



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**RADYASYON ZEMİNİNDE OLUŞAN YARALARDA
İNSAN AMNİYOTİK MEMBRANININ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Murat DİYARBAKIRLIOĞLU

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Oğuz ÇETİNKALE

İSTANBUL - 2013

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalanmış olmayı bir ayrıcalık olarak gördüğüm değerli hocalarım Prof.Dr.Oğuz ÇETİNKALE ve Prof.Dr.Yağmur AYDIN'a; Prof. Dr. M.Zeki GÜZEL ve Prof. Dr. Akın YÜCEL'e sonsuz teşekkürlerimi arz ederim. Yara hakkında her şeyi bizlere öğreten emekli hocamız Prof. Dr. Muzaffer ALTINDAŞ'a ayrı bir teşekkürü borç biliyorum.

Asistanlığımın son zamanlarında kısa bir süre de olsa birlikte çalışma fırsatı bulduğum hocam Doç.Dr. Arif TÜRKMEN'e; cerrahi bilgileri, disiplinleri, etik anlayışları ve her türlü problemimize çözüm arayan yaklaşımlarıyla hep yanımda olan değerli ağabeylerim Doç.Dr.Hakan ARSLAN'a ve Uzm. Dr. Semih BAĞHAKİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başta tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Dr. Mirza Fırat ÇEVİRME ve Dr. Alp ERCAN olmak üzere, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma; büyük bir özveri göstererek tezimin her aşamasında yardımını ve desteğini eksik etmeyen kardeşim Dr. Mehmet CÖMERT'e teşekkür ederim.

Cerrahpaşa'da geçen yılların hep güzel hatırlanacak olmasına katkıda bulunan Cerrahpaşa Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ailesinin tüm değerli üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmamda değerli yardımlarını esirgemeyen Histoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Oktay ARDA ve Arş.Grv. Aslı GÜMÜŞEL'e, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Velittin YEDİGÖZ'e ve Uzm.Dr. Mahmut ÖNCÜL'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Zorlu uzmanlık eğitimi süresince desteklerini her zaman hissettiğim babam Ferudun DİYARBAKIRLIOĞLU'na, annem Füsün DİYARBAKIRLIOĞLU'na, ağabeyim Burak DİYARBAKIRLIOĞLU ve eşi Miray DİYARBAKIRLIOĞLU'na ve öğrencilik yıllarımdan bu yana tükenmez desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Uzm.Dr. Cansu DİYARBAKIRLIOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr.Murat DİYARBAKIRLIOĞLU
İstanbul- 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	III
RESİM LİSTESİ	IV
GRAFİK LİSTESİ	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
4. BULGULAR.....	24
5. TARTIŞMA.....	32
6. KAYNAKLAR.....	38

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Radyasyon yaralarının tedavisinde kullanılmış yöntemler.	13
Tablo 2: Biyomekanik çalışma istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.	24
Tablo 3: Epitel kalınlığı ölçümlerinin istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.	25
Tablo 4: Yara kontraksiyonu ölçümlerinin istatistiksel karşılaştırılması.	26
Tablo 5: Yara iyileşmesi alanlarındaki damar sayımı istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.	27
Tablo 6: Yara iyileşme alanlarındaki kollajen yoğunluğu skorlamalarının istatistiksel karşılaştırılması.	28
Tablo 7: Yara iyileşme alanlarındaki fibroblast hücre sayımlarının istatistiksel karşılaştırılması.	29

RESİM LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1: Amniyotik membranın histolojik görünümü.	14
Resim 2: Kobalt 60 cihazı ve anestezi sonrası sıçanın radyoterapi için pozisyonlanması..	18
Resim 3: Fetal membranların plasentadan ayrılması ve koryon ile amniyotik membranın ayrılması.	19
Resim 4: Kullanıma hazır hale getirilmiş amniyotik membran.....	20
Resim 5: Sağ kalça bölgesine yapılan 2 cm’lik tam kat insizyon ve primer kapama.	20
Resim 6: Cilt altında oluşturulan 2 x 2 cm’lik alan ve yerleştirilecek olan amniyotik membran	21
Resim 7: 3x3 cm’lik alanlar blok halinde çıkarıldı. Orta kısımları histopatolojik inceleme için, kalan kısımları ise biyomekanik ölçüm için ayrıldı.....	22
Resim 8: Yara kopma kuvveti ve kopmaya sebep olan sıvı miktarının ölçümü.	22
Resim 9: Yara iyileşme alanlarının ölçümü.	30
Resim 10: Hematoksilen-Eozin boyasıyla 20 X büyütmede epitel kalınlığının ölçülmesi.	30
Resim 11: Masson trikrom boyası ile yara iyileşme alanlarında kollajen miktarının gösterilmesi.	31
Resim 12: Hematoksilen-eozin boyası ile vaskülarizasyon artışının karşılaştırılması.	31

GRAFİK LİSTESİ

Sayfa No

Grafik 1: Biyomekanik çalışma istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.....	24
Grafik 2: Epitel kalınlaşması ölçüm sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması..	25
Grafik 3: Yara kontraksiyonu ölçümlerinin istatistiksel karşılaştırılması..	26
Grafik 4: Yara iyileşme alanlarındaki damar sayımı istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.	27
Grafik 5: Yara iyileşme alanlarındaki kollajen yoğunluğu skorlarının istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.....	28
Grafik 6: Yara iyileşme alanlarındaki fibroblast hücre sayımının istatistiksel karşılaştırılması..	29

ÖZET

Radyasyon zemininde gelişen yaralar, radyoterapi cihazlarının geliştirilmesi ve verilen radyasyonun normal dokulara verdiği zararın azaltılmasını amaçlayan çalışmalara rağmen, günümüzde plastik ve rekonstrüktif cerrahi açısından önemli bir problem olmaya devam etmektedir. İyileştirilmesi oldukça zor olan radyasyon yaraları ciddi enfeksiyonlara yol açabilmekte hatta hayatı tehdit eden noktalara varabilmektedir. Sadece yaranın olduğu bölgeyi değil, çevre dokuları da olumsuz yönde etkilediği için, lokal dokularla rekonstrüksiyonu neredeyse imkansız kılmakta, serbest doku nakillerini de zorlaştırmaktadır.

Radyasyon zemininde gelişen yaraların tedavisinde günümüzde uzun süreli yara bakımı gerektiren pansumanlar, negatif basınçlı pansuman sistemleri, hiperbarik oksijenle birlikte güçlü antibiyoterapi gibi yöntemler kullanılmakla birlikte, kök hücre ve fibroblast enjeksiyonları, birtakım topikal ajanlar, büyüme faktör uygulamaları gibi yeni yöntemler denenmiştir.

Özellikle oftalmoloji sahasında (en çok korneal ülserlerde) rutin olarak kullanılan amniyotik membran, damak fistüllerinin tedavisinde (deneysel olarak), venöz ülserler, diyabetik ayak yaraları, bası yaraları, yanıklar gibi problemlili yaraların tedavisinde kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda önemli bir problemlili yara türü olan radyasyon zemininde gelişen yaralarda amniyotik membranın etkisi araştırılmış ve yapılan biyomekanik ve histopatolojik incelemelerde, amniyotik membranın antimikrobiyal ve antiinflamatuvar, anjiogenik, epitel indüktif ve kollajen sentezini artırıcı yöndeki etkilerinin, yara iyileşmesi üzerinde olumlu etki gösterdiği gözlenmiştir.

Elde edilmesi kolay, ucuz, bol miktarda bulunabilir bir doku olan amniyotik membran, immünolojik reaksiyon göstermemesi bakımından da önemli bir avantaj teşkil etmektedir.

Bu özellikleri nedeniyle amniyotik membranın, özellikle neoadjuvan radyoterapi verilen hastaların cerrahi tedavisinde kullanılması, radyasyona maruz kalmış dokuları oluşabilecek yaralardan koruyabilir. Aynı şekilde radyasyon zemininde gelişen yaraların bakımı ve tedavisinde de yeni bir tedavi alternatifi olarak kullanılabilir.

ABSTRACT

Radiation injury, continues to be a major problem for plastic and reconstructive surgery, despite the development of radiotherapy devices aimed at reducing the harm caused by the radiation on healthy tissues. These wounds are extremely difficult to treat and may lead to severe infections and can be even life-threatening.

Radiation injury is not only the region consists of the wound, it also adversely affects the surrounding tissues that makes the free tissue reconstruction difficult and local tissue reconstruction almost impossible.

Wound dressings, negative pressure dressings, hyperbaric oxygen therapy and antibiotherapy are the main treatment modalities for radiation wounds today. But also new methods such as stem cell and fibroblast injections, topical agents, growth factor applications have been tried.

Amniotic membrane is routinely used especially in the field of ophthalmology (mostly for corneal ulcers). It is also used for the treatment of palatal fistulas (in an experimental study), venous ulcers, diabetic foot ulcers, pressure sores, burns and successful results were obtained.

The aim of our study was to investigate the effects of amniotic membrane on radiation injury. In biomechanical and histopathological evaluation, amniotic membrane which has antimicrobial, anti-inflammatory, angiogenic and epithelial inductive effects, found to be beneficial for the treatment of radiation injury.

Amniotic membrane is inexpensive, easy to obtain and can be found in plenty, also lack of an immunogenic property is a significant advantage for its usage.

Due to features mentioned above, amniotic membrane can be used in the surgical treatment of patients which were received neoadjuvant radiotherapy to prevent future wounds. It can also be used for the care and treatment of radiation wounds.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Neoadjuvan (preoperatif) radyoterapi günümüzde birçok yumuşak doku sarkomunun yanında, baş boyun kanserleri, özefagus ve rectum kanserleri gibi kanser türlerinde primer tümörün boyutunu küçültmek ve lokal invazyon derecesini azaltmak için kullanılmaktadır. (1-3) Ancak radyoterapi tumor hücrelerinin yanında normal dokulara da zarar vererek, cerrahi sonrası yara iyileşme problemlerine sebep olmaktadır (4-5).

Vasküler endotelial hücreler ve fibroblastlar radyasyon duyarlılığı en fazla olan hücreler arasındadır (6-7). Radyasyon sonrası yara iyileşmesinin bozulduğunu ve fibrozis gelişimini gösteren çalışmalar mevcuttur (7-8).

Amniyotik membran plasentanın en iç kısmında yer alan membrandır. İç kısımda tek tabaka halinde kollajenden zengin mezenkime bağlı olarak bulunan amniyon hücrelerinden oluşur. Amniyotik membranın re-epitelizasyonu tetikleyici, inflamasyon ve fibrozisi azaltıcı ve angiogenez üzerinde de düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir (9). Ayrıca bazı çalışmalarda da antijenitesinin az olması nedeniyle doku mühendisliği çalışmalarında kullanıldığı belirtilmiştir (10). İnsan amniyotik membranının çeşitli etyolojilerle meydana gelen yaralar üzerindeki epitelizasyon sağlayıcı etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (11). Bahsedilen özellikleri nedeniyle radyasyon zemininde gelişen yaralarda da epitelizasyonu indükleyici ve yara iyileşmesini hızlandırıcılığının yanısıra yara gerilim kuvvetini artıracığı düşünüldükçe çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.

Lokal ileri evre tümörler başta olmak üzere malignitelerin küratif tedavisinde preoperatif radyoterapi güncelliğini korumaktadır. Ancak radyoterapi cilt üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle yara iyileşme bozukluklarına neden olabilmektedir. Radyoterapi sonrası yara iyileşmesi problemsiz olarak sağlanabilirse hastaların yara nedeniyle maruz kalabilecekleri komplikasyonlardan kaçınılarak survi artırılabilir gibi hastaların yaşam kalitelerinde de artış sağlanabilecektir. Bu bilgiler ışığında, çalışmamızın kanıtlanmış model üzerinden oluşturulmuş radyasyon zeminindeki yaraya insan amniyotik membranının uygulanması, makroskopik ve histopatolojik değerlendirmeler ışığında, preoperatif radyoterapinin neden olduğu yara iyileşme problemlerine alternatif bir tedavi yaklaşımı sunacağı öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

YARA, YARA İYİLEŞMESİ ve SINIFLANDIRILMASI

Yara, normal bir anatomik yapının, yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünün bozulmasıdır. Yara iyileşmesi ise bu bozulmuş anatomik ve fonksiyonel yapının bütünlüğünün tekrar sağlanması için işleyen karmaşık ve dinamik bir süreçtir (12).

Yara iyileşmesi, bir organizmanın, lokalizasyonu ister deride, isterse karaciğerde veya kalpte olsun, yaralanmalara karşı verdiği topyekün cevap olarak algılanabilir. Bu karmaşık süreç, deride meydana gelen bir yara iyileşmesinde tüm boyutlarıyla görülebilir. İntrensek ve ekstrensek pıhtılaşma sistemleri aktive olur, akut ve kronik inflamatuvar yanıtlar ortaya çıkar, anjiyogenez ve vaskülogenez aracılığıyla yeni damarlanma meydana gelir. Hücreler çoğalır, bölünür, apoptozis gerçekleşir. Ekstrasellüler matriks yığılması olur ve bu oluşum yeniden şekillenir. Bütün bu olaylar eş zamanlı ve üst üste gelen süreçlerde ortaya çıkar.

Yaralar, akut ve kronik olarak ikiye ayrılır. Akut yaralar genellikle normal iyileşme sürecini tamamlayarak iyileşebilirken, kronik yaralarda ise yara iyileşme süreçleri tamamlanamamaktadır (12). Deri grefti donör alanları, ısırıklar ve dermabrazyonlar akut yaralara örnek verilebilir (13). Bası yaraları, diyabetik ayak yaraları ve venöz ülserler ise kronik yaralara örnek olarak verilebilir ve kronik yaraların yaklaşık % 70'ini oluştururlar. (14). Komplike yara ise ayrı bir antite olup, doku defekti ve enfeksiyon birlikteliğini ifade eder (15). Yara iyileşme tipleri ikiye ayrılır (16).

- 1-Yaralanmış organ veya dokunun fiziksel ve fizyolojik bütünlüğünü sağlamak üzere oluşan yeni doku ile onarım; Skar oluşumu
- 2-Yaralanmış organ veya dokuyu daha önce oluşturmuş olan süreçlerin yeniden faaliyete geçerek meydana getirdiği onarım; Rejenerasyon süreci.

Yara iyileşmesi ayrıca primer, sekonder ve tersiyer yara iyileşmesi olarak da sınıflandırılır.

Primer yara iyileşmesi için en iyi örnek enfekte olmayan temiz bir insizyonun

sütürasyonu sonrası meydana gelen yara iyileşmesidir. Sütür hattındaki fibrozis üzerinde epitel rejenerasyonu gerçekleşir. Yaklaşık 24-48 saat içinde epitel çoğalması gerçekleşir. 2. haftadan itibaren kollajen birikimi ve düzenlenmesi devam eder. Birinci ayın sonunda skar yüzeyi normal epidermisle örtülmüştür. İnsizyon hattında deri ekleri kalıcı olarak kaybolur (17).

