

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**KİSMİ KALINLIKTAKİ ALINAN GREFT DONÖR SAHASINA
UYGULANAN TRİTONE FORT® KREMİN 90 GÜNLÜK
İYİLEŞME SÜRECİNDE MELANOSİT SAYISI ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Dudu Dilek YALÇIN

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Turgut ORTAK

“Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 3111-TU-12 proje no.su ile desteklenmiştir.”

ISPARTA-2012

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim sırasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile çalışmamı yönlendiren tüm hocalarıma, tüm eğitim hayatım boyunca desteğini gördüğüm aileme, yine bu çalışmayı destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederim.

Dr. Dudu Dilek YALÇIN

Kasım 2012, ISPARTA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Derinin Anatomisi, Histolojisi ve Görevleri	3
2.1.1. Epidermis	4
2.1.1.1. Epidermisin Tabakaları	4
2.1.1.2. Epidermiste Bulunan Hücreler	5
2.1.2. Dermis	6
2.1.2.1. Papilla Katı (Papillary Layer)	6
2.1.2.2. Retikulum Katı (Reticular Layer)	6
2.1.3. Hipodermis (Subkutis)	7
2.1.4. Deri Ekleri	7
2.1.4.1. Ter Bezleri	7
2.1.4.2. Yağ Bezleri	7
2.1.4.3. Kıl ve Kıl Folikülleri	8
2.1.4.4. Erektör Pili Kasları	8
2.1.4.5. Tırnaklar	8
2.2. Deri Renginin Belirlenmesi	8
2.3. Deri Greftleri	9
2.3.1. Deri Greftlerinin Sınıflandırılması	9
2.3.1.1. Terminolojik Olarak Alıcı ve Vericiye Göre Sınıflama	9
2.3.1.2. Kalınlığa Göre Sınıflama	10
2.3.2. Kısmi Kalınlıkta Alınan Cilt Grefti Donör Sahasının Bakımı	10
2.4. Yara İyileşmesinde Melanositlerin Fizyolojisi	12
2.5. Melanin Sentezi	12
2.6. Tritone Fort® Krem İçeriğindeki Aktif Maddeler	15
2.6.1. Arbutin	15

2.6.2. Kojik Asit	15
2.6.3. Askorbik Asit	16
2.6.4. Glabridin	16
2.6.5. Nikotinamid	17
2.6.6. Glikolik Asit.....	17
2.6.7. Salisilik Asit.....	17
3. MATERYAL ve METOD	18
3.1. Çalışmada Kullanılan İlaçlar	18
3.2. Klinik Çalışmanın Dizaynı.....	18
3.2.1. Greft Donör Sahanın Oluşturulması	19
3.2.2. Klinik Çalışma	20
3.2.2.1. Hasta Profili	21
3.2.2.2. Histopatolojik Kesitlerin Değerlendirilmesi	22
3.2.2.3. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirme Yönteminin Belirlenmesi	29
4. BULGULAR.....	31
4.1. Tanımlayıcı İstatistikler	32
4.2. Melan A Boyası ile İşaretlenmiş Biyopsi Analizleri.....	32
4.3. Bulguların Değerlendirme Fotoğrafları.....	35
4.3.1. Hasta 6'nın Fotoğrafları.....	35
4.3.2. Hasta 10'un Fotoğrafları.....	36
4.3.3. Hasta 5'in Fotoğrafları.....	37
4.3.4. Hasta 2'nin Fotoğrafları.....	38
4.3.5. Hasta 3'ün Fotoğrafları.....	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	40
ÖZET.....	44
SUMMARY	45
KAYNAKLAR	46

SİMGELER ve KISALTMALAR

HE	: Hematoksilen- Eozin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HMB 45	: Melanoma Mouse Monoclonal Antikor
Melan A	: MART 1 Mouse Monoclonal Antikor
PBS	: Fosfat Buffer Saline
UV	: Ultraviyole
MITF	: Mikroftalmi İlişkili Transkripsiyon Faktör
α-MSH	: α Melanosit Uyarıcı Hormon
MCR-1	: Melanokortin 1 Reseptörü
TRP-1	: Tirozinaz İlişkili Protein 1
TRP-2	: Tirozinaz İlişkili Protein 2
E.R	: Endoplazmik Retikulum
DOPA	: 3, 4-Dihidroksi Fenilalanin
DHICA	: 5,6-Dihidroksiindol-2 Karboksilik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
DCT	: DOPA Krom Totomeraz

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Fitzpatrick cilt tipi sınıflanması anketi	9
Tablo 2. Hasta profili	22
Tablo 3. Hastalara ait alınan örneklerdeki HMB 45 ve melan A immunohistokimyasal boyalar ile sayılan aktif melanosit hücre sayıları	31
Tablo 4. Tanımlayıcı istatistikler	32
Tablo 5. Repeated measures anova testi - melan A boyası - mauchly's testi	33
Tablo 6. Repeated measures anova testi - melan A boyası - within – subjects efekti testi	33
Tablo 7. Repeated measures anova testi - melan A boyası - pairwise karşılaştırması	33
Tablo 8. Wilcoxon testi - melan A boyası - zaman boyutu bazlı karşılaştırma	34
Tablo 9. Wilcoxon testi - melan A boyası - tedavi türü bazlı karşılaştırma.....	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Derinin anatomisi.....	3
Şekil 2. Epidermal melanin ünitesi	5
Şekil 3. Melanin biyosentezi	13
Şekil 4. Melanosit hücresinde melanosom evreleri.....	14

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Çalışma modeli ve kullanılan cihazlar	20
Resim 2. Hasta 2'nin preoperatif ve postoperatif 1. gün alınan punch biyopsi örneklerinin H-E boyama görüntüleri	24
Resim 3. Hasta 2'nin postoperatif 21. gün alınan punch biyopsi örneklerinin H-E boyama görüntüleri	25
Resim 4. Hasta 2'nin postoperatif 90. gün alınan punch biyopsi örneklerinin H-E boyama görüntüleri	25
Resim 5. Hasta 1'in HMB 45 immunohistokimyasal boya ile preoperatif ve postoperatif 21. gün görüntüleri	26
Resim 6. Hasta 1'in HMB 45 immunohistokimyasal boya ile postoperatif 90. gün görüntüleri	27
Resim 7. Hasta 1'in melan A immunohistokimyasal boya ile preoperatif, postoperatif 21. gün görüntüleri	28
Resim 8. Hasta 1'in Melan A İmmunohistokimyasal Boya ile Postoperatif 90. Gün Görüntüleri	29
Resim 9. Hasta 6'nın fotoğrafları	35
Resim 10. Hasta 10'un fotoğrafları	36
Resim 11. Hasta 5'in fotoğrafları	37
Resim 12. Hasta 2'nin fotoğrafları	38
Resim 13. Hasta 3'ün fotoğrafları	39

1. GİRİŞ

Deri vücudun alan olarak en geniş organı olup, vücut sıcaklığının ayarlanması, sıvı elektrolit dengesi, vitamin D sentezi, fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere karşı vücudun korunması gibi görevleri üstlenmiştir. Cilt renginin gençlik ve güzelliğin evrensel işareti olduğu düşünülür ve cilt renginin homojen olarak görünmesi, parlaklığı, elastikiyeti kişinin sağlığı ile ilgili genel bir izlenim edinmeye yetebilir. Derideki skarlar, lokal renk değişiklikleri kişinin genel psikolojik durumu ve kişisel algılamasında sorun olarak yansıyabilmektedir. Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi'den istenen ve beklenen sonuç, herhangi bir girişim sonrası kalacak izin en az oranda olmasıdır. İyi bir yara izinin oluşumu birçok faktöre bağlıdır. Kişinin deri tipi, lezyonun vücuttaki yeri, lezyonun deri çizgileriyle olan ilişkisi, minimal doku hasarı, travmatik teknik, nekrotik ve yabancı cisimlerin debridmanı, gerginliğin en aza indirilmesi ile yara izinin en iyi şekilde iyileşmesi ilişkilendirilebilir. Yara izi ve renk değişikliği oluşumu en özenli yapılan tekniklerle önlenememektedir.

Greft, beslenmesi verici alandan tamamen ayrılan alıcı alanda mevcut yeterli beslenmeyi sağlayacak yataktan beslenerek canlılığını devam ettiren doku parçası olup Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahide oldukça sık kullanılmaktadır. Vücudun herhangi bir yerinden başka bir lokalizasyonuna transfer edilen doku; kemik, kıkırdak veya deri olabilir. Deri grefti cildin epidermis ve dermis tabakalarını içerir. Primer olarak onarılamayacak defektlerin kapatılmasında değerli bir seçenektir. Kısmi kalınlıkta alınan deri greftlerinin donör sahaları deri eklerinden yeniden epitelize olarak iyileşmektedir. Donör sahanın bakımı ve iyileşmesi ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma olup en optimal tedavinin hangisi olduğu konusunda görüş ayrılıkları mevcuttur. Greft donör sahası iyileşmesinde sıvı kaybı, ağrı, uzun iyileşme süresi, enfeksiyon gibi bazı komplikasyonlar görülebilmekte ve greft donör sahası ileri dönemde hipertrofik skar veya pigmentasyon bozuklukları ile kötü bir görünüme sahip olabilmektedir. Pigmentasyon bozukluğu hiperpigmentasyon veya hipopigmentasyon şeklinde görülebilir. Ancak hastada hangi tip pigment bozukluğunun olacağı önceden net olarak bilinmemekte olup kişinin genetik yapısı ve cilt tipi ile ilişkilendirilmektedir.

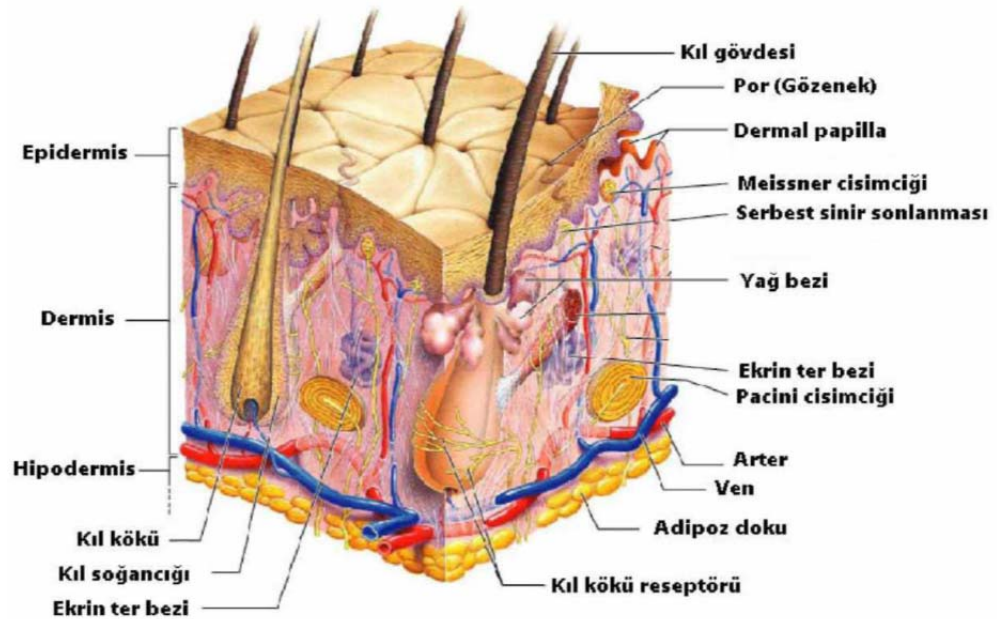
Çalışmamızda, kısmi kalınlıkta alınan deri grefti donör sahasında oluşabilecek pigment değışikliklerinin araştırılması amacıyla, Tritone Fort® krem ve plasebo uygulanmış kısmi kalınlıkta alınmış greft donör sahalarından preoperatif, postoperatif 1.gün, postoperatif 21. gün ve postoperatif 90. gün alınan deri biyopsilerinde aktif melanosit sayımı yapılarak melanosit sayısı üzerine Tritone Fort® kremin etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Anatomisi, Histolojisi ve Görevleri

Deri yaşam için gerekli bir çok koruyucu görevi yerine getiren iki katmanlı bir organdır. Ektodermal kaynaklı epitel tabaka olan epidermis ve mesodermal kaynaklı bağ doku tabakası olan dermisten oluşur. Dış epidermal tabaka ölü hücre ve keratinden oluşur ve önemli bariyer fonksiyonu göstererek bakteriyel ve çevresel toksinleri uzak tutar. Bazal epidermal hücreler yeni epidermal hücreler için kaynak oluşturur. Derin dermal tabakası, epiderminin yeniden restorasyonunu da içeren bir çok önemli fonksiyona sahiptir (1).

Derinin gerçek kalınlığı kişinin yaşına, cinsine ve vücuttaki bölgelere (epidermis/dermis kalınlığı) göre değişir. Yenidoğanın derisi erişkinlere göre 3.5 kat incedir. 5 yaşında erişkin kalınlığına ulaşır. Kadınlarda özellikle dermal tabaka incedir. El ayası ve ayak tabanında en kalın, göz kapakları ve postauriküler alanda en incedir (2).



Şekil 1. Derinin anatomisi

2.1.1. Epidermis

Epidermis esas olarak çok katlı keratinize yassı epitelden oluşur. Daha nadir olarak 3 hücre tipi daha içerir; Melanosit, Langerhan's hücreleri ve Merkel hücresi. Epiderminin dalgalı kısmı rete askısı olarak adlandırılır ve epiderminin dermise yapışmasını bazal membran yardımıyla artırır (3). Dermisten başlayarak epidermis 5 tabakadan oluşur (1).

2.1.1.1. Epiderminin Tabakaları

Taban Katı (*Stratum Basale, Stratum Germinativum*): Bazal lamina üzerine oturmuş tek sıralı kubik, alçak prizmatik hücrelerden oluşur. Stratum bazale mitotik aktivite ile karakterizedir ve epidermis hücrelerinin yenilenmesinden sorumludur (1).

Dikensi Kat (*Stratum Spinozum*): Çok yüzlü (polihedral) ve hafifçe yassılaştırmış hücrelerden oluşur. Az sayıda mitoz görülür. Bu hücrelerin en belirgin özelliği, sitoplazmadan komşu hücrelere doğru uzanan parmaklı hücre uzantılarının içini dolduran sitokeratin filaman demetleri (tonofibril) ve bunların sonlandığı noktalardaki desmozomlardır. Epiderminin sağlamlığı, bu tabakadaki hücrelerden kaynaklanır (1).

Granüllü Kat (*Stratum Granulosum*): Yassılaştırmaya yüz tutmuş 3-5 hücre tabakasıdır. Çekirdeklerin ortada yer aldığı bu hücrelerin sitoplazmasında bol sitokeratin filamanlarının yanı sıra keratohiyalin granülleri vardır. Derinin su geçirmezliğini sağlayan en önemli yapısal engeli bu tabakadır (1).

