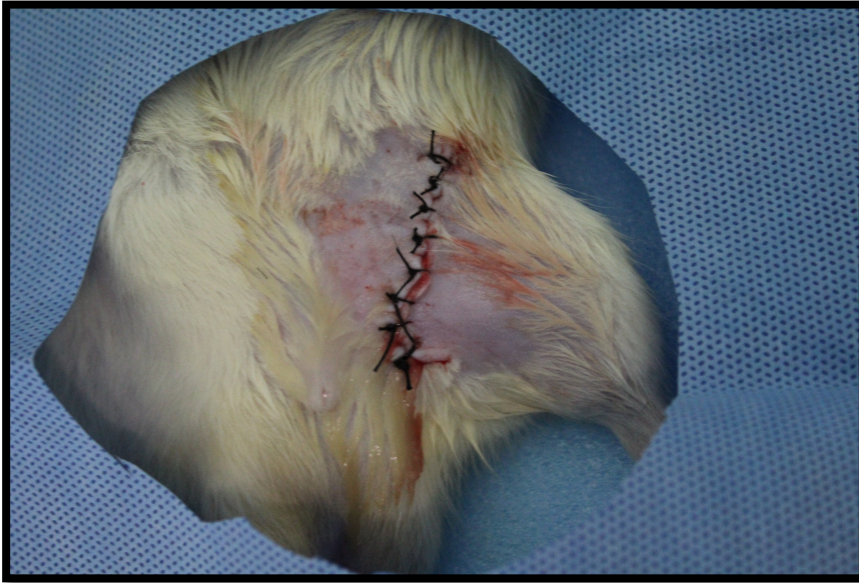
Resim 11. Aproksimatörün yerleştirilmesi ve femoral arterin anastomoza hazır hale getirilmesi

Mikrocerrahi tekniğe uygun olarak 75 mikron , 10/0 monofilaman nylon (Ethicon) suture materyali ile separe dikişler yerleştirilerek anastomoz uygulandı. Klemp açılarak doluş izlendi.



Resim 12. Anastomoz sonrası görünüm

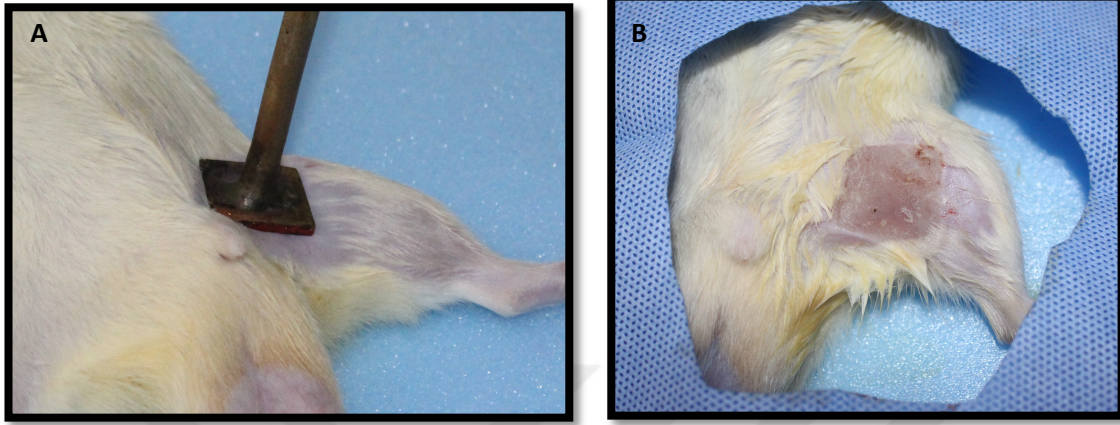
İnsizyon bölgesi, 3/0 ipek sütürler ile primer onararak kapatıldı.



Resim 13. İnsizyonun kapatılması

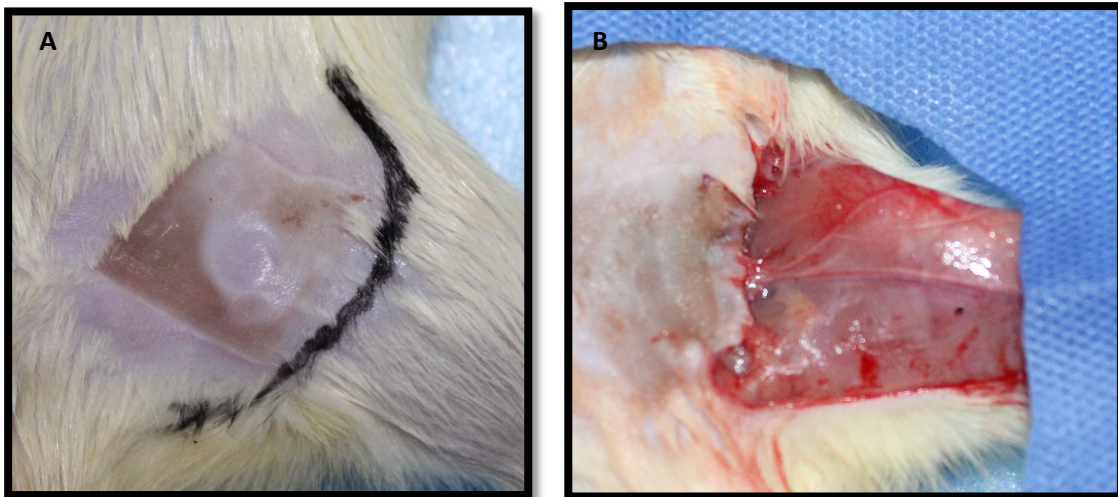
4.7.2 Yanık ve Yanık + Kök Hücre Grubu

Denekler kontrol grubu deneklerindeki aynı prosedür ile anestezi – analjezi uygulanarak operasyona hazırlandı. Bütün deneklerin sol ingüinal alanları femoral arter anastomozu planlanan hattın üzerine gelecek şekilde , yukarda tariflendiği üzere yakıldı.



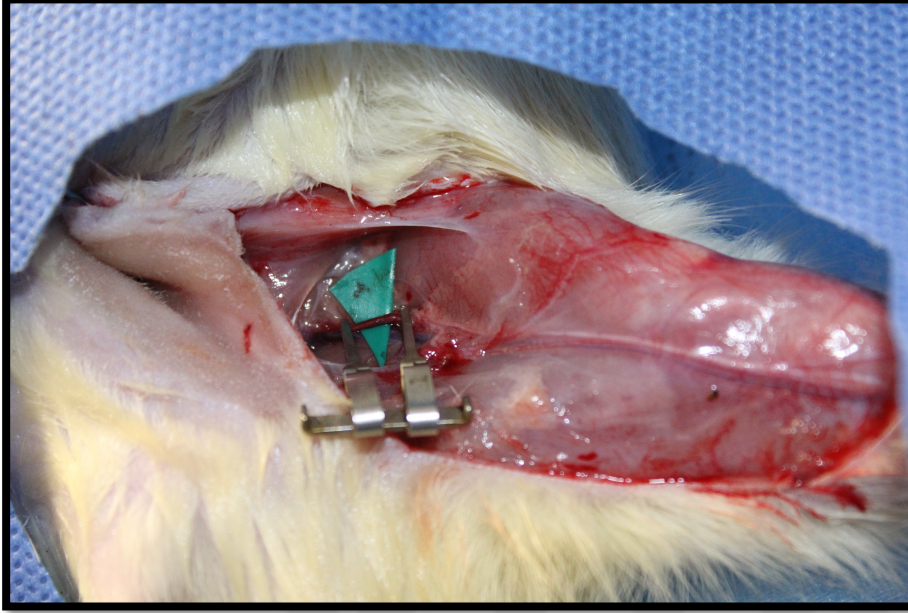
Resim 14. A-B. Yanık ve Yanık + Kök Hücre gruplarında yanık oluşturulması

Yara iyileşmesi, suture hattı komplikasyonlarını minimize etmek ve yanıklı alanın arter anastomozu üzerine olan etkilerinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi için yanık hattının bütünlüğü bozulmadı. İnsizyon ingüinal alanın distalinden, sağlam deri içerecek şekilde tasarlanarak yanıklı hat, bütünlüğü bozulmadan flep şeklinde kaldırılarak femoral artere ulaşıldı.

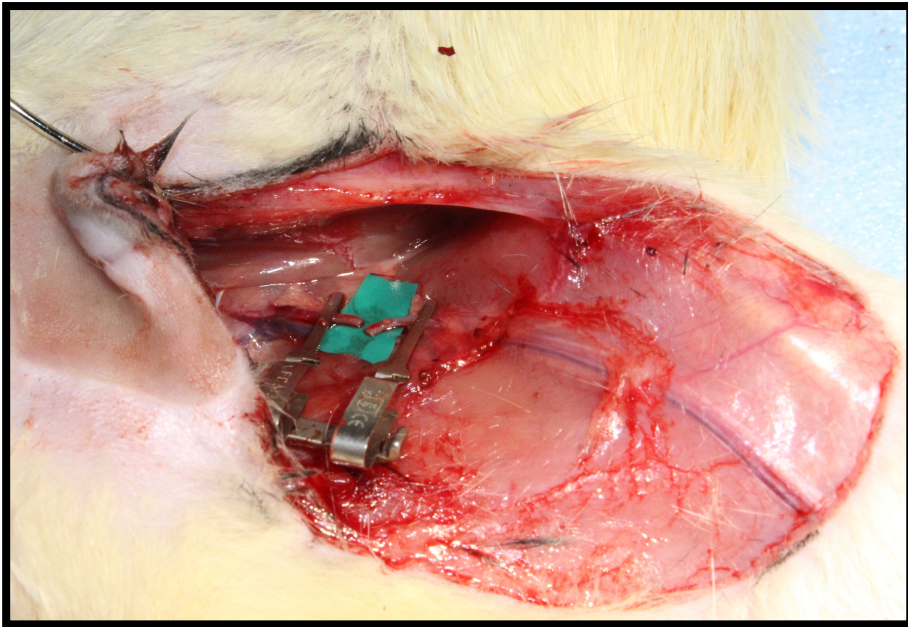


Resim 15. A-B. Yanıklı alanın flep şeklinde kaldırılması

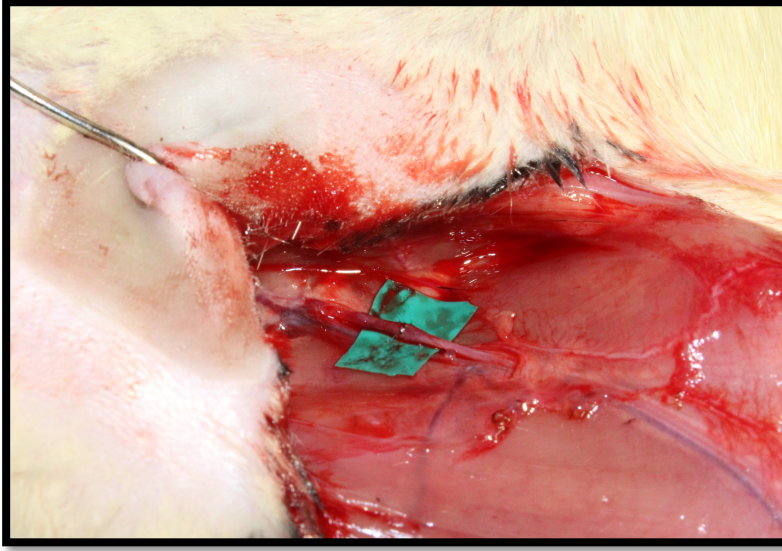
Femoral arter kontrol grubundaki basamaklar aynen tekrarlanarak anastomoza hazır hale getirildi ve anastomoz gerçekleştirildi.



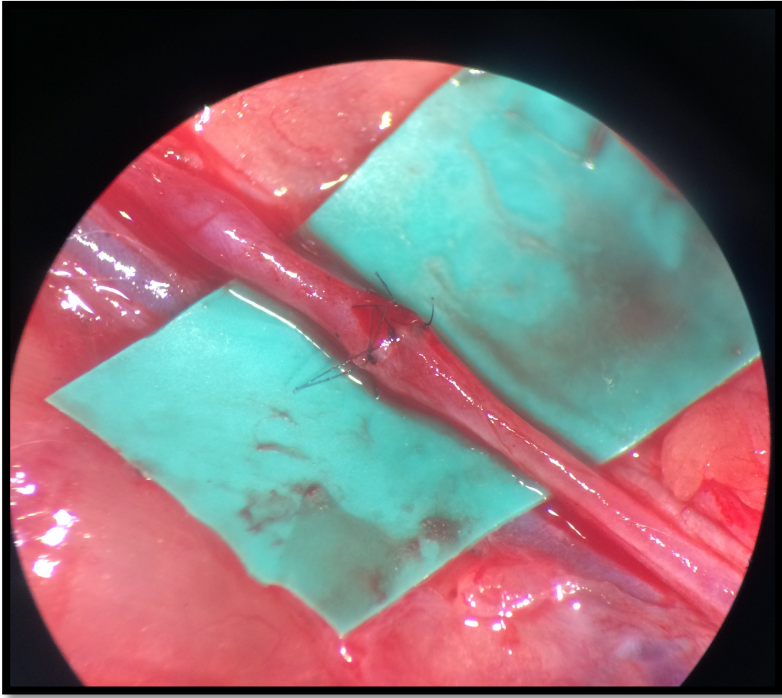
Resim 16. Flep şekilnde kaldırılan yanıklı dokunun altında femoral arter izolasyonu



