

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF
VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Erol BENLİER

**KIKIRDAK GREFT RESORBSİYONUNUN
DOKSİSİKLİN KULLANIMI İLE AZALTILMASI**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Serkan BALTA

EDİRNE – 2012

TEŞEKKÜR

Asistanı olmaktan gurur duyduğum, uzmanlık eğitimimde büyük emeği olan Anabilim Dalı Başkanımız ve tez danışman hocam Sn. Doç. Dr. Erol Benlier başta olmak üzere, tecrübesi ve engin hoşgörüsü ile benden desteğini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Hüsamettin TOP'a, tezimdaki emeklerinden dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına, asistanlık dönemimde birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve klinik çalışanlarına teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
KIKIRDAK DOKUSU GENEL YAPISI	3
MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR	8
DOKSİSİKLİN	13
GEREÇ VE YÖNTEMLER	16
BULGULAR	27
TARTIŞMA	32
SONUÇLAR	36
ÖZET	37
SUMMARY	39
KAYNAKLAR	41
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µm	: Mikrometre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksribonükleik asid
ECM	: Extracellular matrix
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
mm²	: Milimetrekare
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MT-MMP	: Membran-tipi matriks metalloproteinazı
PCNA	: Prolifere hücre nükleer antijeni
TIMP	: Tissue inhibitor matrix metalloproteinases (Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü)
TUNEL	:Terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUTP – biotin nick endlabeling

GİRİŞ VE AMAÇ

Kıkırdak doku, yumuşak dokuyu desteklemek amacıyla özelleşmiş olan bir bağ dokusu olup rekonstrüktif ve estetik cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu doku plastik cerrahi alanında başta fonksiyonel septorinoplasti ve doğumsal kulak yokluğu (mikrotia) onarımı başta olmak üzere mentoplasti, kranioplasti gibi birçok operasyonda destek materyali olarak kullanılmaktadır. Kıkırdak grefti kullanılarak yapılan onarımlarda ise, uygulanan kıkırdak greftinin zamanla deforme olabildiği veya rezorbe olarak hacminin azalabildiği klinik olarak bilinen bir durumdur (1,2). Bu operasyonlarda greft materyali olarak kullanılan kıkırdak dokusunun yerleştirilme amacını gerçekleştirebilmesi, canlılığını ve dayanıklılığını koruması ile rekonstrüksiyon ameliyatlarının uzun dönem sonuçları direkt ilişkilidir (3).

Kıkırdakta oluşabilecek yapısal sorunlara yol açabilen başlıca iki süreç vardır. Bunlardan ilki nekroz iken, ikincisi apoptozistir. Nekroz dokunun beslenme bozukluğu sonucu oluşan hücre ölümü, apoptozis ise programlanmış hücre ölümüdür. Nekrotik değişikliklerden iyi bilinen cerrahi teknikler uygulanarak bir ölçüde kaçınmak mümkün olsa da, apoptozisin sebep olduğu kıkırdak hücre ölümlerinden nasıl korunabileceği henüz tam açıklanabilmiş değildir.

Tetrasiklin grubu bir ilaçlardan biri olan Doksisisiklin bakteriyel protein sentezini inhibe ederek antibiyotik olarak etki gösteren ilaçlar olarak bilinirler. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar tetrasiklinlerin antimikrobial etkileri dışında da biyolojik özellikleri olduğu ve birçok hücre sel fonksiyonu da etkileyen pluripotent ilaçlar olduğunu göstermiştir (4). Doksisisiklinlerin bu etkileri arasında matriks metalloproteinazların inhibisyonu, tümör kaynaklı angiogenezis, kemik resorpsiyonu, polimorfik nötrofillerden oksijen radikal salınımının baskılanması, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) inhibisyonu ve

peroksinitrit kurtarımı (scavenge) ile protein tirozine azotlanmasının inhibisyonu gibi özellikleri sayılabilir.

Doksisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin matriks metalloproteinaz (MMP) inhibisyonu yolu ile dokuya lökosit ve makrofaj akımını azalttığı, kollajenazlar üzerine inhibisyon etkisi ile yara iyileşmesine etkili olduğu, damar intima kalınlaşmasını azalttığı, aortik anevrizmada, periodontal hastalıkta ve artritde doku yıkımını azalttığı, tümör hücre invazyonunu, tümör metastazını ve tümör anjiogenezisini inhibe ettiği gösterilmiştir (5). In vitro olarak osteosarkomda tümör hücrelerinin ve endotelial hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, meme karsinom hücreleri, osteosarkom hücreleri ve makrofajlarda apoptozise neden olduğu ve kondrositlerin matriks sentezini azalttığı gösterilmiştir. Tetrasiklinlerin aynı zamanda nötrofiller üzerinden reperfüzyon hasarını önlediği gösterilmiştir (6).

Doksisiklin birçok hücre fonksiyonu etkilemesi nedeniyle araştırmacılar tarafından birçok alanda kullanılır olmuştur. Deneysel ve klinik çalışmalar doksisiklinin romatoid artrit ve diğer inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yararlı olabileceğini göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda doksisiklinin submikrobiyal dozlarda kullanımı ile reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisine yönelik sonuçlar artmıştır. Ancak literatürde doksisiklinin doku greftlerinin canlılığındaki etkileri ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur.

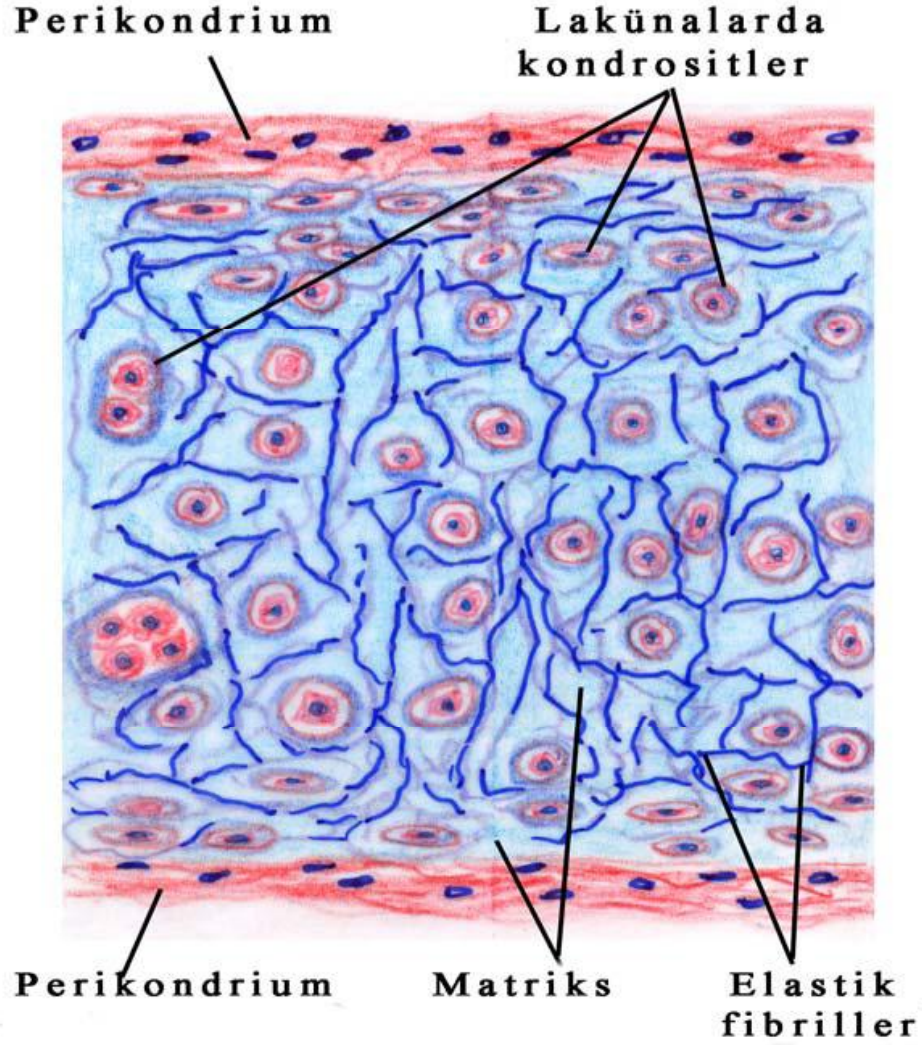
Bu nedenle çalışmamızda doksisiklin kullanarak tavşan modelinde matriks metalloproteinazları inhibe etmeyi ve tavşanın bir kulağından alınarak diğerine nakledilen kırık greftlerinin canlılığını ve sağkalımını arttırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

KIKIRDAK DOKUSU GENEL YAPISI

Bağ dokusunun özelleşmiş bir şekli olan kıkırdağın ana görevi, yumuşak dokuyu desteklemektir. Kıkırdak, temelinde proteoglikan, kollajen ve sudan oluşan ve ekstraselüler matriksi içinde kondrositlerin oluşturduğu basit ancak yüksek oranda özelleşmiş bir yapıya sahip bağ doku elemanıdır (7,8). Kıkırdak yapısının sahip olduğu koyu kıvamdaki matriks, esnekliği sağlayarak mekanik zorlamalar karşısında kalıcı şekil bozukluklarının meydana gelmesini önler. Kıkırdak yapısında vasküler ağ olmadığı için iyileşme ve rejenerasyon potansiyeli kısıtlı olmaktadır (8,9). Bu nedenle kıkırdak hasarı fonksiyon ve içerik kaybına neden olan skar oluşumu ile sonuçlanmaktadır (7–10). Yapısal olarak beslenmesi vasküler bir ağdan ziyade difüzyon ile olduğundan, şekil verilerek çeşitli kontur düzeltmelerinde ve rekonstrüksiyonlarda rahatlıkla kullanılabilir olmaktadır. Bunun yanında yapısının basit olması nedeniyle doku mühendisliğinde bununla ilgili çalışmalarda çok hızlı ilerlemeler kaydedilmektedir (11).

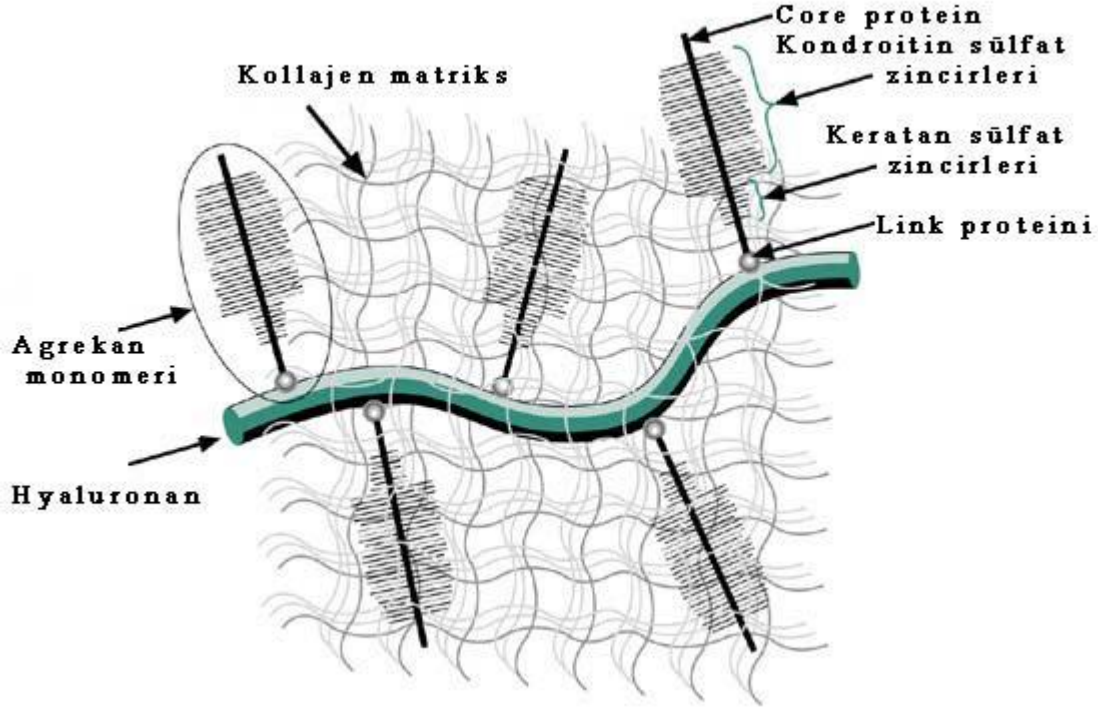
Kıkırdak, gelişen embriyoda mezodermden köken alır. Genç hayvanlarda ya interstisyel alanda mitosis ile ya da perikondrium kaynaklı hücrelerin büyümesiyle meydana gelir. Kıkırdak hücreleri, kondrosit adı verilen tek tip hücrelerdir. Matriks içinde birbirine değmeyecek şekilde kendilerine ait lakünelarda tek tek veya gruplar halinde bulunurlar (Şekil 1).



Şekil 1. Genel kıkırdak yapısı (12)

Matriks, kondrositler tarafından sentez edilir (Şekil 2). Kıkırdağın %70'i sudur. Dehidrate edildiğinde ağırlığının % 40-70'i kollajen, % 15-40'ı proteoglikan ve % 5'i kondrosittir (12). Eklem kıkırdağı dışındaki bütün hyalin kıkırdaklar, perikondrium adı verilen kıkırdak büyümesi ve bakımı için gerekli olan, yoğun bağ dokusundan oluşmuş bir tabaka ile örtülüdür. Zengin kan damarları bulunur. İç tabaka kondroblast adı verilen bağ doku hücrelerden zengindir. Bu hücreler kolaylıkla farklılaşarak kondrositleri oluştururlar. Perikondrium kıkırdak dokusunun korunmasını, beslenmesini ve rejenerasyonunu sağlar. Kıkırdak avaskülerdir, lenfatik damar ve sinirleri yoktur. Beslenmesi perikondriumdaki kapillerler yoluyla veya eklem kavitesinin sinovial sıvıdan difüzyonuyla olur. Bütün

avasküler dokuların hücrelerinde olduğu gibi kondrositler de düşük metabolik aktivite gösterirler (12).



