

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL İKİNCİ DERECE DERİN YANIK MODELİNDE KÜLTÜRE
EDİLMEMİŞ HÜCRE SPREYİ KULLANIMI

Dr. Safa Kürşat NURAL

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2019

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL İKİNCİ DERECE DERİN YANIK MODELİNDE KÜLTÜRE
EDİLMEYİŞ HÜCRE SPREYİ KULLANIMI

Dr. Safa Kürşat NURAL

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ali KONAN

ANKARA

2019

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini özveriyle aktaran başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ali KONAN'a ve Sayın Hocalarım; Prof. Dr. Volkan KAYNAROĞLU, Prof. Dr. Erhan HAMALOĞLU, Prof. Dr. Osman ABBASOĞLU, Prof. Dr. Ataç BAYKAL, Prof. Dr. Kaya YORGANCI, Prof. Dr. M. Bülent TIRNAKSIZ, Prof. Dr. Yusuf Alper KILIÇ, Prof. Dr. Derya KARAKOÇ, Doç. Dr. Ahmet Bülent DOĞRUL, Öğr. Gör. Dr. Timuçin EROL ve Öğr. Gör. Dr. Nezih AKKAPULU'ya, her daim beraber olduğum asistan arkadaşlarıma, tüm hemşire ve personelimize saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mutlu HAYRAN'a, histopatolojik incelemeleri yapan Doç. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU'na, uzun eğitimim boyunca destek ve sevgilerini benden esirgemeyen sevgili ailem, arkadaşlarım, Osman BOSTANCI, Uzm. Dr. Arman ERKAN, Uzm. Dr. Merve MELİKOĞLU ve tıbbiyeye başladığım günden beri her zaman yanımda olan dostum Uzm. Dr. Kaan ALIŞAR'a sonsuz teşekkürler...

Dr. Safa Kürşat NURAL

ÖZET

NURAL SK. Deneysel İkinci Derece Derin Yanık Modelinde Kültüre Edilmemiş Hücre Spreyi Kullanımı. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi olarak hazırlanmıştır. Ankara, 2019.

Yanık yaralanmalarının çoğu ayaktan tedavi edilebilirken %10'luk bir hasta grubunda yanık ünite veya merkezinde izlem ve tedavi gerekir. Bu tedavi süreci bazen komplike olabilir ve sekel/fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir.

Birinci ve yüzeysel ikinci derece yanık yaraları sadece yara bakımı ile iyileşebilirken; derin ikinci ve üçüncü derece yanıklar cerrahi tedavi gerektirir. Bu hastalarda otogreft kullanımı ile yanık yaralarının kapatılması standart tedavi yöntemidir. Ancak uzun süreli yara bakımı gerektirmesi, enfeksiyon, donör saha bakımı ve komplikasyonları gibi sorunlar nedeniyle ideal cerrahi tedavi arayışı sürmektedir.

Kültüre edilmiş epidermal otogreftler bir süredir kullanılmasına rağmen; ideal bir yara tedavi yöntemi olamamıştır. Öte yandan erken dönem otolog hücre spreynin mesh grefte göre re-epitelizasyonu hızlandırdığı düşünülmektedir. Bunun üzerine iki aşamalı enzim etkisiyle keratinosit izolasyonuna dayanan, daha hızlı uygulanılabilen kültüre edilmemiş hücre spreyi kullanımı gündeme gelmiştir.

Bu araştırmanın amacı, sıçanlarda oluşturulan derin ikinci derece yanıklarda kültüre edilmemiş hücre spreyi kullanımının deneysel modelini oluşturmak ve bu yöntemin etkinliğini klasik kısmi kalınlıkta deri grefti ile karşılaştırmaktır.

Deney için 24 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan 4 gruba ayrıldı. İlk grup işlem sonrası 3., ikinci grup işlem sonrası 7., üçüncü grup işlem sonrası 14. ve dördüncü grup işlem sonrası 21. gün makroskopik ve histolojik olarak değerlendirilecek deneklerden oluşuyordu. Hepsinin dorsal derisine farklı lokalizasyonda iki adet derin ikinci derece yanık oluşturuldu. Yanık yarasının 5.gününde işleme alındı. Tanjansiyel eksizyon sonrası yanık yarasının birine kısmi kalınlıkta deri grefti uygulandı. Alınan donör greftinin diğer yarısına iki aşamalı enzim uygulaması yapıldı ve keratinositler açığa çıkarıldı. Bu hücreler diğer tanjansiyel eksizyon yapılan yanık yarasına sprej olarak uygulandı.

İşlem sonrası 3., 7., 14. ve 21.gün denekler sakrifiye edildi ve fotoğrafları çekilerek doğrudan gözlemle makroskopik olarak incelendi, biyopsiler alındı. Spesimenlerde epitelize olmayan alan, inflamatuvar yanıt ve neovaskülarizasyon incelendi.

Doğrudan gözlem yöntemi ile yapılan makroskopik incelemede deri grefti grubu ile sprej grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Ancak histopatolojik incelemede, inflamatuvar yanıt ve neovaskülarizasyon açısından deri grefti ve sprej grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Ayrıca bakılan korelasyon testlerinde makroskopik inceleme yüzdesi ile epitelize olmayan alan, inflamatuvar yanıt ve neovaskülarizasyon arasında istatistiksel olarak ters yönde orta kuvvette anlamlı bir ilişki saptandı.

Bu çalışmanın sonucunda klasik otolog deri grefti ile kültüre edilmemiş hücre sprejinin yara iyileşmesi üzerine etkilerinin benzer olduğu saptandı. Elde edilen sonuçlar kültüre edilmemiş hücre spreji yönteminin yanık tedavisinde kullanılabilecek etkili bir greft yöntemi olabileceğini göstermektedir. Ancak bu yöntemin insanlarda kullanımı ve daha net sonuçlar elde etmek için ileri çalışmalara gereksinim vardır. Tanımladığımız bu hayvan modeli gelecekteki çalışmalarda kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Derin ikinci derece yanık, cerrahi tedavi, otolog hücre, kültüre edilmemiş hücre spreji

ABSTRACT

NURAL SK. The Use of Non-Cultured Cell Spray in Experimental Deep Second Degree Burn Model. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in General Surgery, Ankara 2019.

Most of the burn injuries can be treated in outpatient clinics. Ten per cent of the burn patients need follow-up and treatment in a burn unit or center. The treatment process can sometimes be complicated and may result in sequelae / function loss.

First and superficial second-degree burn wounds heal by wound care; Deep second and third degree burns require surgical treatment. In these patients, the closure of burn wounds with autograft use is the standard treatment method. However, due to problems such as long-term wound care, infection, donor site maintenance and complications, the search for ideal surgical treatment is in progress.

Cultured epidermal autografts, although used for a while; failed to become an ideal wound treatment method. On the other hand, early autologous cell spray is thought to accelerate re-epithelization according to mesh graft. Thereafter, the use of non-cultured cell spray, which is based on keratinocyte isolation with the action of two-stage enzyme, can be applied more rapidly.

The aim of this study was to establish the experimental model of the use of non-cultured cell spray in deep second-degree burns in rats and to compare the effectiveness of this method with the conventional partial-thickness skin graft.

Twenty-four Wistar Albino rats were divided into 4 groups which were evaluated macroscopically and histologically on day 3,7,14 and 21 consecutively. Two deep second degree burns were created on the dorsal skin of the rats. On the 5 day a partial thickness skin graft was applied to one of the burn wounds after tangential excision. Two-stage enzyme was applied to the other half of the donor graft and keratinocytes were exposed. These cells were applied as a spray to the burn wound following tangential excision.

After the procedure, the subjects were sacrificed on the 3rd, 7th, 14th and 21st days and their photographs were taken and tissue specimen were collected for histopathological examination. Non-epithelized area, inflammatory response and neovascularization were assessed histopathologically.

The macroscopic examination performed by direct observation method, the take on rates were significantly better in the spray group. However, there was no statistically significant difference between the skin graft and the spray group in terms of inflammatory response and neovascularization in histopathological examination. In addition, a significant reverse correlation of medium strength was found between the percentage of macroscopic examination and non-epithelized area, inflammatory response and neovascularization.

As a result of this study, it was found that the effect of cell autologous non-cultured cell spray on wound healing was similar the partial thickness skin grafting. The results show that the non-cultured cell spray method can be an effective graft method for the treatment of burns. However, there is a need for further studies to use this method in humans and to obtain clearer results. The animal model we described can be used for future research.

Keywords: Deep second-degree burn, surgical treatment, autologous cell, non-cultured cell spray

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER	ix
TABLolar.....	x
RESİMLER	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Deri Anatomisi.....	3
2.2. Yanığın Şiddeti	7
2.2.1. Yanığın Derinliği	8
2.3. Yanığın Lokal Doku Yanıtı	10
2.4. Yanık Yarasında İyileşmenin Fizyopatolojisi.....	12
2.5. Yanıklarda Genel Tedavi İlkeleri	13
2.6. Yanıkların Cerrahi Tedavisi.....	15
2.6.1. Eskaratomi/Fasiyotomi	15
2.6.2. Eksizyon	15
2.6.3. Tanjansiyel Eksizyon ve Deri Grefti	16
2.6.4. Amputasyon	16
2.6.5. Yanıkta Güncel Tedavi Yöntemleri.....	16
2.6.5.1. Kültüre Edilmiş Hücre Spreyleri.....	17
2.6.5.2. Kültüre Edilmemiş Hücre Spreyleri	17

2.6.5.3. Kültüre Edilmiş ve Edilmemiş Hücre Spreyi	
Yöntemindeki Enzimatik Basamaklar	18
2.7. Deneyssel Yanık Modelleri	18
3. AMAÇ	21
4. GEREÇ VE YÖNTEM	22
5. BULGULAR	29
6. TARTIşMA	40
7. SONUÇLAR	45
8. KAYNAKLAR	46

KISALTMALAR

TVYA Toplam Vücut Yüzey Alanı

TYG Toplam Yanık Genişliği

Str. Stratum



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1: Derinin katmanlarının görünümü	3
2: Epidermisin katmanlarının görünümü	5
3: Dermo-epidermal bileşkenin görünümü.....	6
4: Yanık yarasında zonların şematik görünümü	11
5: Deri grefti ve spre y grubu arasında makroskopik iyileşme yüzdesinin box plot analizi	29
6: Sakrifikasyon gününe göre deri grefti ve spre y grubunun box plot analizi.....	30
7: Deri grefti ve spre y grubunun arasındaki epitelize olmayan alan farkının box plot analizi	33
8: Sakrifikasyon gününe göre deri grefti ve spre y grubu arasındaki epitelize olmayan alan karşılaştırmasının box plot analizi.....	34
9: Deri grefti ve spre y grubunun vaskülarizasyon açısından incelenmesi	35
10: Deri grefti ve spre y grubunun inflamasyon açısından incelenmesi	36
11: Makroskopik analiz ve epitelize olmayan alan arasındaki ilişki grafiğı.....	37
12: Makroskopik analiz ve vaskülarite arasındaki ilişki	37
13: Makroskopik analiz ve inflamasyon arasındaki ilişki.....	38

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
1: Yanık şiddetinin sınıflandırılması.....	8
2: Histolojik skörlama sistemi.....	35



RESİMLER

Resim	Sayfa
1: Yanık yarasının hasara bağlı gelişen zonları. Santral nekrozun etrafında staz ve hiperemi zonu görülüyor.....	10
2: Sıçanların dorsal kısmında alüminyum plaka ile yanık oluşturulduktan sonraki görüntüsü.....	23
3: Yanık yarası oluşturulduktan 5 gün sonra kısmi kalınlıkta deri grefti ve kültüre edilmemiş hücre spreyi için işleme alınmadan önceki yanık bölgelerin görünümü.....	23
4: Kısmi kalınlıkta deri greftinin alındığı sıçanların sağ inguinal bölgesinin görünümü.....	24
5: Tanjansiyel eksizyon sonrası yanık yarasının görünümü	25
6: Küçük parçalara bölünen deri grefti 40 dk. Dispase II solüsyonunda bekletildi	25
7: Doğrudan gözlemlerle makroskopik değerlendirmenin yapıldığı deri greft grubu.....	27
8: Doğrudan gözlemlerle makroskopik değerlendirmenin yapıldığı otolog sprej grubu	27
9: İşlem sonrası 3.gün yanık yaralarında sprej ve deri greftinin görünümü.....	31
10: İşlem sonrası 7.gün yanık yaralarında sprej ve deri greftinin görünümü.....	31
11: İşlem sonrası 14.gün yanık yaralarında sprej ve deri greftinin görünümü.....	32
12: İşlem sonrası 21.gün yanık yaralarında sprej ve deri greftinin görünümü.....	32
13: İşlem sonrası 3. gün deri grefti ve sprej grubunun histolojik görüntüsü	38
14: İşlem sonrası 7. gün deri grefti ve sprej grubunun histolojik görüntüsü	39
15: İşlem sonrası 14. gün deri grefti ve sprej grubunun histolojik görüntüsü	39
16: İşlem sonrası 21. gün deri grefti ve sprej grubunun histolojik görüntüsü	39

1.GİRİŞ

Isı, elektrik, kimyasal maddeler ve radyoaktif ışınlar ile meydana gelen ve protein denatürasyonu ile seyreden doku harabiyetine yanık denir (1). Etkenine göre haşlanma, alev, elektrik, kimyasal, temas yanığı olmak üzere beş ana grupta sınıflanır.

Yanıklar çoğu zaman önlenabilir olup daha çok yaşlıları ve çocukları etkileyen bir yaralanmadır. Yanık yaralanmaları sadece deri ve deri altı dokuları değil tüm organizmayı etkileyen sistemik bir travmadır. Yanık yaralanması sonucunda oluşan doku tahribatının ölçüsü ve derinliği, yanıklı alanın büyüklüğüne, maruz kalınan ısıнын miktarına, yanığın oluşmasına neden olan etkenin temas süresine ve derinin kalınlığına bağlı olarak değişmektedir (1, 2).

Yanık yaralanmalarının tedavisi ile ilgili ilk kaynaklar Hipokrat dönemi ile başlamıştır (3). İlerleyen yıllarda yanık tedavisi ile ilgili birçok tanımlamalar getirilmiş ve tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Ancak günümüz yanık tedavisine uygun tedavi prensipleri İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra uygulanmaya başlamıştır (4).

Bazı yanıklar çok basit yaralanmalar iken, bazıları da hayatı tehdit eden yaralanmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Yanıklar oluşturdukları mortalite ve morbidite nedeni ile kişiler ve toplumlar için büyük problem teşkil etmektedirler (1).

Yanık yaralanmaları istatistiksel olarak incelendiğinde Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 2.400.000 hasta yanık yaralanması nedeniyle hastaneye başvurduğu görülmektedir. Bu hastaların % 8,8'i hastaneye yatırılarak tedavi edilmekte ve bunların da yaklaşık % 8-10'luk kısmının tedavisi mortalite ile sonuçlanmaktadır (4). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 yılı verilerine göre tüm dünyada 195.000 insan yanık ilişkili yaralanmalardan dolayı hayatını kaybetmektedir (5).

Yanık yaralanmaları ülkemiz için de önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son yıllardaki gelişmeler yanık tedavisinde ülkemizin oldukça iyi bir konuma gelmesini sağlamıştır. Hasta nakli, gelişmiş yoğun bakım üniteleri, erken müdahale gibi gelişmeler mortalite, morbidite ve iş gücü kaybını önemli oranda azaltmıştır. Buna rağmen ülkemizde halen güvenilir istatistiksel analizler bulunmamaktadır. Her sene

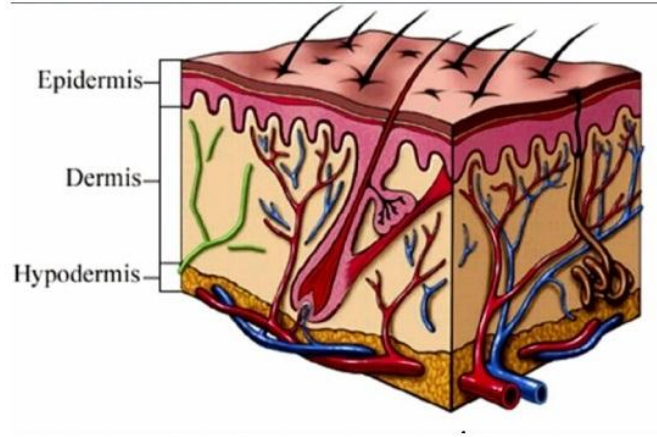
yaklaşık 1.000.000 kişinin yanık nedeniyle hastaneye başvurduğu, bunların % 14'ünün yatarak tedaviye alındığı ve yaklaşık 2000 hastanın yanık nedeniyle hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir. Anabilim dalımızda 1980 yılında mortalite oranının %20, 2012 yılında %4,77 olduğu, mortalitede yıllar içinde belirgin azalma saptandığı görülmüştür (6).

