



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONSTRÜKTİF ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

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

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. SİBEL ATALAY

KAYSERİ 2011



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONSTRÜKTİF ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

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

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. SİBEL ATALAY

Danışman

Prof. Dr. ATILLA ÇORUH

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

Kayseri 2010

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 TARİHÇE	3
2.1.1 Yanık Tedavisi Tarihçesi	3
2.1.2 Stromal Vasküler Fraksiyon Tarihçesi	5
2.2 DERİ	5
2.2.1 Derinin Yapısı	5
2.2.2 Derinin Görevleri	8
2.3 YANIK.....	8
2.3.1 Yanık Derinliği.....	8
2.3.2 Yanık Zonları	10
2.3.3 Yanık Patofizyolojisi	10
2.3.4 Yanık Yarasının İyileşmesi ve Tedavisi	11
2.4 YAĞ DOKUSU	12
2.4.1 Stromal vasküler Fraksiyon	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1 Denekler	19

3.2 Anestezi ve analjezi.....	20
3.3 Stromal vasküler fraksiyonun hazırlanması.....	20
3.4.Yanık oluşturulması	24
3.5 Doku örneklerinin alınması.....	25
3.6 Değerlendirme.....	25
3.6.1 Histopatolojik değerlendirme yöntemi.....	25
3.6.2 İmmünohistokimyasal boyama yöntemi	25
3.6.3 PCNA indeksi değerlendirmesi	26
3.6.4 VEGF Ekspresyon skoru değerlendirmesi	26
3.6.5 İstatistiksel değerlendirme	27
4. BULGULAR	28
4.1 Histopatolojik bulgular	28
4.1.1 Enflamasyon.....	28
4.1.2 Damarlanma	31
4.1.3 Fibroblastik aktivite	33
4.2 VEGF ekspresyon skoru	35
4.3 PCNA indeksi	37
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR	47
TEZ ONAY	53

KISALTMALAR

SVF:	Stromal vasküler fraksiyon
ADSC:	Yağ doku kaynaklı kök hücre (Adipose derived stem cell)
TGF-β :	Transforming growth factor β
PGE₂:	Prostoglandin E ₂
GM-CSF:	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
VEGF:	Damar endoteli büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte growth factor)
b-FGF:	Bazik fibroblast büyüme faktörü (Basic-Fibroblast growth factor)
KGF:	Keratinosit büyüme faktörü (Keratinocyte Growth Factor)
PLA:	İşlenmiş Lipoaspirat Hücreleri (Processed Lipoaspirate Cells)
PDGF:	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet-derived growth factor)
PIGF :	Plasental büyüme faktörü (Placental growth factor)
PCNA:	Çoğalan hücre çekirdek antijeni (Proliferating Cell Nuclear Antigen)
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit

PBS: Fosfat buffer solüsyon

DAB: Diaminobenzidin

Brd U: Bromodeoksiüridin

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Farklı derinlikteki yanıkların klinik özellikleri.....	9
Tablo 2: VEGF ekspresyonunun skorlanması.....	27
Tablo 3: Kontrol ve deney grubu enflamasyon düzeylerinin karşılaştırması.....	30
Tablo 4: Kontrol ve deney grubu damarlanma düzeylerinin karşılaştırması	33
Tablo 5: Kontrol ve deney grubu fibroblastik aktivite düzeylerinin karşılaştırması.....	35
Tablo 6: Kontrol ve deney grubu VEGF değerlerinin karşılaştırması	37
Tablo 7: Kontrol ve deney grubu PCNA indeksi karşılaştırması.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

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

Şekil 23: Kontrol ve deney grubu enflamasyon düzeyleri.....	30
Şekil 24: Kontrol grubu 14.gün	32
Şekil 25: Deney grubu 14. gün	32
Şekil 26: Kontrol ve deney grubu damarlanma düzeyleri	33
Şekil 27: Kontrol grubu 14.gün	34
Şekil 28: Deney grubu 14. gün	34
Şekil 29: Kontrol ve deney grubu fibroblastik aktivite düzeyleri.....	35
Şekil 30: Kontrol grubu 10.gün	36
Şekil 31: Deney grubu 10. gün	36
Şekil 32: Kontrol ve deney grubu VEGF ekspresyon skoru.....	37
Şekil 33: Kontrol grubu 14.gün	38
Şekil 34: Deney grubu 14. gün	38
Şekil 35: Kontrol ve deney grubu PCNA indeksi.....	39

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

ÖZET

Amaç: Bu deneysel çalışmada yağ dokudan elde edilen stromal vasküler fraksiyonun derin ikinci derece yanıkların iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması planlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada yirmi adet Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanların hepsinin bilateral inguinal yağ dokuları çıkarıldı. Yağ dokular kollajenzla muamele edildikten sonra santrifüj edilerek stromal vasküler fraksiyon kısmı ayrıştırıldı. Sıçanların sırtında 70°C sıcak su ile derin ikinci derece yanık oluşturuldu. Sıçanlar rasgele seçilerek iki gruba ayrıldı. Tedavi grubundaki ratların yanık alanına intradermal olarak stromal vasküler fraksiyon, kontrol grubuna ise serum fizyolojik verildi. Yanık alanlarından 3, 7, 10. ve 14. günlerde biyopsi alındı. Histopatolojik incelemede; enflamatuar hücre yoğunluğu, fibroblastik aktivite ve damar yoğunluğu değerlendirildi. İmmünohistokimyasal analizde damar endoteli büyüme faktörü (VEGF) ve çoğalan hücre çekirdek antijeni (PCNA) araştırıldı.

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

Sonuç: Stromal vasküler fraksiyon yanık yarasında hücre çoğalmasını ve damarlanmayı arttırmakta, enflamasyonu daha erken dönemde azaltmakta ve fibroblastik aktiviteyi arttırmaktadır. Stromal vasküler fraksiyon yanık yarasının iyileşmesine katkıda bulunmaktadır.

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

1.GİRİŞ ve AMAÇ

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

tedavi ölü dokuların uzaklaştırılması ve oluşan defektlerin deri grefti ve fleple onarımıdır (1,2).

Yağ dokudan elde edilen stromal vasküler fraksiyon (SVF) (3) hücrelerinin birçok büyüme faktörü salgıladığı (4), yeni damar oluşumunu arttırdığı (5,6), anti-apoptotik etkilerinin olduğu (5), antioksidan etkili olduğu (7), yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği (4,8), anti-enflamatuar etkili olduğu (9), fibroblastlardan kollajen sentezini arttırdığı (10) ve kök hücre kaynağı olduğu (11) gösterilmiştir.

Günümüzde derin II.derece yanık tedavisinde yara iyileşmesini hızlandıracak, erken teğetsel eksizyon gerekliliğini azaltacak, yara dönüşümünü kısmen engelleyerek nekrozu azaltacak etkin ve ekonomik bir tedavi seçeneği yoktur. Stromal vasküler fraksiyonun bilinen etkilerini kısmen veya tamamen sağlayarak yanık yarasının iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceği düşünüldüğü için bu çalışmanın yapılması planlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 TARİHÇE

2.1.1 Yanık Tedavisi Tarihçesi

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

kontraktürlerin tedavisi hakkında bilgi vermiştir. Edward Kentish 1797 de yanık ağrılarının azaltılması ve bül oluşumunun önlenmesi için baskılı giysi kullanımını öneren bir deneme yayınlamıştır. Bu dönemlerde, Marjolin, uzun süre kapanmayan yanık yaralarından yassı hücreli kanser geliştiğini fark etmiştir. Ondokuzuncu yüzyıl başlarında, Dupuytren, 50 yanık hastasının tedavisi ile ilgili bir derleme yayınlamış ve yanık derinliği ile ilgili bugün bile geçerliliğini koruyan sınıflamayı yapmıştır. Yanığa bağlı oluşan gastrik ve duodonal ülserleri de muhtemelen ilk tanımlayan odur ancak bu problem ilk kez 1842 de Londra'da Curling tarafından detaylıca tartışılmıştır. Yanıkta sıvı elektrolit tedavisi Frank P Underhill'in çalışmalarıyla başlamıştır. 1921 yılında Rialto tiyatrosu yangınından sonra yanıklı hastaların bül sıvısının içeriğinin plazmaya benzediğini ve ölüm oranının kaybedilen sıvı miktarı ile ilişkili olduğunu fark etmiştir. Hastalara tuz ve protein içeren sıvılar verilerek sıvı kaybının yerine konması gerektiğini söylemiştir. Boston'da 1946 yılında meydana gelen Coconut Grove Night Club yangınında, Dr. Oliver Cope ve Dr. Francis Moore sıvı tedavisinin miktarı üzerine çalışmalar yaptılar. Hücreler arası boşluğun majör sıvı kaçağı olan alan olduğunu tespit ettiler. Yanan vücut yüzey alanına göre verilmesi gereken sıvı miktarını formüle ettiler. Dr Truman G Blocker yanık tedavisinde multidisipliner ekip çalışmasının önemini ortaya koydu ve 1947'de Texas şehri Limanında amonyum nitrat gübre yüklü iki yük gemisinin çarpışması sonucu ortaya çıkan, 560 kişinin öldüğü, 3000 kişinin yaralandığı felakette ekip çalışmasını uyguladı. Truman ve Virginia Bloker 9 yıl boyunca 800'den fazla yanıklı hasta takip etti ve birçok yayın yaptılar. Andrew M Muster 1970'lerde ağır yanıklı hastaların yaşam kalitelerini inceledi ve erken eksizyonun mortaliteyi önemli ölçüde düşürdüğünü bildirdi (12). Pigeon J, 1960 yılında, ikinci derece yanıkların tedavisinde amniyon zarı kullanımını denedi ve olumlu sonuçlar aldığını bildirdi (13). Withaker AJ, 1962 yılında, yanık tedavisinde soğuk uygulama, steroidli pomad ve antibiyotikli pomatların etkili olduğunu yayınladı (14). Nekrotik dokuların eksizyonu ve deri grefti uygulaması 1954 yılından beri yanık tedavisinde yerini almıştır. İlk 72 saatte yapılan erken teğetsel eksizyon ve deri grefti uygulamasını ilk olarak 1970 yılında Janzekoviç Z tarafından tanımladı ve halen II.derece derin yanıkların tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir (15). Ancak geniş yanıklarda donör alanın kısıtlı olması bunu zorlaştırmaktadır. Bu sebepten dolayı pek çok doku mühendisliği ürünleri ile deri kaybı geçici veya kalıcı olarak yerine konmaya çalışılmaktadır (16). Rejeneratif tıptaki ilerlemelere paralel olarak kök

hücre kullanımı popülerite kazanmaya başladı. İlk kez 2004 yılında Rasulov F derin yanıklı hastalarda kemik iliği kaynaklı kök hücreleri kullandı. Kök hücreler yanık yarasına lokal olarak uygulandığında aktif bir neoanjiogenez ve hızlı bir iyileşme meydana geldiğini gösterdi (17).

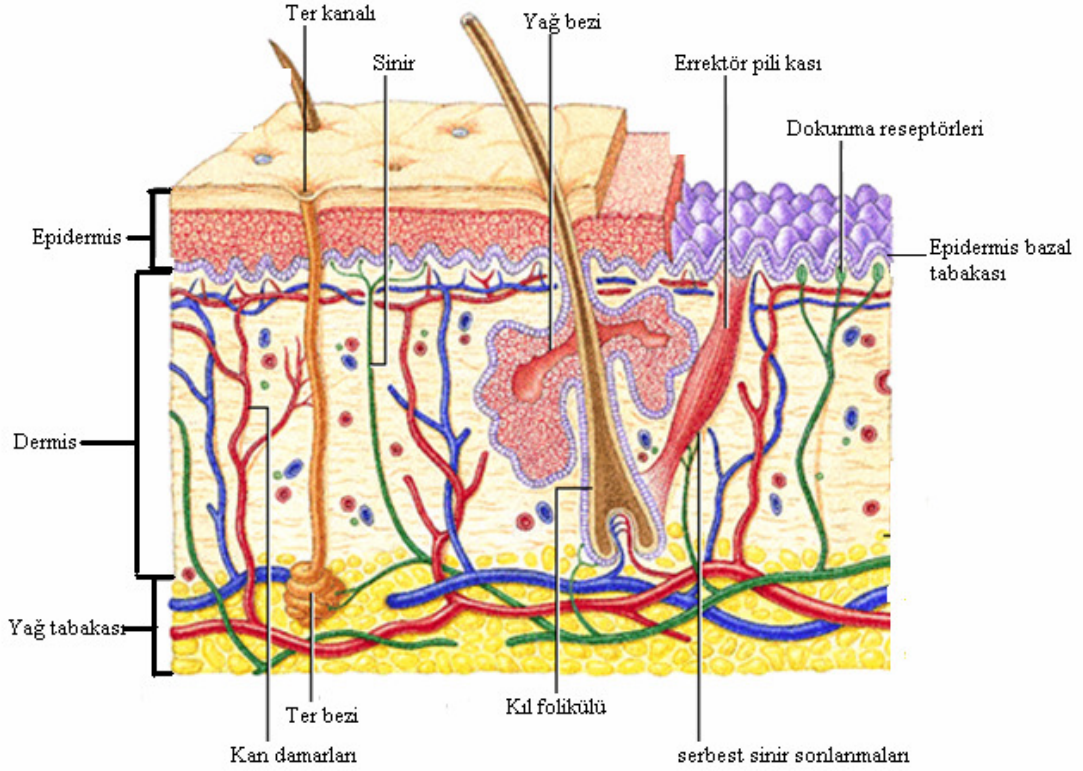
2.1.2 Stromal Vasküler Fraksiyon Tarihçesi

Yağ dokunun hücreden zengin stromal kısmı ilk kez 1964 yılında Rodbell M tarafından tanımlandı ve “Stromal Vasküler Hücreler” olarak adlandırıldı (18). Daha sonra, 1989 yılında Hauner H, stromal vasküler hücrelerin üzerine yoğunlaşarak bunların progenitör (öncü) hücreler içerdiğini ve bu hücrelerin daha sonra adiposite farklılaştığını ortaya koydu (19). Ailhud G 1992 yılında yayınladığı çalışmada SVF içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve öncü hücreler bulunduğunu gösterdi (3). Zuk PA tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada SVF'nun farklı hücelere dönüşebilme potansiyeline sahip multipotent kök hücreler içerdiği kanıtlandı (11). Halen SVF ve ADSC'lerle ilgili çok sayıda deneysel ve klinik çalışma yapılmaktadır. Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi alanında doku yenilenmesi ve gençleştirmede kişinin kendi kök hücrelerinin kullanımı ile ilgili araştırmalar son yıllarda hız kazanmıştır (20).

