T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

RADYOTERAPİ ALMIŞ RATLARDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN KOLON ANASTOMOZ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. GÜNEL GARALOVA

Ankara – 2020

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

RADYOTERAPİ ALMIŞ RATLARDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN KOLON ANASTOMOZ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. GÜNEL GARALOVA

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. AHMET KEŞŞAF AŞLAR

Ankara - 2020

T.C.
YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANA BİLİM DALI

Radyoterapi Almiş Ratlarda Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Kolon Anastomoz İyileşmesi Üzerine Etkisi

GÜNEL GARALOVA

Uzmanlık Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi

13.11.2020

Tez Danışmanı: Prof. Dr. AHMET KEŞŞAF AŞLAR

Jüri Üyelerinin Unvanı Adı Soyadı- İmzası

Prof. Dr. Mehmet Kılıç

Prof. Dr. Bülent Cavit Yüksel

Doç. Dr. Mustafa Özsoy

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Tıpta Uzmanlık derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.
13.11.2020

Günel Garalova

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bana her konuda yardımcı olan, iyi bir hekim olmam için tüm bilgi ve birikimlerini sabır ve özveriyle aktaran, bizlere en iyi çalışma ortamını sunmak için gece gündüz çabalayan saygıdeğer hocam Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet Kılıç 'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmamda emeği geçen başta genel cerrahi hocam olmasının yanı sıra tez danışmanı hocam Prof. Dr. Ahmet Keşşaf Aşlar olmak üzere, cerrahi onkoloji uzmanı Doç.Dr. Mesut Tez, radyasyon onkoloji uzmanı Prof.Dr.Yılmaz Tezcan, Dr.Furkan Öztürk, patoloji uzmanı Dr.Fatma Yıldırım, Ankara üniversitesi kök hücre enstitüsü Doç. Dr.Açelya Yılmazer Aktuna 'ya teşekkürü bir borç bilirim. Egitimimde emeği geçen diğer bütün Ankara Yıldırım Beyazıt Universitesi ekibine de teşekkür ederim.

Beş yıllık eğitimimde hep yanımda olan canım aileme babam, annem ve abime çok teşekkür ederim.

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Dr. Günel Garalova

ÖZET

RADYOTERAPİ ALMIŞ RATLARDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN KOLON ANASTOMOZ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Giriş: Gastrointestinal sistemin en çok görülen kanseri kolorektal kanserlerdir. Her iki cinsiyette görülen bütün kanserlerin %10-15'i kolorektal kanserlerdir. Kolon cerrahisi sonrasında çeşitli komplikasyonlar oluşabilir. En çok görülen komplikasyonlar kanama, fistül, anastomoz darlığı ve anastomoz kaçağıdır. En önemli komplikasyonlardan biri anastomoz kaçağıdır.

Amaç: Bu çalışmada deneysel olarak radyasyon enteriti modeli geliştirilen ratlarda sistemik kök hücre tedavisinin kolon anastomozu iyileşmesine etkisini araştırmağı planladık.

Yöntem: Bu deneysel çalışmada, 36 adet 250-300gr ağırlığında erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Deney 3 grup şeklinde gerçekleştirildi. Her grupa n=8 olacak şekilde erkek Wistar Albino rat alındı. Siçanlar, 12 saatlık aydınlık-karanlık döngüsü ile sabit bir sıcaklıkta (22°C) tutularak ve rastgele üç eşit gruba ayrıldı. I grup: Kontrol grubu/ Sham grubu: Işınlama yapılmayarak 2 hafta sonra kolon rezeksiyonu-anastomozu yapılan. II grup: Radyoterapiden 2 hafta sonra rezeksiyon anastomoz uygulanan gruptur. III grup: Radyoterapiden 2 hafta sonra rezeksiyon anastomoz ve adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre tedavisi uygulanan gruptur. Bütün gruplarda patlama basıncı, vasküler alan, kollajen yoğunluğu, epitelizasyon, inflamasyon yoğunluğu karşılaştırıldı.

Bulgular: Deney hayvanlarının sonuçları karşılaştırıldığında, Kök hücre grubunda mikrovaskülarite alanları ve epitelizasyon skorunun RT grubu ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Kök hücre grubunda (%62.5) epitelizasyon skorunun kontrol grubu (%12.5) ve RT grubuna (%0) göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür. CD31 sayımlarının (mikrovasküler alan) kök hücre grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. CD68 sayısı (Makrofaj sayısı), kollajen yoğunluğu, inflamasyon skoru açısından gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Patlama basınç değerleri incelendiğinde, kök hücre grubundaki patlama basınç değerinin RT ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Sonuç: Preoperatif radyasyon tedavisi sonrasında kolon anastomozu yapılan ve sistemik adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta epitelizasyonun ve mikrovaskülarizasyonun artdığı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Radyoterapi,kök hücre tedavisi,kolon anastomozu

ABSTRACT

EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY ON THE HEALTHİNG OF COLON ANASTOMOSİS İN RATS GİVEN RADİOTHERAPY

İntroduction: Colorectal cancers are the most common cancer of the gastrointestinal system. 10-15% of all cancers seen in both sexes are colorectal cancers. Various complications may occur after colon surgery. The most common complications are bleeding, fistula, anastomotic stenosis and anastomotic leakage. One of the most important complications is anastomotic leakage.

Goal: In this study, we planned to investigate the effect of systemic stem cell therapy on the healing of colon anastomosis in rats with experimentally developed radiation enteritis model

Material and Method: In this experimental study, 36 male Wistar Albino rats weighing 250-300 g were used. The experiment was realized in 3 groups. n=8 male Wistar Albino rats were included in each group. Rats were maintained at a constant temperature (22 ° C) with a 12 hour light-dark cycle and randomly divided into three equal groups. I group: Control group / Sham group: It is the group that underwent colon resection-anastomosis after 2 weeks without irradiation. II group: It is the group in which resection-anastomosis was applied 2 weeks after radiotherapy. III group: this is the group in which resection anastomosis and adipose tissue-derived mesenchymal stem cell therapy was applied 2 weeks after radiotherapy. Bursting pressure, vascular area, collagen density, epithelization and inflammation density were compared in all groups.

Results: When the results of the experimental animals were compared, it was found that the microvascularity areas and epithelization score were significantly higher in the Stem cell group compared to the RT group and the control group. The epithelization score in the Stem cell group (62.5%) was found to be significantly higher than in the control group (12.5%) and the RT group (0%). CD31 counts (microvascular area) were significantly higher in the stem cell group. There was no significant difference found when the groups were compared according to CD68 counts (Macrophage number), collagen density, inflammation score. When the burst pressure values were examined, it was found that the burst pressure value in the stem cell group was higher than in the RT and control groups, but it was not statistically significant.

Conclusion: It was found that after preoperative radiation therapy, in the group where colonic anastomosis was performed and adipose-derived mesenchymal stem cells were applied systemically, epithelization and microvascularization increased.

Keywords: Radiotherapy, stem cell therapy, colonic anastomosis

İÇİNDEKİLER

BEYAN ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
SİMGE VE KISALTMALAR viii
TABLOLAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
GRAFİKLER DİZİNİ xi
RESİMLER DİZİNİ xii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Rektum Kanserinde Preoperatif Radyoterapi 3
2.1.1.Preoperatif RT avantajları 4
2.1.2.Preoperatif RT dezavantajları 5
2.2. Radyoterapinin barsak epiteli ve anastomozlarına etkisi 6
2.2.1. Preoperatif radyoterapinin temel gerekçeleri 6
2.3. Yara iyileşmesi ve Anastamoz iyileşmesi 8
2.3.1. Yara iyileşmesi 8
2.3.2. Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi 10
2.3.2.1. Anastomoz iyileşmesi ve etkileyen faktörler 11
2.4. Anastomoz İyileşmesinin Değerlendirilmesi 13
2.5. Anastomoz kaçaklarının nedenleri 14
2.6. Anastomoz kaçaklarının sağkalıma etkisi 15
2.7. Kök Hücre ve epitel iyileşmesine kök hücrenin katkısı 15

2.7.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) 18
2.7.2. Kök Hücrelerin Potansiyel Kullanım Alanları 19
3. MATERYAL METOT 21
4. BULGULAR 30
5. TARTIŞMA 39
6. SONUÇ 44
7. KAYNAKLAR 45
ETİK KURUL FORMU 55

SİMGE VE KISALTMALAR

RT	:Radyoterapi
KT	:Kemoterapi
KRT	:Kemoradyoterapi
GİS	:Gastrointestinal sistem
MKH	:Mezenkimal Kök Hücre
ADKKH	:Adipoz kökenli kök hücre
KİKKH	:Kemik İliği Kökenli Kök Hücre
VEGF	:Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
PBS	:Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik
Gy	:Gray

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deney hayvanlarının ortalama ağırlıkları 30
Tablo 2. Gruplara göre ortalama patlama basıncı karşılaştırmaları 30
Tablo 3. Gruplara göre mikrovaskülerite alan sayıları karşılaştırılması 32
Tablo 4. Mikrovasküler alan sayıları post-hoc karşılaştırmalar 32
Tablo 5. Gruplara göre mikrovasküler alan (CD31) sayıları 34
Tablo 6. CD 31 sayıları post-hoc karşılaştırmalar 34
Tablo 7. Gruplara göre makrofaj sayıları (CD 68) karşılaştırmaları 36
Tablo 8. Gruplara göre kollajen yoğunluğu karşılaştırması 37
Tablo 9. Gruplara göre inflamasyon skoru karşılaştırması 38
Tablo 10. Gruplara göre epitelizasyon skoru karşılaştırması 38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.Varian Truebeam Linear hızlandırıcı ile ratlarda abdominopelvik bölgenin ışınlanması 22
Şekil 2. Ratlarda uç-uca kolokolik anastomoz 23
Şekil 3. A.- MSC-in vena kavadan yavaş infüzyonu; B.- İnsan Adipoz doku kök hücrelerinin PBS içinde infüzyona hazırlanması 24
Şekil 4. A-lümen içerisine kanül yerlestirilerek manuel sfingomanometreye bağlanması; B-Anastomozun yapıldığı yerden ilk hava kabarcığının çıkışı..... 25

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Gruplara göre ortalama patlama basınçları 31
Grafik 2. Gruplara göre patlama basıncı dağılımları 31
Grafik 3. Gruplara göre ortalama mikrovasküler alan sayıları 33
Grafik 4. Gruplara göre ortalama mikrovasküler alan sayılarının dağılımı 33
Grafik 5. Gruplara göre CD31 ortalama sayıları 35
Grafik 6. Gruplara göre CD31 dağılımları 35
Grafik 7. Gruplara göre CD68 ortalama sayıları 36
Grafik 8. Gruplara göre CD68 dağılımları 37

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Anastomoz hattı çevresinde epitelizasyona ait örnekler 26
Resim 2. Masson Trikrom histokimyasal özel boyası ile anastomoz hattı çevresinde yeniden oluşan kollajen liflerin yoğunluğunu 27
Resim 3. İmmunhistokimyasal olarak CD31 antikoru ile pozitif reaksiyon veren mikrovasküler yapılar 28
Resim 4. İmmunhistokimyasal olarak CD68 antikoru ile pozitif reaksiyon veren makrofaj yoğunluğu 28

1. GİRİŞ

Gastrointestinal sistemin en çok görülen kanseri kolorektal kanserlerdir. Her iki cinsiyette görülen bütün kanserlerin %10-15'i kolorektal kanserlerdir. Amerika'da kanser kaynaklı ölümler incelendiğinde kolorektal kanserler ikinci sırada yer almaktadır (1). Kolorektal kanserlerin ve kolon ile ilgili hastalıkların - kolitler, mekanik tıkanıklıklar, divertikülit, inflamatuvar barsak hastalıkları - tedavisinde cerrahi uygulanmaktadır (2).

Kolon cerrahisi sonrasında çeşitli komplikasyonlar görülebilir. Cerrahi sonrasında komplikasyon görülme riski %10-30 arasındadır. En çok görülen komplikasyonlar kanama, fistül, anastomoz darlığı ve anastomoz kaçağıdır. En önemli komplikasyonlardan biri anastomoz kaçağıdır. Anastomoz kaçağı gelişmesinin muhtemel nedenlerine bakıldığında: cerrahi teknik, iskemi, lokal enfeksiyon, anastomoz hattında gerginlik olması ve anastomozun distal bölgesinde tıkanıklık olması sayılabilir (3). Treitz ligamentinin distalinde anostomoz komplikasyonları özellikle kaçak görülme riski artar. Anterior kolon rezeksiyonlarından sonra bu risk %23'e kadar çıkabilmektedir (4).

Semptom veren kaçaklar dışında asemptomatik kaçakların sıklığı ile ilgili bilgimiz kısıtlıdır. Fakat fark edilen kaçaklardan biraz daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (5,6). Anastomoz kaçaklarını engellemek için farklı yöntemler denenmekte ve yeni yöntemler geliştirilmektedir. Proksimal ostomilerde fekal diversiyon uygulaması, antibiyotik proflaksisi, preop barsak hazırlığı bu yöntemlerden bazılarıdır (7). Bütün bu çabalara ve gelişmelere rağmen günümüzde anastomoz kaçakları cerrahi sonrasında %5-15 sıklıkta görülmekte ve mortalitesi %10-32 arasında değişmektedir (8). Uygulanan ve geliştirilmeye çalışılan bu teknik ve çalışmaların amacı anastomoz ve buna bağlı gelişen komplikasyonların azaltılmasıdır. Bütün gelişmelere rağmen anostomoz nedenli ölümler devam etmektedir ve bu ölümlerin çoğu anastomoz kaçağına bağlı sepsisten kaynaklanmaktadır (9).

Kolorektal kanser tedavisinde multidisipliner yaklaşım içinde yeralan radyoterapi (RT) hem neoadjuvan hem de adjuvan olarak kullanılan yöntemlerden

biridir. RT tümör boyutunu küçülterek rezektabilitesini artırır ve ameliyat sonrası anastomoz komplikasyonunu azaltır (10).

Kök hücre -- kendini yenileyebilen, farklılaşabilen ve yeni hücreler oluşturabilen, bir canlının vücudunda uzun süre bölünmeye devam eden hücrelere denir. Uyarılara göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Normal hücreler bölündüklerinde kendisine benzer bir hücre oluşturur. Kök hücreler ise aldıkları uyarıya göre kendinden farklı hücrelere dönüşebilirler (11).

Mezenkimal kök hücreler birçok dokudan elde edilebilir. En önemli kaynakları kemik iliği ve adipoz dokudur (12). Son dönemde kök hücrelerin özellikleri klinik kullanım alanlarını artırmıştır. Potansiyel olarak hücresel tedaviler, doku mühendisliği, immunsupresif ve gen tedavileri alanlarında daha çok ilgilenilen bir konudur (91). Kök hücrelerin iskemik kalp hastalıklarında ventrikül fonskiyonunun düzelmesinde, kardiyak rejenerasyonda olumlu etkiler yaptığı bilinmektedir (13). Son dönemlerde, birçok alanda olduğu gibi, yara iyileşmesinin kalitesini artırmak, anastomoz kaçaklarını azaltmak ve anastomoz dayanıklılığını artırmak amacı ile de kök hücre tedavisi kullanılmasına dair çalışmalar yayınlanmıştır (14). Sindirim sistemi cerrahisi sonrasında fistül insidansını azaltmak , daha iyi bir anastomoz başarısı elde etmek için yeni yönelim sütür bölgelerinde kök hücrelerin kullanımına doğrudur. Kök hücreler anjiyogenezi, lokal kan akışını, fibroblastların aktivitesini ve kollajen sentezini artırarak iyileşme sürecine dahil olur ve komplikasyonları azaltabilirler (15).

Bu çalışma ile deneysel olarak radyasyon enteriti geliştirilen ratlarda sistemik kök hücre uygulanmasının kolon anastomozu sonuçlarına ve yara iyileşmesine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Rektum kanserlerinde öncelikli olarak tercih edilen tedavi yöntemi cerrahi olmasına rağmen cerrahi sonrasında yüksek nüks oranları ve nüks olan hastalarda tedavinin zorlaşması yeni ve ek tedavi arayışlarına gidilmesine neden olmuştur. Rektum kanserlerinde primer amaç hastalığın tam sağalması, hastalık nükslerinin engellenmesi, sağkalım sürelerinin ve yaşam kalitesinin artırılmasıdır. Sistemik ve lokal rekürrenslerin engellenmesinde radyoterapi ve kemoterapi üstünde çok çalışma yapılmıştır. Kombine tedavilerin sağkalım ve nükslerin önlenmesinde daha başarılı olduğu görülmüş ve organ koruyucu tedaviler, zamanlama üstünde yoğunlaşılmıştır. Hastalığın lokal kontrolünü sağlamak için postoperatif radyoterapiye alternatif olarak kullanılan preoperatif radyoterapinin daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Rektum kanserinde güncel yaklaşım neoadjuvan tedavi sonrası cerrahi uygulanmasıdır. Preoperatif RT/KRT uygulamaları ile nodal hastalık ve primer tümör boyutunda azalma sağlanarak tümör evresi geriletilebilmekte ("downstaging"), anrezektabl ve sınırda rezektabl tümörlere radikal cerrahi uygulanabilmekte, alt rektumda distal yerleşimli tümörlerde sfinkter korunabilmektedir (16).

2.1.Rektum Kanserinde Preoperatif Radyoterapi

Preoperatif (neoadjuvan) tedavi dünyada rektal kanser tedavisinde en çok kabul görülen ve üstünde en çok araştırma yapılan tedavi şeklidir. Neoadjuvan tedavi kapsamında radyoterapinin iki türü bulunmaktadır; kısa süreli ve uzun süreli radyoterapi. Kısa süreli RT 5 fraksiyonda 25 Gy ve uzun süreli RT 28 fraksiyonda 50.4 Gy ile eş zamanlı KT şeklinde uygulanmaktadır (16).

