



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

DUMAN İNHALASYON HASARI OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN
İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Emre ÖZENALP

KAYSERİ – 2018



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

DUMAN İNHALASYON HASARI OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN
İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Hazırlayan
Dr. Emre ÖZENALP

Danışman
Prof. Dr. Atilla ÇORUH

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi
tarafından TSU-2018-7934 kodlu proje ile desteklenmiştir.

KAYSERİ – 2018

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden daima yararlandığım ve çok sevdiğim mesleğimi kazanmamda emeğini esirgemeyen tüm saygıdeğer hocalarıma,

Birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım ve türlü zorluklara beraber göğüs gerdiğimiz sevgili asistan arkadaşlarıma,

Ameliyathane, plastik cerrahi servisi ve yanık ünitesi yoğun bakımda birlikte çalıştığım hemşire, teknisyen ve yardımcı sağlık personeli arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde en büyük emek sahibi olan, hayatımın her aşamasında sevgisini daima üzerimde hissettiğim, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan sevgili annem Kadriye ÖZENALP, babam Rafet ÖZENALP, kardeşim Emel ÖZENALP 'a,

Her zaman yanımda olan, sabrı ve anlayışı ile zorlu asistanlık eğitimini kolaylaştıran, sevgili eşim Şeyma ÖZENALP 'a,

Asistanlığımın en büyük hediyesi biricik kızım Öykü ÖZENALP 'a

Sonsuz teşekkürler...

Dr. Emre ÖZENALP

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	16
2.GENEL BİLGİLER	17
2.1 SOLUNUM SİSTEMİ FİZYOLOJİSİ VE ANATOMİSİ	17
2.1.1 Solunum Sistemi Anatomisi	17
2.1.2 Solunum Sistemi Fizyolojisi.....	23
2.2 DUMAN İNHALASYON HASARI.....	24
2.2.1 İn hale Edilen Dumanın Etki Şekilleri.....	27
2.2.1.1 Termal Hasar.....	28
2.2.1.2 Lokal Toksinlerle Hasar Oluşumu	28
2.2.1.3 Sistemik Toksinlerle Hasar Oluşumu.....	29
2.2.2 Duman İnhalasyon Hasarını Etkileyen Faktörler.....	30
2.2.3 Duman İnhalasyonu Düşünülen Hastaların Değerlendirilmesi ve Tedavisi	31
2.2.3.1 Hastaların Değerlendirilmesi	31
2.2.3.2 Tedavi	32
2.2.3.2.1 Havayolu	32
2.2.3.2.2 Bronşiyal Hijyen Terapisi	33
2.2.3.2.4 Göğüs Fizyoterapisi	33
2.2.3.2.5 Hava Yolu Aspirasyonu	33
2.2.3.2.6 Terapötik Bronkoskopi	34
2.2.3.2.7 Erken Ambulasyon.....	34

2.2.3.2.2 İlave Farmakolojik Tedaviler	34
2.2.3.2.2.1 Bronkodilatörler	34
2.2.3.2.2.2 Kortikosteroidler ve Antibiyotikler	34
2.2.3.2.2.3 Rasemik Epinefrin.....	35
2.2.3.2.2.4 İnhaler N-asetilsistein	35
2.2.3.2.2.5 Heparin/N-asetilsistein Kombinasyonu.....	35
2.2.3.2.2.6 Mekanik Ventilasyon	35
2.2.3.2.2.7 Sıvı Resüsitasyonu	35
2.3 AKUT AKCİĞER HASARI VE AKCİĞER İNFLAMASYONU	36
2.4 KÖK HÜCRELER	36
2.4.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	39
2.4.1.1 Embriyonik Kök Hücreler.....	41
2.4.1.2 Erişkin Kök Hücreler	42
2.4.1.3 Mezenkimal Kök Hücreler.....	43
2.4.1.3.1 Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları	45
2.4.1.3.1.1 Kemik İliği	46
2.4.1.3.1.2 Amniyotik Sıvı.....	46
2.4.1.3.1.3 Umblikal Kord	46
2.4.1.3.1.4 Adipoz Doku	46
2.4.1.3.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Özellikleri	48
2.4.1.3.3 Mezenkimal Kök Hücreler ve Rejeneratif Tıp.....	49
2.4.1.3.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı	50
2.4.2 Stromal Vasküler Fraksiyon İçeriği	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1 DENEY PROTOKOLÜ	54
3.2 DENEKLER.....	54
3.3 DENEY MODELİ PLANLAMASI	55
3.4 DUMAN OLUŞTURULMASI	56
3.5 DUMAN UYGULAMA MODELİ.....	58
3.6 DENEYİN UYGULANIŞI	59
3.7 CERRAHİ İŞLEMLER.....	60
3.8 ÖRNEKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	62

3.8.1 Biyokimyasal Yöntem	62
3.8.2 Histolojik Yöntem.....	63
3.8.3 Islak/Kuru Ağırlık Değerlendirilmesi.....	63
3.9 STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN HAZIRLANMASI	64
3.10 YAĞ DOKU HAVUZU OLUŞTURULMASI	65
3.11 İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	71
4. BULGULAR.....	72
4.1 ISLAK/KURU ORANLARI	73
4.2 BİYOKİMYASAL PARAMETRELER	75
4.2.1 Myeloperoksidaz Düzeyleri.....	75
4.2.2 TNF- α Düzeyleri.....	77
4.2.3 IL-1 Düzeyleri.....	80
4.2.4 IL-6 Düzeyleri.....	82
4.3 IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME.....	84
4.3.1 Intra-alveolar Sıvı Birikimi.....	88
4.3.2 Inter-alveolar Septal Konjesyon	90
4.3.3 Intra-alveolar Hemoraji.....	92
4.3.4 Nötrofil yoğunluğu	93
4.3.5 Makrofaj Sayısı.....	95
4.3.6 Solunum Epiteli Dökülmesi.....	96
5. TARTIŞMA	98
6. SONUÇ	101
KAYNAKLAR	102

KISALTMALAR

ADSCs	Yağ doku kökenli kök hücre
ALS	Amyotrofik lateral skleroz
ARDS	Akut respiratuar distress sendromu
ARK	Arkadaşları
BALT	Bronchus-associated lymphoid tissue
CFU-S	Colony Forming Unit- Spleen
COHb	Karboksihemoglobin
DK	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
EPH	Endotelyal prekürsör hücre
FBS	Fetal buzağı serumu
FiO₂	Fraction of Inspired Oxygen
GVHD	Graft Versus Host Hastalığı
HE	Hematoksilen eozin
HGF-1	Hepatosit büyüme faktörü 1
HKH	Hematopoetik kök hücre
HLA	Human Leukocyte Antigen
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
LTB₄	LökotrienB ₄
MHK	Mezenkimal kök hücreler
MPO	Myeloperoksidaz
MS	Multiple Skleroz
NOS	Nitrik oksit sentaz
PaCO₂	Parsiyel Karbondioksit Basıncı
PAF	Platelet aktive edici faktör
PaO₂	Parsiyel Oksijen Basıncı
PBS	Phosphate-buffered saline
SatO₂	Oksijen satürasyonu
SVF	Stromal vasküler fraksiyon

TNF- α

Tümör nekroz faktör alfa

VEGF

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: İnhalasyon hasarında tarihsel önemli olaylar	24
Tablo 2: Yanmaya bağlı dumanda sık görülen toksik elementler	26
Tablo 3: İnhalasyon hasarı tedavi algoritması	32
Tablo 4: Kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerine göre sınıflandırılması.....	40
Tablo 5: Kök hücre kaynakları ve oluşturdıkları hücreler.....	43
Tablo 6: Yetişkinde mezenkimal kök hücre kaynaklarına örnekler	45
Tablo 7: Adipoz kökenli kök hücrelerin yüzey belirteçleri ve görevleri.....	48
Tablo 8: Anestezi ve cerrahide kullanılan farmakolojik maddeler	55
Tablo 9: SVF eldesi sırasında kullanılan kimyasal maddeler	55
Tablo 10: İnhalasyon hasar modeli süreleri	56
Tablo 11: Deney grupları	59
Tablo 12: Islak/kuru ağırlık oranları	73
Tablo 13: Tüm gruplara ait akciğer dokusu ıslak/kuru ağırlık oranları tanımlayıcı verileri	74
Tablo 14: Deney gruplarının MPO düzeyleri.....	75
Tablo 15: Tüm gruplara MPO ölçümlerine ait tanımlayıcı veriler.....	76
Tablo 16: Deney gruplarının TNF- α düzeyleri.....	77
Tablo 17: Tüm gruplara TNF- α ölçümlerine ait tanımlayıcı veriler	79
Tablo 18: Deney gruplarının IL-1 düzeyleri	80
Tablo 19: Tüm gruplara IL-1 ölçümlerine ait tanımlayıcı veriler	81
Tablo 20: Deney gruplarının IL-6 düzeyleri	82
Tablo 21: Tüm gruplara IL-6 ölçümlerine ait tanımlayıcı veriler	83
Tablo 22: Gruplardaki intra-alveolar sıvı birikim oranları.....	89
Tablo 23: Gruplardaki inter-alveolar septal konjesyon oranları.....	90
Tablo 24: Gruplardaki intra-alveolar hemoraji oranları	92
Tablo 25: Gruplardaki nötrofil artış oranları	93
Tablo 26: Gruplardaki makrofaj sayı oranları	95
Tablo 27: Gruplardaki solunum epitelinde dökülme oranları	96

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Üst ve alt solunum yolları.....	18
Şekil 2: Trakeobronşiyal ağaç	19
Şekil 3: İletici ve solunumsal bölge	20
Şekil 4: Proksimal ve distal hava yolları	21
Şekil 5: Distal hava yolları ve alveol	21
Şekil 6: Akciğer parankimi ve hücreleri	22
Şekil 7: İnhalasyon hasarı patofizyolojisi	27
Şekil 8: Akciğer inflamasyonunda mezenkimal kök hücrelerin etki mekanizması...	36
Şekil 9: Mezenkimal kök hücrelerin etki mekanizmaları	38
Şekil 10: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri.....	39
Şekil 11: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması.....	40
Şekil 12: Embriyonik kök hücrenin diğer hücre tiplerine farklılaşması	41
Şekil 13: Mezenkimal diferansiasyon.....	44
Şekil 14: Mezenkimal kök hücrelerin akciğer dokusundaki anti-inflamatuvar etkileri	51
Şekil 15: İnhalasyon hasar düzeneği.....	57
Şekil 16: İnhalasyon hasar düzeneği şematik hali	57
Şekil 17: Gaz analiz cihazı.....	58
Şekil 18: Torakotomi yapılmadan trakeanın klemplenmesi	61
Şekil 19: Sham grubu (A), Kontrol Grubu Akciğerleri (B).....	61
Şekil 20: Islak-kuru ağırlık değerlendirilmesi	64
Şekil 21: Islak/kuru ağırlık değerlendirilmesi için numaralandırılmış akciğerlerin oda sıcaklığında 24 saat bekletilmesi.....	64
Şekil 22: Sıçanların inguinal bölgelerinden yağ dokusu eksizyonu	65
Şekil 23: Yağ dokusu havuzu	66
Şekil 24: Yağ dokunun 22 numaralı bistüri ile parçalanması	66
Şekil 25: Mikser yardımı ile kimyasal parçalanma.....	67
Şekil 26: Kollegenazla 60 dakika çalkalanan yağ doku	67
Şekil 27: Phosphate-buffered saline eklenerek kollegenazın aktivitesinin azaltılması	68
Şekil 28: Phosphate Buffered Saline eklenmesi sonrası santrifüj işlemi, altta kalan koyu renkli kısım SVF	69

Şekil 29: Thoma lamında hücre sayımı	70
Şekil 30: Kuyruk veninden SVF verilmesi	71
Şekil 31: Duman odasındaki CO değişimi	72
Şekil 32: Duman odasındaki sıcaklık değişimi.....	72
Şekil 33: Tüm gruplara ait akciğer dokusu ıslak/kuru ağırlık oranları tanımlayıcı veri grafiği ve istatistiksel anlamlılıkları.....	74
Şekil 34: Tüm gruplara MPO (ng/ml) ölçümlerine ait tanımlayıcı veri grafiği ve istatistiksel anlamlılıkları	77
Şekil 35: Tüm gruplara TNF- α (ng/ml) ölçümlerine ait tanımlayıcı veri grafiği ve istatistiksel anlamlılıkları	79
Şekil 36: Tüm gruplara IL-1(ng/ml) ölçümlerine ait tanımlayıcı veri grafiği ve istatistiksel anlamlılıkları	82
Şekil 37: Tüm gruplara IL-6 (ng/ml) ölçümlerine ait tanımlayıcı veri grafiği	84
Şekil 38: Sham grubuna ait normal akciğerin ışık mikroskopik görünümleri , A HE $\times$ 4, B HE $\times$ 10.....	85
Şekil 39: Kontrol grubunun ışık mikroskopik görünümü, A: Yaygın hücresel inflamasyon HE $\times$ 4, B: Yaygın intra-alveolar hemoraji HE $\times$ 40	86
Şekil 40: SF grubundaki intra-alveolar sıvı birikimi HE $\times$ 10.....	87
Şekil 41: Kontrol grubundaki yaygın makrofajlar ve ok ile işaretli bölgedeki hemosiderin yüklü makrofaj HE $\times$ 10.....	87
Şekil 42: A: Kontrol grubundaki yaygın nötrofil artışı HE $\times$ 40, B: Solunum epiteli dökülmesi HE $\times$ 40 B.....	88
Şekil 43: Tüm gruplara ait intra-alveolar sıvı birikimi oranları	89
Şekil 44: Tüm gruplara ait inter-alveolar septal konjesyon oranları	91
Şekil 45: Tüm gruplara ait intra-alveolar hemoraji oranları.....	92
Şekil 46: Tüm gruplara ait nötrofil yoğunluğu oranları.....	94
Şekil 47: Tüm gruplara ait makrofaj sayı oranları.....	95
Şekil 48: Tüm gruplara ait solunum epitelinde dökülme oranları.....	97

**DUMAN İNHALASYON HASARI OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN İNFLAMASYON ÜZERİNE
ETKİLERİ**

ÖZET

İnhalasyon hasarı, solunan dumanın toksin ve kimyasal gazların larinks, proksimal ve distal hava yolları ile akciğer parankiminde oluşturduğu akut akciğer hasarını tanımlar. Yanık hastalarında inhalasyon hasarı oluşma sıklığını Tredget %7.3, Barrow ise %28.1 olarak bildirmiştir. İnhalasyon hasarı, yanığın mortalite ve morbiditesini önemli ölçüde artırır. Akut dönemde mukozanın doğrudan irritasyonu ile sekresyon artışı ve bronkokonstrüksiyon gözlenirken, zamanla bölgesel olarak artan inflamasyona bağlı olarak havayolu ödemi gelişir.

Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF), yağ doku kökenli kök hücre (ADSCs), preadipositler, endotelyal hücreler, perisitler, hematopoetik hücre öncülleri ve fibroblastlar gibi heterojenik hücre topluluklarından oluşur. Stromal vasküler fraksiyonun büyüme faktör salınımı, çok sayıda hücre serisine farklılaşma kapasitesi, immün supresyon ve hasarlı bölgeye yerleşme gibi özellikleri vardır.

Literatürde akut akciğer hasarında kültüre kök hücre kullanımı içeren çok sayıda çalışma mevcuttur. Sistemik olarak verilen kök hücrelerin büyük bir kısmının akciğerde tuzaklandığı gösterilmiştir. Stromal Vasküler Fraksiyon içeriğindeki kök hücreler, teröpatik etkilerini farklılaşarak, trofik faktörler salgılayarak, anjiyogenezi uyatarak ve anti-inflamatuvar özellikleriyle yapmaktadırlar. Çalışmamızda duman inhalasyonu ile akut akciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda sistemik olarak verilen SVF'nin akciğer dokusu inflamasyonu ile ilgili etkileri araştırılmıştır.

Altmış adet Wistar Albino sıçan, her grupta 10 hayvan olacak şekilde altı gruba ayrıldı. Sham Grubu; inhalasyon hasarı oluşturulmadı ve tedavi verilmedi ve bu grup, temel değerlerin ölçülmesi için kullanıldı.

Kontrol grubu; inhalasyon hasarı oluşturuldu ve tedavi verilmedi. İnhalasyon hasarından 24. saatte denekler sakrifiye edildi. Sağ akciğerden histopatolojik değerlendirme için örnekler alındı, sol akciğerden ıslak/kuru oranı bakıldı. İntrakardiyak alınan kan, biyokimyasal çalışmalar için kullanıldı.

Serum Fzyolojik Grubu; inhalasyon hasarı oluşturuldu. Kuyruk veninden sistemik olarak %0,9 NaCl verildi. İnhalasyon hasarından 24. saatte ötenazi uygulandı. Sağ

akciğerden histopatolojik örnekler alındı, sol akciğerden de ıslak/kuru oranı tespiti yapıldı. İntrakardiyak alınan kan, biyokimyasal çalışmalar için kullanıldı

Donör-SVF Grubu; inhalasyon hasarı oluşturuldu, sıçanların inguinal bölgelerindeki yağ dokudan SVF elde edildi, daha sonra kuyruk veninden sistemik olarak SVF verildi. İnhalasyon hasarından 24. saatte ötenazi uygulandı. Sağ akciğerden histopatoloji, sol akciğerden ıslak/kuru oranı bakıldı. İntrakardiyak alınan kandan, biyokimyasal parametrelere bakıldı.

Donör olmayan-SVF Grubu; inhalasyon hasarı oluşturuldu, altıncı gruptaki sıçanlardan (sadece yağ doku elde etmek için kullanılan donör grubundan) SVF elde edildi. Daha sonra kuyruk veninden sistemik olarak SVF verildi. İnhalasyon hasarından sonra 24. saatte ötenazi uygulandı. Sağ akciğerden histopatoloji, sol akciğerden ıslak/kuru oranı bakıldı. İntrakardiyak alınan kandan biyokimyasal parametreler bakıldı.

Altıncı grup olan donör grubundan, inhalasyon hasarı oluşturulmadan, inguinal yağ dokusu alındı. Bu yağ dokudan elde edilen SVF'ler donör olmayan-SVF grubuna kuyruk veininden sistemik olarak verildi.

Sıçanların akciğerlerinden bakılan ıslak/kuru ağırlık oranı, SVF tedavisi verilen Donör-SVF ve Donör olmayan SVF grubunda Kontrol grubuna göre düşük bulundu. Histolojik olarak akciğer dokusunda bakılan intra-alveolar septal konjesyon, intra-alveolar hemoraji, intra-alveolar sıvı birikimi, lökosit ve makrofaj sayısı Donör-SVF ve Donör olmayan SVF gruplarında, Kontrol grubuna göre düşük bulundu. Serumda bakılan biyokimyasal parametreler MPO, IL-1, TNF- α SVF tedavi gruplarında Kontrol grubuna göre düşük bulundu.

Deney modelimizle duman inhalasyonuna maruz kalma sonucu akciğer parankiminde ciddi hasar oluştuğunu histopatolojik bulgular, serumdan bakılan biyokimyasal belirteçlerle gösterilmiştir. Çalışmamızda Sistemik olarak verilen SVF'nin, duman inhalasyonu ile oluşturulan akut akciğer hasarı nedeniyle oluşan inflamasyonu, azalttığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: inhalasyon hasarı, stromal vasküler fraksiyon, yağ doku kökenli kök hücre, duman zehirlenmesi, akut akciğer hasarı, akut respiratuar distress sendromu

THE EFFECTS OF STROMAL VASCULAR FRACTION ON THE INFLAMMATION OF SMOKE INHALATION INJURY CREATED RATS

ABSTRACT

Inhalation injury describes the acute lung injury that occurs in the larynx, proximal and distal airways and lung parenchyma by respiratory smoke, toxins, and chemical gases. The incidence of inhalation injury in burn patients was reported by Tredget 7.3% and Barrow 28.1%. Inhalation damage significantly effects the mortality and morbidity of the burn. Increased secretion and bronchoconstriction can be observed with direct irritation of the mucosa in the acute phase, whereas airway edema develops due to locally increased inflammation over time.

Stromal Vascular Fraction (SVF) is composed of heterogeneous cell populations such as ADSCs (Adipose Derived Stem Cells), preadipocytes, endothelial cells, pericytes, hematopoietic cell precursors and fibroblasts. Stromal Vascular Fraction has features; such as growth factor release, differentiation capacity to a large number of cell lines, immunosuppression and settling to the damaged site.

There are many studies in the literature which the cultured stem cells were used in acute lung injury. It has been shown that most of the stem cells given systemically were trapped in the lungs. The stem cells in the SVF show their therapeutic effects by differentiating, secreting trophic factors, stimulating angiogenesis and inhibition of inflammation. In our study, the effects of systemically given SVF on lung tissue inflammation with acute lung injury by smoke inhalation were investigated in rats. Sixty Wistar-Albino groups were divided into six groups of 10 rats each.

Sham Group; no smoke inhalation damage was created and no treatment was given in order to measure the baseline values.

Control Group; inhalation damage was created and no treatment was performed. Twenty four hours after inhalation, rats were sacrificed. Samples were taken for histopathological evaluation from the right lung, and wet to dry weight ratio from the left lung was evaluated. Intracardiac blood was taken for biochemical parameters. Serum Physiological group; inhalation damage was created and then systemically 0.9% NaCl was administered via the rat tail vein. Twenty four hours after inhalation,

rats were sacrificed. Histopathology from a right lung, wet to dry weight ratio from the left lung was evaluated. Intracardiac blood was taken for biochemical parameters. Donor-SVF Group; inhalation damage was created and the SVF was obtained from the adipos tissue from the inguinal region of the rats. Stromal Vascular Fraction was administered systemically via the rat tail vein. Twenty four hours after inhalation, rats were sacrificed. Histopathology from a right lung, wet to dry weight ratio from the left lung was evaluated. Biochemical parameters were taken from the intracardiac blood.

Nondonor-SVF Group; inhalation damage was created from the sixth group (the donor group was used to obtain adipose tissue). Stromal Vascular Fraction was administered systemically from the tail vein. Twenty four hours after the inhalation, the rats were sacrificed. For histopathological interpretation tissue samples were taken from the right lung and for wet to dry weight ratio from the left lung was evaluated. Biochemical parameters were taken from the intracardiac blood.

Adipose Tissue Donor Group; no inhalation damage was created. Only, inguinal fat tissue was taken. Stromal Vascular Fraction was prepared from this adipose tissue and was donated to the nondonor-SVF group.

Wet to dry weight ratio of the lungs of the donor and non-donor SVF groups were lower than the rats of the Control group. Histologically, intra-alveolar septal congestion, intra-alveolar hemorrhage, intra-alveolar fluid accumulation, leukocyte and macrophage density were lower in donor-SVF and non-donor SVF groups compared to the Control Group. Serum biochemical pro-inflammatory parameters were also lower in MPO, IL-1, TNF- α in the Stromal Vascular Fraction treatment groups compared to the Control Group.

In our experimental model, serious damage of the lung parenchyma was demonstrated as a result of smoke inhalation. We showed that the Stromal Vascular Fraction systemically decreased the inflammation caused by smoke inhalation.

Keywords: inhalation injury, stromal vascular fraction, adipose derived stem cell, smoke injury, acute lung injury, acute respiratory distress syndrome.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnhalasyon hasarı, solunan dumanın, toksin ve kimyasal gazların larinks, proksimal ve distal hava yolları ile akciğer parankiminde oluşturduğu akut akciğer hasarını (ALI-Acute Lung Injury) tanımlar. İnhalasyon hasarı, üst solunum yollarını ilgilendiren termal hasar, alt solunum yollarının kimyasal irritasyonu ve zehirli gazların inhalasyonuna bağlı sistemik zehirlenme olmak üzere üç bileşenden oluşur (1). Dumana maruz kalma şekline ve süresine göre, bu olumsuz etkiler, solunum sisteminin çeşitli yerlerinde, farklı şiddetlerde hasar oluşturur. Duman inhalasyonu, yanık yaralanmasına eşlik edebileceği gibi deride yanık olmadan da ortaya çıkabilir. Yanık hastalarında inhalasyon hasarı oluşma sıklığını Tredget Ark. (2) %7,3, Barrow Ark. (3) ise %28,1 olarak bildirmiştir. İnhalasyon hasarı, yanığın mortalite ve morbiditesini önemli derecede artırır.

Solunan havadaki kimyasal irritanlar ile nöronal hücrelerden nöropeptid ve nöronal Nitrik Oksit Sentaz (NOS) salınımı tetiklenir. Artan ısı solunum epiteli hücrelerini tahrip ederek proteinlerin denatürasyonuna ve kompleman kaskadının aktivasyonuna neden olur. Bu durum pro-inflamatuar sitokinlerin ve vasküler permeabilitenin artmasına yol açar (4). Akciğer ödemi, duman inhalasyonundan kaynaklanan akut akciğer yaralanmasının mortalite ve patofizyolojisinin temel belirleyicilerindendir (5).

Stromal vasküler fraksiyon (SVF), yağ dokunun enzimatik veya mekanik olarak parçalanmasıyla yağ doku kökenli kök hücre (ADSCs), preadipositler, endotelyal hücreler, perisitler, hematopoetik hücre öncülleri ve fibroblastlar gibi heterojenik hücre topluluklarından oluşur. Stromal vasküler fraksiyondaki hücrelerin birçok büyüme faktörü salgıladığı, yeni damar oluşumunu arttırdığı, anti-apoptotik ve antioksidan etkilerinin olduğu, yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği, anti-inflamatuar etkilerinin olduğu, fibroblastlarda kollajen sentezini arttırdığı ve kök hücre kaynağı olduğu gösterilmiştir (6).

Birçok tedavi alternatifinin denendiği inhalasyon hasarında etkinliği kesin olarak gösterilmiş olan bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır. İnhalasyon hasarı ve diğer nedenlerle oluşan akut akciğer hasarının tedavisi için kültüre kök hücre kullanılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda sistemik olarak verilen kök hücrelerin büyük kısmının akciğerde tuzaklandığı gösterilmiştir (7). Kültüre kök hücrelerin

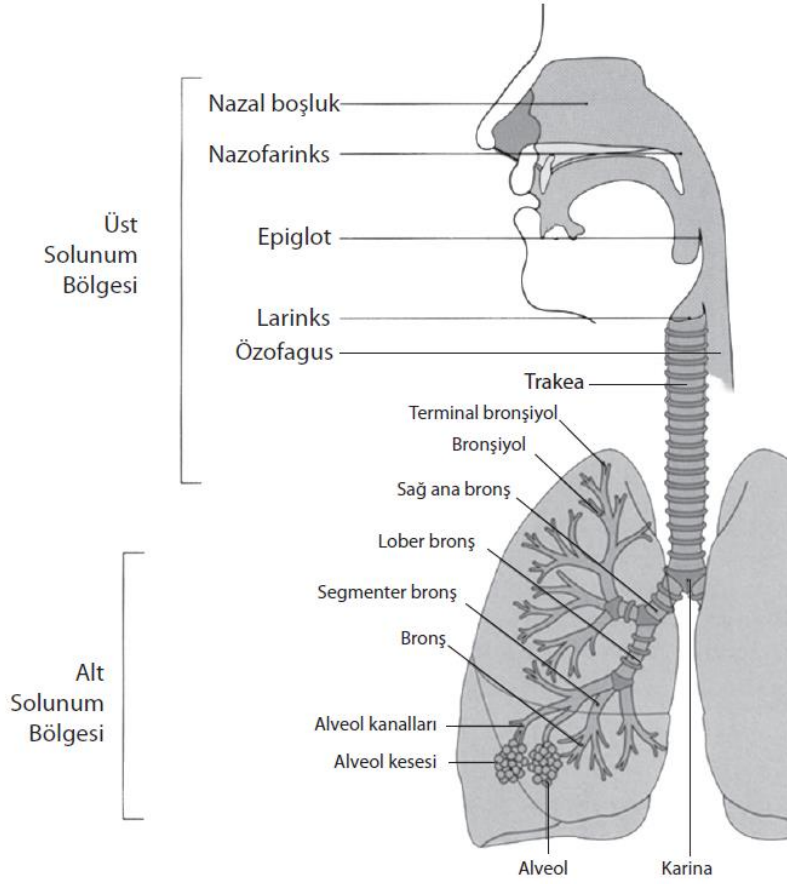
maliyet ve zaman dezavantajları nedeni ile onlara alternatif olarak, elde edilmesi ve uygulanması kolay SVF 'nin inhalasyon hasarında yeni bir tedavi seçeneği olabileceği hipotezi ile bu çalışma yapılmış, SVF'in, inhalasyon hasarı oluşturulmuş sıçanlarda akut akciğer hasarı üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 SOLUNUM SİSTEMİ FİZYOLOJİSİ VE ANATOMİSİ

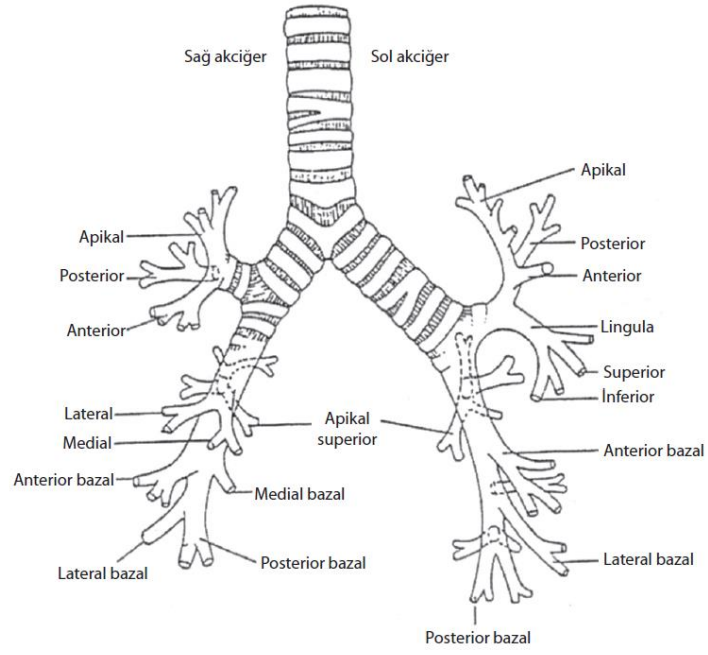
2.1.1 Solunum Sistemi Anatomisi

Solunum sistemi, solunum yoluyla dış ortamdan alınan oksijenin metabolizma sonucu oluşan karbondioksit ile değişimini sağlar. Solunum sistemi üst ve alt solunum bölgesi olarak iki bölümde incelenebilir. Üst solunum bölgesi; nazal ve oral kaviterler, farinks, larinks ve trakeanın başlangıç bölümünden oluşmuştur. Bu düzensiz anatomik sistemin başlıca görevleri: akciğerlere giren havanın ısı ve neminin ayarlanması, partiküllerden temizlenmesi, alt ve üst solunum yolu sekresyonlarının mukosiliyer transportun sağlanmasıdır. Alt solunum bölgesi; trakeanın alt bölümü, iki ana bronş ve akciğerleri barındırır. Alt solunum bölgesine ait yapılar toraks içinde yer alır. Fonksiyonel yönden burun boşluğundan başlayan hava iletimi trakeo-bronşiyal ağaç yoluyla gaz alışverişinin yapıldığı solunum bölgesine kadar uzanır. Gaz alışverişinin yapıldığı solunum bölgesi ise akciğer içinde yer alan uç havayollarını ve alveol sistemini içerir (Şekil 1).



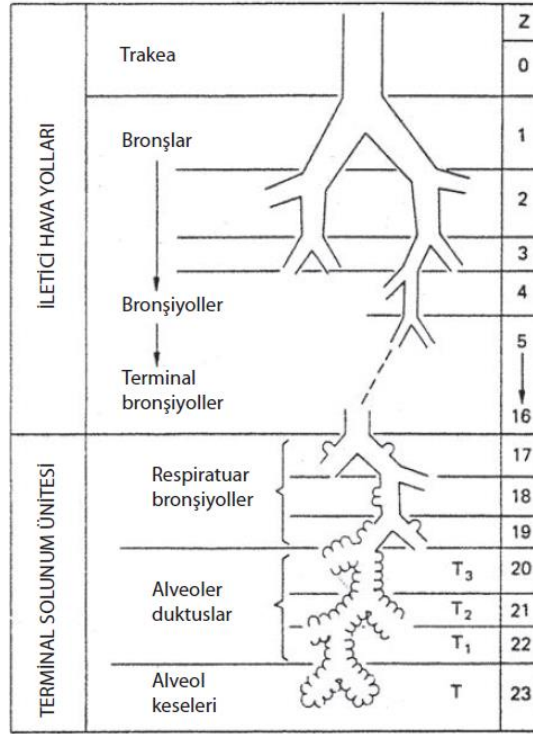
Şekil 1: Üst ve alt solunum yolları

Akciğerler mediasten adı verilen anatomik boşluğun iki yanında yer alır. Hiluslar ile mediastinal yapılara bağlanmışlardır. Hiluslarda bronş, arter, ven, sinir pleksusları, lenf damarları, lenf bezleri ve pulmoner ligament yer alır. Hiluslar dışında akciğerlerin tüm yüzeyleri viseral plevra ile kaplanmış olarak serbest halde bulunur. Akciğer lobları bronş dallanmasına uygun olarak segmentlere ayrılmıştır. Segmentler; kendilerine ait bronşu, arteri ve veni bulunan, fonksiyonel olarak bağımsız akciğer üniteleridir. Bunlar tepesi hilusa, tabanı periferiye doğru yönelik piramit biçiminde yapılardır. Segmentler, en küçük anatomik birim olan ve ince bir bağ dokusu septasıyla birbirlerinden kısmen ayrılabilen 1-2 cm çaplı lobüllerden oluşmuşlardır (Şekil 2).