2.2 DERİ

2.2.1 Derinin yapısı

Deri, yaşamın devamı için çok önemli fonksiyonları olan ve çift katmandan oluşan bir organdır (Şekil1). Deri vücudun en büyük organıdır (21). Vücudun tüm yüzeyini kaplar ve sindirim, solunum ve ürogenital sistem epiteli ile devamlılık gösterir. Vücudun en fazla travmaya maruz kalan organıdır. Hayatın devam edebilmesi için çok önemli fonksiyonları olan derinin devamlılığının ve bütünlüğünün korunması gereklidir.



Şekil 1: Deri anatomisi

Deri temel olarak iki katmandan oluşmuştur; epidermis ve dermis.

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

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

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

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

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

2.2.2 Derinin görevleri

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

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

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

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

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

Metabolik: Vitamin-D metabolizmasında görevlidir.

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

2.3 YANIK

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

2.3.1 Yanık Derinliği

Yanıkta tedavi yanığın derinliği ve kapladığı vücut alanının belirlenmesi ile başlar. Bu nedenle yaralanmanın derinlik ve alan olarak belirlenmesi tedavinin planlanması için çok önemlidir (26). Oluşan doku hasarı etkene, temas süresine, ortama ve etkilenen vücut kısmına göre değişebilir. Yanığın derinliğini erken dönemde belirlemek her zaman mümkün olamamaktadır, doku hasarı genellikle 48 ila 72 saat sonra net olarak belirginleşir. Yanık derinliğini belirlemek için seri klinik gözlem,

ultrasound incelemesi, intravenöz floresan verilmesi, termal kamera kullanılması, biyopsi, vital boyalar, laser dopler flowmetre kullanılabilir. Laser dopler görüntüleme dünyada pek çok yanık merkezinde kullanılmaktadır. Sharma P tarafından yapılan çalışmada laser dopler görüntülemenin tek başına bir tanı aracı olarak kullanılmasından ziyade klinik gözleme yardımcı bir yöntem olabileceği ortaya kondu (27). Günümüzde yanık derinliğini belirlemede en çok kabul gören yöntem seri klinik gözlemdir (28)(Tablo 1).

Tablo1: Farklı derinlikteki yanıkların klinik özellikleri (15).

Yanık Derinliği	Görünüm	Bül	Kapiller Dolum	His
Epidermal	Kırmızı, parlak	Yok	Canlı	Ağrılı
Yüzeysel dermal	Açık pembe	Var	Canlı	Ağrılı
Derin dermal	Kuru, yamalı kırmızı renk	Nadir	Yok	Az veya yok
Tam kat	Kuru, beyaz veya kahverengi	Yok	Yok	Yok

I.Derece (yüzeysel, epidermal) yanık; hasar epidermiste sınırlıdır,

II.Derece (dermal) yanık; epidermis ve dermisen bir kısmında hasar vardır. Yüzeysel II.derece yanıklarda epidermis ve dermisen 1/3 üst kısmı hasarlı iken, derin II.derece yanıklarda dermisen derinlerine kadar uzanan hasar vardır.

III.Derece (Tam Kat) Yanık; derinin her iki katmanının da tamamen etkilendiği yanıktır.

Isının derecesi ve temas süresi doku hasarının esas belirleyicisidir. Ayrıca ısının etkisi vücudun değişik kısımlarında da farklılık gösterir. Derisi kalın olduğu avuç içi ve ayak tabanı gibi bölgeler yanık hasarına daha dirençli iken göz kapağı, el sırtı, ayak sırtı gibi derinin ince olduğu yerler daha hassastır. Çocukların ve yaşlıların derileri erişkinlere göre daha ince olduğu için tam kat yanıklar ve buna bağlı olarak morbidite ve mortalite daha fazla oranda görülür(1,2).

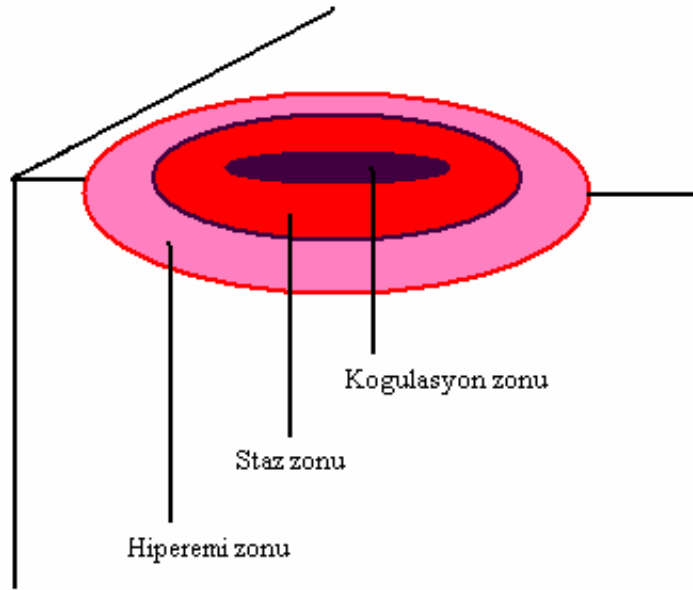
2.3.2 Yanık Zonları

Yüksek ısı temas noktasından çevreye doğru yayılan bölgesel doku hasarına neden olur. Temas alanında hücre ölümü meydana gelirken çevre dokuda protein denaturasyonu oluşur. Yanık zonları ilk kez 1952 yılında Jackson tarafından tanımlanmış olup bu tanımlama halen geçerliliğini korumaktadır (29)(Şekil2).

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

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

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



Şekil 2: Yanık zonları

2.3.3 Yanık Patofizyolojisi

Isının deriye aktarılmasıyla hücresel düzeyde ortaya çıkan ilk etki hücre duvarı bütünlüğünün kaybı ve protein denatürasyonudur. Kısa bir süre sonra toksik

enflamatuar mediatörler ortama salınır. Özellikle nekroz alanı çevresindeki doku hasarının çoğu yanıkla aktive olan toksik enflamasyon mediatörlerine bağlı gelişmektedir. Yara iyileşmesi için enflamasyon gereklidir ancak yanıkta oksidanlar ve proteazlar gibi enflamatuar mediatörlerin aşırı salınımı damar endoteli ve deri hücrelerinin hasarını arttırır. İnflamasyon sitokinlerin de fonksiyonunu bozar. Enflamasyon esnasında ortamdaki oksijenin nötrofiller tarafından kullanılması doku hipoksisini arttırır. Isının hücre hasarı yaptığı alanda damar içi trombozlar meydana gelir ama ilk yaralanmanın oluşumunda iskeminin etkisi yoktur. Hücrelerin bir kısmının canlı olduğu alanlarda ısı ve inflamatuvar mediatörlerin etkisiyle kapiller trombozun ilerlemesi iskemiye neden olarak doku nekrozunu arttırır. Ölü dokular ve bakteriyel kolonizasyona bağlı olarak ortamdaki nötrofiller artar. Nötrofillerden salınan proteazlar ve oksidan ajanlar canlı dokulara da zarar verir (30,31).

Bir dokudaki hücre ölümü temel olarak iki mekanizmayla meydana gelir; apoptoz ve nekroz. Apoptoz intrinsik veya ekstrinsik yolla oluşur. Her iki yolun sonunda da hücre içi proteazlar aktive olur ve hücre ölümü gerçekleşir. Gravante G ve ark. derin kısmi kalınlıktaki yanıklarda apoptotik hücre ölümü olup olmadığını araştırmak için bir çalışma yaptılar. Termal yaralanmanın apoptozu uyardığını, staz zonundaki hücrelerin yarıya yakınının apoptotik olduğunu, apoptozun yanıktan sonra en az 20 gün devam ettiğini ve derin kısmi kalınlıktaki yanıklarda, yüzeysel yanık ve tam kat yanıklara oranla çok daha fazla apoptotik hücre bulunduğunu gösterdiler (32,33).

Yanıklar ilk birkaç gün dinamik bir süreç izlerler. Yoğun enflamasyon, vasokonstriksiyon, enfeksiyon, kan akımının azalması nekroz alanın çevresindeki hasarlı ancak canlılığını koruyan hücrelerin de yıkımına neden olur. Bunun sonucunda yanığın derinliği ve genişliği artar (34).

2.3.4 Yanık Yarasının Tedavisi

Yanık tedavisinin konservatif mi yoksa cerrahi mi olacağını belirlemede temel unsur yanığın derinliğidir. Birinci derece yanıklar ve II.derece yüzeysel yanıklar canlı kalan kıl folikülleri, ter ve yağ bezlerinin epitelinin yüzeye ilerlemesi sonucu kendiliğinden iyileşir. Yanık yarasının iyileşmesi klasik yara iyileşmesine benzemekle beraber bazı önemli farklılıklar arz eder. Hasarlı alana kan akımının azalması, yoğun enflamasyon, epitelizasyonu sağlayacak hücrelerin kaybı ve oluşan skar dokusu yanık yarasını diğer yaralardan daha sorunlu bir hale sokar (31). İkinci derece derin

yanıklarda primer epitelizasyonu sağlayacak deri eki miktarı daha azdır. Ayrıca ölü dokuların ortamdaki uzaklaştırılması gereklidir. Kendi haline bırakıldığında yara iyileşmesi uzun zaman alır, enfeksiyon riski ve hipertrofik skar gelişme oranı yüksektir. İkinci derece derin yanıklar ve tam kat yanıkların en geçerli tedavi yöntemi ölü dokuların debritleme ve deri grefti uygulamasıdır (28).

Yanık yarasının iyileşmesinde kemik iliği kaynaklı hücrelerin de etkin rol oynadığı deneysel çalışmada gösterildi. Rea S ve ark. tarafından yapılan çalışmada farelerde radyasyon ile kemik iliği kurutulduktan sonra yeşil floresan protein ile işaretli kemik iliği hücreleri periferik vene verildi ve hayvanlarda tam kat yanık oluşturuldu. Yanık yarası incelendiğinde erken evrede enflamatuvar hücrelerin tamamının, geç evrede fibroblastların yarısının ve keratinositlerin az bir kısmının kemik iliği kaynaklı hücrelerden oluştuğu gösterildi (35).

2.4 YAĞ DOKUSU

Yağ dokusu, baskın hücre tipi yağ hücreleri (adiposit) olan bağ dokusunun özel bir tipi olup mezankimal kökenlidir. Adipositler bağ dokusunda tek başına olabilecekleri gibi küçük gruplar halinde de bulunabilir. Yağ dokusu, zengin bir vasküler yatak ve sinir ağına sahip bir bağ dokusu ile tam olmayan lobüllere bölünmüştür. Adipositler, retiküler liflerden zengin ince ve ağ şeklinde bir yapı ile desteklenerek birbirlerine bağlanırlar. Yağ dokusunda bulunan hücrelerin yaklaşık üçte ikisi adipositlerdir. Diğer hücreler; çeşitli kan hücreleri, endotel hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve çeşitli farklılaşma evrelerinde olan öncül hücrelerdir (3).

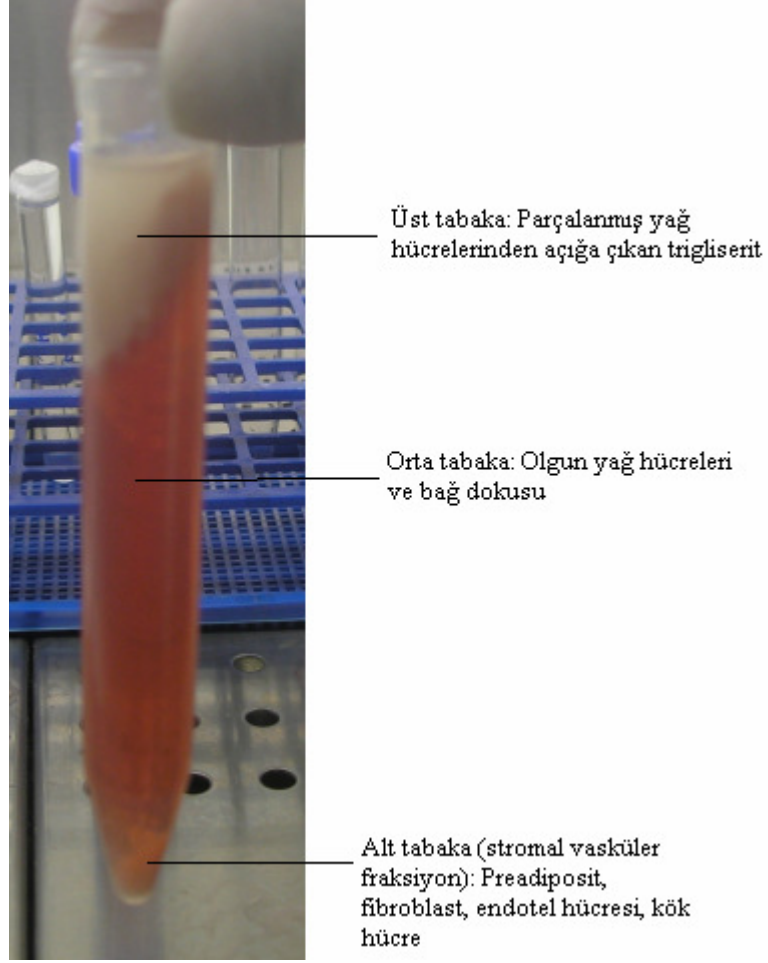
Yağ dokusu insanlarda ilk olarak embriyonal hayatın üçüncü ayından itibaren vücudun çeşitli bölgelerinde (yanak, boyun, omuzlar, kalça, perirenal) görülmeye başlar. İlk olarak içinde yağ bulundurmayan yoğun mezankimal hücre kümeleri oluşur ve bunlar organize damar ağıyla sarılır. Kapillerlerin çevresinde yoğun yağ içeren öncü yağ hücresi kümeleri oluşur. Yağ dokusu gelişiminin son aşamasında yağ hücrelerinin boyutu artarken bunları çevreleyen septalar oluşur. Embriyogenez esnasında yağ dokusu oluşumu ile damar ağı oluşumunun sıkı bir ilişki içinde olduğu görülür. Yağ hücrelerinden salınan spesifik büyüme faktörlerinin anjiyogenezisi

yönlendirmesi önemli bir konudur (3). Büyüme faktörlerine ek olarak salınan ‘monobutyryn’ yağ dokuya spesifik bir anjiogenez faktörüdür (3,36).

Yağ dokusu adipositlerin içerdiği lipid damlacıklarına göre uniloküler (beyaz) ve multiloküler (kahverengi) yağ dokusu olarak sınıflandırılır. Beyaz adipositler sadece büyük bir yağ vakuolüne sahiptir. Yağ asitlerinin depolanması ve kullanılmasından rol alırlar. Kahverengi adipositler multilokülerdir ve hücre içinde bol miktarda mitokondri vardır. Uyarıldıklarında depolanmış kimyasal enerjiyi ısıya dönüştürürler. Yağ dokusunun görevleri şunlardır; Enerji depolama, yağda eriyen vitaminleri depolama, fiziksel koruma, ısı üretimi, adipokin (adipositokin) salınımıdır. Adipokinler yağ dokudan salınan protein yapısındaki maddeler olup endokrin, parakrin ve otokrin etkilere neden olurlar (37).

