



Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**SİMVASTATİN JEL FORMUNUN TAVŞAN KIKIRDAK BLOK HALİNDEKİ
GREFT VİABİLİTESİNE ETKİSİ
DENEYSEL ÇALIŞMA**

DR. MUTLUHAN TEMİZSOY

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2023





Tıp Fakültesi

T.C.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**SİMVASTATİN JEL FORMUNUN TAVŞAN KIKIRDAK BLOK HALİNDEKİ
GREFT VİABİLİTESİNE ETKİSİ
DENEYSEL ÇALIŞMA**

DR. MUTLUHAN TEMİZSOY

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Bülent Saçak

İSTANBUL 2023

ÖNSÖZ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi eğitimim boyunca, üstün bilgi ve becerilerinin yanı sıra, tecrübelerinden büyük kazançlar sağladığım ve yetişmemde sonsuz emekleri olan değerli hocalarım emekli öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Özhan Çelebiler' e, anabilim dalı başkanımız Sn. Prof. Dr. Mehmet Bayramiçli' ye; Sn. Prof. Dr. Erdem Tezel' e, Sn. Prof. Dr. Bülent Saçak' a, Sn. Doç. Dr. Nihal Durmuş Kocaaslan' a, Sn. Doç. Dr. Zeynep Deniz Akdeniz Doğan' a, Sn. Doç. Dr. Dağhan Dağdelen'e, Sn. Doç. Dr. Melekber Çavuş Özkan'a, Sn. Öğr. Üyesi Dr. Ahmet Hamdi Sakarya' ya, Sn. Öğr. Üyesi Dr. Şeyda Güray Evin' e teşekkürü borç bilirim.

Cerrahi sanatının inceliklerini her daim benimle paylaşarak, mesleki olarak gelişmemde büyük rolü olan, asistanlığım süresince benden destek, birikim ve hoşgörülerini hiçbir zaman esirgemeyen, sayın tez danışmanım Prof. Dr. Bülent Saçak' a, Marmara Üniversitesi'ndeki eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, meslektaştan öte dostlarım, Dr. Ulvi Hasanov' a, Dr. Mustafa Önal' a, Dr. Cem Aydın'a, Dr. Fatih İçbudak' a, Dr. İlhan Erdem' e, Dr. Ömer Saraç' a, Dr. Adem Atakan Haytaoğlu' na, Dr. Buğra Mert Aytekin' e, Dr. Görkem Kazaz' a, Dr. Semih Güner' e ve Dr. Ersin İstanbullu' ya, Dr. Nazmi Borazan' a, Dr. Ahmet Utku Sun'a, Dr. Utku Ulubey' e, Dr. Alparslan Çağrı Yaman' a, Dr. İbrahim Mansuroğlu' na, Dr. Ömer Faruk Genç' e ve Dr. Berk Emre Yaman' a uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalışma fırsatı bulduğum Dr. Ömer Faruk Deveci' ye, Dr. Samet Şendur' a, Dr. Zafer Kaya' ya, Dr. Mehmet Cömert' e ve Dr. Mustafa Taygun Oluklu' ya, Dr. İlker Çiçek' e, Dr. Caner Kaya' ya ve Dr. Nazim Ramazanov' a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca plastik cerrahi kliniğinde görev yapan tüm hemşirelere, personellere ve çalışanlara teşekkür ederim.

Tezimin deney sonuçlarının değerlendirilmesindeki yardımları için Sn. Uzm. Dr. Emine Çeşmecioğlu Karavin' e, farmakoloji aşamasında yardımları için Sn. Öğr. Üyesi İsmail Aslan' a ve istatistik aşamasında katkıları için Sn. Prof. Dr. Esra Akdeniz' e teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca bana destek olan, bugünlere gelmemde en çok emeği geçen annem Figen Temizsoy' a babam Türker Temizsoy' a ve kardeşim Tunahan Temizsoy' a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Dr. Mutluhan Temizsoy

İmza



ÖZET

Giriş ve Amaç

Kıkırdak doku, vücudu şekillendirmeye yardımcı olan ve sonra onu destekleyen temel biyolojik malzemedir. Kıkırdak, sıkıştırıcı kuvvetlere direnme, kemik esnekliğini artırma ve esneklik ihtiyacı olan kemikli alanlarda destek sağlama yeteneği dahil olmak üzere birçok işleve sahiptir.

Kıkırdak greftleri; estetik burun ameliyatları, konjenital ya da edinsel burun deformitelerinin düzeltilmesi, mikrotia ve diğer kulak deformitelerinin rekonstrüksiyonu gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte kıkırdak dokusunun greft olarak aktarımında değişik oranda rezorbsiyon gelişebilmektedir. Greft olarak alınan kıkırdaklar %10-90 oranında canlılığını sürdürebilmektedir. Bununla birlikte kıkırdak greft yaşayabilirliğini arttırmak adına literatürde birçok çalışma mevcuttur. Kıkırdak greftinin metil selülöz ile sarılması, fasya ile sarılması gibi birçok yöntem mevcuttur. Bu çalışmalarda anlamlı sonuçlar bulunsa da pratik uygulamalarda genel olarak kabul görmüş bir yaklaşım bulunmamaktadır.

Simvastatin, klinik kullanımda anti-hiperlipidemik ilaç grubunda yer alan bir ilaçtır. Simvastatinin antihiperlipidemik etkilerinin yanı sıra ratlarda anjiogenezi tetiklediğini gösteren yayınlar yer almaktadır. Ayrıca simvastatinin kemik iyileşmesini arttırdığı ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir. Ratlarda simvastatinin enjekte edilebilir formatının minimal invaziv periosteal distraksiyon üzerinde etkisini inceleyen çalışma da mevcuttur. Bununla birlikte bilimiz dahilinde simvastatinin kıkırdak sağ kalımı üzerine etkisini araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın öncelikli amacı; simvastatinin in vivo olarak uygulanabilen jel formatının geliştirilmesi, ikincil olarak amacı simvastatinin jel formunun blok halindeki kıkırdak greftleri çevresine uygulanarak, kıkırdak greftlerinin sağ kalımına etkisinin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışma in vitro ve in vivo olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. İn vitro aşamasında operasyonlar esnasında alınan kırıkdağlardan elde edilen kondroblastlar çoğaltıldı, simvastatinin kondroblastlar üzerinde toksik dozu tespit edildi ve simvastatinin jel formatı üretildi.

Bu çalışma in vivo ve in vitro olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Çalışmanın in vitro aşamasında operasyonlar esnasında alınan kırıkdağlardan elde edilen kondroblastlar in vitro ortamda çoğaltıldı, simvastatinin kondroblastlar üzerinde toksik dozu tespit edildi ve simvastatinin jel formatı üretildi.

Çalışmanın in vivo kısmı çift kör randomize bir çalışma olarak tasarlandı. Çalışmada on iki adet “Yeni Zelanda” cinsi erkek tavşan her grupta 4 tavşan olacak şekilde, toplamda 3 grup olarak düzenlendi. Bu gruplar:

Birinci grup: Kırıkdağ greftlerinin ek bir işlem yapılamdan acılı sahaya nakledildiği kontrol grubu

İkinci grup: Kırıkdağ greftlerinin simvastatin içermeyen jel sürüldükten sonra alıcı sahaya yerleştirildiği plasebo grubu

Üçüncü grup: Kırıkdağ greftlerinin simvastatin içeren jel sürüldükten sonra alıcı sahaya yerleştirildiği deney grubu

Tavşanlara cerrahi işlem öncesi, intramusküler ketamin ve ksilazin ile anestezi sağlandı. Anestezi derinliği parmak kısırtma, ekstremitte çekme yanıtı ve kornea refleksi yoluyla kontrol edildi. Cerrahi işlem sırasında anestezi derinliğini korumak amacı ile gerekli durumlarda Ketamin uygulamaları tekrar edildi.

Uygun anestezi derinliği sağlandıktan sonra hayvanın her iki kulak ve sırt bölgesi tıraş edilerek operasyon masasına yüzüstü yatırıldı. Cerrahi alan Povidon iyot %10 çözelti ile silinerek antisepsi sağlandı ve steril örtüm uygulandı.

Tavşanların her iki kulağında dorsal yüzde, orta hat boyunca uzanan arter lateralinde kalacak şekilde 2 cm uzunluğunda vertikal insizyon ile 2×1 cm boyutunda kırıkdağ grefti

deperikondriye şekilde elde edildi. Greft donor alan insizyonları kanama kontrolü sağlandıktan sonra 4/0 monoflaman polypropylene suture materyali ile basit suture edildi.

Kıkırdak greft donor alanları için sırtta interskapular bölgede orta hattın 1cm sağ ve sol tarafında subkutan cepler oluşturuldu. Kontrol grubundaki kıkırdak greftleri ek bir işleme tabi tutulmadan oluşturulan ceplere yerleştirildi. Plasebo grubu ve simvastatin jel grubundaki deneklerde kıkırdak greftlerine 1cc jel sürüldü. Deney grubundaki jeller % 1.5 simvastatin içermektedir. Greftler jel ile birlikte oluşturulan ceplere yerleştirildi. Kesiler 3/0 monoflaman polypropylene suture materyali ile horizontal matris yöntemi ile suture edildi. Cerrahi süreci takiben tavşanların tekli kafeslerde uygun koşullarda bakımı ve beslenmesi sağlandı.

Her grupta yer alan deneklerin yarısı dördüncü haftanın sonunda, diğer yarısı ise on ikinci haftanın sonunda kurban edilerek kıkırdak greftleri alındı. Greft materyalleri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik ve immünokimyasal olarak değerlendirildi. Alınan kıkırdak dokusu örneklerinde kondrosit nükleus sayısı, kartilaj matrix metakromazisi, periferal proliferasyon, fibrozis, vasküler proliferasyon, inflamatuvar değişiklikler ve kemik metaplazisi incelendi.

Verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism (versiyon 8.0; GraphPad Software, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Verilerin normal dağılım analizinde gruplardan en az birinin normal dağılım göstermediği tespit edildi. Bu sebeple verilerin analizleri Kruskal-Wallis testini takiben Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi. Kantitatif verilerin ifade edilmesinde ortalama \pm standart sapma (s.s.). $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Kontrol grubunda 4 hafta ve 12 hafta sonucunda alınan örneklerde ciddi düzeyde periferal kıkırdak hücre proliferasyonu, sağlıklı kıkırdak hücreleri izlendi. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu, vaskülarizasyon görülmedi. Kemik metaplazisi görülmedi. Masson-trikrom boyamada fibrozis görülmedi. İmmunohistokimyasal çalışmada ise geç dönemde 1 denek hariç kuvvetli glial fibrin asit (GFAP) pozitif boyanma gözlemlendi.

Plasebo grubunda erken dönemde periferal kıkırdak hücre proliferasyonu ve sağlıklı kıkırdak hücrelerinde belirgin azalma olduğu görüldü. Yoğun ve şiddetli inflamatuvar hücre

infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskularizasyon izlendi. Orta derecede fibrosiz ve kuvvetli GFAP pozitif boyaması görüldü. Geç dönemde ise alınan örneklerde kıkırdak dokusu görülmedi.

Deney grubunda ise erken dönemde periferik kıkırdak hücre proliferasyonu ve sağlıklı kıkırdak hücrelerinde belirgin azalma olduğu görüldü. Yoğun ve şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskularizasyon izlendi. Orta derecede fibrosiz ve kuvvetli GFAP pozitif boyaması görüldü. Geç dönemde alınan örneklerde bazı örneklerde benzer bulgular görüldü, bazı örneklerde ise kıkırdak dokusunun tamamen destrukte olduğu görüldü.

Tartışma ve Sonuç:

Çalışmamızda, simvastatinin jel formatının kıkırdak grefti sağ kalımı üzerine olan etkisi incelendi.

Çalışmanın sonucunda kondrosit nükleus sayısı, kartilaj matriks kromazisi ve periferik proliferasyon kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunurken; inflamasyon, vaskularizasyon ve fibrosiz plasebo ve simvastatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Plasebo ve simvastatin grupları arasında bu değerler açısından anlamlı fark bulunmamaktadır. Bununla birlikte kemik metaplazisi ve GFAP immünreaktivitesi skoru açısından tüm gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Literatürde yer alan çalışmalar ile bizim çalışmamız sonuçları arasında bazı benzerlikler ve farklılıklar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda simvastatin inflamasyonu, vaskularizasyonu ve fibrosizi arttırdığı sonucu çıkmıştır. Ancak literatür bulguları simvastatinin inflamasyonu azalattığı ve vaskularizasyonu arttırdığı yönündedir. Bununla birlikte çalışmamızdaki bu değişikliklerin simvastatinin kendi etkisi ile değil de enfeksiyona sekonder olarak meydana gelen değişiklikler olduğu düşünülmektedir.

Kontrol grubunda kıkırdak greft sağ kalımının devam etmesine rağmen, diğer gruplarda kıkırdak greftlerinin tamamen rezorbsiyona uğraması enfeksiyon, jelin kıkırdak grefti çevresinde inflamasyonu tetiklemesi ya da jel tabakanın kıkırdak greft çevresinde difüzyonu engelleyerek greft beslenmesine engel olabilmesi nedeniyle olabileceğini düşündürmektedir. Sebep bunlardan biri ya da kümülatif etkisi olabilir.

Simvastatinin jel formunun kıkırdak sağ kalımına etkisini değerlendirecek çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle bu çalışma bundan sonra bu konuda yapılacak çalışmalar için fikir verici bir çalışma niteliğindedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Kıkırdak, kıkırdak grefti, kıkırdak grefti sağ kalımı, simvastatin, simvastatin jel formu



SUMMARY

Introduction and purpose

Cartilage tissue is the basic biological material that helps shaping and supporting the body. Cartilage has many functions, including the ability to resist compressive forces, increase bone flexibility, and provide support in bony areas that need flexibility.

Cartilage grafts ; It is widely used in many areas such as aesthetic nose surgeries, correction of congenital or acquired nasal deformities , reconstruction of microtia and other ear deformities . However, different rates of resorption may develop in the transfer of cartilage tissue as a graft . Cartilage graft can maintain its vitality at a rate of 10 -90%. However, there are many studies in the literature that aim to increase cartilage graft viability. There are several methods for wrapping the graft ranging from methyl cellulose to fascia . Although there are significant results in these studies, there is no generally accepted approach in practical applications.

Simvastatin is a drug in the anti- hyperlipidemic drug group in clinical use . In addition to the antihyperlipidemic effects of simvastatin, there are publications showing that it triggers angiogenesis in rats. Furthermore, it has been shown that simvastatin increases bone healing and reduces inflammation. There is also a study that examining the effect of the injectable form of simvastatin on minimally invasive periosteal distraction in rats. However, according to our knowledge, there are not enough studies investigating the effect of simvastatin on cartilage survival.

The primary aim of this study; the development of a gel form of simvastatin that can be administered in vivo, and the secondary aim is investigating the effect of the gel form of simvastatin on the survival of cartilage grafts, by applying it around cartilage grafts in block forms.

Materials and Methods

This study was carried out in two stages, *in vivo* and *in vitro*. In the *in vitro* phase of the study, the chondroblasts obtained from the cartilages were augmented *in vitro*, the toxic dose of simvastatin on chondroblasts was detected and a gel format of simvastatin was produced.

The *in vivo* part of the study was designed as a double-blind randomized trial. Twelve “New Zealand ” male rabbits were arranged as 3 groups in total, with 4 rabbits in each group. These groups are:

First group: Control group in which cartilage grafts are transplanted to the recipient site without any additional operation.

Second group: Placebo group in which cartilage grafts were placed in the recipient site after application of a simvastatin-free gel

Third group: Experimental group in which cartilage grafts were placed in the recipient site after applying gel containing simvastatin

Rabbits were anesthetized with intramuscular ketamine and xylazine before the surgical procedure. The depth of anesthesia was checked by finger pinch, limb pull response and corneal reflex. Ketamine applications were repeated when necessary in order to maintain the depth of anesthesia during the surgical procedure.

After providing the appropriate depth of anesthesia, both ears and dorsal region of the animal were shaved and the animal was placed face down on the operation table. Antisepsis was achieved by wiping the surgical field with Povidone iodine 10% solution and sterile dressing was applied.

In the dorsal side of both ears of the rabbits, a 2 cm long vertical incision which is lateral to the artery running along the midline was made, and a 2×1 cm cartilage graft was obtained deperichondrially. Graft donor site incisions were simply sutured with 4/0 monofilament polypropylene suture material after controlling bleeding.

For the cartilage graft donor sites, subcutaneous pockets were created 1 cm to the right and left sides of the midline in the interscapular region on the back. Cartilage grafts in the control group were placed in the pockets that created, without any additional operation. In the placebo group and simvastatin gel group, 1cc gel was applied to the cartilage grafts. The gels in the experimental group contain 1.5% simvastatin. The grafts were placed with the gel in the pockets that formed. Incisions were sutured with 3/0 monofilament polypropylene suture material by using the horizontal matrix method. Following the surgical process, the rabbits were cared for and fed in single cages under appropriate conditions.

Half of the subjects in each group were sacrificed at the end of the fourth week and the other half at the end of the twelfth week, and cartilage grafts were removed. The graft materials were evaluated histopathologically and immunochemically in the Pathology Department of Marmara University Faculty of Medicine. Chondrocyte nucleus number, cartilage matrix metachromasia, peripheral proliferation, fibrosis, vascular proliferation, inflammatory changes and bone metaplasia were examined in the cartilage tissue samples.

Statistical analysis of the data was performed by using GraphPad Prism (version 8.0; GraphPad Software, USA). The conformity of the data to normal distribution was examined by Kolmogorov Smirnov test. In the normal distribution analysis of the data, it was detected that at least one of the groups did not show normal distribution. For this reason, the data were analyzed by Dunn's multiple comparison test followed by Kruskal-Wallis test. Mean ± standard

deviation (s.s.). $P < 0,05$ values were considered statistically significant in expressing quantitative data.

Results

In the samples of the control group which taken at the end of 4. and 12. weeks, peripheral cartilage cell proliferation and healthy cartilage cells were observed at significant level. Inflammatory cell infiltration and vascularization were not observed. No bone metaplasia was observed. Masson-trichrome staining showed no fibrosis. In the immunohistochemical study, strong glial fibrilic acid (GFAP) positive staining was observed except for 1 subject in the late period.

In the placebo group, there was a significant decrease in peripheral cartilage cell proliferation and healthy cartilage cells, in the early period. Intense and severe inflammatory cell infiltration and dense vascularization were observed. Moderate fibrosis and strong GFAP positive staining were observed. In the late period, no cartilage tissue was observed in the samples has been taken.

