



**T.C.SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
GÖZ HASTALIKLARI KLİNİĞİ**

**TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN MEMBRAN'IN
KONJONKTİVA YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzmanlık Tezi
Dr. Mehmet Erol CAN

Ankara, 2014



**T.C.SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
GÖZ HASTALIKLARI KLİNİĞİ**

**TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN MEMBRAN'IN
KONJONKTİVA YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzmanlık Tezi
Dr. Mehmet Erol CAN

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Hasan Basri ÇAKMAK

Ankara, 2014

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, iyi bir göz hekimi olarak yetişmem için elinden gelen gayreti sarf eden, tezimin oluşmasında emeği geçen değerli hocam Doç. Dr. Hasan Basri Çakmak'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan Prof. Dr. Faruk Öztürk'e ,Prof. Dr. Canan Gürdal'a , ve Doç. Dr. Nurullah Çağıl'a teşekkürü borç bilirim.

Klinikte geçirdiğimiz günlerde paylaştığımız her şey için tüm uzmanlarımıza, asistan arkadaşlarıma, hemşire ve personel arkadaşlarımıza teşekkür ederim.

Ayrıca eğitimim boyunca yanımda olan, beni her zaman destekleyen sevgili eşime ve aileme sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Bu uzmanlık tezi, TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından 112S550 numaralı kontrat ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR İNDEKSİ	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1 GENEL BİLGİLER	1
1.1. Konjonktiva Anatomisi Ve Fizyolojisi	1
1.2 Konjonktival Yara İyileşmesi	4
1.3 Konjonktival Yara İyileşmesini Hızlandıran Faktörler.....	7
1.4 Konjonktival Yüzey Defektleri.....	9
1.5 Konjonktival Yüzey Defektlerinde Tedavi Seçenekleri	9
1.5.1 Konjonktival Otogreft	10
1.5.2 Mukozal Membran Greftleri	10
1.5.3 Amniyotik Membran Transplantasyonu	11
1.2 Trombositten Zengin Fibrin	13
1.2.1 Trombositten Zengin Fibrin Yapısı ve Özellikleri.....	15
1.2.2 Trombositten Zengin Fibrin Membranın Kullanım Alanları	17
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1 Deney Hayvan Modelinin Oluşturulması.....	18
2.2 Trombositten Zengin Fibrin Membranın Elde Edilmesi ve Uygulanması.....	19
2.3 Enükleasyon İşlemi ve Sonrasında Örneklerin Hazırlanması.....	21
2.4 Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal İnceleme.....	21
3. SONUÇLAR	22
3.1 Histopatolojik Sonuçlar.....	22
3.2 İmmunhistokimyasal Sonuçlar.....	25
4.TARTIŞMA	29
5. SONUÇ	34
6.KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa No
1.1	Konjonktivanın anatomik bölgeleri	1
1.2	Konjonktivanın histolojik bölümleri.....	2
1.3	Yara iyileşmesi sırasında salınan sitokinlerin kaynağı ve etkileri	8
1.4	Trombositlerin içerdiği granüller ve salınan biyokimyasal maddeler	16
3.1	A ve B gruplarının VEGF immunhistokimyasal değerlendirme sonuçları.....	25
3.2	A ve B gruplarının Platelet Derived Growth Factor (PDGF) için immunhistokimyasal değerlendirme sonuçları	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
1.1 Konjonktivanın anatomik bölümleri 1.Bulber konjonktiva, 2.Palpaoreal konjonktiva, 3.Forniks	2
1.2 Konjonktiva histolojisi 1. Konjonktiva epiteli, 2. Lamina propia	4
1.3 Yara iyileşmesinin inflamatuvar evreleri; biyokimyasal ve hücresele olayların özeti	5
1.4 Yara iyileşme evreleri ve meydana gelen olaylar	6
1.5 Santrifuj sonrasında en üste hüresiz plazma, en altta kırmızı kan hücreleri ve ortada ise trombositte zengin fibrin yumağı	14
1.6 Trombositte zengin fibrin membran (TZFM).....	15
1.7 Trombosit zengin fibrin pıhtısının teorik olarak bilgisayar modeli.....	17
2.1 Konjonktiva defekti oluşturulan tavşan gözü	18
2.2 Trombositte zengin fibrin membran (TZFM) uygulanan tavşan konjonktivası ..	19
2.3 Trombositte zengin fibrin membran (TZFM).....	20
2.4 Trombositte zengin fibrin membranının (TZFM) konjonktival defekte sütünasyonu	20
3.1 A. Birinci gün sonunda A grubunda Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanma B. Birinci gün sonunda B grubundaki Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanma. B grubunda daha yoğun inflamasyon izlenmekte.....	23
3.2 A. Yirmisekizinci gün sonunda Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanmada A grubunda inflamasyon, vaskularizasyon ve proliferasyon devam ediyor B. Yirmisekizinci gün sonunda Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanmada B grubunda normal doku histomorfolojisi görülüyor.....	24
3.3 A. Yirmi sekizinci gün sonunda A grubunda Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ile grade 1 boyanma izleniyor B. Yirmi sekizinci gün sonunda B grubunda Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ile grade 0 boyanma izleniyor	26

3.4 **A.** Yirmi sekizinci gün sonunda A grubunda Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ile grade 1 boyanma izleniyor **B.** Yirmi sekizinci gün sonunda B grubunda Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ile grade 0 boyanma izleniyor27



KISALTMALAR İNDEKSİ

TZF	Trombositten zengin fibrin
TZFM	Trombositten zengin fibrin membran
TGF- β	Transforme growth faktör beta
VEGF	Vasküler endotelyal growth faktör
PDGF	Platelet derivated growth faktör
TGF- α	Transforme growth faktör alfa
EGF	Epidermal growth faktör
IGF-1	İnsülin-like growth faktör 1
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
IL-1	İnterlökin 1
IL-4	İnterlökin 4
IL-6	İnterlökin 6
INF- γ	İnterferon gama
b-FGF	Basic fibroblast growth faktör
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle faktör
SMA	Smooth muscle antigen
AMT	Amniyotik membran transplantasyonu
OYH	Oküler yüzey hastalıkları
H&E	Hemotoksilen-Eozin

ÖZET

Bu çalışma ile konjonktiva doku hasarı sonrasında uygulanan trombositten zengin fibrin membranın (TZFM) yara iyileşmesi üzerine etkilerinin histopatolojik ve immunhistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla çalışma 24 adet yeni Zelanda tavşanı üzerinde yapılmıştır. Tüm tavşanların sadece sağ gözlerinde konjonktival hasar oluşturulmuştur. Oniki adet tavşanın sağ gözlerinde hasarlı bölgeye TZFM suture edilirken, diğer 12 adet tavşan kontrol grubunu meydana getirmiştir. Trombositten zengin fibrin membran için tavşanların femoral venlerinden alınan 5 cc periferik kan 10 cc antikoagülsüz laboratuvar tüpünde biriktirilmiştir. Alınan kan örnekleri Hettich EBA-20 santrifuj cihazında yaklaşık 2700 rpm (yaklaşık 400 g) 12 dakika santrifuj edilmiştir. Santrifuj sonrasında tüpün üstünde kalan hücresiz plazma kısmı ile tüpün dibindeki kırmızı kan hücrelerinden oluşan tabakanın arasındaki fibrin materyal penset yardımıyla TZFM kutusunda preslenerek TZFM elde edilmiştir. Elde edilen TZFM konjonktiva hasarı olan bölgeye 7,0 vicryl ile suture edilmiştir. İşlem sonrasında her iki gruptan 3'er adet tavşanın sağ gözleri sırasıyla 1.,3.,7. ve 28. günde histopatolojik ve immunhistokimyasal inceleme gerçekleştirmek üzere ötanazi sonrasında enükle edilmiştir.

Tavşanların ortalama yaşı 22 hafta (12-30 hafta) ve cinsiyetleri dişi idi. Operasyon sonrası dönemde iki grupta da her hangi bir komplikasyon gelişmedi. Makroskopik olarak incelendiğinde TZFM uygulanan grupta yara iyileşmesinin primer konjonktiva dokusu şeklinde gerçekleştiği gözlemlendi. Kontrol grubunda ise makroskopik iyileşme yoktu. Örnekler yirmi sekizinci günde hemotoksilen-eozin ve immunhistokimyasal olarak boyandı. PRFM uygulanan grupta yirmi sekizinci gün sonunda dokunun primer konjonktiva dokusu gibi iyileştiği ve hiç skar dokusunun oluşmadığı gözlemlendi. Ancak kontrol grubunda yirmi sekizinci gün sonrasında fibrozis ile beraber yara iyileşmesinin devam ettiği gözlemlendi.

Sonuç olarak TZFM konjonktiva doku hasarında güvenli ve yan etkisi olmayan, yara iyileşmesi üzerine destekleyici bir biyomateryaldir. Konjonktival yara iyileşmesindeki etkinliği histopatolojik ve immunhistokimyasal olarak primer konjonktiva iyileşmesine göre üstündür. PRFM konjonktiva doku rejenerasyonu için bir iskele malzemesi sağlar. Trombositten zengin fibrin membran kolay elde edilen otogreft bir yöntemdir ve birçok doku iyileşme defektlerinde güvenle kullanılması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Trombositten zengin fibrin membran, konjonktiva doku hasarı

ABSTRACT

In this study it is aimed that to investigate the histopathologic and immunohistochemical effects on wound healing of platelet rich fibrin membrane (PRFM) in conjunctival tissue damage.

The study was made on 24 New Zealand rabbits. All rabbits were created only in the right eye conjunctival damage. Twelve eyes of 12 rabbits was sutured PRFM between the two ends of damage and the other 12 eyes of 12 rabbits served as the control. To prepare PRFM, 5 mL of fresh blood from the femoral vein of a rabbit was collected into 10 mL glass-coated tubes without anticoagulants. Samples were immediately centrifuged at 2700 rpm (approximately 400 g) for 12 minutes using a Hettich EBA-20 centrifuge. After centrifuge the PRFM clots were mechanically separated, using forceps, from red blood cell corpuscles at the bottom of the centrifuge tubes, and acellular plasma called platelet-poor plasma (PPP) at the top of the tubes and PRFM clots were and gently compressed using PRFM box to drain the remaining fluid. The resulting TZFM was sutured with 7.0 vicryl to the region of conjunctival damage. The rabbits were euthanized, and the three eyes in each group were enucleated 1, 3, 7 and 28 days after surgery to perform histopathological and immunohistochemical examination.

The average age of rabbits was 22 weeks (12-30 weeks) and sex was female. There were not developed any complications in both groups postoperatively. When examined macroscopically in the group TZFM, primary conjunctival tissues occurs in the form of wound healing was observed. In the control group there was no macroscopic healing. After enucleation all specimens were taken from covering the wound area. These specimens were stained with hematoxylin eosin and immunohistochemical in the twenty-eighth day. In PRFM applied group tissue was regenerated primary conjunctival tissue and there was no scar formation observed at the end of day 28. However in control group wound healing and fibrosis was observed to continue after 28 day.

Consequently TZFM is a safe and without side effects biomaterial in the conjunctival tissue damage in wound healing. In conjunctival wound healing activity it is superior to the primary wound healing by histopathologic and immunohistochemically. PRFM provides a scaffold material for conjunctival tissue regeneration. PRFM is an autograft method that is easy to obtain and is expected to use in many tissue healing defects safely.

Key words: Platelet rich fibrin membrane, conjunctival tissue damage

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Konjonktiva Anatomisi Ve Fizyolojisi

Konjonktiva, kapakların iç kısmını ve göz küresinin kornea dışındaki ön kısmını örten, içerisindeki Goblet, Wolfring ve Krause bezleri ile salgılama görevi yapan mukozal membran yapısındaki tabakadır (Özçetin, 2003). Saydam ve ince bir zar olan konjonktiva 3 bölümden oluşmaktadır (Özçetin, 2003)(Tablo-1.1, Şekil 1.1).

Tablo 1.1 Konjonktivanın anatomik bölgeleri

Konjonktivanın Anatomik bölgeleri
Kapak (palpebral) konjonktiva
Forniks
Bulber konjonktiva

1.Kapak (Palpebral) konjonktiva: Göz kapaklarının iç yüzeylerini örten, adeziv kısımdır. Üç bölümü vardır.

1.a.Marjinal konjonktiva: Kapak serbest kenarından başlar tars konjonktivasıyla devam eder. Çok katlı keratinsiz epitel ile kaplıdır.

1.b.Tarsal konjonktiva: Alt ve üsteki tarsi sıkıca yapışıktır. Silindirik epitel ile kaplıdır. Bol damarlıdır.

1.c.Orbiter konjonktiva: Altta müler ve levator kasları vardır. Silindirik epitel ile kaplıdır. Yüzeyi papillalıdır.

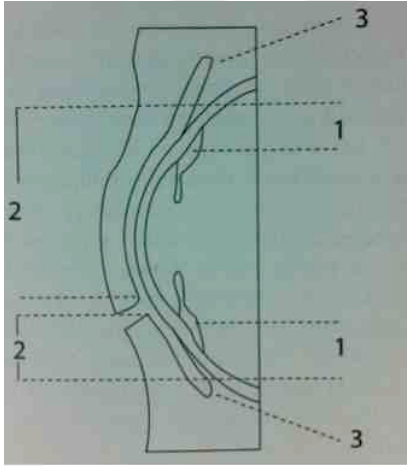
2. Forniks: Göz küresi hareketlerinin serbestçe olmasını sağlayan göz kapağı ve orbita boşluğu arasındaki torba boşluğudur. Alt, üst, iç ve dış bölümlerden oluşmaktadır. İç fornikte alt ucu alt forniksin ortasına kadar uzanan plicata seminularis adını alan konjonktival kıvrım mevcuttur. Plicata seminularisin iç kısmında alt ve üst kapakların iç açıda birleştiği yerde karinkula mevcuttur. Çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Yapısında sebum, krause bezi, kıl folikülleri bulunan pürtüklü bir yapısı mevcuttur.

3.Bulber konjonktiva: İki bölümden oluşur.

