

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ
ANABİLİM DALI

DMEM VE HAM'S F-12 SIVILARI İLE
DERİ GREFTİ YAŞAYABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. ZEKERİYA TOSUN

TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. NEDİM SAVACI

88721

KONYA-2000

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kısaltmalar.....	2
1. Giriş.....	3
2. Genel Bilgiler.....	6
Derinin Embriyolojisi.....	6
Deri ve Deri Greftleri.....	7
Epidermis.....	7
Dermis.....	7
Keratinositler.....	8
Melanositler.....	8
Langerhans Hücreleri.....	8
Merkel Hücreleri.....	8
Bazal Membran ve Dermo-epidermal Bileşke.....	9
Epidermal Ekler.....	9
Derinin Beslenmesi.....	9
Derinin Lenfatik Dolaşımı.....	10
Derinin İnervasyonu.....	10
Deri Grefti Sınıflandırması.....	13
Tam Kalınlıkta Deri Greftleri.....	14
Kısmi Kalınlıkta Deri Greftleri.....	15
Deri ve Allogreftin Önemi.....	15
Deri Grefti Nasıl Tutar?.....	16
Plazmatik İmbibition Dönemi	16
Revaskülarizasyon Dönemi.....	17
Maturasyon Dönemi.....	17
Deri Grefti Reddi.....	17
Deri Greftleri Tarihçesi.....	18
Deri Grefti Saklanması ve Yaşayabilirliği Tarihçesi..	19
3. Materyal ve Metod.....	20
4. Bulgular.....	23
5. Tartışma ve Sonuç.....	29
6. Özet.....	38
7. Summary.....	39
8. Kaynaklar.....	40

KISALTMALAR

DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
HAM'S F-12	: Ham's Nutrient Mixture F-12
PBS	: Phosphate Buffer Solution
FREEZE –DRYING	: Deri greftleri saklanmasıda hızlı soğutup, vakumlama ile kristalize su çekilmesi ve oluşan camsı faz kurutularak oda ısısında saklanmasıdır.
FBS	:Fetal Bovine Serum
TRİPSİN EDTA	: Etilen Diamine Tetra-Acetic Acid

1.GİRİŞ

Kendiliğinden ya da sütür yoluyla kapanmayacak defektler için deri greftleri iyi bir alternatiftir. Özellikle yanık sonrası oluşan geniş defektler bunun iyi bir örneğidir. Bununla birlikte alınan greftin, hastanın defekt alanına hemen uygulanması mümkün olamayabilir ya da operasyon sonrası herhangi bir greft reddi veya greft tutmamasına bağlı olarak alınan deri greftlerinin yeniden kullanılması gerekebilir. Dahası deri grefti bankası oluşturularak allogreft olarak bir başka hasta için bu derilerin saklanması düşünülebilir.

Bu çalışma deri greftleri saklanmasında ‘maksimum hücre yaşayabilirliğine nasıl ulaşabiliriz’ sorusuna cevap bulmak amacıyla planlanmıştır. Bu çalışma ile, saklanan deri greftinin kalitesini kontrol için iyi bir parametre olan ‘viabilite’ araştırılmış olup böylece daha iyi saklama sıvıları geliştirilmesi yolunda bir adım atılmıştır. Viabilite klinik olarak herhangi bir sahaya uygulanan deri greftinin burada revaskülarize olabilmesi konusunda da fikir veren iyi bir parametre olarak kabul edilir. Viabilitesi yüksek olan deri greftlerinin klinik olarak da başarılı sonuçlar vereceği ortadadır.

Deri greftleri, primer ya da epitelizasyon ile kapanamayacak, hatta flep ile örtülemeyecek deri defektleri için hemen hemen tek seçenektirler. Avasküler doku aktarımlarıdır. Deri grefti ile örtülmesi gereken defektler çeşitli sebeplerle oluşabilir. Bunlar;

Yanık

Tümör rezeksiyonu

Kronik atonik yara

Travma sonrası oluşabilir.

Vücudumuzdaki deri dokusunun kaybı sonrası görülen değişiklikler araştırmacıları deri defektlerini nasıl kapatabiliriz sorusuna cevap aramaya yöneltmiştir. Çünkü deri yalnızca vücudu dış organlardan ayıran bir mikrobiyolojik bariyer olmakla kalmaz aynı zamanda vücut ısını ayarlar ve taşıdığı salgı bezleri ile de büyük bir endokrin organ olarak çalışır. Deri aynı zamanda çok sayıda sensöryel sinir ucu sonlanması da içerir. İnsan derisi epidermis ve dermis olmak üzere her birisi ayrı birer embriyonik tabakadan köken alan iki tabakadan oluşmuştur.

Herhangi bir travma sonrası epidermis ve dermisin tam kat kaybı ile oluşan deri doku defekti ancak bir deri grefti ile onarılabilir. İnce kalınlıkta oluşan deri defektleri yeniden epitelize olabilirken tam kat ancak küçük boyutlu kayıplarda kıl foliküllerinin köklerinde bulunan epidermis hücrelerinden epidermal rejenerasyon görülebilir. Böyle küçük defektler için deri grefti nakline gerek yoktur. Büyük olan tam kalınlıktaki deri defektlerinin ise spontan iyileşme şansı olmadığından deri grefti konularak iyileşmesi şarttır. Tüm vücudu tutmayan deri doku kayıpları için böylesi bir deri grefti nakli mümkün iken çok geniş doku kayıplarında donör alan sıkıntısı çekileceği için farklı alternatifler geliştirilmektedir. Allogreft deri bankası kurulması buna iyi bir çözüm olabilecektir. Böyle bir deri bankası ile geniş deri doku kayıpları olan hastalar için akut dönem tedavisi yapılabilecektir. Hastada sıvı-elektrolit kaybı ve enfeksiyon önlenmiş olacak, ısı regülasyonu kısmen sağlanmış olacak ve otogreft sağlanana kadar hastaya destek tedavisi sağlanmış olacaktır. Kısa süreli deri grefti saklamaları için saklama sıvıları geliştirilebilir. Ancak daha uzun süreli deri saklamaları için mutlaka deri bankası şartları oluşturulmalıdır. Deri bankasının getireceği yararların daha çok olacağı açıktır. Böylece alınan bir deri yıllarca saklanabilecek ve daha çok insana hizmet verilmiş olacaktır. Bu çalışma allogreft deri bankasına giden yolda bir basamak olarak düşünülebilir.

Deri grefti saklaması üç ayrı yol ile yapılabilir:

1. +4° C'de serum fizyolojik ya da kültür mediumu ile ıslatılmış gaz tamponda.
2. Gliserin ya da Dimetil sülfoksit ilavesi ile dondurarak.
3. Freeze-drying sonrası oda sıcaklığında bekletilerek.

Freeze –drying işleminde materyal hızlı soğutup, vakumlanır, böylece kristalize su çekilir, ardından oluşan camsı faz kurutulur ve oda ısısında saklanır.

Bu çalışmada deri grefti numuneleri +4° C'de hücre kültür mediumu içinde saklanmıştır.

Bu saklamada amaç ona en uygun ortamı sağlayarak greftte maksimum hücre yaşayabilirliğini sağlamaktır. İzotonik serum içinde deri greftinin saklanması plastik cerrahi kliniklerinde hemen hemen rutin uygulama haline gelmiştir. Bu kadar klasikleşen bir bilgiyi sorgulamak amacıyla alternatif saklama solusyonları hücre yaşayabilirliği açısından karşılaştırarak araştırılmıştır. DMEM ve Ham's F-12

solusyonlarının deri grefti saklanması hücre yaşayabilirliği açısından daha uygun bir ortam olup olmadığı incelenmiştir.

Literatürde greft yaşayabilirliği çalışmaları eksperimental, klinik ya da histolojik olarak çalışılmıştır. Klinik çalışmalar genellikle sınırlı sayıda iken eksperimental ve histolojik çalışmalar biraz daha çoktur. Klinik olarak yapılan araştırmalarda saklama sonrası defekt alana konulan deri greftinin tutması ya da revaskülarize olması olayın başarısını göstermek için yeterli sayılmıştır. Aynı sonuç eksperimental çalışmalar için de geçerlidir. Histolojik çalışmalarda ise amaç maksimum hücre yaşayabilirliğine ulaşmaktır. Saklanan deri greftinde bulunan canlı hücre sayısının çokluğunun çalışmanın başarısı ile doğru orantılı olduğu kabul edilmektedir. Yaşayan bu hücrelerin fonksiyonel olduğu düşünülür. Ancak elimizde greftin klinik başarısı için gerekli canlı hücre sayısına ait bir rakam henüz bulunmamaktadır.

Deri greftlerinin saklanması ve hatta deri bankası kurulması en çok yanık hastaları için gerekli olabilir. Özellikle çok geniş yanığı olan hastalarda akut dönemde sıvı elektrolit kaybını azaltmak amacıyla allogreft olarak bu deri greftlerinden yararlanılmaktadır. Deri greftlerinin saklanması böyle bir amaca da hizmet ettiği için oldukça önemlidir.

Bu çalışmada saklanan deri greftleri hücre seviyesinde viabilite (canlı hücre oranı) ölçü alınarak değerlendirildi. 3 haftalık bir saklama süresi sonunda elde ettiğimiz yaşayan hücre sonuçları bizim için izotonik serumda saklanan deri greftlerine göre ümit verici sonuçlar verdi.

2.GENEL BİLGİLER

Bu çalışma ile saklanan deri greftlerindeki hücre canlılığı nasıl yüksek tutulabilir konusu farklı saklama sıvıları üzerinde çalışılarak araştırılmıştır. Bunun için deri dokusunun temel özellikleri tekrar gözden geçirilmiştir.

Derinin Embriyolojisi

Deri diğer organlarda olduğu gibi embriyonik hayatın 1. ve 2. aylarında embriyogenezis dönemi ve ardından da 3. ay ile doğum arasında geçen fetal hayatta ise büyüme ve farklılaşma periyodu yaşar. Deri ektoderm ve mezoderminden gelişir. Bunlardan epidermis, folikül, sebace, apokrin birimler, ektrin birimler ve tırnaklar ektoderm kökenlidirler. Sinirler, melanositler ve özelleşmiş duyuşal reseptörler nöro ektoderm kökenlidir. Kan ve lenf damarları, langerhans hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri, fibrositler, kaslar, yağ hücreleri ve diğer deri birimleri ise mezoderm kökenlidirler. Epidermis ve eklerinin büyüme ve olgunlaşması dermisten önce olur (1).

İlk iki ay içerisinde embriyonun basit bir derisi bulunur. Epidermis çift tabakalı hale gelir. Bunlardan alttaki bazal, üstteki ise periderm tabakasıdır. Periderm, stratifiye ve kornifiye oluncaya kadar epidermisi örter, zaten bu tabaka tekdüze ve geçici bir hücre tabakasından oluşmaktadır. Periderm dokusu muhtemelen amniotik sıvı ile alış verişi sağladığı düşünölen mikrovilluslarla kaplıdır. Fetal hayatın 6. ayında periderm ince ve yassı tabaka haline döner ve mikrovillus sayısı azalır. Ardından epidermis kornifiye olur. Böylece epidermal sıvı geçişi de bir bakıma engellenmiş olur.