Resim 17. Aproksimatörün yerleştirilmesi ve anastomoza hazırlanan femoral arter

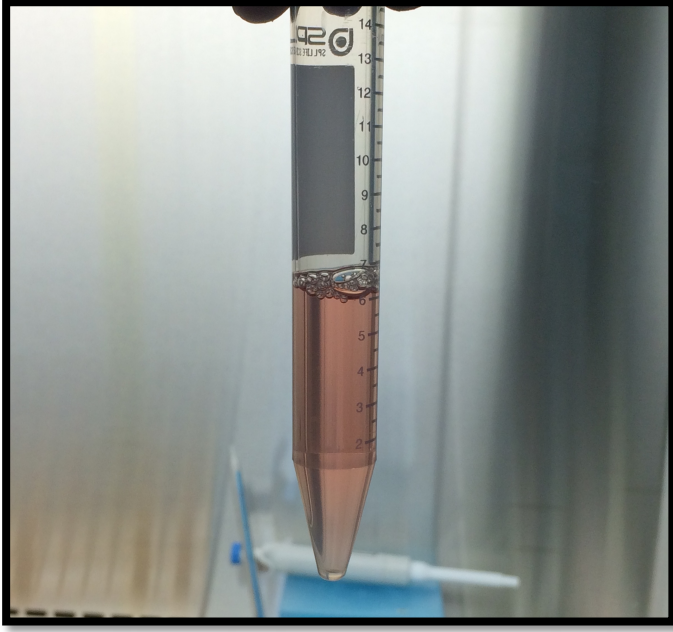


Resim 18. Anastomoz sonrası görünüm

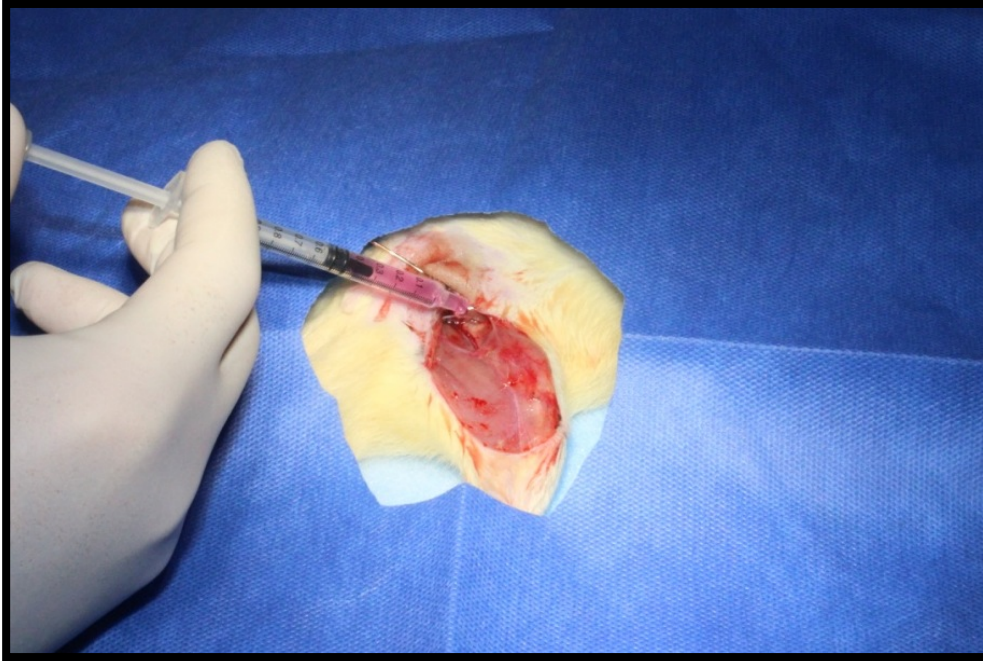


Resim 19. Anastomoz hattının mikroskopik görünümü

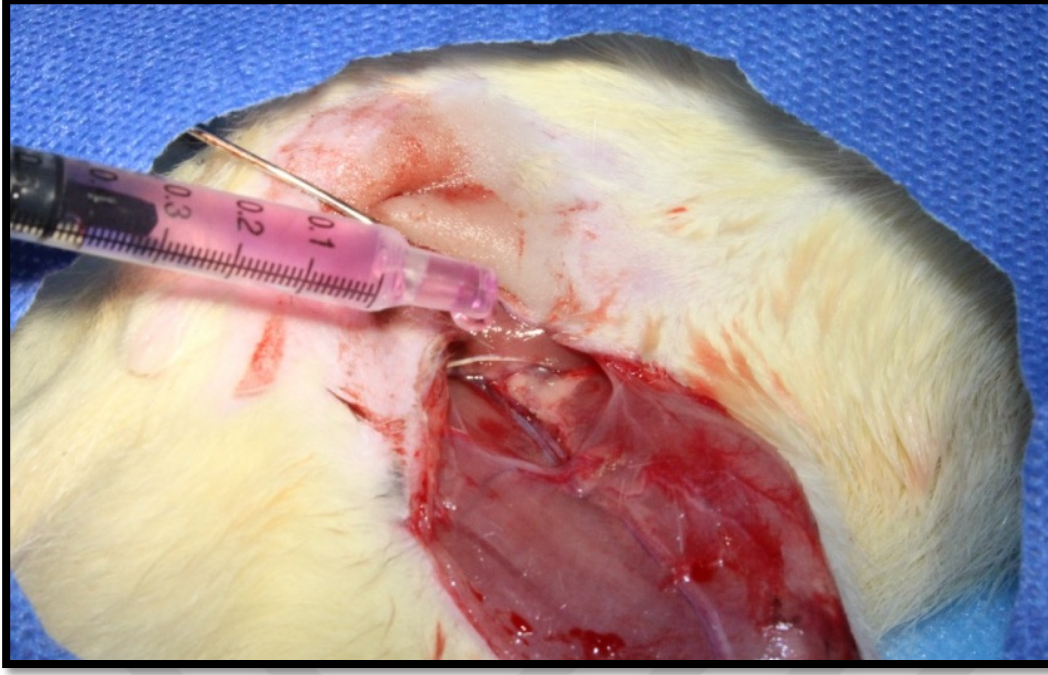
Anastomoz sonrası yanık + kök hücre grubuna 1×10^5 hücre/ml kök hücre enjekte edildi.



Resim 20. Kök Hücreler



Resim 21. Kök hücrelerin anastomoz hattına verilmesi



Resim 22. Kök hücrelerin anastomoz hattına verilmesi, yakın görünüm

Anastomoz sonrası insizyon 3/0 ipek sütürler ile primer onarıldı.



Resim 23. İnsizyonun kapatılması

4.8 Biyokimyasal Yöntem

Malondialdehit (MDA)

MDA tayini için kullanılan reaktifler:

- TBA (Sigma)
- HCl (%37) (Merck)
- TCA (%100) (JT Baker)
- 1.1.1.3 Tetraetoksipropan (Sigma)

TBA reaktifinin hazırlanması:

- 1,875 gr TBA
 - 12,5 ml HCl (%37)
 - ml TCA (%100)
- } Distile su ile 500 ml 'ye tamamlanmıştır.

✓ **Çalışma Standardı: (100 μ M)**

✓ **Stok Standart hazırlanması: (10 mM)**

220 mg 1.1.1.3 Tetraetoksipropan ve 7 ml HCl (%37) %0.9NaCl (SF) ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Stok standart 1/100 dilue edilerek konsantrasyonu 100 μ mol/L olan çalışma standardı hazırlanmıştır.

MDA tayini :

Yagi ve Ohkawa yöntemlerinin modifikasyonu ile yapılmıştır.

50 μ L hemolizat/homojenat, 450 μ L distile su ve 1 mL TBA reaktifi karıştırılarak 100°C'de 20 dakika kaynatılmıştır. Sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek supernatant ayrılmıştır ve ayrılan supernatant 532 nm'de köre karşı okutulmuştur¹⁰⁵⁻¹⁰⁶.

Hemoglobin ölçümü için kullanılan reaktifler

Drabkin çözeltisi hazırlanışı:

1. Potasyum Ferri Siyanür (Merck) (200 mg)
2. Sodyum karbonat (Merck) (1 g)
3. Siyanür (Merck) (50 mg)
4. Potasyum dihidrojen Fosfat (Merck) (140 mg)

1,2,3 ve 4 nolu kimyasallar sırayla bidistile suda çözülerek 1000 mL'ye tamamlanır.

Hemolizat Hazırlanması:

Alınan kan örnekleri 4°C'da soğuk santrifüjde 1620 g'de (3000 rpm) 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra elde edilen plazma örnekleri ependorflara 500-600 µl'lik porsiyonlar şeklinde ayrılarak daha sonra çalışmak üzere -80°C'ye kaldırılarak saklanmıştır. Plazma ayrıldıktan sonra geride kalan eritrositlerin üzerine eşit miktarda soğuk SF ilave edilerek yıkama işlemine başlanmıştır. Her yıkama sonrası santrifüj edilip (3000 rpm de 5'er dk.yeterli) üstteki sıvı kısım ve buffycoat atılıp, dipteki presipitat aynı miktar SF ile karıştırılarak yıkamaya devam edilmiştir. Yıkama işlemi ardı ardına 3 kez tekrarlandıktan sonra, dipteki eritrositlerden 200 µl bir ependorf tüp içine alınmıştır, üzerine 800 µl buz soğukluğunda bidistile su eklenerek 1:5 oranında dilue edilmiştir. Karışım otomatik pipetle iyice karıştırılarak hemoliz yapıp -80°C de derin dondurucuda analize dek saklanmıştır.

Hemoglobin ölçüm Yöntemi

Drabkin yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 2.5 ml drabkinsolusyonu ile 10 µl hemolizat karıştırılarak 5. Dakika absorbanları drabkine karşı 546 nm'de spektrofotometrede okutulmuştur.

MDA

Serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oluşan lipidperoksidasyonu, hücre membran hasarının ve buna bağlı hücre hasarının önemli bir nedenidir. Malondialdehit (MDA), lipidperoksidasyonunda bir son üründür ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede biyokimyasal bir belirteç olarak kullanılır. Lipidperoksidasyonunun başlangıç aşamasında bir lipid radikali olan konjugedien, sonlanma aşamasında ise pentan, etan ve malondialdehid oluşmaktadır.

Biyolojik örneklerde lipidperoksidasyonunun ve serbest radikal aktivitesinin göstergesi olan en kolay ve en popüler metod, bu ürünün tiyobarbitürikasid (TBA) ile olan tepkimesidir ¹⁰⁷. TBA tepkimesi lipidperoksidasyonu için kullanılan non-spesifik bir test olmasına rağmen MDA üretimi için iyi bir göstergedir. Bu tepkime MDA ile TBA arasındaki etkileşime dayanır. Asidik ortamda TBA ile ısıtılan örnek 532 nm’de absorbans veren pembe bir ürün oluşturur.

MDA tayini için kullanılan yöntemin prensibi; hemolizat/homojenatın triklor asetik asitle deproteinize edilmesinin ardından örnekte bulunan MDA’nın TBA ile oluşturduğu TBA-MDA kompleksinin kırmızı renginin 532 nm’de spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Bu çalışmada hemolizat MDA düzeyi ölçümü yapılarak malondialdehitin doğrudan hücreye hasarı değerlendirilmiştir. Serum/plazma MDA değerleri pek çok değişkenden etkilendiğinden ve minör hasarları göstermede yetersiz kaldığından, oysa hemolizat eritrosit lizati olduğu için hemolizatta MDA ölçümü sistemik dolaşımdaki doku/organ hasarının derecesini yansıttığından elde edilen sonuçlar serum/plazma düzeyleri ölçümüne göre daha değerlidir.

SüperoksitDismutaz (SOD)

Süperoksitdismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD) süperoksit serbest radikali (O_2^-)’nin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.

SOD’ın fizyolojik fonksiyonu oksijeni metabolize eden hücreleri O_2^- ’in lipidperoksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD, ayrıca fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar.

SOD miktarı plazmada *YEHUA* Kit kullanılarak enzim immünassay metodu (ELISA) ile ölçülmüştür.

VaskülerEndoteliyal Büyüme Faktörü (VEGF)III

VEGF miktarı plazmada *YEHUA* Kit kullanılarak enzim immünassay metodu (ELISA) ile ölçülmüştür.

Antitrombin III

Antitrombin III miktarı plazmada *YEHUA* Kit kullanılarak enzim immünassay metodu (ELISA) ile ölçülmüştür.

4.9 Histolojik Yöntem

Işık Mikroskopik İnceleme

Deneklerden alınan örnekler % 10' luk formalin solüsyonu içerisinde 24- 48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve dokular bloklanarak rotary mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm' lik kesitler alındı. Dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilin-eozin (H-E) boyaması yapıldı. Ayrıca VEGF, Collogen-1 ve Thy-1 dağılımları indirekt immunohistokimya analizi ile incelendi.

Parafin Doku Takibi

Tespit edilen damar örnekleri, fiksasyon işlemine takiben 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30' ar dakika % 60' dan % 80' e artan etil alkol serilerinden geçirildi. % 95 alkol içerisinde 1' er saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1' er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen:parafin içerisinde 30 dakika 60° C' lik etüvde tutulan örnekler birer saat 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo 6). Alınan 5 µm' lik kesitlere histokimyasal inceleme için hematoksilin-eozin, immunohistokimyasal inceleme için indirek immunohistokimya boyaması yapıldı.

Tablo 6 : Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	24- 48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dakika
	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen-Alkol	30 dakika
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
Emdirme 60° C etüvde	Ksilen-Parafin	30 dakika
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Hematoksilen-Eozin Boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm' lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C' lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95' den % 60' a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk. boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk. akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dk. akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dk. eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk. akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 80 ve % 95' lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 7).

