T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ



PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

KONDROKUTANÖZ KOMPOZİT GREFTLERİN SAĞKALIMININ ARTIRILMASINDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE GHRELİN'İN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Kutay DURUKAN

(UZMANLIK TEZİ)

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yiğit Özer TİFTİKCİOĞLU

İZMİR

2024

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ



PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

KONDROKUTANÖZ KOMPOZİT GREFTLERİN SAĞKALIMININ ARTIRILMASINDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE GHRELİN'İN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Kutay DURUKAN

(UZMANLIK TEZİ)

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yiğit Özer TİFTİKCİOĞLU

İZMİR

2024

ÖN SÖZ

EÜTF Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi bölümünde tamamladığım uzmanlık eğitim sürecinde bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, desteklerini üzerimden esirgemeyen, plastik cerrahi eğitimimde emekleri için, başta tezimin danışmanı olan hocam Sayın Prof. Dr. Yiğit Özer TİFTİKCİOĞLU'na ve değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Tahir GÜRLER' e, Sayın Prof. Dr. Z. Cüneyt ÖZEK'e, Sayın Prof. Dr. Ufuk BİLKAY'a ve Sayın Doç. Dr. Ahmet BİÇER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Plastik cerrahi eğitimimde üzerimde çok büyük emeği olan, sadece bir ameliyatın nasıl yapıldığını değil bir cerrahın nasıl düşünmesi ve vakalara nasıl yaklaşması gerektiğini de en iyi şekilde öğrenme fırsatı bulduğum Doç. Dr. Ersin GÜR abime en içten şükranlarımı sunarım.

Bana sadece cerrahi anlamda değil her türlü sıkıntımda abilik eden Op. Dr. Turgut Furkan KUYBULU başta olmak üzere beraber çalışma fırsatı bulduğum asistan abilerime ve tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Plastik cerrahi eğitimim esnasında arkadaşlığını ve desteğini daima üzerimde hissettiğim, zorlu süreçleri beraber atlattığım ve en sonunda da geri dönüp baktığımda beraber geçen yılları en güzel şekilde hatırladığım değerli ablam Op. Dr. Nargiz İBRAHİMLİ ve değerli arkadaşım Dr. Hamit Hakan BEKİR'e en içten teşekkürlerimi iletirim

Tezimin bilimsel içeriğinin hazırlanmasında her zaman destek olan Sayın Prof. Dr. Yiğit Özer TİFTİKCİOĞLU ve Sayın Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e; Sayın Prof. Dr. Tahir GÜRLER'e, Dr. Esat İMAN'a, Doktora Öğrencisi Ebru EROĞLU'na ve Vet. Hek. Fahri Emrah SOYLU'ya şükranlarımı sunarım.

Beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım, abi ve ablalarım olarak gördüğüm ve kendilerinden çok şey öğrendiğim ameliyathane hemşire ekibine ve aynı şekilde bölümümüzde beraber çalışma fırsatı bulduğum tüm hemşire, teknisyen ve klinik personeline teşekkürü borç bilirim.

Doğduğum günden bu yana, uzakta da olsalar, bana olan güven ve desteklerini daima hissettiğim, zora düştüğümde elimden tutan, iyi bir doktor ve en önemlisi iyi bir insan olmam için ellerinden gelen her şeyi yapan değerli annem ve babama sonsuz sevgilerimi sunarım.

Tıp fakültesinin ilk gününden uzmanlık tezimi noktaladığım bugüne kadar her daim yanımda olan, tıp fakültesinin, cerrahi asistanlığının ve benim en kötü zamanlarımı benimle omuzlayan; güçlü ve bir o kadar da sevgi dolu değerli hayat arkadaşım Esra'ya kalbimin derinliklerinden sevgilerimi sunarım.

Dr Kutay Durukan

İzmir, 2024

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... *I*
ÖZET ..... *III*
ABSTRACT ..... *V*
Keywords: Stem cell, Ghrelin, Cartilage, Grafts ..... *VI*
TABLOLAR LİSTESİ ..... *VII*
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... *VIII*
KISALTMALAR LİSTESİ ..... *X*
1. GİRİŞ *1*
2. GENEL BİLGİLER *4*
2.1. Greftler **4**
2.1.1. Deri greftleri 4
2.1.1.1. Prensipler 4
2.1.1.2. Kullanım alanları 5
2.1.2. Kompozit Greftler 6
2.1.2.1. Prensipler 6
2.1.2.2. Kullanım alanları 6
2.1.2.3. Teknik 7
2.1.3. Kompozit Greftlerin Sağ Kalım Mekanizması 8
2.1.4. Kompozit Greftler ile İlgili Deneysel Çalışmalar 9
2.1.5. Kompozit Greftlerin Klinik Kullanımı 10
2.1.5.1. Burun defektlerinin onarımı 10
2.1.5.2. Göz kapağı defektlerinin onarımı 11
2.2. Kök Hücreler **12**
2.2.2. Adipoz Doku Kökenli Kök Hücreler 14
2.3. Ghrelin **15**
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER *17*
3.1. Etik Kurul Onayı **17**
3.2. Adipoz Doku Kökenli Kök Hücreler **17**
3.2.1. İnsan Kökenli Adipoz Dokunun Temini ve Saklanması 17
3.2.2. Yağ doku Aspirasyon Materyalinden Mezenkimal Kök Hücrelerin Ayrıştırılması 18
3.2.3. Hücrelerin Ekspansiyonu 19
3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması 19
3.2.5. Canlılık Tayini 20
3.2.5.1. Tripan mavisi ile canlılık tayini; 20
3.2.5.2. Nanotek ArthurTM cihazıyla canlılık tayini; 20
3.2.6. Akım Sitometri ile İmmunfenotipleme 20
3.2.7. Kriyoprezervasyon Yöntemi 21
3.2.8. Stok Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözdürülmesi 21
3.2.9. Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması 21
3.2.10. MKH' lerin Karakterizasyonu 22

3.2.11. Oil Red O Boyama 23
3.3. Ghrelin 24
3.4. Deney Hayvanları ve Deneyin Yapıldığı Ortam 24
3.5. Kondrokutanöz Greft Modelinin Oluşturulması 25
3.6. Deney Grupları ve Cerrahi Modeller 28
3.7. Histolojik İnceleme 35
3.7.2. Işık Mikroskobu İçin Kesit Alma: 35
3.7.3. Histokimyasal Yöntem 36
3.7.3.1. Deparafinizasyon İşlemi: 36
3.7.3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi: 36
3.7.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler 39
3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi 39
4. BULGULAR 40
4.1. Makroskobik değerlendirme 40
4.1.1. Kontrol grubu 40
4.1.2. Plasebo grubu 43
4.1.3. Kök hücre grubu 45
4.1.4. Ghrelin grubu 46
4.1.5. Kök hücre + Ghrelin grubu 47
4.2. Histolojik değerlendirme 50
4.2.1. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyaması Bulguları 50
4.2.2. Masson Trikrom Boyaması Bulguları 51
4.2.3. İmmünohistokimyasal Boyama (VEGF) Bulguları 51
4.2.4. H&E ve Masson trikrom boyama bulguları; 51
4.2.5. Anti- VEGF 52
4.3. İstatiksel değerlendirme 53
4.3.1. Klinik bulguların istatiksel değerlendirmesi 53
4.3.2. Histolojik bulguların istatiksel değerlendirmesi 56
5. TARTIŞMA 63
6. SONUÇ 69
7. KAYNAKLAR 71
8. EKLER 81
Ek 1. Etik Kurul Onayı 81
Ek 2. Benzeşim Raporu 82

ÖZET

AMAÇ: Konjenital veya sonradan edinilmiş çeşitli durumlara bağlı fiziksel kusur veya deformitelerin yeniden normal yapı ve fonksiyona kavuşturulması, plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin temel amaçlarından biridir. Bu çalışmanın konusu olan kompozit greftler, nazal alar kanat, dış kulak heliksi ve parmak ucu defektleri başta olmak üzere kompozit yumuşak doku onarım ihtiyacı bulunan defektlerin rekonstrüksiyonunda 100 yıldan fazla süredir kullanılan bir alternatiftir. Literatürde, kompozit greftlerin kullanımındaki sınırlılığı aşmak ve greft sağ kalımını artırmaya yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmada literatürde yapılmış çalışmalara ek olarak kondrokutanöz kompozit greftlerin sağkalımında kök hücrelerin ve ghrelinin etkileri değerlendirilecektir. Ghrelin, en sık midede ve bunun dışında: epidermal hücreler, lenfositler ve makrofajlar dahil birçok hücrede üretilen bir hormondur. Leptin ile olan biyolojik ilişkisi ile inflamatuar süreçler, yara iyileşmesi ve anjiogenez üzerinde etkileri mevcuttur.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmada her grupta 7 tane olacak şekilde toplamda 35 tane, 12-16 hafta yaş aralığında, yaklaşık 300 gram olan, 18 adet erkek ve 17 adet dişi olacak şekilde, Wistar-Albino cinsi sıçan seçişmiştir. Çalışmada tüm gruplarda sıçan sol kulak heliksinden 1x1 cmlik kondrokutanöz greft alımı ve sıçan sırtı sol tarafında açılacak cilt altı cebe greftin yerleştirilmesi planlandı. Kontrol grubunda cerrahiye ek bir prosedür uygulanmadan greftler sıçan sırtı sağ tarafında açılacak cilt altı cebe inset edildi. Plasebo grubundaki her sıçana greftin inset edildiği cep içerisine serum fizyolojik subkutan olarak enjekte edildi. Kök hücre uygulanacak grupta yer alan sıçanlara greftin inset edildiği cep içerisine mezenkimal kök hücre ciltaltına uygulanacak şekilde enjeksiyon yapıldı. Ghrelin grubundaki her sıçana greftin inset edildiği cep içerisine ghrelin içeren solüsyon subkutan olarak enjekte edildi. Kök hücre + Ghrelin grubundaki her sıçana greftin inset edildiği cep içerisine ghrelin + mezenkimal kök hücre subkutan olarak enjekte edildi. Deney grupları 7 gün boyunca izlenmiş ve fotoğraflanmış, 7. Günün sonunda sakrifiye edilerek greftler histolojik olarak değerlendirilmek üzere ayrılmıştır.

BULGULAR: Çalışmanın sonunda toplam greft sağkalım yüzdesi açısından tüm grupların arasında seçilen tüm ölçüm yöntemlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. Yapılan istatiksel analizler sonucunda farklılıklar “Kontrol ile Kök hücre”,

“Kontrol ile Ghrelin”, “Kontrol ile Kök hücre+Ghrelin”, “Plasebo ile Kök hücre”, “Plasebo ile Ghrelin” ve “Plasebo ile Kök hücre+Ghrelin” gruplarından kaynaklandığı belirlenmiştir.

Bununla birlikte histolojik değerlendirmede de (VEGF) bakımından gruplar incelendiğinde gruplar arasında tüm bölge sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Yapılan verhofstad ölçeklemesinde PMNL infiltrasyon ölçümü dışındaki tüm ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

SONUÇ: Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, antiinflamatuar ve yara iyileşmesine yönelik olumlu yönde etkileri güncel literatürün de araştırma konusu olan Ghrelin’in; yüz bölgesinde yer alan ve estetik üniteleri de içine alan pek çok defektin rekonstrüksiyonunda kullanışlı bir alternatif olan kondrokutanöz kompozit greftlerin sağkalımındaki sınırlılıkları aşmak üzere tek başına ya da kök hücre gibi literatürde tanımlanmış olan diğer yöntemlerle birlikte kullanılabilecek alternatif bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Kök hücre, Ghrelin, Kıkırdak, greft

ABSTRACT

AIM: Reconstructions of physical defects or deformities due to various congenital or acquired conditions to normal structure and function is one of the main objectives of plastic, reconstructive and aesthetic surgery. Composite grafts, the subject of this study, have been used for more than 100 years in the reconstruction of defects in need of composite soft tissue repair, especially nasal alar wing, external ear helix and fingertip defects. There are many studies in the literature to overcome the limitations in the use of composite grafts and to increase graft survival. In this study, in addition to the studies in the literature, the effects of stem cells and ghrelin on the survival of chondrocutaneous composite grafts will be evaluated. Ghrelin is a hormone produced most commonly in the stomach, but also in many other cells including epidermal cells, lymphocytes and macrophages. Through its biological relationship with leptin, it has effects on inflammatory processes, wound healing and angiogenesis.

MATERIALS AND METHODS: In the study, a total of 35 Wistar-Albino rats (7 in each group), aged between 12-16 weeks, approximately 300 grams, 18 males and 17 females, were selected. In the study, it was planned to harvest a 1x1 cm chondrocutaneous graft from the left ear helix of the rat in all groups and to place the graft in a subcutaneous pocket to be opened on the right side of the rat back. In the control group, the grafts were inserted into the subcutaneous pocket to be opened on the right side of the rat back without any additional surgical procedure. In each rat in the placebo group, saline was injected subcutaneously into the pocket where the graft was inserted. Mesenchymal stem cells were injected subcutaneously into the pocket where the graft was inserted into the rats in the stem cell group. Each rat in the ghrelin group was injected subcutaneously with a solution containing ghrelin into the pocket where the graft was inserted. In the stem cell + ghrelin group, ghrelin + mesenchymal stem cells were injected subcutaneously into the pocket where the graft was inserted. The experimental groups were monitored and photographed for 7 days, and the grafts were sacrificed at the end of the 7th day and separated for histologic evaluation.

RESULTS: At the end of the study, it was determined that there was a statistically significant difference between all groups in terms of total graft survival percentage in all selected measurement methods. As a result of the statistical analysis, it was determined that the differences were due to the “Control and Stem cell”, “Control and Ghrelin”, “Control and Stem

cell+Ghrelin", "Placebo and Stem cell", "Placebo and Ghrelin" and "Placebo and Stem cell+Ghrelin" groups.

In addition, when the groups were examined in terms of (VEGF) in histologic evaluation, it was determined that there was a statistically significant relationship between the groups in all region results ($p<0.05$). In the verhofstad scaling, it was determined that there was a statistically significant relationship in all measurements except PMNL infiltration measurement ($p<0.05$).

CONCLUSION: When the data obtained as a result of our study are evaluated, we think that Ghrelin, whose anti-inflammatory and wound healing effects are the subject of research in the current literature, is an alternative method that can be used alone or in combination with other methods defined in the literature such as stem cells to overcome the limitations in the survival of chondrocutaneous composite grafts, which are a useful alternative in the reconstruction of many defects in the facial region, including aesthetic units.

Keywords: Stem cell, Ghrelin, Cartilage, Grafts

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3. 1: Mezenkimal Kök Hücrelerdeki yüzey belirteçlerinin % pozitif ekspresyonunun Flow sitometri sonuçları 22
Tablo 3. 2: Flow sitometride kullanılmış olan antikorlar 23
Tablo 3. 3: Işık mikroskobisi doku takibi. 35
Tablo 3. 4: Hematoksilen-Eozin yönteminin aşamaları 36
Tablo 3. 5: Masson Trikrom yönteminin aşamaları 37
Tablo 3. 6: İmmünohistokimya Boyaması 38

Tablo 4. 1: Kontrol grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi. 40
Tablo 4. 2: Plasebo grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi. 43
Tablo 4. 3: Kök hücre grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi. 45
Tablo 4. 4: Ghrelin grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi. 46
Tablo 4. 5: Kök hücre + Ghrelin grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi 47
Tablo 4. 6:Deneklerin Klinik Bulgularının Dağılımı 53
Tablo 4. 7: Deney Grupları Dikkate Alındığında Klinik Bulguların Dağılımı 53
Tablo 4. 8: Deney Grupları Dikkate Alındığında Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Ölçüm Çıktılarının Dağılımı 56
Tablo 4. 9: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad Ölçüm Çıktılarının Dağılımı 60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1:.....16

Şekil 3. 1: Deneğin kulak heliksinden kondrokutanöz kompozit greft almak üzere donör sahanın hazırlanışı. 26
Şekil 3. 2: Deneğin kulak heliksinden alınan 1x1 cm boyutunda kondrokutanöz kompozit greft.....26
Şekil 3. 3: Deneğin sırtında kompozit greftin inset edileceği sahanın hazırlanışı.....27
Şekil 3. 4: Deneğin sırtında kompozit greftin inset edileceği ciltaltı cep.....27
Şekil 3. 5: Deneğin sırtında oluşturulan ciltaltı cebe kompozit greftin inseti. 28
Şekil 3. 6: Plasebo grubundaki bir deneğe, subkutan olarak steril serum fizyolojik enjekte edilmesi.....29
Şekil 3. 7: Kök hücre grubundaki kullanılmak üzere hazırlanmış olan mezenkimal kök hücre. 30
Şekil 3. 8: Kök hücre grubundaki bir deneğe, cilt altına $5x10^6$ hücre barındıran 0,4 ml mezenkimal kök hücre enjekte edilmesi.....31
Şekil 3. 9: 20ng/kg ghrelin içeren solüsyon 32
Şekil 3. 10: Ghrelin grubundaki bir deneğe, subkutan olarak 20ng/kg ghrelin içeren solüsyon enjekte edilmesi. 33
Şekil 3. 11: Kök hücre + Ghrelin grubundaki bir deneğe, subkutan olarak 20ng/kg ghrelin içeren solüsyon ve $5x10^6$ hücre içeren 0,4 ml mezenkimal kök hücre enjekte edilmesi. 34

Şekil 4. 1: Kontrol grubundan Sıçan-6, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 41
Şekil 4. 2: Kontrol grubundan Sıçan-6, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 41
Şekil 4. 3: Kontrol grubundan Sıçan-7, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 42
Şekil 4. 4: Kontrol grubundan Sıçan-7, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 42
Şekil 4. 5: Plasebo grubundan Sıçan-2, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 43
Şekil 4. 6: Plasebo grubundan Sıçan-3, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 44
Şekil 4. 7: Kök hücre grubundan Sıçan-6, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 45
Şekil 4. 8: Ghrelin grubundan Sıçan-3, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü.....46
Şekil 4. 9: Kök hücre + Ghrelin grubundan Sıçan-2, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 47
Şekil 4. 10: Kök hücre + Ghrelin grubundan Sıçan-2, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 48
Şekil 4. 11: Kök hücre + Ghrelin grubundan Sıçan-1, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 48
Şekil 4. 12: Kök hücre + Ghrelin grubundan Sıçan-1, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü 49
Şekil 4. 13: Deney gruplarının Hematoksilen&Eozin boyamasına ait fotomikrograflar. 50
Şekil 4. 14: Deney gruplarının Masson Trikrom boyamasına ait fotomikrograflar. 51
Şekil 4. 15: Deney gruplarının VEGF immünohistokimyasal boyamasına ait fotomikrograflar. 51
Şekil 4. 16: Denek Gruplarına Göre Sağkalım Görülen Alanlarının Dağılımı 54
Şekil 4. 17: Deney Grupları Dikkate Alındığında Nekroz Görülen Alanlarının Dağılımı.....55
Şekil 4. 18: Denek Gruplarına Göre Toplam Sağkalım Yüzdesinin Dağılımı 55
Şekil 4. 19: Denek Gruplarına Göre VEGF-1 Ölçümlerinin Dağılımı.....57

Şekil 4. 20: Denek Gruplarına Göre VEGF-2 Ölçümlerinin Dağılımı 58
Şekil 4. 21: Deney Grupları Dikkate Alındığında VEGF-3 Ölçümlerinin Dağılımı 58
Şekil 4. 22: Denek Gruplarına Göre VEGF-4 Ölçümlerinin Dağılımı 58
Şekil 4. 23: Denek Gruplarına Göre VEGF-5 Ölçümlerinin Dağılımı 59
Şekil 4. 24: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad-Ödemin Dağılımı 61
Şekil 4. 25: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad-Damar Hasarlanmasının Dağılımı 61
Şekil 4. 26: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad-Kıl Kökü Hasarlanmasının Dağılımı 62
Şekil 4. 27: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad-Glandula Sebasea Hasarlanmasının Dağılımı 62

KISALTMALAR LİSTESİ

ADSC:	Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre
AD-MSC:	Adiposit Derive – Mezenkimal Kök Hücre
BSA:	Bovine Serum Albumin
CD:	Cluster of Differentiation
cm:	Santimetre
dk:	Dakika
DMEM:	Dulbecco Modified Eagle Medium
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
EÜ:	Ege Üniversitesi
EÜTF:	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
FBS:	Fetal Bovine Serum
HEPES:	Hydroxyethyl-piperazineethane-sulfonic acid buffer
ISCT:	International Society for Cell Therapy
kg:	Kilogram
Max:	Maksimum
MEM α:	Minimum Essential Medium α
mg:	Miligram
Min:	Minimum
ml:	Mililitre
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PMNL:	Polimorfonükleer Lökosit
SS:	Standart Sapma
SVF:	Stromal Vascular Fraction
TGF:	Transforming Growth Factor
TNF:	Tumor Necrosis Factor
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Konjenital veya sonradan edinilmiş çeşitli durumlara bağlı fiziksel kusur veya deformitelerin yeniden normal yapı ve fonksiyona kavuşturulması, plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin temel amaçlarından biridir. Bu amaca yönelik kullanılabilecek birçok alternatif yöntem mevcut olmakla birlikte bu çalışmanın konusunu kompozit greftler oluşturmaktadır(1).

Kompozit greft konseptini daha iyi anlamak için öncelikle greft kavramı iyi anlaşılmalıdır. Greft; aynı canlıda ya da farklı canlılar arasında, vücutta bir bölgeden başka bir bölgeye kendi kan dolaşımı olmayan dokunun aktarımıdır. Kendi kan dolaşımına sahip olmayan bu doku, aktarıldığı bölgede neovaskülarize olarak canlılığını sürdürür(2).

Lokal fleplerin rekonstrüksiyon seçeneği olarak kullanılamadığı defektlerde greftler bir alternatif olarak değerlendirilebilmektedir. Daha üst rekonstrüktif basamaklara uygun olmayan hasta gruplarında da alternatifler arasında değerlendirilebilmektedir. Tam kalınlıktaki deri greftleri, kısmi kalınlıktaki greftlerle karşılaştırıldığında genellikle alıcı sahadaki deriyle daha iyi renk ve doku uyumuna sahiptir; bunun yanında kısmi kalınlıktaki greftler daha düşük metabolik gereksinime ve daha yüksek hayatta kalma oranına sahiptir(3).

Greftler deri, kıkırdak, kemik vb. gibi tek bir doku tipini içrebileceği gibi bu dokuları kombine şekilde de içerebilmektedir. Birden fazla dokunun birlikte kullanıldığı greftler "kompozit greft" olarak tanımlanmaktadır. Kompozit greftler renk ve doku uyumu açısından deri greftlerine göre daha iyi sonuçlara sahiptir. Ayrıca 2 ya da daha fazla doku tipinin aktarımına imkân tanıması sayesinde daha az skar kontraktürü görülmektedir(1).

Lokal flepler, kompozit greftler ve kulaktan serbest flepler dahil olmak üzere burun defektlerinin onarımında tanımlanmış çok sayıda yöntem mevcuttur (4–17).

Bu çalışmanın konusu olan kompozit greftler, nazal alar kanat, dış kulak heliksi ve parmak ucu defektleri başta olmak üzere kompozit yumuşak doku onarım ihtyacı bulnan defektlerin rekonstrüksiyonunda 100 yıldan fazla süredir kullanılan bir alternatiftir.

Günümüzde travma ve tümör rezeksiyonu sonucu oluşan nazal alar kanat defektlerinde özellikle kondrokütanöz kompozit greftler rekonstrüksiyon alternatifleri arasında yer almaktadır.

Bu tarz defektlerin rekonstrüksiyonunda kompozit greftlerin tercih edilmesinin başlıca nedenleri:

- 3 boyutlu olması;
- Barındırdığı kıkırdak komponent sayesinde alıcı sahada iskelet desteği sağlayabilmesi;
- Alıcı saha ile renk ve şekil uyumluluğu sağlaması;
- Düşük donör saha morbiditesine sahip olmasıdır(18).

Literatürde, avülse olan dokuların kompozit greft olarak alıcı sahaya inset edildiği ve başarılı sonuçların raporlandığı çalışmalar mevcut olmakla birlikte; kompozit greftlerin klinik kullanımı ile ilgili bahsedilmesi gereken çalışma, 1887'de König tarafından cilt ve yağ dokuyu içeren kompozit greft kullanımının tanımlandığı çalışmadır(19–21).

Kompozit greftlerin uygulanmasındaki en büyük kısıtlayıcı faktör alıcı sahadaki defekt çapıdır. Defektin çapı büyüdükçe greft sağ kalım oranları belirgin oranda düşmektedir. Yapılan çalışmalarda, 1,5 cm'den büyük greftlerle başarılı sonuçlar raporlanmış olsa da en iyi sağ kalımın 0,75 ile 1,5 cm arasındaki çaplarda elde edildiği raporlanmıştır(1,22).

Yapılan çalışmalarda düşük greft sağ kalımının temelinde kısıtlı revaskülarizasyonun yer aldığı görülmektedir(23–25).

Literatürde, kompozit greftlerin kullanımındaki sınırlılığı aşmak ve greft sağ kalımını artırmaya yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda, kompozit greft uygulamalarına ek olarak antioksidan etkili ve yara iyileşmesine pozitif etkileri bulunan deferoksamin(26–28), doku oksijenasyonunu artıran hiperbarik oksijen terapisi(29–32), dimetilüre, indometazin ve malatonin gibi ajanlar(33), lokal PRP uygulamaları(34), greftin inset edlmesinin ardından alıcı sahaya soğuk uygulama(23), sistemik perioperatif kortikosteroid uygulaması(35–37), insan kökenli kök hücre uygulamalarının(38) ve kompozit greft üzerinde

dermal pedikül oluşturma gibi teknik modifikasyonların(39) greft sağ kalımına etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmada literatürde yapılmış çalışmalara ek olarak kondrokutanöz kompozit greftlerin sağkalımında kök hücrelerin ve sık bilinen kaynağı mide dışında epidermal hücreler, lenfositler ve makrofajlar dahil birçok hücrede üretilen ve leptin ile olan biyolojik ilişkisi ile inflamatuar süreçler, yara iyileşmesi ve anjiogenez üzerinde etkili olan, ghrelinin etkileri değerlendirilecektir(40–42).

Literatürde ghrelinin, sıçanlarda üreteral obstrüksiyona bağlı renal fibrozise karşı(43), farelerde lipopolisakkaritin neden olduğu nonalkolik steatohepatite (44) ve psoriazis benzeri deri inflamasyonuna karşı (40) ve alveolar makrofajlar üzerindeki etkisi yoluyla sepsis kaynaklı akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) karşı (45) etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Tek bir doku komponentinden oluşan greftlerin aksine kompozit greftlerin, beslenmesinin sadece plazma imbibisyonu tarafından tamamen sürdürülemeyecek kadar büyük bir doku kütlesi içerdiği ve bunun da düşük sağkalımoranları ile yakın ilişkili olduğu konusunda literatürde fikir birliği oluşmuştur(55).