2.4.1 Stromal Vasküler Fraksiyon

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



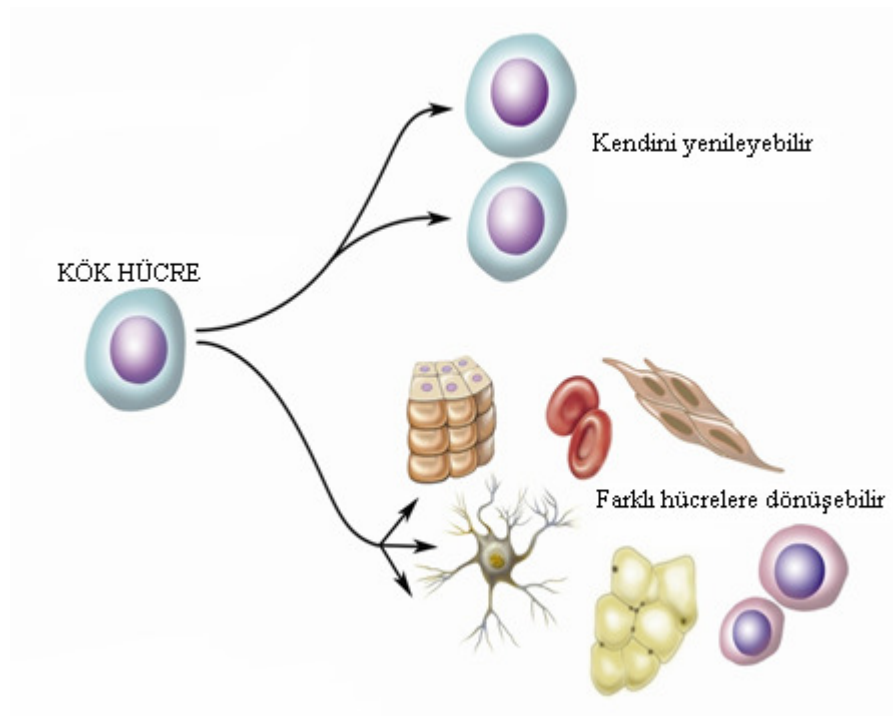
Şekil 3: Fraksiyonlarına ayrılmış yağ dokusu

Stromal vasküler fraksiyon içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler bulunmaktadır (3). Stromal vasküler fraksiyon içerisindeki kök hücreler uygun ortamlarda çoğalabilmekte, farklılaşabilmektedir. Bu hücreler tedavi amaçlı doku yenilenmesinde büyük bir potansiyel oluşturmaktadır. Yağ dokudan elde edilen kök hücreler, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerle aynı işleve sahiptir. Yağ dokunun avantajı daha kolay bir yöntemle elde edilebilmesidir (38-40).

Stromal vasküler fraksiyonun, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), ve transforming growth faktör - β (TGF- β) gibi anjiogenik ve antiapoptotik sitokinleri üretme potansiyeli vardır. Hipoksik ortamda stromal vasküler fraksiyondan VEGF salınımının belirgin derecede artmaktadır (5). Anjiogenez, yani yeni damar oluşumu, yara iyileşmesinde önemli bir basamaktır. Dokuların işlevlerini yerine getirebilmesi için kendilerine özgü damarlanma yapısına

sahip olmaları gereklidir. Damar endoteli büyüme faktörü, endotel hücre büyümesinin güçlü bir uyarandır (41). Stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan preadipositler adipojenik öncü hücre olmalarının yanı sıra mikrovasküler endotel hücrelerle parakrin etkileşim göstermektedir. Preadipositler tarafından salınan 'monobutylin' bir anjiogenik faktör olup endotel hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (36,41). Stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan bir diğer hücre grubu fibroblastlardır. Fibroblastların ana metabolik fonksiyonları, kollajen, proteoglikan ve elastin sentezidir. Fibroblastlardan salınan keratinosit büyüme faktörü (KGF) epidermal hücre büyümesini uyarır, TGF- β ise fibrozisi ve gerilim kuvvetini artırır, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) nötrofil, makrofaj, endotel hücrelerin çoğalmasını ve kemotaksisini uyarır (42).

Kök hücreler kendini yenileyebilen, uzun süre canlı kalabilen, özelleşmiş hücrelere dönüşebilen hücrelerdir (Şekil 4) .



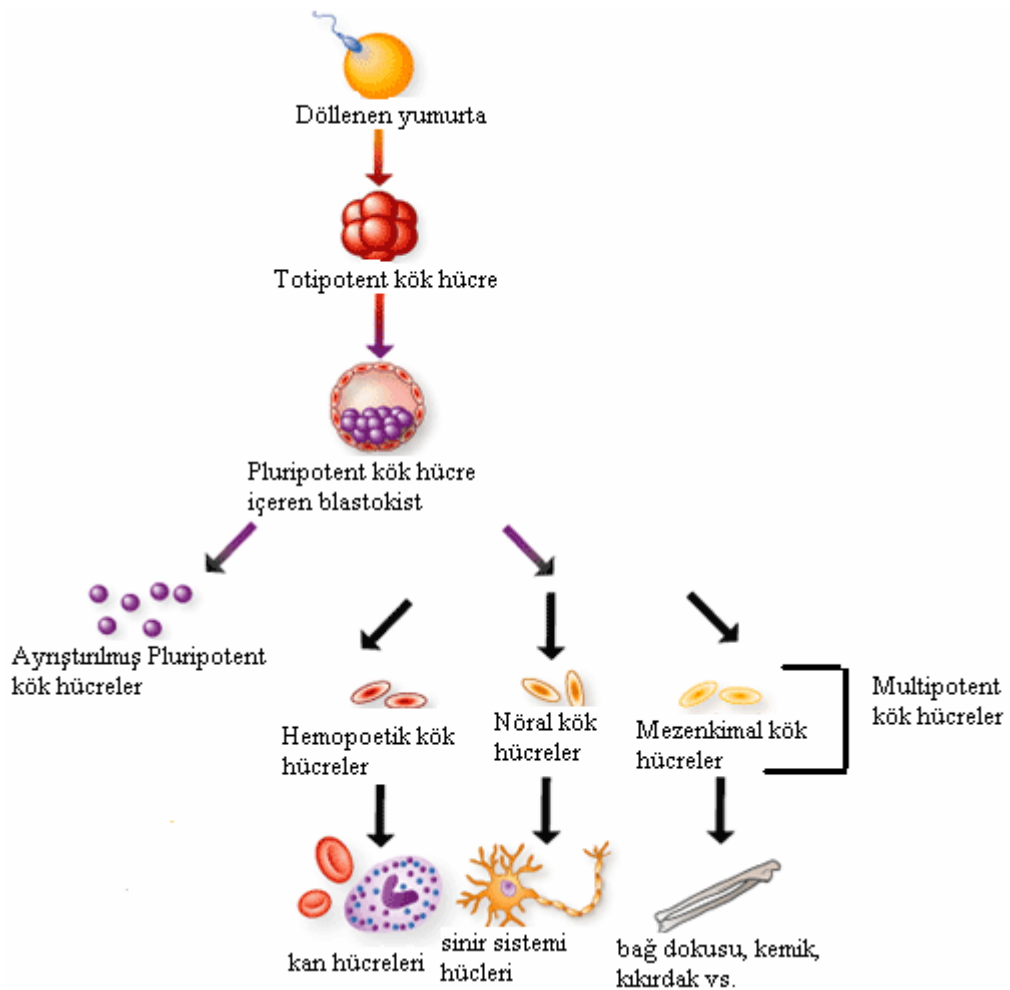
Şekil 4: Kök hücre

Kök hücre tipleri (Şekil 5);

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

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

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



Şekil 5: Kök hücre tipleri

Yağ dokusundan elde edilen kök hücreler erişkin kök hücelere örnektir ve mezenkimal kökenlidir. Erişkin kök hücreleri multipotent veya pluripotent kök hücre yapısında olabilir (11,38). “Erişkin kök hücresi” bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olup, bu hücre kendini

yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre türlerine farklılaşabilir. Erişkin kök hücrelerinin yaşayan organizmadaki esas görevi buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. Dokularda bulunan kök hücrelerden salınan anjiogenik, antiapoptotik ve mitojenik faktörler hasara uğramış dokuların rejenerasyonunu sağlar, çoğu dokuda gösterilmiş olan kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını artırır, inflamasyon ve immün reaksiyonları azaltırlar (43). Zuk P ve ark. 2002 yılında yaptıkları çalışmada “işlenmiş lipo aspiratın (PLA)” kök hücre içerip içermediğini ortaya koymak ve bu hücrelerin farklılaşma potansiyellerini değerlendirmek için bir dizi moleküler ve biyokimyasal tanımlama yaptılar. İşlenmiş lipoaspirat hücrelerinin kemik iliği kaynaklı kök hücrelerle aynı yüzey antijenik özellikleri gösterdikleri, uygun kimyasal uyarımlarla adipojenik, osteojenik, kondrojenik, myojenik ve nörojenik hücreler gibi birçok hücreye farklılaşma kapasitesine sahip olduklarını gösterdiler. Bu hücreleri “Yağ doku kaynaklı kök hücre (ADSC)” olarak adlandırdılar (11). Kern S ve ark. tarafından yapılan çalışmada kemik iliği kaynaklı kök hücreler, göbek kordonu kaynaklı kök hücreler ve yağ doku kaynaklı kök hücreler birbiri ile karşılaştırıldı. Her üç kaynaktan elde edilen kök hücrelerin aynı fibroblastoid morfolojiye sahip olduğu, aynı kolonileri oluşturdukları, aynı multipotansiyel farklılaşma yeteneğine sahip oldukları ve benzer yüzey proteinlerine sahip oldukları gösterildi. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitesinin ADSC’lerde diğer iki gruba göre daha yüksek oranlarda gerçekleştiği görüldü (44). Kim WS ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda; ADSC’lerin fibroblastlardan kollajen sentezini uyararak dermis kalınlığını arttırdığı (4,10), güçlü bir antioksidan aktivite göstererek dermal fibroblastları oksidatif hasardan koruduğu (7), serbest radikallere bağlı oluşan deri hasarını önlediği ve farelerde oluşturulan tam kat yanık yaralarının iyileşmesini belirgin derecede hızlandırdığı gösterildi (45). Park BS ve ark.’nın ADSC’lerin salgı fonksiyonlarını araştırmak için yaptıkları çalışmada ADSC’lerin platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), plasental büyüme faktörü (PIGF), b-FGF, KGF, TGF β 1- β 2, HGF ve VEGF, kollajen ve fibronektin salgıladıkları gösterildi (46). Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin yağ doku, kemik, kıkırdak, iskelet kası, kalp kası, nöral hücre, hemopoetik hücre, endotel hücresi, epitel hücre ve hepatosite farklılaşabildiği in-vivo ve in-vitro deneylerle gösterildi (11,47). Yağ doku kaynaklı kök hücreler anjiogenik ve antiapoptotik büyüme faktörleri salgılamakta ve bu salgıları hipoksik ortamda daha da fazla olmaktadır. Yağ doku kaynaklı kök hücreler aynı zamanda

progenitör hücrelerin endotel hücrelerine farklılaşmasını arttırmaktadır (6). Damar endoteli büyüme faktörü iyileşmekte olan yarada damarlanmanın temel düzenleyicilerindendir (48). Lu F ve ark. tarafından yapılan çalışmada random patern deri fleplerine lokal olarak ADSC uygulandı ve kan akımında ve flep canlılığında belirgin artış olduğu gözlemlendi. Bu artışın hem ADSC'lerin direk olarak endotel hücrelere farklılaşmasına hem de indirek olarak salgıladıkları anjiogenik büyüme faktörlerine bağlı olduğu sonucuna varıldı (49). İskemik dokuların yeniden damarlanması ve fonksiyonlarının tekrar kazanılmasında mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici potansiyelleri ile ilgili kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Uysal CA ve ark. tarafından yapılan çalışmada ADSC'lerin iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği gösterildi (50). Ebrahimian TG ve ark. tarafından yapılan çalışmada yaralara lokal olarak ADSC uygulandı. Yeşil floresan protein ile işaretli ADSC'lerin dermal ve epidermal dokulara yerleştiği ve epidermal marker olan K5 ve K14 sentezlediği gösterildi (8). Rigotti ve ark. tarafından radyonekrozlu dokulara lipoaspirat uygulandığında dokuların yenilendiği ve semptomların düzeldiği gösterildi (51).

Rejeneratif tıp, hasarlı dokuların yenilenmesinde vücudun kendi kök hücrelerinin ve büyüme faktörlerinin kullanılması esasına dayanan alternatif bir tedavi stratejisi oluşturmaktadır (4,6,8,9,11,46,52).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

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

3.1 Denekler

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

Ratların hepsinin inguinal yağ dokuları çıkarılarak stromal vasküler fraksiyon ayrıştırıldı. Sıçanların sırtında derin II.derece yanık oluşturuldu. Ratlar rasgele seçilerek kontrol (n:10) ve deney grubuna (n:10) ayrıldı.

Kontrol Grubu (n=10): Bu gruptaki ratların yanık alanlarına intradermal olarak yaklaşık 1 cc serum fizyolojik 26G enjektör ile tüm yanık alanına dağıldığı gözlenerek enjekte edildi.

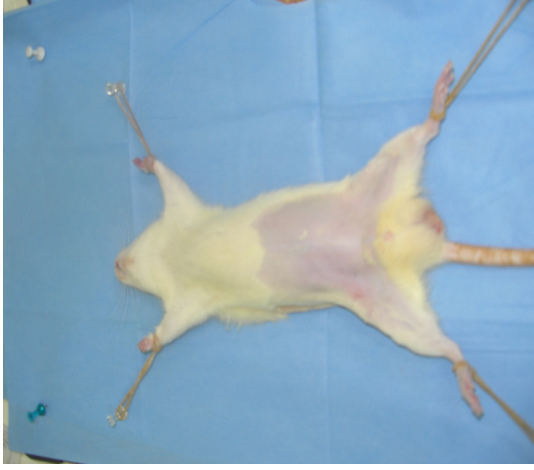
Deney Grubu (n=10): Bu gruptaki ratların yanık alanlarına intradermal olarak yaklaşık 1 cc SVF 26G enjektör ile tüm yanık alanına dağıldığı gözlenerek enjekte edildi.