In the experimental group, a significant decrease in peripheral cartilage cell proliferation and healthy cartilage cells were observed in the early period. Intense and severe inflammatory cell infiltration and dense vascularization were observed. Moderate fibrosis and strong GFAP positive staining were observed. In the specimens that has been taken in the late period; it is observed that, there were similar findings in some specimens, while the cartilage tissue was completely destructed in the other specimens.

Discussion and Conclusion:

In our study, the effect of simvastatin gel format on cartilage graft survival was investigated.

As a result of the study, chondrocyte nucleus number, cartilage matrix chromasia and peripheral proliferation were significantly higher in the control group compared to the other groups; inflammation, vascularization and fibrosis were significantly higher in the placebo and simvastatin groups compared to the control group. There is no significant difference between placebo and simvastatin groups in terms of these values. Besides, no significant difference was found between all groups in terms of bone metaplasia and GFAP immunoreactivity score.

There are some similarities and differences between the studies in the literature and the results of our study. In our study, it was concluded that simvastatin increases inflammation, vascularization and fibrosis. However, literature findings suggest that simvastatin decreases inflammation and increases vascularization. However, these changes in our study are thought to be secondary to the infection and not due to the effect of simvastatin itself.

Although cartilage graft survival continued in the control group; complete resorption of cartilage grafts in the other groups suggests that, infection may be due to the gel triggering inflammation around the cartilage graft or the gel layer may prevent graft nutrition by preventing diffusion around the cartilage graft. The cause may be one of these or the cumulative effect.

There have been no studies in order to evaluate the effect of the gel form of simvastatin on cartilage survival. For this reason, this study is a suggestive study for future studies on this subject.

KEY WORDS: Cartilage, cartilage graft, cartilage graft survival, simvastatin , simvastatin gel form

İçindekiler Tablosu

ÖNSÖZ	IV
BEYAN	VI
ÖZET	VIII
SUMMARY	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XX
ŞEKİLLER, TABLOLAR, BELGELER VE GRAFİKLER DİZİNİ	XXII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2. 1. <i>Kıkırdak Dokusu</i>	2
2. 1. 1. Kıkırdak Dokusu Hücreleri.....	2
2. 1. 2. Perikondriyum.....	3
2. 1. 3. Kıkırdak Dokusunun Gelişimi ve Yapısı.....	3
2. 1. 4. Kıkırdak Dokusu Tipleri.....	4
2. 1. 5. Kıkırdak Hasarı ve Onarım Fizyolojisi.....	6
2. 2. <i>Kıkırdak Grefti</i>	8
2. 2. 1. Kıkırdak Grefti Taihçesi.....	8
2. 2. 2. Kıkırdak Grefti Elde Edilmesi, Hazırlanılması ve Klinik Uygulanması	9
2. 2. 3. Kıkırdak Greftinin Sağ Kalımını Arttırmaya Yönelik İşlemler	10
2. 2. 4. Kıkırdak Greftinin Sağ Kalımının Değerlendirilmesi.....	11
2. 3. <i>Simvastatin</i>	12
2. 3. 1. Simvastatin'in Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri.....	12
2. 3. 2. Simvastatin'in Yan etkileri ve Diğer İlaçlarla Etkileşimleri.....	13
2. 3. 3. Simvastatin'in Doku İyileşme ve Sağ Kalımına Etkisi, Antijiperlipidemi Dışındaki Etkileri.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3. 1. <i>İn Vitro Çalışma ve Jel Üretimi</i>	16
3. 1. 1. İn Vitro Kıkırdak Dokusu Elde Edilmesi.....	16
3. 1. 2. Jel Üretimi.....	20
3. 2. <i>Hayvan Çalışması</i>	20
3. 2. 1. Anestezi.....	21

3. 2. 2. Kıkırdak Greftlerinin Hazırlanılması ve Yerleştirilmesi	21
3. 3. <i>Sonuçların İncelenmesi</i>	24
3. 3. 1. Makroskopik Değerlendirme.....	24
3. 3. 2. Histolojik Değerlendirme	24
3. 3. 3. İstatistiksel Değerlendirme	25
4. BULGULAR	26
4. 1. <i>Makroskopik Bulgular</i>	26
4. 2. <i>Histolojik Bulgular</i>	27
4. 3. <i>İstatistiksel Analiz</i>	34
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ	45
7. KAYNAKÇA	46

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CGF: Konsantre edilmiş büyüme faktörü

cm³: Santimetreküp

CYPs: Sitokrom P450

DMEM: Dulbecco Eagle's minimal essential medium

ECM: Hücre dışı matriks

GFAP: Glial fibrilik asit

H&E: Hematoksilen-Eozin

HDL-C: High density lipoprotein-C

HMG-KoA: 3-hidroksi-3 metilglutaril-koenzim A

IGF-1: İnsülin like growth faktör 1

IL-1: İnterlökin-1

LDL: Low density lipoprotein

Mm: Milimetre

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NO: Nitrik oksit

OECD 439: Organisation for Economic Co-operation and Development 439

PGE2: Prostaglandin E2

Rpm: revolutions per minute

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute Medium 1640

SAMS: Statin-associated muscle symptoms

SOX: SRY-box transcription factor 9

Surgicell: Oksitlenmiş rejenere selülöz

TGF-B: Transforming Growth Factor-B



ŞEKİLLER, TABLOLAR, BELGELER VE GRAFİKLER DİZİNİ

Tablo 1: Simvastatin sitotoksosite çalışması analizi gösterilmektedir. %1.5 konsantrasyon değerinden sonra kondroblastlarda viabilite azalması tespit edilmiştir.

Tablo 2: Çalışma grupları dağılımı

Resim 1: İn vitro aşamada kondroblast proliferasyonuna ait örnek tüpler ve proliferen olan kondroblastların mikroskop altındaki görüntüsü

Resim 2: Kulak dorsal yüzde, orta hatta uzanan arter lateralinde kalacak şekilde insizyonun planlanması görülmektedir.

Resim 3: Deperikondriyalize olarak elde edilen 2×1 cm boyutundaki kıkırdak grefti gösterilmektedir.

Resim 4: İnterskapular bölgede, subkutan planda oluşturulan cebe kıkırdak greftinin yerleştirilmesi (üst solda); alıcı alanın primer suture edilmesi (üst sağda); simvastatin ve plasebo grubu deneklerde kıkırdak greftlerin jel ile birlikte ceplere yerleştirilmesi (altta) gösterilmektedir.

Resim 5: Cerrahi işlemi takiben ilk haftada simvastatin grubunda greft alıcı sahada oluşan abse odağı gösterilmektedir.

Resim 6: Kontrol grubunda 4 hafta ve 12 hafta sonra alınan kıkırdak greftler görülmektedir.

Resim 7: Hasar düzeyi düşük kartilaj dokusunda periferal proliferasyon alanı Hematoksilen eosin görüntüsü (x20)

Resim 8: Hasar düzeyi düşük, sağlam yapıda kartilaj dokusu Hematoksilen eosin görüntüsü (x10)

Resim 9: Sağlam kartilaj dokusunda Masson-Trikrom histokimyasal boyaması (x20)

Resim 10: Hasar düzeyi düşük kartilaj dokusunda GFAP immünohistokimyasal boyaması (x20)

Resim 11: Hasar düzeyi yüksek, yoğun inflamasyon ile destrükte olmuş kartilaj dokusunun Hematoksilen eosin görüntüsü (x10)

Resim 12: Hasar düzeyi yüksek, yoğun inflamasyon ile destrükte olmuş kartilaj dokusunda boş lakünlerin (kondrosit nükleus sayısında düşüş) Hematoksilen eosin görüntüsü (x20)

Resim 13: Hasarlı kartilaj dokusunda Masson-Trikrom histokimyasal boyaması (x20)

Resim 14: Hasarlı kartilaj dokusunda GFAP immünohistokimyasal boyaması (x20)

Resim 15: Plesebo ve simvastatin grubu için hazırlanan jel örneklerinden gönderilen kültür örneği sonuç belgesi

Grafik 1: Gruplar arası kondrosit nükleus sayısı. (*p <0,05).

Grafik 2: Gruplar arası kartilaj matris metokromazisi skoru. (*p <0,05).

Grafik 3: Gruplar arası periferel proliferasyon skoru. (*p <0,05).

Grafik 4: Gruplar arası inflamasyon skoru. (*p <0,05).

Grafik 5: Gruplar arası vaskülarizasyon skoru. (**p <0,01).

Grafik 6: Gruplar arası fibrozis skoru. (*p <0,05).

Grafik 7: Gruplar arası kemik metaplazisi skoru.

Grafik 8: Gruplar arası kemik GFAP immünreaktivitesi skoru.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kıkırdak doku, vücudu şekillendirmeye yardımcı olan ve sonra onu destekleyen temel biyolojik malzemedir (Caplan, 1984). Kıkırdak, sıkıştırıcı kuvvetlere direnme, kemik esnekliğini artırma ve esneklik ihtiyacı olan kemikli alanlarda destek sağlama yeteneği dahil olmak üzere birçok işleve sahiptir (Chang et al., 2021).

Kıkırdak greftleri; estetik burun ameliyatları, konjenital ya da edinsel burun deformitelerinin düzeltilmesi, mikrotia ve diğer kulak deformitelerinin rekonstrüksiyonu gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte kıkırdak dokusunun greft olarak aktarımında değişik oranda rezorbsiyon gelişebilmektedir. Greft olarak alınan kıkırdaklar %10-90 oranında canlılığını sürdürebilmektedir (Cakmak et al., 2005). Bununla birlikte kıkırdak greft yaşayabilirliğini arttırmak adına literatürde birçok çalışma mevcuttur. Kıkırdak greftinin metil selülöz ile sarılması (Erol, 2000), fasya ile sarılması (Daniel & Calvert, 2004) gibi birçok yöntem mevcuttur. Bu çalışmalarda anlamlı sonuçlar bulunsa da pratik uygulamalarda genel olarak kabul görmüş bir yaklaşım bulunmamaktadır.

Simvastatin, klinik kullanımda anti-hiperlipidemik ilaç grubunda yer alan bir ilaçtır. Simvastatinin antihiperlipidemik etkilerinin yanı sıra ratlarda anjiogenezi tetiklediğini gösteren yayınlar yer almaktadır (Zhu et al., 2021). Ayrıca simvastatinin kemik iyileşmesini arttırdığı ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (Gupta et al., 2019; Stein et al., 2005). Ratlarda simvastatinin enjekte edilebilir formatının minimal invaziv periosteal distraksiyon üzerinde etkisini inceleyen çalışma da mevcuttur (Hao et al., 2018). Bununla birlikte bilginiz dahilinde simvastatinin kıkırdak sağ kalımı üzerine etkisini araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın öncelikli amacı; simvastatinin in vivo olarak uygulanabilen jel formatının geliştirilmesi, ikincil olarak amacı simvastatinin jel formunun blok halindeki kıkırdak greftleri çevresine uygulanarak, kıkırdak greftlerinin sağ kalımına etkisinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Kıkırdak Dokusu

Kıkırdak dokusu, sıkıştırıcı kuvvetlere direnme, kemik esnekliğini arttırma ve esneklik ihtiyacı olan kemikli alanlarda destek sağlama yeteneği dahil olmak üzere birçok işleve sahip bir dokudur. Kıkırdak yapımından sorumlu olan primer hücreler, lakün içerisinde yer alan kondrositlerdir. Kıkırdak matriksi fibröz doku ve çeşitli proteoglikan ve glikozaminoglikan kombinasyonlarından oluşur. Kıkırdak bir kez sentezlendikten sonra lenfatik veya kan kaynağından yoksundur. Beslenmenin ve metabolizma sonucu oluşan atıkların uzaklaştırılmasının esas mekanizması difüzyon ile olmaktadır (Chang et al., 2021). Kıkırdak matriksinde glikozaminoglikanların tip 2 kollojen fiber oranına yüksek olması, çevreleyen bağ dokusundaki kan damarları ile matrikse dağılmış olan kondrositler arasında maddelerin difüzyonuna izin vermekte ve böylece doku canlılığının devamını sağlamaktadır (Ross & Pawlina, 2016). Kıkırdak;kemik gibi,fibröz zar benzeri bir perikondrium ile çevrilidir. Bu tabaka rejenerasyonda etkili değildir. Bu nedenle yaralanmadan sonra iyileşmesi yavaştır. Aktif kan akışının olmaması,herhangi bir kıkırdak yaralanmasının iyileşmesinin uzun sürmesinin ana nedenidir. Kıkırdağın sinir innervasyonu yoktur ve bu nedenle yaralanmalarda veya hasar görme durumlarında bir hassasiyet olmaz. Kıkırdakta kalsifikasyon olduğunda kondrositler ölür. Bunu kıkırdağın kemik benzeri doku ile yer değiştirmesi takip eder.Kemikten farklı olarak,kıkırdağın matriksinde kalsiyum yoktur. Bunun yerine,elastikiyet ve esnekliği sağlayan malzeme olan kondrotini yüksek miktarda içerir (Chang et al., 2021).

2. 1. 1. Kıkırdak Dokusu Hücreleri

Kıkırdak, kondrositlerden ve bol miktarda ekstraselüler matriksden oluşan avasküler bir dokudur. Kıkırdak hacminin %95 den fazlası, bu dokunun fonksiyonel bir elemanı olan ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Kondrositler, seyrek, fakat matriksin üretimini ve devamlılığı için gerekli maddelerdir (Ross & Pawlina, 2016).

Kondrositler, hücre dışı matriksi (ECM) korur ve kıkırdak matriksi üretir. Kollajen liflerle çevrili kondrositler, kıkırdağı güçlü ancak esnek hale getiren maddeler salgılar. Genel olarak kondrositler, intervertebral disklerde ve eklem kıkırdağında bulunurlar. Kondrositler, eklem hareketlerinde tampon görevi gören eklem kıkırdaklarında homeostazın sağlanmasında çok önemli rol oynarlar. Diğer özelleşmiş dokulardaki hücreler gibi, kondrositler de birbirinden kıkırdak matriksi ile ayrılırlar. Kondrositler ayrıca kondral onarımdan da sorumludur;

rekonstruktif yapıları nedeniyle, doku hasarı durumunda dış travmaya yanıt verirler (Nahian & Sapra, 2022).

2. 1. 2. Perikondriyum

Perikondriyum, fibroblastlardan ayırt edilemeyen hücrelerden oluşan sıkı bağ dokusudur. Çoğu açıdan perikondriyum, bezleri ve pek çok organı saran kapsülü temsil etmektedir. Aynı zamanda, yeni kıkırdak hücrelerinin kaynağı olarak da hizmet etmektedir (Ross & Pawlina, 2016).

Perikondriyumun dış bölgesi büyük ölçüde kollajen tip I liflerinden ve fibroblastlardan oluşur, ancak kıkırdak matrisine bitişik bir iç tabaka da bölünen ve kondrositlere farklılaşan yeni kondroblastlar için bir kaynak sağlayan mezenkimal kök hücreler içerir (Mescher, 2021).

Hyalin kıkırdağı, sıkıca tutunmuş bir bağ dokusu olan perikondriyum sarmaktadır. Ancak artiküler eklem yüzeylerinin hyalin kıkırdağı perikondriyuma sahip değildir (Ross & Pawlina, 2016).

2. 1. 3. Kıkırdak Dokusunun Gelişimi ve Yapısı

Kıkırdak gelişimi süreci olan kondrogenез, kondroprogenitör mezenkimal hücrelerin yuvarlak, birbirine yaklaşmış hücre kitlesi oluşturmak üzere kümelenmesi ile başlar. Transkripsiyon faktörü SOX-9 (SRX-box transcription factor 9)'un ekspresyonu bu kümelenen hücrelerin kondroblastlara farklılaşmalarını tetikler ve bu hücreler sonradan kıkırdak matriksi salgılar (SOX-9 ekspresyonu tip 2 kollojen salgılanması ile aynı zamana rastlamaktadır.). Kondroblastlar matriks biriktirdikçe birbirinden daha da uzaklaşırlar. Matriks materyali ile tamamen çevrelendiklerinde hücreler kondrosit olarak adlandırılırlar. Kondrojenik nodülün hemen çevresindeki mezenkimal doku ise perikondriyumu meydana getirir (Ross & Pawlina, 2016).

Embriyolojik gelişim sırasında, kıkırdak farklılaşması öncelikle merkezden dışa doğru gerçekleşir; bu nedenle, daha merkezi hücreler kondrositlerin özelliklerine sahipken periferik hücreler tipik kondroblastlardır (Mescher, 2021).

Kondrogenез pek çok molekül tarafından düzenlenmektedir. Bunların arasında ekstra selüler ligandlar, nükleer reseptörler, transkripsiyon faktörleri, adezyon molekülleri ve matriks

proteinleri bulunmaktadır. Ayrıca, kıkırdak iskeletin gelişimi biyomekanik güçler tarafından da etkilenmektedir (Ross & Pawlina, 2016).

Kıkırdak appozisyonel ve intersitisyel olmak üzere iki tip büyüme yeteneğine sahiptir. Matriks salgılamasının başlaması ile birlikte kıkırdak büyümesi iki sürecin kombinasyonu üzerinden devam eder. Bunlar:

1-Appozisyonel büyüme, mevcut kıkırdağın yüzeyinde yeni kıkırdak oluşumu

2-İntersitisyel büyüme, mevcut kıkırdak kitlesi içinde yeni kıkırdak oluşum sürecidir.

Appozisyonel büyüme sırasında üretilen yeni kıkırdak hücreleri, kıkırdağı saran perikondriyumun iç kısmından türemektedirler (Ross & Pawlina, 2016).

2. 1. 4. Kıkırdak Dokusu Tipleri

İçerdiği lif tipine ve yoğunluğuna göre başlıca üç tip kıkırdak dokusu bulunur. Bunlar hyalin, elastik ve fibröz kıkırdaktır (Eşrefoğlu, 2009).

2. 1. 4. 1. Hyalin Kıkırdak

Organizmada en sık izlenen kıkırdak türüdür. Erişkinlerde eklemlerin yüzeylerinde, solunum yollarında (burun, larinks, trakea, bronş), kostaların ventral uçlarında ve epifiz plaklarında bulunur. Eklem yüzeyleri dışındaki tüm bölgelerde tamamen perikondriyum ile kuşatılmıştır (Eşrefoğlu, 2009).

Hyalin kıkırdak fetüsün gelişmekte olan iskeleti için bir model oluşturur. Erken fetal gelişimde hyalin kıkırdak, endokondral kemikleşme süreci ile gelişen kemikler için prekürsördür. Başlangıçta çoğu uzun kemik, matür kemiğin şekline benzeyen kıkırdak modelleri ile temsil edilir (Ross & Pawlina, 2016).