Bu konuda literatürde yapılmış birçok araştırma mevcuttur (17-20). Yapılmış çalışmaların büyük kısmı kısa dönemli RT çalışmalarıdır. Çalışmaların neredeyse tamamında preoperatif RT'nin cerrahi öncesinde yapılmış olmasının lokal kontrol oranlarını artırdığı görülmektedir. İsveç'te yapılan bir çalışmada ise neoadjuvan tedavinin lokal etkisinin yanında sağkalımı da artırdığı görülmüştür (17). Bu çalışmada 1168 rektum kanserli hasta iki gruba ayrılmış ve bir gruba sadece cerrahi

uygulanmış, diğer gruba ise kısa dönem RT+cerrahi tedavi uygulanmıştır. Hasta grupları nüks ve sağkalım açısından değerlendirildiğinde kısa dönem radyoterapi ve cerrahi uygulanan hastalarda nüks oranının daha düşük, sağkalımın ise daha uzun olduğu bulunmuştur (17). İleri dönem yan etki değerlendirildiğinde 14 yıllık takip sonucunda ince barsak tıkanıklık insidansı sadece cerrahi uygulanan hastalarda %5.5 iken, radyoterapi de uygulanan hastalarda insidans %13.9'dur (18).

Başka bir çalışmada kısa dönem radyoterapi ve cerrahi uygulanan hastalarla sadece cerrahi total mezorektal eksizyon uygulanan hastalar karşılaştırılmıştır. Kombine tedavi uygulanan hastalarda 10 yıllık takipler sonunda lokal rekürrensin anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. Kombine tedavi uygulanan grupta rekürrens oranı %5.1 iken cerrahi grupta %11.1'dir. Aynı çalışmada kombine tedavinin sağkalıma etkisinin cerrahi tedaviden üstün olmadığı görülmektedir. Kombine tedavide sağkalım %48 iken cerrahi tedavide %47'dir. Fakat alt gruplar karşılaştırıldığında evre 3 olan, radikal cerrahi yapılan, cerrahi sınırı negatif ve preoperatif RT uygulanan hastalarda sağkalım %50 olmuş ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (19). Başka bir çalışmanın sonucuna göre ise uzun dönemde RT uygulanan hastalarda, RT'nin uygulandığı tarafta anorektal disfonksiyon, anal inkontinans komplikasyonları anlamlı olarak artmış bulunmuştur (20).

2.1.1.Preoperatif RT avantajları

1. Primer tümör hacmini azaltarak cerrahi rezeksiyonun yapılabilmesini sağlar
2. Bölgesel lenf nodlarında kontrolu sağlar
3. Sfinkter koruyucu cerrahiye olanak sağlayabilir
4. Oksijenlenmenin daha iyi olması nedeniyle RT etkinliği daha fazladır
5. Cerrahi sırasında ekilebilecek canlı tümör hücresi oranını azaltır
6. Akut ince barsak hasarları daha az görülür
7. Lokal bölgesel nüksleri azaltır
8. Işınlanmış dokular rezeke edilerek sağlıklı doku ile anastomoz oluşturulabilir (21).

2.1.2.Preoperatif RT dezavantajları

1. Erken evre veya metastatik tümörlerde gereksiz tedavi olabilir
2. Yanlış cerrahi teknik seçimine yönlendirebilir
3. Asıl tedavi olan cerrahiyi geciktirir
4. Postoperatif perineal komplikasyonlar artar
5. Yara iyileşmesi bozulabilir (21).

Kısa ve uzun dönem RT yöntemlerinin karşılaştırıldığı üç çalışma yapılmıştır; *Polonya Çalışması, Avusturya-Yeni Zellanda çalışması* ve *Berlin Cancer Society çalışmaları*. (22-24). *Polonya çalışmasının* ana sonucunda uzun dönem KRT tedavi yönteminin kısa dönem RT tedavisine göre sfinkter korumada daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu çalışmada 316 rektum kanseri olan hastaya iki tedavi yöntemi random olarak gruplandırılarak yapılmıştır. RT ardından her iki gruba da total mezorektal eksizyon uygulanmıştır. Her iki grupta da sfinkter invazyonu olan hastalar dışlanmıştır. Uzun dönem RT tedavisinde tümör gerilemesi daha fazla iken sfinkter koruma oranları her iki yöntem için benzer sonuçlanmıştır (uzun dönem için %61, kısa dönem için %58) ve bu istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Genel sağkalım, hastalıksız sağkalım ve lokal nüks oranları her iki yöntem için benzer bulunurken, pozitif cerrahi sınır uzun dönem KRT alan grupta anlamlı olarak daha az bulunmuştur (22). *Avusturya ve Yeni Zellanda çalışmasında* ise 326 rektum kanserli hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalar random olarak kısa dönem RT ve uzun dönem KRT gruplarına atanmıştır (23). Çalışmada uzun dönem RT ile lokal nüksün daha az olduğunun gösterilmesi ile çalışma sonlandırılmıştır. 3 yıllık takip sonunda lokal nüks oranı ve 5 yıllık sağkalım açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır (23). Çalışmalar uzun dönem RT tedavi yönteminin tümör gerilemesi ve patolojik tam yanıt açısından daha üstün olduğunu gösterirken, sfinkter korumada her iki tedavi yöntemi arasında fark olmadığını göstermiştir. Sfinkter sorunları ile ilgili fark olmamasının nedenleri arasında: cerrahi tipinin önceden belirlenmesi, cerrahın özellikleri ve yetersiz tümör gerilemesi olabilir. Uzun dönem tedavide yüksek doz RT uygulanması ve KT eklenmesi nedeni ile akut dönem toksisite daha fazla görülmektedir. Geç toksisite, hayat kalitesi, postoperatif komplikasyon, mortalite

açısından kısa ve uzun dönem RT arasında farklılık bulunmamaktadır. Sonuç olarak her iki tedavi türünün de etkili ve güvenli olduğu söylenebilir. Ancak distal yerleşimli, yüksek riskli T3, tüm T4, sfinkter korumada ve borderline tümörlerde uzun dönem RT tercih edilmelidir (24).

2.2.Radyoterapinin barsak epiteli ve anastomozlarına etkisi

Radyasyonun dokular ve fonksiyonlar üstündeki etkisi hücrelerin proliferasyon hızına bağlıdır. Yüksek çoğalma hızı olan hücreler radyasyona duyarlı, düşük çoğalma hızı olan hücreler ise dirençlidir. Deri, gastrointestinal sistem, mesane, vajina mukozası, kemik iliği, gonadlar, ekzokrin bezler gibi dokularda akut radyasyon komplikasyonları daha fazla görülür (25). Kolorektal kanserlerde tam rezeksiyon yapılsa bile, birçok hastada kanserin çıkarıldığı primer alanlarda veya uzak organlarda nüksler görülebilmektedir. Radyoterapi tek başına veya kemoterapi ile birlikte nüks riskini azaltmak için neoadjuvan tedavi olarak uygulanmaktadır (26).

2.2.1. Preoperatif radyoterapinin temel gerekçeleri

1- Tümörün rezeksiyonundan sonra rezidü kanser hücrelerinden ekstrapelvik metastaz ve pelvik nüks riskinin azaltılmasını sağlamak
2- Primer tümör boyutu ve yüzeysel lenf nodu metastazlarının cerrahi öncesinde azaltılması/küçültülmesi
3- Geç radyasyon enteriti olasılığını azaltmak
4- Normal oksijenize olan kanser hücrelerinin radyoterapiden hipoksik hücrelere göre daha çok etkilenecek olması
5- Cerrahi sırasında olası tümör ekiminin önlenmesi
6- Postoperatif radyoterapi uygulamasına bağlı gelişebilecek komplikasyonlarının önlenmesi (26).

Preoperatif radyoterapi'de en uygun radyasyon dozu, günlük 2 Gy'lik fraksiyonlarla toplam 45-50 Gy veya eşdeğeridir (26). Radyoterapiden en az bir ay

sonra cerrahi yapılmalıdır, komplikasyonlar daha az görülür. Kısa süreli RT uygulanacak hastalarda bir iki hafta sonra cerrahi düşünülebilir. Cerrahi ve preoperatif RT'nin uygulandığı hastalarda sadece cerrahi uygulanan hastalara kıyasla lokal nüks oranlarının anlamlı olarak düşük olduğu bildirilmektedir. Sağkalım süreleri açısından her iki tedavi yönteminin birbirine üstünlüğünün olmadığı görülmektedir (25). Gastrointestinal kanserler için giderek artan oranlarda preoperatif radyasyon tedavisi kullanılmaktadır ve bu tedavi yönteminin kullanılmasının hücre canlılığının ve iyileşme kapasitesinin azaltması gibi olumsuz sonuçları olabilmektedir.

Radyasyon tedavisi kanserli hücreleri yok ederken sağlam dokulara da zarar vermekte, istenmeyen akut ve kronik etkilenimlere neden olabilmektedir. Preoperatif radyasyon tedavisinin uzun/kronik dönem istenmeyen en önemli etkisi yara iyileşmesinde gecikme ve fibrotik değişikliklerdir. Diğer istenmeyen önemli yan etkileri persistan diyare, sık idrara çıkma, rektal kanama, üretral striktürler, perineal yara iyileşmesinde gecikme, üriner fistül gibi komplikasyonlardır (27). Pelvik radyoterapiden sonra diyare ve genel halsızlık sık görülür. Bu akut dönem şikayetleri genellikle geçicidir, nadir olarak da kronik intestinal şikayetlere yerini bırakabilir (28).

Radyasyonun kalın barsak komplikasyonları;

- Proktokolit
- Kolon veya rektumda darlık
- Anal darlık
- Rektal ülser
- Spontan nekroz
- Fistüller olarak özetlene bilir (29).

Radyasyonun ince barsak komplikasyonları;

- Darlıklar
- Malabsorbsiyon sendromu
- Spontan nekroz
- Fistüller
- Gecikmiş yara iyileşmesi olarak sayıla bilir (29).

RT'nin de anastomoz iyileşmesinde olumsuz etkileri olabilir. Gastrointestinal sistemde RT'nin uzun dönem etkilerine örnek olarak fibrozis, oblitereedici endartrite sekonder olarak gelişen striktür ve iskemi gösterile bilir (30). Preoperatif radyasyon ile kombine lokal hipertermi ekstraperitoneal kolonik anastomozlarda iyileşmeyi geciktirir. Fraksiyone dozlarda radyoterapinin çeşitli yollardan yara iyileşmesini olumsuz etkilediği ortaya konulmuştur. (31).

Literatürde yapılan çalışmalarda kronik komplikasyonun gelişme nedeni olarak vasküler tıkanmanın önemli olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmalarda barsak dokusu incelemelerinde vasküler skleroz ve submukozada fibröz doku oluşumunun arttığı gösterilmiştir (28).

Birçok deneyesel hayvan çalışmasında preoperatif radyoterapinin anastomoz üstündeki etkisi araştırılmıştır. Gerçek kliniğe yakın tasarımı olan bir çalışmada, kolorektal anastomozda seromusküler kan akımında erken dönemde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu etki RT tedavisinden sonraki 4.haftada görülmüş ve etkisi ameliyattan sonraki 4 ay boyunca devam etmiştir. Bir başka çalışmada ise kolorektal anastomozlarda, ameliyatta kullanılan cerrahi tekniğe bağlı olmaksızın preoperatif radyoterapinin seromüsküler kan akımını da erken dönemde ve sonrasında sürekli olarak azalttığı bildirilmiştir (29). Radyasyonla hasarlanmış bir barsakta çalışan cerrahın normal dokuya göre daha yüksek oranda anastomoz komplikasyonunun oluşum riskini göz önüne alması gereklidir.

2.3.Yara iyileşmesi ve Anastamoz iyileşmesi

2.3.1. Yara iyileşmesi

Anatomik veya hücresel bütünlüğün bozulmasına yara denir. Yara iyileşmesi ise bu bütünlüğün yeniden kazanılmasıdır. Yara iyileşmesinin anlaşılması rasyonel cerrahi için önemlidir (32).

Yara iyileşmesi, yaralanma anında başlar ve sonrasında başlayan lokal reaksiyonlar ile devam eden birbirinin içine girmiş 5 evreden oluşur (33).

Yara iyileşmesi fazları:

1- İnflamasyon

2- Fibroblast proliferasyonu (fibroplazi)

3- Damar proliferasyonu (anjiogenesis)

4- Bağ dokusu sentezi

5- Epitelizasyon ve remodeling

Yara iyileşmesi doku bütünlüğü bozulduğu andan itibaren başlar. Travma hücresel yapıyı bozar ve kanamaya neden olur, daha sonra homeostaz başlar. Trombinin etkisi ile fibrinojenin fibrine dönüştüğü koagulasyon fazı gerçekleşir. Koagulasyon bir zincir reaksiyonudur ve her fazda aktif olmayan bir prekürsör aktifleşiyor. Bu prekürsörler yeni bir proteini aktifler ve zincir reaksiyon fibrinojenin fibrine dönüşmesi ile sonuçlanır (32).

İnflamatuar faz ilk 4-5 gün devam eder. Yara iyileşmesinin vital fazıdır. İlk önce lökositler yara yerine ulaşır ve görevleri yaralı dokuyu uzaklaştırmaktır. Lökositlerin yara bölgesine gelmesini sağlayan faktör ise trombositlerden salgılanan kemotaktik maddelerdir. Yaralanmadan birkaç gün sonra monositler göç eder ve makrofajlara dönüşürler. Makrofajların koagülasyonun düzenlenmesi, fibrinolizis, doku debrisleri, bakteriler ve hücrelerin eliminasyonu ile fibroblast aktivitesinin düzenlenmesi gibi görevleri vardır (34). Makrofajların en önemli görevi fibrini fagosite etmek, endotelyal hücre çoğalmasına neden olan büyüme faktörlerini aktifleştirmek ve yara yerinde anjiogenezisi başlatmaktır (33). Makrofajlar damar oluşumunun yanında kollajen sentezini de başlatır. Makrofajdan salgılanan fibroblast büyüme faktörü kollajen yapımında çok önemlidir. Makrofaj aktivitesini azaltan ya da durduran durumlar yara iyileşmesini yavaşlatır. Diğer yandan ise makrofajların aktivasyonlarının uzaması (endotoksin, bakteri ürünleri) aşırı fibroplaziye ve kollajen birikimine neden olur ki bu da fibrozisle sonuçlanır (33). Yara iyileşmesinde önemli bir hücre de trombositlerdir. Trombositler trombin ile aktive olur ve büyüme faktörü salgılayarak kollajen sentezini stimüle eder. Kollajen, fibroblastların endoplazmik retikulumunda yapılır ve ekstrasellüler alana salgılanır.

Fibroplazi ve kollajen sentezi travmanın ardından ilk 24 saatte başlar. Trombositler aynı zamanda neovaskülarizasyonu da aktive ederler (35).

Epitelyal orijinli dokular hariç tüm dokuların iyileşmesinde granülasyon dokusu anahtar konumdadır. Bu doku fibroblastlar, epitelyal hücreler ve makrofajlardan oluşur. Granülasyon dokusunun oluşumunu sağlayan ise fibroblastların proliferasiyasıdır. Fibroblast çoğalması ise makrofajlardan salınan büyüme faktörü ile sağlanır. Bu nedenlerden dolayı makrofajlar inflamasyon evresinin önemli bir parçasıdır.

2.3.2. Gastrointestinal Sistemde Yara İyileşmesi

GİS cerrahisi günümüzde en çok yapılan ameliyatlar arasındadır. Gastrointestinal sistemde yara iyileşmesi ile ilgili bilgilerin artmasına rağmen anastomoz iyileşmesinde meydana gelen sorunlara bağlı anastomoz kaçakları ve bunun sonucunda oluşan ölümler önemli problemlerdir. Cerrahi sonrası kaçak oranları farklı merkezlerden %5-69 arasında bildirilmiştir (36).

Gastrointestinal iyileşme üç evrede incelenebilir (37):

a) Evre I: 0-4 gün, inflamasyon ve ödem evresi
b) Evre II: 3-14 gün, proliferatif fibröz, onarım evresi
c) Evre III: 10-180 gün, reorganizasyon ve remodeling evresi

Bazı farkılıklar olsa da barsak anastomoz iyileşmesi ile yara iyileşmesi aynı ilkelere göre olur. Başlangıç döneminde olan vazokonstrüksiyon, vazodilatasyon ve hematom oluşumunu kapillerlerdeki geçirgenlik artışı izler (38). Cerrahi sonrası ilk 4 gün ödem ve inflamasyon hakimdir. İnvajine olan mukoza ve submukozada 24-48 saat sonra inflamatuar yanıt oluşur ve bu bölge nekroze olup düşer. İnvajinasyon bölgesi küçükse primer iyileşme görülür, bu bulgulardan yola çıkarak anastomozu inverte etmekten kaçınılması gerektiğini söyleyebiliriz. Mukozal inversiyon ve eversiyon iyileşimi uzatacağından duvar tam olarak karşı karşıya getirilmelidir. Kaçak riskini azaltmak için seroza düzgün bir biçimde birleştirilmelidir (37).

Granülasyon dokusu anastomoz bölgesinde 4.güne doğru yoğunlaşır, cerrahiden sonraki 3-5.günlerde anastomoz hattı başta olmak üzere bütün kolonda kollajenik aktivite artar. Bu anastomozda kaçak oluşmasının en riskli dönemidir. Anastomozun dayanıklılığı sütürler ve anastomoz hattının etrafındaki submukozanın gerilimi karşılayabilme gücü ile ilişkilidir (39,40). Cerrahi sonrası dördüncü günden itibaren kollajen sentezi artar ve ikinci haftadan sonra kollajen sentezi ön plandadır ve her geçen gün yara gücü artar. Kollajen sentezi postoperatif yedinci günde normalin %50-60'ına, onuncu günde %100'üne ulaşır. Birinci haftada mukoza epiteli proliferasyonu ve submukozal vasküler proliferasyon izlenir. Remodeling döneminde granülasyon dokusu azalarak yerini düzenli hücre sıralarına, düz kas hücrelerine ve normal dokuya bırakır. Bu evre 10-180 gün arası bir süreyi kapsayabilir. Anastomoz bütünlüğü, kollajen sentezi ve yıkımı arasındaki hassas dengeye dayanır. Bu denge anastomoz komplikasyonlarına neden olan çok sayıda faktörden etkilenir (41).