Tablo 7: Hematoksilen-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	30 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Dehidratasyon	% 80 alkol	1 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi

Örneklerden alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95' ten % 60' a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dakika bekletildi. Pap pen (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5' lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. % 3' lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika bloklama solüsyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti-VEGF (sc-7269, Santa Cruz), anti-collagen-1 (sc-25974, Santa Cruz), anti-Thy-1 (sc-19614, Santa Cruz) ve Anti-Trombin III

(Orb-10111, Biorbyt) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043, Invitrogen) ile 30' ar dakika boyandı. Yine üç defa 5' er dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, 71897, 71898, Milipore) ile 5 dk. boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk. yıkanan kesitler kapatma medyumunu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 8)

İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek, immunoreaktiviteler negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.



Tablo 8: İmmunoperoksidaz Boyaması

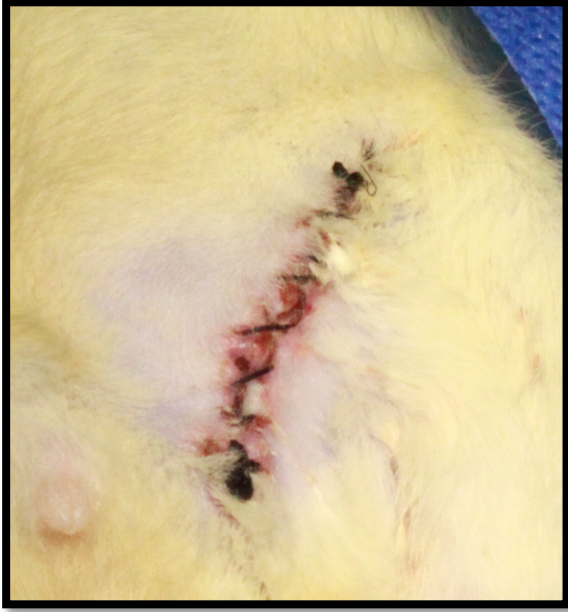
İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60° C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	PBS	10 dakika
Bloklama	Tripsin	15 dk (37 ⁰ C)
Yıkama	PBS	3X5 dk
	%3 Hidrojen Peroksit	5 dk
Yıkama	PBS	3x5 dk
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Birincil Antikor Uygulaması	anti-antitrombinIII, anti-VEGF, anti-kollajen-1, anti-Thy-1	1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
İkincil antikor Uygulaması	Biotinlenmiş antimouse veya anti-rabbit	30 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
İkincil antikor Uygulaması	Streptavidin-peroksidaz uygulaması	30 dk
Kromojen	DAB	5 dk.
Yıkama	Distile su	3x5 dk.
Zıt Boyama	Mayer hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Distile su	10 dk
Dehidratasyon	Alkol (%80, %90, %100)	2 şer dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dk
Kapatma	Entellan	

5. DEĞERLENDİRME

Her üç gruptaki tüm denekler operasyondan sonra 3. gün kafeslerinden çıkarılarak operasyon odasında değerlendirmeye alındı. Bu süre içinde hiç bir deneğe tromboz gelişimini engelleyen herhangi bir ajan verilmedi. Yapılan makroskopik ve mikroskopik değerlendirme sonrasında , histolojik inceleme için anastomoz hattını içeren damar örnekleri ve biyokimyasal inceleme için intrakardiyak kan örnekleri alındı. Histolojik damar örnekleri %10 formalin içeren steril kaplara konuldu. Denekler anestezi – analjezi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

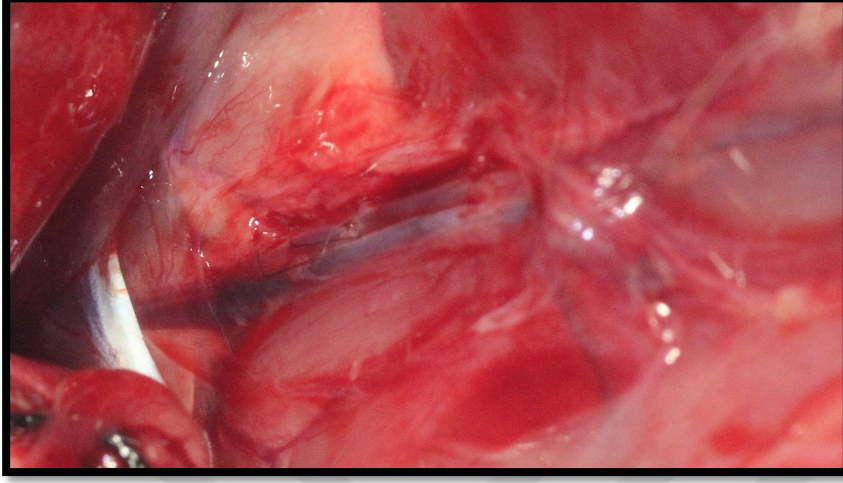
5.1 Kontrol Grubu

Operasyon sonrası 3. gün daha önce tariflenen yöntemle uygun anestezi – analjezi sağlandıktan sonra operasyon masasına sabitlendi.



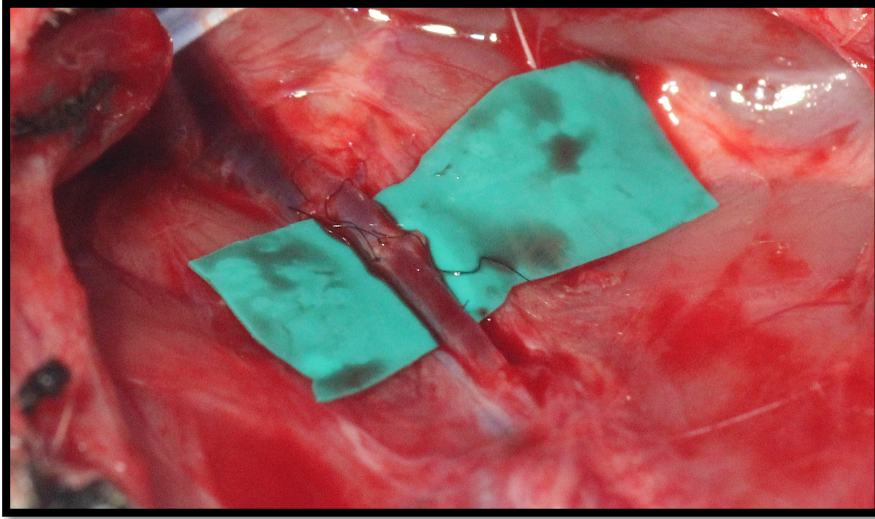
Resim 24. Kontrol grubu. Operasyondan 3. Gün sonundaki görünüm

İnsizyon yeniden açılarak femoral arter ve anastomoz hattına mikroskop altında ulaşıldı.



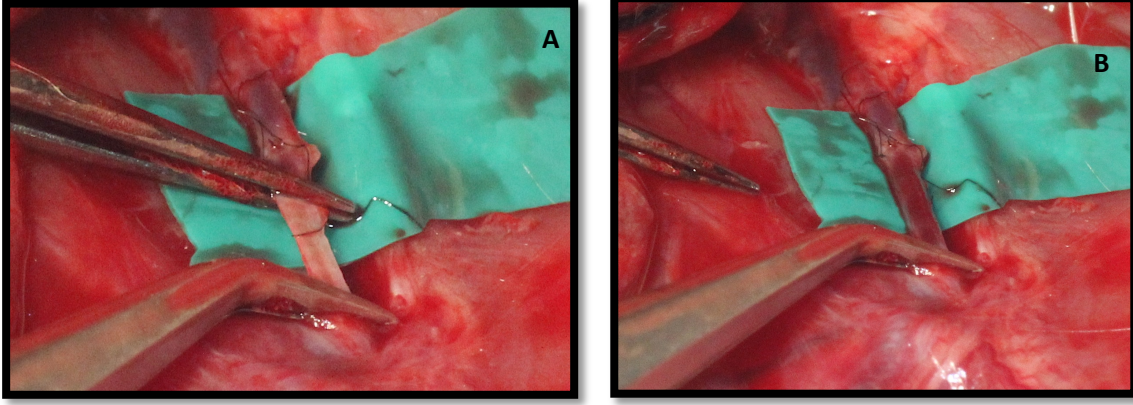
Resim 25. Kontrol grubu, femoral arter ve ven'e ulaşılması

Mikroskop altında femoral arter çevresindeki dokudan yeniden sıyrıldı, altında yeşil fon yerleştirilerek ortaya kondu.



Resim 26. Anastomoz hattının izolasyonu

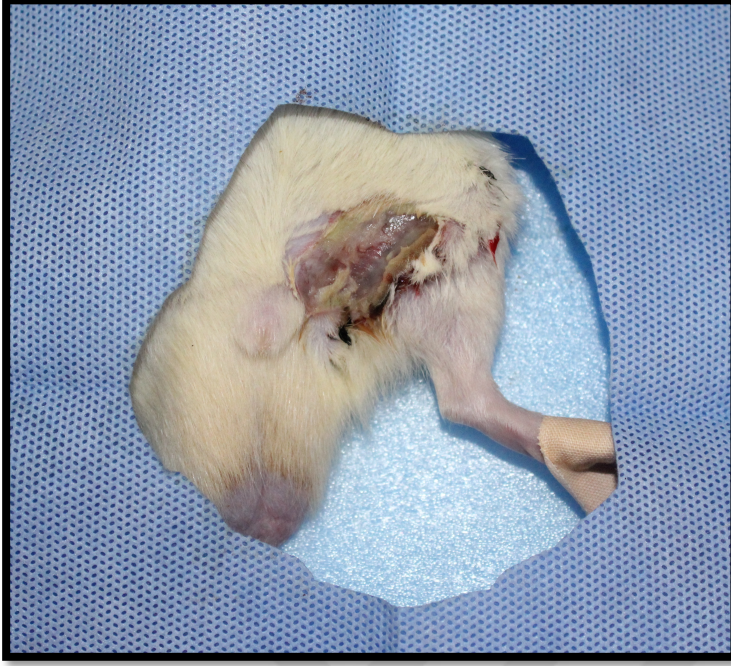
Mikroskop altında femoral arter anastomoz hattı distaline mikropensetler yardımıyla sağma testi yapılarak anastomoz hattının salim olup olmadığı incelendi.



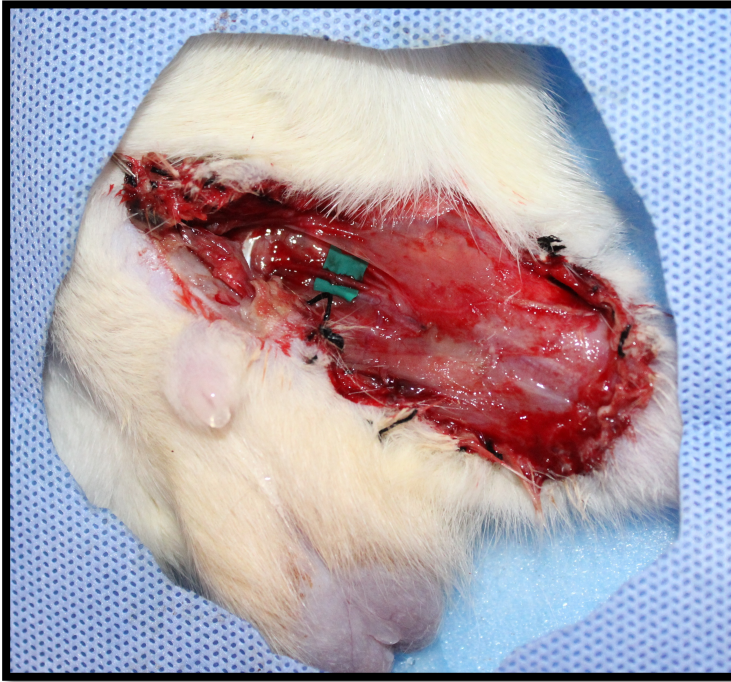
Resim 27. A-B. Sağma testi ile doluşun izlendiği patent bir anastomoz örneği

Kontrol grubundaki deneklerden biri deney sonrasında ölmüş ve bu nedenle bu denek çalışma dışı bırakılmıştır. Yapılan değerlendirme sonucunda 6 adet deneğin femoral arter anastomozlarından bir tanesinde tromboz görüldü. Diğer 5 denekte akımda herhangi bir sorun saptanmadı ve anastomoz hattının patent olduğu gözlemlendi.