Sekonder yara iyileşmesi genellikle hücre ve doku kaybı daha fazla olduğunda gerçekleşir. İltihabi reaksiyon daha yoğundur. Ekstrasellüler matriks birikimi ve aşırı granülasyon dokusu oluşumu gerçekleşir. Yara yüzeyinde büyük miktarda nekrotik atık, eksüda ve fibrin bulunur. Fazla granülasyon dokusu daha fazla skar dokusu ile sonuçlanır. Yara kontraksiyonla orjinal boyutun % 5-10'u kadar küçülür. Bu kasılmanın başlıca sorumlusu miyofibroblastlardır (18).

Tersiyer yara iyileşmesi, gecikmiş primer kapama olarak da adlandırılır. Yara belirli bir süre açık bırakıldıktan sonra kapatılır. Bu süre eksudanın drenajı ve ödem şiddetinde azalma gibi fizyolojik süreçlere olanak sağlar (19).

Yara İyileşmesinin Evreleri

Clark yara iyileşmesinin temel 3 fazda incelenmesi gerektiğini belirtmiştir (20). Bu 3 temel süreç birbirinden keskin sınırlarla ayrılamayan ve iç içe geçmiş süreçlerdir (21).

1-İnflamasyon Fazı

Erken ve geç inflamasyon fazı olarak ikiye ayrılır.

Erken inflamasyon fazı yaranın oluşumu sonrası gerçekleşen koagülasyon evresinin hemen ardından başlar. Kompleman kaskadını ve diğer moleküler olayları tetikleyerek yara bölgesine nötrofil göçünün gerçekleşmesini sağlar. Bu nötrofil infiltrasyonu yarayı enfeksiyondan koruyan temel basamaktır (22). Nötrofil infiltrasyonu sonrası nötrofiller fagositoza başlarlar. Yara üzerindeki debris ve bakteri içeriği nötrofiller tarafından fagosit edilir. Bu basamak yara iyileşmesi açısından oldukça kritiktir; çünkü bakteriyel infiltrasyonun ortadan kaldırılamaması yara iyileşmesinin bozulmasıyla sonuçlanır (23,24). Nötrofillerin yara bölgesine göçünü bir takım sitokinler gerçekleştirir; TGF-beta, C3a ve C5a gibi kompleman komponentleri ve formilmetiyonil peptidleri bunlardan bazılarıdır (24).

Endotel hücreleri üzerindeki yuvarlanma ve yapışma olarak bilinen hareketlerin sonrasında diapedez adı verilen olay gerçekleşir ve nötrofiller endotel hücreleri arasından yara bölgesine ulaşırlar (25). Nötrofiller yara bölgesindeki bakteri ve debrisini oksijen bağımlı birtakım reaksiyonlar ve proteolitik enzimler yoluyla ortadan kaldırırlar (26). Görevini tamamlayan nötrofiller tedrici olarak yara bölgesinden uzaklaştırılırlar (25,27).

Geç inflamasyon fazı, 48-72 saat sonra, makrofajların yara bölgesinde belirerek fagositoza devam etmesiyle başlamış olur (25, 28). Bu hücreler aslında kan dolaşımında bulunan ve birtakım fenotipik değişiklikler sonrası yara bölgesine doku makrofajları olarak ulaşan kan monositleridir. Yara bölgesine bazı kemoatraktanların uyarısı sonucu ulaşırlar. PDGF, TGF- β , lökotrien B₄, platelet faktör IV, elastin ve kollajen yıkım ürünleri bunların bazılarıdır. Makrofajlar nötrofillere göre daha uzun ömürlüdürler ve daha düşük pH'ta aktivite gösterebilirler (29). İnflamasyon fazının ana düzenleyici hücreleridir. Keratinositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri aktive eden birtakım maddeleri salarlar. (TGF- α , EGF, fibroblast growth factor [FGF], kollajenaz vs.) (30). Makrofajların yokluğu veya fonksiyon bozukluğu; yaranın yetersiz otolitik debridmanı, yetersiz anjiogenez, fibroblast proliferasyonunun gecikmesi sonucu yetersiz fibrozis gelişmesi nedeniyle ciddi yara iyileşme bozukluklarına sebep olur (27,31).

İnflamatuvar fazda yara bölgesine gelen son hücre grubu lenfositlerdir. (ortalama 72 saat). Lenfosit göçüne sebep olan ana medyatörler IL-1, kompleman komponentleri ve IgG yıkım ürünleridir. Lenfosit göçünü takiben proliferasyon fazı başlar (25,26, 32).

2-Proliferasyon Fazı

Yara kenarlarında yer alan epitelyal hücreler sıvı kaybını ve daha fazla bakteriyel invazyonu önlemek amacıyla çoğalmaya başlarlar. (22))Bu epitelyal proliferasyonu ve kemotaksisi sağlayan temel medyatörler, plateletler ve makrofajlar tarafından salınan EGF ve TGF- α 'dır (33,34). Aslında epitelizasyon, yaralanmadan hemen sonra salınan IL-1 ve TNF- α gibi sitokinlerin, fibroblastlarda Keratinosit Büyüme Faktörü (KGF) gen ekspresyonunu uyarması ile başlar. KGF-1, KGF-2 ve IL-6, keratinositlerin yara kenarlarından yara yüzeyine doğru göçünü, proliferasyonunu ve diferansiasyonunu sağlar. (35,36). İnsanlarda en önemli Keratinosit Büyüme Faktörü KGF-2 gibi görünmektedir (37).

Fibroblastlar ve endotelial hücreler, proliferasyon fazında en çok proliferen olan hücrelerdir. Yara etrafındaki intakt venüllerdeki endotelial hücreler VEGF(vasküler endotelial büyüme faktörü) salınımı sonucu uyarılarak yeni kapiller tüpleri oluştururlar. VEGF başlangıçta yara etrafındaki keratinositlerden salınırken ayrıca makrofajlar, plateletler, fibroblastlar ve endotelial hücrelerden de salınırlar. Endotelial hücreler ayrıca endotelial Nitrik Oksit Sintetaz (eNOS) yoluyla Nitrik Oksit (NO) sentezleyerek salgırlar. NO, VEGF salınımını daha çok artırır. NO aynı zamanda dokuları iskemi reperfüzyon hasarının toksik etkilerinden de korur (38).

Bu fazda fibroblastlar yara yüzeyine doğru göç ederek kollajen üretmeye ve çoğalmaya başlarlar. Plateletlerden ve makrofajlardan salınan PDGF ve EGF fibroblastlar için temel medyatörlerdir. PDGF salınımı fibroblastlar tarafından otokrin ve parakrin sinyallerle artırılır. Bu arada fibroblastlar daha sonraki evrelerde yara kontraksiyonunu meydana getirecek olan miyofibroblastlara dönüşmeye başlarlar. Bu dönüşümü daha çok makrofajlar tarafından salınan TGF- β 1 sağlar. Myofibroblastların çoğalma potansiyeli, yara çevresindeki fibroblastlara göre daha azdır (39).

PDGF'ye cevap olarak fibroblastlar kollajen tip 3, fibronektin ve glikozaminoglikanlardan oluşan öncü bir matriks sentezlerler (40). İntegrinler, bu öncü matrikse diğer hücrelerin gelip tutunmasını sağlayan proteinlerdir ve üretimleri TNF- α tarafından tetiklenir (41). TGF- β , 7-14.günlerde pik yaparak ekstrasellüler matriks üretimini artırırken, yıkımını azaltır. TGF- β fibroblastları kollajen tip-1 sentezi yönünde uyarır, MMP (matriks metalloproteinaz) üretimini azaltır, MMP inhibitörlerinin salınımını artırır ve hücre adhezyon proteinlerinin salınımını artırır (38).

Geniş yaraların iyileşmesinde fibroblastların miyofibroblastlara dönüşmesini sağlayarak yara kontraksiyonunu sağlayan TGF- β 'nın etkin olduğu düşünülmektedir (42).

Proliferatif fazı, matürasyon fazı takip eder.

3-Matürasyon Fazı

Klinik açıdan yara iyileşmesinin en önemli evresidir. Bu evredeki temel olay kollajenin organize bir biçimde depolanması ve bir ağ oluşturmasıdır. Kollajen sentezindeki herhangi bir bozukluk yara gerilim kuvvetinde azalmayla, kontrolsüz bir depolanma ise hipertrofik skar veya keloid oluşumuyla sonuçlanır (22).

Başlangıçta yara bölgesinde oluşan matriks ağırlıklı olarak (hemostaz evresinde oluşan) fibrin ve (makrofajlar tarafından salınan) fibronektinden meydana gelir (43). Fibroblastlar tarafından sentezlenen glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar bu matrikse eklenerek daha sonra oluşacak kollajen çatı için bir iskelet görevi görürler (44). Bu iskelet çatı yerini daha güçlü ve organize olan kollajen çatıya bırakır. Normal deride kollajen tip 1 %80-90 oranında bulunurken, kollajen tip 3 % 10-20 oranında bulunur. Granülasyon dokusunda ortalama % 30 tip 3 kollajen bulunurken, olgunlaşmış skarda bu oran tekrar % 10'a döner (45). Yara kuvvetinin sağlanmasında belirgin etkisi olmayan Tip 3 kollajenin erken dönemde depolanmasının rolü tam olarak anlaşılmamıştır. Matriksin yeniden şekillenmesini sağlayan matriks metalloproteinazlar (MMP) her kollajen tipi için farklı bir tipe sahiptir. Bunların salınımı TGF- β , PDGF, IL-1 ve EGF gibi sitokin düzeylerinden etkilenir. Doku MMP inhibitörleri salınımlarını azaltırken, TGF- β ve IL-6 ise fibroblastlar tarafından MMP salınımını artırır (46). Matriks metalloproteinazları başta MMP-3 olmak üzere kollajen çatı ve fibroblastlar arasındaki bağlantıları yıkarak matürasyon evresindeki yara kontraksiyonunun gelişmesinde önemli rol oynarlar (47).

Yara kontraksiyonunun daha fazla gerçekleşmesi için fibroblastlar miyofibroblastlara dönüşürler. Bu dönüşüm TGF- β etkisi altında gerçekleşir. Bu diferansiasyon fibronektinin alternatif bir formunun oluşturduğu hücre etkileşimi ile gerçekleşir. Fibroblastlardan daha fazla alfa düz kas aktin izotipi sentezlenmesini sağlayan bu etkileşimin hücre kontraktilitesi ile bağlantısı gösterilmiştir (48). TGF- β fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşmasını artırırken, yara kontraksiyon yükünün azalması miyofibroblastların zamanla apoptoza gitmesine ve kollajen sentezinin de azalarak belirli bir düzeyde kalmasına neden olur. Bunların sonucunda ciltte normal bir skar oluşur. Devam eden mekanik yük ve yara gerilimi miyofibroblastların kollajen sentezinin devam etmesine ve patolojik antiteler olan kontraktür ve hipertrofik skar oluşumuna neden olur (48) .

Kollajen sentezi yaralanmayı takiben 4-5 hafta kadar devam eder. Bu sürede fibroblast sayısı artarken, hücre başına düşen kollajen sentez miktarı da artış gösterir (49, 50).

Başlangıçta sentezlenen kollajen tabakası normal bir ciltteki kollajen tabakasından daha incedir ve cilde paralel olarak dizilmiştir. Zamanla bu kollajen iplikleri absorbe olarak daha kalın ve cilt gerilim çizgilerine uygun olarak dizilmiş bir kollajen yapısı oluşturur. Gerilimi artmış bir yarada kollajen tabakasının kalınlığı daha fazla olur. Bu da yara gerilimi

ile kollajen sentezi ve oryantasyonu arasındaki pozitif korelasyonu gösterir (30).

Granülasyon dokusundaki kollajen bileşimi, normal cilttekinden daha farklıdır. Granülasyon dokusundaki kollajenin lizin rezidüleri daha fazla glikozilasyon ve hidroksilasyona uğrarlar. Bu da daha fazla glikozilasyon ve hidroksilasyonun daha ince kollajen lifleri ile korele olduğunu gösterir (51).

Yara sonrası cilt, bir daha asla eski gücünün % 100'üne kavuşamayacaktır; 1.haftada yara direnci normal derinin % 10'u kadardır. Fakat bu takip eden 4 haftada hızla artar ve 2. ayda yara direncinin hızla artışı kollajenin çapraz bağlarının artışı ve fibril çap artışı sonucudur. 3.ayda yara direnci ortalama %70-80'dir, fakat genellikle bu noktanın ötesine geçmez (52).

İYİLEŞMEYEN YARALAR

Kronik veya iyileşmeyen yaralar olarak tanımlanan yaralar, genelde epitelizeasyonu tamamlanamayan veya 30 gün içerisinde kapanmayan yaralar olarak tanımlanırlar. Diabetes mellitus, arteriyel iskemi, venöz yetmezlik, lenfödem, steroid kullanımı, bağ doku hastalıkları ve radyasyon hasarı yara iyileşmesini geciktiren faktörlerden bazılarıdır. Bu faktörler altında oluşan yaraların çoğunda tedavi debridmanla başlar. Birçok tedavi seçeneğine rağmen bu problemlili yaralarda hala cerrahi tedavi önemli bir yer tutmaktadır (53).

YARA İYİLEŞMESİNİ OLUMSUZ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Yara iyileşmesini olumsuz etkileyen faktörler iki ana grupta ele alınabilir;

1-Lokal (İntrinsik faktörler)

- İskemi ve hipoksi
- Enfeksiyon
- Yabancı cisim
- Radyasyon
- Vasküler bozukluklar (ateroskleroz ve venöz yetmezlik)

2- Sistemik (Ekstrinsik faktörler)

-Sistemik vasküler hastalıklar

-Kronik hastalıklar (Diabetes mellitus, hepatik, renal, otoimmün ve hematolojik hastalıklar)

-Malnutrisyon

-Sistemik ilaç kullanımı (Steroidler gibi.)

-Alkolizm

-Sigara kullanımı

-Kemoterapi

Yara iyileşmesini bozan sistemik ve lokal faktörlerin bir kısmı aşağıda ele alınacak ve çalışmamızın konusu olan radyoterapi zemininde gelişen yaralar ve radyasyon hasarının etki mekanizmaları ayrı bir başlık altında incelenecektir.

ENFEKSİYON

Açık yaralar çevreden ve hastanın kendi florasından kaynaklanan mikroorganizmalarla kontaminasyona açıktırlar. “Kontaminasyon”, yarada çoğalmayan mikroorganizmaları ifade ederken, “kolonizasyon” ise yarada çoğalan mikroorganizmaların var olduğu anlamını taşır. Yara enfeksiyonu, doku ile bakteriyel yük arasındaki dengesizliği ve bunun sonucunda gelişen doku hasarını ifade eder (54). Bakteriyel enfeksiyon yara iyileşmesini birçok mekanizma ile olumsuz yönde etkiler. Yara bölgesindeki akut ve kronik inflamatuvar yük fibroblast proliferasyonunu ve ekstrasellüler matriks sentezini yavaşlatır. (23).