2.3.2.1.Anastomoz iyileşmesi ve etkileyen faktörler

Anastomoz iyileşmesi inflamasyon, re-epitelizasyon ve kollajen metabolizmalarının içinde olduğu karmaşık bir süreçtir. İlk aşama primer inflamatuar fazdır ve sitokin salınımı, lökositlerin göçü ve kollajen lizisi ile başlar. İkinci aşama anastomoz hattında lokal enfeksiyonun başlattığı mukoza sınırlarında re-epitelizasyonun olduğu sekonder inflamatuar fazdır. İkinci fazda da kollajen lizisi devam eder. Anostomozun gerilme gücü kollajen yıkımı, yeni kollajen yapımı ve kollajenler arasında kurulan köprülere bağlıdır. Primer inflamatuar cevap, mukozal reepitelizasyon, sekonder inflamatuar cevap ve kollajen maturasyon hızı anastomoz iyileşmesinde en önemli faktörlerdir (42). Anastomoz iyileşmesi tam kat yaraların iyileşmesinden farklıdır. Kesilen uçlar iyileşme olması ve lümen devamlılığı için birbirilerine yaklaştırılırken, inflamasyon, proliferasyon ve konnektif doku birikiminin yeraldığı fibrotik bir yanıta neden olur; onarım sahasında fibrotik bir skar oluşur. Bu nedenden dolayı iyileşmenin bazı komplikasyonları olabilir. Yetersiz iyileşmeye bağlı anastomoz kaçağı, fistüller veya aşırı iyileşmeye bağlı olarak darlık oluşumu, intestinal obstrüksiyon gibi sorunlar gelişebilir (42-46).

İyileşmekte olan anastomoz hattının kuvveti tamir işleminin kalitesini gösterir. Gastrointestinal yara iyileşmesinde 3-4.günlerde yara gücünde azalma olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir(47). Yara gücündeki azalmanın kollajenaz aktivitesinin artması veya kollajen liflerindeki yapılanmanın enzimatik olarak azalması ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Ayrıca nötrofil aktivitesinin artması da yara gücünde azalmaya neden olabilir. Nötrofil-bağımlı proteazlar ve serbest oksijen radikalleri ekstrasellüler matriksteki değişikliklere neden olarak yara gücünde azalmaya sebep olabilir (48,49).

Gastrointestinal sistemdeki yara iyileşmesini birçok intrensek ve ekstrensek faktörler etkilemektedir. Önemli faktörlerden biri yaştır. Anastomoz kaçakları daha çok yaşlı hastalarda görülür (50). Protein malnütrisyonun olması yara gücünü azaltmaktadır ve kaçaklara neden olmaktadır (51). Antineoplastik ve antiinflamatuvar ajanların yara iyileştirmesini geciktirdiği gösterilmiştir. Şiddetli travma, sepsis durumu da gastrointestinal yara iyileşmesini etkileyen önemli faktörlerdir. Pek çok lokal ve intrensek faktörler nedeni ile azalmış kan akımı, peritoneal sepsis, fekal kontaminasyon anastomoz ayrılma oranlarını arttıran önemli faktörlerdir (52,53). Anastomoz korumasında bir başka önemli faktör ise ekstraperitoneal segmentlerde, özefagusta ve rektum alt 1/3 kısmın serozal örtünün olmamasıdır. Bu durum komplikasyon riskini artırır. Kolonda ise hem fibroblastlar hem de düz kas hücreleri bulunur. Barsak duvarının kesilmesi ile baştaki hemostatik vazokonstrüksiyonu takiben esas olarak kininler tarafından artırılan sekonder vazodilatasyon ve artmış damar permeabilitesi oluşur. Bu işlemin sonunda dokularda ödem ve şişme oluşur. Sütür atarken iskemik nekroz oluşabileceği ve şişen dokuyu sütürün kesebileceği akılda tutulmalıdır (54).

Ameliyat teknikleri veya tedavi yönteminin kendisi de anastomoz iyileşmesinde etkilidir. Kolonun anastomoz için hazırlanması esnasında kaba ve ya fazla mobilizasyonu, hemostaz için aşırı koter kullanımı, kontaminasyonun engellenmesi için konulan klemplerin uzun süreli ve çok sıkı tutulması, sıkı dikiş atılması ve kontrolsüz stapler kullanımı kritik damarları hasarlaya ve dokuda iskemiye neden olabilir (55).

2.4.Anastomoz İyileşmesinin Değerlendirilmesi

Anastomoz iyileşmesinin değerlendirilmesinde mekanik, biyokimyasal ve histolojik yöntemler kullanılmaktadır (56).

1- Mekanik Değerlendirme Yöntemleri

a) **Patlama Basıncı:** barsak lümeni içinde artan gaz ve sıvılar intralüminal basıncı artmasına ve dolayısı ile duvar direncinde artmaya neden olur. *Patlama basıncı* -- artan intralüminal basınca karşı intestinal duvar direncinin gösterdiği kantitatif karşılıktır (56). Genel olarak cerrahi sonrası 3-4.günde en düşük değerde olur, bundan dolayı anastomoz kaçakları en sık bu günlerde görülür. Ameliyatın 7.gününde ameliyat öncesi düzeye çıkar ve patlama bu andan itibaren anastomoz hattı dışında bir bağırsak ansından olur. Bu nedenle iyileşmenin erken döneminin değerlendirilmesi için 7.gün uygundur (54).

b) **Kopma Direnci:** Anastomoz hattını içeren bağırsak ansının uzun eksenine paralel kesilerek, standart genişlik ve uzunlukta hazırlanan bir şeridin iki ucuna karşıt yönlerde kuvvet uygulanırken kopmaya neden olan kuvvettir. İkinci haftaya kadar olan değerlendirmelerde uygun bir parametredir (30).

2- Biyokimyasal Değerlendirme Yöntemleri

Anastomoz iyileşmesinin biyokimyasal parametresi kollajen miktarının tayinidir ve doku kollajen miktarı bir aminoasit olan hidroksiprolin düzeyinin ölçümü ile saptanır. Kollajen miktarı anastomozu izleyen ilk günde hem yapımındaki azalma, hem de ilk 12 saatte artan kollajenaz aktivitesine bağlı olarak en düşük seviyesine iner. Anastomoz için en kritik dönem bu dönemdir (30).

3- Histolojik Değerlendirme Yöntemleri

a) Işık mikroskopu ile anastomoz hattının hücresel infiltrasyonu ve fibroblastik aktivitesi incelenebilir.

b) Daha gelişmiş olarakta elektron mikroskopu kullanarak kollajen lifleri detaylı olarak değerlendirilebilir (30).

2.5.Anastomoz kaçaklarının nedenleri

Kolorektal cerrahilerin en çok çekinilen komplikasyonu anastomoz kaçağıdır. Anostomozun iyileşmesini sekteye uğratan birçok neden sayılmıştır. Anostomoz iyileşmesini engelleyen nedenleri iki bölümde inceleyebiliriz; lokal ve sistemik etkenler (57).

a) Sistemik etkenler

- İleri yaş
- Malnütrisyon
- Şok,sepsis,asidoz
- Anemi
- Hipovolemi
- Elektrolit dengesizliği
- Hipoproteinemi
- Bazı ilaçlar(steroid,NSAİD,KT…)
- İmmun yetmezlik
- Malign hastalıklar
- Karaciğer yetmezliği
- Sarılık
- Obezite
- Üremi
- Diabet

b) Lokal etkenler

- Büyük arterlerden birinde kan akımının yeterli olmaması
- Hipertermi
- Bağırsağın hazırlanma şekli
- Özellikle kolon temizliğinin iyi yapılmamaş olduğu olgu
- Bakteriyel kontaminasyon
- Lokal infeksiyon
- Distal tıkanıklık

- Radyasyon hasarı
- Bağırsak hasarı
- Yabancı cisimler
- Mekanik travmalar; Aşırı mobilizasyon
- Sağlıklı doku uçlarının olmaması
- Anastomoz hattındaki gerilim
- Anastomoz hattının beslenmesi
- Anastomoz hattında hematom
- Cerrahi teknik ve dikiş materyalı (58)

2.6.Anastomoz kaçaklarının sağkalıma etkisi

Kolon kanser cerrahileri sonrasında anastomoz kaçak oranları %4-5 civarındadır. Anastomoz kaçak oranını anastomozun seviyesi, tipi, ameliyat şekli ve cerrahiye bağlı gelişen diğer komplikasyonlar belirler (59). Rektum cerrahisi uygulanan hastalarda anastomoz kaçak oranları %30'lara kadar yükselmektedir (60). Rektum kanseri rezeksiyon ameliyatlarından sonra pelvik sepsis, intrapelvik apse ve anastomoz kaçağı şeklinde gözlenebilen septik komplikasyonlar ölümlerin %25-37'sinden sorumludur (61). İlk 30 gün içindeki mortalitenin en önemli sebebi septik komplikasyonlardır (62). Septik komplikasyon oranları literatürde %1-27 arasında bildirilmiştir (63). Septik komplikasyonlar hastaya ve cerrahi tekniğe ait birçok faktörle ilişkilendirilmiştir.

2.7.Kök Hücre ve epitel iyileşmesine kök hücrenin katkısı

Kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilen hücrelerdir. Kök hücreler aldıkları uyarıya göre dönüşürler. Bu dönüşebilirlik ilk defa bir in vivo allojenik hemopoetik kök hücre nakli sonrası gelişen komplikasyon sonucunda tanımlanmıştır (64). Daha sonra yapılan çalışmalarda, en başta kemik iliğindeki kök hücrelerin in vitro ve in vivo koşullarda sadece köken aldıkları doku ve organların hücrelerine değil, vücudun diğer hücrelerine de dönüşebildikleri (plastisite) gösterilmiştir. Başta

kemik iliği kaynaklı kök hücreler (KİKKH) olmak üzere, farklı kaynaklardan elde edilen erişkin kök hücreler bazı hastalıkların tedavilerinde önemli kaynak olmuşlardır (65).

Kök hücreler bulundukları dokuya göre iki genel gruba ayrılırlar. Bunlar: embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücrelerdir.

Ayrıca farklılaşma potansiyellerine göre de alt gruplara ayrılırlar (65) :

- Totipotent hücre: Döllenme meydana geldiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahip olan hücredir.

- Pluripotent hücre: Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmasına rağmen, tek başlarına artık tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değillerdir (65).

- Multipotent hücre: Birbirine yakın hücre gruplarını oluşturabilen kök hücrelerdir. Örneğin, kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilir.

- Oligopotent hücre: Lenfoid ve myeloid hücrelerde olduğu üzere sadece birkaç hücre grubunu oluşturan kök hücrelerdir.

- Unipotent hücre: Kas ana hücresinde olduğu üzere bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir (66).

Kök hücreler yukarıda da bahsedildiği gibi birden fazla hücre tipine farklılaşma özelliğine sahiptirler. Bunun en belirgin örneği totipotent hücre olan döllenmiş yumurta hücresi ya da zigotla birlikte başlayan farklılaşmanın tüm organizmayı oluşturabilecek kabiliyete sahip olmasıdır. Embriyonel kök hücreler yüksek seviyede telomeraz aktivitesi içerir. Hücre çoğalmasının aktivasyonda azalmaya yol açmaması nedeni ile limitsiz çoğalma kapasitesine sahiptirler. Embriyonel kök hücreler tüm somatik dokuları ayrı ayrı oluşturabilmesine rağmen, tam bir yeni kişi oluşturamazlar (67).

Erişkin kök hücreleri totipotent değil, pluripotent hücrelerdir. Bir doku ya da organdaki farklılaşmamış hücreler olan erişkin kök hücreleri, kendisini yenileyebilir,

bunun yanında içinde bulunduğu doku ya da organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Bu özelliklerinden dolayı esas görevleri bulundukları dokuyu tamir etmek ve devamlılıklarını sağlamaktır. Yapılan çalışmalar sonucunda erişkin kök hücrelerinin vücutta birçok dokudan elde edilebildiği gösterilmiştir (68). Bazı bilim adamları, erişkin kök hücresi yerine '*somatik kök hücresi*' terimini kullanmayı tercih etmişlerdir (69).

Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) kendini yenileyebildiğini, çeşitli bağ doku elemanlarına farklılaşabildiğini ve yapılarının fibroblastlarla benzerlik gösterdiğini ilk kez 1976 yılında Friedenstein göstermiştir (70). Yine 1980 yılında tavşan kemik iliği stromal hücrelerini izole edip, başka hayvanlarda intraperitoneal implantasyon yapan Ashton ve arkadaşları, implantasyon yapılan alanda kemik ve kartilaj oluşumunu göstermişlerdir (69).

Erişkin kök hücrelerinin gösterilmiş olduğu alanlar içine: kemik iliği, periferik kan, arteriyel ve venöz yapılar, çizgili kaslar, diş dokusu, miyokardium dokusu, karaciğer, gastrointestinal sistem, over epiteli, testis, akciğer, meme dokusu, adipoz doku, deri, merkezi sinir sistemi, tükrük bezleri ve paratiroid bezler dahildir. Bu dokuların içindeki kök hücreler bölünmeye hazır halde beklemekte, bölünme sinyalini aldıktan sonra harekete geçerek bölünmeye başlamaktadır (69).

Erişkin kök hücresi hakkında yapılan çalışmaların ilerlemesiyle, kan hücrelerinin kökeni olan hematopoetik kök hücrelerinin farklı embriyonik kökenli (ektoderm ve endoderm) hücrelere kaynak olabileceği ortaya çıkmış ve çalışmalar bu yönde hız kazanmıştır. Kök hücre kullanımında iki önemli özelliğe dikkat etmek gerekir. Bunlardan bir tanesi kök hücrelerin kolay yoldan ve çok miktarda elde edilebilmesi, diğeri ise istenilen dokulara kolaylıkla ve yüksek oranda farklılaşabilmesidir. Erişkin kök hücrelerinin diğer bir çeşidi de adipoz doku kökenli kök hücrelerdir (ADKKH). Bu tip kök hücreler lipoaspirasyon sonrasında veya abdominal ciltaltı yağ dokusundan ayrıştırılma yöntemi ile elde edilen ve in vitro şartlarda farklılaşmadan büyüme özelliğine sahip hücrelerdir. İlk kez insanda 2001 yılında Zuk ve arkadaşları (71,72) tarafından ayrıştırılarak tanımlanan ADKKH, diğer kök hücre kaynaklarına nazaran donörde düşük mortalite riski ve yüksek miktarda elde edilebilmesi ile kök hücre uygulamalarında cazip bir kaynak haline gelmiştir. Bu alanda yapılan birçok çalışmada uygun şartlarda elde edilen

ADKKH'in mezoderm kaynaklı kemik, kıkırdak, kas, fibroblast ve endotel hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir (73,74).

2.7.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Erişkin kök hücre tiplerinden olan mezenkimal kök hücreler, stromal kökenli olmaları nedeni ile genel anlamda 'destek hücresi' özelliği taşırlar. Bu özellikleri onları tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşır hale getirmiştir. MKH, birçok dokudan elde edilebilir, dayanıklı ve sayıca çoğaltmaya elverişli hücrelerdir. Ayrıca MKH osteoblastlar, kondroblastlar, fibroblastlar, adipositler, iskelet kas lifleri, kardiyomiyositler ve endotel hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tipine farklılık gösterebiliyorlar (75). Bu özelliğin yara yerinde iyileşme ve anjiyojenezin artırılmasında rol oynadığı gösterilmiştir (76).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar stromal hücre sistemi üzerinde yoğunlaşmaktadır. İlk zamanlarda kemik iliği kökenli stromal hücreler sadece hematopoezi indüklemek için kullanılıyordu. Zaman geçtikçe stromal hücrelerin in vivo ve in vitro çalışmalarda karaciğer, kalp, adipoz doku, böbrek, kas, kıkırdak, sinir, kemik, akciğer ve barsakların da arasında olduğu çeşitli hematopoetik olmayan dokuların parankim hücrelerine farklılaştığı da gösterilmiştir (77-79).

MKH'ler yüksek klinik kullanım potansiyeli olması sayesinde hücresel tedaviler, doku mühendisliği, bağışıklık baskılayıcı tedaviler ve gen tedavileri konusunda ilgi odağı haline gelmiştir (80). Son yapılan çalışmalarda MKH'lerin kardiyak rejenerasyonda, iskemik kalp hastalıklarında ventriküler fonksiyonların düzenlenmesinde olumlu etkiler meydana getirdiği anlaşılmıştır (81). Bu etkilerin sağlanmasına neden olan faktörlere ise: apoptozis direncinde artış, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) salgılanmasında artış, hücresel düzeyde kan akımında artış, mikrovasküler yapıda artış olarak gösterile bilir (82).

Kemik iliği, organizmanın en zengin kök hücre kaynağıdır. MKH'lerin de ana kaynağı olarak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezoderm kaynaklı hematopoetik, endotel ve mezenkimal kaynaklı kök hücreler bulunmaktadır. MKH-in sadece kemik iliğinden değil, periost, kas dokusu, diş pulpası, maksillofasiyal dokular,

lipoaspirasyon materyalleri, karaciğer, kordon kanı, kordon stroması, amniyon sıvısı, plasenta, sinovial sıvı ve hatta periferik kandan adezyon özellikleri nedeni ile ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür (83).

MKH'lerin birçok çeşitli dokuda bulunmasına rağmen, bu dokularda da çok az miktarda bulunurlar. Bunun yanında adezyon özellikleri nedeni ile yeterli sayıda elde edilmesinde zorluklar yaşanır. Çalışmalarda kullanmak üzere yeterli sayıda hücreye ulaşmak için, elde edilen MKH'lerin in vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir. Işık mikroskobu veya faz kontrast mikroskobu ile incelendiğinde MKH'lerin morfolojisinin iğ şeklinde olduğu ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları dikkati çekmektedir. Bu hücrelerin, düşük yoğunlukta kültür edildiklerinde koloni oluşturdukları, daha yüksek hücre yoğunluğunda ise yan yana dizilmiş hücre grupları halinde çoğaldıkları gözlenmiştir (84).

MKH'lerin in vitro kültür ortamında çoğalmasını sağlamak için çok spesifik ortam ve koşullar gerekmemektedir. 1960'lı yıllardan bu yana kemik iliği hücreleri kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman, stromal hücrelerin hızla plastik kültür kabına yapıştıkları, hematopoetik hücrelerin ise yapışmadıkları bilinmektedir. %10 Fetal Buzağı Serumu (FBS) içeren kültür ortamında plastiğin tabanına yapışmış olan hücreler, fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedirler. Farklılaşmanın sağlanmak istenildiği çalışmalarda ise hedeflenen farklılaşmanın olup olmadığını göstermek amacı ile histokimyasal, immünohistokimyasal veya immünofloresan yöntemler kullanılarak spesifik belirteçler incelenir (84).