Şekil 2. Kıkırdak hücre dışı matriksi ve agrekan yapısı (12)

Kıkırdakta mevcut ekstraselüler matriks yaş, hasar ve metabolik hastalıklarla değişme eğilimindedir. Örneğin matriksteki kollajen miktarı yaşla birlikte artarken proteoglikan içeriğinde azalma oluşur. Bu nedenle matriks katılaşır hatta kalsifiye olabilir. Yaş ilerledikçe mineralizasyonu artan kostal kıkırdağın greft olarak kullanılması teknik güçlükler gösterebilir.

Kıkırdak Dokusu Tipleri

Değişik fonksiyonel ihtiyaçlar nedeniyle her birinin matriks kompozisyonlarında görülen farklılıktan dolayı hyalin kıkırdak, elastik kıkırdak ve fibröz kıkırdak olmak üzere 3 tipte kıkırdak dokusu bulunur.

1- Hyalin kıkırdak: Açık mavi renkte, süt gibi görünen bu kıkırdağın kondrositleri oval olup, tek tek veya birkaçı birden lakünler içinde yerleşir. Kollajen fibrilleri perikondriumdan doku içine yayılır. En sık rastlanan türdür ve matriksindeki kollajenin çoğu

Tip II kollajendir. Hyalin kıkırdağın kuru ağırlığının % 40'ını hücrelerarası amorf madde içindeki kollajen oluşturur. Kollajenin, submikroskopik boyutlardaki lifler formunda olması ve bu fibrillerin temel madde ile hemen hemen aynı refraktif indekse sahip olması nedeniyle, rutin histolojik incelemelerde amorf maddeden ayrı seçilemez. Embriyoda ossifikasyon meydana gelene kadar geçici iskelet görevini yapar. Basınca dirençlidir. Yetişkin memelilerde hyalin kıkırdağ hareketli eklem yüzeylerinde, büyük solunum yolları duvarlarında (burun, larenks, trakea gibi) ve kostaların sternuma bağlandığı uçlarda bulunur. İspirasyonda solunum yollarının kollabe olmasını engeller.

2- Elastik kıkırdak: Sarı renkte olup, kondrositlerin şekli hyalin kıkırdaktaki kondrositlere benzerdir. Hyalin kıkırdak gibi perikondriumu bulunur. Çevreleri kapsülle çevrilidir. Tek tek hücreler şeklinde veya birkaç hücreden oluşan izogen gruplar halinde bulunurlar. Kollajen fibriller bu kıkırdakta da geri plandadır. Fakat bu kıkırdağa esnekliğini kazandıran elastik fibriller, matrikste ağlar oluşturacak şekilde ön planda izlenirler. Elastik fibriller perikondriumun hemen altına denk düşen sahalarda gevşek düzenlenme gösterirler. Daha esnek ve bükülebilir olan elastik kıkırdağın matriksinde Tip II kollajene ek olarak bol miktarda elastik lif vardır. Kulak kepçesi, östaki tüpü, epiglot ve aritenoid kıkırdağın vokal çıkıntılarında bulunur. Elastik kıkırdakta kemikleşme olmaz, dejenerasyon da daha az görülür.

3- Fibröz kıkırdak: Bağ dokunun yoğun olduğu bazı vücut bölgelerinde bulunur. Gri-beyaz renklidir. Bol fibriler elemanlar arasında kondrositler ve az oranda matriksten oluşur. Kondrositler tek tek veya çiftler halinde bulunurlar. Bazen kollajen fibriller arasında sıra şeklinde yerleştikleri de olur Vücudun zorlanmalarla karşı karşıya kaldığı ve ağırlık taşıyan bölgelerinde, yoğun bir ağ şeklinde örülmüş, Tip I kollajen lifleri içeren matrikse sahip kıkırdağıdır. İntervertebral diskte, bazı ligamanların kıkırdakla kaplı kemik yüzeyine bağlandıkları yerlerde ve simfisis pubisinde bulunur.

Kıkırdak Greftleri ve Kaynakları

Otojen kıkırdak, immünolojik ve biyomekanik özellikleri ile çok iyi bir greft materyalidir (13). Kıkırdak greftler kemik greftlere nazaran çeşitli avantajlara sahiptirler; vasküler beslenmeye ihtiyaçları olmaz, kolay şekillendirilebilirler. Ancak kıkırdak grefte uygun şekil vermek için kıkırdağı kesmek, ezmek ve kırmak gibi işlemler greftin ömrünü kısaltmaktadır (14). Kıkırdak greftlerin en önemli dezavantajlarından biri de rezorbsiyona

uğramalarıdır. Donör sahalarna göre otojen kıkırdak greftler septal, auriküler ve kostal kıkırdaklar olarak üç grupta incelenirler.

Kostal kıkırdak greftleri: Vücuttaki en büyük kıkırdak grefti kaynağıdır. Kolaylıkla şekil verilebilir olduğundan ve fazla miktarlarda elde edilebildiğinden çok yönlü kullanım alanına sahiptir. En önemli dezavantajı diğer yöntemlere göre daha invazif olmaları ve yaşlı hastalarda kalsifikasyona uğramalarıdır. Bununla birlikte kostal kıkırdaklar semer burun deformitesinde, malar ve mandibular kontur deformitesinde, dış kulak gibi karmaşık yapıların onarımında sıklıkla kullanılırlar.

Kulak kıkırdak greftleri: Kulak konkasının önemli bir kısmı konkal kıkırdak grefti ya da kompozit tam kat kama greft şeklinde donör saha deformitesi oluşturmadan belirli miktarlarda kullanılabilir. Kulak kıkırdak grefti nasal rekonstrüksiyon, birincil ve ikincil rinoplastiler ve inverted nipple rekonstrüksiyonları gibi farklı alanlarda ve işlemlerde kullanılabilir.

Septum kıkırdak greftleri: Septum, iki taraflı submukozal disseksiyon sonrası sadece kıkırdak olarak veya tek taraflı submukozal disseksiyon sonrası kondromukozal kompozit greft şeklinde hazırlanabilir. Septal kıkırdak greftleri birincil ve ikincil rinoplastilerde kullanılabilir. Kompozit kondromukozal greft olarak ise, göz kapağı rekonstrüksiyonlarında destek ve konjunktival hattın sağlanması gibi amaçlarla kullanılabilir.

Allogreftler ve Xenogreftler: Allojenik (veya homolog) ve xenojenik kıkırdak greftleriyle ilgili yapılan klinik ve deneysel çalışmalar değişik oranlarda başarıya sahiptirler. Otolog greftler, allogreftlere ve xenogreftlere oranla daha uzun bir sağkalıma sahiptir (15). Bu, oluşan immün reaksiyonun miktarı ile ters orantılıdır. Kıkırdak, immünitesi az bir doku olarak kabul edilmektedir. Teorik olarak, içeriğinde alıcı immün sistemini uyaracak ekspozite kondrosit yoktur. Bu, kondrositlerin vasküler bir ağına sahip olmayan matris tarafından kuşatılmış olmasındandır. Tiku ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tavşan kondrositlerinin HLA antijen (klas 2) salınımı yaptıkları ve kondrositlerin antijen sunan hücre fonksiyonu gördüklerini göstermişlerdir (16). Sonuç olarak kondrositler güçlü immün cevap stimülasyonuna sahiptirler ancak relatif olarak az sayıda olduklarından ve yoğun ekstraselüler matrisin varlığı büyük olasılıkla rejeksiyon sürecini yavaşlatmaktadır.

Kıkırdak Hasarı ve İyileşmesi

Erişkin memelilerde kıkırdak doku yaralanmaları veya kıkırdak doku kesileri orijinal kıkırdak dokusu oluşumu ile iyileşmez. Bunun yerine nekrotik ve atrofik değişiklikler meydana gelir. Yaralı alan daha sonra perikondrium tarafından oluşturulan bağ dokusu ile doldurulur. Kıkırdak doku sınırlı derecede yenilenme kapasitesine sahiptir. Kondrositler yaralanma sonrasında bozulmadan kalabilirlerse matriks öğelerini yeniden oluşturabilmektedir (17). Kıkırdak hücresi etrafındaki vaskülaritesi olmayan yüksek dansiteli ekstraselüler matriks iyileşme üzerinde doğrudan etkilidir (18,19).

MATRİKS METALLOPROTEİNAZLAR

Matriks Metalloproteinazlar enzimleri bazal membranı ve matriks elemanlarını yıkabilen çinko bağımlı endopeptidaz ailesidir. Birçok farklı türlerde tanımlanan katalitik aktivitelerinde metal iyonlarına bağımlılıklarından ekstraselüler matriksin (ESM) yapısal proteinlerini parçalayabilme yeteneklerinden dolayı ayrıca özgün evölüsyon sekansları nedeniyle “Matriksinler” olarak da adlandırılırlar. Embriyo gelişiminde, doku şekillenmesi ve morfogenezinde, artrit, periodontit, glomerülonefrit, ateroskleroz, doku ülserasyonu gibi hastalıklarda ve kanserde hücre invazyonu ve metastazında önemli rolleri vardır (20,21). Ayrıca MMP' lar romatoid artrit, osteoartrit, otoimmün ulseratif deri lezyonları ve tümör hücresi invazyonu ve metastazı gibi çeşitli patolojik durumlarda ekstraselüler matriksin yıkımından primer sorumludur (22).

Matriks Metalloproteinazlar enzimleri patolojik ve fizyolojik pek çok olayda görev alırlar. Organogenezis, yara tamiri, inflamatuvar hücre diapedezisi ve anjiogenezis bu enzimlerin etki gösterdiği başlıca olaylardır. Bu etkilerini hücre dışı matriks proteinlerini yıkarak göstermektedirler (23). Bütün MMP enzimleri inaktif olarak sentezlenmekte ve terminal amino zincirinde meydana gelen proteolitik temizlenme ile aktif hale dönüşmektedirler (24).

Başlangıçta her MMP' nin kendine özgü bir substratı olduğu düşünülmüş ve MMP enzimlerinin adlandırılması buna göre yapılmış ancak son yıllarda MMP enzimlerinin pek çok hücre dışı matriks bileşenini yıkabildikleri gösterilmiş ve numaralandırılarak tanımlanması kabul edilmiştir. Örneğin interstisyel kollajenaz olarak bilinen MMP-1 kazein, jelatin, alfa-1 antitripsin, myelin temel protein, L-selektin, pro-TNF ve interlekin-1 beta' yı yıkabilmektedir (23-25).

Matriks metalloproteinazlar enzimleri hücre dışı matriks bileşenlerini yıkıcı etkilerinden dolayı bağ dokusu yıkımı ile seyreden hastalıklarda araştırmaların odak noktası

olmaya başlamışlardır. Aşırı MMP aktivitesinde matriks yıkımı görülür; bu da romatoid artrit, osteoartrit, periodontitis ve kronik ülserasyon ile ilişkilidir.

Nötrofiller ve makrofajlar MMP enzimlerinin ana kaynağıdır; inflamatuvar süreçlerde lökositlerden salgılanan MMP enzimlerinin lökositlerin damar dışına kaçarak dokuya geçebilmelerine ortam hazırlaması doku hasarının oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Nötrofillerin hücre dışı matriks bileşenlerini yıkarak ortaya çıkarttıkları moleküller de patolojik süreçte rol oynayabilir niteliktedir (26,27).

Matriks Metalloproteinazların Sınıflandırılması

Omurgalılarda yirminin üzerinde MMP tanımlanmış olup Matriks metalloproteinazlar yapısal ve/veya substrat özelliklerine göre kendi içlerinde en az 5 alt gruba ayrılırlar. (Tablo 1).

Tablo 2. Omurgalılarda tanımlanmış bazı matriks metalloproteinazlar ve sınıflaması

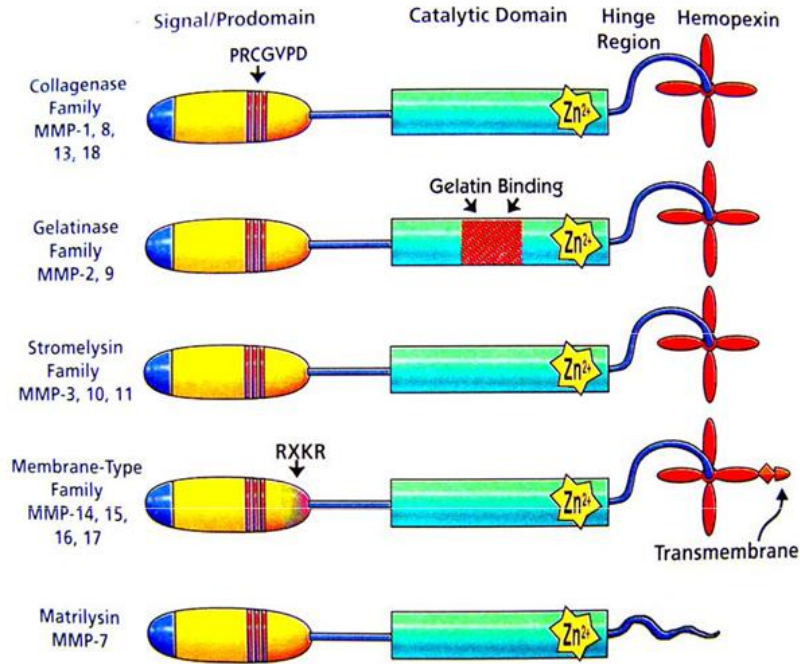
Matrilisinler	Matrilisin (MMP-7) Matrilisin-2 (MMP-26)
Kollajenazlar	Kollajenaz-1 (MMP-1) Kollajenaz-1 (MMP-8 lökosit like) Kollajenaz-1 (MMP-13)
Stromelisinler	Stromelisin-1 (MMP-3) Stromelisin-2 (MMP-10) Metalloelastaz (MMP-12) Stromelisin-3 (MMP-11)
Jelatinazlar	Jelatinaz-A (MMP-2) Jelatinaz-B (MMP-9)
Membran-tipi MMP'ler	MT1-MMP (MMP-14) MT2-MMP (MMP-15) MT3-MMP (MMP-16) MT4-MMP (MMP-17) MT5-MMP (MMP-24) MT6-MMP (MMP-25)

MMP: Matriks metalloproteinazlar.