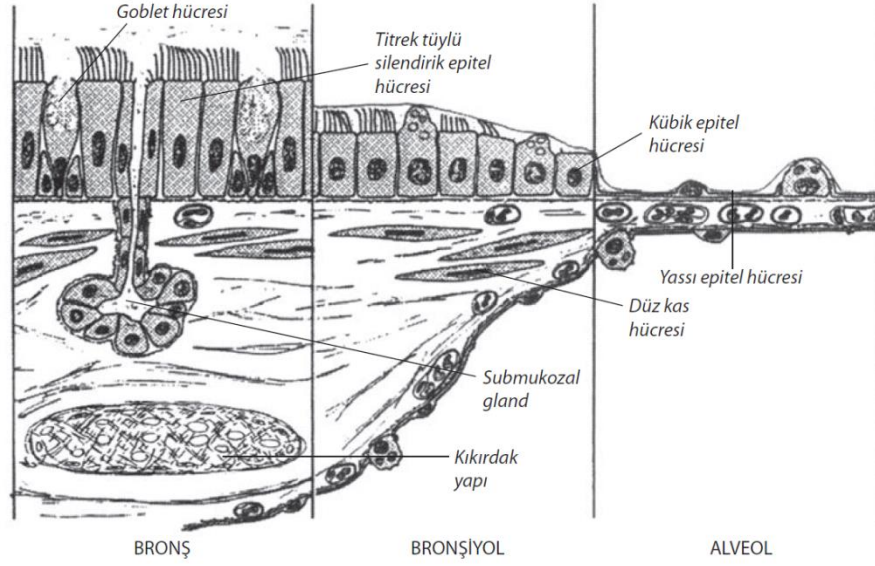
Şekil 2: Trakeobronşiyal ağaç

Solunan hava trakea ve bronş ağacından oluşan alt solunum yolları ile alveol yüzeyine kadar iletilir. Fonksiyonel açıdan bakıldığında havayollarının akciğer parankimi ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Trakeobronşiyal ağaç fonksiyonel açıdan iletilici bölge ve solunumsal bölge olarak ikiye ayrılabilir (Şekil 2). Alt solunum yollarının terminal bronşiyolları da içine alan bölümü, solunum havasının iletilmesini sağlar ve bu nedenle “iletilici bölge” adını alır. Bu saha "anatomik ölü boşluk" olarak da tanımlanır. Terminal bronşiyolların distalinde yer alan respiratuvar bronşiyollar, alveol kanalları ve alveol keseleri havayı hem iletirler, hem de duvarlarında yer alan alveol yapısı ile gaz değişimini sağlarlar. Bu nedenle terminal bronşiyolların distalindeki havayollarına “solunumsal bölge” adı verilir (Şekil 3).

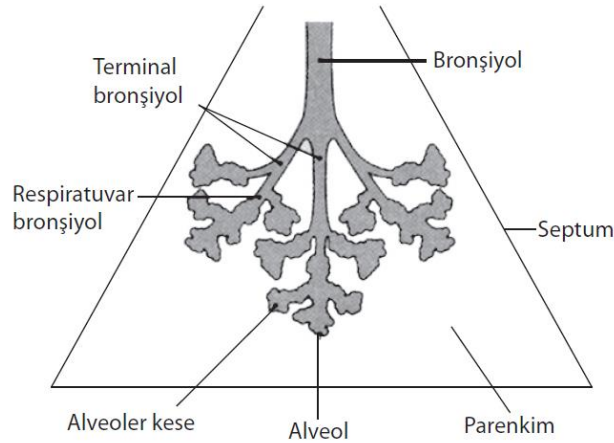


Şekil 3: İletici ve solunumsal bölge

İletici havayolları trakea, bronş ve bronşiyollerden oluşur. Trakea ikiye ayrılarak sağ ve sol ana bronşları oluşturur. Trakea mobildir ve derin inspiryum sırasında boyu hızla değişebilir. Bronkoskopik incelemede trakea bufirkasyonunda her iki ana bronşu birbirinden ayıran ve karşıdan bakıldığında trakea içinde yukarı doğru bıçak sırtı şeklinde uzanan çıkıntıya karina adı verilir. Fibromusküler bir tüp şeklinde olan trakeanın ön ve yan duvarı; 16-20 adet, açıklığı arkaya doğru bakan 'C' şeklinde kıkırdak ile desteklenmiştir. Sağ ana bronş üst lob bronşunu verdikten sonra intermedier (ara) bronş adını alarak aşağıya doğru ilerler. Bronş ağacı trakeadan itibaren “dikotom” tarzında ikiye ayrılarak ortalama 23 dallanma yapar. Lob ve segment bronşlarının yapısı trakeaya benzer. Trakeadan itibaren 10-12. dallanma düzeyinde bronşiyoller, 12-15. dallanma arasında preterminal bronşiyoller bulunur. Bu bronşiyoller “sekonder lobül” adı verilen, fibröz septalarla birbirinden ayrılan, kendilerine ait arter, ven ve bronşiyollerini bulanan en küçük akciğer birimlerini havalandırırlar. Her sekonder lobülde 3-5 terminal bronşiyol bulunur (Şekil 4).



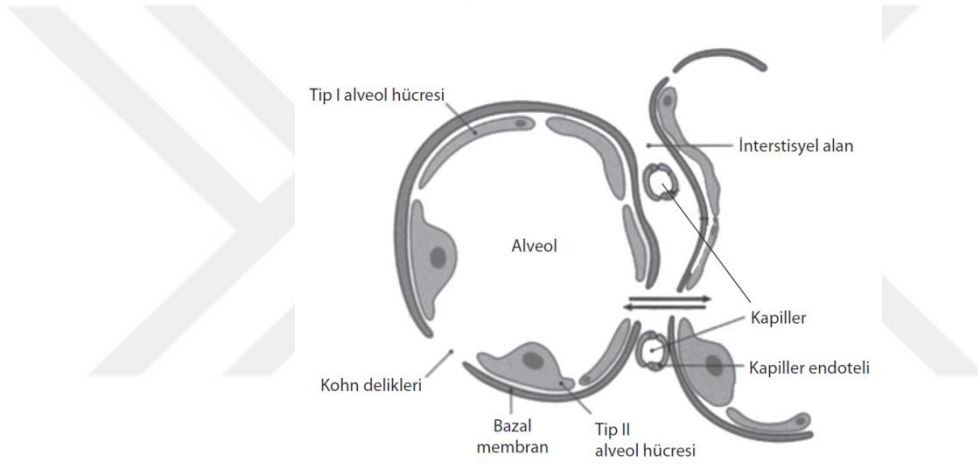
Şekil 4: Proksimal ve distal hava yolları



Şekil 5: Distal hava yolları ve alveol

Terminal bronşiyoller iletilici hava yolları ile solunumsal hava yolları arasında sınır oluştururlar. Her bir terminal bronşiyolün distalinde asinüs adı verilen terminal solunum üniteleri yer alır. Asinus ardışık üç dallanma gösteren respiratuvar bronşiyoller, alveol kanallarını (ductus alveolaris) ve alveol keselerini içerir (Şekil 5). Alveol kanalları duvarlarında düz kas bulunan en uç hava yollarıdır. Respiratuvar bronşiyollerden itibaren hava yolu duvarlarında bulunan alveollerin sayısı giderek artar, alveol kanallarının yüzeyleri tamamen alveollerle kaplanmıştır. Alveoler kanallar iki veya üç alveol kesesine açılırlar. Doğum sırasında 50 milyon civarında

olan alveol sayısı, erişkinde her bir akciğer için yaklaşık 300 milyona ulaşır. Alveol büyüklükleri, yer çekimine bağlı olarak üst akciğer bölgelerinde alt bölgelere göre daha fazladır. Büyüme gelişme sırasında alveollerin sayısındaki artma yanında, toplam alveol yüzeyinde de genişleme olur. Erişkinde 80 m² civarında olan bu yüzey, insan yüzeyinin yaklaşık 40 katıdır. Kapiller yüzeyi ise toplam 70 m² kadar olup, alveol yüzeyinin %85-95'ini kaplamaktadır. Alveol yüzeyinin yaklaşık %90-95'i bazal membran üzerinde örtücü özellikteki Tip-I yassı epitel hücreleri ile kaplanmıştır (Şekil 6). Alveol yüzeyinin genişliği ve alveoler kapiller membranın 0,4 µ kalınlığında oluşu gaz difüzyonuna kolayca olanak sağlar. Alveol köşelerinde yer alan Tip-II epitel hücreleri daha büyük olup, sürfaktan sentezleyen fosfolipidden zengin granüller içerirler.



Şekil 6: Akciğer parankimi ve hücreleri

Tip-II hücreler alveol alanının %5-10'unu kaplamalarına karşılık, pnömositlerin sayıca %60'ını oluştururlar. Birbirine komşu alveollere ait epitel tabakaları arasında kalan bölüme, "alveoller arası septum" adı verilir. Bu septum "interstisyum" adı verilen potansiyel bir aralığı barındırır. İnterstisyel aralıkta kapiller ağı dışında elastik ve kollajen lifler, perisitler, fibroblastlar, monositler, makrofajlar ve bazen de lenfositler bulunur. Sürfaktan alveol epitelyum yüzeyinde bulunur ve alveol söndükçe yüzey gerilimini azaltarak, küçük çaptaki alveollerin atelektaziye uğramalarını önlerler. Sürfaktanın ayrıca interstisyumdan alveollere sıvı sızması için gerekli basıncı yükselttikleri, alveollere sıvı sızması durumunda ise sıvının interstisyuma geri dönmesini kolaylaştırdıkları saptanmıştır. Bu etki alveoler ödem

gelişimini zorlaştırır. Alveollerde epitelyum hücreleri dışında fagositer makrofajlar ve çeşitli mediyatörler salgılayan mast hücreleri bulunur. Alveoler makrofajlar alveol içine ulaşmış toz partiküllerin ve enfeksiyon etkenlerinin fagositozu yanında, dejenere sürfaktanın alveollerden uzaklaştırılmasını sağlarlar. Alveoler hemoraji durumunda aşırı eritrosit fagositozu ve hemoglobın yıkımı nedeniyle aşırı miktarda hemosiderin içerirler.

Alveollerin ventilasyonu bronşiyoller dışında kollateral yollarla da sağlanabilir. Birbirine komşu alveoller arasında gaz geçisi, alveoler septalarda bulunan 2-13µ çapındaki Kohn delikleri (alveoler pore) ile sağlanır. İnspiryumda çapları genişler. Kohn delikleri komşu alveoller arasındaki basıncın dengelenmesinde rol oynadıkları gibi, pnömoni sırasında bakteriyel geçiş nedeniyle enfeksiyonun yayılmasını da kolaylaştırırlar (8-10).

2.1.2 Solunum Sistemi Fizyolojisi

Solunumun amacı, dokulara oksijen sağlamak ve dokularda metabolizma sonucu ortaya çıkan karbondioksiti uzaklaştırmaktır. Bu işlev, akciğerlere hava giriş çıkışını tanımlayan ventilasyon, alveol ve kapiller damarlar arasında oksijen ve karbondiosit gazlarının değişimi olan diffüzyondan oluşur.

Solunum fizyolojisinin temelleri akciğer ve göğüs duvarı mekanik özelliklerine bağlıdır. Akciğerler ve göğüs duvarı farklı elastik özelliğe sahip olup, istirahat ve egzersizde bu elastik özellikler değişkenlik göstermektedir. Akciğerlerin elastik geri kaçma özelliği içe doğru, göğüs duvarının elastik geri kaçma özelliği ise dışa doğrudur. Akciğer ve göğüs duvarında oluşan basınç değişiklikleri sonucunda akciğer hacim değişiklikleri gerçekleşmektedir. İstirahat halindeki akciğer ve göğüs duvarı hacimleri iç ve dış ortam basınçlarında oluşacak değişikliklere bağlı olarak değişikliğe uğrar. Akciğerler göğüs boşluğundan çıkarıldığında sönme (kollabe olma) eğilimindedir ve göğüs boşluğundaki hacmin çok altına iner. İstirahatta, göğüs boşluğunda akciğerlerin sönmemesi burada var olan pozitif transpulmoner basınç ile gerçekleşir. Transpulmoner basınç alveol basıncı ile plevra içi basınç arasındaki farkı tanımlar. Buna göre, akciğerlerin kapanma yönündeki elastik geri kaçma kuvvetine karşın açık kalabilmesi için plevra içi basıncın alveol basıncına göre düşük kalması ile gerçekleşir. Transpulmoner basınç artışına bağlı akciğer hacmindeki artış

doğrusal değildir. Yani akciğerde hacim artışı belli bir düzeyden sonra durur ve eğri plato çizer. Transpulmoner basınçtaki her 1cm H₂ O artışa karşı, akciğerlerin hacim olarak genişleme düzeyi akciğer kompliyansı olarak tanımlanır. Erişkin bir insanın akciğerlerinde 1cm H₂ O basınç artışında 200 ml genişleme gerçekleşir (8-10).

2.2 DUMAN İNHALASYON HASARI

İnhalasyon hasarı, termal ve/veya kimyasal zarar veren maddelerin inhalasyonu sonucu üst solunum yollarını ilgilendiren termal hasar, alt solunum yollarının kimyasal irritasyonu ve zehirli gazların inhalasyonuna bağlı sistemik zehirlenmeden oluşur. Genel olarak, tarihteki yanık trajedileri, bu yaralanma hakkındaki bilimizi önemli ölçüde artırmıştır (11) (Tablo 1).

Tablo 1: İnhalasyon hasarında tarihsel önemli olaylar

1.Dünya Savaşı	Zehirli gazların kullanımı ve akciğerler üzerindeki etkisi
Cleveland Klinik Yangını, 1929	Röntgen filminin dumanının solunmasının zararlı etkisi
Coconut Grove Yangını, 1942	Dumandaki uçucu ürünlerin erken ve geç respiratuar distrese neden olan etkisi
1940'ların ortaları II. Dünya Savaşı	Kan gazı takibi ve yoğun bakımın geliştirilmesi
Vietnam Savaşı, 1960'lar	Alveoler kapiler membran hasarının neden olduğu yetişkin solunum distress sendromunun tanımlanması
1980'ler-1990'lar Las Vegas'taki Otel Yangını ve Kings Cross Yeraltı İstasyonu Yangını	Duman inhalasyon yaralanmasında hava yolu inflamasyonunun etkisinin rolü
Dünya Ticaret Merkezi Saldırısı, 2001	Havayolu epitelinde duman maruziyetinin uzun süreli etkileri
Rhode Island Gece Kulübü Yangını, 2003	Tedavi seçenekleri ve geliştirilmiş ventilatör stratejileri

Duman inhalasyonu, ortaya çıkan şiddetli akciğer hasarı ve sistemik toksisite nedeniyle, alevin neden olduğu termal yaralanmalarda sık mortalite nedenidir (12). İnhalasyon hasarı oluşma sıklığını Tredget %7,3 (2), Barrow (3) ise %28,1 olarak

bildirmiştir. Duman inhalasyonu sonucu ortaya çıkan hasar solunulan havanın direkt termal etkisine, hipoksik gaz inhalasyonuna, inhale edilen dumanın içeriğindeki toksik maddelerin lokal etkisine ve inhale edilen toksik maddelerin sistemik etkilerine bağlı olarak ortaya çıkar (13, 14).

Hasarın artmasına katkıda bulunan diğer patofizyolojik değişiklikler şöyle özetlenebilir; solunan havadaki kimyasal iritanlar ile nöronal hücrelerden nöropeptid ve nöronal Nitrik Oksit Sentaz (NOS) salınımı tetiklenir. Artan ısı solunum epitel hücrelerini tahrip ederek proteinlerin denatürasyonuna ve kompleman kaskadının aktivasyonuna neden olur. Bu durum pro-inflamatuar sitokinlerin ve vasküler permeabilitenin artmasına yol açar (4). Pulmoner kompliansta %50'lere ulaşabilen önemli azalma, ilk 24 saatte ekstravasküler akciğer sıvısı ve pulmoner lenf akımında artma ile ilişkilidir. Sürfaktanın inaktivasyonu ile ventilasyon perfüzyon uyumsuzluğuna neden olan akut mikro-atelektaziler oluşur (15). Siliyalı epitelin destrüksiyonu ve duman inhalasyonu ile siliyer transport fonksiyonu hasarlanır; dökülmüş bronşiyal epitel hücreleri, mukus, fibrin ve nötrofillerin oluşturduğu debris daha hızlı birikir (16). Mikrovasküler sızıntı ile artan havayolu kan akımı, bronşiyal sirkülasyondan kapiller filtratı arttırabilir ve inhalasyon injurisinin pulmoner ödeme katkıda bulunabilir (17). Genel olarak önemsiz olan bronşiyal ve pulmoner dolaşımlar arasındaki anastomozlar, duman inhalasyon hasarından sonra belirginleşir. Duman inhalasyonundan 3 saat sonra kan akımı, trakeada 10 kat, sol ana bronşta 15 kat ve sağ ana bronşta 20 kat artar. Distal hava yollarında kan akışı, sağ akciğerde yaklaşık 4 kez ve sol akciğerde 6 kez artmıştır (18, 19) . Artan hava yolu kan akışı, hava yolunda mukozal ödeme, protein açısından zengin sıvının hava yoluna eksüdasyonuna, nötrofil ve inflamatuvar mediatörlerin artmasına neden olur. Bu yanıtlar artmış hava yolu direnci, alveollere hava akışının kısıtlanması, fibrin pıhtı ve döküntü oluşumu, solunum yollarında sıvı birikmesi, parankimal ödem ve parankimal inflamasyon ve hasarın alevlenmesi ile sonuçlanır. Obstrüktif hava yolu döküntüleri, pul pul yayılmış hava yolu epitel hücreleri, inflamatuvar hücreler, mukus ve protein açısından zengin plazma eksüdatlarından oluşur. Yoğun duman inhalasyon hasarı olan prelinik bir modelde, bronş epitel hücrelerinin yaklaşık %100'ü maruziyetten 24 saat sonra pul pul dökülmüştür (20). Hava yolu bütünlüğünün bozulması, solunum sistemini enfeksiyona karşı savunmasız hale getirir ve plazma sızıntısını ve inflamatuvar hücrelerin hava yollarına transendotelial göçünü artırır.

Yapılan çalışmalar, nötrofillerin bronşiyal mukus bezlerinden solunum yollarına göç ettiğini öne sürmektedir (21). Duman inhalasyonundan sonra hava yoluna sızan protein açısından zengin plazma, hava yolunda fibrin oluşumunu destekleyen, dökülmüş substratları katılaştıran ve çıkarılmasını zorlaştıran prokoagülan faktörler içerir. Duman inhalasyonu sonrası alveoler makrofajların kemotaktik ve fagositik fonksiyonlarında bozulma, akut olaydan sonraki birkaç günde pulmoner enfeksiyon riskini artırır (16). İnhalasyon hasarından, sıklıkla ev yapım malzemeleri ve evde sık kullanılan nesnelerin yanması ile meydana gelen çeşitli toksik kimyasallar sorumludur (Tablo 2). Yangından ölenlerin kanında elliden fazla kimyasal gösterilmiştir. Yanmaya bağlı polivinil klorür (PVC), hidroklorik asit (HCL) ve karbonmonoksiti (CO) içeren en az 75 potansiyel toksik bileşik tariflenmiştir (15).

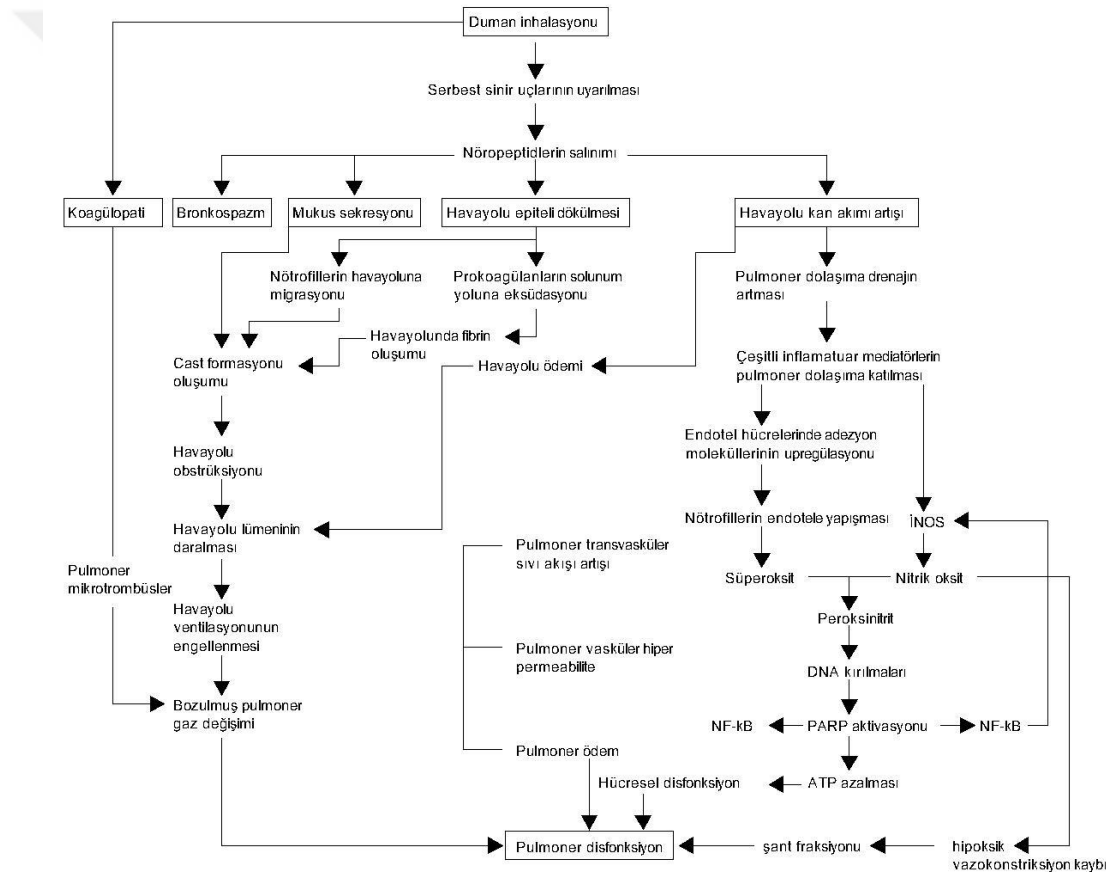
Tablo 2: Yanmaya bağlı dumanda sık görülen toksik elementler

Kaynak	Toksin
Herhangi bir organik madde	Karbonmonoksit
	Karbondioksit
	Azotdioksit
Ağaç, duvar kağıdı	Aldehitler
Naylon	Amonyak
Petrol Plastikleri	Benzen
	Hidrojen klorür
Polivinil Klorür	Karbonil klorür

Dumana maruz kalma şekline ve süresine göre, bu olumsuz etkiler hem üst, hem de alt solunum yollarında farklı şiddetlerde hasar oluşturur (14). Duman inhalasyonundan sonra larinks ödemi ilk 2-8 saatte ortaya çıkar. Alt solunum yollarında ise, derin parankimal hasar 12-96 saat sonra belirginleşir. Oluşan ilerleyici trakeobronşiyal ve pulmoner ödem, vasküler permeabilite artışının bir sonucudur (22). Akut Respiratuar Distress Sendromu (ARDS) termal yaralanmaların en önemli komplikasyonlarından biri olup, şiddetli akciğer yaralanması ile ortaya çıkan akut bir klinik tablodur. Kardiyojenik olmayan akciğer ödemi, şiddetli hipoksi ve akciğer kompliyansında azalma ile karakterizedir (23). Birçok faktör pulmoner fonksiyonu etkiler. Toplam vücut alanının %30'undan fazlasını etkileyen yanık durumunda

artmış kapiller permeabilite sadece yanan bölgede değil, akciğerler de dâhil tüm vücutta sistemik olarak ortaya çıkar. Vasküler permeabilite artışı ile dolaşımdan hücreler arası alana büyük miktarlarda plazma geçişi olur. Bu da termal yaralanma ile birlikte olan inhalasyon hasarını artırır (24, 25). Dumanın içerisinde değişik miktarlarda bulunan toksik maddeler, havayollarına yaptıkları etki ile polimorfonükleer lökositleri aktive ederek akut inflamatuvar süreci başlatır (26). Aktive olmuş lökositler, duman inhalasyonu patofizyolojisinde önemli rol oynarlar (27) (Şekil 7).

Şekil 7: İnhalasyon hasarı patofizyolojisi



2.2.1 İn hale Edilen Dumanın Etki Şekilleri

İnhale edilen duman 4 yolla hasar oluşturabilir (14).

2.2.1.1 Termal Hasar

Dumanın ısı taşıma kapasitesi düşük olduğu için hasar genellikle üst hava yollarında gözlenir. Larinks altı anatomik yapılarda nadiren termal hasar oluşur. Ancak, uzun süre ve yüksek akımlı dumana maruz kalınırsa, larinks altı dokularda da hasar oluşabilir. Dumana göre ısı taşıma kapasitesi çok yüksek olan su buharına maruziyetle alt hava yollarında da hasar oluşturabilir.

Larinks yukarısı anatomik bölge mukozasının, önemli ölçüde su içermesi nedeniyle, bu bölge ısı kontrolü açısından büyük bir kapasiteye sahiptir. Direk termal etki ile su içeren mukoza su kaybına uğrar ve ısı kontrolüne etkisi ortadan kalkar. Üst solunum yollarında ortaya çıkan hasar mukozada eritem, ödem ve ülserasyonla karakterizedir. Ayrıca etkilenen alanlarda kanama ve obstrüksiyon riski de vardır (14,16).

2.2.1.2 Lokal Toksinlerle Hasar Oluşumu

Duman içerisindeki toksinler ve serbest oksijen radikalleri, damar endotel hücrelerinden pro-inflamatuar olarak adlandırılan, histamin, platelet aktive edici faktör (PAF) ve lökotrienB4 (LTB4) gibi kemotaktik ajanların salınımına yol açarlar (28). Gaz değişiminin gerçekleştiği akciğer parankimindeki kapiller damar endoteli de duman inhalasyonundan etkilenir (14). Bu ajanlar ortama polimorfonükleer lökositlerin gelmesine ve akut inflammatuar tabloya yol açarlar. Sonuçta mukoza hasarı, bronşiyal daralma, kapiller permeabilite artışı, lenfatik akım ve mukosilier aktivitede değişiklikler, sürfaktan salgılayan Tip2 pnömosit hasarı, havayolu tıkanması ve atelektaziler meydana gelir. Bu olaylar zinciri, birbirleri ile ilişkili olup, akut solunum yetmezliğine giden tabloyu hazırlar. Semptomlar 24. saate ortaya çıkar ve ARDS tablosu gelişebilir. Daha geç dönemde sekonder akciğer enfeksiyonu da klinik tabloya eklenebilir (5). Özet olarak, akut solunum yetmezliğinin gelişimine neden olan, hava yolu tıkanması, atelektazi ve pulmoner ödemin asıl nedeni, duman içinde bulunan toksik kimyasal ajanlardır (26).

2.2.1.3 Sistemik Toksinlerle Hasar Oluşumu

Yanma olayı gerçekleşirken havadaki oksijen miktarı giderek azalır. İn hale edilen havada oksijenin azalması, karbondioksitin artması hipoksi ile sonuçlanır ve akut dönemde mortaliteyi önemli ölçüde artırır (26). Solunan havadaki oksijen oranı (FiO_2) yanan madde ve ortama göre %13-15 oranına kadar düşebilir ve %10'un altına inerse dumana maruz kalan kişilerde, dispne ve sersemlik meydana getirir. %5'in altına inerse; mental konfüzyon, uykuya meyil, koma ve hatta ölüm meydana gelebilir (14).

Sistemik toksisite yönünden iki gaz çok önemlidir; bunlar inkomplet yanmanın ürünleri olan karbonmonoksit (CO) ve siyanid (CN)'tir. Her iki maddenin inhalasyonu da yüksek mortalite ve morbidite riski taşır. Yanan binalarda her yerde bulunan, görünmeyen ve kokusuz bir gaz olan CO'nun, hemoglobine olan afinitesi oksijene göre 200 kat fazladır. Karbonmonoksit maruziyeti sonrası, CO derhal hemoglobine bağlanarak O_2 taşıma kapasitesinde ileri derecede azalmaya, oksihemoglobin disosiyasyon eğrisinin eş zamanlı sola doğru kaymasına ve dolayısı ile şiddetli doku hipoksisine neden olur (15). Karboksihemoglobin (COHb) seviyesi %20'yi geçince semptomlar ortaya çıkmaya başlar, %60'ı geçince de hayati risk oluşturur. Düşük veya normal CO seviyesi, inhalasyon hasarının varlığını ekarte ettirmez. Hastalar, COHb seviyesi %0 olana kadar %100, O_2 almalıdırlar (29).

Siyanid toksisitesi, hücre içi solunumu bozar; siyanid sitokrom oksidaz enzimini geri dönüşümlü olarak inhibe eder ve doku anoksisine neden olur. Aerobik glikolitik yol inhibisyonu sonucu metabolizma alternatif anaerobik yollara yönlendirilir ve sonuçta asit içerikli ürünler ortaya çıkar (30). Siyanid intoksikasyonunda, hasarı sınırlamak için bazı antidotlar kullanılabilir. Nitratlar hemoglobin oksidasyonunu artırır ve methemoglobine çevirir, oluşan methemoglobin sitokrom oksidazla birleşerek siyanidin bu enzimi inhibe etmesini önler. Sodyum tiyosülfat, mitokondrial enzim rodenaz varlığında, siyanidesülfür grubu taşıyarak tiyosiyanat oluşturur ve tiyosiyanat idrarla atılır. Diğer yandan bir şelat olan hidrosikobalamin siyanidle reaksiyona girip siyanokobalamin oluşturarak siyanidin toksik etkisini önler (31).

Sistemik toksinlerden etkilendiği düşünülen hastaların değerlendirilmesinde arteriyel kan gazı takibi önemlidir. Kan gazı örneklerinde parsiyel oksijen basıncında

(PaO_2) düşme ve metabolik asidoz önemli kriterlerdir. Karbonmonoksit intoksikasyonunda rutin arteriyel kan gazı analizinde PaO_2 , oksijen saturasyonu (SatO_2) ve parsiyel karbondioksit basınç (PaCO_2) seviyesi normal, hatta O_2 uygulaması yapılmış hastalarda PaO_2 seviyesi yüksek bulunabilir. Bu nedenle yaralanmadan hemen sonra ölçülen kan COHb düzeyi, CO intoksikasyonunun değerlendirilmesinde önemlidir. Yaralanmadan sonra tespit edilen COHb değerinin %15'in üzerinde olması CO intoksikasyonu tanısını koydurur. Oda havasında CO'nın yarılanma ömrü, 240-250 dakika iken, %100 O_2 tedavisi ile bu süre 40-60 dakikaya düşürülebilir. Ayrıca hiperbarik oksijen tedavisi ile nörolojik hasarın azaldığı gösterilmiştir (32). Karbonmonoksit eliminasyonunun diğer bir yolu da entübe hastalara mekanik hiperventilasyon yaptırılarak respiratuar alkaloz oluşturmaktır. Hiperventilasyon, COHb yarılanma süresini de kısaltarak intoksikasyonun zararlı etkilerini azaltır (33, 34).

2.2.2 Duman İnhalasyon Hasarını Etkileyen Faktörler

Duman inhalasyonu sonrası solunum sisteminde ortaya çıkan hasarın şiddeti, dumana ve hasara uğrayan organizmaya ait bazı faktörlere göre değişir. Bunlar:

1) Duman içeriği

Gaz: Karbonmonoksit, siyanit, asit ve aldehytleri içerir. Oksidanlar da gaz fazında bulunur. Siyanit ve CO sistemik toksisite yaparken; asit, aldehyt ve oksidanlar daha çok lokal hava yolu hasarı meydana getirir.

Partikül: Dumanın içerdiği partiküllerin oluşturduğu hasar, partikül büyüklüğüne ve hastanın nefes alma özelliğine bağlıdır. Yanan materyalin türüne göre partikül büyüklüğü 0,1–15 μm arasında değişmekle birlikte ortalama 3–5 μm 'dir. Beş μm 'nin üzerindeki partiküller nazofarenkste tutulur ve distale geçişleri önlenir. Daha küçük partiküller ise alveollere kadar ulaşabilir.

2) Dumana maruziyet süresi ve solunan duman miktarı

3) Akciğerlerin hasar öncesi durumu

Başlangıçtaki ve geç dönemdeki hasarın derecesi çoğunlukla akciğerin hasar öncesi durumu ile ilişkilidir. Akciğerde kronik değişiklikleri olanlar (sigara içicileri, kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlar vb.), sağlıklı akciğeri olanlara oranla duman hasarına daha duyarlıdır.

2.2.3 Duman İnhalasyonu Düşünülen Hastaların Değerlendirilmesi ve Tedavisi

2.2.3.1 Hastaların Değerlendirilmesi

Tüm kapalı ortam yanıklı hastalarda duman inhalasyon hasarından şüphelenilmelidir. Yüz yanığı, oral mukoza ve burun kıllarının yanmış olması, kurumlu balgam, wheezing ve oskültasyonda ral alınması, inhalasyon hasarını düşündüren ilk bulgulardır. Yine kapalı ortam yanığı olan bir hastada bilinç bulanıklığının olması karbonmonoksit intoksikasyonunu akla getirmelidir ve aksi ispatlanana kadar duman inhalasyon hasarının varlığı kabul edilmelidir. Birçok tanı yöntemi inhalasyon hasarının değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır. Akciğer grafisi duman inhalasyonu şüphesi olan hastaların değerlendirilmesinde erken dönemde tanı için değil, takip için değerli bir tetkiktir. Erken dönemde, hatta yedinci güne kadar, duman inhalasyon hasarı olsa dahi akciğer grafileri normal olabilir. Normal akciğer grafisi akut inhalasyon yaralanması olmadığını göstermez; ancak erken dönemde infiltrasyonların görülmesi şiddetli inhalasyon hasarının kanıtıdır ve prognozun daha kötü olacağının işareti kabul edilebilir. Akciğer grafisi subakut ve kronik dönemde ortaya çıkan infiltrasyonların ve sekonder akciğer enfeksiyonlarının değerlendirilmesinde ve takibinde yararlıdır (14).

Üst solunum yollarının değerlendirilmesinde fiberoptik bronkoskopi standart bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Şüpheli inhalasyon yaralanması sonrasında ilk 18-24 saatte yapılan bronkoskopik değerlendirmede trakeobronşiyal sistemde eritem, hiperemi, ödem, mukoza nekrozu, kurumlu balgam gibi bulguların saptanması inhalasyon yaralanması tanısı lehinedir.

Alt hava yollarının değerlendirilebilmesi amacı ile Xe133 akciğer ventilasyon sintigrafisi ve solunum fonksiyon testleri kullanılabilir. Sintigrafide havalanmayan akciğer alanları tespit edilebilir. Solunum fonksiyon testinde zorlu vital kapasitenin düşmesi, alt havayolları hasarının değerlendirilmesinde önemlidir (27). Bu bulguların görülmesinden saatler sonra pulmoner ödem ortaya çıkar (9).