Fetal hayatın 3. ayında ise periderm ve bazal tabaka arasında bir ara tabaka ortaya çıkar. Fetal hayatın son üç ayında periderm dökölür, epidermal tabakalar tam gelişmiş ve fonksiyoneldirler. Ergenlik çağında adneksler büyür, bölgesel olarak aktif kıllar gelişir. Apokrin bezler ve yağ bezleri salgı üretmeye başlarlar. Embriyonik dermis glikozaminoglikandan zengin ve ince kollajen fibriller bulunan bir stroma ile geniş bir şekilde ayrılmış mezenkimal hücrelerden oluşmuştur. Fetus derisinin yüksek su içeriğini bu stroma sağlar. Yine fetus derisinde elastin henüz sentez edilmemişken elastik mikrofibriller vardır. Dermiste elastinin olgun formu doğum sonrası yaklaşık 6 ay kadar bulunmaz. Subkutis ise yine doğumdan 6 ay sonra ortaya çıkmaya başlar (2, 3, 4).

Deri ve Deri Greftleri

İnsan derisi epidermis ve dermis olarak iki ayrı yapıdan oluşmuştur. Bu iki yapının köken aldığı embriyonik germ yaprakları da farklıdır. Epidermis ektoderm, dermis ise mezoderm kökenlidir. Epidermis tüm deri kalınlığının yaklaşık %5'ini yani yirmide birini oluşturur (5).

Epidermis:

Epidermis oldukça incedir ve kan damarları içermez. Henüz 12 haftalık bir embriyoda diferansiye olur. Bu ince yapısına rağmen epidermis beş ayrı tabakadan oluşmaktadır. Bunlar içeriden dışarı doğru:

Stratum bazale

Stratum spinosum

Stratum granülozum

Stratum lusidum

Stratum korneum olarak sıralanırlar.

Bu hücrelerin 15-30 günlük bir siklusu olup yüzeye doğru ilerlerler ve dökülürler. Epidermis en ince deri tabakasıdır. Kalınlığı göz kapaklarında 0,04 mm, avuç içlerinde 1,6 mm kadardır. Epidermis en az dört hücreden oluşur. Bunlar en çoktan aza doğru keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleridir (3).

Dermis:

Dermis ise epidermise oranla oldukça kalındır. Yüzeydeki papiller tabaka ile daha derindeki retiküler tabakadan oluşur (6). Çok katlı skuamöz bir epitelden oluşur. Bazal tabakadan başlayarak gelişir ve korneum tabakasından atılır (3). Dermisteki temel hücre fibroblasttır. Fibroblastlar kollajen üretirler. Dermisin büyük kısmı tip 3 kollajenden oluşmuştur. Kollajen yalnız deride değil tüm vücutta bulunan tendon, kemik, ligamentlerin yapısına giren protein yapıdır. Vücutta kollajen yapımı ve yıkımı belli bir uyum içinde yapılır. Skleroderma, keloid ve hipertrofik skar gibi tablolarda bu oran bozulmuştur.

Fibroblast dışında makrofaj ve mast hücreleri de dermisin ana hücreleridir. Makrofajlar genel temizleyici iken mast hücreleri başlıca tip 1 immun yanıtta rol alırlar (2, 3, 4).

Keratinositler:

Skvamöz hücre olarak da bilinir ve epidermisin ana hücresidir. Ektodermal orijinlidir ve ürettiği keratin proteini korneum tabakasının ve aynı zamanda kıl ve tırnağın ana maddesidir. Hücre bölünmesi ile ikiye bölünen keratinositten birisi bazal tabaka olarak kalırken diğeri epidermisin üst kısmına ve ölüme doğru yola çıkarak ilerler. Bu yolculuk yaklaşık 14 gün sürerken bu tabakadan atılması da 14 gün kadar sürer. Toplam bir hücrenin atılmasına kadar geçen süre ortalama 28 gündür. Keratinositler birbirlerine desmosomlarla bağlıdırlar (2, 3, 4).

Melanositler:

Melanozom denilen melanin pigmentlerini yapan hücrelerdir. Nöral yarıktan türemişlerdir. Melanin pigmenti deri ve saçların rengini verir ve ultraviyole ışınlarının zararlı etkilerine karşı koruyucudur. Melanositlerin bazal hücrelere oranı değişik yerlerde farklı olmaktadır. Örneğin yanakta bu oran 1:4 iken alt ekstremitelerde 1:20 'dir. Koyu renkli cildi olanlarda melanosit sentezi açık renkli olanlara oranla daha çoktur (2, 3, 4).

Langerhans Hücreleri:

1860 yılında henüz tıp fakültesi öğrencisi olan Paul Langerhans tarafından keşfedilmiş, ancak fonksiyonu son 30 yılda anlaşılmaya başlamıştır. Fonksiyonel olarak langerhans hücreleri monosit ve makrofaj gibi davranırlarken kemik iliği orijinlidirler. Greft reddini indükleyen hücreler bunlar olduğu gibi kontakt duyarlılıktan da sorumludurlar (2, 3, 4).

Merkel Hücreleri:

Epidermiste bulunur ve fonksiyonu tam bilinmemekle beraber cildin duyusunda görevli olduğu kabul edilmektedir. Bu hücrelerden kaynaklanan ve genellikle güneşle temasa bağlanan tümör olguları bildirilmiştir (3, 7, 8).

Bazal Membran ve Dermo - epidermal Bileşke:

Epidermis ve dermisi birbirinden ayıran kompleks bir yapıdır. Keratinositler hemidesmosomlarla birbirine yapışır bu bölümde kollajen başlıca tip 4 ve tip 7 olarak bulunur. Epidermolizis bülloza gibi bazı genetik hastalıklarda bu aradaki hemidesmosomlarda defekt vardır. Bazal membran epidermis ve dermisi bir arada tutmakla beraber sıvı ve hücre geçişine izin verir.

Dermo epidermal bileşke başlıca 4 yapıdan oluşur:

Hemidesmosomları içeren plazma membranı

Lamina lucida

Basal lamina

Fibröz komponent (3, 4).

Epidermal Ekler:

●**Yağ Bezleri:** Vücutta yaygın olarak bulunurlar ancak avuç içi ve ayak tabanlarında bulunmazlar. Sekresyonlarını kıl kökleri ile aynı kanala drene ederler.

●**Apokrin Bezler:** Anogenital ve aksiller bölgede bulunurlar. Epidermisten türerler.

●**Ekrin Ter Bezleri:** Mukozalar hariç bütün deride bulunurlar.

●**Kıllar:** Epidermal hücrelerin dermis ve subkutan dokuya ilerlemesi ile oluşurlar.

●**Tırnaklar:** Oluşumu kıllar ile aynıdır. İlerleyen bu epidermis tabakası keratinize bir hal alır (2).

Epidermis, dermis ve ekleri resim 1'de gösterilmiştir.

Derinin Beslenmesi

Epidermiste kan damarları yoktur. Bu bölgenin beslenmesi diffüzyonla olur. Dermiste ise kan damarları mevcuttur. Bu damarlar;

Direkt kütanöz

Muskulokütanöz perforatörler ve

Fasyal arterler olarak üç ayrı sistemden gelir.

Bütün bu arter ve ven sistemi derinin yüzeyel ve derin arter ve ven ağı ile zengin bir ilişki kurarlar ve deriyi böylece beslerler (9).

Bunlardan derin olan yapı epidermis ve dermisin arasında ve subkutan dokuda bulunur. Yüzeyel olanı ise retiküler dermisin yüzeyinde bulunur ve papiller dermisi besler. Her bir vasküler halkanın bir arteriyel bir de venöz kolu bulunur. Dermisteki kanlanma sınırlı olup kapiller kan ağı çoğunlukla aktif epidermisi ve onun eklerini besler. Derinin kan akımı hipotalamusun kontrolündedir ve yüzeyel kapiller sisteme gelen kan akımının artırılması ya da azaltılmasıyla ısı regülasyonu sağlanır (2).

Derinin Lenfatik Dolaşımı

Derinin lenfatik dolaşımı dermiste bulunan papiller tabaka ile kan damarlarına paralel pleksuslar ile sağlanır. Bir greft aktarımı sonrası lenfatik dolaşım post operatuar 4.- 5. günde başlar. Lenfatik drenajın operasyon sonrası ödemi azaltmada etkili olduğu düşünülmektedir (9). Normal deride lenfatik drenaj sistemi gözle görülemez. Ancak bunlar retiküler dermisten lokal lenf nodlarına kadar uzanan bir yapı oluştururlar (3).

Derinin İnnervasyonu

Derinin innervasyonu yüzeydeki myelinsiz liflerle serbest reseptörler ve daha derinde bulunan myelinli sinir lifleri aracılığı ile sağlanır. Basınç, sıcaklık, ağrı, dokunma, kaşıntı gibi özel duyular için özelleşmiş duyuşal lifler taşırlar.

Deri duyusu serbest sinir uçları, kılla ilgili sinir uçları ve kapsüllü sinir uçları olmak üzere üç çeşit afferent reseptör içerir.

Serbest sinir uçlarının hem myelinli hem de myelinsiz tipleri mevcuttur. İleti hızları yavaştır. Isı, kaşıntı ve ağrının algılanmasını sağlarlar.

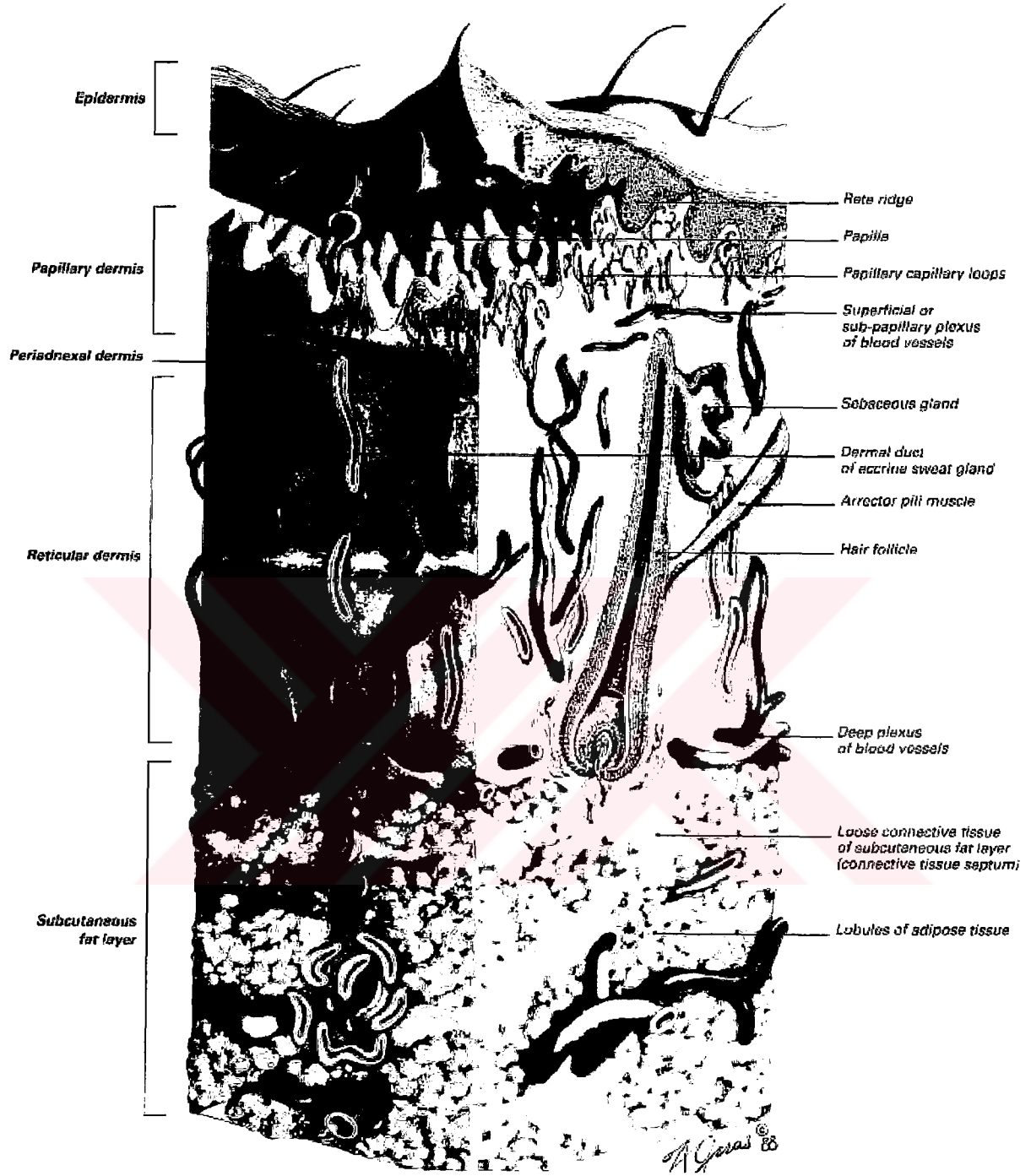
Meissner ve Pacini korpüskülleri kapsüllü sinir sonlanmaları şeklinde özelleşmişlerdir. Pacini cisimcikleri derin duyunun algılanmasından ve titreşimden sorumludur. Palmar, plantar ve parmakların dorsal yüzü ile genital organlar civarında bulunur.