2.7.2. Kök Hücrelerin Potansiyel Kullanım Alanları

Son yıllarda tıp dünyasında yapılan çalışamalar içinde kök hücreler önemli bir yer tutmakla beraber, her yıl bu çalışmalara yenileri eklenmeye devam etmektedir. Kök hücre kaynaklı yapılan çalışmaların bir tanesinde, kemik iliği kaynaklı MKH'lerin, de novo miyokard oluşturduğu gösterilmiştir. Bu sayede miyokard enfarktüsü ve koroner arter hastalıklarında intrakoroner kök hücre infüzyonunu takiben kalp kasında rejenerasyon meydana geldiği gösterilmiştir (85,86). Yapılan bir başka çalışmada ise göz içine korneal kök hücre transplantasyonunu takiben görme kabiliyetinde iyileşme olduğu gösterilmiştir (87).

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklarda spinal kortdaki hasarlı bölgeye verilen kök hücrenin nöral hücre serisine farklılaşarak, ablatif sinir hücrelerini rejenere ettiği ve lökomotor fonksiyonların geri döndüğü gösterilmiştir (88). Tip 1 diyabet hastalarında pankreastaki insülin salgılayan beta hücrelerindeki hasar mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması ve restorasyonu amacı ile yapılan kök hücre çalışmaları da umut vaat etmektedir (89). Ichioka ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada flep cerrahisinde kök hücrenin terapötik anjiogenezi artırıcı etkisinden yararlanılmıştır (90). Sıçanlarda yapılan çalışma neticesinde kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin dorsal cilt fleplerindeki damarlanma üzerinde etkileri araştırılmış, iskemi ve reperfüzyon hasarını azaltan kapiller dansitede belirgin artış tespit edilmiştir. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda kök hücrenin terapötik anjiogenez etkisi de gösterilmiştir (91,92). MKH'lerin bilinen özelliklerinden bir tanesi de vasküler endotelyal hücrelere farklılaşabilmeleridir. VEGF ve MKH'lerin birlikte iskemik fleplerde neovaskülarizasyonu arttırdığı Zheng ve ark.'nın yaptıkları çalışmada gösterilmiştir (93,94). Ayrıca Uysal Ç. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçan dorsal cilt fleplerinde iskemi reperfüzyon hasarının ADKKH uygulaması ve bir takım büyüme faktörleriyle regüle edilmesi sonucunda önlenebileceği gösterilmiştir (95).

3. MATERYAL METOT

Deneysel çalışma 27.07.2020–18.08.2020 tarihleri arasında Kobay Deneysel Hayvan Laboratuarında etik kuruldan 499 nolu onay alındıktan sonra gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 250-300 gram arasında olan 36 adet Wistar Albino erkek rat kullanıldı.Denek sırasında kilo kaybı olan, operasyon sonrasında ve kök hücre enjeksiyonu sırasında arrest olan ratlar deneyden çıkarıldı. Ratlar normal oda sıcakğında 12 saat gündüz, 12 saat gece periyotlarında standart rat yemi ve normal içme suyu ile beslendi.

Deney grupları

I grup-Kontrol grubu/ Sham grup (n=8):

Işınlama yapılmayarak 2 hafta sonra kolon anastomozu yapıldı. Cerrahiden 1 hafta sonrasında anastomoz patlama basıncı kontrol edildi.

II grup (n=8):

Radioterapiden 2 hafta sonra (96) rezeksiyon anastomoz uygulandı. Cerrahiden 1 hafta sonra anastomoz patlama basıncına bakıldı.

III grup (n=8):

Radioterapiden 2 hafta sonra (96) rezeksiyon anastomoz ve sistemik mezenkimal kök hücre tedavisi uygulandı. Cerrahiden 1 hafta sonra anastomoz patlama basıncı değerlendirildi.

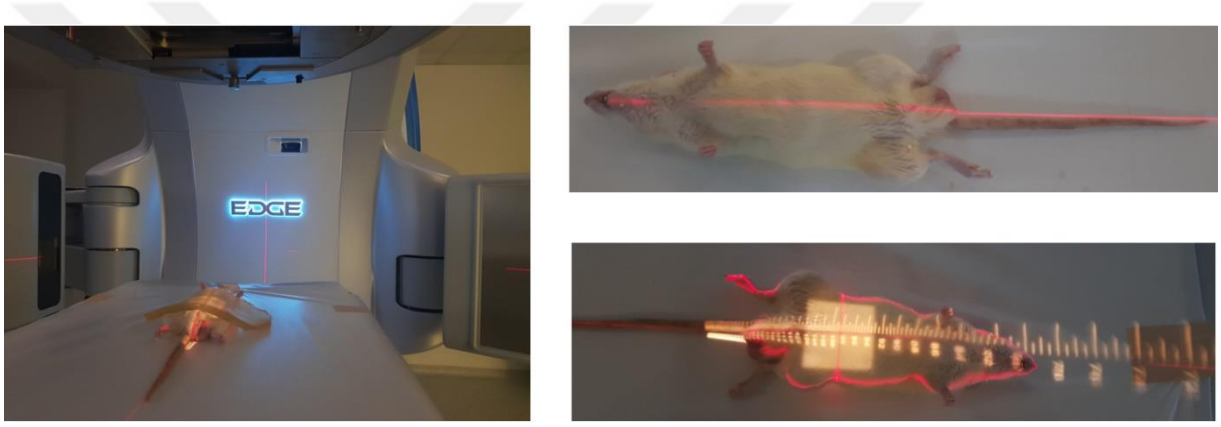
Anestezi

-Radioterapi, ameliyat ve ötenazi'de uygulandı. İntraperitoneal (İP) uygulandı.

50 mg / kg ketaminnhidroklorür ve kas içinden 5 mg / kg ksilazinhidroklorür

Radyoterapi

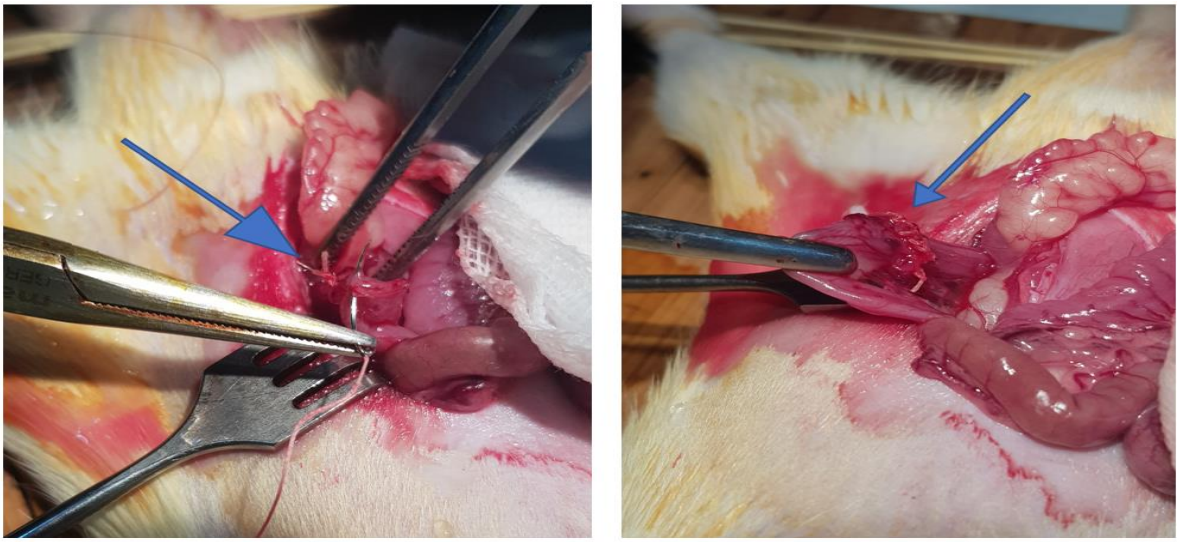
Wistar albino sıçanları, genel anesteziden sonra tam bir hareketsizlik dönemi elde edildiğinde Varian Truebeam Linear hızlandırıcıya (Varian Medical Systems, ABD) yerleştirildi. 5x5 cm alan ile ksifoidden pubise kadar abdominopelvik bölge hedeflendi (Şekil 1). Enerji kaynağı ile karın boşluğu merkezi arasındaki mesafe 100 cm olarak ayarlandıktan sonra karına 1 cm bolus yerleştirildi. Güvenli olduğu ve intestinal mukozal hasara yol açtığı gösterilen 6 MV X-ray foton ile tek doz 11 Gy uygulandı (97). İşlem sonrası sıçanlar anestezik etkiden kurtulana kadar yakından takip edildi. Takip sırasında sıçanlarda ölüm görülmedi.



Şekil 1. Varian Truebeam Linear hızlandırıcı ile ratlarda abdominopelvik bölgenin ışınlanması

Ameliyat prosedürü

Tüm sıçanlar, steril koşullar altında gerçekleştirilen ameliyattan önce 8 saat aç bırakıldı. Tüm kolon anastomozları aynı cerrah tarafından gerçekleştirdi. Genel anestezi intraperitoneal olarak 50 mg / kg ketaminhidroklorür ve kas içinden 5 mg / kg ksilazinhidroklorür ile uygulandı. Daha sonra, ön karın duvarı bir tıraş bıçağı ile tıraş edilerek antiseptik koşullar elde etmek için povidon iyot kullanıldı. Periton boşluğu 4 cm orta hat karın insizyonu ile açıldı. Daha sonra,4/0 Rapid Absorbable PGLA sütürlarla uç-uca kolokolik anastomoz yapıldı (Şekil 2). Karın duvarı kapatıldı. İşlemin sonunda, postoperatif hidrasyon için 15 ml steril %0,9 NaCl solusyonu subkutan olarak enjekte edildi. Hayvanlar postoperatif 24 saat aç bırakıldıktan sonra standart diyet ve içme suyuna başlandı.



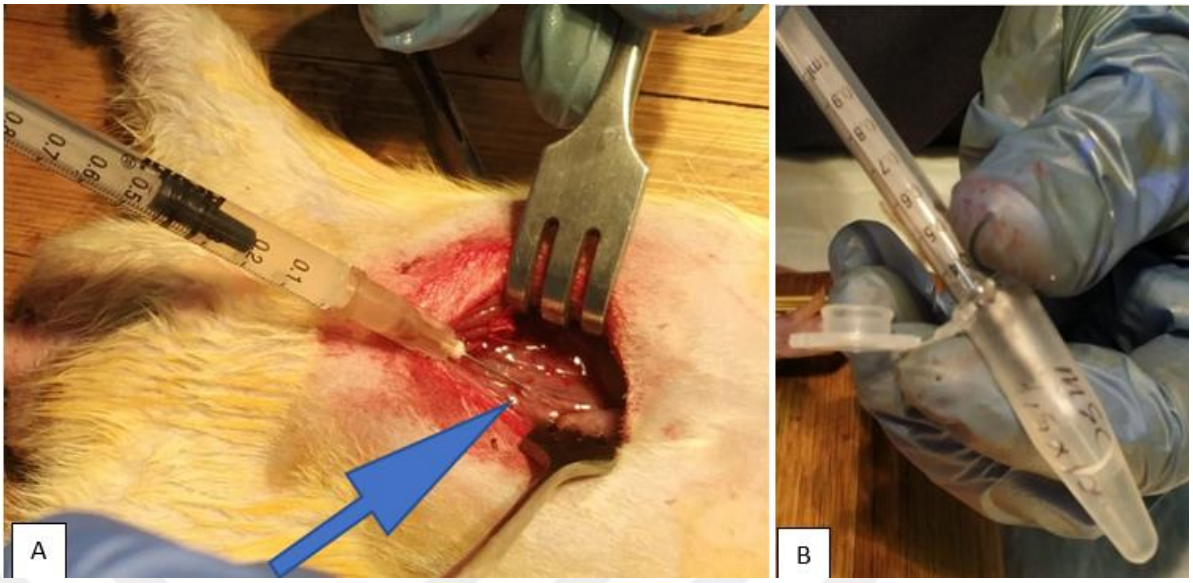
Şekil 2. Ratlarda uç-uca kolokolik anastomoz

Human Ad-MSC-adipose derived mesenchymal stem cells/insan adipoz kökenli mezenkimal kök hücre

Sham ve II gruba III grubla aynı zamanda aynı hacimde steril PBS solüsyonu (MSC'ler olmadan) vena kavadan enjekte edildi.

III gruba anastomoz yapıldıktan sonra MSC tedavisi verildi. Bu grupta, radyasyona maruz kaldıktan 2 hafta sonra , ameliyat günü 0,3 ml PBS 'de 1,5 x 10^{6} MSCler vena kavadan çok yavaş infüze edildi (Şekil 3A).

İnsan Adipoz dokudan türetilmiş kök hücreler (hASC'ler) (Lonza-İsviçre), % 5 CO_2 içinde 37°C'de insan Adipoz dokudan Türetilmiş Kök Hücre Büyüme Bullet KitTM (Lonza-İsviçre) ortamında kültürlendi. Hücreler enjeksiyondan önce toplandı ve steril PBS içinde süspanse edildi (Şekil 3B).



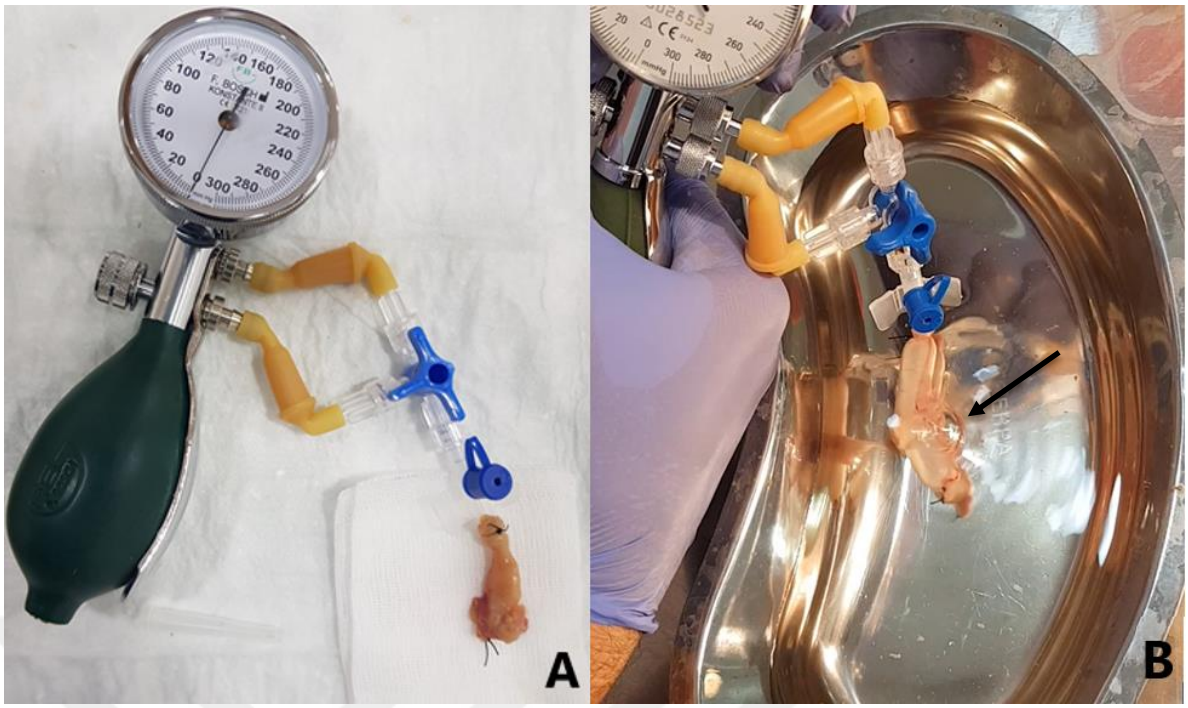
Şekil 3. A.- MSC-in vena kavadan yavaş infüzyonu; B.- İnsan Adipoz doku kök hücrelerinin PBS içinde infüzyona hazırlanması

Ötenazi

Sakrifikasyon işlemi süresi literature uygun olarak belirlendi. Kontrol grubu olan birinc grup da diğer gruplarla beraber aynı süre takip edilmiş ve 7.günde sakrifikasyon uygulanmıştır. Ötenazi gününde hayvanlara anestezi uygulandı ve relaporotomi yapıldı. Histolojik inceleme için kolon toplandı. Hayvanlara anestezi altında servikal dislokasyon uygulanarak ötenazi yapıldı.

Anastomoz patlama basınçlarının ölçümü

Tüm gruplarda anastomozun yapılmasından 1 hafta sonra tüm ratlara intraperitoneal (İP) ketamin ksilozin kokteyli ile anestezi uygulanarak relaparatomi yapıldı. Anastomozu ortada konumlandırarak 10 cm uzunluğunda bir kolon segmenti rezeke edildi ve steril %0,9 NaCl solusyonu ile yıkandı. Çıkarılan segmentlerin distal ucu 3/0 ipekle bağlanarak, proksimal uçları ise lümen içerisine kanül yerlestirildikten sonra manuel sfingomanometreye bağlandı(Şekil 4A). Anastomozun yapıldığı yerden ilk hava kabarcığının çıkışının gözlendiği basınç değeri kaydedildi. Patlatma basıncı (mmHg) olarak kabul edildi (Şekil 4B).