Gram doku başına 1000000 bakteri, yara enfeksiyonu için eşik değer olarak kabul edilir ve bu sayının üzerinde bakteri yara içerisinde kolonize olduğu zaman yara enfeksiyonundan söz edilebilir (55). Bu miktar plastik cerrahi açısından da önem arz etmektedir; çünkü bu sayının üzerinde bakteri ihtiva eden yaraların greft veya flep ile kapatılması uygun değildir (56).

Ateş, hassasiyet ve ağrı, eritem, ödem ve pürülan akıntı yara enfeksiyonuna işaret eden bulgulardır.

MALNUTRİSYON

Yara iyileşme süreci, ek kalori alımı gerektiren, anabolik bir süreçtir (57). Yanık gibi geniş yaralar metabolik tüketim hızını daha çok artırır ve kalori ihtiyacını artırır. Kronik protein düşüklüğü yara iyileşmesini ciddi derecede yavaşlatır. Kronik yarası olan hastaların kilo açısından yakından takibi, besin alımı, protein ve albümin değerlerinin takibi yapılmalıdır (58). Proteinler dışında B ve C vitaminleri de kollajenin hidroksilasyon ve çapraz bağ oluşumu aşamalarında yer aldıklarından kronik yara tedavisinde önemlidirler. Çinko, bakır ve magnezyum eksiklikleri de yara iyileşmesinde önemli yere sahiptir (59). A vitamini (retinoik asit)'in fibroplazi, kollajen sentezi, kollajen çapraz bağ oluşumu ve epitelizasyonda etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca steroidlerin neden olduğu yara iyileşme problemlerinde de A vitamininin etkili olduğu bilinmektedir (60).

DİABET VE OBEZİTE

Diabetik hastalarda yara iyileşmesi, birçok mekanizma ile bozulmuştur. Mikrovasküler hastalık, nöropati, majör vasküler tıkanıklıklar bilinen ana faktörlerdir. Diabetik hastaların yaklaşık % 30-60'ında arteriyel yetersizlik mevcuttur (61). Bazı çalışmalarda diyabetik hastalarda PDGF ve KGF düzeylerinin de düşmüş olduğu ve bunun da iyileşmeyi bozan faktörlerden biri olduğu ileri sürülmüştür (62). Obezite, diyabetten bağımsız olarak yara iyileşmesini bozar. Yaranın yetersiz perfüzyonu ve yağ dokusu nekrozu, diabetik ve diabetik olmayan obez hastalarda yara iyileşme bozukluğunun sebebi olarak görülmektedir (63).

KORTİKOSTEROİDLER

Hem topikal hem de sistemik steroid kullanımı yara iyileşme bozukluğuna sebep olur. İnflamasyon, kollajen sentezi ve yara kontraksiyonu kortikosteroid kullanımıyla bozularak yara iyileşme bozukluğuna sebep olur. Steroidlerin bu aşamaları hangi mekanizmayla bozduğu tam olarak bilinmemektedir. İnflamasyon fazının bozulması, yaranın bakteri direncini düşürerek enfeksiyonun ilerlemesine neden olur. Steroid kullananlarda PDGF ve KGF düşüklüğü görülür (64,65).

Steroidler lizozomal membranları stabilize ederek yara iyileşme sürecini yavaşlatırlar. Kortikosteroid kullananlarda vitamin A desteğinin yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (60).

KEMOTERAPİ

Yara iyileşmesinin proliferatif fazında, bilindiği gibi birçok hücre çoğalma evresindedir. Kemoterapötik ilaçlar en belirgin özellikleri olan antiproliferatif etki ile yara iyileşmesinin bu fazını engelleyerek yara iyileşmesini bozarlar. Bu nedenle birçok onkolojik cerrahi operasyon sonrası yara iyileşmesinin sorunsuz gerçekleşmesi amacıyla postoperatif 5-7 gün boyunca kemoterapi verilmez.

RADYOTERAPİ

Tarihçe

1895 yılında *Wilhelm Konrad Roentgen*, Crookes tüpünden elde ettiği ışıma sayesinde, 1896 yılında kemikleri bir plaka üzerinde fotoğraflayabileceği bir yöntem keşfetti. Bu icat, modern tıpta tanı ve tedavi aracı olarak radyasyon kullanımının yolunu açmış oldu. 1898'de *Curie*, ilk radyoaktif madde olan radyumu tanımlamış ve aynı yılda *Bequerel* radyoaktivite kavramını geliştirmiştir. 1896 yılında *J Daniel* tarafından ilk radyasyon dermatiti rapor edildi. Bunun üzerinden bir dekad geçmeden *Frieben* tarafından, bir teknisyenin elinde kronik maruziyet sonucu gelişen cilt kanseri rapor edildi. *Wolbach*, kronik radyasyon maruziyeti sonrası ortaya çıkan histolojik değişiklikleri göstererek radyasyon hasarına olan ilgiyi artırdı. 1909'da *Butlin* 2 oral kanser vakasında radyum uygulamasının tümörde anlamlı regresyon sağladığını gösterdi (100).

Takip eden 3 dekad boyunca araştırmacılar radyasyonun biyolojik etkilerini ve yarattığı sonuçları araştırdılar. Paterson ve Parker tarafından hazırlanan doz-süre şemaları ile radyasyonun terapötik etkisinin artırılması sağlandı. Coutard ve Strandqvist fraksiyone tedavi yöntemlerini geliştirdiler. Baclesse, tümörlerin merkezi kısımlarının radyasyona çok daha dirençli olduğunu gözlemledi ve radyoterapi süresinin 6-10 hafta olması gerektiğini ileri sürdü. Sonuçta Parker'ın günlük bölünmüş dozlarda verilen ve yaklaşık 5 hafta süren tedavi şeması geniş kabul gördü (101).

Süpervoltaj makinelerinin geliştirilmesiyle tümörün bulunduğu derinliğe yüksek doz radyasyonu ulaştırarak cildin mümkün olduğunca korunması amaçlandı. Bu teknik, cerrahi ve radyoterapinin kombine olarak ilerlemiş kanser tedavisinde kullanılmasını sağladı.

Preoperatif ve postoperatif radyoterapinin tümör üzerindeki etkilerini araştıran birçok çalışma ikisi arasında anlamlı fark olmadığını gösterdi. Fakat preoperatif radyoterapi

sonrası komplikasyonların, postoperatif radyoterapiye göre daha fazla olduğu bilinmektedir (102).

Bu nedenle radyoterapinin doku ve yara iyileşmesi üzerine etkilerinin çok daha iyi anlaşılması ve bu etkileri önleyecek tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi hala araştırmaya açık bir alan olarak varlığını korumaktadır.

Radyoterapi Yöntemleri

1895'te Roentgen'in X-Ray ışınlarını icadı ve 1898'de Curie'ler tarafından yapılan radyumun keşfinden sonra radyoterapi yöntemleri sürekli olarak geliştirilmiştir. Erken dönemde aşırı yüksek dozlarda verilen radyasyonun neden olduğu ciddi yan etkiler fraksiyone radyoterapinin bulunmasıyla azaltılmaya çalışılmıştır. Fraksiyone radyoterapi daha iyi tümör kontrolü sağladığı gibi, dozlar arasındaki sürelerde normal dokuların iyileşmesine de fırsat vermektedir.

Eksternal radyoterapi günümüzde lineer hızlandırıcılar tarafından verilmekte, bu yöntemle radyasyonun derin dokulara daha etkili ulaşması sağlanmakta ve cilt üzerindeki olumsuz etkileri azaltılmaktadır. Bilgisayar ve görüntüleme yöntemlerinin geliştirilmesi ve radyasyon ışınlarının hedefe daha iyi ulaşmasını sağlayan stereotaktik sistemlerle normal dokuların daha fazla korunması amaçlanmaktadır (68).

İnternal radyoterapi (brakiterapi) tümörlü alan içerisine direkt olarak radyasyonun ulaştırılmasını sağlar. Prostat kanserlerinde, yumuşak doku sarkomlarında, meme ve serviks kanserlerinde kullanılmaktadır (66).

Radyoterapi'nin Etki Mekanizması

Radyoterapi kanserli hücreleri öldürürken, sağlıklı hücreler ve dokular üzerinde de akut ve kronik etkilere neden olmaktadır. En önemli komplikasyonlarından biri yara iyileşme bozukluğudur. Radyoterapinin erken dönem etkileri; eritem, kuru deskuamasyon, hiperpigmentasyon ve kıl folikülü kaybıdır. Geç dönem etkileri ise, cilt atrofisi ve cilt kuruluğu, telanjiektazi, pigmentasyon bozuklukları, fibrozis ve iyileşmeyen yaralar olarak sıralanabilir (67). Radyasyonun meydana getirdiği yan etkilerin derecesi ışınlanan vücut bölgesinin radyasyon sensitivitesine, ışınlanan normal doku hacmine, toplam doza ve doz birikimine bağlıdır.

Radyasyonun erken etkileri sonucunda yara iyileşmesinin inflamatuvar ve proliferatif evresindeki olayların normal akışı bozulur. Radyoterapi olumsuz etkisini daha çok hızlı çoğalan hücreler üzerinde göstermektedir. Cilt, mukoza ve kemik iliği en çok etkilenen dokulardır (68) . Radyasyonun yan etkileri irradiye organların hücrelerindeki direkt hücre ölümüne, radyasyonun küçük kan damarları üzerindeki etkisine ve inflamatuvar süreçlerde ve onarım süreçlerinde meydana gelen etkilere bağlı olabilir.

Cilt tüm eksternal radyoterapilerin maruziyet sahasında bulunduğundan tüm gelişmelere rağmen radyasyondan en çok etkilenen dokulardan biridir.

Erken Etkiler

Radyasyon, hasarlı DNA, protein ve hücre membranlarının sebep olduğu apoptotik hücre ölümüne neden olur. Radyasyon hasarı zemininde meydana gelen apoptotik hücre ölümü, hayvan modellerinde daha erken ortaya çıkmaktadır (68). Endotelial hücrelerde de aynı etkilerin meydana gelmesi, vasküler endotelial hasara ve tromboza zemin hazırlar.

Meydana gelen akut inflamatuvar cevap TNF- α , IL-1, IL-8 ve INF- γ sentezine neden olur. Bu sitokinlerin kısa yarılanma ömrü ve anti inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle (TGF- β , IL-4, IL-10 ve IL-13) inflamasyon sonlanır. Ancak radyasyonu takiben meydana gelen inflamatuvar süreç, pro-inflamatuvar sitokinlerin yoğunluğu nedeniyle tam olarak çözülmez (69).

Nitrik oksit (NO), fibroblastlar ve makrofajlar tarafından salınır, kollajen birikimini indükler. Hayvan modellerinde radyasyon zemininde oluşan yaralarda NO'nun azalmış olduğu gösterilmiştir (70). TNF- α ve IFN- γ gibi radyasyon sonucu artan faktörlerse kollajen birikimini engelleyici yönde hareket ederler. Tüm bunların sonucunda, iradiye edilmiş bir yarada erken dönemde gerekli olan kollajen birikimi yetersiz kalır.

Radyasyon hasarı sonrası re-epitelizasyon bazal membranın hasarına bağlı olarak gecikmeye uğrar. Granülasyon dokusu gelişimi aynı şekilde gecikmiştir ve radyasyon hasarı olmayan dokuya göre daha etkisizdir. Radyasyon hasarı sonrası yarada MMP-1 düzeyleri azalmıştır; hücre göçü, angiogenez ve doku rejenerasyonu buna bağlı olarak azalır.

Geç Etkiler

Radyoterapinin geç etkileri, nekroz, atrofi, fibrozis, vasküler hasar ve karsinogenez olarak sıralanabilir. Ekstrasellüler matriks içeriği radyasyon sonrasında değişen TGF- β

düzeyleri, mast hücre aktivasyonu, hasarlı fibroblastlar ve mikrovasküler hasar nedeniyle değişmiştir. Radyasyon maruziyeti olan alanlarda matriks metalloproteinazların yıkımından kaynaklanan yüksek miktarda kollajen tip 1 birikimi mevcuttur (71).Radyasyon maruziyeti olan alanda meydana gelen mikrovasküler hasar, iskemiye, fibrozise, nekroza ve atrofiye neden olur. Mikrovasküler hasar, radyasyonun uzun dönem etkilerinin oluşmasında temel faktör olarak kabul edilse de, kimi çalışmalar radyasyon hasarında dokuda hipoksisi olmadığını göstermiş (72) ve uzun dönem etkilerin fibroblastlarda meydana gelen kalıcı hasardan kaynaklanma ihtimalini düşündürmüştür. İrradiye fibroblastlar fonksiyonel olarak anormaldirler; bir çalışmada normal sinjenik fibroblastların radyasyon yarasına enjeksiyonu sonrasında normal yara iyileşmesi gözlenmiştir (73). Radyasyon sonrası uzun dönem etkilerin en önemlilerinden biri de reaktif fibrozistir. Daha önce bahsedildiği gibi artmış TGF- β sentezi, fibroblastlar ile MMP'lar arasındaki bozulmuş ilişki, reaktif fibrozisin temel nedenleridir. TGF- β 1, radyasyona bağlı fibrozisin temel sorumlusu olarak düşünülmüştür. (74).

Radyasyon Yaralarının Tedavisinde Güncel Deneysel Araştırmalar (67)

Tablo 1: Radyasyon yaralarının tedavisinde kullanılmış yöntemler.

Pansumanlar	Hücre Enjeksiyonları	Topikal Ajanlar	Büyüme Faktörleri
Hidrojel Membranlar	Sağlam fibroblastlar	Polifenolik bioflavonoidler	TGF- β (1,2,3)
Bakteriyel Sellüloz	Dermis kökenli multipotent hücreler	Fenilbutirat, valproik asit, askorbik asit	PDGF
Gümüş Nanopartiküller	Adipoz kök hücreler	Transglutaminazlar	Rekombinant hEGF
Deri Alogreftleri		Bakır tripeptidler	M-CSF
		Trombin reseptör aktive edici peptid	G-CSF
			FGF, VEGF

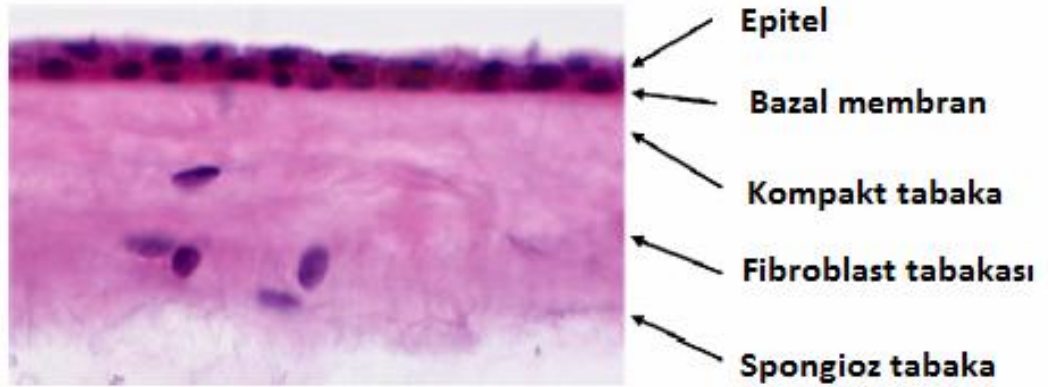
Amniyotik Membran

İnsan amniyotik membranı yaklaşık 100 yıldır problemli yara tedavilerinde kullanılmaktadır. Amniyotik membranın antibakteriyel ve antienflamatuar özellikleri onu yara tedavisinde kullanılabilecek doğal bir tedavi seçeneği olarak sunmaktadır. Son yüzyılda yanıklar, venöz ülserler, korneal ülserler, ortopedik ameliyatlar ve bazı diğer problemli yaraların tedavisinde denenmiştir.