Meissner korpüskülleri ise dokunmanın algılanmasını sağlar. El, ayak, ön kol cildinde sıklıkla bulunurlar (2). Greft operasyonu sonrası reinnervasyonun ise en erken 5 haftada, en geç ise 2 yılda gelişmesi beklenir. Bu süreden sonra reinnervasyon beklenmemelidir (10).

Tam kalınlıktaki deri greftlerinde duyu hissi ince kalınlıktakilere oranla çok daha iyi olmaktadır. Grefte myelinizasyon oldukça yavaş olmaktadır (9).

Otonom sinir sistemine ait postgangliyonik adrenerjik sinir lifleri vazokonstriksiyonu, apokrin ter bezleri fonksiyonunu ve erektor pili kaslarının çalışmasını düzenlemektedir (4).





Resim 1. Epidermis, dermis ve ekleri (11)

Deri Grefti Sınıflandırması

Deri greftleri epidermisi mutlaka, dermisi ise kalınlığına göre belli oranda içerir. İnce kalınlıkta alınan deri greftleri dermisi az oranda içerirken, kalın alınan ya da tam kalınlıkta alınan greftler dermisi daha çok oranda veya tamamen içerir. Kalınlığına göre deri greftleri ince kalınlıkta ya da tam kalınlıkta olarak iki ayrı gruba ayrılır. Alındığı canlıya göre ise şöyle sınıflandırılır:

Otogreft : Greft aynı kişiden alınıp yine aynı kişideki bir defekte konulmuştur.

Allogreft(Homogreft) : Aynı türler arasında ancak genetik yapısı farklı bireyler arasında aktarım yapılmaktadır. İki ayrı insan arasında yapılan greft aktarımı gibi.

Heterogreft(Xenograft) : Farklı türler arasındaki bireyler arası yapılan greft aktarımları bu gruba girer. Maymundan insana yapılan aktarım gibi.

İzogreft : Genetik yapısı eş olan canlılar arasında yapılan aktarımlardır. Tek yumurta ikizleri buna iyi bir örnektir (6) (Tablo1).

TABLO 1:

DERİ GREFTLERİ SINIFLANDIRMASI

VERİCİLERİNE GÖRE DERİ GREFTİ TÜRLERİ
1. OTOGREFT. 2. ALLOGREFT(HOMOGREFT) 3. HETEROGREFT(XENOGRAFT) 4. İZOGREFT

KALINLIKLARINA GÖRE DERİ GREFTİ TÜRLERİ
1. Tam Kalınlıkta 2. Kısmi Kalınlıkta İnce Kalınlıkta Orta Kalınlıkta Kalın Kalınlıkta

Tam Kalınlıkta Deri Greftleri

Epidermisi ve dermisin tamamını içine alır. Ter ve yağ bezleri, nöral uç organları (Meisner Korpusküllü, Merkel hücreleri , Paccioni cisimcikleri gibi) ve kıl folikülleri içermektedir. Tam kalınlıkta alınan deri greftleri ne kadar kalın alınırsa o kadar çok dermal komponent içermektedir. Tam kalınlıkta deri greftleri travmalara daha dirençlidir, estetik açıdan daha iyi bir görünüme sahiptir, kontraksiyon daha azdır ve daha iyi büyüebilmektedir (12).

Kısmi Kalınlıkta Deri Greftleri

Epidermisi mutlaka, dermisi ise kalınlığına göre belli oranda içermektedir. Bu tür greftler için belirli bir kalınlığa bağımlı olmadan subjektif olarak kişiden kişiye değişen ince, orta ve kalın kısmi kalınlıkta deri grefti olarak üçe ayrılmaktadır. Tam kalınlıkta deri greftlerine oranla bunlarda yaşayabilirlik daha yüksektir, donör alan morbiditesi daha az olmakta, geniş defektlerde ise file (mesh) greftle kapatabilme imkanı vermektedir (12). (Tablo 1)

Deri ve Allogreftin Önemi

Deri, dokunma duyusu ile beş duyu organından birisi olarak görev yapar.

Deri kaybına bağlı vücudumuzda ortaya çıkabilecek problemleri şöylece sıralayabiliriz:

1. Sıvı, elektrolit ve protein kaybına bağlı şok ve metabolik bozukluk.
2. Mikroorganizmaların invazyonuna bağlı enfeksiyon ve sepsis ile hayatı tehdit eden tablo.
3. Taşıdığı sinir uçlarının açığa çıkması ile ağrı ve şiddetli ağrıya bağlı görülebilecek ağrı şoku.
4. Deri tarafından örtülen alanların açıkta kalmasına bağlı dokularda bozukluk.
5. Epitelizasyonun yetersizliğine bağlı kötü skar oluşumu ve kontraksiyon tablosu.

Vücutta oluşan deri doku defekti bu nedenle en kısa zamanda kapatılmalıdır. Deri greftleri bu nedenle önemli bir yere sahiptir. Özellikle geniş yanıklı hastalarda bu zararların daha yüksek oranda oluşacağı ortadadır. Bu hastalar için bir allogreft deri bankası kurulması akut dönemdeki tedavileri için büyük bir aşama olacaktır. Deri doku defekti geniş olan bu hastalara hemen yaralanma sonrası konulacak allogreft ile bu zararlar önlenmiş olacak, imkan varsa kültüre epidermel otogreft için vakit kazanılmış olacaktır. Konulan allogreftin burada kalış süresi için kesin bir zaman verilememekle birlikte alıcının yaşının genç olması ve genetik yapıdaki benzerlik bu zamanı uzatmaktadır (13). Böyle bir bankanın deri vericileri öncelikle kadavralar olmalıdır. Ölüm sonrası alınan derilerin banka şartlarında uzun süre saklanması imkanı vardır. Bu süre yıllarla ifade edilebilir. Bondoc ve Burke isimli araştırmacılar allogreftleri kronik, atonik yaralarda da kullanmışlar ve iyi sonuçlar almışlardır (14). Yine Teepe ve arkadaşları da bu konuda çalışmalar yapmışlar ve kronik yaralara konulan allogreftin hastaların yalnızca ağrısını dindirmekle kalmadığını, aynı zamanda granülasyon dokusunu ve bazal membran tabakası oluşumunu da hızlandırdığını göstermişlerdir (15). Böylece allogreft derilerin kullanım endikasyonlarına bir yenisini eklemişlerdir.

Deri Grefti Nasıl Tutar?

Bir deri greftinin tutması için üç aşama mevcuttur:

Plazmatik İmbibition

Revaskülarizasyon

Maturasyon

a-Plazmatik İmbibition Dönemi:

Alınan bir deri greftinde kanlanmanın bozulmasına bağlı rengi soluklaşır. Greftin içindeki damarlar kontrakte olur ve eritrositlerle dolar. Greft, alttaki dokuya fibrin ile yapışır. Fibrinojen, trombin, diğer enzimler ve eksuda salınımı olur. Bu aşamada deri grefti ile alıcı alan arasındaki irtibat canlı bir bağ değildir. Diffuzyon ile alış veriş olur. Deri greftlerinin plasmatik imbibition döneminde yüksek fibrinolitik aktivite nedeniyle kaybedilebilmeleri nadirdir. Ancak sıklıkla streptokok ve psödomonas gibi ajanlara bağlı fibrinoliz nedeniyle greft kaybı görülmektedir. Alttaki doku ile teması olmayan deri greftleri vücut ısısında saklansalar bile dört günden sonra yaşayamazlar.

Bir deri grefti alıcı alana yerleştirildikten sonra kapiller dolaşımdan plazma absorbe etmeye başlar. Greft, bu dönemde ağırlığının %50'si kadar sıvı absorbe eder. Bu, ancak dolaşımın yeniden sağlanmasıyla çözülür. Bu sürenin uzunluğu greftin türüne bağlıdır. İnce kalınlıkta olan greftler plazmatik imbibition dönemini tam kalınlıktaki deri greftlerine göre daha iyi tolere ederler. Aynı zamanda alıcı alanın durumu da etkilidir. Zayıf kanlanan bir alana konan deri grefti için plasmatik imbibition süresi de daha uzun olacaktır (12, 16).

Transfer sonrası greft hücrelerinde anaerobik metabolizma başlamakta ve greft dokusunun pH 'sı saatler içinde 6.8'e düşmektedir. Enzimatik aktivite greftin yüzeyinden derine doğru azalmakta, ancak revaskülarizasyon ile birlikte ise derinden yüzeye doğru yeniden artmaktadır (12).

b-Revaskularizasyon Dönemi

Greft konulduktan 48 saat sonra başlar. Bunun için kabul görmüş üç teori mevcuttur: Bunlardan ilki 'inoskulasyon' yani ağızlaşma teorisidir. Primer revaskularizasyon olarak da bilinir. Buna göre alıcı alan ile greftin damarları arasında karşılıklı ilerleyerek ağızlaşma olmaktadır. Bu olay ikinci günden sonra gerçekleşir.

Sekonder revaskularizasyona göre ise alıcı yataktan yeni bir damarlanmanın greftin içine doğru gelişmesidir ki bu olay da ancak 4. ve 7. günler arasında gerçekleşir (9).

Üçüncü teori her ikisini de kapsamaktadır. Smahel ve Zoltan (17) tarafından tanımlanmış olup öncelikle inoskulasyon, ardından sekonder revaskularizasyonun olduğunu iddia eder. Lenfatik dolaşım ise genellikle arteriyel dolaşıma paralel olmakta ve daha çok inoskulasyon tarzında olmaktadır (12).

c-Maturasyon Dönemi

Revaskularizasyon sonrası greftte mitoz başlar 7 kat daha ince hale gelir (17). 10 gün sonra ise deskuamasyon olmakta ve normal kalınlığa gelmektedir.

Deri Grefti Reddi

Deri greftlerinde red olayı immunolojik bir olay olup greftin tutmamasından farklıdır. Endotel hücrelerine karşı geliştirilmiş antikor cevap ve bunun sonucunda oluşan olaylar dizisi greft reddinden sorumludur. Endotel harabiyetinin sonucu olarak subendotelial kollajen açığa çıkar. Ardından intrinsek pıhtılaşma sistemi aktive olur. Kompleman sistemi aktivasyonu ve trombosit kümeleşmeleri meydana gelir. Sitoliz oluşur ve konulan deri iskemi nedeniyle kaybedilir (16).