3.2 Anestezi ve Analjezi

Ratların inguinal yağ dokuları çıkarılırken, yanık oluşturulurken ve doku örnekleri alınırken intraperitoneal olarak ketamine hidrokloride (Ketalar, Pfizer-İstanbul) (50 mg/kg) ve xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer-İstanbul) (5 mg/kg) verilerek anestezi sağlandı. Cerrahi işlem ve yanık oluşturulmasından sonraki 5 gün içme sularına parasetamol 2mg/ml(Calpol, Glaxo Smith Kline- İstanbul) katılarak analjezi sağlandı (53).

3.3 Stromal Vasküler Fraksiyonun Hazırlanması

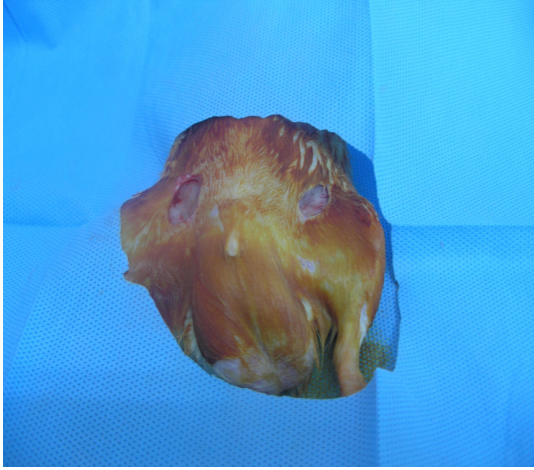
Ratların inguinal bölge deri altı yağ dokularında kök hücre bulunduğu ve bu hücrelerin farklı uyaranlarla osteosit, kondrosit, düz kas hücresi, nöral hücre vs. dönüşebildiği bilinmektedir (54). Anestezi altındaki ratların inguinal bölgeleri traşlandı (Şekil 6) steril %10 povidon iyot (İsosol, merkez Laboratuar- İstanbul) ile temizlendi (Şekil 7). Her iki inguinal krize paralel olarak yapılan insizyon ile girilerek (Şekil 8) inguinal yağ yastıkçıklarından 2 adet 1x1x1 cm (1 cm³) büyüklüğünde yağ dokusu eksize edildi. İnsizyon alanları 3/0 ipek stur ile dikildi (Şekil 9).



Şekil 6: İnguinal bölgesi traşlanmış sıçan



Şekil 7: Povidon iyot ile temizlik

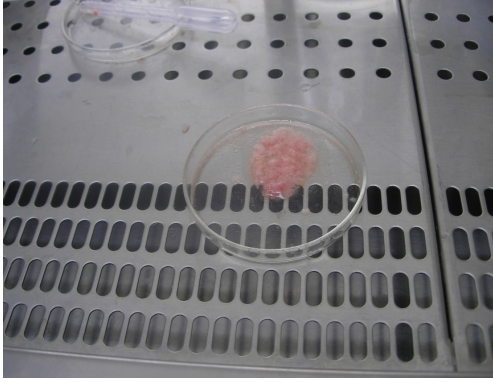


Şekil 8:İnguinal insizyon

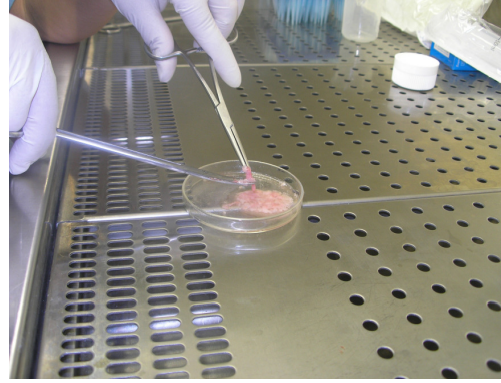


Şekil 9: İnguinal insizyonun kapatılması

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



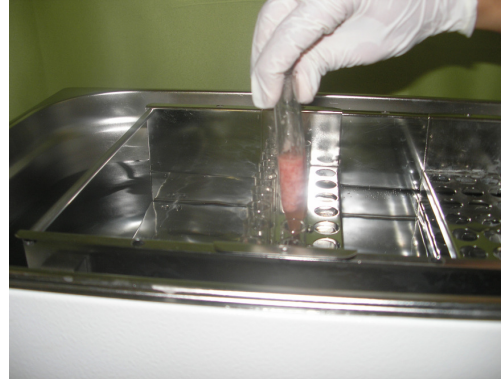
Şekil 10: Çıkarılan inguinal yağ dokuları



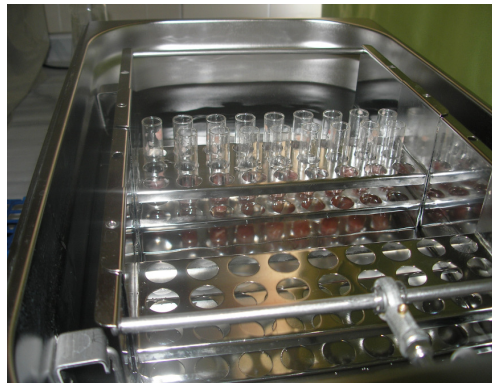
Şekil 11: Yağların ince doku makası ile parçalanması



Şekil 12: Çalkalamalı su banyosu



Şekil 13: Çalkalamalı su banyosuna koyma

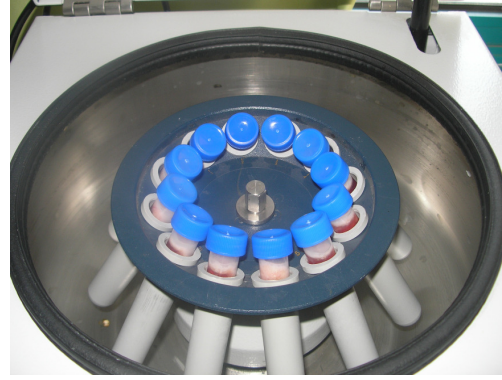


Şekil 14: Çalkalamalı su banyosundaki tüpler

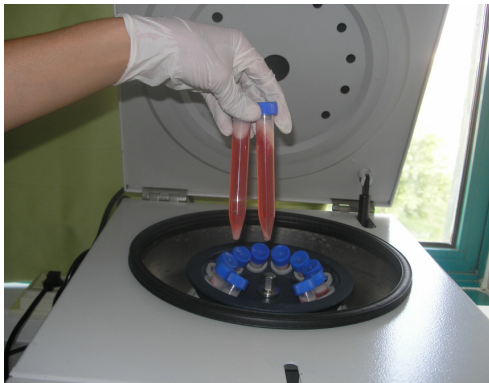
Hücre süspansiyonu 1300 rpm (260G) de iki kez beşer dakika santrifüj edildi (Şekil 15-17). Üstte matür adipositlerden oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Dibe çöken pellet kısım filtreden süzülerek 'stromal vasküler fraksiyon' olarak kullanıldı (Şekil 18) (47,54).



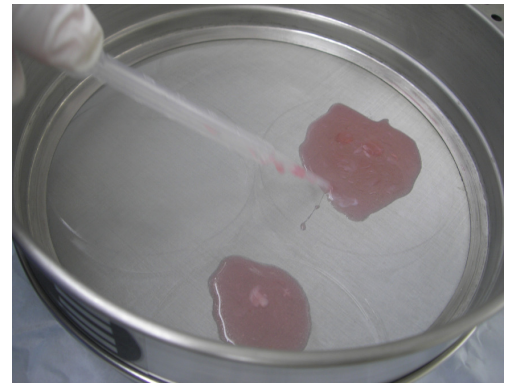
Şekil 15: Santrifüj aleti



Şekil 16: Santrifüje konan tüpler



Şekil 17: Santrifüj edilmiş süspansiyon



Şekil 18: Süzme işlemi

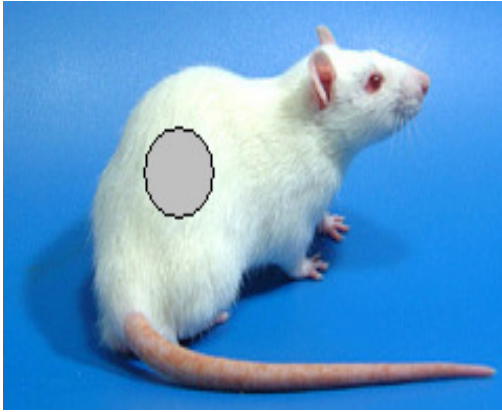
Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin non-immünojenik profile sahip olmalarından dolayı SVF hazırlanırken tüm ratlardan toplanan yağ dokuları birlikte işleme alındı (55).

Elde ettiğimiz stromal vasküler fraksiyon içerisindeki canlı hücrelerin sayımı için 100 mikro litre (μ l) SVF eppendorf tüpüne kondu, üzerine 100 mikro litre (μ l)

Trypan Blue ilave edilerek pipetaj yapıldı. Thoma lamı düz bir zemin üzerine kondu ve lamelin yapışması gereken sayım alanı çerçevesinin üzerine lamel kapatıldı. Thoma lamının her iki yanında bulunan kanalların ortasında kalan sayım alanında, lamelin lam ile birleştiği noktaya hazırladığımız süspansiyondan 50 µl pipetlendi. Daha sonra thoma lamı mikroskopun tablasına yerleştirildi. Hücreler tek tek sayılarak not edildi (52). Yaklaşık olarak 4×10^6 /ml canlı hücre tespit edildi.

3.4 Yanık Oluşturulması

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



Şekil 19: Yanık oluşturulan alan



Şekil 20: Yanık oluşturulması

Ratların total vücut yüzey alanı Gilpin DA tarafından tanımlanan formüle göre hesaplandı (56):

$$SA(\text{cm}^2) = k \times W^{2/3}$$

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

Yanık alanı vücut yüzeyine oranlandığında yaklaşık %2 lik kısmının yanmış olduğu görüldü.

3.5 Doku Örneklerinin Alınması

Sıçanların yanık alanlarından anestezi altında 3, 7, 10. ve 14. günlerde yaklaşık 5×10mm boyutunda insizyonel biyopsiler alındı. Alınan doku örnekleri % 10'luk formol solüsyonuna konuldu.

3.6 Değerlendirme

3.6.1 Histopatolojik Değerlendirme Yöntemi

Yüzde onluk formol içinde saklanan deri örnekleri histopatolojik takibe alındı. Parafin bloklara gömülen örneklerden 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak hemotoksilen-eozin boyası ile boyandı. Boyanan preparatlar ışık mikroskopunda değerlendirildi. Tüm histopatolojik değerlendirmelerde bakılan preparatın hangi gruba ait olduğu patolog tarafından bilinmemekteydi. Histopatolojik incelemede enflamatuvar hücre yoğunluğu (nötrofiller, monositler, lenfositler), damarlanma, fibroblastik hücre yoğunluğu değerlendirildi (57).

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

3.6.2 İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Damar endoteli büyüme faktörü ve PCNA belirlenmesi için immünohistokimyasal boyama kullanıldı. Belirlenen günlerde alınan biyopsiler %10'luk formaldehit solüsyonunda tesbit edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra sırayla %60, 70, 80, 90 ve 100'lük etanol solüsyonlarından geçirilerek dehidrate edildi. 90 dk ksilol solüsyonunda bekletildi ve 60°C'de parafine yerleştirildi. Beş mikron kalınlığında kesitler lizin kaplı lamlara alındı. Etüvde 60°C de bir saat bekletilerek parafin eritildi. Etüvden çıkarılan lamlar 15 dk ksilol dolu kapta bekletildi. Sırasıyla %99'luk, %96'luk ve %70'lik alkol solüsyonlarında beşer dakika bekletildi. Preparatlar alkol solüsyonlarından sonra distile suda 5 dk bekletildi. %10'luk etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, Thermoscientific/Lab Vision, Germany) solüsyonuna konulan camlar mikrodalga fırında %50 güçle 20 dk tutuldu. Endojen hidrojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için dokuların üzerine %3'lük hidrojen peroksit damlatıldı ve 10 dk inkübe edildi. Camlar distile suya alınarak 5 dakika yıkandıktan sonra fosfat buffer solüsyonda (PBS, Thermoscientific/Lab Vision, Germany) 10 dk bekletildi. Damar

endoteli büyüme faktörü antikoru ile boyanacak camlara 1/25 oranında seyreltilmiş VEGF antikor (Vascular Endothelial Growth Factor Ab-1, ThermoScientific/Lab Vision, Germany) damlatılarak 20 saat inkübe edildi. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen Ab-1, ThermoScientific/Lab Vision, Germany) antikor ile boyanacak camlara 1/100 oranında dilüe edilmiş antikor damlatılarak 2 saat inkübe edildi. Antijen antikor bağlanmasını göstermek için camlara biotinylated anti-rabbit antikor damlatılarak 10dk bekletildi, PBS içinde 10 dk yıkandı, streptavidin ABC-HRP damlatılarak 10 dk bekletildi, 10 dk PBS ile yıkandı, diaminobenzidin (DAP) kromojen damlatılarak 10 dk bekletildi, distile su ile 10 dk yıkandı. Zıt boyama işlemi için Mayer hematoksilen damlatılarak 2 dk bekledi, distile suda 2 kez beşer dk yıkandı. Dokular sırasıyla %70'lik, %96'lık ve %99'luk alkol solüsyonlarında beşer dakika ve ksilol solüsyonunda 15 dk bekletildi. Lamaların üzerine balsam damlatılarak lamel ile kapatıldı (58).

3.6.3 PCNA İndeksi Değerlendirmesi

Çoğalan hücre çekirdek antijeni, replikasyon ve onarım mekanizmaları esnasında nükleik asit metabolizmasında rol alan protein yapıdır (59). Çoğalan hücre nükleer antijen antikoru ile işaretlenen doku kesitlerinde hücrelerde nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Hücre proliferasyonu maximum boyanma gösteren alanlardaki hücrelerin sayılması ile skorlandı. Büyük büyütme sahasında (X400) pozitif ve negatif boyanan hücreler sayıldı. Her preparatta 100 hücre sayılıp pozitif boyanan hücrelerin sayısı PCNA indeksi olarak belirlendi (58).

3.6.4 VEGF Ekspresyon Skoru değerlendirilmesi

Kesitlerde, VEGF ekspresyonu, hücrelerin boyanma yoğunlukları ve pozitif boyanan hücrelerin oranına göre skorlandı (60). Skorelama şu şekilde yapıldı (Tablo 2) ;

Tablo 2. VEGF ekspresyonunun skorlanması

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

3.6.5 İstatistiksel Değerlendirme

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

Benzer çalışmalar incelenerek yapılan Power indexi hesaplamasında VEGF için %100, PCNA için %95 değerleri bulundu.