Amniyotik Membranın Özellikleri ve Etki Mekanizmaları

Anatomi ve Histoloji

Amniyotik membran fetal membranların en iç tabakasını oluşturur. Kalınlığı 0,02-0,5 mm olan amniyotik membran 5 tabakadan oluşur; tek sıralı epitel tabakası (amniyotik sıvı ile temas halindedir), bu epitel tabakasının tutunduğu bazal membranın dışında, kompakt tabaka, fibroblast tabakası ve spongiyöz tabaka adı verilen 3 hücre sırası daha bulunur. Amniyotik membran vasküler yapı içermeyen translusent bir tabakadır (75).



Resim 1: Amniyotik membranın histolojik görünümü.

Epitelizasyon İndükleme Özelliği

Amniyotik membran, bir tür bazal membran görevi görerek, epitelizasyonun tetiklenmesinde rol oynar. Bu etkinin temel sebebi epitelyal hücrelerin büyümesini indükleyen büyüme faktörlerinin üretimidir. (EGF, KGF, bFGF gibi.) (76) Amniyotik membran, aynı zamanda apoptozisi önleyici etkisi ile (77) özellikle apoptozisi indükleyici etkisi olan radyasyonun etkilerini tersine döndürme özelliğine sahip olabilir.

İmmünojenite

Başlangıçta amniyotik membran üzerinde herhangi bir HLA antijeninin olduğu gösterilememiştir. Ancak daha sonraki çalışmalar amniyotik membranın epitelyal, mezenkimal hücrelerinde ve fibroblastlarında HLA antijenleri ile birlikte, immun baskılayıcı bir faktör olan CD 59 olduğunu göstermiştir (78). Bu özellikleri ile amniyotik

membran immunolojik açıdan ayrıcalıklı bir yapıdır. Yapılan çalışmalarda doku reddine rastlanmamıştır.

Antienflamatuar ve Anjiogenik Etki

Amniyotik membranın antienflamatuar etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, aktivin üretiminin düzenlenmesi, içerdiği laktoferrin ve IL-1 reseptör antagonistleri ve IL-10 gibi antienflamatuar sitokinlerin, amniyotik membranın antienflamatuar etkisinin temelini oluşturduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca IL-1 α , IL-1s gibi yüksek potentli proenflamatuar sitokinlerin üretimlerinin de amniyotik membran ile baskılandığı görülmüştür (79).

Amniyotik membranın anjiogenik etkisi birçok çalışmada gösterilmiş, ancak bir kısmında tartışmalı bulunmuştur. Faulk ve ark. Kronik bacak ülseri olan 15 hastada yaptıkları çalışmada, kronik bacak ülserlerini amniyotik membran ile sarıp, 5. günde yaptıkları biyopsiler neticesinde anlamlı derecede damar proliferasyonu olduğunu ileri sürmüşlerdir (75). Bir başka çalışmada ise vestibüloplastilerde uygulanan liyofilize amniyotik membranların vaskülarizasyonu incelenmiş ve amniyotik membranın anlamlı derecede vaskülarizasyonu artırdığı gösterilmiştir (80).

Antimikrobiyal Aktivite

Daha önce birçok çalışmada amniyotik membranın antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Robson'ın 50 sıçanla yaptığı bir çalışmada, sıçanlarda oluşan bir yanık modeli üzerine *Pseudomonas Aeruginosa* inoküle edilmiş ve 96. saatte yapılan bakteri sayımında, amniyotik membranlı gruptaki bakteriyel aktivite, deri greftli ve greftsiz yaralardakine göre daha düşük bulunmuştur (75). Ayrıca amniyotik membran antiviral özelliği bulunan ve sistein proteinaz analogu olan Sistatin E içermektedir (81). Daha önce bahsedilen antienflamatuar özellikleri de antimikrobiyal aktivitesine katkı sağlamaktadır.

Analjezik Etki

Amniyotik membranın yaralara uygulandığı klinik çalışmalarda ağrının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Bu etkinin, amniyotik membranın yaranın tamamına yapışması ve açığa çıkan sinir uçlarını kapatması sonucunda ortaya çıktığı düşünülmüştür (82).

Amniyotik Hücrelerin Pluripotent Özellikleri

Amniyotik hücrelerin pluripotent (her üç germ tabakasının hücrelerine dönüşebilme) özelliği olduğu, bu nedenle doku transplantasyonu ve doku mühendisliğinde kullanışlı olabileceği belirtilmiştir. Bu hücreler her üç germ tabakasının (endoderm, mezoderm, ektoderm) hücrelerine dönüşebilirler. Son yıllarda yapılmış olan bir çalışmada, embriyonik hücrelerde gösterilmiş olan stage-spesific embriyonic antigen 3 ve 4, TRA-1-60, ve TRA-1-81 gibi yüzey belirteçleri, amniyotik membran hücreleri üzerinde de gösterilmiştir (83).

Yukarıda bahsedilen özellikleri nedeniyle, daha önce oftalmolojide (korneal ülserler, konjunktiva rekonstrüksiyonu, glokom cerrahisi ve komplikasyonlarında), venöz ülserlerde, oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan amniyotik membranın, problemlili bir yara türü olan ve plastik cerrahi açısından önem arz eden radyasyon yaralarında etkili olabileceği düşünülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Amniyotik membranın radyasyon yaraları üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlayan çalışmamız İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan ve İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan etik kurul onaylarında belirtilen şartlara uygun olarak Cerrahpaşa Tıp Fakültesi bünyesindeki deneysel çalışma laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmamızda kullanılan, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, Wistar-Albino türü 16 adet dişi sıçan, İstanbul Üniversitesi Deneysel ve Tıbbi Araştırmalar Enstitüsü'nden temin edildi.

Sıçanlar her kafeste 1 hayvan olacak şekilde, 21-22° C oda sıcaklığında, 12 saat gündüz / 12 saat gece fotoperiyodunda, %18-20 protein içeren pellet sıçan yemi ve içme suyu sağlanan 16 adet polikarbonat kafeste tutulmuştur.

16 adet sıçandan 3 grup oluşturuldu. Grup 1'deki 8 sıçanın (Sham grubu) sağ kalçalarına radyasyon verilmeksizin 2 cm'lik insizyon yapılmasını takiben, insizyonlar primer suture edildi. Diğer 8 sıçanın sağ kalçaları Grup 2, sol kalçaları Grup 3 kabul edildi. Grup 2'ye (yani radyasyon verilen sıçanların sağ kalçalarına), 2 cm'lik insizyon yapılarak primer sütürasyon uygulandı. Grup 3'e (yani radyasyon verilen hayvanların sol kalçalarına) ise 2 cm'lik insizyon oluşturulmasını takiben, cilt flepleri dekole edilerek 2 x 2 cm genişliğindeki bir alana, kas fasyasının üzerine oturacak şekilde amniyotik membran yerleştirildi.

Grup	Yapılan İşlem
1 (8 sıçan,Sham grubu)	Radyasyon verilmeksizin, sağ kalçaya 2 cm'lik insizyon yapılmasını takiben, primer sütürasyon uygulanması
2 (diğer 8 sıçanın sağ kalçaları)	18 Gy radyasyon verilmesini takiben 2cm'lik insizyon uygulanması ve primer sütürasyon
3 (diğer 8 sıçanın sol kalçaları)	18 Gy radyasyon verilmesini takiben 2 cm'lik insizyon uygulanması, cilt fleplerinin 2x2 cm alan oluşturacak şekilde dekole edilmesi, kas fasyasının üzerine oturacak şekilde amniyotik membran yayılması, primer sütürasyon

Tüm invazif işlemler ve radyoterapi sırasında anestezi için intraperitoneal 35-40 mg/kg ketamine (Ketalar®) ve 10 mg / kg Xylasine (Rompun®) enjeksiyonu uygulandı. İnvazif işlemlerde lokal asepsi kurallarına uygun işlem yapıldı.

Radyoterapi

Deneklerde radyoterapi işlemi, Ferguson ve ark. tarafından tariflenen yönteme uygun olarak gerçekleştirilmiştir (73). 8 adet sıçana, intraperitoneal 35-40 mg/kg ketamine (Ketalar®) ve 10 mg / kg Xylasine (Rompun®) enjeksiyonununu takiben, Kobalt 60 radyoterapi cihazı vasıtasıyla (Cirus,Cis-Bio,Int-France), her iki kalça bölgesini içerecek şekilde, 18 Gy radyoterapi uygulandı.



Resim 2: Kobalt 60 cihazı ve anestezi sonrası sıçanın radyoterapi için pozisyonlanması

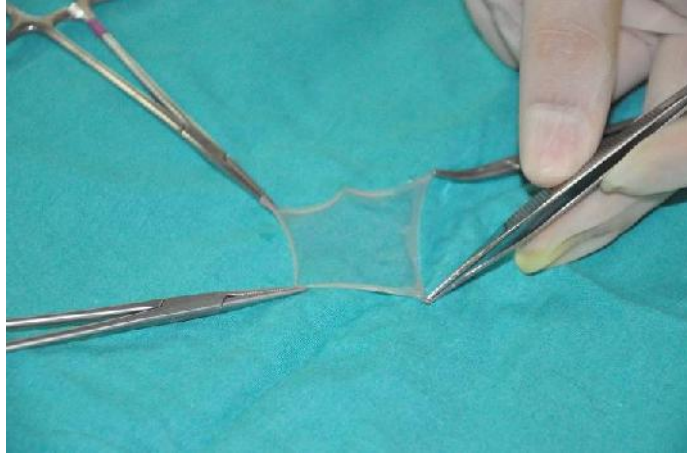
Amniyotik Membran Elde Edilmesi ve Hazırlanışı

İnsan amniyotik membranı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı doğumhanesinde gerçekleştirilen, Hepatit B, Hepatit C ve HIV açısından seronegatif olan hastaların elektif sezaryen operasyonlarında, steril koşullarda alınan plasentalarından elde edilmiştir. Plasentalar serum fizyolojik solüsyonu içerisine konularak steril koşullarda deney ortamına taşınmıştır.

Koryon ve amniyotik membranı içeren fetal membranlar öncelikle plasentadan ayrıldı ve daha sonra amniyotik membran ve koryon ayrıştırıldı. Elde edilen amniyotik membran, % 10'luk sodyum hipoklorit solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Sodyum hipokloritin temizlenmesi amacıyla yeniden salin solüsyonu ile irrigasyon uygulandı. Penisilin ve tobramisin flakonları serum fizyolojik ile sulandırılarak, amniyotik membran bu solüsyonda 10 dakika bekletildi. Daha sonra tüm partikülleri giderecek şekilde yeniden serum fizyolojik ile irrigasyon uygulandı. Bu işlemlerin ardından amniotik membran kullanıma hazır hale getirildi.



Resim 3: Fetal membranların plasentadan ayrılması ve koryon ile amniyotik membranın ayrılması.



Resim 4: Kullanıma hazır hale getirilmiş amniyotik membran.

Cerrahi İşlem

Radyoterapiden 3 hafta sonra cerrahi işlem aşamasına geçildi.

Grup 1 (Sham)'deki 8 adet sıçana, intraperitoneal 35-40 mg/kg ketamine (Ketalar®) ve 10 mg / kg Xylasine (Rompun®) enjeksiyonununu takiben sağ kalça bölgelerine 2 cm'lik tam kat (kas fasyasına kadar) insizyon uygulandı. Bu yara modeli, Sugiyama ve ark. Tarafından tanımlanan yara modelidir (84). İnsizyonu takiben, herhangi bir ek işlem uygulanmaksızın, 5/0 polipropilen dikiş ile basit sutur tekniğine uygun olarak yaralar kapatıldı.



Resim 5: Sağ kalça bölgesine yapılan 2 cm'lik tam kat insizyon ve primer kapama.

Diğer 8 sıçana, intraperitoneal 35-40 mg/kg ketamine (Ketalar®) ve 10 mg / kg Xylasine (Rompun®) enjeksiyonu ile anestezi uygulandı. Grup 2'yi oluşturacak olan sağ kalçalarına 2 cm'lik tam kat insizyon uygulandı. Ek işlem yapılmaksızın, 5/0 polipropilen dikiş ile basit sütür tekniğine uygun olarak insizyonlar kapatıldı. Grup 3'ü oluşturacak sol kalça bölgelerine ise 2 cm'lik tam kat insizyon yapıldı. Cilt flepleri kas fasyası üzerinden dekole edildi. Cilt altında yaklaşık 2 x 2 cm 'lik alan oluşturuldu. Bu alanın üzerine tek kat olmak üzere yayılacak şekilde daha önce hazırlanan amniyotik membranlar yerleştirildi. Takiben insizyonlar 5/0 polipropilen dikiş ile basit sütür tekniğine uygun olarak kapatıldı.



Resim 6: Cilt altında oluşturulan 2 x 2 cm'lik alan ve yerleştirilecek olan amniyotik membran

Cerrahi işlemi takiben 3 hafta sonra sıçanların tümü yüksek doz barbitürat marifetiyle kurban edildi.

Tüm yara bölgeleri, insizyon hatları merkezde kalan 3x3 cm'lik dairesel alanlar şeklinde ve kas fasyası ve bir miktar kas dokusunu da içerecek bloklar halinde çıkarıldı.

Histopatolojik inceleme amacıyla dairesel blokların orta kısımları 22 numara bistüri ile blok olarak ayrıldı. Kalan kısımlar biyomekanik inceleme amacıyla kullanılmak üzere alındı. Parçaların tümü 1 cm genişliğinde olacak şekilde kesildi.



Resim 7: 3x3 cm'lik alanlar blok halinde çıkarıldı. Orta kısımları histopatolojik inceleme için, kalan kısımları ise biyomekanik ölçüm için ayrıldı.

Biyomekanik Ölçüm

Yara kopma kuvveti, iyileşen bir yaranın açılmasına neden olan kuvveti ifade eder. Sıçanların kalça bölgelerinden doku bloklarının çıkarılmasının ardından, biyomekanik ölçüm için ayrılan parçalar, yara kopma kuvveti ölçümü amacıyla manuel olarak hazırlanmış bir düzleme yerleştirildi. Bu düzlemde insizyon hattına perpendiküler yönde kuvvet uygulandı. Altan çekim kuvveti uygulayan yük, sabit akımlı serum fizyolojik ile sağlandı. Yara kenarları ayrıldığı anda, kopmaya sebep olan sıvı miktarı kaydedildi.