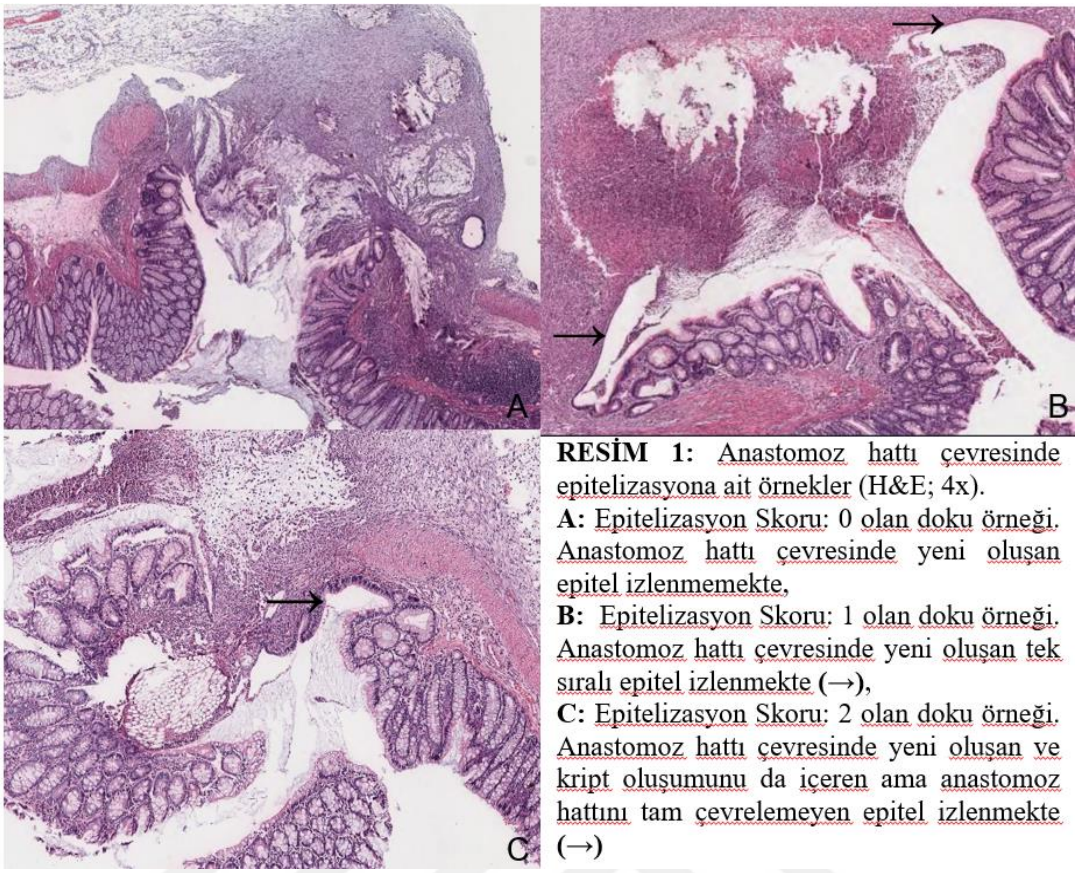


Şekil 4. A-lümen içerisine kanül yerlestirilerek manuel sfingomanometreye bağlanması; B-Anastomozun yapıldığı yerden ilk hava kabarcığının çıkışı

Patoloji

Ratlara ait rezeksiyon materyalleri %10'luk formalin fikastifi içerisinde fikse edildikten sonra anastomoz hattını içerek şekilde makroskopik olarak örneklendi. Örneklenen dokular rutin doku takip protokolüne tabi tutularak parafin bloklar haline getirildi. Tüm ratlara ait dokular Hematoksilen&Eozin (H&E) boyalı preparatlar üzerinden değerlendirildi. Ayrıca parafine gömülü dokulardan histokimya özel boyası Masson Trikrom ve immunhistokimyasal antikorlar olan CD31 ile CD68 çalışılması için 5 µm kesitler hazırlandı.

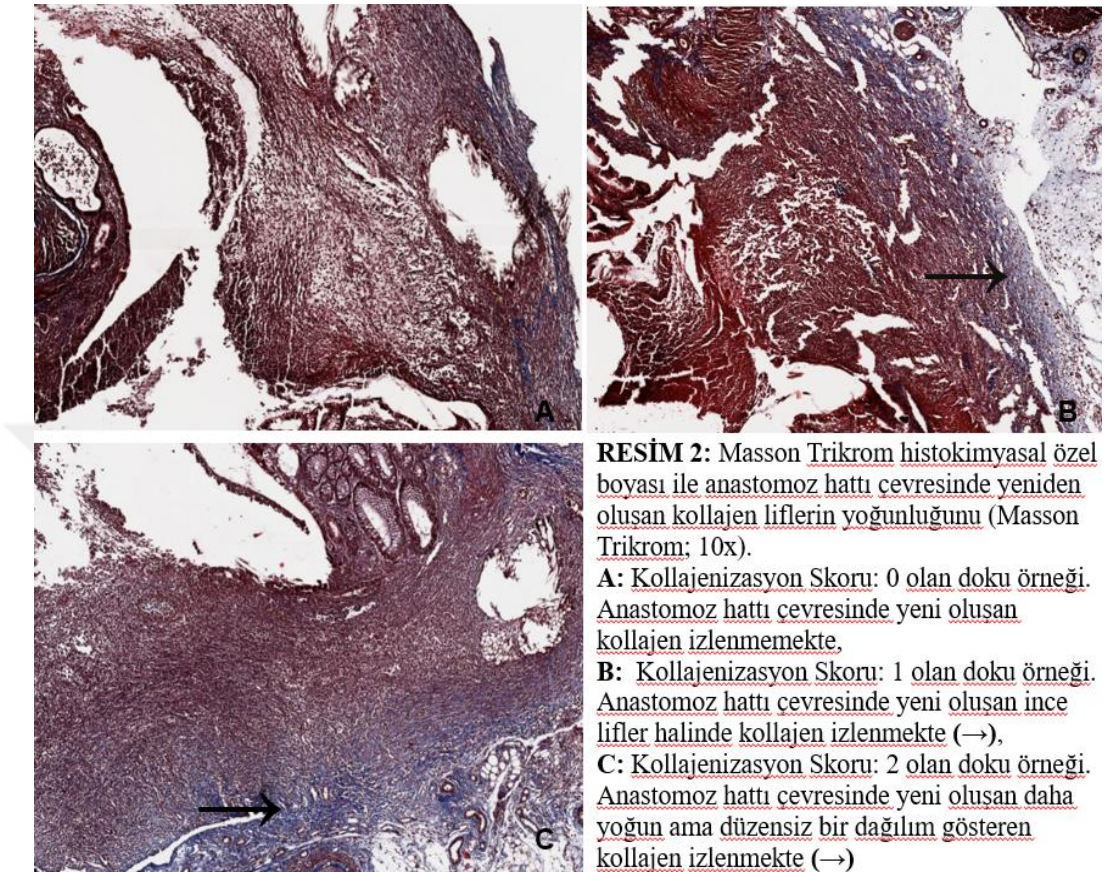
H&E boyalı preparatlar üzerinden mikrovaskülarizasyon, epitelizasyon ve inflamasyon yoğunluğu değerlendirildi. Mikrovaskülarizasyon değerlendirilmesi Nikon Eclipse Ci mikroskop üzerinden 40x/0.65 objektif ile yapıldı. Anastomoz hattında mikrovaskülarizasyonun en yoğun olduğu alanda bir büyük büyütme alanında izlenen mikrovasküler yapıların sayıları kaydedildi. Epitelizasyon ve inflamasyon yoğunluğu ise skor 0'dan skor 3'e kadar skorlandı (Skor 0: Yok, Skor 1: Hafif, Skor 2: Orta, Skor 3: Yoğun).



Resim 1. Anastomoz hattı çevresinde epitelizasyona ait örnekler

Masson Trikrom histokimyasal özel boyası anastomoz hattı çevresinde yeniden oluşan kollajen liflerin yoğunluğunu değerlendirilmek için kullanıldı. Kollajen lif yoğunluğuda skor 0'dan skor 3'e kadar skorlandı (Skor 0: Yok, Skor 1: Hafif, Skor 2: Orta, Skor 3: Yoğun) (98). İmmunhistokimyasal inceleme için 5 µm kalınlıkta kesitler elektrostatik yüklü lamlara (EPIGlass, ca.75x25mm/3x1 inch, positive charged) alınarak ve 60°C'da bir gece kurutulmaya bırakıldı. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemleri de dahil olmak üzere tüm İHK'sal boyama süreci BenchMark XT tam otomatik İHK boyama cihazı ile gerçekleştirildi. İHK boyama sistemi olarak biyotinsiz, HRP multimer bazlı, hidrojen peroksit substrat ve 3, 3' – diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kromojeni içeren (ultraView™ Universal DAB Detection Kit, Catalog number 760-500, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) ile tam otomatik İHK boyama cihazı (Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) kullanıldı. Zıt boyaması hematoksilen ve mavileştirici solüsyon ile cihazda tamamlanan kesitlerin dehidratasyonu, ksilen ile şeffaflandırılması ve lamel kapatılması aşamaları otomatik

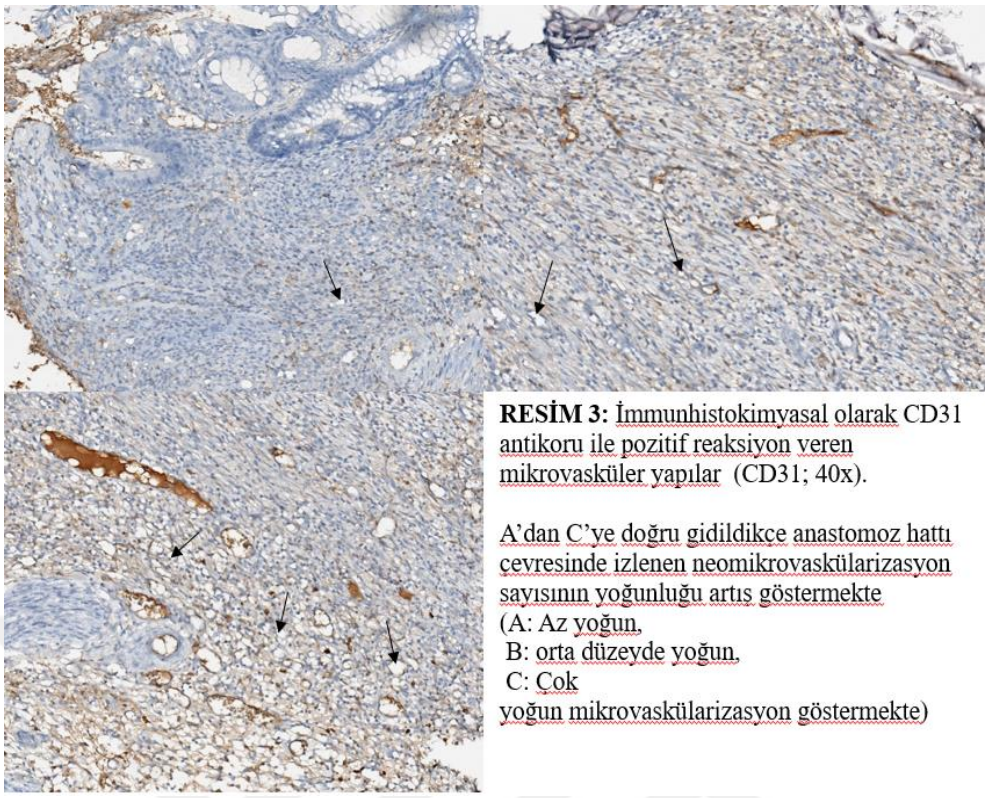
olarak (Dako Coverstainer, CS100-10073) yapılarak işlem sonlandırıldı. Primer antikor olarak CD31 (Cell Marque Klon:JC31) ve CD68 (Cell Marque Klon:KP1) kullanıldı.



RESİM 2: Masson Trikrom histokimyasal özel boyası ile anastomoz hattı çevresinde yeniden oluşan kollajen liflerin yoğunluğunu (Masson Trikrom; 10x).
A: Kollajenizasyon Skoru: 0 olan doku örneği. Anastomoz hattı çevresinde yeni oluşan kollajen izlenmemekte,
B: Kollajenizasyon Skoru: 1 olan doku örneği. Anastomoz hattı çevresinde yeni oluşan ince lifler halinde kollajen izlenmekte (→),
C: Kollajenizasyon Skoru: 2 olan doku örneği. Anastomoz hattı çevresinde yeni oluşan daha yoğun ama düzensiz bir dağılım gösteren kollajen izlenmekte (→)

Resim 2. Masson Trikrom histokimyasal özel boyası ile anastomoz hattı çevresinde yeniden oluşan kollajen liflerin yoğunluğunu

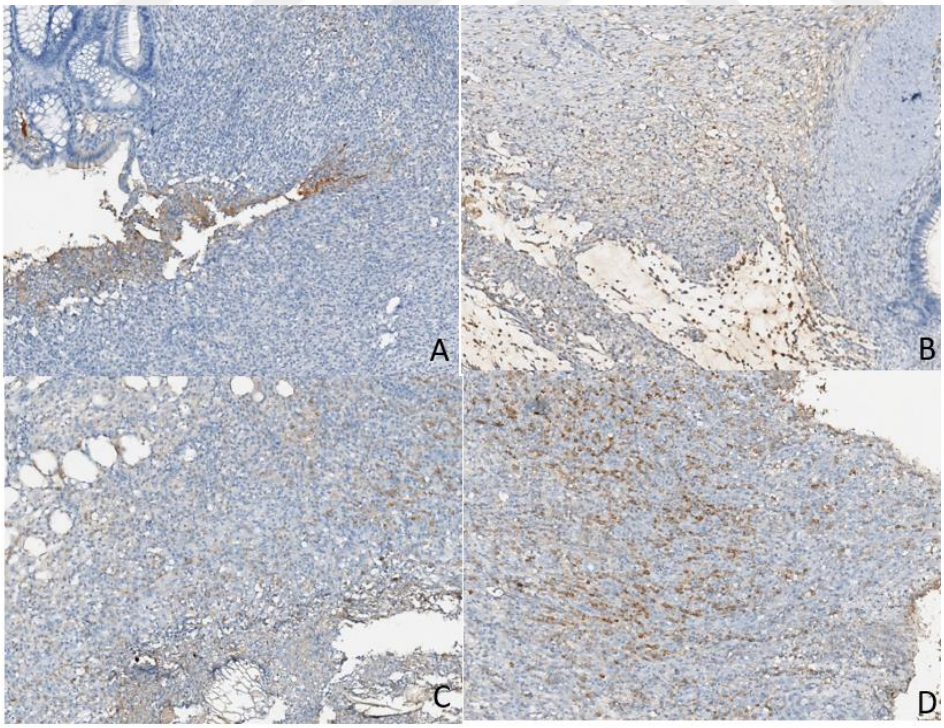
CD31 ile H&E üzerinden değerlendirilen mikrovaskülarizasyon identifiye edilmeye çalışıldı. CD31 boyanmasının en yoğun olduğu alanda bir büyük büyütme alanındaki CD31 ile pozitif reaksiyon veren mikrovasküler yapıların sayıları kaydedildi (99). CD68 ile inflamasyon içerisinde bulunan makrofajların sayısı değerlendirildi. Buna göre CD68 boyanmasının en yoğun olduğu alanda bir büyük büyütme alanındaki CD68 ile pozitif reaksiyon veren makrofajların sayıları kaydedildi (100). Leica Aperio AT Turbo dijital patoloji slayt tarama cihazında HE boyanan mikroskop slaytları 40x, immün boyanan mikroskop slaytları 20x objektifi ile dijitalleştirildi. Dijitalleştirilmiş görüntüler Virapath-2.1 (Virasoft Yazılım A.Ş.) programı kullanılarak görsel materyal elde etmek amacıyla görüntülendi.



RESİM 3: İmmunhistokimyasal olarak CD31 antikoru ile pozitif reaksiyon veren mikrovasküler yapılar (CD31; 40x).

A'dan C'ye doğru gidildikçe anastomoz hattı çevresinde izlenen neomikrovaskülarizasyon sayısının yoğunluğu artış göstermekte
(A: Az yoğun,
B: orta düzeyde yoğun,
C: Çok
yoğun mikrovaskülarizasyon göstermekte)

Resim 3. İmmunhistokimyasal olarak CD31 antikoru ile pozitif reaksiyon veren mikrovasküler yapılar



RESİM 4: İmmunhistokimyasal olarak CD68 antikoru ile pozitif reaksiyon veren makrofaj yoğunluğu (CD68; 40x). A'dan D'ye doğru gidildikçe anastomoz hattı çevresinde izlenen inflamasyon alanı içerisinde artan sayıda makrofajlar izlenmekte

Resim 4. İmmunhistokimyasal olarak CD68 antikoru ile pozitif reaksiyon veren makrofaj yoğunluğu

İstatiksel Analiz

Alfa (α) hatası %5 beta (ß) hatası %20 olacak şekilde her grup için 8 rat deneye dahil edildi.

Verilerin analizinde SPSS 22 programı kullanılmıştır. Verilerin normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için Shapiro Wilk testi kullanılmıştır. Tanımlayıcı analizler normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama ve standart sapma (mean±SD) ve medyan şeklinde sunulmuştur. Normal dağılım gösteren verilerin gruplar arasındaki anlamlılık düzeyini belirlemek için parametrik bir test olan tek yönlü ANOVA t-testi kullanıldı. Post-hoc test olarak bonferoni testi, Tukey testi kullanıldı. Dağılımın normal olmadığı durumda gruplar arasındaki anlamlılık düzeyini belirlemek için non-parametrik bir test olan Kruskal Wallis-H testi kullanıldı. Nitel verilerin analizinde ki-kare testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Hayvanların başlangıç, ameliyat öncesi ve sakrifikasyon öncesi ortalama ağırlıkları tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Deney hayvanlarının ortalama ağırlıkları

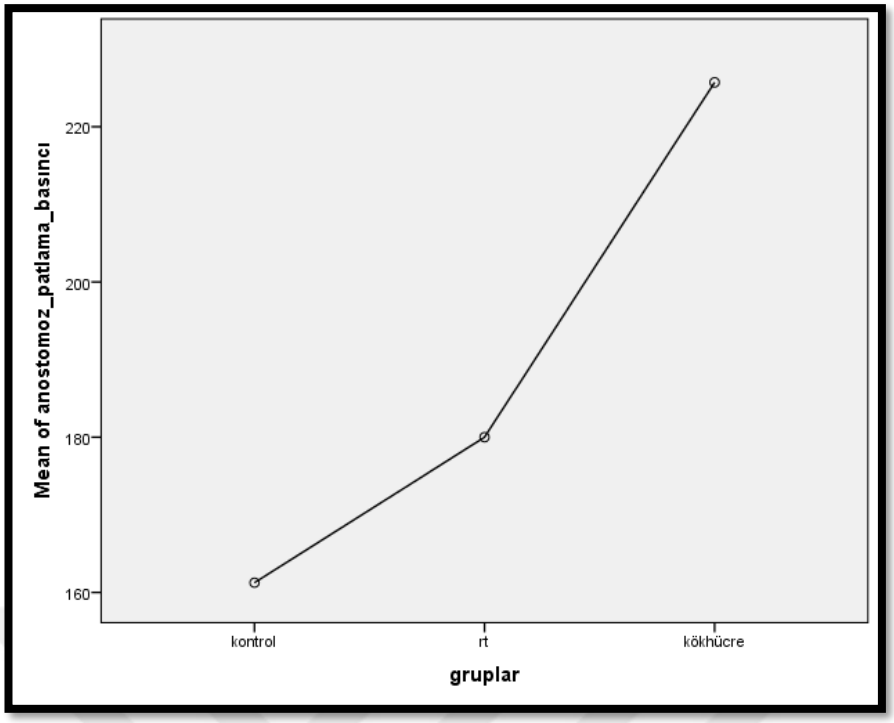
Gruplar		Başlangıç	Ameliyat Öncesi	Sakrifikasyon
Kontrol (gr)	X	257,00	274,25	293,00
	S.S.	3,16	12,759	23,434
RT (gr)	X	258,75	247,00	253,38
	S.S.	5,41	8,944	8,943
Kök hücre tedavisi (gr)	X	260,88	256,00	255,38
	S.S.	6,89	6,503	20,191
Total	X	258,88	259,08	267,25
	S.S.	5,392	14,861	25,733

Deney gruplarına göre ortalama patlama basınçları karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olmadığı bulunmuştur (tablo 2).