Derin yanıkların klasik tedavisi, yanık yarasının eksizyonundan sonra oluşan defektin vücudun sağlam bölgesinden alınan deri greftleri ile kapatılmasıdır. Yanık tedavisinde enfeksiyon oluşması, hastanede yatış süresinin uzaması, estetik problemlerin ortaya çıkması ve iyileşmenin gecikmesi gibi komplikasyonlar görülebilmektedir. Bunların en aza indirilebilmesi için standart tedavi yöntemlerine nasıl katkı sağlanacağı konusu gündeme gelmiştir. Bu sebeple birçok yöntem denenmiş ancak yeterli bir sonuç elde edilememiştir. Yanık tedavisindeki bu arayış hastanın otolog hücrelerinin kullanımının etkili bir yöntem olabileceğini doğurmuştur. (7). Bu sebeple kültüre edilmemiş otolog hücre kullanımı yöntemi son yıllarda bazı olgularda kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemin yara iyileşmesi sürecine iyi yönde birçok kozmetik ve fonksiyonel etkilerinin olduğu savunulmuştur. Günümüze kadar bu yöntem olgu sunumları şeklinde bildirilmiştir. Bu yöntemin etkinliğinin araştırıldığı klinik veya deneysel bir çalışma bulunmamaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Anatomisi

Deri, vücut yüzeyini kaplayan bir örtü olmasının yanı sıra yaşamsal fonksiyonları olan bir organdır. Embriyonal dönemde ektoderm ve mezodermden köken alan deri; epidermis, dermis ve subkutis tabakalarından oluşur. Derinin bu tabakalarının kalınlıkları bölgesel olarak farklılıklar gösterir (Şekil 4) (8, 9).



Şekil 1: Derinin katmanlarının görünümü

Epidermis

Skumöz hücre olarak da bilinen keratinositler epidermisin ana hücreleridir. Bazal tabakadaki hücrelerin bölünmesiyle oluşan yeni hücrelerdir.

Epidermis aşağıdan yukarıya doğru aşağıdaki tabakalara ayrılabilir:

1. Bazal tabaka (Str. Germinativum)
2. Stratum spinozum (Malpighian veya Prickle tabaka)
3. Granüler tabaka (Str. Ganülozum)
4. Stratum korneum (Keratinize tabaka, Horny tabaka)

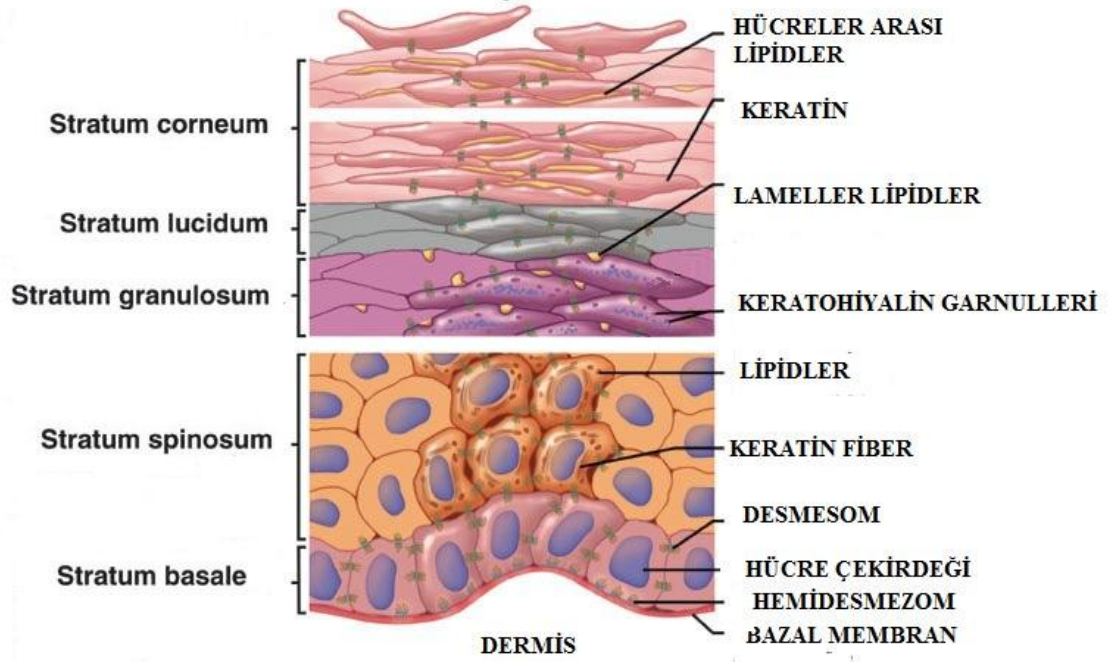
Epiderminin en alt tabakasında tek sıra silindirik hücreden oluşan bazal tabaka bulunur. Sürekli mitotik aktivite göstererek epiderminin tüm katlarını oluşturan bu tabaka aynı zamanda stratum germinativum olarak da isimlendirilir.

Bazal hücrelerin bölünmesi ile oluşan yeni keratinositler (prickle cells) spinous tabakayı meydana getirir. Epiderminin en büyük bölümünü oluşturan tabaka stratum spinosum'dur. Bu tabakanın hücreleri arasında intersellüler bağlantılar (desmosomlar) bulunmaktadır. Bu bağlantılar tahrip olduğunda keratinositler birbirlerinden ayrılır. Bu durum akantoliz olarak bilinir.

Granüller tabakadaki keratinositlerde keratohyalin granülleri vardır.

Stratum korneum çekirdeklerini tamamen kaybetmiş ve yassılaştırmış ölü keratinositlerden (korneositlerden) oluşur.

Keratinositler derinin immün fonksiyonunda önemli rol oynarlar. Alerjik kontakt dermatit gibi durumlarda immün yanıtı indüklerler. Başta TNF- α olmak üzere çeşitli sitokinleri ve inflamatuvar mediyatörleri salgırlar. Epidermiste melanin sentezleyen melanositler, immünolojik görevleri olan Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri de bulunur (Şekil 5) (8, 9) .



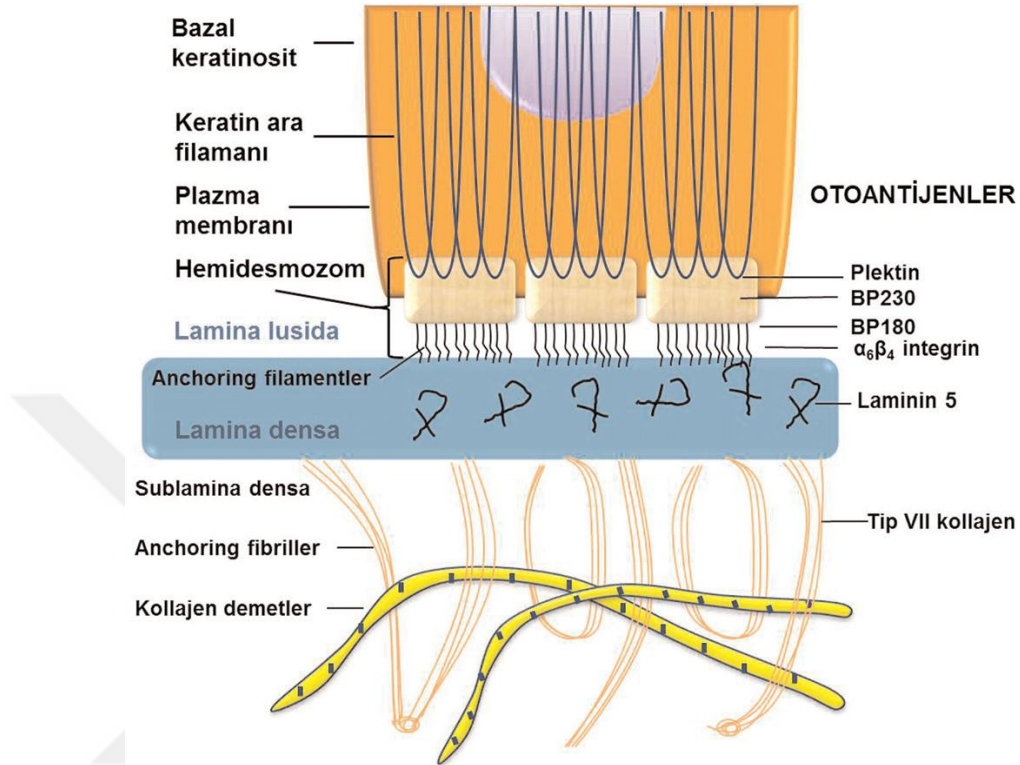
Şekil 2: Epiderminin katmanlarının görünümü

Derma-Epidermal Bileşke

Epidermis ve dermis sınırında bazal membran bulunur. Glikojenden zengin PAS pozitif ve elektron mikroskopik olarak karmaşık bir yapı gösteren bazal membran, epidermis ile dermis arasındaki bağlantıyı sağlar. Dermis ile epidermis arasında bağlantı bazal membran zonu tarafından oluşturulur. Bu bölge elektron mikroskobu ile incelendiğinde dört komponentten oluştuğu görülür:

1. Bazal hücrelerin hemidesmozomları
2. Lamina lucida
3. Lamina densa (bazal lamina)
4. Anchoring fibriller, dermal mikrofibriller ve kollajen fibrillerden oluşan fibröz komponent

Bazal membran zonu (BMZ) yarı geçirgendir. Epidermis ile dermis arasında hücre ve sıvı geçişine izin verir. Epidermise yapısal destek olur ve epidermisle dermisi bir arada tutar. Mukozal yüzeyler epitelden oluşur, keratinize değildir (Şekil 6) (8, 9).



Şekil 3: Dermo-epidermal bileşkenin görünümü

Dermis

Dermis; kollajen, elastik ve retiküler fibriller olmak üzere başlıca bağ dokusundan meydana gelir. Epidermin dermise olan uzantıları rete ridge olarak adlandırılır. Dermisin papillaları eldiven parmağı şeklinde epidermise doğru uzanır.

Temel yapısını fibröz bir protein olan kollajen oluşturur. Fibroblastlar elastik fibrilleri ve asit mukopolisakkaridlerden oluşan dermisen ektrafibriller matriksini de sentezlerler. Kollajen deri direncini sağlayan major proteindir. Elastik fibriller ise derinin elastikiyetini sağlar (8, 9).

Subkutis

Subkutanöz yağ dokusundan oluşan bu kısım dermisin altında uzanır. Fibröz septalarla ayrılmış yağ hücrelerinin oluşturduğu lobüllerden oluşur. Subkutis dış travmalara karşı iç organları adeta bir hava yastığı gibi korur. Koruma görevi dışında enerji ve bazı hormonlar için depo görevi görür (8, 9).

Yanık yaralanmalarında özellikle birinci ve yüzeysel ikinci derece yanıklarda epidermisin tamamının kaybı olmadığı için re-epitelizasyon hızlı olmaktadır. Ancak yanık alanı büyüdüğünde, dermise doğru yayıldığında re-epitelizasyon süreci güçleşmektedir. İyileşmeyi sağlayabilmek için farklı uyaranlar ve yapılar devreye girer. Eitelizasyon deri eklerindeki epitelyum tabakadan ve yara kenarından olur. Eitelizasyonun önemli uyaranlarının kaybı da yanık derinliği ile ilişkilidir. Bu sebeple yanık yarasının iyileşme sürecinin hızı ve niteliği epidermis katındaki kayıplar ve yanık derinliği ile önemli bir ilişki içerisinde.

2.2.Yanığın Şiddeti

Yanık yaralanmalarında tedavi etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerden biri yanık yaralanmasının şiddetidir. Yanığın şiddetinin belirlenmesi için hastanın yaşı, hastanın genel durumu, yanığın yeri, inhalasyon hasarının varlığı, yanık yüzeyinin genişliği ve derinliği gibi faktörler değerlendirilmektedir (2). Amerikan Yanık Derneği, yanıkları genişlik ve derinliklerine göre küçük, orta ve büyük yanıklar olarak sınıflamıştır (Tablo 1) (10).

Tablo 1: Yanık şiddetinin sınıflandırılması (10)

Küçük Yanıklar	- Erişkinlerde %10 veya daha az 2. derece yanıklar - Çocukta %5 veya daha az 2. derece yanıklar - Erişkin veya çocukta %2 veya daha az 3. derece yanıklar
Orta Yanıklar	- Erişkinlerde %10–20 arası 2. derece yanıklar - Çocukta %5–10 arası 2. derece yanıklar - Erişkin veya çocukta %2–5 arası 3. derece yanıklar - Düşük voltajlı elektrik yanıkları - Şüpheli inhalasyon hasarı - Çevresel yanık - Enfeksiyona yatkınlığı artıran yandaş hastalıklar (DM, Orak hücre hastalığı)
Büyük Yanıklar	- Erişkinlerde %20’den fazla 2. derece yanıklar - Çocukta %10’dan fazla 2. derece yanıklar - Erişkinde veya çocukta %5’ten fazla 3. derece yanıklar - Inhalasyon yanıkları - Yüksek voltajlı elektrik yanıkları - Başka bir travmanın eşlik ettiği yanıklar (kafa travması, karın içi yaralanma, kırıklar, vs.) - Kimystandart yanıklar - Göz, kulak, yüz, el, ayak, büyük eklem ve genital bölge yanıkları

2.2.1. Yanığın derinliği

Yanık yaralanmasında yanığın derinliği uzun dönemde tedavi yönetiminin belirlenmesinde önemli bir belirteçdir. Yüzeyel yanıklar kendiliğinden iyileşebilirken, derin yanıklara cerrahi müdahale gerekebilmektedir (11). Yanık derinliğini saptamak

için kullanılan en önemli ve standart yöntem klinik gözlemdir (12). Yanık yarası oldukça dinamik bir süreç içerisindeydir. Özellikle ilk günlerde yüzeysel görünen yanık yarası ilerleyen günlerde derin yanıklara dönüşebilir (11).

Yanıklar derinliğine göre dört dereceye ayrılarak incelenebilir (2):

- **Birinci derece yanıklar:**

En sık güneş etkisiyle veya ani gaz alevlenmesi sonucu oluşur ve epidermis seviyesinde yüzeyledir. Kırmızı renkli, basmakla solan, dokunmakla ağrılı olan bu yanıklar tipik olarak 3-4 günde skarsız şekilde iyileşir (13).

- **İkinci derece yanıklar:**

Çok sıcak sıvılar ile temas veya yüksek ısılı metallere veya aleve kısa süreli temas sonucu ortaya çıkar. Epidermin tamamı ve dermin bazı katları yanıktan hasar görmüştür. En karakteristik görüntüsü içi A vitamininden zengin sıvı dolu büllerdir. İkiye ayrılır; yüzeysel (superfisyel ve orta dermis) ve derin (dermin daha derin kısmı) kısmi kalınlıkta yanıklardır.

İkinci derece yüzeysel yanık yaraları; pembe veya kırmızı, ıslak, ağrılıdır. Künt dokunma hissi ve kapiller dolum mevcuttur. Fonksiyonel kayıp söz konusu olmamaktadır. Pigmentasyon değışikliğı sıktır ama hipertrofik skar gelişimi olmamaktadır. 10-14 günde iyileşmesi beklenir.

İkinci derece derin yanık yaraları; dermin retiküler tabakasına kadar ilerleyen yanıklardır. Kiraz kırmızısı renkte, yüzeyi kurudur, künt duyu hissi, kapiller dolum yoktur. İyileşme süresinde uzun inflamatuvar sürecinden dolayı bu yanıklarda kötü skar (soluk renkli hipertrofik) oluşumuna eğilim vardır. Tedavisinde cerrahi gerektirir (13).