3.a.Skleral konjonktiva: Göz küresinin sklerasını örter. Altındaki tenon kapsülüyle yapışıklığı olmadığından cerrahi girişimlerde kolaylıkla disseke edilir. Yapısındaki silindirik epitelyum altındaki kalın substantia propria, epitelyumun göz küresi üstünde kaymasını sağlar.

3.b.Limbal konjonktiva: Kornea çevresinde 3 mm'lik genişliktedir. Altındaki tenon kapsülüne sıkıca yapışmıştır. Limbusda, kornea ve konjonktiva epitelyumları birbiriyle devam ederler. Kornea bazali altındaki Bowman zarı, limbusa gelmeden sonlanır. Limbusda kornea ile konjoktiva arasındaki sınır düzenli değildir. Kornea, konjonktiva içine parmak uçları gibi girintiler yapar (Vogt ve Busacca palisadları). Bu girintiler limbusda saat 6'da, esmerlerde ve yaşlılarda çok belirgindir (Krachmer, Krachmer, & Holland, 1997).

Konjonktiva histolojik olarak iki kısımdan oluşur (Tablo 1.2, Şekil 1.2)



Şekil 1.1 Konjonktivanın anatomik bölümleri 1.Bulber konjonktiva, 2.Palpabreal konjonktiva, 3.Forniks

Tablo 1.2 Konjonktivanın histolojik bölümleri

Konjonktiva'nın histolojik bölümleri
Epitel
Lamina propria (Konjonktiva stroması)

1.Epitel: Konjonktivanın epiteli tüm konjonktivada aynı olmayıp değişiklik göstermektedir. Kapaklar, forniks ve limbus 2-3 mm çevresinde keratinleşmemiş silindirik epitelyum yer alırken, bulber konjonktivada bazal hücreler silindir şeklinde ve yüzeyde ise epitel hücreleri çok katlı yassı epitel şeklindedir. Epitel hücreleri kapak konjonktivasında 2-3, bulber konjonktivada 6-9, limbus bölgesinde ise 7-10 kata kadar çıkabilmektedir (O'Dwyer & Akova, 2011). Konjonktiva epiteli organize bir bazal membrandan yoksundur ve altındaki lamina propria üzerinde gevşek olarak bulunmaktadır. Epitelde bazal hücreler arasında melanositler, lenfositler ve yaygın olarak Langerhans hücreleri bulunmaktadır (O'Dwyer & Akova, 2011).

Limbus bölgesi hariç olmak üzere tüm konjonktivada özellikle de forniks, karinkül ve plica semilunaris bölgesinde epitelyum hücreleri arasında bardak şeklinde müsin salgılayan goblet hücreleri bulunmaktadır.

Epitelin yüzeyinde bulunan mikrovilli ve mikropili adı verilen yapıların üzerini epitel hücreleri tarafından salgılanan ince bir glikokaliks ve hidrofilik özellikteki müsin tabakası örtmektedir. Gözyaşının konjonktiva üzerinde tutulmasında bu yapıların büyük önemi vardır. Müsinin goblet hücrelerinin yanı sıra konjonktiva ve kornea epiteli tarafından da salgılandığı gösterilmiştir.

2. Lamina propria (Konjonktiva stroması) : Lamina propria üstte lenfoid tabaka altta ise fibrovasküler tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur. Lamia propria kapak konjonktivası ve limbus çevresinde ince, bulber konjonktiva ve forniks konjonktivası altında daha kalındır ve altındaki yapılara gevşek tutunmuştur.

Lenfoid tabaka doğumdan sonraki 6. ile 12. hafta arasında oluşmaya başlar. Bu tabakada gözün immün sisteminde önemli rol oynayan lenfositlerin yanı sıra mast hücreleri ve makrofajlar da bulunmaktadır.

Alta bulunan fibrovasküler tabakada ise bağ dokusu, damarlar, lenf yolları ve sinirler bulunmaktadır. Krause ve Wolfring denilen yardımcı gözyaşı bezleri de bu tabakada bulunmaktadır.

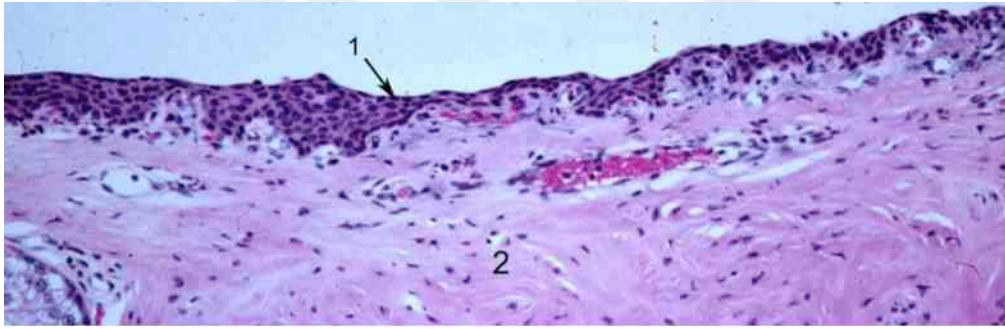
Konjonktiva oftalmik ve fasiyal arterlerin dallarının oluşturduğu arteria konjonktivale posterior ve arteria ciliaris anterior arkları tarafından beslenir. Limbus çevresindeki 3-4

mm'lik alan dışında kalan tüm konjonktiva arteria konjonktivale posterior tarafından beslenirken limbus çevresindeki bölgede ise tenon kapsülü içine dağılmış olan arteria ciliaris anterior dalları (arteria konjonktivalis anterior) tarafından beslenir.

Bulber konjonktivanın venleri episkleral venöz pleksusa, palpebral konjonktivanın venleri ise orbita venlerine dökülür.

Konjonktiva lenfatikleri medialde submandibular, lateralde preauriküler lenf bezlerine boşalır.

Konjonktivanın sinirsel uyarımı nervus trigeminusun oftalmik ve maksiler dalları tarafından sağlanır.



Şekil 1.2 Konjonktiva histolojisi 1. Konjonktiva epiteli, 2. Lamina propia

1.2 Konjonktival Yara İyileşmesi

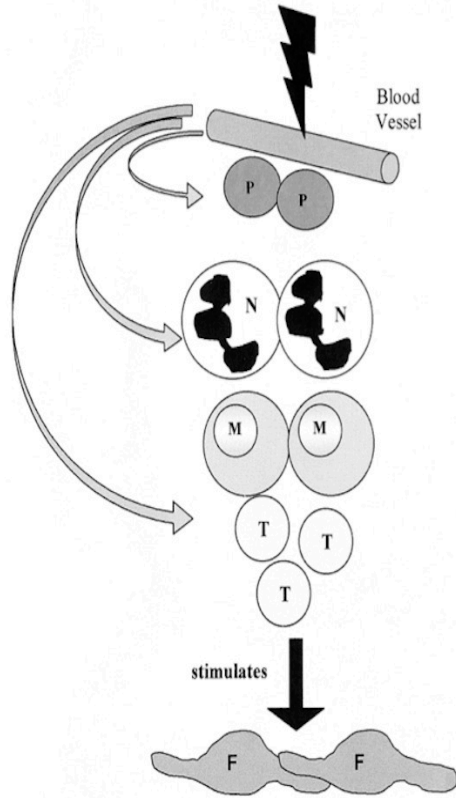
Konjonktiva yara iyileşmesi normal dokudaki yara iyileşmesi ile benzerlik göstermektedir. Dokudaki yara iyileşmesi, birbirini izleyen kompleks ve dinamik 3 aşamalı bir süreçtir. Bu fazlar sırasıyla; inflamatuvar faz, proliferatif faz ve remodeling fazıdır (Singer & Clark, 1999)(Clark, 1996)(Cordeiro et al., 2000).

Yara iyileşmesinin başlangıcı olan inflamatuvar faz, nötrofiller ve monositlerin yara alanına inflamasyona cevap olarak infiltrasyonu ile karakterizedir. Bu aşamada konnektif bağ dokusu ve kan damarlarının hasarlanmasına bağlı olarak plazma proteinleri ile birlikte ekstrasellüler matris fragmanları yara alanına salınırlar. Ayrıca trombosit agregasyonu ve beraberinde hemostaz kaskadı yara yerinde aktive olmuştur. Yara alanında trombositlerin agregasyonu ile başlar ve fibrinojenin fibrin molekülüne

dönüşmesiyle koagülasyon kaskadının son ürünü meydana gelir. Aktive olan trombositler ve koagülasyon kaskadının sonucunda yara yerine büyüme faktörleri, proteazlar ve araşidonik asit metabolitleri salınmaktadır (Cordeiro et al., 2000) (Şekil 1.3).

Trombositlerden salınan başlıca faktörler; PDGF, TGF- α ve TGF- β 'dir.

Ortama salınan büyüme faktörleri yara alınında hücre göçüne ve proliferasyona yol açmaktadır. Ayrıca matriks üretimi ve matriks degradasyonu yapan enzimlerin artışına destek olurlar. İlk 3 gün yara yerinde yoğun olarak bulunan nötrofillerin yerini makrofajlar almaya başlar. Birinci haftadan başlamak üzere fibroblastlar yara yerine hakim olan hücre grubunu oluşturur.



YARALANMA

Trombosit (P) göçü, fibrin oluşumu, kompleman ve araşidonik asit metabolitlerinin aktivasyonu
Artmış damar geçirgenliği ve trombositlerden sitokin salınımı

NÖTROFİL(N) – MAKROFAJ(M)

İlk 24 saatte nötrofil göçü, 3. gün sonunda makrofajlar yara yerinde hakim hücre olur
Makrofajlardan proinflatuar ve profibrojenik faktörler salınması;
PDGF, TGF- β , IL-1, TNF- α , IL-6, M-CSF, TGF- α , EGF, IGF-1, b-FGF

T – LENFOSİT (T)

Yara iyileşmesinde düzenleyici rol alır
PDGF, TGF- β , IL-4, INF- γ

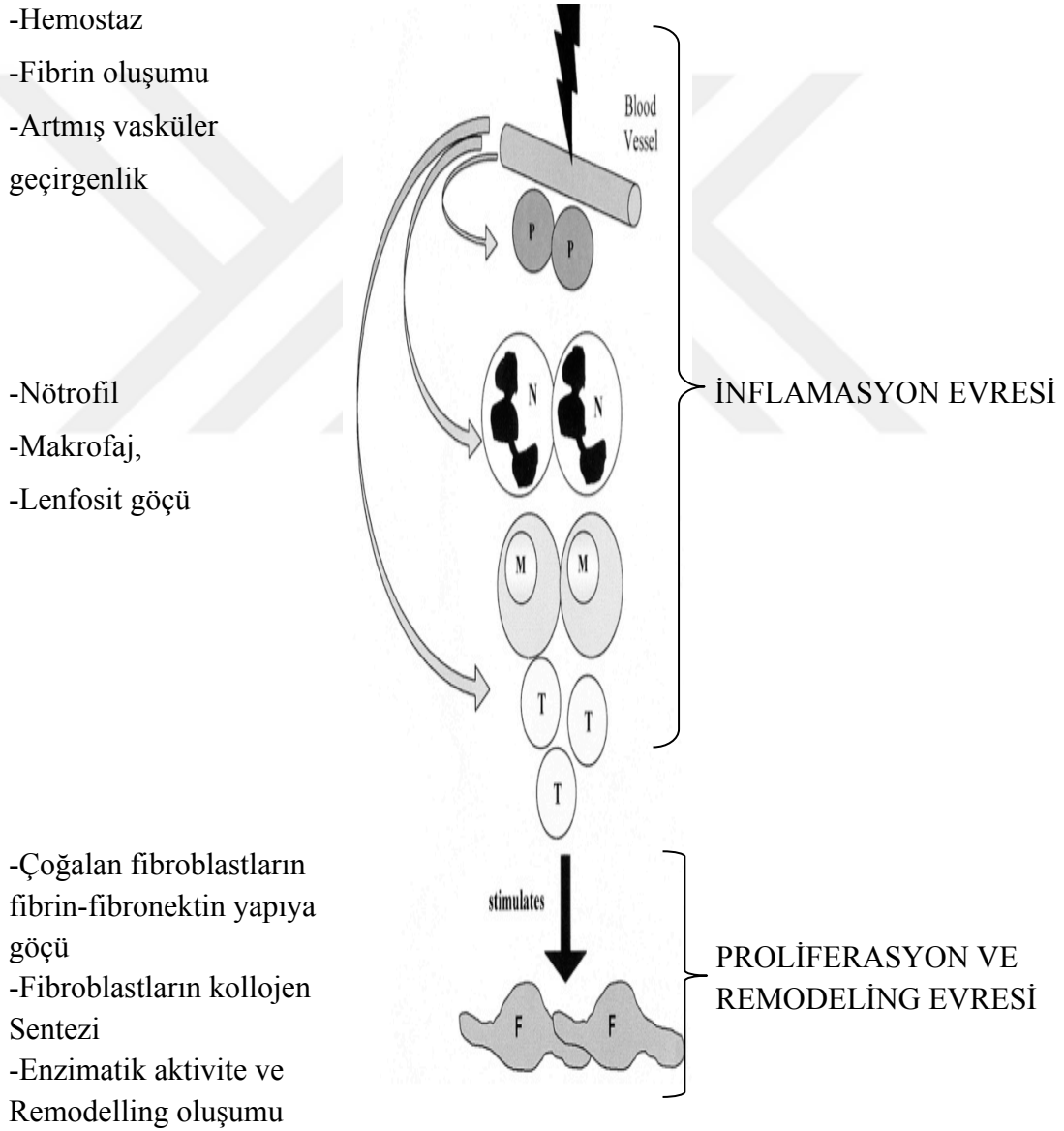
PROLİFERATİF VE REMODELİNG FAZI

Fibroblast (F) proliferasyonu ve granülasyon doku formasyonu

Şekil 1.3 Yara iyileşmesinin inflamatuvar evreleri; biyokimyasal ve hücrel olayların özeti

Proliferatif faz yeniden epitalizasyon ve artmış fibroblastik aktivitee ile karakterizedir. Bu aşamada anjiyogenezis ve granülasyon doku birikimi devam etmektedir.