Solunum fonksiyon testleri meydana gelen hasarın fizyopatolojisini ortaya koyması yönünden yararlı olabilir. Tekrarlanan testler akciğer kapasitesindeki azalmayı ve havayollarındaki obstrüksiyonu ortaya koyar. Ancak ağrı, zayıf

hasta kooperasyonu, kas güçsüzlüğü, hastaya uygulanan sedatif ilaçlar gibi birçok faktör bu testlerin uygulanmasını güçleştirir (5).

2.2.3.2 Tedavi

Tedavi algoritması tabloda görülmektedir (Tablo 3).

Tablo 3: İnhalasyon hasarı tedavi algoritması

Problem	Tedavi
Hipoksi	O ₂ desteği
Bronkore, bol sekresyon	Solunum fizyoterapisi, nazotrakeal aspirasyon
Yoğun sekresyon	Humidifikasyon, nazotrakeal aspirasyon
Wheezing	Tanışal bronkoskopi
Bronkospazm	Nebülize beta-agonist

2.2.3.2.1 Havayolu

İnhalasyon hasarı yönetiminde ilk önce daima havayolu açıklığı ve ventilasyon yeterliliği değerlendirilir. Kaza yerinde entübasyon gerekebilir. Oksijen erken tedavinin önemli bir bileşenidir. Karbonmonoksitin hemoglobine yüksek afinitesi nedeni ile yüksek PO₂ değerleri, COHb yarı ömrünü kısaltarak oksijenasyonu artırır (15).

Akut üst hava yolu obstrüksiyonu, hastaneye yatırılan inhalasyon hasarlı yanık mağdurlarının yaklaşık 1/5 ile 1/3'ün de oluşur. Hafif farengeal ödemden asfiksi ile tam üst hava yolu obstrüksiyonuna hızla ilerleme olasılığı nedeni ile ciddi bir tehliktir. Üst havayolu obstrüksiyonundan şüphelenildiğinde, endotrakeal entübasyon yapılmalıdır (15).

CO zehirlenmesi varsa, tedavi için ilk olarak, yüksek konsantrasyonda nemlendirilmiş O₂ ile CO'nun elimine edilmesine odaklanılmalıdır. Alveoler hipoventilasyon varsa mekanik ventilator gereklidir. Küçük hava yollarının premature kapanmasıyla oluşan bronşiyolit ve alveolitten kaynaklanan hipoksemi nedeni ile de O₂ uygulanması önemlidir (16).

2.2.3.2.2 Bronşiyal Hijyen Terapisi

Hava yolunu temizleme yöntemleri, duman inhalasyonlu hastaların solunumsal yönetiminin temel bir komponentidir. Bronşiyal hijyen terapisi bu amacı gerçekleştirmek amacıyla tanımlanan birçok modalite için kullanılan bir terimdir. Terapötik öksürük, göğüs fizyoterapisi, erken ambulasyon, havayolu aspirasyonu, terapötik bronkoskopi ve farmakolojik ajanlar, retansiyone sekresyonların çıkartılmasında etkilidir (35).

2.2.3.2.3. Terapötik Öksürük

Öksürük reflex veya istemli olarak yapılabilir. Öksürük mekanizmalarının yetmezliği, ağrı, ilaçlar veya artifisyel hava yolu nedeni ile olabilir. Bu oluştuğunda, istemli öksürüğü iyileştirme ve havayolu temizliğine yardımcı olmada kullanılabilecek tekniklerin uygulanması sıklıkla zorunludur. Öksürme ve derin soluma, sekresyonların çıkartılmasına yardım için her 1-2 saatte bir teşvik edilir (15).

2.2.3.2.4 Göğüs Fizyoterapisi

Göğüs perküsyon ve vibrasyonu ve yerçekimi yardımıyla bronşiyal drenajın sağlanmasıdır. Çalışmalar, tekniklerin kombinasyonunun sekresyon çıkartılmasında etkili olduğunu göstermiştir. Entübe hastalarda, postüral drenajla hafif endotrakeal aspirasyon, pulmoner temizliği kolaylaştırmak için yapılmalıdır. Ancak Trendelenburg pozisyonu verilmesi ve diğer çeşitli pozisyonlar akut olarak hipoksemiye arttırabilir. Yoğun bakım ünitelerinde, sekresyonların mobilize edilmesi için her 2 saatte bir hastaların sağ yan ve sol yan pozisyona getirilmesi aynı amacı sağlar (15, 16).

2.2.3.2.5 Hava Yolu Aspirasyonu

Trakeobronşiyal aspirasyon, hava yolunu temizlemenin bir diğer metodudur. Nazotrakeal aspirasyon, hastanın spontan öksürüğü veya daha az invaziv işlemlerle çıkarılamayan, trakeada biriken sekresyonlar ve diğer yabancı materyallerin çıkartılmasını içerir. Hasta re-oksijene edilmeden, 15 saniyeden fazla aspire edilmemelidir. Aspirasyon potansiyel olarak tehlikesiz değildir. Komplikasyonlar, kanama ile nazotrakeal mukozanın irritasyonu, PO₂'de ani düşme, vagal stimülasyon ve bradikardiyi içerir (15).

2.2.3.2.6 Terapötik Bronkoskopi

Tüm diğer teknikler sekresyonların çıkartılmasında yetersiz kaldığı zaman, fiberoptik bronkoskopinin yararlı olduğu gösterilmiştir. Tanıya yönelik fonksiyonlarına ilaveten, bronkoskopi önemli bir terapötik uygulamadır. Daha konservatif metotlar başarısız kaldığında inhalasyon hasarlı hastalarda karşılaşılan bol sekresyon, tekrarlanan bronkoskopik işlemleri gerektirebilir (15).

2.2.3.2.7 Erken Ambulasyon

Erken ambulasyon, solunumsal komplikasyonları önlemenin bir diğer etkili yöntemini oluşturur. Analjeziklerin uygun kullanımı ile ventilatör desteği devam eden hastalar yatak dışına bile alınabilir ve sandalyeye yerleştirilebilir. Oturma pozisyonu birçok faydaya sahiptir; hasta normal olarak hiperventile olan akciğer bölgeleri ile soluyabilir, kas gerginliği ve tonüsü korunur, kontraksiyonlar korunur ve egzersiz toleransı devam eder (15).

2.2.3.2.2 İlave Farmakolojik Tedaviler

2.2.3.2.2.1 Bronkodilatörler

Bazı olgularda faydalıdır. Hava yollarının inhalasyon hasarında, “wheezing” ve bronkospazm yapan kimyasallar, trakeobronşit oluşturabilirler. Bu, özellikle eşlik eden reaktif hava yolu hastalığı olanlarda (astım, kistik fibrozis, sigara içimi gibi) daha dikkat çekici olabilir. Bronkospazmın tedavisinde kullanılan çoğu ilacın, bronşiyal kas tonüsünü kontrol eden biyokimyasal mekanizmaları aktive ettiğine inanılır. Aerosolize semptomimetikler iki yolla etkilidir; bronşiyal kas gevşemesini sağlarlar ve mukosiliyer temizlenmeyi uyarırlar. Daha yeni bronkodilatörler, daha etkilidir ve eski jenerasyon ilaçlardan daha az yan etkiye sahiptirler (15, 16).

Albuterolün devamlı nebulizasyonu, kombine yanık ve duman inhalasyon hasarı modelinde, hava yolu temizliğini sağlayarak ve sıvı değişimini azaltarak pulmoner fonksiyonları iyileştirir (36).

2.2.3.2.2.2 Kortikosteroidler ve Antibiyotikler

Kortikosteroidler ve antibiyotikler, duman inhalasyonunu takiben akciğer ile ilişkili morbidite ve mortaliteyi değiştirmez. Yanık mağdurlarında uzun süre kullanımı enfeksiyona yatkınlığı artırır. Ayrıca güncel bilgiler, profilaktik antibiyotik kullanımını desteklememektedir ve sadece dirençli organizmalarla enfeksiyona

predispozisyon oluşturabilirler. Steroidler, yalnızca refrakter bronkospazm veya sekresyonlar bulunduğu endike olabilir.

2.2.3.2.2.3 Rasemik Epinefrin

Aerosol yöntemi ile topikal vazokonstriktör, bronkodilatör ve mukolitik olarak kullanılır. Kalpatımı aşırı artmadıkça her 2-4 saatte bir uygulanır (15).

2.2.3.2.2.4 İnhaler N-asetilsistein

Kuvvetli bir mukolitik ajandır. Aynı zamanda solunum yolu için bir irritandır. Mukozal değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle, hastalar bronkospazm bulguları için değerlendirilir ve gerekliyse bir bronkodilatör ilave edilebilir (15).

2.2.3.2.2.5 Heparin/N-asetilsistein Kombinasyonu

Dumadaki kimyasallarla direkt olarak veya araşidonik kaskaddaki ürünlerin biri veya birkaçıyla alveoler makrofajlar aktive olduğu zaman üretilen serbest oksijen radikallerinin temizlenmesinde yararlıdır. Desai ve ark.nın retrospektif çalışmasında, inhalasyon hasarlı çocuk hastalarda heparin/N-asetilsistein kullanımının, atelektazi insidansı, reentübasyon ve mortalite oranlarını azalttığı gösterilmiştir (37). Böbrek yetmezliği veya hipovolemik şoka bağlı ölümler bile görülebilir (38, 39).

2.2.3.2.2.6 Mekanik Ventilasyon

İnhalasyon hasarı yönetiminde konservatif yaklaşımlar, entübasyon ve pozitif basınçlı ventilasyondan kaçınma da önemlidir. Ventilatör desteği zorunluysa kontrollü hiperkapni ve sınırdaki yeterli oksijen düzeyi ile baro ve volüm travmadan korunma tercih edilebilir.

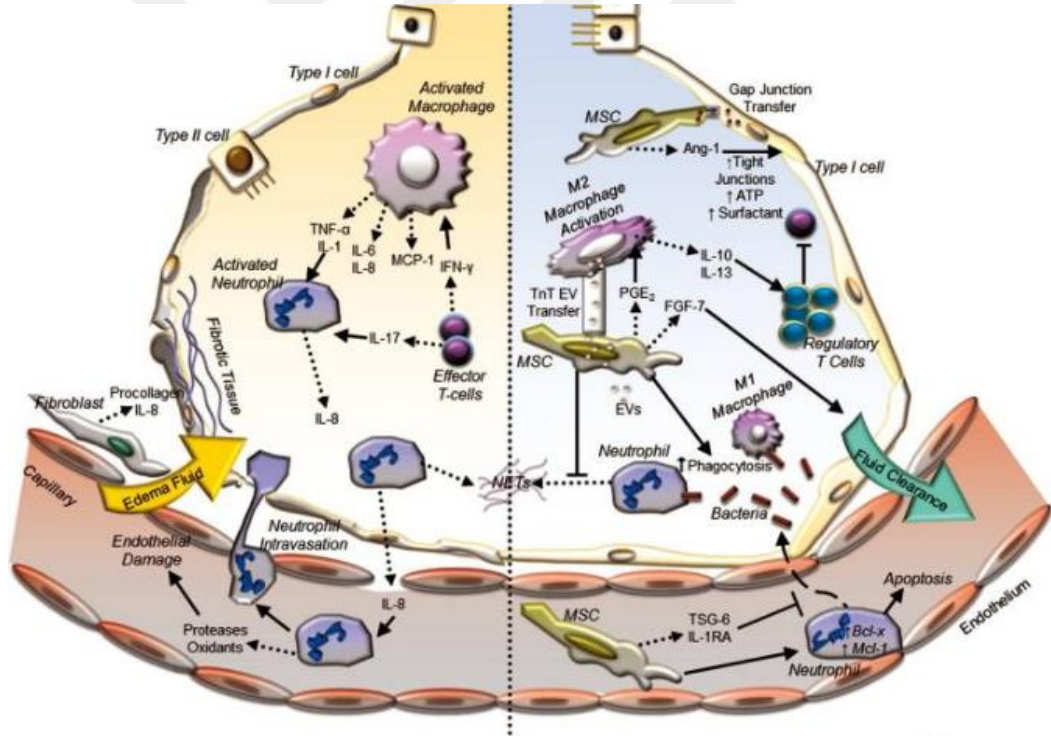
Geçen 40 yılda, özellikle son 10 yıl boyunca, duman inhalasyonlu hastaların tedavisi için alternatif olarak bulunan yeni ventilator modlarında artış vardır. Maalesef, klinisyenler için mevcut seçeneklerin sayısı artıyor gibi görünse de, her bir ventilasyon modunun spesifik rolünü tanımlayan yeterli kontrollü çalışmalar ve ventilasyon modlarının karşılaştırmalı çalışmaları henüz mevcut değildir. Prensip olarak kabul edilebilir bir oksijen satürasyonu hedeflenmelidir.

2.2.3.2.2.7 Sıvı Resüsitasyonu

İnhalasyon hasarının yönetiminde, erişkinlerde 30-50 mL/saat, 30kg ve daha düşük ağırlıklı çocuklarda saatte 0,5-1,0 mL/kg idrar çıkışı, hastaya uygulanan uygun sıvı resüsitasyonunun en iyi göstergesidir(40).

2.3 AKUT AKCİĞER HASARI VE AKCİĞER İNFLAMASYONU

Akut akciğer hasarı, hipoksemiye, kompliyans kaybına ve pulmoner ödeme neden olan şiddetli bir hasar olarak tanımlanır. Bazı durumlarda ARDS'ye ve çoklu organ yetmezliğine ilerler ve hastaların % 30 45'inde ölümle sonuçlanır (41). Pnömoni, major cerrahi, sistemik enfeksiyon ve inhalasyon hasarı gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak akut akciğer hasarı gelişebilir. Nedeni ne olursa olsun patofizyolojik mekanizma benzerdir. Şiddetli akciğer inflamasyonu, nötrofil ve makrofajların alveolar alana yayılmasına neden olur, bu da IL-6, IL-1 β , IL-8 ve TNF- α gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi ile birlikte, endotelial ve epitelyal akciğer tabakalarına zarar verir (42). Bu inflammatuar ortam reaktif oksijen radikallerinin üretimini artırır, akciğerin bariyer fonksiyonu bozar, vasküler geçirgenlik ve ödem artar. Bu durum uzarsa pulmoner fibrozis ile sonuçlanabilir (Şekil 8).

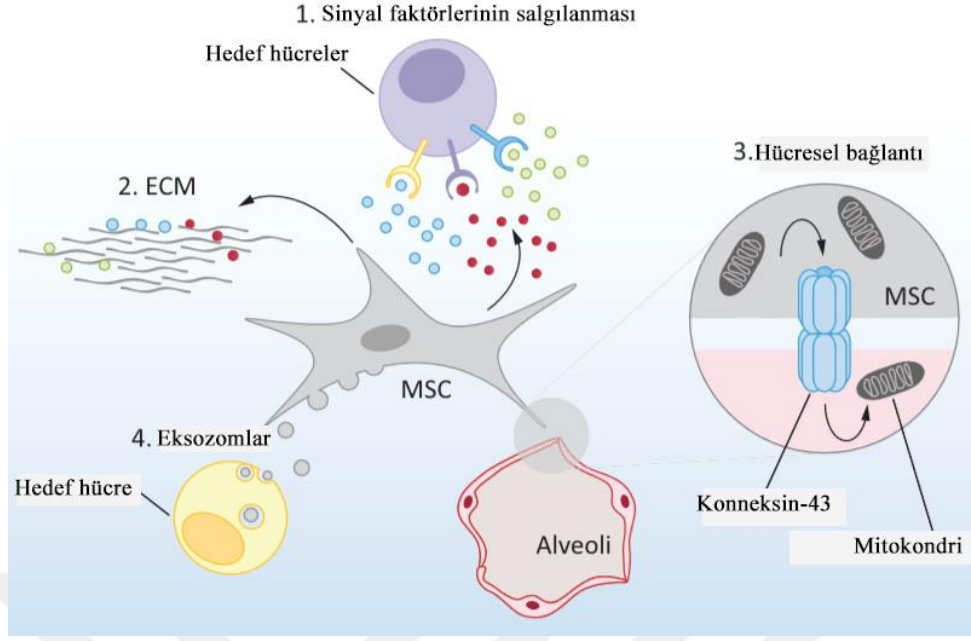


Şekil 8: Akciğer inflamasyonunda mezenkimal kök hücrelerin etki mekanizması

2.4 KÖK HÜCRELER

Kök hücre, bir canlının vücudunda bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen ve bu sayede farklılaşmış hücreler oluşturabilen hücrelerdir. İlk kök hücre izolasyonu

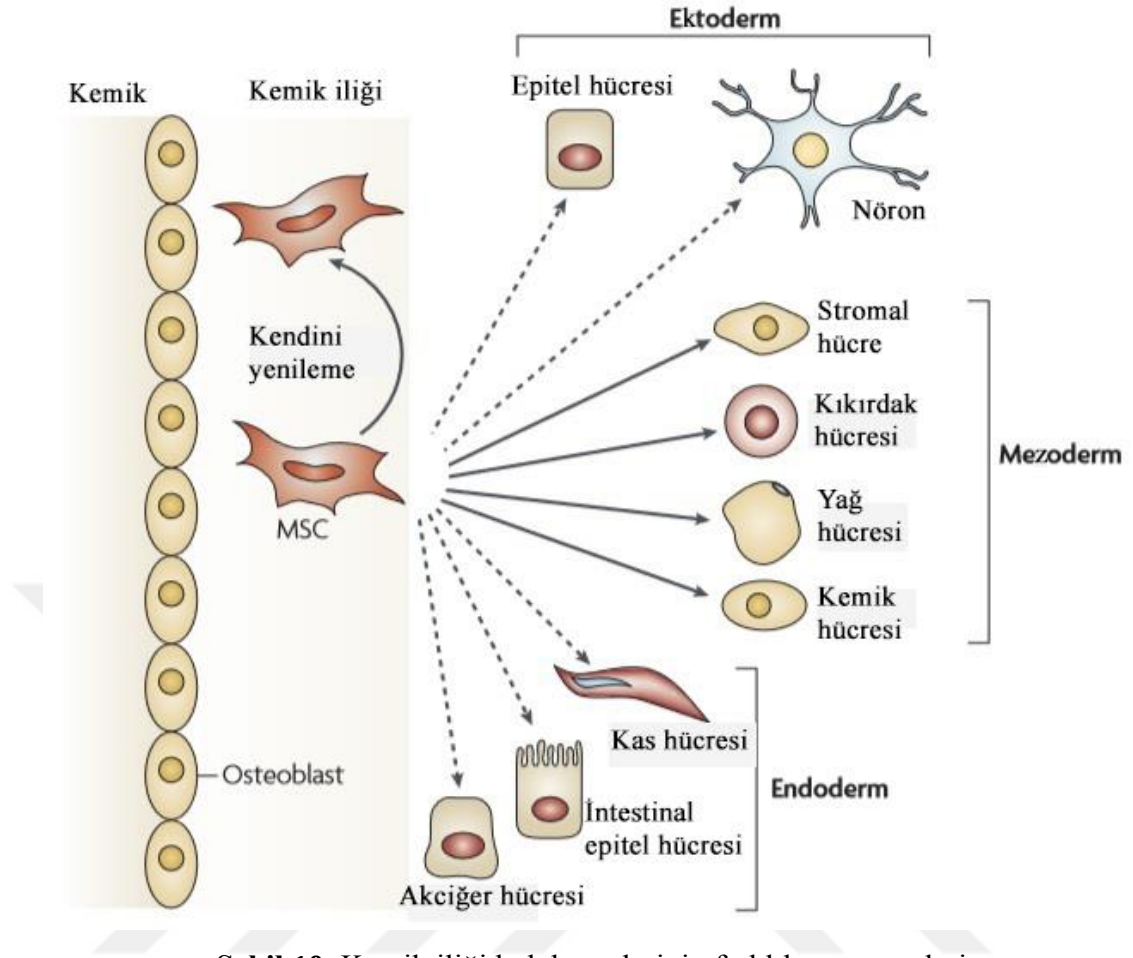
Evans ve ark. tarafından 1981 yılında gerçekleştirildi (43). Kendi kendini yenileyebilen hücrelerin varlığı ilk kez 1950'li yılların başlarında gösterilmiş olmakla beraber kök hücre tanımı bugünkü anlayışımıza 1961 yılında Till ve ark'ın irradiye edilmiş farelere sinjeneik türden kemik iliği verdiği zaman fare dalakları üzerinde oluşan kolonileri tanımlamaları ile gelmiştir. İrradiye edildikten sonra sinjeneik kemik iliği nakli yapılan farelerin dalaklarında mikroskopik olarak belirlenmiş eritroid, miyeloid ve megakaryositik serilere farklılaşabilen kolonilerin varlığının gösterilmesi, bu kolonilerin multipotansiyel kök hücreyi ifade edebileceği görüşünden hareketle bu kolonilere Colony-Forming-UnitSpleen (CFU-S) adı verilerek multipotansiyel kök hücrenin tanımı yapılmıştır (44). Vücutta yenilenmesi gereken dokulardan aldıkları sinyallere göre genler ve dış uyarılar aracılığıyla farklı hücre tiplerine dönüşebilirler (45). Vücudumuzdaki herhangi bir hücre grubunda ölüm ya da hasar meydana gelince kök hücreler hangi hücreye ihtiyaç varsa o hücreye dönüşürler. Kök hücrelerin bu yetenekleri hücre hasarlarına bağlı gelişen Alzheimer, Tip 1 Diabetes Mellitus, Multiple Skleroz (MS), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi hastalıkların tedavileri konusunda umut verici olmuş ve kök hücre tedavileri konusundaki ilgiyi arttırmıştır. Kök hücreler, mezenkimal ve embriyonel olarak 2 gruba ayrılır. Mezenkimal kök hücreler (MKH), erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları nedeni ile genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MKH'lerin tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşımasının temelini oluşturmaktadır. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeni ile içinde bulundukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar (6) (Şekil 9).



Şekil 9: Mezenkimal kök hücrelerin etki mekanizmaları(MKH: mezenkimal kök hücre, ECM: ekstrasellüler matriks)

Mezenkimal kök hücrelerin temel kaynakları kemik iliği ve adipoz dokulardır. Yapılan son çalışmalarda kemik iliğinden elde edilen kök hücreler ile yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerinde fark olmadığı gösterilmiştir (46-48).

Dokuya özgün kök hücrelerin, kaynak dokudan daha farklı bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine “erişkin kök hücre plastisitesi” denilmektedir. 1983 yılında Sale ve ark tarafından allojenik hematopoetik kök hücre nakli sonrası, yaygın akciğer ossifikasyonların bağlı olarak solunum yetmezliğinin tespiti üzerine invivo plastisite kavramının ilk düşünceleri doğmuştur (49). Sonraki yıllarda, başta kemik iliğinde bulunan kök hücrelerin in vitro ve in vivo koşullarda yalnızca kaynaklandıkları doku ve organların hücrelerini değil vücudun diğer işlevsel hücrelerine de dönüşebildiklerini (plastisite) gösteren raporlar yayınlanmıştır (50-52) (Şekil 10).



Şekil 10: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri

Bjornson ve ark. beyin kök hücrelerinin kan hücreleri ve iskelet kas hücrelerine dönüşebildiğini göstermiştir (52).

2.4.1 Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler bulundukları dokuya göre embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Farklanma potansiyellerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerine göredir (Tablo 4) (53).

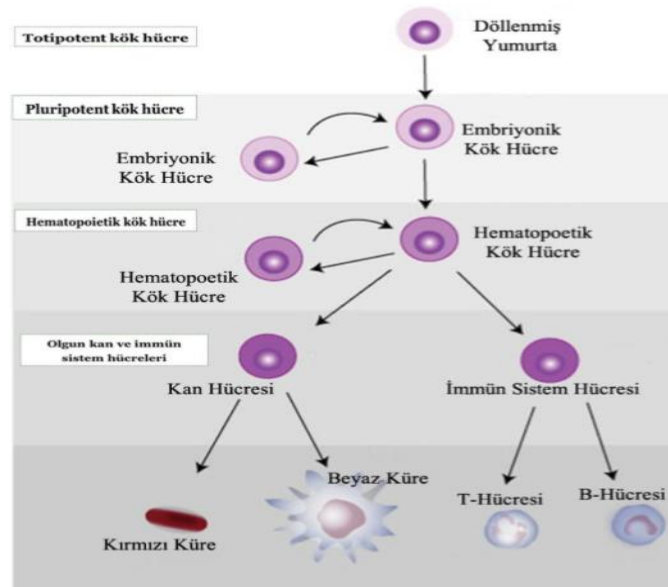
Tablo 4: Kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerine göre sınıflandırılması

Totipotent	Tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve yeteneğe sahip hücrelerdir.
Pluripotent	Blastokist aşamasını takiben çok geniş hücre gruplarını oluşturabilen hücrelerdir.
Multipotent	Farklı organ sistemlerinde, farklı doku tiplerine dönüşebilme yeteneği olan hücrelerdir.

Totipotent Hücre: Sperm ile yumurta birleştiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu hücrelere her şeye dönüşebilen anlamına gelen totipotent hücre denir. Döllenmeden sonraki ilk 4 gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücredir ve her bir hücre ayrı bir organizmayı oluşturabilir.

Pluripotent Hücre: Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren meydana gelen hücreler blastokist adı verilen küresel bir şekil alır. Bu kürenin içindeki hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen, artık tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildir. İşte bu tür hücrelere pluripotent hücre denir.

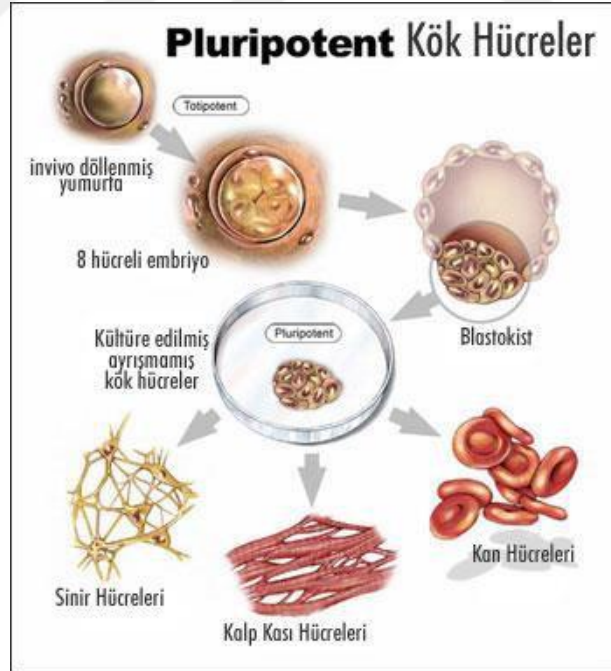
Multipotent Hücre: Birbirine yakın hücre gruplarını oluşturabilen kök hücrelerdir. Kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilir (53) (Şekil 11)



Şekil 11: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması

2.4.1.1 Embriyonik Kök Hücreler

Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonel hücre “totipotent” özelliktedir. Bu hücreler sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip olan kök hücrelerdir. Erken embriyonel dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotenttir. Fertilizasyonun yaklaşık 5. gününde bu hücreler “blastokist” denilen içi boşluklu hücre topluluklarına dönüşürler. Blastokistin iç hücre kitlesindeki hücrelerin (embriyoblastlar), endoderm, ektoderm ve mezoderminden köken alan yaklaşık 250 hücre tipine farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Pluripotent özellikteki insan embriyonel kök hücreleri blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Embriyonel kök hücreler yüksek seviyede telomeraz aktivitesine sahiptirler ve hücre replikasyonu ile aktivasyonda azalma göstermezler, bu nedenle sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptirler. Kök hücreler embriyonun gövdesi dışına çıkarıldıklarında deneysel yolla farklılaşmaları ve dokulardaki hücrelere benzer hücrelere dönüşebildikleri gösterilmiştir (Şekil 12). Ancak yüksek telomeraz enzimi etkinliği sonucunda kontrolsüz çoğalma ile tümör hücresine dönüşme olasılığı da yüksektir.



Şekil 12: Embriyonik kök hücrenin diğer hücre tiplerine farklılaşması

Fetal hayatın ilerleyen dönemlerinde hücreler daha özel görevlere sahip olup erişkin tip kök hücrelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreleri tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. İnsan embriyonik kök hücreleri ilk defa 1998 yılında James Thompson ve ark tarafından üretilmiştir (54). Doku tamiri ve Parkinson, Alzheimer, kalp yetmezliği gibi birçok hastalığın tedavilerinde etkili olabilecek embriyonel kök hücre kullanımı beraberinde etik ve medikolegal tartışmalar getirmiştir.

2.4.1.2 Erişkin Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler, kemik iliği veya beyin gibi differansiye olmuş dokulardaki farklılaşmamış kök hücrelerdir. Organizmanın hayatı boyunca, kendilerini yenileyebilir, kopyalayabilir ve ilgili dokuya ait bir hücreye dönüşebilirler. Erişkin kök hücreler embriyonik kök hücreler kadar farklılaşma kapasitesine sahip olmasalar da pluripotent özelliktedirler. Bu hücreler köken aldıkları dokulardan bağımsız olarak mezodermal, ektodermal ve endodermal farklılaşma gösterebilmektedirler (55).

Yetişkinde kök hücreler kemik iliği, yağ doku, beyin, bağırsak gibi çeşitli organ ve dokularda bulunurlar (Tablo 5)(55). Kök hücrelerde bulunması gereken iki temel özellik vardır. Birincisi simetrik bölünme ile kendisini yenileyebilmeli, ikincisi ise gerektiğinde başka hücreye/hücrelere dönüşebilmelidir. Böylece kök hücre eksik dokuyu tamamlar iken bir yandan da kendi yedeğini de meydana getirir. Çeşitli sinyallerle özelleşen kök hücreler farklı bir hücreye dönüştüğünde pluripotentlik özelliğini kaybeder.

Tablo 5: Kök hücre kaynakları ve oluşturdıkları hücreler

Kök Hücre	Kaynak	Üretilen
Hematopoetik	Kemik iliği	Kan, endotel, hepatosit, kas hücreleri
Nöral	Beyin	Nöronlar, astrositler, oligodendrositler, kan hücreleri
Epitelyal	Bağırsak, epidermis	Epitelyal katlardaki tüm hücreler
Mezenkimal	Kemik iliği, yağ, kıkırdak	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, ilik stroması, nöral hücreler, endotelyal hücreler
Embriyonik	Primordial germ hücreleri, blastokist hücreleri	Bütün hücreler

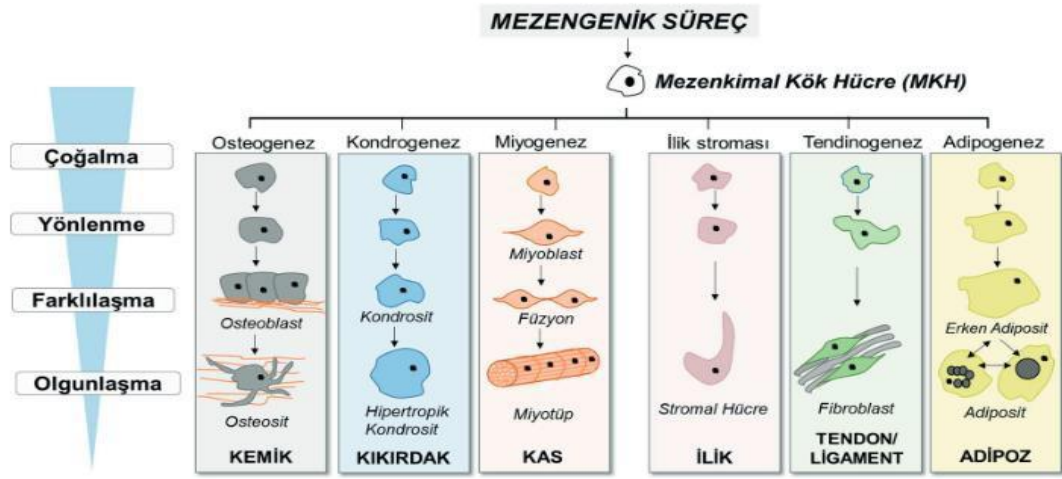
Erişkin kök hücreler ile ilgili ilk çalışmalar hematopoetik kök hücreler ile yapılmıştır. Ernest A. McCulloch ve James E. Tillilke 1960’larda kemik iliği hücrelerinin klonal özelliğini ortaya çıkarmışlardır (56). Friedenstien ve ark. 1976 yılında, MKH’lerin kendini yenileyebildiğini, değişik bağ doku elemanlarına farklılaşabileceğini ve fibroblastlara benzer yapıları olduğunu göstermişlerdir (57). Malign ve malign olmayan hastalıkların tedavilerinde 1976 yılından günümüze kök hücre naklinde erişkin türde hematopoetik kök hücreler kullanılmaktadır.

2.4.1.3 Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler, erişkin tip kök hücre grubuna dâhildir. Stromal kökenli olmaları nedeni ile genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşırlar. Bu sebepten MKH’ler tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Kemik iliği, yağ dokusu ve kıkırdak gibi bir çok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya

elverişli dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözünür faktörler, hücrelerarası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeni ile içinde bulundukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyici etkilere sahiptirler (58).

Multipotent özellikleri MKH'ler ile yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament hücrelerine farklılaşabilirler (Şekil 13). Kemik iliğinden elde edilen stromal hücrelerin kültür kabına yapışma özelliklerine göre hematopoetik hücrelerden ayrımı ile 1960'lı yıllarda MKH dönemi başlamıştır (59). Friedenstein, fetal buzağı serumu içeren kemik iliği kültürünün ortama yayılması sonrasında, 1982 yılında MKH'lerin kemik hücreleri, adipositler ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerine dönüştüğünü göstermiştir (60).



Sekil 13: Mezenkimal diferansiasyon

Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği (The International Society for Cellular Therapy; ISCT) yayınladığı kılavuzda, MKH'lerin tanımlanması için 3 kriter önermiştir;

- 1) Plastik hücre kültür kabına yapışabilme özelliği,
- 2) İn vitro koşullarda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşabilme,
- 3) CD 73, CD90 ve CD105 belirteçlerini %95'in üzerinde ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçlerini %2'den az oranda eksprese etmeleri.