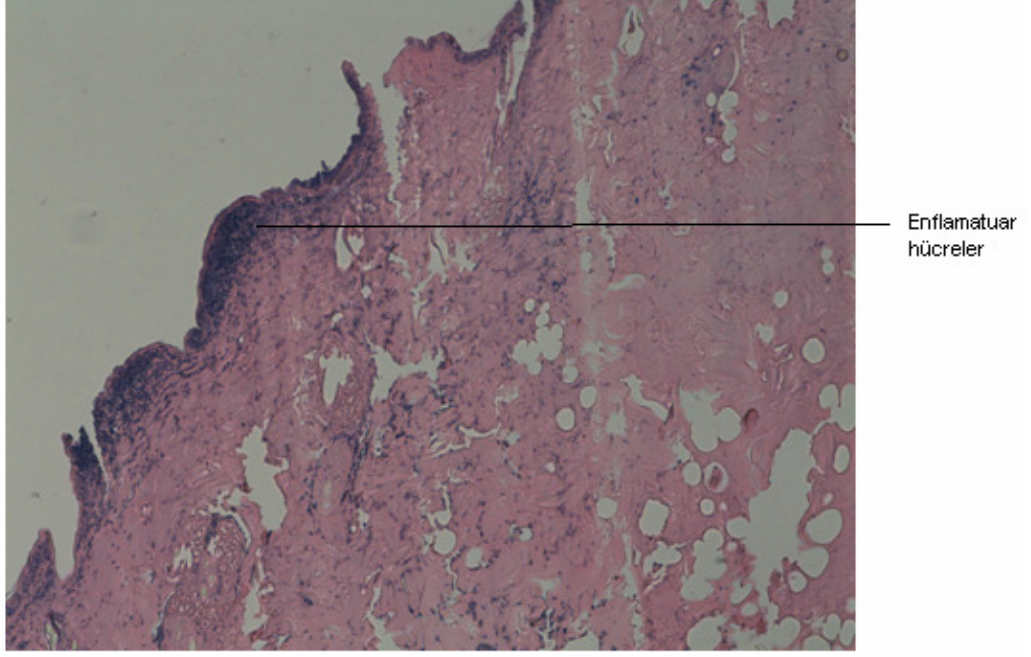
4. BULGULAR

4.1 Histopatolojik bulgular

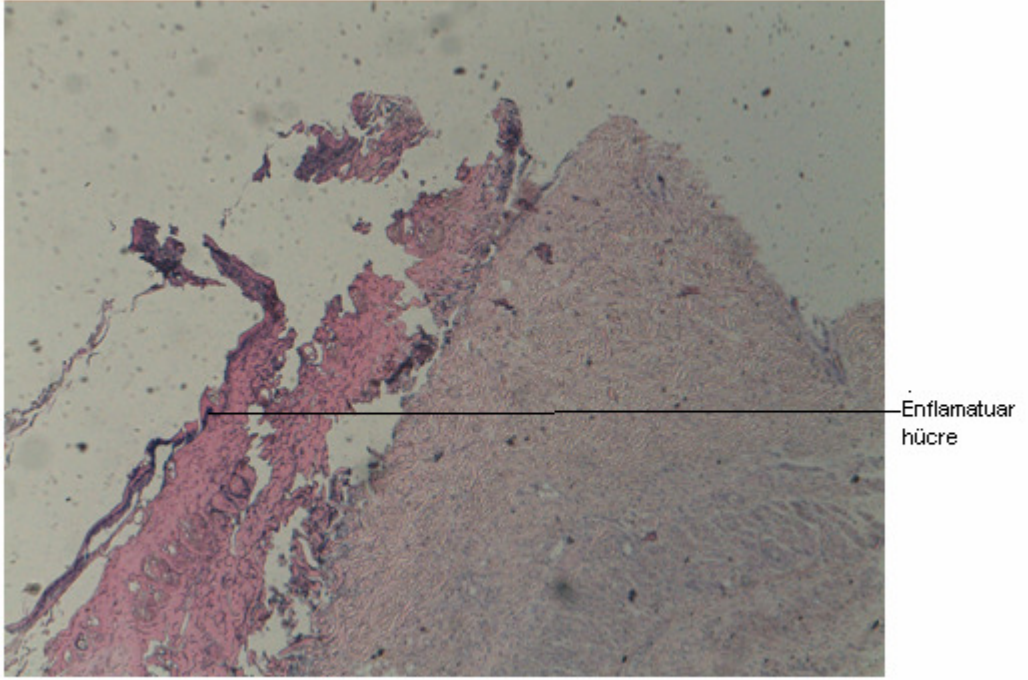
Histopatolojik incelemede alınan doku örneklerinin iyileşme sürecini takip etmek için enflamasyon, damarlanma ve fibroblastik aktivite değerlendirildi. Her bir parametre için kontrol ve tedavi grupları karşılaştırıldı.

4.1.1 Enflamasyon

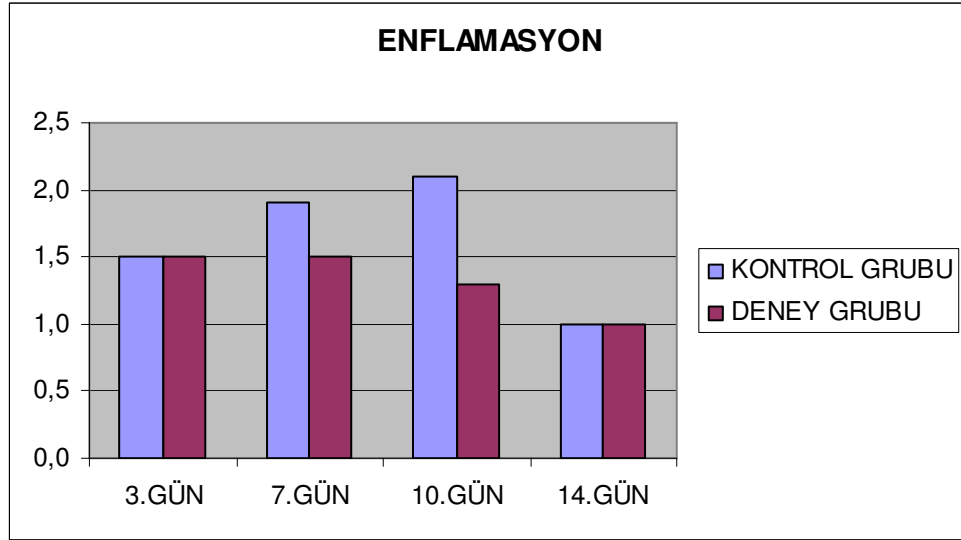
İncelenen doku örneklerinde 3 gündeki enflamasyon düzeyi her iki grupta hemen hemen eşit olarak gözlemlendi. Yedinci gün enflamasyon düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ancak kontrol grubunda artma eğilimi gözlemlenirken deney grubunda azalma eğiliminde olduğu görüldü. Onuncu günde kontrol grubunda enflamasyon belirgin olarak artarken deney grubunda düşük seviyelerde idi (Şekil 21,22) ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ondördüncü gün kontrol grubu enflamasyon düzeyi azalarak deney grubu ile aynı değerlere ulaştı (Şekil 23)(Tablo 3).



Şekil 21: Kontrol grubu 10.gün (Hematksilen-eozin X40)



Şekil 22: Deney grubu 10.gün (Hematoksilen-eozin X40)



Şekil 23: Kontrol ve deney grubu enflamasyon düzeyleri

Enflamasyonun düzeylerinin günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında;

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

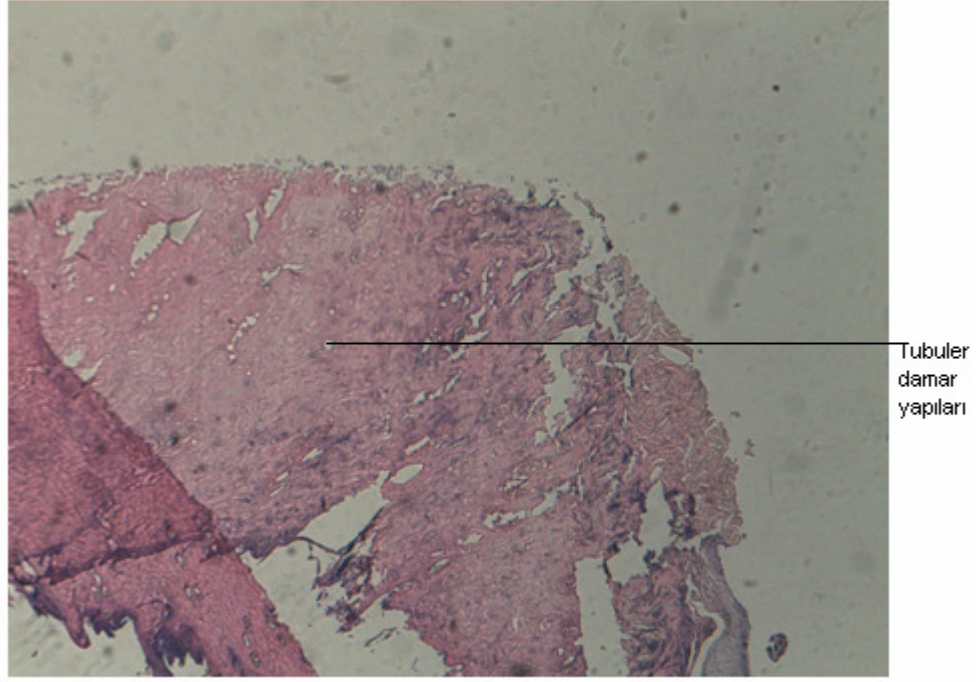
Deney grubunda enflamasyon düzeyinin en yüksek olduğu günler 3. gün ve 7. gün idi. Yedinci günden sonra enflamasyon gerileme eğilimi olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak günler arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 3: Kontrol ve deney grubu enflamasyon düzeylerinin karşılaştırması

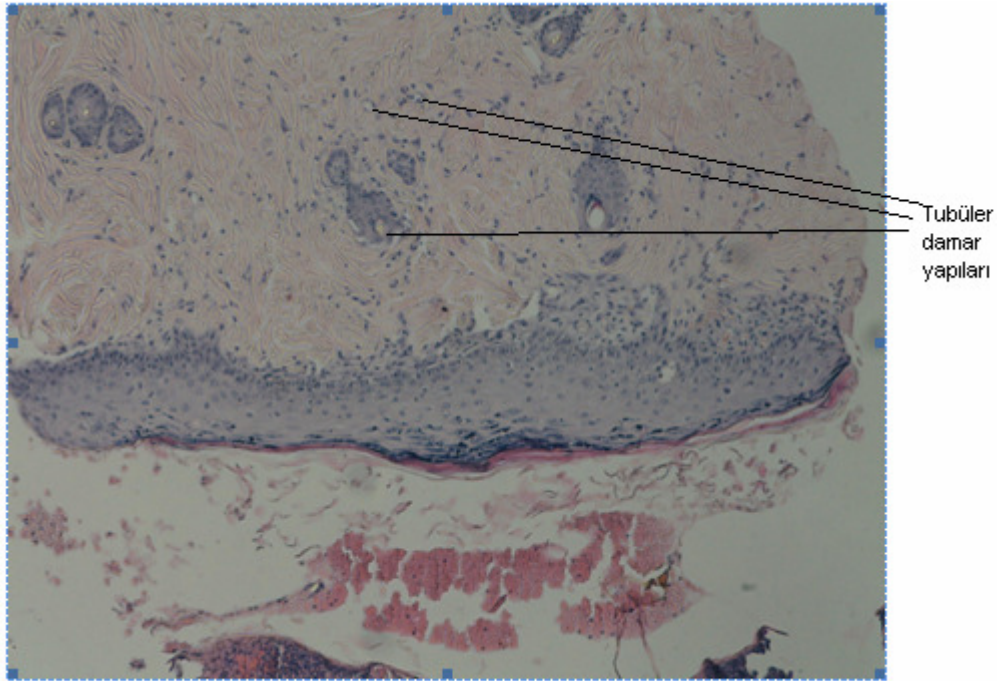
	3. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p - %75 p)</i>	7. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p - %75 p)</i>	10. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p - %75 p)</i>	14. GÜN $\bar{X} \pm S.S$ <i>Ort(%25 p - %75 p)</i>
Kontrol Grubu	1.50±0.84 1.00(1.00-2.25)	1.90±0.73 2.00(1.00-2.25)	2.10±0.73 2.00(1.75-3.00)	1.00±0.47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

4.1.2 Damarlanma

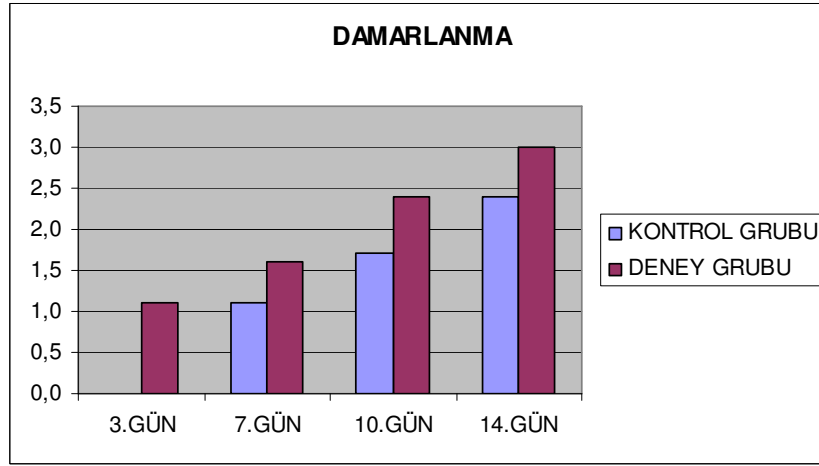
Histopatolojik olarak damarlanmanın değerlendirilmesinde kontrol grubu ile deney grubu arasında 3.gün, 10.gün ve 14.gün anlamlı farklılık tespit edildi (Şekil 24,25). Ancak 7.gün de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Damarlanma kontrol grubunda 7. günden sonra ortaya çıkarken, deney grubunda 3. günden sonra ortaya çıkmaktadır ve sonraki günlerde daha yüksek seviyelerde seyretmektedir (Şekil 26)(Tablo 4).



Şekil 24: Kontrol grubu 14.gün (Hematoksilen-eozin X40)



Şekil 25: Deney grubu 14.gün (Hematoksilen-eozin X40)



Şekil 26: Kontrol ve deney grubu damarlanma düzeyleri

Damarlanmanın günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında kontrol grubunda ve deney grubunda tüm günler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü.