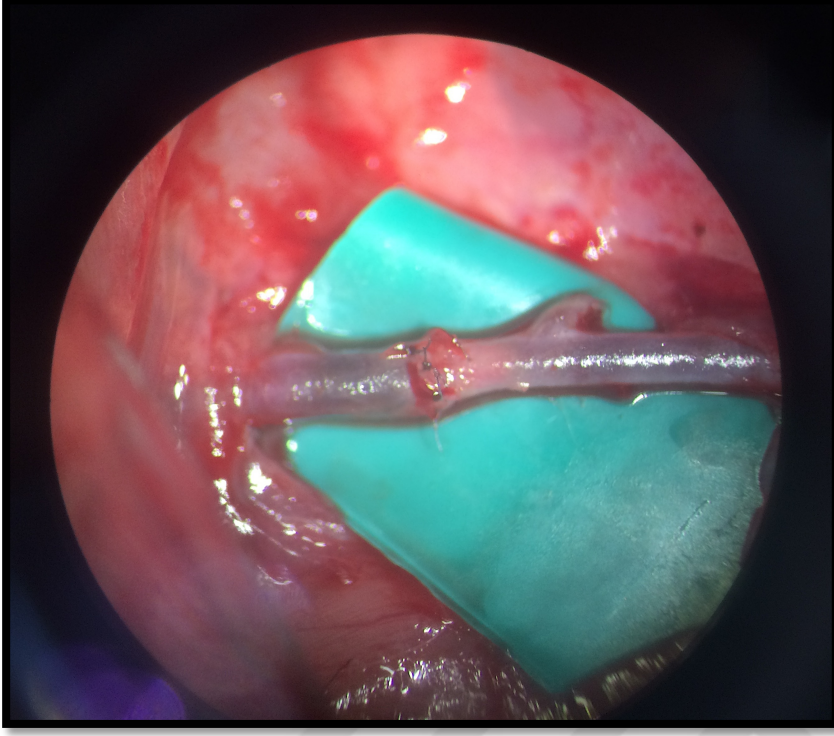
5.2 Yanık Grubu



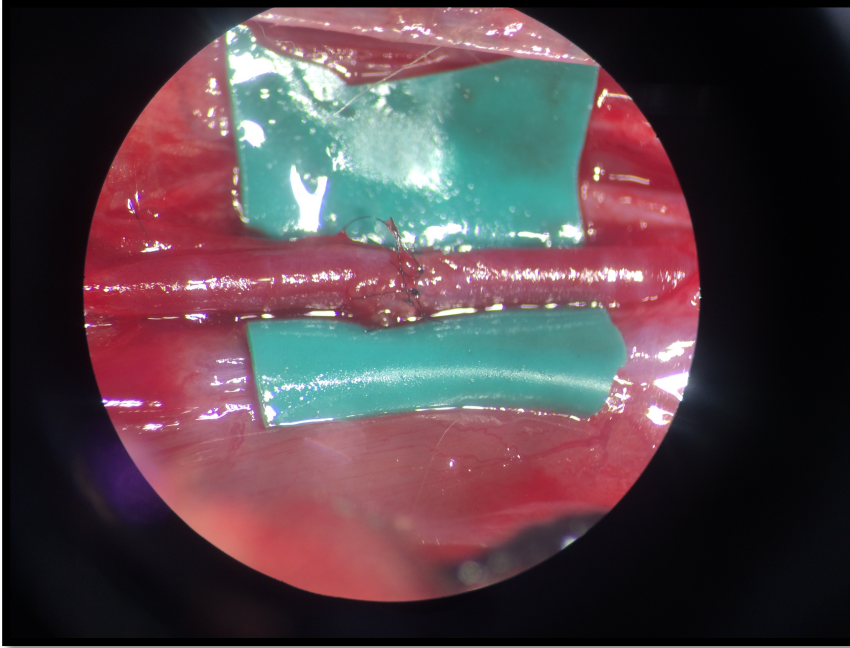
Resim 28. Yanık grubu , deney sonrası 3. Günde yara



Resim 29. Yanık grubu, anastomoz hattının izolasyonu

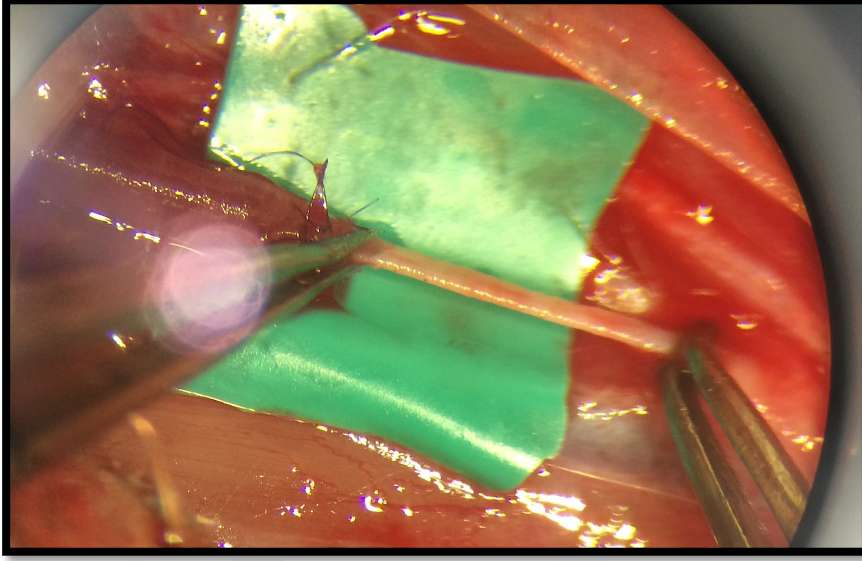


Resim 30. Tromboz gelişen femoral bir arterin mikroskopik görüntüsü

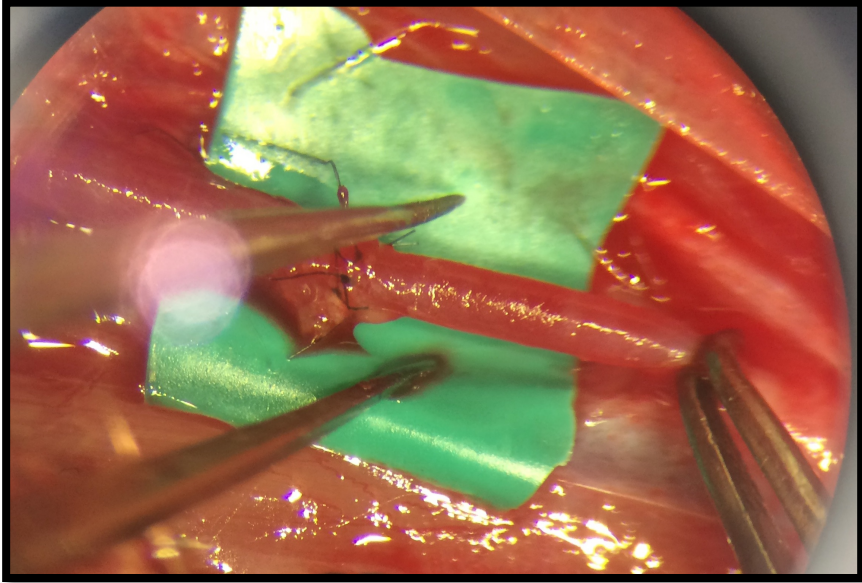


Resim 31. Çalışan bir femoral artersin mikroskopik görüntüsü

A



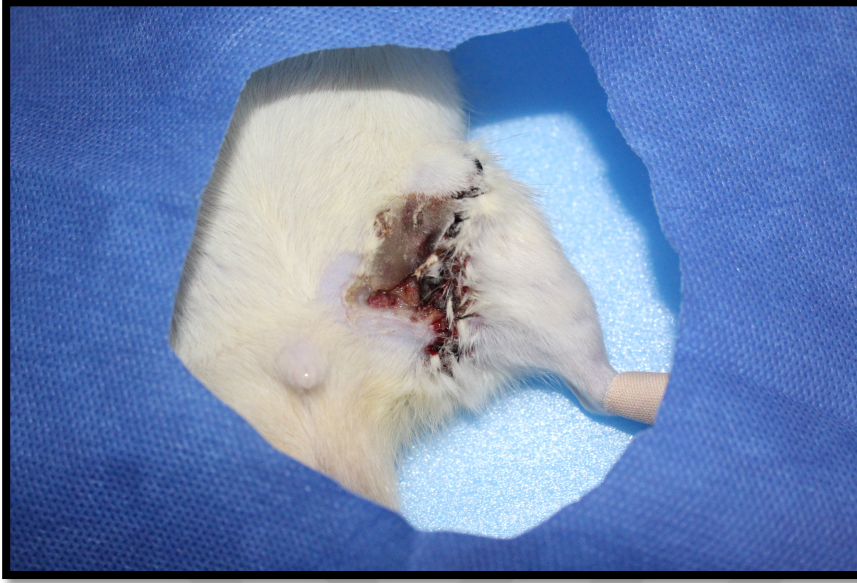
B



Resim 32.A-B. Sağma testi ile patent bir femoral arterin mikroskopik görüntüsü

Yanık grubundaki deneklerin bir tanesinde yara açılması ve buna bağlı anastomoz alanında çok miktarda altlık olarak kullanılan talaş ve yabancı cisme rastlanıldı ve ala enfekte olarak izlendi. Bu sebeble bu denek çalışma dışı bırakılmış ve kalan 6 deneğin 3 tanesinde femoral arter anastomoz hattının tromboze olduğu gözlemlenmiştir.

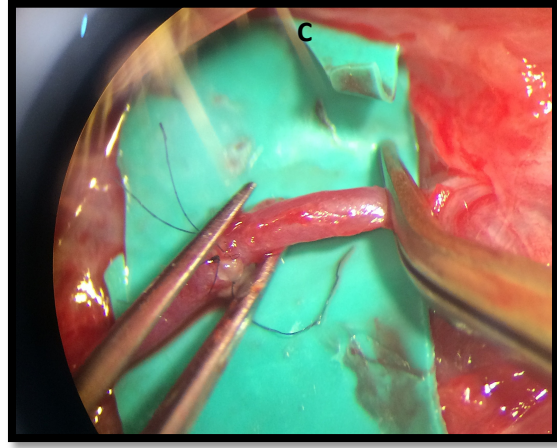
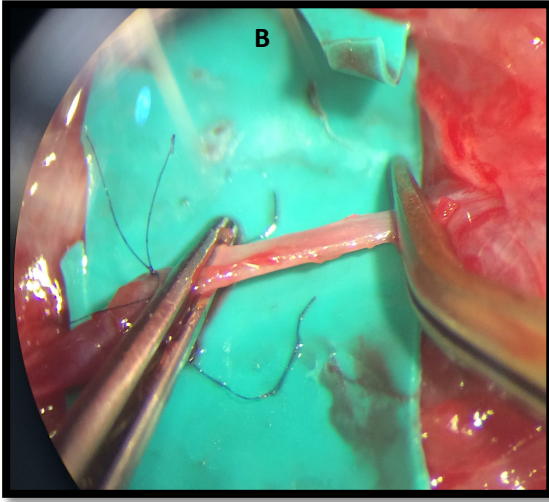
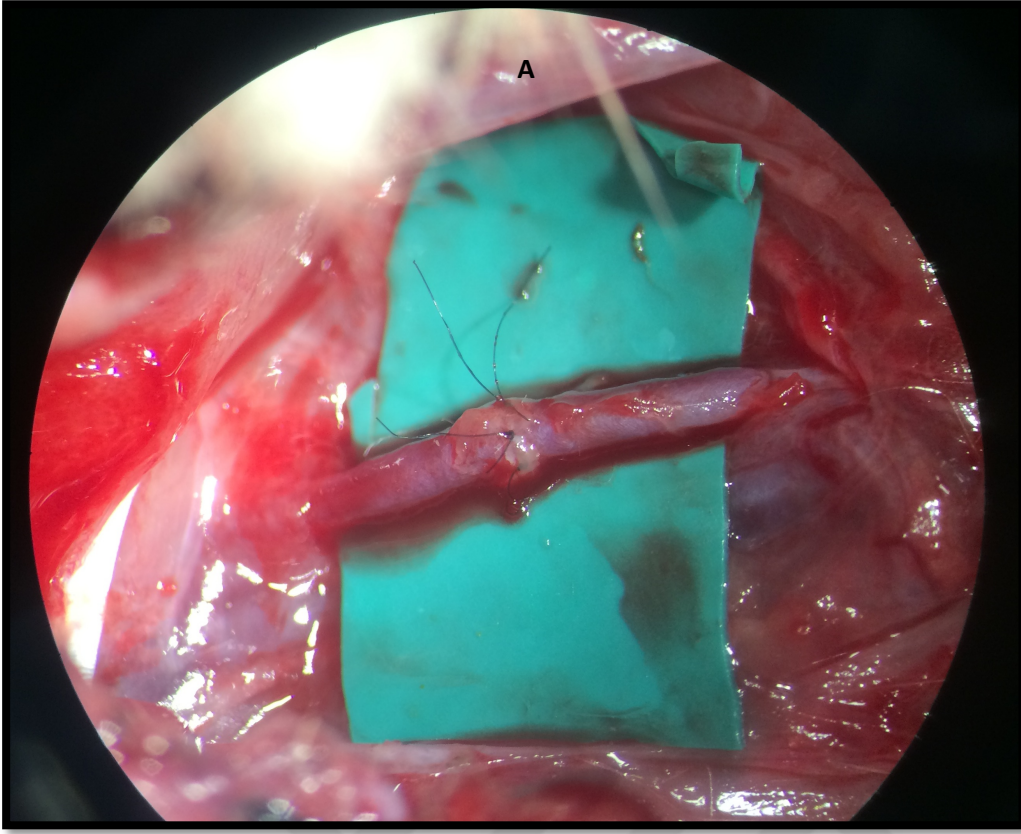
5.3 Yanık + Kök Hücre Grubu



Resim 33. Yanık + Kök Hücre Grubu, deney sonrası 3. günde yara yerinin görüntüsü



Resim 34. Femoral arterin izolasyonu, Yanık zemini altında operasyon sonrası 3. Günde anastomoz + kök hücre ekimi yapılmış femoral arter



Resim 35. A- Femoral arterin mikroskopik görüntüsü. B ve C Sağma testi ile patent olduğu görülen bir femoral arter örneği

Yanık + Kök Hücre grubunda yapılan operasyon sonrası 3. gün değerlendirmede , 7 adet denekten 3 tanesinde femoral arter anastomoz hattında trombüs saptanmış, 4 adet denekte ise anastomoz hattının salim olduğu gözlenmiştir.

5.4 Anastomoz Başarılarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Gruplar arası astomoz başarılarının istatistiksel değerlendirilmesi için Chi- Square testi kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı fark olarak kabul edildi.