Mezenkimal kök hücrelerin hayvanlarda ve insanlarda lenfositlerin çoğalmasını engelleyerek bağışıklık yanıtlarını düzenleyici etkileri olduğu bildirilmiştir. Human Leukocyte Antigen (HLA) özdeş hematopoetik kök hücrelerle birlikte

nakledildiklerinde akut ve kronik Graft Versus Host Disease'ın (GVHD) azalmasına neden olmuşlardır. Son yıllarda, otolog olarak farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler kullanılarak kemik, kırık ve kornea gibi üç boyutlu doku parçacıklarının üretilmesi gerçekleştirilmiş ve bu üretilen doku parçacıklarının (özellikle kemik ve kırık) klinik denemeler kapsamında insanlarda uygulanmasına başlanmıştır (61,62).

2.4.1.3.1 Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Kök hücre elde edilmesi için ana kaynak sayılan kemik iliği günümüzde yerini adipoz dokuya bırakmaktadır. İnsanda ilk kez 2001 yılında Zuk ve ark. tarafından ayrıştırılarak tanımlanan adiposit kökenli kök hücre (AKKH), diğer yetişkin kök hücre kaynaklarıyla karşılaştırıldığında düşük verici morbiditesi ve yüksek oranda elde edilebilme özellikleri nedeni ile doku mühendisliği uygulamaları için uygun hücre kaynağı olarak görülmektedir (63).

Kemik iliği ve adipoz doku dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir (63). Kemik/periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvı, hatta periferik kandan da adezyon özellikleri nedeni ile ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür (Tablo 6).

Tablo 6: Yetişkinde mezenkimal kök hücre kaynaklarına örnekler

Kemik iliği	Adiposit, astrosit, nöron, kardiyomiyosit, kondrosit, osteoblast, kas, hepatosit, endotel hücresi, stroma hücresi (fibroblast)
Kas dokusu	Adiposit, endotel hücresi, nöron, kondrosit, osteosit
Spongios kemik	Adiposit, kondrosit, osteoblast
Dermis	Adiposit, kondrosit, kas, osteoblast
Adipoz doku	Kondrosit, kas, osteoblast, stroma hücresi (fibroblast), endotel hücresi
Periosteum	Kondrosit, osteoblast
Perisit	Kondrosit, osteoblast
Periferik kan	Adiposit, fibroblast, osteoblast, osteoklast

Mezenkimal kök hücrelerin, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi özellikleri büyük ölçüde benzerlik gösterir. Ancak farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özelliklerinde, köken alınan doku tipine göre bazı değişiklikler olabildiği de gösterilmiştir. Bulundukları mikro çevreye ve organizmada ihtiyaç duyulması haline bağlı olarak, MKH'lerin biyolojik özellikleri ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler olduğu da gösterilmiştir. Bununla ilişkili olarak da spesifik bir dokunun onarımı için, o bölgeden elde edilen kök hücrelerin kullanımının avantajları olacağı gündeme gelmiştir (59).

2.4.1.3.1.1 Kemik İliği

Kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden farklı olarak stromada multipotent MKH bulunur (64). İlk kez 1966 yılında Friedenstein tarafından fibroblastlara benzemelerinden dolayı fibroblast kolonize oluşturunca ünite (CFU-F) olarak tanımlanmış, mezenkimal kök hücre ismini daha sonra almışlardır (65)

2.4.1.3.1.2 Amniyotik Sıvı

Ekstraembriyonik kaynaklar içerisinde doğum öncesi kök hücre elde edilebilen tek kaynak amniyon sıvısıdır. Amniyon sıvısı içerisinde fetal deri, gastrointestinal trakt epiteli ve solunum yolu hücreleri bulunmaktadır. Gebeliğin ilerleyen haftalarına göre sıvının hücre kompozisyonunda değişiklikler olmaktadır (66). Amniyotik sıvıdan kök hücre izolasyonu 2003 yılında Anker ve ark. tarafından tanımlanmıştır (67).

2.4.1.3.1.3 Umbilikal Kord

Umbilikal kord konusunda yapılan kök hücre çalışmalarında ilk bulunan hücreler hematopoetik kök hücrelerdir. Yapısal olarak embriyonik kök hücre ile erişkin kök hücre arasında bulunmaktadırlar. 2000 yılında Erices A ve ark. tarafınca yapılan çalışmada umbilikal kordun MKH açısından zengin olduğu gösterilmiştir (68). Kök hücre eldesi için umbilikal kordun kanından faydalandığı gibi Wharton jelinden de kök hücre elde etmek mümkündür (69).

2.4.1.3.1.4 Adipoz Doku

Adipoz doku ya da yağ dokusu, adipositlerden oluşmuş olan gevşek bağ dokusudur. Adipoz dokunun yağ formunda enerji depolama, vücudun destek ve izolasyonunu sağlama gibi görevleri vardır. Erkeklerde vücut ağırlığının %15-20'sini, kadınlarda

ise vücut ağırlığının %20-25'ini yağ dokusu oluşturmaktadır. Mezoderm kökenli olan yağ dokusunun bulunduğu konum ve fonksiyonlarına göre birkaç tipi bulunmaktadır. Bunlar; beyaz, kahverengi, mekanik, kemik iliği ve meme yağ dokusudur. Beyaz yağ dokusu hücreleri, sitoplazmalarının ortasında tek bir yağ damlacığı içerir. Vücutta enerji kaynağı sağlarlar ve leptin, adiponektin, lipokalin gibi adipokin faktörler salgılayarak endokrin organ görevi yaparlar. Adipositlerden ve adipoz stromal hücrelerden açığa çıkan proteinlerin otokrin, parakrin ve endokrin etkileri ile hem lokal hem de sistemik etkileri olduğu gösterilmiştir. Adipositlerden sentezlenen sitokinlerin homeostaziste, immün cevapta, vazoregülasyonda ve steroid metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Multiloküler yağ dokusu (kahverengi yağ dokusu) hücrelerinin sitoplazmalarında ise çok sayıda lipid damlacığı ve kahverengi mitokondriyumlar mevcuttur (70). Kahverengi yağ dokusu içerdiği organelleri sayesinde termoregülasyonu sağlar. Beyaz adipoz doku yağı depolarken kahverengi adipoz doku yağı yakar (71). Mekanik adipoz doku avuç içi, göz çevresi gibi özelleşmiş bölgelerde destek görevi sağlar. Memedeki adipoz doku laktasyon sonrasında meme glandlarına destek ve enerji sağlarken kemik iliğindeki adipoz doku ise hematopoetik kök hücre ve progenitör hücreler için düzenleyici sinyaller sağlamaktadır. Zuk ve ark. tarafından yapılan çalışmada adipoz dokunun MKH'lerden oldukça zengin olduğu gösterilmiştir (63). Poznanski ve ark. tarafından yapılan çalışmada yağ dokusunun kök hücre bakımından oldukça zengin bir doku olduğu gösterilmiştir (72). Ayrıca adipoz doku santimetre küp başına kemik iliğine göre 100 ile 1000 kat daha fazla pluripotent hücre içermektedir (73-75).

Adipoz dokunun elde edilmesi cerrahi eksizyon veya liposuction ile yapılabilir. Kullanılan liposuction tekniğine bağlı olarak alınan SVF'nin içinde %2-10 arasında adipoz kökenli kök hücre bulunmaktadır. Toplanan dokulardan kök hücreleri ayırtmak için tanımlanmış protokoller mevcuttur. Bu yöntemlerde ortak olarak kollajenaz veya tripsin gibi enzimler ile hücreler arası bağların koparılması ve santrifüj yöntemi ile hücreleri yoğunluklarına göre ayırma hedeflenmektedir (76).

Adipoz kökenli kök hücreler doğal süreçte olgun adipositlere dönüşme eğilimindedirler, ancak dış etkenlerin değişmesi durumunda farklı dokulara dönüşebilirler. Bu dönüşüm AKKH'lerin yüzey belirteçlerinin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (77) (Tablo 7).

Tablo 7: Adipoz kökenli kök hücrelerin yüzey belirteçleri ve görevleri

Yüzey Belirteci	Görevi
CD29 (beta-1-integrin)	Anjiogenezis
İnterselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1:CD54)	İmmunglobulin süper gen ailesi
CD44 (Hyaluronatreseptörü)	Ekstraselüler maktriiks gelişimi
HLDR-, MHC class1+	İmmün modülasyon, azalmış rejeksiyon
CD105, CD73, CD90 pozitifliği CD45, CD34 ve CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 negatifliği	Mezenkimal stromal hücrekriterleri

Multipotent yapıdaki AKKH'ler askorbat, betagliserofosfat, deksametazon ve vitamin D3 etkisinde osteojenik farklılaşmaya uğramaktadır (78). Hepatosit büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü ile uyarılması durumunda AKKH hepatositlere dönüşüm gerçekleşmekte ve kök hücrelerin albumin ve diğer fraksiyonlarda protein ürettikleri gözlenmektedir (79). Huang ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada TGFb1, askorbik asit ve insülin ile kondrojenik farklılaşma oluşturulmuştur (80).

2.4.1.3.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Fenotipik Özellikleri

Mezenkimal kök hücreleri diğer dokulardaki hücrelerden ayıran karakteristik özellikleri bulunmaktadır. Plastik ve cam gibi yüzeylere kolayca tutunabilmeleri MKH'lerin kültür petri kaplarına yapışmalarını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle in vitro kültürlerde izolasyonları kolaylaşmaktadır. Düşük yoğunluktaki kemik iliği mononükleer hücreleri "basalmedia" olarak %10'luk fetal bovin serumunda(FBS) 2-3 gün bekletildiklerinde petri kabının yüzeyinde kök hücreler görülmeye başlar. Petri kabına tutunmamış olan hücreler bu aşamada uzaklaştırılır ve hücreler birleşip bir tabaka oluşturana kadar FBS eklenmeye devam edilir. Mezenkimal kök hücreler tripsin ile muamele edilip, daha ileri pasajlarla sayıları çoğaltıldıktan sonra da toplanabilirler.

Kemik iliğindeki 1 milyon mononükleer hücreden 2-5 tanesi MKH'dir. Adipoz dokuda ise cm³ başına kemik iliğine göre 100 ile 1000 kat daha fazla pluripotent hücre bulunmaktadır (73-75). Mezenkimal kök hücrelerin toplamının yaklaşık %10 kadarı hücre döngüsünün S, G2, M fazlarında proliferasyon olurken, %90'ı G0/G1 fazında beklerler. Yapılacak olan indüksiyon ile daha fazla kök hücrenin aktivasyonu

mümkün olabilmektedir. Aktive olan MKH'ler sitokin sentezleme özelliğine sahiptirler. Mikroskopik incelemede MKH'ler fibroblastoid, çubuk şeklinde gözlenmektedir. Hücreler, düşük yoğunluklarda kültür ortamında koloni oluşturmaya eğilim gösterirler. Yüksek hücre yoğunluğunda ise koloni oluşturmak yerine yan yana dizilmiş hücre grupları halinde çoğalmaktadırlar (81).

2.4.1.3.3 Mezenkimal Kök Hücreler ve Rejeneratif Tıp

Rejeneratif tıp, teknolojik gelişmeler ile birlikte hızla önem kazanarak birçok araştırmacı ve bilim adamı için ilgi odağı haline gelmiştir. Günümüzde rejeneratif tıp alanında hastalıklı ve hasarlı organları yenileyici, kanser tedavisi hatta ölümsüzlük de dâhil olmak üzere birçok konuda çalışmalar yapılmaktadır. Rejeneratif tıp temelinde kök hücre, büyüme faktörleri, hasar görmüş ve yaşlanmış hücrelerin onarılıp yerine yenilerinin koyularak veya mevcut dokunun rejenerasyonunu sağlayarak fonksiyonlarını iyileştirmeyi hedeflemektedir. Mezenkimal kök hücrelerin özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği bu hücrelerin uygun mikro çevre koşullarında başta destek (bağ dokusu) doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyelinin gösterilmiş olmasıdır. Çeşitli araştırmalar bu hücrelerin in vitro koşullarda uygun uyaranlar ile osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerinin olduğunu ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir (82). Mezenkimal kök hücreler, in vitro ortamda kolaylıkla farklılaşmaya yönlendirilebilmektedir. Adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşma özelliklerinin in vitro ortamda gösterilmesinin MKH tanımlaması için şart olduğu bildirilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda benzer veya farklı uyaranlara maruz bırakılarak günler içerisinde çok sayıda hücrenin farklı tipte hücreye dönüşüm gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir (72, 73).

Mezenkimal kök hücrelerin karakter kazanabilmesi için kök hücrenin kaynaklandığı dokudan uzaklaştırılması, hazırlanması ve elde edilmesini takiben uygun şartlarda kültüre edilerek istenilen hücre türüne farklılaştırılması ve sadece farklılaştıkları türdeki hücrelerin çoğaltılması gerekmektedir. Farklılaşma çalışmalarında, MKH'lerin hedeflenen farklılaşmış hücrelere dönüşümünün gerçekleştiğini göstermek için histokimyasal, immünohistokimyasal veya immünfloresan yöntemler kullanılır. Mezenkimal kök hücrelerin, kendi dizinleri dışındaki farklı hücre dizinlerine de farklılaşabilme niteliği, özellikle rejeneratif tıp ile ilgili alanlarda çok ilgi uyandırmış, bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kök hücre plastisitesi, bir

hücrenin köken aldıkları dokulardan farklı dokulara dönüşebilme özelliğini tanımlamaktadır (83).

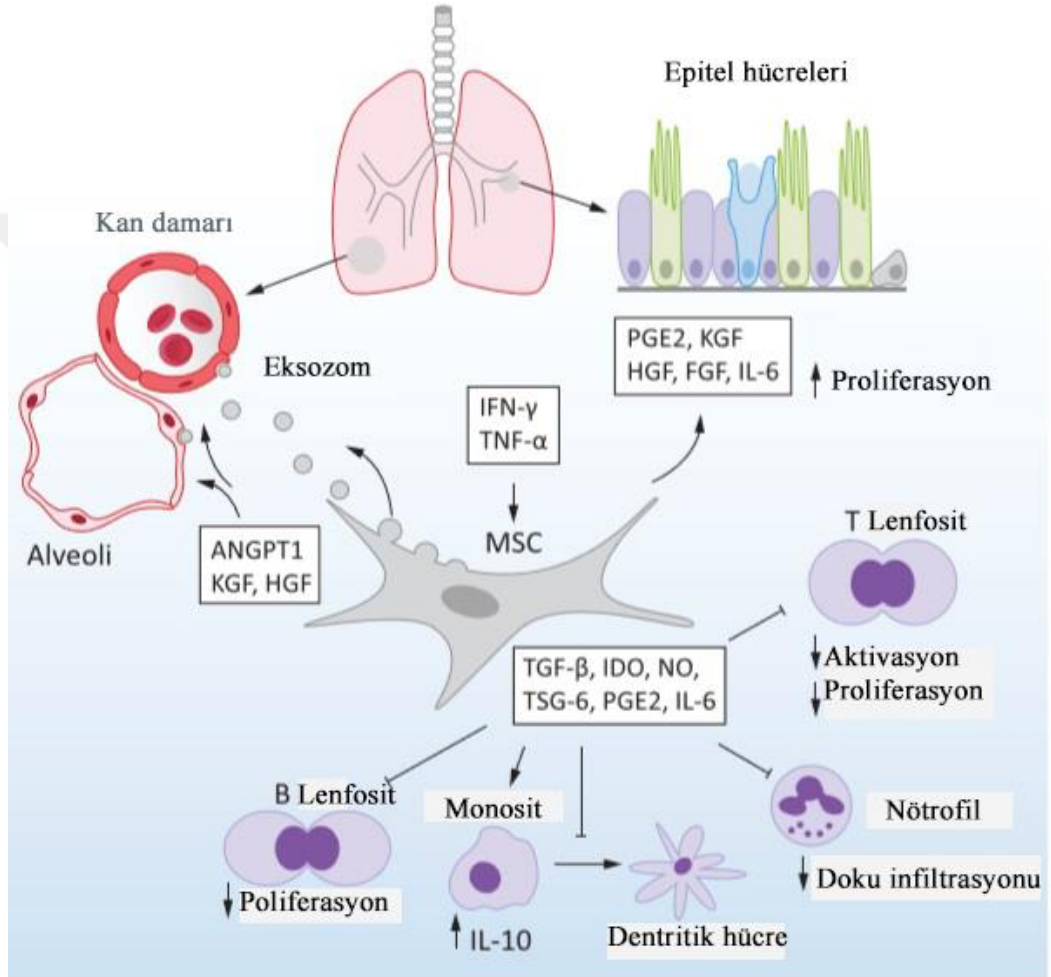
2.4.1.3.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımı

Kök hücreler ile ilgili son yıllarda çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Hücrelerin yüksek sayıda ve kolay elde edilebilmesi ve uygun in vitro ve in vivo şartlarda istenilen hücre ve doku yapısına kolayca ve yüksek oranda dönüşebilmeleri nedeniyle doku mühendisliğinde sıkça kullanılmaktadır. Son zamanlarda problemlı bölgelerde yeni damar oluşumunu arttırmak için kök hücre nakilleri uygulanmaktadır (84). Endotelial progenitör hücreler sisteme enjekte edildikten sonra seçici bir şekilde iskemik dokulara yerleşir, böylece bu hücreler iskemik flepleri kurtarmada önemli rol oynayabilir. Terapötik anjiyogenezin flep yaşayabilirliğini artırma, yara iyileşmesini geliştirme, doku çoğalmasını hızlandırma potansiyeli olup tek başına büyüme faktörlerinden çok, hasarlı hücreleri yenileyerek faydalı olmaktadır.

Kemik iliği kökenli MKH'lerinin de novo miyokard dokusu oluşturduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda miyokard enfarktüsü ve koroner arter hastalıklarında intra koroner kök hücre infüzyonunun, kalp kası rejenerasyonunda oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (85). Oftalmolojide de araştırmacılar hasar görmüş göze korneal kök hücre naklederek tekrar görmeyi sağlamışlardır (86). Aynı hücrelerin başka uyaranlarla nöral hücre serisine de dönüşebildikleri gözlenmiş ve ALS gibi hastalıklarda omurilikte hasarlı bölgeye verilen kök hücrelerin ablatif sinir hücrelerini rejenere ettiği ve sonuçta lökomotor fonksiyonun geri kazanıldığı gösterilmiştir (87).

Osteopeni ve osteoporoz gibi birçok insanı etkileyen hastalıkları tedavi etmek için çalışmalar yapılmaktadır. Bu konuda kemik onarımına yönelik farmakolojik, genetik ve hücresel tedaviler denenmektedir. Osteoblast farklılaşması iskelet dokusunun oluşması ve kemik şekillenmesinde önemli bir aşamadır (88). Mezenkimal kök hücrelerin in vitro osteojenik potansiyelinin gösterilmesini takiben MKH'lerin skafold (çatı;iskele) ve biyomateryellere eklenmesi ile defektlerin onarımına yönelik önemli çalışmalar yapılmıştır. Kemik defekti onarımına yönelik bir çalışmada AKKH ile kalvarial kemik defekti onarımı araştırılmıştır. Sıçanda deneysel yarık damak modelinde poliaktik asit skafolda AKKH emdirilerek defekte uygulanmış ve defekt kapatılmıştır. Kök hücre uygulanmayan skafoldda defekt açık kalmıştır (89).

Mezenkimal kök hücrelerin anti-inflamatuar etkileri üzerinde çok fazla çalışma yapılmıştır (90-92). Bu hücrelerin terapötik etkisi iki farklı mekanizmadan kaynaklanır. Bunlar doğrudan hücreler arası etkileşim ve hücre dışına eksozomlar gibi farklı çözünür ürünlerin parakrin salınmasıdır (93). Özellikle akciğer dokusundaki anti-inflamatuar etkilerini, trofik faktörler salgılayarak yaptıkları öngörülmüştür. Bu etkileri 'bystander effect' olarak tanımlanmıştır (6) (Şekil 14).



Şekil 14: Mezenkimal kök hücrelerin akciğer dokusundaki anti-inflamatuar etkileri

2.4.2 Stromal Vasküler Fraksiyon İçeriği

Rodbell 1966 yılında adipoz dokuda, adipositler progenitor hücreler, fibroblastlar, kan ve endotel hücrelerinden oluşan heterojen stromal vasküler fraksiyonu tanımlamıştır (94). Stromal vasküler fraksiyon, içerdiği kök hücre dışında çeşitli büyüme faktörleri sentezleme yeteneği olan preadiposit, adipoblast ve endotelial

hücreler de içermektedir. Ailhaud ve ark. yaptıkları bir çalışmada taze yağ dokunun santrifüjünden; trigliserid, olgun yağ hücreleri ve stromal vasküler fraksiyon (preadipositler, fibroblastlar, endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, perisitler, kök hücreler) elde edilebildiğini göstermişlerdir (95). Ayrıca SVF, yağ dokuyu besleyen kapillerlerden de hücreler (eritrositler, B ve T lenfositler, monosit ve makrofajlar, mast hücreleri, natural killer hücreler ve hematopoetik kök hücreler) içermektedir (96). Stromal vasküler fraksiyon, yağ dokudan elde edilen multipotent diferansiyasyon kapasitesine sahip (osteojenik, adipojenik, endotelyal, kondrojenik, keratinosit, myosit, nöral) heterojen hücre popülasyonunu içerir (97).

a) Mezenkimal Kök Hücreler: Stromal vasküler fraksiyon yoğun şekilde MKH benzeri hücre içerir (74, 75, 77). In vitro olarak yağ dokusu oluşturabilen mitotik aktivitesi bulunan adipozit öncülü (preadipozit) hücrelere dönüşebilen hücrelerdir. Morfolojik olarak fibroblastlara benzerler. Özel besi yerlerinde adipoz dışı dokulara da diferansiye olabilirler.

b) Endotelyal Progenitör Hücreler: Stromal vasküler fraksiyonda MKH içeriğine ek olarak endotelyal preküsör hücreler (EPH) de bulunmaktadır. Hasar görmüş damarların endotel hücreleri dolaşımda bulunan kemik iliği kökenli EPH ile yenilenir. Yaşlanma, damar endoteli ve onu onaran EPH disfonksiyonuyla ilişkilendirilmiştir. Endotel disfonksiyonu ateroskleroza ve kardiyovasküler hastalıklara sebep olur. Endotel hücresinin yaşlanması kronojik bir hadise olmayıp bölünme yeteneğindeki yavaşlamadır. Endotelyal Preküsör Hücre uygulanması damarda endotel, kalpte kardiyomyosit apoptozisini engelleyerek kardiyovasküler remodellingi sağlayabilir (98). Damar yaralanması oluşturulan hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda ekzojen uygulanan EPH'in ateroskleroz ve yeniden tıkanmayı azalttığı gösterilmiştir (99). Derialtı ve visseral yağ dokularından elde edilen SVF hücreleri içinde CD34, CD133 pozitif yüzey belirteçleri taşıyan hücre grupları gösterilmiştir. Özellikle CD34 pozitif ve CD31 negatif kümeler yüksek anjiogenik özellik göstermektedir. Bu etkiyi, direk anjiogenezi uyarak ya da IGF-1, HGF-1 ve VEGF gibi büyüme hormonlarının salınımını arttırarak gösterirler (50, 100)

c) İmmün Düzenleyici Monosit ve Makrofajlar: Stromal vasküler fraksiyonda kök ve progenitör hücrelere ek olarak monosit ve makrofajlar da mevcuttur.

Periferik kandan elde edilen monositlerin yetişkin kök hücre özelliği göstererek hepatositlere, pankreatik- β benzeri hücrelere ve insülin sekrete edebilen neoislet hücrelere dönüşebildiği gösterilmiştir (100, 101). Yağ doku kökenli makrofajlarda (M2 fenotipi gösterenler) yapılan bir diğer çalışmada ise IL-10 (İnterkkin-10) ve IL-1 (İnterlökin-1) reseptör antagonisti etkileri nedeniyle anti-inflamatuar etki gösterdikleri bildirilmiştir (102).

d) Preadipozit Hücreler: Preadipozitler, adipojenik progenitör, yani olgun yağ hücresi haline gelebilme özelliği taşıyan öncül hücrelerdir. Olgun yağ hücrelerinden farklı olarak küçük hacime sahip olduklarından ve sitoplazma içi yağ damlacıkları olmadığından mekanik travma ve iskemiye olan toleransları daha fazladır. Charriere ve ark. yaptıkları çalışmada adipoz dokudan elde edilen SVF hücrelerini işaretleyerek fare peritoneal kavitesine enjekte etmişler ve preadipozitlerin fenotipik değişikliklerini incelemişler. Preadipozitlerin hızla yüksek fagositik özellik kazandığı, preadipozitlerin %60-70'inin makrofaja spesifik beş antijeni (F4/80, Mac-1, CD80, CD86, ve CD45) ekspresse ettiğini göstermişlerdir. Invitro yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup preadipositlerin plastisite yetenekleri ile adipoz hücre kadar etkin şekilde hücresel immünitede etkin olan makrofajlara da dönüşebildiği gösterilmiştir (103).

e) Perisitler: Rouget hücreler veya adventisyal hücreler olarak da bilinirler ve mezenkimal orjinlidirler. Kapiller bazal membranında, endotel hücrelerini (EH) dış yüzeyden evrelerler. Endotel hücreler ile birbirlerini tamamlayacak şekilde (anahtar- kilit modeli) hücre-hücre bağlantıları vardır. Endotel hücreler ile aralarındaki mesafe 20nm'den azdır. Uzun, ayaksız uzantıları olan polimorfik hücrelerdir. Perisitler; vimentin, desmin, aktin-miyozin, siklik GMP-protein kinaz ve tropomiyozin sekrete edebilirler. Mezenkimal kök hücre ve perisitlerden eksprese edilen ortak sitokin ve hormonlarla mikrodolaşımı düzenlerler; ayrıca immüniteden doku rejenerasyona kadar değişen birçok görevleri vardır. Perisitlerin bazı özellikleri; matriks protein sentezi, kontraktilite, permeabilitenin düzenlenmesi, endotel hücrelerin yenilenmesi, olup ayrıca adipositlere, kondroblastlara, osteoblastlara, fibroblastlara, makrofajlara ve damar düz kas hücrelerine dönüşebilen mezenkimal potansiyelleri de mevcuttur (104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 DENEY PROTOKOLÜ

Araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSU-2018 7934 kodlu proje ile desteklendi. Hayvan çalışması Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığının 15.03.2017 tarih ve 19/025 sayılı izni ile Erciyes Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

3.2 DENEKLER

Çalışmada ağırlıkları 297-394 gr arası 60 adet Wistar–Albino tipi sıçan kullanıldı. Hayvanlar pleksiglas kafeslerde muhafaza edildi ve her kafese en fazla 4 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 sıçanlar deney öncesi ve deney süresince standart laboratuvar yemi ile beslendiler.

Sıçanlar rastgele seçilerek sham (n:10), kontrol (n:10), SF (n:10), donör SVF (n:10) donör olmayan SVF (n:10) ve yağ donörü (n:10) grupları oluşturuldu.

Tüm sıçanların grupları kafeslerine yazılarak numaralandırıldı. Sıçanlar kafeslere dörderli dağıtıldılar. Çalışma sonunda tüm sıçanlar, periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer[®], USA) enjekte edilerek kurban edildi.

Kullanılan alet, malzeme, farmakolojik ve kimyasal ajanlar, Tablo 8 ve Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 8: Anestezi ve cerrahide kullanılan farmakolojik maddeler

Kullanılan Farmakolojik Maddeler	Uygulama Yolu	Uygulama Dozu-Amacı
Ketamin hidroklorür (Ketalar® Pfizer®, USA)	Periton içi	40mg/kg-Anestezi
Ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer, Germany)	Periton içi	5mg/kg-Anestezi
Povidon-iodür (%10)		Antisepsi

Tablo 9: SVF eldesi sırasında kullanılan kimyasal maddeler

SVF elde edilmesinde gerekli kimyasallar	Uygulama amacı
Fetal buzağı serumu (PBS)	Kök hücre eldesi
Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS)	Yıkama, pH dengeleme
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Kök hücre eldesi
Kollajenez, Tip I	Hücrelerin birbirinden ayrıştırılması

3.3 DENEY MODELİ PLANLAMASI

İnhalasyon yaralanmasında hasarın derecesi, duman maruziyet süresine ve dumanın bileşimine bağlıdır (105). Üst hava yolu, aşırı ısı transferiyle ilişkili doğrudan termal yanıklara maruz kalsa da, bu tür yaralanmalar nadirdir. En çok hasar, büyük ölçüde duman partiküllerinin içinde bulunan zehirli organik ajanların kimyasal hasarına atfedilebilir ve bunlar büyüklüklerine göre distal hava yollarına çökerler (106). Bu nedenle çalışmamızda inhalasyon hasarı modeli olarak partiküllü gaz inhalasyonuna dayanan Zhu ve ark.'larının çalışmasını kullandık (107). Bu modelde demir plakalı elektrikli ocak üzerine konulan sıçanın ağırlığına göre 120gr/kg odun talaşı konularak duman üretilmiş, üretilen bu duman boru sistemi yardımı ile sıçanların bulunduğu duman odasına aktarılmıştır. Sıçanlar 3 tur ve her turda 9 dakika dumana maruz bırakılmış ve her tur arasında 30 saniye normal oda havasında bekletilmiştir. Oluşturduğumuz düzenekte sıçanların duman odasında hareket edebilmesi için aynı anda 4 sıçana duman uygulanmıştır. Yapılan pilot çalışmada sıçanların ölmesi üzerine mevcut sistemi güncelledik. Tek seferde konulan

talaş miktarını 50gr/kg düşürdük. Dumana maruziyet süresini 5 dakikaya indirip, oda havasında kalma süresini 1 dakikaya çıkarınca sıçanların en az 24 saat yaşabildiğini gözlemledik ve patoloji tarafından da onaylanan inhalasyon hasarı oluşturabildik (Tablo 10).

Duman odasına aynı anda konulan 4 sıçanın ortalama ağırlığı 1250-1500gr olduğu takdirde, tek seferde konulacak talaş miktarı 62,5-75 gramdır. Ocak kızdırıldıktan sonra sıçanlar ve talaş aynı anda sisteme konularak plastik kapak kapatıldı. 5 dakika boyunca sıçanlar dumana maruz bırakıldı. Sistemik toksisiteyi azaltmak için sıçanlar beşinci dakika oda havasına alınarak burada bir dakika bekletildi. Altıncı dakika tekrar duman odasına konularak onbirinci dakikaya kadar dumana maruz bırakıldı. Sıçanlar onbirinci dakika sistemik toksisiteden korunmak için tekrar oda havasına çıkarılarak bir dakika bekletildi. On ikinci dakikada tekrar duman odasına yerleştirilerek beş dakika boyunca dumana maruz bırakıldı.

Tablo 10: İnhalasyon hasar modeli süreleri

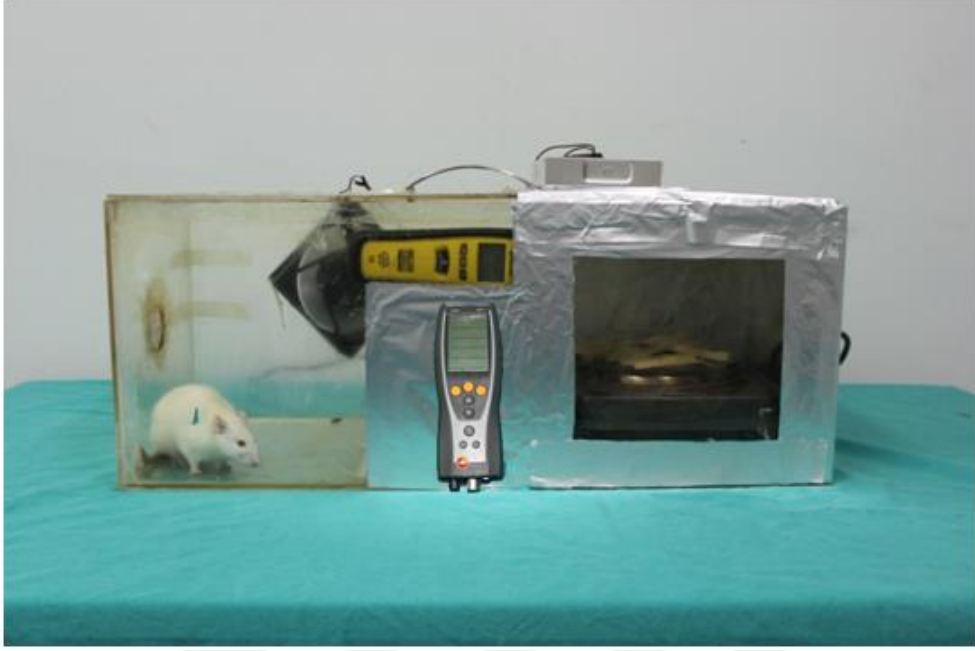
Süre	İşlem
0-5 dk	Dumana maruz bırakılma
5-6 dk	Normal oda havasında bekletilme
6-11 dk	Dumana maruz bırakılma
11-12	Normal oda havasında bekletilme
12-17 dk	Dumana maruz bırakılma

11-12 dakika Normal oda havasında bekletilme

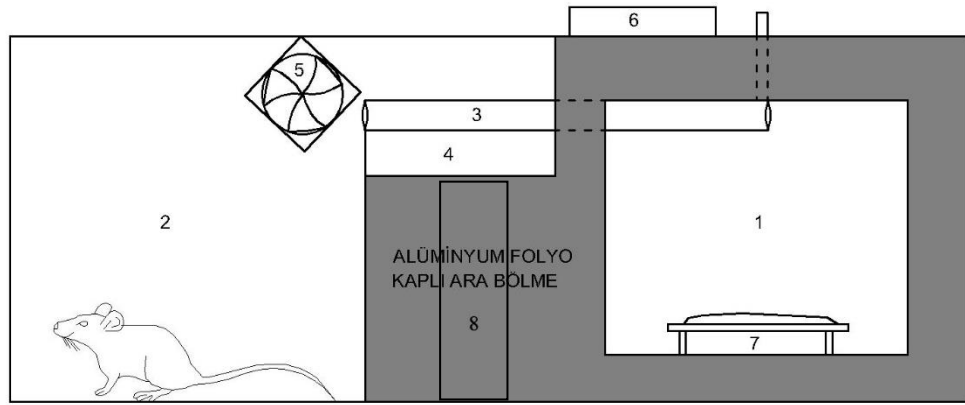
3.4 DUMAN OLUŞTURULMASI

İnhalasyon hasarı modeli Feng Zhu ve ark. çalışması örnek alınarak tasarlandı (107). Deney modeli birbirine bağlantılı iki odadan oluşmaktaydı; yanma odası ve duman odası. Yanma odasında demir elektrikli ısıtıcıda (Kumtel®, Kayseri Türkiye) odun talaşı yakılarak (50gr/kg) duman üretildi ve bu oda alüminyum ile kaplanarak sıçanların dumanı soluduğu odaya ısının yayılması önlendi. Bu şekilde termal hasar oluşumu önlenmeye çalışıldı. Duman

odası ve yanma odası arasına dumanın geçebileceği bir tünel oluşturuldu. Duman odası CO seviyesi ve oda sıcaklığını ölçebilen baca gazı analizatörü (Testo® 327-1 Lenzkirch, Almanya) yerleştirildi. (Şekil 15-16)



Şekil 15: İnhalasyon hasar düzeneği



Şekil 16: İnhalasyon hasar düzeneği şematik hali

- 1: Yanma odası
- 2: Duman odası
- 3: Tünel
- 4: Sıcaklık ölçer
- 5: Fan
- 6: Güç kaynağı

- 7: Elektrikli ısıtıcı
- 8: Baca gazı analizatörü

3.5 DUMAN UYGULAMA MODELİ

Sham grubundaki sıçanlar duman ve oksijen uygulanmaksızın duman odasında tutuldu. Diğer 4 gruptaki sıçanlara ise; Feng Zhu ve ark. deney protokülü uygulandı. Elektrikli ısıtıcı ısıdıktan sonra 50gr/kg talaş demir plakanın üzerine yerleştirildi. Çalışma sırasında, duman odasındaki gaz profili oranları ve ısı değişimleri monitorize edildi. Gaz profili ve sıcaklık ölçümleri, baca gazı analizatörü (Testo[®] 327-1, Lenzkirch, Almanya) ile yapıldı (Şekil 17).