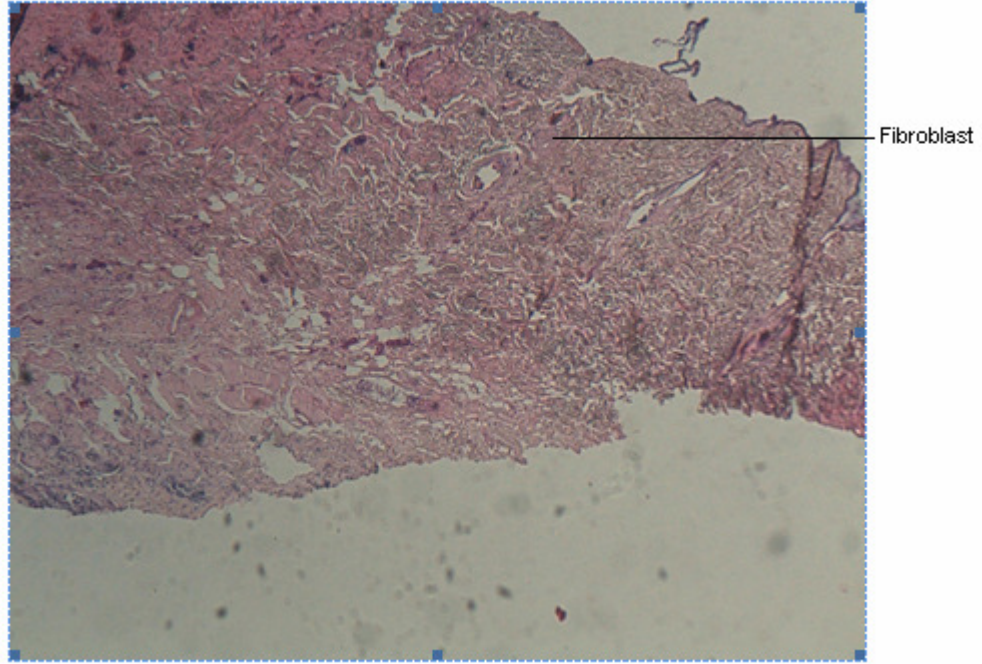
Tablo 4: Kontrol ve deney grubu damarlanma düzeylerinin karşılaştırması

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

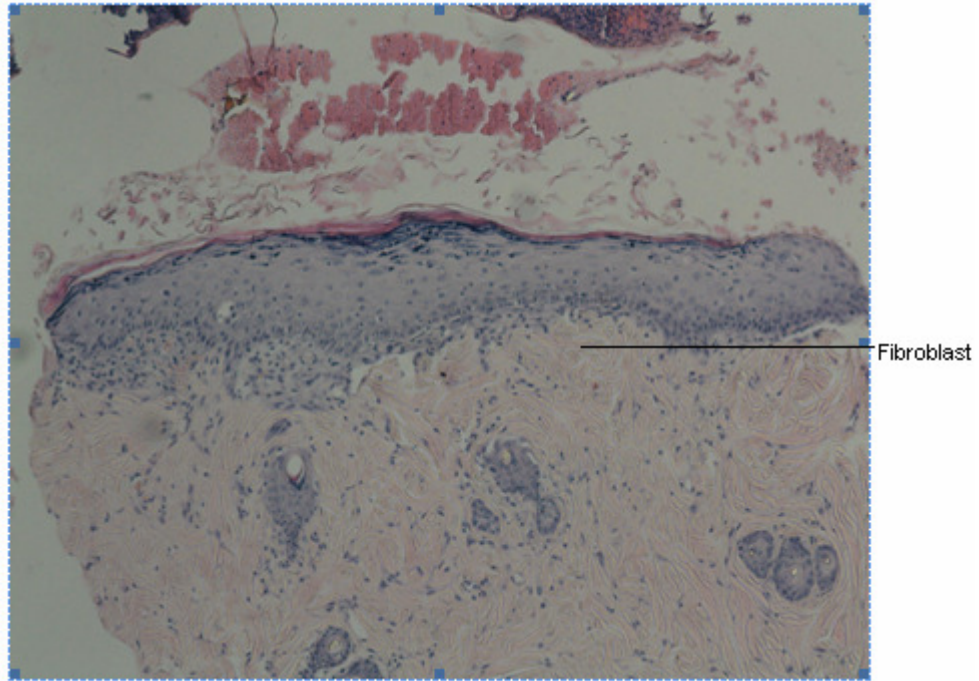
4.1.3 Fibroblastik aktivite

Histopatolojik olarak fibroblastik aktivitenin değerlendirilmesinde gruplar arasında 3.gün ve 14.gün anlamlı fark bulunurken (Şekil 27,28), 7.gün ve 10.gün anlamlı bir fark tespit edilmedi. Fibroblastik aktivite deney grubunda 3. gün başlarken kontrol grubunda aynı gün hiç bir aktivite gözlenmedi. Yedinci gün kontrol grubunda fibroblastik aktivitenin başlamış olduğu gözlenirken deney grubunda artarak devam etti. Onuncu günde her iki grubunda fibroblastik aktiviteleri eşit olarak gözlendi.

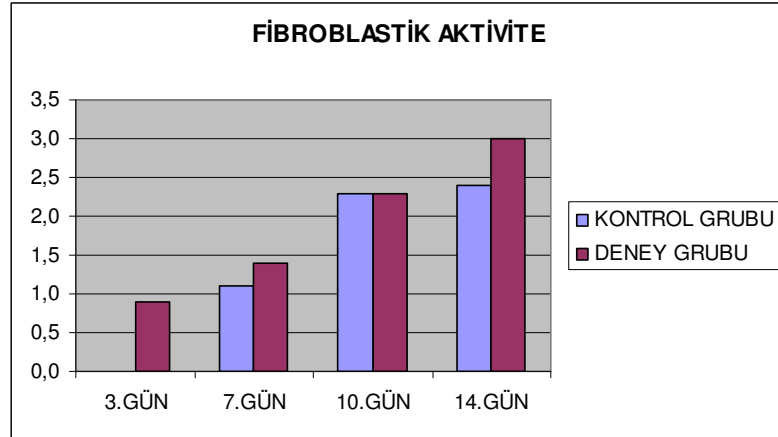
Ondördüncü gün kontrol grubunda hafif bir artış izlenirken deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görüldü (Şekil 29)(Tablo 5).



Şekil 27: Kontrol grubu 14.gün (Hematoksilen-eozin X40)



Şekil 28: Deney grubu 14.gün (Hematoksilen-eozin X40)



Şekil 29: Kontrol ve deney grubu fibroblastik aktivite düzeyleri

Fibroblastik aktivitenin günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında kontrol grubunda 3, 7. ve 10. günler arasında fark varken, 14.gün de fark olmadığı görüldü. Deney grubunda tüm günler arasında farklılık olduğu görüldü.

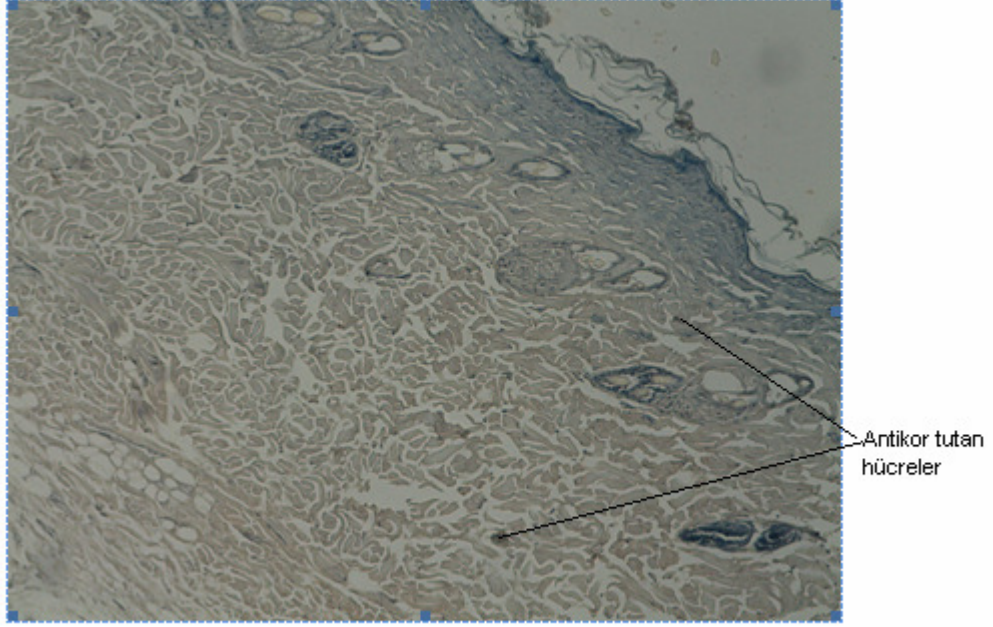
Tablo 5: Kontrol ve deney grubu fibroblastik aktivite düzeylerinin karşılaştırması

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

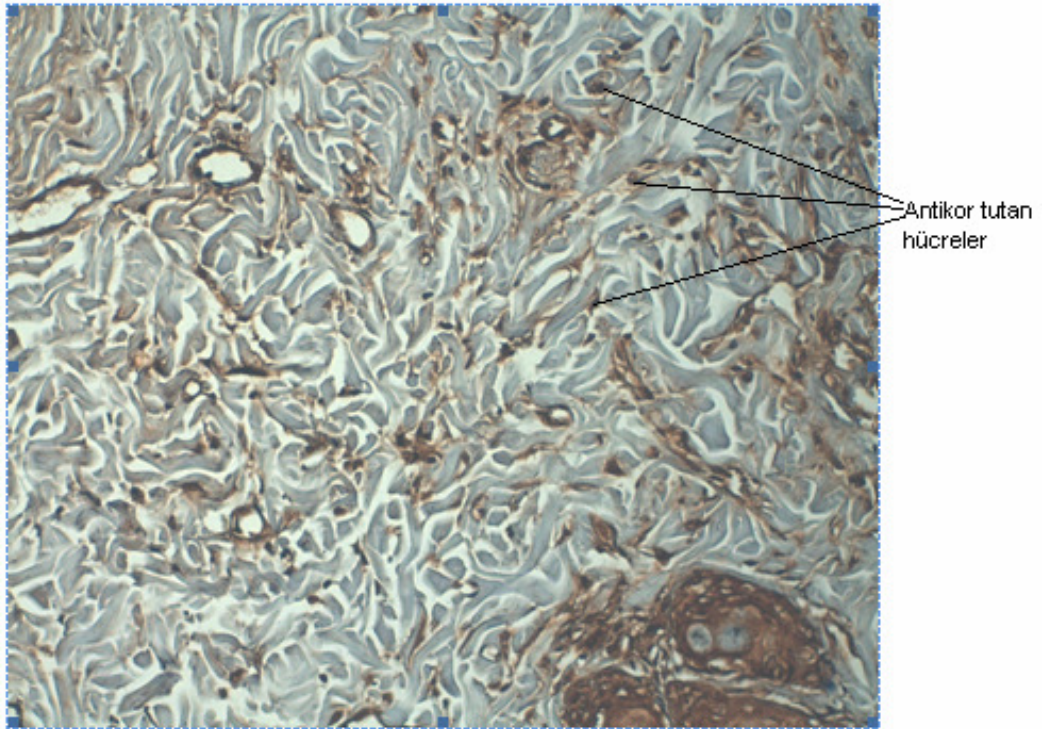
4.2 VEGF Ekspresyon skoru

Biyopsi alınan her gün için deney ve kontrol grubu verileri birbiri ile kıyaslandı. Kontrol ve deney grubu VEGF değerlerinin karşılaştırmasında 3.gün ve 10. günlerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (Şekil 30,31). Deney grubunda 3. gün VEGF ekspresyon skoru kontrol grubunun neredeyse iki katı seviyede idi.

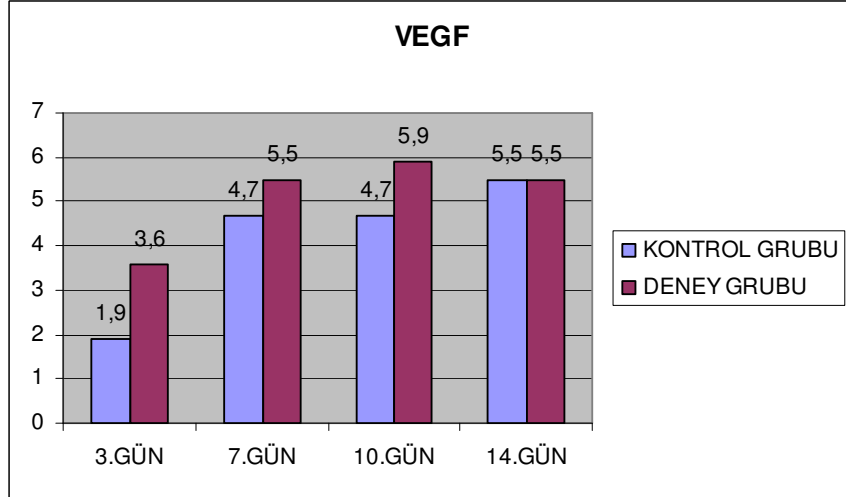
Onuncu güne kadar VEGF ekspresyon skoru deney grubunda daha yüksek seviyelerde devam etti. Ondördüncü gün her iki grubunda VEGF ekspresyon skoru düzeylerinin eşitlenmiş olduğu görüldü (Şekil 32)(Tablo 6).