Tüm bu faktörler göz önüne alındeığında, bu çalışma ile hem kondrokutanöz greft sağ kalımının artırılmasında yeni bir alternatif tanımlanması hem de ghrelinin etkileri ile ilgili literatür bilgisine katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Greftler

Deri greftleri ve kompozit greftlerin özellikle yüz bölgesinde yer alan defektlerin rekonstrüksiyonunda geniş bir kullanım alanı mevcuttur. Lokal fleplerin rekonstrüksiyon seçeneği olarak kullanılamadığı defektlerde ve daha üst rekonstrüktif basamaklara uygun olmayan hasta gruplarında da alternatifler arasında değerlendirilebilmektedir. Her cerrahi girişimde olduğu gibi bu seçeneklerin tercih edildiği hastalarda da iyi bir cerrahi planlama ve hastanın yapılacak işlem ile ilgili ayrıntılı bilgilendirilmesi yapılacak işlemin başarısı için çok önemlidir.

2.1.1. Deri greftleri

2.1.1.1. Prensipler

Deri greftleri, tam kalınlıkta epidermis ve değişen miktarlarda dermiş tabakasından oluşur. Deri greftlerinin sınıflaması da içerdikleri dermiş kalınlığına göre yapılmaktadır. Kısmi kalınlıkta bir deri grefti epidermis ve değişken miktarlarda dermis içerirken, tam kalınlıkta deri grefti, farklı olarak dermis tabakasının tamamını içerir(46).

Yaş, cinsiyet ve bulunduğu vücut bölgesine göre deri kalınlığı farklılık göstermektedir. Yenidoğanın deri kalınlığı yetişkininkinden yaklaşık 3,5 kat daha ince olup, beş yaş civarında yetişkin kalınlığına yaklaşmaktadır. Cinsiyet açısından, kadın cildi erkeklerden daha ince yapıdadır. Bulunduğu yere göre değerlendirildiğinde ise, en ince deri göz kapaklarında, en kalın deri ise avuç içi ve ayak tabanlarında yer almaktadır(47).

Deri greftleri donör sahadaki dolaşımını sağlayan vasküler sistemden ayrılarak kendine ait bir dolaşım kaynağı olmaksızın uygun alıcı sahaya taşınır. Kendine ait bir dolaşım kaynağı olmaması ve alıcı sahadan revaskülarizasyon ile beslenmesini sağlaması nedeniyle greft ile rekonstrüksiyonda optimal sonuca ulaşılması için greft ve alıcı saha açısından yapısal ve boyutsal kısıtlamalar mevcuttur.

Greftin alıcı sahaya adaptasyonu ve beslenmesini sağlayacak dolaşım kaynağının oluşması sürecinde gözlenen 3 temel aşama vardır:

(1) besin maddelerinin diffüzyon yoluyla plazmadan emildiği “plazma imbibisyonu” (0-48 saat);

(2) alıcı sahada yer alan damar tomurcuklarının greftte var olan kapiller ağ ile anostomozlar kurması (> 24-48 saat); ve

(3) greftte yeni vasküler ağların oluştuğu neovaskülarizasyon basamağı (> 72 saat)(48).

2.1.1.2. Kullanım alanları

Yüz bölgesindeki defektlerin rekonstrüksiyonunda; deri greftleri, lokal fleplerle kıyaslandığında renk ve doku uyumu açısından daha kötü sonuçlara sahiptir. Özellikle kısmi kalınlıktaki deri greftleri çevre dokuya göre atrofik bir görünüm oluşturmakla birlikte komşu deriyle karşılaştırıldığında daha parlak bir görünüme sahiptirler. Ayrıca travma ya da yara yeri enfeksiyonu durumlarında retraksiyon ve sonucunda kontraktür görülme olasılığı daha yüksektir [4]. Tam kalınlıktaki deri greftleri ise daha iyi renk ve doku uyumuna sahip olup lokal travmaya daha dayanıklıdır, ancak iyileşme sürecinde daha yüksek metabolik ihtiyaca sahip olması nedeniyle kısmi ya da tam greft kaybı oranları daha yüksektir(49).

Greft ile rekonstrüksiyonun öncelikli olarak planlandığı durumlar:

(1) Alan açısından geniş ancak daha ince bir doku ile onarım ihtiyacı;

(2) lokal fleplerin kullanılamadığı; veya

(3) Hastanın daha üst rekonstrüktif basamakları kabul etmediği durumlar,

olarak sıralanabilmektedir(49).

2.1.2. Kompozit Greftler

2.1.2.1. Prensipler

Kompozit greftler, çoğunlukla deri, kıkırdak ve diğer dokular olmak üzere iki veya daha fazla dokuyu içermektedir. İçerdikleri doku komponentleri sayesinde cilt defektinin rekonstrüksiyonuna ek olarak, yumuşak dokuya iskelet desteği sağlayabilirler. Ancak kompozit greftlerin metabolik ihtiyacının daha yüksek olması nedeniyle greft kayıp oranları deri greftlerine göre daha yüksektir(50).

Greftin alıcı sahada en optimal şekilde beslenmesi amacıyla alıcı zeminle temas eden yüzeyinin 5mm den küçük olmaması ve greft boyutunun 1cm'i aşmaması önerilmektedir(46).

Revaskülarizasyon süreci deri greftlerine benzemekle birlikte yeni oluşan vasküler ağ kıkırdak yapı içerine invazyon göstermemektedir. Bu nedenle kompozit greftlerin sağ kalımında en önemli faktör revaskülarize olabilen doku komponentlerinin iyi bir şekilde revaskülarize olmasına bağlıdır. İyi bir planlama ve titiz cerrahi teknik bu konudaki en temel iki unsurdur. Bunlara ek olarak, hasta seçiminde de dikkat edilmesi gereken noktalar mevcut olup şu şekilde sıralanabilmektedir:

- Hastanın yaşının < 65 olması,
- Tütün ürünü kullanmaması
- Revaskülarizasyon basamağını ve yara iyileşmesini negatif yönde etkileyecek sistemik hastalıklarının olmaması(46).

2.1.2.2. Kullanım alanları

Kompozit greftler sadece iyi renk ve doku uyumu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda belirli bir miktarda şekillendirme ve destek gerektiren küçük defektleri rekonstrükte etmek için kullanılır. Greftin revaskülarizasyonunu iyileştirmek ve sağ kalımını artırmak için rekonstrüksiyon deri flebi ile kombine edilebilir(51).

Deri ve kıkırdak dokuyu birlikte içeren kondrokutanöz kompozit greftlerde, daha yüksek deri/kıkırdak oranı sağlanması halinde tam kalınlıkta deri greftine benzer greft davranışı

elde edilebilmekte ve greft sağkalımını artmasının yanında daha büyük bir greft kullanılmasına imkân tanır(46).

Kompozit greftler sıklıkla göz kapağı, kulak kepçesi, burun alar kanatı, kolumellada yer alan küçük, tam veya kısmi kalınlıktaki defektlerin onarımında kullanılır(3).

2.1.2.3. Teknik

Kompozit greft alınması ve hazırlanması teknik olarak zor olmamakla birlikte bu onarımların başarısı için iyi bir planlama şarttır. Planlama aşamasında dikkate alınması gereken önemli bir nokta, kompozit greftlerin önemli ölçüde kontraksiyona eğilimli olmasıdır; bu durum dikkate alınmadığı takdirde hedeflenen estetik ve fonksiyonel sonuçlara ulaşılamayacaktır. Bu nedenle, bu greftler kontraksiyonu kompanze edecek şekilde defekte göre daha büyük boyutta planlanmalıdır(3).

Rekonstrüksiyonun ilk adımı defektin optimal şekilde hazırlanması ve alıcı sahanın optimal vaskülarizasyonunun sağlanmasıdır. Bu amaçla Baker, öncelikle yaranın sekonder iyileşmeye bırakılmasını, ardından ikinci aşamada aralıklı de-epitelizasyon ile alıcı sahanın hazırlanmasını savunmaktadır(46).

Daha sonra, donör alan seçilerek greft, kontraksiyon miktarı da göz önüne alınarak defektten büyük boyutta olacak şekilde tasarlanır. Greft eksize edildikten sonra uygun hemostaz sağlanır. Donör alan katman katman onarılır. Greft defekte uygun şekillendirildikten alıcı sahaya insete hazır hale getirilir. Alıcı sahada dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta hemostaz esnasında doku koterizasyonunun minimum yapılmasıdır. Greft üzerindeki gerginliği ve doku stresini en az miktarda tutmak için inset esnasında mümkün olan en az sayıda ve en düşük kalınlıkta dikişler tercih edilmelidir(46).

Greft inset edildikten sonra aralıklı olarak atravmatik şekilde temizlenmeli ve antibiyotikli merhemle nemli tutulmalıdır. Sağlıklı bir şekilde iyileşmiş greftler genellikle İlk ameliyattan sekiz ila on iki hafta sonra, şekillendirme veya dermabrazyon yoluyla küçük revizyonlara imkân tanımaktadır.

2.1.3. Kompozit Greftlerin Sağ Kalım Mekanizması

Kompozit greftin çevre dokudan beslenmesini sağlaması, greftin donör sahadan alındığı andan revaskülarizasyon süreci tamamlanana kadar zayıftır. Greftin çevre dokudan beslenmesinin üç mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir:

(1) Plazma imbibisyonu;

(2) Alıcı saha ve greft arası vasküler sistem arası oluşan anostomozlar;

(3) Alıcı sahada yer alan kapillerlerin greft içerisine penetrasyonu(52–56).

Goldman tarafından tanımlandığı gibi plazma imbibisyonunun deri greftlerinin erken dönem beslenmesinde önemli bir rol oynadığı düşünülse de kompozit greftlerin, beslenmesinin sadece plazma imbibisyonu tarafından tamamen sürdürülemeyecek kadar büyük bir doku kütlesi içerdiği konusunda literatürde fikir birliği oluşmuştur(55).

Ancak kompozit greftin barındırdığı, özellikle de kıkırdak ve fasya gibi, düşük metabolik gereksinime sahip doku komponentlerinin beslenmesi plazma imbibisyonu tarafından sağlanabilmektedir.

Davis ve Traut (57) 1925 yılında köpeklerde deri grefti ile alıcı bölgedeki damarlar arasında oluşan anastomozların mikroskobik kanıtını ortaya koymuşlardır. 1955 yılında McLaughlin (56) burun alar kanat defektlerinde kompozit greft kullanımı ile ilgili hasta serisi raporlamıştır. Bu çalışmada Greftin "ölü beyaz" göründüğü altı saatlik bir sürenin ardından, greftte pembe bir renk gözlemleyen McLaughlin, bunu alıcı saha ile greft arasında erken dönemde oluşan anostomozların greftin beslenmesine katkıda bulunduğunun kanıtı olarak değerlendirdi. Ballantyne ve Converse(54) tarafından gerçekleştirilen histolojik ve stereomikroskobik bir çalışmada, civciv embriyo damarları ile tavşan kulaklarından alınan kompozit greft damarları arasında oluşan anastomozlar gösterilmiştir. Çalışmanın devamında greft damarlarında belirgin dejenerasyon görülmüş olupı; bu da yazarlara, greftin kesin beslenmesinin, alıcı sahadaki damarların greft içerisine penetrasyonuna güçlü bir şekilde bağlı olduğunu düşündürmüştür. Converse ve Ballantyne (58), difosfopiridin nükleotid dehidrojenaz aktivitesine dayanan canlılık çalışmalarında, deri grefti damarlarında belirgin dejenerasyon ve alıcı sahadaki damarlarının greft içerisne penetrasyonu gösterilmiş; 24 saat sonra alıcı saha

damarları deri grefti dermisine nüfuz ettiği ve üçüncü veya dördüncü günde greftin, alıcı bölgedeki damarlar tarafından revaskülarize olduğu görülmüştür.

2.1.4. Kompozit Greftler ile İlgili Deneysel Çalışmalar

DeHaan ve Stark (59) 1961 yılında Yeni Zelanda beyaz tavşanlarında histamin iyontoforezinin kullanıldığı deneysel bir hayvan modelinde kompozit greftlerin sağ kalımını değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada greft inset edilmeden önce alıcı sahanın 1 hafta öncesinden hazırlandığı vakalarda kas ve deri komponentini içeren kompozit greft sağ kalımınının daha yüksek olduğu raporlanmıştır.

1977'de MacCollum ve Grabb(60), deri ve kıkırdak komponentleri içeren kondrokutanöz kompozit greftlerde alıcı sahanın önceden hazırlanmasının etkisini incelendiği bir çalışma yayınlanmıştır. Rhesus maymunu modelinin kullanıldığı bu çalışmada, alıcı sahanın 10 gün önceden hazırlandığında kulak heliksinden alınan kondrokutanöz kompozit greftlerde %88'lik bir sağkalım oranı, önceden hazırlanmamış alıcı sahanın kullanıldığı kompozit greftlerde ise %22'lik bir sağkalım oranı raporlanmıştır.

Perioperatif sistemik steroid uygulamasının domuz (61) ve tavşan (62) modelinde çalışılmış ve yapılan çalışmalrın sonucunda bu uygulamanın kompozit greft sağ kalımında anlamlı iyileşme sağladığı raporlanmıştır.

1987'de Hartman ve Goode (37) tarafından tavşan kulağı modelinde sistemik metilprednizolon uygulamasının kompozit greftlerin sağkalımına etkisinin araştırıldığı çalışmada; hayvanlara ameliyat sonrası ilk 4 gün boyunca, ilk doz ameliyattan hemen sonra olacak şekilde, günde 30 mg/kg IM metilprednizolon uygulanmış. Steroid tedavisi uygulanan deney grubunda greft yüzey alanının ortalama %75,4'ünde sağkalım gözlenmiş olup kontrol grubunda ise bu oran %41 olarak raporlanmıştır.

Daha yakın zamanda, aynı tavşan kulağı deney modelini kullanan Aden ve Biel (36) tarafından ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası 7 gün boyunca metilprednizolon uygulanan grupta greft sağ kalımında anlamlı bir iyileşme olduğu raporlanmıştır. Steroid grubunda greft sağ kalım oranı %71 olarak raporlanırken ameliyat öncesi tek doz salin uygulanan grupta sağ kalım %23 olarak raporlanmıştır. Ameliyat sonrası 3 günlük metilprednizolon tedavisi alan

grupta aynı kontrol grubundan daha iyi bir sonuç elde edilmediği ve sağ kalım oranının %32 olduğu raporlanmıştır.

Yücel ve ark. (63), kondrokütanöz kompozit greftlerin sağ kalımının artırılmasında ve daha büyük kompozit greftlerin kullanımına yönelik adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AD-MKH) kullanımının etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada sıçanlarda kompozit greft deney modeli oluşturulmuş ve alıcı sahaya önceden değil greft insetinden hemen önce AD-MKH uygulanan deney grubunda makroskobik olarak kompozit greftlerde total nekroz oluştuğu, alıcı sahaya önceden AD-MKH uygulanan deney grubunda ise daha yüksek greft sağ kalım oranı ve greftte daha az kontraktür oluştuğu gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda AD-MKH uygulaması ile greft inseti arasında 4 gün beklenmesi durumunda AD-MKH'lerin grefti sağ kalımını ölçüde artırabileceği raporlanmıştır.

2.1.5. Kompozit Greftlerin Klinik Kullanımı

2.1.5.1. Burun defektlerinin onarımı

Burun defektlerinin onarımında kompozit greftlerin kullanımı ile ilgili ilk çalışma, alar kanatta yer alan defektleri onarmak için kondrokutanöz kompozit kulak greftleri kullanan ve %53'lük bir greft sağkalım oranı bildiren Konig (64) tarafından 1914 yılında yayınlanmıştır. Günümüze kadar geçen süre içerisinde greft fizyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar sayesinde sağ kalıma etki eden faktörler daha iyi analşılmış olup daha yüksek greft sağ kalım oranları elde edilmeye başlanmıştır.

Kulak heliksi kendine özgü şekli ve yapısı sayesinde, çeşitli burun defektlerinin onarımında kullanılabilecek kondrokutanöz kompozit greftler için oldukça kullanışlı bir donör saha alternatifi görevi görmektedir (46).

Burun alar kanat defektleri için en uygun kompozit greft donör sahası, defektin lokalizasyonu ve hangi doku katmanlarının dahil olduğuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Burun alar kanatta küçük boyutlu ve tam kalınlıkta bir defekt ya da kolumellada yer alan defektler için için dış kulak heliksinin kökünden alınacak bir kondrokutanöz kompozit greft onarım için kullanılabilir. Daha lateral yerleşimli ve çoğunlukla fibro-yağlı doku içeren defektler için dış kulak lobülünden alınacak kompozit greftler kullanılabimektedir. Tragus ve anti-tragustan alınacak kompozit greftler alar rim boyunca kalınlığı az olan defektlerin onarımında kullanılabilmektedir. Nostrillerde yer alan darlığın düzeltilmesinde sağlam yapısal

destek sağlayacak bir grefte ihtiyaç vardır; dış kulak trianguler fossadan alınacak kompozit greft bu alanın onarımı için oldukça uygundur (46).

Kompozit grefte ek olarak lokal fleplerinde kullanılacağı daha büyük defektlerde, ilk aşamada lokal flebin yapılması, iyileşme süreci tamamlandıktan sonra ikinci aşama olarak kompozit greftin uygulanması yararlı olabilmektedir (46). Bu uygulama ile iyileşme sürecinde greft üzerindeki gerilim minimum seviyede tutulmuş olur.

2.1.5.2. Göz kapağı defektlerinin onarımı

Göz kapağında yer alan defektlerin rekonstrüksiyonu, göz kapağının estetik hedefleri ve kompleks fonksiyonel gereklilikleri nedeniyle oldukça karmaşıktır. Rekonstrüksiyon sürecinde, onarım ihtiyacı duyulan katmanlar şu şekilde ayrı ayrı ele alınmalıdır:

- ön lamel (deri ve orbicularis oculi kası),
- septum ve
- arka lamel (tarsal plak ve konjonktiva).

Göz kapağı onarımında kompozit greftler en sık tarsal defektlerin rekonstrüksiyonunda kullanılmaktadır (65).

Göz kapağında farklı katmanların onarımı için kompozit greftler lokal fleplerle birlikte kullanılabilmektedir. Örneğin geniş, tam kat alt göz kapağı defekti olan bir hastada arka lamelin onarımında kompozit greft; buna ek olarak ön lamelin onarımında lokal flep kullanılabilir.

İlk olarak 1951'de Callahan (66) tarafından tam kat göz kapağı defektlerinin rekonstrüksiyonunda karşı taraf göz kapağından alınan beşgen şekilli bir kompozit greft tekniği raporlanmıştır.

Göz kapağı onarımında kullanılan kompozit greftler diğer greftlerden farklı olarak; ameliyat sonrası göz kapağının-göz küresi ile ilişkisini bozmadan bir miktar gerilime sahip olacak şekilde tasarlanmalıdır. Bu nedenle, greft iyileşirken sütur hatlarındaki aşırı gerilimi önlemek için destekleyici dikişlerin veya pansumanların kullanılması gerekli olabilir (65).

Bu teknikte, göz kapağının gevşekliğine ve greftin boyutuna bağlı olarak donör saha defekti primer olarak kapatılabilir veya kapatmayı kolaylaştırmak için lateral kantotomi yapılabilir. Bu yazarların uygulamalarında göz kapağındaki küçük defektlerin primer onarımı ile alınan sonuçların iyi olması ve daha büyük defektlerde de rotasyon-ilerletme fleplerinin daha kullanışlı olması nedeniyle bu tür greftlerin kullanımı nadirdir. Bu durumda, primer onarım ve lokal flep kullanıldığında karşı göz kapağında donör saha morbiditesi oluşmamasının da etkisi mevcuttur.

Yalnızca arka lamel rekonstrüksiyonu amacıyla tarsokonjonktival fleplere alternatif olarak nazal septal mukokondral kompozit greft de benzer şekilde kullanılabilir (67).

Göz kapağı onarımları içerisinde alt göz kapağının kirpik komponenetinin onarımında kaştan alınan ve göz kapağı kenarı boyunca inset edilen ince bir kompozit greftin kullanımı mümkündür (68).

Göz kapağının zengin damar desteği greftin sağ kalım oranını artırmaktadır.

2.2. Kök Hücreler

Kök hücreler; yenilenme ve farklı hücre tiplerine dönüşebilme özelliği olan farklılaşmamış hücrelerdir (69).

Köken aldıkları kaynağa göre, embriyonik tip ve erişkin tip kök hücreler olarak iki temel gruba ayrılabilmektedir (70).

En sınırlı farklılaşma yeteneğine sahip olup sadece tek tip hücre grubuna farklılaşma yeteneğine sahip hücreler unipotent kök hücreler olarak adlandırılmaktadır. Bu grup hücrelere verilebilecek en uygun örneklerden biri dermatositlerdir (71).

Belirli sayıda hücre grubuna farklılaşma yeteneğine sahip hücreler oligopotent kök hücreler olarak adlandırılmaktadır(71).

Farklılaşma yeteneği bakımından bir üst hücre grubu olarak değerlendirilebilen pluripotent kök hücrelere göre daha kısıtlı farklılaşma yeteneğine sahip hücreler multipotent kök hücreler olarak adlandırılmaktadır(71).

Bu grup hücrelere verilebilecek en uygun örneklerden biri hematopoetik kök hücrelerdir.

Ekstraembriyonik yapılara farklılaşma özelliğine sahip olmayan kök hücreler pluripotent hücreler olarak adlandırılmaktadır(71,72).

Bu grup hücrelere verilebilecek en uygun örneklerden biri embriyonik kök hücrelerdir.

Son olarak en yüksek farklılaşma kapasitesine sahip; pluripotent hücrelerden farklı olarak embriyonik ve ekstra-embriyonik yapılara farklılaşabilme yeteneğine sahip olan kök hücreler totipotent kök hücreler olarak adlandırılmaktadır (71).

Bu grup hücrelere verilebilecek en uygun örneklerden biri, insan organizmasının tamamına farklılaşma yeteneğine sahip olan zigottur.

2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler içerisinde önemli bir grup olan mezenkimal kök hücreler; göbek kordonu, endometriyum ve yağ dokusu gibi farklı doku kaynaklarından temin edilebilmektedir (70).

Bunun yanında, kendini yenileyebilen, hematopoetik ve yağ doku gibi farklı hücre gruplarına farklılaşabilen multipotent kök hücrelerdendir (73).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cell Therapy (ISCT)) ‘ne göre mezenkimal kök hücreler;

- Kültür oluşturulduğunda plastik yüzeylere tutunabilmeli,

- Yüzey belirteci olarak CD90, CD73, CD105’i eksprese ederken; CD19, CD34, CD45, CD11b, CD14, HLA-DR’ı eksprese etmemeli,

- Osteoblast ve kondroblast ve adipositlere dönüşebilmelidir (74).

Mezenkimal kök hücrelerin farklı doku kaynaklarından temin edilebilmesi ve farklı tipteki hücre gruplarına farklılaşabilmesi, MKH'lerin klinik uygulamalar ve deneysel çalışmalardaki kullanılabilirliğini artırmaktadır (70).

Mezenkimal kök hücre kaynağı olarak günümüzde en sık kullanılan dokular arasında; kemik iliği, adipoz doku ve kordon kanı yer almaktadır (75).

2.2.2. Adipoz Doku Kökenli Kök Hücreler

Adipoz doku kökenli kök hücreler, erişkin mezenkimal kök hücre grubundan olup (60) adiposit, osteoblast ve kondrosit farklılaşabilmektedirler (76).

İnsan kökenli adipoz doku kökenli kök hücrelerin dokudan izolasyonu ilk olarak Zuk ve ark. tarafından 2001 yılında tanımlanmıştır (77).

Bu fibroblast benzeri iğsi yapıdaki hücreler, 2006 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT) tarafından adipoz doku kökenli stromal kök hücreler şeklinde isimlendirilmiştir(78).

Bu hücreler yüzey belirteçleri açısından incelendiğinde; CD73, CD90, CD105 ekspresyonu görülürken, CD11b, CD14, CD34, CD45'i eksprese etmediği görülmektedir (76).

Bunun yanında kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerden farklı olarak PW1 belirtecini eksprese edebilmektedir (74).

Adipoz doku kökenli kök hücreler; yağ dokusundan kolayca temin edilebilmeleri ve elde edildikleri donör sahada minimal morbidite görülmesi, hücre ayrımının ve kültürlemesinin kolaylığı gibi sebeplerle kök hücre çalışmaları için önemli bir kaynak görevi görmektedir (79,80).

Bunun yanında yapılan çalışmalarda, yağ doku donorünün yaşı, cinsiyeti, vücut kitle indeksi ve kronik-sistemik hastalık varlığı adipoz doku kökenli kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma yeteneği üzerinde etkili olduğu görülmüştür (81).

Literatürde yer alan çalışmalarda adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin; hücresel apoptozisi ve doku inflamasyonunu azalttığı, anjiogenezi artırdığı ve dokularda serbest oksijen radikallerine karşı protektif etkileri olduğu gösterilmiştir (82).

Apoptozis üzerine olan etkilerini, anti-apoptotik proteinlerin üretimini arttırarak sağladıkları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (76).

Adipoz doku kökenli kök hücreler; transforming growth factor β1 (TGF-β1), VEGF, anijogenin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 gibi pek çok faktör ile anjiogenez üzerine etki etmektedir. Bu hücrelerin anjiogeneze sadece faktörler ile değil; damar duvarı ssağlamlığı ve sızıntıları önlemede görev alan perisite benzeyen hücrelere dönüşebilme kapasiteleri ile de etki ettiklerini gösteren çalışmalar da mevcuttur (74).

Vücutta doku hasarı, inflamasyon ya da doku hipoksisi geliştiğinde adipoz doku kaynaklı kök hücrelerden sağlanan anti-inflamatuvar sitokin ekspresyonu ile anti-inflamatuar etki sağlandığı da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (74,83).

Tüm bu özellikleri ile adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin; kompozit greftlerin sağ kalımı üzerinde pozitif etkileri olduğu literatürde yer alan çalışmalarda gösterilmiştir(63).

Yağ doku kaynaklı kök hücre uygulamaları plastik cerrahinin günlük pratiğinde de sıkça yer bulmakta olup, kullanım açısından pratik bir yöntemdir.

2.3. Ghrelin

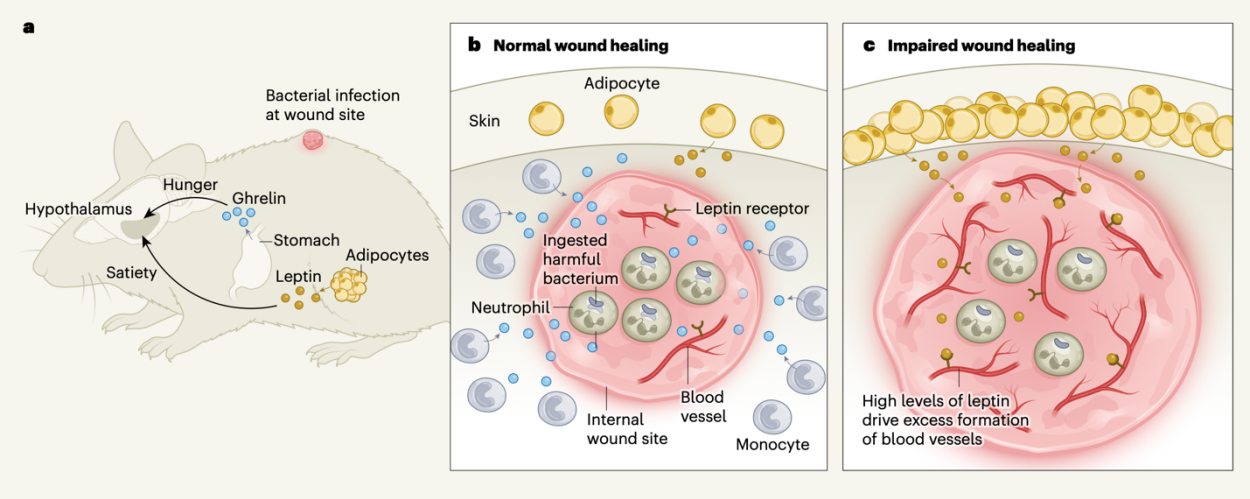
Ghrelin esas olarak mide hücreleri tarafından üretilen bir peptittir. Bunun yanında birçok ek organdan ve epidermal hücreler, lenfositler, makrofajlar dahil olmak üzere deride bulunan birçok hücre türü tarafından salgılanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ghrelin üretimi ve eksikliğinin birçok hastalıktaki inflamatuar süreçlerle yakından bağlantılı olduğu gösterilmiştir (40,42,84).