Resim 8: Yara kopma kuvveti ve kopmaya sebep olan sıvı miktarının ölçümü.

Histopatolojik Çalışma

Histokimya Yöntemleri

Çıkarılan doku bloklarının orta kısımları histopatolojik inceleme için alındı. Fiksator olarak %4'lük nötral tamponlanmış formol kullanıldı. Dokular fikse edildikten sonra akan çeşme suyu altında 4 saat bırakıldı. Ardından sırasıyla %70, %80, %90, %96, %100 yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Toluol içerisinde şeffaflaştırıldıktan (doyurulduktan) sonra parafin içerisinde bekletildi ve gömme işlemi gerçekleştirildi. Mikrotom ile 5µ kalınlığında kesitler alındı. Işık mikroskopik incelemeler için doku kesitlerine Hematoksilen + Eozin (H + E) boyası yapıldı.

Hematoksilen + Eozin

Hematoksilen + Eozin boyası için alınan kesitler 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün toluol yardımı ile kesitler üzerindeki parafin uzaklaştırıldı. Kesitler, azalan alkol serisinden (100°, 96°, 90°, 70°) geçirildi ve saf suya alındı. Ardından Hematoksilen'de 17 dakika bekletilerek hücre çekirdekleri boyandı. Çeşme suyunda 10 dakika morartma yapıldı ve %1'lik asit alkolde çabucak çalkalanıp tekrar çeşme suyunda 10 dakika morartma yapıldı. %1'lik lityum karbonat çözeltisi içerisinde 1 dakika mavileştirme yapıldı. Ardından sitoplazmayı boyamak için kesitler 3 dakika eozin boyasında bekletildi. Artan alkol serisinden (70 °, 90°, 96°, 100 °) geçirilen kesitler toluolde ikişer kez 15'er dakika bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

Masson'un Üçlü Boyası

Kollajen dağılımını saptamak amacıyla Masson'un üçlü boyası kullanıldı. Yara iyileşme alanlarının hesaplanmasının ardından kollajen dağılımı skorlaması yapıldı.

Histopatolojik Parametreler

Histopatolojik incelemede, yara kontraksiyonlarının kıyaslanması amacıyla, yara iyileşme alanları mikron kare cinsinden hesaplanarak kaydedildi. Epitel kalınlıkları yine mikron cinsinden hesaplanarak kaydedildi. İyileşme alanlarındaki vaskülarizasyon artışını kıyaslamak amacıyla bu alanlarda damar sayımı yapıldı. Kollajen dağılımını kıyaslamak amacıyla, iki araştırmacı tarafından 0-300 arasında skorlama yapıldı.

İstatistiksel Yöntem

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan, minimum-maksimum değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Smirnov testi ile kontrol edildi. Değişkenlerin varyanslarının homojenliği kontrol edildi. Niceliksel verilerin analizinde ANOVA, alt analizlerde Tukey test, Tamhane's T2 test kullanıldı. Analizlerde SPSS 21.0 programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

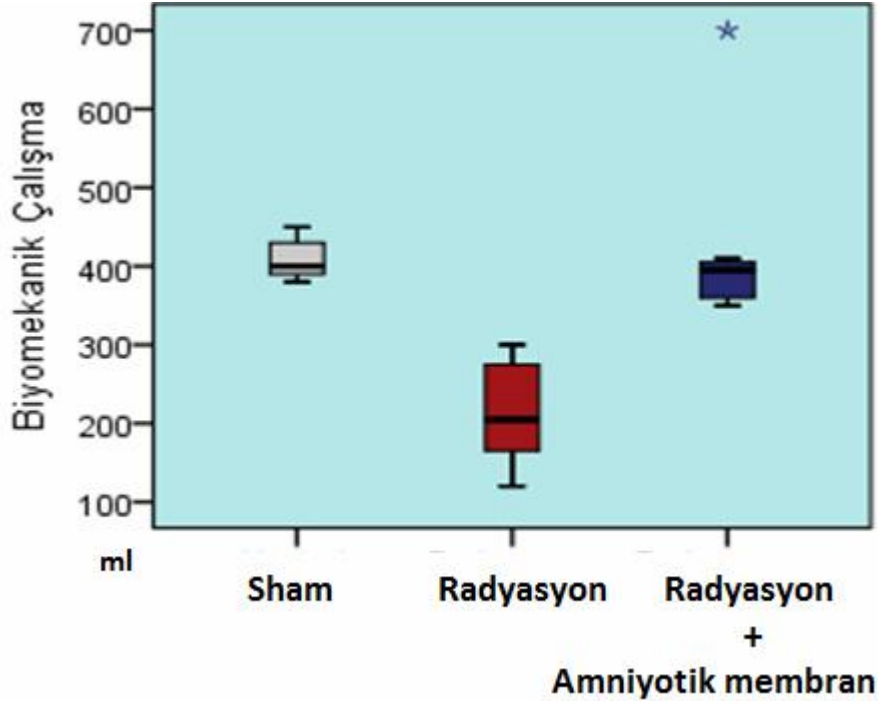
Biyomekanik Çalışma

Tablo 2: Biyomekanik çalışma istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.

		Sham	Radyasyon	Radyasyon+Amniyon	p
Biyomekanik Çalışma	Ort.±s.s.	408,8 ± 25,9*	213,8 ± 65,9	421,3 ± 114,8*	0,000
	Med(Min-Mak)	400 380 - 450	205 120 - 300	395 350 - 700	

ANOVA (Tukey / Tamhane) / * Radyasyon grup ile fark p<0,05 / ≠ Radyasyon+AMniyon grup ile fark p<0,05

Radyasyon grubunda biyomekanik çalışma değerleri Sham ve radyasyon + amniyon gruplarından anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha düşüktü. Sham ve radyasyon+ amniyon gruplarından biyomekanik çalışma değerleri anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 2)



Grafik 1: Biyomekanik çalışma istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması. Amniyotik membran grubu ile sadece radyasyon grubunun yara kopma kuvveti farklılıkları görülüyor.

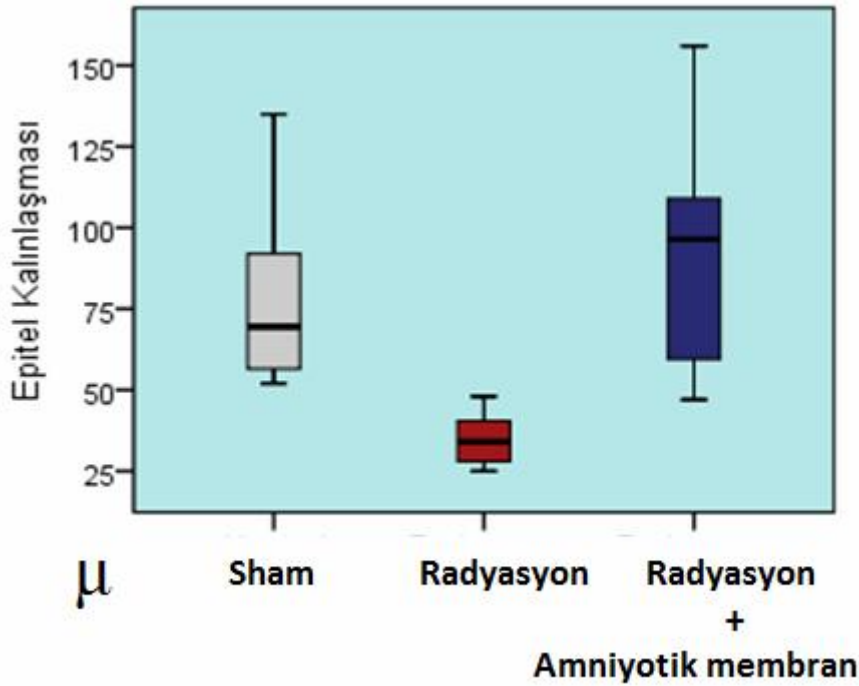
Histopatolojik Çalışma

Epitel Kalınlığı

Tablo 3: Epitel kalınlığı ölçümlerinin istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.

		Sham	Radyasyon	Radyasyon+Amniyon	p
Epitel	Ort.±s.s.	77,9 ± 27,8*	34,8 ± 8,0	91,6 ± 36,3*	0,001
Kalınlaşması	Med(Min-Mak)	70 52 - 135	34 25 - 48	97 47 - 156	
ANOVA (Tukey / Tamhane) / * Radyasyon grup ile fark p<0,05 / ≠ Radyasyon+AMniyon grup ile fark p<0,05					

Radyasyon grubunda epitel kalınlaşma değerleri Sham ve radyasyon+ amniyon gruplarından anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha düşüktü. Sham ve radyasyon+ amniyon gruplarından epitel kalınlaşma değerleri anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir (Tablo 3)



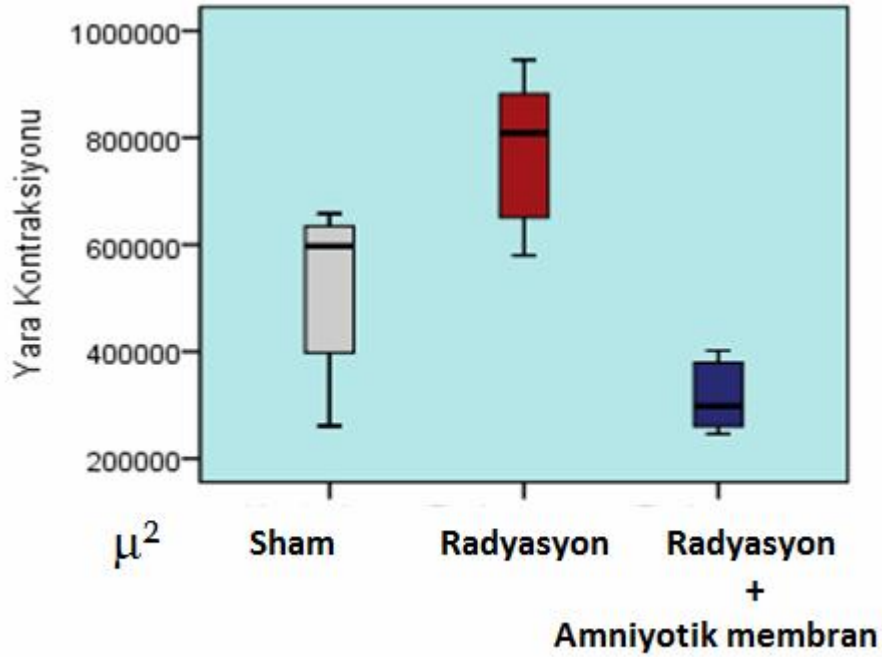
Grafik 2: Epitel kalınlaşması ölçüm sonuçlarının istatistiksel karşılaştırılması. Amniyotik membran grubu ile radyasyon grubu arasındaki farklılık görülüyor.

Yara Kontraksiyonu

Tablo 4: Yara kontraksiyonu ölçümlerinin istatistiksel karşılaştırılması.

	Sham	Radyasyon	Radyasyon+Amniyon	p
Yara	Ort.±s.s.	522386 ± 150968*#	776108 ± 134678	315455 ± 63777*
Kontraksiyonu	Med(Min-Mak)	597018 261141 - 658345	808726 579875 - 945821	297701 245824 - 401784
ANOVA (Tukey / Tamhane) / * Radyasyon grup ile fark p<0,05 / # Radyasyon+AMniyon grup ile fark p<0,05				

Radyasyon grubunda yara kontraksiyon değeri Sham ve radyasyon+ amniyon gruplarından anlamlı (p < 0,05) olarak daha yüksekti. Radyasyon+amniyon grubunda yara kontraksiyon değeri Sham grubundan anlamlı (p < 0,05) olarak daha düşüktü. (Tablo 4)



Grafik 3: Yara kontraksiyonu ölçümlerinin istatistiksel karşılaştırılması. Amniyotik membran grubunda yara iyileşme alan ölçümlerinin daha küçük olduğu (yara kontraksiyonunun daha fazla olduğu) görülüyor.

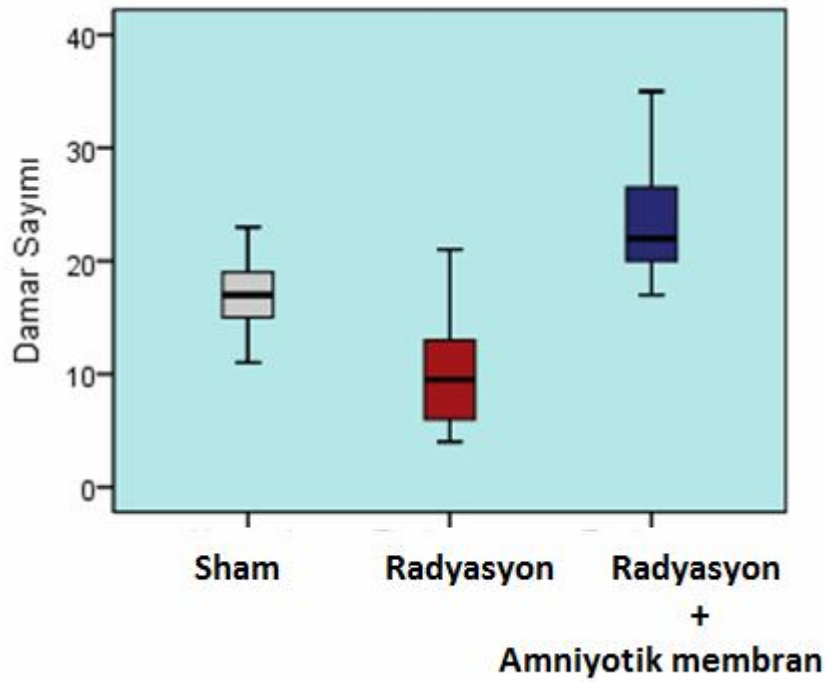
Vaskülarizasyon Artışı

Tablo 5: Yara iyileşmesi alanlarındaki damar sayımı istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması.