- **Üçüncü derece yanıklar**

Bu tam kalınlıkta yanıklar derinin tüm katlarını içerir, kuru görünümü, kayışimsı eskar vardır ve duyusuzdur ve bu yanıklarda cerrahi tedavi olmaksızın skar gelişimi, sepsis, mortalite riski artar. Hem dermal hemde epidermal yapılar canlılığını yitirmiştir, ancak yara kenarından tekrar epitelize olurlar (13).

- **Dördüncü derece yanıklar**

Yanığın kas, tendon ve kemikleri de etkilediği oldukça derin bir grubudur. Genellikle temas yanıkları, elektrik yanıkları ve yanık sırasında bilinç kaybı olan hastalarda gelişmektedir (13).

2.3. Yanığın Lokal Doku Yanıtı

Yanık yaralanmasında termal hasar sonucu bir lokal yanıt oluşur. Bu hasara bağlı vazodilatasyon ve geçirgenlik artar (Resim 5) (14).



Resim 1: Yanık yarasının hasara bağlı gelişen zonları. Santral nekrozun etrafında staz ve hiperemi zonu görülüyor.

Yanık yaralanmasında lokal cevap temelde iskemik bir yaradır. Yaranın değişik alanlarında, farklı derinlikte üç zonu vardır:

- **Nekroz (Koagülasyon) Zonu**

Yanık yarasında hasarın en fazla olduğu bölgedir. Yapısal proteinlerin koagülasyonu sonucu irreversibl doku kaybı vardır (15).

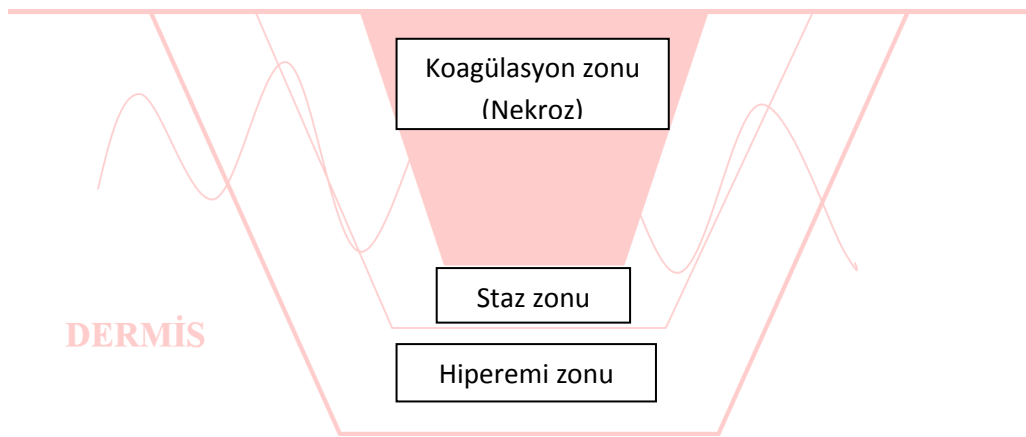
- **İskemi (Staz) Zonu**

Yaranın hasarlı ancak canlı doku içeren zonudur. Bu bölgede belirgin bir inflamatuvar reaksiyon vardır. Ayrıca doku perfüzyonu bozulmuştur. Yanık tedavisindeki amaç bu kısmın perfüzyonunu arttırmaktır. Enfeksiyon, hipotansiyon vs. ile bu bölgenin kanlanması tamamen bozulur, dokular nekroza girer ve dokular koagülasyon zonuna döner (15).

- **İnflamasyon (Hiperemi) Zonu:**

Bu bölge en dıştaki kısımdır. Burada doku perfüzyonu artmıştır. Ciddi sepsis veya uzamış hipoperfüzyon gelişmezse bu zondaki dokular genellikle iyileşir (15).

Yanık yarasındaki bu üç zon üç boyutludur. Enfeksiyon varlığında ve yaranın kuruması durumunda hücre kaybı yaşanır. Var olan hasar hem periferiye hem de dokuların derinlerine doğru hızlıca ilerleyebilir (14, 15).



Şekil 4: Yanık yarasında zonların şematik görünümü

2.4. Yanık Yarasında İyileşmenin Fizyopatolojisi

Yanık yarasında iyileşme yanık yarasının derinliğine, genişliğine, etyolojisine, yaşa ve yapılan tedaviye göre değişmektedir (16).

Yanık hasarı, hasarın olduğu bölgedeki kan damarlarına zarar vererek hasar bölgesine olan kan akımını azaltır veya durdurur ve bu bölgeyi çevreleyen bölgedeki kan akımını da değiştirir. Yanık yarasında arteriyol ve kapillerlerde trombozis ve tıkanıklık oluşmaktadır. Bu nedenle vasküler trombozun neden olduğu avasküler durum doku perfüzyonunu bozar. Trombozlar ve perfüzyonun bozulma derecesi, yanığın ağırlık ve derinliği ile paraleldir. İkinci derece yanıklarda reperfüzyon bir hafta sonra, üçüncü derece yanıklarda ise üç haftadan sonra başlamakta ve sonrasında granülasyon dokusu gelişmektedir (16).

Granülasyon dokusu, eskar dokusunun spontan ya da cerrahi yolla ayrılmasından sonra gözlenir. Makrofaj, fibroblast ve kollajenden oluşup kırmızı ve vasküler bir yapıdır. Granülasyon dokusu çoğalarak kısa sürede yanık yarısındaki defekti doldurur. Yara kenarından gelişen epitelizasyonla da granülasyon dokusunun üzeri kenarlardan kapatılmaya çalışılır (16).

Doku onarım tipleri re-epitelizasyon. Skar formasyonu ve kontraksiyon olarak üçe ayrılır (17):

Re-epitelizasyon: Birinci ve ikinci derece yanıklarda epidermisin kalıntılarının bulunması nedeniyle bu yanıklar genelde re-epitelizasyonla iyileşirler. Bazal hücre katmanı farklılaşır ve epitelizasyon 3-4 gün içinde tamamlanır. Yanık dermise doğru yayıldığında ise epitelizasyon yara kenarındaki bazal keratinositlerin ve cilt adeneksindeki (kıl folikülü, ter ve yağ bezleri vs.) epitelyum hücrelerinin göçü ile re-epitelizasyon sağlanır. Bu göç için bazı uyarıcı faktörler vardır. Bunlar EGF, TGF- α , TGF- β , IL-1'dir. Bu uyarıların doğrudan veya dolaylı olarak etkisiyle keratinosit göçü olur. Ayrıca keratinositlerin laminin, kollajen tip IV, fibronektin gibi proteinlerle teması da göçü başlatır. Nemli bir yüzey bu göçü hızlandırır. Göç eden keratinositler bütün yarayı kapladığında yaradaki hücrelerle temas edince epidermisin bütün katları oluşturulmaya başlanır (17).

Skar Formasyonu: İkinci bir iyileşme çeşidi de dokunun sert bileşeninin oluşmasını içerir. Cilt kendine dermis tabakası oluşturmaya çalışır. Bu süreçte dokuya gücünü veren ekstraselüler matriks oluşur. Skar dokusu ayrışmayı önlemek için esastır. Skar oluşumu 3 faza ayrılır. Yara kapatıldıktan sonraki ilk 4-5 gün geriminde büyük bir değişiklik olmaz. Bu dönemde inflamatuvar hücreler oldukça fazladır. Bu yüzden bu evreye inflamatuvar evre denir. Bu süreden sonra yaradaki gerim kuvvetinin arttığı yoğun kollajen birikimi olan evre başlar. Bu dönemde ekstraselüler matriks yapımı ve neovaskülarizasyon vardır. Son evre ise insizyonun güçlendiği evredir. Bu evre daha sakin geçer. Hücre sayısında ve vaskülarizasyondaki artış bu evrede daha azdır (17).

Kontraksiyon: Son iyileşme tipi de kontraksiyondur. Bu sürecin patolojik kontraktürden ayrı tutulması gerekir. Kontraksiyon, yaranın boyutunda nispeten hızlı, mekanik bir azalmadır. Özellikle kemirgenlerde belirgindir. Açık bir yara orijinal halinin %80-90'ı kadar daralır. Kalan kısmı epitelizasyon ve skar oluşumu ile kapanır (17).

2.5. Yanıklarda Genel Tedavi İlkeleri

Yanık hastalarının yanık ünitesine kabulü yapıldıktan sonra yapılması gereken ilk ve en önemli adım hava yolu açıklığı ve sıvı resüsitasyonudur. Sonrasında tetanoz profilaksisi yapılmalı, analjezi sağlanmalı ve yara bakımına başlanmalıdır (2, 18, 19). Öncelikle tam kan sayımı, elektrolit ölçümü, kan üre azotu, kreatinin, kan şekeri değerlerini kapsayan rutin laboratuvar testleri yapılmalıdır. Elektrik yaralanması olan hastalarda kas veya miyokard hasarını belirlemek amacıyla elektrokardiyografi ile birlikte, miyogloblin ve kreatinin kinaz düzeyleri bakılmalı ve idrar tahlilleri yapılmalıdır (20).

İnhalasyon yaralanmasından şüphelenilen hastalarda akciğer grafisi, arteriyel kan gazı ölçümü, karboksihemoglobin düzeyi ve elektrokardiyografi tetkikleri yapılmalıdır. İnhalasyon yaralanması şüphesi bulunan ve entübe hastalarda tanı ve tedavi amaçlı fiberoptik bronkoskopi önerilmektedir (18, 20).

Sıvı tedavisindeki en önemli amaç hemodinamik stabiliteyi, doku ve organ perfüzyonunu sağlamaktır. Verilecek sıvı miktarı hastanın vücut ağırlığına ve yanık

yüzeyinin genişliğine göre hesaplanabilir. Ancak sıvı tedavisinin yeterli olup olmadığı kan basıncı, nabız, saatlik idrar miktarı ve dansitesi, santral venöz basınç gibi parametrelerle belirlenmelidir (19).

Beslenme desteği toplumdaki hiçbir hasta grubunda geniş yanıklı hastalarda olduğu kadar önemli değildir. Yanık yaralanmasında hipermetabolik cevap bazal metabolizma hızını %200'e kadar artırır (21). Erken dönemde enteral yolla parenteral beslenmeye göre daha iyi destek sağlandığı, gastrointestinal sistemde mukozal bütünlüğünün korunduğu ve katabolik hormon salınımının önlendiği bilinmektedir (22). Yanık sonrası erken enteral beslenme ile immünglobulinlerde ve hücresel immünütede artış gösterilmiştir. Ayrıca kritik hastalardaki beslenme desteğinin bağırsak bariyer fonksiyonunu sürdürmeye, bakteriyel translokasyonu engellemeye ve bağırsak mukozal bütünlüğünü korumaya yardımcı olduğu gösterilmiştir (21).

Yanık yaralarında yara bakımı oldukça önemlidir. Yanık yarası enfeksiyonu mortalitenin en önemli nedenlerindendir. Son 50 yılda yara bakımı konusunda büyük gelişmeler olmuştur. Tüm bu gelişmeler ışığında yanık tedavisinde bazı konularda net bir fikir birliği sağlanamasa da yanık yarası bakımı güncel bir biçimde şekillenmiştir. Bu konulardan birisi bülberdir. Bazı araştırmacılar bülberin patlatılmasını savunurken bazıları ise olduğu gibi bırakılmasını söylemektedir. Büyük olan bülber patlatılabileceği veya içinin aspire edilebileceğini belirtenler de vardır (23).

Yanığın temizlenmesi enfeksiyonlardan korunmada en etkili yöntemlerden biridir. Yanık yarası oda sıcaklığında su ile yıkanmalı, ölü dokular uzaklaştırılmalıdır. Chlorhexidine glukonate sabunu deri florasındaki mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi olduğu için tercih edilmektedir. Derin ve nekrotik yaralarda topikal antimikrobiyaller kullanılabilir. Ancak yüzeysel ve küçük yaralarda kullanmaya gerek yoktur. Eğer kullanılacaksa %1'lik gümüş sülfadiazin tercih edilmelidir. En az yan etkiye sahip ilaç budur. Epitelizasyonu bozması nedeniyle nekrotik dokular uzaklaştırılıp re-epitelizasyon başladığında kullanımına son verilmelidir (1, 23).

Yanık pansumanının üç amacı vardır: Drenajın absorpsiyonu, ağrının azaltılması, yaranın çevreden izolasyonu ve korunması. Yanığın derinliği birinci ve yüzeysel ikinci derece yanık ise uygun pansumanla bu yaralar iyileşebilmektedir. Küçük boyutlu ve uygun lokalizasyonlu yüzeysel yanıklarda açık pansuman tercih

edilebilmektedir (24). Örneğin yüz yanıklarında yanık derinliği yüzeysel ise açık pansuman tercih edilebilir. Önemli olan yarayı temiz ve nemli tutmaktır.

Yara pansumanının en önemli basamaklarından birisi de drenajın absorpsiyonudur. Pansumanın kalınlığını belirleyen de bu drenaj miktarıdır. Yüzeysel yanıkların ilk günleri drenajın çok olduğu zamanlardır. Yanık pansumanında drenajın yoğun olduğu dönemde önce nonadheziv tabak üstüne adheziv tabaka konularak tespit yapılmalıdır. Nonadheziv tabaka için vazelin-petrolatum emdirilmiş gazlı bez, adheziv tabaka için ped kullanılabilir. Tespit için flaster veya sargı bezi tercih edilebilir. Pansuman sıklığı kişiden kişiye değişmektedir. Bu konudaki öneriler iki günde birden haftada bire kadar değişmektedir (1, 23).

2.6. Yanıkların Cerrahi Tedavisi

Birinci ve yüzeysel ikinci derece yanık yaraları pansumanla iyileşebilmektedir. Ancak derin ikinci ve üçüncü derece yanıklar cerrahi tedavi gerektirir.

2.6.1. Eskaratomi/Fasiyotomi

İkinci derece derin ve üçüncü derece yanıklar ekstremitelerde oluştuysa ve çepeçevre sardıysa periferik dolaşımı bozabilir, ödemden dolayı venöz akımı takiben arteriyel akım bozulabilir. Bu durum saptandığında yanık skarının yatağından serbestleşmesini sağlayan medial ya da lateralinden insizyonlar yapılarak eskaratomi uygulanır. Eskaratomiler kan akımını rahatlatması için uzunlamasına yapılmalıdır. Bazen eskaratomi doku dolaşımını sağlamada yeterli olmaz. Böyle durumlarda fasiyotomi gerekli olur. Eskaratomi altındaki kas kompartmanlarına uygulanan fasiyotomi yanık derinliğinin veya doku harabiyetinin ileri dönemde olduğunun önemli bir göstergesidir (1, 25).

2.6.2. Eksizyon

Yanıklı deri iki hafta içinde iyileşmezse ikinci dereceden daha derin bir yanıktır ve eksize edilmelidir. Yanık yarası eksizyonu ile yanıklı dokunun kendiliğinden ayrılması beklenmez ve cerrahi olarak vücuttan uzaklaştırılır. Bu yöntem ile hastanede yatış süresi önemli ölçüde azaltılmıştır. Ayrıca yanık yarası enfeksiyonunda da belirgin bir azalma söz konusudur. Sağ kalımda belirgin bir

iyileşme söz konusudur. Yanık yarası eksizyonunun eksizyonu dermatomlarla yapılır. Yanıklı doku altından canlı, kanayan bir doku çıkana dek eksize edilmelidir. Ameliyatta %20'den fazla eksizyon yapılmamalı ve ameliyat süresi 2 saati geçmemelidir (1).

2.6.3. Tanjansiyel Eksizyon ve Deri Grefti

Bu hastalarda otogreft kullanımı ile yanık yaralarının kapatılması standart tedavi yöntemidir. Eskar dokusu dermatom veya bistüri ile tanjansiyel eksizyon şeklinde veya hidrocerrahi debridmanla temizlendikten veya spontan ayrıştıktan sonra defektin kapatılması için otolog deri grefti kullanılmaktadır. Otolog greft yanık dokusuna uzak ve sağlam bir deri tabakasından kısmi kalınlıkta alınır. Tanjansiyel eksizyon yapılan yanık bölgesine tespit edilir. Majör yanıklarda, yanık dokusunun eksizyonunun beşinci günde tamamlanması önerilmektedir. Yanık yarasının eksizyonu için tanjansiyel eksizyon kullanılır. Eksizyon canlı görünen dokuya kadar yapılır. Yeterince parlamayan, tromboze damarlar içeren doku varlığında eksizyonun yetersiz olduğu anlaşılır. Tanjansiyel eksizyon daha önceden kullanılan tam kat eksizyon yöntemlerine göre daha avantajlıdır. Ağrıyı, rekonstrüksiyon problemlerini ve hastane yatış süresini en aza indirir (26). Eksizyon sonrası yaralar dermis eşdeğerleri ile kapatılsa da daha sonra greftleme gerekmektedir. Çok geniş yanıklarda donör sahanın kısıtlı olması aynı bölgeden birden çok seansta greft alınmasını gerektirmekte ancak tekrarlanan her greft alma işlemiyle birlikte alınan greftin kalitesi düşmektedir (25). Ayrıca donör sahanın uzun süreli yara bakımı gerektirmesi, enfeksiyon komplikasyonları gibi sorunlar nedeniyle donör saha ihtiyacını azaltacak ideal cerrahi tedavi arayışı sürmektedir.