Literatür incelendiğinde; ghrelinin, angiogenezi artırıcı (85,86), antioksidan etkili (87) Bir peptid hormon olduğunu gösteren çalışmalar olduğu görülmektedir.

Yara iyileşmesini düzenleyici etkilerini de gösteren çalışmalar mevcut olup (41),

Kratofil ve ark. (42) ‘ın yaptığı çalışmada leptinin CCR2 eksikliği olan farelerde düzensiz anjiyogeneze ve yara iyileşmesinde yavaşlamaya sebebiyet verdiği; monosit kökenli ghrelin ile bunun önüne geçilebileceği, hematopoetik kaynaklı ghrelinin de revaskülarizasyon ve yara iyileşmesini düzenlemede kritik olduğu gösterilmiştir.

Bunların yanında karaciğer üzerindeki anti-inflamatuar etkilerini (44) ve obstrüktif nefropatili hastalarda renal fibrozisi azalttığını (43) gösteren çalışmalar da mevcuttur.



Şekil 2. 1: a, Ghrelin ve leptin hormonlarının hipotalamus üzerinde açlık üzerine zıt etkileri mevcuttur**. b,** Normal bir yara iyileşme sürecinde, nötrofiller enfeksiyona neden olan bakterileri fagosite eder ve bu süreçte yara çevresinde revaskülarizasyon gerçekleşir. Monositler ise yara bölgesini çevreler ve iyileşmeye yardımcı olan ghrelini üretir**. c,** Monositlerden yoksun olacak şekilde tasarlanan farelerde anormal ve gecikmiş yara iyileşmesi görülmekte. (88)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Etik Kurul Onayı

Çalışma, T.C. Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 28.09.2023 traihli, 2023-065 sayılı onay onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Kullanılması planlanan Mezenkimal kök hücreler EÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılacak ghrelin toz formda temin edilmiş ve çalışmada kullanılması planlanan doza uygun şekilde seyreltilerek solüsyon formuna getirilmiştir. Sıçanlarda kondrokutanöz greft modeli çalışması ve deney basamakları EÜ Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Deney sonunda sonra materyaller EÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına histolojik analizleri yapılmak üzere teslim edilmiştir.

3.2. Adipoz Doku Kökenli Kök Hücreler

Çalışmada, daha önceki çalışmalarda insandan elde edilmiş olan adipoz kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır. EÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 02.04.2015 tarihli, 15-3.2/19 nolu etik kurul onayı ile gerçekleştirilen çalışma sonucunda elde edilen ve EÜ Kordon Kanı Hücre- Doku Uygulama Aaraştırma Merkezi laboratuvarında kriyoprezervasyon tekniği ile saklanmakta olan kök hücreler temin edilmiştir.

Kullanılmış olan adipoz doku kökenli kök hücrelerin ilk elde edilme ve kriyoprezervasyon yöntemi ile depolanan kök hücrelerin bu çalışma için kullanıma hazırlanma süreci aşağıda anlatılmıştır.

3.2.1. İnsan Kökenli Adipoz Dokunun Temini ve Saklanması

EÜTF Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 02.04.2015 tarihli, 15-3.2/19 nolu etik kurul onayı sonrasında çalışma başlamıştır. Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin temini için; EÜTF Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği' nde; 20–55 yaş aralığında, kronik sistemik ve genetik hastalığı olmayan, çalışma için gönüllü olan 10 sağlıklı kadın hastadan; genel ve/veya lokal anestezi kullanılarak steril şartlar sağlanarak, abdominal bölge alt kadrandan "klasik mekanik vakumlu lipoaspirasyon" tekniği ile düşük basınçta, 4 mm boyutlu

aspirasyon kanülü ile 50'şer ml lipoaspirat elde edilmiştir. İşlemler için hastalara bilgilendirilmiş onam formaları verilmiş ve kendi rızaları alınarak işlemler uygulanmıştır.

Elde edilen lipoaspirat materyalleri steril olarak süzülerek sıvı ve kan hücreleri lipoaspirattan uzaklaştırılmıştır. lipoaspirat materyalleri %1'lik penisilin streptomisinli PBS içeren steril kaplarda laboratuvara taşındı ve 4 saat içinde izolasyon işlemi başlamıştır.

3.2.2. Yağ doku Aspirasyon Materyalinden Mezenkimal Kök Hücrelerin Ayrıştırılması

Çalışmada yer alan tüm hücre tabanlı basamaklar EÜ Kordon Kanı Hücre- Doku UAM laboratuvarında gerçekleştirildi.

Bu işlemlerden lipoaspiratın yıkanma aşamasında, eritrosit ve lökositlerin arındırılmasına yönelik aseptik şartlar sağlanrak yıkama işlemi uygulandı. %1'lik penisilin streptomisinli-PBS içeren steril transport kabındaki lipoaspirattan kan fraksiyonlarının kendiliğinden ayrılması beklendikten sonra ayrılan kan 25'lik steril pipetler ile alındı. Ardından eşit miktarda antibiyotikli PBS eklenerek lipoaspirat 5-10 dk çalkalandıktan sonra 1-2 dk bekletildi ve PBS ayrılarak 50'lik pipetler ile alındı. Bu yıkama prosedürü materyal yeterli temizliğe ulaşana kadar en az 3 kez olacak şekilde tekrarlandı.

Enzimle manuel parçalama aşamasında ise adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri barındıran SVF elde etmek üzere, yıkanmış olan lipoaspirat ekstrasellüler matriksten ayrılmak üzere önceden hazırlanmış olan %0,075 tip 1 kollojenaz enzimi kullanılarak yaklaşık 1- 3 saat süresince 37 ºC' de 15 dk periyotlarla inkübe edildi. Süspansiyon homojenize olduğunda enzimatik parçalanma aşaması tamamlandı.

Enzim aktivitesinin nötralizasyonu DMEM F12 besiyeri (%8 otolog serum, %1 L–Glutamin ve %1 penisilin streptomisin barındıran) ile gerçekleştirildi. Ardından SVF pelletine, bağ doku ile matur adipositlerden ayrıştırılmak üzere 1000 rpm de 7 dk süre ile santrifüj uygulandı. Bu aşamının ardından pellet, 15 ml hacimli falkon tüpte 1000 ml lik besiyeri aracılığıyla pipetaj uygulanarak homojenize edildi. Besiyeri içerisinden 50 mikrolitre örnekleme sonrasında Nanotek Arthur TM cihazı ile canlılık değerlendirmesi ve hücrelerin sayımı gerçekleştirildi.

Geride kalmış SVF pelleti; %1’ lik L-Glutamin, %8’lik otolog serum, DMEM F12, %1’ lik penisilin / streptomisin içeren taze hücre kültürü medyumuyla süspansiye edilerek her flask içerisinde en fazla $1x10^6$ hücre barındırması planlanarak 75 cm2 ’lik hücre kültürü flasklarına ekim yapıldı.

Hücreler önceden uygun şekilde sterilize edilmiş ve ortam koşulları % 21 O2, % 5 CO2, 37 ºC olan inkübatörde 2 gün süreyla inkübe edildi. 2 gün sonunda flaska yapışmayan hücreler PBS ile uzaklaştırılarak, aynı taze hücre kültürü mediumuyla besiyerleri yenilendi. Hücreler %80 yoğunluğa eriştiğinde Tripsin -EDTA ile kaldırılarak pasajlandı.

3.2.3. Hücrelerin Ekspansiyonu

İzole edilmiş olan primer hücre kültürü örneklerini çoğaltılmak için ilk 10 gün süreyle %1 Penisilin-Streptomisin (Lonza 10K/10K 100 ml 17-602E), %8 otolog serum, %1 L-Glutamin (Lonza 200 mM 500 ml-17-605F) içeren DMEM F12 (Gibco) hücre kültürü medyumu kullanılmıştır. 10 Günün sonunda serum yüzdesi %5’e azaltılmıştır.

Hücreler, horizontal pozisyondaki 75 ve 25 cm2’lik kapakları filtreli flasklar (Orange scientific-4410200N) içinde kültüre bırakılmıştır. Yeterli yoğunluk elde edilinceye kadar geçen süre zarfında kültürler %5 CO_2, %21 O_2 ve %74 N_2 barındıran inkübatör içerisinde kültüre bırakılmıştır.

Hücreleri canlılık ve proliferasyon açısından değerlendirmek üzere Olympus CH30 inverted tip mikroskop kullanılmıştır. Hücrelerin pasajlama, ortam değişimi, dondurma ve çözdürme basamakları laminar akımlı kabinde (ESCO Class II, Biological Safety Cabinets) uygulanmıştır.

3.2.4. Hücrelerin Pasajlanması

Ekspansiyonu sağlanmış ve yoğunluğu %80-90’a ulaşmış primer hücre kültürü örnekleri pasajlnma aşamasında hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla %0.25’lik tripsin (BI, Trypsin EDTA Solution B, Cat. No: 03-052-1B) hücrelerin yüzeylerini tamamen kaplaması sağlanacak şekilde flaska eklenmiş ve 5 dk süreyle inkübatöre alınmıştır. Hücrelerin yüzeyden ayrılmasını takiben flaska besiyeri dahil edilerek santrifüjasyon tüpüne alınarak 5dk süresince 1200 rpm hızda santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonucunda oluşan supernatant uzaklaştırılarak

milimetredeki sayıları 10^5 -10^6 arasında olacak şekilde pasaja alınmış ve 2 günde bir besiyeri değişimi sağlanmıştır.

3.2.5. Canlılık Tayini

3.2.5.1. Tripan mavisi ile canlılık tayini;

Tripan mavisi (Biological industries Cat. No:03-102-1B) ile boyamada, canlı hücrelerde boyanın hücre içerisine geçişi mümkün olmadığı çin hücreler mikroskop altında şeffaf renkte, canlı olmayan hücrelerde boyanın hücre içine geçişi sağlanabildiği için mikroskop altında mavi renkte görülmeltedir. Canlılık tayininde 50 µl hücre ve 50 µl tripan mavisi boyası kullanılmıştır. Bu aşamada Neubauer lamında 4x4'lük karelerin oluşturduğu 4 adet sahada bulunan hücrelerin ışık mikroskobu ile sayım ve ortalama hesapları yapılmıştır.

Canlılık yüzdesi hesabı aşağıdaki formülde verilmiştir. Canlı hücre sayısı, dilüsyon faktörü ve $2x10^4$ ile çarpılarak milimetrede yer alan canlı hücre sayısı bulunmuştur.

$$Viabilite\ (\%) = \frac{Canlı\ hücre\ sayısı}{Toplam\ hücre\ sayısı} \times 100$$

3.2.5.2. Nanotek ArthurTM cihazıyla canlılık tayini;

Çalışmada 3 farklı kanalı (kırmızı-yeşil floresan, parlak zemin) olan ArthurTM cihazı ile kısa zaman içerisinde hücre canlılığı, sayımı, hücre döngüsü ve Anneksin V apoptoz analizleri elde edilebilmiş ve sonuç grafiği elde edilebilmiştir.

3.2.6. Akım Sitometri ile İmmunfenotipleme

Kültürü devam etmekte olan hücrelerin akım sitometik analizi BD Accuri^{TM} C6 Akım sitometri cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Akım sitometri sonucunda CD34 ve CD45 negatif ve CD73, CD90 ve CD105 pozitif olarak bulunmuş ve hücreler mezenkimal kök hücre olarak değreelndirilmiştir.

3.2.7. Kriyoprezervasyon Yöntemi

Elde edilen primer hücre kültürü üçüncü kez pasajlandıktan sonra hücreler; kriyotüplerde %6 Trehaloz, %4 DMSO, %20 otolog serum, %70 DMEM F12 ile -20 ºC sıcaklıkta 30 dakika süreyle, -80 ºC de 1 saat süreyle bekletilmesinin ardından -196 ºC sıcaklıktaki sıvı azot içerisine alındı. Aşamalı ve yavaş dondurma sayesinde buz kristalleri oluşumu engellenmiştir.

Akım sitometri ile immunfenotiplenen ve kök hücre olarak değerlendirilen hücreler; canlılık tayini, gibi işlemlerin ardından kriyoprezervasyon ile ilerideki çalışmalarda da kullanılabilmek üzere depolanmıştır.

3.2.8. Stok Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözdürülmesi

Akım sitometri ile immunfenotiplenen ve kök hücre olarak değerlendirilerek kriyoprezervasyon ile ilerideki çalışmalarda da kullanılabilmek üzere depolanan hücreler mevcut çalışmada kullanılmak üzere çözdürme işlemine tabi tutulmuştur.

196ºC (Air Liquide DMC-Cryopal TP 60-60 L)' de depolanmış olan kriyo tüp alınarak 37ºC' deki su banyosu içine alındı. Tüp içeriğinde yer alan materyaller %10 FBS (Fötal sığır serumu, S0115, Biochrom AG, Almanya), %0.1 gentamisin (50 mg/ml) (SV30080, HyClone, USA) ve % 1 HEPES (1M) (L1613, Biochrom AG, Almanya) içeren α-MEM (SV30265.01, HyClone, USA) besiyeri ile santrifüj tüpü içine (Grenier Bio-One, Almanya) alındı.

Hücreler toplandıktan sonra 800 rpm ve 4ºC' de 5 dakika süreyle santrifüje tabi tutuldu (5810 R, Eppendorf, Almanya) ve elde edilen süpernatant ayrıldı. Elde edilen hücre pelleti nazikçe tüpün yüzeyinden kaldırılarak besiyeri ile süspansiyon sağlandı. Süspanse durumdaki hücreler uygun boyuttaki flask (Grenier Bio-One, Almanya) içerisine aktarıldı. Etiketlenen flasklar 37ºC' de %5 CO2 mevcut inkübatör içerisinde(HERA Cell, Heraeus, Almanya) inkübasyona tabi tutuldu.

3.2.9. Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin üstünde yer alan kullanılmış besi yeri ayrıldı. Hücre yüzeyleri 37ºC'de bulunan Ca+2, Mg+2' bulundurmayan PBS (L1825, Biochrom AG, Almanya) ile yıkamaya

tabi tutuldu. Üzerlerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu (SH30236.01, HyClone, USA) eklenerek 4-5 dakika süreyle 37ºC içinde inkübasyon uygulandı.

Mikroskop yardımıyla bütün hücrelerin yüzeyden ayrıldığı görüldüğünde %10 PBS'ye sahip besiyeri ile hücreler santrifüj tüpü içerisine alındı. Hücreler 800 rpm ve 4ºC'de 5 dakikasüreyle santrifüje tabi tutularak süpernatant ayrıldı. Ardından tüpün en altında yer alan hücreler nazikçe tüpün yüzeyinden kaldırılarak ve vasat ile süspansiyon uygulandı. Süspansiyon 1:3 oranında yeni flask içine aktarıldı ve taze besiyeri eklenerek kültür devam ettirildi.

3.2.10. MKH' lerin Karakterizasyonu

MKH' ler yüzeyden ayrılarak toplama sonrasında hücre konsantrasyonu $1x10^6$ hücre/ml olarak kendi besi yeri içerisinde süspansiyon uygulandı. Akış sitometri (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) ile karakterizasyonu sağlanarak elde edilen verilere CellQuest yazılım (BD Biosciences, USA) ile analiz uygulandı. Artıklar ve ölü hücreler dışlandı.

Tablo 3. 1: Mezenkimal Kök Hücrelerdeki yüzey belirteçlerinin % pozitif ekspresyonunun Flow sitometri sonuçları

Antikor / Hücre	CD29	CD90	CD54	CD45	CD11b	CD106	MHC Sınıf 1	MHC Sınıf II
AdMKH	99.81	98.24	99.74	0.66	0.77	9.10	81.81	0.84

Akış sitometriden alde edilen veriler incelendiğinde CD29, CD90, CD54 ve MHC I antikorları pozitif saptandı. CD45, CD11b ve MHC II antikorlarında pozitiflik % 2' nin altında saptandı. Stoklanan MKH' lerde endotelyal hücrelerle kontaminasyon olmadığı görüldü.

Tablo 3. 2: Flow sitometride kullanılmış olan antikorlar

Akış sitometrisi için kullanılan antikorlar
CD29 (Integrin beta 1 zinciri; BD, USA)
CD45 (Protein tyrosine fosfataz, reseptör tipi; BD, USA)
CD54 (ICAM-1; Intersellüler adhezyon molekülü 1; BD, USA)
CD90 (Thy-1/Thy-1.1; BD, USA)
CD106 (vasküler hücre adezyon molekülü; VCAM-1; BD, USA)
CD11b (hematopoetik hücre belirteci, Abcam, ab78457)32
MHC Class I (büyük doku uyumluluk kompleksi sınıf I antijen reseptörü; BD, USA)
MHC Class II (büyük doku uyumluluk kompleksi, MHC sınıf II, hücre yüzey reseptörü; BD, USA)

3.2.11. Oil Red O Boyama

Yağ dokudan elde edilen AdMKH' lerin yağ hücreleri ile kontaminasyon açısından ve uzun süren kültür süreci nedeniyle yağ hücresine farklılaşma açısından incelenmesi için Oil Red O boyama yapıldı.

Kullanılmış besiyeri ayrıldı. Kültür yüzeyine PBS ile tekrar yıkama uygulandıktan sonra %10 formalin eklenerek ve 10 dakikalığına oda sıcaklığına alındı. Kültür, %10' luk formalin ayrıldıktan sonra taze formalin eklenerek 1 saat daha oda sıcaklığında tekrar inkübasyona bırakıldı. Bir saat süren inkübasyon ardından formalin tekrar ayrıldı. %60 isopropanol çözeltisi (PX1830, Merck, Almanya) ile yıkama uygulandı. Oda sıcaklığında bekletilerek kültür yüzeyi kurutuldu. Oil red O (O0625, Sigma, USA) boya çözeltisi (%21) eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sağlandı.10 dakika sonra distile su yardımıyla 4 defa yıkama uygulandı. Elde edilen materyaller ters faz ışık mikroskobunda incelemeye tabi tutuldu.

Boyama neticesinde kültürde herhangi bir boyanma görülmedi. Böylece kültürde adipositler ile kontaminasyon olmadığı ve tekrarlayan pasaj sayısına bağlı adipositlere farklılaşma olmadığı görüldü.

3.3. Ghrelin

Çalışmada ghrelin ve MKH + ghrelin gruplarında 20ng/kg ghrelin kullanılması planlanmıştır. Bunun için 1 mg (1000000 ng) toz formdaki ghrelin 1ml asetik asit içerisinde çözdürülerek stok konsantrasyon elde edilmiştir. Ardından bu 1ml lik solüsyondan 10 mikrolitre alınarak 250 ml SF (serum fizyolojik) ile karıştırılmıştır. Elde edilen solüsyondan 14 adet ependorfa 0.5 ml solüsyon koyulmuş ve her bir ependorftaki solüsyon 0.5 ml SF ile seyreltilmiştir. Ardından her bir sıçanda kg başına 1ml solüsyon kullanılması planlandı.

3.4. Deney Hayvanları ve Deneyin Yapıldığı Ortam

Çalışmada her grupta 7 tane olacak şekilde toplamda 35 tane, 12-16 hafta yaş aralığında, yaklaşık 300 gram olan, 18 adet erkek ve 17 adet dişi olacak şekilde, Wistar-Albino cinsi sıçan seçişmiştir. Sıçanlar çalışma süresince 24 °C oda sıcaklığında, kafesleri günde bir kere temizlenerek, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngü sağlanarak 5 grup halinde muhafaza edilmiştir. Sıçanların beslenmesi ad-libitum olarak sağlanmıştır. Altlık materyali olarak talaş seçlmiştir. Çalışma sürecince hayvanların bakımları sağlanmış, operasyon sonrası ağrıları ve doğalın dışındaki hareketleri dikkate alınarak deney sonuçlarına etki etmemesi göz önüne alınarak 1 mg/kg meloksikam ciltaltı olarak uygulanmıştır.

Genel anestezide 50 mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Xylazine intraperitoneal olarak kullanılmıştır. Sıçan kulak heliksinden kondrokutanöz greft eksizyonu, graftin inset için deepitelizasyon ile hazırlanıp şekillendirilmesi, sıçan sırtında alıcı cebin hazırlanması ve greftin inseti tek kişi elinden standart cerrahi tekniklere göre gerçekleştirilmiştir.

3.5. Kondrokutanöz Greft Modelinin Oluşturulması

Çalışmada tüm gruplarda, Yücel ve ark. (63) tarafından yapılan çalışmada da kullanılan modelde olduğu gibi, sıçan sol kulak heliksinden 1x1 cmlik kondrokutanöz greft alımı ve greftin sıçan sırtı sağ tarafında açılacak cilt altı cebe yerleştirilmesi planlandı.

Buna yönelik 50 mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Xylazine intraperitoneal yolla verilerek genel anestezi elde edilmiştir. Genel anesteziyi takiben sıçanlar supin pozisyonda iken sol paraspinal ve sol periaurikuler bölgeleri tıraş edilmiştir. Tıraş ve çizim sonrasında ameliyat sahasında alkol ve povidin iyodür le uygun antisepsi elde edilmiştir.

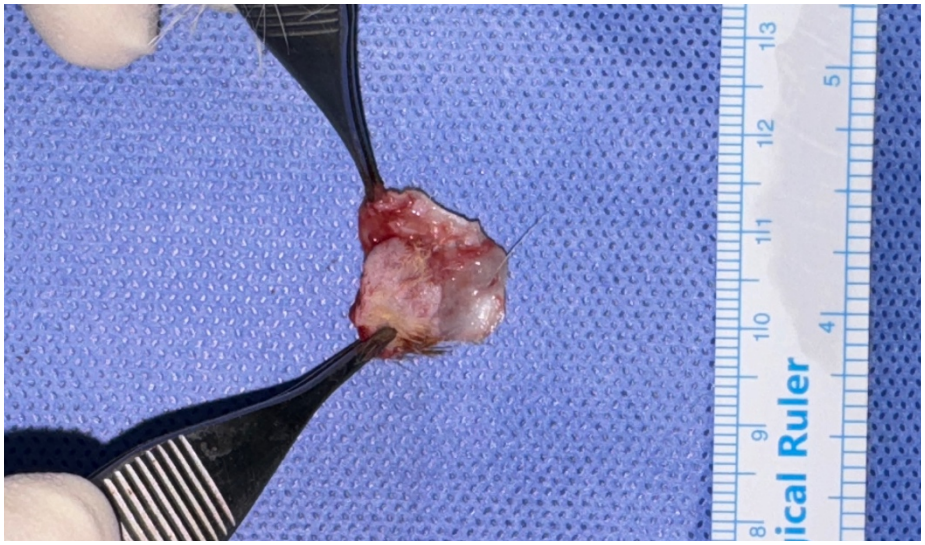
Ameliyat öncesi çizimler dahilinde sol periaurikuler bölgeden insizyon ile operasyona başlanmıştır. Kıkırdak doku boyunca diseksiyona devam edilmiş ve 1x1 cm lik kıkırdak doku boyutuna ulaşıldığında diseksiyona son verilerek kondrokutanöz doku greft olarak eksize edilmiştir.

Ardından greft dış yüzünde 0.3x0.3cm lik deri adası bırakılacak şekilde depitelize edilre hazırlanmıştır. Ardından sıçan sol paraspinal bölgesine yapılan 1cm lik vertical insizyonu takipen keskin ve künt diseksiyonlar ile cilt altında 1x1cmlik cep hazırlanmıştır. Ardından greftler üzerindeki deri adası ile 4-0 naylon süturlar kullanılarak çevre deriye suture edilerek

inset edilmiştir ve greft gözleme alınmıştır. Hayvanlar genel aesteziden çıktıktan sonra kendi kafeslerine transfer edilmiştir.



Şekil 3. 1: Deneğin kulak heliksinden kondrokutanöz kompozit greft almak üzere donör sahanın hazırlanışı.



Şekil 3. 2: Deneğin kulak heliksinden alınan 1x1 cm boyutunda kondrokutanöz kompozit greft.



Şekil 3. 3: Deneğin sırtında kompozit greftin inset edileceği sahanın hazırlanışı.



Şekil 3. 4: Deneğin sırtında kompozit greftin inset edileceği ciltaltı cep.



Şekil 3. 5: Deneğin sırtında oluşturulan ciltaltı cebe kompozit greftin inseti.

Operasyon sonrası 1. 3., 5., ve 7. günlerde greftler klinik olarak izlenmiş ve standart mesafe ve konumdan fotoğraflanmıştır. Greftlerin sağ kalımı (renk, kapiller dolum ve sıcaklık) ve nekroz yüzdeleri değerlendirilmiştir.

Deneyin sonunda, 7. Günde sıçanlara genel anestezi uygulanarak servikal dislokasyon tekniği ile sakrifikasyon yapılmıştır. Sakrifikasyonun ardından greftler sıçanlardan alınmıştır. Ardından greftler %10 Formalin solüsyonu ile fiksasyon sonrası histolojik değerlendirme için histoloji laboratuvarına transfer edilmiştir.

3.6. Deney Grupları ve Cerrahi Modeller

35 adet Wistar-Albino sıçan randomize olarak plasebo, kontrol, mezenkimal kök hücre, ghrelin ve mezenkimal kök hücre + ghrelin grubu olmak üzere her grupta 7 sıçan olacak şekilde 5 ayrı gruba ayrılmıştır.

3.6.1. Kontrol grubu (n=7)

Sıçanlarda sol kulak heliksinden 1x1 cmlik kondrokutanöz greft alındı. Herhangi ek bir işlem yapılmadan greftler sıçan sırtı sol tarafında açılacak cilt altı cebe inset edildi.

Operasyonun ardından 1.-3.-5. ve 7. günlerde greftler klinik olarak izlenmiş ve standart mesafe ve konumdan fotoğraflanmıştır. Deneyin sonunda, 7. Günde sıçanlara genel anestezi uygulanarak servikal dislokasyon tekniği ile sakrifikasyon yapılmıştır.

3.6.2. Plasebo grubu (n=7)

Sıçanlarda sol kulak heliksinden 1x1 cmlik kondrokutanöz greft alındı. Ardından greftler sıçan sırtı sol tarafında açılacak cilt altı cebe inset edildi.

Placebo grubundaki her sıçana greftin inset edildiği cep içerisine 0.4ml %0.9 NaCl içeren serum fizyolojik subkutan olarak enjekte edildi.