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
grup * basari	19	100,0%	0	0,0%	19	100,0%

grup * başarı Cross tabulation

			basari		Total
			basarili	basarisiz	
grup	kontrol	Count	5	1	6
		% within grup	83,3%	16,7%	100,0%
	yanik	Count	3	3	6
		% within grup	50,0%	50,0%	100,0%
	yanik+kök hücre	Count	4	3	7
		% within grup	57,1%	42,9%	100,0%
Total	Count	12	7	19	
	% within grup	63,2%	36,8%	100,0%	

Chi- Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1,605 ^a	2	,448
Likelihood Ratio	1,723	2	,423
Linear-by-Linear Association	,837	1	,360
N of Valid Cases	19		

a. 6 cells (100,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,21

Test sonucunda P değeri 0.448 olarak saptanmış her üç grupta anastomoz başarı veya başarısızlık oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

5.5 Biyokimyasal Parametrelerin İstatistiksel Sonuçları ve Biyokimyasal Değerlendirme

Parametrelerin istatistiksel analizinde üç grup birlikte Kruskal-Wallis Testi ile ; gruplar kendi aralarında Mann- Whitney U testi ile karşılaştırıldı.

Tablo 9.

PARAMETRE	KONTROL (mean±SD)	YANIK (mean±SD)	YANIK ve KÖK HÜCRE (mean±SD)
MDA (nmol/g Hb)	2.62±0.77	3.00±0.68	2.02±0.33
SOD S (ng/ml)	2.41±0.53	2.50±0.80	3.56±0.70
SOD H (ng/ml)	12±2.94	11.5±1.84	21.2±1.96
SOD H (nmol/g Hb)	0.62±0.12	0.68±0.13	1.00±0.15
VEGF P (ng/L)	693.1±103	657±124	665±88.2
ATIII (ng/ml)	43±12	44±11	42±9

Tablo 10.

PARAMETRE	KONTROL x YANIK	(KONTROL) x (YANIK + KÖK HÜCRE)	(YANIK) x (YANIK+ KÖK HÜCRE)
MDA(nmol/g Hb)	P=0.4	P=0.2	P=0.02
SOD S (ng/ml)	P=0.7	P=0.004	P=0.02
SOD H (ng/ml)	P=0.5	P=0.004	P=0.004
SOD H (nmol/g Hb)	P=0.5	P=0.006	P=0.01
VEGF P (ng/L)	P=0.63	P=0.63	P=0.87
ATIII (ng/ml)	P=0.87	P=0.75	P=0.87

Hemolizat MDA düzeyine (mean + stddev) (Tablo 9) göre gruplar incelendiğinde kontrol grubuyla yanık grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P>0.05$). Yanık ile yanık + kök hücre grubu karşılaştırıldığında ise kök hücre uygulanması ile hemolizat MDA düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($P<0.05$).

Bu çalışmada yanık bölgesindeki anastomozun işlevselliğine ve yanık iyileşmesine kök hücre uygulamasının yararı olup olmadığını belirlemede MDA oksidatif strese bağlı doku hasarını ; SOD düzeyi ölçümü ise antioksidan savunmayı yansıtmaktadır. Yanık anastomozunda kök hücre uygulaması ile hemolizat MDA düzeyinin anlamlı azalması buna karşın serum, hemolizat SOD düzeylerinin anlamlı artışları oksidatif stresin azalmasını ve antioksidan savunmanın artmasını göstermektedir. Doku hasarının azaldığının ve yanık iyileşmesinin hızlanabileceğinin bir göstergesidir.

Hemolizat ve serum SOD düzeyi (mean + std dev) değerlerine göre gruplar incelendiğinde, kontrol ve yanık grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur. Ancak, Yanık + kök hücre grubunun SOD değerleri kontrol ve tedavisiz yanık gruplarına göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artmış bulunmuştur [serum SOD ($p<0.005$), hemolizat SOD ($p<0.01$)].(bkz. Tablo 9)

Plazma VEGF düzeyleri (mean + stddev) incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (bkz. Tablo9).

Plazma Antitrombin III düzeyleri (mean + stddev) (tablo 9) incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Bu durum kök hücre uygulamasının olumsuz bir etkisi olmadığını yansıtabilir.

Hemolizat MDA düzeyleri incelendiğinde; kontrol ve yanık+kök hücre grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (tablo 10). Bu durum kök hücre uygulamasının yanıklı olguda MDA düzeylerinde düşüş sağlayarak ve hatta sağlıklı kontrol düzeylerine yakın değerlere düşüşü sağlayarak oksidan stresi azaltıcı etkili olduğunu göstermektedir. Tedavisiz yanık ve kök hücre uygulanan yanık grupları kıyaslandığında kök hücre uygulaması ile yanıklı olgularda hemolizat MDA düzeyindeki istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanması ($p<0.05$)(tablo2) kök hücre uygulamasının oksidan stres oluşumunu engelleyebileceğini ve böylece doku tamirinin daha iyi ve hızlı olabileceğini göstermektedir.

Hemolizat ve serum SOD düzeyleri incelendiğinde kontrol ve yanık grupları arasında anlamlı farklılık yoktur (tablo 10). Ancak, Yanık+kök hücre grubunun SOD değerleri kontrol ve

tedavisiz yanık gruplarına göre anlamlı olarak artmış bulunmuştur (kontrolle kıyaslanınca serum SOD($p<0.005$), (hemolizat SOD($p<0.01$) tedavisiz yanık grubuyla kıyaslanınca serum SOD ($p<0.05$), (hemolizat SOD ($p<0.02$) (tablo2)). Bu durum kök hücre uygulamasının gruplarda antioksidan savunmayı arttırarak oksidan stres ve buna bağlı komplikasyonlar gelişmesini engelleyebileceğini göstermektedir.

Gruplar arasında plazma VEGF aktivitesi değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (tablo 10). Plazma VEGF verileri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmaması, yanık oluşumu ve bu zeminde kök hücre uygulamasının kısa dönemde vaskulogenez, anjiogenez ve damar geçirgenliğinde olumlu yada olumsuz bir değişikliğe neden olmadığı yani etkisiz olduğu ve anastomozun işlevselliğini değerlendirmede bir biyobelirteç şeklinde yararlı olamadığı şeklinde yorumlanabilir.

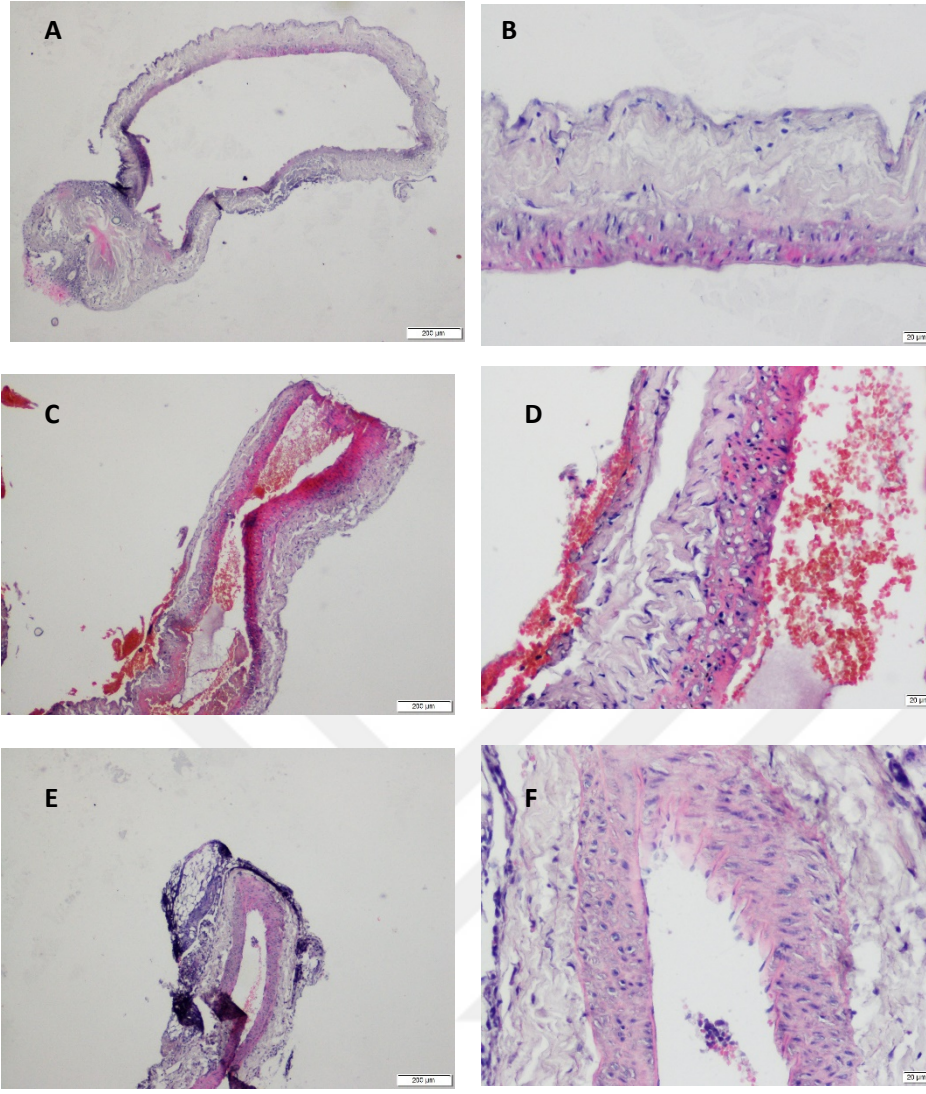
Gruplar arasında plazma Antitrombin III aktivitesi değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$) (tablo 10). Plazma Antitrombin III verileri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmaması, gerek yanık oluşumu gerekse bu zeminde kök hücre uygulamasının erken dönemde damar anastomozunun işlevselliğini değerlendirme ve tromboz oluşumunu belirleme yönünden bu parametrenin klinisyene bu konuda ipucu verebilecek bir biyo-belirteç olmadığı yönünde yorumlanabilir.

5.6 Histolojik Değerlendirme

Histokimyasal Sonuçlar

Dokularda histolojik analiz için yapılan H-E boyaması sonucu damar yapısı tüm gruplarda kolaylıkla seçilebildi (Resim 36). Damar yapısını oluşturan tunika intima, media ve adventisya tabakaları ayırt edilebildi. Tunika intima tabakasını oluşturan endotel yapısının tek katlı yassı epitel özelliğinde olduğu, tunika media tabakasının bağ dokusu elemanları ve düz kaslardan oluştuğu, adventisya tabakasında diğer tabakalara nazaran daha fazla olduğu ve bağ dokusu elemanlarından oluştuğu gözlemlendi. Gruplar arasında farklılık saptanmadı.

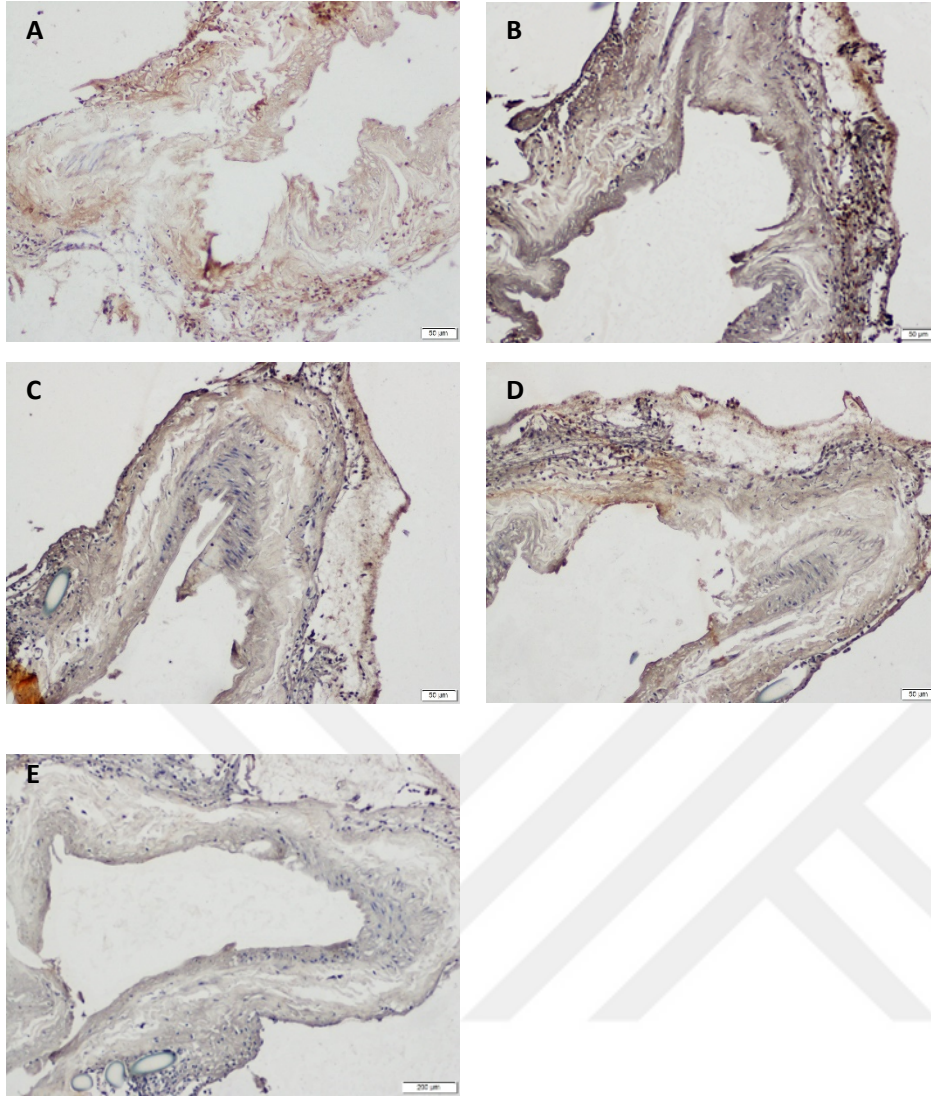




Resim 36. Grup 1 (A, B), Grup 2 (C, D) ve Grup 3 (E, F) ait damar örneklerinin H-E ile boyamaları. Scale Bar: 200 µm (A, C, E), 20 µm (B, D, F)