MT: Membran-tipi

Matriks metalloproteinazların en basit yapısal alt sınıfı matrilisindir ve bir sinyal peptid, bir propeptid domain ve çinko bağlayıcı alanı kapsayan katalitik “domain”den oluşur (28). Kollajenazlar ek olarak, tip I, II, III ve diğer fibriler kollajenlerin doğal sarmal yapılarını yıkan, prolinden zengin menteşe bölgesi vasıtasıyla katalitik “domain”e bağlanmış basit hemopeksin benzeri “domain” içeren küçük “domain” yapılar bulundurlar (29,30). Stromelisinler kollajenazlara benzer yapısal “domain”lere sahip olup matrilisinler gibi geniş substrat özellikleri bulunur ve proteoglikanlar, fibronektin ve laminini kapsayan çoğu ECM

proteinlerini yıkarlar (30). Jelatinazlar katalitik “domain”leri içinde fibronektin tip-I’nin üç kez tekrarını içeren ek bir bölge içerir. Bu onlara jelatin ve aynı zamanda tip-IV, V, VII ve X kollajen, fibronektin ve laminini yıkmak için bir üstünlük sağlar (29,30). Jelatinaz A (MMP-2) ve Jelatinaz B (MMP-9) olmak üzere iki tipi vardır. Molekül ağırlığı 72 kDa olan MMP-2 fibroblastlar, keratinositler, endotelial hücreler, makrofajlar, osteoblastlar ve kondrositler tarafından salınır Jelatinaz A’nın karakteristik özelliği ise PMNL’lerden salınmamasıdır. Molekül ağırlığı 92 kDa olan MMP-9 TIMP-1 tarafından baskılanır ve polimorfonükleer nötrofillerden salınır (31,32). MMP’lerin beşinci büyük alt grubu membran tipi MMP’lerdir (MT-MMP). Bu MMP’ler glikozilfosfatidilinozitol tutunma noktaları veya C-terminal transmembran “domain”leri vasıtasıyla hücre yüzeyine tutunur ve diğer ECM substratları kadar jelatin, fibronektin ve aggregan’ı yıkarlar (30).



Şekil 3. Matriks metalloproteinazların yapısal alanları. Hinge region (dayanak alanı) (6)

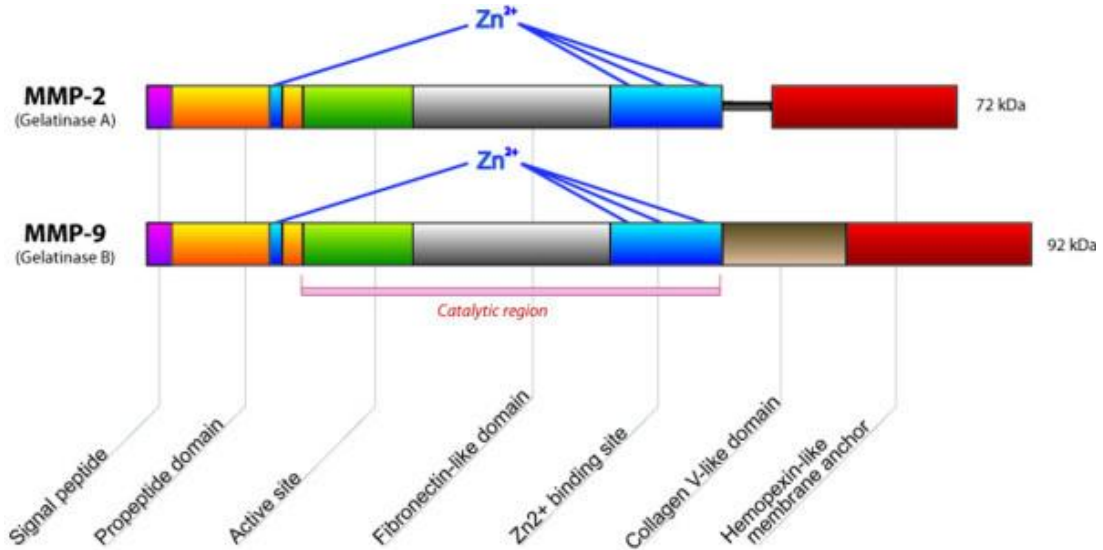
Jelatinaz A (MMP-2)

1972 yılında Haris ve Krane jelatinaz aktivitesini romatizmalı eklem dokusunda gözlemlemişlerdir (33). 1978 yılında sıçan kemik kültürü dokusunda stromelisin1 ve kollajenaz 1’den farklı olarak bir jelatinaz aktivitesi belirlenmiştir (34). Bunu takip eden yılda fare tümör dokusunda temel membran tip IV kollajenini sindiren benzer bir enzim tespit edilmiştir. Bu enzim ilk olarak tip IV kollajenaz olarak adlandırılmıştır. Diğer ismi 72kDa jelatinaz’dır. MMP-2 fare tümörü, tavşan kemiği, insan cildi ve diş eti dokusundan izole edilmiştir. Collier ve arkadaşları 1988 yılında sinyal dizisi hariç tam nükleik asit dizisini

yayınlamıştır (35). MMP-2 katalitik bölge içerisinde üç tekrarlı fibronektin tip II bölgesi içermektedir; bu enzimin jelatin substratına bağlanmasını sağlamaktadır ve Jelatinaz A'yı en uzun MMP'lerden biri yapmaktadır (Şekil 4).

Jelatinaz B (MMP-9)

Sopata ve Dancewicz tarafından 1974 yılında insan polimorfonükleer lökositlerinde bir jelatinaz belirlenmiştir (36). Bu aktif olmayan bir enzimdir. Tip-V kollajenini parçalayabilen benzer bir enzim tavsan makrofajında tespit edilmiş ve ilk olarak tip-V kollajenaz olarak adlandırılması sağlanmıştır (37). Nötrofillerin kollajenaz ve jelatinaz aktiviteleri ayrıştırılmış, enzim saflaştırılarak karakterize edilmiş ve cDNA'sının dizisi ortaya konmuştur (38). Jelatinaz-B MMP'lerin en büyüğüdür ve üç fibronektin benzeri bölge ile bir kollajen tip-V benzeri bölge içermektedir (Şekil 4). Moleküler ağırlığı 92,000 Dalton olduğu için 92 kDa jelatinaz olarak da adlandırılır. TIMP-1, pro-MMP-9'a bağlanarak, enzimin aktivasyonunu ve aktivitesini kontrol edebilen bir kompleks oluşturur. Jelatinaz B'nin insan nötrofil formu molekül içi bir disülfid bağı ile lipokaline bağlı olarak bulunur. Bazı çalışmalarda bu protein insan plazmasında 95 kDa'luk jelatinaz olarak tespit edilmiştir (39).



Şekil 4. MMP-2 ve MMP-9'un Şematik Yapısı. MMP'lar sinyal peptid, propeptid alanı, aktif kısmı, fibronektin benzeri alan, Zn²⁺ bağlayıcı alan, kollajen V benzeri alan ve hemopeksin benzeri membran ankordan oluşmaktadır (24)

Stromelizinler

Stromelizin 1 (MMP 3) ve stromelizin 2 (MMP 10) benzer substrat özgülüğüne sahip iken, MMP 3'ün proteolitik etkinliği MMP 10'a göre daha yüksektir. MMP 11, stromelizin 3 olarak da adlandırılmasına rağmen diğer MMP'ler içinde sınıflandırılır çünkü sekans ve substrat özgülüğü MMP 3 ve 10'dan ayrıdır (40).

Fibroblastlardan pro-stromelizin-1 olarak üretilen Stromelizin-1 çok sayıda substratı parçalar. Başlıca substratları proteoglikanlar, tip IV kollajen, laminin ve fibronektindir. Jelatin ve kazeine daha düşük ilgi gösterir, tip III ve IX kollajeni de bir telopeptidaz gibi kesebilir. Hücrel fibrinolizde de önemli işlevi olduğu düşünülmektedir. Stromelizin-2, stromelizin-1 ile aynı substratları parçalar fakat buldukları dokular farklıdır. Örneğin keratinositlerde yalnızca stromelizin-2 uyarılırken Romatoid sinovya sıvısında yalnızca stromelizin-1 bulunur. Yara iyileşmesi sırasında ise keratinositlerde her ikisi de eksprese edilir. Stromelizin-3 diğerlerinin ESM substratlarını parçalamazken özgül olarak α 1-tripsin inhibitörünü parçalar. Fizyolojik rolü kesin olarak bilinmemekle birlikte epitelyal tümörlerin stromasında çok miktarda bulunduğu için serin proteaz inhibitörlerini baskılayarak plazmin gibi enzimlerin matriks proteinlerini parçalamasını sağladığı düşünülmektedir (41).

Metalloproteinazların inhibisyonu

Metalloproteinazların katalitik aktivitesi özgül doku inhibitörleri (TIMP) tarafından kontrol edilir (42,43). Metalloproteinazlar ile bunların özgül doku inhibitörleri arasındaki denge matriks parçalanmasında önemli bir yer tutmaktadır. Ayrıca a2- makroglobulin ve plazminojen aktivatör inhibitörü de dogal proteinaz inhibitörleri arasında bulunmaktadır (42,43).

Matriks metalloproteinazlarına benzer şekilde bunların doku inhibitörleri de ekstraselüler matriks parçalanmasının neden olduğu birçok biyolojik ve patolojik durumda önem taşımaktadır. Çünkü MMP'lerin katalitik aktivitesi TIMP'ler tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar sadece MMP'lerin katalitik aktivitesini bloke ederken, diğer serin, sistein, aspartik proteazlar üzerinde etkileri yoktur. TIMP'ler multifonksiyonel proteinlerdir, inhibitör etkileri dışında büyüme faktörlerine benzer etki, anjiyogenezisi inhibe edici etki gibi başka fonksiyonları da bulunur (42,43).

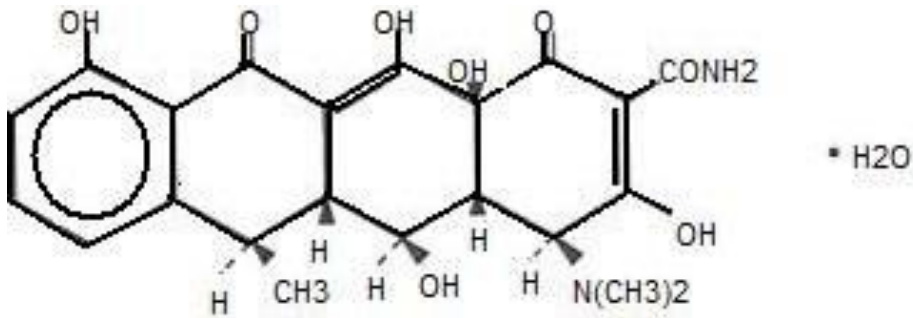
TIMP ailesi, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 ve TIMP-4 olmak üzere bugüne kadar tanımlanmış olan dört üyeden oluşmaktadır. Aralarında yaklaşık olarak %41-52 sekans benzerliği bulunur. Bunların ortak özellikleri 12 tane korunmuş sistein rezidüsüne sahip

olmaları ve metalloproteinazlar ile nonkovalent kompleksler oluşturarak inhibe etmeleridir (42,43).

DOKSİSİKLİN

Tetrasiklinler yapıcı birbirine çok yakından benzeyen ve bir tetrasiklik bileşik olan Naftasenkarboksamid' den türeyen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. İlk tetrasiklin antibiyotiği 1948 yılında *Streptomyces aureofaciens*' ten elde edilen klortetrasiklidir. Daha sonra oksitetrasiklin, tetrasiklin, dimetilklortetrasiklin adlı diğer doğal tetrasiklinler tedavi amaçlı kullanıma girmişlerdir. Bunları yarı sentetik tetrasiklinler olan metasiklin, doksisiklin ve minosiklin izlemiştir. Tetrasiklinler bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteriyostatik etki oluştururlar.

Doksisiklin tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Doksisiklin genellikle monohidrat ve hyclate formu olmak üzere iki kimyasal formül halinde kullanılmakta olup bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe etmek suretiyle bakteriyostatik etki oluştururlar. Bakteri hücresi içine, hücre dışı duvarındaki porin kanallarından geçmek ve sitoplazma membranındaki aktif transport mekanizması tarafından hücre içine pompalanmak suretiyle girerler. Bakteri hücresi içine girdikten sonra ribozomların 30S alt-birimine bağlanırlar ve bunun sonucu 50S alt-biriminin akseptör noktasına (A noktasına) aminoasil transfer RNA' nın bağlanmasını bloke ederler ve peptid zincirine amino asit eklenmesini olanaksız duruma getirirler.



Sekil 5. Doksisiklinin kimyasal yapısı(C₂₂H₂₄N₂ O₈ .H₂O) (4)

Günümüzde yapılan son çalışmalar, doksisisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin güçlü MMP inhibitörü olduklarını, antibiyotik etkileri dışında birçok hücrel foksiyonu etkileyen pluripotent ilaçlar olduğunu göstermiştir (4). Kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklinler ile yapılan çalışmalar antibiyotik ve anti-MMP etkisinin molekülün farklı bölgelerinde olduğunu göstermiştir. Buna göre tetrasiklinlerin antibiyotik etkileri A halkasının karbon-4 pozisyonundaki dimetilamino grubunda, anti-MMP aktivitesi karbon-12 hidroksil ve karbon-11 karbonil oksijen grubunda bulunmaktadır (44).