Operasyonun ardından 1.-3.-5. ve 7. günlerde greftler klinik olarak izlenmiş ve standart mesafe ve konumdan fotoğraflanmıştır. Deneyin sonunda, 7. Günde sıçanlara genel anestezi uygulanarak servikal dislokasyon tekniği ile sakrifikasyon yapılmıştır.



Şekil 3. 6: Plasebo grubundaki bir deneğe, subkutan olarak steril serum fizyolojik enjekte edilmesi.

3.6.3. Kök Hücre Grubu (n=7)

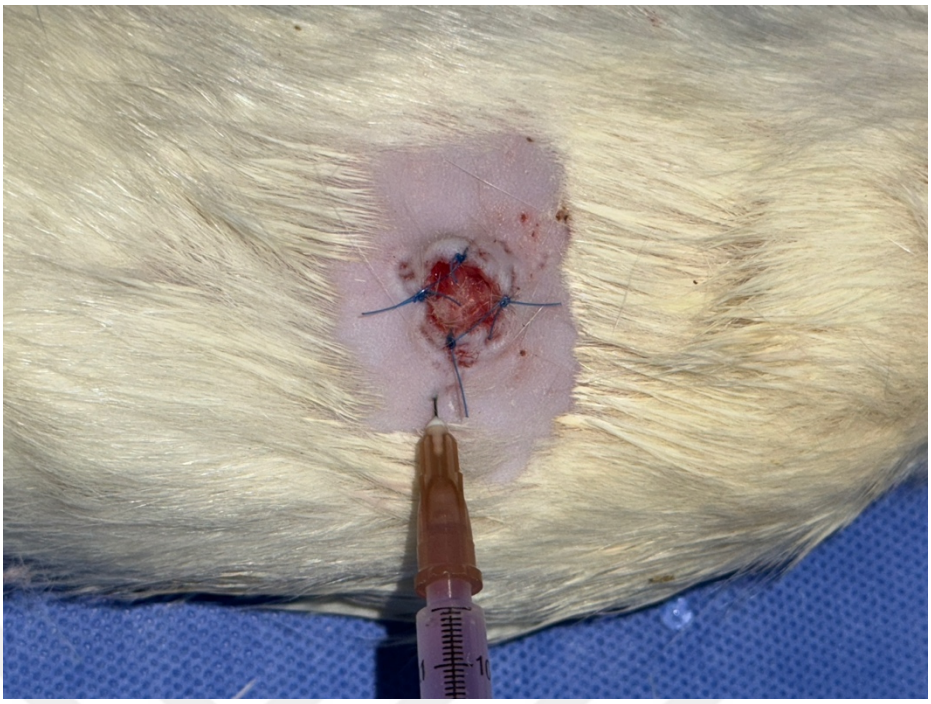
Sıçanlarda sol kulak heliksinden 1x1 cmlik kondrokutanöz greft alındı. Ardından greftler sıçan sırtı sol tarafında açılacak cilt altı cebe inset edildi.

Bu grupta yer alan her sıçanda greftin inset edildiği cep içerisine $5x10^6$ hücre barındıran 0,4 ml adipoz doku kökenli kök hücre ciltaltı olarak enjekte edildi.

Operasyonun ardından 1.-3.-5. ve 7. günlerde greftler klinik olarak izlenmiş ve standart mesafe ve konumdan fotoğraflanmıştır. Deneyin sonunda, 7. Günde sıçanlara genel anestezi uygulanarak servikal dislokasyon tekniği ile sakrifikasyon yapılmıştır.



Şekil 3. 7: Kök hücre grubundaki kullanılmak üzere hazırlanmış olan mezenkimal kök hücre.



Şekil 3. 8: Kök hücre grubundaki bir deneğe, cilt altına $5x10^6$ hücre barındıran 0,4 ml mezenkimal kök hücre enjekte edilmesi.

3.6.4. Ghrelin Grubu (n=7)

Sıçanlarda sol kulak heliksinden 1x1 cmlik kondrokutanöz greft alındı. Ardından greftler sıçan sırtı sol tarafında açılacak cilt altı cebe inset edildi.

Ghrelin grubundaki her sıçana greftin inset edildiği cep içerisine 20ng/kg ghrelin içeren solüsyon subkutan olarak enjekte edildi.

Operasyonun ardından 1.-3.-5. ve 7. günlerde greftler klinik olarak izlenmiş ve standart mesafe ve konumdan fotoğraflanmıştır. Deneyin sonunda, 7. Günde sıçanlara genel anestezi uygulanarak servikal dislokasyon tekniği ile sakrifikasyon yapılmıştır.



Şekil 3. 9: 20ng/kg ghrelin içeren solüsyon

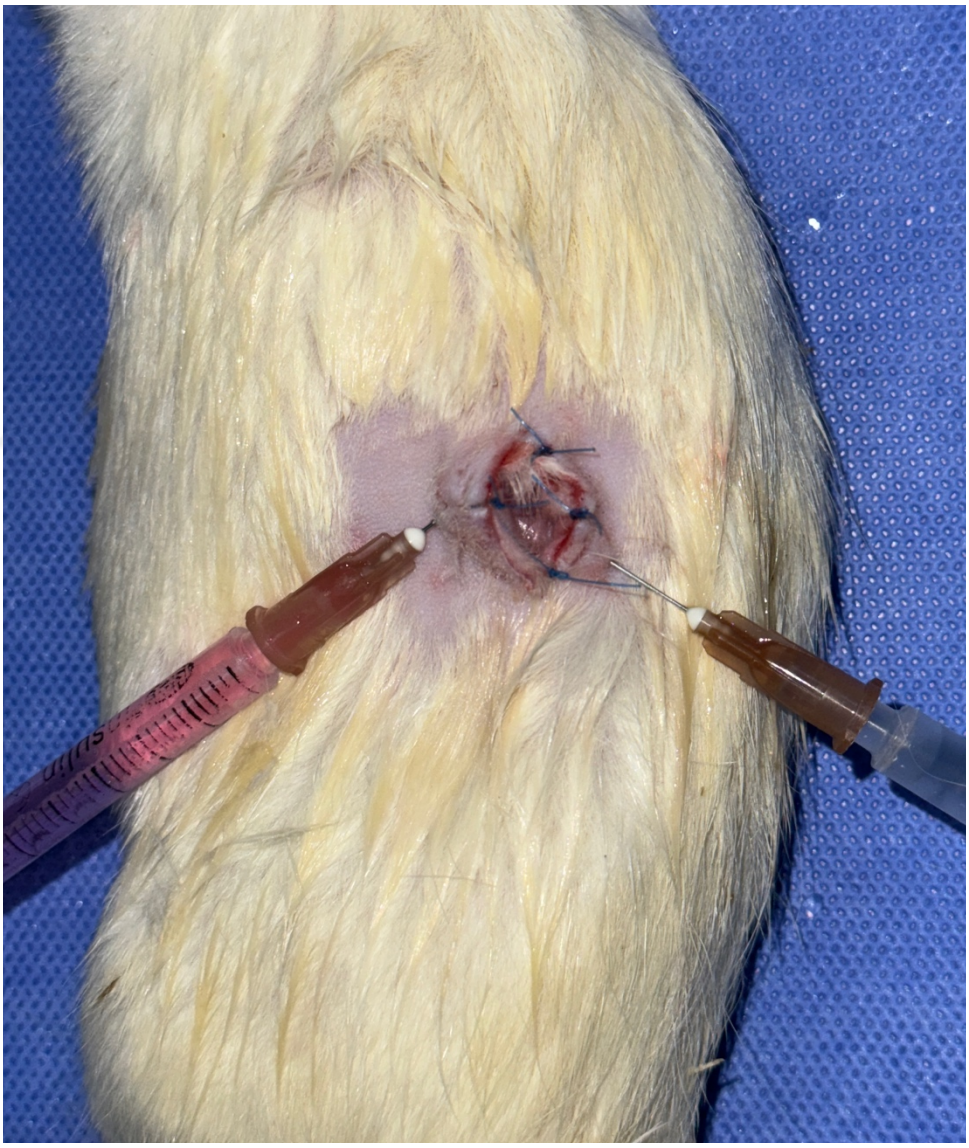


Şekil 3. 10: Ghrelin grubundaki bir deneğe, subkutan olarak 20ng/kg ghrelin içeren solüsyon enjekte edilmesi.

3.6.5. Kök Hücre + Ghrelin Grubu (n=7)

Sıçanlarda sol kulak heliksinden 1x1 cmlik kondrokutanöz greft alındı. Ardından greftler sıçan sırtı sol tarafında açılacak cilt altı cebe inset edildi. Kök hücre + Ghrelin grubundaki her sıçana greftin inset edildiği cep içerisine 20ng/kg ghrelin + $5x10^6$ hücre barındıran 0,4 ml adipoz doku kökenli kök hücre ciltaltı olarak enjekte edildi

Operasyonun ardından 1.-3.-5. ve 7. günlerde greftler klinik olarak izlenmiş ve standart mesafe ve konumdan fotoğraflanmıştır. Deneyin sonunda, 7. Günde sıçanlara genel anestezi uygulanarak servikal dislokasyon tekniği ile sakrifikasyon yapılmıştır.



Şekil 3. 11: Kök hücre + Ghrelin grubundaki bir deneğe, subkutan olarak 20ng/kg ghrelin içeren solüsyon ve $5x10^6$ hücre içeren 0,4 ml mezenkimal kök hücre enjekte edilmesi.

3.7. Histolojik İnceleme

3.7.1. Histolojik analizler için kullanılacak araç ve gereçler

Kondrokutanöz kompozit greftlerin sağkalımının artırılmasında mezenkimal kök hücreler ve ghrelin'in etkinliğinin araştırılması amacıyla deney gruplarından alınan doku örnekleri aşağıda belirtilen araç ve gereçler kullanılarak histopatolojik olarak değerlendirilecektir.

Sakrifiye edilen deneklerden alınan biyopsiler %4 formaldehit solüsyonu içerisine alınarak 48 saat bekletildi. Fiksasyon sonrası bir gün boyunca fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu ile yıkanan dokular rutin histolojik takip işlemlerine tabi tutuldu.

Tablo 3. 3: Işık mikroskobisi doku takibi.

Uygulama	**İşlem**	**Süre**
Dehidratasyon Aşaması	%80 Alkol	45 dakika..
	%95 Alkol	45 dakika..
	%96 Alkol	45 dakika..
	%100 Alkol	45 dakika..
Şeffaflaşma Aşaması	Ksilol	10-15 dakika..
Parafine Gömme Aşaması	Parafin I	30 dakika..
	Parafin II	30 dakika..

3.7.2. Işık Mikroskobu İçin Kesit Alma:

Spesimenler bloklanmanın ardından oda sıcaklığında 1 günlük süre ile bekletildi. Kesit alınmasının öncesinde 1 saat süreyle +4ºC sıcaklıkta saklandı. Spesmenlerden ışık mikroskobik değerlendirme için Leica RM 2145 markalı mikrotom ile 5 mikrometrelik kesitler alındı. 37˚C sıcaklıkta su banyosu ile kesitler açılarak polilizinli lamlara doku kesitleri transfer edildi.

3.7.3. Histokimyasal Yöntem

3.7.3.1. Deparafinizasyon İşlemi:

Işık mikroskobik görüntülemeler için tüm boyamalardan önce etüvde 57˚C 1 saat boyunca bekletilerek dokuların deparafinizasyonu sağlandı. Etüvden çıkan preparatlar soğuduktan sonra bir gece ksilolde bekletildi. Deparafinize olan kesitlerde genel morfolojiyi değerlendirmek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H&E) ve kolajen-kas yapılarını daha iyi analiz etmek amacıyla Masson Trikrom histokimyasal boyamaları (BioOptica Masson Trichrome (with aniline blue), 04-010802, Milano, Italy) yapıldı. İmmunohisto kimya için Seçilen antikor VEGF (bs1665R,BIOSS), anjiyogenez süreçleri araştırmada kullanılan önemli parametrelerdendir. Boyanan preparatlar Olympus Bx51 ışık mikroskobuna entegre Olympus DP72 kamera ile fotoğraflanarak değerlendirildi.

3.7.3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi:

Aşağıdaki tabloda yer alan işlem basamakları uygulanarak Hematoksilen&Eozin boyaması yapıldı.

Tablo 3. 4: Hematoksilen-Eozin yönteminin aşamaları

Aşama	İşlem	Süre
Rehidratasyon Basamağı	%100 Alkol	2 dakika..
	%100 Alkol	2 dakika..
	%95 Alkol	2 dakika..
	%80 Alkol	2 dakika..
	Distile su	5 dakika..
Hematoksilen ve Eozin Boyama Basamağı	Hematoksilen	10 dakika..
	Akar su	1 dakika.. yıkama
	Asit alkol	Fazla rengi akana kadar yıkama
	Akar su	2-3 kez daldır çıkar
	Amonyaklı su	2-3 kez daldır çıkar
	Akarsu	2-3 kez daldır çıkar
	Distile su	1 dakika..
	Eozin	2 dakika..

Dehidratasyon Basamağı	%95 Alkol	1-2 kez daldır çıkar
	%100 Alkol	1-2 kez daldır çıkar
	%100 Alkol	2 kez daldır çıkar

Tablo 3. 5: Masson Trikrom yönteminin aşamaları

İşlem Basamakları	**Süre**
Distile su	5 dakika.
6 damla A solüsyonu (Weigert'in demirli hematoksileni A solüsyonu) ve 6 damla B solüsyonu (Weigert'in demirli hematoksileni B solüsyonu) karışımı	10 dakika.
10 damla C solüsyonu (Pikrik asit alkollü solüsyonu)	4 dakika.
Distile su	3-4 saniye
10 damla D solüsyonu (Mallory'nin Ponceau asit fuksini)	4 dakika.
Distile su	3-4 saniye
10 damla E solüsyonu (Fosfomolibdik asit solüsyonu)	10 dakika.
10 damla F solüsyonu (Masson anilin mavisi)	5 dakika.
Distile su	3-4 saniye
%95 Alkol	3-4 saniye
%100 Alkol	1 dakika.
Ksilol	30 dakika.

Tablo 3. 6: İmmünohistokimya Boyaması

İşlem Basamakları	**Süre**
%100 Alkol	2 dakika.
%100 Alkol	2 dakika..
%95 Alkol	2 dakika..
%80 Alkol	2 dakika..
Distile su ile yıkama	5 dakika..
Sodyum sitrat solüsyonu 90°C mikrodalgada	30 dakika..
Soğuk su banyosu	20 dakika..
Distile su	5 dakika..
%0,1'lik Triton x solüsyonunda	5 dakika..
%3'lük H_2O_2 solüsyonu	10 dakika..
PBS tamponu içerisinde 3 kez	2'şer dakika..
Dokuları etrafı pappen ile çizilir ve Serum blocking solüsyonu damlatılır	30 dakika..
Serum bloking solüsyonu dokudan uzaklaştırılır ve primer antibody damlatılır nemli ortamda (+4°C)	Gece boyu
PBS tamponu içerisinde 3 kez	2 dakika..
Primer ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika..
PBS tamponu içerisinde 3 kez	2 dakika..
Streptoavidin ile işaretli antikor (HRP)	30 dakika..
PBS tamponu içerisinde 3 kez	2 dakika..
DAB (3,3-diaminobenzidine)	Gözle takip
Distile su ile yıkama	3 dakika..
Hematoksilen	1 dakika..
Çeşme suyu ile yıkama	5 dakika..
Distile su ile yıkama	2 dakika..
%95 alkol	Daldır çıkar
%100 alkol	Daldır çıkar
%100 alkol	Daldır çıkar

Uygulanan protokoller sonrasında preparatlar 30 dakika ksilolde bekletilip entellan yardımıyla kapatılmış ve görüntülemeye hazır hale gelmiştir.

3.7.3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

Her grupta kesitlerin immünohistokimyasal değerlendirilmesi sistematik randomize seçilmiş dijitalize görüntülerde immünreaktivite yoğunluğunun 0'dan 3+'e histolojik skorlanması ile gerçekleştirildi. İmmünreaktivetinin yokluğu 0 değeri alırken, düşük yoğunlukta immünreaktivite 1+, orta yoğunlukta immünreaktivite 2+, yüksek yoğunlukta immünreaktivite 3+ olarak değerlendirildi.

3.8. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmada elde edilen veriler IBM Sosyal Bilimler için veri analizi programı paket versiyon 29.0 (IBM Corp., Armonk, NY) ile analiz edildi. Kategorik veriler için sıklık ve yüzde, sürekli veriler için ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum tanımlayıcı değer olarak seçildi. Kategorik değişkenlerin kıyaslanmasında "Ki-Kare Testi", gruplar arası "Kruskal Wallis H-Testi" tercih edildi. Grafikler Graphpad Prism versiyon 9.5 paket programı ile elde edildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilen değişkenlerde farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U-testi tercih edildi. Sonuçlar, p değerinin 0,05'ten küçük olması halinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskobik değerlendirme

Tüm deney grupları 1.3.5. ve 7. günlerde makroskobik değerlendirmeye tabi tutuldu. Her bir gruptaki kondrokutanöz kompozit greftlere ait kutanöz komponent olan deri adası makroskobik olarak değerlendirilerek standart mesafe ve pozisyondan fotoğraflandı.

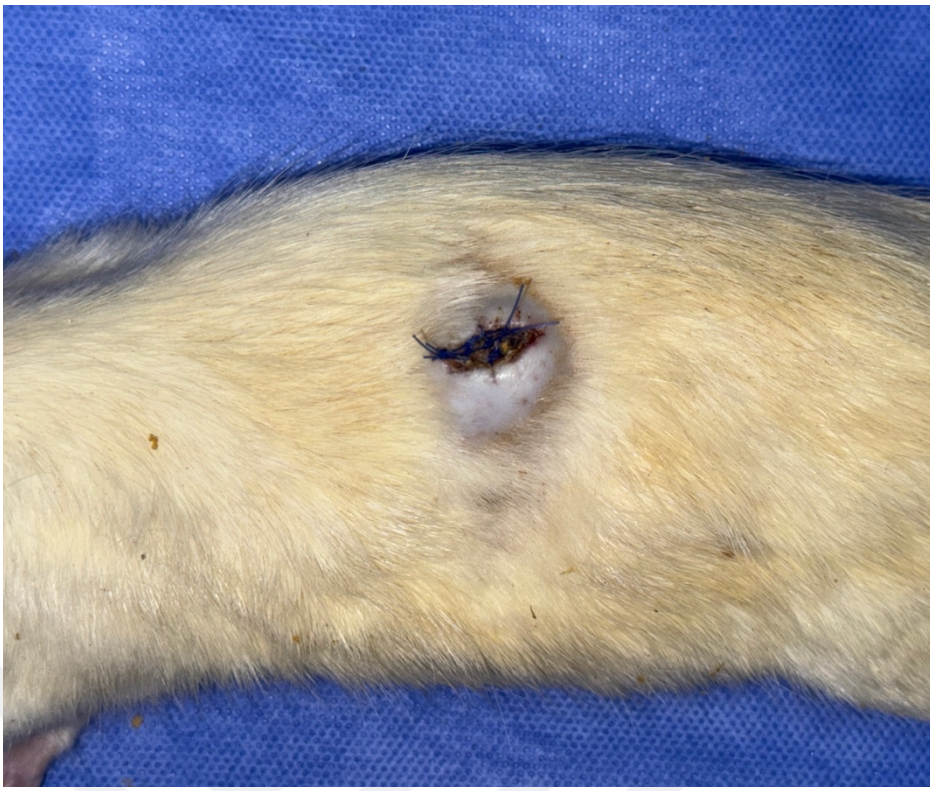
10. Günde deri adaları nekroz görülen yüzey alanı oranları açısından değerlendirildi. Deri grefti tüzey alanı %10'luk 10 eşit parçada değerlendirilmiş ve nekroz oranları bunun üzerinde hesaplanmıştır.

4.1.1. Kontrol grubu

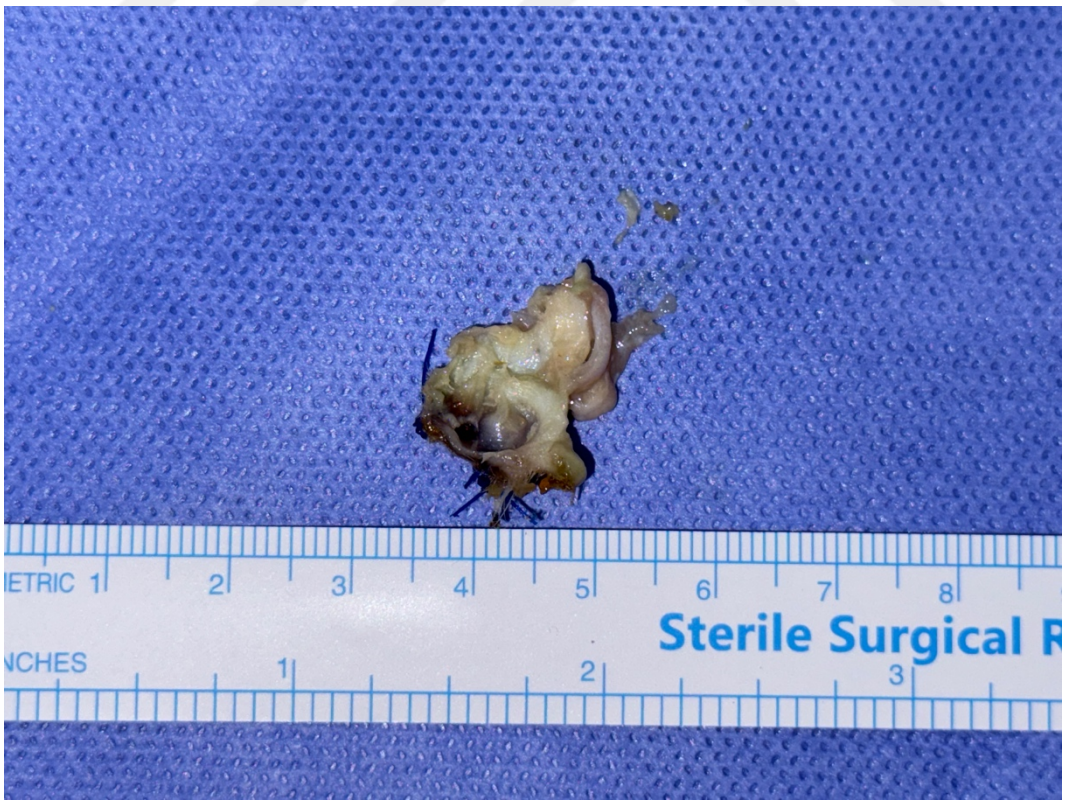
7. günün sonunda, kontrol deney grubunda yer alan sıçanlarda deri adasındaki sağkalım görülen alanlar ve toplam sağ kalım yüzdeleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4. 1: Kontrol grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi.

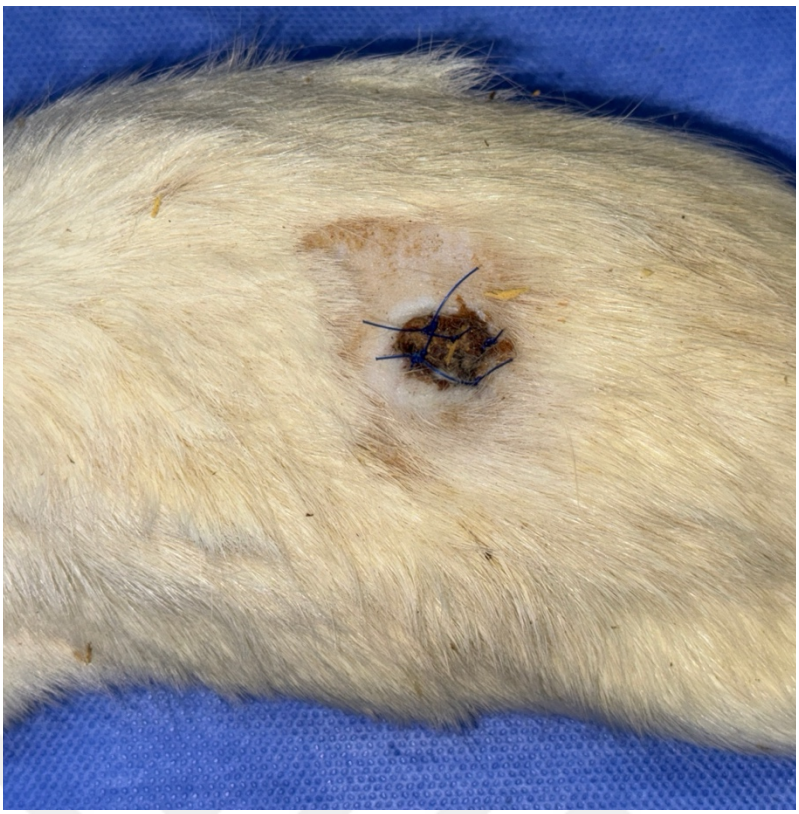
KONTROL	Toplam greft (cm^2)	Sağkalım görülen alan (cm^2)	Nekroz görülen alanı (cm^2)	Toplam sağkalım yüzdesi
K-1	1	0.3	0.7	30%
K-2	1	0.4	0.6	40%
K-3	1	0.2	0.8	20%
K-4	1	0.1	0.9	10%
K-5	1	0.1	0.9	10%
K-6	1	0	1	0%
K-7	1	0	1	0%



Şekil 4. 1: Kontrol grubundan Sıçan-6, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü



Şekil 4. 2: Kontrol grubundan Sıçan-6, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü



Şekil 4. 3: Kontrol grubundan Sıçan-7, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü



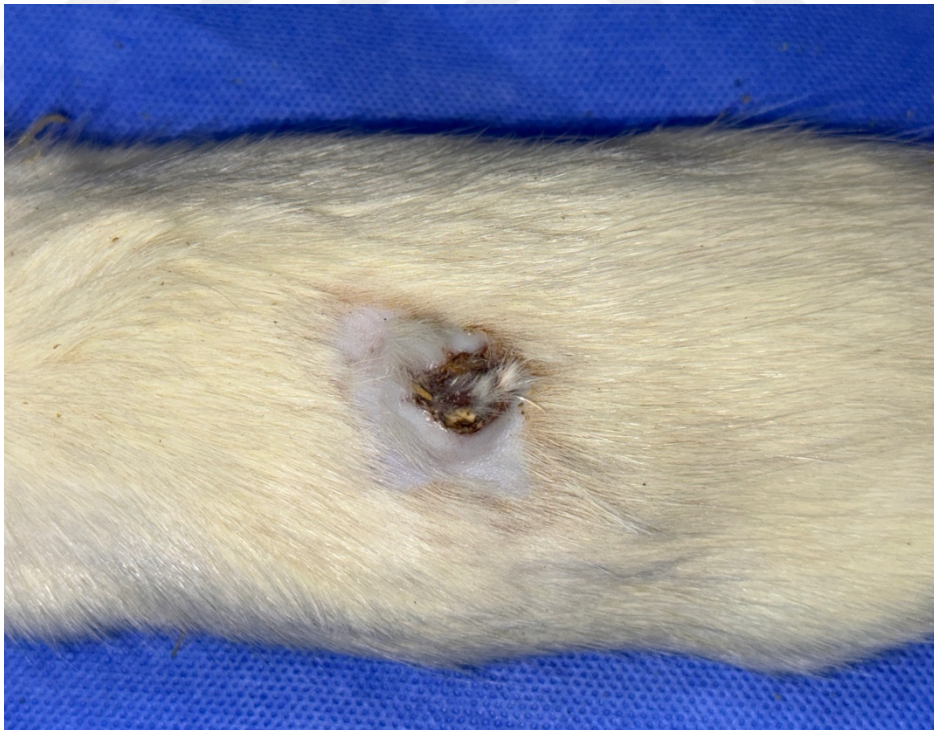
Şekil 4. 4: Kontrol grubundan Sıçan-7, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü

4.1.2. Plasebo grubu

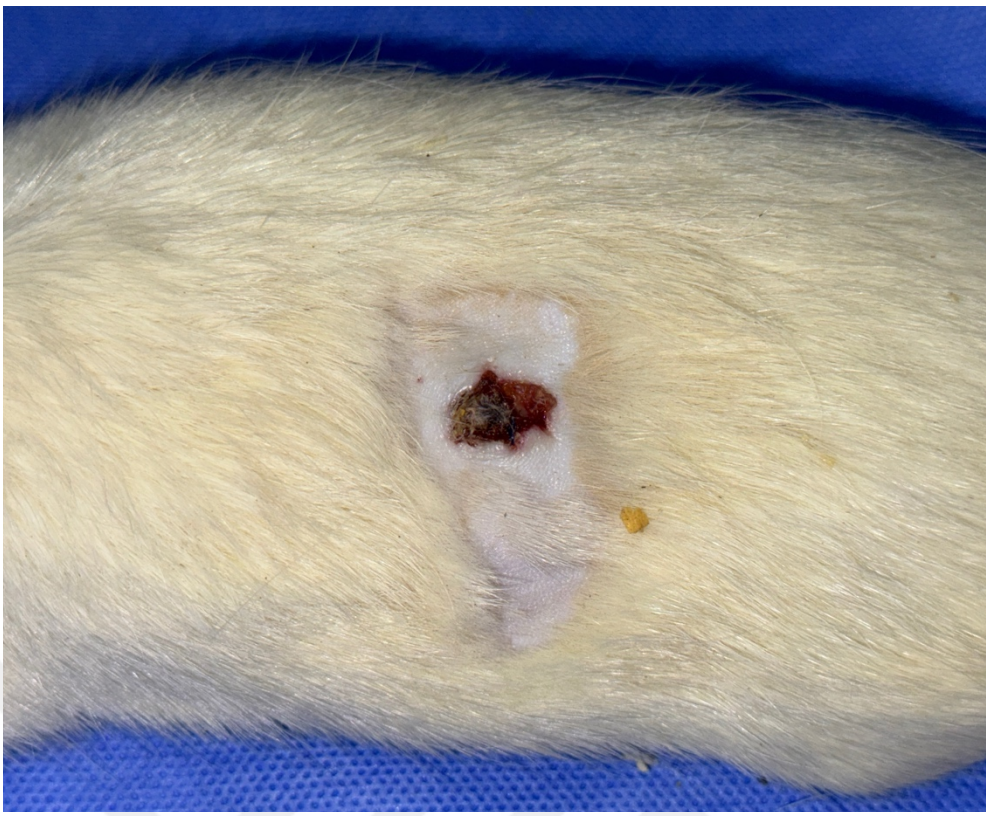
7. günün sonunda, plasebo deney grubunda yer alan sıçanlarda deri adasındaki sağkalım görülen alanlar ve toplam sağ kalım yüzdeleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4. 2: Plasebo grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi.