Hücresele düzeyde bu olayın gerçekleşmesi ise greft materyalindeki allojenik MHC antijenlerinin anlaşılması ile çözülmüştür. Efektör mekanizma bir takım maddelerin salınması ile harekete geçer (18). Greft reddinden sorumlu temel uyaran donör tipi intersitisyel dendritik hücreler ya da donörün antijenlerini karşılayan alıcıya ait dendritik hücrelerdir. Ancak donör dendritik hücreleri allogreft reddinden en çok sorumlu potent uyandır (19). Bu, deri greftinden o bölgeyi drene eden lenf noduna doğru hızla ilerler (20).

Deride Langerhans hücreleri ve T lenfositleri gibi immunolojik aktif hücreler çoğunlukla epidermis yerleşimlidirler. Langerhans hücrelerinin makrofaj benzeri oldukları düşünülür ve bunlar deride antijen sunan temel hücrelerdir (21).

Deri Greftleri Tarihçesi:

Deri grefti tanımına uyan ilk kayıtlar yaklaşık 3000 yıl önce Hindular tarafından yapılmış olmakla beraber yayınlanan ilk çalışmalar 19. yüzyılın ilk yarısına aittir (22).

Elimizdeki ilk bilimsel yayın ise 1804 yılında koyunlardan tam kalınlıkta deri greftini alarak bir saat kadar dış ortamda beklettikten sonra başarı ile uygulayan While Baronio'ya aittir. O yıllarda bu çalışma klinik olarak uygulamaya girmemiş, ancak 1872 yılı sonrasında Reverdin, Ollier, Thiersch ve Wolfe'un başarılı klinik uygulamaları sonrasında adı anılır olmuştur. 1881 yılında Girdner isimli araştırmacı kadavra derisini homogreft olarak insana nakletmiş, ancak bu uygulama başarısız olmuştur. Brewer ise 1882 yılında kadavradan ve ampute olan bir bacadan amputasyondan 36 saat sonra deri grefti aldığını yazmıştır (23).

Jonathan Warren ve Joseph Pancoast ise 1840 ve 1844 yıllarında koldan yüze tam kalınlıkta deri greftini başarıyla nakletmişler ancak bu olay Avrupa'da pek yankı bulmamıştır. Reverdin 1869 yılında başarı ile yaptığı deri nakillerini yayınlamış, ardından Londra'da Pollock grefti kronik yaralarda uygulamıştır. Yine aynı yıllarda Amerika'da ise Hamilton Reverdin ekolünün takipçisi olmuştur. Ancak Reverdin greftleri adacık tarzında koyduğu için hem skatrizasyon fazla olmakta idi, hem de eklem kontraktürü gibi bir takım komplikasyonlar sık görülmekte idi. 1871 yılında Fransız Ollier bu tür problemlerin azaltılması için greftin adacıklar halinde değil, mümkün olan büyük bir parça halinde alınması gerektiğini vurgulamıştır.

Thiersch 1874 yılında Reverdin tarzı greftlemenin sorunlarını araştırmıştır. O'na göre ince kalınlıktaki greftlerin tutma ihtimali daha yüksek olmakta, ayrıca greftleme öncesi granülasyon dokusunun temizlenmesi gerekmektedir. Bu görüşlerini 1886 yılında Alman Cerrahi Kongresinde sunmuş ve bu prosedür günümüze kadar Thiersch greftleme olarak gelmiştir. 1885 yılında Von Eshmarc ve 1893 yılında Krause tam kalınlıkta deri grefti operasyonlarını yayınlamışlardır .

20 yüzyılda ise greft konusunda büyük yenilikler olmuştur. Finochietto 1920 yılında ilk kez alınan greftin kalınlığını ölçen bir alet geliştirmiştir. 1930'larda Humby dermatomu ve ardından Padgett ile Reese dermatomu geliştirilmiştir.

Geniş deri doku defektleri için file (mesh) greft uygulaması önerisi ise ilk kez 1930 yılında Douglas tarafından ortaya atılmıştır. Bu yaklaşım geniş deri doku defektleri ve yanıklar konusunda yeni bir yaklaşım ortaya koymuştur (12).

O'connor ve arkadaşları (1981) ise ileri teknoloji uygulamasının temeli olan ilk başarılı kültüre epiteliyal otogreft vakasını yapan ekip olmuştur (24). Ardından dev nevüslerde, degloving tarzı yaralanmalarda, epidermolizis büllosa ve kronik deri ülserlerinde kullanılır olmuştur.

Deri Grefti Saklanması ve Yaşayabilirliği Tarihçesi:

Bu konuda ilk çalışma 1903 yılında Wentscher tarafından yapılmıştır. Wentscher, insan derisini homogreft olarak yedi günlük ve ondört günlük iki ayrı saklama sonucunda ikincisinden başarılı sonuçlar almıştır (25). Carrel saklama solusyonu olarak bir çok deneme sonrasında vazelinin en iyi sonucu verdiğini iddia etmiştir. Preserve deri greftlerinin klinikte daha çok yararlı olabileceğini vurgulamıştır (26). Kubanyı aldığı otogreftleri hastanın kendi serumunda saklamıştır ve grefti aldıktan oniki gün sonra uygulamıştır (27). Brown ve McDowell 1943 yılında tam kalınlıkta deri greftini otogreft olarak buz kabı içerisinde 48 saat saklayarak başarılı bir şekilde uygulamışlardır. Bundan bir yıl sonra ise Webster vakalarını sunmuştur (23).

Vanni 1950 yılında domuz derisini 3 °C'de 2-7 gün kadar başarı ile saklamışken tavşan derisinde bu başarıyı yakalayamamıştır (28). 1954'te ise Pepper tavşan derisini 0 °C'de beş haftaya kadar saklamıştır (29). Aynı yıl Skoog ise tam kalınlıkta rat cildinin -3 °C'de üç haftaya kadar canlı kalabildiğini göstermiştir (30). Georgiade ve arkadaşları (31) aldıkları deri greftini buzdolabında 21 gün saklamışlar ve canlılığını göstermişlerdir.

Dondurma yöntemi ile deri greftini ilk kez saklayanlar ise Mider ve Morton olmuştur. Bu araştırmacılar rat derisini -50 °C ile -70 °C derece arasında izotonik serum içinde saklamışlardır. 1945'te Strumia ve Hodges aynı yöntemle dondurarak deri saklamışlardır. 1952'de Billingham ve Medawar dondurma öncesi 'cryoprotectan' ajan olarak %15'lik gliserol ile cildi işleme tabi tutmuşlardır (32). 1954'te Meedavar ve 1966'da Perry farklı saklama tekniklerini yayınlamışlardır. 1964 yılında ise Lehr ve arkadaşları dondurma sonrası başarılı bir deri otogreft transplantasyonu vakasını yayınlamışlardır (33).

3. MATERİYAL VE METOD

1. Bu çalışmada yaşları 25-35 arasında değişen (ortalama yaş 32) 16 erkek, 10 bayan toplam 26 hastanın pannikülektomi materyalleri steril şartlarda alınmıştır. Bunun için hastaların onayı alınmıştır. Greft donor alanı bu nedenle hastaların karın bölgesi olmuştur. Özellikle estetik kaygılarla abdominal dermo lipektomi yapılan olgular çalışmaya dahil edilmiş olup bu hastaların deriye ait ya da deriyi etkileyebilecek sistemik bir hastalığı bulunmamaktaydı. Diyabet, malignite ya da immun sistemi etkileyebilecek bir patolojisi olanlar da çalışma dışı tutulmuştur. Belli bir yaş grubundan hasta seçilmesi ile de standardizasyon sağlanmıştır. Yine bu hastalar ilaç kullanımı özellikle steroid ve benzerleri açısından sorgulanmıştır. Materyaller tam kalınlıkta deri grefti olarak ortalama 1 cm² büyüklükte epidermis, dermis ve cilt altı dokuları içerecek şekilde alınmış olup, epidermis ve dermis kalacak şekilde tüm cilt altı dokular uzaklaştırılmıştır.

PBS (Seromed L, 1815) dolu tüplerle laboratuvara teslim edilmiştir. Bu amaçla seçilen sıvının PBS olması bu mediumun yapısı ile ilgilidir. PBS, osmotik basıncı ve pH'sı dengeli bir taşıma mediumudur. Greftin çevre şartlarından en az şekilde etkilenmesi amacıyla hastalardan alınıp laboratuvara + 4 °C'ye konulmasına kadar geçen sürenin minimal olmasına özen gösterilmiştir. Çalışmalar laminar flow kabini altında yapılmıştır. Böylece de materyallerin çalışılan ortamla kontaminasyonu ya da enfeksiyon riski en aza indirilmiş olmaktadır.

2. Bu materyaller taze PBS ile yıkandıktan sonra kıllar pens yardımı ile alındı ve %70'lik etil alkol içine 2-3 kez 10 saniye süre olacak şekilde daldırılıp çıkarılarak bakteriyel kontaminasyona karşı temizlikleri yapıldı.

3. Steril serum fizyolojik ile 3 dakika süre ile yıkanıp alkolden temizlendi.

4. Serum fizyolojik kontrol grubu olmak üzere Ham's F-12 (Seromed, F 0813) ve DMEM (Sigma, D 6546) solusyonları üç ayrı saklama solusyonu olarak çalışıldı. Her üç gruptan altışar adet ve iki numunedede greft alınır alınmaz 'Kazanılan Hücre Sayısı' bakıldığı için toplam 20 numune kullanıldı. Her bir materyalin içine 36 ml'ye 1 cm² doku materyali olacak şekilde dağıtıldı. Materyaller steril santrifüj tüpleri içerisinde kapağı sıkıca kapatılarak +4 °C'de bekletildi. 6 parça 12. ve 16. günlerde mantar küfü gözlemi nedeniyle çalışmadan çıkarıldı.

5. Numuneler 21. güne kadar +4° C'ye sabitlenmiş buzdolabına konuldu. Bu süre içinde sürekli kontroller yapılarak herhangi bir sebeple buzdolabı ısısında değişiklik olup olmadığı kontrol edildi.

6. 21. günün sonunda laminar flow kabini içerisinde petri disklerle konulan deri biyopsileri PBS ile yıkandı (Resim 2). Gözlemde deri numunelerinin ödemli olduğu görüldü. Ancak bu, hazırlanan saklama sıvısı ile numune oranının 1/20 olmasına bağlandı. Çalışmamızı diğer deri grefti saklanması çalışmalarından ayıran özelliklerinden birisi de numunelerin saklama sıvısı emdirilmiş steril gazlı bez içinde değil, saklama sıvısının içerisine direkt olarak konularak yaşayabilirliğin gözlenmesi idi.

7. Daha önce yaptığımız pilot çalışma ile Tripsin EDTA (Seromed, L 2143) kullanılarak CO₂ 'li 37°C'deki inkübatör şartlarında epidermis-dermis ayrışım zamanı ortalama 105 dakika olarak belirlendi. Tripsin-EDTA böyle bir fonksiyonu hücreler arası bağları ve kalsiyum bağlarını gevşeterek sağlar. Tripsin EDTA ile böyle bir dermo- epidermal ayrışım sağlayarak yalnızca epidermisi elde edip değerlendirmek amacıyla bu şartlarda her numune ortalama 4 - 4,5 ml Tripsin EDTA solusyonu bulunduran petri kabında bekletildi.

8. Deri materyalleri Tripsin EDTA enziminin etkisini durdurmak amacıyla fetal inek serumu içeren ortama alındı. Çeşitli oranlardaki derişimine bakılarak bu enzimin etkisinin FBS'in hangi yüzde değerinde inhibe olduğu araştırıldı. Bu amaçla hazırlanan %15 FBS (Seromed, S O113) derişimindeki ortam ile tripsin EDTA etkisine bağlı hücre lizisinin olmadığı görüldü ve bu değer üzerinden çalışıldı. Pens ve penset yardımı ile epidermis dermisten kenarlarından başlayarak yavaşça çekilerek ayrıldı (Resim 3, 4).