2.6.4. Amputasyon

Ekstremitenin, parmakların önemli bir kısmının yandığı ve iyileşmenin mümkün olmadığı durumlarda ilgili bölge ampute edilerek yanık yarası ortadan kaldırılmış olur (1).

2.6.5. Yanıklarda Güncel Tedavi Yöntemleri

Yanık hastalarında otogreft kullanımı ile yanık yaralarının kapatılması standart tedavi yöntemidir. Ancak uzun süreli yara bakımı gerektirmesi, enfeksiyon, donör saha bakımı ve komplikasyonları gibi sorunlar nedeniyle ideal cerrahi tedavi arayışı sürmektedir.

2.6.5.1. Kültüre Edilmiş Hücre Spreyleri

İdeal cerrahi arayışının bir süreci olarak kültüre edilmiş hücre spreyi kullanımı gündeme gelmiştir. Bu yöntem yaklaşık 80'li yıllardan beri kullanılmaktadır (27). Değişik kullanımlar olmakla birlikte genel uygulama basamakları açıklanmıştır. Öncelikle yanık olmayan bir bölgeden kısmi kalınlıkta deri grefti alınır. Daha sonra dispase ile muamele edilir. Bu şekilde epidermis-dermis bağlantısı ayrılır. Tripsin enzimi kullanılarak keratinositler ortaya çıkarılır (28). Bu aşamadan sonra kültür işlemi başlar. Kültür için fetal serum, hidrokortizon ve choleragen (kolera toksin) içeren Eagle çözeltilisi kullanılabilir (29). Sonrasında kültürdeki hücre kolonisi arttıkça keratinositler tekrar ayrılıp alt kültürler oluşturulur. Genellikle üç alt kültür uygun hücre sayısı ve kullanım için yeterli olmaktadır. Elde edilen bu hücreler sprej yöntemi ile tanjansiyel eksizyon yapılan yanık yarasına püskürtülmektedir. Yaklaşık olarak bu işlem iki hafta sürmektedir. Bir süredir kullanılan bu yöntem klasik greftleme yöntemine göre ağrıyı ve mortaliteyi azalttığı bildirildi (30). Ancak yapılan izlemlerde farklılaşmış keratinositlerin kullanımı kozmetik olarak yetersiz rejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca bazı cilt hücre popülasyonunun kaybı ve bül oluşumu yöntemin sınırlılıkları olarak gösterilmiştir (31).

2.6.5.2. Kültüre Edilmemiş Hücre Spreyleri

Kültüre edilmiş hücre sprej yönteminde ve klasik kısmi kalınlıkta deri grefti uygulamasındaki zorluklar ve olumsuz sonuçlar nedeniyle bu yöntem son dönemde popülerleşmiştir. Yöntem alınan kısmi kalınlıkta deri greftinin dispase II ile epidermis-dermis arası bağlantının ayrılması; ardından tripsin ile keratinositlerin açığa çıkması esasına dayanır. Yanıklı bölgenin tanjansiyel eksizyonu sonrası keratinositlerin sprej şeklinde yaraya püskürtülür. Ancak bu konudaki çalışmalar olgu sunumu şeklindedir. Esteban ve ark. altı hastalık bir olgu sunumu yayınlamışlardır. Bu hastalar haşlanma, elektrik, kimyasal ve patlama yanığı şeklinde yanık nedenleri değişmektedir. Bu yöntemin sonucunda hastalarda kozmetik ve fonksiyonel açıdan oldukça olumlu sonuçlar aldıklarını belirtmişlerdir. Gerlach ve ark. da sekiz hastalık olgu sunumunda benzer sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca özellikli bölgelerde (yüz, perine vs) etkili sonuçlar aldıklarından bahsetmişlerdir.

2.6.5.3 Kültüre Edilmiş ve Edilmemiş Hücre Spreyi Yöntemindeki Enzimatik Basamaklar

Güncel tedavi yöntemlerinde kullanılan en önemli iki enzim dispase II ve tripsindir. Dispase II epidermis-dermis bağlantısını ayırırken tripsin epidermisten keratinositlerin açığa çıkmasını sağlar.

Dispase II, nonpolar amino asitlerin N-terminal peptid bağlarını hidrolize eden nötral bir proteazdır. İn vitro yetiştirilen birçok doku ve hücreyi ayırmak için kullanılabilir. Enzim çok yumuşaktır ve hücre zarlarına zarar vermez. Bu proteaz, fibronektini ve tip IV kollajenini parçalar. Dispaz II, Lösin-Fenilalanin bağlarının bölünmesi için spesifiktir. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} ve Al^{3+} enzimi aktive eder. EDTA, EGTA, Hg^{2+} ve diğer ağır metaller enzimi inhibe eder.

Tripsin, lizin ve arginin kalıntılarının C-terminal tarafındaki peptidleri ayırır. Tripsin ayrıca, amino asitlerin sentetik türevlerinin ester ve amid bağlantılarını ayırmak için de kullanılabilir. Serin proteaz inhibitörleri tripsini inhibe eder.

2.7. DeneySEL Yanık Modelleri

Yanık travması tek bir patofizyolojisi olmayan, birçok organ sistemini etkileyen yıkıcı bir yaralanmadır. Karmaşıklığı ve birçok sistemi ilgilendirmesi nedeniyle in vitro deneyler yanık patofizyolojisini açıklamada yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden yanık yaralanmalarını daha iyi anlamak ve uygun tedavi yöntemlerini geliştirmek için hayvan deneyleri geliştirilmiştir. Oluşturulan hayvan deneyi modelleri sayesinde birçok hastalığın olduğu gibi yanığında mekanizması daha iyi anlaşılmış, tedavi yöntemlerine birçok yenilik getirilmiştir. Elbette bu çalışmaların da sınırlılıkları mevcuttur. Özellikle uygun hayvan deneyi modelini belirlemek en büyük sorunlardan biri olmuştur. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçları insanlarda doğrudan kullanmalarının önündeki engellerden birisi de etik ve finansal problemler nedeniyle uygun deney hayvanı modelini seçmemeleridir. Bunun için yanık yaralanmaları ile ilişkili birçok hayvan modeli belirlenmiştir (32).

Deneyisel yanık modellerinde birçok hayvan seçilebileceği gibi en çok tercih edilen hayvanlardan birisi sıçanlardır. Sıçanlar birçok organ sistemi açısından insanlara benzemektedir. Ayrıca derileri tıpkı insanlar gibi epidermis ve dermis içerir. Ancak yara iyileşmesi yönünden bazı farklılıklar içermektedir. Yara kontraksiyonları hızlı olduğu için iyileşme süreleri de büyük ölçüde azalmaktadır. Bu sebeple büyük hayvanlara göre sepsis ve immünsupresyon daha az görülmektedir. Buna ek olarak kemirgen yanma modellerinde daha az iyileşme süresi araştırmacıların yara iyileşme mekanizmasını hızlı bir şekilde incelemelerine olanak sağlar.

En sık görülen modellerde yanık çeşidi olarak temas ve haşlanma yanığı kullanılır. Temas yanığı belirli bir sıcaklığa kadar ısıtılmış suyun içine yanık oluşturulacak aparatın bırakılıp sonra doğrudan cilde uygulanmasıyla yapılır. Haşlanma yanığı ise belirli bir süre uygulamak kaydıyla ısıtılmış suyun uygun aparatla cilde temasını sağlamak şeklinde uygulanır. Ayrıca bazı araştırmacılar kullanılan malzemeyi direk uygun sıcaklığa getirecek araçlar geliştirmişlerdir (33).

Yanık yarası için genellikle deney hayvanlarının dorsal derisi kullanılır. Bunun sebebi olarak deney hayvanının yanık yarası oluşturulduktan sonra bu kısma ulaşamaması gösterilmiştir (32). Ayrıca bölgedeki kontraksiyonun az olduğu, modelin oluşturulma esnasında altta vertebral kemiklerin destek dokusu görevi gördüğü bildirilmiştir. Ancak bu bölgenin kanlanmasının diğer bölgelere göre farklı olduğu ve buna bağlı olarak iyileşme sürecinde değişiklikler olabileceği belirtilmiştir (34).

Deneyisel yanık modellerinde yara bakımı da özellikli olmaktadır. Yanık yarası oluşturulduktan sonra diğer hayvanların yaraya zarar vermemesi için ayrı ayrı kafeslerde tutulmalı,analjezisi yeterli sağlanmalı, beslenme ve hidrasyon miktarı iyi ayarlanmalıdır.

Bazı deneyisel yanık modellerini örnekleri ile inceleyecek olursak Venter ve ark. yaklaşık 1 kg. alüminyum plaka ile yanık modeli oluşturmuşlardır. Sıcaklık kontrol cihazı ile plakayı ısıtmışlar ve sıçanların dorsal derisini kullanmışlardır. 60, 70 ve 80 C° ile yanık uyguladıkları üç grup incelemişlerdir. Yaklaşık 10 sn. deri teması olmuş ve hayvanlar arası ısıtma süresini 3 dk. belirlemişlerdir. 3 gün sonra deneklerden biyopsi almışlardır. Makroskopik inceleme için fotoğraflar çekip bir yazılım yöntemi

ile değerlendirme yapmışlardır. Histolojik olarak ise yanık derinliğini saptamışlardır. 60 C° grubunda yüzeyel ikinci derece, 70 C° grubunda derin ikinci derece, 80 C° grubunda ise nc derece yanık olduğunu saptamışlardır. (33).

Pereira ve ark. ise derin ikinci derece yanık modelini standardize etmeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. On iki adet sıçanın anestezi sonrası dorsal derisini traş etmişlerdir. 10 mm yüzey alanına sahip yaklaşık 51 gr. alüminyum plaka kullanmışlardır. Bunu sıcaklık kontrol cihazı ile 100 C°'ye getirip 15 sn. kendi ağırlıyla uygulamışlardır. Analjezi olarak metamizol sodyum vermişlerdir. 7., 14., 21. ve 28. gün değerlendirmeye almışlardır. Yara kontraksiyonunu ve büyüklüğünü incelemişlerdir. Histopatolojik değerlendirmeler yapmışlar. Bu şekilde derin ikinci derece yanık oluşturduklarını saptamışlardır (35).

Chan ve ark. erken dönemde deri grefti kullanılmasını araştırmak amacıyla beş adet domuz kullanarak bir deney modeli oluşturmuşlardır. Farklı lokalizasyonlarda 92 C°'ye ısıtılmış su ile cildin temasını sağlayan özel bir aparatla 20 sn. yanık meydana getirilmiştir. Sonra bu yanık alanlar kontrol grubu ve 3., 14. ve 21. gün kısmi kalınlıkta deri grefti uygulanarak değerlendirilmiş. Alınan biyopsilerle mikrobiyolojik, histolojik ve makroskopik incelemeler yaparak erken dönem deri grefti uygulamasının faydalarını açıklamışlardır (36).

Singh ve ark. ise domuzlarda temas süresine göre yanık yarasının derinliğini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Sıcaklık kontrol cihazına bağlı alüminyum plakayı 100 C°'ye ısıtıp 5, 10, 15, 20 ve 30 sn. bekleterk yanık derinliğine etkilerini incelemişlerdir (37).

3.AMAÇ

Bu araştırmanın amacı, sıçanlarda oluşturulan derin ikinci derece yanıklarda kültüre edilmemiş hücre spreyi kullanımının deneysel modelini oluşturmak ve bu yöntemin etkinliğini klasik kısmi kalınlıkta deri grefti ile karşılaştırmaktır.

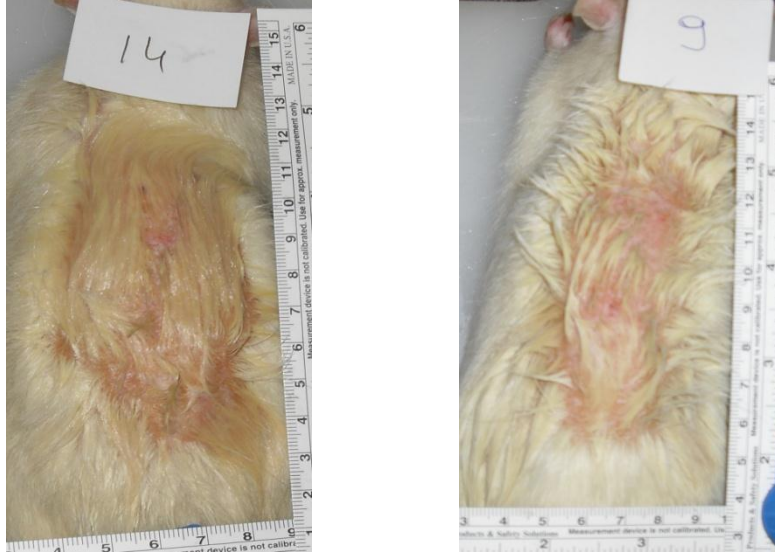


4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 23/10/2018 tarih, 2018/61 kayıt numaralı ve 52338575-120 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Çalışmanın deney aşaması Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

Çalışma için ağırlıkları 250-350 gram arasında değişen toplam 24 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her birinde 6 adet sıçan bulunan 4 gruba rastgele ayrıldı. Bu gruplar postoperatif 3,7,14 ve 21 gün yara bakımı ve izlem yapılan gruplardan oluştu. Hayvanlar deneyde kullanılmadan 10 gün önce tek tek kafeslerde su kısıtlaması olmadan, standart yem ile beslenip ortam koşullarına uyum göstermesi sağlandı. Sabit ısıda, 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda barındırıldı.

Denekler 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg Xylazine HCl (Alfazyne® %2, 20 mg/ml, 30 ml, Alfasan İnt B V. Hollanda) karışımının intraperitoneal uygulanmasıyla uyutuldu. Anestezi almış sıçanların dorsal derisi tıraş edildikten sonra termometre kontrollü 100°C'ye ısıtılmış kaynar su içerisine 2 cm² yüzey genişliğine sahip 51 gram ağırlığında alüminyum plaka bırakıldı. Sıçanların dorsal kısmında 15 saniye plakanın kendi ağırlığı ile temas sonucu iki adet yaklaşık 2 cm² büyüklüğünde derin ikinci derece yanık oluşturuldu (Resim 6). Hemen sonrasında analjezi için metamizol sodyum (Onpyron®, Onfarma, Samsun) 40 mg/kg dorsal boyun kısmına subkutan, takibinde 200 mg/kg metamizol sodyum içme suyuna karıştırılarak oral yolla verildi. Ayrıca hidrasyon için 5 ml serum fizyolojik dorsal boyun kısmına subkutan enjekte edildi.



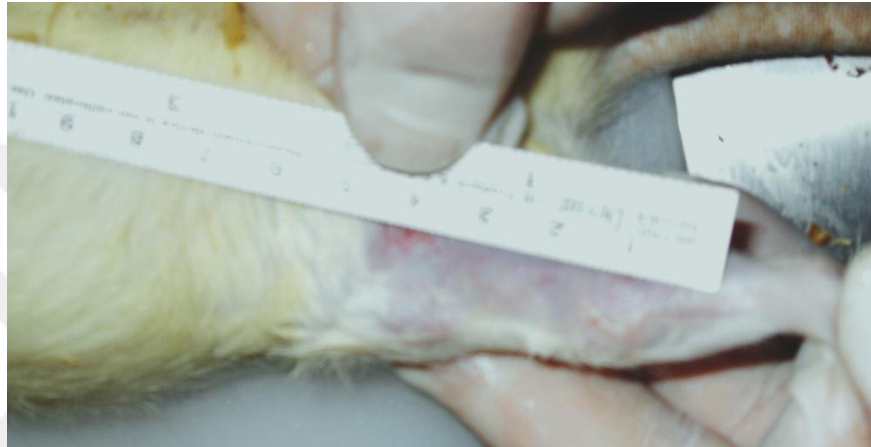
Resim 2: Sıçanların dorsal kısmında alüminyum plaka ile yanık oluşturulduktan sonraki görüntüsü

Denekler 5 gün sonra tanjansiyel eksizyon, deri ve spray grefti için tekrar işleme alındı (Resim 7).