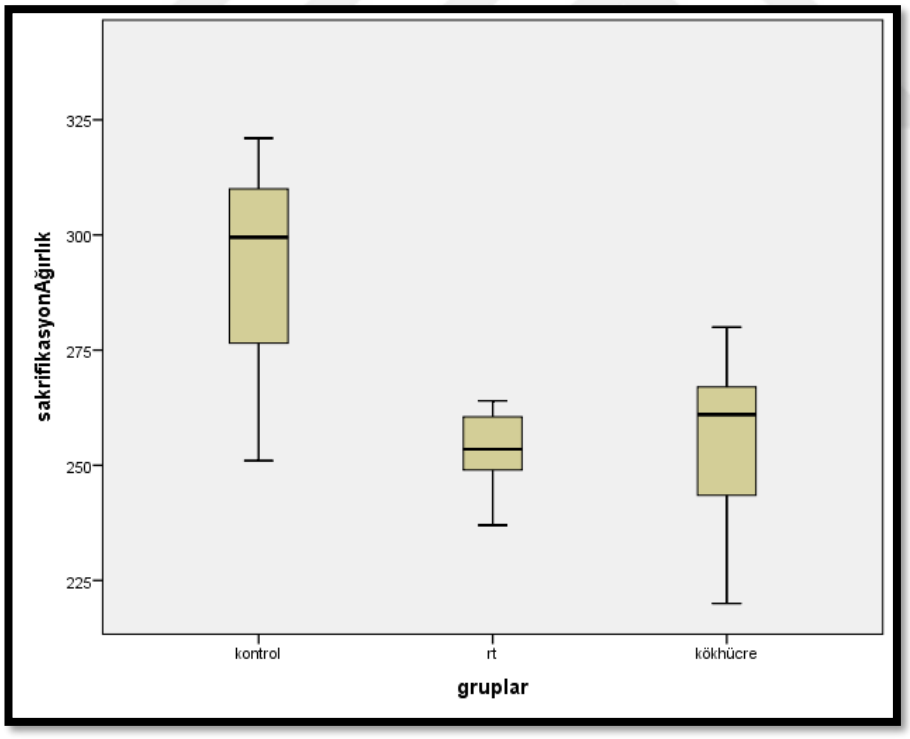
Tablo 2. Gruplara göre ortalama patlama basıncı karşılaştırmaları

Gruplar	X	S.S.	Median	Min.	Max.	p
Kontrol	161,25	93,26	130,00	80	300	
RT	180,00	51,64	160,00	120	240	0.233
Kök hücre	225,71	58,55	220,00	120	300	
Total	187,73	73,54	190,00	80	300	

Gruplara göre ortalama patlama basıncı değerleri ve dağılımları grafik 1 ve grafik 2'de verilmiştir.



Grafik 1. Gruplara göre ortalama patlama basınçları



Grafik 2. Gruplara göre patlama basıncı dağılımları

Deney gruplarına göre mikrovaskülarite alan sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur.

Tablo 3. Gruplara göre mikrovaskülerite alan sayıları karşılaştırılması

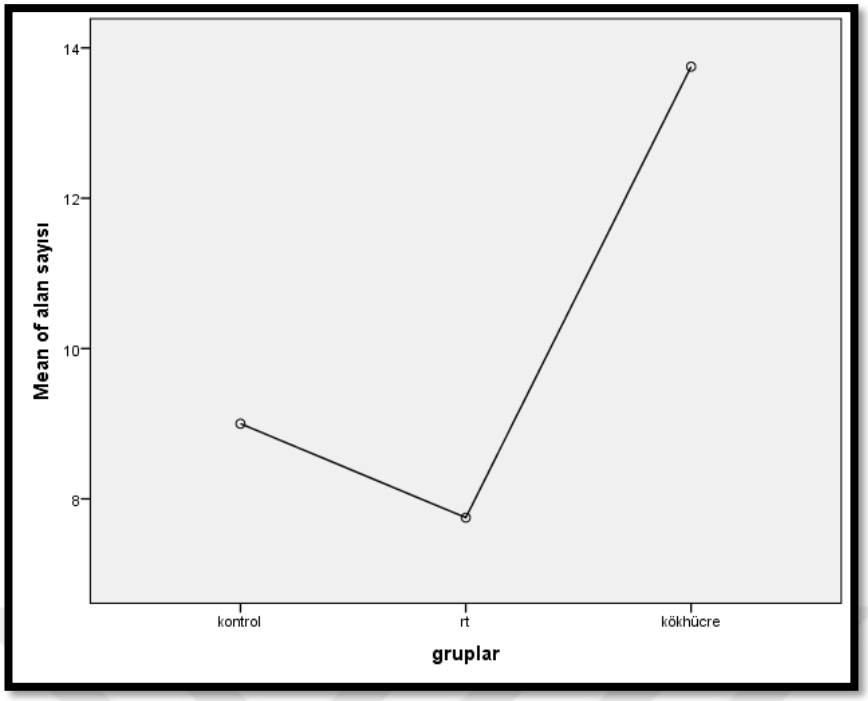
Gruplar	X	S.S.	Median	Min.	Max.	p
Kontrol	9,00	4,84	7,00	5	18	
RT	7,75	4,20	7,50	2	16	**0.043**
Kök hücre	13,75	4,92	13,50	6	22	
Total	10,17	5,18	9,50	2	22	

Mikrovaskülarite alanları açısından ikili alt grup karşılaştırmalarına bakıldığında kök hücre grubunda RT grubuna göre mikrovaskülarite alanlarının anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir (tablo 4).

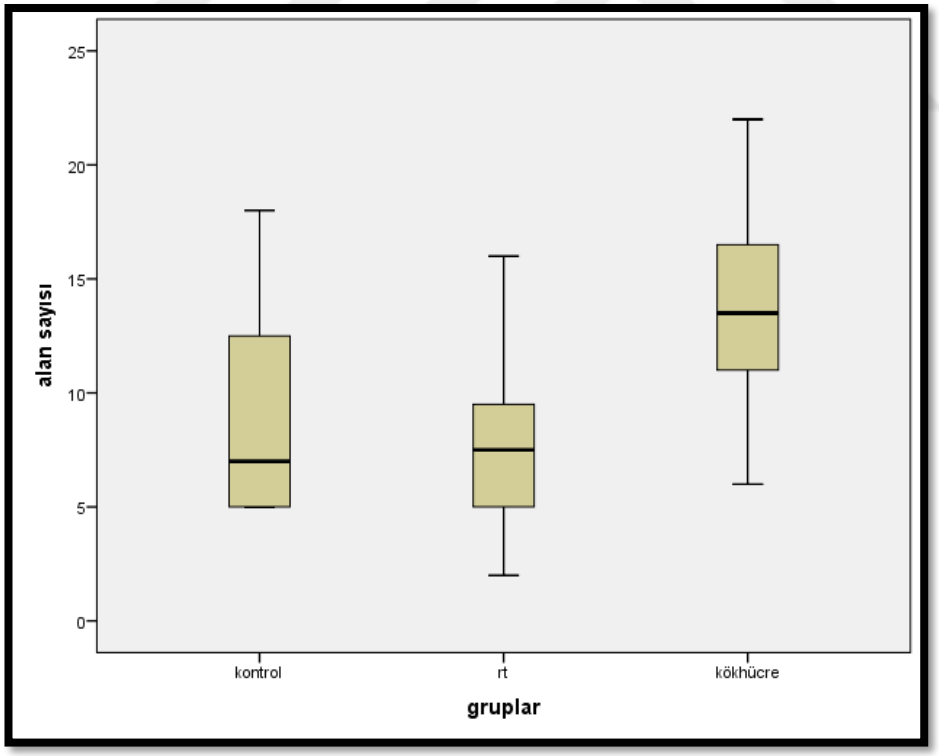
Tablo 4. Mikrovasküler alan sayıları post-hoc karşılaştırmalar

	(J)				% 95 G.A.	
(I) gruplar	gruplar	Fark (I-J)	S.H.	p	Alt sınır	Üst sınır
Kontrol	RT	1,250	2,33	1,000	-4,82	7,32
	Kök hücre	-4,750	2,33	0,164	-10,82	1,32
RT	Kontrol	-1,250	2,33	1,000	-7,32	4,82
	Kök hücre	-6,000	2,33	0,**050**	-12,07	,07
Kök hücre	Kontrol	4,750	2,33	0,164	-1,32	10,82
	RT	6,000	2,33	**0,050**	-,07	12,07

Deney gruplarına göre ortalama mikrovasküler alan sayıları ve dağılımlar grafik 3 ve grafik 4'de verilmiştir.



Grafik 3. Gruplara göre ortalama mikrovasküler alan sayıları



Grafik 4. Gruplara göre ortalama mikrovasküler alan sayılarının dağılımı

Deney grupları arasında CD31 sayıları (mikrovasküler alan) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur (tablo 5).

Tablo 5. Gruplara göre mikrovasküler alan (CD31) sayıları

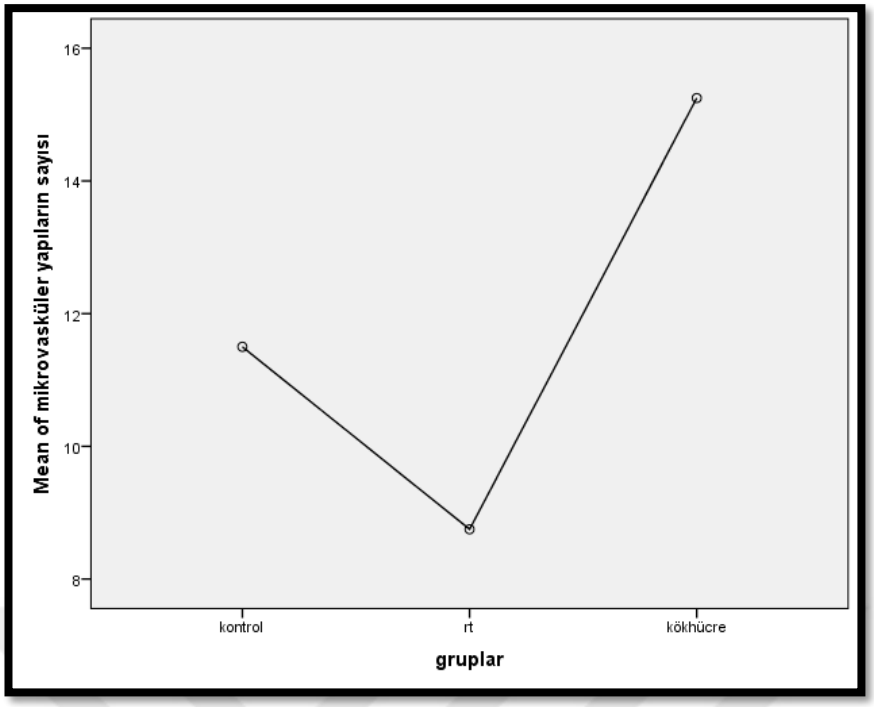
Kontrol	11,50	3,38	12,50	7	15	
RT	8,75	4,95	8,50	2	18	**0.015**
Kök hücre	15,25	3,73	14,50	10	20	
Total	11,83	4,75	12,50	2	20	

CD 31 sayıları açısından ikili alt grup karşılaştırmalarına bakıldığında kök hücre grubunda RT grubuna göre CD 31 sayılarının (mikrovaskülarite alanları) anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir (tablo 6).

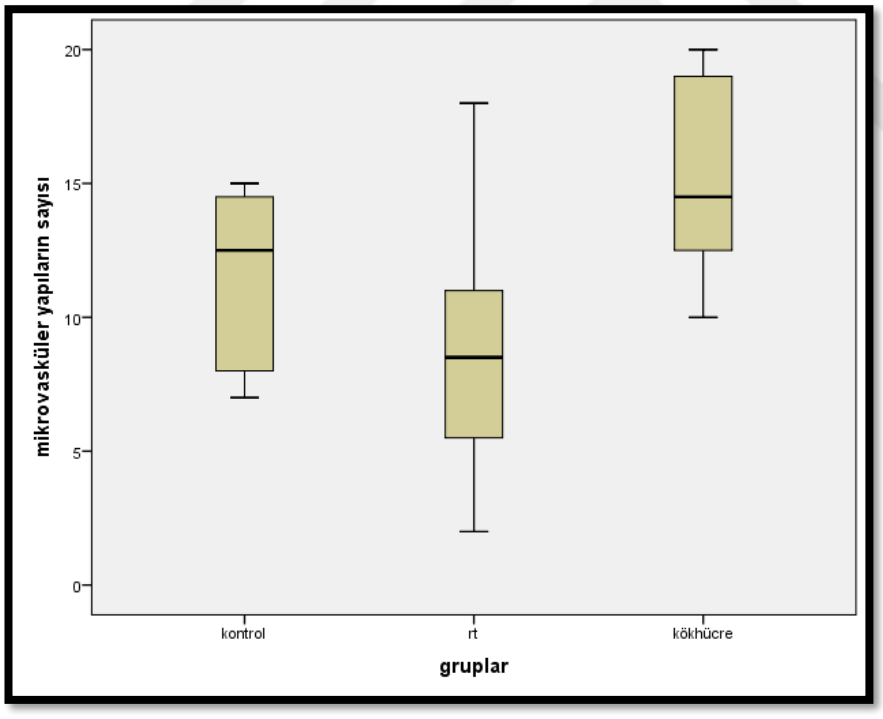
Tablo 6. CD 31 sayıları post-hoc karşılaştırmalar

(I)	**(J)**				**%95 G.A.**	
Gruplar	**gruplar**	**Fark (I-J)**	**S.H.**	**p**	**Alt sınır**	**Üst sınır**
Kontrol	RT	2,750	2,038	0,575	-2,55	8,05
	Kök hücre	-3,750	2,038	0,240	-9,05	1,55
RT	Kontrol	-2,750	2,038	0,575	-8,05	2,55
	Kök hücre	-6,500*	2,038	**0,013**	-11,80	-1,20
Kök hücre	Kontrol	3,750	2,038	0,240	-1,55	9,05
	RT	6,500*	2,038	**0,013**	1,20	11,80

Deney gruplarına göre ortalama CD 31 sayıları (mikrovasküler alan) sayıları ve dağılımları grafik 5 ve grafik 6'da verilmiştir.



Grafik 5. Gruplara göre CD31 ortalama sayıları



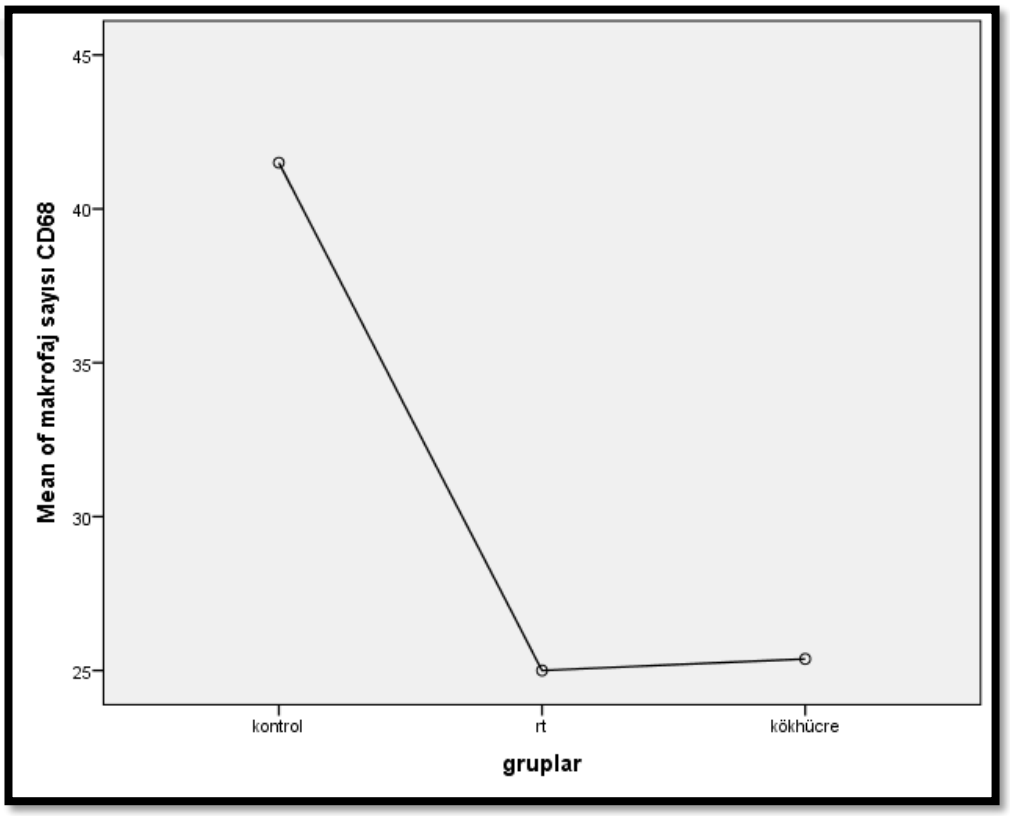
Grafik 6. Gruplara göre CD31 dağılımları

Deney grupları arasında CD68 sayıları (makrofaj sayıları) karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olmadığı bulunmuştur (tablo 7).