Fibrin molekülü yara kenarları arasındaki boşlukların doldurulması için iskele görevi görmektedir. 4.günden itibaren granülasyon dokusu ile birlikte yeni matriks dokusu oluşmaya başlar. Remodeling fazda ise granülasyon dokusu yerini skar dokusu almaya başlarken, yara yeri kontraksiyonu meydana gelmektedir. Fibroblastik aktivitenin apoptozis ile kontrolü sonucunda matriks yapım ve yıkımı dengelenmektedir (Şekil 1.4). Tüm bu olayların sonunda yara yeri direnci oluşarak büyük ölçüde iltihapsız hücrelerden yoksun üzeri normal epitelyum ile örtülü doku rejenerasyonu meydana gelir.



Şekil 1.4 Yara iyileşme evleri ve meydana gelen olaylar

1.3 Konjonktival Yara İyileşmesini Hızlandıran Faktörler

Konjonktiva yara iyileşmesinde hücrel ve hümoral faktörler etkilidir. Hücrel faktörlerden trombositler, makrofajlar, lenfositler ve fibroblastlar yara iyileşmesinde etkin rol oynamaktadır. Hücrel faktörlerin etkinliğini regüle eden birçok büyüme faktörü vardır (L, JG, MF, AN, & PT, 2000). Bunların büyük bir kısmı yara bölgesindeki hücrelerden salgılanır ve yara iyileşmesinin her safhasında etkilidir. Bu faktörler; PDGF, TGF- α , TGF- β , EGF, IGF-1, TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, bFGF, ve İnterferonlardır (L et al., 2000)(Tablo1.3).

Tablo 1.3 Yara iyileşmesi sırasında salınan sitokinlerin kaynağı ve etkileri

Sitokin	Salındığı hücre	Sitokinin etkisi
TGF- β	Trombositler	Fibroblast göçünü stimüle eder.
	Makrofajlar	Kollojen sentezini artırır.
	T-lenfositler	Makrofajlar için kemotaktik etkilidir.
	Fibroblastlar	Angiogenesis stimüle eder.
		Epitel ve endotel göçü ve proliferasyonu inhibe eder.
PDGF	Trombositler	Makrofajlar ve fibroblastlar için kemotaktik etkilidir.
	Makrofajlar	Fibroblast, endotel ve epitel hücre proliferasyonunu stimüle eder.
	T-lenfositler	Glikozaminoglikan ve fibronektin üretimini stimüle eder.
	Fibroblastlar	TGF- β sekresyonunu stimüle eder.
	Epitel hücreler	
	Endotel hücreleri	
	Düzkas hücreleri	
TGF- α ve EGF	Trombositler	Epitel hücre kemotaksis ve proliferasyonunu stimüle eder.
	Makrofajlar	Angiogenesis stimüle eder.
	Epitel hücreler	Fibroblast göçünü stimüle eder.
		Fibronektin sentezini stimüle eder.
IGF-1	Makrofajlar	Fibroblast göçünü ve proliferasyonunu stimüle eder.
	T-lenfositler	Ekstra selüler matriks sentezini ve kontraksiyonunu stimüle eder.
	Epitel hücreler	Angiogenesis stimüle eder.
	Endotel hücreleri	Epitel hücre kemotaksis ve proliferasyonunu stimüle eder.
	Fibroblastlar	
	Düzkas hücreleri	
TNF- α	Makrofajlar	Yara iyileşmesinin erken dönemlerinde (ilk birkaç gün) saptanır, proinflamatuar etkilidir.
	T-lenfositler	PDGF'e sinerjist etkilidir.
		Angiogenesis stimüle eder.
		Fibroblastlardan M-CSF sekresyonunu stimüle eder.
		Fibroblast proliferasyonunu invitro stimüle eder.
IL-1	Makrofajlar	Angiogenesis stimüle eder.
	T-lenfositler	Fibroblast proliferasyonunu invitro stimüle eder.
		Fibroblastlardan M-CSF sekresyonunu stimüle eder.
		Kollojen sentezini inhibe eder.
IL-6	Makrofajlar	
	T-lenfositler	
IL-4	T-lenfositler	Fibroblastlar için kemotaktiktir.
		Kollojen ve fibronektin sentezini artırır.
İNTERFERON	T-lenfositler	Kollojen sentezini inhibe eder.
bFGF	T-lenfositler	Fibroblast göçünü ve proliferasyonunu stimüle eder.
	Makrofajlar	Ekstra selüler matriks sentezini ve kontraksiyonunu stimüle eder.
	Endotel hücreleri	Angiogenesis stimüle eder.
		Epitel hücre göçünü ve Ekstra selüler matriks sentezini stimüle eder.

Kompleks olan yara iyileşmesinde herbir hümorale faktör, hücresele faktörler tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Herhangi bir şekilde bu faktörlerdeki yetersizlik yara iyileşmesinin bozulmasına ya da bu faktörlerin fazlalığı ise yara iyileşmesinin normalin dışında patolojik boyutta olmasına neden olmaktadır.

1.4 Konjonktival Yüzey Defektleri

Konjonktival yüzey defektleri tedavi edilmediği takdirde göz hareketlerinde kısıtlılıktan görme kaybına kadar gidebilecek ciddi sorunlara neden olabilmektedir. Bu sorunun etkin bir şekilde tedavisi, meydana gelebilecek organ fonksiyon kayıplarını önlemede önemlidir.

Konjonktiva defektlerindeki primer tedavi, dokuyu rekonstrükte etmek ve fonksiyon gören bir yüzey oluşturmaktır. Tedavi edilen defektler arasında kimyasal yanıklar, periokuler yüzey neoplazileri, pterjium, bleb sızıntısı, filtran cerrahisi, semblefaron serbestleştirilmesi ve skatrisyel konjonktivittir.

Perioküler yüzey neoplazilerinin tedavilerinde öncelikli olarak primer ekzisyon ve konjonktival greftleme tercih edilmektedir. Konjonktival greftlemeye alternatif olarak amniotik membran transpalantasyonu (AMT) kullanılmaktadır.

Pemfigus, Stevens-Johnson, kimyasal yanıkların tedavisinde konjonktiva transplantasyonu genellikle mümkün olmamaktadır. Bu tür oküler yüzey hastalıklarının (OYH) tedavisinde mukozal membran yada AMT kullanılmaktadır.

Glokom cerrahisinden sonra meydana gelen bleb ile ilişkili problemlerden sonra da genellikle AMT kullanılmaktadır.

1.5 Konjonktival Yüzey Defektlerinde Tedavi Seçenekleri

Oküler yüzey kavramı ilk defa 1977 yılında Thoft tarafından tanımlanmıştır (Thoft, 1977). Günümüzde ise oküler yüzey bozukluğu olarak adlandırılan bir grup hastalık tanımlanmıştır. Bu grup hastalıklar içerisinde yer alan Stevens-Johnson sendromu,

kimyasal yanıklar, kontakt lens ile ilişkili keratopati ve pterjiumun tedavisinde oküler yüzey transplantasyonu günden güne geliştirilerek kullanılmıştır. Oküler yüzey hastalıklarının tedavisinde ve restorasyonunda konjonktiva-limbal otogreft, mukozal membran greftleri ve sıklıkla amniyotik membran greftleri kullanılmaktadır.

1.5.1 Konjonktival Otogreft

İlk defa 1977 yılında oküler yüzey epiteli hasarlanmış gözlere sağlıklı konjonktiva doku transplantasyonu işlemi Thoft tarafından tanımlanmıştır (Thoft, 1977). Günümüzde en sık kullanım alanlarından biri olan pterjium cerrahisinde kullanılmaya başlanmasıyla nüks oranlarında azalma görülmüştür. Thoft' un tanımladığı transplantasyon yönteminin temeli konjonktival transdifferansiyasyona dayanmaktadır (Corrent, 1989). Konjonktival otogreft konjonktival skarı olan hastalarda oküler yüzeyin stabilitesini sağlamaktadır (Harris, Berry, Pakurar, & Sheppard, n.d.). Limbal kök hücrelerin keşfinden sonra ilk defa 1989 yılında Kenyon and Tseng, Thoft tekniğini modifiye ederek konjonktiva-limbal otogreft tekniği geliştirmişlerdir (Kenyon & Tseng, 1989). Oküler kimyasal yaralanmalardan kontakt lens ile ilişkili birçok hastalığın tedavisine kadar birçok oküler yüzey hasarında başarılı bir şekilde kullanılması rağmen, iyatrojenik doku defekti ile beraber limbal kök hücre yetmezliğine neden olabilmesi nedeniyle önemli bir sorun teşkil etmektedir. Ayrıca uzun dönemde kullanılan limbal dokunun yerindeki fonksiyonların değişimi ileride olası komplikasyonların gelişimi açısından önem taşımaktadır (Basti & Rao, 2000).

1.5.2 Mukozal Membran Greftleri

Oküler yüzeyde skatrisyel problemlere yol açan Stevens-Johnson sendromu, kimyasal yanıklar gibi durumlarda konjonktiva dokusunun normal yapısının bozulması ile birlikte mukus salgılamında bozulma meydana gelir (Wenkel, Rummelt, & Naumann, 2000). Çeşitli sebeplerden dolayı meydana gelen skatrisyel konjonktiva dokusu; semblefaron, ağrı, kuru göz semptomlarına ve görme düzeyinde azalmaya neden olur (Wenkel et al., 2000). Skatrisyel oküler yüzey patolojilerinde otolog sağlam konjonktivanın transplantasyonu en iyi tedavi seçeneğidir. Fakat otolog konjonktiva naklinin mümkün olmadığı durumlarda farklı yüzey rekonstrüksiyonları

kullanılmaktadır. Bunlar ağız içi, yanak ve dudak mukozası (oral mukozal greftler) (Dening, 1927)(Tsubota et al., 1996)(Shore, Foster, Westfall, & Rubin, 1992), sert damak mukozası (Mannor, Mathers, Wolfley, & Martinez, 1994), maksiller sinüs mukozası (Fry & Woods, 1987), burun mukozası (Wenkel et al., 2000) ve de sıklıkla amniyotik membran mukozasıdır (Shimazaki, Yang, & Tsubota, 1997).

Konjonktivanın kullanılmadığı durumlarda, kullanılan mukozal membran greflerinin etkinliğini ve kullanımını kısıtlayan birçok faktör mevcuttur. Ağız içi, yanak ve dudak mukozası intraepitelyal goblet hücrelerinden yoksundur ve sadece subepitelyal mukozal bezler mevcuttur. Cerrahi hazırlık ve transplantasyon sırasında bu hücrelerin bir kısmında azalma ve hasarlanma gerçekleşmektedir (Vastine, Stewart, & Schwab, 1982). Sert damak mukozası diğer kullanılan mukozalara göre daha kalındır ve bulber konjonktiva için uygun değildir (Mannor et al., 1994), alınmasına bağlı komplikasyonlar mortaliteye neden olabilmektedir. Maksiller sinüs mukozasının da elde edilmesi çok zordur.

Burun mukozası ise son yıllarda oküler yüzeyde kullanılmakta olan başka bir alternatif mukozal grefttir. Burun mukozasının ince olması, alınmasının kolay olması, intraepitelyal salgı bezlerini içermesi ve transplantasyon sonrası immüsupresyon gerektirmemesi avantajlarındandır (Wenkel et al., 2000). Ayrıca içermiş olduğu kök hücreler oküler yüzey rekonstrüksiyonunda fayda sağlamaktadır (Wenkel et al., 2000).

1.5.3 Amniyotik Membran Transplantasyonu

Amniyotik membran fetal plasentanın üçlü tabakasından en içte yer alanıdır. Amniyotik membran içte tek katlı epitel hücreleri ile kalın bir bazal membran, koriona bakan dış yüzde ise kalın kollajen tabakası içeren stromal matriksten oluşan yarı saydam bir zardır (Mamede et al., 2012). Amniyotik membran ilk defa 1910 yılında Davies tarafından ciltte terapötik amaçlı kullanılmıştır (Davis, 1910). Oküler yüzeyde ise AMT ilk defa 1940' lı yıllarda De Rotth (De ROTTH, 1940) ve Sorsby (Arnold Sorsby & Haythorne, 1947)(A Sorsby & Symmons, 1946) tarafından kullanılmıştır. Kim ve Tseng'in 1995 yılında tavsanlarda oküler yüzey hasarı sonucunda AMT ile yaptığı bir çalışma sonrası

popülarite kazanmış ve takip eden yıllarda oftalmoloji dünyasında kullanım alanı giderek artmıştır (J. C. Kim & Tseng, 1995).

Amniyotik membran transpalntasyonu; persistan epitel defektleri, iyileşmeyen stromal ülserler, band keratopati, büllöz keratopati, korneaskleral perforasyonlar, kimyasal yanıklar, skatrisyel pemfigoid, Stevens-Johnson sendromu, toksik epidermel nekroliz, desmotosel, entropiyon, semblefaron, konjonktival malign melanomun ek tedavisi ve parsiyel limbal kök hücre yetmezliğinin de dahil olduğu birçok oküler yüzey bozukluğunda kullanılmaktadır (Ozcan, Ersoz, Yağmur, & Oksuz, 2003)(Huang, Lai, & Lai, 1999).