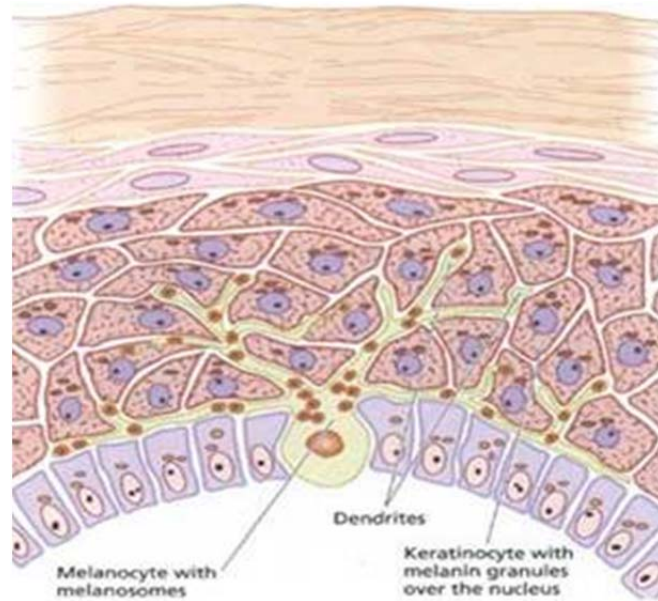
Şeffaf Kat (*Stratum Lucidum*): Hücreleri çok yassı olup organel içermez. Çok yoğun keratin filamanları ve keratohiyalin proteininin değişimiyle ortaya çıkan elaidin maddesini barındırır (1).

Boynuzsu Kat (*Stratum Corneum*): Boynuzsu kat, yassı hücrelerin üst üste 15-20 katman yapacak şekilde yığılmasıyla ortaya çıkar. Hücreler, çekirdek içermez ve sitoplazma keratin ile doludur (1).

2.1.1.2. Epidermiste Bulunan Hücreler

Keratinosit: Keratinize epitel hücrelerine keratinosit denilir. Keratinositler derinin bir nevi “*Stem cell*” hücreleri olarak kabul edilmektedir. Çoğalarak ve değişikliğe (diferansiyasyon) uğrayarak üst katları oluşturur. Esas görevleri “*keratin*” denen fibriler proteinleri sentezlemektir. Keratinositler, immün cevap gelişiminde de bazı sitokin ve inflamatuvar mediatörleri salgılayarak rol alırlar. Epidermal hücrelerin %90-95’i keratinositlerden oluşur (1).

Melanosit: Taban katındaki keratinositlerin arasında tek tek bulunan hücrelerdir. Embriyon döneminde sinir kabartısındaki (krista nöralis) hücrelerden köken alır. Deriye göç eder ve 11 haftalık insan embriyolarında deri biyopsilerinde belirlenebilir. Doğum sonrası yaşam sırasında melanositler epidermin bazal tabakasında bulunur. Bazal tabaka hücrelerinin 4-10’da biri melanositlerden oluşmaktadır (epidermal hücrelerin yaklaşık olarak %3-5’i). Hematoksilin-Eozin (H-E) ile sitoplazmaları açık renkte görülür (clear cell) (1). Bu hücrelerin dendritik uzantıları vardır. Bu uzantılar vasıtasıyla hücrede sentez edilen melanin, melanozom denen melanin paketleri halinde keratinositlerin üst bölümlerine taşınır. Bir melanosit 30-40 keratinositi melanize eder, bu sisteme epidermal melanin ünitesi denir (1).



Şekil 2. Epidermal melanin ünitesi

Langerhan's hücreleri: Dikensi kattaki (stratum spinosum) keratinositler arasında yerleşir. En çarpıcı oluşum sitoplazmadaki Bierbeck granülleri (vermiform granüller)'dir. Sinir kabartısından köken aldığı düşünülen Langerhan's hücrelerinin kemik iliğindeki öncü hücrelerden farklandığı bilinmektedir. Derinin immün yanıtında rol oynar (1).

Merkel hücreleri: Epiderminin taban katında, az sayıda bulunan hücrelerdir. İçerdiği granüllerin işlevi bilinmemekle birlikte yapı olarak sürrenal medullasındaki katekolamin içeren granüllere benzerliği nedeniyle nöroendokrin sistemde görev alan hücreler olabilecekleri düşünülmektedir (1).

2.1.2. Dermis

Embriyon gövdesinin mezoderm yaprağının iç paraksiyel bölgesinden köken alan dermis, yüzeysel yerleşimli papilla ve derin yerleşimli retikül olmak üzere 2 kattan oluşur.

2.1.2.1. Papilla Katı (Papillary Layer)

Üzerine epiderminin oturduğu bazal laminanın 3. tabakası olan retiküler lamina'daki ince kollajen demetleri (tip-VII kollajen içeren bağlayıcı lifler) hemen altındaki gevşek bağ dokusu ile bazal laminayı birbirine bağlar. Papilla katında bol miktarda bağ dokusu hücresi ve yaygın kılcak damar ağı ve temas, ağrı, ısı gibi duyuları alan serbest sinir sonlanmaları, kılıflı sinir sonlanmaları olarak kabul edilen duyu cisimcikleri yer alır; Paccini cisimciği basınç duyusunu, Meissner cisimciği temas duyusunu, Krause cisimciği soğuk duyusunu alırlar (1).

2.1.2.2. Retikulum Katı (Reticular Layer)

Çoğunluğu tip-I kollajen liflerinin oluşturduğu düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında olan bu katta papilla katına kıyasla daha az hücre bulunur. Elastin lameller özellikle yağ ve ter bezlerinin etrafında ağ meydana getirirler. Fibroblastların yanı sıra az sayıda lökosit, mast hücresine ve yağ hücresine rastlanır (1).

2.1.3. Hipodermis (Subkutis)

Deriyi alttaki organlara bağlayan bağ dokusuna denir. Derinin altındaki yapıların üzerinde hareket etmesini sağlar. Yaygın yağ dokusu hücresi bulunur (panniculus adiposus). Vücudun en belirgin yağ deposudur (1).

2.1.4. Deri Ekleri

Derinin epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarının yanı sıra ektoderm ve mezoderm yapraklarından oluşan oluşumlarına deri ekleri denir.

2.1.4.1. Ter Bezleri

Ekrin ve apokrin olmak üzere 2 tür ter bezi bulunur.

Ekrin Ter Bezleri: Basit kıvrıntılı tübüler bez biçimindedir. Dermisin derinlerine hatta hipodermise kadar uzanırlar. Ekrin ter bezlerinde salgının hücreden salgılanma tipi merokrin (ekrin)'dir, yani salgı içeriği salgı keseciklerinin ekzositozuyla hücre dışına verilir. Kolinerjik sinir lifleriyle innerve edilirler. Hemen tüm vücutta bulunurlar (1).

Apokrin Ter Bezleri: Aksilla, areola ve anüs gibi gövdenin bazı bölgelerinde bulunur. Ekrin ter bezleri gibi deri yüzeyine açılmak yerine kıl folikülü kanalında yağ bezlerinin açılma noktasına çok yakın olan bir yere açılır (1).

2.1.4.2. Yağ Bezleri

Yağ bezleri el ayası, ayakların tabanı ve yan tarafları dışında kalan bölümlerinde dermis ve epidermiste yer alan deri ekleridir. Lobüllü yapıdadır. Salgı ürününü, çok katlı yassı epitelle döşeli olan kıl folikülü kanalının 1/3 üst bölümüne boşaltır. Kıl folikülünün bulunmadığı vücut bölgelerinde ise doğrudan deriye açılır. En çok yüzde saçlı deride ve alında bulunur. Cinsiyet hormonlarının kontrolü altında çalışırlar (1).

2.1.4.3. Kıl ve Kıl Folikülleri

Dudaklar, el ayası, ayak tabanı, el ve ayak parmaklarının distal falankslarının distal yüzleri, penis ve klitoris başı, vulvanın küçük ve büyük dudaklarının içe bakan yüzleri dışında derinin tüm bölümlerinde bulunur. Kılların geliştiği organcıklar olan kıl folikülleri, epidermisin dermise ve /veya hipodermise doğru yaptığı çöküntülerle oluşur (1).

2.1.4.4. Erektör Pili Kasları

Bir ucuyla kıl folikülünün etrafındaki bağ dokusu kılıfına, diğer ucuyla da dermis papillalarına tutunan küçük düz kas hücreleri demetine erektör pili kası denir(1).

2.1.4.5. Tırnaklar

Keratinleşmiş epitel hücrelerinin sıkıca bir araya gelmesiyle oluşur.

2.2. Deri Renginin Belirlenmesi

İnsan deri rengi 4 pigmentce sağlanır. Bunlar:

Epidermis'te:

Eksojen üretilen karotenoidler (sarı)

Endojen üretilen melanin (kahverengi)

Dermis'te:

Kapillerde oksijene hemoglobin (kırmızı)

Venüllerde indirgenmiş hemoglobin (mavi)

Bunlar arasında deri renginin farklılığını belirleyen ana belirleyici melanindir. Deri pigmentasyonu, melanosit homeostazı, MITF-M 1 aracılığıyla melanin düzenlenmesi, tirozinaz ve diğer melanojenik enzim ve melanozom transferi ile melanin formasyonu içeren biyokimyasal ve hücrel süreçlerin sonucudur (4).

Fitzpatrick cilt tipi sınıflaması 1975 yılında Dr. Thomas Fitzpatrick tarafından geliştirilmiştir. Fitzpatrick'in cilt rengini belirlemek için kullandığı anket 2

bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler genetik özellikler ve güneşe maruz kalındığında derinin gösterdiği reaksiyondur. Bu sınıflama ile cilt tipi 6 kategoriye ayrılmıştır.

Tablo 1. Fitzpatrick cilt tipi sınıflanması anketi

Genetik Faktör					
	0	1	2	3	4
Göz rengi	Açık mavi Açık gri Açık yeşil	Mavi Gri Yeşil	Ela Açık- kahverengi	Koyu kahverengi	Kahverengimsi Siyah
Doğal saç rengi	Kızıl Sarışın	Sarışın	Koyu sarışın Açık kahverengi	Koyu kahverengi	Siyah
Doğal ten rengi (Güneşe maruz kalmadan önce)	Fil dişi beyazı	Hafif sarışın	Kumral	Bronz Açık kahverengi	Koyu kahverengi Siyah
Cidin güneşe temas etmeyen bölgelerindeki çil sayısı	Çok	Biraz	Az	Çok az	Yok
Cildin Güneş Teması sonrası Reaksiyonu					
Cildin güneşe karşı olan reaksiyonu	Her zaman yanar Kabarcık oluşur Soyulur	Genellikle yanar Kabarcık oluşur Soyulur	Orta derecede yanar	Çok nadir yanar	Yanmaz
Cildin bronzlaşma sıklığı	Hiçbir zaman	Ara sıra	Bazen	Genellikle	Her zaman
Cildin bronzlaşma derecesi	Hiç veya çok az	Hafif	Orta derece	Çok	Çok fazla
Yüzün güneşe hassaslık derecesi	Çok hassas	Hassas	Normal	Dirençli	Çok dirençli

Tip 1: 0-6 puan **Tip 2:** 7-12 puan **Tip 3:** 13-18 puan **Tip 4:** 19-24 puan **Tip 5:** 25-30 puan **Tip 6:** 31 ve üzerinde puan

2.3. Deri Greftleri

Greft, beslenmesi verici alandan tamamen ayrılan alıcı alanda yeterli beslenmeyi sağlayabilecek yataktan beslenerek canlılığını devam ettiren doku parçasıdır (2).

2.3.1. Deri Greftlerinin Sınıflandırılması

2.3.1.1. Terminolojik Olarak Alıcı ve Vericiye Göre Sınıflama

Otogreft: Alıcı ve verici aynıdır.

İsogreft: Alıcı ve verici arasında genetik benzerlik/aynılık mevcuttur.

Allogreft (homogreft): Aynı tür, farklı bireyden alınan grefttir.

Xenogreft (heterogreft): Farklı türden alınan grefttir (2).

2.3.1.2. Kalınlığa Göre Sınıflama

A) Kısmi (Split) Kalınlıkta Deri Grefti

Kalınlıklarına göre;

- a) Thin (ince) split-thickness (0,005-0,012 inch)
- b) Medium (orta) split-thickness (0,012-0,018 inch)
- c) Thick (kalın) split-thickness.(0,018-0,030 inch) olarak ayrılırlar.

B) Tam (Full) Kalınlıkta Deri Grefti

Tam kalınlıkta deri grefti tüm dermis ve epidermisi içerirken kısmi kalınlıkta deri grefti çeşitli oranlarda dermisi içerir. Bu tip greftler salgı bezleri, ter bezleri, saç follükülleri ve kılcıl damar gibi adneksal yapıları içerir. Donör saha primer kapatılır.

2.3.2. Kısmi Kalınlıkta Alınan Cilt Grefti Donör Sahasının Bakımı

Kısmi kalınlıkta cilt greftleri, rekonstrüktif cerrahide doku defektlerinin kapatılmasında sık kullanılan yöntemlerden biridir. Kısmi kalınlıkta deri greftlerinin alındığı verici sahaların tedavisi epitelizasyonla spontan iyileşme prensibine dayanır. Reepitelizasyonu, pilosebace birimler ve ter bezlerinden yürüyen epitel hücreleri sağlar. Ortalama olarak ince kısmi kalınlıkta deri greftinin donör alanı 10 günde, orta kısmi kalınlıkta deri greftinin donör alanı 10-21 gün arasında iyileşir. Daha kalın greftlerin donör alanları ise daha geç iyileşir.

Bugüne kadar greft donör saha bakımı için birçok pansuman yöntemi kullanılmış olmasına rağmen tedavisi hâlâ tartışmalıdır ve henüz standart bir yöntem bulunmamaktadır. Uygulanan pansumanlar yaranın açık ya da kapalı tutulmasından, kullanılan çok sayıda kimyasal ajanlar, antibiyotikler ve değişik antiseptiklere kadar çok değişkenlik göstermektedir. Gümüş nitrat, sülfamilon penisilin, vazelin, fucidin, jelonat (5-7), yine Opsite (8) ve selüloz (9) gibi sentetikler kullanılan maddelerden sadece bazılarıdır. İdeal bir pansuman malzemesi; dehidratasyonu önleyip oluşan eksüdayı absorbe ederken, yara yüzeyinde uygun bir nem sağlamalı, yara

iyileşmesini kolaylaştırmalı, enfeksiyonu önlemeli ve uygulamasının kolay olmasının yanında en az bakım gerektirmelidir. Böylece kullanılan materyal, altında epitelizasyonun gerçekleştiği koruyucu bir bariyer olarak iş görmelidir.

Bugüne kadar kullanılan farklı pansuman yöntemleri ve gereçlerinin ortak amacı; hızlı, sorunsuz, hasta memnuniyeti yüksek ve minimal skar bırakan bir yara iyileşmesi elde etmektir (10). Ancak bu iyileşme sürecinde epitelizasyon gecikmesi, enfeksiyon, sıvı ve elektrolit kaybı, kötü skar formasyonu ve ağrı gibi komplikasyonlar oluşabilmektedir (11). Donör alan pansumanlarını açık, yarı açık, kapalı, yarı kapalı ve biyolojik pansumanlar olmak üzere beş gruba ayırmak mümkündür (10). Bazı otörler açık yöntemi savunurlarken (12, 13) uygulamanın ağrı ve uzamış iyileşme süresi gibi dezavantajları da bildirilmiştir (14).