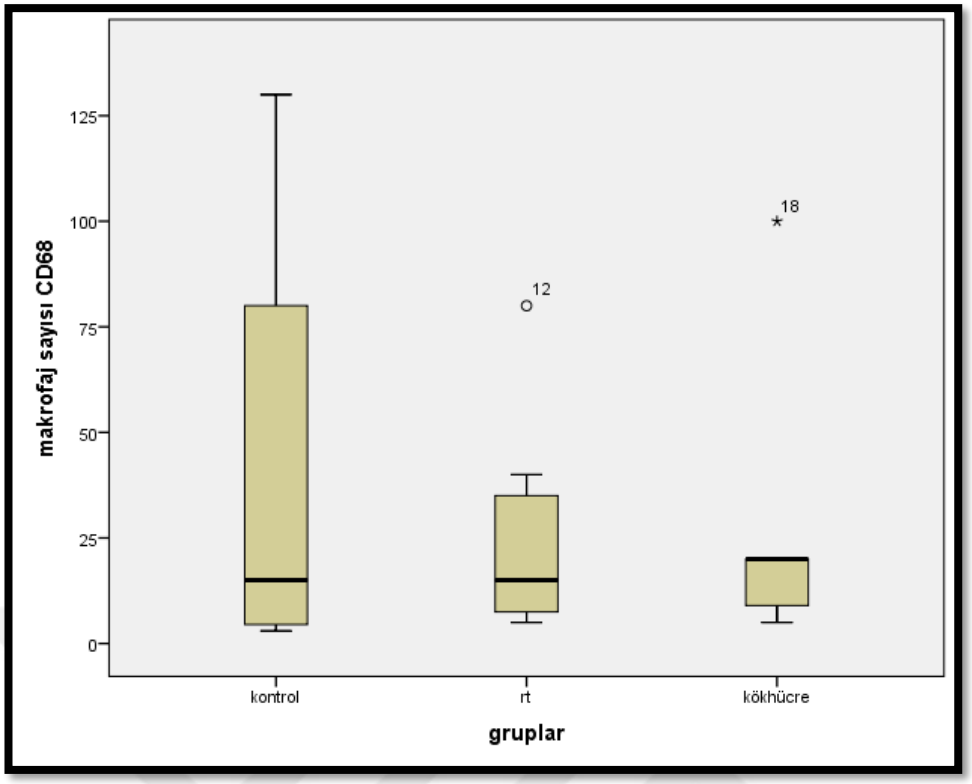
Tablo 7. Gruplara göre makrofaj sayıları (CD 68) karşılaştırmaları

Gruplar	X	S.S.	Median	Min.	Max.	p
Kontrol	41,50	49,67	15,00	3	130	
RT	25,00	25,49	15,00	5	80	0.600
Kök hücre	25,38	30,79	20,00	5	100	
Total	30,63	36,04	20,00	3	130	

Deney gruplarına göre ortalama CD 68 sayıları (mikrovasküler alan) sayıları ve dağılımları grafik 7 ve grafik 8'de verilmiştir.



Grafik 7. Gruplara göre CD68 ortalama sayıları



Grafik 8. Gruplara göre CD68 dağılımları

Gruplara göre kollajen yoğunluğu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (tablo 8).

Tablo 8. Gruplara göre kollajen yoğunluğu karşılaştırması

			Kollajen yoğunluğu			
			Yok	**Hafif**	**Orta**	
Gruplar	Kontrol	n	3	3	2	
		Satır %	37,5	37,5	25,0	
	RT	n	2	3	3	0.460
		Satır %	25,0	37,5	37,5	
	Kök hücre	n	0	5	3	
		Satır %	0,0	62,5	37,5	

Gruplara göre inflamasyon skoru karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (tablo 9).

Tablo 9. Gruplara göre inflamasyon skoru karşılaştırması

			İnflamasyon Skor			
			Hafif	**Orta**	**Yoğun**	**p**
Gruplar	Kontrol	n	2	4	2	
		Satır %	25,0	50,0	25,0	
	RT	n	2	3	3	0.438
		Satır %	25,0	37,5	37,5	
	Kök hücre	n	3	3	2	
		Satır %	37,5	37,5	25,0	

Gruplara göre epitelizasyon skoru karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur (tablo 10). Kök hücre grubunda (%62.5) epitelizasyon skorunun kontrol grubu (%12.5) ve RT grubuna (%0) göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

Tablo 10. Gruplara göre epitelizasyon skoru karşılaştırması

			Epitelizasyon Skoru			
			Yok	**Hafif**	**Orta**	p
Gruplar	Kontrol	n	1	6	1	
		Satır %	12,5	75,0	12,5	
	RT	n	3	5	0	**0.024**
		Satır %	37,5	62,5	0,0	
	Kök hücre	n	0	3	5	
		Satır %	0,0	37,5	62,5	

5. TARTIŞMA

Anastomoz kaçakları GİS ameliyatları sonrasında ciddi morbidite ve mortaliteye neden olan önemli komplikasyondur (101). GİS yara iyileşme sürecini etkileyen birçok faktör vardır. Gastrointestinal yara iyileşme sürecinde kaliteyi artırmak ve anastomoz direncini artırmak için kullanılan yöntemlerden biri de kök hücre tedavisidir (102). Özellikle adipoz doku kökenli kök hücreleri - kolay elde edilmesi ve farklı dokulara dönüşebilmesinden dolayı GİS yara iyileşmesi ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır (102).

Bizim çalışmamızın sonuçlarına baktığımızda gruplara göre epitelizasyon skoru karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur. Kök hücre grubunda (%62.5) epitelizasyon skorunun kontrol grubu (%12.5) ve RT grubuna (%0) göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. CD68 sayısı (Makrofaj sayısı), kollajen yoğunluğu, inflamasyon skoru açısından gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir farkın olmadığı bulunmuştur. Patlama basıncı değerlerine bakıldığında kök hüce grubunda RT ve kontrol grubuna göre ortalama değerinin yüksek olduğu ama istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur.

Uysal CA ve arkadaşlarının yönetdikleri bir çalışmada kemik iliği kökenli ve adipoz kökenli kök hücreler karşılaştırılmıştır ve adipoz kökenli kök hücre gruplarında damarlanmanın anlamlı olarak daha fazla olduğu bulunmuştur (103). Bizim çalışmamızda da mikrovaskülarite alanları açısından bakıldığında kök hücre grubunda RT grubuna göre mikrovaskülarite alanlarının anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. CD31 sayımlarının (mikrovasküler alan) kök hücre grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur.

Karakaya ve ark. tarafından immunsuprese edilen sıçanlarda yapılan kolon anastomozlarında kök hücrenin anastomoz üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada histopatolojik inceleme sonucunda reepitelizasyon, iskemik nekroz, fibrozis ve muskuler tabakada bozulma açısından farklılık saptanmamıştır. Vasküler proliferasyon açısından yapılan değerlendirmede 4. gün sakrifiye edilen sıçanlar arasında anlamlı farklılık saptanmazken, kök hücre verilen ve 7. günde sakrifiye edilen gruplarda daha fazla vasküler proliferasyon saptanmıştır. İmmunsuprese

edilen ve edilmeyen sıçanlarda yapılan kolon anastomozuna subserozal kök hücre enjeksiyonunun yapılmasının anastomoz dayanıklılığını vasküler proliferasyonu arttırdığı bulunmuştur. Riskli gastrointestinal anastomozlarda, adipoz doku kaynaklı kök hücre uygulamasının uygun bir yöntem olabileceği belirtilmiştir (104). Tarafımızca yapılan çalışmada mikrovaskülarite alanları açısından ikili alt grup karşılaştırılmıştır. Kök hücre grubunda RT grubuna göre mikrovaskülarite alanlarının anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda çalışmamızda kök hücre grubunda epitelizasyonun arttığı gözlemlenmiştir

Dirk ve ark. tarafından yüksek doz radyoterapi sonrası adipoz doku kökenli kök hücre uygulamasının kolon anastomoz iyileşmesi ve anjiogenik, inflamatuvar süreçlere etkisinin incelendiği çalışmada adipoz doku kökenli kök hücre tedavisinin ülser boyutunu azalttığı, mukozal vasküler yoğunluğu arttırdığı ve kanamayı sınırladığı gösterilmiştir. Ayrıca, tek doz adipoz doku kökenli kök hücre enjeksiyonuna göre 2.doz kök hücre enjeksiyonlarından sonra tip 2 makrofajların daha büyük bir oranda iyileşme bölgesinde bulunduğu ve infalamasyon sürecini daha güçlü sınırladığı belirtilmiştir. Sonuç olarak, adipoz doku kökenli kök hücre enjeksiyonlarının gelişmiş damar oluşumu ve azaltılmış iltihaplanma yoluyla radyoterapi alan bir kolonda anastomotik iyileşmeyi desteklediği gösterilmiştir (99). Bizim çalışmamızda da kök hücre tedavisi uygulanan deney hayvanlarında mikrovasküler alanların kök hücre grubunda anlamlı olarak fazla olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda çalışmamızda makrofaj sayılarında ve inflamasyon açısından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda fark bulunmamasının nedeni çalışma tasarımı ve ya çalışma yöntemine de bağlı olabilir. Çalışmamızda kök hücre tedavisi deneylere VCİ ile ve tek doz olarak yapılmıştır.

Adas ve arkadaşları tarafından kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücre tedavisinin kolon anaostomoz iyileşmesine etkisinin incelendiği çalışmada kontrol grubuna göre 4.gün sakrifiye edilen kök hücre tedavisi uygulanan grupta patlama basıncının yüksek olduğu, 7.gün sakrifiye edilen grupta ise fark olmadığı bulunmuştur. İnfalamasyon açısından gruplar karşılaştırıldığında iskemik kolon anastomozlarında inflamasyon hariç diğer iyileşme parametrelerinde hızlanma olduğu bulunmuştur. Epitelizasyonun kontrol grubuna göre kök hücre grubunda anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir (98). Bizim çalışmamızda da epitelizasyon parametresinin kök hücre tedavisi uygulanan grupta önemli olarak fazla

olduğu bulunmuştur. Ayrıca *Adas ve arkadaşları* tarafından yapılan çalışmada patlama basıncının da kök hücre tedavi grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (98). Patlama basıncı kollajen yoğunluğuna bağlıdır (105). Bizim çalışmamızda ise kollajen yoğunlıuğu ve patlama basıncı açısından gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanamamıştır. Bu farklılık bizim çalışmamızda uygulanan radyasyon dozuna, adipoz kökenli kök hücre kullanılmasına ve bütün sakrifikasyonun aynı günde - 7.günde yapılmasına bağlı ola bilir.

Morgan ve arkadaşları tarafından lokal adipoz kökenli kök hücre uygulamasının anastomoz zayıflığı üstüne etkisinin araştırıldığı çalışmada, adipoz kaynaklı kök hücrelerin hem postoperatif 3.günde (% 25.0'a karşı % 87.5; p = 0.02) hem de 7.günde (% 25.0'a karşı % 87.5; p = 0.02) kontrol grubuna kıyasla anastomoz sızıntısını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Tek başına emilebilir bir jelatin süngerin kullanılmasının, ameliyat sonrası 3. veya 7. günlere kontrol grubuna kıyasla anastomotik sızıntı üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada kök hücre ile tedavi edilen hayvanlarda vasküler endotelin büyümesinde 5,9 kat ve 7,4 kat artış olduğu görülmüştür (98).

Alvarenga ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek riskli anastomozla ilişkili anastomoz kaçağının ve ölüm oranının adipoz doku kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerle tedavi edilen grupta azaldığı gösterilmiştir. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin uygulanması anastomozda kollajen liflerinin birikiminde azalma, goblet hücrelerinin korunması, miyeloperoksidaz aktivitesinde azalma, lamina propriada CD4+ T-hücreleri ve makrofajların birikiminde azalma, apoptotik hücre sayısında azalma ve NF-κ B aktivasyonu ile sonuçlanmıştır (106).

Komiyama ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada gastrotomi iyileşmesinde adipoz kaynaklı kök hücre tedavisi uygulanan ratlarda kök hücre enjeksiyonundan 7 gün sonra anjiogenezis ve kollajen birikiminde önemli bir artma olduğu ve bunun gastrostomi yerinin iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür. Aynı çalışmada adipoz kökenli kök hücre tedavisi uygulanan grupta 28. günden sonra kollajen birikiminin ise önemli olarak azaldığı bildirilmiştir. Patlama basıncının ise kök hücre transplante edilen grupta 7.günden sonra daha yüksek olduğu bulunmuştur (107).

Yoo ve arkadaşları tarafından iskemik kolon anastomozu iyileşmesine adipoz kökenli kök hücre tedavisinin etkisinin araştırıldığı deneysel çalışmada kök hücre tedavisi yapılan ve yapılmayan iki grup arasında yara enfeksiyonu, anastomoz kaçağı veya ölüm oranı açısından hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Adipoz kökenli kök hücre tedavisi uygulanan grupta, kontrol grubuna göre, daha az vücut ağırlığı kaybı, daha az ileus, daha az ülser ve daha az striktür ile giden anastomoz iyileşmesi görülmüştür. Kök hücre tedavisinin patlama basıncını ve kolajen birikimini artırdığı gösterilmiştir. Tarafımızca yapılan çalışmada da deney gruplarına göre ortalama patlama basınçları karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olmadığı bulunmuştur. *Yoo ve arkadaşlarının* çalışmalarında kök hücre tedavisi uygulanan grupta epitelizasyon ve mikrovasküler yoğunluk (CD31) kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur (108). Bizim çalışmamızda da gruplar arasında CD31 sayıları (mikrovasküler alan) karşılaştırıldığında kök hücre grubunda RT grubuna göre CD 31 sayılarının anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür.

Adaş ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kemik iliği kökenli kök hücre tedavisinin 4.günde enflamasyon dışında, iskemik kolon anastomozunun tüm iyileşme parametrelerini anlamlı derecede hızlandırdığı bulunmuştur. Yedinci günde kemik iliği kökenli kök hücre tedavisi hidroksiprolin seviyelerini ve patlama basıncını artırmıştır.

Histolojik parametrelerin, özellikle anjiyogenezin de iskemik kolon anastomozlarının iyileşmesi için önemli olduğu bulunmuştur (109). Tarafımızca yapılan çalışmada kemik iliği kökenli kök hücre değil adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre kullanılmakta olup 7.günde deney gruplarına göre ortalama patlama basınçları karşılaştırıldığında gruplar arasında fark olmadığı bulunmuştur.

Tadauchi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da iskemik kolitli ratlarda kök hücre enjeksiyonun sadece doku rejenerasyonunda etkili olmadığı, aynı zamanda anjiogenezis hatta nörogeneziste de etkili olduğu bulunmuştur (110). *Sukho ve arkadaşları* tarafından adipoz doku kökenli kök hücre tedavisinin kolon anastomoz sızıntısına etkisinin değerlendirildiği çalışmada; sızıntı, apse oluşumu, adezyon oluşumu, anastomoz patlama basıncı ve histoloji postoperatif 3. ve 7. günde değerlendirilmiştir. Kök hücre uygulamasının, adezyon oluşumunda artış olmaksızın kontrol grubuyla kıyasla anastomoz sızıntısını önemli ölçüde azalttığı

bulunmuştur. Kök hücre transplantasyonu yapılan grupta, kontrol grubuna göre anastomoz bölgesinde daha fazla CD3+ T hücresi ve CD163 + anti-inflamatuar makrofaj sayısının anlamlı olarak fazla olduğu bulunmuştur. Anastomoz patlama basıncı, damar yoğunluğu ve kollajen birikimi açısından gruplar arasında fark bulunamamıştır. Sızıntının azalmasında antiinflamatuar makrofajların ve T hücrelerinin sayısının artmasının olumlu etkiye neden olabileceği ifade edilmiştir (111).

Pelvik radyoterapi alan hastalarda gastrointestinal hasarlanmalara bağlı olarak ciddi ve kronik komplikasyonlar gelişebilir. *Semont ve arkadaşları* tarafından radyasyon kaynaklı keskin kolonik ülserasyon gelişen deneysel modelde mezenkimal kök hücre tedavisinin etkinliği test edilmiştir. Bu modelde, kemik iliği kaynaklı kök hücre, ışınlamadan hemen ve üç hafta sonra (lezyonlar oluşduktan) intravenöz olarak uygulanmıştır. Kök hücre tedavisinin, radyasyona bağlı kolon ülserini ve mortaliteyi azalttığı bulunmuştur. Kök hücre tedavisinin hücre infüzyon zamanından asılı olmayarak terapötik etkinliği indüklediği bulunmuştur. İnfüze edilen kök hücreler sadece kolonda etkili olmaz aynı zamanda kandaki endojen kök hücre mobilizasyonunu da arttırır ve bu da zaman içinde kalıcı faydalar sağlar. Işınlanmış fare kolonlarında, kök hücre tedavisinin epitel hücreleri tarafından WNT4 ligandının ekspresiyonunu arttırdığı görülmüştür. Epitelyal rejenerasyon hızı mezenkimal kök hücre enjeksiyonu sonrası SOX9 progenitör/kök hücre markeri genleri pozitif olan kolonik epitelyal hücreler sayesinde artıyor. Yapılan bu çalışma kök hücre tedavisinin endojen progenitör hücreleri stimule ederek rejeneratif süreci hızlandırdığını, radyasyonun neden olduğu kolorektal hasarı sınırladığı veya azalttığını göstermektedir (112). Bizim çalışmamızda da adipoz kökenli kök hücre tedavisi uygulanan rat grubunda diğer grublara göre epitelizasyonun anlamlı olarak fazla olduğu bulunmuştur.

Biz bu çalışmada kök hücre tedavisini tek doz, intraoperatif ve sistemik olarak uyguladık. Sonuç olarak epitelizasyonun ve mikrovaskulyarizasyonun arttığını gördük. Kök hücre tedavisinin çok dozlu, lokal ve farklı aşamalarda uygulanmasına ve sonuçlarının araştırılmasına gerek vardır.

6. SONUÇ

Preoperatif radyasyon tedavisi uygulanan ve radyasyon enteriti geliştirilen ratlarda sistemik kök hücre tedavisinin anastomoz iyileşmesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bu deneysel çalışmanın sonuçlarına göre:

1. cerrahi sonrası 7.günde yapılan değerlendirmelerde RT + sistemik ADKKH tedavisi uygulanan deneylerde mikrovaskülarizasyon ve epitelizasyon parametrelerinin kontrol grubuna ve sadece RT uygulanan gruba göre daha anlamlı olduğu bulunmuştur.
2. Kontrol, Radyasyon ve RT + ADKKH tedavisi uygulanan 3 grup karşılaştırıldığında makrofaj sayısı, kollajen yoğunluğu, inflamasyon skoru değerlerinde anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.
3. Postoperatif 7.günde Kontol , Radyasyon ve RT + sistemik ADKKH tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında Kök hücre grubunda anastomoz patlama basıncının median değeri yüksek bulunsa da istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.