		Sham	Radyasyon	Radyasyon+Amniyon	p
Damar Sayımı	Ort.±s.s.	17,0 ± 3,6* [‡]	10,3 ± 5,6	23,6 ± 5,8*	
	Med(Min-Mak)	17 11 - 23	10 4 - 21	22 17 - 35	0,000

ANOVA (Tukey / Tamhane) / * Radyasyon grup ile fark p<0,05 / [‡] Radyasyon+AMniyon grup ile fark p<0,05

Radyasyon grubunda damar sayımı değeri Sham ve radyasyon+ amniyon gruplarından anlamlı (p < 0,05) olarak daha düşüktü. Radyasyon+amniyon grubunda damar sayımı değeri Sham grubundan anlamlı (p < 0,05) olarak daha yüksekti. (Tablo 1)



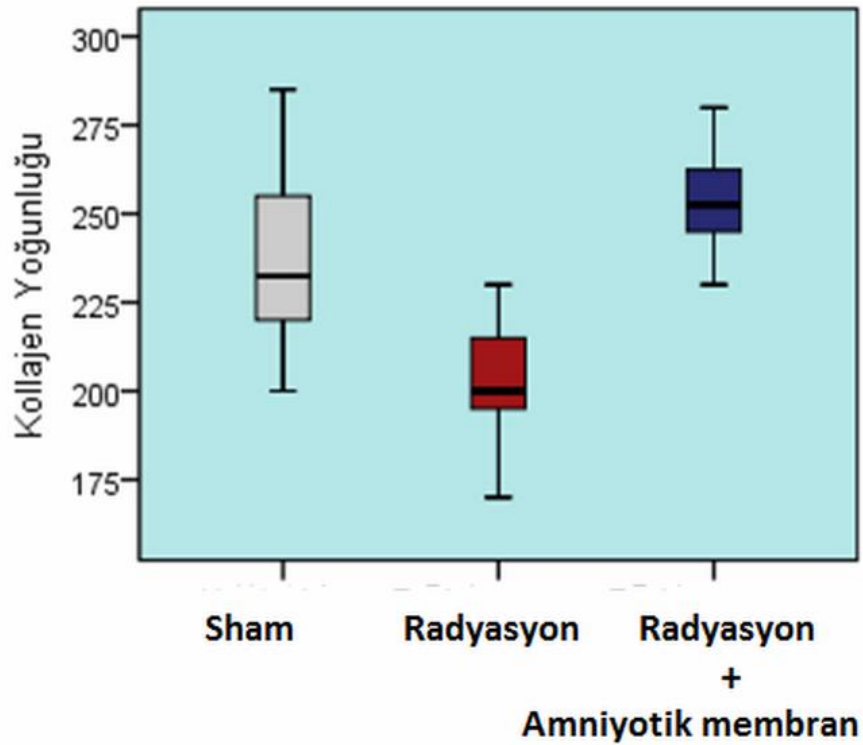
Grafik 4: Yara iyileşme alanlarındaki damar sayımı istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması. Amniyotik membran grubunda belirgin vaskülarizasyon artışı görülüyor.

Kollajen Yoğunluğu

Tablo 6: Yara iyileşme alanlarındaki kollajen yoğunluğu skorlamalarının istatistiksel karşılaştırılması.

		Sham	Radyasyon	Radyasyon+Amniyon	p
Kollajen	Ort. ± s.s.	237,5 ± 26,7*	202,5 ± 18,3	253,8 ± 15,8*	
Yoğunluğu	Med(Min-Mak)	233	200	253	0,000
ANOVA (Tukey / Tamhane) / * Radyasyon grup ile fark p<0,05 / ≠ Radyasyon+AMniyon grup ile fark p<0,05					

Radyasyon grubunda kollajen yoğunluğu değerleri Sham ve radyasyon+ amniyon gruplarından anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha düşüktü. Sham ve radyasyon+ amniyon gruplarından kollajen yoğunluğu değerleri anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir. (Tablo 6)



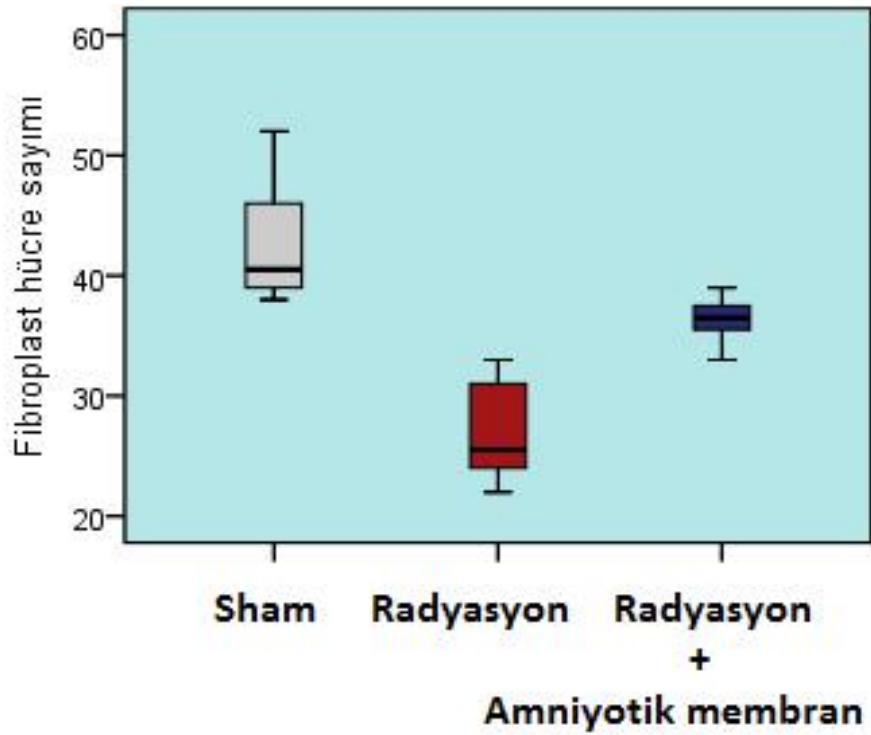
Grafik 5: Yara iyileşme alanlarındaki kollajen yoğunluğu skorlarının istatistiksel sonuçlarının karşılaştırılması. Amniyotik membran grubunda kollajen yoğunluğu artışı görülüyor.

Fibroblast Hücre Sayımı

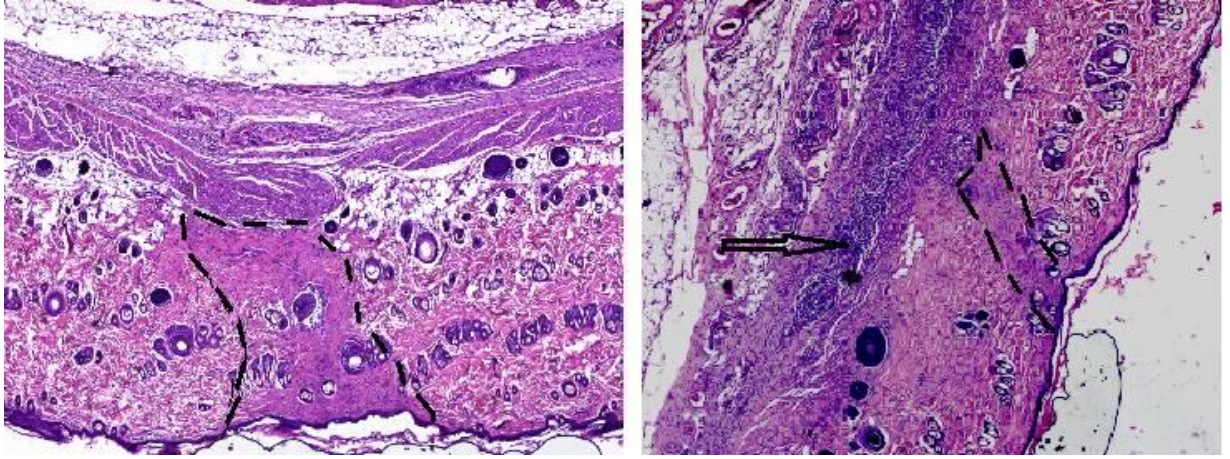
Tablo 7: Yara iyileşme alanlarındaki fibroblast hücre sayımlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Fibroblast	Ort.±s.s.	42,6 ± 5,0* [‡]	27,0 ± 4,1	36,4 ± 1,8*	
hücre sayısı	Med(Min-Mak)	41	26	37	0,000
		38 - 52	22 - 33	33 - 39	
ANOVA (Tukey / Tamhane) / * Radyasyon grup ile fark p<0,05 / [‡] Radyasyon+AMniyon grup ile fark p<0,05					

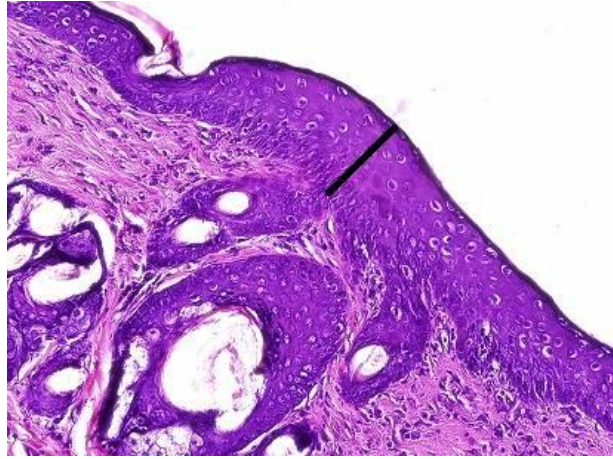
Radyasyon grubunda yara fibroblast hücre sayısı kontrol ve radyasyon+ amniyon gruplarından anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha düşüktü. Radyasyon+amniyon grubunda fibroblast hücre sayısı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha düşüktü.



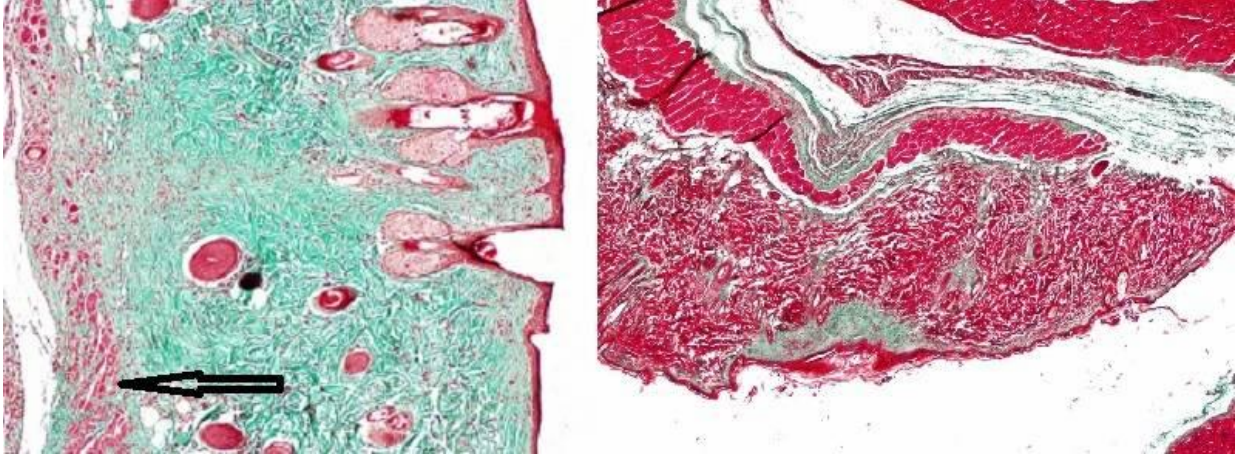
Grafik 6: Yara iyileşme alanlarındaki fibroblast hücre sayımının istatistiksel karşılaştırılması. Amniyotik membran grubunda, radyasyon grubuna göre anlamlı artış görülüyor.



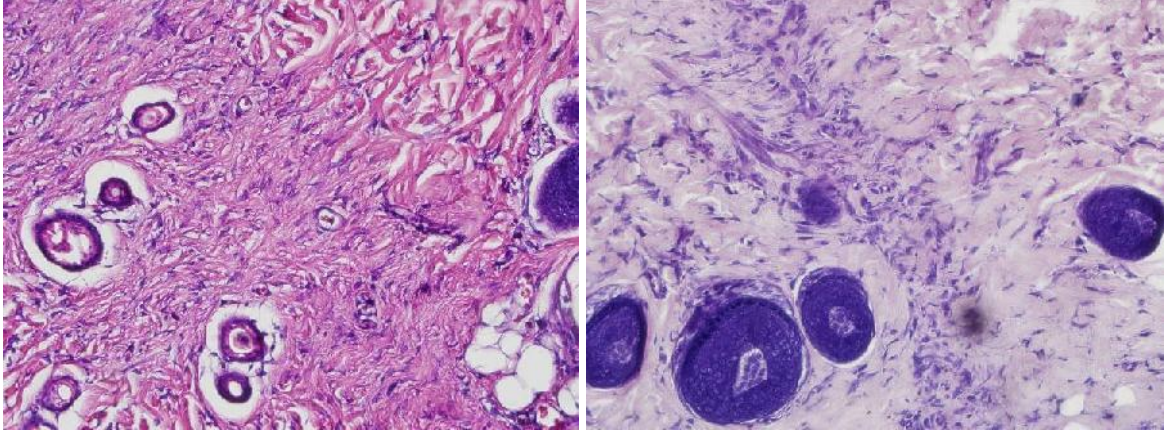
Resim 9: Yara iyileşme alanlarının ölçümü. Amniyotik membranlı grupta yara kontraksiyonunun daha fazla olduğu görülüyor. (Sağ). Amniyotik membran, kas ile subkutan yağlı doku arasında izleniyor. (Kalın ok). (Hematoksilen-Eozin, 4X)



Resim 10: Hematoksilen-Eozin boyasıyla 20 X büyütmede epitel kalınlığının ölçülmesi. Tüm piyeslerde epitelin en kalın yeri mikron olarak ölçülerek kaydedildi. (Hematoksilen-Eozin, 20X)



Resim 11: Masson trikrom boyası ile yara iyileşme alanlarında kollajen miktarının gösterilmesi. Amniyotik membranlı grup (sol) ile amniyotik membransız grubun (sağ) karşılaştırılması. Ok işareti amniyotik membranı gösteriyor. (Masson trikrom, 4X)



Resim 12: Hematoksilen-eozin boyası ile vaskülarizasyon artışının karşılaştırılması. Amniyotik membran grubunda (sol), radyasyon grubuna göre (sağ) belirgin vaskülarizasyon artışı görülüyor. (Hematoksilen Eozin, 4X)

5. TARTIŞMA

Radyasyon yaklaşık 100 yıldır çeşitli malignitelerin tedavisinde kullanılmaktadır. Radyoterapi, postoperatif dönemde adjuvan tedavi olarak kullanılabildiği gibi, yumuşak doku sarkomları gibi birtakım malignitelerin tedavisinde neoadjuvan veya palyatif tedavi olarak da kullanılabilmektedir.

Özellikle bu yumuşak doku sarkomlarında kullanılan neoadjuvan radyoterapiler sonucunda, radyasyonun dokular ve yara iyileşmesi üzerindeki etkileri gözlemlenmiş ve birçok çalışmada ortaya konmuştur (4,85,86).

Cerrahiye yardımcı olması, lokal rekürrens riskinin azaltılması ve fonksiyonların korunması amacıyla özellikle ekstremitelerin yumuşak doku kanserlerinde preoperatif (neoadjuvan) olarak kullanılan radyoterapi bu faydalarının yanında ciddi yara iyileşme problemlerine neden olmaktadır. Radyoterapinin yara iyileşmesi üzerine etkileri geç dönemde de ortaya çıkabildiğinden, preoperatif (neoadjuvan) radyoterapi sonrası komplikasyonları azaltabilecek cerrahi zamanlaması net değildir (86,87).