Şekil 30: Kontrol grubu 10.gün (VEGF antikor X40)



Şekil 31: Deney grubu 10.gün (VEGF antikor X100)



Şekil 32: Kontrol ve deney grubu VEGF ekspresyon skoru

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

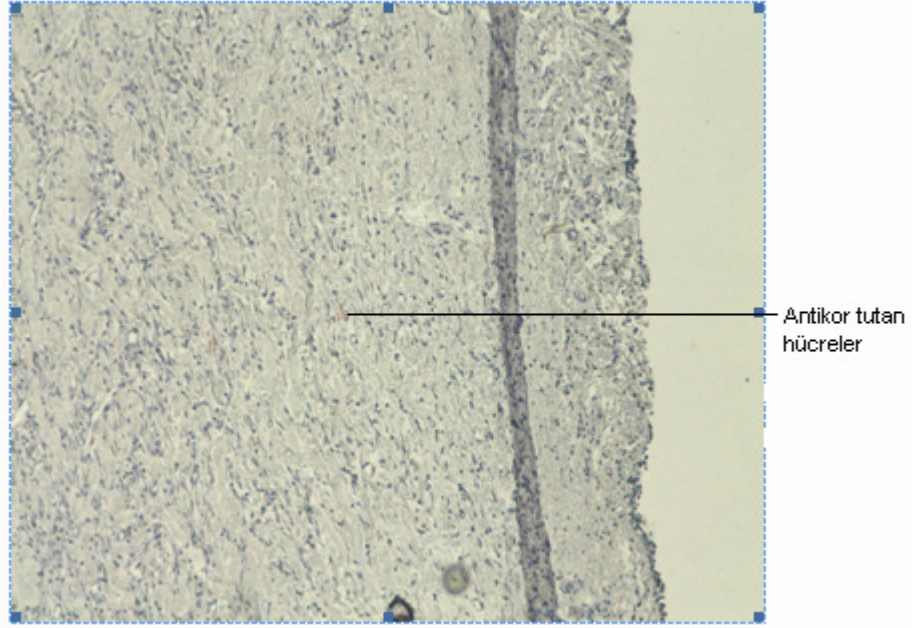
Tablo 6: Kontrol ve deney grubu VEGF değerlerinin karşılaştırması

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

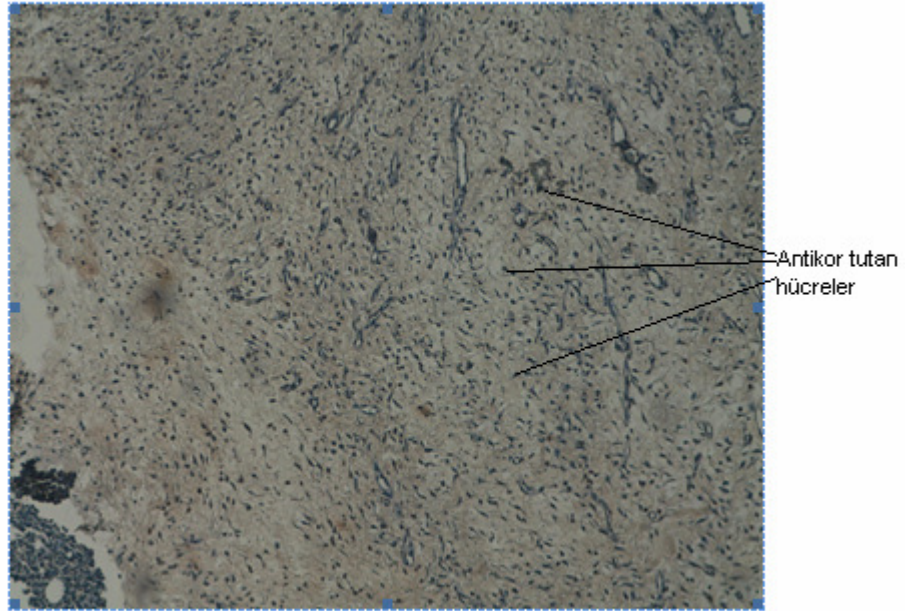
4.3 PCNA indeksi

Kontrol ve deney grubu PCNA değerlerinin karşılaştırmasında 3, 10. ve 14. günlerde istatistiksel anlamlı bir fark olduğu görüldü (Şekil 33,34). Her iki grupta da PCNA indeksinin 7. günde belirgin olarak yüksek olduğu görüldü. Onuncu günde ve 14. günde kontrol grubu ile deney grubu arasında belirgin bir farklılık vardı. Özellikle

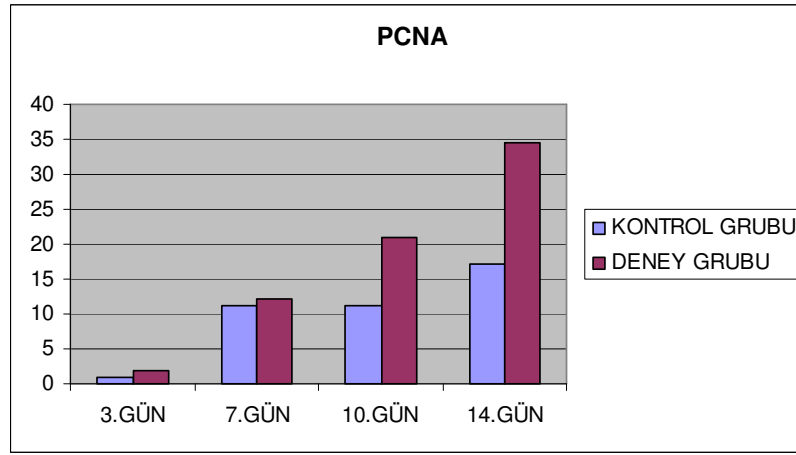
14. günde deney grubu PCNA indeksinin belirgin derecede artmış olduğu görüldü (Şekil 35)(Tablo 7).



Şekil 33: Kontrol grubu 14.gün (PCNA antikor X40)



Şekil 34: Deney grubu 14.gün (PCNA antikor X100)



Şekil 35: Kontrol ve deney grubu PCNA indeksi

PCNA değerlerinin günlere göre dağılımının varyans analizi yapıldığında;

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

Tablo 7: Kontrol ve deney grubu PCNA indeksi karşılaştırması

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

5. TARTIŞMA

İkinci derece derin yanıklarda tedavi sürecini kısaltmak ve komplikasyonları azaltmak için nekrotik dokuların erken tanjansiyel eksizyonu ve greft ile deri bariyerinin oluşturulması günümüzde en geçerli tedavi metodudur (15,27,30). Çalışmanın yanık modeli üzerine kurulmasının nedeni günümüzde ikinci derece derin yanıklarda cerrahi tedavi gereksinimini azaltabilecek, yara iyileşmesini hızlandıracak, morbidite ve mortaliteyi azaltacak medikal bir tedavi seçeneğinin olmamasıdır. Özellikle geniş yanıklarda yanık alanlarının hiç olmazsa bir kısmının hastanın kendi hücreleri ile onarılması tedavi sürecini kısaltacak ve yapılacak cerrahi tedavileri azaltacaktır.

İkinci derece derin yanık oluşturulmasında haşlanma metodu tercih edildi. Aynı derinlikteki yanığı elde etmek için sıcak metallerin temasıyla oluşturulan deneysel yanık modelleri de vardır. Ancak temas ettirilen cismin uygulayacağı basınç değiştiğinde oluşan yanığın derinliği de değişebilmektedir. Temas ettirilen cismin tüm alanlarındaki ısı miktarının da farklı olabileceği düşünüldü. Cismin çevresindeki alanlar merkeze oranla daha düşük ısıda olabilir, buna bağlı olarak da elde edilen yanık yarası her alanda istenilen derinlikte olmayabilir. Ayrıca deney hayvanının vücut yüzeyi eğimli olduğu için sıcak cisim her noktaya eşit olarak temas etmeyebilir. Homojen ve her denekte aynı derinlikte yanık oluşturabilmek için haşlanma yanık modelinin daha uygun olacağı düşünüldü.

İkinci derece derin yanık oluşturmak için literatürde farklı ısı dereceleri ve süreleri vardır. Alemdaroğlu C 90⁰C 15 sn (61), Santos Heredero S 70⁰C de 12sn (62),

Khorasani G 90⁰C de 6 sn (63), Jurjus A 80⁰C de 25 sn (64), Dökümcü Z 70⁰C de 30sn (65) haşlama sonucu derin II.derece yanık elde ettiklerini yayınladılar. Isı değerleri ve süreleri arasındaki bu farklılıklardan dolayı bir pilot çalışma yapıldı. Pilot çalışmada 70⁰C de 15 ve 30sn ve 90⁰C de 10sn sürelerle haşlanma yanıkları oluşturuldu. Yanık alanlarının histolojik incelemesinde 70⁰C de 30 sn süreyle oluşturulan yanığın istenilen derinlikte olduğu görüldü ve çalışmada bu metodun kullanılmasına karar verildi. Elde ettiğimiz veri Dökümcü Z'nin (65) verileri ile uyuşmaktadır.

Oluşturulacak yanık alanının genişliği planlanırken farklı günlerde 4 kez biyopsi alınmasına olanak sağlayacak büyüklükte olması, ancak sistemik enflamatuvar yanıt ve denekte hayati tehlike oluşturmayacak küçüklükte olmasına önem verildi. Alemdaroğlu C'nin yaptığı çalışmada 1cm çapı olan silindirden sıcak sıvı dökülerek yanık oluşturulmuştur (61). Bu yöntem modifiye edilerek çalışmamızda ağız açıklığı 7cm² olan şişe kullanıldı. Şişe içerisine doldurulan sıcak su şişenin ağzından ratın sırtına kenarlardan sızdırmayacak şekilde temas ettirildi. Böylece istenilen genişlikte yanık alanı oluşturuldu. Haşlanma yanıkları, sıvının dökülmesi veya sıvıya batırılma yoluyla oluşturulmaktadır. Biz çalışmamızda dökme yöntemini kullandık. Batırılma yöntemi de kullanılabilir ancak bu yöntemde hem ratın daha geniş alanı yakılmakta hem de her taraf eşit şekilde batırılmamaktadır. Dökümcü Z batırma yöntemi ile yaklaşık %20 lik bir yanık alanı elde etmiştir (65). Geniş yanıkta sıvı canlandırma protokolüne ihtiyaç olacağı, artmış sistemik enflamatuvar yanıt oluşacağı ve deneklerin kaybedilebileceği düşünüldüğü için tercih edilmedi. Uyguladığımız şişe ile yakma yöntemi literatürde ilk kez tarafımızca denenmiştir.

Çoğalan hücrelerin belirlenmesi yanık yarasının iyileşme sürecinde doku yenilenmesinin bir göstergesidir. Yanık yarasında çoğalan hücreler gösterilmesi için Alemdaroğlu C Bromodeoksiüridin (Brd U) tekniğini kullanmıştır (61). Bu test indirekt bir ölçme yöntemidir. Souza RB III.derece yanık yarası iyileşmesinin değerlendirmesinde PCNA yöntemini kullanmıştır (66). PCNA yöntemi replikasyon ve onarım mekanizmaları esnasında DNA sentezleyen hücrelerin direk olarak gösterilmesini sağladığı için biz de bu yöntemi tercih ettik.

Yeni damar oluşumunun belirlenmesinde VEGF önemli bir belirteçtir. Çalışmamızda damarlanmanın değerlendirilmesi hem histolojik incelemelerde tubuler yapıların ortaya konması ile hem de VEGF düzeylerinin karşılaştırılması ile

ortaya konmuştur. İmmünohistokimyasal analizde VEGF değerlendirmesi Li R (60) tarafından belirtilen yöntemle göre semi-kantitatif metodla yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda yara iyileşmesi 14. güne kadar değerlendirilmiştir. 14. günde yapılan epitelizasyon değerlendirmesinde hem deney grubunda hem kontrol grubunda yeterli düzeyde epitel oluşmadığı görülmüştür. Aynı derinlikteki yanık modellerinde yapılan çalışmalarda, Khorasani G epitelizasyonun 25. günde olduğunu (63), Baoyong L 14. günde yeni epidermal hücrelerin oluşmaya başladığını ancak düzenli epidermisin 21. gün tamamlandığını gösterdi (67). Epitel oluşumunun değerlendirilmesi için 14 günden daha uzun süreli takiplere ihtiyaç vardır. Yanık yarasının iyileşmesinde epitelizasyon çok önemlidir ancak sadece epitel oluşumu ile değil, doku elemanlarının yenilenmesi ile oluşan iyileşme çok daha önemlidir. Zira rejenerasyon ile derinin yerine getireceği fonksiyonları artacak, skar dokusu oluşumu ve buna bağlı olarak ortaya çıkan olumsuzluklar azalacaktır. Çalışmamızda SVF'un yanık yarasında damarlanmayı, fibroblastik aktiviteyi ve hücre çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir. Bunların tümü göz önüne alındığında rejenerasyonun olumlu yönde etkilendiği görülmektedir.

İkinci derece derin yanık yarasının iyileşmesini takip etmek için Baoyong L'un çalışmasında 3,5,7,14,21.günlerde (65), Alemdaroğlu C çalışmasında 3,7,14. gün biyopsi alınmıştır (61). Yanık derinliğini belirlemek için yaptığımız pilot çalışmada 1. ve 2. gün alınan biyopsilerde dokuda hücresel düzeyde belirgin bir farklılık oluşmadığını gördük. Yanık derinliği ve canlı hücrelerin ayırımı ancak 3. gün netleşmektedir. Bu nedenle biyopsi almaya 3. gün başladık. Klasik yara iyileşme aşamaları göz önüne alındığında hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi için 7 ve 10. günlerde biyopsi alınması uygun görüldü. Yaralar yaklaşık 2.haftadan sonra remodeling fazına girmektedir. Bizim uygulamayı planladığımız tedavide yanık yarasında deneyeceğimiz yöntemin erken dönemdeki etkinliğinin araştırılması planlandı. Yanık yarasında ilk 14 günlük periyodaki değişikliklerin tedavinin yönlendirilmesine katkı sağlayacağı düşünüldü. Bu nedenle son biyopsi 14.gün alındı. Stromal vasküler fraksiyonun fibroblastları arttırıcı etkisinin skar oluşumuna nasıl yön verdiği de araştırılmalıdır. Bu amaçla 14 günden daha uzun süreli çalışmalar planlanmalıdır.

Çalışmamızda SVF, yanık oluşturulduktan hemen sonra uygulandı çünkü staz zonundaki hücrelerin ilk 72 saatte yapılan uygun tedaviler ile kurtarılabileceği

bilinmektedir (32,68). Staz zonunda hücrelerin kurtarılmasının hem yanığın derinliğinin artmasını önlemede hem de yara iyileşmesini hızlandırmada fayda sağlar. Çalışmada SVF intradermal olarak verildi çünkü topikal olarak uygulandığında yüzeydeki nekrotik doku bariyerini geçip dermiste beklenen etkiyi gösteremeyeceği düşünöldü.

Yaptığımız çalışmada 3. gün yapılan biyopside SVF uygulanan grupta fibroblast yoğunluğunun kontrol grubuna göre belirgin düzeyde yüksek olduğu göröldü. Bu veri SVF uygulanan grupta fibroblastların korunduğunu ve proliferasyonunun uyarıldığını göstermektedir. Bu olumlu etkinin hem SVF içerisindeki fibroblastların direk olarak hasarlı alana nakledilmesine hem de ADSC'lerin fibroblastları koruyucu etkilerine bağlı olduğu düşünölmektedir. Kim WS (4) tarafından yapılan çalışmada ADSC'lerin hücreler arası etkileşim ile fibroblast proliferasyonunu arttırdığı ve parakrin etki ile fibroblastlarda kollajen ve fibronektin salınımı uyardığı gösterilmiştir. Bu veriler bizim çalışmamızda gösterilen fibroblast artışını desteklemektedir ancak fibroblastların kollajen ve fibronektin üretimlerini gösteren bir verimiz yoktur. İleriki çalışmalarda kollajen ve fibronektin seviyelerinin ölçümü ve dermis kalınlığındaki değişikliklerin belirlenmesi SVF'nin fibroblastlar üzerindeki etkilerini daha net ortaya konmasına yardımcı olacaktır.