Yarı açık pansumanların ağırlı olduğu ve pansuman değişiminde yeni oluşan ince epitelin bütünlüğünün bozulduğu belirtilmektedir (15). Kapalı pansumanın dehidratasyonu, mekanik travmayı ve dışarıdan kontaminasyonu önlediği için, açık pansumandan daha üstün olduğunu düşünmektedirler (7, 16). Ayrıca kapalı pansumanın öncekilerden daha az ağırlı olduğu rapor edilmiştir (17).

Kılınç ve arkadaşları, verici sahaları kapalı, yarı açık ve açık bırakarak karşılaştırmışlar ve kapalı yöntemin diğerlerinden istatistiksel olarak daha hızlı iyileşme gösterdiğini bulmuşlardır (18). Ancak kapalı yöntemlerin özellikle geniş yüzeylerde pansuman altında sıvı birikme potansiyeline (19, 20) ve yüksek enfeksiyon oranlarına (10) sahip oldukları da bildirilmiştir.

Disa ve arkadaşları, kapalı pansumanla eksüdayı emici özelliği olan kalsiyum sodyum alginatı kombine etmişler ve komplikasyonsuz bir iyileşme elde etmişlerdir (21). Hâlâ sırları tam olarak çözülememiş olmakla birlikte yara iyileşmesi üzerine sayısız dış etken rol oynamaktadır ve bunlardan en önemlisi nemdir. Birçok çalışmada nemin yara iyileşmesi üzerine olumlu etkisi bildirilmiştir (22-24). Bunu açıklayan olası mekanizmalar:

- a. Epidermal hücrelerin nemli yara yüzeyi üzerinde kuru yara kabuğunun altındakine göre daha kolay ve hızlı göçü (22, 24)
- b. Oksijen parsiyel basıncında artış (23)

c. Yara eksudasında mevcut büyüme faktörleri ve proteinazların korunması(25, 26)

d. Yara yatağındaki bakteri florasının değişmesidir (27, 28).

Ayrıca nemli ortamda artmış fibrinojen ve fibronektin çökeltisi de reepitelizasyonu uyarmaktadır (29).

2.4. Yara İyileşmesinde Melanositlerin Fizyolojisi

Derinin tüm yapısal elemanları skar formasyonunda yer alırlar, böylece yaranın rengi çevre normal dokudan ayrılır. Çünkü epidermisin hücresel komponentleri kalitatif ve kantitatif değişikliklere uğrar. Epidermisteki pigment değişikliklerinin ana nedeni yara iyileşmesi sırasında epidermal melanin ünitesinin dağılması ve ünite üyelerinin (keratinositler ve melanositlerin) reepitelizasyon sırasında farklı davranmalarıdır. Keratinositler normalde çok hızlı bölünürken melanositler daha yavaş hızla bölünürler. Melanositler UV radyasyonuna maruz kaldıklarında ve yara iyileşmesi sırasında daha yüksek hızda bölünürler ve biraz gecikmeyle ilerleyen keratinosit tabakalarını takip ederler. Yaradaki melanositler cerrahi travmadan 10 gün sonra sayıca normalin üstünde bir artışa uğrarlar (30).

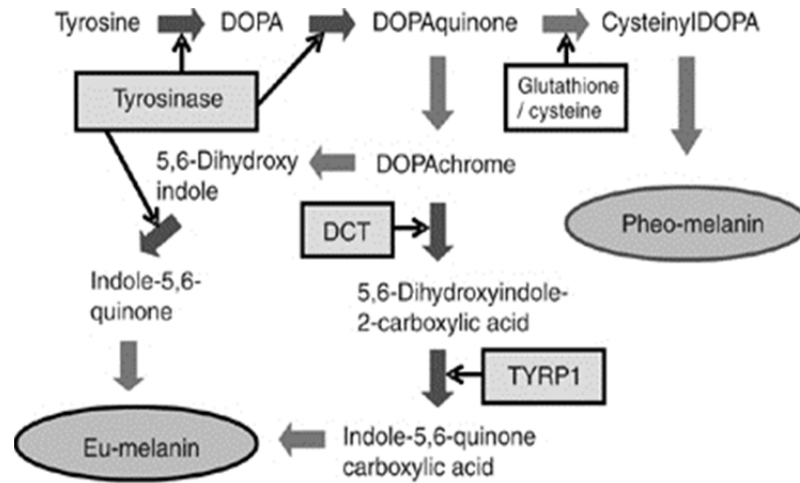
Yara iyileşmesinde melanositlerin sayısal değişikliğinden daha da önemli olan yeni oluşan epiteldeki melanosit morfolojisindeki değişiklikler olabilir. Melanositler her iki ucunda iki major dendrit olan iğ şeklini alabilirler ve bu yüzden keratinositlere dendritik yapışma normalden sapma gösterir. Dolayısıyla melanozom transfer hızı da eskisi kadar hızlı olmayabilir (31).

2.5. Melanin Sentezi

Memelilerde pigmentasyon için α -melanosit uyarıcı hormon (α -MSH) gereklidir. α -MSH melanokortin 1 reseptörüne (MCR1) bağlanır ve siklik AMP (cAMP) düzeyini artırır ve buda melanosite spesifik transkripsiyon faktörünü yani mikrooftalmi ilişkili transkripsiyon faktörünü (MITF) aktive ederek melanogenezi uyarır (32-35). Melanin sentezi temel olarak tirozinaz, tirozinaz ilişkili protein 1 (TRP-1) ve tirozinaz ilişkili protein 2 (TRP-2) tarafından regüle edilir. Tirozinaz bakır içeren tip I membran glikoproteinidir ve melanogenezde hız sınırlama

enzimidir. Tirozinaz ilk olarak endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenir ve Golgi cisimciğinde kompleks şeker modifikasyonları ile olgunlaşır. Golgi cisimciğinde diğer adım ise trans-Golgi ağından melanozomlara uzanan trafiktir (36). Tirozinaz ubikuitin-aracılı proteazom yolu (37, 38) ve lizozomal yol aracılığıyla parçalanır (39). Diğer proteinlere benzer şekilde sentez ve parçalama arasındaki denge tirozinazın hücre içi protein seviyesine göre ayarlanır.

Tirozinaz melanin sentezinde ilk olarak tirozinin DOPA'ya hidroksilasyonunu katalizleyerek ikinci olarak da DOPA'nın DOPA-kinona oksidasyonunu katalizleyerek bifonksiyonel etki gösteren bir enzimdir. TRP-2, DOPA kromun tekrar düzenlenerek 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asite (DHICA) dönüşümünü katalizleyerek DOPA krom totomeraz olarak fonksiyon görür. TRP-1 ise DHICA'yı karboksillenmiş bir indol-kinona okside eder (40).



Şekil 3. Melanin biyosentezi

Memelilerde melaninin başlıca iki tipi vardır; siyah/kahverengi eumelanin ve sarı/kırmızı feomelanin. Eumelanin ve feomelanin içinde tirozinaza ihtiyaç vardır. Melanozomlar melanin pigmentinin sentezlendiği organeller içinde sınırlanmıştır. Önceki araştırmalar deri pigmentasyonunun epidermal hücreler içindeki pigment granüllerinin sayısına, kümesine ve dağılımına bağlı olduğunu göstermiştir (41). Bronzlaşmamış ciltte melanin pigmentleri epidermin bazal tabakasında, bronzlaşmış ciltte ise derinin tüm katmanlarında yer almaktadır (42).

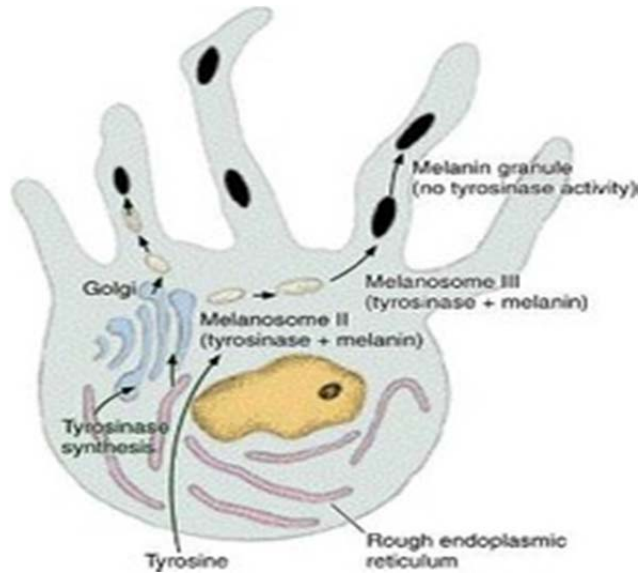
Melanozomlar olgunlaşma safhasına göre birçok farklı morfolojik bölümden geçmektedir (43). Bunlar;

I. EVRE melanozomlar: Küre şeklinde olup melanin içermezler.

II. EVRE melanozomlar: Ovaldirler, ilk melanin depolanması burada görülür.

III. EVRE melanozomlar: Elektron yoğun melanin içerirler, tirozinaz aktivitesi çok yüksektir.

IV. EVRE melanozomlar: Opak melanin içerirler, tirozinaz aktivitesi azalmıştır.



Şekil 4. Melanosit hücresinde melanosom evreleri

Melanozomların keratinositlere taşınımı çekirdeğini UV'den koruma olarak algılanmaktadır (43). Mikroskop çalışmaları melanozomların ağırlıklı olarak koyu deride keratinositlere tek tek dağıldığını rapor etmektedir, açık ten renginde ise genel olarak kümelenmiş şekilde görülür (44, 45). Keratinositlerin epidermis hücresine doğru yukarı yayılmaları sırasında hem hücre hem de pigment organelleri dağılır (42). Melanin sonunda atılır, ancak melanozomlarda bulunan aminoasit, lipid ve karbonhidratlar kornifiye tabakadan önce yeniden emilerek epidermal metabolizmada kullanılırlar. Dolayısıyla, epidermin melanizasyonu statik değil, süreğen yenilenmeyi gerektirir (31).

İnsan derisinin melanin pigmentasyonu Constitutive (Esas) ve Facultative (İndüklenebilir) olmak üzere iki komponente ayrılır.

Constitutive (Esas) olan deri pigmentasyonu güneş radyasyonunun herhangi doğrudan etkisi olmaksızın hücrel genetik programa göre üretilen kutanöz melanin pigmentasyonudur (Güneşten korunan vücut bölgelerinin rengidir) (31).

Facultative (İndüklenebilir) deri pigmentasyonu ya da bronzlaşma, kısa ömürlü anında (immediate) bronzlaşma ve delayed (ertelenen) reaksiyonlardır ki, her ikisi de UV radyasyonu ile oluşurlar. UV'e maruziyet kesilince esas seviyeye dönüş olur, çünkü fakültatif değişiklikler reversible'dir (31).

2.6. Tritone Fort® Krem İçeriğindeki Aktif Maddeler

2.6.1. Arbutin

Arbutin ayı üzümü bitkisi yapraklarından elde edilen bileşenlerden biridir, daha az miktarda kıvılcık, armut ve yaban mersini meyvesi yapraklarında da bulunur (4). Messenger RNA ekspresyonunu etkilemeden tirozinaz aktivitesini düşüren ve doğal olarak oluşan madde glukonopiranosiddir (46, 47). Arbutin melanozomların olgunlaşmasını inhibe eder (48). Ancak melanositler için toksik değildir (46). Arbutinin etkinliği yüksek konsantrasyonlarda düşük olanlara göre daha etkilidir, ancak paradoksal hiperpigmentasyona da sebep olabilirler (47). Laboratuvar çalışmalarında hiperpigmentasyon bozuklukları tedavisinde arbutinin hidrokinona göre melanositler üzerinde daha az toksik etki yaptığı bulunmuştur. Günümüzde sentetik formda α -arbutin ve deoksi-arbutin olarak bilinen maddenin tirozinaz inhibisyonu bitkisel olarak kimyasaldan türetilenden daha etkilidir (46, 49, 50). Amerika da %3 konsantrasyonunda arbutin bulunmaktadır, ancak hiperpigmentasyon için kontrollü deneyler gerçekleştirilmemiştir. Klinik çalışmalar %3 deoksiarbutinin açık tenli hastalarda solar lentigada etkili olduğunu göstermiştir (50).

2.6.2. Kojik Asit

Kojik asit doğal, hidrofilik mantarsı türevidir ve Acetobacter, Aspergillus ve Penicillium'dan geliştirilmiştir (48). Kimyasal olarak 5-hidroksimetil-4-hidroksi-pirone-4-1-one olarak bilinir (46). Tirozinazın güçlü bir inhibitörüdür ve enzimin aktif bölgesinde bakır şelasyonu yaparak etki eder (46, 51-53). Kojik asitle tedavi edilen melanositler nondendritik olur ve melanin içeriğinde azalma gösterirler (54).

Kojik asit %1-4 konsantrasyonlarda bulunmaktadır (55). %1 konsantrasyonda topikal olarak uygulanan kojik asit herhangi bir hassasiyet sergilememektedir (56). Ancak yapılan yeni uzun dönem çalışmalar kojik asitin potansiyel allerjiye, kontakt dermatite ve eriteme sebep olabileceğini göstermişlerdir (48, 56, 57). Bilinmiş bir sensitizördür ve hücre kültür çalışmalarında mutajenik olduğu gösterilmiş ve Japon piyasasında yasaklanmıştır (58). Kojik asitin depigmentasyon etkisi gösteren hiçbir klinik hakemli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle depigmentasyon maddesi olarak etkisi belirsizdir (4). Kojik asitin inhibitör aktivitesi kozmetik kullanımlarda yeterli potansiyele ve stabiliteye sahip olmadığından birçok yarı sentetik kojik asit türevleri genellikle C-7 hidroksil eter modifikasyonları, hidroksifenil eter, glikosid ve amid türevleri sentezlenmiştir (59).

2.6.3. Askorbik Asit

L-askorbik asit (AA) suda çözünen önemli bir antioksidandır ve depigmentasyon maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (60). Askorbik asit gümüş iyonları ile Dopa kinonu azaltarak ve dihidroksiindol-2-karboksil asit oksidasyonunu bloke ederek melanin üretimini engeller (46, 48, 61). Askorbik asit melanini siyahtan hafif bronz rengine çevirir (48, 62) Askorbik asit son derece kararsızdır. Aköz bir çözeltide hızlı bir şekilde okside olur ve bu nedenle biyolojik olarak aktif cilt açıcı ürün hazırlamak zordur. Magnezyum askorbid-2-fosfat gibi askorbat esterler bu tarz dezavantajları önlemek için sentezlenmiştir (63). Epidermiste tutunur, bu güneş kremlerine karşı bir avantajdır (64). Foto koruyucu etkisi vardır, UV kaynaklı radikal hasarı korur (65).

Askorbik asit ağartma formüllerinde hidrokinoon kombinasyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu tarz kombinasyonlar koyu tenli etnik gruplarda iyi tolere edilmektedir. Bununla birlikte askorbik asidin foto yaşlanma ve melasma tedavisinde biraz etkisi olduğu gösterilmiştir (66, 67).