Resim 3: Yanık yarası oluşturulduktan 5 gün sonra kısmi kalınlıkta deri grefti ve kültüre edilmemiş hücre spreyi için işleme alınmadan önceki yanık bölgelerin görünümü

Denekler 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg Xylazine HCl (Alfazyne® %2, 20 mg/ml, 30 ml, Alfasan İnt B V. Hollanda) karışımının intraperitoneal uygulanmasıyla uyutuldu. Zhai Q ve ark. kısmi kalınlıkta deri grefti için sıçan modellerinde inguinal bölgenin kullanılmasını önermektedir (38). Buna uygun olarak tarafımızca kısmi kalınlıkta donör deri grefti için deneklerin sağ inguinal bölgesi kullanıldı (Resim 8).



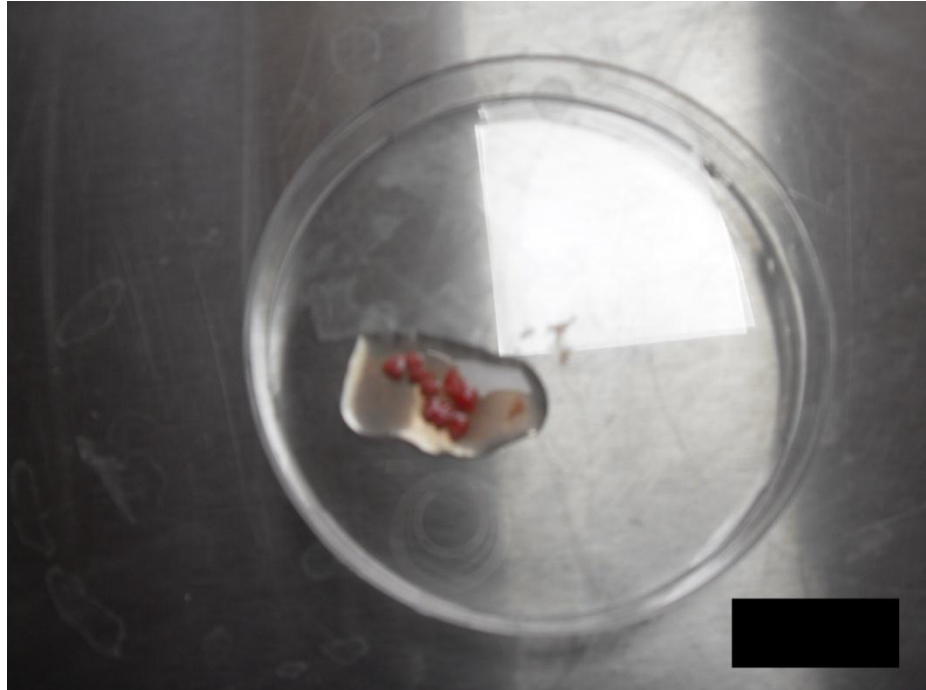
Resim 4: Kısmi kalınlıkta deri greftinin alındığı sıçanların sağ inguinal bölgesinin görünümü

Anestezi sonrası donör bölge klorheksidin (Dermanios Scrub®, Anios) ile dezenfekte edildi. Bistüri yardımıyla 4×1 cm büyüklüğünde kısmi kalınlıkta deri grefti alındı. Alınan deri grefti ortadan ikiye bölündü ve iki adet 2×1 cm büyüklüğünde deri grefti elde edildi. Yanık dokunun ikisine de el dermatomu (Wecprep™ Blades, Pilling Weck Surgical, PA, USA) ile tanjansiyel eksizyon yapıldı (Resim 9).



Resim 5: Tanjansiyel eksizyon sonrası yanık yarasının görünümü

Yanık alanlardan üst kısımda olan alana split thickness deri grefti uygulandı. Graft 4.0 monofilament absorbabl dikiş (Maxon™ Covidien) ile tespit edildi (Resim 10). Alınan deri greftinin kalan kısmı steril bir kaba alındı ve küçük parçalara bölündü. Spesimenin dermis-epidermis bağlantısı ayrılana kadar, Dispase II (Dispase II Neutral Protease, NC, USA) solüsyonu içeren bir kaptaki 40 dakika bekletildi (Resim 11).



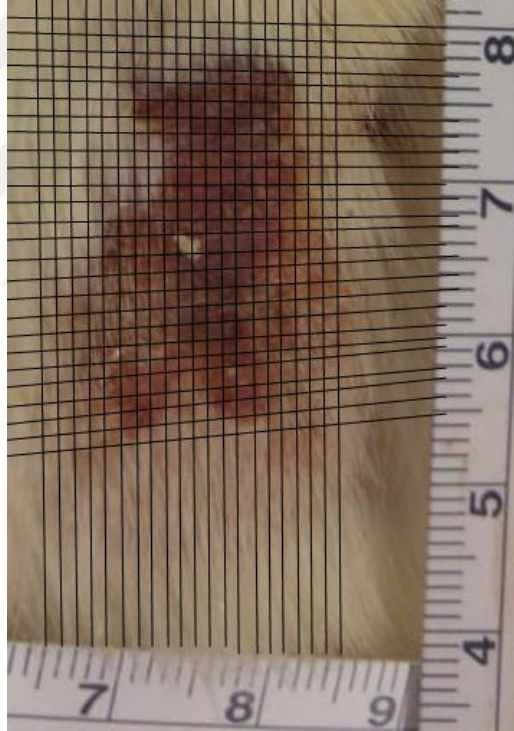
Resim 6: Küçük parçalara bölünen deri grefti 40 dk Dispase II solüsyonunda bekletildi

Daha sonra enzimi uzaklaştırmak için ringer laktat solüsyonuna alındı. Aynı bir kaba alınarak epidermis ve dermis bistüri, penset yardımıyla mekanik olarak ayrıldı. Epidermis alınarak Tripsin/EDTA (Trypsin EDTA Solution C %0.05/0.02, Biological Industries, USA) solüsyonu içeren tüpte ara ara sallanarak 15 dk bekletildi. Daha sonra yine enzimi uzaklaştırmak için ringer laktat solüsyonu ile spesimen yıkandı. Ringer laktat solüsyonu ile yıkanan hücre süspansiyonu 70 mikrometre hücre süzgecinden (70uM Cell Strainer, Orange Scientific, Belgium) geçirildi. Rejeneratif bazal keratinosit içeren bu süspansiyon ringer laktat eklenerek 200 g hızla 5 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan ringer laktat enjektör yardımıyla atıldı. Tüpte çökelti halinde kalan rejeneratif bazal keratinosit içeren süspansiyona tekrar ringer laktat solüsyonu eklendi. 22 G siyah renkli iğne ucu takılı enjektörle alt kısımdaki tanjansiyel eksizyon yapılan yanık yarasına yaklaşık 5 cm uzaklıktan püskürtüldü. Denekler işlem sonrası ayrı ayrı kafeslere alındı. İşlem sonrası petrolatum emdirilmiş steril gazlı bezle pansuman şeklinde rutin yara bakımına devam edildi.

İlk grup postoperatif 3.gün yüksek doz anestezi ajanla sakrifiye edilerek deri ve sprej grefti yapılan iki sahadan ve sağlam deriden biyopsi alındı. İkinci grup postoperatif 7.gün yüksek doz anestezi ajanla sakrifiye edilerek deri ve sprej grefti yapılan iki sahadan ve sağlam deriden biyopsi alındı. Üçüncü grup postoperatif 14.gün yüksek doz anestezi ajanla sakrifiye edilerek deri ve sprej grefti yapılan iki sahadan ve sağlam deriden biyopsi alındı. Dördüncü grup postoperatif 21.gün yüksek doz anestezi ajanla sakrifiye edilerek deri ve sprej grefti yapılan iki sahadan ve sağlam deriden biyopsi alındı. Sakrifikasyondan sonra tüm denekler doğrudan gözlem yöntemi ile makroskopik olarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi. Tüm gruplarda yara iyileşmesi, nekrotik alan milimetrik çizimler yapılarak değerlendirildi. Her karenin yarısından fazlasında iyileşme bulgusu saptandıysa 1; nekroz görüldüyse 0 olarak skorlandı. Toplam kare sayısına göre makroskopik iyileşme yüzdesi belirlendi (Resim 12,13).



Resim 7: Doğrudan gözlemlenen makroskopik değerlendirilen deri greft grubu



Resim 8: Doğrudan gözlemlenen makroskopik değerlendirilen otolog spreynin grubu

Örnekler yanık alanların uzun aksına paralel olarak alındı. Formol ile tespit edilip parafin bloklara gömüldü. Daha sonra 5 mm kalınlığında bölümler alınarak hematoxilen-eosin ile boyandı. Histopatolojik açıdan ışık mikroskobu altında incelendi. Dokular yara iyileşmesi bulguları (epitelize olmayan alan, vaskülarizasyon, inflamasyon) açısından semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Vaskülarizasyon ve inflamasyon açısından 0-3 arasında bir puan verilerek histolojik olarak skorlandı.

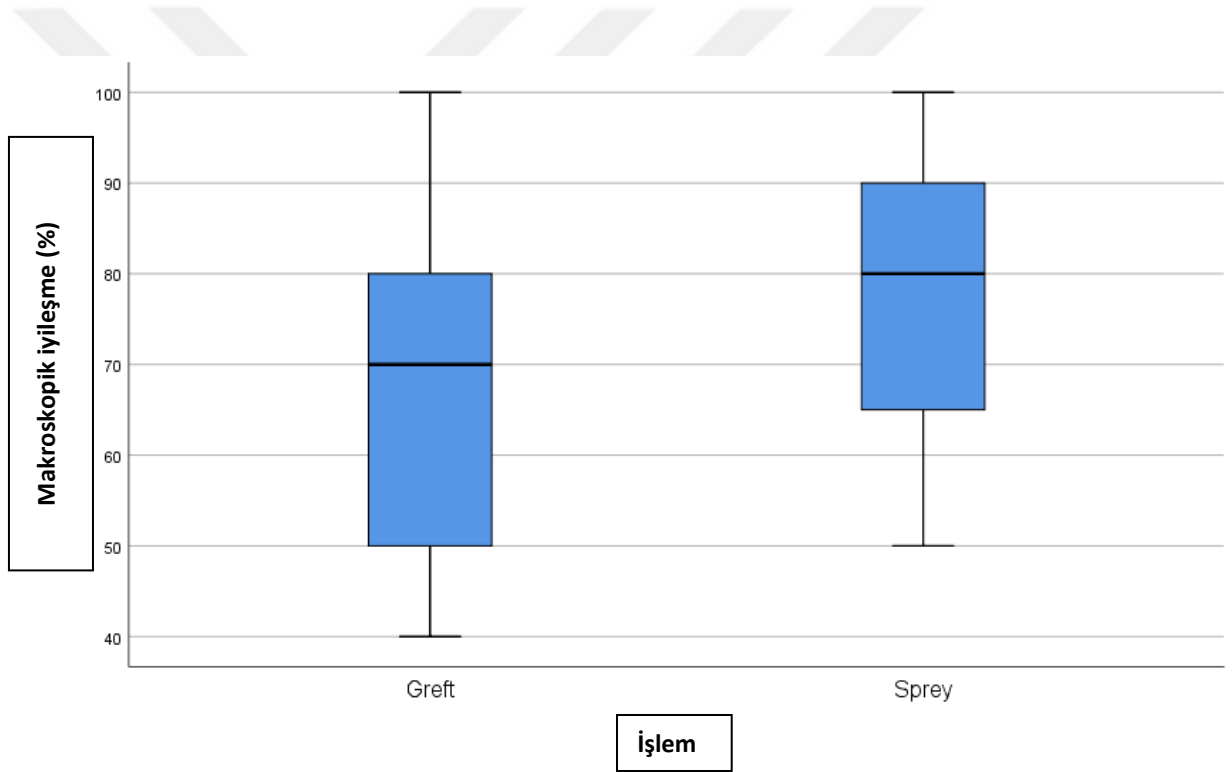
İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS sürüm 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, ABD) kullanılarak analiz edildi. Fotoğrafların makroskopik analizinde Wilcoxon testi kullanıldı. Korelasyon testleri Spearman testi ile yapıldı. Tanımlayıcı istatistiksel değerler, ortanca $\pm$ SD olarak ifade edildi.



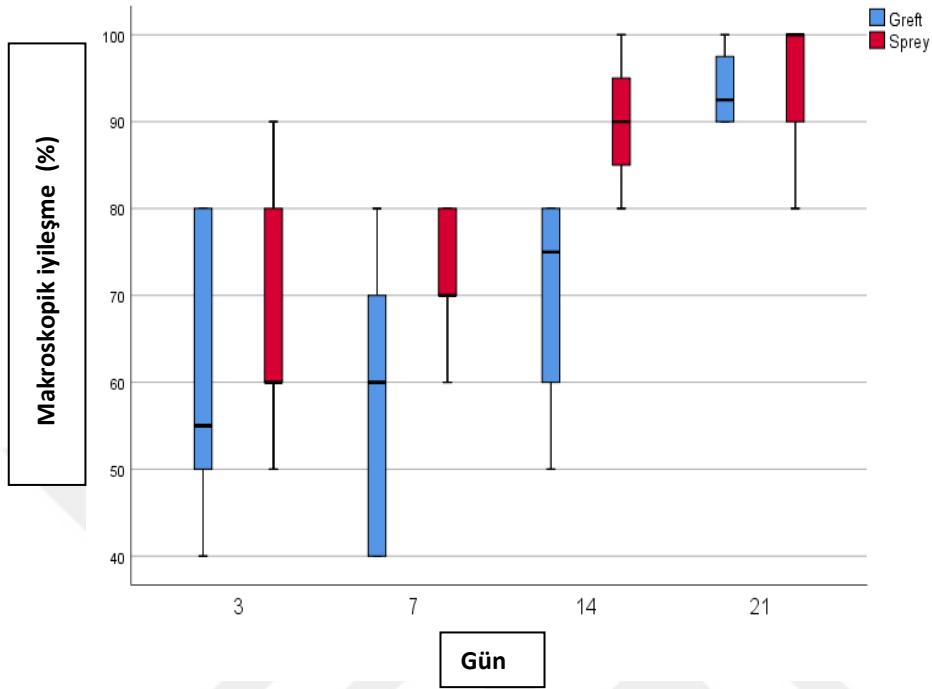
5.BULGULAR

Sıçanlarda oluşturulan derin ikinci derece yanıklarda kültüre edilmemiş hücre spreyi kullanımının deneysel modelini oluşturmak ve bu yöntemin etkinliğini klasik kısmi kalınlıkta deri grefti ile karşılaştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada 24 adet denek kullanıldı. Denekler işleme alındıktan sonra sakrifikasyona kadar üçü yanık şoku ve dehidratasyona bağlı; biri ise işlemten sonra 10. gün sepsise bağlı eksitus oldu. Kalan 20 denek makroskopik analiz, epitelize olmayan alan miktarı, inflamasyon ve vaskülarizasyon açısından değerlendirildi.



Şekil 5: Deri grefti ve sprej grubu arasında makroskopik iyileşme yüzdesinin box plot analizi

Tüm deney hayvanları bir arada değerlendirildiğinde deneklerin sakrifikasyon sonrası çekilen fotoğrafları üzerinden yapılan makroskopik analiz sonucu (ortanca skor 80'e karşı 70) sprej grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha iyi bulundu ($p=0,011$, Wilcoxon testi) (Şekil 7).