Amniyotik membranın oküler yüzeyde kullanılmasında etkili olan faktörler; epitelizasyonu hızlandırması (Kurpakus, Stock, & Jones, 1992), fibrozisi inhibe etmesi (Tseng, Li, & Ma, 1999), antiinflamatuvar ve anti anjiyogenetik faktörleri salgılaması (Shimmura, Shimazaki, Ohashi, & Tsubota, 2001), anti mikrobiyal ve anti viral etkinliğinin olmasıdır (Talmi, Sigler, Inge, Finkelstein, & Zohar, 1991)(Ni et al., 1997). Tüm insan organ ve doku nakillerinde olduğu gibi AMT' nin de bulaşıcı hastalık riski mevcuttur. Amniotik membran elektif sezeryan sırasında hepatit B, hepatit C, HIV, HTLV, CMV, Creutzfeld-Jakob hastalığı, tüberkülozis ve sifiliz yönünden seronegatif olan hastalardan hazırlanmaktadır (Addis, Hunt, & Dart, 2001). Amniyon membranı steril şartlarda hazırlanan 50 mg/ml penisilin, 50 mg/ml streptomisin, 100 mg/ml tobramisin ve 2.5 mg/ml amfoterisin B içeren 500cc serum fizyolojik ile kan pıhtılarından temizlenir ve amniyon koryondan künt diseksiyonla ayrılır. Amniyon membranı aynı solüsyon ile yıkanır ve amniyonun koryondan ayrılan tarafı yani epitel yüzeyi yukarı gelecek şekilde steril sellüloz asetat kağıtlara gergin şekilde yerleştirilir. Kağıtlar kare parçalar şeklinde kesilerek Dulbecco modifiye Eagle solüsyonu ve gliserol içeren şişelere yada saklama kaplarına yerleştirilir ve -80°C'de dondurularak saklanır. Kullanılmadan önce oda sıcaklığında bekletilerek erimesi sağlanır.

Amniotik membranın hazırlanması ve saklanması zorluğu yanı sıra, transplasental mikrobiyal geçiş, submembranoz hematoma, erken membran ayrışması, subepitelyal

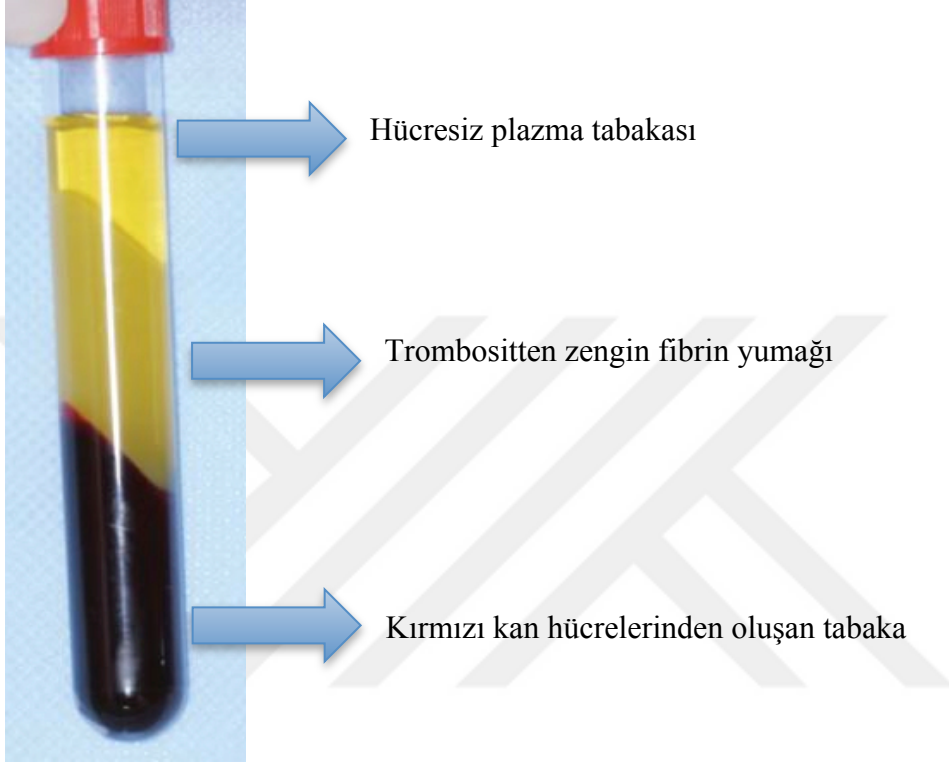
amniyon membran kalıntısı ve piyojenik granülom gibi komplikasyonların görülmesi nedeniyle kullanımı kısıtlıdır (Ma, See, Liau, & Tsai, 2000).

1.2 Trombositten Zengin Fibrin

Trombositten zengin plazma (TZP) ve ürünlerinin son yıllarda özellikle ortodonti ve periodontolojide doku rejenarasyonuna katkı sağladığı birçok araştırmacı tarafından tespit edilmiştir. İçermiş olduğu sitokinler ve büyüme faktörleri, doku rejenerasyonuna ait hücre proliferasyonu, kemotaksis, hücre farklılaşması ve matriks sentezi gibi anahtar hücresel olayları düzenlemektedir. Dolayısıyla TZP, büyüme faktöründen zengin bir otojen kaynaklı plazmadır ve cerrahi olarak uygulanması erken yara iyileşmesi ve rejenerasyonu için olumlu katkılar sağlayabilmektedir (E Anitua, 2000)(Marx et al., 1998).

Trombosit zengin fibrin membran tekniği ağız ve çene cerrahisinde özel kullanım için ilk defa 2001 yılında Fransız Joseph Choukroun ve ark. tarafından Fransa'da geliştirilmiştir (Dohan et al., 2006a)(Dohan et al., 2006b)(Dohan et al., 2006c). Antikoagülan içermeyen deney tüpünün içerisine 10 ml periferik kan alındıktan sonra masa başı santrifüj cihazı ile 2700 rpm (yaklaşık 400g) devirde 12 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında deney tüpünde 3 adet tabaka meydana gelir. En üstte hücresiz plazma, altta koagüle olmuş kırmızı kan hücreleri yer alırken bu iki tabaka arasında trombosit zengin fibrin yumağı yer almaktadır (Şekil 1.5). Bu fibrin yumağı tüp içerisinden penset yardımıyla çıkarılıp kırmızı kan hücrelerinden temizlendikten sonra kullanılmaktadır. Elde edilen trombosit zengin fibrin yumağı preslenerek yoğun TZFM haline dönüştürülebilmektedir (Şekil 1.6). Trombositten zengin fibrin membranı yüksek düzeyde büyüme faktörleri ve matriks proteinleri salgılamaktadır. Büyüme faktörlerinden bazıları VEGF, PDGF ve TGF- β dir. Matriks proteinlerinden ise trombospodin-1, fibronektin, ve vitronektin ortama salınmaktadır (Dohan Ehrenfest, de Peppo, Doglioli, & Sammartino, 2009). Trombositten zengin fibrin membranından salınan faktörler en az 7 (yedi) gün boyunca salınmaya devam etmektedirler (Dohan Ehrenfest et al., 2009).

Trombositten zengin fibrin membranı yara iyileşmesinde fibrin molekülü ve matriks proteinleri ile yara iyileşme alanında destek görevi görürken, salgılamış olduğu büyüme faktörleri ve sitokinler ile yara iyileşmesinin tüm safhalarına yardımcı olmaktadır (Del Corso, Sammartino, & Dohan Ehrenfest, 2009).



Şekil 1.5 Santrifuj sonrasında en üste hüresiz plazma, en altta kırmızı kan hücreleri ve ortada ise trombositten zengin fibrin yumağı



Şekil 1.6 Trombositten zengin fibrin membran (TZFM)

1.2.1 Trombositten Zengin Fibrin Yapısı ve Özellikleri

Hücreler ve dokular hasara uğradığında yaşayan hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını da içerisine alan yara iyileşmesi gerçekleşir. Yara iyileşmesi karmaşık fakat genelde düzenli bir olaydır. Düzenli aralıklarla birbirini izleyen dalgalar halinde özelleşmiş hücre tipleri önce zedenlenme alanını temizler ve sonra giderek artan bir biçimde boşluğu defekt kalmaksızın doldurur.

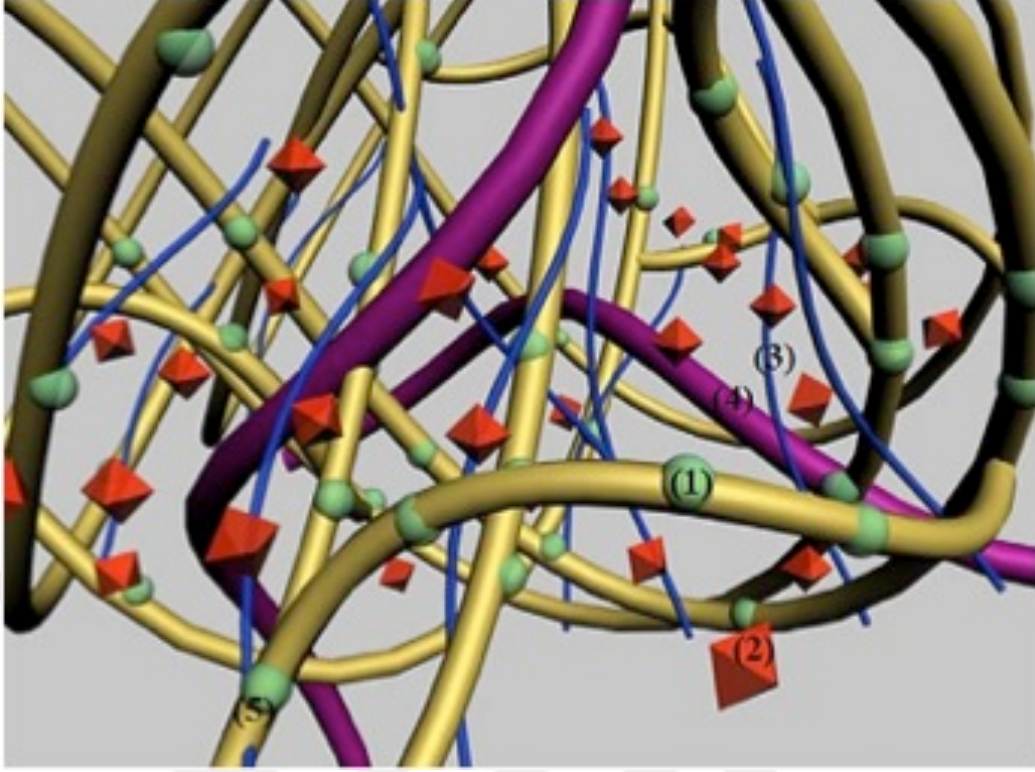
Trombositler kemik iliğindeki megakaryositler tarafından üretilen 2–4 μm çapında, mitokondri ve mRNA içermesine rağmen çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Trombositler, Alfa granül, Delta granül (Yoğun cisim) ve Lambda granüllerine (Lizozomlar) sahiptir (Rendu & Brohard-Bohn, 2001) (Tablo 1.4). Bu granüllerin içindeki faktörler hemostaz sağlanmasının yanı sıra yara iyileşmesine yardımcı olmaktadır.

Tablo 1.4 Trombositlerin içerdiği granüller ve salınan biyokimyasal maddeler

Alfa Granül	Delta Granül (Yoğun Cisim)	Lambda Granül (Lizozomlar)
Glikoproteinler <ul style="list-style-type: none">• Fibronektin, vWF, Trombospondin, vb. Hemostaz Faktörleri <ul style="list-style-type: none">• Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Protein S, Plazminojen, vb. Hücrel Mitojenler <ul style="list-style-type: none">• PDGF, TGF-β, EGF, VEGF, FGF-II, vb. Proteoglikanlar <ul style="list-style-type: none">• PF4, HRGP, PBP, vb. Proteaz İnhibitörleri Albumin-immünglobulinler	Nükleotidler <ul style="list-style-type: none">• ATP,ADP• GTP,GDP Aminler <ul style="list-style-type: none">• Serotonin• Histamin Çift değerlikli Katyonlar <ul style="list-style-type: none">• Kalsiyum• Magnezyum	Asit Proteazlar <ul style="list-style-type: none">• Katepsin D, E• Karboksipeptidazlar• Kollajenaz• Asit Fosfataz• Arisülfataz Glikohidrolazlar <ul style="list-style-type: none">• Heparinaz• Diğerleri

Fibrin; fibrinojen denilen bir plazma molekülünün aktif formudur. Hemostaz sırasında trombosit agregasyonunda belirleyici rol oynar. Aslında, fibrinojen tüm koagülasyon reaksiyonlarının son substratıdır. Polimerize fibrin jel ilk skatrissel yaralı alanın matrisini teşkil ederken, çözünebilen protein olan fibrinojen trombin tarafından bir çözünmeyen fibrine dönüştürülür (Altmeyden, Hansen, Bonnländer, Horch, & Jeschke, 2004)(Brissett & Hom, 2003)(Matras, 1985). Bu nedenle fibrin molekülü bir biyomateryal olarak kabul edilebilir. Trombositler hem hemostaz hem de yara iyileşmesinin başlaması ile ilişkilidir. Bu nedenle hemostaz, iyileşmenin ilk aşaması olarak kabul edilebilir.

Bu teknikte ne antikoagülan ne de sığır trombin (ne de başka bir jelleşme ajanı) gerekmemektedir. Antikoagülan olmadığından tüp duvarları ile temas halinde olan kan trombositlerinin birkaç dakika içinde aktivasyonu sonucu pıhtılaşma meydana gelecektir. Fibrinojen tüpün üst kesiminde yoğunlaşmadan önce, dolaşımdaki trombin'i fibrine dönüştürür. Trombositler teorik olarak tek parça halinde topluca fibrin kafese hapsolmuş olarak bulunur (Şekil 1.7). Bu kafes yapısındaki trombositler sahip oldukları granüllerden ortama büyüme faktörleri, interlökinler vb. mediatörleri salgılayarak yara iyileşmesini hızlandırır.



1-Fibrin fibrilleri üzerindeki sitokin, 2- Trombositler, 3- Fibrin ile ilişkili glikanik zincirler, 4- Dolaşımdaki glikoproteinler(fibronektin), 5- Fibrin fibriller ile ilişkili glikanik zincirler ve sitokinler

Şekil 1.7 Trombosit zengin fibrin pıhtısının teorik olarak bilgisayar modeli

1.2.2 Trombositten Zengin Fibrin Membranın Kullanım Alanları

Trombositten zengin fibrin (TZF) 2. nesil trombosit çözeltilisidir. İlk defa Choukroun ve ark. tarafından ağız ve çene cerrahisinde özel kullanım için geliştirilmiştir. Diş hekimleri tarafından periimplant defektlerin onarılması ve açık ve kapalı sinüs lift operasyonu başta olmak üzere ortodontolojik problemlerde, orta kulak zarı tamirinde, plastik cerrahide, diyabetik hastaların kapanmayan yaralarının tedavisinde, eklem ameliyatlarında özellikle sporcuların eklem ameliyatlarında doku rejenerasyonunu hızlandırmak ve defektif dokuların iyileşmesini desteklemek amacıyla kullanılmaktadır (Jang, Ha, Lee, & Kim, 2011)(Connell et al., 2008)(Sclafani, 2009).