Şekil 17: Gaz analiz cihazı

3.6 DENEYİN UYGULANIŞI

Tablo 11: Deney grupları

Grup	İnhalasyon Hasarı	Tedavi	Yağ Doku Donörü
Sham	-	-	-
Kontrol	+	-	-
SF	+	%0.9 NaCl	-
Donör SVF	+	SVF	+
Donör olmayan SVF	+	SVF	-
Yağ donörü	-	-	+

Sham grubunda, inhalasyon hasarı oluşturulmadı ve tedavi verilmedi, intrakardiyak kan ve akciğer parankiminden histolojik örnekler alındı. Baz değerlerin ölçülmesi için kullanıldı.

Kontrol grubunda, inhalasyon hasarı oluşturuldu ve tedavi verilmedi. İnhalasyon hasarı oluşturulduktan 24 saat sonra intrakardiyak kan alınarak sıçanlar sakrifiye edildi. Sağ akciğerden histopatolojik değerlendirme için örnekler alındı, sol akciğerden ıslak/kuru oranı bakıldı.

Serum Fizyolojik (SF) grubunda inhalasyon hasarı oluşturuldu. Hasar oluşturulduktan 3 saat sonra sistemik olarak, kuyruk veninden 0,2 ml %0.9 NaCl verildi. İnhalasyon hasarı oluşturulduktan 24 saat sonra intrakardiyak kan alınarak sıçanlar sakrifiye edildi. Sağ akciğerden histopatoloji, karşı akciğerden de ıslak/kuru oranı tespiti yapıldı. Bu grup hem kuyruk veninden uygulanan işlemin etkisini değerlendirmek için oluşturuldu.

Donör SVF grubunda, inhalasyon hasarı oluşturuldu, hasar oluşturulduktan hemen sonra sıçanların kendi inguinal yağ dokusundan SVF elde edildi. Hasar oluşturulduktan 3 saat (yağ dokudan SVF elde etme süresi) sonra sistemik olarak, kuyruk veninden 0,2 ml SVF içeren çözelti verildi, 24. saat intrakardiyak kan alınarak sıçanlar kurban edildi. Sağ akciğerden histopatoloji, karşı akciğerden ıslak/kuru oranı bakıldı.

Donör olmayan SVF grubunda, inhalasyon hasarı oluşturuldu, yağ donörü olarak, duman inhalasyonuna maruz kalmamış (altıncı grup) donör grubu kullanıldı. Hasar oluşturulduktan 3 saat (yağ dokudan SVF elde etme süresi) sonra sistemik olarak, kuyruk veninden 0,2 ml SVF içeren çözelti verildi, 24. saat intrakardiyak kan alınarak sıçanlar kurban edildi. Sağ akciğerden histopatoloji, sol akciğerden ıslak/kuru oranı bakıldı. Bu grup SVF etkisinin, yağ doku eksizyonu cerrahisi ile değişebileceği düşüncesi ile oluşturuldu.

Altıncı grup yalnız yağ dokusu donörü olarak kullanıldı. Bunun dışında herhangi bir işleme maruz bırakılmadı (Tablo 11).

Deney sonrası, denekler duman odasından çıkarılarak normal oda ısısı ve atmosferine bırakıldı.

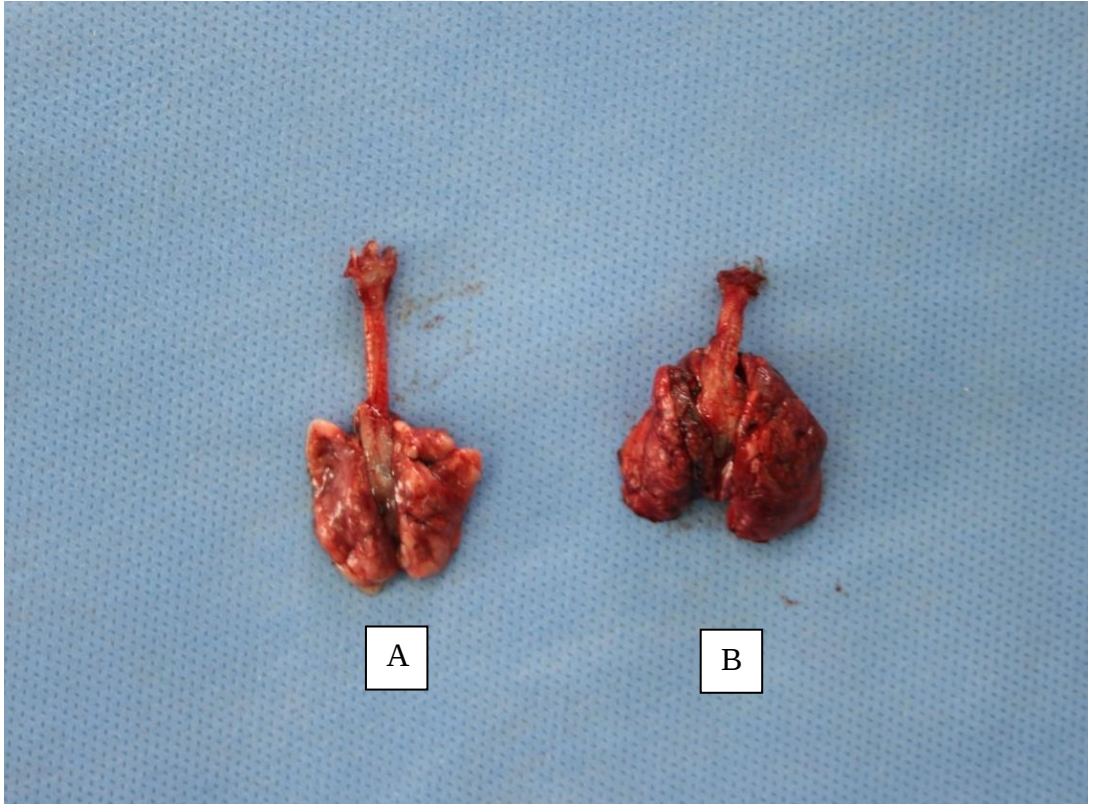
3.7 CERRAHİ İŞLEMLER

İnhalasyon hasarı sonrası akciğer inflamasyonunun erken saatlerde başladığı, ilk 24 saatte maksimum değerine çıktığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Her bir sitokin ve ıslak/kuru oranının ilk 24 saatte tepe yaptığı zaman farklıdır (90). Çalışmamızda tek bir zaman diliminde değerlendirme yapıldığı için tüm parametrelerin yüksek ve anlamlı olduğu hasar sonrası 24. saat seçildi.

İnhalasyon hasarı oluşturulduktan 24 saat sonra, kan ve doku örnekleri almak için deneklere, 40mg/kg (periton içi) ketamin, 5mg/kg ksilazin (periton içi) ile anestezi verildi. İntrakardiyak kan örnekleri alındı. Sonra toraks orta hat insizyonu yapıldı. Orta hattın sternum açılarak torakotomi yapıldı (Şekil 18). Trakea klemplenmeden hemen önce, servikal dislokasyon ile sıçanlar kurban edildi. Akciğer trakea ile birlikte enblok olarak çıkarıldı (Şekil 19). Deneklerin sağ akciğerleri ıslak/kuru oranı bakılmak için kullanıldı. Sol akciğerden patoloji için örnekler alındı.



Şekil 18: Torakotomi yapılmadan trakeanın klemplenmesi



Şekil 19: Sham grubu (A), Kontrol Grubu Akciğerleri (B)

3.8 ÖRNEKLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

3.8.1 Biyokimyasal Yöntem

Deneyisel modellerde inhalasyon hasarı takibinde, inflamasyonun biyokimyasal belirteçleri olarak parankimde ya da serumda IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve MPO kullanılmıştır (13, 107-110). Bu nedenle biz de intrakardiyak alınan örneklerden serumda MPO, TNF- α , IL-1 ve IL-6 baktık. Ölçümler MPO, TNF- α , IL-1 ve IL-6 sıçan kitleri (ABCAM[®], Cambridge, ABD.) ile yapıldı. Sıçanlar inhalasyon hasarı sonrası inflamasyonun en yoğun olduğu 24. saatte sakrifiye edilerek, serumlarında ölçüm yapıldı. (22, 108).

Kan örnekleri, 4000 devir/dk hızında, 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Serum örnekleri analiz gününe kadar (yaklaşık 10-90 gün arası) -20°C’de saklandı. Serumda değerlendirme yapılabilmesi için, katı sandviç metoduyla ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) yöntemi kullanıldı. Ticari olarak temin edilen sıçan kitleri MPO, TNF- α , IL-1 ve IL-6 konsantrasyon analizi için kullanıldı.

ELISA kiti tabakasının (ELISA kit plate) üzerindeki kuyucuklar, spesifik antikorlarla kaplıdır. Sıçanın serumu, kuyucuklara eklenir, böylece ortamda bulunan MPO, TNF- α , IL-1 ve IL-6 molekülleri, kuyucuk duvarlarına yapışık antikorlarca tutulur. Ortama, bakılan sitokinlere karşı bir antikor olan biyotinle işaretlenmiş konjugat eklenir ve 1 saat inkübasyona bırakılır. Biyotin, dolayısıyla konjugat, sitokinlere bağlanır ve sandviç yapısını oluşturur. Avidinle işaretli peroksidaz enzimi ortama eklenir ve 45 dakika inkübasyona bırakılır. Peroksidaz, konjugata yani sitokin sandviğine bağlanır.

Peroksidazın substratı olan 3,3', 5,5' Tetrametilbenzidin'in (TMB) eklenmesiyle reaksiyon oluşur ve kuyucuklarda, örnek içindeki sitokin konsantrasyonu ile doğru orantılı yoğunlukta mavi renk meydana getirir. Otuz dakikalık bekleme süresinin ardından, son basamakta kuyucuklara eklenen “stop çözeltisi” ortam pH’sını düşürerek peroksidazın katalizlediği reaksiyonu durdurur. Aynı zamanda kuyucuk içindeki çözeltinin rengini de maviden sarıya dönüştürür. Oluşan bu rengin yoğunluğu, tabaka okuyucu (plate reader) ile 450nm’de ölçülür. Mevcut olan MPO, TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeyi pg/ml cinsinden belirlenir.

3.8.2 Histolojik Yöntem

Duman inhalasyonu ile akciğerlerde oluşan hasarın histolojik olarak değerlendirildiği birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda akciğerlerde; bronşit, inter-alveoler septal konjesyon, intraalveoler hemoraji, atelektazi, intra-alveolar sıvı birikimi, lökosit infiltrasyonu, makrofaj yoğunluğu ve solunum epitelinde dökülme gibi değişiklikler gözlemlenmiştir (13, 111-114). Çalışmamızda inter-alveoler septal konjesyon, intra-alveoler hemoraji, intra-alveolar sıvı birikimi, lökosit yoğunluğu, makrofaj yoğunluğu ve solunum epitelinde dökülme bakıldı.

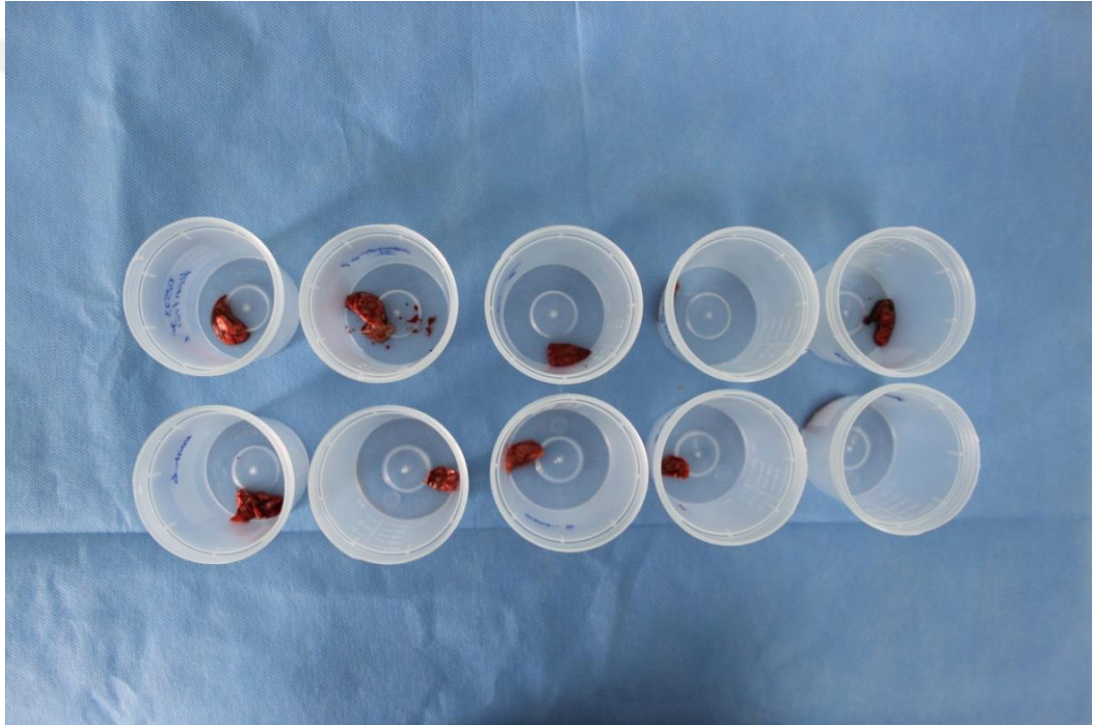
Işık mikroskopisi için tüm sıçanlardan, sol akciğerlerin aynı anatomik bölgelerden kesitler alındı. Deney hayvanlarından alınan akciğer örnekleri ışık mikroskobu incelemesi için %10 formalinde 24 saat tespit edildi. Dokular parafin bloklara gömülerek bloklandı. Parafine gömülen bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alındı ve preperat haline getirilen örnekler histolojik inceleme için Hemotoksilen-Eosin (HE) boyası ile boyandı. Aynı patolog tarafından tüm preparatlar semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Sonuçlar çok, orta, az ve yok olmak üzere değerlendirildi. Işık mikroskopu (Olympus BH-2) ile değerlendirmeleri yapılan preperatların Canon EOS 300D digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.8.3 Islak/Kuru Ağırlık Değerlendirilmesi

Islak/kuru ağırlık oranı akciğer ödemi belirteci olarak kullanıldı. Zhu ve ark.'ların çalışmasında inhalasyon sonrası ıslak/kuru oranının en yüksek 24 saat olması nedeni ile sıçanlar 24. saatte kurban edilip örnekler alındı (107, 113). Sıçanlar kurban edildikten sonra sağ akciğer ışık mikroskopik değerlendirmeler için kullanıldı. Sol akciğer ıslak/kuru ağırlık tespiti için kullanıldı. Bu nedenle sıçanlar kurban edilir edilmez sol akciğeri numaralandırılıp hassas terazi ile tartılarak not edildi (Şekil 20). Her bir akciğer oda ısısında 24 saat kaldıktan sonra ağırlıkları tekrar ölçüldü. Numaralandırılmış her bir akciğerin ıslak ağırlıkları kuru ağırlıklarına bölünerek ıslak/kuru oranları tespit edildi (115, 116) (Şekil 21).



Şekil 20: Islak-kuru ağırlık değerlendirilmesi

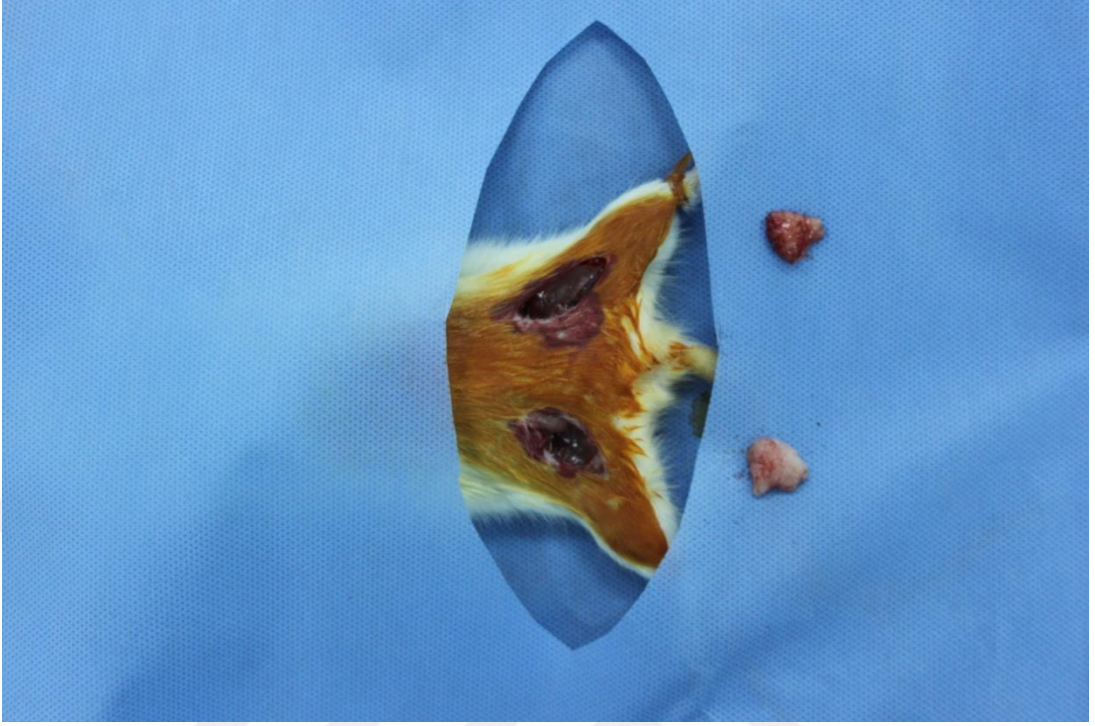


Şekil 21: Islak/kuru ağırlık değerlendirilmesi için numaralandırılmış akciğerlerin oda sıcaklığında 24 saat bekletilmesi

3.9 STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN HAZIRLANMASI

Anestezi altındaki sıçanların inguinal bölgeleri traşlandı, steril %10 povidon iyot (Isosol[®], Merkez Laboratuar, İstanbul, Türkiye) ile temizlendi. Her iki inguinal ligamente paralel olarak yapılan insizyon ile girilerek inguinal yağ yastıkçıklarından

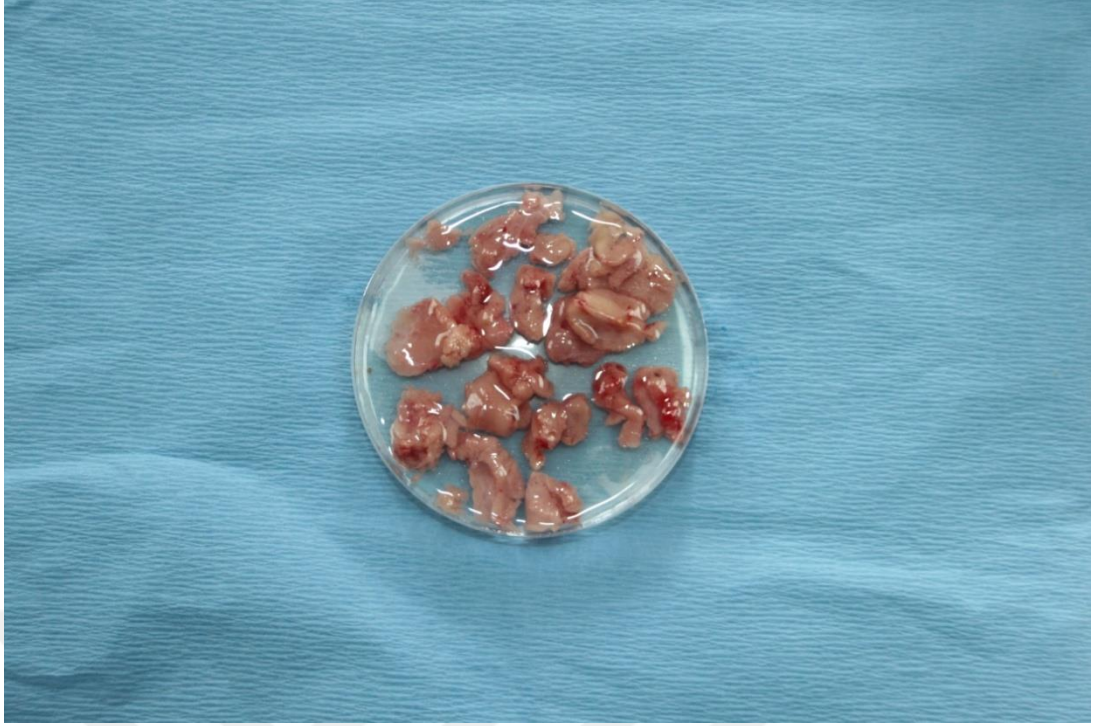
2 adet (1cm³) büyüklüğünde yağ dokusu eksize edildi (Şekil 22). İnsizyon alanları 3/0 atravmatik ipek basit dikiş (Doğsan[®], Trabzon, Türkiye) ile dikildi



Şekil 22: Sıçanların inguinal bölgelerinden yağ dokusu eksizyonu

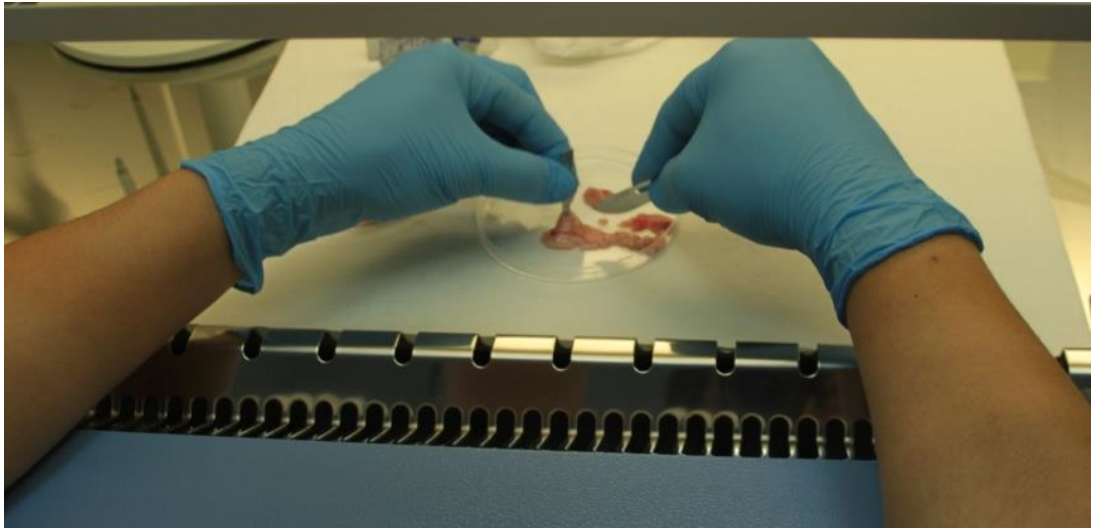
3.10 YAĞ DOKU HAVUZU OLUŞTURULMASI

Her bir sıçantan elde edilen yağ doku miktranın az olması ve ADSC'lerin allojenik olmamaları nedeni ile bu sorun yağ doku havuzları oluşturularak çözümlendi (117). Stromal vasküler fraksiyon içerisindeki diğer hücrelerin allojenik olabileceği göz ardı edildi. Donör SVF ve donör gruplarındaki tüm sıçanlardan alınan yağ dokularından iki ayrı havuz oluşturuldu (Şekil 23).



Şekil 23: Yağ dokusu havuzu

Çıkarılan yağ dokuları 3 kez fosfat buffer solüsyonu ile yıkandı. Önce 22 numaralı bistürü ile küçük parçalara bölündü (Şekil 24).

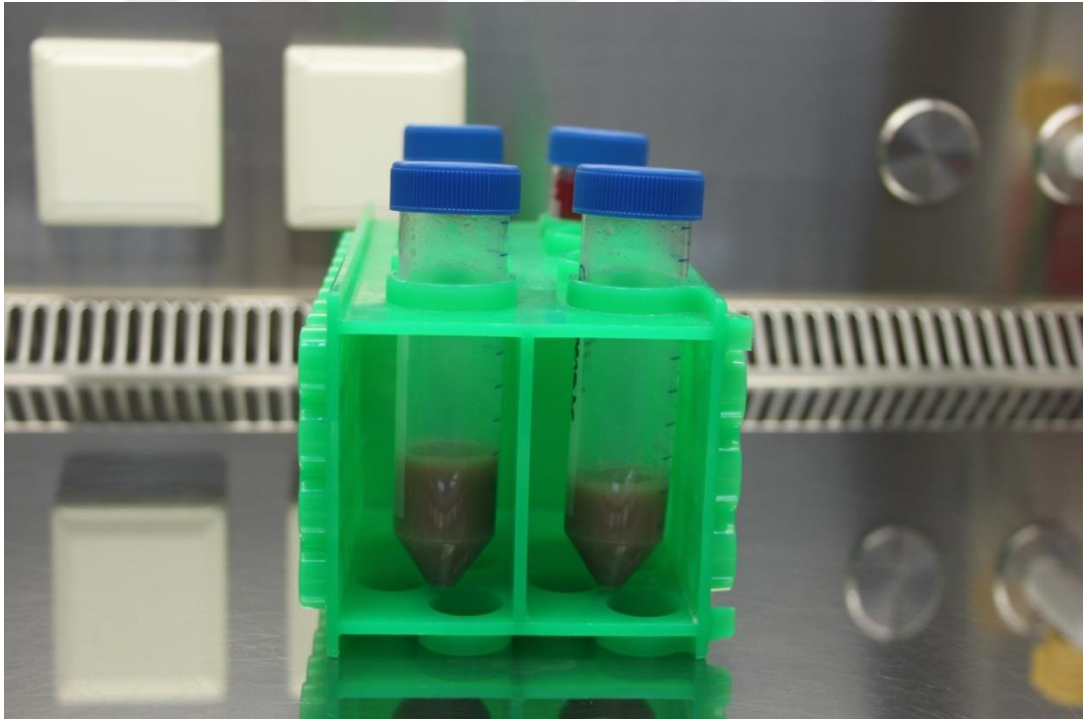


Şekil 24: Yağ dokunun 22 numaralı bistürü ile parçalanması

Dokular %0,1 kollajenazla (Collagenase I Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya) muamele edilerek mikserde 37°C de 60 dakika karıştırıldı (Şekil 25-26).



Şekil 25: Mikser yardımı ile kimyasal parçalanma



Şekil 26: Kollejenazla 60 dakika çalkalanan yağ doku

Kollajenazın nötralizasyonu için %10 Phosphate-buffered Saline (PBS) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium'dan (DMEM) oluşan kontrol medium eklendi (Şekil 27). Hücre süspansiyonu 1300 rpm (260G) de beş dakika santrifüj edildi.



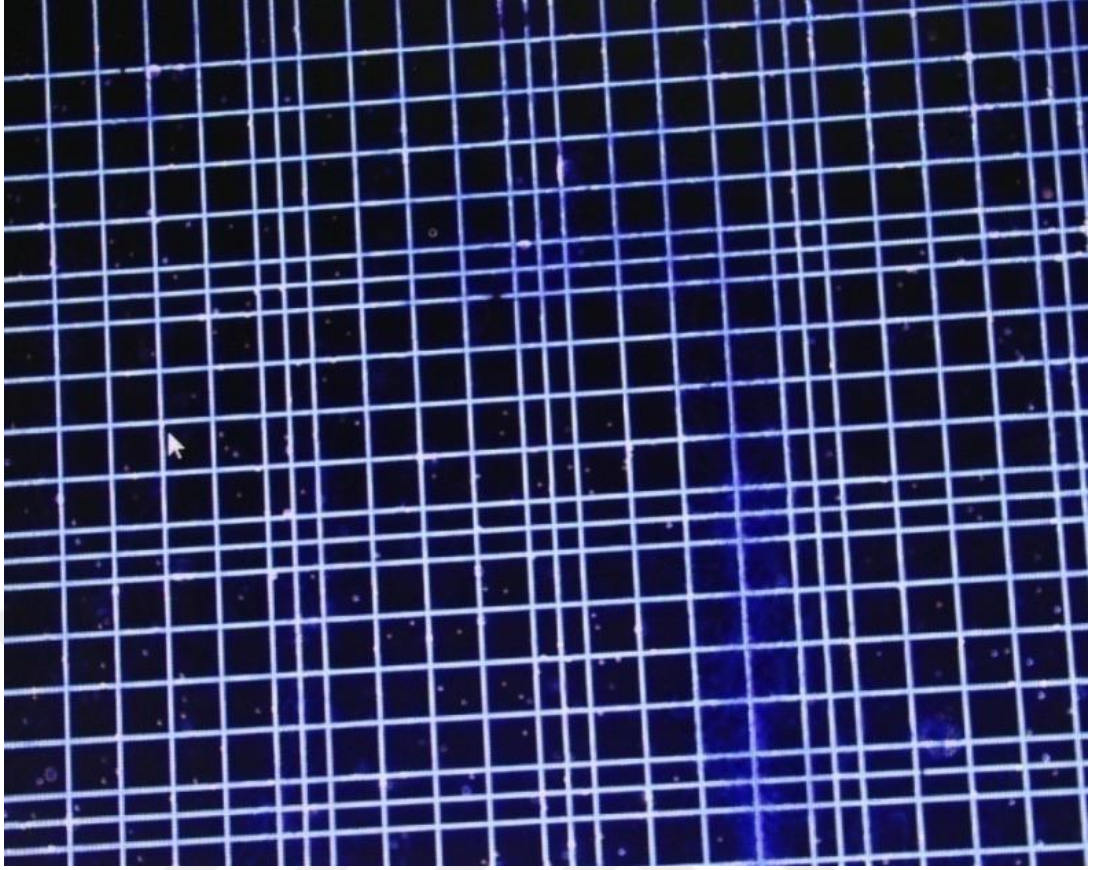
Şekil 27: Phosphate-buffered saline eklenerek kollejenazın aktivitesinin azaltılması

En üstte matür adipositlerden oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Dibe çöken pellet kısım filtreden süzülerek “Stromal Vasküler Fraksiyon” olarak kullanıldı (55, 118) (Şekil 28). Donör SVF ve Donör gruplarından elde edilen SVF, her bir grup için 2 ml olacak şekilde serum fizyolojik ile seyreltilti. Bu şekilde yoğunluğu azalan SVF' nin kuyruk veninden daha kolay verilmesi planlandı.



Şekil 28: Phosphate Buffered Saline eklenmesi sonrası santrifüj işlemi, altta kalan koyu renkli kısım SVF

Elde ettiğimiz SVF'nin bir kısmı, canlı hücre sayımı için trypan blue ile boyandı. 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 50µl pipetlendi. Daha sonra Thoma lamı mikroskopun tablasına yerleştirildi. Hücreler tek tek sayılarak not edildi (119). Yaklaşık olarak 4×10^6 /ml canlı hücre tespit edildi (Şekil 29).



Şekil 29: Thoma lamında hücre sayımı

Donör ve donör olmayan SVF grubuna 0,2 ml (içerisinde ortalama 800.000 hücre olacak şekilde) kuyruk veninden serum fizyolojik ile seyreltilmiş SVF sistemik olarak verildi (Şekil 30).



Şekil 30: Kuyruk veninden SVF verilmesi

3.11 İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Değişkenleri tanımlamak için ortalama $\pm$ standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri kullanıldı.

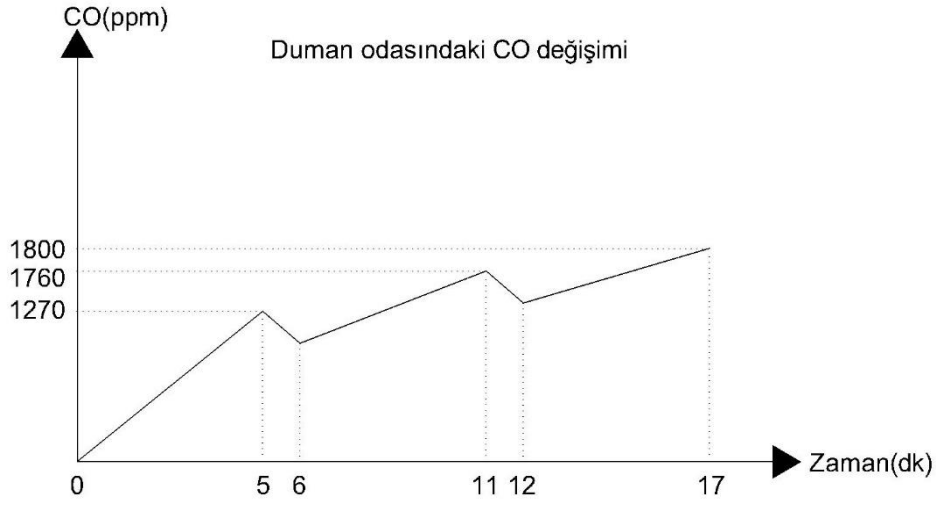
Parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenleri karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. ANOVA sonucunda fark bulunduğunda farkın kaynağı Bonferroni post-hoc testi ile araştırıldı.