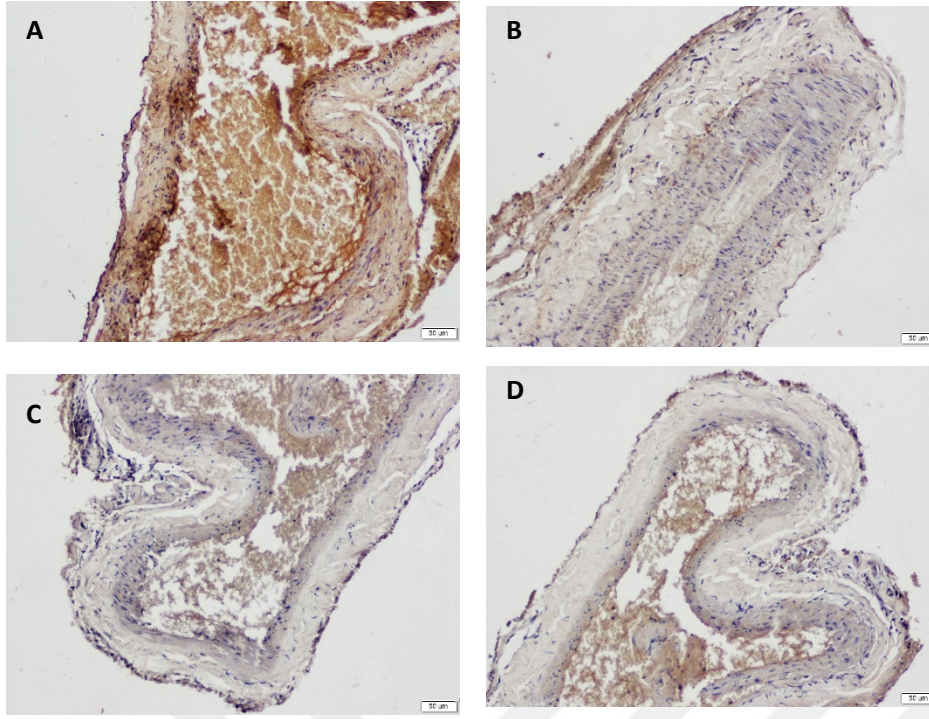
İmmunohistokimyasal Sonuçlar

Trombin III, VEGF, Kollajen-1 ve Thy-1 immunohistokimyasal boyamalar sonrasında grup 1 de Anti-trombin III immunoreaktivitesinin orta şiddette pozitif olduğu ve boyanmanın tunika adventisya ve yer yerde endotel de olduğu gözlemlendi (Resim 37A). VEGF boyamasının endotel ve tunika adventisya tabakasında pozitif olduğu ve diğer boyamalara nazaran boyanmanın orta şiddette olduğu saptandı (resim 37B). Kollajen-1 boyamasının özellikle tunika media tabakasında olduğu ve zayıf şiddette pozitif olduğu izlendi. Etraf bağ dokusunda da zayıf şiddette pozitif olduğu saptandı (Resim 37C). Thy-1 boyamasının ise daha az tunika media da özellikle tunika adventisyada daha fazla olduğu, etraf bağ dokuda da az sayıda pozitif hücrelerin olduğu gözlemlendi (Resim 37E). Tüm gruplarda yapılan kontrol immunohistokimya boyamalarında boyanmanın olmadığı gösterildi (resim 37E).



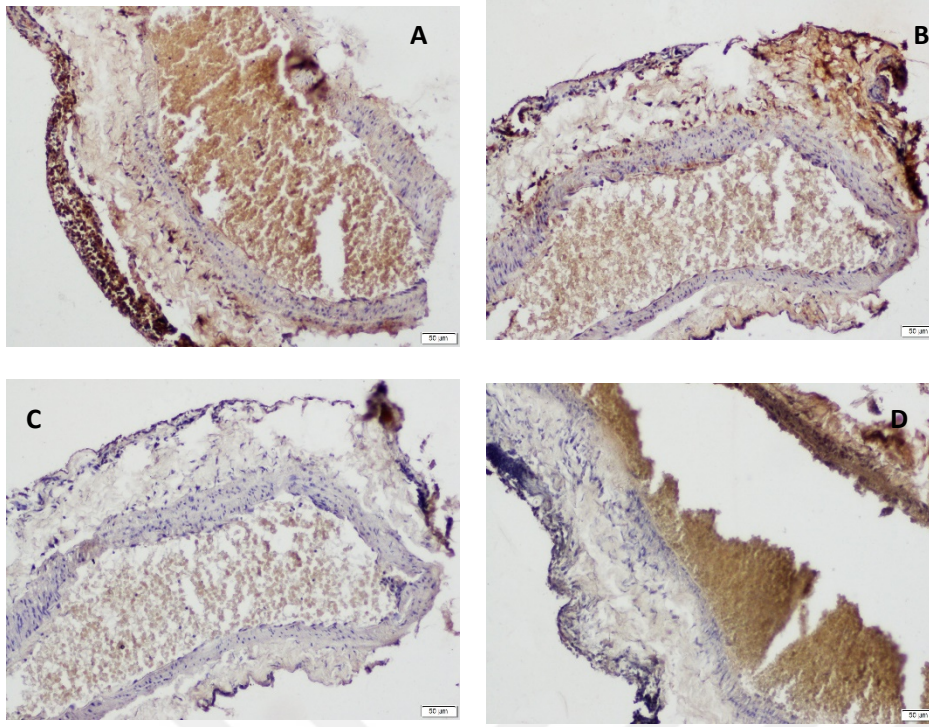
Resim 37: Grup 1 örneklerinde Anti-trombin III (A), VEGF (B), Kollagen-1 (C) ve Thy-1 (D) boyamaları. (E) Kontrol immunohistokimya boyaması. Scale bars: 20 µm

Anti-trombin III, VEGF, Kollajen-1 ve Thy-1 immunohistokimyasal boyamalar sonrasında grup 2 de Anti-trombin III immunoreaktivitesinin kuvvetli pozitif pozitif olduğu ve boyanmanın tunika adventisya ve endotel de yoğun şekilde olduğu gözlemlendi (Resim 38A). VEGF boyamasının endotel ve tunika adventisya tabakasında pozitif olduğu ve boyanmanın yer yer orta, fakat genel olarak zayıf şiddette olduğu gözlemlendi (resim 38B). Kollajen-1 boyamasının tunika media tabakasında olduğu ve etraf bağ dokusunda olduğu, grup 1 e nazaran daha az boyanma olduğu, tespit edildi (Resim 38C). Thy-1 boyamasının ise tunika adventisyada ve çevre dokuda olduğu izlendi (Resim 38D).



Resim 38: Grup 2 örneklerinde Anti-trombin III (A), VEGF (B), Kollagen-1 (C) ve Thy-1 (D) boyamaları. Scale bars: 20 µm

Anti-trombin III, VEGF, Kollajen-1 ve Thy-1 immunohistokimyasal boyamalar sonrasında kök hücre verilen grup 3 de Anti-trombin III immunoreaktivitesinin tunika adventisya tabakasında kuvvetli pozitif, endotel de ise orta şiddette pozitif olduğu (Resim 39A). VEGF boyamasının endotel ve tunika adventisya tabakasında pozitif olduğu, endotel de orta şiddette pozitif iken, tunika adventisyada kuvvetli pozitif olduğu saptandı (Resim 39B). Boyanmanın grup 1 ve 2 ye oranla daha fazla olduğu izlendi. Kollajen-1 boyamasının ise tunika media tabakasında olduğu ve etraf bağ dokusunda olduğu boyanmanın ise zayıf şiddette olduğu saptandı (Resim 39C). Thy-1 boyamasının ise tunika adventisyada ve çevre dokuda olduğu fakat kuvvetli pozitif olarak boyandığı izlendi (Resim 39D) .



Resim 39: Grup 1 örneklerinde Anti-trombin III (A), VEGF (B), Kollagen-1 (C) ve Thy-1 (D) boyamaları. Scale bars: 20 µm

Sonuç olarak kök hücre uygulaması sonrasında anjiogenezis belirteci olan VEGF in arttığı, Thy-1 ekspresyonunda diğer gruplara oranla daha fazla olduğu saptandı. Kollajen-1 immunoreaktivitesinin benzer olması kök hücre uygulaması sonrasında fibrozis e arttıracak şekilde kollajen 1 salınımının olmadığını, normal iyileşme sürecindeki kollajen varlığı ile benzer olduğu sonucuna varıldı. Özellikle kök hücre uygulaması sonrasında angiogenesis in artması iyileşmeyi desteklediğini düşündürdü. Thy-1 in varlığı ise mezenkimal kök hücreler ile inflamatuvar hücreler arasındaki doğrudan ilişkiden dolayı olabileceğini, iyileşme içinde pozitif etkinin sağlanmış olabileceğini düşündürdü. Anti-trombin III immunoreaktivitesinin yanık grubunda en fazla olduğu, kök hücre uygulaması ile Anti-trombin III ekspresyonunun azaldığı görüldü.

6. TARTIŞMA

Yanıklar tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ciddi bir sağlık sorunu, hastalar için ağır bir travma, önemli bir mali sorun olmaya devam etmektedir. Yaşanılan travma, psikolojik sorunlar ve hastaların uzuvlarını kaybetmeye kadar ilerleyebilen komplikasyonlar nedeniyle bu durumdan hastalar ile birlikte aileleri de etkilenmektedir. Bu travma ile karşılaşma ihtimalinin özellikle üretken bir dönem olan 20-50 yaş grubu arasında daha fazla olması ³³ nedeniyle olayın yarattığı maddi ve manevi hasar daha da büyümeaktadır.

Yanık yaralarının erken tedavisi ve ve hastaların mobilizasyonu ; enfeksiyon, hastanede kalma süresi ve buna bağlı komplikasyonları azaltmada önemli yer tutmaktadır. Özellikle erken debridman ve ölü dokuların belirlenip hızla yanık yarısından uzaklaştırılması yanığın oluşturduğu stres faktörleri ve çeşitli vücuda hasar verecek radikal salınımı azaltmakta ve iyileşmeyi hızlandırmaktadır ⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸⁻⁹⁻¹⁰.

Ölü dokuların debridmanı sonrası açıkta kemik, tendon, damar , sinir gibi dokuların kalması halinde bu yaraların rekonstrüksiyonu için flep seçenekleri gözden geçirilmelidir. Ekstremiteler gibi lokal flep seçeneklerinin kısıtlı olduğu yerlerde özellikle alt 1/3 tibia komşuluğunda serbest flepler iyi seçeneklerdir.

Serbest fleplerin kullanımının zamanlaması konusunda değişik yaklaşımlar olmakla birlikte yapılan literatür araştırmasında akut debridman sonrası serbest flep kullanımı başarılı sonuçlar ortaya koymuştur ¹³. Bu çalışmalarda yanık yaralarının lokalize bir alanda olması nedeniyle serbest flepler için alıcı arter ve ven yanık hasarının olmadığı alanlardan temin edilebilmiştir ¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷. Fakat klinik olarak karşılaşılan hastaların bazılarında değişik derecelerde total ekstremitte yanıkları izlenebilmektedir. Bu durum da debridman sonrası yara rekonstrüksiyonu için lokal flepler ; alıcı arter ve venin yanık zemini altında kalması sebebiyle serbest flep seçenekleri tartışmalı hale gelebilmektedir. Bu durumda hastalar için öngörülen tedavi protokolü ekstremitelerde total yanık nedeni değişebilmektedir. Serbest fleplerin başarısı için alıcı arter ve venin yanıktan direkt olarak etkilenmemiş, hasar görmemiş olması zorunludur. Derin termal yanıklarda ve elektrik yanıklarında bu durum görülebilmek birlikte 1. yanıklarda, derin ve yüzeysel 2. derece yanıklarda, arter ve venin lokalizasyonuna göre bazı durumlarda 3. derece yanıklarda bu damarların direk hasar görmemiş olması olasıdır.

Bu derecelerdeki yanmış doku altında kalan vasküler yapılar, direk hasar görmedikleri halde yanık nedenli oluşan, yanığın zeminde yarattığı lokal faktörler ve inflamatuvar çevre içerisinde bulunmaktadır.

Yanık yarasında akut dönemde yapılan debridman neticesinde yara rekonstrüksiyonu için serbest flep gerektiren hastalarda, alıcı arter ve ven; yanığa bağlı direk hasarın olmadığı 1. - yüzeysel veya derin 2. derece yanık zeminini altında olabilmektedir. Yapılan literatür araştırmasında akut dönemde bu şekilde tedavi edilmiş klinik veya deneysel bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bunun muhtemel sebebi alıcı arter ve venin direk yanık hasarı görmemesine rağmen yanık zemini altında kalması ve bu damarlara güvenilmemesi olabilir.

Benzer bir örnek olarak termal yanık sonrası dış merkezce değerlendirilmiş, bir çok operasyon öyküsü olan ve sol tibia ön yüzünün tüme yakın açıkta kaldığı total ekstremite yanıklı hasta akut dönem atlatıldıktan sonra kliniğimize refere edilmiş ve serbest latissimus dorsi kas flebi ile rekonstrüksiyonu planlanmıştır. Alıcı arter ve venin yanıktan direk hasar görmediği, nekroz veya yapısal bütünlüğün bozulmadığı izlenmiş ve anastomozlar eski yanık zemini altında anterior tibial arter ve ven ' e yapılarak flepte başarı sağlanmıştır.



Resim 40. Klinik geç döneme kadar beklemiş yanıklı bir hasta. A- Sol Tibia üzerinde periost dahil yumuşak doku defekti, B- Lastissimus dorsi serbest kas flebi ile defekt onarımı.