Olgun kıkırdak hücreleri olan kondrositler lakunalar içinde yer alırlar. Canlıda geniş oval şekilli olan bu hücreler, histolojik teknikler sırasında içerdikleri su, lipid ve glikojeni kaybederek büzüşükleri için preparatlarda lakuna duvarları ile kondrositler arasında gerçekte bulunmayan bir boşluk kalır. Bu büzüşme nedeni ile kondrositlerin sitolojik özelliklerinin incelenmesi ışık mikroskopik düzeyde zordur. Büzüşme olmasa da dehidrasyon sırasında kaybedilen su ve lipitlerden dolayı sitoplazmaları vakuollü görülür (Eşrefoğlu, 2009).

Kıkırdak matriksini sentezleyen kondroblastlar, iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, sekresyon granülleri, veziküller, lipid, glikojen, intermediyer filamentler, mikrofilamentler ve mikrotübüller içerirler (Eşrefoğlu, 2009).

Hyalin kıkırdak matriksi kondrositler tarafından üretilmektedir ve üç ana molekül sınıfı içermektedir:

1-Kollojen molekülleri:Kollojen ana matriks proteinidir.%80 oranında tip 2 kollojen vardır.

2-Proteoglikanlar: Hyaluronan, kondrotin sülfat ve keratan sülfat

3-Çoklu yapışkan glikoproteinler: Ankorin C II, tenasin ve fibronektin (Ross & Pawlina, 2016).

2. 1. 4. 2. Elastik Kıkırdak

Hyalin kıkırdak matriksinin normal bileşenlerine ilaveten çok miktarda dallanan, anastomozlaşan elastik lif içeren kıkırdak tipidir. Elastik liflerin varlığı elastik kıkırdağın hyalin kıkırdaktan daha elastik olmasını, eğilip bükülebilmesini sağlar. Bu tip kıkırdak elastikiyet gereken dış kulak, dış kulak yolu, epiglottis, östaki tüpü ve larinkse (cuneiform, corniculat ve epiglottis) izlenir. Hyalin kıkırdaktan farklı olarak elastik kıkırdak yaşlanmayla birlikte kalsifikasyona uğramaz (Eşrefoğlu, 2009).

2. 1. 4. 3. Fibröz Kıkırdak

Kıkırdak ile sıkı bağ dokusu arasında yapısal özellik gösterir. Kondrositler genellikle hücre dizileri yaparlar, nadiren izojen gruplar şeklinde bulunurlar. Kondrosit grupları arasında yer yer fibroblastlara da rastlanır. Fibröz kıkırdak, intervertebral disklerde,bazı eklemlerde (sternoklavikular ve temporomandibular), symphysis pubiste, diz meniskuslarında ve tendonların kemiğe tutunduğu bölgelerde bulunur. Fibröz kıkırdağın hücrelerinin sadece gelişim döneminde değil, erişkin dönemde de matriks moleküllerini salgılaması bu kıkırdağın dış ortam şartlarına daima uyumlu kalmasını sağlar (mekanik basınç, beslenme şartlarında değişiklikler, hormonal değişiklikler v.b.) (Eşrefoğlu, 2009).

Fibröz kıkırdağın ekstraselüler matriksi hem tip 1 hem de tip 2 kollojen fibrillerinin bulunması ile karakterizedir. Bu kollojenlerin nispi oranları değişiklik gösterebilir. Örneğin ,

diz ekleminin menisküsleri sadece az miktarda tip 2 kollojen içerirken, intervertebraldisk eşit miktarda tip 1 ve tip 2 kollojen fiberleri içermektedir (Ross & Pawlina, 2016).

Fibröz kıkırdaktaki tip 1 ve tip 2 kollojen miktarı arasındaki oran yaş ile değişmektedir. Yaşlı bireylerde, tip 2 kollojen fibrillerini sürekli üreterek çevreleyen matriks içine boşaltan kondrositlerin metabolik aktivitesi nedeni ile tip 2 kollojen daha fazladır.

Bunun yanında, fibröz kıkırdağın ekstraselüler matriksi, agrekandan daha yüksek miktarda versikan (fibroblastlar tarafından salgılanan bir proteoglikan monomer) içermektedir. Versikan da yüksek düzeyde hidrate proteoglikan kümeleri oluşturmak üzere hyaluronanı bağlayabilir (Ross & Pawlina, 2016).

2. 1. 5. Kıkırdak Hasarı ve Onarım Fizyolojisi

Kıkırdak dokusunun hasar görmesi durumunda onarım yeteneği sınırlıdır. Kıkırdak fazla miktarda yoğun ve tekrarlayıcı stresi tolere edebilir. Bununla birlikte kıkırdak hasarlandığında en küçük hasarlarda bile iyileşme yetersizliği göstermektedir. Bu hasara yanıtızsızlık durumu, kıkırdağın avaskuler olmasına, kondrositlerin hareketsizliğine ve matür kondrositlerin sınırlı proliferasyon yeteneğine bağlanabilir (Ross & Pawlina, 2016).

Küçük çocuklar dışında, hasarlı kıkırdak, esasen yaralı bölgeyi işgal eden ve yeni kıkırdak üreten perikondriyumdaki hücrelere bağlı olarak, yavaş ve genellikle eksik bir onarımdan geçer. Hasarlı bölgelerde, perikondrium yeni kıkırdak oluşturmak yerine yoğun bağ dokusundan bir yara oluşturur. Kıkırdağın onarım veya rejenerasyon için zayıf kapasitesi, kısmen damarsızlığına ve düşük metabolik hızına bağlıdır (Mescher, 2021).

Moleküler düzeyde kıkırdak onarımı, tip 1 kollojenin skar dokusu halinde biriktirilmesi ile kıkırdağa spesifik kollojenlerin ekspresyonu yoluyla onarım arasındaki kararsız bir dengedir. Bununla birlikte, yetişkinlerde iyileşmekte olan yara bölgesinde sıklıkla yeni kan damarları gelişir ve asıl kıkırdak onarımı yerine kemik büyümesi stimüle olur (Ross & Pawlina, 2016).

Literatürde kıkırdak hasarı ve onarım fizyolojisi ile ilgili çalışmalar yaygın olarak osteoartrit modelleri üzerinde yapılmaktadır. Osteoartritte, etkilenerek hasar gören kıkırdakta nitrik oksit (NO) ve prostoglandin E2 (PGE2) üretimi artar. Bu nedenle, hastalıklı kıkırdakta aktive kondrositler tarafından üretilen NO ve PGE2, osteoartritr hastalığının ilerlemesini modüle edebilir ve bu nedenle terapötik müdahale için potansiyel hedefler olarak düşünülmelidir (Amin et al., 2000).

Kıkırdak hasarı patofizyolojisinde birtakım sitokinlerin rol oynadığı literatürde yer almaktadır. E. Roy Pettipher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tavşan diz eklemlerine İnterlökin-1 (IL-1) enjeksiyonunun, eklem boşluğunda polimorfnükleer ve mononükleer lökositlerin birikmesine ve eklem kıkırdağından proteoglikan kaybına neden olduğu gösterilmiştir (Pettipher et al., 1986).

Kıkırdak hasarında olduğu gibi onarımında da birtakım sitokinler rol almaktadır. Michael E. Joyce ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Transforming Growth Factor-B (TGF-B)'nin rat femurunda kondrojenesis ve osteogenesis başlangıcında rol aldığı gösterilmiştir (Joyce et al., 1990). Guenther ve arkadaşlarının tavşan eklem kıkırdak kültürlerinde yapmış olduğu çalışmada insülin like growh faktör 1 (IGF-1)'in kollojen ve glikozaminoglikan sentezini arttırdığı belirtilmiştir (Guenther et al., 1982). Aynı zamanda Tyler ve arkadaşlarının yayınladığı çalışmada IGF-1'in, IL-1'in etkisini antagonize ederek kıkırdakta bozulmayı azalttığı bildirilmiştir (Tyler, 1989).

Hasar görmüş kıkırdağın tedavisi için birçok klinik çalışma yapılmıştır. Bunlar arasında artroskopik debridman, mikrofraktü, osteokondral allogreft, devamlı pasif hareketler, periosteal perkondral greftler ve kondrosit transplantasyonu bulunmaktadır (Suh et al., 1995). Bu çalışmalar arasında perikondriyal greftler üzerinde çok durulmuştur. 1972 de Skoog, Ohlsean ve arkadaşları tarafından yayınlanan makalede tavşan kıkırdağı perikondriyumunun kondrojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Skoog et al., 1972). Yine Can ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada tavşan kulağından tek taraflı perikondriyum korunarak alınan kıkırdak grefti sonrasında defektin tamamen kıkırdak dokusu ile onarıldığı; her iki taraf perikondriyumu alınan defekt alanlarında kondrojenin defekt alanına komşu alanlarda sınırlı olduğu, geri kalan sahanın fibrotik dokularla rejenere olduğu görülmüştür (Haberl Can et al., 2008). Perikondriyumun kıkırdak tamirindeki rolü nedeni ile tedavi amaçlı olarak insanlarda ilk defa el bileği ve parmak eklemlerinde başarı ile kullanıldı (Suh et al., 1995). Pastacaldi ve arkadaşları tarafından romatoid artritli hastalarda el bileğinde (Pastacaldi & Engkvist, 1979), Engkvist ve arkadaşları tarafından küçük eklemlerde (Engkvist & Johansson, 1980) perikondriyal greftler kullanılarak yapılan artroplastiler başarılı sonuçlar vermiştir.

2. 2. Kıkırdak Grefti

2. 2. 1. Kıkırdak Grefti Tarihçesi

Kıkırdak grefti tarihçesine baktığımız zaman bu konu ile ilgili çalışmalar 19.yy'ın ilk yarısına dayanmaktadır. Ancak klinik anlamda kullanımları çok daha geç yıllarda başlayacaktır.

İlk kıkırdak grefti çalışmalarının Albert Theodore Middeldorpf (1824-1869) tarafından yapıldığı tahmin edilmektedir. Middeldorpf, deneysel modelde almış olduğu kıkırdak parçalarını peritona yerleştirmiş; ancak bunların tamamen eridiğini bildirmiştir. 1872'de F.W.Zahn fetal kıkırdaklarla ilgili deneyler yapmış ancak başarılı olamamıştır (Santoni-Rugiu & Sykes, 2007).

İlk başarısız çalışmaları takiben Ollier tarafından kıkırdak greftlerinin hayatta kalabilmesi için perikondrium ile birlikte nakledilmesi gerektiğini bildirmiştir. Friedrich Mangold (1859-1909) tavşanlarda perikondrium ile birlikte nakledilen kıkırdağın 9 ay sonra hayatta kalabileceğini göstermiştir. Takiben bir hastada 3×5 cm boyutunda kıkırdak greftini boyun cildi altına yerleştirmiş ve 8 ay sonra da larinksdeki defekti kapatmak için boyundan kompozit flep kaldırmıştır. Bu ameliyat 1900'de yapıldı ve muhtemelen yapılan ilk kıkırdak grefti vakası olmuştur. Mangold takip eden yıllarda eyer burun deformitesi bulunan iki hastada kıkırdak grefti kullanmıştır (Santoni-Rugiu & Sykes, 2007).

Paul Bert kıkırdak greftleri ile ilgili yaptığı çalışmalarda kıkırdak greftlerinin yaşayabileceğini ve hatta kemik oluşumuna yol açabileceği sonucuna varmıştır. Bert ayrıca kıkırdak greftlerinin yaşayabilirliğinde alıcı sahanın önemli rol oynadığını doğrulamıştır (Santoni-Rugiu & Sykes, 2007).

Fisher, kulak ve burun rekonstrüksiyonu için perikondriyumlu ve perikondriyumsuz kosta kıkırdağı kullanmış ve perikondriyumun greft yaşayabilirliği için elzem olmadığını belirtmiştir. Hippolyte Morestin (1868-1919) orbital, malar ve mandibular kemik defektleri rekonstrüksiyonunda kıkırdağın başarı ile kullanılabilceğini belirtmiştir. Heinrich Hellferich (1851-1911) perikondriyuma yakın yerleştirilen kıkırdak greftlerinin hayatta kalma oranlarının daha yüksek olduğunu belirtmiştir (Santoni-Rugiu & Sykes, 2007).

1923'te Harold Neuhof heterogreftler ile ilgili yapmış olduğu çalışmaların sonucunda kıkırdak greftin rezorbe olduğunu ve fibröz doku ile yer değiştirdiğini ancak yine de kalıcılığı

nedeni ile kulak ve burun rekonstrüksiyonları için kullanılabilceğini bildirmiştir (Santoni-Rugiu & Sykes, 2007).

Peer sonuçlarını 1950'lerde yayınladığı çalışmalarla nasal septum, kostal kıkırdak ve kulak kıkırdağının herm perikondriyumlu hem de perikondriyumsuz mükemmel greft kaynakları olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Ayrıca 14 yıllık uzun takipler sonucunda kıkırdak dokusunun canlılığını uzun süre koruyabildiğini gözlemlemiş, greftin tamamen rezorbe olduğu veya kemikleştiği hipotezini çürütmüştür (Santoni-Rugiu & Sykes, 2007).

Kıkırdak greftleri, alınması ve şekillendirilebilmesinin kolay olması, şeklini ve hacmini uzun süre koruyabilmesi nedeniyle günümüzde hala greft kaynağı olarak tercih edilmekte, bu özellikler onu kulak ve burun rekonstrüksiyonu için değerli kılmaktadır (Santoni-Rugiu & Sykes, 2007).

Rinoplastide çeşitli amaçlarla değişik şekillerde greftler kullanılmaktadır. Bu greftlerden bir tanesi olan doğranmış greftlerin kullanımı yakın zamanda Erol tarafından Türk lokumu greftleri (yani Surgicell'e sarılı doğranmış kıkırdak greftleri) tekniğinin yayınlanmasıyla yeniden popülerlik kazandı (Daniel & Calvert, 2004). Erol yayınlamış olduğu çalışmada bu tekniği şöyle tanımlamıştır: Septal, alar, konkal ve kostal orjinlerden alınan kıkırdak 11 numara bisturi yardımı ile 0.5-1 mm (milimetre)' lik parçalar halinde kesilir. Parenteral olarak alınan 1 santimetreküplük (cm³) kan, kıkırdak kütesine eklenir. Bu kıkırdak kütesi sonra Surgicell ile sarılarak silindirik bir form elde edilir ve rifamisin ile nemlendirilir. Erol yapmış olduğu çalışmada deviye septal kıkırdağın dorsal kısmının aşırı eksizyonu ve Surgicell ile sarılı küp şeklinde kıkırdağın yerleştirilmesi sonrası tüm hastalarda 1-10 yıllık takipler sonrası nüks olmaksızın düz bir burun elde edildiğini belirtmiştir. Tekniğin aynı zamanda primer rinoplastilerde,ince burun derisi olan hastalarda ve/veya aşırı dorsal rezeksiyon yapılan hastalarda,rezeksiyon sonrası kemik düzensizliklerini kamufule etmede etkili olduğu belirtilmiştir (Erol, 2000).

2. 2. 2. Kıkırdak Grefti Elde Edilmesi, Hazırlanılması ve Klinik Uygulanması

Kıkırdak greftleri; estetik burun ameliyatları, konjenital ya da edinsel burun deformitelerinin düzeltilmesi, mikrotia ve diğer kulak deformitelerinin rekonstrüksiyonu, temporomandibuler eklem ankilozunun tedavisi ve kraniofasyal bölgedeki defekt onarımı gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Rinoplasti cerrahisinin başlangıcından bu yana, travmatik eyer burun deformitelerinin ve sekonder cerrahi defektlerin rekonstrüksiyonunda greftler kullanılmaktadır (Daniel & Calvert, 2004). Sekonder rinoplastide otolog greftler için septal kartilaj, aurikular kartilaj, kostalar, iliak ve kalvaryal kemik olmak üzere beş tane potansiyel donör alan vardır. Septal kartilaj tercihen kullanılır. Çünkü ek insizyon gerekmez, donör saha morbiditesi olmaz, kıkırdağın alınması septumdaki eğriliği düzeltebilir ve hava yolunu iyileştirebilir (Marin et al., 2008).

Kıkırdak greftleri kulak rekonstrüksiyonunda da önerimli yer tutmaktadır. Öncülüğünü Brent, Nagata, Tanzer, Walton ve Beahm'ın kurduğu teknikler şu anda kullanılan kulak rekonstrüksiyonunun temelini oluşturmaktadır. 1959 yılında Tanzer, otolog kaburga kıkırdağı kullanarak kulak rekonstrüksiyonunda önemli bir yol kat etti. Çalışmalarında kıkırdak greftleri rezorbe olmadan kalıcı sonuçlar elde etti. Kulak rekonstrüksiyonu için otojen kaburga kıkırdağının kullanımı, kalıcı dayanıklılık ile mükemmel estetik sonuçlar sağladığından, mikrotia rekonstrüksiyonu için en kalıcı tekniklerden biridir (Olshinka et al., 2017).

Temporomandibular eklem ankilozunun düzeltilmesi için cerrahi olarak birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlar arasında kostakondral greft, sternoklavikular greft, metatars başı, kalvaryal kemik grefti, kondroosseöz iliak crest grefti sayılabilir. Bunlar arasında kosta kondral greftler, kondiler kıkırdağın mandibulanın ana büyüme merkezi olduğu konseptine dayanarak popülerlik kazanmıştır (Mehrotra & Sidebottom, 2017).

Mikrotia rekonstrüksiyonu için en uygun yöntem kostal kıkırdakların kullanımınıdır (Pan et al., 2008). Kıkırdak greftleri doğuştan kulak deformitelerinde kullanıldığı gibi ısırma, yanma, trafik kazaları sonucu oluşan edinsel deformitelerde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Pearl ve arkadaşları parsiyel kulak defektinin olduğu 50 hastada kostal kıkırdak grefti kullanarak başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir (Pearl & Sabbagh, 2011).

2. 2. 3. Kıkırdak Greftinin Sağ Kalımını Arttırmaya Yönelik İşlemler

Kıkırdak greftleri klinik olarak birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle kıkırdak greftlerinin sağ kalımını arttırmaya yönelik bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır.

Orbay ve arkadaşlarının 2011 yılında yayınlamış olduğu bir çalışmada; yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerin kıyılmış kıkırdak greftleri sağ kalımını arttırdığını bildirmişlerdir (Orbay et al., 2012).