2.6.4. Glabridin

Meyan kökü ekstreleri dünya çapında depigmente edici kozmetik ürünlerin çok yaygın bir bileşenidir. Meyan kökünde aktif maddeler glabridin, licochalcone A ve liquiritindir (68, 69). Liquiritin melanin dispersiyonu ile depigmentasyona neden

olur (70). Glabridin ana meyan kökü içeriğidir, süper oksit anyon üretim ve siklooksijenaz inhibisyonu ile antiinflamatuvar etki göstermektedir (62, 69). Glabridinin antioksidan olduğu kadar, siklo oksijenaz ve lipoksijenaz ürünlerinde çift inhibisyon aracılığıyla antiinflamatuvar olduğu gösterilmiştir (69, 71). Klinik öncesi çalışmalar glabridinin tirozinaz inhibitörü gibi çalıştığını göstermektedir (69). Mekanizması kojik asite benzemektedir (55). Meyan kökü ekstraktları ile ilgili çok az klinik çalışma vardır.

2.6.5. Nikotinamid

Nikotinamid suda çözünen, fizyolojik olarak aktif niasin (vit B3) derivativesidir. Hücre proliferasyonu veya tirozinaz aktivasyonu inhibisyonu yapmadan %35-68 oranında melanosom transferini azaltır (72, 73). Araştırmalar nikotinamidin ayrıca keratinositler ve melanositler arasındaki etkileşime (ör. hücre sinyal yolu) müdahale ederek, melanositler üzerine direkt inhibisyon yapmadan melanogenezini azaltabildiğini göstermektedir (72).

2.6.6. Glikolik Asit

Glikolik asit epidermolizi indükleyerek, bazal tabakada melanin dağılımını sağlayarak ve dermal kollajen sentezini artırarak çalışan doğal bir α -hidroksiasittir (74). Kimyasal peelingde %20-70'lik konsantrasyonda kullanılır ve peeling için su veya sodyum bikarbonat ile nötralizasyon gerektirir.

2.6.7. Salisilik Asit

Salisilik asit en eski kimyasal peeling ajanlarından biridir, 1882 de Alman dermatolog Unna tarafından tanımlanmıştır. Salisilik asit epitel hücreleri arasındaki interselüler lipid bağlantılarını kesintiye uğratarak keratolize neden olan bir β -hidroksiasittir (48, 75). Peeling amaçlı olarak %20-30 konsantrasyonda kullanılır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Çalışmada Kullanılan İlaçlar

Bu çalışmada kısmi kalınlıkta alınan deri greft donör sahasına Tritone Fort® (Akatis-AG) isimli kremin ve kontrol grubu olarak da sıvı vazelin uygulamasının iyileşme sürecinde melanosit sayısı üzerine etkisi araştırılmıştır.

Tritone Fort® krem içerisinde ;

%2 Kojik Asit

%2 Alfa Arbutin

%0.1 Glabridin

%6 Glikolik Asit

%0.1 Askorbil Tetraisopalmitat

%5 Nikotinamid

%0.5 Salisilik Asit bulunmaktadır.

Bu krem Sağlık Bakanlığı 24.3.2005 tarihli ve 5324 sayılı kozmetik kanununa dayanılarak eczanelerde bulunmaktadır.

3.2. Klinik Çalışmanın Dizaynı

Çalışmaya gönüllülük esasına dayanılarak kısmi kalınlıkta deri grefti ile onarılabilecek defektleri olan veya yapılacak ameliyat gereği kısmi kalınlıkta deri grefti ile onarılabilecek defektleri oluşabilecek hastalardan seçilmiştir. 18-60 yaş arası, okur yazar, herhangi bir ek hastalığı bulunmayan, 10 erkek hasta dahil edilmiştir.

Cilt tiplerine göre hastalar açık ten (Fitzpatrick cilt tipi 3) ve koyu ten (Fitzpatrick cilt tipi 4) olarak 2 gruba ayrılmıştır. Her 2 hasta grubunda da 5 hasta bulunmaktadır.

Hastaların greft donör sahalarına epitelizasyon tamamlanıncaya kadar Tritone Fort® krem ve sıvı vazelin günde 2 kez yarı kapalı pansuman şeklinde, epitelizasyon

tamamlandıktan sonra ise hasta postoperatif 90. güne kadar sıvı vazelin ve Triton Fort® kremi hastanın kendisi tarafından günde 2 kez tariflendiği biçimde uygulanması sağlanmıştır.

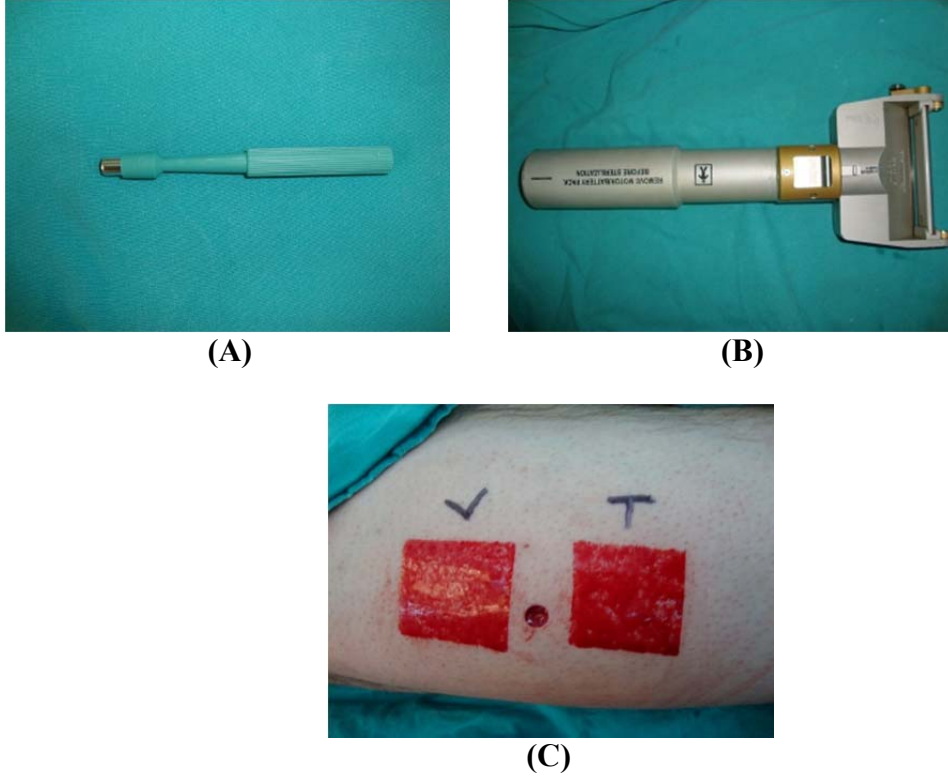
Hastalar preoperatif, postoperatif 1., postoperatif 21. ve postoperatif 90. günde fotoğraflama ve alınan punch biyopsi örneklerinde immunohistokimyasal (HMB 45 ve Melan A boyaları) olarak boyanan aktif melanositlerin sayımı ile değerlendirilmiştir. Fotoğraflamada sıvı vazelin uygulanan alanlar 'V', Tritone Fort® krem uygulanan alanlar 'T' olarak işaretlenmiştir.

Alınan biyopsi örneklerinde preoperatif epitel bütünlüğünün korunduğunun, postoperatif 1. günde ülser oluşturacak şekilde uygun greftin alındığının, postoperatif 21. günde epitelizasyonun tamamlandığının ve postoperatif 90. günde epitel bütünlüğünün devam ettiğinin gösterilmesi için H-E boyası kullanıldı,

Çalışma 07.03.2012 tarih ve 09 sayılı karar ile Süleyman Demirel Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

3.2.1. Greft Donör Sahanın Oluşturulması

Çalışma için her hastanın sağ veya sol uyluk anterolateralinden aralarında yaklaşık 1-1,5 cm boşluk bırakılacak şekilde 0,016 inch kalınlığında Humeca® 4.D80 motorlu dermatom ile parsiyel kalınlıkta 2 adet deri grefti alındı.



Resim 1. Çalışma modeli ve kullanılan cihazlar

(A) 6 mm Çaplı Punch Biyopsi Aleti

(B) Motorlu Dermatome

(C) Operasyon Esnasında Punch Biyopsi ve Kısmi Kalınlıkta Deri Grefti Alınması

3.2.2. Klinik Çalışma

Çalışmaya dahil edilen 10 erkek hastanın sağ veya sol uyluktan greft alınacak bölgesi operasyon öncesi Sony DSC-W220 fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı. Greft alınacak bölgenin orta hattından 0,6 mm çaplı punch biyopsi aleti ile (KAI Medikal) biyopsi yapıldı. Ardından hastanın açık doku defektlerini kapatmak amaçlı 0,016 inch kalınlığında parsiyel kalınlıkta punch biyopsi yapılan alanın 1 cm proksimal ve distalinden 2 adet deri grefti alındı. Greft donör sahalarına tüm hastalarda proksimaline sıvı vazelin emdirilmiş cm^2 'de 18 ilmek bulunan gazlı bez, distaline Tritone Fort[®] krem emdirilmiş cm^2 'de 18 ilmek bulunan gazlı bez ile pansuman yapıldı. Donör sahaların üzerleri ayrı ayrı olacak şekilde kapatıldı.

Hastaların greft donör sahaları postoperatif 1. günde sıvı vazeline ve Tritone Fort[®] krem emdirilmiş gazlı bezleri greft donör sahasında kalacak şekilde açıldı. Gazlı bezler kenarlardan bir miktar kaldırıldı ve 0,6 mm çapında her 2 alandan punch biyopsi yapıldı. Biyopsi yapılan alanlar 4/0 prolen ile sütüre edildi. Ardından gazlı

bez ıslanacak şekilde sıvı vazelin emdirilmiş gazlı beze sıvı vazelin, Tritone Fort® uygulanmış gazlı beze Tritone Fort® krem tekrar uygulandı. Güneşten ve travmadan korumak için hastaların donör sahalarına ayrı ayrı petler konuldu ve sarıldı. Punch biyopsi almak dışındaki pansuman uygulaması tüm hastalarda epitelizasyon tamamlanıp gazlı bezler kalkıncaya kadar günde 2 kez 12 saat ara ile uygulandı.

Epitelizasyonun tamamlanıp gazlı bezlerin greft donör sahadan ayrılmasından sonra hastalara günde 2 kez Tritone Fort® krem ve sıvı vazelin uygulamasını kendilerinin nasıl yapacakları konusunda eğitim verildi ve hastaların greft donör sahalarının fotoğraflaması yapıldı. Hastaneye yatış nedenleri ile ilgili tedavileri tamamlanan hastalar epitelizasyonun tamamlanmasından sonra taburcu edildi ve hastalara 15 günlük aralarla poliklinik kontrolleri yapıldı. Yatış nedenleri ile ilgili tedavisi devam eden hastaların hastanede günlük takiplerine devam edildi.

Tüm hastaların postoperatif 21. günde greft donör sahalarının fotoğraflamaları yapıldıktan sonra her 2 alandanda punch biyopsiler tekrarlandı. Greft donör sahaları açık bırakılarak güneşten korunma ve travmadan kaçınma ile ilgili eğitim verildi. Hastalar postoperatif 90. güne kadar aralıklı olarak poliklinik takiplerine çağrıldı ve sıvı vazeline ve Tritone Fort® krem uygulamasına devam edildi.

Hastaların greft donör sahaları postoperatif 90. günde tekrar fotoğraflandı ve her 2 alandan punch biyopsiler yapıldı. Biyopsi alanları 4/0 prolen ile sütüre edildi. Sıvı vazelin ve Tritone Fort® krem uygulaması sonlandırıldı.

3.2.2.1. Hasta Profili

Hasta profili farklı yaşlarda, eğitim durumlarında 10 erkek hastadan oluşmaktadır. Tablo 2 'de hastalar ile ilgili ayrıntılı hasta profili görülmektedir.

Tablo 2. Hasta profili

Hasta Kodu	Yaş	Eğitim Durum	Ek Hastalık	Operasyon Nedeni	Fitzpatrick Cilt Tipi Sınıflanması
1	43	İlkokul	Yok	Osteomyelit Sonrası Tibia Önü Doku Defekti	4
2	20	Lise	Yok	Spiral Makinesi ile Yaralanma Sonucu Ön Kolda Doku Defekti	4
3	24	Üniversite	Yok	Araç İçi Trafik Kazası Sonrası Tibia Önü Doku Defekti	4
4	53	İlkokul	Yok	Araç İçi Trafik Kazası Sonucu Tibia Önü Doku Defekti	3
5	50	İlkokul	Yok	Çapa Makinesi İle Yaralanma Sonucu Gluteal Bölgede Doku Defekti	4
6	37	Üniversite	Yok	Omuzda Konjenital Nevus	3
7	54	İlkokul	Yok	Araç Dışı Trafik Kazası Sonucu Ayak Dorsalinde Doku Defekti	3
8	42	İlkokul	Yok	Açık Tibia Fraktürü Sonrası Doku Defekti	3
9	26	Lise	Yok	Araç İçi Trafik Kazası Sonucu Bası Yarası	4
10	21	Lise	Yok	Çapa Makinesi İle Yaralanma Sonucu Ön Kolda Doku Defekti	3

3.2.2.2. Histopatolojik Kesitlerin Değerlendirilmesi

A) Hematoksilen - Eozin ile Boyama

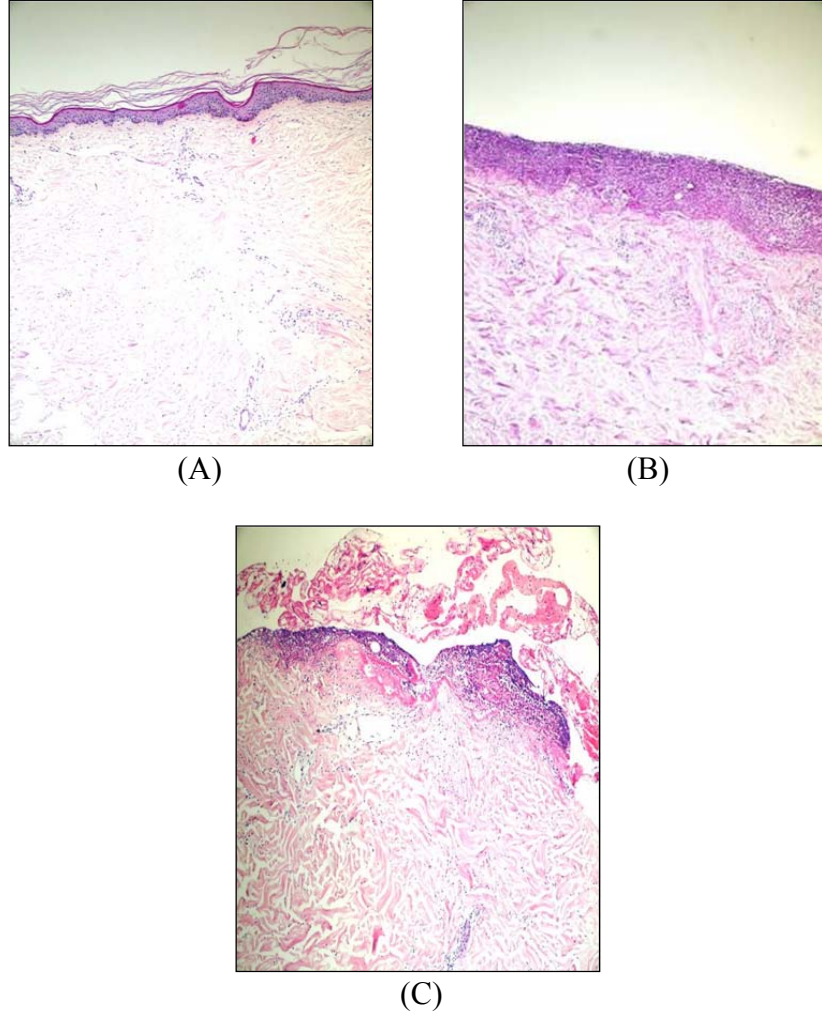
Doku örnekleri formalinde fikse edildi. Alkolde dehidrate edildikten sonra parafin bloklara gömülüp, mikrotomla (LEICA® RM 2255, Almanya, 2004) 5 mikrometre kalınlığında kesildi. Lamlar üzerine yerleştirildi. Preperatlar 65°C'lik kurutma tablasında 10 dk. bekletildi ve deparafinizasyon işlemi için 30 dakika ksilende bekletildi, absolü alkolde 20 dakika bekletilip distile sudan geçirildi. Hemotoksilen Eozin Boyası için Mayers hematoksilen ile 10 dakika bekletildi ve distile sudan geçirilerek yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra Eozinde 15-25 saniye bekletildi. Distile suda yıkandı. Alkolden geçirilip havada kurutuldu ve ksilene konuldu. Daha sonra entelen kullanılarak kapatma işlemi yapıldı.

Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanan örnekler ışık mikroskopisi (Olympus® BX51, Japonya, 2007) altında x4, x10, x40 büyütmede tüm sahalarda incelendi.

B) İmmunohistokimyasal Boyama

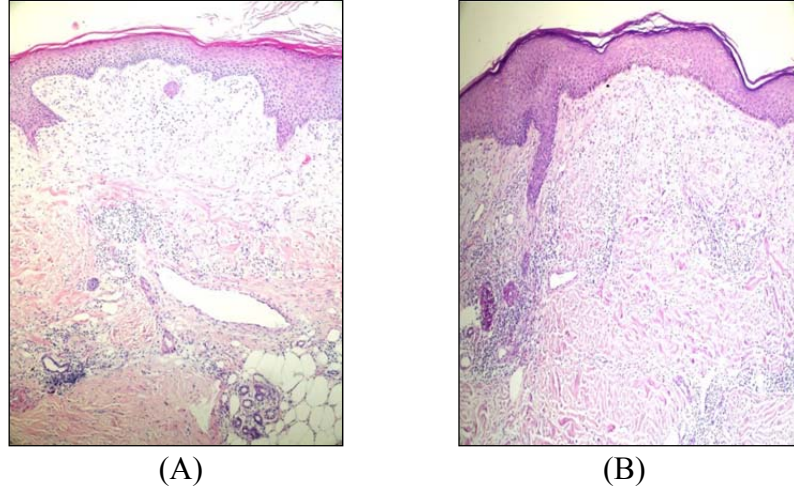
İmmunohistokimyasal boyama için Parafin bloklardaki dokularından 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak, poly-L-lysine ile kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Preperatlar bir gece 37°C'lik etüvde bekletildi ve deparafinizasyon işlemi için 20 dakika xsilende bekletildi, absöüt alkolde 20 dakika bekletilip distile sudan geçirildi. Antijen retrieval işlemi için kesitler PT modulle (Labvision) cihazında sitrat tampon içerisinde 98° C'de 20 dakika ısıtıldı. İşlem sonrası 20 dakika oda ısısında sitrat tampon içerisinde soğutuldu, distile sudan geçirildi. Kesitlere H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) damlatıldı ve 20 dakika inkübasyona bırakıldı. PBS (pH: 7,6) (Fosfat buffer Saline)'de yıkandı. Ultra V bloking yapıldı. 5 dakika inkübe edildi. Melanoma Mouse monoclonal (Clone HMB45 Cat.No:MS-364-S0 Thermo Labvision.Fremont, CA-USA) için 1 /40 dilüsyonda, 60 dakika, MART 1 Mouse Monoclonal/Clone (Melan A Cat.No:MS-716-R7 Thermo Labvision Fremont, CA-USA) için 60 dk. oda ısısında inkübasyona bırakıldı. PBS'de yıkandı. Sekonder antikor olarak Biotinyloted Goat Anti-Polyvalent (TP-125-BN Labvision Freemont, CA-USA) damlatıldı. 20 dakika inkübe edildi. PBS'te yıkandı. Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR Labvision Freemont, CA-USA) damlatılarak 20 dakika inkübe edildi ve PBS'de yıkandı. DAB Chromojen yapıldı. 5–15 dakika inkübe edildi ve distile suda yıkandı. Mayers hematoksilen ile zıt boyama 15 saniye 1 dakika yapıldı ve distile sudan geçirildi. Alkolden geçirilip havada kurutuldu ve xsilene konuldu. Daha sonra entelen kullanılarak kapatma işlemi yapıldı. İmmunohistokimyasal boyamaları tamamlanan örnekler ışık mikroskopisi (Olympus® BX51, Japonya, 2007) altında x4, x10, x40 büyütmede tüm sahalarda incelendi.

Bazal tabakada ortalama 250 hücre sayıldı ve 250 hücre içerisindeki melanositler sayı olarak kaydedildi.



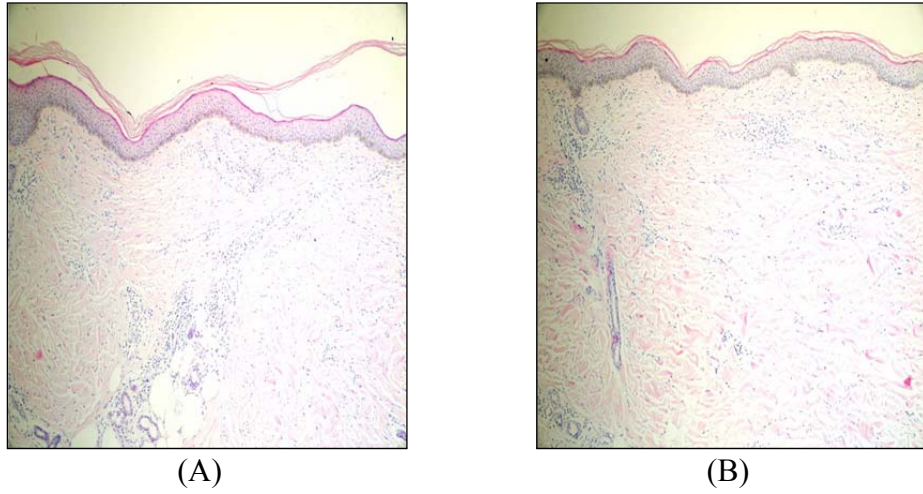
Resim 2. Hasta 2'nin preoperatif ve postoperatif 1. gün alınan punch biyopsi örneklerinin H-E boyama görüntüleri

- (A) Preoperatif Alınan Biyopsi Örneğinin H-E, X100 ile Normal Dokunun Histopatolojik Görünümü,
(B) Postoperatif 1. Gün Triton Fort® Krem ve,
(C) Postoperatif 1. Gün Sıvı Vazelin Uygulanmış Bölgeden Alınan Biyopsinin H-E, X100 ile Ülser Görünümü



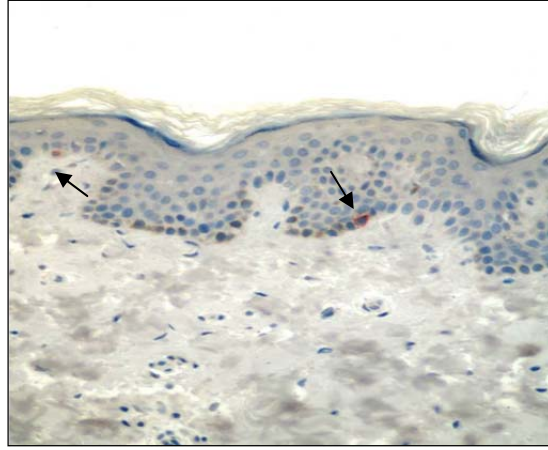
Resim 3. Hasta 2'nin postoperatif 21. gün alınan punch biyopsi örneklerinin H-E boyama görüntüleri

(A) Postoperatif 21. Gün Triton Fort® Krem ve (B) Sıvı Vazelin Uygulanmış Bölgeden Alınan Biyopsi Örneğinin H-E, X100 ile Epitelizasyonun Tamamlanmasının Görünümü

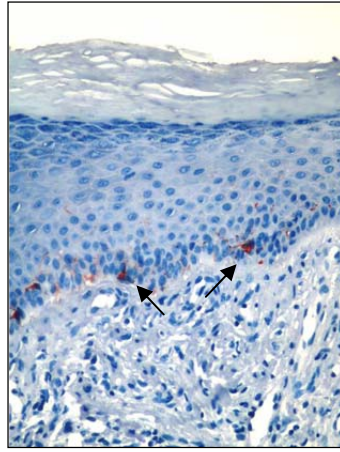


Resim 4. Hasta 2'nin postoperatif 90. gün alınan punch biyopsi örneklerinin H-E boyama görüntüleri

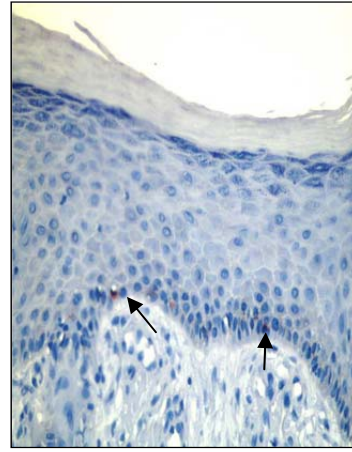
(A) Postoperatif 90. Gün Triton Fort® Krem ve (B) Sıvı Vazelin Uygulanmış Bölgeden Alınan Biyopsi Örneğinin H-E, X100 ile Normal Dokunun Histopatolojik Görünümü



(A)



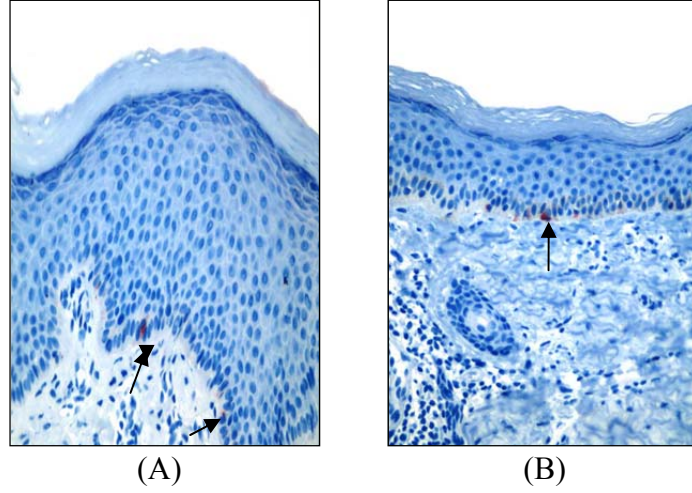
(B)



(C)

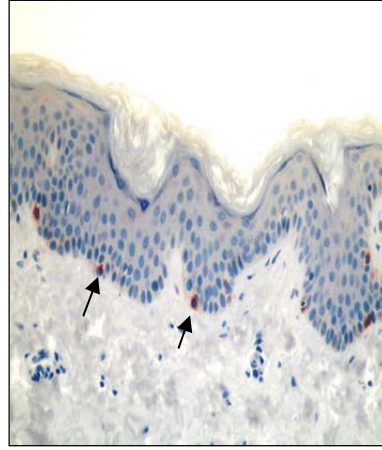
Resim 5. Hasta 1'in HMB 45 immunohistokimyasal boya ile preoperatif ve postoperatif 21. gün görüntüleri

(A) Preoperatif HMB-45, X400 İmmunohistokimyasal Boya ile Boyanmış Biyopsi Örneğinin Görünümü, (B) Postoperatif 21. Gün Tritone Fort® Krem ve (C) Sıvı Vazelin Uygulanmış Alandan Alınan Biyopsi Örneğinin HMB 45, X400 İmmunohistokimyasal Boya ile Boyanmış Görünümü (okla işaretli hücreler HMB 45 boyası ile boyanan aktif melanositler)

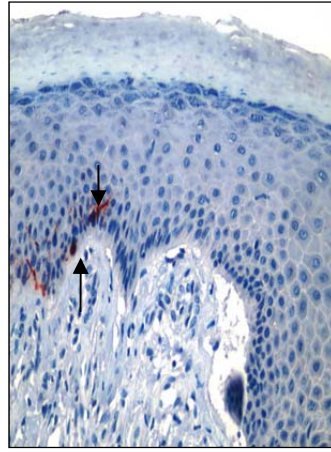


Resim 6. Hasta 1'in HMB 45 immunohistokimyasal boya ile postoperatif 90. gün görüntüleri

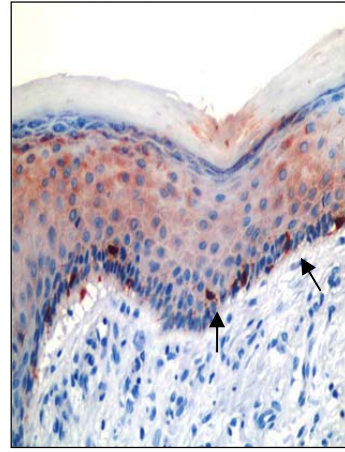
(A) Postoperatif 90. Gün Tritone Fort® Krem ve (B) Sıvı Vazelin Uygulanmış Alandan Alınan Biyopsi Örneğinin HMB 45, X400 İmmunohistokimyasal Boya ile Boyanmış Görünümü (okla işaretli hücreler HMB 45 boyası ile boyanan aktif melanositler)



(A)



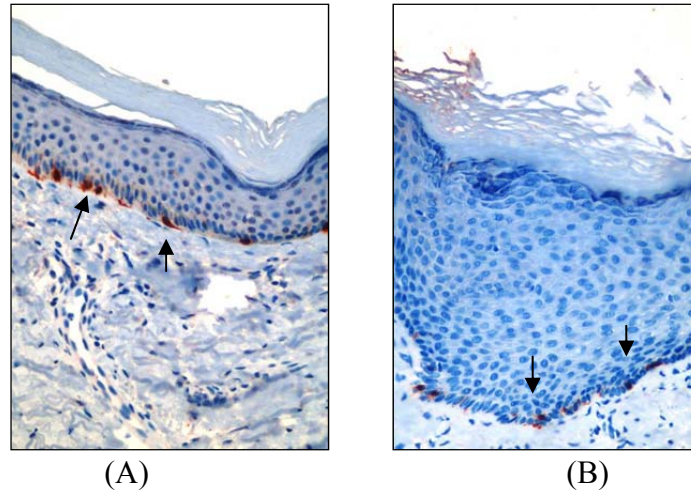
(B)



(C)

Resim 7. Hasta 1'in melan A immunohistokimyasal boya ile preoperatif, postoperatif 21. gün görüntüleri

(A) Preoperatif Melan A, X400 İmmunohistokimyasal Boya ile Boyanmış Biyopsi Örneğinin Görünümü, (B) Postoperatif 21. Gün Tritone Fort® Krem ve (C) Sıvı Vazelin Uygulanmış Alandan Alınan Biyopsi Örneğinin Melan A, X400 İmmunohistokimyasal Boya ile Boyanmış Görünümü (okla işaretli hücreler Melan A boyası ile boyanan aktif melanositler)



Resim 8. Hasta 1'in Melan A İmmunohistokimyasal Boya ile Postoperatif 90. Gün Görüntüleri

(A) Postoperatif 90. Gün Tritone Fort® Krem ve (B) Sıvı Vazelin Uygulanmış Alandan Alınan Biyopsi Örneğinin Melan A, X400 İmmunohistokimyasal Boya ile Boyanmış Görünümü (okla işaretli hücreler Melan A boyası ile boyanan aktif melanositler)

3.2.2.3. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirme Yönteminin Belirlenmesi

Çalışmada denek grubu 10 hastadan oluşturulmuş ve her hastadan 0, 1, 21 ve 90. günlerde bir tanesi kontrol grubu bir tanesi de tedavi grubu olmak üzere 7 biyopsi alınmıştır. Hastalardan alınan biyopsilerdeki ölçülen değerlere zamana bağlı olarak tekrarlayan testler yapıldığı için, genel analiz için “Repeated Measures Anova” testi uygulanmıştır. “Repeated Measures Anova” aynı değişkenin farklı zaman dilimlerinde veya farklı tanı gruplarına karşı olan değişimi ölçmede kullanılabilir (76). Repeated Measures analizinde, analiz edilebilecek etki grupları; karşılaştırma grupları, zaman ve grup*zaman'dan oluşmaktadır. Çalışmada grup olarak tedavi türleri, zaman olarak ise 3 ayrı zamanda alınan gözlemler oluşturulmuştur.