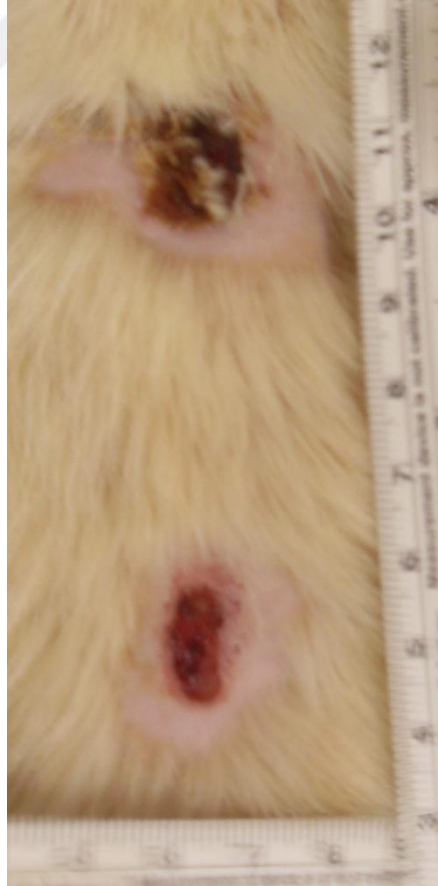


Şekil 6: Sakrifikasyon gününe göre deri grefti ve sprej grubunun box plot analizi

Sakrifikasyon gününe göre yapılan değerlendirmede makroskopik iyileşme yüzdesi günlere göre artmaktaydı. Günlere göre deri grefti ve sprej grubu karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark olmadığı görüldü (3.gün $p=0,279$, 7.gün $p=0,102$, 14.gün $p=0,102$, 21.gün $p=0,785$). Ancak bununla birlikte aradaki fark 14.günde en fazla olmakta (14.gün ortanca skor deri grefti grubu için 75, sprej grubu için 90; çeyrekler arası aralık deri grefti için 60-80, sprej grubu için 85-95), 21.gün sonunda ise eşitlenmekteydi (21.gün ortanca skor deri grefti için 92,5, sprej grubu için 100; çeyrekler arası aralık deri grefti için 90-97,5, sprej grubu için 90-100) (Şekil 8).



Resim 9: İşlem sonrası 3.gün yanık yaralarında sprej ve deri greftinin görünümü



Resim 10: İşlem sonrası 7.gün yanık yaralarında sprej ve deri greftinin görünümü



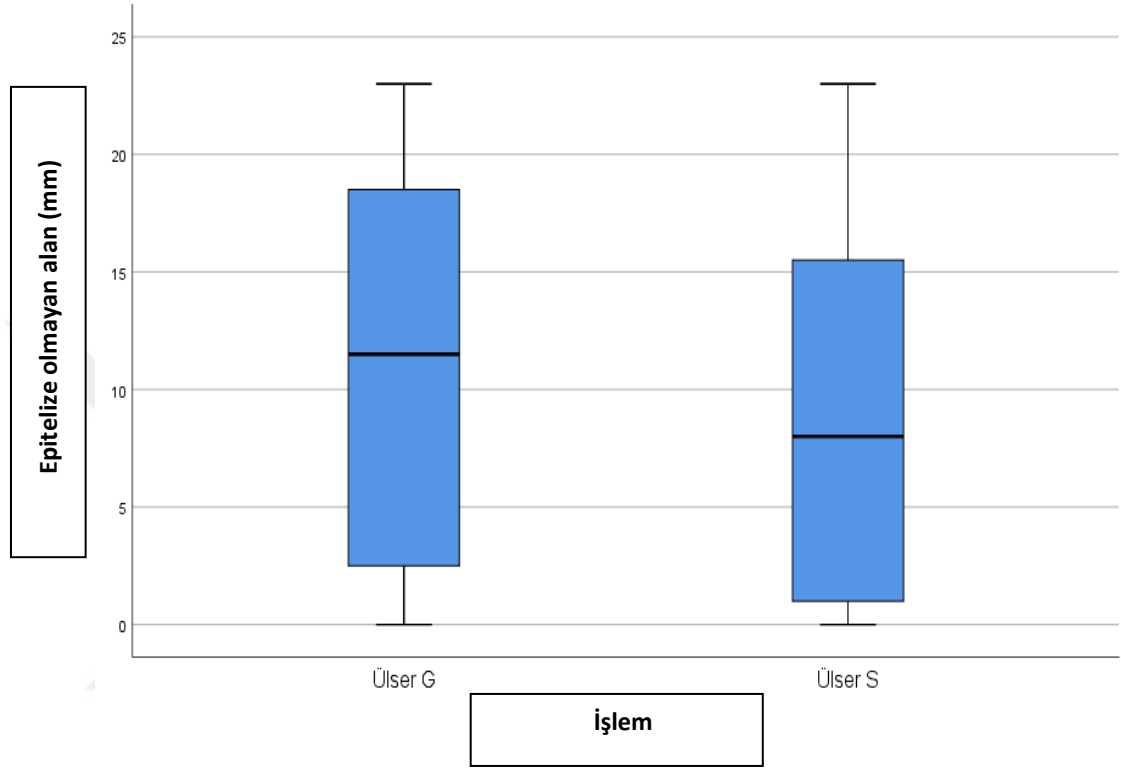
Resim 11: İşlem sonrası 14.gün yanık yaralarında sprej ve deri greftinin görünümü



Resim 12: İşlem sonrası 21.gün yanık yaralarında sprej ve deri greftinin görünümü

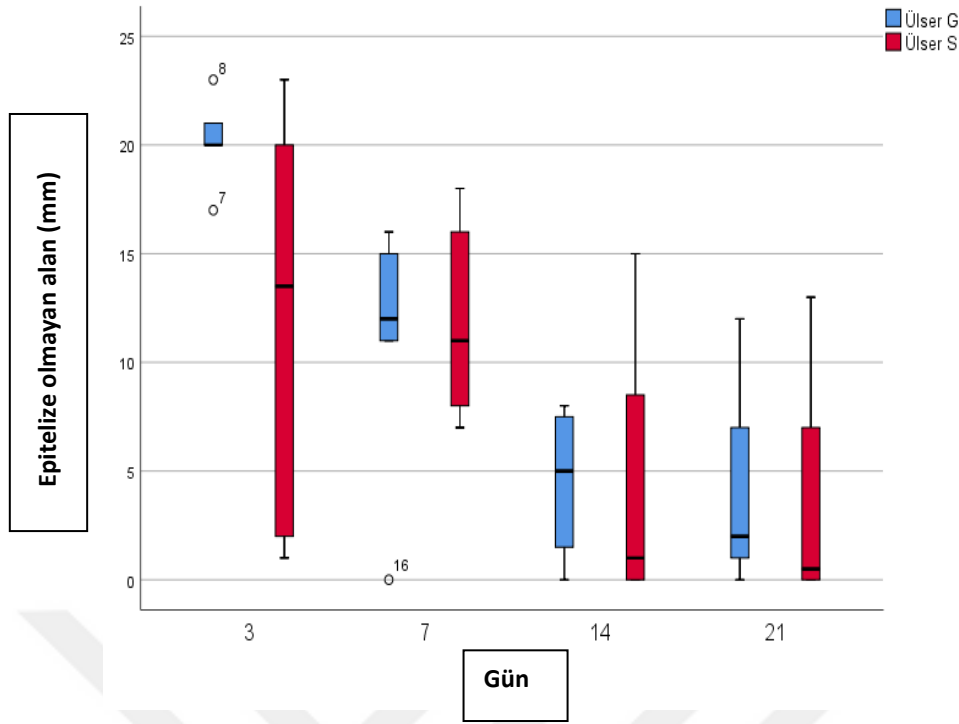
* G: Deri grefti

S: Sprey



Şekil 7: Deri grefti ve sprej grubunun arasındaki epitelize olmayan alanı farkının box plot analizi

Tüm deney hayvanları bir arada değerlendirildiğinde deri ve sprej grubunun epitelize olmayan alanlarının arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,192$, Wilcoxon testi). Ancak tanımlayıcı istatistikler değerlendirildiğinde epitelize olmayan alan ortanca değerinin sprej grubunda daha küçük olduğu görüldü (ortanca skor 11,5'e karşı 8) (Şekil 9).



Şekil 8: Sakrifikasyon gününe göre deri grefti ve sprej grubu arasındaki epitelize olmayan alan karşılaştırmasının box plot analizi

Sakrifikasyon gününe göre yapılan değerlendirmede iki grup arası epitelize olmayan alan farkı istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamakla birlikte (3.gün $p=0,138$, 7.gün $p=0,686$, 14.gün $p=0,715$, 21.gün $p=0,414$); 3.günde en fazla farka ulaşmakta (3.gün ortanca skor deri grefti grubu için 20, sprej grubu için 13,5; çeyrekler arası aralık deri grefti için 20-21, sprej grubu için 2-20), 21.gün sonunda aradaki fark azalmaktadır (21.gün ortanca skor deri grefti grubu için 2, sprej grubu için 0,5; çeyrekler arası aralık deri grefti için 1-7, sprej grubu için 0-7) (Şekil 10).

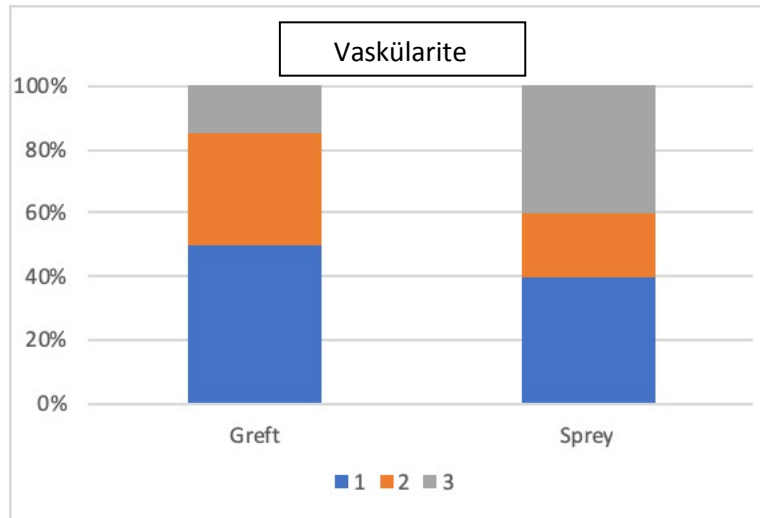
Ayrıca histolojik skorumaya yöntemine göre tüm denekler incelendi. İnflamatuvar yanıt ve vaskülariteye göre histolojik skorumaya yapıldı (Tablo 4).

Tablo 2: Histolojik skarlama sistemi

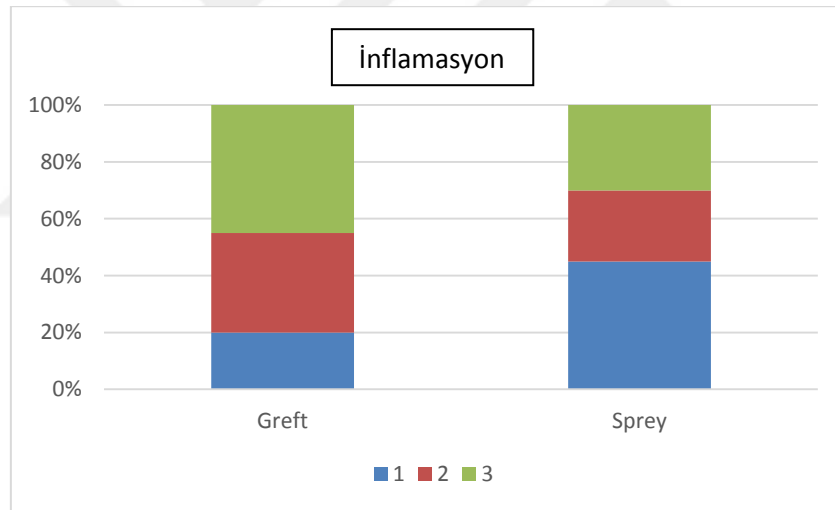
	Skorlar			
	0	1	2	3
Akut inflamasyon	Yok	Az	Orta	Fazla
Neovaskularizasyon	Yok	<5 /HPF	6-10 /HPF	>10 /HPF

HPF: High power field (Yüksek büyütme alanı)

Histolojik skarlama yöntemine göre tüm gruplar incelendi. Tüm gruplara neovaskularizasyon bakılarak 0-3 arası puan verildi. Denekler değerlendirildiğinde deri grefti grubunda 10 denek 1 puan, 7 denek 2 puan, 3 denek de 3 puan aldı. Sprey grubu değerlendirildiğinde ise 8 denek 1 puan, 4 denek 2 puan, 8 denek ise 3 puan aldı. Toplamda deri grefti grubunun neovaskularizasyon skoru 33, sprej grubunun neovaskularizasyon skoru 40 olarak belirlendi. Sprej grubunda 3 puan alan denekler bütün grubun %40'ı iken deri grefti grubunda 3 puan alan deneklerin yüzdesi %20 olarak hesaplandı. Buna göre vaskülarite skoru açısından deri grefti grubu ile sprej grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,232$, Wilcoxon testi). Günlere göre incelendiğinde ise neovaskularizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (3.gün $p=0,059$, 7.gün $p=0,564$, 14.gün $p=0,705$, 21.gün $p=0,564$) (Şekil 11).

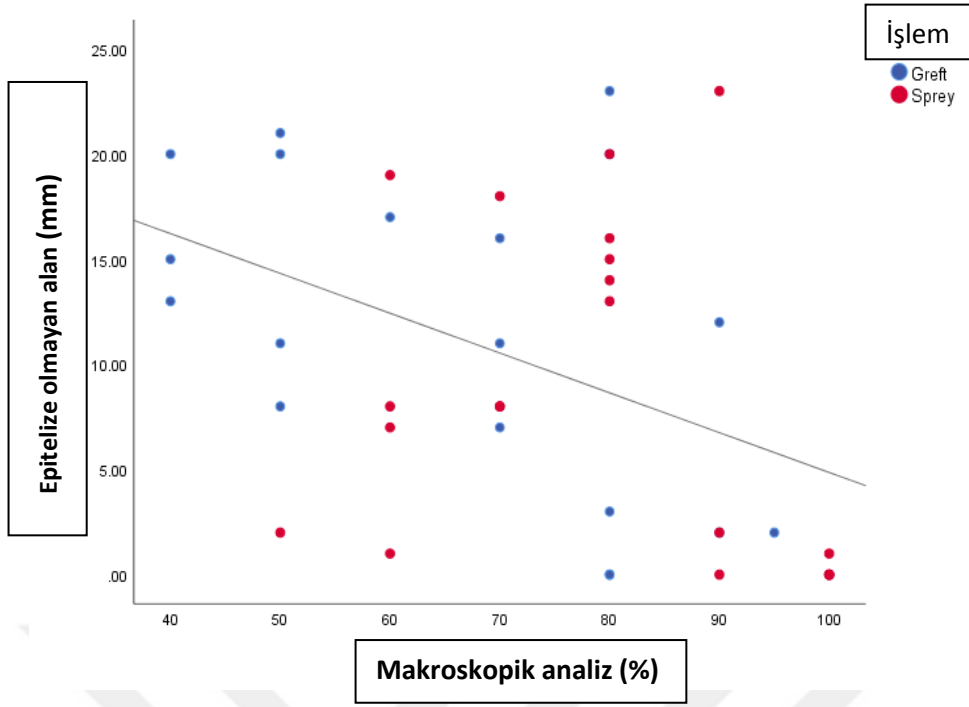
**Şekil 9:** Deri grefti ve sprej grubunun vaskülarizasyon açısından incelenmesi

Histolojik skora göre tüm gruplar incelendiğinde inflamatuvar yanıt bakılan deneklere azdan yükseğe doğru 0-3 arası puanlama yapıldı. Değerlendirme yapıldığında deri grefti grubunda 4 denek 1 puan, 7 denek 2 puan, 9 denek de 3 puan aldı. Sprey grubu değerlendirildiğinde ise 9 denek 1 puan, 5 denek 2 puan, 6 denek ise 3 puan aldı. Toplamda deri grefti grubunun inflamatuvar yanıt skoru 45, sprej grubunun inflamatuvar yanıt skoru 37 olarak belirlendi. Sprej grubunda 3 puan alan denekler bütün grubun %30'ı iken deri grefti grubunda 3 puan alan deneklerin yüzdesi %45 olarak hesaplandı. Buna göre histolojik skorlama tablosu incelendiğinde inflamatuvar yanıt açısından deri grefti grubu ile sprej grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,174$, Wilcoxon testi). Günlere göre incelendiğinde yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (3.gün $p=0,705$, 7.gün $p=0,480$, 14.gün $p=0,450$, 21.gün $p=0,157$) (Şekil 12).