Çalışma ile yanık zemini altında damar anastomozu çalışabilirliği ve yanığın neden olduğu lokal etkilerin anastomoz başarısını değiştirip değiştirmediği araştırılmıştır. Bu nedenle derin ikinci derece yanık modeli seçilerek anaastomoz yapılacak femoral arterin direk olarak yanıktan etkilenmesi ve yanması engellenmiştir. Kontrol grubundan 1 denek operasyon sonrası öldüğü ve yanık grubundan 1 denekte yara açılması, yara içinde yabancı cisim saptanması nedeniyle çalışma dışı bırakılmıştır.

Mikrocerrahi yöntem ile yapılmış damar anastomozlarında büyük vasküler problemler genellikle operasyondan sonra saatler içinde kendilerini göstermektedir²⁰. Gözden kaçmış teknik bir hataya veya çeşitli diğer faktörlere bağlı meydana gelebilecek tromboz genellikle ilk 12-24 saatlik zaman dilimi içinde oluşmakta bu nedenle bu period atlatıldıktan sonra tromboz görülme ihtimali oldukça nadir olmaktadır²⁰. Kendi klinik tecrübemizde hastalara yapılan serbest flep uygulamalarında yapılan arter anastomozu sonrası ilk iki günde herhangi bir problem yaşanmadığı takdirde sonradan bir problem görülmedi. Biz bu sonuçla femoral arter anastomozunu sonrası 3 gün beklemeyi ve sonra değerlendirmeyi uygun bulduk.

Yanık zemini altında yapılan anastomozlarda başarı oranları kontrol grubuna göre daha düşük olmakla birlikte yapılan istatistiksel analiz sonucunda her üç grupta anastomoz başarısı istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Denek sayısının her grupta artırılması ile sonuçların değişmesi olası olmakla birlikte çalışma sonucunda istatistiksel olarak yanığın lokal etkilerinin anastomoz başarısını etkilemediği görülmüştür.

Serbest flep operasyonlarından sonra trombozu önlemek için çeşitli ajanlar kullanılmakla birlikte , bunların yararları ile ilgili tartışma devam etmektedir¹⁰⁸⁻¹⁰⁹⁻¹¹⁰⁻¹¹¹. Biz bu nedenle deneklere anastomoz sonrası herhangi bir tromboz önleyici ajan vermemeyi uygun bulduk.

Kök hücre uygulamalarının yara iyileşmesine olumlu yönde etkilerini gösteren çalışmaların sayısı oldukça fazladır²²⁻²³⁻²⁴. Anastomoz hattının yanık alanı altında, çeşitli mediyatörlerin salındığı inflamasyon zemininde bulunması nedeniyle, yara iyileşmesine bir çok olumlu etkisi olan kök hücre uygulamasının anastomoz hattında ne gibi değişikliklere neden olacağı ve anastomoz başarı oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratıp yaratmadığı diğer bir araştırma konusunu içermektedir. Yapılan literatür taramasında bununla ilgili bir çalışmaya

rastlanılmamıştır. Bu amaçla 3. grubu oluşturan deneklere femoral arter anastomozunu takiben hat üzerine kök hücre ekimi yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi. Deney sonunda üç grupta anastomoz başarı oranlarında istatistiksel bir fark bulunmadı.

Bununla birlikte kök hücre uygulamasının yapıldığı 3. grup ta MDA ve SOD değerlerine bakıldığında oksidatif stresin daha iyi tolere edilebildiği görülmüştür.

VEGF yara iyileşmesinde bir ok önemli etkileri olan anjiogenezisi indükleyen bir mediyatördür. Ratlarda yapılan bir çalışmada VEGF nin intraluminal verilmesi ile anastomoz hattında daha hızlı endotelizasyon ve iyileşme gösterilmiştir ¹⁰³. Yine yanık travmasına bağlı trombüse olan meylin artmasında önemli parametrelerden biri ATIII düşüşür ⁶⁷⁻⁶⁸⁻⁶⁹. Normal koagülasyon sisteminde trombozisin önlenmesinde görev alır ¹¹². Anastomoz öncesi ATIII ‘ün aktif formunun kullanılması trombozun önlenmesinde efektif sonuçlar ortaya koymuştur ¹¹².

Çalışmada yara iyileşmesine önemli katkıları görülen, oksidatif stresin azalmasında ve kompanse edilmesinde anlamlı fark yaratan kök hücre uygulamasının VEGF ve ATIII değerlerinde anlamlı fark yaratan bir değişikliğe neden olmadığı ortaya çıkmıştır.

7. SONUÇ

Yanık yaralarının tedavisinde en önemli parametrelerden biri erken tedavidir. Erken cerrahi eksizyon ile ölü dokuların hızla uzaklaştırılması ve uygun rekonstrüktif seçenek ile hızlı iyileşme, komplikasyonlarda azalma ve hastanın hızlı bir şekilde kendi sosyal ortamına geri döndürülmesi mümkün olabilmektedir.

Bu çalışmada yanık zemini altında damar anastomozunun çalışabilirliğine ve kök hücre uygulaması ile ne gibi değişiklikler olduğunu araştırdık.

Yaptığımız çalışmanın sağladığı bulgular ışığında , damarların yanıktan doğrudan etkilenmediği fakat üzerini kapatan derinin yandığı durumlarda anastomoz başarı oranları istatistiksel olarak normal doku ile aynı çıkmıştır. Bu durumda yanık zemini altında kalan damarlarda , yanığın lokal etkilerine bağlı gelişen inflamasyon alanı içinde dahi anastomoz başarıları istatistiksel olarak değişmemiştir. Yara iyileşmesinde bir çok önemli etkisi bulunan kök hücre uygulaması anastomoz patensinde bir değişikliğe yol açmamıştır.

Bu veriler ışığında özellikle ekstremitelerde olmak üzere yüzey olarak geniş yanıkların bulunduğu, cerrahi debridman ve debridman sonrası rekonstrüksiyon için serbest fleplerin gerekebileceği yanık yaralarında, flebi besleyecek damarların yanıklı doku altında kalması halinde bile akut dönemde serbest fleplerin klinik olarak uygulanabilir olduğunu ve klinik uygulamalar ile bu sayede hızlı ve etkili bir sonuçlar almanın mümkün olacağını düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

- 1- Herndon DN. Total Burn Care, third edition. 2007, Saunders –Elsevier
- 2- Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. Burns. 2014 Nov;40(7):1375-83
- 3- Gibran NS, Wiechman S, Meyer W, Edelman L, Fauerbach J, Gibbons L, et al. American Burn Association consensus statements. J Burn Care Res.2013;34:361–5.
- 4- American Burn Association. National Burn Repository, Version 5.0, 2009
- 5- Heimbach D. Early burn excision and grafting. Surg Clin North Am. 1987;67:93
- 6- Nguyen TT, Gilpin DA, Meyer NA, Herndon DN. Current treatment of severely burned patients. Ann Surg 1996;223(1):14-25
- 7- Ong YS, Samuel M, Song C. Meta-analysis of early excision of burns. Burns. 2006 Mar;32(2):145-50.
- 8- Burke JF, Bondoc CC, Quinby WC. Primary burn excision and immediate grafting: a method of shortening illness. J Trauma 1974;14:389-95.
- 9- Demling RH, La Londe C. Early burn excision attenuates the postburn lung and systemic response to endotoxin. Surgery 1990;108:28-35.
- 10- Chipp E, Milner CS, Blackburn AV. Sepsis in burns: a review of current practice and future therapies. Ann Plast Surg 2010;65:228-36.
- 11- Williams FN, Jeschke MG, Chinkes DL, Suman OE, Branski LK, Herndon DN. Modulation of the hypermetabolic response to trauma: temperature, nutrition, and drugs. J Am Coll Surg 2009;208:489-502.
- 12- Semer NB. Practical plastic surgery for nonsurgeons. 2001. Henley & Belfus, Philadelphia.
- 13- Jabir S, Frew Q, El-Muttardi N, Dziewulski P. A systematic review of the applications of free tissue transfer in burns. Burns. 2014 Sep;40(6):1059-70.
- 14- Pan CH1, Chuang SS, Yang JY. Thirty-eight free fasciocutaneous flap transfers in acute burned-hand injuries. Burns. 2007 Mar;33(2):230-5.
- 15- Nappi JF, Lubbers, LM, Carl BA. Composite tissue transfer in burn patients. C/in Plast Surg 1986; 13: 137-144.

- 16-** Stefanacci HA, Vandevender DK, Gamelli RL. The use of free tissue transfers in acute thermal and electrical extremity injuries. *J Trauma*. 2003 Oct;55(4):707-12.
- 17-** Baumeister S, Köller M, Dragu A, Germann G, Sauerbier M. Principles of microvascular reconstruction in burn and electrical burn injuries. *Burns*. 2005 Feb;31(1):92-8
- 18-** Platt AJ, McKiernan MV, McLean NR. Free tissue transfer in the management of burns. *Burns*. 1996 Sep;22(6):474-6
- 19-** Orgill DP, Ogawa R. Current methods of burn reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2013 May;131(5):827e-36e
- 20-** Wei FC, Mardini S. *Flaps and Reconstructive Surgery*. 2009, Saunders-Elsevier.
- 21-** Janis JE. *Essentials of Plastic Surgery*. 2007, Quality Medical Publishing. St.Louis, Missouri.
- 22-** 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; 48: 15–24.
- 23-** Nie C, Yang D, Xu J, Si Z, Jin X, Zhang J. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. *Cell Transplant* 2011; 20: 205–16.
- 24-** Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2010; 5: 103– 10.
- 25-** Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 2007; 212: 702–9.
- 26-** S. S. Collawn, N. S. Banerjee, J. de La Torre, L. Vasconez, and L. T. Chow, “Adipose-derived stromal cells accelerate wound healing in an organotypic raft culture model,” *Annals of Plastic Surgery*, vol. 68, no. 5, pp. 501–504, 2012.
- 27-** Reichenberger MA, Mueller W, Schafer A: Adipose Derived Stem Cells Protect Skin Flaps Against Ischemia - Reperfusion Injury. *Stem Cell Rev Rep* 2012, 8, 854–862.
- 28-** Mohammadi AA, Amini M, Mehrabani D, Kiani Z, Seddigh A. A survey on 30 months electrical burns in Shiraz University of Medical Sciences Burn Hospital. *Burns* 2008;34:111-3.
- 29-** Mayhall CG. The epidemiology of burn wound infections: then and now. *Clin Infect Dis* 2003; 37:543–50.

- 30-** Tang K, Jian L, Qin Z, Zhenjiang L, Gomez M, Beveridge M. Characteristics of burn patients at a major burn center in Shanghai. *Burns* 2006; 32:1037–43.
- 31-** Pasalar M, Mohammadi AA, Rajaeefard AR, Neghab M, Tolidie HR, Mehrabani D. Epidemiology of burns during pregnancy in southern Iran: Effect on maternal and fetal outcomes. *World Appl Sci J* 2013;28:153-58.
- 32-** Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ*. 2004 Jun 12;328(7453):1427-9
- 33-** Bessey PQ1, Phillips BD, Lentz CW, Edelman LS, Faraklas I, Finocchiaro MA, Kemalyan NA, Klein MB, Miller SF, Mosier MJ, Potenza BM, Reigart CL, Browning SM, Kiley MT, Krichbaum JA. Synopsis of the 2013 annual report of the national burn repository. *J Burn Care Res*. 2014 May-Jun;35 Suppl 2:S218-34
- 34-** Grabb and Smith's Plastic Surgery, Sixth Edition, 2010 Lippincott & Wilkins
- 35-** Wachtel TL, Berry CC, Wachtel EE, Frank HA. The inter-rater reliability of estimating the size of burns from various burn area chart drawings. *Burns* 2000; 26:156.
- 36-** Spurr ED, Shakespeare PG. Incidence of hypertrophic scarring in burn-injured children. *Burns* 1990;16(3):179–81.
- 37-** A.M.I. Watts, M.P.H. Tyler , M.E. Perry , A.H.N. Roberts , D.A. McGrouther. Burn depth and its histological measurement. *Burns* 27 (2001) 154–160
- 38-** Mathes Plastic Surgery, Volume 1, 2006 Elsevier
- 39-** Zawacki B E. The natural history of reversible burn injury. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1974; 139:867-72
- 40-** E J van Hasselt. *Burns Manual*. 2nd edition.2008
- 41-** Robins EV. Burn shock. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 1990;2:299–307.
- 42-** Finnerty CC, Herndon DN. Is propranolol of benefit in pediatric burn patients? *Adv Surg.* 2013;47:177-97
- 43-** Pham TN, Cancio LC, Gibran NS, American Burn Association. American Burn Association practice guidelines burn shock resuscitation. *J Burn Care Res*. 2008;29:257–66.
- 44-** Shirani KZ, Vaughan GM, Mason Jr AD, Pruitt Jr BA. Update on current therapeutic approaches in burns. *Shock*. 1996;5:4–16.