HMB 45 ve Melan A boyası için yapılan genel testin ardından zaman boyutunda tedavi türlerinin farklarının incelenebilmesi için analizlere Wilcoxon testi ile devam edilmiştir.

İkili grupların karşılaştırılmasında ise eşleştirilmiş örneklerdeki ilk ve sonraki ölçümler arasında bir fark olup olmadığını belirleyen Wilcoxon testi kullanılmıştır. Wilcoxon testi non-parametrik bir test olmasından ötürü parametrik t-testinde gerekli

olan örneklem sayısının yeterli olması ($n > 30$) ve değişkenlerin normal dağılımı ön savları geçerli değildir. Bu sebeple 10 deneğin zaman faktörünün ikili karşılaştırmalarında bu test yöntemi kullanılmıştır (77). Parametrik testlerin ön koşullarının sağlanamaması nedeniyle seçilen Wilcoxon testi, plasebo ve tedavinin zaman boyutunda öncelikle bir fark gösterip göstermediğini, ikinci aşamada ise hangi zaman dilimlerinde farkların oluştuğunu belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Sıvı vazelin ve Triton Fort® krem uygulanacak greft donör sahalalarının tam orta kısmından preoperatif (0. gün) alınan biyopsi örneği 0-V, 0-T olarak adlandırılmış ve hastaların preoperatif melanosit sayılarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Postoperatif 1. günde alınan biyopsilerde greftler bazal tabakayı içerdiğinden aktif melanosit sayımı yapılamamıştır. Postoperatif 1. günde alınan biyopsiler kısmi kalınlıktaki deri greftlerinin uygun kalınlıkta olduğunu göstermek amacıyla yapılmıştır. Sıvı vazelin ve Triton Fort® krem uygulanan greft donör sahalarından postoperatif 21. gün alınan örnekler 21-V ve 21-T olarak, postoperatif 90 gün alınan örnekler ise 90-V ve 90-T olarak adlandırılmıştır.

Hastalara ait alınan biyopsi örneklerindeki Melan A ve HMB 45 immunohistokimyasal boyalar ile işaretlenen aktif melanosit hücre sayıları Tablo 3 de gösterilmiştir.

Tablo 3. Hastalara ait alınan örneklerdeki HMB 45 ve melan A immunohistokimyasal boyalar ile sayılan aktif melanosit hücre sayıları

Hasta		0.Gün V-T	1. Gün V	1.Gün T	21.Gün V	21.Gün T	90. Gün V	90. Gün T
1	MELAN A	33	0	0	35	20	34	18,00
	HMB45	27	0	0	35	20	26	15
2	MELAN A	19	0	0	31	18	32	18
	HMB45	16	0	0	39	15	40	13
3	MELAN A	31	0	0	27	18	30	17
	HMB45	25	0	0	28	19	30	18
4	MELAN A	20	0	0	31	15	34	11
	HMB45	17	0	0	44	17	45	15
5	MELAN A	22	0	0	26	21	37	20
	HMB45	19	0	0	21	17	30	13
6	MELAN A	29	0	0	31	25	31	23
	HMB45	26	0	0	33	19	34	17
7	MELAN A	29	0	0	26	14	35	13
	HMB45	27	0	0	33	21	31	14
8	MELAN A	36	0	0	37	23	37	14
	HMB45	31	0	0	33	20	37	19
9	MELAN A	31	0	0	21	19	21	17
	HMB45	30	0	0	19	17	22	16
10	MELAN A	29	0	0	29	18	30	18
	HMB45	27	0	0	31	19	39	17

4.1. Tanımlayıcı İstatistikler

Hastaların alınan biyopsilerinden elde edilen verilerin immunohistokimyasal boya tipi, verilen tedavi türü ve biyopsi alınan günlere göre minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4' te verilmiştir.

Tablo 4. Tanımlayıcı istatistikler

Değişken	Boyama Türü	Tedavi Türü	Gözlem Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
Gun.0.V	HMB45	Sıvı Vazelin	10	16,00	31,00	24,500	5,296
Gun.21.V	HMB45	Sıvı Vazelin	10	19,00	44,00	31,600	7,530
Gun.90.V	HMB45	Sıvı Vazelin	10	22,00	45,00	34,300	6,464
Gun.0.T	HMB45	Triton-Fort®	10	16,00	31,00	24,500	5,296
Gun.21.T	HMB45	Triton-Fort®	10	15,00	21,00	18,400	1,837
Gun.90.T	HMB45	Triton-Fort®	10	13,00	19,00	15,700	2,057
Gun.0.V	MelanA	Sıvı Vazelin	10	19,00	36,00	27,900	5,685
Gun.21.V	MelanA	Sıvı Vazelin	10	21,00	37,00	29,400	4,671
Gun.90.V	MelanA	Sıvı Vazelin	10	21,00	37,00	32,100	4,677
Gun.0.T	MelanA	Triton-Fort®	10	19,00	36,00	27,900	5,685
Gun.21.T	MelanA	Triton-Fort®	10	14,00	25,00	19,100	3,348
Gun.90.T	MelanA	Triton-Fort®	10	11,00	23,00	16,900	3,478

Tablo 4'te genel bir kanı oluşması için değişkenlerin minimum, maksimum ve ortalama değerleri incelenmiştir. İnceleme sonucunda hem HMB 45 hem de Melan A boyası için sıvı vazelin uygulanan bölgelerdeki minimum, maksimum ve ortalama değerlerinin yani aktif melanosit sayısının artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Triton Fort® krem uygulanan bölgelerdeki değerler incelendiğinde ise genel olarak aktif melanosit hücre sayısının azaldığı görülmüştür.

4.2. Melan A Boyası ile İşaretlenmiş Biyopsi Analizleri

Veri setinin küresellik (sphericity) düzeyinin ölçülmesi için yapılan Mauchly's Test sonuçlarına göre $p < 0,05$ ($p = 0,003$) olduğundan (Tablo 5) zaman ve

zaman*tedavi grubu etkileri Greenhouse-Geisser değerine bakılarak yorumlanmıştır (Tablo 6).

Tablo 5. Repeated measures anova testi - melan A boyası - mauchly's testi

WithinSubject Efekti	Mauchly's W	Ki-Kare	P-Değeri	Epsilon		
				Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
Zaman	0,505	11,627	0,003**	0,669	0,743	0,500

Tablo 6. Repeated measures anova testi - melan A boyası - within - subjects efekti testi

Kaynak	Greenhouse-Geisser	F Değeri	P-Değeri
Zaman		4,936	0,027**
Zaman * Tedavi.Türü		17,864	0,000**

Buna göre tedavi grupları dikkate alınmaksızın, Melan A ile bakılan melanosit sayıları 0, 21 ve 90. gün değerlendirmelerinde farklılıklar gözlemlenmiştir. İlgili farklılıklar incelendiğinde kontrol ve tedavi grupları arasında zaman boyutunda farklılık gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Zaman etkisinin bileşenleri incelendiğinde farkın 0 ve 21. günler arasında görüldüğü tespit edilmiştir.

Tablo 7. Repeated measures anova testi - melan A boyası - pairwise karşılaştırması

Ölçü: Tedavi	Ortalama Fark	Standart Sapma	P-Değeri	95% Güven Düzeyi	
				Alt Sınır	Üst Sınır
0.G – 21G	3,650	1,352	0,044*	0,082	7,218
0G – 90G	3,400	1,622	0,152	-0,882	7,682
21.G - 90 G	0,250	0,770	1,000	-2,283	1,783

Wilcoxon testi ile zaman etkisi her bir tedavi grubu için ayrı ayrı ikili karşılaştırmaya tabi tutulmuştur. (Tablo 8).

Tablo 8. Wilcoxon testi - melan A boyası - zaman boyutu bazlı karşılaştırma

Karşılaştırma Grubu	Tedavi Türü	Z Değeri	P-Değeri
0-21 Gün	Sıvı Vazelin	-0,712	0,476
0-90 Gün	Sıvı Vazelin	-1,847	0,065*
21-90 Gün	Sıvı Vazelin	-2,047	0,041**
0-21 Gün	Triton Fort®	-2,812	0,005**
0-90 Gün	Triton Fort®	-2,805	0,005**
21-90 Gün	Triton Fort®	-2,546	0,011**

Sıvı vazelin uygulanan hastalarda 90. günde melanosit sayılarının 0 güne göre yüksek olduğu görülmüş, Triton Fort® krem uygulanan hastalarda ise grubunda 90. günde melanosit sayısının hem 0 hem de 21. günlere göre azaldığı gözlemlenmiştir.

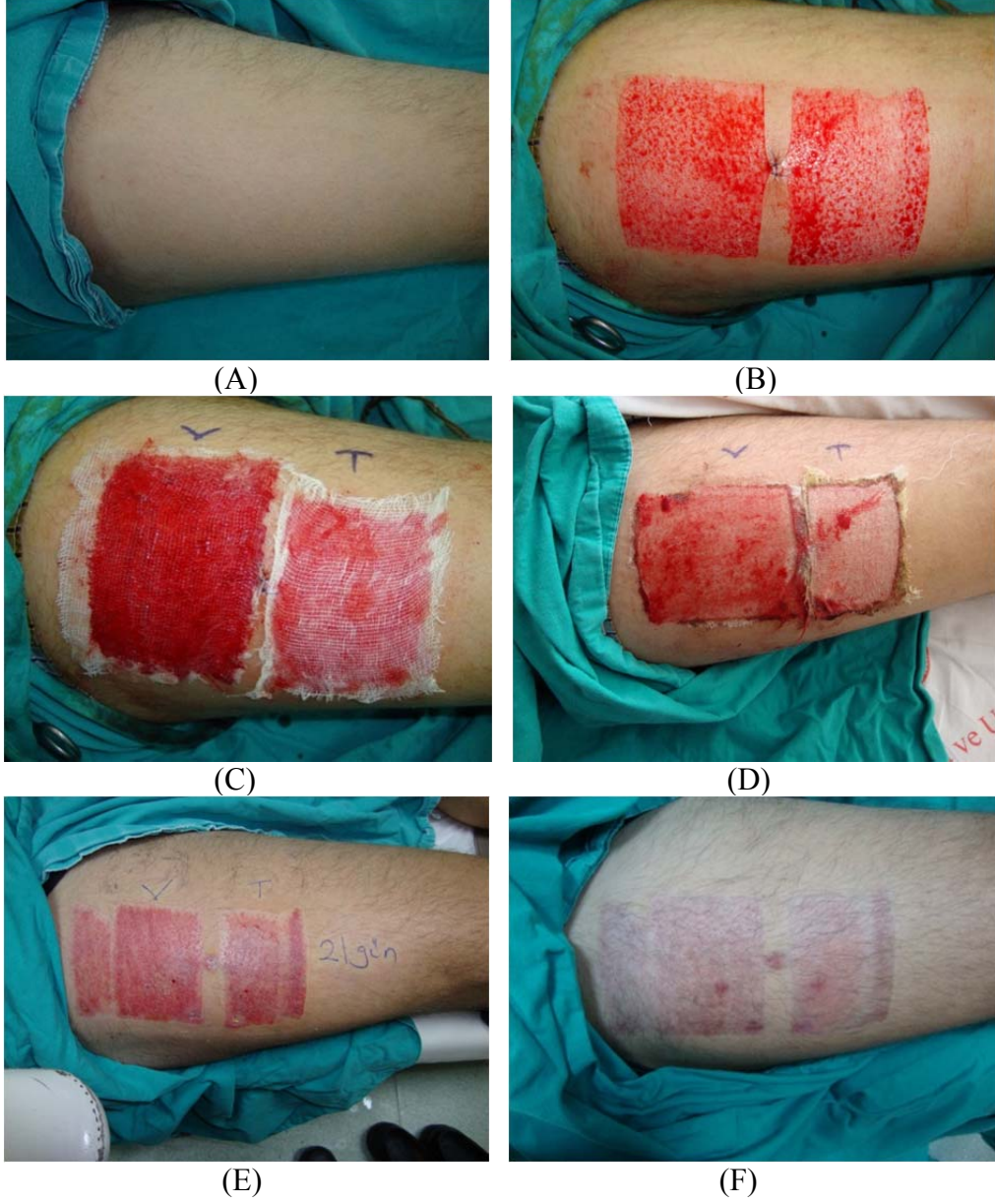
Wilcoxon testi ile her değerlendirme zamanı için tedavi grupları karşılaştırıldığında Triton Fort® krem grubunda melanosit sayılarının hem 21 hem de 90. günlerde vazelin grubuna göre düşük olduğu bulundu (Tablo 9).