PLASEBO	Toplam greft cm^2)	Sağkalım görülen alan (cm^2)	Nekroz görülen alanı (cm^2)	Toplam sağkalım yüzdesi
P-1	1	0.2	0.8	20%
P-2	1	0.4	0.6	40%
P-3	1	0.1	0.9	10%
P-4	1	0	1	0%
P-5	1	0	1	0%
P-6	1	0.3	0.7	30%
P-7	1	0.1	0.9	10%



Şekil 4. 5: Plasebo grubundan Sıçan-2, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü



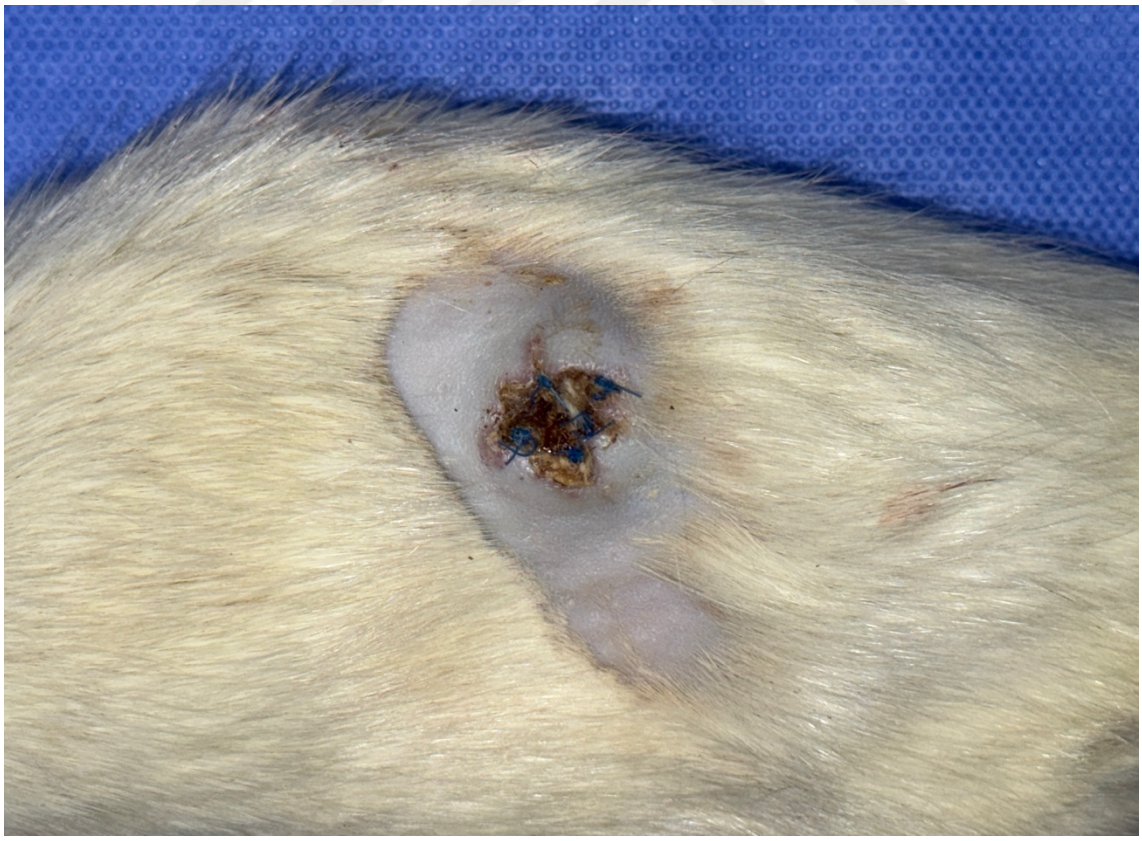
Şekil 4. 6: Plasebo grubundan Sıçan-3, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü

4.1.3. Kök hücre grubu

7. günün sonunda, kök hücre deney grubunda yer alan sıçanlarda deri adasındaki sağkalım görülen alanlar ve toplam sağ kalım yüzdeleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4. 3: Kök hücre grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi.

KÖK HÜCRE	Toplam greft (cm^2)	Sağkalım görülen alan (cm^2)	Nekroz görülen alanı (cm^2)	Toplam sağkalım yüzdesi
KH-1	1	0.4	0.6	40%
KH-2	1	0.5	0.5	50%
KH-3	1	0.4	0.6	40%
KH-4	1	0.3	0.7	30%
KH-5	1	0.5	0.5	50%
KH-6	1	0.2	0.8	20%
KH-7	1	0.4	0.6	40%



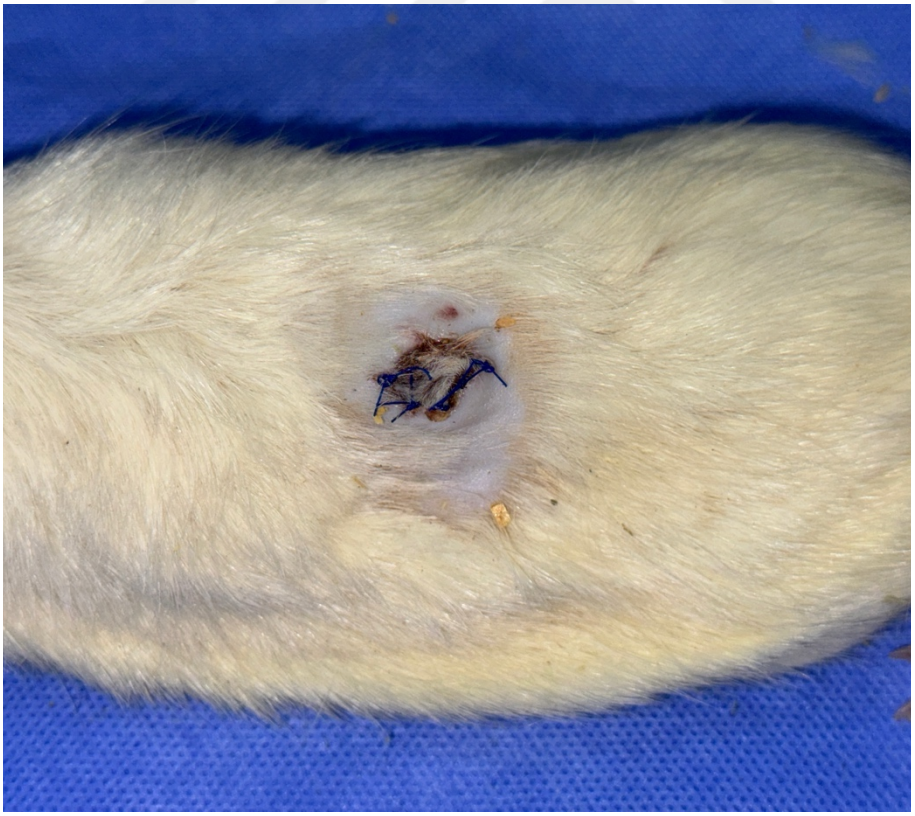
Şekil 4. 7: Kök hücre grubundan Sıçan-6, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü

4.1.4. Ghrelin grubu

7. günün sonunda, ghrelin deney grubunda yer alan sıçanlarda deri adasındaki sağkalım görülen alanlar ve toplam sağ kalım yüzdeleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4. 4: Ghrelin grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi.

GHRELİN	Toplam greft (cm^2)	Sağkalım görülen alan (cm^2)	Nekroz görülen alanı (cm^2)	Toplam sağkalım yüzdesi
G-1	1	0.5	0.5	50%
G-2	1	0.4	0.6	40%
G-3	1	0.7	0.7	70%
G-4	1	0.4	0.6	40%
G-5	1	0.2	0.8	20%
G-6	1	0.5	0.5	50%
G-7	1	0.4	0.6	40%



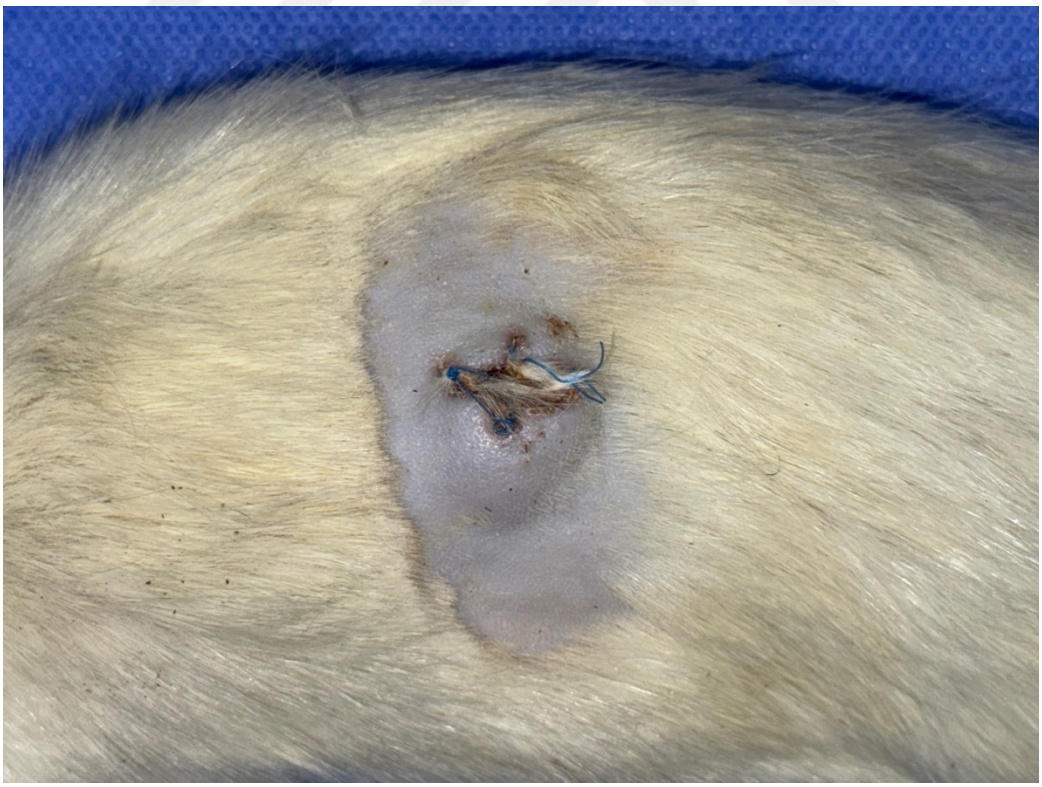
Şekil 4. 8: Ghrelin grubundan Sıçan-3, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü

4.1.5. Kök hücre + Ghrelin grubu

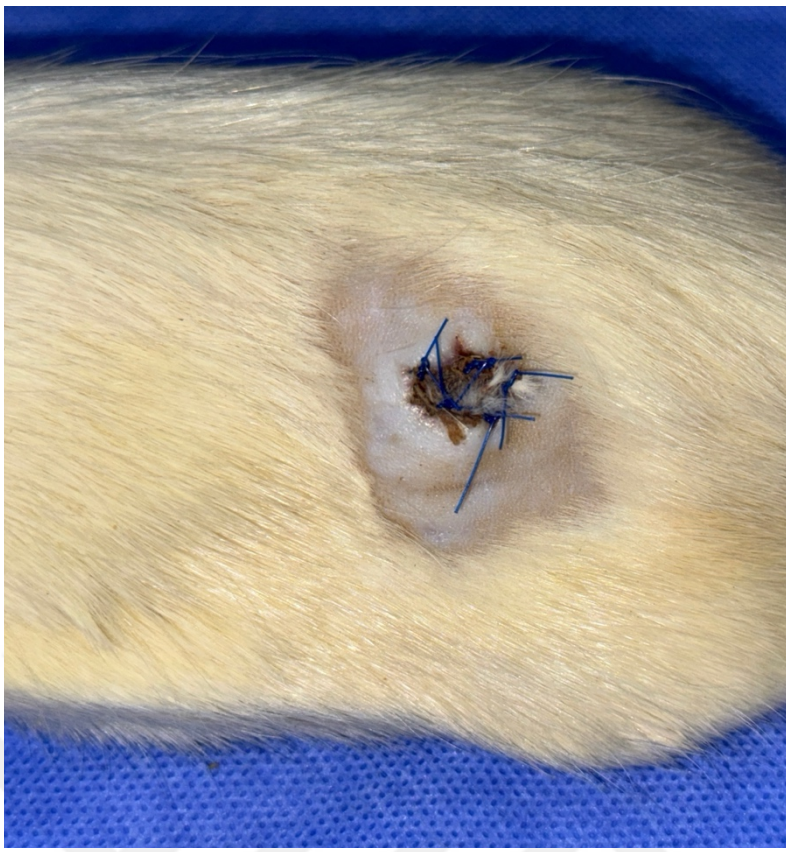
7. günün sonunda, kök hücre + ghrelin deney grubunda yer alan sıçanlarda deri adasındaki sağkalım görülen alanlar ve toplam sağ kalım yüzdeleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 4. 5: Kök hücre + Ghrelin grubunda yer alan kondrokutanöz kompozit greftlerin makroskobik değerlendirmesi.

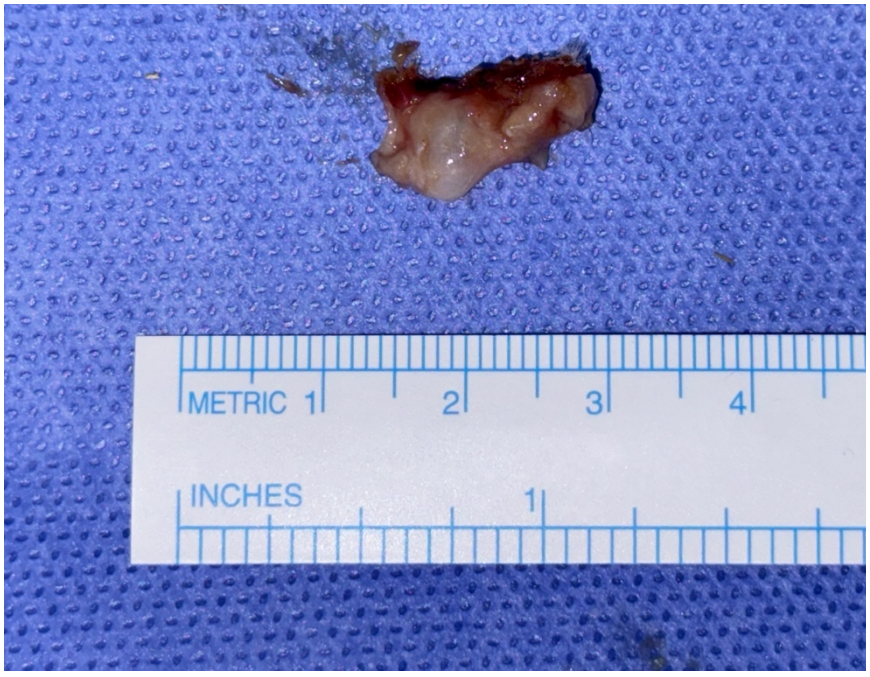
KÖK HÜCRE + GHRELİN	Toplam greft (cm^2)	Sağkalım görülen alan (cm^2)	Nekroz görülen alanı (cm^2)	Toplam sağkalım yüzdesi
KHG-1	1	0.6	0.4	60%
KHG-2	1	0.7	0.3	70%
KHG-3	1	0.5	0.5	50%
KHG-4	1	0.4	0.6	40%
KHG-5	1	0.5	0.5	50%
KHG-6	1	0.3	0.7	30%
KHG-7	1	0.6	0.4	60%



Şekil 4. 9: Kök hücre + Ghrelin grubundan Sıçan-2, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü



Şekil 4. 10: Kök hücre + Ghrelin grubundan Sıçan-2, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü



Şekil 4. 11: Kök hücre + Ghrelin grubundan Sıçan-1, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü

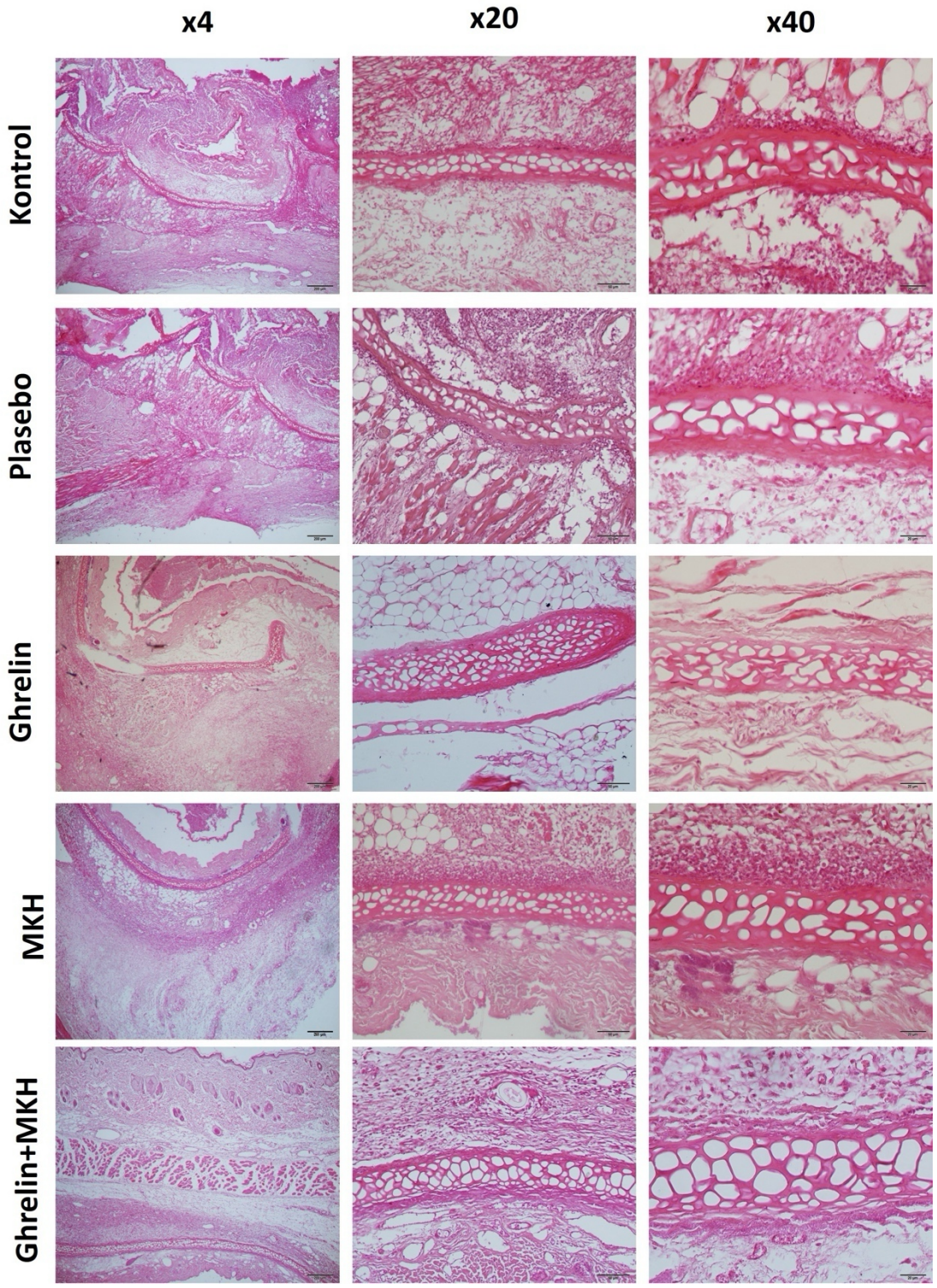


Şekil 4. 12: Kök hücre + Ghrelin grubundan Sıçan-1, greftin ameliyat sonrası 7. Gün görüntüsü

,

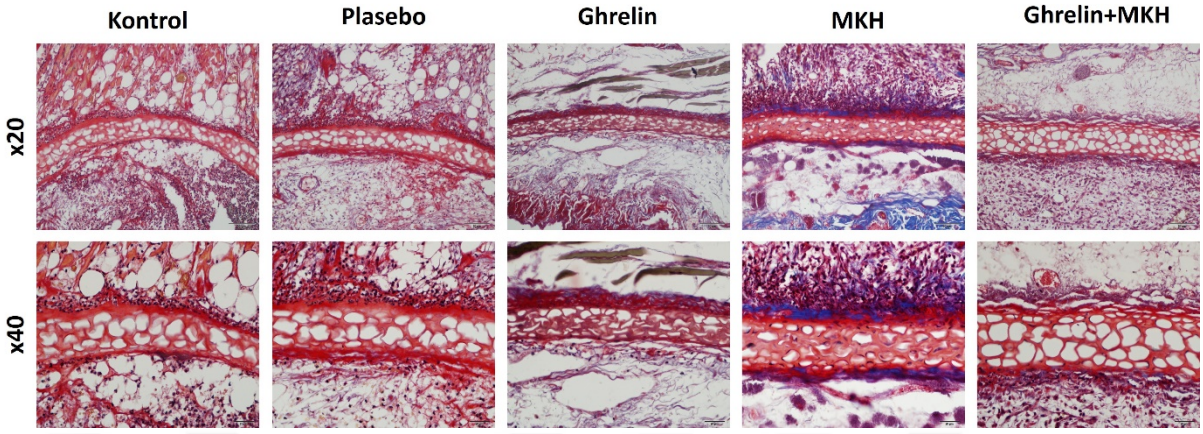
4.2. Histolojik değerlendirme

4.2.1. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyaması Bulguları



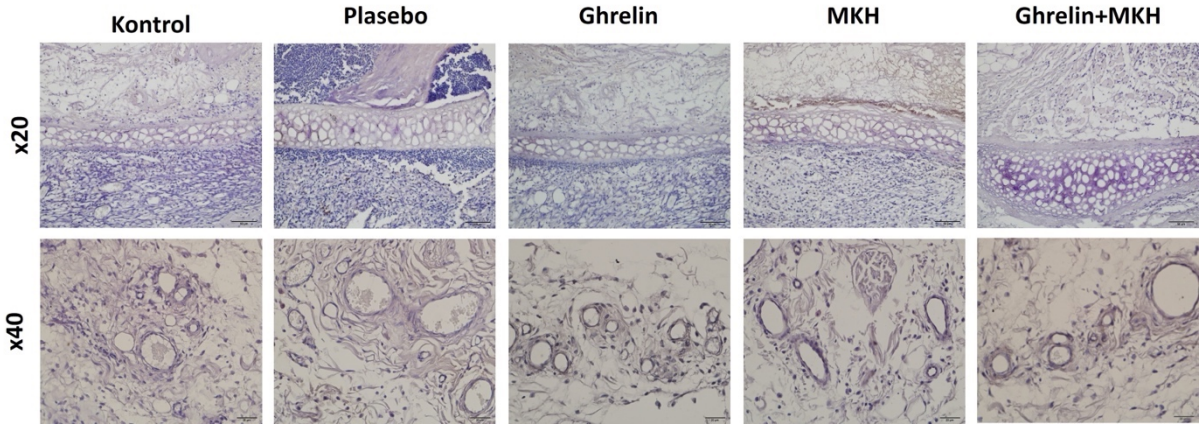
Şekil 4. 13: Deney gruplarının Hematoksilen&Eozin boyamasına ait fotomikrograflar.

4.2.2. Masson Trikrom Boyaması Bulguları



Şekil 4. 14: Deney gruplarının Masson Trikrom boyamasına ait fotomikrograflar.

4.2.3. İmmünohistokimyasal Boyama (VEGF) Bulguları



Şekil 4. 15: Deney gruplarının VEGF immünohistokimyasal boyamasına ait fotomikrograflar.

4.2.4. H&E ve Masson trikrom boyama bulguları;

Deney kontrol grubunda subdermal implante edilen kıkırdak yapısı ve dış kulak yoluna ait lümen yapısı görüldü. Perikondriumu disseke tarafta inflamasyon bulgularının olduğu, yoğun miktarda PML hücresinin ilgili bölgeye geldiği görüldü. Bağ dokusunda yüksek/orta seviyede ödem varlığı saptandı. Kıkırdak dokusunun inceldiği, kondrosit hücrelerinde intrasitoplazmik ödem varlığı görüldü. Kondroblast hücrelerinin silindiği görüldü.