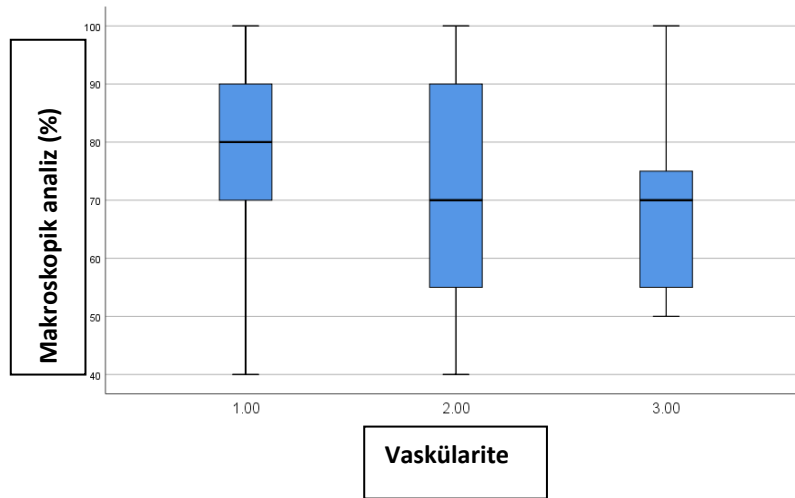
Şekil 10: Deri grefti ve sprej grubunun inflamasyon açısından incelenmesi

Denekler ayrıca makroskopik analiz ve epitelize olmayan alan, vaskülarite, inflamatuvar yanıt ile karşılaştırıldı. Bunun için spearman testi kullanıldı.

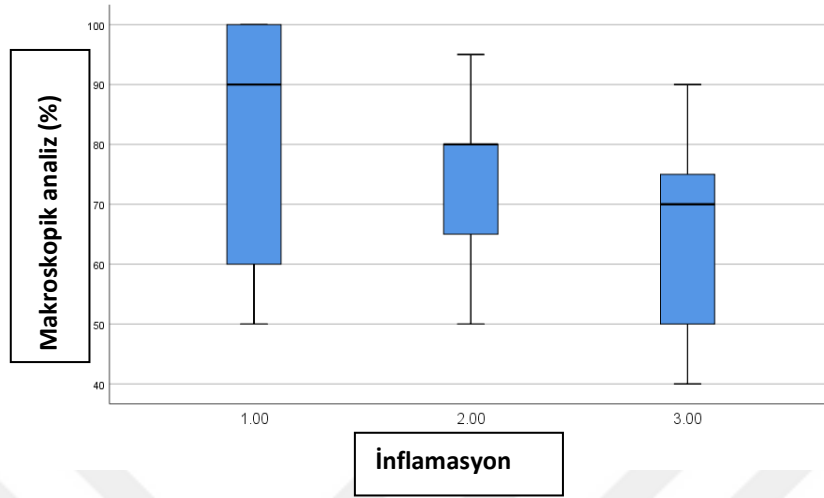


Şekil 11: Makroskopik analiz ve epitelize olmayan alan arasındaki ilişki grafiği

Makroskopik analiz yüzdesi ve epitelize olmayan alan boyutu arasında ters yönde, orta kuvvette istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir ilişki görüldü ($r=0,52$, $p=0,06$, Spearman testi) (Şekil 13).

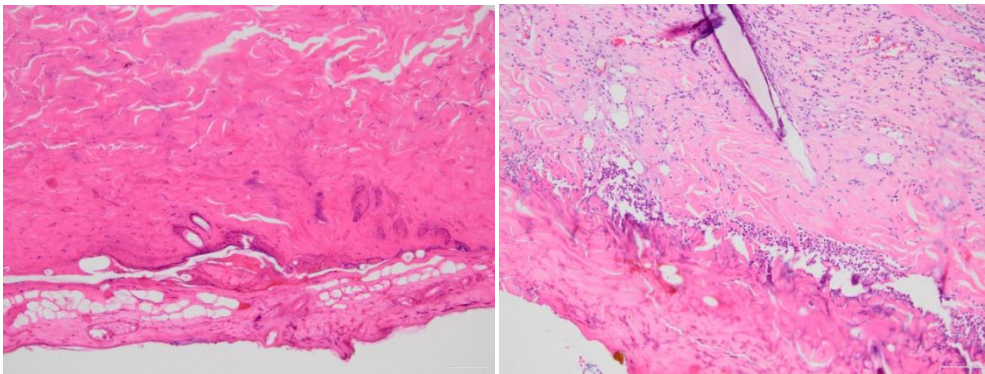


Şekil 12: Makroskopik analiz ve vaskülarite arasındaki ilişki

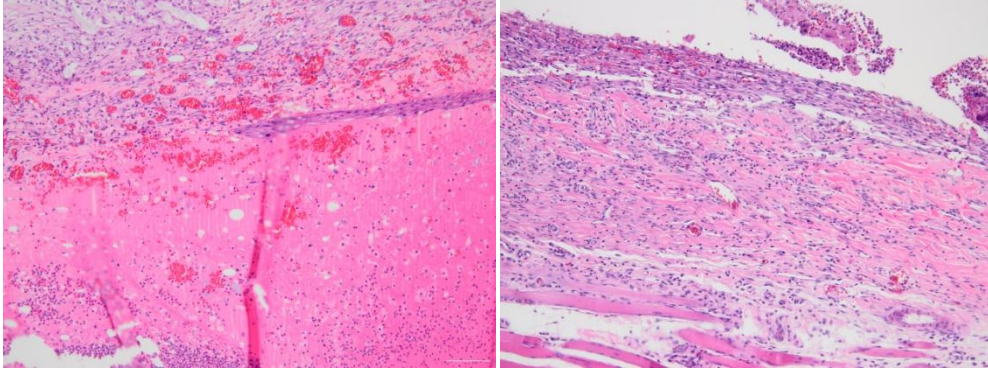


Şekil 13: Makroskopik analiz ve inflamasyon arasındaki ilişki

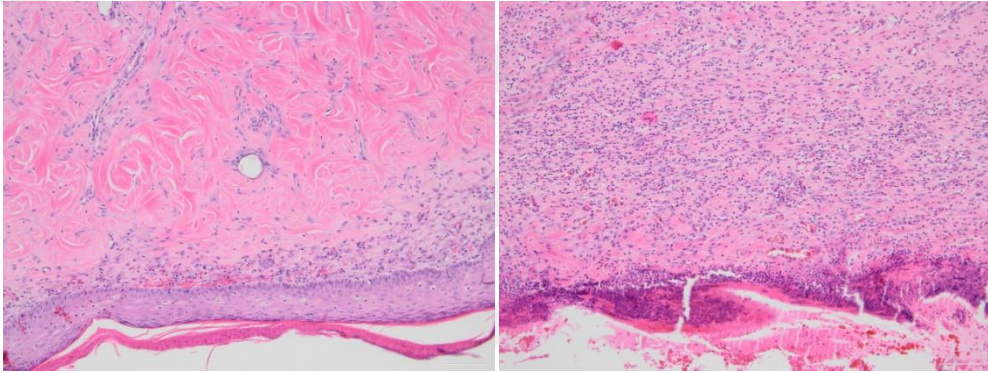
Benzer şekilde vaskülarite düzeyi de makroskopik analiz yüzdesi ile ilişkili idi ($r=0,3$, $p=0,05$, Spearman testi) (Şekil 14). Yine aynı şekilde inflamatuvar yanıt düzeyi de makroskopik analiz yüzdesi ile ilişkili idi ($r=0,4$, $p=0,01$, Spearman testi) (Şekil 15).



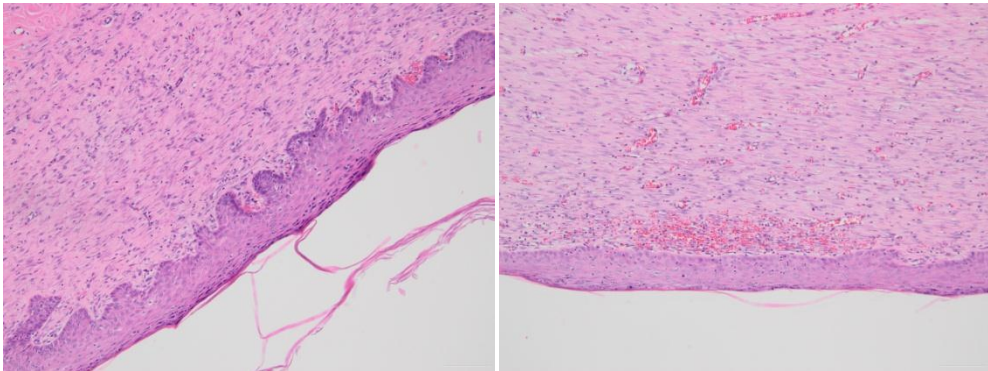
Resim 13: İşlem sonrası 3. gün deri grefti ve sprej grubunun histolojik görüntüsü



Resim 14: İşlem sonrası 7. gün deri grefti ve spreyc grubunun histolojik görüntüsü



Resim 15: İşlem sonrası 14. gün deri grefti ve spreyc grubunun histolojik görüntüsü



Resim 16: İşlem sonrası 21. gün deri grefti ve spreyc grubunun histolojik görüntüsü

6.TARTIŞMA

Yanık olguları yüzey alanı büyüklüğüne, derinliğine göre komplike olabilmekte ve ölümle sonuçlanabilmektedir. Yanık tedavisinin maliyeti de oldukça fazla olabilmektedir (7, 39). Yanık yaralanmalarının çoğu ayaktan tedavi edilebilirken % 10'luk bir hasta grubunda izlem ve tedavi gerekir. Bu tedavi süreci bazen komplike olabilir ve sekel/fonksiyon kaybı ile sonuçlanabilir (1).

Birinci ve yüzeysel ikinci derece yanık yaraları sadece yara bakımı ile iyileşebilirken; derin ikinci ve üçüncü derece yanıklar cerrahi tedavi gerektirir. Bu hastalarda otogreft kullanımı ile yanık yaralarının kapatılması standart tedavi yöntemidir. Ancak uzun süreli yara bakımı gerektirmesi, enfeksiyon, donör saha bakımı ve komplikasyonları gibi sorunlar nedeniyle ideal cerrahi tedavi arayışı sürmektedir (24, 40).

Bütün bu sorunlar nedeniyle son yıllarda kültüre edilmemiş hücre spreyi kullanımı gündeme gelmiştir (41, 42). Fakat günümüze kadar bu yöntemin etkinliğinin araştırıldığı klinik veya deneysel bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yöntem sadece olgu sunumları şeklinde bildirilmiş. Bu sebeple bu güncel metodun etkinliğinin araştırılması amacıyla sıçanlarda deneysel olarak derin ikinci derece yanık oluşturarak kültüre edilmemiş hücre spreynin kullanımını irdelemeyi amaçladık.

Öncelikle derin ikinci derece yanık oluşturmak için 24 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullandık. Pereira ve ark. sıçanlarda derin ikinci derece yanık oluşturulmasında standardizasyonu sağlamak için bazı kriterler bildirmişler. Yanık modelini oluşturmak için 51 gram ağırlığında alüminyum plaka hazırlamışlar ve bu plakayı 100 °C'ye ısıtılmış kaynar suda bekletmişler. Yaptıkları histolojik ve makroskopik çalışmada bu şekilde derin ikinci derece yanık oluştuğunu görmüşler (35). Biz de çalışmamızda bu şartları sağlayarak 2 cm² yüzey alanına sahip iki adet yanık yarası oluşturduk. Yaraları oluştururken alüminyum plakaları kendi ağırlıyla bıraktık. Ek bir basınç uygulamadık (33). 5.gün işlem için denekleri tekrar incelediğimizde derin ikinci derece yanık oluşturduğumuzu gördük (Resim 7).

Yanık yarası oluşturmak için sıçanların dorsal derisini kullandık. Abdullahi ve ark. sıçanlarda deneysel yanık modeli oluştururken dorsal derinin kullanılmasının faydalı olacağını söylemişler. Bunun sebebi olarak deney hayvanının yanık yarası

oluşturulduktan sonra bu kısma ulaşamamasını göstermişler (32). Ayrıca bölgedeki kontraksiyonun az olduğunu, modelin oluşturulma esnasında altta vertebral kemiklerin destek dokusu görevi gördüğünü bildirmişler. Ancak bu bölgenin kanlanmasının diğer bölgelere göre farklı olduğunu ve buna bağlı olarak iyileşme sürecinde değişiklikler olabileceğini belirtmişler (34).

Kısmi kalınlıkta deri grefti için donör saha olarak inguinal bölgeyi kullandık. Zhai ve ark. yaptıkları çalışmalarında inguinal bölgeden kısmi kalınlıkta deri greftinin alınmasının kolaylıklarından bahsetmişlerdir (38). Deri greftini alırken bistüri kullandık ve sağ tarafı seçtik.

Deri rejenerasyonu, farklı hücre serilerinin ve hücre sinyallerinin öncülük ettiği progenetik hücrelerin doku yapısını ve fonksiyonunu restore ettiği dinamik bir süreçtir. Bu bilgi ışığında kültüre edilmemiş hücre spreysi metodu son yıllarda popülerleşen bir yöntemdir. Hastanın otolog hücrelerini kullanarak iyileşmeyi hızlandırdığı ve iyileşmenin niteliğini artırdığı düşünülmektedir (42, 43). Bu yöntem kısmi kalınlıkta donör deri greftinin küçük parçalara ayrılarak bir dizi enzimatik reaksiyondan geçtikten sonra debride edilen yanık bölgesine keratinositlerin püskürtülmesi esasına dayanır. Esteban ve ark. kültüre edilmemiş hücre spreysinin avantajlı yönlerini minimal hücre manüplasyonu gerektirmesi, progenitor ve epidermal kök hücre kaybının azalması ve hastanın kendi dokusunu “biyoreaktör” olarak kullanması olarak sıralamıştır (42). Gerlach ve ark. ise epidermiste bulunan rejeneratif bazal keratinositlerin geleneksel yöntemlerle izole edilemeyeceğini bildirmiştir. Bu yöntemle hücrelerin ortaya çıkarılabileceğini savunmuştur (43).

Bu yenilikçi yaklaşım aslında ilk olarak kültüre edilmiş hücre uygulaması şeklinde ortaya çıkmıştır. İlk başta klasik yöntemlere göre oldukça avantajlı olduğu düşünülmüştür. Kültüre edilmiş epidermal otogreftler bir süredir kullanılabilir olmasına rağmen; süreç uzayabilmekte ve sonuçlar tatmin edici olmayabilmektedir. Öncelikle farklılaşmış keratinositlerin kullanımı genellikle kozmetik olarak yetersiz rejenerasyonla sonuçlanır (44). Kültüre edilmemiş hücre spreysi metodu hastanın yarası açık bir şekilde kültür bekleme sorununa son vermiştir. İn vitro hücre manipülasyonu miktarını azaltmış ve daha da önemlisi, progenitor hücre ve epidermal kök hücre kaybı ile erken hücre diferansiasyonunu önlemiştir.

Derin ikinci derece ve üçüncü derece yanıklarda altın standart yöntem cerrahidir. Günümüzde cerrahi tedavi ileri yanık merkezlerinde erken tanjansiyel eksizyon ve kısmi kalınlıkta deri grefti uygulaması şeklinde yapılmaktadır. Fakat bu klasik cerrahi tedavi modalitesi birçok problemi de beraberinde getirmektedir. Başlıca sorunları enfeksiyon, uzun süreli yara bakımı gerektirmesine bağlı hastanede yatış süresinin uzunluğu, geniş yanıklı hastalarda donör saha sorunu ve fonksiyonel, estetik kayıplara yol açması olarak sayılabilir.

Esteban ve ark. kültüre edilmemiş hücre spreysi metodunun klasik otogreftlemeye göre re-epitelizasyonunun daha hızlı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca el, yüz ve eklem gibi özel bölgelerde kullanımının daha kolay ve yüz güldürücü sonuçlarının olduğunu rapor etmişlerdir (42). Gravante ve ark. da epitelizasyonun spreys metodunda daha hızlı geliştiğini, özellikli bölgelerdeki yanıklarda kullanımının kolaylığını savunmuşlardır (45).