Tablo 9. Wilcoxon testi - melan A boyası - tedavi türü bazlı karşılaştırma

Karşılaştırma Grubu	Zaman	Z Değeri	P-Değeri
Triton-Fort®-Sıvı Vazelin	Gün 21	-2,803	0,005**
Triton-Fort®-Sıvı Vazelin	Gün 90	-2,805	0,005**

4.3. Bulguların Değerlendirme Fotoğrafları

4.3.1. Hasta 6'nın Fotoğrafları



Resim 9. Hasta 6'nın fotoğrafları

(A) Preoperatif Görünüm, (B) Kısmi Kalınlıkta 2 Adet Deri Grefti Alınmış ve Orta Hattan Alınan Punch Biyopsi Görüntüsü, (C) Sıvı Vazelin Emdirilmiş Gazlı Bez (V) ve Tritone Fort® Krem (T) Emdirilmiş Gazlı Bezin Greft Donör Sahasına İntraoperatif Uygulanmasının Görüntüsü, (D) Postoperatif 1. Günde, (E) Postoperatif 21. Günde ve (F) Postoperatif 90. Günde Greft Donör Sahalarının Görüntüsü

4.3.2. Hasta 10'un Fotoğrafları



(A)



(B)



(C)

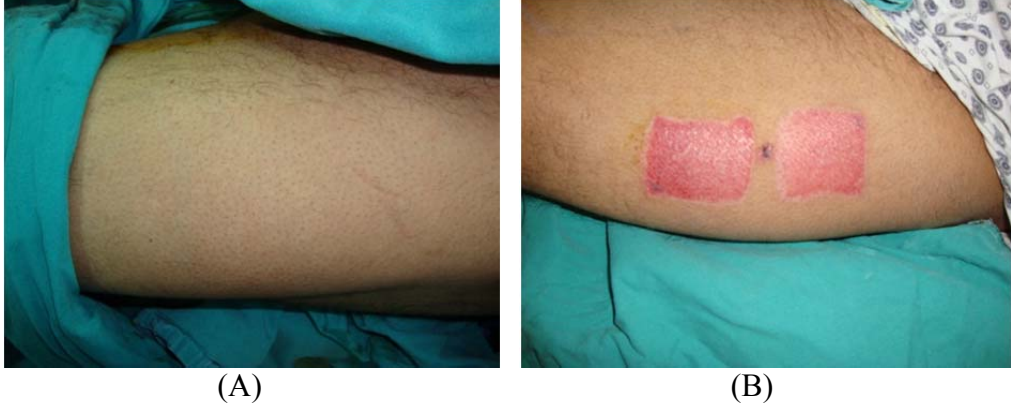


(D)

Resim 10. Hasta 10'un fotoğrafları

(A) Preoperatif Görünüm, (B) Postoperatif 13. Gün Epitelizasyonun Tamamlanması Sonrası Greft Donör Sahadan Ayrılması Sonrasının Görüntüsü, (C) Postoperatif 21. Gün ve (D) Postoperatif 90. Günde Greft Donör Sahalarının Görüntüsü

4.3.3. Hasta 5'in Fotoğrafları



Resim 11. Hasta 5'in fotoğrafları

(A) Preoperatif Görünüm, (B) Postoperatif 21. Gün ve (C) 90. Günde Greft Donör Sahalarının Görüntüsü

4.3.4. Hasta 2'nin Fotoğrafları



(A)



(B)



(C)

Resim 12. Hasta 2'nin fotoğrafları

(A) Preoperatif Görünüm, (B) Postoperatif 21. Gün ve (C) 90. Günde Greft Donör Sahalarının Görüntüsü

4.3.5. Hasta 3'ün Fotoğrafları



(A)



(B)



(C)

Resim 13. Hasta 3'ün fotoğrafları

(A) Preoperatif Görünüm, (B) Postoperatif 21. Gün ve (C) 90. Günde Greft Donör Sahalarının Görüntüsü

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İyileşmiş greft donör alanlarındaki renk değişiklikleri ile ilgili literatürde herhangi bir yayın yoktur. Ancak başka nedenlere bağlı pigment değişikliklerinin kişinin yaşam kalitesinde olumsuz etkisi olduğu bilinmektedir (78). Tritone Fort® krem yaklaşık 10 yıldır ülkemizde reçetesiz olarak satışı olan ve hiperpigmentasyon tedavisinde kullanılan bir üründür. Ancak ürünle ilgili gerek ülkemizde gerekse üretici firmanın satışını yaptığı diğer ülkelerde yapılmış herhangi bir klinik çalışma bulunmamaktadır. Ürün içerisindeki aktif maddeler tirozinaz inhibisyonu (kojik asit, arbutin ve meyan kökü ekstreleri), kimyasal peeling (salisilik asit ve glikolik asit), antienflamatuar etki (askorbik asit) ve melanozom transfer hızı azaltması (Niasinamid) ile etki göstererek hiperpigmentasyon tedavisinde yer almaktadır.

Bizim çalışmamızda Tritone Fort® krem kullanılan grupta melanosit sayısının her iki postoperatif ölçümde de preoperatif ölçümlere göre azaldığı görüldü. Halbuki sıvı vazelin kullanılan grupta 21. Günde anlamlı olmayan ancak 90. Günde anlamlılık düzeyine ulaşan bir artmış melanosit sayısı cevabı vardı.

Tritone Fort® krem ile yapılmış herhangi bir klinik çalışma bulunmamasına rağmen içeriğindeki aktif maddeler ile ilgili bazı çalışmalar mevcuttur.

Yokota ve ark.'nın 1998 yılında yaptığı çalışmada UVB ışınlanmasından sonra 3 hafta boyunca kahverengi kobaylara glabridin uygulanmış ve 3. haftanın sonunda UVB kaynaklı pigmentasyonda ve eritemde bir azalma rapor edilmiştir. Glabridin ile ilgili literatür taramasında herhangi bir klinik çalışmaya rastlanamamıştır.

Lim ve ark. nın 40 epidermal melasmalı Çinli hastada yaptığı çalışmada hastaların yüzlerinin yarısına %2'lik hidrokinon ve %10' luk glikolik asit içeren jel ve diğer yarısına %2'lik hidrokinon ve %10'luk glikolik asit jel içeriğiyle kojik asit uygulanmış, üçlü tedavi uygulanan 40 hastanın 24'ünde melazmanın tamamen kaybolduğu, %2'lik hidrokinon ve %10'luk glikolik asit ama kojik asit eklenmeyen 40 hastanın 19'unda melazmanın azaldığı gözlemlenmiştir. Tüm hastalarda kızarıklık, batma ve hafif ekfoliyasyon görülürken yan etkiler yüzün kojik asit uygulanan tarafında da uygulanmayan tarafında da gözlemlendi (79). Yine 39 melasmalı

hastanın yüzlerinin bir tarafına %2 kojik asit, %5 glikolik asit içeren formülasyon diğer tarafına %2 hidrokinon, %5 glikolik asit içeren formülasyon kullanılmış ve kojik asit içeren formülasyonda hastaların %28'i, hidrokinon içeren formülasyonda %21'inde dramatik iyileşme gözlenmiş, ancak bu iki tedavi arasında anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir. Ancak kojik asit içeren formülasyonunun daha rahatsız edici olduğu vurgulanmıştır (80). Bizim çalışmamızda Triton Fort® krem uygulanan alanlardaki renk değişikliği değerlendirilememesine rağmen, tüm hastalarda kremin uygulanmasından sonra yanma şikayeti olmuştur.

Lim ve ark. nın 2009 yılında yayınladığı bir makalede epidermis örnekleri α -MSH ile inkübe edilip, bu örnekler Fontana-Masson boyasıyla boyanarak melanosit sayısındaki artış gösterilmiştir. Benzer bir analizle cilt örnekleri melanin inhibitörü olan arbutin ile tedavi edilmiş ve bu örneklerde melanosit sayısının azaldığı gösterilmiştir. Aynı kültür metodlarını kullanarak, α -MSH yardımıyla melanogenezi 24 saat boyunca stimüle edip daha sonra aynı örneklere arbutin uygulanmış ve melanin içeriğine sahip pigment hücrelerinin bizim çalışmamıza benzer şekilde önemli ölçüde azaldığı tesbit edilmiştir (40).

Melazması olan 29 kadına Huh ve ark.'nın randomize, çift kör grup ve plasebo kontrol gruplu yaptıkları çalışmada, hastaların yüzlerinin bir tarafına C vitamini ve kontrol grubu olarak da diğer tarafa distile su uygulanmıştır. Çalışmada C vitamini uygulanan hastaların plasebo grubuna göre pigmentasyonda büyük azalma gösterdiği gözlenmiştir (81). Yine çift kör grup çalışması topikal %5 L-askorbik asit ve %4 hidrokinon karşılaştırılarak melazmadaki değişim kolorimetri, dijital fotoğraf, düzenli renkli slaytlar ve öznel değerlendirilmelerle kıyaslanmıştır. Ancak kolorimetrik ölçümler iki grup arasında fark gözlemlenememiştir (66).

Çift kör randomize nikotinamid kullanımı ile ilgili Hakozaki ve ark.'ları tarafından yapılan çalışmada diskromili kadın hastaların yüzlerinin bir yarısına %5 nikotinamid ve diğer yarısına plasebo uygulanmış, 8. haftanın sonunda kolorimetrik değerlendirmede anlamlı şekilde nikotinamid kullanılan tarafın tedaviye yanıt verdiği gösterilmiştir (72).

Greft verici alanlarında pigmentasyonu etkilemeye yönelik bir çalışma ve önerilen bir tedavi bulunmamaktadır.

Çalışmanın planlanmasında hasta sayısının az olmasının nedenleri klinik çalışmaya uygun hasta profilinin sağlanmasındaki zorluk, immunohistokimyasal boyaların pahalı olması, çalışmaya verilen ödenek miktarının kısıtlılığıdır.

Kullanılan ürünlerin ödenekleri Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklendiğinden ve ödenek miktarının kısıtlı olmasından ürünün paketine uygun plasebo hazırlanamamıştır. Bu nedenle çalışma çift kör randomize bir çalışma olarak planlanamamış ve hastaya uygulanan tedaviler ve uygulanan bölgeler bilinerek çalışma dizayn edilmiştir.

Literatürde pigmentasyon bozuklukları ile ilgili yapılan (özellikle hiperpigmentasyon tedavileri) çalışmalarda genellikle Fanton Mossana boyası kullanılmıştır (82). Fontano Masson ile yapılan incelemeler daha uygun ücretlendirilse de gümüş içeriği nedeni ile artefaktların melanosit olarak değerlendirilebileceği düşünülerek HMB 45 ve Melan A immunohistokimyasal boyalarının kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde hipopigmentasyon veya hiperpigmentasyon ile ilgili yapılmış çalışmalarda melanositleri saymak amaçlı HMB 45 ve Melan A immunohistokimyasal boyaları oldukça sık kullanılmıştır (83-85). 2 boya kullanılması çalışmanın sonuçlarının korelasyonunu göstermek ve güvenilirliği artırmak amaçlı planlanmıştır.

Punch Biyopsi alınması tüm alınan biyopsilerin eşit çapta ve derinlikte olması için planlanmıştır. Aynı zamanda punch biyopsi aleti ile biyopsi alım zamanı kısalarak hastanın işlem süresi kısaltılmıştır.

Motorlu dermatom kullanımı greft derinliğinin standart olmasını, düzgün boyutlarda greft alınmasını ve greft alım zamanının kısalmasını sağlamıştır.

Greft donör sahaların planlanmasında aynı uyluk anterolaterali hem kontrol grubu hemde tedavi grubu için belirlenmiştir. Alınan 2 greft donör saha arasındaki mesafe melanosit sayısının bölgelere oranla farklı olabileceğinden yakın olarak planlanmıştır. Ancak gerek sıvı vazelinin gerekse Tritone Fort® kremin uygulama sonrası ne kadarlık bir alana etki ettiği bilinmemekte ve büyük bir özenle uygulanmasına ve kapatılmasına rağmen birbirlerine bulaş olasılığını göz ardı ettirmemektedir. Ancak aynı uyluk bölgesinden greft alınması hastanın diğer

bacağında da oluşabilecek bir iz kaygısı olmaması açısından dikkat edilebilecek bir unsurdur.

Hastaların fotoğraflama ile ilgilide değerlendirilmesi çalışmanın başlangıç aşamasında planlanmış olup standart ısı ve aydınlatmada fotoğraf çekilebilecek alanın olmaması ve skarların 90. günde halen kırmızı renkte görünüp görsel değerlendirme için uygun olmaması, çalışmanın dezavantajlarından sayılabilir.

Bu çalışmada hasta sayısının az olması hastaların skarlarının hiperpigmente veya hipopigmente iyileşeceğine ait kesin bulgu olmaması, epitelizasyondan sonra tedavileri kendilerinin düzenli olarak uygulanmasının sağlanması, biyopsi tarihlerinde ve rutin kontrol tarihlerinde düzenli poliklinik başvurularının sağlanması, 90 günlük sürecin yara iyileşmesi açısından kısa bir süre olması çalışmanın çözülmesi gereken problemler arasında sıralanabilmektedir.

Tritone Fort[®] krem içeriği hiperpigmentasyon tedavisinde yer alan bir çok etken maddeye sahiptir. Yapılan çalışma ile kısmi kalınlıkta alınan deri grefti donör sahasında aktif melanositleri azalttığı gösterilmekle birlikte melanosit sayısının azalmasının hiperpigmentasyon tedavisinde kesin bir bulgu olmadığı bilinmektedir. Tritone Fort[®] Kremin etkinliği, biyoyararlanımı, yan etkileri gibi faktörlerin araştırılması amaçlı daha kapsamlı ve etken maddelerin tek tek değerlendirilebileceği geniş klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Kısmi Kalınlıkta Alınan Greft Donör Sahasına Uygulanan Triton Fort® Kremi 90 Günlük İyileşme Sürecinde Melanosit Sayısı Üzerine Etkisinin Araştırılması

İnsanoğlu tarihinde estetik her zaman önemli bir yer edinmiştir. Estetik anlayışı bazen vücudun üstüne dekore edilen takılarla, bazen direk tene yapılan süslemeler yoluyla, bazen ise sadece sağlıklı ve parlak bir cilt ile yaşam bulmuştur. Zamana ve kültüre göre değişkenlik göstermesine rağmen pürüzsüz bir cilt estetiğın yanı sıra sağlığında simgesi olmuştur.

Bu çalışmada; içerisinde renk açıcı bir çok etken bulunan Tritone Fort® krem, kısmi kalınlıktaki greft donör sahalarına uygulanmış olup, plasebo olarak sıvı vazelin kullanılmıştır. Hastalardan preoperatif, postoperatif birinci gün, yirmibirinci gün ve doksanıncı günlerinde, plasebo ve Tritone Fort® krem uygulanan her iki alandan da punch biyopsiler alınıp aktif melanositler immunohistokimyasal boyalar yardımı ile sayılmıştır. Toplu sonuçlar “Repeated Measures Anova“, ikili sonuçlar ise Wilcoxon testi, üçlü sonuçlar ise Friedman testi ile analiz edilmiştir.

Analiz sonucunda Tritone Fort® kremi aktif melanosit sayısını anlamlı olacak şekilde azalttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Tritone Fort® Krem, Greft Donör Sahası, Repeated Measures Anova Testi, Wilcoxon Testi, Friedman Testi

SUMMARY

A Study on the Effect of Triton Fort Cream on the Number of Melanocytes at Graft Donor Sites during 90 Days of Healing

Throughout history human aesthetics has always been important. To make their bodies more aesthetically pleasing, people decorate their bodies with ornaments or decorations; sometimes they use them directly through their skin or aesthetic concerns has just be formed as a healthy and radiant skin. Even if the meaning of aesthetic varies across time and culture, as well as the skin's perfectness seemed as the aesthetic sign, it also becomes sign of the health.

In this study, Tritone Fort cream as a colour lightener was used, which has properties that allow it to be applied to a partial thickness graft donor site. Liquid Vaseline was used as a placebo. Biopsys were taken from both the Tritone Fort and placebo sites and melanocytes were counted using immunehistochemical dyes at the preoperative period, postoperative first day, twenty-first and ninetieth day. Collective results are analysed with "Repeated Measures ANOVA" and binary results were analysed with the Wilcoxon test.

By analyzing the results, the Tritone Fort cream was found to reduce significant number of active melanocytes.