SVF'nin fibroblastlar ve endotel hücrelerini koruyucu etkisi yanık travmasına yanıt olarak oluşan apoptozun önlenmesine bağlı da olabilir. Gravente G (32,33) staz zonundaki dermis ve deri eki hücrelerinin büyük bir kısmının apoptoza programlanmış olduğunu gösterdi. Kullandığımız yanık modelinde dermisin canlı kalan kısmı ısıdan etkilenerek hasara uğrayan ancak hücrelerin hala canlılığını koruduğu staz zonu olarak değerlendirilmelidir. Buradaki hücreler yanık travması sonrası muhtemelen apoptoza programlanmıştır. Apoptoza programlanmış hücrelerin kurtarılması doku hasarını azaltır. Rehman J (5) ve Kim WS (7) yağ doku stromal hücrelerinin çeşitli sitokinler salgılayarak anti-apoptotik etkinlik gösterdiğini ortaya koydu. Bizim çalışmamızda direk olarak apoptozu değerlendirmeye yönelik bir veri yoktur bu nedenle SVF'nun yanık yarasındaki apoptoza olan etkisi net olarak ortaya konamamıştır ancak önceki çalışmaların verisi ışığında SVF uyguladığımız grupta apoptozun önlenmesi fibroblastların ve damarlanmanın artışına katkı sağlamış olabilir. Stromal hücrelerin anti-apoptotik etkinliğinin sonuçları bizim elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Fibroblastlardan kollajen sentezi yaklaşık 21 günde olmaktadır. Çalışmada fibroblastların kollajen sentezini ortaya koymak için bir değerlendirme yapılmadı. Kollajen sentezinin değerlendirilmesi için 14 günden uzun takip sürelerine ihtiyaç vardır.

SVF yanık yarasındaki damarlanmayı belirgin olarak arttırmaktadır. Damarlanmada ki artış hem histolojik incelemede direk tubüler damar yapılarındaki artışın gösterilmesi ile hem de immünohistokimyasal analizde VEGF düzeyinin artışı ile gösterildi. Stromal hücrelerin anjiogenik etkisinin endotel hücrelerin çoğalmasına, apoptozun azaltılmasına ve VEGF salınımının artmasına bağlı olarak gerçekleştiği Rehman J (5) tarafından da gösterilmişti. Aynı çalışmada stromal hücrelerden salınan VEGF'ün hipoksik ortamda belirgin düzeyde artış gösterdiği ortaya konuldu. Yanık yarasında damarlarda mikrotrombüsler oluşur. Ayrıca hasarlı dokudan ortama salınan toksik inflamasyon mediatörleri kapiller endotel hasarı oluşturmaktadır. Bunların sonucunda yanık yarasında da hipoksik bir ortam oluşturmaktadır ve dolayısıyla VEGF salınımının arttığı düşünülmektedir (15). Yanık yara modeli ile eksizyonel yara modeli arasında stromal hücrelere bağlı oluşan damarlanma artışını karşılaştıran bir çalışma yoktur. İleriki çalışmalarda stromal hücrelerin farklı yaralarda etkinliğinin karşılaştırılmasına yönelik bir çalışma da planlanabilir.

Kim WS (4) tam kat eksizyonel yara modelinde, Rehman J (5) iskemik yara modelinde, Ebrahimian TG (8) radyasyon uygulanan ve uygulanmayan farelerde oluşturulan yara modelinde yağ dokusu stromal hücrelerinin yara iyileşmesini hızlandırdığını ve yaraların daha erken sürede kapandığını gösterdiler. Bizim çalışmamızda da SVF'nin yanık yarasının iyileşmesinde olumlu etkileri olduğu gösterildi. Bu bulgular daha önceki yara iyileşme çalışmaları ile de uyumludur.

Çalışmamızda SVF'nun anti-enflamatuar etkinliğini gösteren bulgular elde edildi. Stromal vasküler fraksiyon uygulanan yanık yaralarında enflamasyonun üçüncü günden sonra artmadığı kontrol grubunda ise artışın onuncu güne kadar devam ettiği görüldü. Yanık yarasında nekroz alanı çevresindeki doku hasarının çoğu yanıkla aktive olan toksik enflamasyon mediatörlerine bağlı gelişmektedir. Yara iyileşmesi için enflamasyon gereklidir ancak yanıkta oksidanlar ve proteazlar gibi enflamatuar mediatörlerin aşırı salınımı damar endoteli ve deri hücrelerinin hasarını artırır. Enflamasyon büyüme faktörlerinin de fonksiyonunu bozar. Enflamasyon esnasında ortamdaki oksijenin nötrofiller tarafından kullanılması doku hipoksisini artırır (16).

Gonzales ve ark. tarafından yapılan çalışmada ADSC'lerin otoimmün yanıtı ve enflamasyonu azalttığı gösterildi. Lokal olarak enjekte edilen ADSC'ler çeşitli enflamatuvar sitokin ve kemokinlerin sentezini azaltmakta aynı zamanda anti-enflamatuvar sitokin olan interlökin-10'nun salınımını arttırmaktadır (9). Kim WS tarafından yapılan çalışmada tam kat eksizyonel yara modeli iyileşmesinde dermisteki inflamatuvar hücre yoğunluğunun ADSC uygulanan grupta daha az olduğu gösterildi (4). Bu veriler bizim çalışmamızla da uyumaktadır.

Yanık yarasının iyileşmesinde kök hücre etkinliği çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Rea S yaptığı çalışmada kemik iliği kaynaklı kök hücreleri kullandı ve kök hücrelerin yanık yarasında inflamatuvar hücrelere, fibroblastlara, keratinositlere farklılaştığını gösterdi (35). Rasulov MF yaptığı klinik çalışmada kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin yanık alanlarının iyileşmesini hızlandırdığını gösterdi (17). Kemik iliğinden kök hücre elde edilmesi yağ dokuya göre daha zor bir işlemdir. Yağ doku kaynaklı kök hücreler kolay elde edilebilen zengin bir otogreft kaynağıdır (39). Yeşil floresan işaretli SVF hücrelerin yanık yarasındaki akibeti ve kök hücrelerin hangi hücrelere hangi oranlarda farklılaştığının ortaya konması için ileri çalışmaların yapılması gereklidir.

Saflaştırılmış yağ doku kaynaklı kök hücrelerinin etkinliği heterojen hücre karışımından oluşan SVF ile karşılaştırıldığında in-vitro farklılaşma potansiyeli daha fazladır (52). Ancak SVF den ADSC izolasyonunda daha fazla teknik ekipmana ihtiyaç duyulmakta, daha uzun zaman gerektirmekte ve tedavi maliyetini yükseltmektedir. Yanık gibi acil müdahale gerektiren yaralanmalarda taze elde edilen SVF kullanılması daha uygun olacaktır.

Yağ doku kişinin kendisinden elde edildiği için immün reaksiyon oluşması beklenmez ve etik bir sorun oluşturmaz (39). SVF nun yağ emme yöntemiyle elde edilmesi kolay ve morbiditeyi çok fazla arttırmayan bir yöntemdir. Geniş yanıklarda deri grefti almak için kullanılabilir donör alan kısıtlıdır. İkinci derece derin yanıklarda deri grefti uygulanmadan önce yanık alanlarına intradermal olarak SVF uygulanmasının doku onarımını hızlandıracağı ve deri grefti konması gereken alanı azaltacağı görüşündeyiz.

6. SONUÇ

Yanık travması tüm dünyada önemli oranlarda morbidite ve mortalite yaratan bir sorundur. Birinci ve III.derece yanıkların tedavi algoritmaları açıktır. Birinci derece yanıklar kendiliğinden iyileşirken III.derece yanıklarda mutlaka cerrahi tedavi uygulanması gereklidir. Yüzeysel ikinci derece yanıklar primer epitelizasyonla iyileşebilmektedir. Derin II.derece yanıklarda ve mix tip (derin ve yüzeysel yanık alanlarının birlikte bulunduğu) yanıklarda tedavi algoritması tartışmalıdır. Genellikle yanığın derinliğinin net olarak ortaya konabilmesi için birkaç günlük takip önerilmektedir. Ancak bu sürede çeşitli faktörlere bağlı olarak yanığın derinliği ve genişliği artabilmektedir. Çalışmamızda erken dönemde uygulanan SVF'nun yanık yarasında enflamasyonu azaltarak, fibroblastik aktiviteyi, damarlanmayı ve hücre çoğalmasını arttırarak iyileşmeyi olumlu yönde etkilediği ortaya konuldu. İkinci derece derin yanıklarda ve karışık derinlikteki yanıklarda yanık alanlarına erken dönemde kişinin kendisinden elde edilen SVF'nun uygulanmasının dokunun yenilenmesine yardımcı olacağı, hasar görmüş ancak canlılığını koruyan hücreleri kurtaracağı, cerrahi tedavi gereksinimini ve dolayısıyla morbidite ve mortaliteyi azaltabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

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

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

24. Hansen SL, Mathes SJ, Young DM. Schwartz's Principles of Surgery (8th ed). The McGraw-Hill Copany Inc, New York, 2005, p.429-52.
25. Young DM. Burn and electric injury. In: Mathes SJ(ed). Plastic Surgery (2nd ed). Saunders Elsevier, USA, 2006,Vol.1,pp. 815-816.
26. Kassira W, Namias N. Outpatient management of pediatric burns. J Craniofac Surg. 2008;19(4):1007-9.
27. Sharma VP, O'Boyle CP, Jeffery SL. Man or machine? The clinimetric properties of laser Doppler imaging in burn depth assessment. J Burn Care Res. 2011 ;32(1):143-9.
28. Kamolz LP, Kitzinger HB, Andel H, Frey M . The surgical treatment of acute burns. Eur Surg 2000;38(6):417-423.
29. Jackson DM. The diagnosis of the depth of burning. Br J Surg. 1953;40(164):588-96.
30. Keck M, Herndon DH, Kamolz LP, Frey M, Jeschke MG. Pathophysiology of burns. Wien Med Wochenschr. 2009;159(13-14):327-36.
31. Shakespeare P. Burn wound healing and skin substitutes. Burns. 2001 ;27(5):517-22.
32. Gravante G, Palmieri MB, Esposito G et all. Apoptotic cells are present in ischemic zones of deep partial-thickness burns. J Burn Care Res. 2006;27(5):688-93.
33. Gravante G, Palmieri MB, Esposito G et all. Apoptotic death in deep partial thickness burns vs. normal skin of burned patients. J Surg Res. 2007;141(2):141-5.
34. Singh V, Devgan L, Bhat S, Milner SM. The pathogenesis of burn wound conversion. Ann Plast Surg. 2007;59(1):109-15.
35. Rea S, Giles NL, Webb S et all. Bone marrow-derived cells in the healing burn wound--more than just inflammation. Burns. 2009;35(3):356-64.
36. Wilkison WO, Choy L, Spiegelman BM. Biosynthetic regulation of monobutyryl, an adipocyte-secreted lipid with angiogenic activity. J Biol Chem. 1991;266(25):16886-91.

37. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280(6):827-47.
38. Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K et al. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell.* 2005;16(3):1131-41.
39. Dicker A, Le Blanc K, Aström G et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res.* 2005;308(2):283-90.
40. De Francesco F, Tirino V, Desiderio V et al. Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One.* 2009;4(8):6537.
41. Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem.* 1992;267(23):16317-22.
42. Lorenz PH, Longaker MT. Wound healing: Repair biology and wound and scar treatment. In: Mathes SJ(ed). *Plastic Surgery* (2nd ed). Saunders Elsevier, California, 2006, Vol.1, p. 212
43. Karaöz E. , Ovalı E. *Kök Hücreler* (1 ed), Derya Kitapevi, 2004, sf.64
44. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294-301.
45. Kim WS, Park BS, Sung JH. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Arch Dermatol Res.* 2009;301(5):329-36.
46. Park BS, Jang KA, Sung JH, Park JS, Kwon YH, Kim KJ, Kim WS. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. *Dermatol Surg.* 2008;34(10):1323-6.
47. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008;45(2):115-20.

48. Wilgus TA, Matthies AM, Radek KA. Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. *Am J Pathol.* 2005;167(5):1257-66.
49. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(1):50-8.
50. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 2009;124(3):804-15.
51. Rigotti G, Marchi A, Galiè M et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(5):1409-22.
52. Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T et al. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(6):1515-21.
53. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LF. Fundamental aspects on animal research as applied to experimental surgery. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(1):103-11.
54. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S et al. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci.* 2007;48(1):43-52.
55. McIntosh KR, Lopez MJ, Borneman JN, Spencer ND, Anderson PA, Gimble JM. Immunogenicity of allogeneic adipose-derived stem cells in a rat spinal fusion model. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(9):2677-86.
56. Gilpin DA. Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size. *Burns.* 1996;22(8):607-11.
57. Mikus D, Sikiric P, Seiwerth S et al. Pentadecapeptide BPC 157 cream improves burn-wound healing and attenuates burn-gastric lesions in mice. *Burns.* 2001;27(8):817-27.

58. Chu Y, Yu D, Wang P, Xu J, Li D, Ding M. Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats. *Wound Repair Regen.* 2010;18(5):499-505.
59. Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene.* 1997;14(6):629-40.
60. Li R, Younes M, Wheeler TM et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) in human prostate. *Prostate.* 2004 1;58(2):193-9.
61. Alemdaroğlu C, Değim Z, Celebi N, Zor F, Oztürk S, Erdoğan D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns.* 2006;32(3):319-27.
62. Santos Heredero FX, Hamann C, Obispo Martin JM et al. Experimental burn model. *Annals of Burns and Fire Disaster.* 1996;12(2).
63. Khorasani G, Hosseinimehr SJ, Zamani P, Ghasemi M, Ahmadi A. The effect of saffron (*Crocus sativus*) extract for healing of second-degree burn wounds in rats. *Keio J Med.* 2008;57(4):190-5.
64. Jurjus A, Atiyeh BS, Abdallah IM et al. Pharmacological modulation of wound healing in experimental burns. *Burns.* 2007;33(7):892-907.
65. Dokumcu Z, Ergun O, Celik HA et al. Clostridial collagenase aggravates the systemic inflammatory response in rats with partial-thickness burns. *Burns.* 2008;34(7):935-41.
66. Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Low-dose propranolol improves cutaneous wound healing of burn-injured rats. *Plast Reconstr Surg.* 2008 Dec;122(6):1690-9.
67. Baoyong L, Jian Z, Denglong C, Min L. Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models. *Burns.* 2010 Sep;36(6):891-6.
68. Nisanci M, Eski M, Sahin I, Ilgan S, Isik S. Saving the zone of stasis in burns with activated protein C: an experimental study in rats. *Burns.* 2010;36(3):397-402.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

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

Tarih: 4.7.2011

İmza

Başkan:Prof. Dr.Galip Kemali GÜNAY.....

Üye:Prof. Dr. Atilla ÇORUH.....

Üye:Prof. Dr. Cüneyt TURAN.....

Üye:Doç.Dr.Teoman ESKİTAŞÇIOĞLU

Üye:Doç.Dr.Hızır AKYILDIZ.....