Nonparametrik verileri karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Fark bulunduğunda farklı grubu belirleyebilmek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldı.

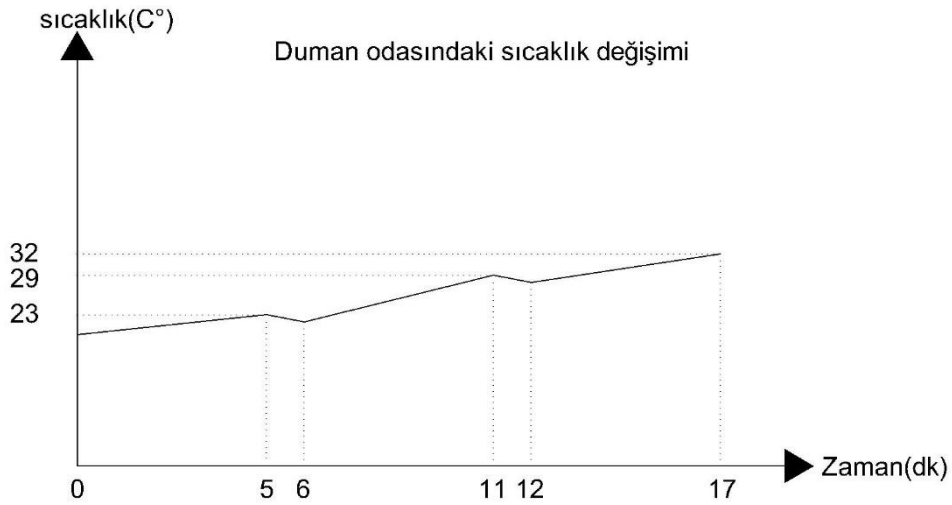
İstatistiksel analiz ve hesaplamalar IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp, NA, USA) ile yapıldı. İstatistiksel olarak, $p \leq 0,05$ değeri anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Duman odasındaki CO miktarı ve sıcaklık Testo[®] 327-1 baca gazı analizatörü ile ölçüldü. Deney sırasında duman odasındaki CO seviyesi takip edilerek gruplar arasında homojenizasyon sağlandı. Oda sıcaklığının 35C° üzerine çıkması engellenerek sıcak havaya bağlı inhalasyon hasarı engellendi. Örnek gruptaki, CO ve duman odası sıcaklığının zamana bağlı değişimi aşağıda gösterilmiştir (Şekil 31-32).



Şekil 31: Duman odasındaki CO değişimi



Şekil 32: Duman odasındaki sıcaklık değişimi

4.1 ISLAK/KURU ORANLARI

Sakrifiye edilen sıçanların numaralandırılmış akciğerleri oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra hassas terazide tekrar ölçülerek, ıslak ağırlık oranı kuru ağırlık oranına bölünerek aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 12).

Tablo 12:Islak/kuru ağırlık oranları

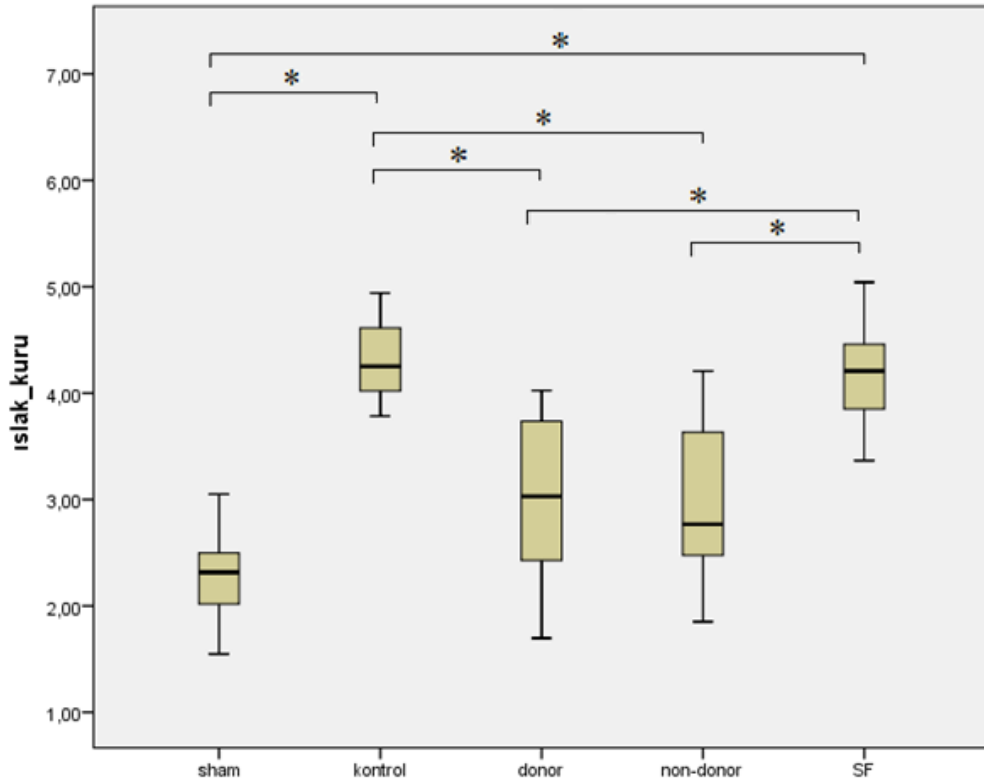
	Sham	Kontrol	Donör SVF	Donör olmayan SVF	SF
Islak/kuru ağırlık oranı	2,03	4,15	3,22	4,21	3,85
	2	4,05	4,02	2,26	4,32
	2,02	4,61	3,53	4,03	4,10
	3,05	4,94	3,74	2,48	4,46
	2,37	3,78	3,95	3,63	3,98
	2,62	4,35	2,18	2,88	4,41
	2,5	4,02	2,84	3,51	6,14
	2,26	4,85	2,84	1,85	3,37
	1,55	4,43	2,43	2,54	3,43
	2,43	2,88	1,70	2,65	5,04

Gruplardaki deneklere ait akciğer ıslak/kuru ağırlık oranlarına ait değerler “Sham” grubunda $2,28 \pm 0,41$; “Kontrol” grubunda $4,21 \pm 0,60$; “SF” grubunda $4,31 \pm 0,81$; “Donör olan SVF” grubunda $3,04 \pm 0,79$ ve “Donör olmayan SVF” grubunda ise $3,00 \pm 0,79$ olarak saptandı (Tablo 13, şekil 33). ANOVA testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak önemli anlamlılık vardı ($p < 0,001$). Farkın kaynağı Bonferroni post-hoc testi ile araştırıldı. “Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki ağırlık oran değerleri “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak önemli anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p < 0,001$; $p < 0,001$). “Sham” grubu ile “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p = 0,185$; $0,251$). “Kontrol” grubu ile “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” gruplarının ağırlık oran değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p = 0,005$; $0,004$). “Kontrol” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında, ağırlık oran değerleri aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p = 1,000$). “Donör SVF” grubu ile “donör olmayan SVF” grubu ikili

kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Donör SVF” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında ise, “donör SVF” grubunun ağırlık oran değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,002$). “Donör olmayan SVF” grubu ile “SF” grubu kıyaslandığında da, “donör olmayan SVF” grubunun ağırlık oran değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0.001$).

Tablo 13: Tüm gruplara ait akciğer dokusu ıslak/kuru ağırlık oranları tanımlayıcı verileri

Grup	Ortalama	Standart Hata	Medyan	Minimum	Maximum
Sham	2,28	,41	2,31	1,55	3,05
Kontrol	4,21	,60	4,25	2,88	4,94
Donör SVF	3,04	,79	3,03	1,70	4,02
Donör olmayan SVF	3,00	,79	2,77	1,85	4,21
SF	4,31	,81	4,21	3,37	6,14



Şekil 33: Tüm gruplara ait akciğer dokusu ıslak/kuru ağırlık oranları tanımlayıcı veri grafiği ve istatistiksel anlamlılıkları (*: $p<0,05$)

4.2 BİYOKİMYASAL PARAMETRELER

4.2.1 Myeloperoksidaz Düzeyleri

Gruplara ait MPO düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14: Deney gruplarının MPO düzeyleri

	Sham	Kontrol	Donör SVF	Donör olmayan SVF	SF
MPO (ng/ml)	1,23	2,89	1,63	2,83	2,09
	1,09	3,16	1,03	1,09	2,23
	1,89	2,03	1,22	0,96	2,49
	0,69	3,63	2,48	2,29	2,76
	0,29	2,63	2,03	1,09	1,89
	1,09	2,96	1,32	0,42	3,10
	2,29	3,03	0,56	0,69	2,33
	1,89	3,83	1,12	1,76	2,49
	0,83	4,28	1,77	0,96	2,83
	1,63	*	1,96	1,23	2,96

(* ile işaretli değer güvenilir veri olmadığı düşünülerek değerlendirmeye alınmadı.)

Gruplardaki deneklere ait MPO değerleri “Sham” grubunda $1,29 \pm 0,62$; “Kontrol” grubunda $3,16 \pm 0,67$; “SF” grubunda $2,52 \pm 0,39$; “Donör SVF” grubunda $1,51 \pm 0,57$ ve “Donör olmayan SVF” grubunda ise $1,33 \pm 0,74$ olarak bulundu (Tablo 15, şekil 34). ANOVA testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p < 0,001$). Farkın kaynağı Bonferroni post-hoc testi ile araştırıldı.

“Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki MPO değerleri “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p < 0,001$; $p = 0,001$). “Sham” grubu ile “Donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p = 1,000$; $1,000$).

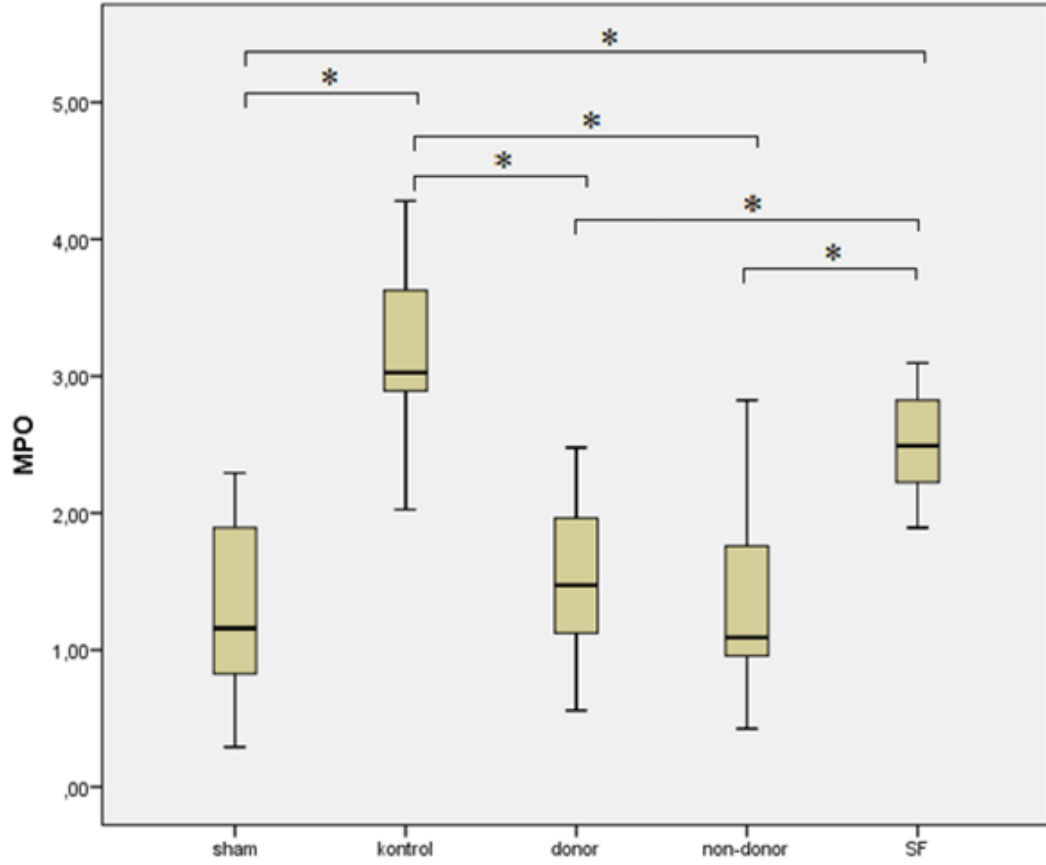
“Kontrol” grubu ile “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” gruplarının MPO değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $<0,001$). “Kontrol” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,268$).

“Donör SVF” grubu ile “donör olmayan SVF” grubu ikili kıyaslandığında, “donör SVF” grubu MPO değeri göre daha düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Donör SVF” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında ise, “donör SVF” grubunun MPO değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,006$).

“Donör olmayan SVF” grubu ile “SF” grubu kıyaslandığında da, “donör olmayan SVF” grubunun MPO değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,001$).

Tablo 15: Tüm gruplara MPO ölçümlerine ait tanımlayıcı veriler

Grup	Ortalama	Standart Hata	Medyan	Minimum	Maximum
Sham	1,29	0,62	1,16	0,29	2,29
Kontrol	3,16	0,67	3,03	2,03	4,28
Donör SVF	1,51	0,57	1,47	0,56	2,48
Donör olmayan SVF	1,33	0,74	1,09	0,42	2,83
SF	2,52	0,39	2,49	1,89	3,10



Şekil 34: Tüm gruplara MPO (ng/ml) ölçümlerine ait tanımlayıcı veri grafiği ve istatistiksel anlamlılıkları (*: $p < 0,05$)

4.2.2 TNF- α Düzeyleri

Tablo 16: Deney gruplarının TNF- α düzeyleri

	Sham	Kontrol	Donör SVF	Donör olmayan SVF	SF
TNF- α (ng/ml)	3365,13	4855,69	3709,44	4600,97	4346,25
	3638,74	5454,72	2563,2	2817,92	4728,33
	3426,84	6964,17	2690,56	3327,36	4327,36
	3218,89	5964,17	2690,56	3709,44	4855,69
	3473,61	5365,13	3582,08	4091,53	4817,92
	3256,66	6709,44	3072,64	2945,28	4200
	3415,50	6766,1	3327,36	3454,72	7148,18
	3327,36	5072,64	3582,08	4365,13	4346,25
	3327,36	5327,36	3454,72	3327,36	5874,58
	4327,36	5857,25	3200	2945,28	7294,43

Gruplara ait TNF- α düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 16). Gruplardaki deneklere ait TNF- α değerleri “Sham” grubunda $3491,89 \pm 362,53$; “Kontrol” grubunda $5831,05 \pm 797,38$; “SF” grubunda $5193,90 \pm 1171,09$; “Donör SVF” grubunda $3187,27 \pm 417,90$ ve “Donör olmayan SVF” grubunda ise $3558,50 \pm 620,26$ olarak saptandı (Tablo 17, Şekil 35). Kruskal-Wallis testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p < 0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile grupların post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldı.

“Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki TNF- α değerleri “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p=0,003$; $p=0,040$). “Sham” grubu ile “Donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p=1,000$; $1,000$).

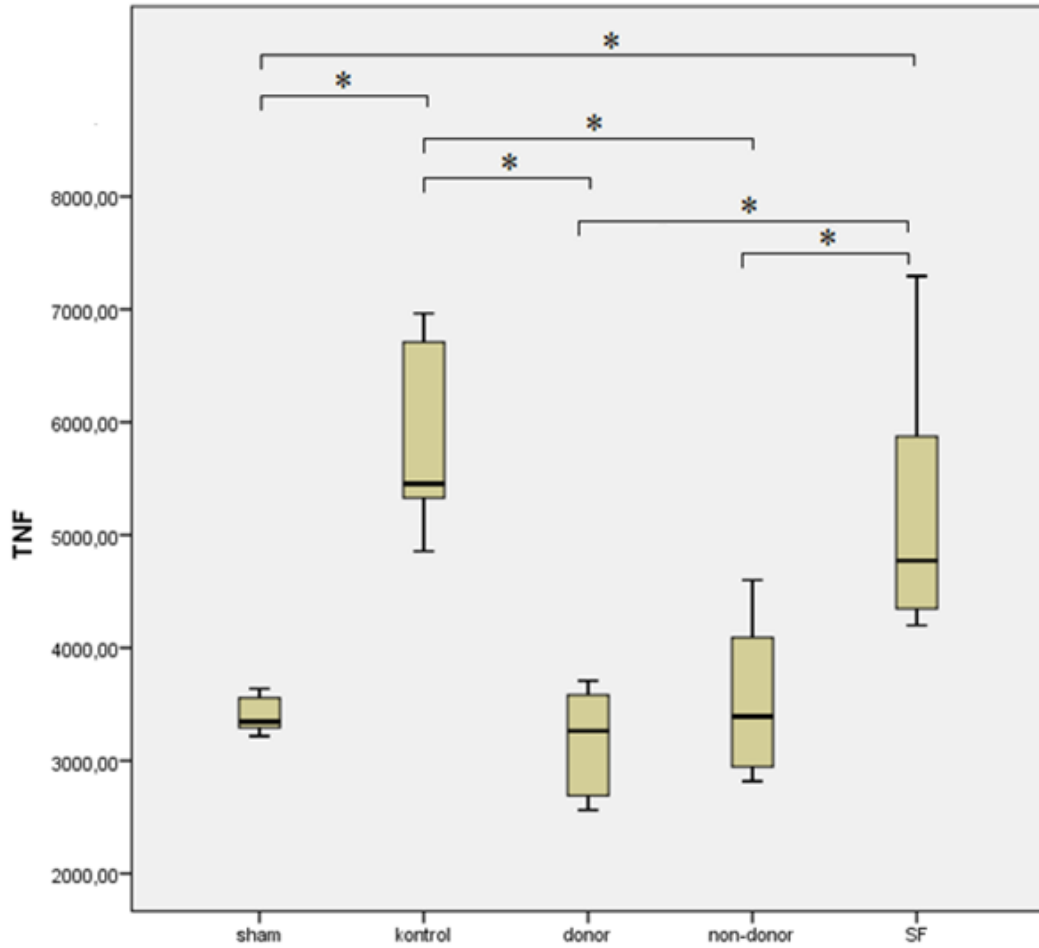
“Kontrol” grubu ile “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” gruplarının TNF α değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p < 0,001$; $p=0,002$). “Kontrol” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$).

“Donör SVF” grubu ile “donör olmayan SVF” grubu ikili kıyaslandığında, “Donör SVF” grubu TNF- α değeri göre daha düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Donör SVF” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında ise, “donör SVF” grubunun TNF- α değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,001$).

“donör olmayan SVF” grubu ile “SF” grubu kıyaslandığında da, “donör olmayan SVF” grubunun TNF- α değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,035$).

Tablo 17: Tüm gruplara TNF- α ölçümlerine ait tanımlayıcı veriler

Grup	Ortalama	Standart Hata	Medyan	Minimum	Maximum
Sham	3491,89	362,53	3346,25	3218,89	4327,36
Kontrol	5831,05	797,38	5454,72	4855,69	6964,17
Donör SVF	3187,27	417,90	3263,68	2563,20	3709,44
Donör olmayan SVF	3558,50	620,26	3391,04	2817,92	4600,97
SF	5193,90	1171,09	4773,12	4200,00	7294,43



Şekil 35: Tüm gruplara TNF- α (ng/ml) ölçümlerine ait tanımlayıcı veri grafiği ve istatistiksel anlamlılıkları (*: $p < 0,05$)

4.2.3 IL-1 Düzeyleri

Tablo 18: Deney gruplarının IL-1 düzeyleri

	Sham	Kontrol	Donör	Donör olmayan SVF	SF
IL-1 (ng/ml)	1198,51	886,45	184,32	1198,51	574,4
	666,6	1886,45	1120,5	1120,5	1042,48
	574,4	1198,51	1744,61	184,32	659,51
	1120,5	1808,44	574,4	1198,51	1666,6
	418,37	1808,44	1042,48	1432,55	2290,71
	1198,51	1574,4	262,34	418,37	1042,48
	914,82	574,4	1257,52	808,44	1276,52
	1290,71	1574,4	808,44	964,47	886,45
	320,5	1978,65	1900,64	1120,5	1198,51
	1432,55	*	262,34	574,4	2368,72

(* ile işaretli değer güvenilir veri olmadığı düşünülerek değerlendirmeye alınmadı.)

Grupların IL-1 düzeyleri aşağıdaki tablodaki gibidir (Tablo 18). Gruplardaki deneklere ait IL-1 değerleri “Sham” grubunda $673,55 \pm 185,14$; “Kontrol” grubunda $1476 \pm 487,21$; “SF” grubunda $1430 \pm 536,77$; “Donör SVF” grubunda $726,66 \pm 221,53$ ve “Donör olmayan SVF” grubunda ise $712,06 \pm 248,23$ olarak saptandı (Tablo 19, Şekil 36). Kruskal-Wallis testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p < 0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile grupların post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldı.

“Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki IL-1 değerleri “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p = 0,003$; $p = 0,001$). “Sham” grubu ile “Donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p = 1,000$; $1,000$).

“Kontrol” grubu ile “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” gruplarının IL-1 değerleri

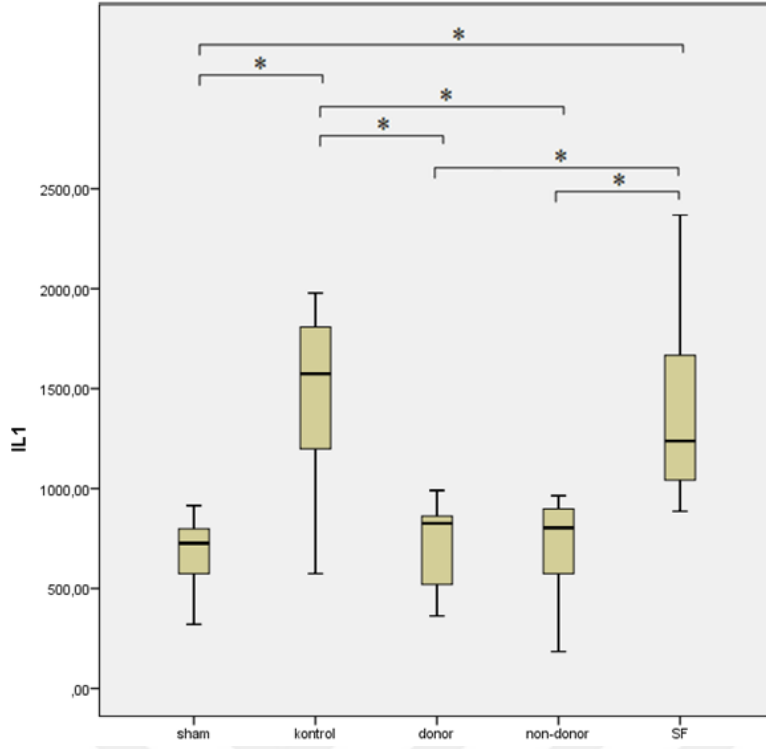
istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p=0,038$; $0,030$). “Kontrol” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$).

“Donör SVF” grubu ile “donör olmayan SVF” grubu ikili kıyaslandığında, “Donör SVF” grubu IL-1 değerine göre daha düşük olmasına rağmen aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Donör SVF” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında ise, “donör SVF” grubunun IL-1 değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,016$).

“Donör olmayan SVF” grubu ile “SF” grubu kıyaslandığında da, “donör olmayan SVF” grubunun IL-1 değerleri istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi ($p=0,013$).

Tablo 19: Tüm gruplara IL-1 ölçümlerine ait tanımlayıcı veriler

Grup	Ortalama	Standart Hata	Medyan	Minimum	Maximum
sham	673,55	185,14	726,52	320,50	914,82
kontrol	1476,68	487,21	1574,40	574,40	1978,65
donör SVF	726,66	221,53	825,46	362,34	990,64
donör olmayan SVF	712,06	248,23	803,47	184,32	964,47
SF	1430,64	536,77	1237,52	886,45	2368,72



Şekil 36: Tüm

gruplara IL-1(ng/ml) ölçümlerine ait tanımlayıcı veri grafiği ve istatistiksel anlamlılıkları (*: $p < 0,05$)

4.2.4 IL-6 Düzeyleri

Tablo 20: Deney gruplarının IL-6 düzeyleri

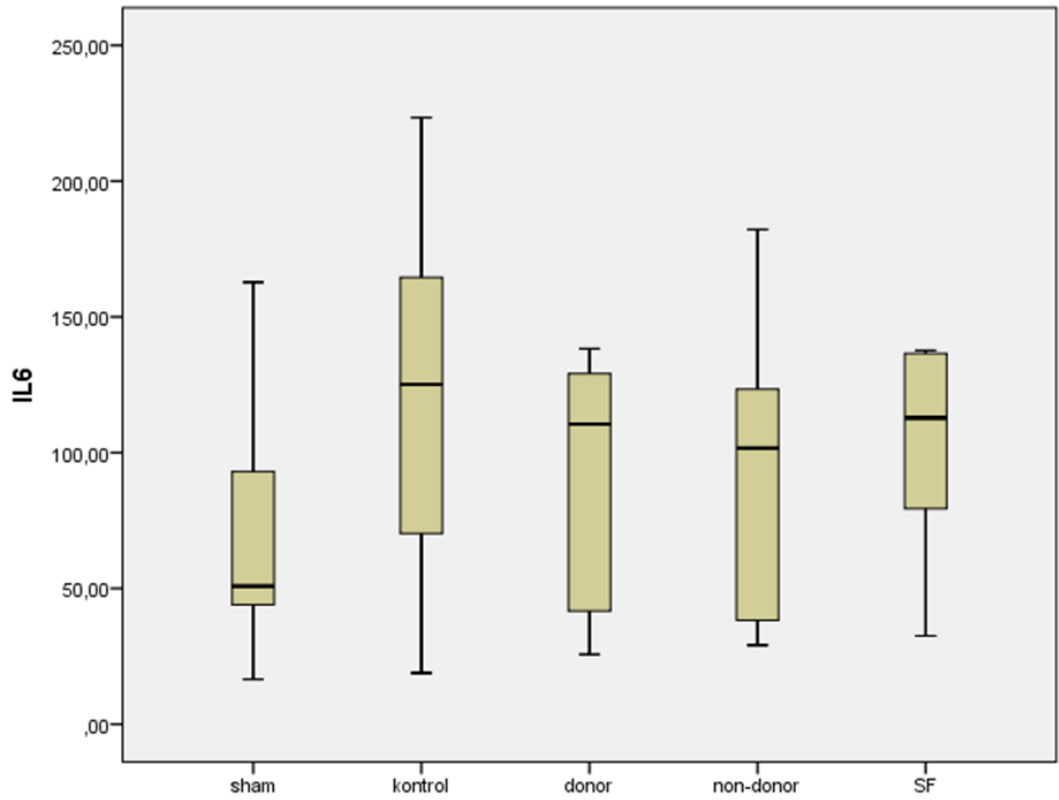
	Sham	Kontrol	Donör SVF	Donör olmayan SVF	SF
IL-6 (ng/ml)	102,24	18,84	32,55	63,4	137,66
	43,97	145,12	15,41	38,26	106,81
	53,11	121,12	25,69	188,22	66,82
	81,68	70,25	93,1	29,12	37,12
	43,97	181,07	38,26	97,67	18,84
	31,41	48,54	105,67	105,67	35,98
	93,1	223,41	133,09	35,98	
	16,55	127,98	25,69	38,26	
	162,79	164,54	41,69	22,26	91,96
	48,54	*	29,12	23,41	32,55

(* ile işaretli değer güvenilir veri olmadığı düşünülerek değerlendirmeye alınmadı.)

Gruplara ait IL-6 düzeyleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 20). Gruplardaki deneklere ait IL-6 değerleri “Sham” grubunda $67,74 \pm 43,10$; “Kontrol” grubunda $120,10 \pm 65,49$; “SF” grubunda $103,47 \pm 38,00$; “Donör SVF” grubunda $94,03 \pm 44,09$ ve “Donör olmayan SVF” grubunda ise $93,62 \pm 50,24$ olarak saptandı (Tablo 21, Şekil 37). ANOVA testi sonucu tüm gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,244$). Gruplar arası farklılığı ifade etmek üzere p değerleri Bonferroni post-hoc testi ile belirlendi.

Tablo 21: Tüm gruplara IL-6 ölçümlerine ait tanımlayıcı veriler

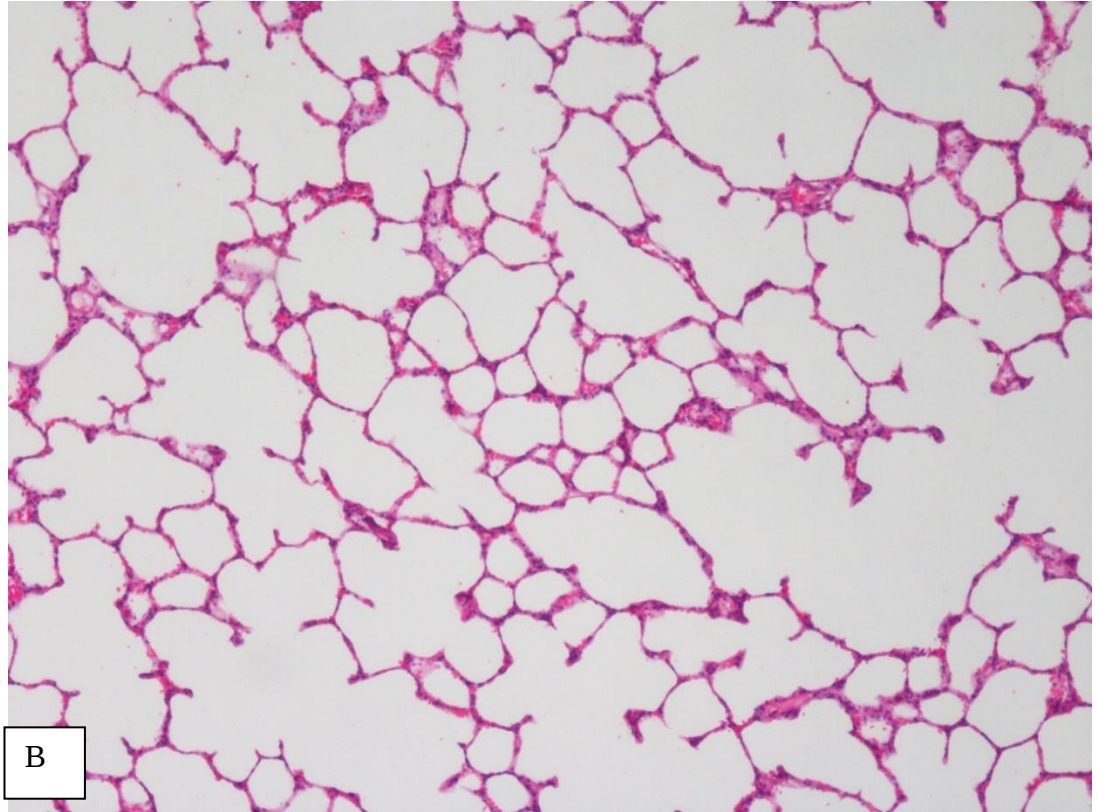
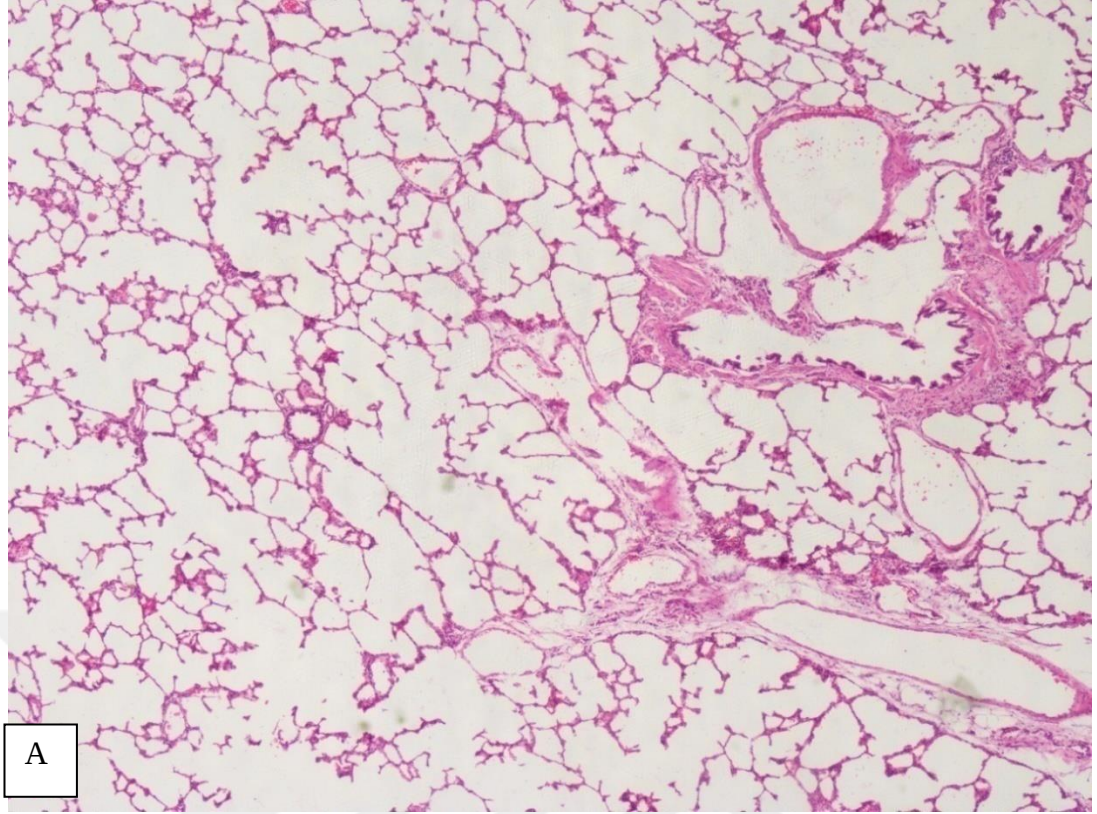
Grup	Ortalama	Standart hata	Medyan	Minimum	Maximum
Sham	67,74	43,10	50,83	16,55	162,79
Kontrol	120,10	65,49	125,12	18,84	223,41
Donör SVF	94,03	44,09	110,54	25,69	138,26
Donör olmayan SVF	93,62	50,24	101,67	29,12	182,22
SF	103,47	38,00	112,82	32,55	137,66