Yapılan çalışmalarda preoperatif (neoadjuvan) radyoterapinin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin, postoperative (adjuvan) radyoterapiye göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Preoperatif radyoterapide yara iyileşme problemleri görülme olasılığı % 45'lere ulaşırken, postoperatif radyoterapi sonrası bu olasılık % 17 oranında gözlemlenmiştir (85,87).

Radyasyon zemininde oluşan yaralar günümüzde plastik cerrahi açısından önemli bir sorun olmaya devam etmekte olup, radyoterapi, problemlili yaraların ana etyolojilerinden biri olarak varlığını sürdürmektedir.

Radyasyon yaralarının tedavisinde daha önce bakteriyel sellüloz, hidrojelili pansumanlar, hücre enjeksiyonları (fibroblastlar, multipotent hücreler gibi), birtakım topikal ajanlar (polifenolik bioflavonoidler, transglutaminazlar gibi) ve büyüme faktörleri (TGF beta, PDGF vs) gibi birçok yöntem araştırılmıştır ve günümüzde de yeni tedavi modaliteleri araştırılmaktadır (67).

Radyoterapi zemininde oluşan yaralarda temel olarak, radyasyonun indüklemiş olduğu apoptozis sonucunda epitelyal hücre kaybı, radyasyon maruziyeti sonrası artan TNF-alfa ve IFN-gama gibi kollajen sentezini engelleyen sitokinlerin artmasına bağlı gerçekleşen kollajen sentez bozukluğu ve buna bağlı olarak yara gerilim kuvvetinde azalma ve endotelyal hasara bağlı mikrovasküler dolaşım bozukluğu söz konusudur (69,70).

Yara iyileşmesini engelleyen bu problemler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla çalışmamızda, apoptozisi engelleyici etkisi (77), epitelizasyonu indükleyici etkisi (76), ve anjiogenetik etkisi gösterilmiş olan amniyotik membranın, radyasyon zemininde meydana gelen yaralarda yeni bir tedavi modalitesi olup olamayacağı araştırılmıştır.

Radyoterapide lineer hızlandırıcıların kullanılmaya başlamasıyla, yüzeysel dokulara, 6 cm derinliğe kadar istenilen dozda radyoterapi verme imkanı doğmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, *Ferguson ve ark.* tarafından yapılan çalışmada belirlenmiş doz olan 18 Gy radyasyon, sıçanların kalça bölgelerine lineer hızlandırıcı vasıtasıyla uygulanmıştır (73). Bu modelde 18 Gy tek doz fraksiyone radyasyonun iyileşmekte olan cerrahi bir yarada yeterli düzeyde iyileşme problemi yaratacağı belirlenmiştir.

Radyasyon, etkisini özellikle cilt, mukozalar ve kemik iliği gibi hızlı çoğalan dokular üzerinde göstermektedir (68). Eksternal radyoterapilerin tamamında, radyoterapi sahasında kalan cilt, radyasyonun olumsuz etkilerine maruz kalmaktadır. Daha önce yapılan bir çalışmada radyasyonun KGF (Keratinocyte growth factor) üzerinde inhibitör etki gösterdiği ve buna bağlı olarak epitelyal atrofi gerçekleştiği gösterilmiştir (88). Çalışmamızda kullanılan insan asellüler amniyotik membranının, birçok büyüme faktörü içerdiği ve bunlar arasında KGF'nin de bulunduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (76). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda radyasyonlu alan üzerinde oluşturulan yara modeline uygulanan amniyotik membranın epitel kalınlaşması üzerine etkisi incelenmiştir. Epitel kalınlıkları ışık mikroskopunda mikron cinsinden değerlendirilmiş ve radyasyon + amniyotik membran grubunda, sadece radyasyon verilen gruba göre anlamlı artış gözlenmiştir. ($p < 0,05$) Radyasyon + amniyotik membran grubu ile sham grubu arasında anlamlı fark görülmemiştir. ($p > 0,05$)

Çalışmamızda kullanılan yara modelinin tanımlandığı *Ferguson ve ark.* tarafından yapılan çalışmada, radyasyon sonrası oluşturulan yaraya uygulanan intradermal fibroblast enjeksiyonunun, yaranın kopma kuvvetini artırdığı gösterilmiştir (73). Aynı çalışmada,

fibroblast kültürünün enjeksiyon öncesi ışınlanması sonucunda yara kopma kuvvetinde azalma meydana gelmesi, radyasyon maruziyeti sonrası yara iyileşme problemlerinde fibroblast hasarının önemli bir etken olduğunu göstermektedir. Bir başka çalışmada ise amniyotik membranın fibroblastların sayısı ve fonksiyonu üzerinde artırıcı etkisi olduğu gözlemlenmiştir (103). Çalışmamızda da, amniyotik membran grubunda, radyasyon grubuna göre, fibroblast hücrelerinde anlamlı derecede artış gözlemlenmiştir.

Radyasyon maruziyeti sonrası meydana gelen yarada TGF-beta düzeylerinin düşmüş olduğu gözlenmiştir (67). TGF-beta aynı zamanda fibroblastlardan TGF-beta salınımı için pozitif geri besleme özelliğine de sahiptir (89). Bu nedenle yara iyileşmesinin erken döneminde kollajen sentezi azalmakta ve yara gerilim kuvvetinde azalma meydana gelmektedir. Geç dönemde radyasyon zemininde meydana gelen fibrozisin ise reaktif olarak yükselen TGF beta etkisine bağlı olduğu düşünülmüştür (87). Amniyotik membran epitelyal hücrelerinden TGF-beta salınımı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (76). Bu etkiyle amniyotik membran ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentez ve depolanmasını, hücre adhezyon moleküllerinin sentezlenmesini ve matriks degradasyon proteinlerinin sentezinin azalmasını sağlayarak yara iyileşmesini güçlendirebilir.

Literatürdeki bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, histopatolojik kesitlerde kollajenin gösterilmesi için kullanılan Masson trikrom boyası ile yara iyileşme bölgelerindeki kollajen miktarları skorlanmış ve istatistiksel sonuçları karşılaştırılmıştır. Radyasyon+amniyotik membran grubunda yara iyileşme bölgelerindeki kollajen miktarı, radyasyon grubuna göre anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p < 0,05$). Radyasyon + amniyotik membran grubu ile Sham grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Yine aynı veriler doğrultusunda bu kriterlerin biyomekanik yansımalarının gösterilmesi amacıyla, sıçanların insizyon bölgelerinden alınan doku parçalarında, insizyon hattına perpendiküler yönde uygulanan ve yarada kopmaya neden olan kuvvetlerin karşılaştırılması istatistiksel olarak yapılmıştır. Radyasyon grubunda, radyasyon+amniyotik membran grubuna göre anlamlı derecede yara kopma kuvveti azalması saptanmış ($p < 0,05$) ancak radyasyon+amniyotik membran grubu ile Sham grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu bulgular, literatürdeki veriler ile uyumludur. Radyasyon zemininde gelişen yaralarda, yara kopma kuvvetinin azalması kollajen üretim eksikliğine bağlı olabileceği gibi, yapılan bazı çalışmalarda irradiye edilmiş dokulardaki yaralarda azalan

Nitrik Oksit (NO) düzeylerinin de bu güçsüzlüğe katkıda bulunabileceği belirtilmiştir (67). Ancak oftalmolojik çalışmalarda korneal ülserlerde kullanılan amniyotik membranın, bu bölgede nitrik oksit salınımını azalttığı yönünde çalışmalar mevcuttur (90). Radyasyon zemininde oluşan yaralarda amniyotik membranın nitrik oksit salınımı üzerindeki etkisinin anlaşılabilmesi için daha ileri düzey çalışmalara gereksinim vardır.

Yukarıda bahsedilen faktörler nedeniyle radyasyon zemininde meydana gelen yaralarda, yara kontraksiyonu yetersiz olmakta ve iyileşmesi oldukça zor olan atonik yaralar oluşmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda amniyotik membranın yara kontraksiyonunu artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (91). Çalışmamızda amniyotik membran yerleştirilmesinden 3 hafta sonra doku blokları eksize edilmiş ve yara iyileşme sahalarının alanları mikroskop altında mikron kare cinsinden ölçülmüştür. İstatistiksel sonuçlarımızda radyasyon+amniyotik membran grubunda yara alanlarının, hem radyasyon hem de Sham gruplarına göre anlamlı derecede küçük olduğu görülmüştür. Bu veriler yara kontraksiyonu lehine yorumlanmış ve literatürdeki bilgilerle uyumlu bulunmuştur.

Radyasyon zemininde oluşan yaralarda mikrovasküler yapıların endotel hasarına bağlı olarak oklüde olması ve büyük damarlarda meydana gelen endarteritler, doku hipoksisi sonrası yara iyileşmesini bozan temel faktörlerdendir (92).Radyoterapi sonrasında endotelial hücreler tarafından sentezlenen intersellüler adhezyon molekülleri olan ICAM-1 ve E-selektin sentezinin bozulmuş olması bu vasküler hasarın önemli bir kanıtıdır (93).

Amniyotik membranın EGF, TGF-beta, KGF, KGFR, HGF (Hepatosit growth faktör), HGFR, bFGF gibi birçok büyüme faktörünün yanında vasküler endotelial hücrelerin gelişimini sağlayan VEGF sentezlediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (76). Ayrıca bazı klinik çalışmalarda da amniyotik membran kullanılan alanlarda vasküler proliferasyonun sağlandığı klinik ve histopatolojik olarak gösterilmiştir (75,80).

Çalışmamızda radyasyon zemininde oluşturulan yara modelinde, amniyotik membranın vasküler proliferasyonunu artırıcı etkisi, histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Yara iyileşme alanlarında mikrovasküler yapıların sayımı yapılmış ve istatistiksel karşılaştırmada radyasyon grubunda Sham grubuna göre damar sayısında anlamlı derecede azalma gözlenmiş, buna karşılık radyasyon + amniyotik membran grubunda radyasyon grubuna göre anlamlı düzeyde artış gözlenmiştir. Bu bulgular literatürdeki bilgilerle de uyumlu bulunmuş ve radyasyonun yara iyileşmesi üzerindeki

olumsuz etkilerinin temel nedenlerinden olan mikroanjiopati üzerinde, amniyotik membranın olumlu bir etkisi olabileceği düşünülmüştür.

Tüm insan doku ve organlarında olduğu gibi amniyotik membran da bazı viral ajanların bulaşmasına sebep olabilir. Bu nedenle amniyotik membranla yapılacak tüm çalışmalarda hastanın viral seroloji panelinin (HBV, HCV, HIV) kontrol edilmesi ve sezaryen operasyonu öncesi hazırlanması gerekmektedir. Bunlarla birlikte amniyotik membran ile HTLV-1, CMV, sfiliz ve tüberküloz bulaşı olabileceği de bildirilmiştir (94). Çalışmamızda amniyotik membran temin edilecek hastaların viral serolojileri kontrol edilmiş ve herhangi bir bulaşıcı viral hastalık açısından negatif oldukları belirlenmiştir.

Amniyotik membranın kullanımı öncesi hazırlanması ve saklanması ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve birçok farklı yöntem belirlenmiştir. Bunlar içerisinde en sık kullanılanları gliserol ile kriyoprezervasyon, dimetil sülfoksit ile kriyoprezervasyon, liyofilizasyon ve gama-irradiyasyon ile sterilizasyondur. Uzun süreli saklama olanağı sağlayan bu yöntemlerin yanında, amniyotik membran taze olarak da kullanılabilir (95).

Çalışmamızda amniyotik membran taze olarak kullanılmıştır. Amniyotik membranın taze olarak hazırlanmasında penisilin+eritromisin, penisilin+tobramisin gibi antibiyotik kombinasyonları kullanılabilir. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nın da korneal ülserler için taze amniyotik membran kullanımı öncesinde uyguladığı prosedür, çalışmamızda uygulanmıştır. Amniyotik membran öncelikle sodyum hipoklorit solüsyonunda daha sonra ise penisilin+tobramisin içeren solüsyonlarda bekletilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda amniyotik membran üzerinde herhangi bir HLA antijeni bulunmadığı belirtilmiş olsa da, daha yakın zamanda yapılan çalışmalarda amniyotik membranın HLA class1a ve 1b antijenlerini içerdiği, fakat taşıdığı CD 59 sayesinde immun baskılayıcı özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (78). Bu özellikleri nedeniyle amniyotik membran immünolojik açıdan ayrıcalıklı bir yere sahiptir ve allojenik veya çalışmamızda olduğu gibi ksenojenik transplantasyonlarda immünolojik red reaksiyonlarına neden olmamaktadır. Çalışmamızda da amniyotik membran yerleştirilen sıçanların hiçbirinde immünolojik red reaksiyonlarına rastlanmamıştır.

Amniyotik membranın antienflamatuar ve antimikrobiyal özellikleri daha önce birçok çalışmada gösterilmiştir (75). Bu etkisinin yerleştirildiği yüzeye tam olarak yapışması sonucu kontaminasyona izin vermemesi sonucu ortaya çıktığını ileri süren çalışmalar mevcuttur (96). Ancak daha yakın zamanda yapılan çalışmalar amniyotik membranın, human- β -defensin-3 gibi bazı antimikrobiyal peptidlerin ve IL-10 gibi antienflamatuar sitokinlerin salınımı yoluyla bu antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiğini ileri sürmüştür (97,98). Çalışmamızda da amniyotik membran yerleştirilmesini takiben 3 hafta boyunca hiçbir hayvanda enfeksiyon lehine bir bulgu ortaya çıkmamıştır.