Özellikle perikondrium disseke edilen kısımda anjiyogenez yönünde bir artış olduğu saptandı.

Plasebo grubunda da Deney kontrol grubuna benzer bir histopatolojik görünümün olduğu saptandı.

Ghrelin grubunda kıkırdağın görece daha kalın olduğu Kontrol ve plasebo grubunda görülen inflamatif hücre yoğunluğunun düşük olduğu görüldü. Kondrosit hücrelerinin normal histolojik yapıya yakın ve kondroblastların yoğunluğunun da yüksek olduğu saptandı.

MKH grubunda kıkırdak yapısının korunduğu görüldü. Perikondrium disseke edilen kısımda yoğun hücre invazyonu görüldü. Kontrol ve plasebo grubuna kıyasla bağ dokusu içerisinde ödemin düşük/orta yoğunlukta olduğu tespit edildi.

Ghrelin+MKH grubunda ise kıkırdak yapısının korunduğu saptandı. Perikondrium disseke edilen kısımda düşük seviyede ödem varlığı görüldü, bu kısımda hücrelerin homojen dağıldığı saptandı. Kıkırdağın normal histolojiye yakın olduğu ve kondroblast hücrelerinin korunduğu görüldü. Tüm gruplar içinde normal histolojik görünüme en yakın grup olduğu saptandı.

Tedavi grupları olan Ghrelin, MKH ve Ghrelin+MKH gruplarında disseke edilen kısımda perikondriyuma yakın alanlarda yeni kolajen sentezi olduğu düşünülen mallory trikrom boya ile mavi boyanma varlığı dikkat çekici idi. Ayrıca bu alanlarda anjiyogenez yönünde bir farklanma olduğu saptandı.

4.2.5. Anti- VEGF

Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF); endoteliyal hücre proliferasyonunu arttıran, hücre göçünü destekleyen ve apoptozu inhibe eden bir faktördür. Damar geçirgenliğinin yanı sıra anjiyogenezi indükler ve vaskülogenezin düzenlenmesinde bir rol oynamaktadır.

Deney grupları içerisinde tüm gruplarda VGEF ekspresyonu olduğu görüldü. Bu ekspresyonun Ghrelin ve Ghrelin+MKH grubunda daha yoğun olduğu görüldü.

4.3. İstatiksel değerlendirme

Tablo 4. 6:Deneklerin Klinik Bulgularının Dağılımı

Değişkenler (N=35)	n (%)	Ortalama ± SS	Medyan (Min-Max)
Grup			
Kontrol	**7 (20,0)**		
Plasebo	**7 (20,0)**		
Kök hücre	**7 (20,0)**		
Ghrelin	**7 (20,0)**		
Kök hücre+Ghrelin	**7 (20,0)**		
Sağkalım görülen alan (cm^2)		**0,33±0,20**	**0,40 (0,00-0,70)**
Nekroz görülen alanı (cm^2)		**0,68±0,19**	**0,60 (0,30-1,00)**
Toplam sağkalım yüzdesi		**33,1±19,96**	**40,00 (0,00-70,00)**

Çalışma kapsamında değerlendirmeye beş farklı gruptan 35 denek dahil edilmiştir. Deneklerin klinik özelliklerinin dağılımı Tablo 4.6'da yer almaktadır.

4.3.1. Klinik bulguların istatiksel değerlendirmesi

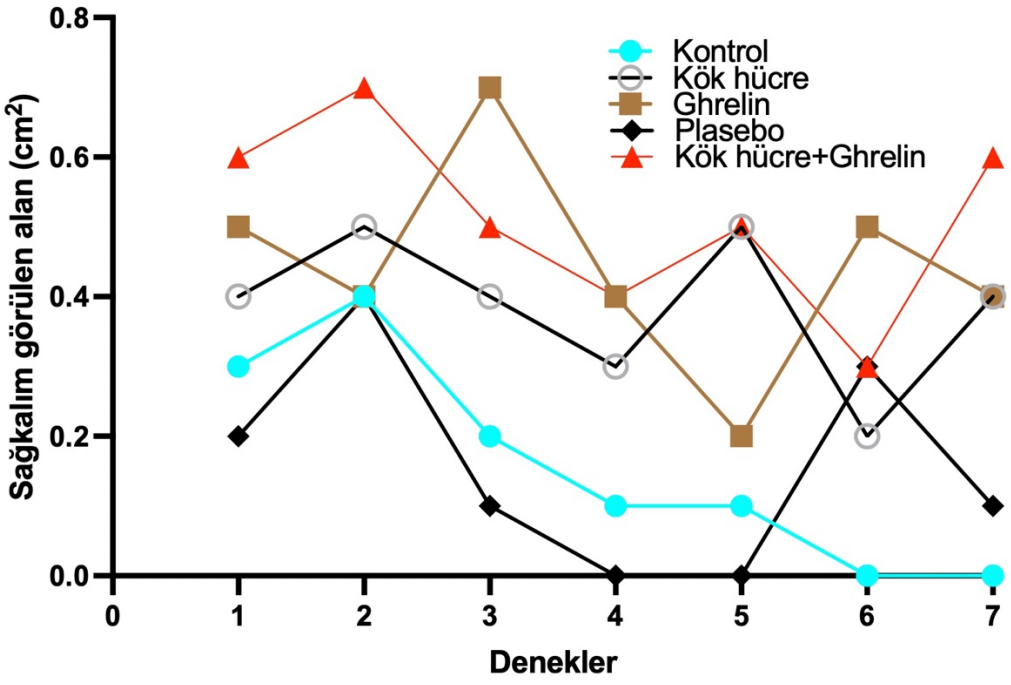
Tablo 4. 7: Deney Grupları Dikkate Alındığında Klinik Bulguların Dağılımı

Gruplar	Sağkalım görülen alan (cm2)		p-değeri	FARK*
	Ortalama±SS	Medyan (Min-Max)		
Kontrol[1]	**0,16±0,15**	**0,1 (0-0,4)**		
Plasebo[2]	**0,16±0,15**	**0,1 (0-0,4)**		
Kök hücre[3]	**0,39±0,11**	**0,4 (0,2-0,5)**	**<0,001**	1-3;1-4;1-5; 2-3;2-4;2-5
Ghrelin[4]	**0,44±0,15**	**0,4 (0,2-0,7)**		
Kök hücre+Ghrelin[5]	**0,51±0,13**	**0,5 (0,3-0,7)**		
Gruplar	**Nekroz görülen alanı (cm2)**		**p-değeri**	**FARK***
	Ortalama±SS	**Medyan (Min-Max)**		
Kontrol[1]	**0,84±0,15**	**0,9 (0,6-1)**		
Plasebo[2]	**0,84±0,15**	**0,9 (0,6-1)**		
Kök hücre[3]	**0,61±0,11**	**0,6 (0,5-0,8)**	**<0,001**	1-3;1-4;1-5; 2-3;2-4;2-5
Ghrelin[4]	**0,61±0,11**	**0,6 (0,5-0,8)**		
Kök hücre+Ghrelin[5]	**0,49±0,13**	**0,5 (0,3-0,7)**		

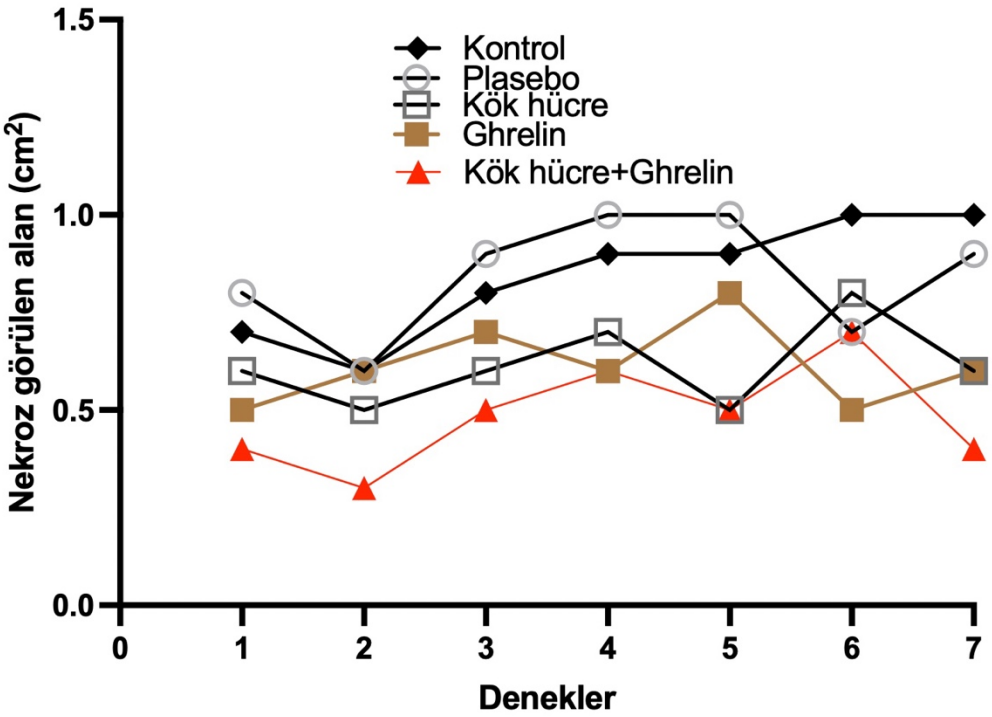
Gruplar	Toplam sağkalım yüzdesi		p-değeri	FARK*
	Ortalama±SS	Medyan (Min-Max)		
Kontrol[1]	**15,71±15,12**	**10 (0-40)**		
Plasebo[2]	**15,71±15,12**	**10 (0-40)**		1-3;1-4;1-5; 2-3;2-4;2-5
Kök hücre[3]	**38,57±10,69**	**40 (20-50)**	**<0,001**	
Ghrelin[4]	**44,29±15,12**	**40 (20-70)**		
Kök hücre+Ghrelin[5]	**51,43±13,45**	**50 (30-70)**		

* Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U-testi.

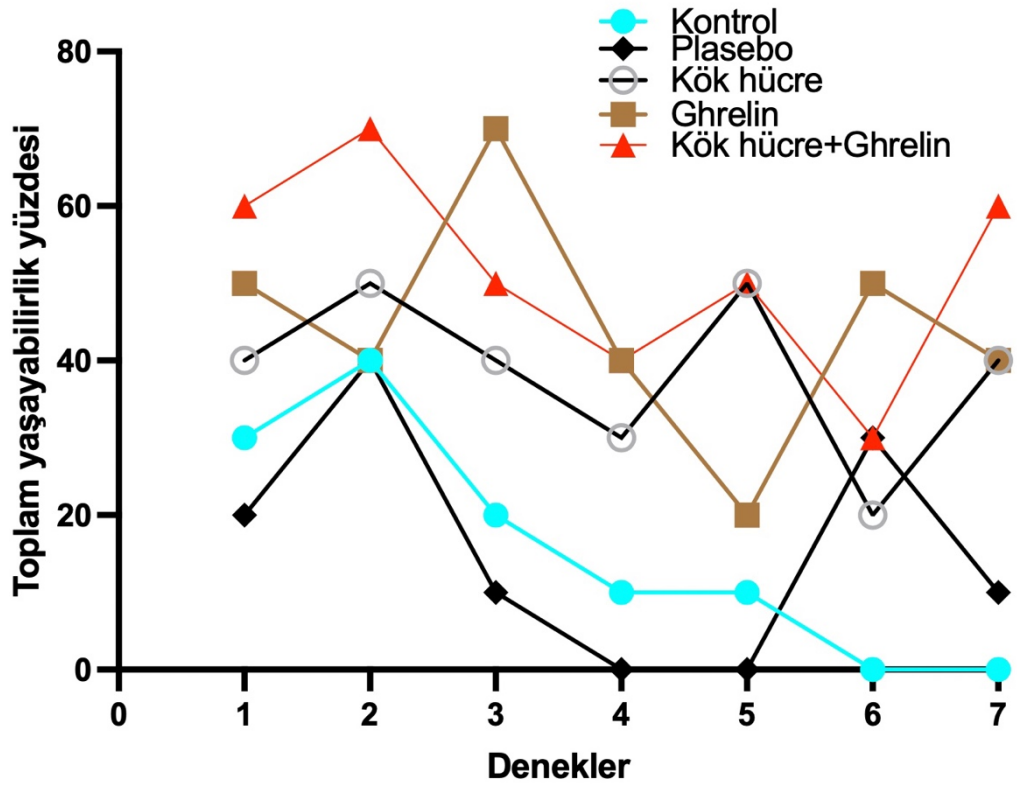
Denek gruplarına göre yaşayan sağkalım görülen alan, nekroz görülen alan ve toplam sağkalım yüzdesinin dağılımı Tablo 4.7'de yer almaktadır. Tablo değerlendirildiğinde gruplar içinde tüm ölçüm tiplerinde istatistiksel bakımdan anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır. Farklılığın hangi gruplardan köken aldığını tespit için yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U-testi neticesinde tüm ölçümlerde farklılıklar "Kontrol ile Kök hücre", "Kontrol ile Ghrelin", "Kontrol ile Kök hücre+Ghrelin", "Plasebo ile Kök hücre", "Plasebo ile Ghrelin" ve "Plasebo ile Kök hücre+Ghrelin" gruplarından kaynaklandığı belirlenmiştir.



Şekil 4. 16: Denek Gruplarına Göre Sağkalım Görülen Alanlarının Dağılımı



Şekil 4. 17: Deney Grupları Dikkate Alındığında Nekroz Görülen Alanlarının Dağılımı



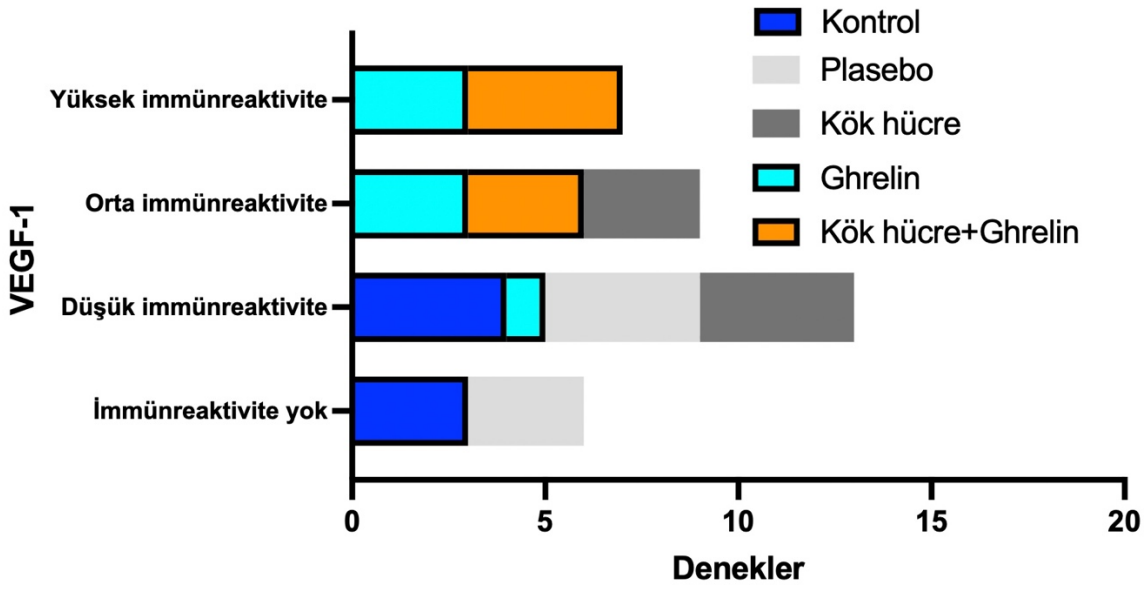
Şekil 4. 18: Denek Gruplarına Göre Toplam Sağkalım Yüzdesinin Dağılımı

4.3.2. Histolojik bulguların istatiksel değerlendirmesi

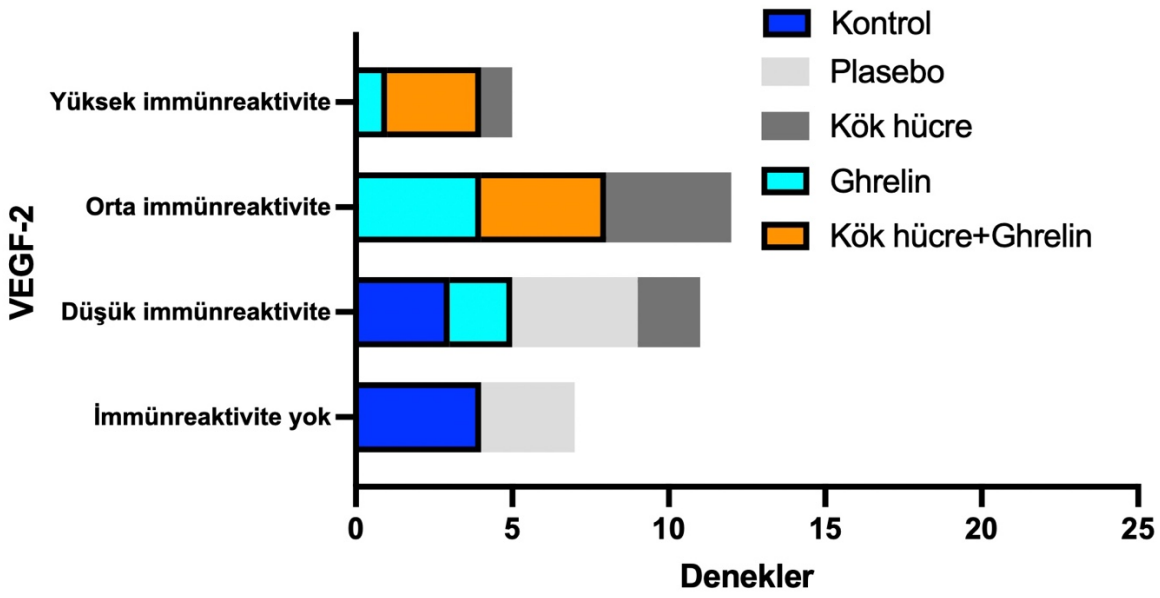
Tablo 4. 8: Deney Grupları Dikkate Alındığında Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Ölçüm Çıktılarının Dağılımı

Ölçümler	Kontrol	Plasebo	Kök hücre	Ghrelin	Kök hücre+Ghrelin	p-değeri
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
VEGF-1						**0,002**
İmmünreaktivite yok	**3 (42,9)**	**3 (42,9)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	
Düşük immünreaktivite	**4 (57,1)**	**4 (57,1)**	**4 (57,1)**	**1 (14,3)**	**0 (0)**	
Orta immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**3 (42,9)**	**3 (42,9)**	**3 (42,9)**	
Yüksek immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**3 (42,9)**	**4 (57,1)**	
VEGF-2						**0,004**
İmmünreaktivite yok	**4 (57,1)**	**3 (42,9)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	
Düşük immünreaktivite	**3 (42,9)**	**4 (57,1)**	**2 (28,6)**	**2 (28,6)**	**0 (0)**	
Orta immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**4 (57,1)**	**4 (57,1)**	**4 (57,1)**	
Yüksek immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**1 (14,3)**	**1 (14,3)**	**3 (42,9)**	
VEGF-3						**0,002**
İmmünreaktivite yok	**4 (57,1)**	**4 (57,1)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	
Düşük immünreaktivite	**3 (42,9)**	**3 (42,9)**	**2 (28,6)**	**1 (14,3)**	**0 (0)**	
Orta immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**4 (57,1)**	**4 (57,1)**	**3 (42,9)**	
Yüksek immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**1 (14,3)**	**2 (28,6)**	**4 (57,1)**	
VEGF-4						**<0,001**
İmmünreaktivite yok	**4 (57,1)**	**4 (57,1)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	
Düşük immünreaktivite	**3 (42,9)**	**3 (42,9)**	**4 (57,1)**	**1 (14,3)**	**0 (0)**	
Orta immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**3 (42,9)**	**4 (57,1)**	**3 (42,9)**	
Yüksek immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**2 (28,6)**	**4 (57,1)**	
VEGF-5						**0,001**
İmmünreaktivite yok	**3 (42,9)**	**2 (28,6)**	**1 (14,3)**	**0 (0)**	**0 (0)**	
Düşük immünreaktivite	**4 (57,1)**	**5 (71,4)**	**2 (28,6)**	**0 (0)**	**0 (0)**	
Orta immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**4 (57,1)**	**5 (71,4)**	**4 (57,1)**	
Yüksek immünreaktivite	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**2 (28,6)**	**3 (42,9)**	

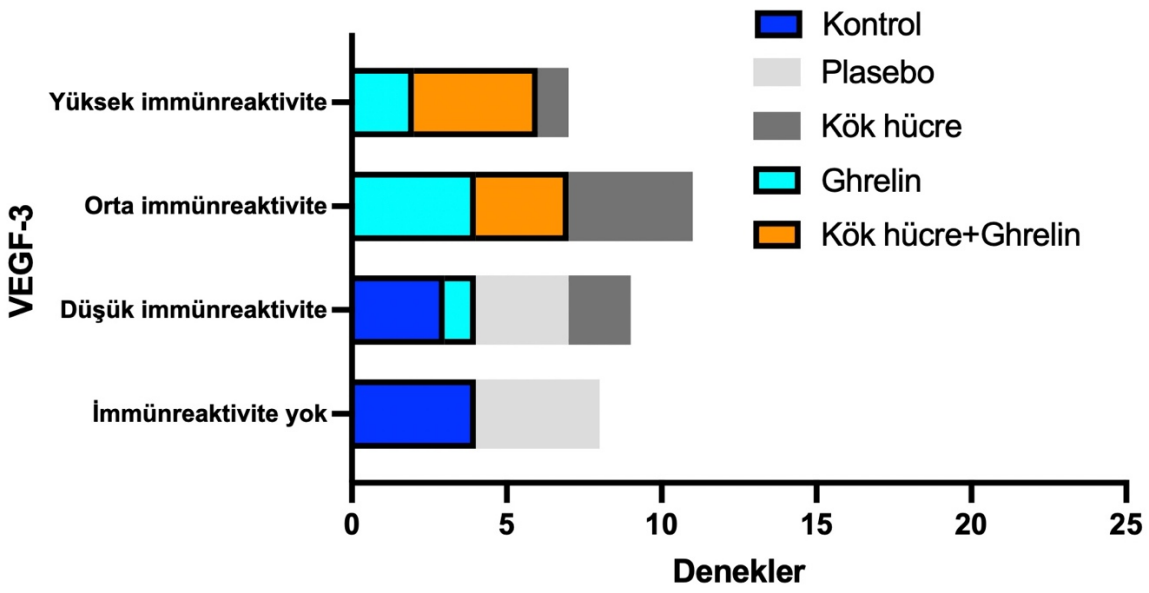
Çalışma içerisinde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) açısından gruplarda yer alan her denekten 40x magnifikasyonda beş (5) ayrı alan değerlendirmeye alınmış ve gruplara göre her alan için değerlendirme sonuçları Tablo 4.8'de sunulmuştur. Tablo değerlendirildiğinde gruplar içinde tüm bölge sonuçlarında istatistiksel bakımdan anlamlı bir ilişki varlığı saptanmıştır ($p<0,05$).