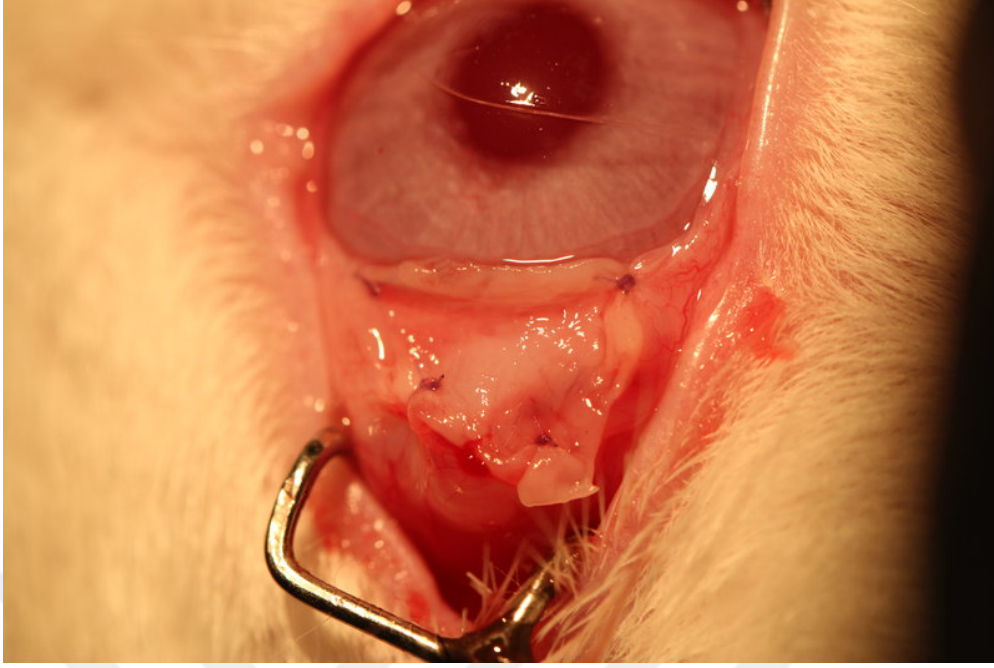
2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Deney Hayvan Modelinin Oluşturulması

Çalışmaya 24 adet yaşları 12 ila 30 hafta arasında, ortalama ağırlığı 3000-3500 kg arasında değişen dişi yeni Zelanda tavşanı alındı. Tavşanlar kontrol ve çalışma grubu olmak üzere iki gruba (A grubu ve B grubu) ayrıldı. Tüm deney hayvanlarının sadece sağ gözleri çalışmaya dahil edildi. A grubundaki tavşanlar kontrol grubunu oluştururken, B grubundaki tavşanlar ise çalışma grubu olarak alındı. Tavşanların tüm işlemleri genel anestezi altında gerçekleştirildi. Tavşanların genel anestezisi ketamine (50mg/kg vücut ağırlığı) ve xylazine (5mg/kg vücut ağırlığı) ile intramusküler yoldan uygulandı. Genel anestezi altında A grubundaki tavşanların sağ göz konjonktivalarının üst kadranda, limbustan 5 mm uzaklıktan 10X10 mm boyutlarında kare şeklinde konjonktiva dokusu subkonjonktival 0,5 cc Dengeli Tuz Solusyonu (DTS) ile şişirildikten sonra tabanda çıplak sklera kalıncaya kadar diseksiyon sonrasında eksize edilerek primer yara iyileşmesine bırakıldı (Şekil 2.1). B grubundaki tavşanlarda ise genel anestezi altında sağ gözlerde kontrol grubundaki tavşanlar gibi aynı kadranda doku defekti meydana getirildi, doku defekti olan bölgeye elde edilen TZFM uygulandı (Şekil 2.2).



Şekil 2.1 Konjonktiva defekti oluşturulan tavşan gözü



Şekil 2.2 Trombositten zengin fibrin membran (TZFM) uygulanan tavşan konjonktivası

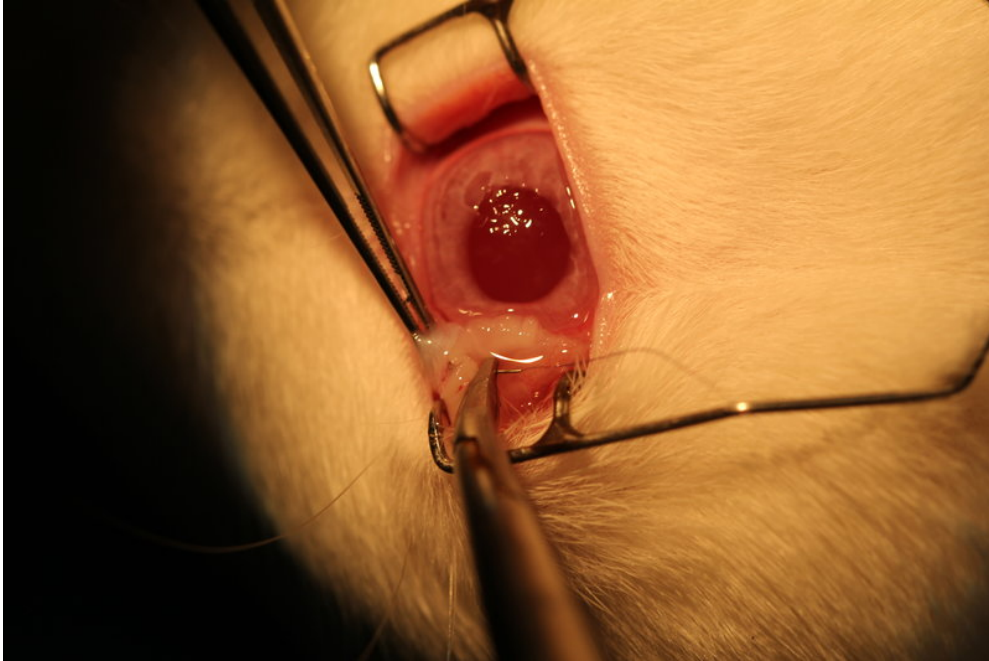
2.2 Trombositten Zengin Fibrin Membranın Elde Edilmesi ve Uygulanması

Çalışma grubundaki tavşanların her birinden saha temizliği yapıldıktan sonra femoral yada kulak venlerinden steril bir şekilde yaklaşık 5cc kan örnekleri antikoagülan içermeyen 10 cc tüp içerisine alındı. Alınan örnekler 12 dakika boyunca Hettich EBA 20 Santrifuj cihazı ile 2700 rpm devirde (≈ 400 g kuvveti) santrifüj işlemine tabi tutularak TZF materyali elde edildi. Daha sonra forseps yardımıyla tüpteki orta tabakadan TZF jeli ayrılarak TZFM hazırlama aparatı ile preslenmek suretiyle membran haline dönüştürüldü (Şekil 2.3). Elde edilen TZFM konjonktiva hasarı olan bölgeye 7,0 vicrly yardımıyla suture edildi (Şekil 2.4).

Postoperatif 1.günden ötenazi işlemine kadar olan dönemde her iki gruptaki tavşanların konjonktiva dokuları Canon EOS 650 D fotoğraf makinesi ile makro çekim yapılarak yara iyileşmesi dökümanate edildi.



Şekil 2.3 Trombositten zengin fibrin membran (TZFM)



Şekil 2.4 Trombositten zengin fibrin membranın (TZFM) konjonktival defekte sütürasyonu

2.3 Enükleasyon İşlemi ve Sonrasında Örneklerin Hazırlanması

Ötenazi işlemi tavşanlar genel anestezi altındayken intravenöz Xylazine 2cc enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. Konjoktiva 360 derece diseke edildikten sonra rektus kasları, kas forsepsi yardımıyla ekarte edildikten sonra skleraya yapıştıkları yerden kesildi. Orbita serbestleştirildikten sonra nazikçe öne çekildi ve künt uçlu enükleasyon makası ile temporal taraftan globun arkasına ucu kapalı olarak girildi. Optik sinir kapalı makas ucu ile hissedildikten sonra makasın ucu açılarak optik sinir çok kısa güdük kalmayacak şekilde kesildi. Göz küresi çevre bağ dokudan serbestleştirilerek çıkarıldı ve enükleasyon tamamlandı. Postoperatif 1. günden başlamak üzere her iki gruptan 3'er adet toplam 6 tavşana ötenazi uygulandı. Benzer şekilde 3. günde 6 adet, 7. günde 6 adet ve 28. günde ise son kalan 6 adet tavşana ötenazi işlemi uygulandı. Ötenazi sonrası her gruptaki tavşanların gözleri enükleasyon sonrası 24-48 arasında formaldehid solüsyonunda fiksasyon amacıyla tutuldu. Formaldehid solüsyonunda bekletildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Daha sonra her tavşanın yara iyileşmesi bölgesinden alınan parafin içine gömülü örneklerden mikrotom yardımı ile 4 mikrometre (μm) kalınlığında kesitler alındı. Alınan örneklerden daha sonra histopatolojik ve immunhistokimyasal incelemeler gerçekleştirildi.

2.4 Histopatolojik ve İmmunhistokimyasal İnceleme

Mikrotom yardımıyla alınan kesit örnekleri öncelikli Hemotoksilen-Eozin (H&E) ve Smooth Muscle Antigen (SMA) yardımıyla boyanarak yara iyileşmesi mikroskopik olarak değerlendirildi. Daha sonra alınan tüm örneklerde monoklonal VEGF antikoru, VEGF reseptör 2, monoklonal PDGF ve monoklonal TGF- β boyanma gerçekleştirilerek immunhistokimyasal değerlendirme için örnekler hazırlandı.

3. SONUÇLAR

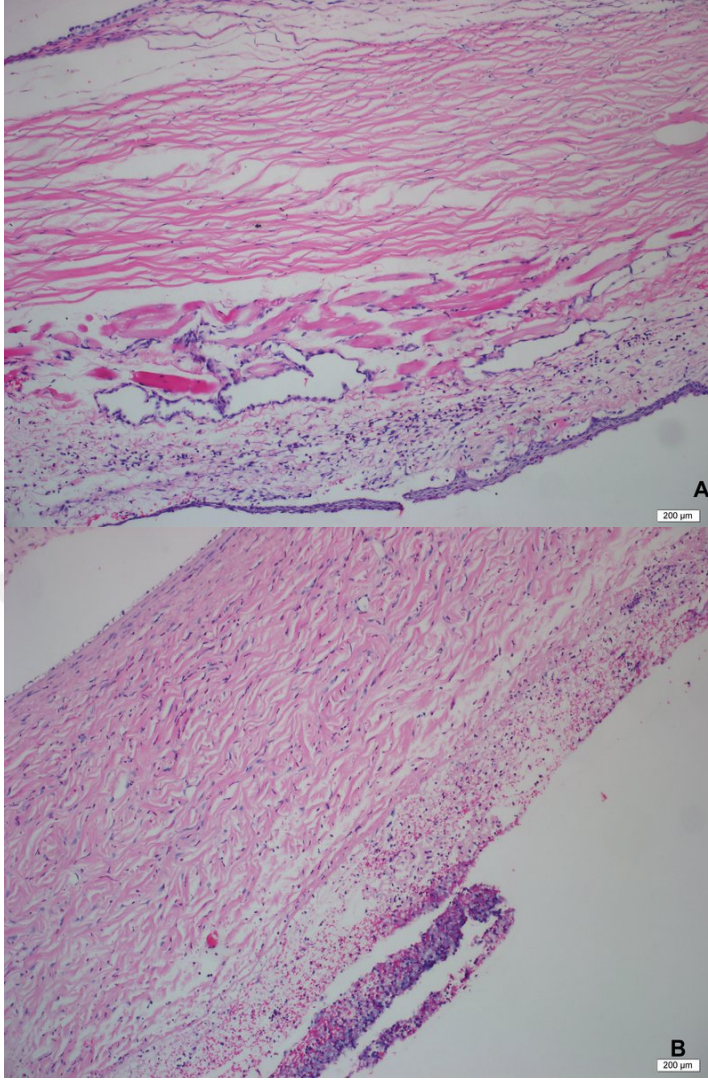
Operasyon sonrası hem kontrol hem de çalışma grubundaki tavşanlarda cerrahi işlem sırasında ve sonrasında herhangi bir komplikasyon gerçekleşmedi. Tüm sonuçlar tek merkezde ve aynı ekip tarafından değerlendirildi. Değerlendirme öncesi Lam-lamalize otomatik boyama cihazının kalibrasyonu yapıldı. İmmunhistokimyasal inceleme için kullanılacak monoklonal antikorların tavşan dokusunda boyanma özelliği işlemde önce denenerek boyanma sağladığı tespit edildi. VEGFR 2'nin tavşan dokusunda boyanması gerçekleşmediği için değerlendirilemedi.

Boyanma sonrası sonuçlar için grade 0-3 arasında değişen derecelendirme sistemi kullanıldı. Bu derecelendirme sisteminde immünhistokimyasal boyanma paterni dokularda boyanmanın şiddetine ve yaygınlığına göre +, ++, +++ olarak değerlendirildi. Grade 0' da herhangi bir boyanma yok iken grade 3 en yoğun boyanma olarak kabul edildi.

3.1 Histopatolojik Sonuçlar

Enükleasyon materyalleri %10' luk formaldehid solüsyonu içinde tespit edildikten sonra, uygun lokalizasyonlardan örnekler alındı. Dokular doku takip cihazında bir gece uygun solüsyonlardan geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom cihazı ile 4 µm kalınlıkta kesitler alınarak etüvde parafinden arındırıldı ve Hemotoksilen&Eozin (H&E) boyası ile boyanarak mikroskop altında incelendi.