Kök hücre tedavisi radyasyon almış ratlarda epitelizasyonu hızlandırmaktadır. Ancak anastomozun gerilim kuvvetini değiştirmemektedir.

7. KAYNAKLAR

1.Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Smigal C, Thun MJ, et.al. Cancer statistic, 2007. CA Cancer J Clin 2007;57: 43-66.

2.Kirchhoff P, Clavien P.A., Hahnloser,D. Complications in colorectal surgery: risk factors and preventive strategies. Patient Safety in Surgery 2010,4:5-8.

3.Ruiz-Tovar, Jaime. Postoperative complications of colon surgery, Vicent Morales-Castineiras and Eduardo Lobo-Martinez Cir Cir 2010,78:281-288.

4.Nuh N Rahbari, Jürgen Weitz, Werner Hohenberger. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: a proposal by the İnternational Study Group of Rectal Cancer. 2010 Mar; 147(3):339-51

5.Mc Ginn FP, Gartell PC, Clifford PC, Brunton FJ. Staples or sutures for low colorektal anastomoses: a prospective randomized trial. Br J Surg 1985;72:603-5.

6.Rullier E, Laurent C,Garrelon JL, Michel P,et al. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rektal cancer. Br J Surg 1998 ;85 :355-8.

7.Baum ML, Anish DS, Chalmers TC, Sacks HS, et al. A survey of clinical trials of antibiotic prophlaxis in colon surgery:evidence against further use of no-treatment controls. N Eng J Med 1991:305:795-9.

8.Bieleck K, Gajda A. The Causes and Preventention of Anastomotic Leak After Colorectal Surgery, Klinicka Onkologie Zvlastni Cislo 1999, 25-30.

9.Çetinkaya DU. Mezenkimal kök hücreler. In: Kansu E (ed). Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları. s.l. : Ankara: Yalçın Matbaacılık, 2009:53-62

10. KINAY, M. (2009). Kolorektal Kanser Loko-Rejyonel Tedavisi: Rektum Kanserinde Radyoterapi. Türkiye Klinikleri Tıbbi Onkoloji-Özel Konular, 2(3), 35-44.

11. 91.Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. Histochemistry and cell biology;132(5):533-46. 2009.

12. Karaoz E, Ayhan S, Gacar G, Aksoy A, Duruksu G, Okcu A, et al. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. Cytotherapy;12(3):288-302. 2010.

13. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. Annals of plastic surgery;54(5):546-52. 2005

14. Karakaya, E. (2017). Everolimus ile immunsuprese edilen sıçanlarda yapılan kolon anastomozlarında kök hücrenin anastomoz üzerine etkileri: Deneysel çalışma.

15. Yoo JH, Shin JH, An MS et al. Coloproctology Adipose-tissue-derived Stem Cells Enhance the Healing of Ischemic Colonic Anastomoses : An Experimental Study in Rats. Coloproctology 2012;28:132-139.

16. KONU-GÜNCELLEME, TEMEL. Rektum Kanseri Neoadjuvant Tedavisinde Uzun ve Kısa Süreli Radyoterapi Rejimlerinin Karşılaştırılması. 2014.

17. Dahlberg M, Glimelius B, Påhlman L. Improved survival and reduction in local failure rates after preoperative radiotherapy: evidence for the generalizability of the results of Swedish Rectal Cancer Trial, AnnSurg. 1999;229(4):493-7.

18. Folkesson J, Birgisson H, Pahlman L, Cedermark B, Glimelius B, Gunnarsson U. Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. J Clin Oncol. 2005;23(24):5644-50.

19. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T et al Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. N Engl J Med. 2001;345(9):638-46.

20. Peeters KC, van de Velde CJ, Leer JW, Martijn H, Junggeburt JM, Kranenbarg EK, el al. Late side effects of shortcourse preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excisionfor rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients--a Dutch colorectal cancer group studyJ Clin Oncol. 2005;23(25):6199-206.

21. Sebag-Montefiore D, Stephens RJ, Steele R, Monson J, Grieve R, Khanna S, et al. Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCICCTG C016): a multicentre, randomized trial. Lancet. 2009;373:811-820.

22. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowska Guttmejer A. Sphincter preservation following preoperative radiotherapy for rectal cancer: report of a randomized trial comparing short-term radiotherapy vs. conventionally fractionated radiochemotherapy. Radiother Oncol 2004;72:15-24.

23. Bujko K, Nowacki MP, Kepka L. Polish Colorectal Study Group. Postoperative complications in patients irradiated pre-operatively for rectal cancer: report of a randomized trial comparing short-term radiotherapy vs. chemoradiation. Colorectal Dis 2005;7:410-6.

24. Ngan S, Fisher R, Goldstein D. A randomized trial comparing local recurrence (LR) rates between short course (SC) and long course (LC) preoperative radiotherapy (RT) for clinical T3 rectal cancer: An intergroup trial (TROG, AGITG, CSSANZ, RACS). In: 46th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology June 04-08, 2004, Chicago, IL, J ClinOncol2010:28.

25. Gerard A, Buyse M. Preoperative radiotheraphy as adjuvant treatment in rectal cancer. Annals of Surgery, November 1988:606-614)

26. Cummings BJ. Adjuvant radiation theraphy for colorectal cancer. Cancer, September 1992:70(5):1372-1383

27. Reed PW, Garb JL. Long term results and complicatıons of preoperative radiation in the treatment of rectal cancer. Surgery, February 1988:103(2):161-167

28. Wellwood JM, Jackson BT. The intestinal complications of radiotheraphy. Brıtısh Journal of Surgery, 1973:60(10):814-818

29. Kuzu MA, Köksoy C. Effects of preoperative fractıoned irradiatıon on left colonic anastamozis in the rat. Dis Colon Rectum, March 1998:41(3):370-376

30. Thorntorn FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. Surg Clin North Am 1997; 77: 549-73.

31. Biert J, Seifert WF, De Man B. Combined preoperative irradiation and local hypertermia delays early healing of experimental colonic anastomoses. Arch Surg 1996; 131: 1037-42.

32. Carrico TJ, Mehrhof Jr. Al, Cohen IK. Biology of Wound Healing. Surg Clin North Am 1984; 64: 721-33.

33. Thorntorn FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. Surg Clin North Am 1997; 77: 549-73.

34. Gustafson GT. Ecology of wound healing in the oral cavity. Scand J Heamatol 1984; 40: 393-409.

35. EKMEKÇİ, P., & BOSTANCI, S. (2002). Yara iyileşmesi. Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi, 12(2), 114-120.

36. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factors contributing to leakage of colonic anastomosis. Ann Surg 1973; 177: 513-8.

37. Ellison G. Wound healing in the gatrointestinal tract. Semin Vet Med Surg 1989; 4: 287-92.

38. Hendriks T, Walter JB. Healing of experimental intestinal anastomoses. Dis Colon Rectum, 1990:891-901

39. Hawley PR, Faulk WP, Dunphy JE. Collagenase activity in the gastrointestinal tract. Br J Surg 1970; 57: 896-900.

40. Jiborn H, Ahonen J, Zederfelt B. Healing of experimental colonic anastomoses: the effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. Am J Surg 1980; 139: 406-13.

41. Hermann JB, Woodward SC, Puaski EJ. Healing of colonic anastomoses in the rat. Surg Gynecol Obstet 1964; 119: 269-75.

42. Engin A. Yara iyileşmesi Temel Cerrahi Ed . Sayek İ. Güneş kitabevi Ltd Şti Ankara 1993, s:185..

43. Tez M, Keskek M, Ozkan O, Karamursel S. External metallic circle in microsurgical anastomosis of common bile duct. Am J Surg 2001; 182: 130-3

44. Katsikas D, Sechas M, Antypas G. Beneficial effects of omental wrapping of unsafe intestinal anastomoses. An experimenatl study. Int Surg 1977; 62: 435-7.

45. Merad F, Hay JM, Fingerhut A, Flamant Y, et al. Omentoplasty in the prevention of anastomotic leakage after colonic or rectal resection: a prospective randomized study in 712 patients. French Associations for Surgical Research. Ann Surg 1998; 227: 179-86.

46. John H, Buchmann P. Improved perineal wound healing with the omental pedicle graft after rectal excision. Colorectal Dis 1991; 6: 193-6.

47. Barbul A. Wound healing. The Surgical Clinics of North America, June 1997:509-527

48. Hawley PR, Faulk WP. Collagenase activity in the gastro-intestinal tract.Brıtısh Journal of Surgery, 1970:57(12):896-900

49. Chowcat NL, Savage FJ. Role of collagenase in colonic anastomoses:a reappraisal. . Brıtısh Journal of Surgery, 1988:75:330-334

50. Stoop MJ, Hendrics T. Advanced age alone does not supress anostomotic healing. Surgery 1996:119:15-19

51. Martens MF, Hendricks T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat:differences between small and large bowel. Gut, 1991:32:1482-1487

52. Shandall A, Lowndes R. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. Brıtısh Journal of Surgery, 1985:72:606-609

53. Van Der Ham AC, Kort WJ. Effect of antibiotics in fibrin sealent on healing colonic anastomoses in the rat. Brıtısh Journal of Surgery, 1992:79:525-528

54. Hendriks T, Walter JB. Healing of experimental intestinal anastomoses. Dis Colon Rectum, 1990:891-901

55. Chung RS. Blood flow in colonic anastomoses. Effect of stapling and suturing. Ann Surg 1987; 206: 335-9.

56. Ellison G. Wound healing in the gatrointestinal tract. Semin Vet Med Surg 1989; 4: 287-92.

57. Saner H. Kolon ve rektum anstomoz kaçaklarında kollajen metabolizmasının rolü ve kaçakların önlenmesinde kollejenaz enzim inhibisyonunun etkisi. 1976 Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi İstanbul.

58. Hedberg SE, Welch CE. Complications following surgery of colon. Surg Clin North Am 1963; 43: 75-6.

59. Pronio A, Di Filippo A, Narilli P, et al. Anastomotic dehiscence in colorectal surgery. Analysis of 1290 patients. Chir Ital. 2007;59:599-609.

60. Mulholland MW, Doherty GM. Complications in Surgery. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia 2006: 504-505.

61. Kanellos I, Blouhos K, Demetriades H, et al. The failed intraperitoneal colon anastomosis after colon resection. Tech Coloproctol 2004;8:53-55

62. Branagan G, Finnis D. Wessex Colorectal Cancer Audit Working Group. Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. Dis Colon Rectum 2005;48:1021-1026.

63. Chang SC, Lin JK, Yang SH, et al. Long-term outcome of anastomosis leakage after curative resection for mid and low rectal cancer. Hepatogastroenterology 2003;50:1898-1902

64. Sale GE, Storb R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. Experimental hematology;11(10):961-6. 1983.

65. E K. Kök Hücreler. E K, E O, editors2004.

66. Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. The Journal of clinical investigation;115(1):5-12. 2005

67. Ural A. Embriyonel ve mezodermal kök hücreler. Ural A, editor.

68. E. Kansu BÇ. Erişkin ve hematopoetik kök hücreler. 2009.

69. F. Şahin GS, S. Omay. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. Şahin F, editor2005

70. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Experimental hematology;4(5):267-74. 1976.

71. 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 engineering;7(2):211-28. 2001.

72. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Secco M, Strauss BE, Zatz M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. Cell transplantation;19(3):279-89. 2010

73. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Biochimie;87(1):125-8. 2005.

74. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery;32(6):370-3. 2004.

75. DU Ç. Mezenkimal kök hücreler. 2009.

76. Joo HH, Jo HJ, Jung TD, Ahn MS, Bae KB, Hong KH, et al. Adipose-derived stem cells on the healing of ischemic colitis: a therapeutic effect by angiogenesis. International journal of colorectal disease;27(11):1437-43. 2012.

77. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulsom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. Molecular pathology : MP;56(2):86-96. 2003.

78. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem cells (Dayton, Ohio);19(3):180-92. 2001.

79. Hawley RG, Sobieski DA. Stem cell bouillabaisse-potpourri. Stem cells (Dayton, Ohio);20(5):360-3. 2002.

80. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. Histochemistry and cell biology;132(5):533-46. 2009.

81. Karaoz E, Ayhan S, Gacar G, Aksoy A, Duruksu G, Okcu A, et al. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. Cytotherapy;12(3):288-302. 2010.

82. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, et al. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. Plastic and reconstructive surgery;121(1):59-69. 2008.

83. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. Journal of inflammation (London, England);2:8. 2005.

84. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods (San Diego, Calif);45(2):115-20. 2008.

85. Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M. Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. Minerva cardioangiologica;57(2):249-67. 2009.

86. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. Stem cells (Dayton, Ohio);23(3):355-64. 2005.

87. Graham-Rowe D. Fetal tissue graft restores lost sight. New scientist (1971);184(2471):16-7. 2004.

88. Vastag B. Stem cells step closer to the clinic: paralysis partially reversed in rats with ALS-like disease. Jama;285(13):1691-3. 2001.

89. Karaoz E, Okcu A, Saglam O, Genc ZS, Ayhan S, Kasap M. Pancreatic islet derived stem cells can express co-stimulatory molecules of antigen-presenting cells. Transplantation proceedings;42(9):3663-70. 2010.

90. Ichioka S, Kudo S, Shibata M, Ando J, Sekiya N, Nakatsuka T. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. Annals of plastic surgery;52(4):414-8. 2004.

91. 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 (New York, NY);275(5302):964-7. 1997.

92. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. Circulation;103(5):634-7. 2001.

93. Heinl-Green A, Radke PW, Munkonge FM, Frass O, Zhu J, Vincent K, et al. The efficacy of a 'master switch gene' HIF-1alpha in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. European heart journal;26(13):1327-32. 2005.

94. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. Experimental physiology;90(3):315-26. 2005.

95. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. Plastic and reconstructive surgery;124(3):804-15. 2009.

96. Souba, W. W., & Wilmore, D. W. (Eds.). (2001). Surgical research. Elsevier. **567-568**

97. Lu L, Li W, Chen L, Su Q, Wang Y, Guo Z, Lu Y, Liu B, Qin S. Radiation-induced intestinal damage: latest molecular and clinical developments. Future Oncol. 2019 Dec;15(35):4105-4118. doi: 10.2217/fon-2019-0416. Epub 2019 Nov 20. PMID: 31746639.

98. Adas G, Kemik O, Eryasar B, Okcu A, Adas M, Arikan S, Erman G, Kemik AS, Kamali G, Dogan Y, Karaoz E. Treatment of ischemic colonic anastomoses with systemic transplanted bone marrow derived mesenchymal stem cells. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Sep;17(17):2275-85.

99. Morgan A, Zheng A, Linden KM, Zhang P, Brown SA, Carpenter JP, Spitz FR, Kwiatt ME. Locally Transplanted Adipose Stem Cells Reduce Anastomotic Leaks in Ischemic Colorectal Anastomoses: A Rat Model. Dis Colon Rectum. 2020 Jul;63(7):955-964.

100. Van de Putte D, Demarquay C, Van Daele E, Moussa L, Vanhove C, Benderitter M, Ceelen W, Pattyn P, Mathieu N. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Improve the Healing of Colonic Anastomoses Following High Dose of Irradiation Through Anti-Inflammatory and Angiogenic Processes. Cell Transplant. 2017 Dec;26(12):1919-1930. doi: 10.1177/0963689717721515.

101. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE. Factor contributing to leakage of colonic anastomoses. Annals of surgery;177(5):513-8. 1973.

102. Caziuc A, Calin Dindelegan G, Pall E, Mironiuc A. Stem cells improve the quality of colonic anastomoses - A systematic review. Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology;20(6):1624-9. 2015.

103. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. Annals of plastic surgery;65(2):237-44. 2010

104. Karakaya, E. (2017). Everolimus ile immunsuprese edilen sıçanlarda yapılan kolon anastomozlarında kök hücrenin anastomoz üzerine etkileri: Deneysel çalışma.

105. OKLUND H, CHRISTENSEN H, SEYER-HANSEN M, ANDREASSEN TT. Collagen deposition and mechanical strength of colon anastomoses and skin incisional wounds of rats. J Surg Res 1996; 66: 25-30.

106. Alvarenga Jr, V., da Silva, P. T., Bonfá, N. D., Pêgo, B., Nanini, H., Bernardazzi, C., ... & Schanaider, A. (2019). Protective effect of adipose tissue–derived mesenchymal stromal cells in an experimental model of high-risk colonic anastomosis. Surgery, 166(5), 914-925.

107. Komiyama, S., Sakakura, C., Murayama, Y., Komatsu, S., Shiozaki, A., Kuriu, Y., ... & Okamoto, K. (2013). Adipose-derived stem cells enhance tissue regeneration of gastrotomy closure. journal of surgical research, 185(2), 945-952.

108. Yoo JH, Shin JH, An MS, Ha TK, Kim KH, Bae KB, Kim TH, Choi CS, Hong KH, Kim J, Jung SJ, Kim SH, Rho KH, Kim JT, Yang YI. Adipose-tissue-derived Stem Cells Enhance the Healing of Ischemic Colonic Anastomoses: An Experimental Study in Rats. J Korean Soc Coloproctol. 2012 Jun;28(3):132-9.

109. Adas, G., Arikan, S., Karatepe, O., Kemik, O., Ayhan, S., Karaoz, E., ... & Ustek, D. (2011). Mesenchymal stem cells improve the healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). Langenbeck's archives of surgery, 396(1), 115-126.

110. Tadauchi, A., Narita, Y., Kagami, H., Niwa, Y., Ueda, M., & Goto, H. (2009). Novel Cell-Based Therapeutic Strategy for Ischemic Colitis with Use of Bone Marrow–Derived Mononuclear Cells in Rats. Diseases of the colon & rectum, 52(8), 1443-1451.

111. Sukho, P., Boersema, G. S., Cohen, A., Kops, N., Lange, J. F., Kirpensteijn, J., ... & Verseijden, F. (2017). Effects of adipose stem cell sheets on colon anastomotic leakage in an experimental model: Proof of principle. Biomaterials, 140, 69-78.

112. Sémont, A., Demarquay, C., Bessout, R., Durand, C., Benderitter, M., & Mathieu, N. (2013). Mesenchymal stem cell therapy stimulates endogenous host progenitor cells to improve colonic epithelial regeneration. PloS one, 8(7), e70170.