Bu yöntemin getirdiği en önemli avantajlardan biri de geniş yanıklı hastalarda donör saha sorununu çözmesidir. Klasik otogreftleme yöntemi 1900'li yıllarda 1:1 şeklinde başlamış; 1960'lı yıllarda Meek tekniğinin tanımlanmasıyla 1:4, 1:6 oranı kullanılmaya başlanmıştır (46). Ancak bu yeni teknikle birlikte oranın 1:20'nin üzerine çıkabileceği söylenmiştir. Böylelikle yaranın kapalı izlenme zamanının da kısılacağı belirtilmiştir (43, 47). Esteban ve ark. ise yeni bir formülasyonla bu oranı 1:100'e çıkardıklarını savunmuşlardır (48). Ancak bizim çalışmamızda donör saha-yanık alanı oranını karşılaştıracak tarzda bir girişim yapılmadı. Bu çalışmanın amacı öncelikle kültüre edilmemiş otolog deri grefti ile ilgili bir hayvan modeli yaratmaktır. Sonuçlara bakılınca bu konuda çalışmamız başarılı olmuştur. Elbette ki bu çalışma temel alınarak yapılacak daha çok çalışma vardır. Çalışmanın ikinci sonucu olarak, kültüre edilmemiş otolog deri greftinin klasik deri greftine göre daha çok tutma oranına sahip olduğu görülmektedir. Ancak bu sonucu değerlendirirken dikkatle yaklaşılmalıdır. Bu çalışmada yanık yarası hayvanların sırtında ve orta hatta yaratılmıştır. Bu bölgenin seçilme nedenleri yukarıda anlatılmıştı. Bilindiği gibi greftlerin beslenmeleri ilk üç günde sadece alttaki dokulardan difüzyonla olmaktadır. Bu nedenle greftin alttaki iyi kanlanan bir dokuya teması greftin yaşaması için önemlidir. Orta hatta klasik grefti yayacak düz bir alan yaratmak vertebrae nedeniyle mümkün olmamıştır, ayrıca vertebrae üzerinde debridman sonrası kemiklerin üzerinde kalan doku çok ince kalmıştır. Bu faktörler klasik deri greftinin yaranın bazı

bölgelerinde tutmasını zorlaştırmış olabilir. Bu alanlarda kültüre edilmemiş otolog hücre greftleri sıvı – sprej halinde yaraya uygulandığından doku ile teması daha iyi olmuş olabilir. Bu sonuçlardan kültüre edilmemiş otolog hücre grefti ile kısmi kalınlıkta deri greftinin hayvan vücudunun değişik bölgelerinde karşılaştırılmaları da yeni bir çalışma konusu olabilir.

Biz çalışmamızda kültüre edilmemiş hücre spreji yöntemiyle kısmi kalınlıkta deri grefti uygulamasını karşılaştırmayı hedefledik. Bunun için sıçanların dorsal derisinin üst kısmına klasik otogreft uygulaması; alt kısmına ise kültüre edilmemiş hücre spreji metodunu uyguladık. Daha sonra postoperatif 3, 7, 14 ve 21 gün sonunda biyopsi aldık. Bunlar patoloj tarafından incelendi. Makroskopik analiz, epitelize olmayan alan, vaskülarite ve inflamatuvar yanıt gibi parametreler üzerine incelemeler yaptık.

Makroskopik analiz deneklerin sakrifikasyonundan hemen sonra çekilen fotoğraflar üzerinden yorumlandı. Tüm gruplarda yara iyileşmesi, nekrotik alan milimetrik çizimler yapılarak değerlendirildi. Her karenin yarısından fazlasında iyileşme bulgusu saptandıysa 1; nekroz görüldüyse 0 olarak skorlandı. Toplam kare sayısına göre makroskopik iyileşme yüzdesi belirlendi. Yapılan bu hesaplamalarda iyileşme oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde sprej grubu lehine olduğunu gördük. Uzun ve ark. deri flebi canlılığını değerlendirmede bu şekilde makroskopik analiz yaptığını raporlamıştır (49).

Çalışmamızda iki grubu karşılaştırmak için kullandığımız parametrelerden birisi de epitelize olmayan alan hesaplanmasıydı. Tüm gruplar incelendiğinde sprej ve otolog deri grefti uygulanan deneklerde epitelize olmayan alan bakımından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı. Ancak bütün değerlere bakıldığında sprej grubunda epitelize olmayan alanın azaldığı tespit edildi.

Ayrıca epitelize olmayan alanın makroskopik analiz yüzdesi ile korelasyonu istatistiksel olarak incelendi. İkisi arasında ters yönde, orta kuvvette istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü. Böylelikle fotoğraflar üzerinden yapılan doğrudan gözlemlerle makroskopik analizin objektif değerlendirilmesi de yapılmış oldu. Bunun sonunda sprej grubu lehine iyileşmenin daha iyi olduğu görülmektedir. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da iki grup arasında greft tutması açısından en büyük fark, sprej grubu lehine olmak üzere, üçüncü günde görülmektedir. Bu

durum sprey şeklinde uygulanan greftin alttaki dokuya daha iyi temas etmesiyle açıklanabilir. Erken dönemde görülen bu fark ilerleyen günlerde kapanmaktadır.

Deri rejenerasyonu oldukça karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Bu sürece öncülük eden birçok farklı hücre sinyali ve hücre serileri vardır. Doku yapısını ve fonksiyonunu restore eden de progenitör hücrelerdir (50). Epidermal rejenerasyon ve homeostaz, stratum bazalede bulunan proliferere olabilen amplifiye keratinositler olarak epidermal kök hücrelerle sağlanır. Postmitotik farklılaşma ve göç yoluyla, bazal tabakadaki hücreler tamamen tabakalı epidermisi yeniden oluşturabilir. Bu sürecin temeli yara iyileşmesine dayanmaktadır. Yara iyileşmesinin histolojik evreleri incelendiğinde hemostatik/inflamatuvar evre, mononükleer hücreler ve lenfositlerce infiltrasyonu gösteren sonraki inflamatuvar evre, ilgili angiogenezis ve kollajen sentezi ile birlikte proliferatif evre (51). Yara iyileşmesinin bu histolojik evreleri göz önüne alındığında inflamatuvar yanıtın ve neovaskülarizasyonun ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Bakılan parametrelerden bir diğeri de vaskülarizasyondur. Neovaskülarizasyon yara iyileşmesi temelinde oldukça önemli bir süreçtir. Bu değerlendirmede vaskülarizasyon histolojik olarak 0-3 arasında puanlandı. Böylelikle bir histolojik skor elde edildi. Yapılan incelemede de yine sprey grubu lehine neovaskülarizasyonun arttığını söyleyebiliriz. Yara iyileşmesi temelindeki neovaskülarizasyonun artması sprey grubunun iyileşmede pozitif katkılarının olduğunun habercisi olarak yorumlanmıştır.

Çalışmamızda iki grup arasında ne vaskülarizasyonda ne de inflamasyonda bir fark görülmemiştir. Bu sonuç kültüre edilmemiş otolog hücre spreynin etkili bir greft yöntemi olabileceğini göstermektedir. Ancak bu konuda daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

7. SONUÇLAR

Bu çalışma sıçanlarda oluşturulan deneysel ikinci derece derin yanıklarda kültüre edilmemiş hücre spreynin etkinliğini incelemek için yapılmıştır. Sonuç olarak:

- Deneklerin fotoğrafları üzerinden yapılan doğrudan gözlemle makroskopik incelemede spreynin grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.
- Epitelize olmayan alan değerlendirildiğinde deri grefti ve spreynin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.
- Deri grefti ve spreynin grubu arasında neovaskülarizasyon ve inflamasyon için istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Bu sonuçlar kültüre edilmemiş hücre spreynin yönteminin yanık tedavisinde kullanılabilecek etkili bir greft yöntemi olabileceğini göstermektedir. Ancak elde edilen sonuçlarla insanlarda kullanımı için ve daha net sonuçlar elde edebilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Yorgancı K. Yanıklar. *Katkı Pediatri Dergisi*, 2004;26(4-5):873-899.
2. Yorgancı K, Öner Z. Yanıklar. *Temel Cerrahi*. 4.Baskı. Editör: İskender Sayek. 2013;4: 529-42, 494-508.
3. Majno G. The healing hand: man and wound in the ancient world. Harvard University Press, 1991;1:142-179.
4. Pruitt B, Wolf SE, Mason A. Epidemiological, demographic, and outcome characteristics of burn injury. *Total Burn Care*. DN Herndon. 2012;4:15-45.
5. Stylianou N, Buchan I, Dunn KW. A review of the international Burn Injury Database (iBID) for England and Wales: descriptive analysis of burn injuries 2003–2011. *BMJ open*, 2015;5(2):e006184.
6. Zerbaliyev E. Kuruluşundan Bugüne Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı Yanık Ünitesinde Yatarak İzlenen Hastalarda Tedavi Etkinliğinin Retrospektif Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2013.
7. Açikel C, Eren F, Çeliköz B. Bir Yanık Ünitesinde Yatarak Tedavi Edilen Akut Yanıklı Hastaların Maliyeti. *Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turk J Plast Surg)*, 2002;10(3):186-9.
8. Kazancı A. Yaşlanmayla deride meydana gelen değişimlerin incelenmesi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi, 2012.
9. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental dermatology*, 2016;25(2):92-8.
10. Singer AJ, Dagum AB. Current management of acute cutaneous wounds. *New England Journal of Medicine*, 2008;359(10):1037-46.
11. Jaspers ME, van Haasterecht L, van Zuijlen PP, Morkink LB. A systematic review on the quality of measurement techniques for the assessment of burn wound depth or healing potential. *Burns*, 2019;45(2):261-281.
12. Bessey PQ. Wound Care. *Total Burn Care*. DN Herndon. 2007;3:127-36.
13. Özkaya NK, Alğan S, Akkaya H. Yanıklı Hastanın Değerlendirilmesi ve Tedavi Yaklaşımının Belirlenmesi. *Ankara Medical Journal*, 2014;14(4):170-175.
14. Koltka K. Yanık yaralanmaları: Yanık derinliği, fizyopatolojisi ve yanık çeşitleri. *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi*, 2011;9:1-6.
15. Hettiaratchy S, Dziewulski P. Pathophysiology and types of burns. *British Medical Journal*, 2004;328(7453):1427-9.

16. Keskin Y. Deneysel yanık iyileşmesinde manyetik alan tedavisinin ve elektrik stimülasyonunun etkileri. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, 2012.
17. Greenhalgh DG. Wound Healing. Total burn care. DN Herndon. 2007;3:578-595.
18. Mlcak RP, Suman OE, Herndon DN. Respiratory management of inhalation injury. Burns, 2007;33(1):2-13.
19. Yastı AÇ, Şenel E, Saydam M, Özok G, Çoruh A, Yorgancı K. Guideline and treatment algorithm for burn injuries. Ulus Travma Acil Cerrahi Dergisi, 2015;21(2):79-89.
20. Kagan RJ, Warden GD. Care of minor burn injuries: an analysis of burn clinic and emergency room charges. The Journal of Burn Care & Rehabilitation, 2001;22(5):337-40.
21. Holt B, Graves C, Faraklas I, Cochran A. Compliance with nutrition support guidelines in acutely burned patients. Burns, 2012;38(5):645-9.
22. Rieg LS. Metabolic alterations and nutritional management. AACN Advanced Critical Care, 1993;4(2):388-98.
23. Monafo W, Bessey P. Wound Care. Total Burn Care. Herndon DN. 2002;2:109-119.
24. O'brien SP, Billmire DA. Prevention and management of outpatient pediatric burns. Journal of Craniofacial Surgery, 2008;19(4):1034-9.
25. Özkan Z, Alataş ET. Yanıkta cerrahi tedavi ve klinik deneyimlerimiz. Journal of Clinical and Experimental Investigations, 2014; 5 (1): 76-79.
26. Janzekovic Z. The burn wound from the surgical point of view. The Journal of Trauma, 1975;15(1):42-62.
27. Gallico III GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. New England Journal of Medicine, 1984;311(7):448-51.
28. Hartmann B, Ekkernkamp A, Johnen C, Gerlach JC, Belfekroun C, Küntscher MV. Sprayed cultured epithelial autografts for deep dermal burns of the face and neck. Annals of Plastic Surgery, 2007;58(1):70-3.
29. O'Connor N, Mulliken J, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. The Lancet, 1981;317(8211):75-8.
30. Munster AM. Cultured skin for massive burns. A prospective, controlled trial. Annals of Surgery, 1996;224(3):372.

31. Harris PA, Leigh IM, Navsaria HA. Pre-confluent keratinocyte grafting: the future for cultured skin replacements? *Burns*, 1998;24(7):591-3.
32. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MJC, Sciences ML. Animal models in burn research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014;71(17):3241-55.
33. Venter NG, Monte-Alto-Costa A, Marques RG. A new model for the standardization of experimental burn wounds. *Burns*, 2015;41(3):542-7.
34. Mitsunaga Junior JK, Gagnani A, Ramos MLC, Ferreira LM. Rat an experimental model for burns: a systematic review. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2012;27(6):417-23.
35. Pereira T, Dos Santos D, Lima-Ribeiro MHM, de Pontes-Filho NT, Carneiro-Leão AMDA, Correia MTDS. Development of animal model for studying deep second-degree thermal burns. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012;2012:460841.
36. Chan QE, Harvey JG, Graf NS, Godfrey C, Holland AJ. The correlation between time to skin grafting and hypertrophic scarring following an acute contact burn in a porcine model. *Journal of Burn Care & Research*, 2012;33(2):e43-e8.
37. Singh M, Nuutila K, Minasian R, Kruse C, Eriksson E. Development of a precise experimental burn model. *Burns*, 2016;42(7):1507-12.
38. Zhai Q, Zhou F, Ibrahim MM, Zhao J, Liu X, Wu J. An immune-competent rat split thickness skin graft model: useful tools to develop new therapies to improve skin graft survival. *American Journal of Translational Research*, 2018;10(6):1600-10.
39. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, 2009;17(6):763-71.
40. Morgan ED, Bledsoe SC, Barker J. Ambulatory management of burns. *American Family Physician*, 2000;62(9):2015-26, 29-30, 32.
41. Gerlach JC, Johnen C, McCoy E, Bräutigam K, Plettig J, Corcos A. Autologous skin cell spray-transplantation for a deep dermal burn patient in an ambulant treatment room setting. *Burns*, 2011;37(4):e19-e23.
42. Esteban-Vives R, Choi MS, Young MT, Over P, Ziembicki J, Corcos A. Second-degree burns with six etiologies treated with autologous noncultured cell-spray grafting. *Burns*, 2016;42(7):e99-e106.
43. Gerlach JC, Johnen C, Ottoman C, Bräutigam K, Plettig J, Belfekroun C. Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells. *Burns*, 2011;34(3):271-9.

44. Chester D, Balderson D, Papini R. A review of keratinocyte delivery to the wound bed. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 2004;25(3):266-75.
45. Gravante G, Di Fede M, Araco A, Grimaldi M, De Angelis B, Arpino A, et al. A randomized trial comparing ReCell® system of epidermal cells delivery versus classic skin grafts for the treatment of deep partial thickness burns. *Burns*, 2007;33(8):966-72.
46. Meek C. Extensive severe burn treated with enzymatic debridement and microdermagrafting: case report. *The American Surgeon*, 1963;29:61-4.
47. Yanaga H, Udoh Y, Yamauchi T, Yamamoto M, Kiyokawa K, Inoue Y, et al. Cryopreserved cultured epidermal allografts achieved early closure of wounds and reduced scar formation in deep partial-thickness burn wounds (DDB) and split-thickness skin donor sites of pediatric patients. *Burns*, 2001;27(7):689-98.
48. Esteban-Vives R, Corcos A, Choi MS, Young MT, Over P, Ziembicki J, et al. Cell-spray auto-grafting technology for deep partial-thickness burns: Problems and solutions during clinical implementation. *Burns*, 2018;44(3):549-59.
49. Uzun H, Bitik O, Çalış M, Aksöyler DY, Üstün GG, Kösemehmetoğlu K, et al. Varenicline increases random flap survival in rats submitted to nicotine. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*, 2018;52(5):312-8.
50. Wood FM, Stoner ML, Fowler BV, Fear MW. The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: a one-step process. *Burns*, 2007;33(6):693-700.
51. Zabel DD, Feng JJ, Scheuenstuhl H, Hunt TK, Hussain MZ. Lactate stimulation of macrophage-derived angiogenic activity is associated with inhibition of Poly(ADP-ribose) synthesis. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 1996;74(3):644-9.