Birinci günde enükle edilen dokulardan çalışma grubunda kontrol grubuna oranla daha fazla inflamasyon gözlemlendi. Her iki grupta da belirgin bir vasküler proliferasyon ve fibrozis gözlenmedi (Şekil 3.1).



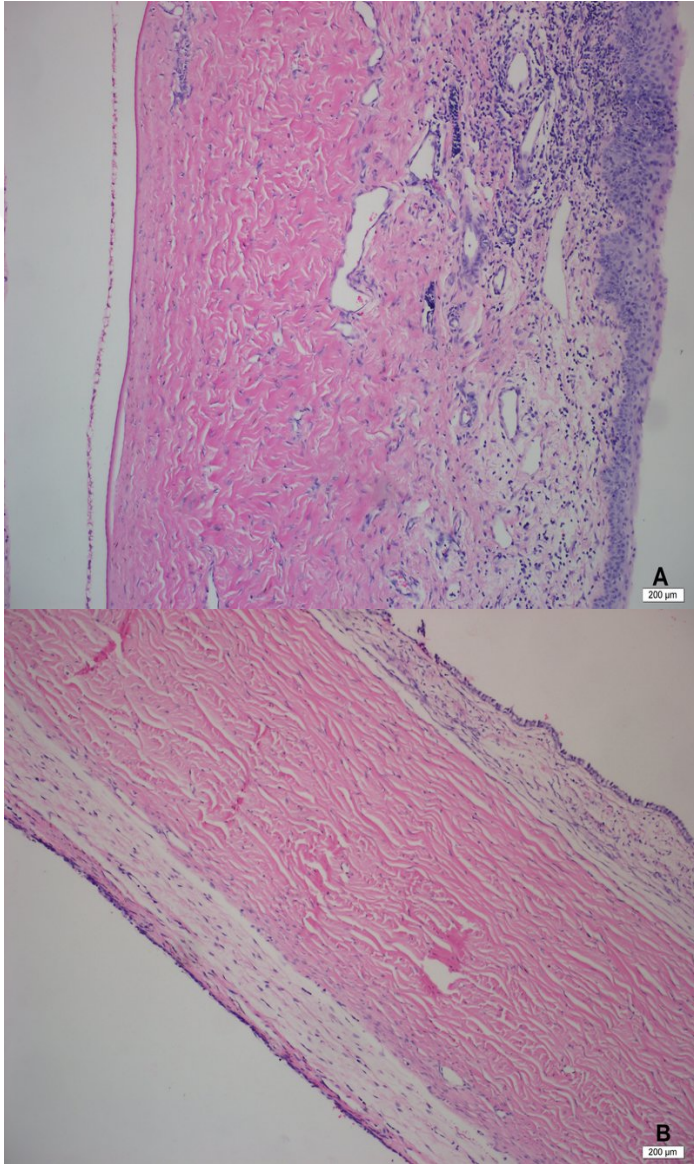
Şekil 3.1 A. Birinci gün sonunda A grubunda Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanma
B. Birinci gün sonunda B grubundaki Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanma. B grubunda daha yoğun inflamasyon izlenmekte

Üçüncü günde enükle edilen dokulardan B grubunda A grubuna oranla biraz daha fazla inflamasyon bulunduğu saptandı. Ancak her iki grupta da inflamasyonun 1. güne oranla azaldığı izlendi. Dokularda B grubunda biraz daha belirgin oranda vasküler proliferasyonun tabloya eşlik ettiği gözlemlendi.

Yedinci günde A grubunda inflamasyonun bir miktar devam ettiği ancak B grubunda belirgin ölçüde azaldığı izlendi. Vasküler proliferasyon her iki grupta da devam

etmekteydi. Bu dönemde gruplarda iltihabi granülasyon dokusunun gelişmeye başladığı izlendi.

Yirmisekizinci günde A grubunda inflamasyon, vasküler proliferasyon ve fibrozis çeşitli şiddetlerde izlenirken, B grubunda dokunun tamamen iyileştiği ve normal histomorfolojisine dönüştüğü tespit edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 A. Yirmisekizinci gün sonunda Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanmada A grubunda inflamasyon, vaskülarizasyon ve proliferasyon devam ediyor **B.** Yirmisekizinci gün sonunda Hemotoksilen&Eozin (H&E) ile boyanmada B grubunda normal doku histomorfolojisi görülüyor

Smooth Muscle Antigen ile boyanmada B grubunda sadece 3. günde pozitiflik tespit edildi. A grubunda ise 3. günden başlayan 7. ve 28. gün sonunda devam eden SMA pozitifliği görüldü.

Her iki grupta 28. günün sonunda makroskopik olarak kıyaslama yapıldığında, B grubunda doku defektinin tamamen normal konjonktiva dokusu şeklinde iyileştiği ve doku formasyonunun doğal olduğu gözlenirken; A grubunda ise devam eden inflamasyon ile birlikte konjonktival doku formasyonunun oluşmadığı izlendi.

3.2 İmmunhistokimyasal Sonuçlar

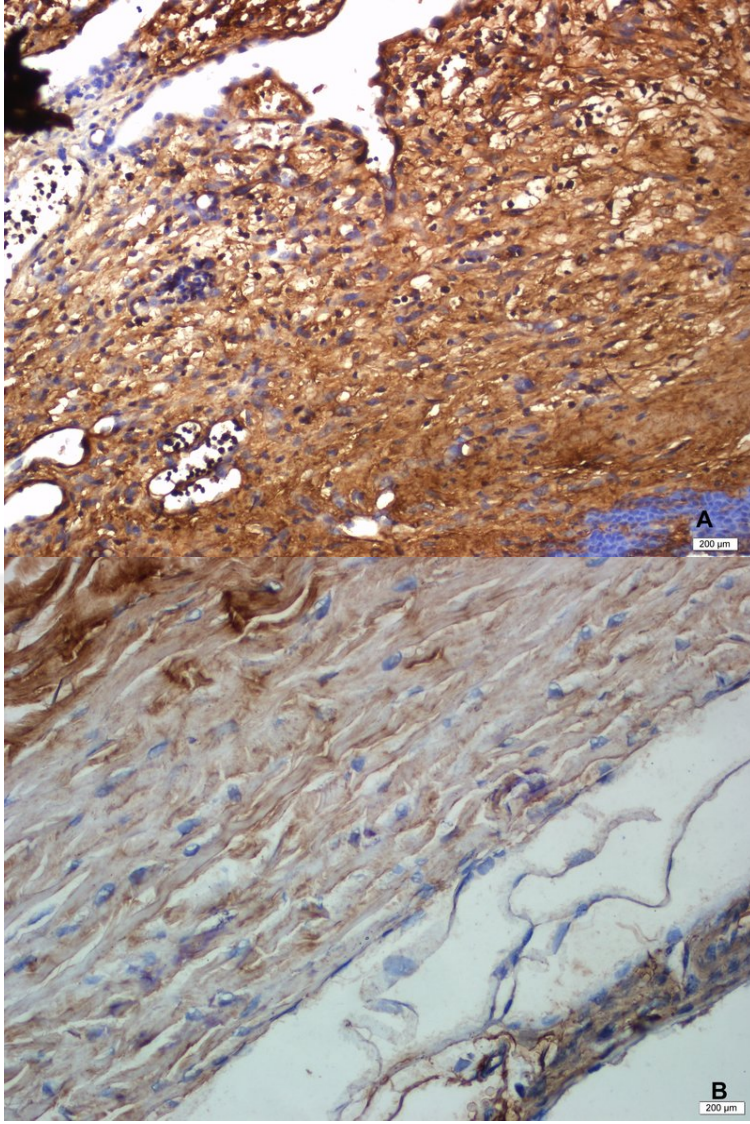
Parafin bloklardan alınan örneklerde daha önceden belirlenen immunhistokimyasal işaretçilerden VEGF, TGF- β ve PDGF ile boyanma gerçekleştirildi.

Vascular Endotelial Growth Factor, 1. gün sonunda B grubunda grade 1 olarak tespit edilirken, A grubunda grade 0 olarak tespit edilmiştir. Üçüncü ve 7.gün sonunda ise VEGF, B grubunda grade 2 olarak devam ederken, A grubunda 3. gün grade 1, 7.gün sonunda ise grade 2 olarak tespit edilmiştir. Yirmisekizinci gün sonunda ise B grubundaki preparatlarda VEGF, grade 0 boyanma paterni gösterirken, A grubunda ise grade 2 olarak boyanma paterni göstermiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 A ve B gruplarının VEGF immunhistokimyasal değerlendirme sonuçları

Patolojik inceleme günü	VEGF	
	A grubu	B grubu
1.gün	-	+
3. gün	+	++
7.gün	++	++
28.gün	++	-

Platelet Derived Growth Factor, 1.gün A ve B grubunda grade 1 olarak izlenmiştir. Üçüncü gün boyamalarda ise A grubunda grade 1 olarak boyanma izlenirken, B grubunda 3. gün grade 2 olarak boyanma gözlenmiştir. Yedinci gün incelemelerde PDGF için hem A hem de B grubunda grade 2 boyanma izlenmiştir. Yirmi sekizinci gün boyanmalarda ise A grubunda PDGF ile grade 1 boyanma izlenirken, B grubunda grade 0 boyanma izlenmiştir (Şekil 3.3)(Tablo 3.2).

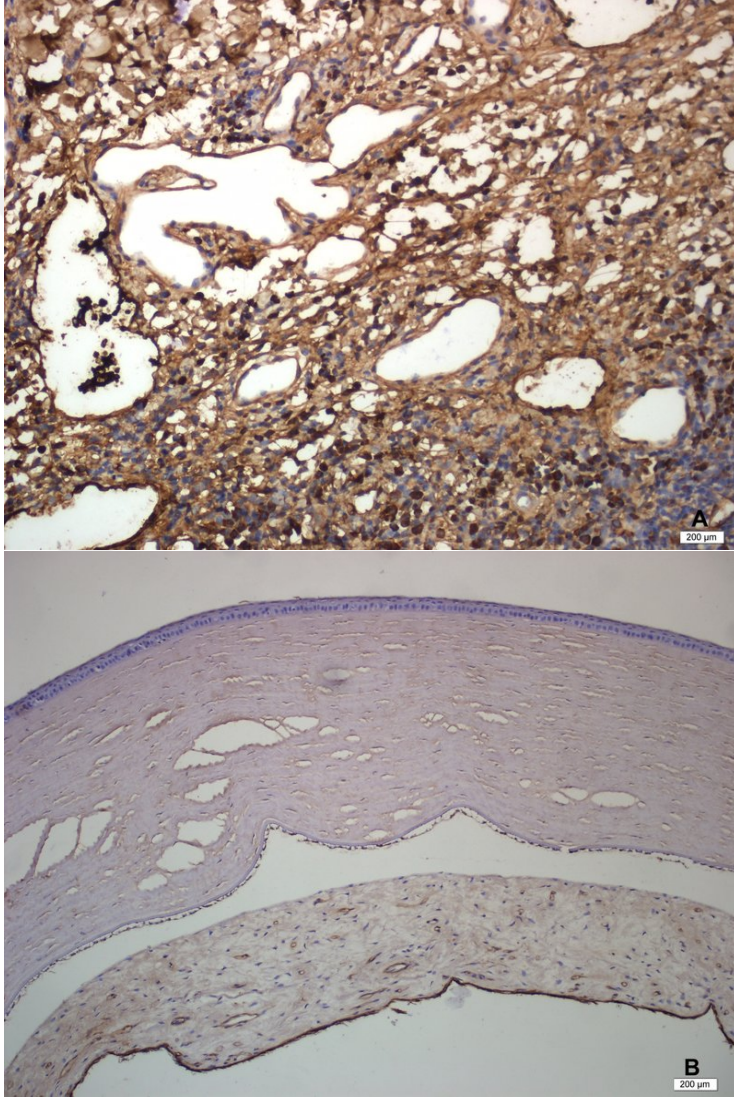


Şekil 3.3 A. Yirmi sekizinci gün sonunda A grubunda Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ile grade 1 boyanma izleniyor B. Yirmi sekizinci gün sonunda B grubunda Platelet Derived Growth Factor (PDGF) ile grade 0 boyanma izleniyor

Tablo 3.2 A ve B gruplarının Platelet Derived Growth Factor (PDGF) için immunhistokimyasal değerlendirme sonuçları

Patolojik inceleme günü	PDGF	
	A grubu	B grubu
1.gün	+	+
3. gün	+	++
7.gün	++	++
28.gün	+	-

Transforming Growth Factor Beta ile 1. gün boyamalarda A grubunda grade 0 olarak boyanma izlenirken, B grubunda grade 1 olarak boyanma izlenmiştir. Üçüncü gün TGF- β ile boyanmada A grubunda grade 1 boyanma izlenirken, B grubunda grade 2 olarak boyanma gözlenmiştir. Yedinci gün boyanmalarda ise hem A hem de B grubunda grade 2 olarak boyanma tespit edilmiştir. Yirmi sekizinci gün sonunda ise A grubunda grade 1 boyanma izlenirken, B grubunda grade 0 olarak gözlenmiştir (Şekil 3.4)(Tablo 3.3).



Şekil 3.4 A. Yirmi sekizinci gün sonunda A grubunda Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ile grade 1 boyanma izleniyor **B.** Yirmi sekizinci gün sonunda B grubunda Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ile grade 0 boyanma izleniyor

Tablo 3.3 A ve B gruplarının Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ile immunhistokimyasal değerlendirme sonuçları

Patolojik inceleme günü	TGF- β	
	A grubu	B grubu
1.gün	-	+
3. gün	+	++
7.gün	++	++
28.gün	+	-

4. TARTIŞMA

Oküler yüzey hastalıkları içinde yer alan; konjonktival doku defekti, kronik inflamasyon ve limbal kök hücre yetmezliği gibi hastalıkların tedavisinde çeşitli tedavi seçenekleri mevcuttur. Oküler yüzey hastalıklarının uygun bir şekilde tedavisinin yapılamaması; gözde ağrı, göz hareketlerinde kısıtlılık, kapak deformiteleri, vaskülarizasyon, skatrizasyon ve bunların bir sonucu olarak da görme azlığına neden olabilecek ciddi sonuçlar meydana getirir (Holbach, 1995)(Kheirkhah et al., 2008). Bu yüzden OYH' nin uygun bir şekilde tedavi edilmesi morbiditenin azaltılması için önem arz etmektedir. Günümüzde OYH tedavisinde en sık kullanılan yöntemlerin başında konjonktival otogreft, AMT ve mukozal membran greftleri yer almaktadır.