Topkara ve arkadaşlarının tavşan kıkırdakları üzerinde yapmış olduğu başka bir çalışmada konsantre edilmiş büyüme faktörününün (CGF) kıyılmış kıkırdak greftleri üzerinde sağ kalımı arttırdığı belirtilmiştir (Topkara et al., 2016). Göral ve arkadaşlarının tavşan kıkırdak greftleri üzerinde yaptığı başka bir çalışmada ise plateletten zengin fibrinin tavşan kıkırdakları sağ kalımı üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir (Göral et al., 2016). Yine plateletten zengin fibrinin kıkırdak sağ kalımı üzerine Güler ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise benzer sonuç bulunmuş; hatta inflamasyon ve fibrosizi kısmen azalttığı gözlenmiştir (Güler et al., 2015).

Mekanik etkilerin de kıkırdak sağ kalımı üzerine nasıl etki ettiği ile ilgili çalışmalar da yer almaktadır literatürde. Çakmak ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kıkırdak greftlerinde ezilme şiddeti arttıkça kıkırdak dokusunda sağ kalımında azalma ve kıkırdak greftinde daha fazla bağ dokusuna dönüşüm gözlenmiştir (Cakmak et al., 2005). Botulinum toksinin kıkırdak greftlerinin çeşitli formlarının sağ kalımı üzerine etkisini araştıran bir çalışmada kıkırdak greftlerine yapılan müdahalelerin sağ kalımı olumsuz azalttığı; botulinum toksinin kıyma işlemi yapılan kıkırdak greftlerde sağ kalımı arttırdığı bildirilmiştir (Kaya, 2019).

Tüm bu çalışmaların yanı sıra kıkırdak greft sağ kalımı için yapılan ancak olumsuz sonuçlanan bazı çalışmalar da literatür de yer almaktadır. Cemal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Surgicell ya da fasyaya sarılmayan kıkırdak greftlerin sağ kalımının daha fazla olduğu tespit edilmiş (Firat et al., 2011). Yine Kazıkdaş ve arkadaşlarının tavşan kıkırdak greftlerinde yapmış olduğu bir çalışmada oksitlenmiş rejenere selülöz (Surgicell) ile sarılan kıkırdaklarda sağ kalımın azaldığı, kondroblastların rejenere olma kabiliyetlerinin düştüğü ve fibröz formasyonunun arttığı belirtilmiştir (Kazıkdaş et al., 2007). Yine başka bir çalışmada fasyaya sarılmış ve doğranmış kıkırdaklarda rezorbsiyonun tek parça blok halindeki kıkırdak greftlere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (Fatemi et al., 2012).

2. 2. 4. Kıkırdak Greftinin Sağ Kalımının Değerlendirilmesi

Literatür çalışmalarına bakıldığında zaman kıkırdak sağ kalımının değerlendirilmesi başlıca makroskobik ve mikroskobik olarak iki şekilde yapılmaktadır.

Kıkırdak sağ kalımını değerlendirirken makroskobik ölçüt olarak sarı kahverengi renkte pigmentasyonda artış, kıkırdak rezorbsiyon ve distorsiyonu (Firat et al., 2011), parlaklık, renk ve kapsül formasyonu oluşumu ile değerlendirilebilir (Göral et al., 2016).

Mikroskopik incelemede ise hematoksilen-eozin, Masson trikrom, Evans van Gieson, Safranin-O ve glial fibrilik asit (GFA) boyaarı kullanılabılır. Glial fibrilik asit protein kondrositlerin rejenerasyon potansiyelini gösterir (Calvert et al., 2006). H-E (Hematoksilen-eozin) ile boyanmış bölümler, kondrosit canlılığını ve kondroid dokusunun durumunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Masson's Trichrome, kolajen fibrillerini yeşile boyayarak matrisin kolajen içeriğini gösterir. Orcein, matristeki elastik lifleri boyar (Güler et al., 2015).

Histolojik değerlendirmede kondrositlerde nükleus kaybı, periferal proliferasyon; matriksdeki kollojen ve elastik fiberler; çevre dokulardaki fibrozis, inflamasyon, vaskularizasyon, metaplazik kemik formasyonu, fragmantasyon ve rezorbsiyon kullanılabılır (Güler et al., 2015).

2. 3. Simvastatin

Simvastatin, statin grubu antihiperlipidemik ilaçtır. Bu sınıf ilaçlar HMG-KoA (3-hidroksi-3 metilglutaril-koenzim A) inhibisyonu yaparak lipit seviyesini düşürürler. Bu sınıfta lovastatin, atorvastatin, fluvastatin, pravastatin, simvastatin, rosuvastatin ve pitavastatin bulunmaktadır. LDL (Low density lipoprotein) düzeyini düşürmede en güçlü etki yapan ilaçlardır (Bertram G. Katzung, 2016).

1987'de ilk hidroksi-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörü olan lovastatin, önce ABD'de ve daha sonra diğer birçok ülkede piyasaya sürüldü (Tobert, 2003). Merck & Co., Inc. (Rahway, NJ USA) ayrıca lovastatinden kimyasal olarak yalnızca ek bir yan zincir metil grubuna sahip olmasıyla ayrılan simvastatini geliştirmiştir. Simvastatin ilk olarak İsveç'te Nisan 1988'de ve ardından dünya çapında tanıtıldı (Pedersen & Tobert, 2004).

Statinler ayrıca oksidatif stresi azaltırlar ve aterosklerotik lezyonların stabilitesinde artış ile birlikte vaskuler inflamasyonu azaltırlar. Akut koroner sendromdan hemen sonra, lipit düzeyine bakılmaksızın redüktaz inhibitörleri ile beraber tedaviye başlamak standart uygulama haline gelmiştir (Bertram G. Katzung, 2016).

2. 3. 1.Simvastatin'in Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri

Simvastatin, inaktif lakton önölacı halinde olup gastrointestinal kanalda hidrolize edilerek aktif olan β -hidroksil türevine dönüşür. Statinlerin hepsinde olduğu gibi simvastatin de karaciğer de ilk geçiş eliminasyonuna uğrar. Simvastatin CYPs (Sitokrom P450) 3A4 ve 3A5 enzimleri tarafından metabolize edilir. Kolesterol sentezi gece yarısı ile saat 02:00 arasında

maksimum düzeye ulaştığı için özellikle ilaçların bu vakitte alınması önerilir (Bertram G. Katzung, 2016; Laurence L. Brunton, 2023).

Simvastatin lipofilitesi yüksek bir statin olup %60-85 oranında absorbe edilir. Buna rağmen karaciğerden ilk geçiş eliminasyonu yüksek olduğu için %5'den daha az biyoyararlanıma sahiptir. Kana geçen simvastatinin %95 den daha fazlası plazma proteinlerine bağlanır. Yarı ömrü yaklaşık olarak 2-5 saattir. %80 den fazlası ile hepatic yolla atılır (Neuvonen et al., 2008).

Simvastatin klinik kullanımda yaygın olarak oral yoldan alınan tablet formu bulunmaktadır. Lokal etki gösteren jel ya da krem formu bulunmamaktadır. Bu formları daha çok deneysel çalışmalarda hayvan modelleri üzerinde kullanılmaktadır.

Simvastatin hidrosimetilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörüdür. Bu enzim, de novo kolesterol sentezinde hız kısıtlayıcı basamak olan HMG-CoA'nın mevalonata dönüşümünü katalize eder. Bu enzimin statinler tarafından rekabetçi inhibisyonu, hepatic kolesterol sentezini azaltır. Hücre içi kolesterol konsantrasyonundaki azalma, hepatosit hücre yüzeyinde LDL reseptör ekspresyonunu indükler. Bu da dolaşımdan LDL-C ekstraksiyonunun artmasına ve dolaşımdaki LDL-C konsantrasyonunun azalmasına neden olur. Statinlerin ayrıca HDL-C (high density lipoprotein) kolesterol konsantrasyonundaki artışlar ve trigliserit konsantrasyonundaki düşüşler dahil olmak üzere diğer lipit parametreleri üzerine de yaralı etkileri vardır (Maron et al., 2000; Schachter, 2005).

Statinler ayrıca atorejonik lipoprotein düzeyini azaltabileceği diğer mekanizmalar arasında apolipoprotein B100'ün hepatic sentezinin inhibisyonu ve trigliseritten zengin lipoproteinlerin sentezi ve salgılanmasındaki azalma yer almaktadır (Ginsberg et al., 1987; Schachter, 2005)

2. 3. 2. Simvastatin'in Yan etkileri ve Diğer İlaçlarla Etkileşimleri

Statin toksisitesi veya intoleransı en yaygın olarak SAMS (Statin-associated muscle symptoms)'ler şeklinde bulgu verir. Statin tedavisinin daha ciddi olabilen diğer yan etkileri arasında yeni başlayan tip 2 diabetes mellitus, nörolojik ve nörokognitif etkiler, hepatotoksiste, renal toksiste yer alır (Ward et al., 2019).

Bazı hastalarda serum aminotransferaz aktivitesi yükselir (Normalin üç katı kadar). Bu durum karaciğer toksisitesi ile ilişkili değildir ve genellikle geçicidir. Aminotransferaz düzeyi izlenen ve stabil olan hastada semptom görülmezse tedaviye devam edilmelidir. Bu bulgu, daha ciddi bir hepatic toksisitenin habercisidir. Bu hastalar keyifsizlik ve anoreksi ile başvururlar.

Bu tip hastalarda, serum aminotransferaz düzeyini sürekli olarak normal değerin üst limitinin üç katından yüksek seyreden asemptomatik hastalarda ilaç hemen kesilmelidir (Bertram G. Katzung, 2016).

Redüktaz inhibitörü kullanan hastada plazma kreatinin kinaz aktivitesi çok az yükselir ve bu durum genellikle ağır fiziksel aktivite ile ilişkilidir. Nadiren hastada kreatin kinaz aktivitesinin belirgin olarak artmasıyla birlikte çizgili kaslarda genel bir rahatsızlık ve güçsüzlük görülür. İlaç kesilmezse böbrek hasarına neden olan myoglobinemi gelişir (Bertram G. Katzung, 2016).

Simvastatin karaciğerde büyük ölçüde CYP3A4 enzimi ile metabolize edildiği için güçlü CYP3A4 inhibitörleri ile beraber kullanımından kaçınılmalıdır. Bu ilaçlar arasında eritromisin, klaritromisin, itrakonazol, telitromisin, ketakonazol, posakonazol, HIV proteaz inhibitörü nefazadon yer almaktadır. Bunun tersine fenitoin, griseofulvin, barbitüratlar, rifampin ve tiazolidindionlar gibi ilaçlar CYP3A4 ekspresyonunu arttırarak bu enzime bağımlı statinlerin plazma konsantrasyonunu azaltırlar (Bertram G. Katzung, 2016).

2. 3. 3. Simvastatin'in Doku İyileşme ve Sağ Kalımına Etkisi, Antijiperlipidemi Dışındaki Etkileri

Simvastatin, klinik kullanımda anti-hiperlipidemik ilaç grubunda yer alan bir ilaçtır.

Bununla birlikte literatür çalışmalarına bakıldığında keşif noktası net bir şekilde yer almamakla birlikte anti-hiperlipidemik etkileri dışında birçok etkilerinin kanıtlandığı çalışmalar yer almaktadır.

Simvastatinin antihiperlipidemik etkilerinin yanı sıra ratlarda anjiogenezi tetiklediğini gösteren yayınlar mevcuttur (Zhu et al., 2021). Asai ve arkadaşları diabetik farelerde yaptığı bir çalışmada topikal simvastatinin lenfanjiogenez ve anjiogenez aracılığı ile yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermiştir (Asai et al., 2012). Ratlarda simvastatinin enjekte edilebilir formatının minimal invaziv periostal distraksiyon üzerinde etkisini inceleyen çalışma da mevcuttur (Hao et al., 2018). Ayrıca simvastatinin kemik iyileşmesi arttırdığı ve inflamasyonu azalttığına yönelik çalışmalar da mevcuttur (Gupta et al., 2019; Stein et al., 2005). Statinlerin immünmodülatör ve antiinflamatuvar etkileri serum kolesterol düşürücü etkilerinden bağımsızdır. Simvastatinin osteoartrit progresyonunu yavaşlatmada faydalı olduğu ve kartilaj hasarını azalttığı gösterilmiştir (Aktas et al., 2011). Yine başka bir çalışmada simvastatinin embriyoda kıkırdak farklılaşmasında etkili olduğu bulunmuştur (Kramer et al., 2012). Bununla birlikte simvastatinin kıkırdak sağ kalımı üzerine etkisini araştıran yeterli çalışma bulunmamaktadır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Bezmialem Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı (Protokol kodu: E.79986 Tarih:05.10.2022) alınarak in vivo aşaması Marmara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı ile Bezmialem Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde; in vitro aşaması SFA-ARGE laboratuvarında gerçekleştirildi.

3. 1. İn Vitro Çalışma ve Jel Üretimi

3. 1. 1. İn Vitro Kıkırdak Dokusu Elde Edilmesi

Bu çalışma in vivo ve in vitro olmak üzere iki aşamalı olarak gerçekleştirildi. Çalışmanın in vitro aşamasın SFA ARGE (İstanbul-Türkiye) laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu aşamada operasyonlar esnasında alınan kıkırdaklardan elde edilen kondroblastlar in vitro ortamda çoğaltıldı, simvastatinin kondroblastlar üzerinde toksik dozu tespit edildi ve simvastatinin jel formatı üretildi. Çalışmanın in-vitro metodolojisi gerçekleştirilirken sırasıyla aşağıdaki basamaklar takip edildi:

1- İnsan kondrosit hücreleri, Chondrocyte Growth Medium, DMEM (Dulbecco Eagle's minimal essential medium) ve RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium 1640) içinde $72 \text{ h} \pm 24 \text{ h}$ $37 \pm 1 \text{ C}$, %5 CO₂ ortamında çoğaltıldı; konfluensi (hücrelerin yaklaşarak dokulaşma iletişimi başlatması) faz-kontrast invert (Leica DMI 1500X) mikroskop takip edildi.

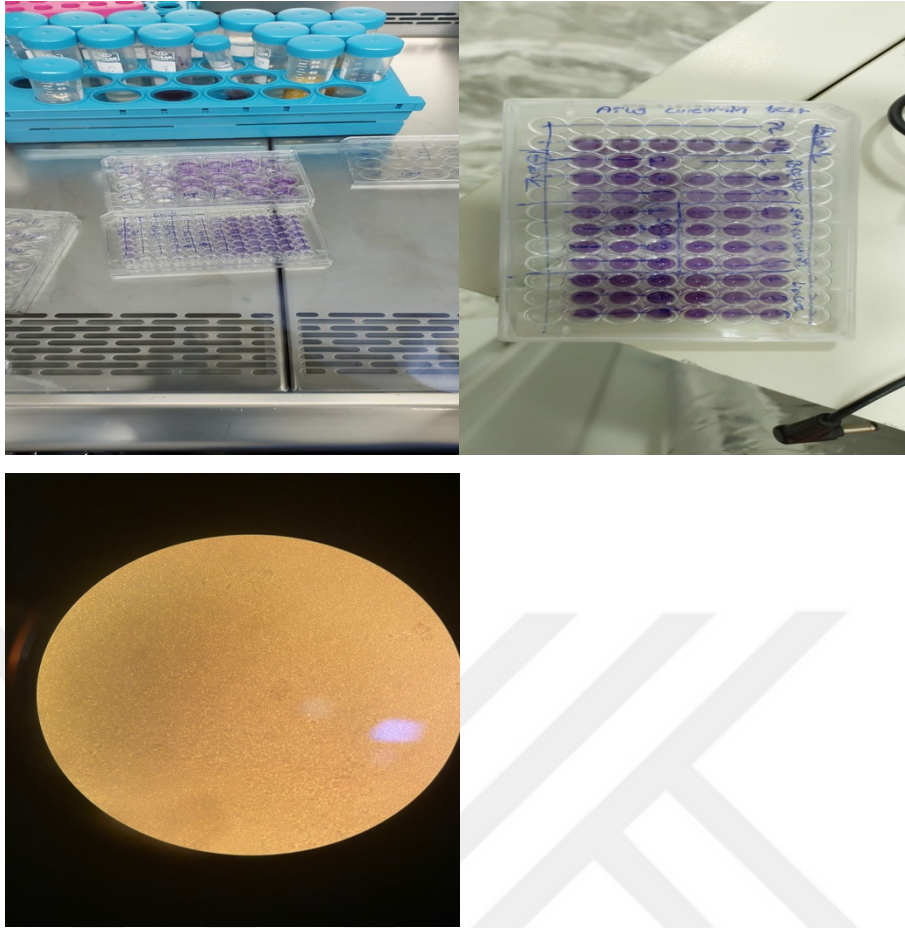
2- Çoğalma sonrasında, 24 kuyucuklu plateler içine, doku iskelesine, sıyırıcı yardımıyla alınan kondrositler, 7 gün \pm 3 gün boyunca, doku iskelesi üzerinde proliferasyonu için beklenildi. Proliferasyon için deney düzeni şu şekilde olmuştur:

Test prosedürü, OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 439 yönergesine göre hazırlanmıştır. Test, 3 boyutlu, üç tekrarlı olarak (numune, pozitif kontrol ve negatif kontrol) gerçekleştirilmiştir. Prosedüre göre, doku üzerine sıvı ürünler için 30 ul, katı ürünler için 25 mg numuneleme yapılmıştır. Sıvı numuneler nylon bariyer ile kapatılmıştır. 35 dakika 37°C , 5% CO₂, 90% RH koşullarında inkübe edilmiştir. Süre sonunda oda koşullarında seviye 2 güvenli laminer akışlı biyogüvenlik kabininde 25 dakika bekletilmiştir. Dokuya konulan numune, oda sıcaklığında Dulbeco solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası, Dulbeco solüsyonu içinde 24 saat 37°C , 5% CO₂, 90% RH koşullarında inkübe edilmiştir. Süre sonunda Dulbeco solüsyonu yıkanıp tekrar eklenerek 18 saat daha 37°C , 5% CO₂, 90% RH koşullarında inkübe edilmiştir. Süre sonunda, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

(MTT) protokolüne göre canlılık spektrofotometre ile (570 - 600 nm) okunarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, kabul kriterlerine göre kategorilendirilmiştir.

3- Hücre proliferasyonu, faz-kontrast invert (Leica DMI 1500X Marka) mikroskop ile takip edildi.