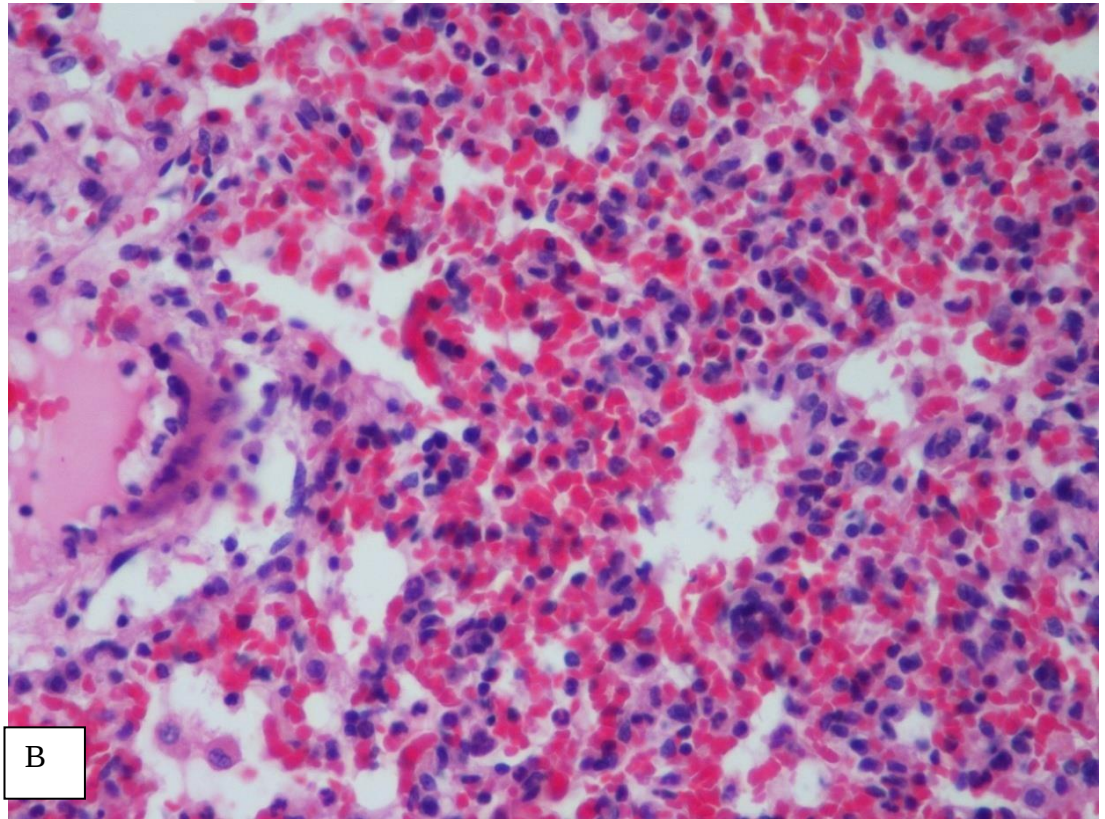
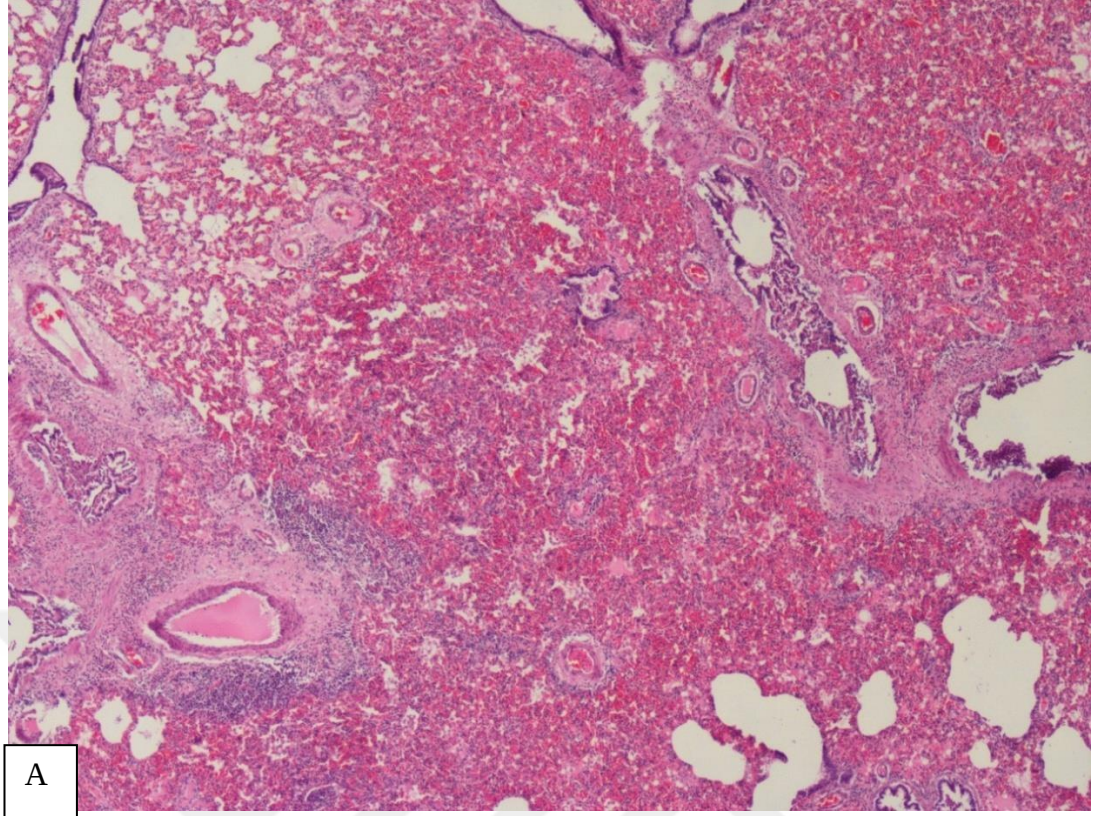
Şekil 37: Tüm gruplara IL-6 (ng/ml) ölçümlerine ait tanımlayıcı veri grafiği

4.3 IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME

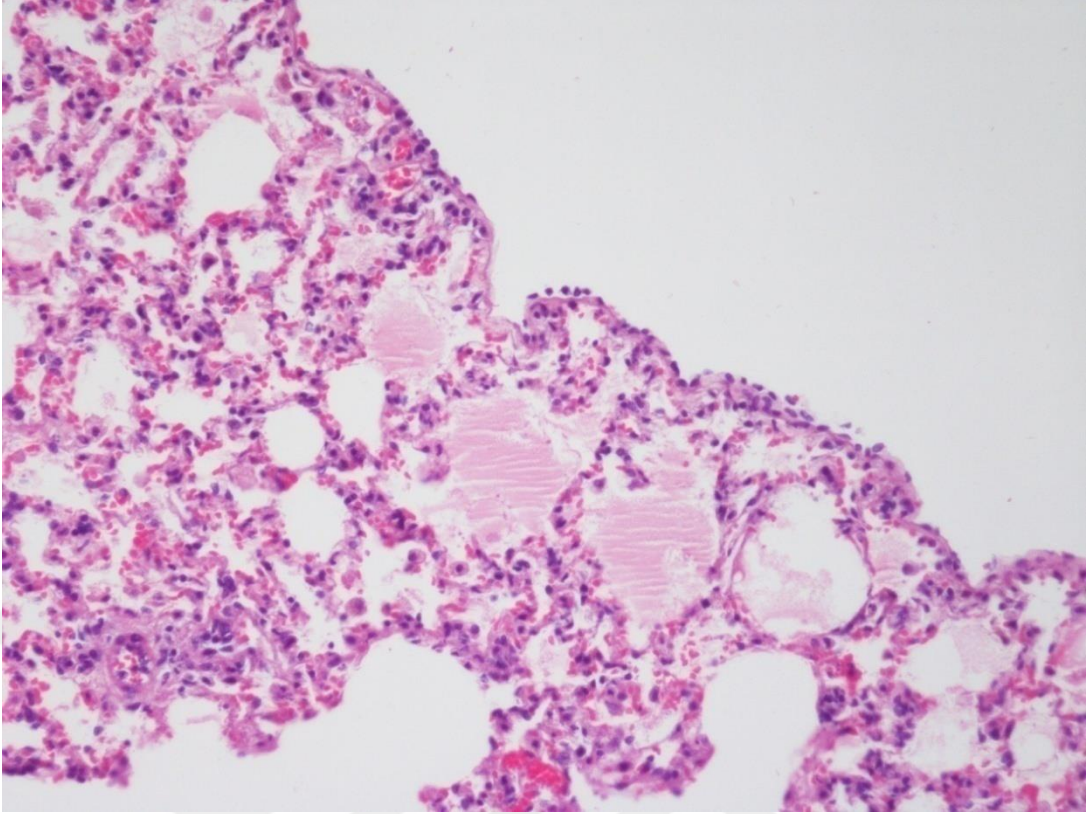
Akciğerlerin, ışık mikroskobu ile yapılan incelemesinde; inter-alveolar sıvı birikimi, intra-alveolar septal konjesyon, intra-alveolar hemoraji, nötrofil ve makrofaj sayısı, solunum epitelinde dökülme bakıldı. Sham grubu göre kontrol grubundaki parankim yapısındaki hasar ve hücre yoğunluğu fotoğraflarda gösterilmiştir (Şekil 37-38).



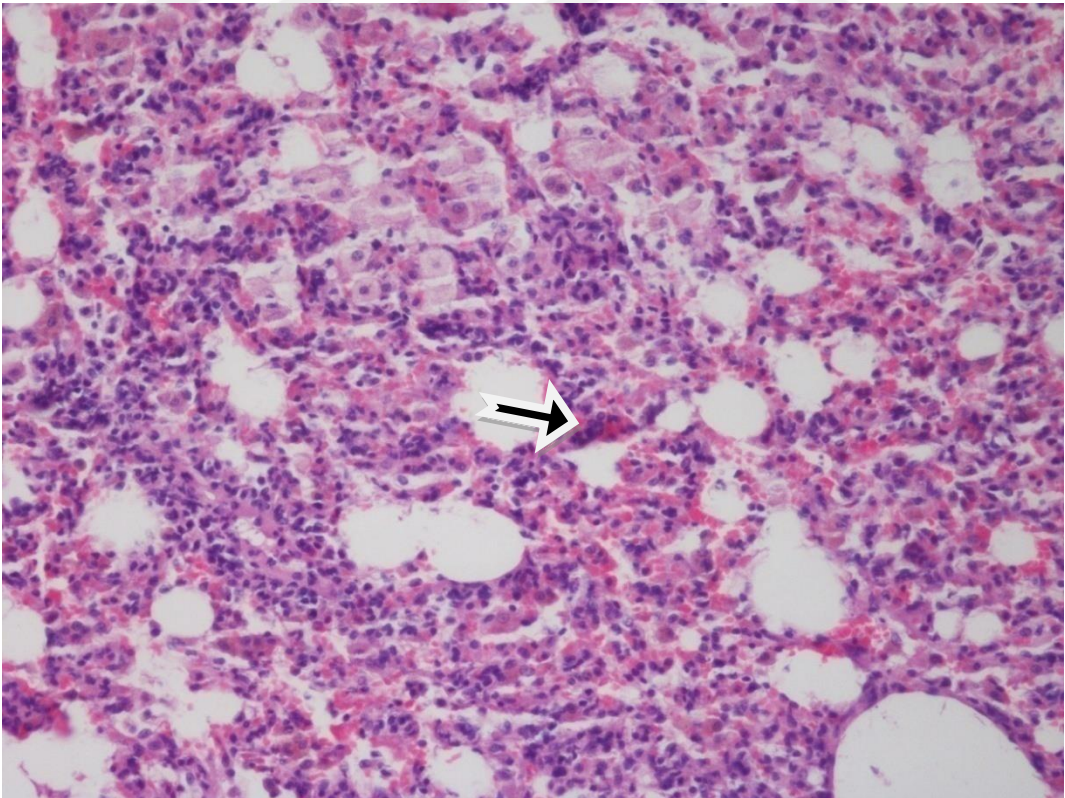
Şekil 38: Sham grubuna ait normal akciğerin ışık mikroskopik görüntüleri , A
HE×4, B HE×10



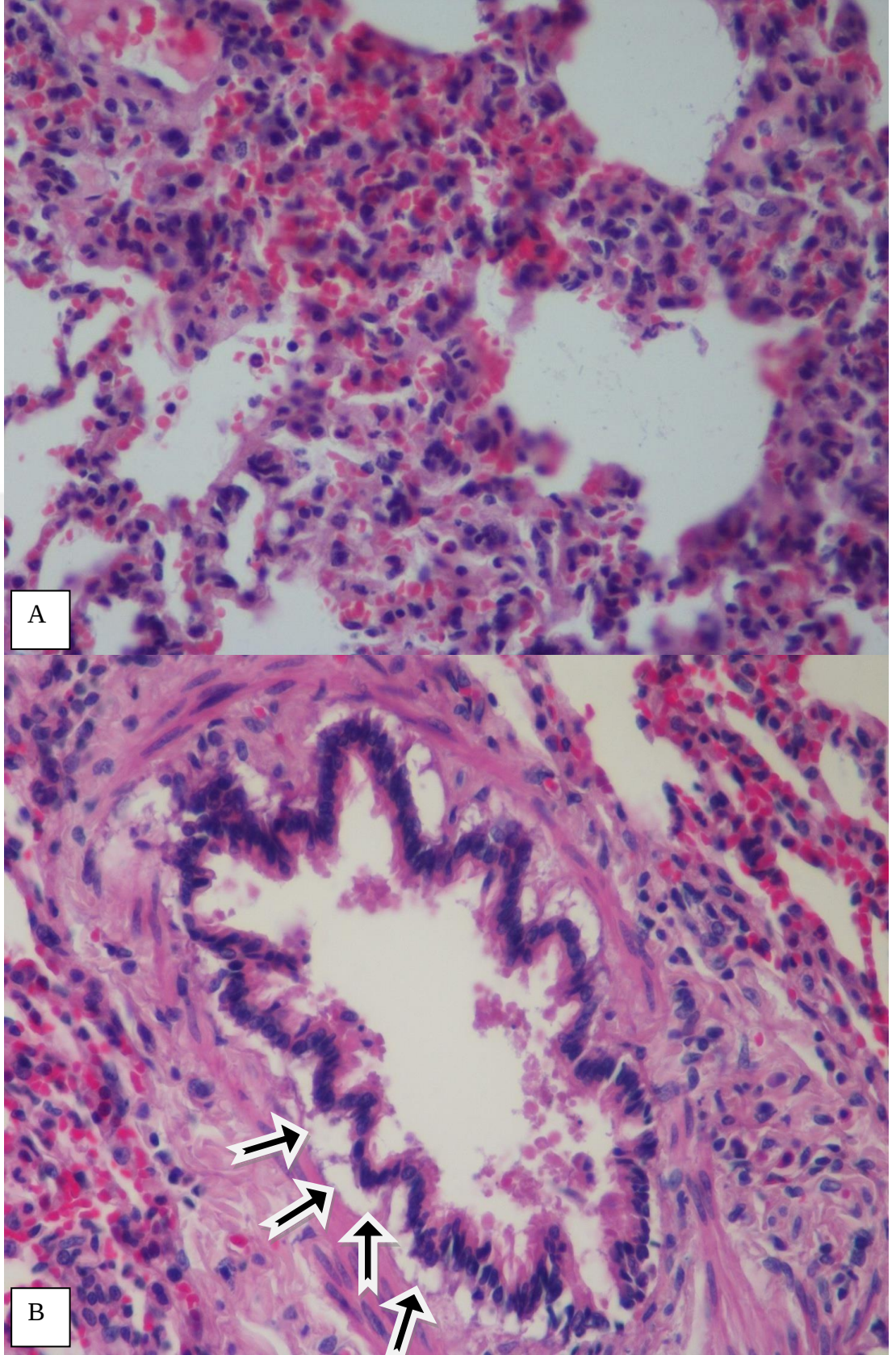
Şekil 39: Kontrol grubunun ışık mikroskopik görünümü, A: Yaygın hücresel inflamasyon HE×4, B: Yaygın intra-alveolar hemoraji HE×40



Şekil 40: SF grubundaki intra-alveolar sıvı birikimi HE×10



Şekil 41: Kontrol grubundaki yaygın makrofajlar ve ok ile işaretli bölgedeki hemosiderin yüklü makrofaj HE×10



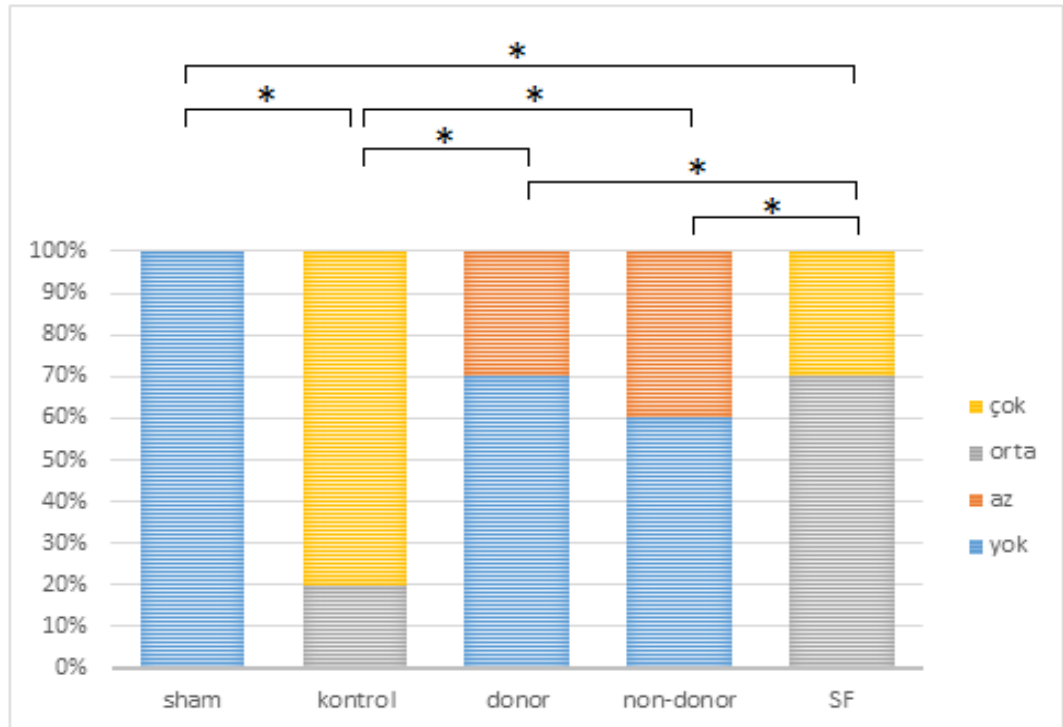
Şekil 42: A: Kontrol grubundaki yaygın nötrofil artışı HE×40, B: Solunum epiteli dökülmesi HE×40 B

4.3.1 Intra-alveolar Sıvı Birikimi

Gruplardaki deneklere ait intra-alveoler sıvı birikimi tabloda gösterilmiştir (Tablo 22, Şekil 43).

Tablo 22: Gruplardaki intra-alveolar sıvı birikim oranları

Grup		Yok	Az	Orta	Çok
Sham	N	10	0	0	0
	%	100,0	0,0	0,0	0,0
Kontrol	N	0	0	2	8
	%	0,0	0,0	20,0	80,0
Donör SVF	N	7	3	0	0
	%	70,0	30,0	0,0	0,0
Donör olmayan SVF	N	6	4	0	0
	%	60,0	40,0	0,0	0,0
SF	N	0	0	7	3
	%	0,0	0,0	70,0	30,0



Şekil 43: Tüm gruplara ait intra-alveolar sıvı birikimi oranları

Ki-Kare testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p<0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için grupların ikili karşılaştırmaları yapıldı.

“Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki intra-alveolar sıvı birikim “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p=0,001$). “Sham” grubu ile “Donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p=0,093$; $0,370$).

“Kontrol” grubu ile “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” gruplarındaki intra-alveolar sıvı birikim istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$).

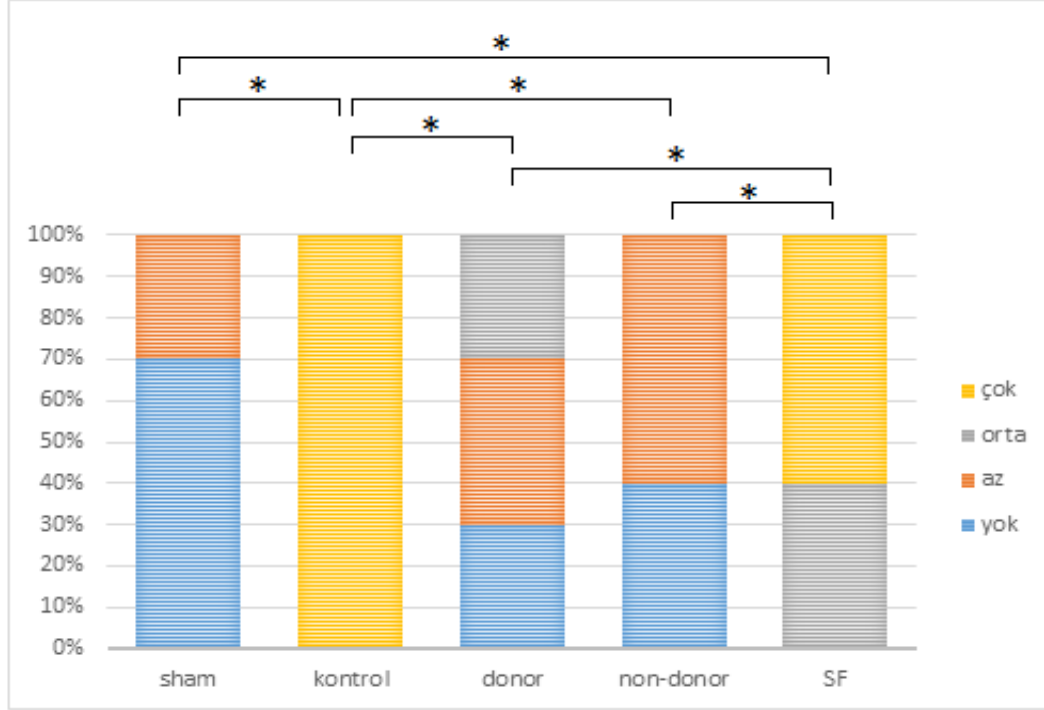
“Donör SVF” grubu ile “donör olmayan SVF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,170$). “Donör SVF” grubu ve “donör olmayan SVF” grubu “SF” grubu ile ikili kıyaslandığında ise, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grubundaki intra-alveolar sıvı birikim istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p=0,004$; $p<0,001$).

4.3.2 Inter-alveolar Septal Konjesyon

Gruplardaki deneklere ait inter-alveolar septal konjesyon tabloda gösterilmiştir (Tablo 23, Şekil 44).

Tablo 23: Gruplardaki inter-alveolar septal konjesyon oranları

Grup		Yok	Az	Orta	Çok
Sham	N	7	3	0	0
	%	70,0	30,0	0,0	0,0
Kontrol	N	0	0	0	10
	%	0,0	0,0	0,0	100,0
Donör SVF	N	3	4	3	0
	%	30,0	40,0	30,0	0,0
Donör olmayan SVF	N	4	6	0	0
	%	40,0	60,0	0,0	0,0
SF	N	0	0	4	6
	%	0,0	0,0	40,0	60,0



Şekil 44: Tüm gruplara ait inter-alveolar septal konjesyon oranları

Ki-Kare testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p<0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için grupların ikili karşılaştırmaları yapıldı.

“Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki interalveolar septal konjesyon “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$). “Sham” grubu ile “Donör SF” ve “donör olmayan SF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p=0,211$; $0,087$).

“Kontrol” grubu ile “donör SF” ve “donör olmayan SF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SF” ve “donör olmayan SF” gruplarındaki inter-alveolar septal konjesyon istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$). “Kontrol” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,070$).

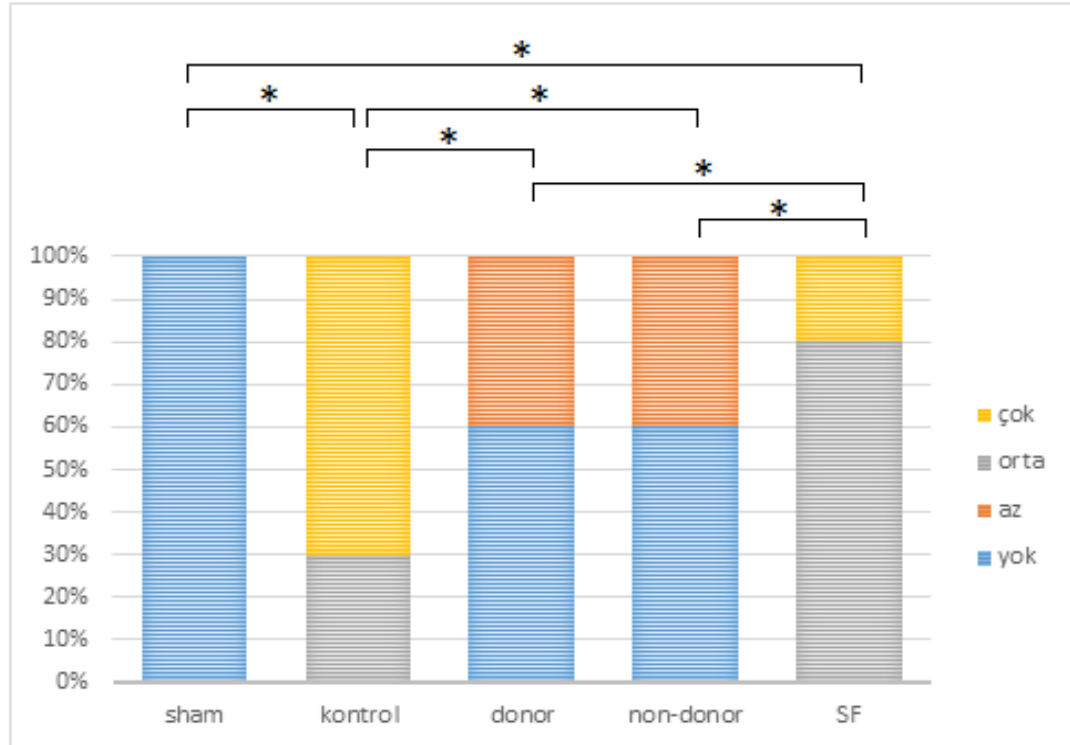
“Donör SF” grubu ile “donör olmayan SF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Donör SF” grubu ve “donör olmayan SF” grubu “SF” grubu ile ikili kıyaslandığında ise, “donör SF” ve “donör olmayan SF” grubundaki interalveolar septal konjesyon istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$).

4.3.3 Intra-alveolar Hemoraji

Gruplardaki deneklere ait intra-alveolar hemoraji değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 24, Şekil 45).

Tablo 24: Gruplardaki intra-alveolar hemoraji oranları

Grup		Yok	Az	Orta	Çok
Sham	N	10	0	0	0
	%	100,0	0,0	0,0	0,0
Kontrol	N	0	0	3	7
	%	0,0	0,0	30,0	70,0
Donör SVF	N	6	4	0	0
	%	60,0	40,0	0,0	0,0
Donör olmayan SVF	N	6	4	0	0
	%	60,0	40,0	0,0	0,0
SF	N	0	0	8	2
	%	0,0	0,0	80,0	20,0



Şekil 45: Tüm gruplara ait intra-alveolar hemoraji oranları

Ki-Kare testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p<0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için grupların ikili karşılaştırmaları yapıldı.

“Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki intra-alvolar hemoraji varlığı “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$). “Sham” grubu ile “Donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p=0,087$; $0,087$).

“Kontrol” grubu ile “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” gruplarındaki intra-alvolar hemoraji varlığı istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$). “Kontrol” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,070$).

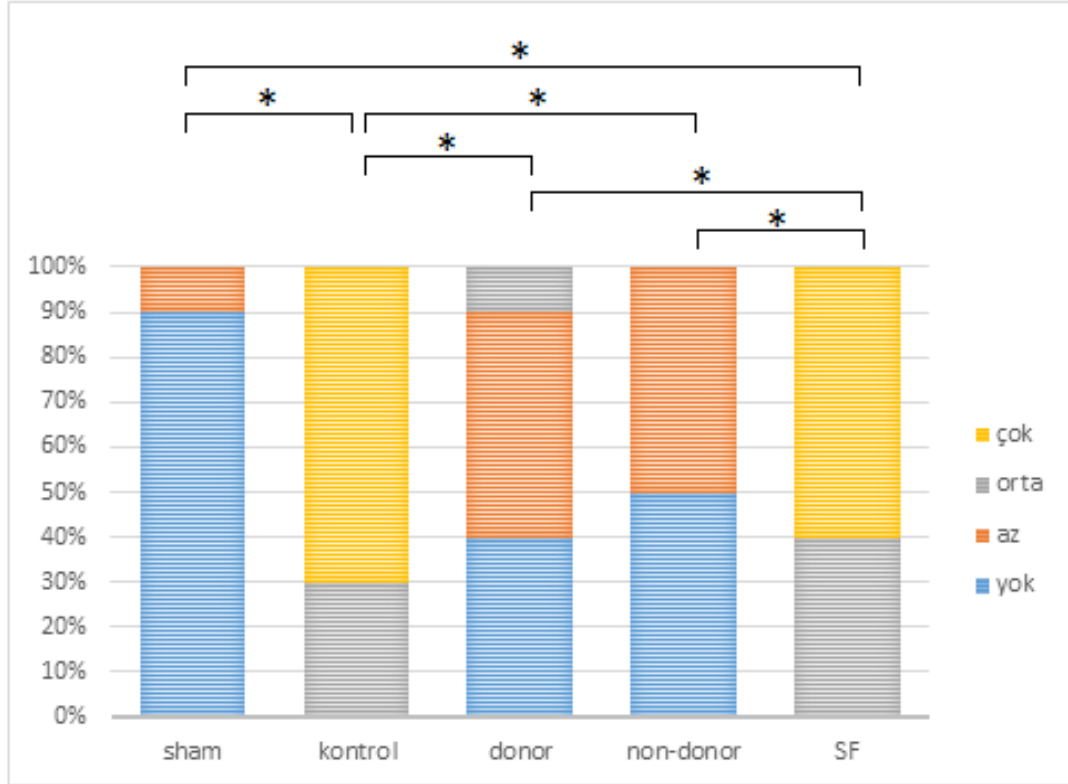
“Donör SVF” grubu ile “donör olmayan SVF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Donör SVF” grubu ve “donör olmayan SVF” grubu “SF” grubu ile ikili kıyaslandığında ise, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grubundaki intra-alvolar hemoraji varlığı istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$).

4.3.4 Nötrofil Yoğunluğu

Gruplardaki deneklere ait nötrofil değerleri tabloda gösterilmiştir(Tablo 25, Şekil 46).

Tablo 25: Gruplardaki nötrofil artış oranları

Grup		Yok	Az	Orta	Çok
Sham	N	9	1	0	0
	%	90,0	10,0	0,0	0,0
Kontrol	N	0	0	3	7
	%	0,	0,0	30,0	70,0
Donör SVF	N	4	5	1	0
	%	40,0	50,0	10,0	0,0
Donör olmayan SVF	N	5	5	0	0
	%	50,0	50,0	0,0	0,0
SF	N	0	0	4	6
	%	0,0	0,0	40,0	60,0



Şekil 46: Tüm gruplara ait nötrofil yoğunluğu oranları

Ki-Kare testi sonucu tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p < 0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için grupların ikili karşılaştırmaları yapıldı.

“Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki nötrofil yoğunluğu “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p < 0,001$; $p < 0,001$). “Sham” grubu ile “Donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p = 0,061$; $0,141$).

“Kontrol” grubu ile “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” gruplarındaki nötrofil artışı istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p = 0,001$; $p < 0,001$). “Kontrol” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p = 1,000$).

“Donör SVF” grubu ile “donör olmayan SVF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p = 0,574$). “Donör SVF” grubu ve “donör olmayan SVF” grubu “SF” grubu ile ikili kıyaslandığında ise,

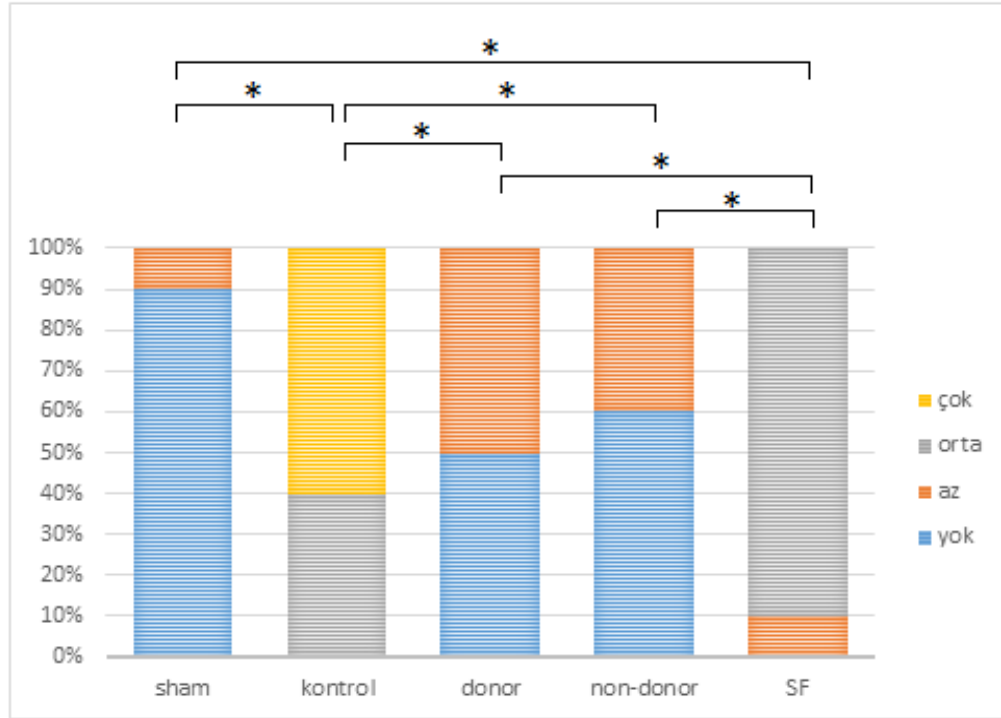
“donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grubundaki nötrofil yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p=0,001$; $p<0,001$).