Konjonktival otogreft tekniği başarılı yüzey stabilitesinin sağlanması yanında limbus ile beraber kullanıldığında mevcut kök hücrelerin nakli gerçekleştiği için başarı oranı yüksektir. Bununla beraber konjonktival otogreft tekniğinde iyatrojenik doku defektine neden olunması, özellikle limbal kök hücreler ile beraber kullanılması bu tekniğin kısıtlamalarıdır.

Oküler yüzey hastalıklarından olan pterijum tedavisinde en sık kullanılan ve cerrahisi sonrasında nüks oranı en düşük olan yöntem konjonktival otogrefttir (Prabhasawat, Barton, Burkett, & Tseng, 1997). Fakat tekniğin zor oluşu, her zaman greft alınması için gerekli dokunun olmamasının yanında greftte ödem, greft nekrozu, subkonjonktival hematom, inklüzyon kistleri, tenon granulumu, dellen oluşumu gibi komplikasyonlar bildirilmiştir (Prabhasawat et al., 1997)(Cukur, Yararcan, Akyol, & Çakmaklı, 1997)(Lewallen, 1989).

Amniyotik membran transplantasyonu günümüzde OYH tedavisinde en sık kullanılan yöntemdir (Dua, Gomes, King, & Maharajan, 2004). Amniotik membranın korneal epitel defekti, desmatosel, pterijum cerrahisi, oküler kimyasal travmalar ve skatrisyel hastalıkların tedavisi başta olmak üzere geniş bir kullanım alanı mevcuttur (Dua et al., 2004). Amniyotik membranın içermiş olduğu sitokinler ve büyüme faktörleri sayesinde oküler yüzey doku defektlerinin iyileşmesine destek olurken (Koizumi et al., 2000),

salgıladığı anti inflamatuvar faktörler sayesinde skar dokusunun oluşmasına engel olduğu gösterilmiştir (Lee, Li, Tan, Meller, & Tseng, 2000).

İlk defa Kim ve Tseng tarafından oküler yüzey hasarı oluşturulan tavşan gözlerinde etkinliği gösterildikten sonra oftalmojide yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (J. C. Kim & Tseng, 1995). Pterjium cerrahisinde konjonktival otogreft kadar etkili olduğu genel olarak kabul edilmekle beraber başarı oranı çeşitli yayınlarda değişiklik göstermektedir. Zheng K ve ark. (Zheng, Cai, Jhanji, & Chen, 2012) yapmış oldukları meta analiz sonucunda AMT ile konjonktival otogreft arasında nüks oranları arasında anlamlı fark tespit etmemişler, Prabhasawat ve ark. (Prabhasawat et al., 1997) ise AMT ile tedavi ettikleri pterjium hastalarında %37,5 nüks oranı tespit etmişlerdir. Ahmad Kheirkhah ve ark. (Kheirkhah et al., 2011) konjonktival otogreft ile AMT' yi karşılaştırdıkları bir çalışmada 1. ay sonunda AMT ile tedavi edilen pterjium hastalarının %85,1' inde cerrahi alanda konjonktival inflamasyonun devam ettiği gözlemlemişler, konjonktival otogreft grubunda ise bu oranı %15 olarak tespit etmişlerdir. Ahmad Kheirkhah ve ark. (Kheirkhah et al., 2011) bu durumun nüks oranlarındaki değişiklerle ilişkili olabileceğini ifade etmişlerdir.

Konjontival hasarların yanında korneal yüzey hastalıklarından olan tekrarlayıcı epitel defektleri ve desmatoselde kullanılabilmesi konjoktival otogreftte üstünlüğüdür. Konjonktival otogreft elde edilirken doku defektine neden olmaktadır. Geniş oküler yüzey defektlerinde elde edilememesi ve kullanılamaması amniotik membrana göre dezavantajlarıdır.

Amniyotik membran hazırlanması pahalı ve saklanması zor bir yöntemdir. Hazırlanması için ilaç olarak penisilin, streptomisin, tobramisın ve amfoterisin B'ye , nitrozselüloz kâğıdına, Dulbecco modifiye Eagle solüsyonuna ve Gliserol'e ihtiyaç vardır. Ayrıca hazırlandıktan sonra -80°C'de muhafaza edilmesi gerekmektedir. Amniyotik membran transplantasyonuna bağlı HCV, HBV ve HIV kontaminasyonu gelişebilir. Amniyotik membranın elde edileceği donörün seronegatif olması gerekmektedir.

Oküler yüzey hastalıklarında konjonktival otogreft ve amniyotik membranın kullanılmadığı durumlarda mukozal membranlar kullanılmaktadır. En sık kullanılan mukozal membranlar; ağız içi yanak ve dudak mukozası (Dening, 1927) (Tsubota et al., 1996)(Shore et al., 1992), sert damak mukozası (Mannor et al., 1994), maksiller sinüs mukozası (Fry & Woods, 1987) ve burun mukozası (Wenkel et al., 2000) dır.

Ağız içi yanak ve dudak mukozası (oral mukozal greftler) skatrisyel OYH' ye bağlı meydana gelen konjonktiva ve korneal problemlerde en sık kullanılan mukozal membrandır (Fu, Liu, & Tseng, 2011). Yeterli boyutta kolayca greft elde edilebilmesinin kolaylığı ve greftin stabilliğini koruması önemli bir avantajdır. Bununla birlikte goblet hücrelerini içermediği için bazı endikasyonlarda kısıtlmaya neden olmaktadır (Mai & Bertelmann, 2013). Ayrıca oral mukoza alınırken meydana gelen epitel hasarlanması veya epitel kaybı önemli bir sorun olmaktadır (Vastine et al., 1982). Sert damak mukozası diğer greftlerden farklı olarak daha kalın bir greft özelliği taşır. Oküler yüzey epiteli non-keratinize epitele sahiptir. Sert damak epiteli ise normalde keratinize bir epitele sahiptir. Transplantasyon sonrası bu epitel non-keratinize forma dönüşmektedir (Cohen & Shorr, 1992). Fakat sert damak mukozası transplantasyonu yapılan bazı olgularda parakeratoz ve ortokeratozun devam ettiği izlenmiştir (Pelletier, Jordan, Brownstein, & Li, 1998)(Ito, Fujiwara, & Nagasako, 2007). Sert damak mukozasının elde edilmesi diğer mukozal membranlara göre zordur.

Diğer bir alternatif mukozal membran ise burun mukozasıdır. Burun mukozası ince, elde edilmesi kolaydır. Goblet hücrelerinin yanı sıra intraepitelyal salgı bezlerini içermektedir (Wenkel et al., 2000). Ayrıca iyi gelişmiş bir vasküler yapıya ve bol miktarda kök hücreye sahiptir (Wenkel et al., 2000)(J. H. Kim et al., 2010). Wenkel ve ark.(Wenkel et al., 2000) mukus defektine neden olan OYH' de nazal mukozal membranın uzun dönem sonuçlarında, impresyon sitolojik incelemelerde goblet hücre sayısının arttığını, göz yaşı film kapasitesinin düzeldiğini ve hastaların görme düzeylerinde artış meydana geldiğini göstermişlerdir.

Trombositten zengin fibrin, 2. nesil bir trombosit konsantrasyonudur (A Simonpieri, Choukroun, Girard, Ouaknine, & Dohan, 2004). Daha öncesinde kullanılan TZP' ye

göre birçok avantajı vardır. Trombositten zengin plazmanın hazırlanması sırasında 2 kez santrifüj işlemine gereksinim duyulur. Antikoagulan içerikli tüpe ihtiyaç vardır ve hazırlığın tamamlanabilmesi için sığır trombini ve kalsiyum klorid kullanılır, nispeten pahalı bir uygulamadır.

Trombositten zengin fibrinin elde edilmesi TZP' ye göre kolaydır. Antikoagülen içermeyen tüpe alınan periferik kanın masa başı santrifüj cihazıyla santrifüje edilmesi sonucunda elde edilir (A Simonpieri et al., 2004). Elde edilen fibrin preslenmek suretiyle TZFM haline getirilmektedir. Santrifüj sonucunda edilen fibrin jel koagülasyon kaskadının son ürünüdür. Bu fibrin ürünün içerisinde çok sayıda trombosit bulunmaktadır. Bu trombositlerden çeşitli miktarlarda büyüme faktörleri ve sitokinler salınmaktadır (Dohan et al., 2006c). Bu büyüme faktörleri ve sitokinler başta ortodonti ve periodontolojide kemik dokusunda matürasyonu sağlamak için kullanılmaya başlansa da zamanla yumuşak bağ doku rejenerasyonunda da kullanılmaya başlanmıştır (Marx et al., 1998)(Eduardo Anitua et al., 2006).

Choukroun ve ark. (Choukroun et al., 2006) sinüs lift operasyonunda greft ile birlikte TZF kullanılan grupta 4. ayın sonundaki kemik kalitesiyle, sadece greft kullanılanlarda 8. ayın sonundaki kemik kalitesinin aynı olduğunu vurgulamışlardır. Simonpieri ve ark. (Alain Simonpieri, Del Corso, Sammartino, & Dohan Ehrenfest, 2009) TZF kombinasyonu ile kullanılan sinüs lift operasyonlarının 1 ile 5 yıllık sonuçlarında herhangi bir greft yada implant kaybının izlenmediğini belirtmişlerdir.

Chang ve Zhao (Chang & Zhao, 2011) TZF'yi periodontal defektlerde uygulamışlar, 12. ay sonunda radyolojik olarak defektlerin kemik benzeri dens doku şeklinde iyileşmesinin yanında, klinik olarak defektlerin düzeldiğini göstermişlerdir.

Thorat ve ark. (Mk, Ar, & Clinical, 2011) kronik periodontite bağlı defektlerin tedavisinde yalnızca konvansiyonel flep cerrahisi uygulananlar ile TZF birlikteliğinde konvansiyonel flep cerrahisi uygulananlarda 9.ayın sonunda TZF kombinasyonu uygulananlarda anlamlı derecede defektlerin iyileştiğini göstermişlerdir.

Dohan ve ark.(Dohan et al., 2006c)(Dohan Ehrenfest et al., 2009) (Del Corso et al., 2009) yapmış oldukları çalışmalarda TZF'den 1 hafta ile 28 gün arasında yavaş bir şekilde PDGF ve TGF- β gibi birçok büyüme faktörünün salgılandığını göstermişlerdir. Yara iyileşmesi için gerekli olan zaman diliminde TZF'den kaynaklanıp ortama salınan bu büyüme faktörlerinin yara iyileşmesinde önemli bir rol aldığını belirtmişlerdir.

Trombosit zengin fibrin yapısından dolayı bir biyomateryal olarak kabul edilmektedir. Fibrin sahip olduğu 3 boyutlu yapısıyla içerisinde trombositler barındırarak yara iyileşmesi için gerekli büyüme faktörleri ve sitokin kaynağı görevi üstlenirken, yara iyileşmesi sırasında destek dokusu olarak görev almaktadır.

Lundquist ve ark.(Lundquist, Dziegiel, & Ågren, 2008) fibrinin PDGF ve TGF- β tripsinin ile yapılan proteolize karşı bu faktörleri koruduğu böylece ortamdaki büyüme faktörleri için koruyucu bir rol aldığını göstermişlerdir.

Hücre adezyonu ve proliferasyonu yara iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır. Dokulardaki onarım ve rejenerasyon için ekstraselüler matris kritik bir role sahiptir. Wu ve ark. (Wu et al., 2012) yapmış oldukları çalışmada TZF'nin hücre adezyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada TZF'nin mitojen gibi davranarak hücre çoğalmasını desteklediği, fibrin molekülünün yara iyileşmesi sırasında biyomateryal olarak büyük destek sağladığı belirtilmiştir.

Trombositten zengin fibrinin etkinliğini gösteren birçok hücre kültürü çalışması yapılmıştır. Gassling ve ark. (Gassling et al., 2010) insan periost hücre kültüründe biyolojik kollojen ile TZF'yi doku iskeleti olarak kullandıkları çalışmalarında TZF'nin periost hücreleri için daha iyi bir doku destek görevine sahip olduğunu ve bununla birlikte kemik doku mühendisliğine uygun olduğunu göstermişlerdir.

5. SONUÇ

Trombositten zengin fibrin molekülü son yıllarda ortodontoloji ve periodontoloji biliminde doku defektlerinin tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve bu alanda tedavi seçeneklerine yeni bir bakış açısı getirmiştir. Biyomateryal olarak kullanılabilmesinin yanında doku iyileşmesi için büyüme faktörleri ve sitokinler için eşsiz bir kaynaktır. Bizim çalışmamızda konjonktival defektlerde TZFM' nin yara iyileşmesini hızlandırdığı, mevcut yara bölgesinde konjonktiva dokusunun normal doku yapısına dönmesine yardımcı olduğu histopatolojik olarak ispatlanmıştır. Daha önce oküler dokularda kullanılmayan TZF' nin oküler yumuşak dokuda da etkili olduğunu ve OYH' nin tedavisinde yeni bir tedavi seçeneği olabileceğini düşünmekteyiz.