Tetrasiklinin antimikrobiyal ve antibiyotik özelliklerinden ayrı olarak kolajenolitik aktiviteyi engelleyen bir özelliğe sahip olduğunu gösteren bu sonuç, devam eden çalışmalarda da doğrulanmıştır (45,46). Yapılan çalışmalarda minosiklin, doksisisiklin ve tetrasiklinin kolajenolitik aktiviteyi inhibe ettiği gösterilmiş iken tetrasiklin grubu dışındaki antibiyotiklerin bu etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (45,46).

Tetrasiklinlerin anti-MMP aktivitesine dayanarak yapılan çalışmalarda doksisisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin yara iyileşmesi üzerine etkili olduğu (6), lökosit akışını azaltarak doku hasarını (4,44,47) ve damar intima kalınlaşmasını azalttığı (44,48) gösterilmiştir. Ayrıca aortik anevrizma (49), periodontal hastalık (4) ve artritte doku yıkımını azalttığı (50), tümör hücre invazyonu, tümör metastazı (51,52) ve tümör anjiogenezisini inhibe ettiği (53) gösterilmiştir. Myokard infarktüsü sonrası doksisisiklin kullanımı ile MMP inhibisyonu sağlanmış ve muhtemel doku hasarı azaltılmıştır (54).

Doksisisiklin'in MMP inhibisyon mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Yapılan çalışmalar bu mekanizmaların; Pro MMP'lerin oksidatif inhibisyonu, doksisisiklinin doğrudan enzimle ilişkili Zn^{+2} veya Ca^{+2} 'ya bağlanarak aktif bölgeyi bloke etmesi, proenzimi aktivasyon esnasında parçalanmaya yatkın hale getiren yapısal değişiklikleri indüklemesi, MMP mRNA transkripsiyonunun inhibisyonu, ekstrasellüler aktivasyon esnasında pro-MMP zimojenin yıkılması ve MMP koruyucu alfa-1p'nin inhibisyonu, indirekt olarak serin proteazların (PNL elastaz) aktivite azalması ile olabileceğini varsaymaktadır (4). Tetrasiklinlerin periodonditis ve kemik rezorpsiyonu azaltılması amacıyla onların yakın zamanda tespit edilen intrinsek-antiinflamatuvar aktivitelerinden faydalanılmıştır (47). Tetrasiklinler kolajenazlar üzerine olan etkileri ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle romatoid artritte de kullanılmıştır. Doksisisiklinin lökosit, makrofaj ve kondrosit kolajenazı invitro olarak inhibe ettiği belirtilmiştir (50).

Tetrasiklinlerin diğer antiinflamatuvar mekanizmaları çeşitli aşamalarda meydana gelmektedir. Bu mekanizmalardan biri araziidonik asit ve prostoglandin E2 inhibisyonu ile

inflamatuvar hücre yıkımının engellemesidir. Ayrıca lökosit tip kollejenaz (MMP8) inhibe ederek nitrik oksit ve L arginin metabolizması etkileyerek antienflamatuvar etki gösterdikleri düşünülmektedir (4-6).

Farmakokinetik

Tetrasiklinler oral veya parenteral olarak verilirler. Lokal uygulama için merhem ve damla formları bulunur. Oral verilişlerinden sonra doksisiklin ve minosiklin (%90-100) dışındaki tetrasiklin türevleri sindirim kanalından genellikle düzensiz ve tam olmayan (%60-70) bir absorpsiyona uğrarlar. Sindirim kanalından tetrasiklinlerin başlıca absorbe olduğu yerler, mide ve ince barsaklardır. Karaciğerde metabolize olurlar. Başlıca eliminasyon yolları böbreklerdir (45).

Yan Etkileri

1- Gastrointestinal sistem bozuklukları: Sindirim mukozasına iritan etkileri sonucunda bulantı, kusma ve diyare oluşabilir.

2- Karaciğer bozuklukları: Yüksek dozda oral ve özellikle parenteral tetrasiklin uygulanması durumunda ağır sarılık tablosu geliştiği bildirilmiştir.

3- Böbrek bozuklukları: Böbrek hastalarında protein sentezini inhibe ederek ve bir katabolik etki oluşturarak üremi tablosunu ağırlaştırabilirler.

4- Dişlerde renklenme yapabilirler

5- Allerjik belirtiler: Ürtiker gibi.

6- Hematolojik bozukluklar.

7- Fotosensibilizasyon.

8- Psödötümör serebri (45).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmanın hayvanların canlı kaldığı dönemlerini içeren kısmı, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı ve Histoloji Anabilim Dalının ortak çalışması ile birlikte yapılmıştır. Çalışmamız Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından 2012-81 No'lu proje olarak desteklenmiştir (Ek 1). Çalışma öncesinde Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınmıştır (Ek 2).

HAYVANLARIN ÖZELLİKLERİ VE BAKIM KOŞULLARI

Çalışmanın hipotezinin ispatı için; kulakta kıkırdak dokusunun yeterli olması, cerrahi sonuçların elde edilmesi ve histopatolojik incelemenin daha kolay olması nedeniyle daha önce de kullanılmış olan tavşan modeli uygun görülmüştür (55). Deneysel çalışma için 21 adet sağlıklı Beyaz Yeni Zelanda tipi tavşan kullanılmıştır. Yaşları 26-28 hafta arası olarak belirlenen tavşanların ağırlıkları 2000-3000 gr arasında bulunmaktaydı. Tavşanlar 21 ± 1 °C sıcaklıkta, % 40-60 nem ihtiva eden ve 12 saatlik gece/gündüz standartlarının sağlandığı laboratuvar koşullarında ve veteriner gözetiminde barındırıldılar. Tavşanların tümü serbest kullanımda su ve standart pelet yem ile beslendiler. Tedavileri süresince birbirlerine zarar vermelerini önlemek için 3'lü veya 4'lü olarak bakım havuzlarında takip edildiler. Deney hayvanlarının her biri numaralandırıldı.

ÇALIŞMANIN MATERYAL VE METODU

Çalışmada Yeni Zelanda tipi 21 adet erişkin erkek tavşan 7'li gruplara ayrılarak kullanıldı. Deneydeki 1.Gruptaki (Kontrol grubu) ve 2.Gruptaki (Doksisiklin verilen grup)

tüm hayvanların anestezi uygulaması sonrası sol kulaklarından 1x1cm lik kıkırdak greftleri alınarak karşı kulağa yerleştirildi. Deney ve kontrol grubundaki nakledilen kıkırdak greftlerinin ağırlıkları hassas terazi (Sartorius Precision balance BP 310 S) ile ölçüldü. İnsan ömründeki 1 yıla karşılık gelen tavşandaki 3 aylık çalışma süresi belirlendi.(Rudderman RH, Guyuron B, Mendelsohn G. The fate of fresh and preserved, non-crushed and crushed autogenous cartilage in the rabbit model. Ann Plast Surg. 1994;32:250-254.) 3 ay boyunca Deney grubuna günlük 30 mg/kg/gün doksisisiklin (Monodox®, Deva-İstanbul) hazırlanarak günlük tek doz gavaj yöntemi ile verildi. Kontrol grubuna da aynı miktarda içme suyu gavaj yöntemi ile oral olarak verildi. Deney grubunda kullanılan doksisisiklin dozu in vivo yapılmış çalışmalardaki MMP'yi inhibe eden en uygun doz olduğu için seçildi (56).

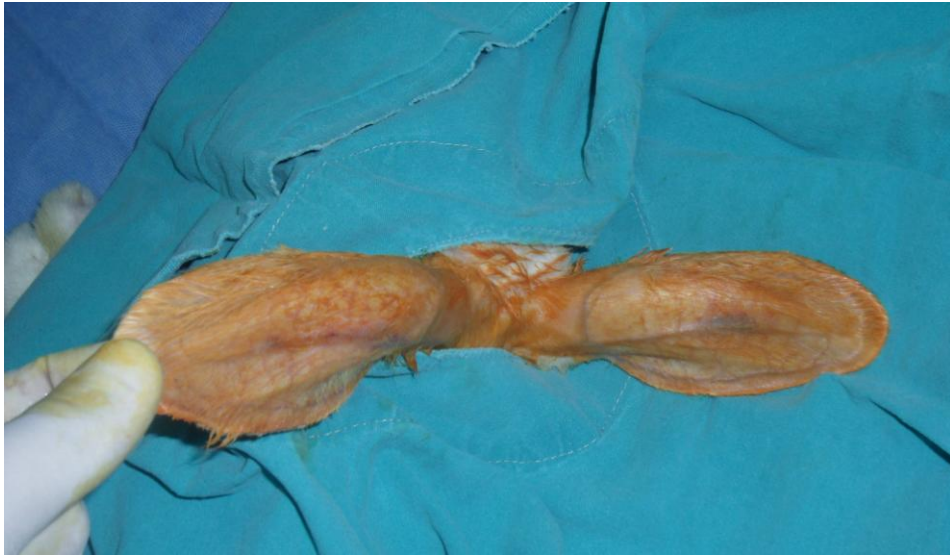
Sham grubu 3. Grup olarak belirlendi ve hayvanlara sadece cerrahi stres yaşatıldı, anestezi uygulaması sonrası sol kulaktaki kıkırdağına sadece bistüri ile çizik atıldı, greft olarak kıkırdak kaldırılmadı veya nakledilmedi. Sham grubunda sadece kan parametrelerine bakıldı.

Tüm hayvanların preoperatif, postoperatif 1.hafta, postoperatif 1.ay ve postoperatif 3.ayda heparinli enjektörler ile kanları alındıktan sonra kanlar 30 dk içerisinde santrifüje alındı. Dakikada 1000 devirden 15 dk santrifüj uygulandı, kanın üst kısmında biriken plazmalar ependorf tüplerine alındı ve tüpler numaralandırıldıktan sonra -85°C derin dondurucuda saklandı. Tüm deneklerin kanlarında MMP-3, MMP-9 ve TIMP-1 aktivitelerine biyokimyager eşliğinde MMP-3, MMP-9 ve TIMP-1 rabbit ELİSA kitleri (CUSABIO BIOTECH Co.td.) ile bakıldı. Deney kitin içindeki kullanım talimatına uygun olarak Tıp Fakültesi Hematoloji laboratuvarında çalışıldı. Microplate ELX 800 (Bio-tek Ins.) marka ELİSA okuyucuda 450 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Postoperatif 3.ayda deney sonlandırıldı. Deney ve kontrol grubundaki nakledilen kıkırdaklar çıkarılarak ağırlıkları tekrar ölçüldü. Donör sahadan cilt biopsileri alındı ve histolojik karşılaştırmanın yapılabilmesi için bütünlüğü bozulmamış sağ kulak kıkırdaklarından 0,5x0,5 cm'lik ek kıkırdak biopsileri alındı.

ANESTEZİ VE CERRAHİ İŞLEMLER

Cerrahi işlem öncesinde deneklere 5 mg/kg dozunda xylazin hidroklorür (Rompun®, Bayer-İstanbul) ve 40 mg/kg dozunda ketamin hidroklorür (Ketalar®, Pfizer-İstanbul) kas içine uygulanarak anestezi sağlandı. İntramusküler anestezik sonrası 10 dk beklendi ve tüm sıçanların kulak eksternal cildi traşlandıktan sonra hayvanlar prone pozisyona alınarak %10 povidon iyot çözeltisi ile temizlenmesi takiben operasyon sahası steril örtülerle hazırlandı

(Şekil 6). Operasyona başlamadan önce hayvanların sol kulak venlerinden kan örnekleri alındı ve heparinli tüplerde uygun koşullarda saklandı. Tavşanlara profilaktik olarak preoperatif ve cerrahi sonrası 3 gün 40mg/kg/gün intramusküler Sulbactam-Ampicillin (Duobactam im/iv 1000mg/4 cc, Eczacıbaşı İlaç Sanayi, İstanbul-Türkiye) yapıldı. Cilt altına operasyon sırası ve sonrasında ağrıyı azaltması ve kanama kontrolüne yardımcı olması için 1 ml kadar adrenalinli lidokain hidroklorür (Jetokain ampul, Adeka) enjekte edildi. Deney devam ederken lüzumu halinde uygulanan anestezi dozunun üçte bir oranı yeniden verilerek anestezinin devamı sağlanmıştır.



Şekil 6. Tavşanın operasyon öncesi hazırlığı

Operasyon mikrocerrahi aletleri ile gerçekleştirildi. Steril şartlarda sol kulak kepçesi dorsal yüzüne 'H' harfi şeklinde cilt-ciltaltı-subperikondrial insizyon yapıldı (Şekil 7).



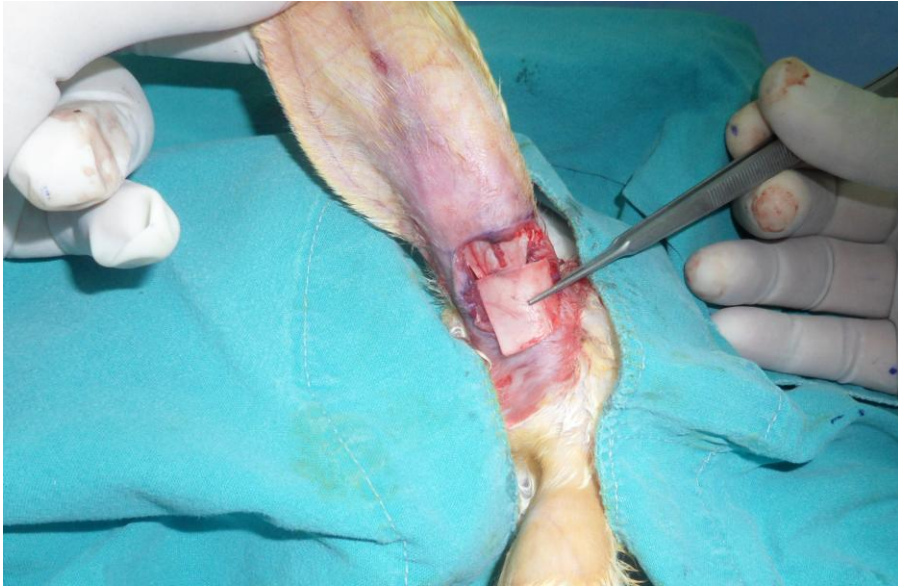
Şekil 7. H' harfi şeklinde cilt-ciltaltı-subperikondrial insizyon ve lokal anestezi uygulaması

Yeterli ekspozisyon sonrasında kıkırdağa ulaşıldı ve kıkırdaktan 1x1 cm boyutlarında kıkırdağı çıkarmak için gerekli ölçümler cetvel ile yapıldı. Ölçüm sonrası insizyonlar bistüri yardımı ile yapıldı (Şekil 8).