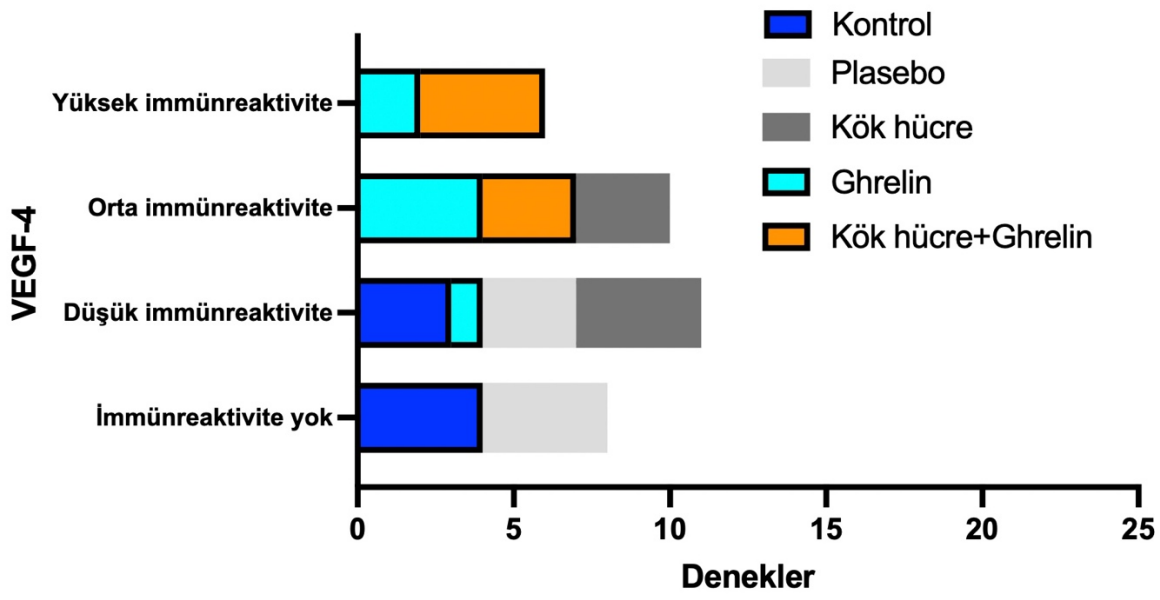
Şekil 4. 19: Denek Gruplarına Göre VEGF-1 Ölçümlerinin Dağılımı



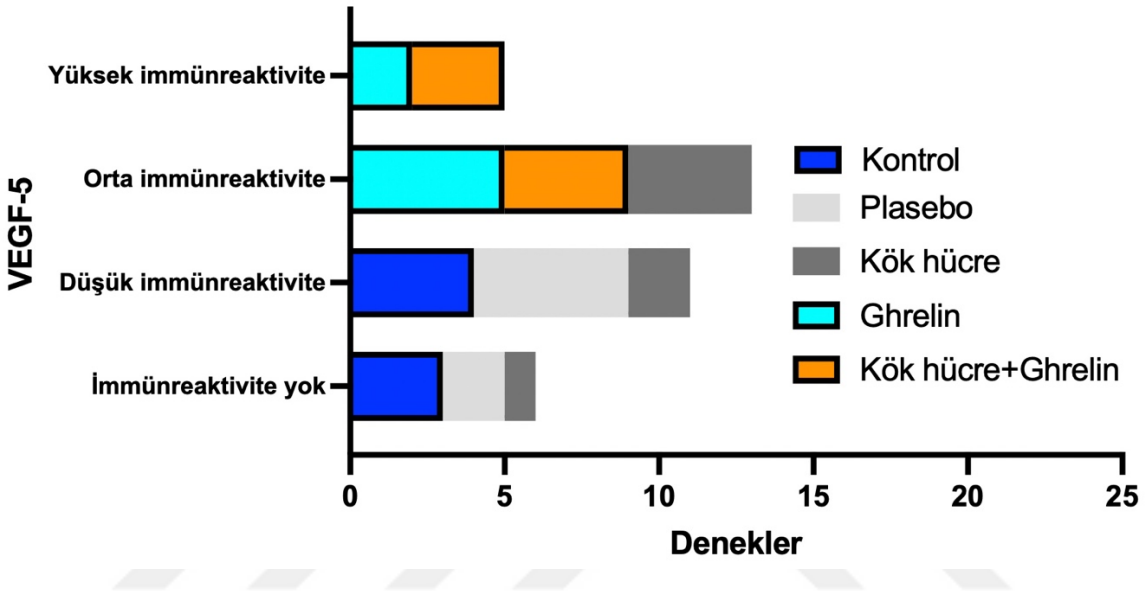
Şekil 4. 20: Denek Gruplarına Göre VEGF-2 Ölçümlerinin Dağılımı



Şekil 4. 21: Deney Grupları Dikkate Alındığında VEGF-3 Ölçümlerinin Dağılımı



Şekil 4. 22: Denek Gruplarına Göre VEGF-4 Ölçümlerinin Dağılımı

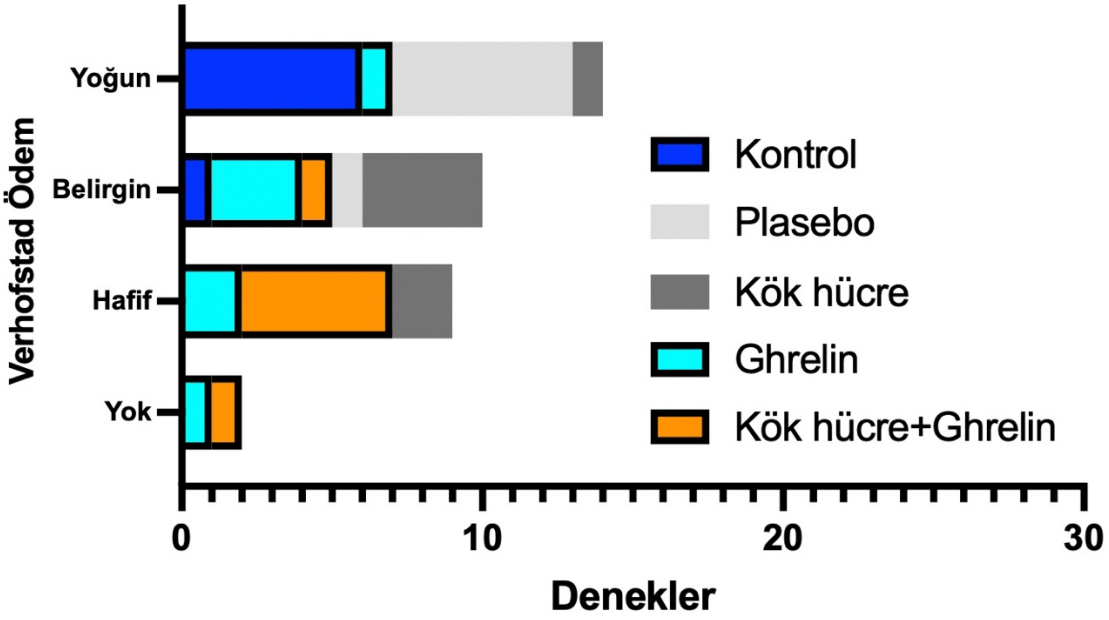


Şekil 4. 23: Denek Gruplarına Göre VEGF-5 Ölçümlerinin Dağılımı

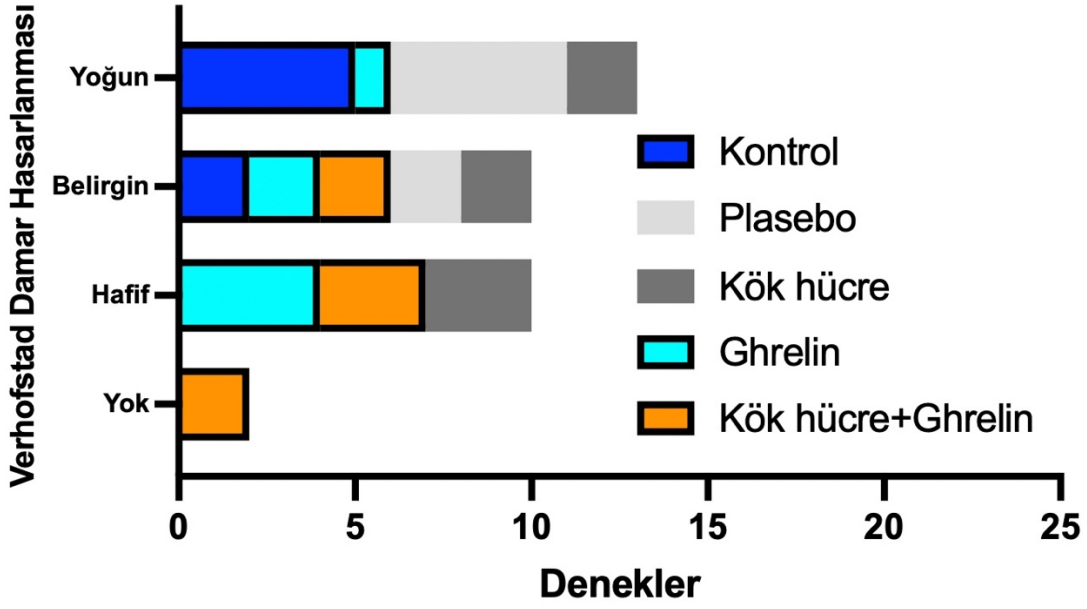
Çalışma içerisindeki grupların verhosstad-ödem, PMNL infiltrasyon, damar hasarlanması, kıl kökü hasarlanması ve Glandula sebasea hasarlanması açısından değerlendirme sonuçları Tablo 4.9'da verilmektedir. Tabloya bakıldığında gruplar içinde PMNL infiltrasyon ölçümü dışındaki tüm ölçümlerde istatistiksel bakımdan anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Tablo 4. 9: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad Ölçüm Çıktılarının Dağılımı

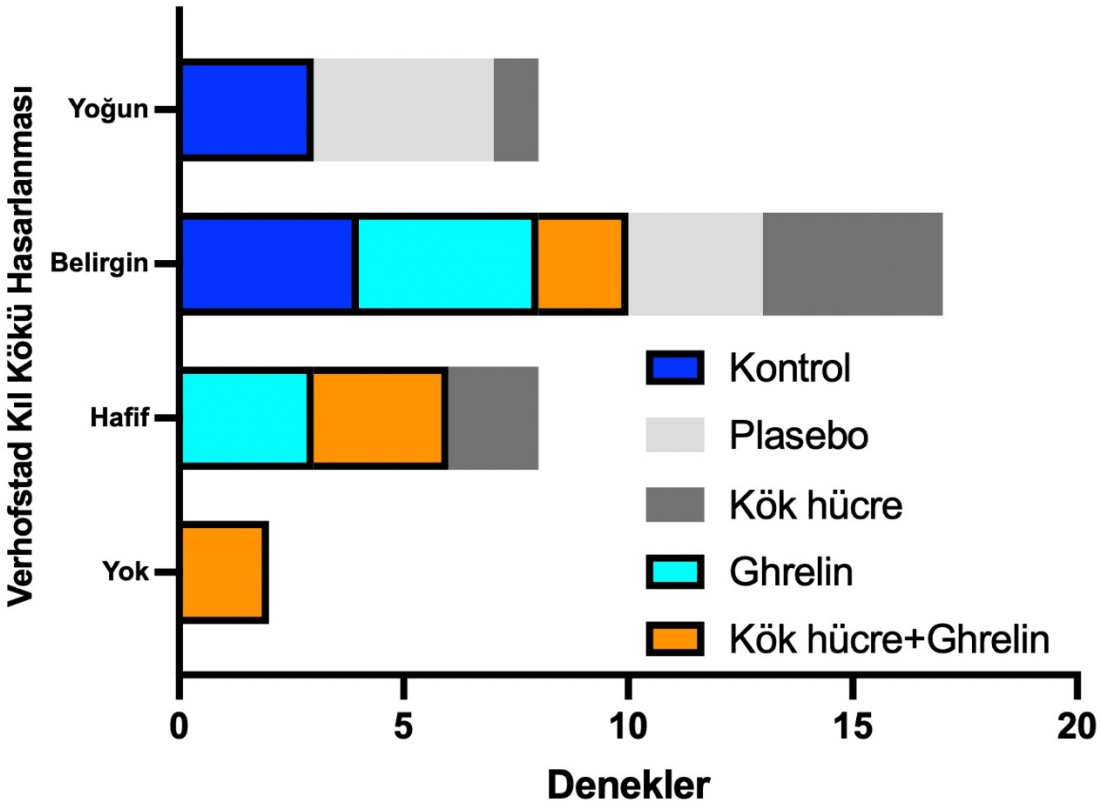
Ölçümler	Kontrol	Plasebo	Kök hücre	Ghrelin	Kök hücre+Ghrelin	p-değeri
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Verhofstad Ödem						**0,004**
Yok	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**1 (14,3)**	**1 (14,3)**	
Hafif	**0 (0)**	**0 (0)**	**2 (28,6)**	**2 (28,6)**	**5 (71,4)**	
Belirgin	**1 (14,3)**	**1 (14,3)**	**4 (57,1)**	**3 (42,9)**	**1 (14,3)**	
Yoğun	**6 (85,7)**	**6 (85,7)**	**1 (14,3)**	**1 (14,3)**	**0 (0)**	
Verhofstad PMNL İnfiltrasyon						0,176
Normal sayı	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	
Hafif artış	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	2 (28,6)	4 (57,1)	
Belirgin artış	3 (42,9)	2 (28,6)	3 (42,9)	2 (28,6)	2 (28,6)	
Yoğun infiltrasyon	4 (57,1)	5 (71,4)	2 (28,6)	2 (28,6)	0 (0)	
Verhofstad Damar Hasarlanması						**0,026**
Yok	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**2 (28,6)**	
Hafif	**0 (0)**	**0 (0)**	**3 (42,9)**	**4 (57,1)**	**3 (42,9)**	
Belirgin	**2 (28,6)**	**2 (28,6)**	**2 (28,6)**	**2 (28,6)**	**2 (28,6)**	
Yoğun	**5 (71,4)**	**5 (71,4)**	**2 (28,6)**	**1 (14,3)**	**0 (0)**	
Verhofstad Kıl Kökü Hasarlanması						**0,028**
Yok	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**0 (0)**	**2 (28,6)**	
Hafif	**0 (0)**	**0 (0)**	**2 (28,6)**	**3 (42,9)**	**3 (42,9)**	
Belirgin	**4 (57,1)**	**3 (42,9)**	**4 (57,1)**	**4 (57,1)**	**2 (28,6)**	
Yoğun	**3 (42,9)**	**4 (57,1)**	**1 (14,3)**	**0 (0)**	**0 (0)**	
Verhofstad Glandula Sebasea Hasarlanması						**0,005**
Yok	**0 (0)**	**0 (0)**	**4 (57,1)**	**1 (14,3)**	**1 (14,3)**	
Hafif	**0 (0)**	**0 (0)**	**3 (42,9)**	**1 (14,3)**	**3 (42,9)**	
Belirgin	**2 (28,6)**	**3 (42,9)**	**0 (0)**	**3 (42,9)**	**3 (42,9)**	
Yoğun	**5 (71,4)**	**4 (57,1)**	**0 (0)**	**2 (28,6)**	**0 (0)**	



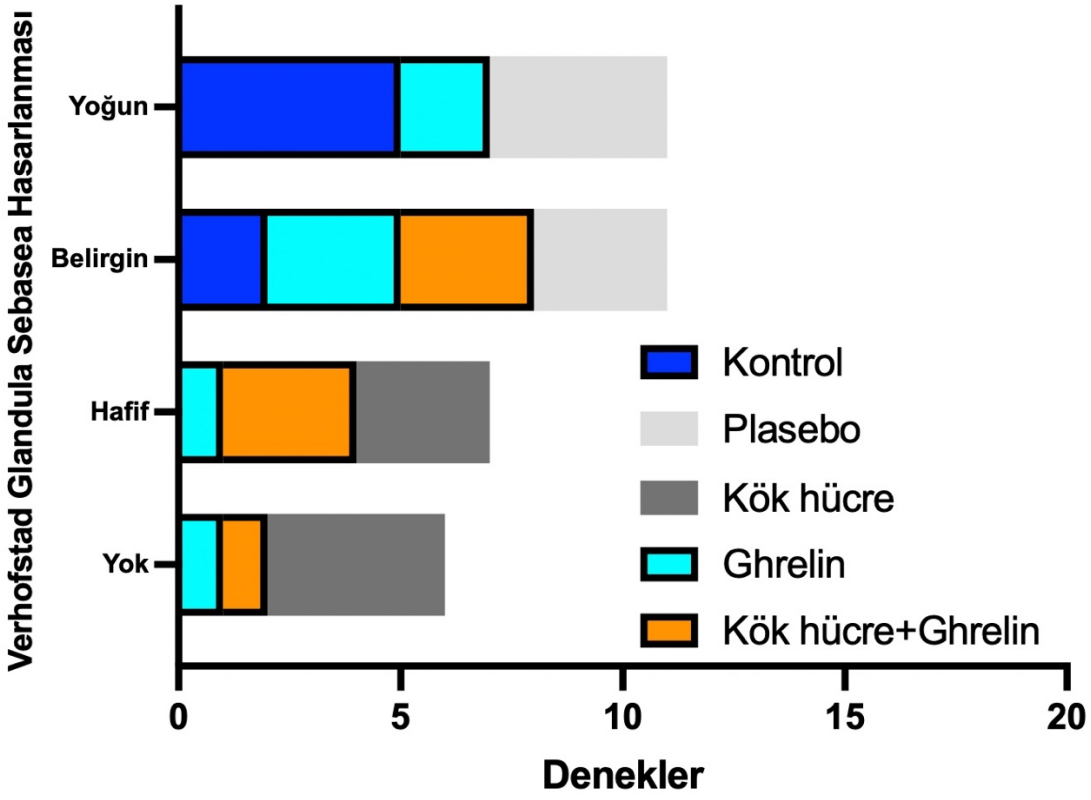
Şekil 4. 24: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad-Ödemin Dağılımı



Şekil 4. 25: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad-Damar Hasarlanmasının Dağılımı



Şekil 4. 26: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad-Kıl Kökü Hasarlanmasının Dağılımı



Şekil 4. 27: Deney Grupları Dikkate Alındığında Verhofstad-Glandula Sebasea Hasarlanmasının Dağılımı

5. TARTIŞMA

Kondrokutanöz kompozit greftler özellikle yüzdeki çeşitli defektlerin rekonstrüksiyonunda kullanışlı bir tekniktir. Kompozit greftler sadece iyi renk ve doku uyumu değil, aynı zamanda belirli bir miktarda şekillendirme ve destek gerektiren; sıklıkla göz kapağı, kulak kepçesi, burun alar kanatı ve kolumellada yer alan küçük defektlerin rekonstrüksiyonunda kullanılır. (3,51)

Kondrokutanöz kompozit greftlerin klinik kullanımını kısıtlayan çeşitli dezavantajları mevcuttur. Bu kısıtlılıklardan biri greftin iyileşme sürecinde uğradığı kontraksiyondur. Kompozit greft alınması ve hazırlanması teknik olarak zor olmamakla birlikte bu onarımların başarısı için iyi bir planlama şarttır. Planlama aşamasında dikkate alınması gereken önemli bir nokta, kompozit greftlerin önemli ölçüde kontraksiyona eğilimli olmasıdır; bu durum dikkate alınmadığı takdirde hedeflenen estetik ve fonksiyonel sonuçlara ulaşılamayacaktır(3)

Kullanımı kısıtlayan başka bir dezavantajı ise beslenmeye bağlı düşük sağkalım oranlarıdır(50)

Kompozit greftin çevre dokudan beslenmesini sağlaması, greftin donör sahadan alındığı andan revaskülarizasyon süreci tamamlanana kadar zayıftır(52–56).

Literaürde kompozit greftlerin sağkalımında alıcı sahadan beslenmenin etkilerinin araştırıldığı çok sayıda deneysel çalışma mevcuttur. Davis ve Traut (57) tarafından köpekler üzerinde yapılan çalışmada deri grefti ile alıcı bölgedeki damarlar arasında oluşan anastomozlar mikroskobik olarak gösterilmiştir.

1955 yılında McLaughlin (56) burun alar kanat defektlerinde kompozit greftlerin kullanıldığı hasta serisinde greftin soluk-beyaz renkteki altı saatlik sürecin ardından, rengin pembeye dönüştüğünü gözlemlemiştir. Çalışmada gözlenen bu durum alıcı saha ile greft arasında erken dönemde oluşan anostomozların greftin beslenmesine katkıda bulunduğunun kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

Ballantyne ve Conversel civciv embriyo damarları ile tavşan kulaklarından alınan kompozit greft damarları arasında oluşan anastomozları histolojik olarak göstermişlerdir.

Çalışmanın devamında greft damarlarında belirgin dejenerasyon görülmesi greftin kesin beslenmesinin, alıcı sahadaki damarların greft içerisine penetrasyonuna güçlü bir şekilde bağlı olduğunu düşündürmüştür(54). Difosfopiridin nükleotid dehidrojenaz aktivitesine dayanan canlılık çalışmalarında, deri grefti damarlarında belirgin dejenerasyon ve alıcı sahadaki damarlarının greft içerisne penetrasyonunu göstermişler; 24 saat sonra alıcı saha damarları deri grefti dermisine nüfuz ettiği ve üçüncü veya dördüncü günde greftin, alıcı bölgedeki damarlar tarafından revaskülarize olduğunu göstermişlerdir(58).

Greftin beslenmesinin en iyi seviyeye getirilmesi amacıyla alıcı zeminle temas eden yüzeyinin 5mm den küçük olmaması ve greft boyutunun 1cm i aşmaması önerilmektedir(46).

Literatürde, kompozit greftlerin kullanımı ve sağ kalımındaki bu sınırlılıkları aşmak amacıyla yapılan çok sayıda deneysel çalışma yer almaktadır. DeHaan ve Stark (59) Yeni Zelanda beyaz tavşanlarında histamin iyontoforezinin kullanıldığı deneysel bir hayvan modelinde kompozit greftlerin sağ kalımını değerlendirmişler ve greft inset edilmeden önce alıcı sahanın 1 hafta öncesinden hazırlanmasının kompozit greft sağ kalımını arttırdığını raporlamışlardır

1977'de MacCollum ve Grabb (60), deri ve kıkırdak komponentleri içeren kondrokutanöz kompozit greftlerde alıcı sahanın önceden hazırlanmasının etkisini inceledikleri Rhesus maymunu modelinin kullanıldığı çalışmalarında, alıcı sahanın 10 gün önceden hazırlandığında kulak heliksinden alınan kondrokutanöz kompozit greftlerde daha yüksek sağkalım oranı raporlamışlardır.

Perioperatif sistemik steroid uygulamasının domuz (61) ve tavşan (62) modelinde çalışılmış ve yapılan çalışmalar sonucunda bu uygulamanın kompozit greft sağ kalımında anlamlı iyileşme sağladığı raporlanmıştır.

1987'de Hartman ve Goode (37) tarafından tavşan kulağı modelinde postoperatif sistemik metilprednizolon uygulamasının kompozit greftlerin sağkalımına atkisi araştırılmış ve sistemik steroid uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha yüksek greft sağkalım oranı raporlanmıştır.

Daha yakın zamanda, aynı tavşan kulağı deney modelini kullanan Aden ve Biel (36) perioperatif metilprednizolon uygulanan grupta greft sağ kalımında anlamlı bir iyileşme olduğu raporlanmıştır.

Yücel ve ark., kondrokütanöz kompozit greftlerin sağ kalımının artırılmasında ve daha büyük kompozit greftlerin kullanımına yönelik adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AD-MKH) kullanımının etkinliğini sıçan deney modelinde araştırmışlardır. Çalışmada alıcı sahaya önceden AD-MKH uygulanan deney grubunda daha yüksek greft sağ kalım oranı gözlemlenmiştir(63).

Çalışmamızda Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ve ghrelin uygulaması ile kondrokutanöz kompozit greft sağkalımının arttırılabileceği varsayılmış olup bu hipotezi doğrulamaya ve hangi uygulamanın daha etkili olduğunu belirlemeye yönelik olarak deney modeli planlanmıştır.

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler; literatürde hücresel apoptozisi ve doku inflamasyonunu azaltıcı, anjiogenezi artırıcı ve dokularda serbest oksijen radikallerine karşı koruyucu etkileri literatürde yer alan çalışmalarda raporlanmıştır(82).

Apoptozis üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, bu etkilerinin anti-apoptotik proteinlerin üretimini arttırarak sağladıkları gösterilmiştir(76).

Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler; transforming growth factor β1 (TGF-β1), VEGF, anijogenin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 ve perisit benzeri hücrelere dönüşebilme kapasiteleri ile anjiogenezi düzenlemektedir(74).

Vücutta doku hasarı, inflamasyon ya da doku hipoksisi geliştiğinde adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerden anti-inflamatuvar sitokin ekspresyonu ile anti-inflamatuar etki sağlandığı literatürdeki çalışmalarda gösterilmiştir(74,83).

Ghrelin ise esas olarak insan ve sıçan mide hücreleri tarafından üretilmekte olup (89) bunun yanında birçok ek organdan ve epidermal hücreler, lenfositler, makrofajlar dahil olmak üzere deride bulunan birçok hücre türü tarafından salgılanan bir peptittir. Eksikliğinin birçok hastalıktaki inflamatuar süreçlerle yakından bağlantılı olduğu bilinmektedir (40,42,84). Angiogenezi artırıcı (85,86), antioksidan etkili (87) ve yara iyileşmesini düzenleyici bir peptid hormondur (41,42).

Çalışmamızda Ghrelin ve Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, mevcut anti inflamatuar, antioksidan, anjiogenezi artırıcı ve yara iyileşmesini artırıcı etkileri ile kondrokutanöz kompozit greftlerin sağkalımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda gruplar içerisinde tüm ölçüm yöntemlerinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır. Yapılan istatiksel analizler sonucunda farklılıklar "Kontrol ile Kök hücre", "Kontrol ile Ghrelin", "Kontrol ile Kök hücre+Ghrelin", "Plasebo ile Kök hücre", "Plasebo ile Ghrelin" ve "Plasebo ile Kök hücre+Ghrelin" gruplarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Toplam greft sağkalım yüzdesi en düşük kontrol ve plasebo grubunda bulunurken en yüksek kök hücre + ghrelin grubunda bulunmuştur. Toplam greft sağkalım yüzdesi Ghrelin grubunda da kök hücre grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Bununla birlikte histolojik değerlendirmede de (VEGF) bakımından gruplar incelendiğinde gruplar arasında tüm bölge sonuçlarında istatistiksel bakımdan anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Tüm VEGF gruplarında "yüksek immünreaktivite" yüzdesel olarak en yüksek kök hücre + ghrelin grubunda sonrasında da ghrelin grubunda bulunmuştur.

Yapılan verhofstad ölçeklemesinde PMNL infiltrasyon ölçümü dışındaki tüm ölçümlerde istatistiksel bakımdan anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu ölçeklemede istatistiksel açıdan anlamlı bulunan " ödem, damar hasarlanması ve kıl kökü hasarlanması" yüzdesel olarak en düşük kök hücre + ghrelin grubunda sonrasında da ghrelin grubunda saptanırken "glandula sebasea hasarlanması" yüzdesel olarak en düşük kök hücre grubunda ve sonrasında da ghrelin ve kök hücre + ghrelin gruplarında saptanmıştır.

Çalışmamızda deney gruplarında cilt altı cebe yerleştirilen kompozit greft materyalleri H&E ve Masson trikrom boyama ile histolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Deney kontrol grubunda perikondriumu disseke tarafta inflamasyon bulgularının olduğu, yoğun miktarda PML hücresinin ilgili bölgeye geldiği görüldü. Bağ dokusunda yüksek/orta seviyede ödem varlığı saptandı. Kıkırdak dokusunun inceldiği, kondrosit hücrelerinde intrasitoplazmik ödem varlığı görüldü. Kondroblast hücrelerinin silindiği görüldü. Özellikle perikondrium disseke edilen kısımda anjiyogenez yönünde bir artış olduğu saptandı.

Plasebo grubunda da Deney kontrol grubuna benzer bir histopatolojik görünümün olduğu saptandı.

Ghrelin grubunda kıkırdağın görece daha kalın olduğu Kontrol ve plasebo grubunda görülen inflamatif hücre yoğunluğunun düşük olduğu görüldü. Kondrosit hücrelerinin normal histolojik yapıya yakın ve kondroblastların yoğunluğunun da yüksek olduğu saptandı. MKH grubunda kıkırdak yapısının korunduğu görüldü. Perikondrium disseke edilen kısımda yoğun hücre invazyonu görüldü. Kontrol ve plasebo grubuna kıyasla bağ dokusu içerisinde ödemin düşük/orta yoğunlukta olduğu tespit edildi.

Ghrelin+MKH grubunda ise kıkırdak yapısının korunduğu saptandı. Perikondrium disseke edilen kısımda düşük seviyede ödem varlığı görüldü, bu kısımda hücrelerin homojen dağıldığı saptandı. Kıkırdağın normal histolojiye yakın olduğu ve kondroblast hücrelerinin korunduğu görüldü. Tüm gruplar içinde normal histolojik görünüme en yakın grup olduğu saptandı.

Tedavi grupları olan Ghrelin, MKH ve Ghrelin+MKH gruplarında disseke edilen kısımda perikondriyuma yakın alanlarda yeni kolajen sentezi olduğu düşünülen masson trikrom boya ile mavi boyanma varlığı dikkat çekici idi. Ayrıca bu alanlarda anjiyogenez yönünde bir farklanma olduğu saptandı.

Çalışmamızda ayrıca, endoteliyal hücre proliferasyonunu arttıran, hücre göçünü destekleyen ve apoptozu inhibe eden bir faktör olan Vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonları da ölçülmüştür. Damar geçirgenliğinin yanı sıra anjiyogenezi indüklemekte ve vaskülogenezin düzenlenmesinde bir rol oynamaktadır.

Deney grupları içerisinde tüm gruplarda VGEF ekspresyonu olduğu görüldü. Bu ekspresyonun Ghrelin ve Ghrelin+MKH grubunda daha yoğun olduğu görüldü. Tüm VEGF gruplarında "yüksek immünreaktivite" yüzdesel olarak en yüksek kök hücre + ghrelin grubunda sonrasında da ghrelin grubunda bulunmuştur.

Histolojik değerlendirmede deney grupları Verhofstad Skalasında göre; damar hasarlanması, ödem, PMNL infiltrasyonu, glandula sebasea hasarlanması ve kıl kökü hasarlanmasına yönelik kıyaslanmış ve bu kıyaslama incelenmiştir. Bu ölçeklemede istatistiksel açıdan anlamlı bulunan " ödem, damar hasarlanması ve kıl kökü hasarlanması" yüzdesel olarak en düşük kök hücre + ghrelin grubunda sonrasında da ghrelin grubunda saptanırken "glandula sebasea hasarlanması" yüzdesel olarak en düşük kök hücre grubunda ve sonrasında da ghrelin ve kök hücre + ghrelin gruplarında saptanmıştır.

Çalışmamız sonucunda ghrelinin, tek başına ve kök hücre ile birlikte kullanımının Angiogenezi artırıcı (85,86), antioksidan (87) ve yara iyileşmesini düzenleyici etkileri ile greft sağ kalımı üzerinde pozitif etkileri olduğunu belirledik ve bulgularımızı istatistiki olarak ta teyirt ettik.