6.KAYNAKLAR

- Adds, P. J., Hunt, C. J., & Dart, J. K. (2001). Amniotic membrane grafts, “fresh” or frozen? A clinical and in vitro comparison. *The British Journal of Ophthalmology*. doi:10.1136/bjo.85.8.905
- Altmeppen, J., Hansen, E., Bonnländer, G. L., Horch, R. E., & Jeschke, M. G. (2004). Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *The Journal of surgical research* (Vol. 117, pp. 202–207). doi:10.1016/j.jss.2003.10.019
- Anitua, E. (2000). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 14(4), 529–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10453668>
- Anitua, E., Sánchez, M., Nurden, A. T., Nurden, P., Orive, G., & Andía, I. (2006). New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends in Biotechnology*, 24, 227–234. doi:10.1016/j.tibtech.2006.02.010
- Basti, S., & Rao, S. K. (2000). Current status of limbal conjunctival autograft. *Current Opinion in Ophthalmology*, 11, 224–232. doi:10.1097/00055735-200008000-00003
- Brissett, A. E., & Hom, D. B. (2003). The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 11(4), 245–250. doi:10.1097/00020840-200308000-00005
- Chang, Y.-C., & Zhao, J.-H. (2011). Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Australian Dental Journal*, 56, 365–71. doi:10.1111/j.1834-7819.2011.01362.x
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.-O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., ... Dohan, D. M. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 101, 299–303. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.012
- Clark, R. A. F. (1996). The molecular and cellular biology of wound repair. *Provisional Matrix* (p. 611). Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=tt_ZHV1J_CAC&oi=fnd&pg=PA3&dq=roberts+sporn+molecular+and+cellular+biology+of+wound+repair&ots=KaPi6uWwJn&sig=c5ssTbEn-FNLFCm7hXMgichwD8s
- Cohen, M., & Shorr, N. (1992). Eyelid reconstruction with hard palate mucosa grafts. *Ophthalmic Plastic Reconstruction Surgery*, 8(3), 183–195.

- Connell, S. M. O., Impeduglia, T., Hessler, K., Wang, X., Carroll, R. J., & Dardik, H. (2008). Autologous platelet-rich fibrin matrix as cell therapy in the healing of chronic lower-extremity ulcers. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00426.x
- Cordeiro, M. F., Chang, L., Lim, K. S., Daniels, J. T., Pleass, R. D., Siriwardena, D., & Khaw, P. T. (2000). Modulating conjunctival wound healing. *Eye (London, England)*, 14 (Pt 3B, 536–547. doi:10.1038/eye.2000.141
- Corrent, G. (1989). Promotion of Graft Survival by Photothrombotic Occlusion of Corneal Neovascularization. *Archives of Ophthalmology*, 107(10), 1501–1506. doi:10.1001/archophth.1989.01070020575043
- Cukur, A., Yararcan, M., Akyol, F., & Çakmaklı, Z. (1997). Primer pterjiüm cerrahisinde konjonktival otogreftleme ile çıplak sklera bırakılması yöntemlerinin karşılaştırılması. *T.Oft.Gazi*, 27, 141–145.
- Davis, J. (1910). Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. *Johns Hopkins Med J*, 15, 307.
- De ROTTH, A. (1940). Plastic Repair Of Conjunctival Defects With Fetal Membranes. *Archives of Ophthalmology*, 23(3), 522–525. doi:10.1001/archophth.1940.00860130586006
- Del Corso, M., Sammartino, G., & Dohan Ehrenfest, D. (2009). Re: “Clinical evaluation of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: a 6-month study.” *Journal of Periodontol*, Nov 80(11), 1697–1699.
- Dening, R. (1927). Transplantation von Mundschleimhaut bei verschiedenen Erkrankungen der Hornhaut und bei Verbrennungen und Verätzungen des Auges. *Archives of Ophthalmology*, 118, 4729–4737.
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 101(3), e37–44. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.008
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 101(3), e45–50. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.009
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006c). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates?

Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics, 101, e51–e55. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.010

Dohan Ehrenfest, D. M., de Peppo, G. M., Doglioli, P., & Sammartino, G. (2009). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors* (Chur, Switzerland), 27, 63–69. doi:10.1080/08977190802636713

Dua, H. S., Gomes, J. a. ., King, A. J., & Maharajan, V. S. (2004). The amniotic membrane in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology*, 49(1), 51–77. doi:10.1016/j.survophthal.2003.10.004

Fry, T. L., & Woods, C. I. (1987, July 1). Readily available full-thickness mucous membrane graft. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*.

Fu, Y., Liu, J., & Tseng, S. C. G. (2011). Oral mucosal graft to correct lid margin pathologic features in cicatricial ocular surface diseases. *American Journal of Ophthalmology*, 152(4), 600–608.e1. doi:10.1016/j.ajo.2011.03.011

Gassling, V., Douglas, T., Warnke, P. H., Açil, Y., Wiltfang, J., & Becker, S. T. (2010). Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clinical Oral Implants Research*, 21, 543–549. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01900.x

Harris, T., Berry, E., Pakurar, A., & Sheppard, L. (n.d.). Biochemical transformation of bulbar conjunctiva into corneal epithelium: an electrophoretic analysis. *Experimental Eye Research*, 41(5), 597–605.

Holbach, L. M. (1995). Diseases of the eyelid-conjunctival complex and corneal complications of lid disease. *Current Opinion in Ophthalmology*, 6, 39–43. doi:10.1097/00055735-199508000-00008

Huang, S., Lai, H., & Lai, I. (1999). The treatment of *Pseudomonas* keratoscleritis after pterygium excision. *Cornea*, 18 Sep(5), 608–611.

Ito, R., Fujiwara, M., & Nagasako, R. (2007). Hard palate mucoperiosteal graft for posterior lamellar reconstruction of the upper eyelid: histologic rationale. *The Journal of Craniofacial Surgery*. doi:10.1097/scs.0b013e318053446d

Jang, S. H., Ha, J. K., Lee, D. W., & Kim, J. G. (2011). Fibrin Clot Delivery System for Meniscal Repair, 23(3), 180–183.

Kenyon, K. R., & Tseng, S. C. (1989). Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*.

Kheirkhah, A., Blanco, G., Casas, V., Hayashida, Y., Raju, V. K., & Tseng, S. C. G. (2008). Surgical strategies for fornix reconstruction based on symblepharon

severity. *American Journal of Ophthalmology*, 146, 266–275.
doi:10.1016/j.ajo.2008.03.028

Kheirkhah, A., Nazari, R., Nikdel, M., Ghassemi, H., Hashemi, H., & Behrouz, M. J. (2011). Postoperative Conjunctival Inflammation After Pterygium Surgery With Amniotic Membrane Transplantation Versus Conjunctival Autograft. *American Journal of Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ajo.2011.04.013

Kim, J. C., & Tseng, S. C. (1995). Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea*, 14, 473–484. doi:10.1097/00003226-199509000-00006

Kim, J. H., Chun, Y. S., Lee, S. H., Mun, S. K., Jung, H. S., Lee, S. H., ... Kim, J. C. (2010). Ocular surface reconstruction with autologous nasal mucosa in cicatricial ocular surface disease. *American Journal of Ophthalmology*. doi:10.1016/j.ajo.2009.07.030

Koizumi, N. J., Inatomi, T. J., Sotozono, C. J., Fullwood, N. J., Quantock, A. J., & Kinoshita, S. (2000). Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research*, 20, 173–177.

Krachmer, J. H., Krachmer, P., & Holland, E. J. (1997). No Title. In *Cornea* (pp. 3–27).

Kurpakus, M. A., Stock, E. L., & Jones, J. C. (1992). The role of the basement membrane in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Developmental Biology*, 150, 243–255. doi:10.1016/0012-1606(92)90239-D

L, C., JG, C., MF, C., AN, A., & PT, K. (2000). The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. *Survey of Ophthalmology*, 45 Jul-Aug(1), 49–68.

Lee, S. B., Li, D. Q., Tan, D. T., Meller, D. C., & Tseng, S. C. (2000). Suppression of TGF-beta signaling in both normal conjunctival fibroblasts and pterygial body fibroblasts by amniotic membrane. *Current Eye Research*, 20, 325–334. doi:10.1076/0271-3683(200004)2041-5FT325

Lewallen, S. (1989). A randomized trial of conjunctival autografting for pterygium in the tropics. *Ophthalmology* (Vol. 96, pp. 1612–1614).

Lundquist, R., Dziegiel, M. H., & Ågren, M. S. (2008). Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair and Regeneration*, 16(3), 356–363. doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00344.x

Ma, D. H., See, L. C., Liao, S. B., & Tsai, R. J. (2000). Amniotic membrane graft for primary pterygium: comparison with conjunctival autograft and topical mitomycin C treatment. *The British Journal of Ophthalmology*, 84, 973–978. doi:10.1136/bjo.84.9.973

- Mai, C., & Bertelmann, E. (2013). Oral mucosal grafts: old technique in new light. *Ophthalmic Research*, 50(2), 91–98.
- Mamede, A. C., Carvalho, M. J., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Maia, C. J., & Botelho, M. F. (2012). Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications. *Cell and Tissue Research*, 349(2), 447–458. doi:10.1007/s00441-012-1424-6
- Mannor, G. E., Mathers, W. D., Wolfley, D. E., & Martinez, J. A. (1994). Hard-palate mucosa graft in Stevens-Johnson syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 118, 786–791.
- Marx, R., Carlson, E., Eichstaedt, R., Schimmele, S., Strauss, J., & Georgeff, K. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 85, 638–646.
- Matras, H. (1985). Fibrin seal: the state of the art. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery : Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 43(8), 605–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3891930>
- Mk, T., Ar, P., & Clinical, P. B. (2011). Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects : a controlled clinical trial, (1923), 925–932. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01760.x
- Ni, J., Abrahamson, M., Zhang, M., Fernandez, M. A., Grubb, A., Su, J., ... Gentz, R. (1997). Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 10853–10858. doi:10.1074/jbc.272.16.10853
- O'Dwyer, P. A., & Akova, Y. A. (2011). Konjonktiva. In *Temel Göz Hastalıkları* (2nd ed., pp. 169–170).
- Ozcan, A., Ersoz, T., Yağmur, M., & Oksuz, H. (2003). Nüks pterjyumda cerrahi: konjonktiva ve amniotik membran transplantasyonu. *MN Oftalmoloji*, 10, 50*53.
- Özçetin, H. (2003). Konjonktiva Hastalıkları. In *Klinik Göz Hastalıkları* (pp. 40–58).
- Pelletier, C., Jordan, D., Brownstein, S., & Li, S. (1998). An unusual complication associated with hard palate mucosal grafts: presumed minor salivary gland secretion. *Ophthalmic Plastic Reconstruction Surgery*, Jul 14(4), 256–260.
- Prabhasawat, P., Barton, K., Burkett, G., & Tseng, S. C. (1997). Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts, and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology*.

- Rendu, F., & Brohard-Bohn, B. (2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12, 261–273. doi:10.1080/09537100120068170
- Sclafani, A. P. (2009). Applications of Platelet-Rich Fibrin Matrix in Facial Plastic Surgery, 1(212), 270–276. doi:10.1055/s-0029-1242033.
- Shimazaki, J., Yang, H. Y., & Tsubota, K. (1997). Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology*.
- Shimmura, S., Shimazaki, J., Ohashi, Y., & Tsubota, K. (2001). Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea*, 20, 408–413. doi:10.1097/00003226-200105000-00015
- Shore, J. W., Foster, C. S., Westfall, C. T., & Rubin, P. A. (1992). Results of buccal mucosal grafting for patients with medically controlled ocular cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology*, 99, 383–395.
- Simonpieri, A., Choukroun, J., Girard, M., Ouaknine, T., & Dohan, D. (2004). Immediate post-extraction implantation: interest of the PRF. *Implantodontie*, 13, 177–189 French.
- Simonpieri, A., Del Corso, M., Sammartino, G., & Dohan Ehrenfest, D. M. (2009). The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part II: implant surgery, prosthodontics, and survival. *Implant Dentistry*, 18, 220–229. doi:10.1097/ID.0b013e31819b5e3f
- Singer, A. J., & Clark, R. A. (1999). Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, 341, 738–746. doi:10.1056/NEJM199909023411006
- Sorsby, A., & Haythorne, J. (1947). Further experience.
- Sorsby, A., & Symmons, H. (1946). Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of second degree). *British Journal of Ophthalmology*, 30, 337–345.
- Talmi, Y. P., Sigler, L., Inge, E., Finkelstein, Y., & Zohar, Y. (1991). Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta*, 12, 285–288.
- Thoft, R. A. (1977). Conjunctival transplantation. *Archives of Ophthalmology*, 95(8), 1425–1427.
- Tseng, S. C., Li, D. Q., & Ma, X. (1999). Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. *Journal of Cellular Physiology*, 179, 325–335. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199906)179:3<325::AID-JCP10>3.0.CO;2-X

- Tsubota, K., Satake, Y., Ohyama, M., Toda, I., Takano, Y., Ono, M., ... Shimazaki, J. (1996). Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 122, 38–52.
- Vastine, D., Stewart, W., & Schwab, I. (1982). Reconstruction of the periocular mucous membrane by autologous conjunctival transplantation. *Ophthalmology*, 89(9), 1072–1081.
- Wenkel, H., Rummelt, V., & Naumann, G. O. (2000). Long term results after autologous nasal mucosal transplantation in severe mucus deficiency syndromes. *The British Journal of Ophthalmology*, 84, 279–284. doi:10.1136/bjo.84.3.279
- Wu, C.-L., Lee, S.-S., Tsai, C.-H., Lu, K.-H., Zhao, J.-H., & Chang, Y.-C. (2012). Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian Dental Journal*, 57, 207–12. doi:10.1111/j.1834-7819.2012.01686.x
- Zheng, K., Cai, J., Jhanji, V., & Chen, H. (2012). Comparison of Pterygium Recurrence Rates After Limbal Conjunctival Autograft Transplantation and Other Techniques. *Cornea*. doi:10.1097/ICO.0b013e31823cbeeb

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Erol Can 1984 yılında Adana’da doğdu. İlkokul öğrenimini Amasya’da, orta ve lise öğrenimini Konya’da tamamladı. 2002 yılında girdiği Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinden 2008 yılında mezun oldu. Mezun olduktan sonra 2008 Eylül-Ocak 2009 yılında Kastamonu’da pratisyen hekim olarak çalıştıktan sonra Ocak 2009- Aralık 2009 yılları arasında Ankara Numune Hastanesi Dahiliye kliniğinde asistan doktor olarak görev yaptı. Ağustos 2010 – Ağustos 2014 yılları arasında Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma hastanesi Göz Hastalıkları kliniğinde asistan doktor olarak görev yapmıştır.