4- Dokulaşma tamamlandıktan sonra, simvastatin ile ilgili çalışmalar başlandı. Simvastatin içeren doku içi infüzyon sıvı formülasyonlar hazırlandı. Simvastatin uygulama dozunu belirlemek üzere, kondrosit üzerindeki sitotoksosite veya irrtasyon analizleri yapıldı. Buna göre, % 1, 1.5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 oranlarıyla toksisite ve/veya irrtasyon testleri yapılarak, simvastatinin non-irritan spektrumu belirlendi (Tablo 1). Bu çalışmalar, OECD 439 (Organisation for Economic Co-operation and Development) Test protokolüne göre gerçekleştirildi. Çalışma OECD 439 protokolüne göre, sppektrofotometrik metot ile yapılırken, konfirmasyonunda faz-kontrast invert (Leica DMI 1500X) mikroskop görüntüleri kullanıldı.



Resim 1: İnceleme aşamada kondroblast proliferasyonuna ait örnek tüpler (Üstte) ve proliferasyon alan kondroblastların mikroskop altındaki görüntüsü (Altta)

3. 1. 2. Jel Üretilmesi

Bir beher içinde bitkisel gliserin tartılıp (0.5 gr) üzerine hidroksi etil selüloz polimeri (0.8 gr) eklenildi.

İkinci beherde pentilen glikol (30 gr) ile simvastatin (0.75) çözüldü ve su (17.2 gr) eklendi. 2000-3000 rpm (revolutions per minute) dönüş hızında mekanik karıştırıcı ve homojenizator yardımı ile ürün karıştırıldı. Kıvam alması için ikinci beherde çözünen etken madde içeren karışım birinci beherin üzerine yavaş yavaş ilave edilerek homojenizasyona devam edildi.

Final ürün şeffaf hale gelmesi için Polisorbat T-80 (0.75 gr) yüzey aktif maddesi ilave edildi, ph kontrol edilerek jel kıvamına gelen ürün ambalaj içerisine konarak üretim işlemi tamamlandı.

3. 2. Hayvan Çalışması

Çalışma çift kör randomize bir çalışma olarak tasarlandı. Çalışmada on iki adet “Yeni Zellanda” cinsi erkek tavşan (ortalama ağırlıkları:3-4 kg, ortalama 4 aylık) her grupta 4 tavşan olacak şekilde, toplamda 3 grup olarak düzenlendi (Tablo 2). Kıkırdak grefti olarak kulak ve alıcı alan olarak dorsal interskapular bölge kullanıldı.

Deney hayvanlarının tamamını standart fiziksel şartların sağlandığı; 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık siklusunda, 20-21°C sıcaklığında tekli kafeslerde barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları, standart laboratuvar yemi ve musluk suyu verilerek düzenli olarak karşılandı.

Grup	Örnek Sayısı	Kıkırdak greftlerine uygulanan işlem
1-Kontrol Grubu	4 adet tavşan	Kıkırdak greftleri ek bir işleme tabi tutulmadı.
2-Plasebo Grubu	4 adet tavşan	Kıkırdak greftleri simvastatin içermeyen jel ile birlikte tavşan sırtında subkutan ceplere yerleştirildi.
3-Deney Grubu	4 adet tavşan	Kıkırdak greftleri simvastatin içeren jel ile birlikte tavşan sırtında subkutan ceplere yerleştirildi.

Tablo 2: Çalışma grupları dağılımı

3. 2. 1. Anestezi

Tavşanlara cerrahi işlem öncesi, 35mg/kg ketamin (Ketasol® flakon Richter Pharma,Wels,Austria), 10 mg/kg ksilazin (Rompun® flakon, Bayer, Leverkusen,Germany) intramuskuler yol ile anestezi sağlandı. Anestezi derinliği parmak kısırtma, ekstremitte çekme yanıtı ve kornea refleksi yoluyla kontrol edildi. Cerrahi işlem sırasında anestezi derinliğini korumak amacı ile gerekli durumlarda Ketamin uygulamaları tekrar edildi.

Uygun anestezi derinliği sağlandıktan sonra hayvanın her iki kulak ve sırt bölgesi tıraş edilerek operasyon masasına yüzüstü yatırıldı.

3. 2. 2. Kıkırdak Greftlerinin Hazırlanılması ve Yerleştirilmesi

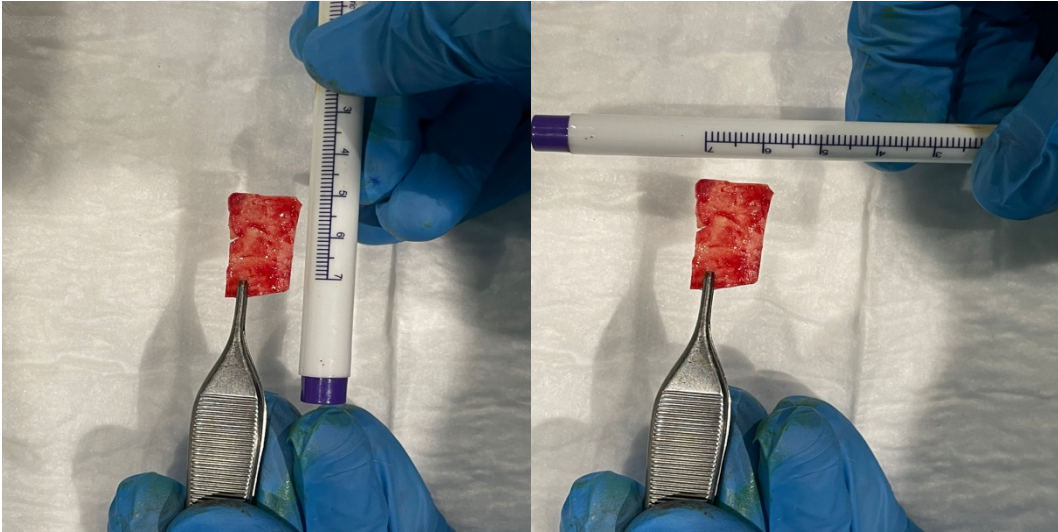
Cerrahi alan Povidon iyot %10 çözelti (Poviderm® , Sultanbeyli,İstanbul) ile silinerek antisepsi sağlandı ve steril örtüm uygulandı.

Tavşanların her iki kulağında dorsal yüzde, orta hat boyunca uzanan arter lateralinde kalacak şekilde 2 cm uzunluğunda vertikal insizyon planlandı (Resim 1). Planlanan insizyon yapılarak subperikondriyal plana ulaşıldı ve bu planda disseksiyona devam edildi. Kıkırdak her iki yüzeyden serbestlendikten sonra 2×1 cm boyutunda kıkırdak grefti bisturi yardımı ile

kesilerek elde edildi (Resim 2). Greft donor alan insizyonları kanama kontrolü sağlandıktan sonra 4/0 monoflaman polypropylene suture materyali (Monoprolen®, Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) ile basit suture edildi.



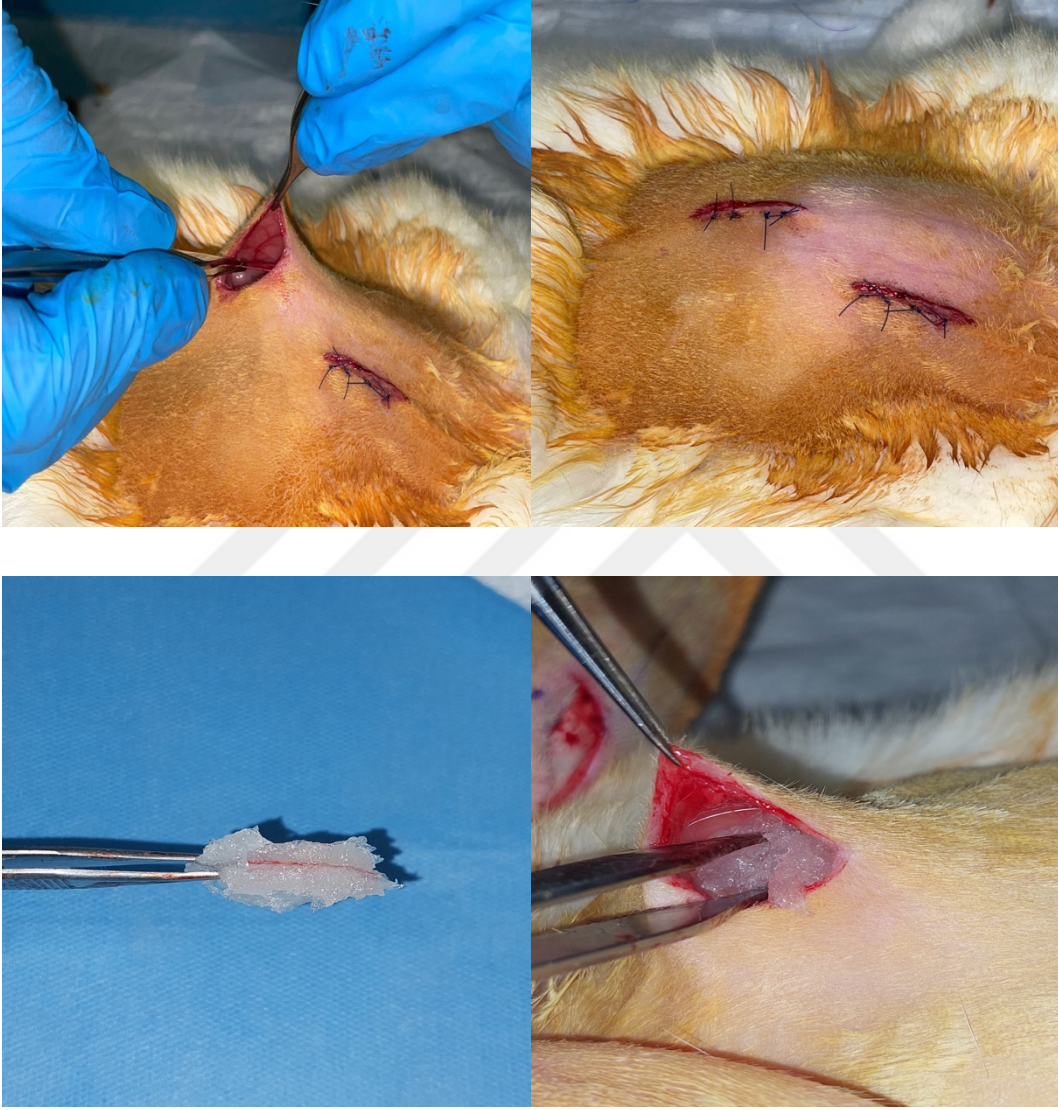
Resim 2: Kulak dorsal yüzünde, orta hatta uzanan arter lateralinde kalacak şekilde insizyonun planlanması görülmektedir.



Resim 3: Deperikondriyalize olarak elde edilen 2×1 cm boyutundaki kıkırdak grefti gösterilmektedir.

Kıkırdak greft donor alanları için sırtta interskapular bölgede orta hattın 1cm sağ ve sol tarafında insizyonlar yapıldı. Cilt altı planda kas fasyası üzerinde disseksiyon yapılarak kıkırdak greftlerin yerleşebileceği cepler oluşturuldu. Oluşturulan ceplerin birbiri ile iştirakli olmadığı kontrol edildi. Kontrol grubundaki kıkırdak greftleri ek bir işleme tabi tutulmadan

oluşturulan ceplere yerleştirildi. Plasebo grubu ve simvastatin jel grubundaki deneklerde kıkırdak greftlerine 1cc jel sürüldü. Deney grubundaki jeller % 1.5 simvastatin içermektedir. Greftler jel ile birlikte oluşturulan ceplere yerleştirildi. Kesiler 3/0 monoflaman polypropylene sütür materyali (Monoprolen[®], Ethicon, San Lorenzo, Puerto Rico) ile horizontal matris yöntemi ile sütüre edildi (Resim 3).



Resim 4: İnterskapular bölgede, subkutan planda oluşturulan cebe kıkırdak greftinin yerleştirilmesi (üst solda); alıcı alanın primer suture edilmesi (üst sağda); simvastatin ve plasebo grubu deneklerde kıkırdak greftlerin jel ile birlikte ceplere yerleştirilmesi (altta) gösterilmektedir.

Daha sonra tavşanların tekli kafeslerde uygun koşullarda bakımı ve beslenmesi sağlandı.

Her grupta yer alan deneklerin yarısı dördüncü haftanın sonunda, diğer yarısı ise on ikinci haftanın sonunda sakrifiye edilerek kıkırdak greftleri alındı. Greft materyalleri Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik ve immünokimyasal olarak değerlendirildi.

3. 3. Sonuçların İncelenmesi

3. 3. 1. Makroskopik Değerlendirme

Greft donor bölgesi, greftlerin alıcı bölgeye adaptasyonu ve greftte oluşan makroskopik değişiklikler değerlendirildi.

3. 3. 2. Histolojik Değerlendirme

Tüm gruplardan elde edilen toplam 24 adet kıkırdak dokusu %10 formaldehit solüsyonunda fikse edildi ve rutin histolojik değerlendirmelere tabi tutuldu. Yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilen içinde şeffaflaştırıldı ve parafine gömüldü. 24 adet parafin blok elde edildi. Alınan kesitlere Hematoksilen-Eozin (H&E), Masson Trichrom boyaları ve glial fibrilik asit protein (GFAP) immunhistokimyasal çalışması uygulandı. Viabl lakunalarındaki kartilaj hüclerlerinin sitoskeletal komponentini göstermek için glial fibrilik asit protein kullanılmıştır. Yaklaşık 5µm kalınlığında alınan parafin kesitler genel histopatolojik değerlendirilme için hematoksilen ve eozin (H&E) ve Masson trikrom ile boyandı. Hazırlanan preparatlar Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji laboratuvarında aynı patolog tarafından değerlendirildi. Kıkırdak dokusunda kondrosit nükleus sayısı, kartilaj matrix metakromazisi, periferal proliferasyon, fibrozis, vasküler proliferasyon, inflamatuvar değişiklikler ve kemik metaplazisi incelendi. Değerler tüm lam üzerinde semikantitatif olarak değerlendirildi. %0-25 (skor 1), %25-50 (skor 2), %50-75 skor 3) ve %75-100 (skor 4) skorlandı. Kesitlerde GFAP immunoreaktivite derecesi %0-25 (skor 1), %25-50 (skor 2), %50-75 skor 3) ve %75-100 (skor 4) immunboyanma şeklinde değerlendirildi ve skorlandı. Tüm değerlendirmeler gruplar hakkında bilgisi olmayan bir patolog tarafından ışık mikroskobu (Olympus BX-53, Tokyo, Japonya) altında değerlendirildi.

GFAP İmmünhistokimyası:

EPİTOMIC Cambridge, United Kingdom firmasından tedarik edilen; AC-0002A GFAP (EP13) antikoru ile 1:100 antikor dilüsyonu ile 32 dakika Antikor inkübasyonu uygulandı, Antijen Retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ile CC1 32 dakika

Standart protokolü uygulandı. Sekonder görüntüleme için ROCHE/ UltraView Universal DAB Detection Kit ile Standart UltraView IHC Protokolü uygulandı, tüm işlemler ROCHE/Ventana BenchMark XT IHC Stainer (ROCHE/Ventana, Tucson AZ – USA) cihazı üzerinde yapıldı.

3. 3. 3. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism (versiyon 8.0; GraphPad Software, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Verilerin normal dağılım analizinde gruplardan en az birinin normal dağılım göstermediği tespit edildi. Bu sebeple farklı grupların verilerinin gruplar arası analizleri Kruskal-Wallis testini takiben Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi. Grup içi karşılaştırmalarda Mann Whitney testi uygulandı. Kantitatif verilerin ifade edilmesinde ortalama \pm standart sapma (s.s.). $P<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

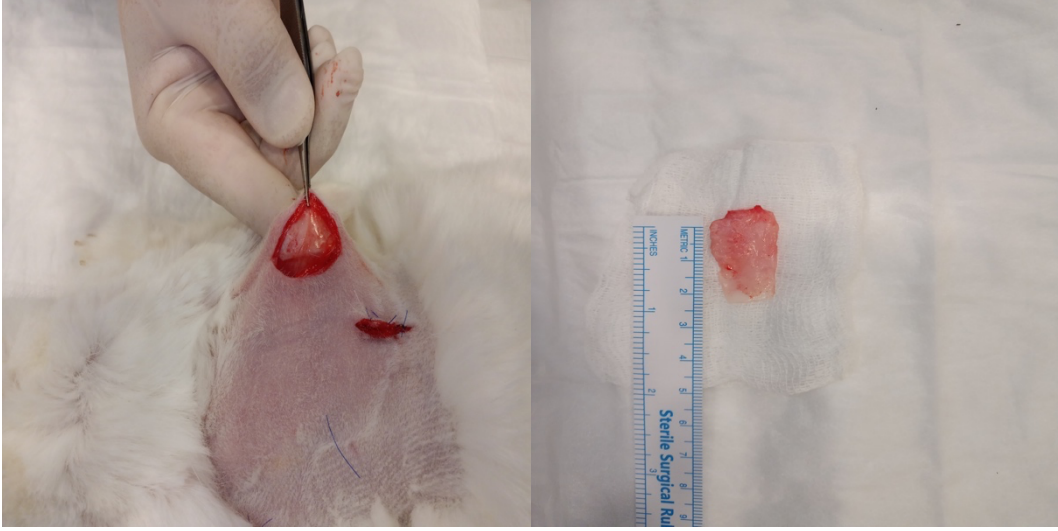
4. 1. Makroskopik Bulgular

Cerrahi işlemden sonra ilk haftada simvastatin grubunda 3 denekte greft alıcı sahada enfeksiyon belirtileri görülmesi üzerine bu hayvanlar çalışma dışı bırakıldı (Resim 4). Bu hayvanların yerine yeni tavşanlar aynı cerrahi prosedürler uygulanarak çalışmaya yeniden dahil edildi. Bu durum haricinde takiplerde deneklerde ve preparatlarda herhangi bir problem ile karşılaşılmadı. 1. ay ve 3. ay sonunda, takibin sona erdirildiği deneklerde kıkırdak dōnor alanının sorunsuz iyileştiği ve kulak kıkırdak desteğinin bozulmadığı görüldü.



Resim 5: Cerrahi işlemi takiben ilk haftada simvastatin grubunda greft alıcı sahada oluşan abse odağı gösterilmektedir.

Greft alıcı saha açıldığı zaman, hem 4 hafta sonra hem de 12 hafta sonra kontrol grubu tavşanlarda kıkırdak greftlerin subdermal bölgede çevre dokuya yapışık olduğu ve yapısal bütünlüğünün bozulmadığı görüldü. Kıkırdak greftlerinde gözle görülür bir rezorbsiyonun olmadığı, doku elastikiyeti ve renginin korunduğu görüldü (Resim 5). Kontrol grubu deneklerde kıkırdak greftleri çevre dokudan rahatlıkla diseke edilebildi. Buna karşın plasebo ve simvastatin gruplarında ise her iki dönemde alınan kontrol örneklerinde kıkırdak greftlerin kısmen rezorbe olduğu, alıcı sahada fibrosiz ve bazı deneklerde lokalize enfeksiyon ve abse formasyonlarının olduğu görüldü.