4.3.5 Makrofaj Sayısı

Gruplardaki deneklere ait makrofaj değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 26, Şekil 47).

Tablo 26: Gruplardaki makrofaj sayı oranları

Grup		Yok	Az	Orta	Çok
Sham	N	9	1	0	0
	%	90,0	10,0	0,0	0,0
Kontrol	N	0	0	4	6
	%	0,0	0,0	40,0	60,0
Donör SVF	N	5	5	0	0
	%	50,0	50,0	0,0	0,0
Donör olmayan SVF	N	6	4	0	0
	%	60,0	40,0	0,0	0,0
SF	N	0	1	9	0
	%	0,0	10,0	90,0	0,0



Şekil 47: Tüm gruplara ait makrofaj sayı oranları

Ki-Kare testi sonucu tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p<0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için grupların ikili karşılaştırmaları yapıldı.

“Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki makrofaj yoğunluğu “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$). “Sham” grubu ile “Donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu (sırasıyla $p=0.141$; 0.303).

“Kontrol” grubu ile “donor SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” gruplarındaki makrofaj sayısı istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$).

“Kontrol” grubu ile “SF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,102$).

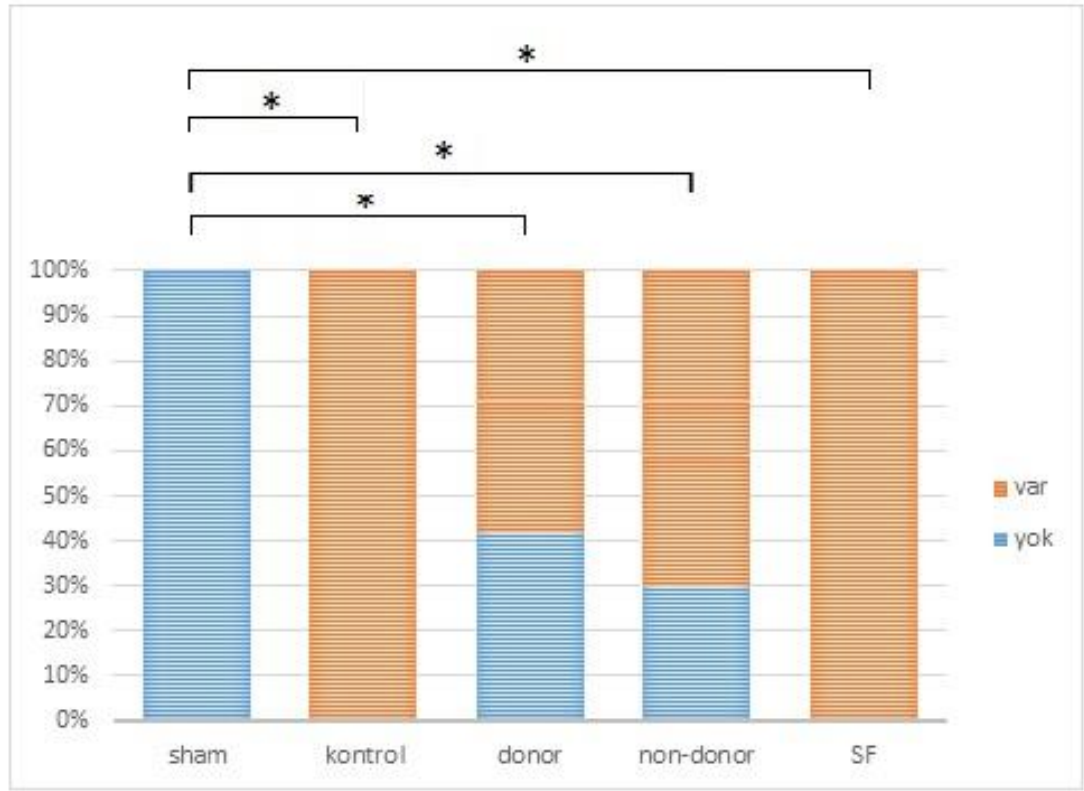
“Donör SVF” grubu ile “donör olmayan SVF” grubu ikili kıyaslandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=1,000$). “Donör SVF” grubu ve “donör olmayan SVF” grubu “SF” grubu ile ikili kıyaslandığında ise, “donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grubundaki makrofaj varlığı istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$).

4.3.6 Solunum Epitelinde Dökülme

Hasar sonrası solunum epitelinin bazal membrandan ayrılmasını tarifleyen solunum epitelinde dökülme değerleri tabloda gösterilmiştir(Tablo 27, Şekil 48).

Tablo 27: Gruplardaki solunum epitelinde dökülme oranları

Grup		Yok	Var
Sham	N	10	0
	%	100,0	0,0
Kontrol	N	0	10
	%	0,	100,0
Donör SVF	N	7	3
	%	70	30,0
Donör olmayan SVF	N	7	3
	%	70,0	30,0
SF	N	0	10
	%	0,0	100,0



Şekil 48: Tüm gruplara ait solunum epitelinde dökülme oranları

Ki-Kare testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık vardı ($p<0,001$). Farklı grupları belirleyebilmek için grupların ikili karşılaştırmaları yapıldı. “Sham” grubu ile “kontrol” grubu ve “SF” grubu kıyaslandığında, “Kontrol” ve “SF” gruplarındaki solunum epitelinde dökülme “Sham” grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (sırasıyla, $p<0,001$; $p<0,001$). “Sham” grubu ile “Donör SVF” ve “donör olmayan SVF” grupları ikili kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi.

Tüm diğer gruplar sham grubuna göre daha fazla solunum epitelindeki dökülme gösterirken, kendi aralarında fark yoktur.

5. TARTIŞMA

Duman inhalasyonu sonucu meydana gelen akut akciğer hasarı, yanık hastalarında morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir (120). Akut akciğer hasarı nedeniyle gelişen ARDS' den sağkalım, akciğer koruyucu ventilasyon ve konservatif sıvı tedavileri gibi yoğun destekleyici tedavi yöntemleri ile artmış olmakla birlikte, ARDS hastalarının morbiditesi ve mortalitesi halen çok yüksektir. Bu kadar morbid ve mortal olmasına rağmen ARDS'de tanı, prognoz ve tedavisine yönelik mevcut literatürde henüz kesin bir fikir birliği ve yaklaşım yoktur. Tedaviye yönelik yaklaşımlar, ülkeye ve yanık tedavi birimlerine bağlı olarak oldukça değişkendir. Çalışmanın bu konuda kurulmasının nedeni, duman inhalasyon hasarında mortalite, morbitide, tedavi gereksinimi ve hastanede kalış süresini azaltabilecek genel kabul görmüş uygun bir tedavi seçeneğinin olmamasıdır (24, 121).

Üst hava yolu, aşırı ısı transferiyle ilişkili doğrudan termal yanıklara maruz kalsa da, bu tür yaralanmalar nadirdir. Havanın özgül ısısı oldukça düşüktür ve üst hava yolu ısıyı dengeye getirmek ve termal hasarı en aza indirmek için nispeten geniş bir yüzey alanına, yüksek laminar akışa sahiptir. Bu nedenle, en çok hasar büyük ölçüde duman partiküllerinin içinde bulunan zehirli organik ajanların kimyasal hasarına atfedilebilir ki bunlar büyüklüklerine göre distal hava yollarına çökerler (106). Bu nedenle biz de çalışmamızda, Zhu ve ark.'ın partiküllü gaz inhalasyonuna dayanan modelini kullandık (107). Islak/kuru ağırlık oranı, birçok modelde duman inhalasyonundan sonra artmıştır (122). Modelimizde inhalasyon hasarı ile ıslak/kuru ağırlık oranının arttığı gözlemledik.

Klinik çalışmalar, inhalasyon hasarına maruz kalan hastalarda pulmoner ödem, kanama, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yaygın alveolar hasar ve pulmoner fibrozis gibi önemli patolojik özellikler göstermiştir (4, 123, 124).

Deneysel modellerde inhalasyon hasarı takibinde, biyokimsyasal parametre olarak parankimde ya da serumda IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve MPO kullanılmıştır (13, 107-110). Akciğer parankiminin homojenizasyonun zorluğu nedeniyle biyokimsal parametrelere serumda bakıldı. Islak/kuru ağırlık ve biyokimyasal parametrelerin hasar sonrası en yüksek değerine 18-24 saatlerde ulaştığı gösterilmiştir (90, 108). Biz de inhalasyon hasarı sonrası 24. saatte serumda bakılan örneklerde IL-1, IL-6, TNF- α ve MPO' nun arttığını gösterdik.

Oluşturduğumuz inhalasyon hasarında, hava yolu mukozasında konjesyon, ödem ve kanama, nötrofil infiltrasyonu, alveolar kollaps olduğunu gözlemledik. Hem ışık mikroskopik ve hem de ıslak/kuru ağırlık oranlarında olduğu gibi biyokimyasal parametrelerinde kontrol grubunda yüksek olması, inhalasyon hasarı modelimizin diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermektedir.

İnhalasyon hasarı, ARDS ve kök hücreler ile ilgili son yıllarda çok sayıda deneysel çalışma yapılmıştır (93). Halim ve ark.'nın (125) yapmış olduğu çalışmada astım ile ilişkili hava yolu inflamasyonunda aerosol şeklinde hazırlanmış MKH'nin hava yolu inflamasyonunu azaltmada ve hava yolunun yeniden yapılanmasını tersine çevirmede olumlu etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle hava yolu inflamatuvar hastalıklarının tedavisi ve önlenmesinde yenilikçi bir tedavi yaklaşımı olabileceğinin üzerinde durulmuştur. Soliman ve ark.'ın (126) yaptığı çalışmada lipopolisakkarit ile indüklenen akut akciğer hasarında, MKH'nin koruyucu etkileri araştırılmıştır.

İntraperitoneal olarak verilen kemik iliği kökenli MKH floresans görüntülemeye akciğere yerleştikleri gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin, inflamatuvar hücrelerin akciğerlere infiltrasyonunu azalttığı, hasarlı dokuların onarımını uyardığı, inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanmasını baskılayarak, akut akciğer hasarının şiddetini azaltan antioksidan ve immünmodülatör etkileri gösterilmiştir.

Cui ve ark.'ın (110) yaptığı çalışmada duman inhalasyon hasarı oluşturulan sıçanlara PKH26 ile işaretlenen insan amniyon kökenli kök hücreler kuyruk veninden sistemik olarak verilmiştir, akciğer fibrozunun, bilgisayarlı tomografi skorunun ve inflamasyon seviyelerinin azalttığı gösterilmiştir. Asmussen ve ark.'ın (127) yaptığı çalışmada insan mezenkimal kök hücrelerinin, bir koyun bakteriyel pnömoni modelinde akut akciğer hasarının şiddetini azalttığını göstermişlerdir. Pamuk dumanı inhalasyonu ardından izofluran anestezisi sonrası canlı *Pseudomonas Aeruginosa* inhale ettirilen koyunlar; Serim Fizyolojik, düşük doz MKH ve yüksek doz MKH olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Hem düşük ve hem de yüksek doz MKH grubundan kontrol grubuna göre PaO₂/FiO₂ oranı daha yüksek, sadece yüksek doz MKH grubunda ise ıslak/kuru oranı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Ihara ve ark.'ları (92) yağ doku kökenli deri hücreleri, duman inhalasyonundan sonra pulmoner mikrovasküler hiperpermeabiliteyi azalttığını göstermişlerdir. Mikrovasküler hiperpermeabilite akciğer lenf akışı, ekstrasvasküler akciğer sıvı içeriği, plazma ve akciğer lenf sıvısında protein içeriği ölçülerek

değerlendirilmiştir (91). Özellikle işaretlenmiş kök hücrelerin sistemik verilmesinden kısa süre sonra akciğerde toplandıkları gözlenmiştir. Eggenhofer ve ark.'ları MKH'nin intravenöz infüzyon sonrası kısa ömürlü olduğunu ve MKH'nin akciğerleri geçemediğini göstermişlerdir (7).

Yapılan deneysel çalışmalar ADSC'lerin ARDS hastalarının tedavisi için güvenli ve etkin bir tedavi seçeneği olabileceğini kuvvetle göstermektedir. Kotani ve ark.'ın çalışmasında bleomisin ile akciğerde pnömoni oluşturulmuş, tedavide intravenöz olarak ADSC verilmiştir. Verilen en yüksek ADSC hücre sayısı, 2×10^5 /ml ile TNF- α ve IL-12 düzeylerini daha da düşürmüştür. Çalışmamızda elde edilen SVF'nin Thoma lamı ile sayımında 4×10^6 /ml ADSC elde edildi ki, bu sayı Kotani ve ark.'ların en iyi sonuç olarak elde ettiği ADSC sayısından daha fazladır (92, 109).

Eğer akciğer dokusundaki inflamatuvar değişiklikleri, hasardan sonra farklı zaman dilimlerinde ölçebilseydik, hasarın gelişim ve değişimini daha iyi takip edebilirdik. Lange ve ark. yaptığı çalışmada inhalasyon hasarı sonrası akciğer parankimindeki IL-6 mRNA 8. saatte, serumda ise 15. saatte istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş, sonraki saatlerde ise azaldığı gözlemlenmiştir (90, 108). Ayrıca IL-6'nın hem pro-inflamatuvar hem de anti-inflamatuvar özellikleri olduğu, akut inflamasyonda nötrofillerin IL-6 reseptörleri üzerinden apoptoz gerçekleştirdiği gösterilmiştir (128, 129). Çalışmamızda gruplar arasında IL-6 seviyelerinin anlamlı bulunmaması, zamana ve/veya IL-6'nın anti-inflamatuvar etkisine bağlı olabileceği düşünülmüştür.. Çalışmamızın sonucunda ışık mikroskopik değerlendirmede solunum epitelinde dökülme dışında diğer incelenen parametrelerde (inter-alveoler septal konjesyon, intra-alveoler hemoraji, intra-alveolar sıvı birikimi, lökosit infiltrasyonu, makrofaj yoğunluğu) sham grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı farklar ortaya çıkarmıştır. Solunum epitelinde dökülme, dumana maruziyet sonrası yüksek oranda görüldüğü ve çalışmamız 24. saatte tamamlandığı için, gruplar arası fark olmayabileceğini düşündürmüştür (20, 130).

Rodriguez ve ark.'ları, çalışmalarında 13 romatoid artritli hastaya intravenöz ve intra-artikuler olarak SVF vermişlerdir (131). Sadece yan etki olarak bir hastada yüzde kızarma ve ateş ortaya çıkmıştır. Tüm hastalarda semptomların kendiliğinden düzeldiği görülmüş, anti-inflamatuvar, farklılaşma yeteneği ve trofik faktör üretimi göz önüne alındığında gelecek tedavi yöntemleri için umut verici olduğunu

söylemişlerdir. Benzer şekilde Zheng ve ark.'larının çalışmasında, ARDS'nin allojeneik yağ doku kökenli kök hücrelerle tedavisinin, klinik güvenli ve kullanılabilir olduğu gösterilmiştir (132). Biz de çalışmamızda kullandığımız SVF'nin, intravenöz verilmesi sırasında ya da daha sonra herhangi bir komplikasyonu ile karşılaşmamıştır.

Kök hücrelerin antijenik özellik taşıması ve tek bir hücreden SVF eldesinin zor olması nedeniyle grupların yağ dokuları birleştirilerek bir donör havuzu oluşturuldu. Donör ve Donör SVF havuzlarından SVF elde edildi. Stromal vasküler fraksiyon içerisindeki antijenik özellikleri olan, çalışma sırasında göz ardı ettiğimiz hücrelerin etkilerini değerlendirmek için, ileride ADSC ve SVF'nin etkilerini karşılaştıran bir çalışma yapılabilir.

Bildiğimiz kadarıyla ilk kez, SVF' nin sıçan modelinde duman inhalasyonu ile oluşturulan akut akciğer hasarında yararlı etkilerini gösterdik. Bu özel bir öneme sahiptir çünkü ARDS hastalarında MKH'lerin etkinliğini gösteren sınırlı sayıda çalışma varken SVF'nin etkinliğini gösteren başka deneysel bir çalışma yoktur.

6. SONUÇ

Inhalasyon hasarı, yanığın mortalite ve morbiditesini önemli derecede artırır. Akut hasarın patofizyolojisi, bir çok sitokinin ve mediatörün rol aldığı kompleks bir olaydır. Akciğer inflamasyonu, duman inhalasyonundan kaynaklanan akut akciğer yaralanmasının mortalite ve patofizyolojisinin temel belirleyicilerindendir.

İnsanlarda sistemik olarak verilmesinin güvenli olduğu gösterilen SVF'nin, inhalasyon hasarında sistemik olarak verilmesinin ardından hem doku düzeyindeki histopatolojik bulgular ve hem de serumda bakılan biyokimyasal belirteçler ile sistemik olarak inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak hayvan çalışmalarında elde ettiğimiz bu sonuçların, otolog olarak klinik uygulamada da benzer şekilde etki edebileceği düşüncesindeyiz. Kültüre kök hücrelerin maliyet ve zaman dezavantajları nedeni ile onlara alternatif olarak, elde edilmesi ve uygulanması kolay SVF 'nin inhalasyon hasarında yeni bir tedavi seçeneği olabilir.

KAYNAKLAR

1. Woodson LC. Diagnosis and grading of inhalation injury. J Burn Care Res. 2009;30:143-5.
2. Tredget EE, Shankowsky HA, Taerum TV, Moysa GL, Alton JD. The role of inhalation injury in burn trauma. A Canadian experience. Ann Surg. 1990;212:720-7.
3. Barrow RE, Spies M, Barrow LN, Herndon DN. Influence of demographics and inhalation injury on burn mortality in children. Burns. 2004;30:72-7.
4. Rehberg S, Maybauer MO, Enkhbaatar P, Maybauer DM, Yamamoto Y, Traber DL. Pathophysiology, management and treatment of smoke inhalation injury. Expert Rev Respir Med. 2009;3:283-97.
5. Witten ML, Quan SF, Sobonya RE, Lemen RJ. New developments in the pathogenesis of smoke inhalation-induced pulmonary edema. West J Med. 1988;148:33-6.
6. Savukinas UB, Enes SR, Sjolund AA, Westergren-Thorsson G. Concise Review: The Bystander Effect: Mesenchymal Stem Cell-Mediated Lung Repair. Stem Cells. 2016;34:1437-44.
7. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. Front Immunol. 2012;3:297.
8. Guyton A, Hall JE. Respiratory Physiology. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
9. Weinberger SE, Cockrill AB, Mandel J. Principles of pulmonary medicine. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2008.1-18 p.
10. West JB, Luks AM. West JB. Respiratory Physiology. Baltimore. Baltimore: Lippincott Williams&Wilkins; 2004.
11. Demling RH. Smoke inhalation lung injury: an update. Eplasty. 2008;8:e27.

12. Thompson PB, Herndon DN, Traber DL, Abston S. Effect on mortality of inhalation injury. *J Trauma*. 1986;26:163-5.
13. Cetin C, Ozyilmaz M, Baycu C, Kose AA, Karabagli Y. Effects of rolling inhibition on smoke inhalation injury. *Burns*. 2003;29:307-14.
14. Antonio AC, Castro PS, Freire LO. Smoke inhalation injury during enclosed-space fires: an update. *J Bras Pneumol*. 2013;39:373-81.
15. Mlcak RP, Suman OE, Herndon DN. Respiratory management of inhalation injury. *Burns*. 2007;33:2-13.
16. Lee AS, Mellins RB. Lung injury from smoke inhalation. *Paediatr Respir Rev*. 2006;7:123-8.
17. Kramer GC, Herndon DN, Linares HA, Traber DL. Effects of inhalation injury on airway blood flow and edema formation. *J Burn Care Rehabil*. 1989;10:45-51.
18. Lange M, Hamahata A, Traber DL, Cox RA, Kulp GA, Nakano Y, et al. Preclinical evaluation of epinephrine nebulization to reduce airway hyperemia and improve oxygenation after smoke inhalation injury. *Crit Care Med*. 2011;39:718-24.
19. Abdi S, Herndon DN, Traber LD, Ashley KD, Stothert JC, Jr., Maguire J, et al. Lung edema formation following inhalation injury: role of the bronchial blood flow. *J Appl Physiol* (1985). 1991;71:727-34.
20. Cox RA, Jacob S, Zhu Y, Mlcak R, Kraft R, Herndon DN, et al. Airway obstruction and bacterial invasion in autopsy tissue of pediatric burn victims. *J Burn Care Res*. 2014;35:148-53.
21. Cox RA, Burke AS, Jacob S, Oliveras G, Murakami K, Shimoda K, et al. Activated nuclear factor kappa B and airway inflammation after smoke inhalation and burn injury in sheep. *J Burn Care Res*. 2009;30:489-98.
22. Herndon DN, Traber DL, Niehaus GD, Linares HA, Traber LD. The pathophysiology of smoke inhalation injury in a sheep model. *J Trauma*. 1984;24:1044-51.

23. Mortelliti MP, Manning HL. Acute respiratory distress syndrome. *Am Fam Physician*. 2002;65:1823-30.
24. Enkhbaatar P, Traber DL. Pathophysiology of acute lung injury in combined burn and smoke inhalation injury. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:137-43.
25. Sozumi T. The role of nitric oxide in vascular permeability after a thermal injury. *Ann Plast Surg*. 1997;39:272-7.
26. Wang CZ, Li A, Yang ZC. The pathophysiology of carbon monoxide poisoning and acute respiratory failure in a sheep model with smoke inhalation injury. *Chest*. 1990;97:736-42.
27. Murakami K, Traber DL. Pathophysiological basis of smoke inhalation injury. *News Physiol Sci*. 2003;18:125-9.
28. Kavas G. Serbest Radikaller Ve Organizma Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri*. 1989;1:1-8.
29. Prien T, Traber DL. Toxic smoke compounds and inhalation injury--a review. *Burns Incl Therm Inj*. 1988;14:451-60.
30. Mayes RW. ACP Broadsheet No 142: November 1993. Measurement of carbon monoxide and cyanide in blood. *J Clin Pathol*. 1993;46:982-8.
31. Langford RM, Armstrong RF. Algorithm for Managing Injury from Smoke Inhalation. *Brit Med J*. 1989;299:902-5.
32. Weaver LK, Hopkins RO, Chan KJ, Churchill S, Elliott CG, Clemmer TP, et al. Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med*. 2002;347:1057-67.
33. Fisher JA, Rucker J, Sommer LZ, Vesely A, Lavine E, Greenwald Y, et al. Isocapnic hyperpnea accelerates carbon monoxide elimination. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:1289-92.
34. Takeuchi A, Vesely A, Rucker J, Sommer LZ, Tesler J, Lavine E, et al. A simple "new" method to accelerate clearance of carbon monoxide. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1816-9.

35. Endorf FW, Gamelli RL. Inhalation injury, pulmonary perturbations, and fluid resuscitation. *J Burn Care Res.* 2007;28:80-3.
36. Palmieri TL, Enkhbaatar P, Bayliss R, Traber LD, Cox RA, Hawkins HK, et al. Continuous nebulized albuterol attenuates acute lung injury in an ovine model of combined burn and smoke inhalation. *Crit Care Med.* 2006;34:1719-24.
37. Desai MH, Mlcak R, Richardson J, Nichols R, Herndon DN. Reduction in mortality in pediatric patients with inhalation injury with aerosolized heparin/N-acetylcystine [correction of acetylcystine] therapy. *J Burn Care Rehabil.* 1998;19:210-2.
38. Herndon DN, Barrow RE, Linares HA, Rutan RL, Prien T, Traber LD, et al. Inhalation injury in burned patients: effects and treatment. *Burns Incl Therm Inj.* 1988;14:349-56.
39. Hughes KR, Armstrong RF, Brough MD, Parkhouse N. Fluid requirements of patients with burns and inhalation injuries in an intensive care unit. *Intensive Care Med.* 1989;15:464-6.
40. Schaefer TJ, Nunez Lopez O. Burns, Resuscitation And Management. StatPearls. Treasure Island (FL)2018.
41. Maca J, Jor O, Holub M, Sklienka P, Bursa F, Burda M, et al. Past and Present ARDS Mortality Rates: A Systematic Review. *Respir Care.* 2017;62:113-22.
42. Fanelli V, Vlachou A, Ghannadian S, Simonetti U, Slutsky AS, Zhang H. Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options. *J Thorac Dis.* 2013;5:326-34.
43. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292:154-6.
44. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14:213-22.
45. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7.

46. Cooper GM, Durham EL, Cray JJ, Jr., Bykowski MR, DeCesare GE, Smalley MA, et al. Direct comparison of progenitor cells derived from adipose, muscle, and bone marrow from wild-type or craniosynostotic rabbits. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127:88-97.

47. Suga H, Eto H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, et al. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126:1911-23.

48. Brown SA, Levi B, Lequeux C, Wong VW, Mojallal A, Longaker MT. Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126:1936-

49. Sale GE, Storb R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 1983;11:961-6.

50. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:656-63.

51. Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL, et al. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2009;123(2 Suppl):56S-64S.

52. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999;283:534-7.

53. Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest*. 2005;115:5-12.

54. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-7.

55. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45:115-20
56. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Pillars article: Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963. 197:452-454. *J Immunol*. 2014;192:4945-7.
57. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4:267-74.
58. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
59. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol*. 2003;56:86-96.
60. Fridenshtein A. [Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment]. *Arkh Patol*. 1982;44:3-11.
61. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 2005;2:8.
62. Yang T, Hu Y, Wang C, Binks BP. Fabrication of Hierarchical Macroporous Biocompatible Scaffolds by Combining Pickering High Internal Phase Emulsion Templates with Three-Dimensional Printing. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9:22950-8.
63. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.
64. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*. 1982;1:87-94.
65. Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966;16:381-90.

66. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatitot S, et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res.* 2006;16:329-36.
67. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102:1548-9.
68. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000;109:235-42.
69. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med.* 2004;200:123-35.
70. Casteilla L, Dani C. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab.* 2006;32:393-401.
71. Cannon B, Nedergaard J. Developmental biology: Neither fat nor flesh. *Nature.* 2008;454:947-8.
72. Poznanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab Invest.* 1973;29:570-6.
73. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005;54:132-41.
74. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy.* 2004;6:7-14.
75. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174:101-9.
76. Katz AJ, Hedrick MH, Lull R, Futrell JW. A novel device for the simple and efficient refinement of liposuctioned tissue. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107:595-7.

77. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-95.
78. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng*. 2001;7:729-41.
79. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, et al. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro*. 2007;21:324-9.
80. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:763-9.
81. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest*. 2000;105:1663-8.
82. Aszodi A, Bateman JF, Gustafsson E, Boot-Handford R, Fassler R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Struct Funct*. 2000;25):73-84.
83. Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi.pdf. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*. 2005;15:48-56.
84. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood*. 1997;90:4665-78.
85. Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M. Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Minerva Cardioangiol*. 2009;57:249-67.
86. Graham-Rowe D. Fetal tissue graft restores lost sight. *New Sci*. 2004;184:16-7.
87. Vastag B. Stem cells step closer to the clinic: paralysis partially reversed in rats with ALS-like disease. *JAMA*. 2001;285:1691-3.
88. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;228:79-102.

89. Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant RT, et al. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117:857-63.
90. Lange M, Nakano Y, Traber DL, Hamahata A, Traber LD, Enkhbaatar P. Time course of the inflammatory and oxidative stress response to pulmonary infection in mice. *Exp Lung Res*. 2012;38:157-63.
91. Shologu N, Scully M, Laffey JG, O'Toole D. Human Mesenchymal Stem Cell Secretome from Bone Marrow or Adipose-Derived Tissue Sources for Treatment of Hypoxia-Induced Pulmonary Epithelial Injury. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10).
92. Ihara K, Fukuda S, Enkhtaivan B, Trujillo R, Perez-Bello D, Nelson C, et al. Adipose-derived stem cells attenuate pulmonary microvascular hyperpermeability after smoke inhalation. *PLoS One*. 2017;12:e0185937.
93. Horie S, Gonzalez HE, Laffey JG, Masterson CH. Cell therapy in acute respiratory distress syndrome. *J Thorac Dis*. 2018;10:5607-20.
94. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J Biol Chem*. 1966;241:3909-17.
95. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*. 1992;12:207-33.
96. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100:1249-60.
97. Zavan B, Vindigni V, Gardin C, D'Avella D, Della Puppa A, Abatangelo G, et al. Neural potential of adipose stem cells. *Discov Med*. 2010;10:37-43.
98. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-7.
99. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110:349-55.

100. Ungefroren H, Fandrich F. The programmable cell of monocytic origin (PCMO): a potential adult stem/progenitor cell source for the generation of islet cells. *Adv Exp Med Biol.* 2010;654:667-82.
101. Ruhnke M, Nussler AK, Ungefroren H, Hengstler JG, Kremer B, Hoeckh W, et al. Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation.* 2005;79:1097-103.
102. Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett.* 2007;112:61-7.
103. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, Andre M, Bacou F, Penicaud L, et al. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem.* 2003;278:9850-5.
104. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol.* 1991;6:269-86.
105. Kimura R, Traber LD, Herndon DN, Linares HA, Lubbesmeyer HJ, Traber DL. Increasing duration of smoke exposure induces more severe lung injury in sheep. *J Appl Physiol (1985).* 1988;64:1107-13.
106. Rong YH, Liu W, Wang C, Ning FG, Zhang GA. Temperature distribution in the upper airway after inhalation injury. *Burns.* 2011;37:1187-91.
107. Zhu F, Qiu X, Wang J, Jin Y, Sun Y, Lv T, et al. A rat model of smoke inhalation injury. *Inhal Toxicol.* 2012;24:356-64.
108. Lange M, Szabo C, Traber DL, Horvath E, Hamahata A, Nakano Y, et al. Time profile of oxidative stress and neutrophil activation in ovine acute lung injury and sepsis. *Shock.* 2012;37:468-72.
109. Kotani T, Masutani R, Suzuka T, Oda K, Makino S, Ii M. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of intravenous adipose-derived stem cell transplantation in a mouse model of bleomycin-induced interstitial pneumonia. *Sci Rep.* 2017;7:14608.

110. Cui P, Xin H, Yao Y, Xiao S, Zhu F, Gong Z, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cells alleviate lung injury induced by white smoke inhalation in rats. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:101.
111. Matthew E, Warden G, Dedman J. A murine model of smoke inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280:L716-23.
112. Demling R, Ikegami K, Lalonde C. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidant activity correspond with death after smoke exposure in the rat. *J Burn Care Rehabil.* 1995;16:104-10.
113. Hubbard GB, Langlinais PC, Shimazu T, Okerberg CV, Mason AD, Jr., Pruitt BA, Jr. The morphology of smoke inhalation injury in sheep. *J Trauma.* 1991;31:1477-86.
114. Ischiropoulos H, Mendiguren I, Fisher D, Fisher AB, Thom SR. Role of neutrophils and nitric oxide in lung alveolar injury from smoke inhalation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150:337-41.
115. Matsuyama H, Amaya F, Hashimoto S, Ueno H, Beppu S, Mizuta M, et al. Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by ATP via the P2Y receptors: an experimental study. *Respir Res.* 2008;9:79.
116. Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, Kobayashi A, Kooguchi K, Fujiwara I, et al. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;16 :762-9.
117. 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;15:2677-86.
118. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, Nakata S, Ohkuma M, et al. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci.* 2007;48:43-52.
119. Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T, Luccioni G, Marazzi M, Tosca MC, et al. Nonexpanded mesenchymal stem cells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16:1515-21.

120. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 2012;122:2731-40.
121. Enkhbaatar P, Pruitt BA, Jr., Suman O, Mlcak R, Wolf SE, Sakurai H, et al. Pathophysiology, research challenges, and clinical management of smoke inhalation injury. *Lancet*. 2016;388:1437-46.
122. Nakazawa H, Gustafsson TO, Traber LD, Herndon DN, Traber DL. alpha-Trinositol decreases lung edema formation after smoke inhalation in an ovine model. *J Appl Physiol* (1985). 1994;76:278-82.
123. Loh CH, Liou SH, Chang YW, Chen HI, Perng WC, Ku HY, et al. Hepatic injuries of hexachloroethane smoke inhalation: the first analytical epidemiological study. *Toxicology*. 2008;247:119-22.
124. Chatzivasiloglou F, Katsenos S, Psara A, Tsintiris K. Orange-Pigmented Sputum as a Manifestation of Smoke Grenade Inhalation Injury. *J Bronchology Interv Pulmonol*. 2016;23:76-8.
125. Halim NSS, Ch'ng ES, Kardia E, Ali SA, Radzi R, Yahaya BH. Aerosolised Mesenchymal Stem Cells Expressing Angiopoietin-1 Enhances Airway Repair. *Stem Cell Rev*. 2018.
126. Soliman MG, Mansour HA, Hassan WA, El-Sayed RA, Hassaan NA. Mesenchymal stem cells therapeutic potential alleviate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rat model. *J Biochem Mol Toxicol*. 2018:e22217.
127. Asmussen S, Ito H, Traber DL, Lee JW, Cox RA, Hawkins HK, et al. Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia. *Thorax*. 2014;69:819-25.
128. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:878-88.
129. Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:561459.

130. Burns TR, Greenberg SD, Cartwright J, Jachimczyk JA. Smoke inhalation: an ultrastructural study of reaction to injury in the human alveolar wall. *Environ Res.* 1986;41:447-57.

131. Rodriguez JP, Murphy MP, Hong S, Madrigal M, March KL, Minev B, et al. Autologous stromal vascular fraction therapy for rheumatoid arthritis: rationale and clinical safety. *Int Arch Med.* 2012;5:5.

132. Zheng G, Huang L, Tong H, Shu Q, Hu Y, Ge M, et al. Treatment of acute respiratory distress syndrome with allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: a randomized, placebo-controlled pilot study. *Respir Res.* 2014;15:39.



TC.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Emre Özcanalp'a ait Duman İnhalasyon Hedefli
slosterulmuş rotte de stroual vasküler
freksiya un... inflamasyon üzerindeki etkileri adlı çalışma, jürimiz
tarafından... Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

İmza

Başkan... Prof. Dr. Atilla Çoruh... İmza

Üye... Prof. Dr. Cengiz Çetin... İmza

Üye... Prof. Dr. İrfan Özyazgan... İmza

Üye..... İmza

Üye..... İmza