- 45-** Moritz A R, Henriquez F C. Studies of thermal injury II. The relative importance of time and surface temperature in the causation of cutaneous burns. *Am J Pathol* 1947;23:695-720
- 46-** Bass H, Moore J L, Conkley W T. Lethality in mammalian cells due to hyperthermia under oxic and hypoxic conditions. *Int J Radiat Biol* 1978;33:57-67
- 47-** Robson M C , Del Becarro E J, Hegggers J P, et al. Increasing dermal perfusion after burning by decreasing thromboxane production. *J Trauma* 1980; 20: 722-5
- 48-** Keck M, Herndon DH, Kamolz LP, Frey M, Jeschke MG. Pathophysiology of burns. *Wien Med Wochenschr.* 2009;159(13-14):327-36.
- 49-** Singer AJ, McClain SA. Persistent wound infection delays epidermal maturation and increases scarring in thermal burns. *Wound Repair Regen*, 10: 372–377, 2002.
- 50-** Johnson G S, Lineberger T, Hothem A L, Adams K, Hinston T, Winkenwerder W. Erythrocyte flexibility in the burned patient. *Burns* 1979;6:91-5
- 51-** Johnson C E, Granström E, Hamburg M. Prostaglandins and thromboxane in burn injury in man. *Scand J Plast Reconst Surg* 1979;13:45-47
- 52-** Barış Ç, Berrak Ç Y. Systemic Responses to Burn Injury. *Turk J Med Sci* 34 (2004) 215-226
- 53-** Marc G. Jeschke, Lars-Peter Kamolz, Folke Sjöberg, Steven E. Wolf. *Handbook of Burns Volume 1: Acute Burn Care.* Springer Science & Business Media, 2012
- 54-** Till GO, Beauchamp C, Menapace D, et al. Oxygen radical dependent lung damage following thermal injury of rat skin. *J Trauma* 23: 269-77, 1983
- 55-** Tranbaugh RF, Lewis FR, Christensen JM, et al. Lung water changes after thermal injury: the effects of crystalloid resuscitation and sepsis. *Ann Surg* 192:479-90, 1980.
- 56-** Meakins JL. Etiology of multiple organ failure. *J Trauma* 30: 165- 8, 1990.
- 57-** Reyes R Jr, Wu Y, Lai Q, Mrizek M, Berger J, Jimenez DF, Barone CM, Ding Y. Early inflammatory response in rat brain after peripheral thermal injury. *Neuroscience Letters* 407 (2006) 11–15
- 58-** Orman MA, Nguyen TT, Ierapetritou MG, Berthiaume F, Androulakis IP. Comparison of the Cytokine and Chemokine Dynamics of the Early Inflammatory Response in Models of Burn Injury and Infection. *Cytokine.* 2011 Sep;55(3):362-71

- 59- Pallua N, Low JF, von Heimburg D. Pathogenic role of interleukin- 6 in the development of sepsis. Part II: Significance of anti-inter- leukin-6 and anti-soluble interleukin-6 receptor-alpha antibodies in a standardized murine contact burn model. *Crit Care Med* 2003; 31(5):1495–1501.
- 60- Boehm U, Klamp T, Groot M, et al. Cellular responses to inter- feron-gamma. *Ann Rev Immunol* 1997; 15:749–795.
- 61- Mack VE, McCarter MD, Naama HA, et al. Dominance of T-helper 2-type cytokines after severe injury. *Arch Surg* 1996; 131(12):1303–1308.
- 62- O’Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, et al. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann Surg* 1995; 222(4):482– 490.
- 63- Merritt EK, Cross JM, Bamman MM. Inflammatory and protein metabolism signaling responses in human skeletal muscle after burn injury. *J Burn Care Res.* 2012 Mar-Apr;33(2):291-7
- 64- Loebl EC, Baxter CR, Curreri PW. The mechanism of erythrocyte destruction in the early post-burn period. *Ann Surg* 1973; 178:681–686.
- 65- Topley E, Jackson DM, Cason JS, et al. Assessment of red cell loss in the first two days after severe burns. *Ann Surg* 1962; 155:581–590
- 66- Nimah M, Brilli RJ. Coagulation dysfunction in sepsis and multi- ple organ system failure. *Crit Care Clin* 2003; 19:441–458.
- 67- Bartlett RH, Fong SW, Marrujo G, et al. Coagulation and platelet changes after thermal injury in man. *Burns* 1981; 7:370–377.
- 68- Kowal-Vern A, Gamelli RL, Walenga JM, et al. The effect of burn wound size on hemostasis: a correlation of the hemostatic changes to the clinical state. *J Trauma* 1992; 33:50–56; discussion 56–57.
- 69- Saliba MJ Jr. Heparin in the treatment of burns: a review. *Burns* 2001; 27:349–358.
- 70- Murakami K, McGuire R, Cox RA, et al. Recombinant antithrom- bin attenuates pulmonary inflammation following smoke inhala- tion and pneumonia in sheep. *Crit Care Med* 2003; 31:577–583.
- 71- Kowal-Vern A, Latenser BA. Antithrombin (human) concentrate infusion in pediatric patients with >50% TBSA burns. *Burns* 2003; 29:615–618.
- 72- Ghavami Y, Mobayen MR, Vaghardoost R. Electrical burn injury: a five-year survey of 682 patients. *Trauma Mon.* 2014 Nov;19(4):e18748.

- 73- Sahin I, Ozturk S, Alhan D, Açikel C, Isik S. Cost analysis of acute burn patients treated in a burn centre: the Gulhane experience. *Ann Burns Fire Disasters*. 2011 Mar 31;24(1):9-13.
- 74- Aleksandra Piotrowski , Anne-Marie Fillet , Philippe Perez , Philippe Walkowiak , Denis Simon , Marie-Jean Corniere , Pierre-Andre Cabanes , Jacques Lambrozo. Outcome of occupational electrical injuries among French electric company workers: A retrospective report of 311 cases, 1996–2005. *Burns*. 2014 May;40(3):480-8.
- 75- Buja Z, Arifi H, Hoxha E. Electrical burn injuries. An eight- year review. *Annals of Burns and Fire Disasters* - vol. XXIII - n. 1 - March 2010
- 76- Yano K, Hata Y, Matsuka K, Ito O, Matsuda H. Effects of washing with a neutralizing agent on alkaline skin injuries in an experimental model. *Burns* 1994; 20(1):36–39.
- 77- Cathy Thomas Hess, RN, BSN, CWOCN. *Clinical Guide To Skin & Wound Care*, Seventh Edition. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. 2013
- 78- Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1992;78:71-100
- 79- Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg*. 2004; 187: p11- p16
- 80- Gürler T. Yara İyileşmesi. in: Arman Çağdaş. *Estetik Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi*. Ege Üniversitesi Basımevi, 2003; 17-26
- 81- Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R : Burn wound infections. *Clinical microbiology reviews* 2006, 19(2):403-434.
- 82- Janzekovic Z. A new concept in the early excision and immediate grafting of burns. *J Trauma* 1970;10(12):1103-8.
- 83- Pietsch JB, Netscher DT, Nagaraj HS, Groff DB. Early excision of major burns in children: effect on morbidity and mortality. *J Pediatr Surg* 1985;20(6):754-7
- 84- Cheema T. *Complex Injuries of The Hand*. 2014, JP Medical Ltd.
- 85- Wolff KD, Hölzle F. *Raising of Microvascular Flaps*. 2005, Springer
- 86- Koźlik M, Wójcicki P. The use of stem cells in plastic and reconstructive surgery. *Adv Clin Exp Med*. 2014 Nov-Dec;23(6):1011-7.
- 87- Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett*. 2011 Jun;16(2):236-57.

- 88-** Teng M, Huang Y, Zhang H. Application of stems cells in wound healing -an update. *Wound Repair Regen.* 2014 Mar-Apr;22(2):151-60.
- 89-** Rohwedel J, Maltsev V, Bober E: Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 1994, 164, 87.
- 90-** Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM: Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 1993, 44, 41.
- 91-** Zarzeczny A, Caulfield T: Emerging ethical, legal and social issues associated with stem cell research and the current role of the moral status of the embryo. *Stem Cell Rev* 2009, 5, 96–101.
- 92-** Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–72.
- 93-** Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–76.
- 94-** Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 3349–60.
- 95-** V. I. Shumakov, N. A. Onishchenko, M. F. Rasulov, M. E. Krashennnikov, and V. A. Zaidenov, “Mesenchymal bone marrow stem cells more effectively stimulate regeneration of deep burn wounds than embryonic fibroblasts,” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 136, no. 2, pp. 192–195, 2003.
- 96-** M. F. Rasulov, A. V. Vasilchenkov, N. A. Onishchenko et al, “First experience of the use bone marrow mesenchymal stem cells for the treatment of a patient with deep skin burns,” *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, vol. 139, no. 1, pp. 141–144, 2005.
- 97-** Kim CG, Lee JJ, Jung DY, Jeon J, Heo HS, Kang HC, et al. Profiling of differentially expressed genes in human stem cells by cDNA microarray. *Mol Cells* 2006; 21: 343–55.
- 98-** Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW. Adipose- derived cells. *Cell Transplant* 2007; 16: 963–70.
- 99-** Alon T, Hemo I, Itin A, Pe’er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1: 1024–8.

- 100- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103:159–65.
- 101- Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*. 2007 Dec 15;102(6):1358-67.
- 102- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005 Oct-Dec;9(4):777-94.
- 103- Infanger M, Shakibaei M, Kossmehl P, Hollenberg SM, Grosse J, Faramarzi S, Schulze-Tanzil G, Paul M, Grimm D. Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model. *J Vasc Res*. 2005 May-Jun;42(3):202-13. Epub 2005 Apr 14.
- 104- Koray Kadam, 2014. Deneysel temas tipi yanıklarda acil uygulanan tedavi yöntemlerinin yara iyileşmesi üzerine etkilerinin alpinia officinarum (havlıcan) topical tedavisi ile karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı, İzmir
- 105- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*. 1976 Apr;15(2):212-6
- 106- Onkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8
- 107- Knight JA, Pieper RK, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem*. 1988 Dec;34(12):2433-8
- 108- Yii NW, Evans GR, Miller MJ, Reece GP, Langstein H, Chang D, Kroll SS, Wang B, Robb GL. Thrombolytic therapy: what is its role in free flap salvage? *Ann Plast Surg*. 2001 Jun;46(6):601-4.
- 109- Richards RS, Bowen CV, Glynn MF. Microsurgical free flap transfer in sickle cell disease. *Ann Plast Surg*. 1992 Sep;29(3):278-81.
- 110- Veravuthipakorn L1, Veravuthipakorn A. Microsurgical free flap and replantation without antithrombotic agents. *J Med Assoc Thai*. 2004 Jun;87(6):665-9.
- 111- Zaman SR, Rawlins JM. Heparin induced thrombocytopaenia (HIT) as a cause of free flap failure in lower limb trauma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2014 Jun;67(6):884-6.
- 112- Partecke BD, Fischer C, Buck- Gramcko D. Antithrombin III- an important factor in long-lasting microvascular operations. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 1985 Mar;17(2):81-5

9. ABSTRACT

Burns are a kind of injury occurred on skin, muscle or bone with various etiologic factors and are one of the most severe kind of trauma.

Due to the benefits obtained in developed countries, especially in severe burns, early tangential excision has entered into standard treatment algorithm. Early tangential excision and grafting reduces mortality and morbidity, development of infection risk and length of stay in hospital. In addition with early excision of eschar, risk of hypertrophic scar and release of inflammatory mediators decreases.

If there is a well-vascularized wound bed is available after early debridement of a wound caused by burn, skin grafting is carried out as a first step procedure, and in the absence of proper wound bed local flap procedures are carried out as an alternative. However, in patients with burns, raising local flaps from surrounding tissues around the burn often not possible, especially in the extremities, and in this case the best choice are free flaps.

Recently, burn injury-free intact areas are selected for vascular anastomosis in early wound debridement and reconstruction with free flap procedures and anastomosis performed under these areas. Literature review also supports that. However, in some cases referred to burn centers; varying degrees of burns can be monitored on all surfaces, especially in the extremities, and therefore there can be no available tissue for free flap transfer which is not damaged with burn. The literature has not revealed a study on the applicability of the free flaps in such cases. Several systemic and local factors interact in burns. When free flap required in these cases, if performing vessel anastomosis under the burn area necessary, how it is influenced by local effect of burn is issue of concern and there is no experimental or clinical studies on this subject.

It has been shown that adipocyte-derived stem cells reduces ischemia-reperfusion damage occurring after ischemia in reconstructive flap surgery and have positive contributions to flap survey in addition to several positive effects on wound healing such as acceleration in re-epithelialization by releasing growth mediators such as PDGF, FGF, TGF- β ; acceleration of neovascularization and wound healing, increase of keratinocytes and dermal fibroblast proliferation by releasing mediators such as VEGF-A, HGF (hepatic growth factor), FGF-2.

For that purpose, if the vessels do not directly affect from burn under burnt tissue, but the burnt tissue covers on them, vascular anastomosis success and application of stem cells effect on it in an environment where the local effects of burn are present were investigated.

For this purpose subjects (21 Wistar – albino rats weighing 300 grams) were separated into three groups which are control, burn and burn + stem cells groups. Femoral artery anastomosis was performed only in the first group according to the model; femoral artery anastomosis under the burnt tissue was performed after burning left inguinal regions of the subjects in the second group; stem cell application to the anastomosis line under the burnt tissue was performed in the last group. Anastomotic patency of all subjects were evaluated 3 days after surgery and subjects were sacrificed after samples were taken for biochemical and histological studies.

Two subjects excluded from study due to wound dehiscence and detecting large amount of foreign bodies in one rat in burn group and one casualty in control group.

1 of the 6 femoral artery anastomosis in the control group; 3 of the 6 femoral artery anastomosis in the burn group; 3 of the 7 femoral artery anastomosis in the burn + stem cell group has resulted in thrombosis at the end of the experiment. These data statistically evaluated and there were no significant differences between groups after statistical analysis.

VEGF is a mediator which increases angiogenesis and endothelial healing. Yet one of the predisposing factors of post-burn thrombosis is the decrease occurring in ATIII. This two parameters and how they changed after stem cell application was examined in all three groups. Statistically and histopathologically there were no significant changes observed in VEGF and ATIII levels in three groups although a better response to oxidative stress was observed in stem cell group subjects.

In the light of such information, the vascular structures was not directly affected from burn even if there is no intact tissue and vascular structures under the burn area can used as a source in the choice of vascular structure around the wounds requiring free flap indication after burn wound debridement, and in these patients free flaps are available for use.

We believe that, should not be avoid free flap procedures in cases requiring free flap for early and appropriate treatment of patients; in burns including large surface area, especially in extremities, even if vascular structures present under burnt areas and further experimental and clinical studies is needed to be done.