Resim 6: Kontrol grubunda 4 hafta ve 12 hafta sonra alınan kıkırdak greftler görülmektedir.

4. 2. Histolojik Bulgular

4 hafta sonunda kontrol grubundan alınan örnekler:

Ciddi düzeyde periferik kıkırdak hücre proliferasyonu, sağlıklı kıkırdak hücreleri izlenildi. İnflamatuar hücre infiltrasyonu, vaskülarizasyon görülmedi. Kemik metaplazisi görülmedi (Resim 6,7). Masson-trikrom boyamada fibrozis görülmedi (Resim 8). İmmunohistokimyasal çalışmada ise kuvvetli GFAP (Resim 9) pozitif boyanma gözlemlendi.

4 hafta sonunda plasebo grubundan alınan örnekler:

Bir denekten alınan örnekte periferik kıkırdak hücre proliferasyonu ve sağlıklı kıkırdak hücrelerinde belirgin azalma olduğu görüldü. Yoğun ve şiddetli inflammatuar hücre infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskülarizasyon izlenmedi. İnflamasyon histiyositik hücrelerin ve yer yer gronülom ve dev hücrelerin eşlik ettiği şiddetli aktif kronik inflamasyon tipindedir. Masson-trikrom boyamada orta düzeyde fibrozis, immunohistokimyasal çalışmada ise kuvvetli GFAP pozitif boyanma gözlenmedi.

Diğer denekten alınan örneklerin birinde yoğun ve şiddetli inflammatuar hücre infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskülarizasyon izlenmedi. İnflamasyon histiyositik hücrelerin ve yer yer gronülom ve dev hücrelerin eşlik ettiği şiddetli aktif kronik inflamasyon tipindedir. Kesitlerde rezidü kartilaj dokusu saptanmadı. Kartilaj dokusunun tamamen destrükte olduğu düşünüldü.

Diğerinde ise lenf nodu izlenmedi. Kartilaj dokusu ve/veya kartilaj destrüksiyonu lehine yorumlanabilecek inflamasyon görülmedi.

4 hafta sonunda simvastatin grubundan alınan örnekler:

Deneklerden alınan örneklerin incelemesi şu şekildedir:

1. numune: Periferal kıkırdak hücre proliferasyonu ve sağlıklı kıkırdak hücrelerinde belirgin azlık mevcuttur. Yoğun ve şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskülarizasyon izlendi. İnflamasyon histiyositik hücrelerin ve yer yer gronülom ve dev hücrelerin eşlik ettiği şiddetli aktif kronik inflamasyon tipindedir (Resim 10,11). Masson-trikrom boyamada orta düzeyde fibrozis (Resim 12), immunohistokimyasal çalışmada ise kuvvetli GFAP (Resim 13) pozitif boyanma gözlendi.

2. numune: Yoğun ve şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskülarizasyon izlendi. İnflamasyon histiyositik hücrelerin ve yer yer gronülom ve dev hücrelerin eşlik ettiği şiddetli aktif kronik inflamasyon tipindedir. Kesitlerde rezidü kartilaj dokusu saptanmamıştır. Kartilaj dokusunun tamamen destrükte olduğu düşünüldü.

3. numune: Periferal kıkırdak hücre proliferasyonu ve sağlıklı kıkırdak hücrelerinde belirgin azlık mevcuttur. Yoğun ve şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskülarizasyon izlendi. İnflamasyon histiyositik hücrelerin ve yer yer gronülom ve dev hücrelerin eşlik ettiği şiddetli aktif kronik inflamasyon tipindedir. Masson-trikrom boyamada orta düzeyde fibrozis, immunohistokimyasal çalışmada ise kuvvetli GFAP pozitif boyanma gözlendi.

4. numune: Kas dokusu izlenmiştir. Kartilaj dokusu ve/veya kartilaj destrüksiyonu lehine yorumlanabilecek inflamasyon görülmedi.

12 hafta sonunda kontrol grubundan alınan örnekler:

Ciddi düzeyde periferal kıkırdak hücre proliferasyonu, sağlıklı kıkırdak hücreleri izlendi. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu, vaskülarizasyon görülmedi. Kemik metaplazisi fokal alanda mevcuttur. Masson-trikrom boyamada hafif fibrozis görülmüştür. İmmunohistokimyasal çalışmada ise bir denekten alınan örnekte kuvvetli, diğerinden alınan örnekte zayıf GFAP pozitifliği gözlendi.

12 hafta sonunda plasebo grubundan alınan örnekler:

Kas dokusu izlendi. Kartilaj dokusu ve/veya kartilaj destrüksiyonu lehine yorumlanabilecek inflamasyon görülmedi.

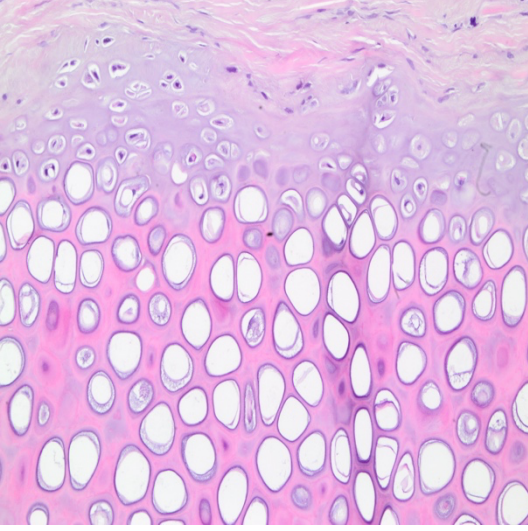
12 hafta sonunda simvastatin grubundan alınan örnekler:

Deneklerden alınan örneklerin incelemesi şu şekildedir:

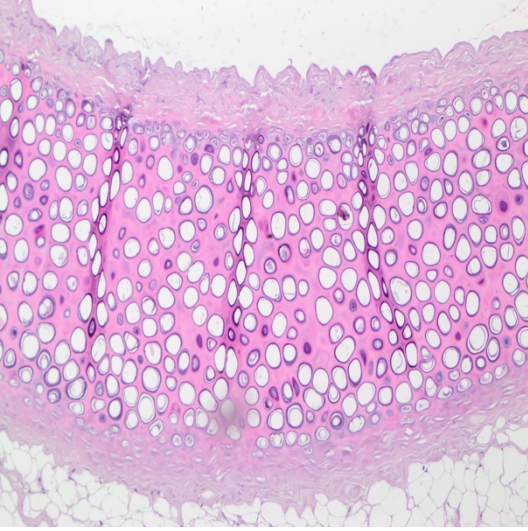
1. numune: Kas dokusu izlendi. Kartilaj dokusu ve/veya kartilaj destrüksiyonu lehine yorumlanabilecek inflamasyon görülmedi.

2. numune: Periferal kıkırdak hücre proliferasyonu ve sağlıklı kıkırdak hücrelerinde belirgin azlık mevcuttur. Yoğun ve şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskülarizasyon izlendi. İnflamasyon histiyositik hücrelerin ve yer yer gronülom ve dev hücrelerin eşlik ettiği şiddetli aktif kronik inflamasyon tipindedir. Masson-trikrom boyamada orta düzeyde fibrozis, immunohistokimyasal çalışmada ise kuvvetli GFAP pozitif boyanma gözlemlendi.

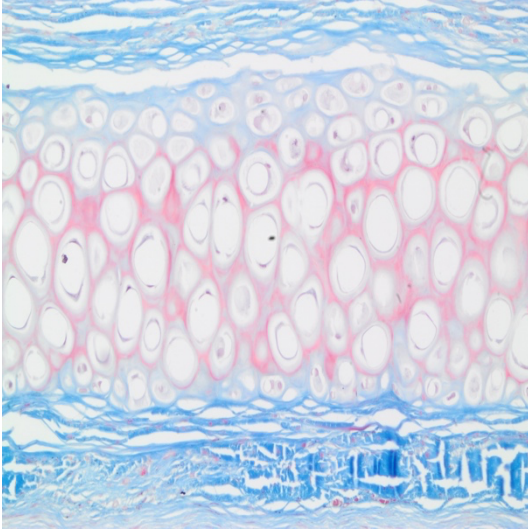
3 ve 4. numuneler: Yoğun ve şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yoğun düzeyde vaskülarizasyon izlendi. İnflamasyon histiyositik hücrelerin ve yer yer gronülom ve dev hücrelerin eşlik ettiği şiddetli aktif kronik inflamasyon tipindedir. Kesitlerde rezidü kartilaj dokusu saptanmamıştır. Kartilaj dokusunun tamamen destrükte olduğu düşünüldü.



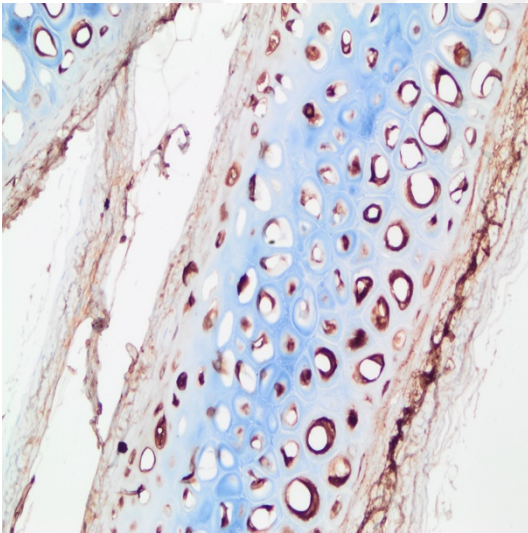
Resim 7: Hasar düzeyi düşük kartilaj dokusunda periferel proliferasyon alanı Hematoksilen eosin görüntüsü (x20)



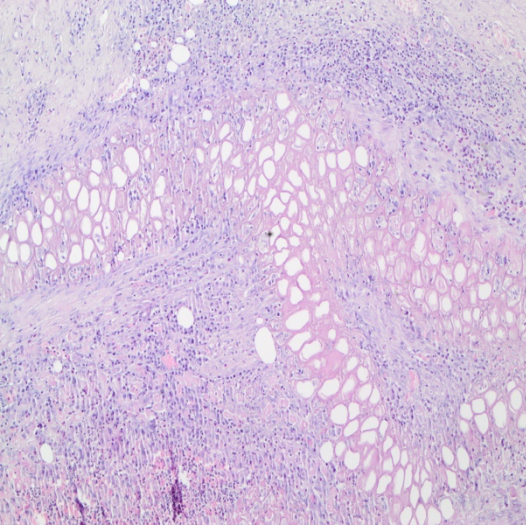
Resim 8: Hasar düzeyi düşük, sağlam yapıda kartilaj dokusu Hematoksilen eosin görüntüsü (x10)



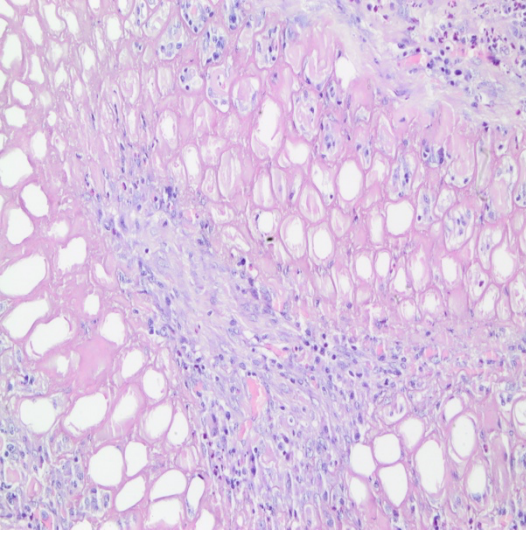
Resim 9: Sağlam kartilaj dokusunda Masson-Trikrom histokimyasal boyaması (x20)



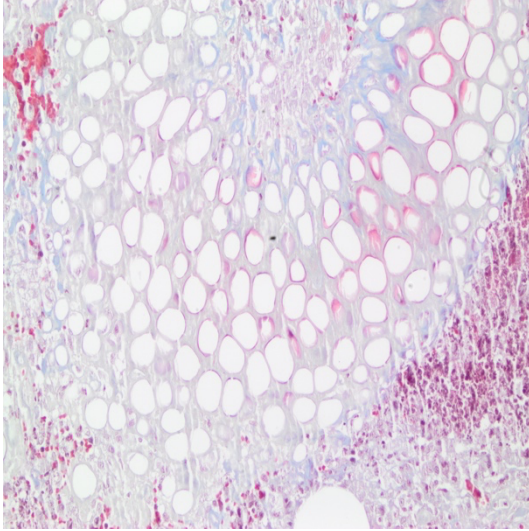
Resim 10: Hasar düzeyi düşük kartilaj dokusunda GFAP immünohistokimyasal boyaması (x20)



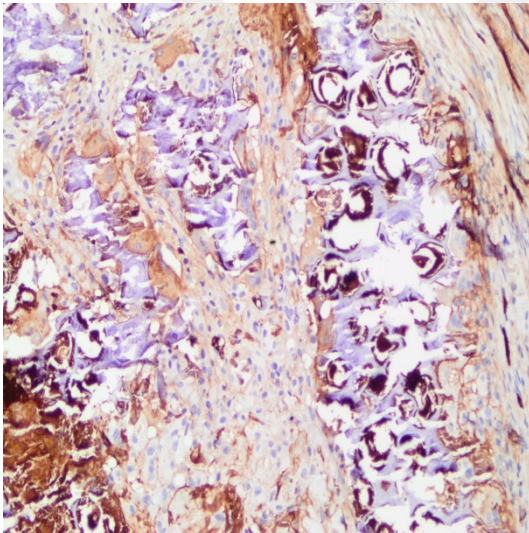
Resim 11: Hasar düzeyi yüksek, yoğun inflamasyon ile destrükte olmuş kartilaj dokusunun Hematoksilen eosin görüntüsü (x10)



Resim 12: Hasar düzeyi yüksek, yoğun inflamasyon ile destrükte olmuş kartilaj dokusunda boş lakünlerin (kondrosit nükleus sayısında düşüş) Hematoksilen eosin görüntüsü (x20)



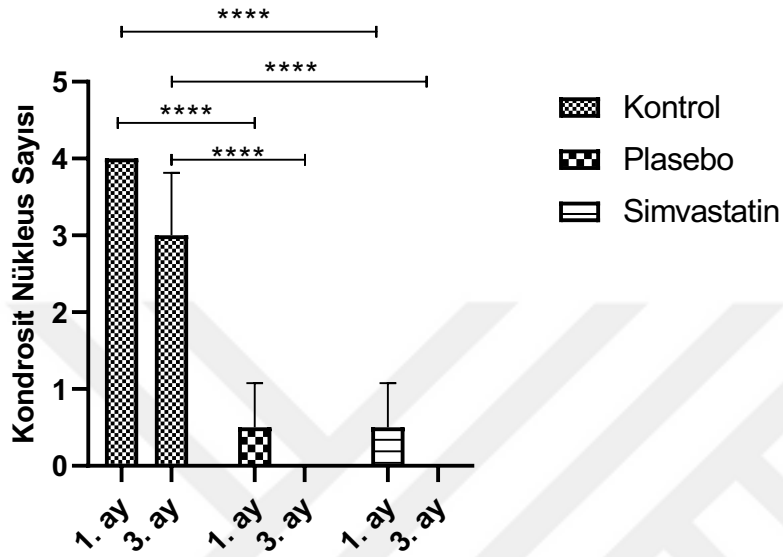
Resim 13: Hasarlı kartilaj dokusunda Masson-Trikrom histokimyasal boyaması (x20)



Resim 14: Hasarlı kartilaj dokusunda GFAP immünhistokimyasal boyaması (x20)

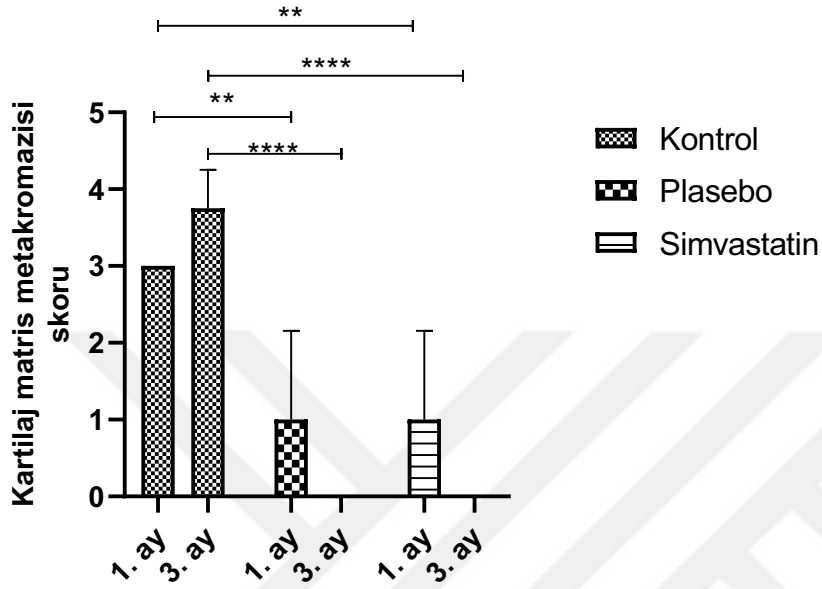
4. 3. İstatistiksel Analiz

Kondrosit nükleus sayıları incelendiğinde hem birinci hem de üçüncü ayda plasebo ve simvastatin grubunda kontrol grubuna kıyasla daha az nükleus sayısı gözlenmiştir (**p <0,001).



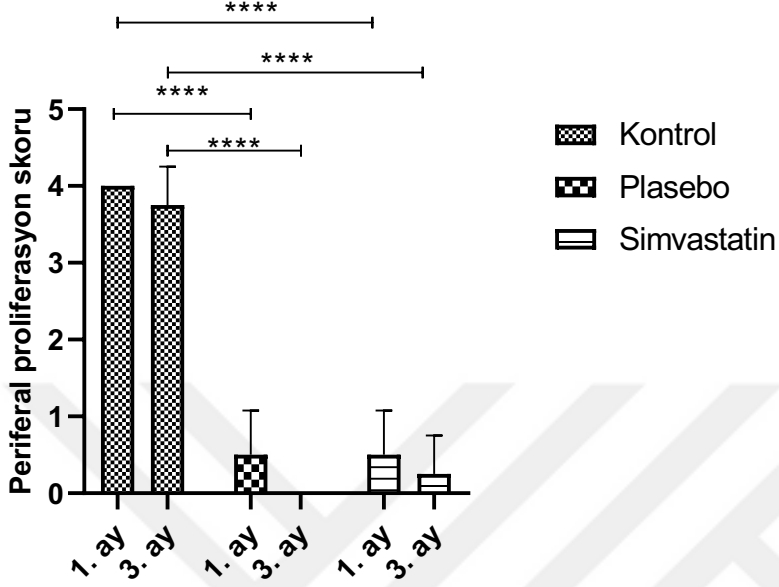
Grafik 1: Gruplar arası kondrosit nükleus sayısı. (****p <0,0001).