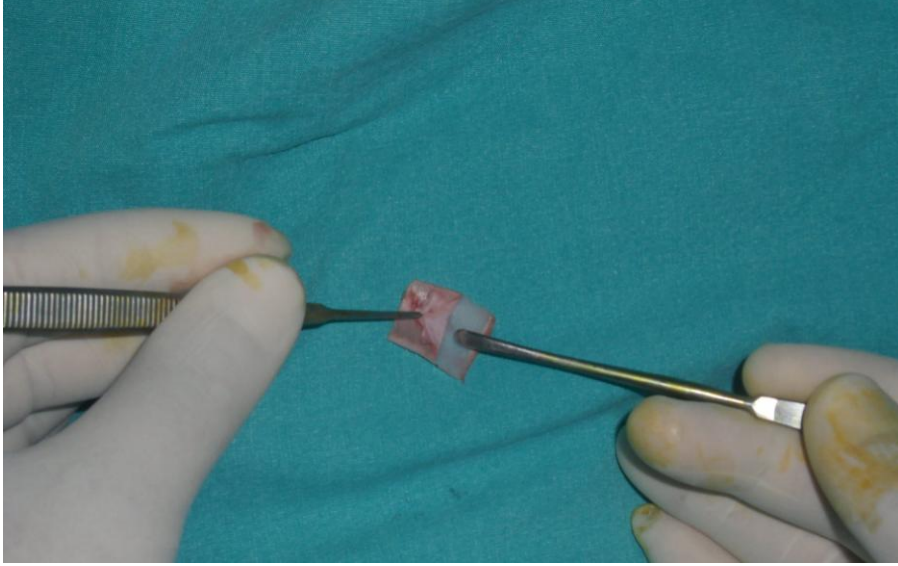
Şekil 8. Ekplorasyon sonrası kıkırdağın insizyonu

Kıkırdak çevre dokularda tamamen serbestlendikten sonra 1x1 cm boyutlarında bütün olarak çıkarıldı (Şekil 9).



Şekil 9. Kıkırdağın çıkarılması

Çıkarılan kıkırdağın üzerinde kıkırdağa yapışık olan perikondrium dokusu elevatör ile ayrıldı (Şekil 10).



Şekil 10. Kıkırdağın perikondriumunun elevatör yardımı ile sıyırılması

Perikondriumu ayrılmış olan kıkırdağın boyutları tekrar ölçüldü (Şekil 11).



Şekil 11. Kıkırdağın boyutlarının ölçülmesi

Çıkarılmış olan kıkırdakların hassa terazide ağırlıkları ölçülerek kaydedildi (Şekil 12).



Şekil 12. Kıkırdakların hassas terazide ölçümleri

Kıkırdağın alındığı edilen kulak cildi 4/0 ipekle sutüre edildi. Karşı kulağın proksimaline kulak tabanına paralele 1cm lik insizyon yapılarak kulağın perikondriumunun üzerine kıkırdak greftlerinin yerleştirileceği poş hazırlandı. Sol kulaktan alınan kıkırdaklar tartıldıktan sonra hazırlanan poşa en blok olarak yerleştirildi (Şekil 13).



Şekil 13. Kıkırdak greftinin alıcı alana yerleştirilmesi

Alıcı saha cildi 4/0 ipekle sutüre edildi. Donör sahada hematoma engellemek için bolster tarzı sıkı pansumanı yapıldı ve hayvanlar bakım havuzlarına alındı (Şekil 14).



Şekil 14. Cerrahi sonrası donör sahanın kapatılması

Cerrahi sonrası 1 hafta boyunca hayvanların günlük yara pansumanları ve postoperatif 3 gün boyunca antibiyotikleri yapıldı. Postoperatif 1.günden itibaren deney grubuna gavaj yöntemi ile 30mg/kg/gün doksisisiklin 3 ay boyunca verildi. Kontrol grubuna ise aynı yöntem ile sadece içme suyu verildi (Şekil 15).



Şekil 15. Gavaj yöntemi ile ilacın verilmesi

Postoperatif 7.gün, 1.ay ve 3.ay hayvanların kanlarındaki MMP-3, MMP-9 ve TIMP-1 değerlerinin ölçülebilmesi için sol kulak venlerinden yaklaşık 2 cc kanları heparin ile yıkanmış enjektörlere alındı (Şekil 16).



Şekil 16. Kulak veninden kan alınması

Postoperatif erken veya geç dönemde komplikasyon yaşanmayan hayvanların takibinde yapılan veteriner değerlendirmesinde sham grubundan 2 hayvanda ve deney grubundan 1 hayvanda mantar enfeksiyonu saptandı ve veteriner önerisi ile hayvanlar deneyden çıkarılarak izole edildi ve tedavilerine başlandı. Diğer hayvanların takibinde sorun yaşanmaması üzerine deney plandığı gibi 3.ayda sonlandırıldı. Deneydeki tüm tavşanların kontrol kanları alındıktan sonra yüksek doz anestezik enjeksiyonunu takiben sakrifiye edildi. Sağ kulaklarına nakledilmiş olan kıkırdak greftleri çıkarıldı (Şekil 17).



Şekil 17. Postoperatif 3.ayda kıkırdakların çıkarılması

Hassas bir şekilde kıkırdak üzerine yapışık olan fibrotik dokular temizlendi ve kıkırdak kurutulduktan sonra tartı sonuçları alındı. Sağlam olan sağ kulak kıkırdağından histolojik karşılaştırmanın yapılması için 0,5x0,5 cm'lik greft yapılmamış sağlıklı kulaklardan kıkırdak biyopsileri alınarak deney sonlandırıldı.

İMMUNHİSTOKİMYASAL İNCELEME

Alınan kıkırdak doku örneklerinde inceleme için kıkırdak dokusundan 6 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemini takiben kesitler suya indirildi. Suya indirilen kesitler antijen retrieval içinde mikrodalga fırında 20 dk kaynatıldı. Oda ısısında 20 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler PBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra hidrojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi için metanolde (Riedel-de Hæn 24229) hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 20 dk muamele edildi. Distile su içinde çalkalanarak kesitler Fosfat Buffer Solusyonu (PBS; pH 7.6) ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Ultra V Block, LabVision, TA-015-UB) uygulandı. Daha sonra kesitler nemli chamber içinde 1/100 oranında sulandırılmış primer antikor ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kullanılan antikorlar, rabbit polyclonal anti-PCNA antibody (ABCAM (2426), USA) ve mouse monoclonal keratin antibody, Pan Ab-1 (AE1/AE3, Thermo LabVision, USA) ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 20 dk sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision, TM-015-BN) tutuldu. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere 20 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Streptavidin Peroxidase, LabVision, TS-015-HR) uygulandı. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk 3-amino 9 etil karbazol (AEC) kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 5 dk Mayer hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı. Akarsuda 5 dk yıkanan kesitler kapatma solüsyonu (Mounting Medium, LabVision, TA-060-UG) konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirmeye alındı.

“TUNEL” Boyama

Parafin bloklardan lam üzerine alınan 5 µm'lik kesitler 1 gece 37 °C'lik etüvde tutulduktan sonra toluolde 3x5 dk bekletilerek parafinden iyice arındırılarak azalan alkol serilerinden (%100, %95, %70) 3'er dk geçirilip distile suya indirildi. 5 dk distile suda tutulan kesitlere daha sonra antijen iyileştirme amacıyla 15 dk oda ısısında proteinaz K (20 µg/ml, Chemicon, 21627) uygulandı. Distile su ile yıkanan kesitler endojen peroksidazı bloklamak için metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂' de 5 dk bekletildi. Distile su ve PBS ile

çalkalandıktan sonra lam üzerinde kesitlerin etrafı hidrofobik kalem (Zymed, 00-8899) ile çizilerek havuz oluşturuldu ve kesitlere 5 dk oda ısısında dengeleme tamponu uygulandı. Daha sonra kesitler 37 °C'de TdT enziminde 1 saat bekletildikten sonra durdurma/yıkama tamponuyla 15 saniye çalkalandı ve oda ısısında 10 dk bekletildi. 3 kez PBS'de yıkanan kesitlere antidigoksinin konjugatı uygulandı ve oda ısısında 30 dk tutuldu. Kesitlere 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk diaminobenzen (DAB) kromojen solüsyonu (LabVision, TA-002-HAC) uygulaması yapıldı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra 10 dk Metil green uygulanarak zıt boyama yapıldı. Distile sudan hızla geçirilen kesitler %100 N-Butanolde de hızla geçirildi. Dehidrate edilen kesitler 3x2 dk toluolde tutulduktan sonra kapatma solüsyonu konarak lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda değerlendirmeye alındı.

Prolifere Hücre Nükleer Antijeni (PCNA)

Prolifere hücre nükleer antijeni; moleküler ağırlığı 36-kDa olan hücre siklusu ile ilgili nükleer matriks proteinidir (57,58). PCNA, hücre siklusunun proliferasyon fazını görüntülemek için kullanılan bir antijendir (59). Hücre kinetiğini ölçmede güçlü ve germ hücrelerinin proliferasyon aktivitesinin değerlendirilmesinde ucuz, basit ve doğru bir yöntemdir (57).

Prolifere hücre nükleer antijeni, hücrede iki çeşit immunreaktivite şekli gösterebilir. Granüler reaksiyon, muhtemelen replizoma bağlı PCNA kaynaklıdır. Sitoplazmik reaktivite ise mitotik hücrede saptanmaktadır. S fazında granüler PCNA immunreaktivitesi, alt fazlara göre farklılıklar göstermektedir. Erken S fazında nükleusta, dağılımı homojen olmayan küçük noktacıklar şeklinde izlenir. Bu noktalar, nükleus periferinde ve perinükleoler kısımda bulunmazlar. Muhtemelen çok sayıda replizom demetleri bulduran, replikom bölgelerine bağlıdır. S fazına ilerledikçe, noktacıklarda belirgin artış vardır. Daha sonra nükleus periferinde ve perinükleoler alanda da noktacıklar izlenir. S fazının sonlarına doğru, noktacıkların sayısında ve boyutlarında artış olmaktadır. Bunun nedeni, geç replike olan heterokromatin yaklaşmasıdır. S fazının sonunda ise DNA replikasyonu olmaktadır ve noktacıklarda artış sınırlı sayıdadır (60,61).

Spermatogenezin etkinliği; spermiyohistogenez, mayozdaki germinal hücre kaybı ve spermatogonyum proliferasyon aktivitesine bağlıdır. PCNA, germinal hücre kayıplarının teşhisinde kullanılır. Çünkü germinal hücre kaybında, özellikle PCNA düzeyi azalmış ve DNA sentezinde bozulma uyarılmıştır. Ayrıca PCNA, DM'nin spermatogenez üzerine etkilerinin, histopatolojik bulgularla doğrulanmasında ve germ hücre kinetiğinin değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır (57).

Kıkırdak biyopsilerinde PCNA antikoru ile işaretlenen doku kesitlerinde hücrelerde nükleer boyanma pozitif olarak kabul edildi. Hücre proliferasyonu maksimum boyanma gösteren alanlardaki hücrelerin sayılması ile skorlandı. Işık mikroskobu altında her bir preperattan rastgele 10 farklı alan X20 objektifte sayılarak pozitif hücre yoğunluğu değerlendirildi. Semikantitatif değerlendirme aşağıdaki biçimde yapıldı; yok (-), çok az (\pm), az (+), orta (++) , çok sayıda (+++).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızın verileri “SPSS (ver.16.0) programı”na yüklendi. Çalışma sonucu elde edilen sayısal veriler ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Verilerin değerlendirilmesinde; ağırlık farklarının karşılaştırılmasında ve farklı zaman dilimlerinde alınan kanların analiz sonucu elde edilen MMP değerleri tekrarlayan ölçümlerinde Mann-Whitney U testi varyans analizi kullanarak karşılaştırıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p<0.05$ alındı.

BULGULAR

MAKROSKOPİK İNCELEME BULGULARI

Tüm spesimenler yerleştirildikleri yuvada çıkarıldıkları sırada makroskopik olarak incelendi. Kapsül oluşumu, damarlanma durumu, kıkırdak izlenebilirliği, rezorpsiyon miktarı açısından gözlemlendi. Deney ve kontrol grubunda blok kıkırdak yapısı tamamıyla korunmuştu. Doğal kıkırdak renklerinde herhangi bir değişiklik izlenmiyordu; parlak inci rengi görünüm mevcuttu. Kıkırdak boyutlarında azalma izlenmiyordu. Kontrol grubunda deney grubuna göre kıkırdağın etrafını daha fazla fibrozisin daha yoğun olduğu görüldü.

AğIRLIK İNCELEME BULGULARI

Deney ve kontrol gruplarında sol kulaktan alınan kıkırdaklar hayvanların sağ kulaktaki hazırlanan ceplerine yerleştirilmeden önce ve deney sonlandırılıp kıkırdaklar 3. Ayda çıkarıldıktan sonra hassas terazide tartıldı. Her spesimen için ayrı ayrı kendi ağırlığı yüzdesi türünden artış veya azalış hesaplandıktan sonra istatistiksel analizler yapıldı. Yapılan istatik sonuçları doğrultusunda 3 ay boyunca doksisiklin tedavisi alan grubun kıkırdaklarındaki ağırlık azalması, kontrol grubundaki kıkırdak greftlerinin ağırlıklarındaki azalma ile karşılaştırıldı. Mann-Whitney U testi ile yapılan karşılatırma sonucunda; doksisiklin alan deney grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az kıkırdak ağırlık kaybı olduğu gözlendi ($p=0,005$).