9. Elde edilen epidermise iki bistüri yardımı ile mekanik ayrıştırma yapıldı (Resim 5). Takiben 6-7 dakika steril serolojik pipet ile ajitasyon yapıldı (Resim 6). Ajitasyon, hücre yığınlarının pipet içerisine hızlı bir şekilde çekilip bırakılması işlemidir. Böylece homojenizasyon sağlanmış oldu. Çalışmamızda dermal hücre bileşimi dikkate alınmamış olup epidermal hücreler gözönünde tutulmuştur. Dermal içeriğin viabilitesinin değerlendirilmesi ise buna uygulanacak işlemlerin farklı olması nedeniyle ayrı bir çalışma konusu olacak kadar geniş bir konudur.

10. Küçük parçalara ayrılan epidermis manyetik karıştırıcı ile (Resim 7) 20-30 dakika karıştırıldı. Bu sayede hücre yığınları (Resim 8) tek tek olacak şekilde ayrıştırılarak hücre süspansiyonu hazırlanmış oldu. Bu işlem sterilize edilmiş özel oktagonal bar (Resim 7) (Sigma, 211,533-1) ile standartlara uygun süre ve hızda yapılmıştır. Oktagonal bar, hücre süspansiyonunu oluşturan hücre yığınlarının tek tek hücreler haline gelmesini sağlamaktadır.

11. Hücre süspansiyonunun viabilitesi 1:1 oranlarında Trypan blue (Sigma, T 6146) boya testi ile yapıldı. Bu işlem öncesi boya ve hücre süspansiyonu karıştırılmadan önce 37 °C'ye dengelenmiş olmalıdır. Homojenize edilmiş süspansiyondan 10 µl alındı 10 µl trypan blue ile karıştırıldı. Boyanın nüfuzu için 2 dakika beklenildi. 5 dakikayı geçmeyecek şekilde sayım işlemi bitirildi. Bu sürenin daha uzun sürmesi halinde boya hücrelere toksik etki yapacak, hücreler ölecek, bu da yanlış sonuçlar çıkmasına sebep olacaktır. Sayım işlemi x100 büyütmeli ışık mikroskopunda gerçekleştirildi. Boya alan ve mavi renkli olarak gözlenen hücreler ise ölü hücre olarak kabul edilmiştir (Resim 9, 10, 11).

Membran hasarı olan hücreler geçirgen hale gelirler ve Trypan blue boyasını içine alacakları için mavi renkte görüleceklerdir. Hücre membranında %10 ve daha fazla kayıp varsa bu hücre ölü hücre kabul edilir.

12. Makler sayım kamerası ile hücre sayısı hesaplandı. Bu işlem için homojenize edilen hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak toplam 10 kare sayılır, bu on kare mililitredeki toplam hücre sayısına eşittir. Çapı 15 µ'dan büyük hücreler mitotik yeteneği çok zayıf kabul edildiğinden çalışma dışı tutulmuş ve sayısal değerlendirmeye alınmamıştır.

4. BULGULAR

+4 °C'de saklanan deri greftleri 3 haftanın sonunda değerlendirildi. Birim alandaki canlı hücre sayısı (V: Viabilite) ve canlı hücrelerin diğerlerine oranı (KHS: Kazanılan Hücre Sayısı) olarak iki ayrı parametre şeklinde değerler tablo haline getirildi (Tablo 3). DMEM, Ham's F-12 ve serum fizyolojik grubuna ait altışar adet olmak üzere toplam 18 adet deri grefti materyalinin yaşayabilirliği değerlendirmeye alındı.

Kontrol grubu olması bakımından materyal alınır alınmaz viabilite ve kazanılan hücre sayılarına bakıldı (Tablo 2). İki ayrı numunede çalışılan bu sonuçlara göre viabilite oranı %97,5 ve %98 bulundu. Kazanılan hücre sayısı ise 3,8 milyon ve 3,4 milyon bulundu. Bu değerler bizim için ulaşılması gereken optimum sayı olmakla beraber saklama sonrası hücrelerde belli bir kayıp olması ise kaçınılmazdır. Kazanılan hücre sayısı materyal metod kısmında bahsi geçen tüm işlemler yapıldıktan sonra elde edilen hücre süspansiyonunun makler hücre sayım kamarasına konulduktan sonra canlı ya da cansız görülebilen bütün hücrelerdir.

Sonuçlar Kruskal-Wallis tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi (34).

KHS anlamlı çıkmadı. V ise üç grup arasında farklı bulundu. Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını bulmak için ikili gruplar arası Mann-Whitney U (Düzeltilmiş Z testi) testi yapıldı. P değerlerinin yorumu için Benferroni düzeltmesi yapıldı (Tablo 4) (35). Sonuçlar tablo 5 ve tablo 6'da değerlendirilmiştir.

İzotonik serum ile DMEM ve İzotonik serum ile Ham's F-12 arasında anlamlı farklılık olduğu, ancak DMEM ve Ham's F-12 arasında viabilite açısından anlamlı bir fark olmamakla beraber Ham's F-12 sıvısında saklanan numunelerde yüksek çıkan viabilite değerinin DMEM' den farklı olarak içerdiği L-Glutamik asitten kaynaklandığı düşünüldü. İstatiksel olarak anlamlı olan viabilite farkının klinik uygulamalara da yansıtacağı ortadadır. Canlı hücre sayısı daha yüksek olan bir deri grefti numunesinin otogreft olarak uygulanmasında revaskülarize olma şansının daha yüksek, allogreft olarak uygulanmasında da alıcı alanda daha uzun süre kalacağı sonucuna varılabilir.

Kazanılan hücre sayısının serum fizyolojikte yüksek çıkması başlangıçta yanıltıcı olmakla birlikte bunun yalnızca mikroskopik inceleme sırasında inceleme alanına giren hücre sayısı olduğu ve canlı hücre anlamına gelmediği unutulmamalıdır. Ancak yine de serum fizyolojikte saklanan hücre süspansiyonunun incelemede nasıl görüntüye çok düştüğü bilinmemektedir. Bu bulgularla izotonik serumun deri grefti saklanması konusunda göz ardı edilmemesi gereken alternatifleri olduğu gösterildi.

TABLO 2:

MATERYALLER ALINIR ALINMAZ BAKILAN VİABİLİTE VE KAZANILAN HÜCRE SAYISI DEĞERLERİ

	SERUM FİZ.	
	V	KHS
N₁	98	3,8
N₂	97,5	3,4

TABLO 3:

3. HAFTA SONUNDAKİ VİABİLİTE DEĞERLERİ

	SERUM FİZ.		DMEM		Ham's F-12	
O	V	KHS	V	KHS	V	KHS
N₁	61	2,8	73	2,6	61	2,3
N₂	66	2,8	69	2,0	86	1,8
N₃	53	1,8	82	2,1	81	2,2
N₄	54	1,9	66	2,0	74	1,2
N₅	61	2,2	76	2,2	68	1,8
N₆	62	2,4	71	2,2	81	2,1
ORT	59,5	2,3	72,8	2,1	75,1	1,9

V : Tripan blue boyası ile boyandıktan sonra görülen canlılık= **Viabilite**

KHS : 1 cm² lik biyopsi alanından elde edilen keratinosit sayısı. Burada sadece küçük olan keratinositler sayıldı. Büyükler korneum tabakasına ait olup fazla işe yaramayacağı varsayılarak sayıma dahil edilmedi = **Kazanılan Hücre Sayısı**

N : Numune

Sonuçlar Kruskal-Wallis (KW) tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

V için

Kruskal-Wallis : 7,93

P : 0,019

KHS için

KW: 2,527

P : 0,283

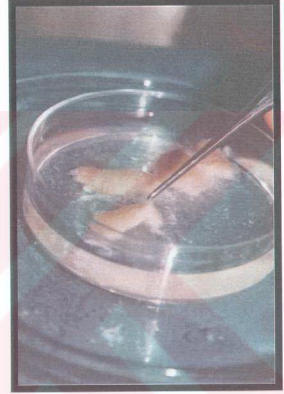
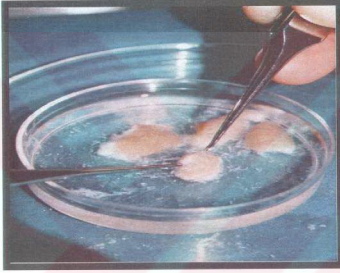
TABLO 4:

MANN-WHITNEY U TESTİ

	Z	P
SF-DMEM	2,81	0,015
SF-Ham's F- 12	2,43	0,045
DMEM- Ham's F-12	0,48	Anlamlı Değil p>0,15



Resim 2. Epidermis ve dermis ayrılmadan önce petri disk içerisinde PBS ile yıkama sonrası biyopsi örnekleri



Resim 3-4. Penset yardımı ile epidermisin ayrışımı



Resim 5. Mekanik ayrıştırma sonrası epidermis parçaları



Resim 6. Otomatik dispenser ile pipeting aşaması

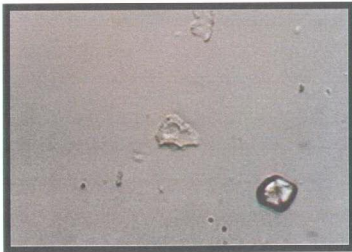
**Resim 7. Manyetik karıştırıcı içerisinde
epidermis parçalarının hücre
süspansiyonu haline gelme
aşaması**



**Resim 8. 'Clamp' olarak ifade edilen hücre
hücre grupları**

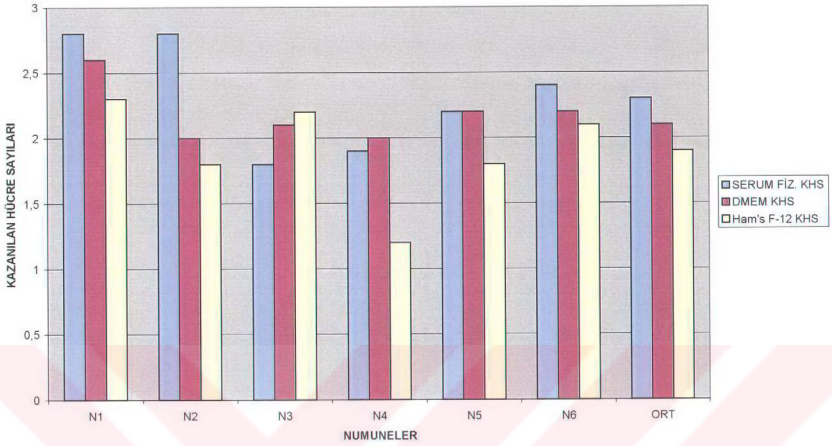


**Resim 9. Boyayı membrandan geçirmiş
ölü keratinosit. 200 FM büyütme**

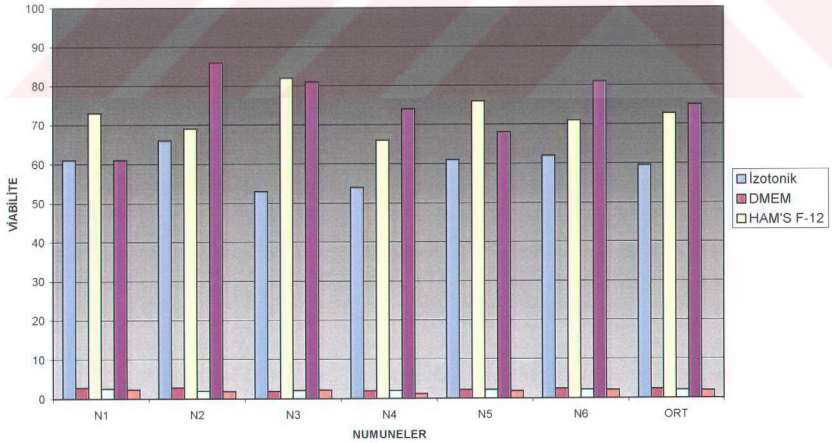


Resim 10-11. Boyayı membrandan geçirmemiş canlı keratinosit 200 FM büyütme

TABLO 5: 3. HAFTA SONUNDAKİ KAZANILAN HÜCRE SAYILARI



TABLO 6: 3. HAFTA SONUNDAKİ VİABİLİTE DEĞERLERİ



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Deri grefti saklanması için şu an kabul görmüş üç ayrı teknik mevcuttur:

1. +4 °C’de serum fizyolojik ya da kültür mediumu ile ıslatılmış gaz tamponda.
2. Gliserin ya da Dimetil sülfoksit içinde dondurarak.
3. Freeze-drying sonrası oda sıcaklığında bekletilerek.