Gruplar arası kartilaj matriks metakromazisi skoru karşılaştırdığında, kartilaj matriks metakromazisi skoru hem birinci hem de üçüncü ayda simvastatin ve plasebo gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (birinci ay: $**p < 0,01$ ve üçüncü ay: $****p < 0,0001$).



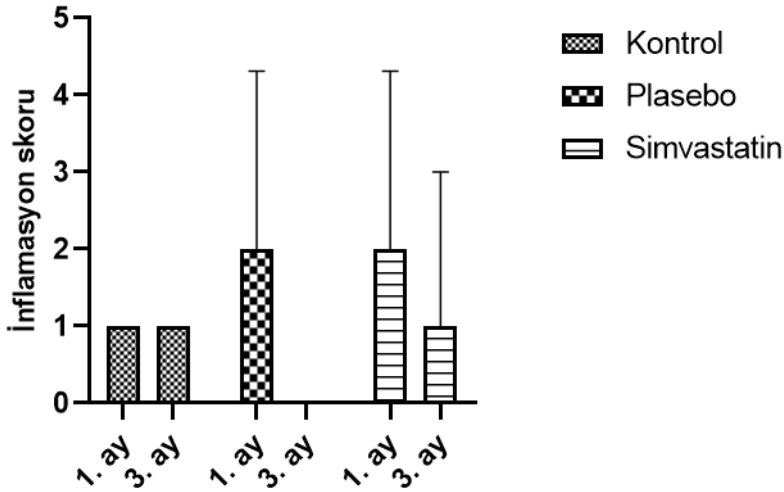
Grafik 2: Gruplar arası kartilaj matriks metokromazisi skoru. ($**p < 0,01$ ve $****p < 0,0001$).

Gruplar arası periferel proliferasyon skoru karşılaştırdığında, periferel proliferasyon skoru hem birinci hem de üçüncü ayda plasebo ve simvastatin grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (****p <0,0001).



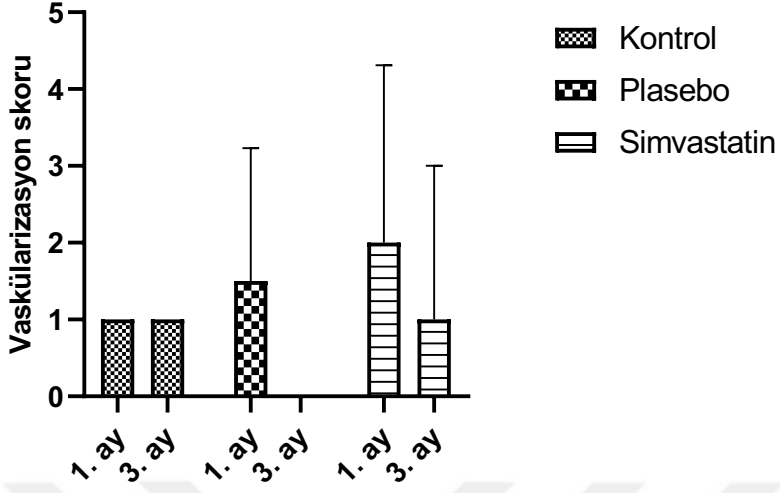
Grafik 3: Gruplar arası periferel proliferasyon skoru. (***p <0,001).

Gruplar arası inflamasyon skoru karşılaştırdığında, inflamasyon tüm gruplarda benzer bulunmuştur.



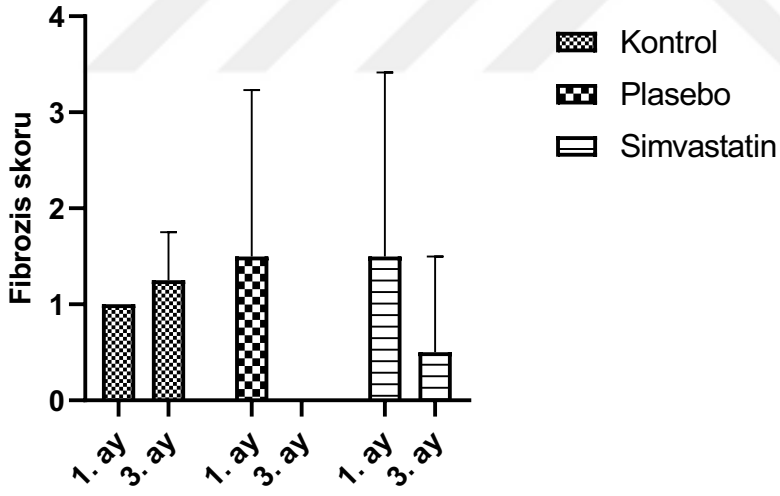
Grafik 4: Gruplar arası inflamasyon skoru.

Vaskülarizasyon skoru incelendiğinde gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır.



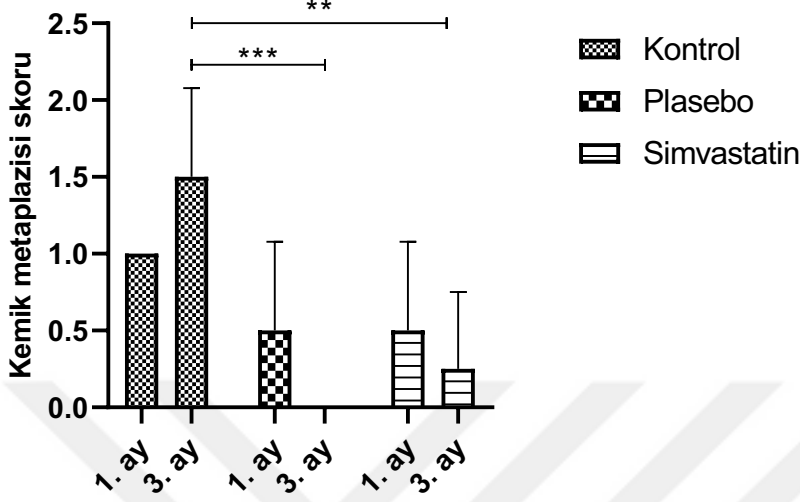
Grafik 5: Gruplar arası vaskülarizasyon skoru.

Fibrozis skoru incelendiğinde gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır.



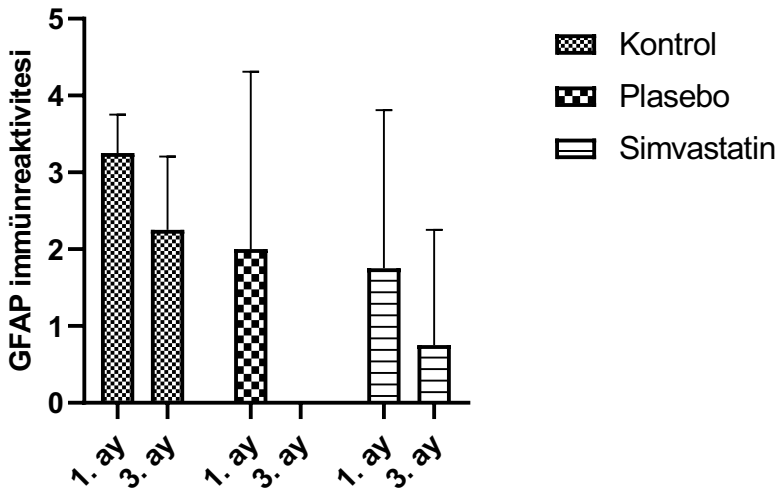
Grafik 6: Gruplar arası fibrozis skoru.

Kemik metaplazisi skorları incelendiğinde üçüncü ayda plasebo ve simvastatin grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (sırasıyla ***p <0,01 ve **p <0,01).



Grafik 7: Gruplar arası kemik metaplazisi skoru.

GFAP immünreaktivitesi skorları incelendiğinde gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır.



Grafik 8: Gruplar arası kemik GFAP immünreaktivitesi skoru.

5. TARTIŞMA

Kıkırdak greftleri; estetik burun ameliyatları, konjenital ya da edinsel burun deformitelerinin düzeltilmesi, mikrotia ve diğer kulak deformitelerinin rekonstrüksiyonu, temporomandibuler eklem ankilozunun tedavisi ve kraniofasyal bölgedeki defekt onarımı gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kıkırdak doku gerektiren deformitelerin rekonstrüksiyonu için otolog dokular, allogreftler, alloplastik implantlar kullanılabilir. Alternatif kaynakların uygulanmasındaki en büyük endişe, allojenik ve ksenojenik hücre ve dokularda bulunan ilgili immünojenisite riski olmuştur. Bununla birlikte, otolog onarım teknikleri immünolojik endişeleri ortadan kaldırdığı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca allojenik kıkırdak greftlerinde dokuda skarlaşma ve greftler ile hastalık taşınması riski mevcuttur (Revell & Athanasiou, 2009). Bu nedenlerden ötürü otolog greftler günümüzde yaygın kullanım alanına sahiptirler. Ancak otolog kıkırdak greftlerinde öngörülemez oranlarda rezorbsiyon görülebilmekte ve bu durum uzun dönemde istenmeyen sonuçlara yol açabilmektedir. Bu çalışmada, simvastatinin jel formatının kıkırdak grefti sağ kalımı üzerine olan etkisi incelendi.

Kıkırdak greft sağ kalımı çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan deney modeli tavşandır (Bulam et al., 2015). Tavşanlarda, insana benzer şekilde kıkırdak greft kaynağı olarak septal, kostal ve auriküler kıkırdaklar kullanılabilir. Literatüre baktığımızda insan ve tavşanlarda yapılan çalışmalarda bu alanlardan alınan kıkırdak greftleri sağ kalımı üzerinde anlamlı fark görülmemiştir (Buyuklu et al., 2011; Hizal et al., 2011). Çalışmada yeterli miktarda kıkırdağa ulaşmamızı mümkün kıldığı için ve oluşacak donör saha morbiditesi daha az olacağı için donör kıkırdak olarak kulak kıkırdağı tercih edildi. Greft alıcı alan olarak ise daha önce yapılan çalışmalarda sıkça kullanılan ve alınan kıkırdak greftlerinin yerleşebileceği kadar yeterli hacim imkanı sağlayan sırt bölgesi tercih edildi. Sırtta kıkırdak greftlerinin yerleştirildiği ceplerin arasında yeterince uzaklık olmasına dikkat edildi ve böylece ceplerin sonradan birbiri ile iştirakli olma olasılığı engellendi.

Literatürde yer alan kıkırdak greft çalışmalarında genellikle 8 haftalık takip süresi yapılmaktadır (Firat et al., 2011; Orbay et al., 2012; Ozturk & Aydın, 2013). Zalzal ve arkadaşları yayınladıkları çalışmada kıkırdak greftleri için 8 hafta ve 16 hafta gözlem süreleri sonuçları arasında anlamlı fark bulmadıklarını bildirmişlerdir (Zalzal et al., 1986). Özdemir tavşanlarda yaptığı çalışmada kıkırdak greftlerinde 56. gün ile 90. günler arasında histokimyasal ve immünohistokimyasal anlamlı farklar bulması nedeni ile takip süresinin

minimum 90 gün olması gerektiğini belirtmiştir (H., 2008). Tarhan ve arkadaşları tavşanlarda greftler üzerine yapmış olduğu çalışmada 4, 8, 12 ve 16 haftalık takip süreleri kullanmışlardır (Tarhan et al., 2008). Bizim çalışmamızda net sonuçlar elde etmek adına literatürdeki benzer çalışmalar göz önünde bulundurularak kıkırdak greftlerinin yarısı 4 hafta, yarısı 12 hafta süre ile takip edildi.

Kıkırdak greftleri, dokuya destek amaçlı olarak kullanıldığı rekonstrüksiyon cerrahisinde daha çok blok halinde kullanılmaktadır. Mekanik kuvvetlere maruz kalma kıkırdak greft sağ kalımında azalmaya neden olabilmektedir. Çakmak ve arkadaşlarının tavşan kıkırdak grefti üzerine yapmış olduğu çalışmada kıkırdak greftlerinin ciddi şekilde ezilmesinin yaygın nekroza ve hacimde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Çakmak et al., 2005). Yine başka bir çalışmada kıkırdak greftleri bütünlüğünü bozan işlemlerin (ezme, kıyma) greft sağ kalımı üzerinde olumsuz etki yaptığı belirtilmiştir (Kaya, 2019). Bu nedenle çalışmamızda mekanik kuvvetlerin greft sağ kalımı üzerindeki etki durumunu ortadan kaldırmak, tek bir değişkenin greft sağ kalımı üzerine olan etkisini gözlemlemek amacı ile tüm kıkırdak greftleri blok halinde kullanılmıştır.

Kıkırdak greftleri klinik olarak birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle kıkırdak greftlerinin sağ kalımını arttırmaya yönelik bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Yağ dokusu kaynaklı kök hücreleri (Orbay et al., 2012), konsantre edilmiş büyüme faktörü (Topkara et al., 2016), plateletten zengin fibrin (Göral et al., 2016) gibi biyolojik faktörlerin uygulanması sonucunda kıkırdak greft viabilitesinin arttığı gösterilmiştir.

Tüm bu çalışmaların yanında literatürde kıkırdak greft sağ kalımı için yapılan ancak olumsuz sonuçlanan bazı çalışmalar da yer almaktadır. Cemal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Surgicell (Ethicon, Somerville, NJ) ya da fasyaya sarılmayan kıkırdak greftlerin sağ kalımının daha fazla olduğu tespit edilmiş (Firat et al., 2011). Kazıkdaş ve arkadaşlarının tavşan kıkırdak greftlerinde yapmış olduğu bir çalışmada oksitlenmiş rejenere selülöz (Surgicell) ile sarılan kıkırdaklarda sağ kalımın azaldığı, kondroblastların rejenere olma kabiliyetlerinin düştüğü ve fibröz formasyonunun arttığı belirtilmiştir (Kazıkdaş et al., 2007). Yine başka bir çalışmada fasyaya sarılmış ve doğranmış kıkırdaklarda rezorbsiyonun tek parça blok halindeki kıkırdak greftlere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (Fatemi et al., 2012).

Literatüre bakıldığında kıkırdak grefti sağ kalımı değerlendirilmesi için birtakım parametreler kullanılmıştır. Bulam, Ayhan ve arkadaşları tavşan kıkırdak greftlerinde sağ

kalımı değerlendirirken ağırlık kaybını değerlendirmişlerdir (Bulam et al., 2015). Çakmak ve arkadaşları ise yaptığı çalışmada matriks metakromazisi, lakunalarındaki kondrosit nuleus kaybı ve fibrosiz bakmışlardır (Cakmak et al., 2005). Viabl lakunalarındaki kartilaj hüclerlerinin sitoskeletal komponentini göstermek için glial fibrilik asit protein kullanılmıştır (Orbay et al., 2012). Çalışmamızda ağırlık ve boyut değişimi kullanılmamıştır. Bunun nedeni plasebo ve simvastatin gruplarından alınan kontrol örneklerinde kıyaslanabilir ve sağlıklı, bütünlüğü korunmuş kırık grefti bulunmamasıdır.

Çalışmanın sonucunda kondrosit nükleus sayısı, kartilaj matriks kromazisi ve periferel proliferasyon kontrol grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunurken; inflamasyon, vaskularizasyon, fibrosiz ve GFAP immünreaktivite skoru açısından gruplar arası anlamlı fark bulunmamıştır. Bununla birlikte kemik metaplazisi skoru 3. ayda kontrol grubunda plasebo ve simvastatin grubundan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır.

Literatürde simvastatinin kırık grefti sağ kalımı üzerine etkisini araştıran çalışma bulunmamakla beraber yara iyileşmesi ve başka doku sağ kalımları üzerine etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur. Asai ve arkadaşları; topikal simvastatinin, diabetik farelerde lenfanjiogenez ve anjiogenez aracılığı ile yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermiştir (Asai et al., 2012). Stein ve arkadaşları ratlarda yapmış olduğu çalışmada simvastatinin kemik iyileşmesi arttırdığını ve inflamasyonu azalttığı göstermiştir (Stein et al., 2005). Hao ve arkadaşları simvastatinin enjekte edilebilir formunun minimal invaziv periostal distraksiyon uygulanan ratlarda kemik formasyonunun inflamasyon olmadan arttırdığı gösterilmiştir (Hao et al., 2018). Otuki ve arkadaşları farelerde yaptığı çalışmada ise simvastatinin topikal uygulamasının, kroton yağının neden olduğu akut tahriş edici kontakt dermatitte antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Otuki et al., 2006).

Statinler sistemik olarak kullanıldığı zaman hepatobilier sistem, muskuler sistem gibi birçok sistem üzerine yan etki oluşturabilecek ilaçlardır. Uzun süreli kullanımda bu risklerin ortaya çıkma ihtimali artmaktadır. Ayrıca ilk geçiş eliminasyonu yüksek olup, sistemik kullanımda yarı ömrü 2-5 saattir (Neuvonen et al., 2008). Çalışmamızda bu olası yan etkilerin önüne geçmek, simvastatinin kırık greftlerine etki süresini mümkün olduğunca uzatmak ve işlemi tekrarlamadan uygulanabilirliğini kolaylaştırmak adına simvastatin jel formatında kullanılmıştır.

Literatürde yer alan çalışmalar ile bizim çalışmamız sonuçları arasında bazı benzerlikler ve farklılıklar bulunmaktadır. Bernard ve arkadaşları farelerde yapmış olduğu çalışmada deneysel olarak oluşturulan artritlerde simvastatinin inflamasyonu baskıladığını göstermişlerdir (Leung et al., 2003). Mörsdorf ve arkadaşları farelerde iskemik flep modellerinde yaptığı çalışmada simvastatin uygulanan hayvanlarda yeni damar oluşumları gözlemlemiştir (Mörsdorf et al., 2009). Bizim çalışmamızda her üç grup arasında inflamasyon, fibrosiz ve vaskularizasyon açısından anlamlı fark saptanmadı. Ancak çalışmamızdaki bu değişikliklerin simvastatinin kendi etkisi ile değil de oluşan kronik enfeksiyona bağlı olarak meydana gelen değişiklikler olduğu düşünülmektedir.