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Kontrol ve deney gruplarından alınan kıkırdak greftleri ve cerrahi müdahaleye maruz kalmamış sağlam kıkırdak biyopsileri ışık mikroskobu altında her bir preperattan rastgele 10

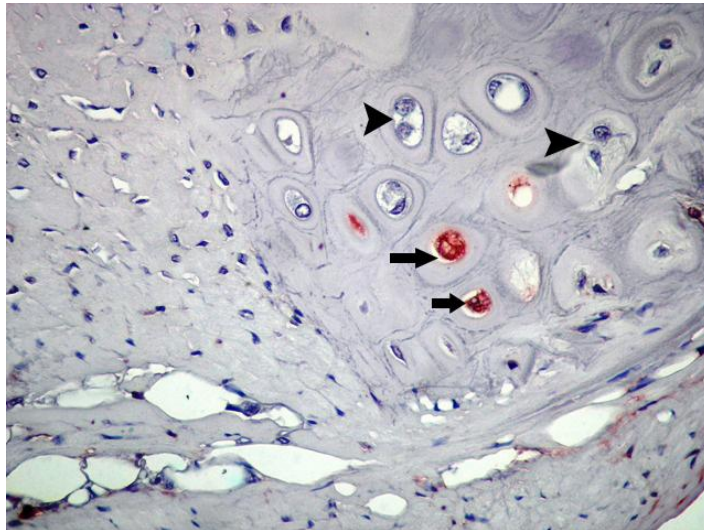
farklı alan X20 objektifte sayılarak pozitif hücre yoğunluğu TUNEL ve PCNA boyamaları ile ayrı ayrı semikantitatif olarak değerlendirildi ve ortalamaları alındı. Yapılan değerlendirme sonucunda 3 ay Doksisisiklin tedavisi alan gruplarda nakledilen kıkırdak greftlerinde, ilaç verilmemiş kontrol grubuna göre daha az TUNEL boyama gösteren apoptotik hücre olduğu ve kontrol grubuna göre daha fazla PCNA ile boyanan proliferatif hücre olduğu görüldü (Şekil 18-22). Kıkırdak grefti yapılmayan kontrol ve doksisisiklin gruplarının sağlam kıkırdakları karşılaştırıldığında TUNEL ve PCNA ile boyanan hücre sayıları arasında farklılık saptanmadı (Tablo 2).

Tablo 2. Kıkırdakların immunhistokimyasal değerlendirmesi

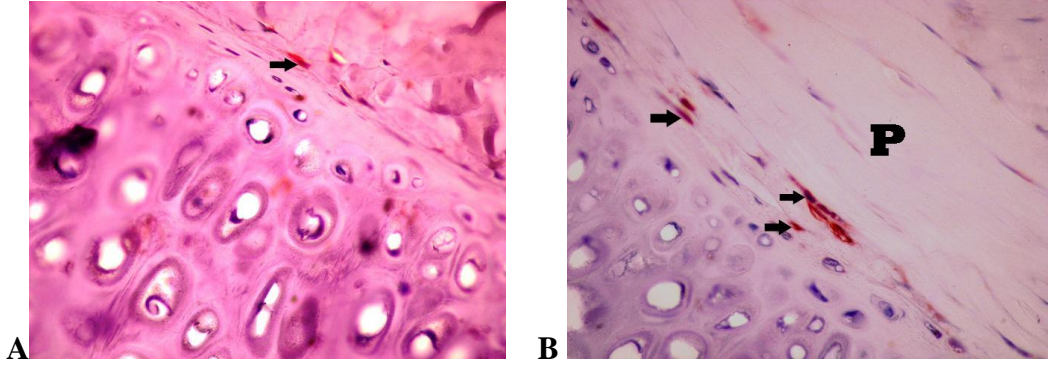
(±) çok az, (+) az, (++) orta, (+++) çok sayıda

	TUNEL	PCNA
Kontrol grubu kıkırdak grefti	+++	±
Kontrol grubu sağlam kıkırdak	±	+
Doksisisiklin grubu kıkırdak grefti	+	++
Doksisisiklin grubu sağlam kıkırdak	±	+

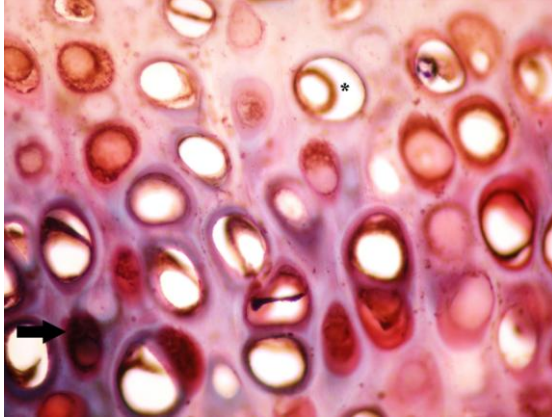
PCNA : Prolifere hücre nükleer antijeni, **TUNEL**:Terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUTP – biotin nick endlabeling.



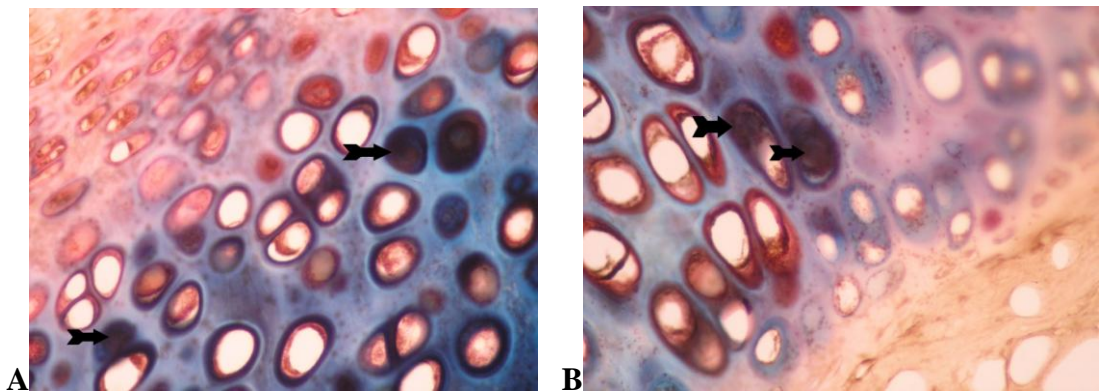
Şekil 18. Tavşanın kıkırdak greftinin alınmadığı sağlam kıkırdağındaki PCNA boyaması. Ok başı; çoğalmakta olan kondrositleri göstermekte. Altta izlenen oklar ise PCNA pozitif boyanmış olan hücreleri göstermekte, X400.



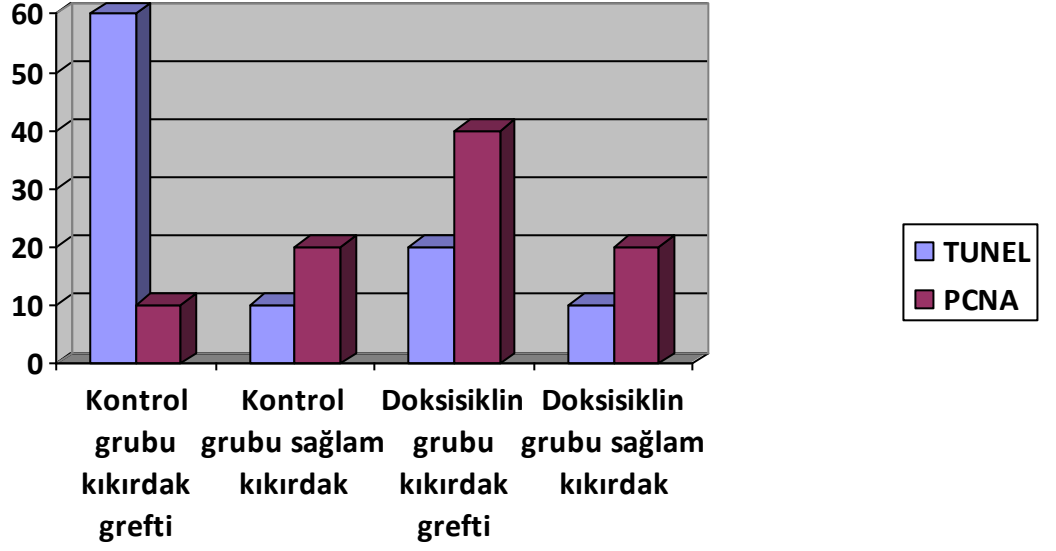
Şekil 19. Kıkırdak greftlerinin 3 ay sonraki PCNA ile boyanmış histolojik görünümü, X400. A) Kontrol grubunda nakledilen kıkırdak greftlerinin 3 ay sonraki histolojik görünümü ve PCNA ile boyanmış hücreler. B) Doksisisiklin grubunda nakledilen kıkırdakların 3 ay sonraki histolojik görünümü. Doksisisiklin grubunda daha fazla sayıda PCNA pozitif hücre izlenmektedir.



Şekil 20. TUNEL ile boyanmış greft yapılmayan bir tavşan kıkırdağı. Ok; TUNEL pozitif boyanmış olan apoptotik hücreyi göstermektedir, X400.



Şekil 21 Kıkırdak greftlerinin 3 ay sonraki TUNEL ile boyanmış histolojik görünümü, X400. A) Kontrol grubundaki kıkırdak greftlerinde TUNEL ile boyanmış hücreler. B) Doksisisiklin grubundaki kıkırdak greftlerinde TUNEL ile boyanmış hücreler. Kontrol grubunda daha fazla TUNEL pozitif kıkırdak hücresi dikkati çekmektedir.

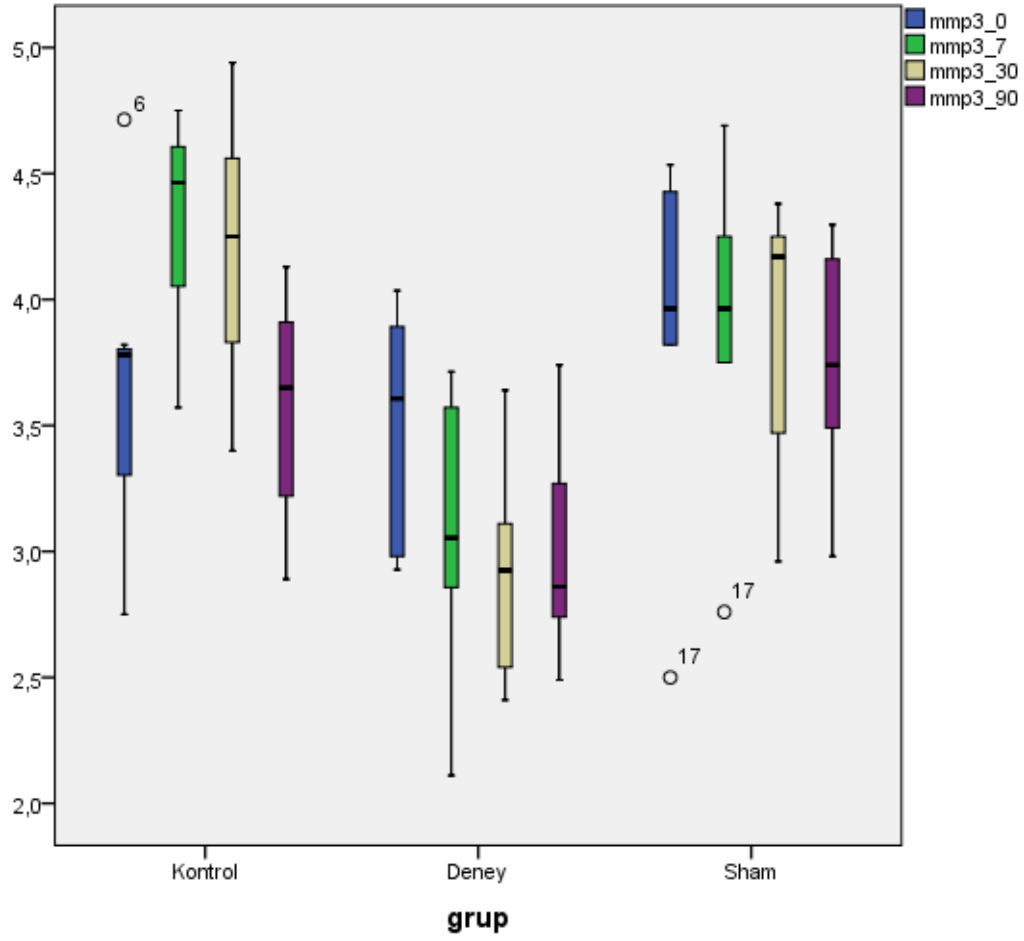


Şekil 22. Kıkırdak TUNEL ve PCNA boyaması sonrasında histolojik sayımlarının değerlendirmesi.

PCNA : Prolifere hücre nükleer antijeni, **TUNEL**:Terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUTP – biotin nick endlabeling.

BİYOKİMYASAL BULGULAR

Deney gruplarındaki MMP3, MMP9 ve TIMP1 ölçümleri daha önceden santrifüj edilmiş ve plazmaları alınmış olan kan örnekleri derin dondurucudan çıkarılıp uygun koşullar sağlandıktan sonra biyokimyager eşliğinde 450 nm lik mikropate okuyuculu ELİSA okuyucuda çalışıldı (ELX 800 ELİSA okuyucu). Alınan kan sonuçları gruplar arasında ve kendi içlerindeki farklı zaman dilimlerinde ayrı ayrı karşılaştırıldığında Doksisisiklin alan grupta 7. gün ve 30. günlerdeki MMP-3 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma izlenmiştir.