Ayrıca amniyotik membranın, radyoterapi maruziyetinin çok daha geç dönemlerinde ortaya çıkan fibrozis üzerindeki antifibrotik etkisi, bir sıçan karaciğer fibrozisi modeli üzerinde çalışılmış ve olumlu etkileri olduğu ortaya konmuştur (99). Ancak yumuşak dokularda da, çalışmamızın kapsamadığı çok daha uzun dönemlerde, radyasyon maruziyetine bağlı olarak yoğun fibrozis olabileceği bilinmektedir. Amniyotik membranın radyasyon zeminindeki yaralarda uzun dönemde ortaya çıkan fibrozis üzerindeki antifibrotik etkisinin gösterilmesi için daha uzun süreli klinik ve deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Radyasyon zemininde gelişen yaralarda amniyotik membran uygulaması ilk defa çalışmamızda kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarla amniyotik membranın, kolay ulaşılabilmesi, ucuz olması, antimikrobiyal ve antienflamatuar etkileri, immünojenik olmaması ve yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileriyle, özellikle neoadjuvan radyoterapi almış hastaların cerrahi tedavilerinde yara oluşumunu önleyici olarak kullanılabileceği ve radyasyon zemininde gelişen yaraların klinik tedavisinde de kullanıma açık olduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Yang JC, Chang AE, Baker AR et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol* 1998; 16: 197–203.
2. Lindholm P, Valavaara R, Aitasalo K et al. Preoperative hyperfractionated accelerated radiotherapy and radical surgery in advanced head and neck cancer: a prospective phase II study. *Radiother Oncol* 2006; 78: 146–51.
3. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 638–46.
4. Kunisada T, Ngan SY, Powell G et al. Wound complications following preoperative radiotherapy for soft tissue sarcoma. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28: 75–9.
5. Keller J, Dickie G. Effect of surgery on normal tissue toxicity in patients treated with accelerated radiotherapy. *Acta Oncol* 2002; 41: 56–62.
6. Dimitrievich GS, Fischer-Dzoga K, Griem ML. Radiosensitivity of vascular tissue. I. Differential radiosensitivity of capillaries: a quantitative in vivo study. *Radiation Res* 1984; 99: 511–35.
7. Kesikuru R, Jukkola A, Nuutinen J et al. Radiation-induced changes in skin type I and III collagen synthesis during and after conventionally fractionated radiotherapy. *Radiother Oncol* 2004; 70: 243–8.
8. Sidhartha Nanda, Sudip Chakraborty, Amit Ray an Inamuddin, Healing of cervical necrotizing fasciitis using amniotic membrane as a dressing material *Natl J Maxillofac Surg*. 2011 Jul-Dec; 2(2): 147–151.
9. Solomon A, Wajngarten M, Alviano F. Suppression of inflammatory and fibrotic responses in an invitro model of allergic inflammation by the amniotic membrane stromal matrix. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:941–8.
10. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of amniotic membrane for potential use in tissueengineering. *Eur Cell Mater*. 2008;15:88–99.
11. Sidhartha Nanda, Sudip Chakraborty, Amit Ray an Inamuddin, Healing of cervical necrotizing fasciitis using amniotic membrane as a dressing material *Natl J Maxillofac Surg*. 2011 Jul-Dec; 2(2): 147–151.

12. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Percoraro RE, Rodeheaver G, Robson MC (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair Regen.* 2(3):165-70.
13. Vaneau M, Chaby G, Guillot B et al., (2007). Consensus panel recommendations for chronic and acute wound dressings. *Arch Dermatol* 143(10):1291-1294.
14. Stadelmann, W.K., A.G. Digenis, and G.R. Tobin, Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *American Journal of Surgery*, 1998. 176(2A): p. 26S-38S.
15. T Velnar, T Bailey V Smrkol, The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms, *J Int Med Res*, 2009;37: 1528-1542
16. Woolley K, Martin P, Conserved mechanisms of repair: from damaged single cells to wounds in multicellular tissues. *Bioessays.* 2000;22 (10): 911-919.
17. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2003). *Basic Pathology. Temel Patoloji.* Çeviri editörü Çevikbaş U. 7. edisyon. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 74-75.
18. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2000). *Basic Pathology. Temel Patoloji.* Çeviri editörü Çevikbaş U. Altıncı baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 55-56.
19. Shai A, Maibach HI (2005). *Wound Healing and Ulcers of the Skin. Diagnosis and Therapy – the Practical Approach.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 7-35
20. Clark RA.; Wound repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1989;1:1000-1008.
21. David M., Young P., Stephen J. Wound healing. Ed: Miller. In: *Modern surgical Care.* 1998; 1: 1237-1247.
22. Broughton G, Janis JE, Attinger CE: The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 suppl): 12S – 34S
23. Robson MC: Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg Clin North Am* 1997; **77**: 637–650
24. Robson MC, Steed DL, Franz MG: Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 2001; 38: 72 – 140.
25. Hart J: Inflammation. 1: its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care* 2002; 11: 205 –209.
26. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE: Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 suppl): 1e-S – 32e-S
27. Skover GR: Cellular and biochemical Dynamics of wound repair. Wound environment in collagen regeneration. *Clin Podiatr Med Surg* 1991; 8: 723 – 756.

28. Hunt TK: The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med* 1998; 17: 1265 – 1273.
29. Ramasastry SS: Acute wounds. *Clin Plast Surg* 2005; 32: 195 – 208
30. Witte MB, Barbul A: General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 509 – 528.
31. Ennis WJ, Meneses P: Wound healing at the local level: the stunned wound. *Ostomy Wound Manage* 2000; 46(1A suppl): 39S – 48S.
32. Hunt TK, Hopf H, Hussain Z: Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care* 2000; 13: 6 – 11
33. Lawrence, W., and Diegelmann, R. Growth factors in wound healing. *Clin. Dermatol.* 12: 157, 1994.
34. Grotendorst, G., Soma, Y., Takehara, K., et al. EGF and TGF- α are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J. Cell Physiol.* 139: 617, 1989
35. Smola, H., Thiekotter, G., and Fusenig, N. Mutual induction of growth factor gene expression in by epidermal-dermal cell interaction. *J. Cell Biol.* 122: 417, 1993.
36. Xia, Y., Zhao, Y., Marcus, J., et al. Effects of keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) on wound healing in an ischemia-impaired rabbit ear model and on scar formation. *J. Pathol.* 188: 431, 1999
37. Jimenez, P., and Rampy, M. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J. Surg. Res.* 81: 238, 1999.
38. Goldman, R. Growth factors and chronic wound healing: Past, present, and future. *Adv. Skin Wound Care* 17: 24, 2004.
39. Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., et al. Transforming growth factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122: 103, 1993.
40. Pierce, G., Mustoe, T., Altmann, B., et al. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J. Cell Biochem.* 45: 319, 1991
41. Gailit, J. X., Bueller, J., and Clark, H. R. Platelet-derived growth factor and inflammatory cytokines have differential effects on the expression of integrins α 1 β 1 and α 5 β 1 by human dermal fibroblasts in vitro. *J. Cell Physiol.* 169: 281, 1996
42. Yang, C., Lin, S., and Yu, H. Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar. *J. Dermatol. Sci.* 14: 162, 1997.

43. Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P., et al. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab. Invest.* 43: 47, 1980.
44. Witte, M., and Barbul, A. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North Am.* 77: 509, 1997.
45. Ehrlich, H., and Krummel, T. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair Regen.* 4: 203, 1996.
46. Henry, G., and Garner, W. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg. Clin. North Am.* 83: 483, 2003
47. Bullard, K.M., et al., Stromelysin-1-deficient fibroblasts display impaired contraction in vitro. *J Surg Res*, 1999. 84(1): p. 31-4.
48. Grinnell, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 13: 264, 2003
49. Diegelmann, R. Analysis of collagen synthesis. *Methods Mol. Med.* 78: 349, 2003.
50. Madden, J. W., and Smith, H. C. The rate of collagen synthesis and deposition in dehisced and resutured wounds. *Surg. Gynecol. Obstet.* 130: 487, 1970
51. Forrest, L. Current concepts in soft connective tissue wound healing. *Br. J. Surg.* 70: 133, 1983.
52. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2003). Basic Pathology. Temel Patoloji. Çeviri editörü Çevikbaş U. 7. edisyon. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 75-76.
53. Mathes Plastic Surgery, Second Edition, Volume 1, Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment pg. 219
54. Robson MC Infection in the surgical patient: an imbalance in the normal equilibrium. *Clin Plast Surg.* 1979 Oct;6(4):493-503
55. Mimi Leong, M.D., Linda G. Phillips, M.D., Wound Healing, in Sabiston Textbook of Surgery 2004, Elsevier Saunders: USA. p. 183-207
56. Heggors, J.P., Assessing and controlling wound infection. *Clin Plast Surg.* 2003. 30(1): p. 25-35, v.
57. Arnold M, Barbul A. Nutrition and wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117(7 suppl) ; 42S-58S
58. Burns, J.L., J.S. Mancoll, and L.G. Phillips, Impairments to wound healing. *Clin Plast Surg.* 2003. 30(1): p. 47-56.
59. Izadi, K. and P. Ganchi, Chronic wounds. *Clin Plast Surg.* 2005. 32(2): p.209-22.

60. Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK; Effects of vitamin A and glucocorticoids upon inflammation and collagen synthesis. *Ann Surg.* 1973 Feb;177(2):222-7.
61. Mathes Plastic Surgery, Second Edition, Volume 1, Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment pg. 220
62. Keswani SG, Katz AB, Lim FY, Zoltick P, Radu A, Alaei D, Herlyn M, Crombleholme TM; Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. *Wound Repair Regen.* 2004 Sep-Oct;12(5):497-504
63. Mathes Plastic Surgery, Second Edition, Volume 1, Wound Healing: Repair Biology and Wound and Scar Treatment pg. 221.
64. Brauchle M, Fässler R, Werner S J; Suppression of keratinocyte growth factor expression by glucocorticoids in vitro and during wound healing. *Invest Dermatol.* 1995 Oct;105(4):579-84.
65. Beer HD, Longaker MT, Werner S; Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J Invest Dermatol.* 1997 Aug;109(2):132-8.
66. Vicini F, Vargas C, Gustafson G, Edmundson G, Martinez A. High dose rate brachytherapy in the treatment of prostate cancer. *World J Urol.* 2003 Sep;21(4):220-8.
67. Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: review of the literature . *Radiat Oncol.* 2012 Sep 24;7:162.
68. Dormand EL, Banwell PE, Goodacre TE. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J.* 2005 Jun;2(2):112-27.
69. Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP. The role of cytokines in the development of normal-tissue reactions after radiotherapy. *Strahlenther Onkol.* 1998 Nov;174 Suppl 3:12-5.
70. Schäffer M, Weimer W, Wider S, Stülten C, Bongartz M, Budach W, Becker HD. Differential expression of inflammatory mediators in radiation-impaired wound healing. *J Surg Res.* 2002 Sep;107(1):93-100.
71. Sassi M, Jukkola A, Riekkari R, Höyhty M, Risteli L, Oikarinen A, Risteli J. Type I collagen turnover and cross-linking are increased in irradiated skin of breast cancer patients. *Radiother Oncol.* 2001 Mar;58(3):317-23.
72. Rudolph R, Tripuraneni P, Koziol JA, McKean-Matthews M, Frutos A. Normal transcutaneous oxygen pressure in skin after radiation therapy for cancer. *Cancer.* 1994 Dec 1;74(11):3063-70.

73. Ferguson PC, Boynton EL, Wunder JS, Hill RP, O'Sullivan B, Sandhu JS, Bell RS. Intradermal injection of autologous dermal fibroblasts improves wound healing in irradiated skin. *J Surg Res.* 1999 Aug;85(2):331-8.
74. Martin M, Lefaix J, Delanian S TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 May 1;47(2):277-90.
75. Kesting MR, Wolff KD, Nobis CP, Rohleder NH. Amniotic membrane in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg.* 2012 Dec 16.
76. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2000 Mar;20(3):173-7.
77. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix *Science.* 1995 Feb 10;267(5199):891-3.
78. Rooney IA, Morgan BP. Characterization of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 antigen on human amniotic cells and in amniotic fluid. *Immunology.* 1992 Aug;76(4):541-7.
79. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med.* 2000 Jul 13;343(2):86-93.
80. Güler R, Ercan MT, Ulutunçel N, Devrim H, Uran N. Measurement of blood flow by the ¹³³Xe clearance technique to grafts of amnion used in vestibuloplasty. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Aug;35(4):280-3.
81. Ni J, Abrahamson M, Zhang M, et al. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family Z cystatins. *J. Biol. Chem.* 1997;272:10853-10858
82. Ley-Chávez E, Martínez-Pardo ME, Roman R, Oliveros-Lozano Fde J, Canchola-Martínez E. Application of biological dressings from radiosterilized amnios with cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients. *Ann Transplant.* 2003;8(4):46-9.
83. Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, Laranjo M, Maia CJ, Botelho MF. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell Tissue Res.* 2012 Aug;349(2):447-58.
84. Sugiyama K, Ishii G, Ochiai A, Esumi H. Improvement of the breaking strength of wound by combined treatment with recombinant human GCSF, recombinant human M-CSF, and a TGF-beta1 receptor kinase inhibitor in rat skin. *Cancer Sci.* 2008 May;99(5):1021-8.

85. Sheplan LJ, Juliano JJ. Use of radiation therapy for patients with soft-tissue and bone sarcomas. *Cleve Clin J Med*. 2010;77(1):27-9.
86. Al-Absi E, Farrokhyar F, Sharma R, Whelan K, et al. A systematic review and meta-analysis of oncologic outcomes of pre- versus postoperative radiation in localized resectable soft-tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(5):1367-74.
87. Johnson LB, Adawi D, Agren MS, Jorgensen LN, et al. Combination of pre-operative radiotherapy and surgery suppresses local accumulation of collagen and TGF-beta1 in rats. *J Surg Res*. 2006 Jun 15;133(2):136-42.
88. Farrell CL, Rex KL, Kaufman SA, Dipalma CR, Chen JN, Scully S, Lacey DL. Effects of keratinocyte growth factor in the squamous epithelium of the upper aerodigestive tract of normal and irradiated mice. *Int J Radiat Biol*. 1999 May;75(5):609-20
89. Faler BJ, Macsata RA, Plummer D, Mishra L, et al. Transforming growth factor-beta and wound healing. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*. 2006;18(1):55-62
90. Wichayacoop T, Briksawan P, Tuntivanich P, Yibchok-Anun S. Anti-inflammatory effects of topical supernatant from human amniotic membrane cell culture on canine deep corneal ulcer after human amniotic membrane transplantation. *Vet Ophthalmol*. 2009 Jan-Feb;12(1):28-35.
91. Loeffelbein DJ, Baumann C, Stoeckelhuber M, Hasler R, Mücke T, Steinsträßer L, Drecol E, Wolff KD, Kesting MR. Amniotic membrane as part of a skin substitute for full-thickness wounds: an experimental evaluation in a porcine model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Jul;100(5):1245-56.
92. Grabb&Smith's Plastic Surgery 6th Edition, Radiation and Radiation Injuries, pg 162-168
93. Prott FJ, Handschel J, Micke O, Sunderkötter C, Meyer U, Piffko J. Long-term alterations of oral mucosa in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Sep 1;54(1):203-10.
94. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004 Jan-Feb;49(1):51-77.
95. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*. 2010 Jan;31(2):216-25
96. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*. 1991 May-Jun;12(3):285-8.

97. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Nov;191(5):1678-87.
98. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea.* 2000 May;19(3):348-52.
99. Ricci E, Vanosi G, Lindenmair A, Hennerbichler S, Peterbauer-Scherb A, Wolbank S, Cargnoni A, Signoroni PB, Campagnol M, Gabriel C, Redl H, Parolini O Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. *Cell Tissue Bank.* 2013 Sep;14(3):475-88.
100. Kutman C, Çelebioğlu B. Radyoterapi ve radyasyonun tarihçesi. Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Yıllığı. 2000; 1(1):49-50.
101. Arıyan S. Radiation injury. In: Mathes SJ (ed). *Mathes Plastic Surgery Volume1.* 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2006:835-53.
102. O'Sullivan B, Davis AM, Turcotte R, Bell R, et al. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet.* 2002;359(9325):2235-41.
103. Mahmoudi-Rad M, Abolhasani E, Moravvej H, Mahmoudi-Rad N, Mirdamadi Y Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation *Clin Exp Dermatol.* 2013 Aug;38(6):646-51.