Kontrol grubunda kıkırdak greft sağ kalımının devam etmesine rağmen, diğer gruplarda kıkırdak greftlerinin tama yakın rezorbsiyona uğraması enfeksiyon, jelin kıkırdak grefti çevresinde inflamasyonu tetiklemesi ya da jel tabakanın kıkırdak greft çevresinde difüzyonu engelleyerek greft beslenmesine engel olabilmesi nedeniyle olabilir. Bu durum, bahsettiğimiz sebeplerden biri ya da hepsinin kümülatif etkisi sonucu oluşabilir. Deneklerde takip süresince enfeksiyonu düşündürecek bulgular yoktu. Plasebo grubu ve simvastatin grubu jellerden deney öncesi alınan numuneler ile örneklerde üreme tespit edilmemiştir (Resim 15). Cerrahi işlem sırasında sterilizasyon koşullarına dikkat edilmesine rağmen plasebo grubu ve simvastatin grubunda mikro enfeksiyon odaklarının yaygın olarak görülmesinin nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Deney süresi sonunda kıkırdak greftlerinin alınması için alıcı saha incelendiğinde küçük, sınırlı abse odaklarının görüldü (Resim 5). Deney takip süresi o denek için sonlandırılacağı ve denekte klinik bulgu olmaması sebebi ile görülen abse odaklarından kültür örneği alınmadı. Jel canlı için yabancı bir madde olması nedeni ile inflamasyonu tetikleyebilir. Ancak istatistik sonuçlarına göre her üç grupta inflamasyon arasında anlamlı fark bulunmaması bu ihtimali geri planda bırakmaktadır. Bununla birlikte jel deneklerde inflamasyon şiddeti düşük olan kronik inflamasyona neden olabilir ve bu nedenle gruplar arasında anlamlı fark olmayabilir. Patoloji örneklerinde kronik inflamasyon görülmesi bu durumu destekler niteliktedir. Bildiğimiz kadarıyla kıkırdak greft çevresi yapı kalınlığının, kıkırdak greft ile çevre doku arasındaki difüzyonuna nasıl etki ettiği ile ilgili bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Greft çevresi zarf kalınlığı kadar greft kalınlığı da difüzyon üzerinde etkilidir. Kıkırdak dokunun oksijen difüzyon katsayısı diğer dokulara göre daha düşüktür (Androjna et al., 2008). Bu durum hem greftin kendi kalınlığının hem de çevre doku kalınlığının kıkırdak doku beslenmesinde önemli olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak simvastatinin kıkırdak grefti üzerine öngörülen etkisi çalışmamızda görülmemiştir. Ancak bildiğimiz kadarıyla daha önce simvastatinin jel formunun kıkırdak sağ kalımına etkisini değerlendirecek çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamız bundan sonra konu ile ilgili yapılacak çalışmalar için fikir verici bir çalışma niteliğindedir.





SFA ARGE
VE ÖZEL SAĞLIK HİZMETLERİ LTD ŞTİ
Sanayi Mah. Teknopark Bulvarı No:1/3a/Z01 Pendik İstanbul
TEL: 0216 504 81 82 E-MAIL: info@sfaerge.com

ANALİZ SERTİFİKASI / ANALYSIS CERTIFICATE

Sertifika Numarası / Certificate Number : ASY23000037

Sertifika Tarihi / Date of Certificate: 11.05.2023

Ürün Adı / Sample Name : Simvastatin Jel Çalışması

Üretim-Seri Numarası / Production-Serial Number: SFA/3504

ÜTT-SKT / PD-ED : 29.11.2022 /-

Ambalaj / Packing - Miktar / Amount : Steril Kap

Ürün Saklama Koşulları / Product Storage Conditions : Oda Sıcaklığı / Room Temperature

Ürün Analiz Rapor Numarası / Product Analysis Report Number : SFAA220165

Analiz Sonuçları / Results of Analysis				
Analiz / Analysis	Metot / Method	Sonuç / Result	Birim / Unit	Spesifikasyon / Specification
Aerobik Mezofilik Koloni Sayımı* / Enumeration of Aerobic Mesophilic Bacteria	TS EN ISO 21149	<10	Kob/g-ml cfu/g-ml	Uygun/Pass
Toplam Küf Maya Sayımı* / Enumeration Of Total Yeast And Mould	TS EN ISO 16212	<10	Kob/g-ml cfu/g-ml	Uygun/Pass
S aureus Aranması* / Detection of S.aureus	TS EN ISO 22718	Tespit Edilmedi / Not Detected	-	Uygun/Pass
Pseudomonas aeruginosa Aranması* / Detection of P.aeruginosa	TS EN ISO 22717	Tespit Edilmedi / Not Detected	-	Uygun/Pass
Candida albicans Aranması* / Detection of Candida albicans	TS EN ISO 18416	Tespit Edilmedi / Not Detected	-	Uygun/Pass
E.coli Aranması* / Detection of E.coli	TS EN ISO 21150	Tespit Edilmedi / Not Detected	-	Uygun/Pass

Açıklamalar / Commentary

1. Bu analiz sertifikası sadece bu ürüne aittir / This analysis certificate belongs only to this product.
2. İmzasız analiz sertifikası geçersizdir / Unsigned analysis certificate is invalid.
3. Ek Açıklamalar

Onay / Seal
Cem Emre ÇELİK
CR-GE Planlama Teknik
Müdürü
/P&D Planning Technical
Manager

SFA ARGE VE ÖZEL SAĞLIK HİZMETLERİ LTD. ŞTİ.
Sanayi Mah. Teknopark Bulvarı No:1/3a/Z01
SFA ARGE Pendik/İSTANBUL, Tel:0216 504 81 82
www.sfaerge.com info@sfaerge.com

Resim 15: Plesebo ve simvastatin grubu için hazırlanan jel örneklerinden gönderilen kültür örneği sonuç belgesi

6. SONUÇ

Bu çalışmada simvastatinin jel formunun kıkırdak greft sağ kalımı üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda kıkırdak greft sağ kalımı, simvastatin ve plasebo grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az bulunmuştur. Simvastatinin kıkırdak greft çevresi dokuda inflamasyon, fibrosiz ve vaskularizasyonu anlamlı derecede değiştirmediği görülmüstür. Ancak bu durumun simvastatinin sadece kendi etkisi ile değil; enfeksiyon ve çevre dokuda tetiklenen kronik inflamasyonun, simvastatinin karşıt etkileri ile dengelenmesi sonucunda oluştuğu düşünülmektedir.

Simvastatin jel formunun kıkırdak greftler üzerine etkisini araştıran muhtemel ilk çalışma olması nedeniyle, çalışmamızın bu alanda yapılacak olan diğer çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.



7. KAYNAKÇA

Aktas, E., Sener, E., & Gocun, P. U. (2011). Mechanically induced experimental knee osteoarthritis benefits from anti-inflammatory and immunomodulatory properties of simvastatin via inhibition of matrix metalloproteinase-3. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 12, 145-151.

Amin, A. R., Dave, M., Attur, M., & Abramson, S. B. (2000). COX-2, NO, and cartilage damage and repair. *Current rheumatology reports*, 2(6), 447-453.

Androjna, C., Gatica, J. E., Belovich, J. M., & Derwin, K. A. (2008). Oxygen diffusion through natural extracellular matrices: implications for estimating "critical thickness" values in tendon tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 14(4), 559-569.

Asai, J., Takenaka, H., Hirakawa, S., Sakabe, J.-i., Hagura, A., Kishimoto, S., Maruyama, K., Kajiya, K., Kinoshita, S., & Tokura, Y. (2012). Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *The American journal of pathology*, 181(6), 2217-2224.

Bertram G. Katzung, M., PhD. (2016). *Temel ve Klinik Farmakoloji* (Vol. Dislipidemide Kullanılan İlaçlar). Nobel Tıp Kitapevi.

Bulam, H., Ayhan, S., Yilmaz, G., Sezgin, B., Sibar, S., Tuncer, S., Findikcioglu, K., & Latifoglu, O. (2015). The effect of subcutaneous platelet-rich plasma injection on viability of auricular cartilage grafts. *Journal of Craniofacial Surgery*, 26(5), 1495-1499.

Buyuklu, F., Hizal, E., Yilmaz, Z., Sahin, F. I., & Cakmak, O. (2011). Viability of crushed human auricular and costal cartilage chondrocytes in cell culture. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 39(3), 221-225.

Cakmak, O., Bircan, S., Buyuklu, F., Tuncer, I., Dal, T., & Ozluoglu, L. N. (2005). Viability of crushed and diced cartilage grafts. *Archives of facial plastic surgery*.

Calvert, J. W., Brenner, K., DaCosta-Iyer, M., Evans, G. R., & Daniel, R. K. (2006). Histological analysis of human diced cartilage grafts. *Plastic and reconstructive surgery*, *118*(1), 230-236.

Caplan, A. I. (1984). Cartilage. *Scientific American*, *251*(4), 84-97.

Chang, L.-R., Marston, G., & Martin, A. (2021). Anatomy, cartilage. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Daniel, R. K., & Calvert, J. W. (2004). Diced cartilage grafts in rhinoplasty surgery. *Plastic and reconstructive surgery*, *113*(7), 2156-2171.

Engkvist, O., & Johansson, S. H. (1980). Perichondrial arthroplasty. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, *14*(1), 71-87.

Erol, Ö. O. (2000). The Turkish delight: a pliable graft for rhinoplasty. *Plastic and reconstructive surgery*, *105*(6), 2229-2241.

Eşrefoğlu, M. (2009). *Genel Histoloji* (Vol. Kıkırdak Dokusu). Medipres Yayınevi.

Fatemi, M. J., Hasani, M. E., Rahimian, S., Bateni, H., Pedram, M., & Mousavi, S. J. (2012). Survival of block and fascial-wrapped diced cartilage grafts: an experimental study in rabbits. *Annals of plastic surgery*, *69*(3), 326-330.

Firat, C., Gurlek, A., & Aydn, N. E. (2011). Viability of cartilage grafts in various forms. *Journal of Craniofacial Surgery*, *22*(5), 1666-1670.

Ginsberg, H., Le, N., Short, M., Ramakrishnan, R., & Desnick, R. (1987). Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin. Implications for regulation of apolipoprotein B synthesis. *The Journal of clinical investigation*, *80*(6), 1692-1697.

Göral, A., Aslan, C., Bolat Küçükzeybek, B., Işık, D., Hoşnuter, M., & Durgun, M. (2016). Platelet-rich fibrin improves the viability of diced cartilage grafts in a rabbit model. *Aesthetic Surgery Journal*, *36*(4), NP153-NP162.

Guenther, H., Guenther, H. E., Froesch, E., & Fleisch, H. (1982). Effect of insulin-like growth factor on collagen and glycosaminoglycan synthesis by rabbit articular chondrocytes in culture. *Experientia*, 38(8), 979-981.

Gupta, S., Del Fabbro, M., & Chang, J. (2019). The impact of simvastatin intervention on the healing of bone, soft tissue, and TMJ cartilage in dentistry: a systematic review and meta-analysis. *International journal of implant dentistry*, 5(1), 1-11.

Güler, I., Billur, D., Aydın, S., & Kocatürk, S. (2015). Efficacy of platelet-rich fibrin matrix on viability of diced cartilage grafts in a rabbit model. *The Laryngoscope*, 125(3), E104-E111.

H., Ö. (2008). *Oksidize rejenere selüloz, otojen fasya ve aselüler dermal matrikse sarılı kıyılmış kıkırdak greftlerinin incelemesi: Tavşanlarda deneysel çalışma (Uzmanlık tezi)*.

Haberal Can, İ., Atilla, P., Çakar, A. N., & Önerci, M. (2008). An animal study on cartilage healing using auricular cartilage as a model. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 265, 307-311.

Hao, J., Chou, J., Kuroda, S., Otsuka, M., Kasugai, S., & Lang, N. P. (2018). Injectable simvastatin gel for minimally invasive periosteal distraction: In vitro and in vivo studies in rat. *Clinical oral implants research*, 29(2), 227-234.

Hizal, E., Buyuklu, F., Ozer, O., & Cakmak, O. (2011). Effects of different levels of crushing on the viability of rabbit costal and nasal septal cartilages. *Plastic and reconstructive surgery*, 128(5), 1045-1051.

Joyce, M. E., Roberts, A. B., Sporn, M. B., & Bolander, M. E. (1990). Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *The Journal of cell biology*, 110(6), 2195-2207.

Kaya, Z. (2019). Botulinum toksin Tip-Anın blok, ezilmiş ve kıyılmış kıkırdak grefti sağ kalımı üzerine etkisinin değerlendirilmesi: Deneysel çalışma.

Kazıkdas, K. C., Ergur, B., Tugyan, K., Guneli, E., Kaya, D., & Sahan, M. (2007). Viability of crushed and diced cartilage grafts wrapped in oxidized regenerated cellulose and esterified hyaluronic acid: an experimental study. *The Laryngoscope*, 117(10), 1728-1734.

Kramer, J., Bartsch, M., Krug, D., Klinger, M., Nitschke, M., & Rohwedel, J. (2012). Simvastatin modulates mouse embryonic stem cell-derived chondrogenesis in vitro. *Toxicology In Vitro*, 26(7), 1170-1176.

Laurence L. Brunton, P., Björn C. Knollmann, MD, PhD. (2023). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [14 ed.]*. McGraw Hill / Medical Books.

Leung, B. P., Sattar, N., Crilly, A., Prach, M., McCarey, D. W., Payne, H., Madhok, R., Campbell, C., Gracie, J. A., & Liew, F. Y. (2003). A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis. *The Journal of Immunology*, 170(3), 1524-1530.

Marin, V. P., Landecker, A., & Gunter, J. P. (2008). Harvesting rib cartilage grafts for secondary rhinoplasty. *Plastic and reconstructive surgery*, 121(4), 1442-1448.

Maron, D. J., Fazio, S., & Linton, M. F. (2000). Current perspectives on statins. *Circulation*, 101(2), 207-213.

Mehrotra, D., & Sidebottom, A. J. (2017). Management of ankylosis of the temporomandibular joint. In *Maxillofacial Surgery* (pp. 1502-1517). Elsevier.

Mescher, A. L. (2021). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. McGraw Hill. Books.

Mörsdorf, P., Bächle, A., Amon, M., Schramm, R., Rezaeian, F., Vollmar, B., Harder, Y., & Menger, M. (2009). Simvastatin reduces ischemia-induced inflammation and stimulates neovascularisation of critically perfused flaps. *Chirurgisches Forum und DGAV Forum 2009*,

Nahian, A., & Sapro, A. (2022). Histology, Chondrocytes. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Neuvonen, P. J., Backman, J. T., & Niemi, M. (2008). Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. *Clinical pharmacokinetics*, 47, 463-474.

Olshinka, A., Louis, M., & Truong, T. A. (2017). Autologous ear reconstruction. *Seminars in plastic surgery*,

Orbay, H., Tobita, M., Hyakusoku, H., & Mizuno, H. (2012). Effects of adipose-derived stem cells on improving the viability of diced cartilage grafts. *Plastic and reconstructive surgery*, 129(2), 369-377.

Otuki, M. F., Pietrovski, E. F., & Cabrini, D. A. (2006). Topical simvastatin: preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. *Journal of dermatological science*, 44(1), 45-47.

Ozturk, M., & Aydin, O. (2013). Use of diced cartilage grafts wrapped with amniotic membrane in soft tissue augmentation: experimental study. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 122(1), 66-70.

Pan, B., Jiang, H., Guo, D., Huang, C., Hu, S., & Zhuang, H. (2008). Microtia: ear reconstruction using tissue expander and autogenous costal cartilage. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 61, S98-S103.

Pastacaldi, P., & Engkvist, O. (1979). Perichondrial wrist arthroplasty in rheumatoid patients. *The Hand*, 11(2), 184-190.

Pearl, R. A., & Sabbagh, W. (2011). Reconstruction following traumatic partial amputation of the ear. *Plastic and reconstructive surgery*, 127(2), 621-629.

Pedersen, T. R., & Tobert, J. A. (2004). Simvastatin: a review. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(12), 2583-2596.

Pettipher, E. R., Higgs, G. A., & Henderson, B. (1986). Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8749-8753.

Revell, C. M., & Athanasiou, K. A. (2009). Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 15(1), 1-15.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2016). *Histology A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Santoni-Rugiu, P., & Sykes, P. J. (2007). *A History of Plastic Surgery*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Schachter, M. (2005). Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental & clinical pharmacology*, 19(1), 117-125.

Skoog, T., Ohlséan, L., & Sohn, S. A. (1972). Perichondrial potential for cartilagenous regeneration. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 6(2), 123-125.

Stein, D., Lee, Y., Schmid, M. J., Killpack, B., Genrich, M. A., Narayana, N., Cullen, D. M., Reinhardt, R. A., & Marx, D. B. (2005). Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *Journal of periodontology*, 76(11), 1861-1870.

Suh, J.-K., Scherping, S., Mardi, T., Steadman, J. R., & Woo, S. L. (1995). Basic science of articular cartilage injury and repair. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 3(2), 78-86.

Tarhan, E., Cakmak, O., Ozdemir, B. H., Akdogan, V., & Suren, D. (2008). Comparison of AlloDerm, fat, fascia, cartilage, and dermal grafts in rabbits. *Archives of facial plastic surgery*.

Tobert, J. A. (2003). Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature reviews Drug discovery*, 2(7), 517-526.

Topkara, A., Özkan, A., Özcan, R. H., Öksüz, M., & Akbulut, M. (2016). Effect of concentrated growth factor on survival of diced cartilage graft. *Aesthetic Surgery Journal*, 36(10), 1176-1187.

Tyler, J. A. (1989). Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochemical Journal*, 260(2), 543-548.

Ward, N. C., Watts, G. F., & Eckel, R. H. (2019). Statin toxicity: mechanistic insights and clinical implications. *Circulation research*, 124(2), 328-350.

Zalzal, G. H., Cotton, R. T., & McAdams, A. J. (1986). Cartilage grafts—present status. *Head & neck surgery*, 8(5), 363-374.

Zhu, J., Tan, J., Zhang, C., Jia, J., Leng, H., Xu, Y., & Song, C. (2021). Single Intraosseous Simvastatin Application Induces Endothelial Progenitor Cell Mobilization and Therapeutic Angiogenesis in a Diabetic Hindlimb Ischemia Rat Model. *Plastic and reconstructive surgery*, *148*(6), 936e-945e.