Tablo 3. Matriks Metalloproteinaz-3 değerlerinin tüm gruplardaki 0. gün, 7. gün, 30. gün ve 90. günlerdeki ortalama değerleri

TARTIŞMA

Kıkırdak mezenşimden köken alan kondrosit, kondroblast ve su yüklü matriksten oluşan özelleşmiş konnektif yapıya sahip bir dokudur. Vücutta yumuşak dokuya destek veren, eklem yüzeyinin sürtünmesini azaltan ve mekanik darbelerin emilimi gibi görevlere sahiptir. Bu derece önemli görevleri olan kıkırdak dokunun hasarlarında veya eksikliğinde oluşabilecek deformite ve fonksiyon kaybı, ağır patolojileri de beraberinde getirebilmektedir.

Günümüzde plastik cerrahi uygulamalarında kıkırdak grefti kullanımı estetik ve rekonstrüktif uygulamalarında önemli bir yere sahiptir. Yapılmış olan birçok çalışma, kullanılan kıkırdak greftlerinin klinik olarak başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir. Ancak kıkırdak dokusu, vücutta kısıtlı miktarda bulunur ve kıkırdak defekti veya deformitesi gibi onarılması gereken durumlarda, yine bir kıkırdak dokusunun kullanılması tercih edilir.

Kıkırdak grefti kullanılarak yapılan onarımlarda ise, uygulanan kıkırdak greftinin zamanla deforme olabildiği veya rezorbe olarak hacminin azalabildiği klinik olarak bilinen bir durumdur (1,2). Bu tip istenmeyen etkiler, kıkırdak grefti kullanılarak yapılan septorinoplasti, doğumsal kulak yokluğu (mikrotia), gibi özellikli ameliyatların özellikle uzun dönemli sonuçlarını etkileyerek başarısını azaltabilmekte ve düzeltici ek işlemlere gerek duyulabilmektedir (1). Kıkırdak greftinin canlılığının ve yapısal özelliklerinin mümkün olduğunca korunabilmesi bu açıdan çok önemlidir.

Kıkırdakta oluşabilecek yapısal sorunlara yol açabilen başlıca iki süreç vardır. Bunlardan ilki nekroz iken, ikincisi apoptozistir. Nekroz dokunun beslenme bozukluğu, apoptozis ise programlanmış hücre ölümüdür. Nekrotik değişikliklerden iyi bilinen cerrahi teknikler uygulanarak bir ölçüde kaçınmak mümkün olsa da, apoptozisin sebep olduğu kıkırdak hücre ölümlerinden nasıl korunabileceği henüz tam açıklanabilmiş değildir.

Kıkırdak greftinin ilk klinik kullanımının 1896 yılında Konig tarafından yapıldığı bilinir. Daha sonraki yıllarda, kostal ve septal kıkırdak greftlerinin canlılığı üzerine de çalışmalar yapılmıştır (55). Guyuron ve arkadaşları 1994 yılında, deneysel olarak otojen kıkırdak greftlerinde canlılık oranlarının %70 ile %90 arasında değiştiğini ve aynı yıl yayınlanan klinik araştırmalarında ise, canlılığın %87,5 gibi yüksek oranlarda olduğunu bildirdiler (62). Verwoerd ve arkadaşları ise 1991’de ezilmiş kıkırdak greftlerinde yüksek oranda nekroz oluştuğunu tespit etmiştir. Yine Bujia ve arkadaşları ezilmiş kıkırdak greftlerinde canlı kondrositlerin %10 ile %30 arasında kaldığını tespit etmişlerdir (63). Bu çalışmalardan, kıkırdak greftlerin yüksek canlılık oranlarına sahip olduğu, ancak, travma gibi faktörlerin bunu olumsuz etkilediği sonucuna varılabilir. Bizde çalışmamızda greft materyali olarak kullanılan kıkırdak dokusunun yerleştirilme amacını gerçekleştirebilmesi, canlılığını ve bütünlüğünü koruması ile direkt ilişkili olduğundan çalışmamızda kıkırdak yaşayabilirliğinde doksisisiklin MMP inhibisyonu üzerinden etkisini incelemeyi amaçladık.

Doksisisiklin tetrasiklin grubunda yer alan bir antibiyotiktir. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar tetrasiklinlerin birçok hücresel fonksiyonu etkileyen pluripotent ilaçlar olduğunu göstermiştir. Doksisisiklin ve diğer tetrasiklin türevlerinin MMP inhibisyonu ile dokuya lökosit ve makrofaj akımını azalttığı, kollejenazlar üzerine baskılayıcı etkisi ile yara iyileşmesine etkili olduğu, damar intima kalınlaşmasını azalttığı, aortik anevrizma, periodontal hastalıkta ve artritide doku yıkımını azalttığı, tümör hücre invazyonunu, tümör metastazı ve tümör anjiogenezisini inhibe ettiği gösterilmiştir (4,6).

Doksisisiklin MMP inhibisyonu sayesinde anjiogenez ve dokulara lökosit akımını azaltır, bu sayede inflamatuvar yanıtı azaltır. Tetrasiklinler aynı zamanda makrofajlar ve mezengial hücrelerdeki nitrik oksit sentezi için mRNA’nın destabilizasyonunu ve salınımını inhibe eder, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) ve reaktif oksijen türevlerini azaltır (4). Deneysel çalışmalarda özellikle MMP2 ve MMP9’un ECM degradasyonu ile yara iyileşmesinde önemli olduğu saptanmıştır. ECM degradasyonunda asıl rolü MMP’lerin oynadığı düşünülmektedir (6,21). MMP’ler ECM degradasyonu ile pek çok normal biyolojik sürece (embriyonik gelişim, organ morfogenez, sinir büyümesi, yara iyileşmesi, endometriyal siklus vb) ve patolojik sürece (artrit, kanser, kardiyovasküler hastalık, periodontal hastalık, cilt ülserasyonu, vb) katılır (4,6). Bu biyolojik ve patolojik süreçlerde MMP’lerin proteolitik aktiviteleri endojen olarak makroglobulin ve doku tipi-MMP (TIMP) inhibitörleri tarafından kontrol edilir (6,29,64). Endojen inhibitörler dışında birçok eksojen MMP inhibitörü gösterilmiştir. Eksojen inhibitörler TGF, retinoid, heparin, kortikosteroidler, tetrasiklinler, sentetik MMP inhibitörleri, deksametazon, kateşin olarak bilinir (4,64).

Tetrasiklinlerin aynı zamanda nötrofiller üzerinden reperfüzyon hasarını engellediği gösterilmiştir (4). Doksisisiklinin birçok hücrel fonksiyonu etkilemesi nedeniye araştırmacılar tarafından ilgi çekici bir ilaç olmuştur. Litaratürde yara iyileşmesi (21), kemik rezorpsiyonu (47,65), damar hasarı (28,48), aterom plaklarının oluşmasının engellenmesi, myokard enfarktüsü sonrası ventrikül hipertrofinin engellenmesi (54), gibi birçok klinik ve deneysel çalışmada kullanılmıştır. Ancak doksisisiklinin kırkırdak rezorpsiyonunu engellenmesinde kullanılması ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur.

Çalışmamızda doksisisiklinin kırkırdak resorbsiyonunu azaltmaktaki etkisini araştırdık. Doksisisiklin kırkırdak naklinden hemen sonraki gün başlanmış ve 3 ay boyunca aralıksız olarak günlük 30mg/kg dozundan verilmiştir. Doksisisiklin ve kontrol gruplarının yapılan histopatolojik incelemesinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çevre dermiste inflamatuvar infiltrasyonun derecesinin bariz azaldığı ve kırkırdak resorbsiyon miktarının daha az olduğu saptandı. Yapılan biyokimyasal değerlendirmeler sonucunda MMP-3 miktarlarının doksisisiklin grubunda 7. günde ve 30. günde azaldığı görülmüştür. Bu sonuç doksisisiklinin MMP inhibisyonu yaptığını tekrar göstermektedir. Kırkırdak rezorbsiyon miktarını ölçmek için deneyimizde kırkırdakların greft olarak nakli öncesi ve nakilde 3 ay sonraki ağırlıkları ölçülmüştür. Kırkırdakların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark doksisisiklin grubunda daha az olarak bulunmuştur.

Kırkırdakların greft olarak naklinden 3 ay sonraki yapılan histopatolojik değerlendirmede kırkırdaklardaki apoptoza uğramış olan hücrelerin değerlendirilmesinde TUNEL boyaması kullanıldı. Nakledilen kırkırdaklar için kontrol grubu ve doksisisiklin grubu birbirleri ile ve nakledilmemiş sağlam kırkırdak ile karşılaştırıldı. Nakledilmeyen sağlam tavşan kırkırdaklarında fizyolojik olan TUNEL pozitif boyanmış apoptotik hücreler görüldü. Kırkırdak grefti olarak nakledilen kontrol ve doksisisiklin gruplarında sağlıklı kırkırdak dokusuna göre beklendiği gibi daha fazla apoptotik hücreye rastlandı. Ancak doksisisiklin tedavisi alan grupta kontrol grubuna göre çok daha az apoptotik hücreye rastlandı. Doksisisiklin tedavisi alan grupta daha az apoptoza uğramış hücre bulunması tezimizi destekler nitelikte olup kırkırdakta nakil sonrası olan ağırlık azalma miktarlarındaki farkıda açıklamaktadır.

Her hangi bir nedenle estetik veya rekonstrüktif amaçlı kırkırdak grefti gerektiren bir durumda ileri dönemdeki sonuçlarının daha verimli olması belki de kırkırdak resorbsiyonuna bağlı sekonder düzeltme gerektirebilecek vakaların önüne geçebilmek için ucuz maliyetli, kolay kullanılabilir olan doksisisiklinin faydalı olabileceği görüşündeyiz. Ancak tavşan ömründe 3 aylık dönem insan yaşamında 1 senelik sürece karşılık gelmektedir. Bu şartlarda

Çalışmanın klinik olarak insanda uygulanması durumunda bir senelik doksisiklin tedavisi çok uzun bir süreç olacağından, tedavi sresinde azaltma ve en uygun süreci bulma ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir.

SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Estetik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen çalışmada Yeni Zellanda tipi tavşanlarda deneysel olarak doksisisiklin kullanımı ile kıkırdak resorbsiyonunun azaltıcı etkisi araştırıldı.

Elde ettiğimiz bulgular ışığında aşağıdaki sonuçlara varıldı:

- 1- Doksisisiklin kıkırdak grefti uygulamalarında kıkırdağın resorbsiyon miktarını anlamlı olarak azalttı.
- 2- Yıllardır antibiyotik olarak kullanılan doksisisiklin son yıllarda MMP inhibitörü etkisi nedeniyle gündeme gelmiştir. Deneyimizde doksisisiklinin MMP azaltıcı etkisi biyokimyasal olarak da kanıtlanmış oldu.
- 3- Kıkırdak greftlerinin yaşayabilirliğini etkili birçok tedavi yöntemi tarif edilmiştir, bunların birçoğu uygulaması zor, bir kısmı da efektif bulunmamıştır ve bu konuda tam bir görüş birliği sağlanamamıştır.

Doksisisiklin tedavisi resorbsiyon miktarını azaltıcı etkisiyle, güvenle ve kolay kullanılabilir, maliyeti ucuz bir tedavi yöntemi olabileceği görüşündeyiz.

ÖZET

Modern plastik cerrahi uygulamalarında kıkırdak grefti kullanımı estetik ve rekonstrüktif uygulamalarında önemli bir yere sahiptir. Ancak kıkırdak dokusu, vücutta kısıtlı miktarda bulunur ve kıkırdak defekti veya deformitesi gibi onarılması gereken durumlarda, yine bir kıkırdak dokusunun kullanılması tercih edilir. Kıkırdak greftinin canlılığının ve yapısal özelliklerinin mümkün olduğunca korunabilmesi bu açıdan çok önemlidir.

Çalışmada Yeni Zellanda tipi 21 adet erişkin erkek tavşan 7'li gruplara ayrılarak kullanıldı. Deneydeki 1.Grup; Kontrol grubu, 2.Grup; Doksisisiklin tedavisi alan grup ve 3.Grup; Sham grubu olarak ayrıldı. İlk iki gruptaki tüm hayvanlardan anestezi uygulaması sonrası sol kulaklarından 1x1cm lik kıkırdak greftleri alındı. Ağırlıkları ölçüldükten sonra kıkırdaklar karşı kulağa yerleştirildi. Sham grubunda kıkırdak nakli yapılmadı, sadece kıkırdak üzerine bistüri ile kesi yapılarak cerrahi stres yaşatıldı. Deney grubuna 3 ay boyunca günlük 30/mg/kg/gün doksisisiklin gavaj yöntemi ile verildi. Kontrol grubuna ise benzer stresin oluşturulması için aynı yöntem ile içme suyu verildi. Tüm hayvanların preoperatif, postoperatif 1.hafta, postoperatif 1. ay ve postoperatif 3. kan örnekleri alındı.

Deney başlangıcından sonraki 3. ayda sonlandırıldı. Kontrol ve deney grubundaki kıkırdak greftleri çıkarıldı ve ağırlıkları tekrar ölçüldü. Üç ay boyunca doksisisiklin tedavisi alan gruptaki kıkırdak ağırlığındaki azalma miktarları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha az olarak bulundu. Ayrıca doksisisiklin verilen gruptaki MMP-3 miktarları 7. günde ve 30. günde azalmış olarak bulundu. Alınan kıkırdak greftlerinin histopatolojik incelemesinde ise doksisisiklin verilen grupta kontrol grubuna göre daha fazla oranda proliferen hücre ve daha az oranda apoptoza uğramış hücre görüldü. Bu veriler kıkırdak grefti rezorpsiyonundaki doksisisiklinin azaltıcı etkisini göstermiş olup klinik uygulamalarda sıkca kullandığımız bir

ilacın farklı bir mekanizma üzerinden plastik cerrahide yeni bir kullanım oluşturmasına zemin hazırlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Doksisisiklin, matriks metalloproteinaz, kırık grefti, apoptoz

THE USE OF DOXYCYCLINE TO REDUCE RESORPTION OF CARTILAGE GRAFTS

SUMMARY

The use of cartilage grafts has an important place in modern aesthetic and reconstructive plastic surgery applications. However, the cartilage tissue in the body has a limited amount. Deformities or defects of the cartilage tissue can only be repaired with itself. Therefore graft viability of the cartilage becomes very important in this point of view.