Bunlar içerisinde +4 °C’de serum fizyolojik ile ıslatılmış gaz tampon içinde saklama en pratiği ve en sık kullanılanıdır (36). Belki de bunun en sık sebeplerinden birisi son iki tekniğin birinciye oranla daha pahalı olmasıdır. Saklama amacıyla kullanılan ısının +4 °C olması bu ısı derecesinde doku metabolizması bazal düzeyde kalırken buz-kristal formasyonuna karşı hiperosmolar hasarın önlenmiş olmasındandır (37).

Çalışmamızda saklama sıvısının hacmi özellikle yüksek tutuldu, çünkü Matsuka ve arkadaşları (36) saklama sıvısının hacmi arttıkça canlılık süresinin uzadığını göstermişlerdir. Buna bağlı olarak saklama sıvısı 36 ml. olarak belirlendi. Canlılık oranımızdaki yükseklik saklama sıvımızın alınan greft materyalinin yaklaşık 10-15 kat olması ile açıklanabilir (36).

Matsuka, viabiliteyi daha da artıracak düşüncesiyle kullandığı saklama sıvısını üç günde bir değiştirmiştir. Ancak bunun da kontaminasyon riskini artıracak unutulmamalıdır. Bu nedenle çalışmada böyle bir uygulamaya gidilmemiştir.

‘Trypan blue’ boyası ile boyama tekniği ise hücre yaşayabilirliği çalışmaları için kullanılabilen hücre membranının geçirgenliğine dayalı basit bir işlemdir. Bu çalışmada bu nedenle tercih edilmiştir. Ölen hücreler hücre zarı bütünlüğünü kaybeden hücreler olduğundan ‘Tripan blue’ boyası ile mavi boyanan hücreler olacaktır (38). Ancak hücrenin proliferasyonunu ve bölünmesini gösterme yeteneği yoktur (39).

Bir çok çalışmada saklanan deri greftinin viabilite ile değerlendirilmesi tartışılmıştır. Greftin saklama sonrası başarısının ancak otogreft olarak uygulanması sonrası vereceği sonuca bağlı olduğunu iddia edenler olmuştur. Yine Matsuka ve arkadaşları saklanan greftin viabilitesi ile klinik başarısının oldukça birbirine yakın olduğunu bildirmişler ve bunu deneysel olarak ratlar üzerinde yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir (36).

Bir derinin saklama sonrası klinik olarak kullanılması için maksimum sürenin 2-3 hafta olduğu bildirilmiştir (40). Bu çalışmada süreyi bu nedenle 3 hafta olarak belirledik. Ancak saklanan greftin hücre yaşayabilirliği bu çalışmada kriter olarak alınmıştır. Hücre yaşayabilirliği saklanan deri greftinden faydalanma derecesinin değerlendirilmesinde iyi

bir gösterge olarak kabul edilmiştir (39). Buna rağmen daha uzun süre deri grefti saklanması öneren araştırmacılar da (29) olmuştur. 3 hafta saklama fikri ise Wentscher'den Skoog'a kadar bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (36). +4 °C'de 3 haftayı geçen deri saklamalarında greftin viabilitesini sürdürme şansı oldukça azalmaktadır, çünkü epidermis piknotik hale gelmekte, vasküler yapılar bozulmaktadır. Materyal alınmasından sonra buzdolabına konulana kadar geçen süre minimal olmalıdır (38). Çalışmada buna dikkat edilmiştir.

+4 °C'de izotonik serum içinde deri grefti saklanmasında 2 haftanın sonunda deri grefti metabolizmasının % 50 azaldığı bulunmuştur (41). Buradan yola çıkarak izotonik serumun iyi bir saklama sıvısı olmadığı ve +4 °C'de uzun süreli saklamaların iyi sonuç vermeyebileceği söylenebilir.

Yine bizim çalışmamıza çok benzer bir çalışma yapan Matsuka ve arkadaşları deri greftini izotonik serum ile ıslatılmış tampon içinde saklamışlar ve 3 haftanın sonunda hemen hemen sıfıra yakın bir viabilite bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise deri grefti yüksek volümlü izotonik serumun içinde saklanmış ve belki de buna bağlı olarak viabilite literatürdeki bu çalışmadan daha yüksek bulunmuştur. Greftin direkt olarak saklama sıvısının içinde saklanması rehidrasyona neden olan bir uygulamadır. Bizim çalışmamızda izotonik serumda viabilitenin literatüre göre daha yüksek bulunması bu uygulamaya bağlı olabilir. Ancak buna rağmen DMEM ve Ham's F-12 sıvılarındaki canlılık oranı izotonik serumdan daha yüksek bulunmuştur.

Saklama solusyonu olarak geniş kabul görmüş ideal bir sıvı yoktur. Bizim seçtiğimiz DMEM ve Ham's F-12 besleyici trofik mediumlar olduğundan izotonik seruma üstünlüğe sahiptir. Nitekim 1984'te Hurst ve arkadaşları besleyici doku kültür mediumlarının izotonik seruma üstünlüğünü göstermişlerdir (37). Bu mediumlar deri grefti için gerekli olan ortamı ve hücrelerin ihtiyacı olan maddeleri azami ölçüde içermektedirler (TABLO 7, 8). Kültür mediumları ile yapılan saklamada greftin kalitesinde bir değişiklik olmadığı da yine aynı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (37).

Kültür mediumlarında saklanan deri greftlerinde viabilitenin daha yüksek bulunmuş olması araştırmacıları bunun sebebini aramaya yöneltmiştir. Buna yönelik ortaya atılan düşüncelerden birisi bunların genellikle glikoz içermeleridir (42). Bu doğru olsa da, yeterli bir açıklama değildir. Glikoz bunların taşıdığı maddelerden yalnızca birisidir. Bunun dışında inorganik tuzlar, amino asitler ve vitaminleri de taşımaktadırlar. Bununla birlikte tek başına bu düşünce doğru kabul edilse bile bizim çalışmamızla uyumlu görünmemektedir. Çünkü Ham's F-12 sıvısındaki glikoz miktarı DMEM sıvısının yaklaşık

dörtte biridir ve çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da Ham's F-12 sıvısındaki viabilite kısmen daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca glikozun hücre içine alımı için insülin gerekliliği bilinmektedir. Kültür mediumu içerisinde aerobik mi yoksa anaerobik metabolizma mı sürdürüldüğü tartışmalı bir konudur. Glikoz aerobik metabolizma için besleyicidir. Ham's F-12'de DMEM'den farklı olarak L-Glutamin içeriği genel olarak daha iyi bir destek sağlamış olabilir (43, 44, 45).

Hira ve arkadaşları da deri greftlerini karbondioksitli ortamda saklamışlar ve greftteki ATP ve glikoz düzeylerini daha yüksek bulmuşlardır (46). Bu da greftin böyle bir ortamda metabolizmasını yavaşlattığını ve daha az enerji harcadığını düşündürmüştür. Yine aynı araştırmacılar deri greftlerinin düşük ATP ve glikoz düzeylerinde bile canlı kalabildiğini göstermişlerdir. Greftlerin metabolizmasını yavaşlatmak yerine yaşaması için gerekli maddeleri içeren kültür mediumlarında saklanması daha uygun gibi görünmektedir.

Greft saklanması viabilite iyi bir gösterge olmasına rağmen bazı araştırmacılar dokudaki ATP ve glikoz düzeyi (40) ve saklama sıvısındaki oksijen miktarı ile deri tarafından bunun kullanılması gibi farklı değerleri esas almışlardır (47). Kearney ve arkadaşları viabiliteyi ortamdaki tetrazolium redüktaz enzimi düzeyini ölçerek göstermişlerdir (48, 49). Klinik açıdan da uygulanabilecek ve geniş kabul görmüş parametrenin hücre membranının sağlamlığı esasına dayalı olan çalışma olduğunu düşünmekteyiz (50).

İzotonik serum deri greftleri saklanması geniş bir kabul görmüş ve uzun süre cerrahlar tarafından yaygın olarak kullanıla gelmiştir. Ancak Hurst ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada izotonik serum ile diğer saklama ortamları karşılaştırılmış ve izotonik serumun gerilerde kaldığı vurgulanmıştır. İzotonik serum ile yapılan saklamada viabilite süresinin kısa olduğu, greftin ödematöz ve dayanıklılığının azalmış olduğu bulunmuştur. Bu tarihten itibaren mevcut greft saklama solusyonları konusunda büyük gelişmeler olmuştur ve alternatif saklama ortamları aranmıştır (40). Bizim çalışmamızda serum fizyolojiğe alternatif arayışımız bu temel mantığa dayandırılmıştır.

Çalışmada saklanan deri greftlerinden altı tanesi mantar kontaminasyonuna uğradı. Bu nedenle bunlar çalışma dışı tutuldu. Ancak çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda kontaminasyonun anlamlı bir sonuç farkına yol açmadığı bildirilmiştir: Titley ve arkadaşları 102 ince kalınlıkta deri greftini bakteriyolojik açıdan incelemişler ve anlamlı bir fark olmadığını vurgulamışlardır (51). 10^5 organizma/g değerinin üzerinde kontaminasyonu olan greft uygulamasının iyi sonuç vermeyebileceği belirtilerek kontaminasyon ve etkileri konusunda kantitatif bir değer ortaya konulmuştur ki klinik

olarak son derece yararlı bir bilgidir (52). Kontaminasyondan kaçınmak amacıyla saklama sıvısına antibiyotik de eklenebilir (39). Ancak böyle yapmak yerine kontamine olan numuneler çalışma dışı tutulmuştur.

Deri greftlerinin saklanması bir çok amaca yönelik olabilmektedir. Bunlar arasında farklı bir yöntem de kronik yaralarda allogreft olarak kullanılmalarıdır (53). Bondoc ve Burke yaptıkları çalışmada atonik yaralarda yaraya bakteriyel invazyonu, yaradan su kaçışını, protein kaybını ve ağrıyı önlemek amacıyla allogreft olarak dondurulmuş deriyi kullanmış ve bunları yayınlamışlardır (12). Yine bir başka deneysel çalışmada domuzlardan alınan deri greftleri -16°C 'de saklanmış, 6 ay sonra bile biyolojik bir örtü olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (54). Bu çalışma deri greftlerinin saklanması endikasyonlarına bir yenisini daha eklemekte ve belki de bir deri bankası kurulmasını gündeme getirmektedir. Yine aynı sebeplerle Teepe ve arkadaşları kronik deri ülserlerinde taze allogreftlerle kültüre allogreftleri karşılaştırmışlar ve kronik ülserasyonlar üzerindeki etkilerinde fark bulamamışlardır (13).