Keywords: Tritone Fort[®] Cream, Graft donor sites, Repeated Measures Anova Test, Wilcoxon Test, Friedman Test

KAYNAKLAR

1. Ed:Jungueira L.C, Carneiro J. Çeviri Ed:Aytekin Y, Solakoğlu S. (Basic Histology, Tenth Edition, 2003) Nobel Tıp Kitabevi 2006:369-383
2. Ed:Smith J.W, Grabb and Smith's Plastic Surgery Fourth Edition:20-21.
3. DeSanti L. Pathophysiology and current management of burn injury. *Adv Skin Wound Care*. 2005 Jul-Aug;18(6):323-32; quiz 32-4.
4. Leyden JJ, Shergill B, Micali G, Downie J, Wallo W. Natural options for the management of hyperpigmentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. Oct;25(10):1140-5.
5. Bellinger CG, Conway H. Effects of silver nitrate and sulfamylon on epithelial regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1970 Jun;45(6):582-5.
6. Salisbury RE, Wilmore DW, Silverstein P, Pruitt BA, Jr. Biological dressings for skin graft donor sites. *Arch Surg*. 1973 May;106(5):705-6.
7. Brady SC, Snelling CF, Chow G. Comparison of donor site dressings. *Ann Plast Surg*. 1980 Sep;5(3):238-43.
8. James JH, Watson AC. The use of Opsite, a vapour permeable dressing, on skin graft donor sites. *Br J Plast Surg*. 1975 Apr;28(2):107-10.
9. Uysal AC, Alagoz MS, Orbay H, Sensoz O. An alternative dressing material for the split-thickness skin graft donor site: oxidized regenerated cellulose. *Ann Plast Surg*. 2006 Jul;57(1):60-4.
10. Feldman DL. Which dressing for split-thickness skin graft donor sites? *Ann Plast Surg*. 1991 Sep;27(3):288-91.
11. Ablaza VJ, Berlet AC, Manstein ME. An alternative treatment for the split skin-graft donor site. *Aesthetic Plast Surg*. 1997 May-Jun;21(3):207-9.
12. Artz CP, Bronwell AW, Sako Y. The exposure treatment of donor sites. *Ann Surg*. 1955 Aug;142(2):248-51.
13. Friedman GD, Capozzi A, Pennisi VR. Care of the split-thickness skin graft donor site. *J Trauma*. 1974 Feb;14(2):163-7.
14. Tan ST, Roberts RH, Blake GB. Comparing DuoDERM E with scarlet red in the treatment of split skin graft donor sites. *Br J Plast Surg*. 1993 Jan;46(1):79-81.
15. Duinslaeger LA, Verbeken G, Vanhalle S, Vanderkelen A. Cultured allogeneic keratinocyte sheets accelerate healing compared to Op-site treatment of donor sites in burns. *J Burn Care Rehabil*. 1997 Nov-Dec;18(6):545-51.
16. Gemberling RM, Miller TA, Caffee H, Zawacki BE. Dressing comparison in the healing of donor sites. *J Trauma*. 1976 Oct;16(10):812-4.
17. Birdsell DC, Hein KS, Lindsay RL. The theoretically ideal donor site dressing. *Ann Plast Surg*. 1979 Jun;2(6):535-7.
18. Kilinc H, Sensoz O, Ozdemir R, Unlu RE, Baran C. Which dressing for split-thickness skin graft donor sites? *Ann Plast Surg*. 2001 Apr;46(4):409-14.
19. Ramirez OM, Granick MS, Futrell JW. Optimal wound healing under Op-Site dressing. *Plast Reconstr Surg*. 1984 Mar;73(3):474-5.

20. Muhart M, McFalls S, Kirsner RS, Elgart GW, Kerdel F, Sabolinski ML, et al. Behavior of tissue-engineered skin: a comparison of a living skin equivalent, autograft, and occlusive dressing in human donor sites. *Arch Dermatol*. 1999 Aug;135(8):913-8.
21. Disa JJ, Alizadeh K, Smith JW, Hu Q, Cordeiro PG. Evaluation of a combined calcium sodium alginate and bio-occlusive membrane dressing in the management of split-thickness skin graft donor sites. *Ann Plast Surg*. 2001 Apr;46(4):405-8.
22. Dyson M, Young S, Pendle CL, Webster DF, Lang SM. Comparison of the effects of moist and dry conditions on dermal repair. *J Invest Dermatol*. 1988 Nov;91(5):434-9.
23. Svensjo T, Pomahac B, Yao F, Slama J, Eriksson E. Accelerated healing of full-thickness skin wounds in a wet environment. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Sep;106(3):602-12; discussion 13-4.
24. Vogt PM, Andree C, Breuing K, Liu PY, Slama J, Helo G, et al. Dry, moist, and wet skin wound repair. *Ann Plast Surg*. 1995 May;34(5):493-9; discussion 9-500.
25. Breuing K, Andree C, Helo G, Slama J, Liu PY, Eriksson E. Growth factors in the repair of partial thickness porcine skin wounds. *Plast Reconstr Surg*. 1997 Sep;100(3):657-64.
26. Chen WY, Rogers AA, Lydon MJ. Characterization of biologic properties of wound fluid collected during early stages of wound healing. *J Invest Dermatol*. 1992 Nov;99(5):559-64.
27. Mertz PM, Eaglstein WH. The effect of a semioclusive dressing on the microbial population in superficial wounds. *Arch Surg*. 1984 Mar;119(3):287-9.
28. Eaglstein WH. Effect of occlusive dressings on wound healing. *Clin Dermatol*. 1984 Jul-Sep;2(3):107-11.
29. Atiyeh BS, El-Musa KA, Dham R. Scar quality and physiologic barrier function restoration after moist and moist-exposed dressings of partial-thickness wounds. *Dermatol Surg*. 2003 Jan;29(1):14-20.
30. Dressler J, Busuttill A, Koch R, Harrison DJ. Sequence of melanocyte migration into human scar tissue. *Int J Legal Med*. 2001 Oct;115(2):61-3.
31. Ed: Wolff K. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Seventh Edition: 591-608.
32. Briganti S, Camera E, Picardo M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res*. 2003 Apr;16(2):101-10.
33. Kim DS, Jeong YM, Park IK, Hahn HG, Lee HK, Kwon SB, et al. A new 2-imino-1,3-thiazoline derivative, KHG22394, inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. *Biol Pharm Bull*. 2007 Jan;30(1):180-3.
34. Ohguchi K, Akao Y, Nozawa Y. Involvement of calpain in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *Mol Cell Biochem*. 2005 Jul;275(1-2):103-7.
35. Schwahn DJ, Xu W, Herrin AB, Bales ES, Medrano EE. Tyrosine levels regulate the melanogenic response to alpha-melanocyte-stimulating hormone in human melanocytes: implications for pigmentation and proliferation. *Pigment Cell Res*. 2001 Feb;14(1):32-9.
36. Orlow SJ. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol*. 1995 Jul;105(1):3-7.
37. Ando H, Watabe H, Valencia JC, Yasumoto K, Furumura M, Funasaka Y, et al. Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of ubiquitin-proteasome function. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9;279(15):15427-33.

38. Tamir S, Eizenberg M, Somjen D, Izrael S, Vaya J. Estrogen-like activity of glabrene and other constituents isolated from licorice root. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001 Sep;78(3):291-8.
39. Fujita H, Motokawa T, Katagiri T, Yokota S, Yamamoto A, Himeno M, et al. Inulavosin, a melanogenesis inhibitor, leads to mistargeting of tyrosinase to lysosomes and accelerates its degradation. *J Invest Dermatol.* 2009 Jun;129(6):1489-99.
40. Lim YJ, Lee EH, Kang TH, Ha SK, Oh MS, Kim SM, et al. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of alpha-melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. *Arch Pharm Res.* 2009 Mar;32(3):367-73.
41. Del Bino S, Sok J, Bessac E, Bernerd F. Relationship between skin response to ultraviolet exposure and skin color type. *Pigment Cell Res.* 2006 Dec;19(6):606-14.
42. Nielsen KP, Zhao L, Stamnes JJ, Stamnes K, Moan J. The importance of the depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological processes. *J Photochem Photobiol B.* 2006 Mar 1;82(3):194-8.
43. Barral DC, Seabra MC. The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res.* 2004 Apr;17(2):111-8.
44. Minwalla L, Zhao Y, Le Poole IC, Wickett RR, Boissy RE. Keratinocytes play a role in regulating distribution patterns of recipient melanosomes in vitro. *J Invest Dermatol.* 2001 Aug;117(2):341-7.
45. Thong HY, Jee SH, Sun CC, Boissy RE. The patterns of melanosome distribution in keratinocytes of human skin as one determining factor of skin colour. *Br J Dermatol.* 2003 Sep;149(3):498-505.
46. Draelos ZD. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatol Ther.* 2007 Sep-Oct;20(5):308-13.
47. Maeda K, Fukuda M. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 Feb;276(2):765-9.
48. Grimes PE. Management of hyperpigmentation in darker racial ethnic groups. *Semin Cutan Med Surg.* 2009 Jun;28(2):77-85.
49. Funayama M, Arakawa H, Yamamoto R, Nishino T, Shin T, Murao S. Effects of alpha- and beta-arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995 Jan;59(1):143-4.
50. Boissy RE, Visscher M, DeLong MA. DeoxyArbutin: a novel reversible tyrosinase inhibitor with effective in vivo skin lightening potency. *Exp Dermatol.* 2005 Aug;14(8):601-8.
51. Ortonne JP, Passeron T. Melanin pigmentary disorders: treatment update. *Dermatol Clin.* 2005 Apr;23(2):209-26.
52. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol.* 1994 Dec;46(12):982-5.
53. Parvez S, Kang M, Chung HS, Cho C, Hong MC, Shin MK, et al. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res.* 2006 Nov;20(11):921-34.

54. Moon KY, Ahn KS, Lee J, Kim YS. Kojic acid, a potential inhibitor of NF-kappaB activation in transfectant human HaCaT and SCC-13 cells. *Arch Pharm Res.* 2001 Aug;24(4):307-11.
55. Halder RM, Richards GM. Management of dyschromias in ethnic skin. *Dermatol Ther.* 2004;17(2):151-7.
56. Nakagawa M, Kawai K. Contact allergy to kojic acid in skin care products. *Contact Dermatitis.* 1995 Jan;32(1):9-13.
57. Serra-Baldrich E, Tribo MJ, Camarasa JG. Allergic contact dermatitis from kojic acid. *Contact Dermatitis.* 1998 Aug;39(2):86-7.
58. Petit L, Pierard GE. Skin-lightening products revisited. *Int J Cosmet Sci.* 2003 Aug;25(4):169-81.
59. Lee YS, Park JH, Kim MH, Seo SH, Kim HJ. Synthesis of tyrosinase inhibitory kojic acid derivative. *Arch Pharm (Weinheim).* 2006 Mar;339(3):111-4.
60. Panich U, Tangsupa-a-nan V, Onkoksoong T, Kongtaphan K, Kasetsinsombat K, Akaraseenont P, et al. Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system. *Arch Pharm Res.* May;34(5):811-20.
61. Picardo M, Carrera M. New and experimental treatments of cloasma and other hypermelanoses. *Dermatol Clin.* 2007 Jul;25(3):353-62, ix.
62. Woolery-Lloyd H, Kammer JN. Treatment of hyperpigmentation. *Semin Cutan Med Surg.* Sep;30(3):171-5.
63. Davis EC, Callender VD. Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. *J Clin Aesthet Dermatol.* Jul;3(7):20-31.
64. Darr D, Combs S, Dunston S, Manning T, Pinnell S. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. *Br J Dermatol.* 1992 Sep;127(3):247-53.
65. Dreher F, Maibach H. Protective effects of topical antioxidants in humans. *Curr Probl Dermatol.* 2001;29:157-64.
66. Espinal-Perez LE, Moncada B, Castanedo-Cazares JP. A double-blind randomized trial of 5% ascorbic acid vs. 4% hydroquinone in melasma. *Int J Dermatol.* 2004 Aug;43(8):604-7.
67. Farris PK. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. *Dermatol Surg.* 2005 Jul;31(7 Pt 2):814-7; discussion 8.
68. Fu B, Li H, Wang X, Lee FS, Cui S. Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *J Agric Food Chem.* 2005 Sep 21;53(19):7408-14.
69. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* 1998 Dec;11(6):355-61.
70. Amer M, Metwalli M. Topical liquiritin improves melasma. *Int J Dermatol.* 2000 Apr;39(4):299-301.
71. Chandrasekaran CV, Deepak HB, Thiyagarajan P, Kathiresan S, Sangli GK, Deepak M, et al. Dual inhibitory effect of Glycyrrhiza glabra (GutGard) on COX and LOX products. *Phytomedicine.* Feb 15;18(4):278-84.

72. Hakozaki T, Minwalla L, Zhuang J, Chhoa M, Matsubara A, Miyamoto K, et al. The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Br J Dermatol*. 2002 Jul;147(1):20-31.
73. Greatens A, Hakozaki T, Koshoffer A, Epstein H, Schwemberger S, Babcock G, et al. Effective inhibition of melanosome transfer to keratinocytes by lectins and niacinamide is reversible. *Exp Dermatol*. 2005 Jul;14(7):498-508.
74. Song JY, Kang HA, Kim MY, Park YM, Kim HO. Damage and recovery of skin barrier function after glycolic acid chemical peeling and crystal microdermabrasion. *Dermatol Surg*. 2004 Mar;30(3):390-4.
75. Roberts WE. Chemical peeling in ethnic/dark skin. *Dermatol Ther*. 2004;17(2):196-205.
76. Park EC, M.Ki, C. Correct Use of Repeated Measures Analysis of Variance. *Review-General Laboratory Medicine*. 2009;29:1-9.
77. Ed:Aktürk Z, Acemoğlu H .Sağlık Çalışanları İçin Araştırma ve Pratik İstatistik, Erzurum 2012).
78. Misery L, Schmitt AM, Boussetta S, Rahhali N, Taieb C. Melasma: measure of the impact on quality of life using the French version of MELASQOL after cross-cultural adaptation. *Acta Derm Venereol*. May;90(3):331-2.
79. Lim JT. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. *Dermatol Surg*. 1999 Apr;25(4):282-4.
80. Garcia A, Fulton JE, Jr. The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic acid for the treatment of melasma and related conditions. *Dermatol Surg*. 1996 May;22(5):443-7.
81. Huh CH, Seo KI, Park JY, Lim JG, Eun HC, Park KC. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin C iontophoresis in melasma. *Dermatology*. 2003;206(4):316-20.
82. Anbar TS, Westerhof W, Abdel-Rahman AT, El-Khayyat MA. Evaluation of the effects of NB-UVB in both segmental and non-segmental vitiligo affecting different body sites. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2006 Jun;22(3):157-63.
83. Abdallah M, Abdel-Naser MB, Moussa MH, Assaf C, Orfanos CE. Sequential immunohistochemical study of depigmenting and repigmenting minigrafts in vitiligo. *Eur J Dermatol*. 2003 Nov-Dec;13(6):548-52.
84. Tobiishi M, Haratake A, Kaminaga H, Nakahara M, Komiya A, Koishikawa H, et al. Pigmentation in intrinsically aged skin of A1 guinea pigs. *Pigment Cell Res*. 2004 Dec;17(6):651-8.
85. Kim J, Taube JM, McCalmont TH, Glusac EJ. Quantitative comparison of MiTF, Melan-A, HMB-45 and Mel-5 in solar lentigines and melanoma in situ. *J Cutan Pathol*. Oct;38(10):775-9.