21 adult male New Zealand rabbits were used in this study and they are divided into three groups; Group 1 (Control group), Group 2 (doxycycline treatment group) and Group 3 (Sham group). Cartilage grafts with 1x1 cm dimension harvested from the left ears of first two groups after anesthetic application. Grafts were placed against the opposite ear after measuring weights. No cartilage transplantation applied to Sham group, only a scalpel incision was made on their cartilage to give the surgical stress. The dose of 30/mg/kg/day was given to the experimental group by the method of gavage for 3 months. Drinking water was given to the control group with the same method to give the same stress. All animals preoperative, postoperative 1st week, postoperative 1st month and postoperative 3th month blood samples were collected.

The experiment was ended 3 months after graft application. Cartilage grafts were removed after 3 months and weights of control and experimental groups were measured again. Weight reduction in the cartilage grafts of doxycycline group was significantly found less than the control group. In addition, MMP-3 results of the doxycycline group were found low in 1st week and 1st month. Histopathological examination of cartilage grafts in

doxycycline group showed more proliferating cells and less apoptotiz cells than the control group. These data demonstrated the effect of doxycycline in reducing the cartilage graft resorption. This drug is frequently used in clinical applications but our study shows a different mechanism of doxycycline that generates a new usage for plastic surgery.

Key Words: Doxycycline, matrix metalloproteinase, cartilage graft, apoptosis

KAYNAKLAR

1. Acarturk S, Arslan E, Demirkan F, Unal S. An algorithm for deciding alternative grafting materials used in secondary rhinoplasty. *Br J Plast Surg* 2006;59:409-416.
2. Arslan E, Unal S, Demirkan F, Gurbuz O, Beden V. Augmentation rhinoplasty with a combination of triple cartilage grafts for secondary rhinoplasty in a middle-aged population. *Aesthetic Plast Surg* 2005;29(4):240-5.
3. Araco A, Gravante G, F. Araco F. Autologous Cartilage Graft Rhinoplasties. *Aesth Plast Surg* 2006;30:169-174.
4. Golub LM, Lee HM, Ryan ME. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res* 1998;12:12-26.
5. Steffan L. Tetracycline inhibit human synovyal Collogenaz in vivo and in vitro. *J Lab Clinic Med* 2002;139(5):295-302.
6. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):491-4.
7. Görür K, Polat G, Özcan C, Arslan A, Vayisoğlu Y, Öztürk Ö.G, Bağdatoğlu Ö. The Role of Apoptosis in Traumatic versus Nontraumatic Nasal Septal Cartilage. *Plast Reconst Surg* 2007;119(6):1773-1776.
8. Randolph MA, Yaremchuk MJ. Repair, grafting and engineering of cartilage In: Mathes S(ed), Mathes, Plastic Surgery, 2nd Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006(1):621-638.
9. Hunziker EB: Articular Cartilage Repair: Problems And Perspectives. *Biorheology* 2000;37:163-164.
10. Hunziker EB: Growth factor induced healin of partial thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:22-32

11. Vacanti CA, Upton J: tissue engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin plast surg* 1994;21:445-462.
12. Jurqueira LC, Carreiro J, Kelley RO. *Basic Histology*. 8. Baskı. Stamford: Appleton and Lange, 1995. Ss.124-130.
13. Adamson PA: Grafts in rhinoplasty. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg* 2000;126:561-2.
14. Gammert C: Autogenous vital cartilage from the nasal septum, rib and auricle for grafting in rhinology, *Rhinology The State of Art*. Tos M, Thomsen J, Bale V (ed). Kugler Publications S:191-2,1995.
15. Upton J, Sohn SA, Glowacki J. Neocartilage derived from transplanted perichondrium: What is it? *Plast Reconstr Surg* 1981;68:166.
16. Elves MW. A study of transplantation antigens on chondrocytes from articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 1974;56:178-85.
17. Akay M.Turan. *Genel Histoloji*. (Dördüncü Baskı).Ankara Palme Yayıncılık 1999.
18. Peretty GM, Randolph MA, Caruso EM, et al: Bonding of cartilage matrices with culture chondrocytes: an experimental model. *J Orthop Res* 1998;6:89-95.
19. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing: an overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28:847-64.
20. H.Nagase. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-60.
21. Visse R and Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function and Biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-39.
22. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64:474-484.
23. Seven A, Candan G, Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim*. 1995;8:3906-11.
24. Sier CF, et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74(3):413-7.
25. Musso O, et al. In situ detection of matrix metalloproteinase-2 (MMP2) and the metalloproteinase inhibitor TIMP2 transcripts in human primary hepatocellular carcinoma and in liver metastasis. *J Hepatol* 1997;26(3):593-605.

26. Soo C, Shaw WW, Zhang X. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue-Derived Inhibitors in Cutaneous Wound Repair. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:638-647.
27. La Fleur M, Underwood JL, Rappolee DA. Basement Membrane and Repair of Injury to Peripheral Nerve: Defining a Potential Role for Macrophages, Matrix Metalloproteinases, and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases. *J Exp Med*. 1996;184:2311-2326.
28. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005;9(2):267-85.
29. Lee MH, Murphy G. Matrix metalloproteinases at a glance. *J Cell Science* 2004;117:4015-6.
30. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore. *Cur Opin Cell Biol* 2001;13:534-40.
31. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: Do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontolgy* 2000, 2005;39:53-72.
32. Keles GC, Gunes S, Sumer AP, Sumer M, Kara N, Bagci H et al. Association of matrix metalloproteinase-9 promoter gene polymorphism with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 2006;77.1510-1514.
33. Harris ED, Krane SM. An endopeptidase from rheumatoid synovial tissue culture. *Biochim. Biophys* 1972;258:566-576.
34. Sellers, A.; Reynolds, J.J., Meikle, M.C.: "Neutral metallo-proteinases of rabbit bone. Separation in latent forms of distinct enzyme that when activated degrade collagen, gelatin and proteoglycans", *Biochem J* 171 (1978) 493- 496.
35. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL et al. H-ras oncogenetransformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J. Biol. Chem* 1988;263:6579-6587.
36. Sopata I, Dancewicz AM. Presence of a gelatin specific proteinase and its latent form in human leucocytes. *Biochim Biophys Acta* 1974;370:510-523.
37. Mainardi CL, Seyer JM, Kang AH. Type-specific collagenolysis: a type V collagen-degrading enzyme from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;97:1108-1115.
38. Wilhelm SM, Collier IE, Marner BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secreted a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 1989;264:17213-17221.
39. Vartio T, Hedman K, Jansson SE, Hovi T. The Mr 95,000 gelatin-binding protein in differentiated human macrophage and granulocytes. *Blood* 1985;65:1175-1180.

40. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Structure, Function and Biochemistry *Circ Res* 2003;92:827-839.
41. Tüzün Y, Güler MA, Oğuz O, Aksungur VL. Dermatoloji Cilt 1 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2008
42. Bode W, Maskos K: Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* 2003;384:863-872.
43. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H: Tissue inhibitors of metalloproteinases: Evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:267-283.
44. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol* 2002;160(3):1089-95.
45. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Casino A et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1984;19:651-655.
46. Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS, Golub LM, Greenwald RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem* 2001;8:305-316.
47. Bazerra MM, Brito GA, Ribeiro RA Rocha FA. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(5):613-6.
48. Islam MM, Franco CD, Courtman DW, Bendeck MP. A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. *Am J Pathol* 2003;163:1557-66.
49. Curci JA, Mao D, Bohner DG, Allen BT, Rubin BG, Reilly JM et al. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2000;31:325-42.
50. Greenwald RA, Golub LM, Lavietes B, Ramamurthy NS, Gruber B, Laskin RS et al. Tetracyclines inhibits human synovial collagenase in vivo and in vitro. *J Rheumatol* 1987;14:28-32.
51. Seftor RE, Seftor EA, De LJ, Kleiner DE, Leferson J, Stetler-Stevenson WG et al. Chemically modified tetracyclines inhibit human melanoma cell invasion and metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1998;16:217-25.
52. Fife RS, Sledge GW. Effects of doxycycline on cancer cells in vitro and in vivo. *Adv Dent Res* 1998;12:94-6.

53. Marie GS, Baoqian Z. CMT-3, a chemically modified metracycline, inhibits bony metastases and delays the development of paraplegia in a rat model of prostate cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999;30(878):678-82.
54. Ariel T, Micah SF, İsrail M. Effect of matrix metalloproteinase inhibition by doxycycline on myocardial healing and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 2005;19:383-90.
55. Yılmaz S, Erçöçen AR, Can Z, Yenidünya S, Edalı N, Yormuk E. Viability of diced, crushed cartilage grafts and the effects of Surgicel (oxidized regenerated cellulose) on cartilage grafts. *Plast Reconstr Surg* 2001;108:1054.
56. Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, Hamann GF. Doxycyclin inhibits MMP s via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiol of Disease* 2007;25:506-513.
57. Altay B, Cetinkalp S, Doganavşargil B, Hekimgil M, Semerci B. Streptozotocin-induced diabetic effects on spermatogenesis with proliferative cell nuclear antigen immunostaining of adult rat testis. *Fertil Steril* 2003;80(2):828-31.
58. Avunduk MC, Tavlı Ş, Yol S, Tavlı L, Yavuz A, Güngör S et al. Mide karsinomlarında hücre proliferasyon belirleyicisi olarak pna, ki-67 ve agnor kullanımı. *Ank Üniv Tıp Fak Mecm* 2000;53(1):11-5.
59. Şen O, Kayaselçuk F, Zorludemir S, Aydın MV, Erdogan B. Meningiomlarda histopatolojik tanının flowsitometrik dna analizi, pna ve ki-67 ile korelasyonu. *Türk Nöroş Derg* 2002;12:48-53.
60. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. *ADÜ Tıp Fak Derg* 2008;9(3):51-61.
61. Dierendonck JHV, Wijsman JH, Keijzer R, Velde CHVJ, Cornelisset CJ. Cell-cycle-Related Staining Patterns of Anti-proliferating Cell Nuclear Antigen Monoclonal Antibodies Comparison with BrdUrd Labeling and Ki-67 Staining. *Am J Pathology* 1991;138(5):1165-72.
62. Rudderman RH, Guyuron B and Mendelsohn G. The fate of fresh and preserved, noncrushed and crushed autogenous cartilage in the rabbit model. *Ann. Plast. Surg* 1994;32:250.
63. Bujia J. Determination of the viability of crushed cartilage grafts: Clinical implications for wound healing in nasal surgery. *Ann Plast Surg* 1994;32:261.
64. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77:863-9.
65. Steinmeyer J, Deaufeldt S, Taiwo YO. Pharmacological effect of tetracyclines on proteoglycanases from interleukin-1-treated articular cartilage. *Biochem Pharmacol* 1998;55:93-100.

EKLER

Ek 1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı



SAYI : B.30.2.TRK.0.73.00.00/ 2459/8480
KONU :

EDİRNE

24 Nis 2012

Sayın Doç. Dr. Erol BENLİER
Trakya Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Plastik ve Estetik Cerrahisi Anabilim Dalı
EDİRNE

Yöneticiliğini yapmış olduğunuz ve Arş. Gör. Dr. Serkan BALTA'nın "Kıkırdak Greft Resorbsiyonunun Doksisisiklin Kullanımı ile Azaltılması" başlıklı tıpta uzmanlık projesinin, 12 (on iki) ay süre ve 19.709,00 TL ile desteklenmesine, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun 09.04.2012 tarih ve 2012/03 sayılı toplantısında mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi'nin 12. maddesi uyarınca düzenlenen ve ekte sunulan Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sözleşmesi'nin tarafınızca imzalanarak 1 (bir) hafta içinde Rektörlüğe iletilmesi hususunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Beyhan KARAMANLIOĞLU
Rektör Yardımcısı ve
Komisyon Başkanı

EK: 1 adet protokol sözleşmesi

Ek 2

T.C.

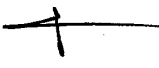
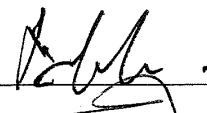
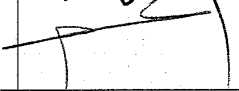
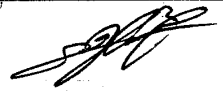
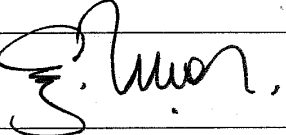
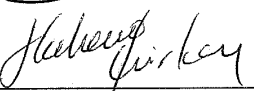
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

EDİRNE

Oturum Sayısı: 02
KARAR NO: 2012.02.05

Karar Tarihi: 30.03.2012

Yürütücülüğünü Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Erol Benlier'in yaptığı Dr. Serkan Balta'nın Tıpta Uzmanlık tezi olarak planlanan TÜHDYEK-2012/20 protokol nolu " Kıkırdak Greft Rezorbsiyonunun Doksisisiklin Kullanımı ile Azaltılması ."başlıklı çalışma hakkında görüşüldü; araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda: Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile İlişki	Toplantı Katılımı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Burhan AKSU Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç. Dr. Hayati ARDA Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Vet.Hek. Ziya ÇUKUR Veteriner Hekim	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Hüseyin KOÇ Sivil Toplum Örgütü Üyesi Sivi Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Beytullah ÖZKAN Fen-Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr. Y. Atakan SEZER Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Doç. Dr. Enis ULUÇAM Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Yrd.Doç.Dr.Hakan GÜRKAN Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	
Osman GÜLTEKİN Sivil Üye	<input type="checkbox"/> var <input type="checkbox"/> yok	<input type="checkbox"/> evet <input type="checkbox"/> hayır	