Bununla birlikte geniş deri doku defektleri için allojenik deri grefti ile akut dönem kapatma yerine 'kültüre epidermal otogreft' konulması alternatif olarak düşünülebilir. Teorik olarak bu düşünce doğru kabul edilse bile allojenik deri grefti uygulamasının önemi değişmemekte hatta daha da artmaktadır. Çünkü özellikle %60'ın üzerinde deri doku defekti olan hastalar için önerilen bu uygulama hem ucuz hem de elimizde anında hazır olmaktadır. Kültüre epidermal greftin ekonomik açıdan daha çok külfet getirmesinin yanında hazırlanması için 3 hafta gibi bir süre gerektirmesi de allojenik deri grefti ihtiyacını artırmaktadır (55, 56).

Allogreftlerin konuldukları yabancı organizma üzerine etki etmeyecekleri ve onların biyolojik yapısı ile uyumlu olmayacakları ise doğru değildir. Nitekim Eisinger ve arkadaşları kültüre allogreftlerin epidermal kaynaklı faktörleri salgılayarak adeta biyolojik bir membran gibi davrandıklarını göstermişlerdir (57). Bu faktörler yara kenarından salgılanan keratinosit proliferasyonunu ile migrasyonunu ve epidermal eklerin yapımını indüklemekte, kollajen kontraksiyonun ise azaltmaktadır. Dahası klinik çalışmalarda kültüre allogreftlerin kronik ülserli hastalarda yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmektedir (58, 59).

Backere saklama solusyonu olarak gliserolü önererek Avrupa deri bankası teklifini ortaya atmıştır. Bu çalışmanın temelini 1984'te Alman Ulusal Deri Bankası'nın deri grefti saklanması gliserolü kullanarak başarılı sonuçlar alması oluşturmuştur (60). Deri grefti saklanması yaygınlığı ve gördüğü kabul açısından son derece değerli olan bu çalışma

yanık merkezi olmaya aday merkezler için de deri bankası önerisini gündeme getirmektedir.

Deri grefti saklanması cryoprotectan ajan olarak değişik maddeler denenmiştir. Ancak bunların en ilginçlerinden birisi de saklama çözümü olarak balın kullanılmasıdır. Subrahmanyam +4 °C'de 12 haftaya kadar greftin canlı olarak kalabildiğini klinik çalışma ile göstermiştir (61).

Yukna freeze dried otojen deri greftlerini mukogingival defektlerde kullanmış ve normal otojen greftlerle farklı bulmamıştır (62). Bu çalışma 'Saklanan deri greftlerinin yaşayabilirliği histolojik olarak gösterilse bile klinik başarı için ölçü olabilir mi?' sorusuna da cevap niteliğindedir. Üstelik çalışma ağız içi gibi greft stabilitesinin zor sağlandığı bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Buradan yola çıkarak ekstraoral dokularda böyle bir çalışmanın sonuçlarının çok daha iyi olacağı düşünülebilir.

Burke 1978 yılında yaptığı bir klinik çalışmaya dayanarak dondurulmuş ya da banka greftlerinden oto ya da allogreft olarak kullanılanların sonuçlarının yine aynı greftlerden taze olarak elde edilenlerden çok farklı olmadığını iddia etmiştir. Yine bu çalışma ile banka grefti ile taze otogreft arasında bir karşılaştırma yapılmış olmaktadır (63). Burke'un araştırması deri grefti saklanmasına soğuk bakan araştırmacılar için hem de klinik olarak iyi sonuçlar vererek kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır.

İnsan derisinin viabilitesi domuz, tavşan, köpek, rat ve fare ile karşılaştırılmış ve insan cildinin çok az farklı olmak üzere tavşan cildinde yaşayabilirliğin en iyi olduğu bulunmuştur. Ancak 20 güne kadar olan yaşayabilirlikte ikisi arasında fark bulunmamıştır (64).

Deri grefti saklanması çok farklı ortamlar kullanılmıştır. Shepard ise yaptığı çalışmada ince kalınlıkta deri greftlerini kendi donör alanlarında saklamayı planlamış ve ortalama 14 güne kadar saklamıştır (65).

Allogreft olarak derinin kullanılması iyi gösterilmiş olsa bile klinikte doku reddi açısından ne söylenebilir? Bizim çalışmamız klinik bir çalışma olmadığından böyle bir soruya cevap aranmamıştır. Ancak, bu konuda literatürde verilmiş bir rakam yoktur, bununla birlikte Teepe (13) ve arkadaşlarının çalışmasında akut rejeksiyon görülmemiş, hatta immunsupressif tedavi alan bir hastada allogreft 3 ay kadar yaşatılmıştır. Bu sürenin uzaması yanıklı bir hasta için metabolik tablosunun düzelmesine yardımcı olacak, kronik yarası olan birisi için ise yara iyileşmesini hızlandıracaktır.

Dokuların saklanması, depolanması yalnızca deri için değil diğer organlar için de önemlidir. Çünkü böylece iskemi ve nekroz ihtimali azalmakta ve replantasyon sonrası o

organın yaşama şansı artmaktadır (66). Ampute olmuş doku ve organların uygun şartlarda saklanması ve taşınmasının önemi bir çok çalışmada vurgulanmış ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (67).

Wandall'ın yaptığı bir çalışmada deuterated mediumda deri grefti saklanmış ve bunun viabiliteyi artırmadığı gösterilmiştir (68).

Çalışmanın önemi şöyle sıralanabilir:

Greft kalite kontrolü ve alıcı tarafından beklenen kabul oranı ile saklama solusyonu kalitesini ortaya koyacak teknik başarıyla çalıştırılmıştır.

'Viabilite' nin bu parametreler için geçerli bir parametre olduğu görüşü doğrulanmış oldu. Bunun yanında greft saklanmasında uygun sıvının bulunması allogreft saklama çalışmalarına imkan tanımış oldu.

Diğer çalışmalara göre bir yenilik olarak, toplam hücre sayısı gündeme gelmiş oldu. Birim alan yaraya gelen keratinosit sayısı ve bunun yara iyileşmesine etkisi gündeme gelmiş oldu. Bir ileri teknoloji uygulaması olan epidermal hücre kültür grefti çalışmasının ilk basamakları başarıyla uygulanmıştır.

Tablo 7:**DMEM İÇERİĞİ (43, 44, 45, 69)**

KOMPONENT	D 6546 g/L
İNORGANİK TUZLAR	
Kalsiyum Klorid·2H ₂ O	0,265
Ferric Nitrat·9H ₂ O	0,0001
Mağneyum Sulfat (anhydrous)	0,09767
Potasyum Klorid	0,4
Sodyum Bikarbonat	3,7
Sodyum Klorid	6,4
Sodium Fosfat Monobasik (anhydrous)	0,109
AMİNO ASİTLER	
L-Arjinin·HCl	0,084
L-Sistin·2HCl	0,0626
Glisin	0,03
L-Histidin·HCl·H ₂ O	0,042
L-İzolösin	0,105
L-Lösin	0,105
L-Lizin·HCl	0,146
L-Metionin	0,03
L-Fenilalanin	0,066
L-Serin	0,042
L-Treonin	0,095
L-Triptofan	0,016
L-Tirozin·2Na·2H ₂ O	0,10379
L-Valin	0,094
VİTAMİNLER	
Kolin Klorid	0,004
Folik Asid	0,004
myo-İnozitol	0,0072
Niasinamid	0,004
D-Pantotenik Asit (hemicalcium)	0,004
Piridoksal·HCl	—
Piridoksin·HCl	0,004
Riboflavin	0,0004
Tiamin·HCl	0,004
DİĞERLERİ	
D-Glikoz	4,5
HEPES	—
Fenol kırmızısı·Na	0,015
Piruvik Asit·Na	0,11

Tablo 8:

Ham's F-12 İÇERİĞİ (70, 71)

	N6760
KOMPONENTLER İNORGANİK TUZLAR	(F-12) g/L
Kalsyum Klorid.2H ₂ O	0,0441
Cupric Sulfate.5H ₂ O	0,0000025
Ferrous Sulfate.7H ₂ O	0,000834
Mağnezyum Klorid.6H ₂ O	0,123
Mağnezyum Sulfat (anhydrous)	-
Potasyum Klorid	0,224
Potasyum Fosfat Monobasik (anhydrous)	-
Sodyum Klorid	7,599
Sodyum Fosfat Dibasic (anhydrous)	0,14204
Çinko Sulfat.7H ₂ O	0,000863
AMİNO ASİTLER	
L-Alanin	0,009
L-Arjinin.HCl	0,211
L-Asparajin.H ₂ O	0,01501
L-Aspartik Asit	0,0133
L-Sistein.HCl~H ₂ O	0,035
L-Glutamik Asid	0,0147
L-Glutamin	0,146
Glisin	0,00751
L.Histidine.Hcl.H ₂ O	0,02096
L-İzolösin	0,00394
L-Lösin	0,0131
L-Lizin.HCl	0,0365
L-Metionin	0,00448
L-Fenilalanine	0,00496
L-Prolin	0,0345
L-Serin	0,0105
L-Treonin	0,0119
L-Tryptofan	0,00204
L-Tirozin.2Na.2H ₂ O	0,00778
L-Valin	0,0117
VİTAMİNLER	
D-Biotin	0,0000073
Kolin Klorid	0,01396
Folik Asit	0,00132
myo-İnozitol	0,018

Niasinamid	0,000037
D-Pantotenik Asit (hemicatcium)	0,00048
Piridoksin.HCl	0,000062
Riboflavin	0,000038
Tiamin.HCl	0,00034
Vitamin B-12	0,00136



6. ÖZET

DMEM VE HAM'S F-12 SIVILARI İLE İLE DERİ GREFTİ YAŞAYABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Klasik bir bilgi olarak deri greftleri izotonik serum içinde saklanmakta ve gerek otogreft, gerekse allogreft olarak kullanılabilir. Saklanan bu greftlerin hücre yaşayabilirliğinin maksimum düzeyde tutulması klinik başarıyı artıracaktır. Ayrıca greft total keratinosit sayısını gündeme getirerek önemli bir parametre çalışıldı. Yaşları 25-35 arasında değişen 26 hastaya ait pannüklektomi materyalleri steril şartlarda elde edilmiştir. 6 materyal mantar kontaminasyonu sebebiyle çalışmaya dahil edilmedi. 36 ml'ye bir (1) cm² parça gelecek şekilde ve DMEM, Ham's F-12 solusyonları içinde +4 °C'ye sabitlenmiş buzdolabına konularak 3 hafta saklanmıştır. DMEM ve Ham's F-12 solusyonları dokular için besleyici özelliğe sahip sıvılardır. Bu sürenin sonunda materyaller PBS ile yıkanarak Tripsin EDTA ile muamele edildi. Epidermis dermisten ayrılarak manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu süspansiyona tripan blue boyası ile viabilite testi yapıldı.

DMEM ve Ham's F-12 ile elde edilen sonuçlar birbirine yakın ancak izotonik serumla göre oldukça yüksek bulunmuştur. Bu çalışma ile allogreft ve oto greft saklanması viabilitenin yeri olduğu ve başarılı olarak kullanılabilirliği gösterilmiş oldu.

7. SUMMARY

INVESTIGATION OF THE SKIN GRAFT VIABILITY WITH THE DMEM AND HAM'S F-12 FLUIDS

Storage of the skin graft in serum physiologic is an routine application and these grafts may be used as an otograft or allograft. Better clinical results can be obtained by having maximum viability levels of the skin grafts. In this study graft keratinocytes quantity was emphasized that is an important parameter for the storage. Skin grafts were prepared from panniculectomi materials of 26 patients which were between 25-35 years old under steril conditions. Six (6) samples were excepted from the study because of fungal contamination. Each 1 cm² skin grafts put into 36 ml. DMEM and Ham's F-12 mediums and preserved at +4 °C for 3 weeks. DMEM and Ham's F-12 fluids are nutrient mediums for the tissues. After 3 weeks storage period the skin grafts washed with PBS and transfered to Tripsin EDTA. Epidermis was separeted from dermis by mechanically and homogenized with magnetic mixer. Viability was measured after trypan blue application to the samples.