6. SONUÇ

Kompozit greftler, nazal alar kanat, dış kulak heliksi ve parmak ucu defektleri başta olmak üzere kompozit yumuşak doku onarım ihtyacı bulnan defektlerin rekonstrüksiyonunda 100 yıldan fazla süredir kullanılan bir alternatiftir. Günümüzde travma ve tümör rezeksiyonu sonucu oluşan nazal alar kanat defektlerinde özellikle kondrokütanöz kompozit greftler rekonstrüksiyon alternatifleri arasında yer almaktadır.

Kompozit greftlerin uygulanmasındaki en büyük kısıtlayıcı faktör alıcı sahadaki defekt çapıdır. Defektin çapı büyüdükçe greft sağ kalım oranları belirgin oranda düşmektedir. Yapılan çalışmalarda düşük greft sağ kalımının temelinde kısıtlı revaskülarizasyonun yer aldığı görülmektedir

Literatürde, kompozit greftlerin kullanımındaki sınırlılığı aşmak ve greft sağ kalımını artırmaya yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmada literatürde yapılmış çalışmalara ek olarak kondrokutanöz kompozit greftlerin sağkalımında kök hücrelerin ve sık bilinen kaynağı mide dışında epidermal hücreler, lenfositler ve makrofajlar dahil birçok hücrede üretilen ve leptin ile olan biyolojik ilişkisi ile inflamatuar süreçler, yara iyileşmesi ve anjiogenez üzerinde etkili olan, ghrelinin tek başına ve mezenkimal kök hücre ile birlikte kullanımının kompozit greft sağ kalımına etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın sonucunda ghrelin kullanımının kompozit greft sağkalımı üzerine olumlu etkileri olduğu makroskobik ve histolojik olarak gösterilmiştir.

Çalışmamızda kompozit greftin deri komponentinde sağkalım yüzdesinin makroskobik olarak değerlendirilmiş ve mezenkimal kök hücre ve ghrelinin tek başına kullanılması durumunda sağ kalım yüzdesinin kontrol ve plasebo grubuna göre daha yüksek olduğu istatistiki olarak gösterilmiştir.

Kompozit greftin kıkırdak komponentinin sağkalımını değerlendirmek üzere yapılan histopatolojik değerlendirmelerde Ghrelin, MKH ve Ghrelin+MKH gruplarında disseke edilen kısımda perikondriyuma yakın alanlarda yeni kolajen sentezi olduğu düşünülen Masson trikrom boya ile mavi boyanma varlığı dikkat çekici idi. Ayrıca bu alanlarda anjiyogenez yönünde bir farklanma olduğu saptandı.

Deney grupları içerisinde tüm gruplarda VGEF ekspresyonu olduğu görüldü. Bu ekspresyonun Ghrelin ve Ghrelin+MKH grubunda daha yoğun olduğu görüldü. Tüm VEGF gruplarında "yüksek immünreaktivite" yüzdesel olarak en yüksek kök hücre + ghrelin grubunda sonrasında da ghrelin grubunda bulunmuştur.

Histolojik değerlendirmede deney grupları Verhofstad Skalasında göre; damar hasarlanması, ödem, PMNL infiltrasyonu, glandula sebasea hasarlanması ve kıl kökü hasarlanmasına yönelik kıyaslanmış ve bu kıyaslama incelenmiştir. Bu ölçeklemede istatistiksel açıdan anlamlı bulunan " ödem, damar hasarlanması ve kıl kökü hasarlanması" yüzdesel olarak en düşük kök hücre + ghrelin grubunda sonrasında da ghrelin grubunda saptanırken "glandula sebasea hasarlanması" yüzdesel olarak en düşük kök hücre grubunda ve sonrasında da ghrelin ve kök hücre + ghrelin gruplarında saptanmıştır.

Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, antiinflamatuar ve yara iyileşmesine yönelik olumlu yönde etkileri güncel literatürün de araştırma konusu olan Ghrelin'in; yüz bölgesinde yer alan ve estetik üniteleri de içine alan pek çok defektin rekonstrüksiyonunda kullanışlı bir alternatif olan kondrokutanöz kompozit greftlerin sağkalımındaki sınırlılıkları aşmak üzere tek başına ya da kök hücre gibi literatürde tanımlanmış olan diğer yöntemlerle birlikte kullanılabilecek alternatif bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Kim CM, Oh JH, Jeon YR, Kang EH, Lew DH. Effects of human adipose-derived stem cells on the survival of rabbit ear composite grafts. Arch Plast Surg. 01 Eylül 2017;44(5):370-7.

2. Kashif J. Classification and Types of Grafting in Surgery. C. 11, Archives of Clinical and Experimental Surgery. 2022.

3. Hicks K, Thomas JR. Skin and composite grafts. C. 9, Plastic and Aesthetic Research. OAE Publishing Inc.; 2022.

4. Parkhouse N, Evans D. Reconstruction of the ala of the nose using a composite free flap from the pinna. Br J Plast Surg. 1985;38:306-13.

5. Friedman HI, Stonerock C, Brill A. Composite Earlobe Grafts to Reconstruct the Lateral Nasal Ala and Sill. Ann Plast Surg. 2003;50(3):275-81.

6. Fedok F, Nolst Trenité GJ, Becker DG, Gausas R, Editor G, Bucky LP, vd. Multi-Specialty Facial Plastic Surgery; Editors in Chief Nasal Reconstruction: Aesthetic and Functional Considerations for Alar Defects. C. 19, Facial Plastic Surgery. 2003.

7. Chae Cho B, Woo Park J, Soo Baik B. Correction of Severe Secondary Cleft Lip Nasal Deformity Using a Composite Graft: Current Approach and Review. Ann Plast Surg. 2000;48(2):131-7.

8. Yotsuyanagi T, Yamashita K, Urushidate S, Yokoi K, Sawada Y. Reconstruction of Large Nasal Defects with a Combination of Local Flaps Based on the Aesthetic Subunit Principle. Plast Reconstr Surg. 2021;107(6):1358-62.

9. Meyers S, Rohrer T, Grande D. Use of Dermal Grafts in Reconstructing Deep Nasal Defects and Shaping the Ala Nasi. C. 27, • Dermatol Surg. 2001.

10. Kaufman AJ, Brodland DG. Reconstruction of a Large Surgical Defect on the Nasal Tip and Ala. Dermatol Surg. 2001;27(1):83-5.

11. Levasseur JG, Mellette JR. Techniques for Reconstruction of Perialar and Perialar-Nasal Ala Combined Defects. C. 26, • Dermatol Surg. 2000.

12. Fader DJ, Wang TS, Johnson TM. Nasal reconstruction utilizing a muscle hinge flap with overlying full-thickness skin graft. J Am Acad Dermatol. 2000;43(5):837-40.

13. Byrd DR, Otley CC, Nguyen TH. Alar batten cartilage grafting in nasal reconstruction: Functional and cosmetic results. J Am Acad Dermatol. 2000;43(5):833-6.

14. Murakami CS, David Kriet ; J, Ierokomos AP. Nasal Reconstruction Using the Inferior Turbinate Mucosal Flap. Arch Facial Plast Surg [Internet]. 1999;1:97-100. Erişim adresi: www.ama-assn.org/facial.

15. Hatoko M, Tanaka A, Kuwahara M, Tada H, Muramatsu T. An Evaluation of Hard Palate Mucosa Graft as a Lining Material in Alar Reconstruction: A 7-Year Experience Applied to the Full-Thickness Alar Defect. Plastic Reconstructive Surgery. 2000;105(6):1940-7.

16. Bakhach J, Conde A, Demiri E, Baudet J. The Reverse Auricular Flap: A New Flap for Nose Reconstruction. Plastic Reconstructive Surgery. 1999;104(5):1280-8.

17. Ozek C, Gurler T, Uckan A, Bilkay U. Reconstruction of the distal third of the nose with composite ear-helix free flap. Ann Plast Surg. Ocak 2007;58(1):74-7.

18. Raghavan U, Jones NS. Use of the auricular composite graft in nasal reconstruction. C. 115, The Journal of Laryngology & Otology. 2001.

19. Koenig F. Eine neue Methode der Aufrichtung eingesunkener Nasen durch Bildung des Nasenrückens aus einem Haut-Periost-Knochenlappen der Stirn. Arch klin Chir. 1887;3(1):165-73.

20. Rees TD. The transfer of free composite grafts of skin and fat: a clinical study. Plast Reconstr Surg Transplant Bull. 1960;25:556-64.

21. Dupertius SM. Free ear lobe grafts of skin and fat. Plast Reconstr Surg. 1946;1:135-44.

22. Nichter LS, Morwood DT, Williams GS, Spence RJ. Expanding the limits of composite grafting: a case report of successful nose replantation assisted by hyperbaric oxygen therapy. Plastic Reconstructive Surgery. 1991;87(2):337-40.

23. Hirase Y. Postoperative cooling enhances composite graft survival in nasal-alar and fingertip reconstruction. Br J Plast Surg. 1993;46(8):707-11.

24. Murphy AD, Keating CP, Penington A, McCombe D, Coombs CJ. Paediatric fingertip composite grafts: Do they all go black? Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 01 Şubat 2017;70(2):173-7.

25. Heistein JB, Cook PA. Factors Affecting Composite Graft Survival in Digital Tip Amputations. Ann Plast Surg. 2003;50(3):299-303.

26. Weinstein GS, Maves DF, Mccormack ML. Deferoxamine decreases necrosis in dorsally based pig skin flaps. Otolaryngol Head Neck Surg. 1989;101(5):559-61.

27. Mohammadpour M, Behjati M, Sadeghi A, Fassihi A. Wound healing by topical application of antioxidant iron chelators: Kojic acid and deferiprone. Int Wound J. Haziran 2013;10(3):260-4.

28. Ramli RN, Budi AS, Rizaliyana S, Fauzi AR. The effect of deferoxamine injection on composite graft survival in rabbits. Annals of Medicine and Surgery. 01 Aralık 2020;60:542-5.

29. Zhang F, Cheng C, Gerlach T, Kim DY, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Effect of Hyperbaric Oxygen on Survival of the Composite Ear Graft in Rats. Ann Plast Surg. 1998;41(5):530-4.

30. Li EN, Menon NG, Rodriguez ED, Norkunas M, Rosenthal RE, Goldberg NH, vd. The effect of hyperbaric oxygen therapy on composite graft survival. Ann Plast Surg. Ağustos 2004;53(2):141-5.

31. Camison L, Naran S, Lee WW, Grunwaldt LJ, Davit AJ, Goldstein JA, vd. Hyperbaric Oxygen Therapy for Large Composite Grafts: An Alternative in Pediatric Facial Reconstruction. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 01 Aralık 2020;73(12):2178-84.

32. McClane S, Renner G, Bell PL, Early EK, Shaw B. Pilot study to evaluate the efficacy of hyperbaric oxygen therapy in improving the survival of reattached auricular composite grafts in the New Zealand White rabbit. Otolaryngology - Head and Neck Surgery. 2000;123(5):539-42.

33. LIM AAT, WALL MP, GREINWALD JH. Effects of dimethylthiourea, melatonin, and hyperbaric oxygen therapy on the survival of reimplanted rabbit auricular composite grafts. Otolaryngol Head Neck Surg. 1999;121(3):231-7.

34. Jeon YR, Kang EH, Yang CE, Yun IS, Lee WJ, Lew DH. The effect of platelet-rich plasma on composite graft survival. Plast Reconstr Surg. 2014;134(2):239-46.

35. Fann PC, Hartman DF, Goode RL. Pharmacologic and Surgical Enhancement of Composite Graft Survival [Internet]. C. 119, Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1993. Erişim adresi: http://archotol.jamanetwork.com/

36. Aden KK, Biel MA. The Evaluation of Pharmacologic Agents on Composite Graft Survival [Internet]. C. 118, Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1992. Erişim adresi: http://archotol.jamanetwork.com/

37. Hartman DF, Goode RL. Pharmacologic Enhancement of Composite Graft Survival [Internet]. 1986. Erişim adresi: http://archotol.jamanetwork.com/

38. Jiang Y, Tuan RS. Bioactivity of human adult stem cells and functional relevance of stem cell-derived extracellular matrix in chondrogenesis. Stem Cell Res Ther. 01 Aralık 2023;14(1).

39. Chandawarkar RY, Cervino AL, Wells MD. Reconstruction of nasal defects using modified composite grafts. Br J Plast Surg. 2003;56(1):26-32.

40. Qu R, Chen X, Hu J, Fu Y, Peng J, Li Y, vd. Ghrelin protects against contact dermatitis and psoriasiform skin inflammation by antagonizing TNF-α/NF-κB signaling pathways. Sci Rep. 01 Aralık 2019;9(1).

41. Liu C, Hao Y, Huang J, Li H, Yang Z, Zeng Y, vd. Ghrelin accelerates wound healing in combined radiation and wound injury in mice. Exp Dermatol. 01 Şubat 2017;26(2):186-93.

42. Kratofil RM, Shim HB, Shim R, Lee WY, Labit E, Sinha S, vd. A monocyte–leptin–angiogenesis pathway critical for repair post-infection. Nature. 01 Eylül 2022;609(7925):166-73.

43. Sun GX, Ding R, Li M, Guo Y, Fan LP, Yue LS, vd. Ghrelin attenuates renal fibrosis and inflammation of obstructive nephropathy. Journal of Urology. 01 Haziran 2015;193(6):2107-15.

44. Yin Y, Wang Q, Qi M, Zhang C, Li Z, Zhang W. Ghrelin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by chronic low-grade inflammation via blockade of Kupffer cell M1 polarization. J Cell Physiol. 01 Temmuz 2021;236(7):5121-33.

45. Li B, Zeng M, He W, Huang X, Luo L, Zhang H, vd. Ghrelin protects alveolar macrophages against lipopolysaccharide-induced apoptosis through growth hormone secretagogue receptor 1a-dependent c-jun n-terminal kinase and wnt/ß-catenin signaling and suppresses lung inflammation. Endocrinology. 01 Ocak 2015;156(1):203-17.

46. Jewett BS, Baker SR. Skin and Composite Grafts. Içinde: Principles of Nasal Reconstruction. Springer New York; 2011. s. 133-61.

47. SOUTHWOOD WFW. THE THICKNESS OF THE SKIN. Plastic Reconstructive Surgery. 1955;15(5):423-9.

48. y MIR LM. BIOLOGY OF THE SKIN GRAFT. Plast Reconstr Surg. 1951;8(5):378-89.

49. Hom DB, Tope WD, Murakami CS. Minimally Invasive Options and Principles for Cutaneous Reconstruction Principles to Assess Facial Defects. Facial Plastic and Reconstructive Surgery. 2016;

50. Konior R. Free composite grafts. Otolaryngol Clin North Am [Internet]. 1994;27:81. Erişim adresi: https://spos.gib.gov.tr/Spos/Sorgu

51. Converse j. Reconstructive plastic surgery. 1964.

52. Becker OJ. Extended applications of free composite grafts. Trans Amer Acad Ophthal Otolaryng. 1960;64:649-59.

53. Walter CD. Composite Grafts in Nasal Surgery. Arch Otolaryngol [Internet]. 1969;90(95):106-14. Erişim adresi: http://archotol.jamanetwork.com/

54. BALLANTYNE DL, CONVERSE JM. Vascularization of composite auricular grafts transplanted to the chorio-allantois of the chick embryo. Transplant Bull. 1958;5(4):373-7.

55. Converse JM. Carcinoma of the nose. Içinde: Reconstructive Plastic Surgery. 1964. s. 783-825.

56. MCLAUGHLIN CR. COMPOSITE EAR GRAFTS AND THEIR BLOOD SUPPLY. Br J Plast Surg. 1954;7(3):274-8.

57. Davis JS, Traut HF. ORIGIN AND DEVELOPMENT OF THE BLOOD SUPPLY OF WHOLE-THICKNESS SKIN GRAFTS: AN EXPERIMENTAL STUDY. Ann Surg. 1925;82(6):871-9.

58. CONVERSE JM, BALLANTYNE DL. DISTRIBUTION OF DIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDE DIAPHORASE IN RAT SKIN AUTOGRAFTS AND HOMOGRAFTS. Plast Reconstr Surg Transplant Bull. 1962;30:415-25.

59. DEHAAN CR, STARK RB. Changes in efferent circulation of tubed pedicles and in the transplantability of large composite grafts produced by histamine iontophoresis. Plast Reconstr Surg Transplant Bull. 1961;28:577-83.

60. MACCOLLUM MS, GRABB WC. INCREASING THE INCIDENCE AND THE SIZE OF SUCCESSFUL EXPERIMENTAL COMPOSITE EAR GRAFTS BY ADVANCE PREPARATION OF THE RECIPIENT BED. Plast Reconstr Surg. 1977;60(5):759-62.

61. Mendelson BC, Woods JE. EFFECT OF CORTICOSTEROIDS ON THE SURVIVING LENGTH OF SKIN FLAPS IN PIGS. Br J Plast Surg. 1978;31:293-4.

62. Mes LGB. Improving Flap Survival by Sustaining Cell Metabolism Within Ischemic Cells: A Study Using Rabbits. Plast Reconstr Surg. 1980;65(1):56-65.

63. Yucel E, Alagoz MS, Eren GG, Yasar EK, Izmirli HH, Duruksu G, vd. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells to increase viability of composite grafts. Journal of Craniofacial Surgery. 01 Temmuz 2016;27(5):1354-60.

64. Konig F. auUber nasenplastik. Beitr Klin Chir. 1924;94:515.

65. Cannon PS, Madge SN, Kakizaki H, Selva D. Composite grafts in eyelid reconstruction: The complications and outcomes. British Journal of Ophthalmology. Eylül 2011;95(9):1268-71.

66. Callahan A, Birmingham A. THE FREE COMPOSITE LID GRAFT. Archives of Ophthalmology [Internet]. 1951;45(5):539-45. Erişim adresi: http://archopht.jamanetwork.com/

67. Bae Y, Kim S, Hwang S, Kim K, Oh C. Reconstruction of the lower eyelid with septal mucochondral composite graft and upper eyelid musculocutaneous flap. J Korean Soc Plast Reconstr Surg. 2004;31:309-14.

68. Kasai K. Eyelash reconstruction with strip composite eyebrow graft. Ann Plast Surg. Haziran 2008;60(6):649-51.

69. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, vd. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. C. 36, Biotechnology Advances. Elsevier Inc.; 2018. s. 1111-26.

70. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. C. 20, Cell Transplantation. 2011. s. 5-14.

71. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. C. 10, Stem Cell Research and Therapy. BioMed Central Ltd.; 2019.

72. Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges. Cell Stem Cell. 2020;27(4):523-31.

73. Yao P, Zhou L, Zhu L, Zhou B, Yu Q. Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. C. 83, European Neurology. S. Karger AG; 2020. s. 235-41.

74. Krawczenko A, Klimczak A. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Contribution to Angiogenic Processes in Tissue Regeneration. C. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.

75. Tekeli S. Stem cells; mesenchymal stem cells and current clinical applications. Istanbul Bilim University Florence Nightingale Transplantation Journal. 07 Ekim 2016;1(2):72-83.

76. Yao C, Zhou Y, Wang H, Deng F, Chen Y, Zhu X, vd. Adipose-derived stem cells alleviate radiation-induced dermatitis by suppressing apoptosis and downregulating cathepsin F expression. Stem Cell Res Ther. 01 Aralık 2021;12(1).

77. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, vd. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. C. 7, TISSUE ENGINEERING. Mary Ann Liebert, Inc; 2001.

78. Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. C. 8, Cells. MDPI; 2019.

79. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, vd. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 01 Aralık 2002;13(12):4279-95.

80. Ballestín A, Casado JG, Abellán E, Vela FJ, Álvarez V, Usón A, vd. Adipose-Derived Stem Cells Ameliorate Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Skin Free Flap Model. J Reconstr Microsurg. 03 Mayıs 2018;34(8):601-9.

81. Khazaei S, Keshavarz G, Bozorgi A, Nazari H, Khazaei M. Adipose tissue-derived stem cells: a comparative review on isolation, culture, and differentiation methods. C. 23, Cell and Tissue Banking. Springer Science and Business Media B.V.; 2022.

82. Han HH, Lim YM, Park SW, Lee SJ, Rhie JW, Lee JH. Improved skin flap survival in venous ischemia-reperfusion injury with the use of adipose-derived stem cells. Microsurgery. 01 Kasım 2015;35(8):645-52.

83. Mazini L, Rochette L, Admou B, Amal S, Malka G. Hopes and limits of adipose-derived stem cells (ADSCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in wound healing. C. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020.

84. Kroemer G, Zitvogel L. Ghrelin and leptin regulating wound healing. C. 43, Trends in Immunology. Elsevier Ltd; 2022. s. 777-9.

85. Wang L, Chen Q, Pang J. The effects and mechanisms of ghrelin upon angiogenesis in human coronary artery endothelial cells under hypoxia. Peptides (NY). 01 Şubat 2023;160.

86. Wang J, He L, Huwatibieke B, Liu L, Lan H, Zhao J, vd. Ghrelin stimulates endothelial cells angiogenesis through extracellular regulated protein kinases (ERK) signaling pathway. Int J Mol Sci. 01 Eylül 2018;19(9).

87. Omrani H, Alipour MR, Mohaddes G. Ghrelin improves antioxidant defense in blood and brain in normobaric hypoxia in adult male rats. Adv Pharm Bull. 2015;5(2):283-8.

88. Dixit VD. Immune cells use hunger hormones to aid healing. Nature. 2022;609(7925):39-40.

89. Hosoda H. Effect of Ghrelin on the Cardiovascular System. Biology (Basel). 08 Ağustos 2022;11(8):1190.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2023-065 28.09.2023
KONU: Onay

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **"KONDROKUTANÖZ KOMPOZİT GREFTLERİN SAĞKALIMININ ARTIRILMASINDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE GHRELİN'IN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI"** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: **Prof. Dr. Yiğit Özer TİFTİKCİOĞLU, EÜTF Plastik ve Rekonstrüktif ve Estetik Cer. AD**
Prof. Dr. Tahir GÜRLER. EÜTF Plastik ve Rekonstrüktif ve Estetik Cer. AD
Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL, EÜTF Histoloji-Embriyoloji AD
Dr. Kutay DURUKAN, EÜTF Plastik ve Rekonstrüktif ve Estetik Cer. AD
Dr. Esat İMAN, EÜTF Plastik ve Rekonstrüktif ve Estetik Cer. AD
Dr. Öğr. Ebru EROĞLU, EÜTF Histoloji-Embriyoloji AD

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda her iki eşeyden 35 adet Wistar-Albino sıçan deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Aytül ÖNAL

(KATILMADI)
Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Prof. Dr. Uğur KAYA

(KATILMADI)
Prof. Dr. Okan BİLGE

Doç. Dr. Murat Celal SÖZBİLEN

Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI

Uzm Vet. Hek. F. Emrah SOYLU

(KATILMADI)
Özcan NALBANTOĞLU

(KATILMADI)
Melek Merve AFŞAROĞLU

Ek 2. Benzeşim Raporu



turnitin Sayfa 2 of 73 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği trn:oid:::1:3028140672

11% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çakışan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Rapordan Filtrelenen

- Alıntılanan Metin

Ön Sıradaki Kaynaklar

7% İnternet kaynakları
4% Yayınlar
5% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

KUTAY DURUKAN

KONDROKUTANÖZ KOMPOZİT GREFTLERİN SAĞKALIMININ ARTIRILMASINDA MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE GHRELİ...

UZMANLIK ÖĞRENCİLERİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği
trn:oid:::1:3028140672

Gönderi Tarihi
2 Eki 2024 14:31 GMT+3

İndirme Tarihi
2 Eki 2024 14:35 GMT+3

Dosya Adı
KD-tez_intihal_23.09.24_-Word_hali.docx

Dosya Boyutu
923.9 KB

68 Sayfa

13.464 Sözcük

89.112 Karakter

Ön Sıradaki Kaynaklar

7% İnternet kaynakları
4% Yayınlar
5% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Ön Sıradaki Kaynaklar

Gönderi içinde en yüksek eşleşme sayısına sahip kaynaklar. Çakışan kaynaklar görüntülenmeyecektir.

1	Öğrenci makaleleri	
Ege Üniversitesi		4%
2	İnternet	
acikbilim.yok.gov.tr		2%
3	İnternet	
9lib.net		1%
4	İnternet	
dergipark.org.tr		0%
5	İnternet	
www.klimik.org.tr		0%
6	İnternet	
www.researchgate.net		0%
7	İnternet	
dudakdamakyariklari.org		0%
8	Yayın	
Sunay, Özgür. "Adipoz Kökenli Kök Hücre Yardımlı Distraksiyon Osteogenez", Dok...		0%
9	İnternet	
isfaw2019.isfaw.org		0%
10	Yayın	
Çakmak, Süleyman. "Sıçan Modelinde Radyoterapiye Bağlı Oluşturulacak Cilt Has...		0%
11	Yayın	
Demir, Özge. "Geometrik cisimlerin öğretiminde somut materyal kullanımının öğ...		0%

12 İnternet
dspace.trakya.edu.tr:8080 0%

13 İnternet
www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 0%

14 Yayın
Güç, Hasan. "Fare Kuyruğunda Oluşturulan Sekonder Lenfödem Modelinde Embri... 0%

15 İnternet
libratez.cu.edu.tr 0%

16 Yayın
Varlıhan, Gülce Nil. "Oral Yolla Alınan K2 ve D3 Vitamininin Sıçan Kalvaryal Kemik ... 0%

17 İnternet
asescongress.com 0%

18 İnternet
sbe.ogu.edu.tr 0%

19 Yayın
Jeffrey S. Kroin, Robert J. McCarthy, Richard D. Penn, Timothy J. Lubenow, and Ant... 0%

20 İnternet
hdl.handle.net 0%

21 Yayın
Yörük, Eda Öncel. "Geriatrik Olgularda Sarkopeni ve Serum Ürik Asit Ilişkisi", Dok... 0%

22 İnternet
agris.fao.org 0%

23 İnternet
petroalianza.blogspot.com 0%

24 Yayın
Kuvvetlioğlu, Nazim. "Sıçanlarda Formaldehit Maruziyetiyle Testislerde Oluşan M... 0%

25 İnternet
dspace.kocaeli.edu.tr:8080 0%

26 İnternet
earsiv.atauni.edu.tr 0%

27 Yayın
Tokgöz, Sami. "KWL (ne biliyorum? Ne öğrenmek istiyorum? Neöğrendim?) Strate... 0%

28 İnternet
adudspace.adu.edu.tr:8080 0%

29 İnternet
biblio.ugent.be 0%

30 İnternet
core.ac.uk 0%

31 İnternet
impnc2022.org 0%

32 İnternet
pesquisa.bvsalud.org 0%

33 İnternet
sbk2019.org 0%

34 Yayın
Ulukaya, Hüseyin Emre. "Tavşan kulağında oluşturulan modellerde hyalüronik asi... 0%

35 Yayın
Özgenç, Özge. "Köpeklerde yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin β-TCP ve... 0%

36 Yayın
Şener, Ebru. "Beş yıldızlı otel işletmelerinde markalaşmanın tüketici satın alma d... 0%

37 Yayın
Holovics, Heidi Jo. "Investigation of sampling techniques for drug delivery", Proq... 0%