The results of the viability which was obtained with DMEM and Ham's F-12 were almost the same but both were better than serum physiologic. This study indicated that viability assesment is an important part for the storage of the skin otograft and allograft and may be applicated successfully.

8. KAYNAKLAR

1. Rudolph R, Ballantyne DL. In: McCarthy JG. Editors. Skin Grafts. Philadelphia:1990: 221-274.
2. Tüzün Y, Tüzün B, Katoğyan A. Normal Derinin Yapısı ve Gelişmesi. Tüzün Y, Katoğyan A editor. Dermatoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1994:17-28.
3. MacKie RM. In MacKie RM editors. Anatomy of the normal skin. New York:1998: 11-26.
4. Arnold HL, Odom RB, James WD. Diseases of the skin . In: Arnold HL, Odom RB, James WD. editors. The skin: Philadelphia: WB Saunders, 1990 :1-13.
5. Skin grafts. In: Green David P. Editors. Operative Hand Surgery. New York Churchill Livingstone, New York 1993: 1711-1713.
6. Skin Grafts. In: Mc Carthy J.G. editors. Plastic Surgery. U.S.A. W.B. Saunders Company, New York 1990:221-274.
7. Traest K, De Vos R, van den Oord JJ. Pagetoid Merkel cell Carcinoma. J Cutan Pathol 1999; 26 (7): 362-365.
8. Quereshy FA, Goldstein JA. Merkel cell carcinoma of the cheek: a case report. J Oral Maxillofac Surg 1999; 57 (8): 999-1004.
9. Skin Grafts In: Mimis Cohen editors. Mastery of Plastic and Reconstructive Surgery. Little, Brown and Company, New York 1994: 45-55.
10. Epstein E. Skin Surgery. 6th ed. Philadelphia. WB. Saunders Company.1987.
11. Geras AJ. Dermatology. 1st ed. Switzerland: Sandoz Pharma Ltd. 1990.
12. Chick L R. Brief history and biology of skin grafting. Ann Plast Surg. 1988; 21 358-365.
13. Ward EF, Mendell NR, Seigler HF, Macqueen JR, Amos DB, Factors Which have a significant effect on the survival of human skin grafts. Transplantation 1978; 26:3 194-198.
14. Bondoc CC, Burke JF, Clinical experience with viable frozen human skin and a frozen skin bank. Ann Surg 1971;174:3 371-382
15. Teepe R G C, Koebrugge E J, Ponc M, Vermeer B J. Fresh versus cryopreserved cultured allografts for treatment of chronic skin ulcers. British Journal Of Dermatology, 1990; 122 81-89
16. Wolff K, Stingl G. Cellular Interactions and the skin: The epidermis as an immune organ. Triangle- Sandoz Journal one Medical Science. Dermatology, 1987; 26:3/4 139.
17. Smahel J. The healing of skin graft. Clin Plast Surg 1977 4:409.
18. Wecker H, Auchincloss H Jr. Cellular mechanisms of rejection. Curr Opin Immunol. 1992; 3 : 561.
19. Setum CM, Hegre OD, Serie JR, Moore WV. The potency of splenic dendritic cells as alloantigen presenters in vivo. Quantitation of the number of cells required to achieve graft rejection. Transplantation 1990; 49 :1175.

20. Larsen CP, Steinman RM, Witmerpack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990; 172 : 1483.
21. Wolff K, Stingl G. The Langerhans cell. *J Invest Dermatol* 1983; 80: 16.
22. Hauben D J, Baruchin A, Mahler A. On the history of the free skin graft. *Ann Plast Surg* 1982;9 242-245.
23. Webster JP, Refrigerated skin grafts. *Ann of Surg* 1944; 120:4 431-449.
24. O'connor N E, Mulliken J B, Banks-Schlegel S et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981; 1 75-78.
25. Wentscher J, Ein weiterer beitrag zur iiberlebensfahigkeit der menschlichen epidermiszellen. *Dtsch Z Chir* 1903;70 21-44
26. Carrel A, The preservation of tissue and its application to surgery. *JAMA* 1912; 59, 523-527
27. Kubanyi E, Über provisorische aufbewahrung der zu transplantierenden Gewebe. Versuche mit überlebendem Gewebe. *Archiv. F. Klin. Chir.* 1930; 161 502-510
28. Vanni G, Auto and homotransplantation of skin preserved at low temperatures. *Plast Reconstr Surg* 1950; 6 161-170
29. Pepper FJ, Studies on the viability of mammalian skin autografts after storage at different temperatures. *Brit J Plast Surg* 1954; 250-256
30. Skoog T, An experimental and clinical investigation of the effect of low temperature on the viability of excised skin. *Plast Reconstr Surg* 1954;14 403-416
31. Georgiade NG, Perschel E, Brown I. A clinical and experimental investigation of the preservation of skin. 1956; 17: 267 - 271
32. Konstantinow A, Mühlbauer W, Hartinger A, Donnersmarck GGH, Skin Banking: A simple method for cryopreservation of split-thickness skin and cultured human epidermal keratinocytes. *Ann Plast Surg* 1991; 26:1 89-97
33. Lehr HB, Berggren RB, Lotke PA, Coriell LL, Permanent survival of preserved skin autografts. *Surgery* 1964; 56 742-746
34. Trapp RG. Basic & Clinical Biostatistics. Second ed. U.S.A. Beth Dawson- Saunders, 1994.
35. Brian SE. Statistical Methods for Medical Investigations. Second ed. U.S.A. John Wiley & Sons Inc. 1994.
36. Matsuka K, Hata Y, Yano K, Ito O, Matsuda H, Epidermal cell viability in rat skin preserved at 4 °C. *Ann Plast Surg* 1993; 31:4 358-363.
37. Hurst LN, Brown DH, Murray KA, Prolonged life and improved quality for stored skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 1984; 73 105-109.
38. Randolph MS, Wainwright JF. Integrated Study of the Structural and Metabolic Degeneration of Skin During 4 °C Storage in Nutrient Medium. *Cryobiology* 1985; 22:18-34.

39. Fahmy F S, Navsaira H A, Frame J D, Jones C R, Leigh I M. Skin graft storage and keratinocyte viability. *British Plast Reconstr Surg.* 1993;46 292-295.
40. Hurst LN, Lindsay WK, Lee J, Viability of skin grafts stored in various media. *Can J Surg* 1973;14: 209-209.
41. Lawrence JC. Storage and skin metabolism. *Br J Plast Surg* 1972; 25 440-453.
42. Zuker RM. Discussion: Prolonged life and improved quality for stored skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 1984; 73 110.
43. Smith, J.D., Freeman,G., Vogt,M. and Dulbecco, RThe Nucleic Acid of Polyoma Virus. 1960: 12, 185-196.
44. Morton, H.J., A Survey of Commercially Available Tissue Culture Media. *In Vitro.* 1970: 6, 89
45. Rutzky, L.P. and Pumper, R.W. Supplement to a Survey of Commercially Available Tissue Culture Media *In Vitro.* 1970; 9, 468.
46. Hira M, Tajima S, YamamotoY. The Metabolism of Skin Grafts Stored with Excess Carbon Dioxide. 1992; 89: 6 1122- 1128.
47. Alsbjörn BF, Jensen MG, Sqrensen B. Effect of Solcoseryl on Cadaveric Split Skin Oxygen Consumption During 4 °C Storage and in Frozen Biopsies *Cryobiology* 1989; 26: 119-123.
48. Kearney JN, Wheldon LA, Gowland G. Cryopreservation of Skin Using a Murine Model Validation of a Prognostic Viability Assay. *Cryobiology* 1990; 27: 24-30.
49. Ingham E, Matthews B, Kearney JN, Gowland G. The Effects of Varration of Cryopreservation Protocols on the Immunogenicity of Allogeneic Skin Grafts. *Cryobiology* 1993; 30: 4.
50. Jensen HS, Skin viability studies in vitro. Skin viability studies in vitro. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1984; 18 55-59.
51. Titley OG, Cooper M, Thomas A, Hancock K. Stored skin-stored trouble? *British Plast Reconstr Surg* 1994; 47 24-29.
52. Krizek TJ, Robson MC, Kho E. Bacterial growth and skin graft survival. *Surgical Forum* 1967; 18: 518-519.
53. Rappaport I, Pepino AT, Dietrick W. Early use of xenografts as a biologic dressing in burn trauma. *Am J Surg* 1970; 120: 144-148.
54. Visuthikosol V, Punyahotra N, Wavykain T, Kruavit A, Boonpucknavig V. A study of Simplified Porcine Skin Preservation. *Ann of Plast Surg* 1993; 30: 341-344.
55. Rennekampff HO, Kiessig V, Hansbrough SF. Current Concepts in the development of Cultured Skin Replacements. *J of Surg Res* 1996; 62: 288-295.
56. Stark GB, Kaiser HW. Cologne Burn Centre Experience with Glycerol-preserved Allogeneic Skin:Part II: Combination with Autologous Cultured Keratinocytes. *Burn* 1994; 20: 34-38.

57. Eisinger M, Sadan S, Silver I A, Flick R B. Growth regulation of skin cells by epidermal cell-derived factors: implications for wound healing. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1988; 85 1937-1941.
58. Philips T J, Bhawan J, Leigh I M, et al. Cultured epidermal allografts: clinical use, survival, and expressions of maturation markers. *Clin Res* 1988; 36 684.
59. Clancy J M P, Shehade S A, Blight A E et al. Treatment of leg ulcers with cultured epithelial allografts. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18 1356-1357.
60. Backere AC. Euro skin bank: large scale skin-banking in Europe based on glycerol-preservation of donor skin. *Burns* 1994; 20:1 S4-S9.
61. Subrahmanyam M. Storage of skin grafts in honey. *The Lancet* 1993; 341 63-64
62. Yukna RA. Evaluation of the use of freeze-dried skin allografts in the treatment of human mucogingival problems. *J Periodontol* 1977; 48 187.
63. Burke JF. Contribution of frozen skin bank to treatment of massive burns. *Acta Med Pol* 1978; 19 1.
64. Rosenquist MD, Cram AE, Kealey GP. Skin preservation at 4°C: A species comparison. *Cryobiology* 1988; 25 31-37.
65. Shepard GH. The storage of split-skin grafts on their donor sites. *Plast Reconstr Surg* 1972; 49:2 115-122.
66. Belzer FO, Southard JH. Principles of Solid Organ Preservation by Cold Storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-676 .
67. Kitahara AK, Suzuki Y, Zhan CW, Wada H, Nishimura Y. Evaluation of New Improved Solution Containing Trehalose in Free Skin Flap Storage. *Brit J Plast Surg* 1998; 51:118-121.
68. Wandall JH. Healing of Splint Skin Autografts After Storage in Deuterated Medium. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1972; 6: 36-39.
69. Dulbecco, R. and Freeman, G. Plaque Production by the Polyoma Virus. *Virology*. 1959; 8, 396-397.
70. Ham RG. An Improved Nutrient Solution for Diploid Chinese Hamster and Human Cell Lines. *Exp Cell Res*. 1963; 29 515-526.
71. Ham RG. Clonal Growth of Mammalian Cells in a Chemically Defined, Synthetic Medium. *Proc Nat Acad Sci*. 1965; 53 288-293.