



T.C.

**AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ
ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**APELİN HORMONUNUN RATLARDA RANDOM
FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ**

**Arş. Gör. Dr. Harun TEKİN
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM**

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

AFYONKARAHİSAR 2024

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

APELİN HORMONUNUN RATLARDA RANDOM FLEP
YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ

Arş. Grv. Dr. Harun TEKİN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM

Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 23.TUS.001 kodlu proje ile
desteklenmiştir.

AFYONKARAHİSAR 2024

KABUL ONAY SAYFASI

T.C.

AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

Tez Başlığı : Apelin Hormonunun Ratlarda Random Flep Yaşayabilirliğine Etkisi
Tezi Hazırlayan : Arş. Grv. Dr. Harun TEKİN
Tez Savunma Tarihi : 17.07.2024
Tez Kabul Tarihi : 17.07.2024
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM

İş bu çalışma jürimiz tarafından PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM

Üye

Prof. Dr. Cengiz ÇETİN

Üye

Dr.Öğr. Üyesi Salih KAVUNCU

ONAY

DEKAN

Prof. Dr. Necip BECİT

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca, emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen, sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM'a

Tez çalışmamda desteğiyle hep yanımda olan, yardımseverliği ve bilimsel bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Zülfikar Kadir SARITAŞ'a

Tezimde ilaç uygulanabilirliği için formülasyon geliştirilmesinde desteklerini esirgemeyen Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL'e

Tez çalışmamın histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeleri ile tezime olan katkılarından dolayı Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Dr. Hasan Hüseyin DEMİREL'e

Tez çalışmamın biyokimyasal analizlerinin yapılmasında katkıları ve destekleri için Muğla Sıtkı Kocaman Üniversitesi, Milas Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aziz BÜLBÜL'e

Tez çalışmamın cerrahi operasyonları sırasında benimle birlikte sabırla çalışan Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğretim görevlileri, Dr. Öğr. Üyesi Fatma GÖRÜCÜ ve Arş. Gör. Yusuf KOÇ'a

Uzmanlık eğitimim boyunca, ameliyathane ve serviste birlikte çalıştığım ekip arkadaşlarıma, 23.TUS.001 numaralı proje ile çalışmamı desteklerinden dolayı Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Dr. Harun TEKİN
Afyonkarahisar, Temmuz 2024

APELİN HORMONUNUN RATLARDA RANDOM FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ

Harun TEKİN

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta
Uzmanlık Tezi
Temmuz 2024
Danışman: Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM

ÖZET

Amaç: Kullanışlı işlem avantajı nedeniyle, ekstremitre rekonstrüksiyonu ve yara onarımında genellikle rastgele desenli deri flepleri kullanılır. Apelin-13, güçlü çoklu biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiş bir endojen peptiddir. Son zamanlarda, ısıya duyarlı jel oluşturuvcu sistemler, avantajlarından dolayı yara pansuman malzemesi olarak giderek daha fazla ilgi görmektedir. Bu çalışmada, rastgele deri flebinin hayatta kalmasını desteklemek için apeli-13 yüklü, poloksamer 188 ve plokamer 407 kullanılarak in situ jel formülasyonu hazırlandı ve random flep modelinde etkisi incelendi.

Gereç ve Yöntem: Deney hayvanları, rastgele dört gruba ayrıldı. İlk gruptaki denekler kontrol grubu diğer gruplar ise iskemi uygulanan fleplerde, apelin maddesinin jel formasyonunda uygulanmasının etkisini test etmek amacıyla iskemi/reperfüzyon protokolü esnasında apelin içeren jel veya apelin içermeyen jel uygulamasına göre alt gruplara ayrıldı. 1.Grup Kontrol Grubu (n=6) 2.Grup Random flep iskemi-reperfüzyon grubu (n=12) 3.Grup Random flep Apelin içermeyen jel grubu (n=12) 4.Grup Random flep Apelin içeren jel grubu (n=12).

Flep olarak, günlük uygulamada da oldukça sık kullanılan random deri flepleri kullanıldı. Sıçan dorsumunda 3x9 cm'lik kaudal pediküllü dorsal yarımada flebi (Mc Farlane flebi) kaldırıldı. Daha sonra flepler eski yerlerine sütüre edildi ve yarısı postoperatif 7. gün diğer yarısı postoperatif 14.günde ampute edilen flepler, histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak iskemi-reperfüzyon hasarı bulguları açısından detaylı incelemeye tabi tutuldu. Çalışmada, İmmünohistokimyasal olarak ise VEGF, i-NOS ve e-NOS, nNOS markerları kullanılarak histolojik incelemeler yapıldı. Biyokimyasal analiz için intrakardiyak kan numuneleri alınarak kan ve serum örneklerinden hemogram, VEGF, SOD, CAT, n-NOS, i-NOS, e-NOS, TNF- α , IL-1 β , MDA, IL-6, TGF β seviyeleri ölçüldü.

Bulgular: Çalışmanın immünohistokimyasal bulgularında, iNOS, eNOS ve nNOS ekspresyonu immünohistokimyasal olarak belirlenmiş ve flep grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ekspresyon düzeyleri düşük bulunmuştur, bu durum I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığını düşündürmektedir. Jel ve Apelin jel uygulaması yapılan grupta ise iNOS, eNOS ve nNOS ekspresyonlarının yükseldiği gözlemlendi.

Serum örneklerinden, iNOS ve nNOS seviyeleri analiz edilmiş, gruplar arasında serum seviyelerinde anlamlı fark bulunmazken eNOS seviyeleri apelin jel grubunda flep grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) olarak yüksek bulunmuştur. Bununla

birlikte, serum CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin seviyelerinde ise, flep grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ($p<0,001$), apelin yüklü jel grubunda ise anlamlı olarak arttığı ($p<0,001$) görülmüştür.

Sonuç: Hazırlanan apelin-13 jel yüklü fleplerin, flep kaynaklı iskemi üzerine histopatolojik ve immünohistokimyasal veriler ile olumlu etkilerini gözlemledik, aynı zamanda antioksidan etkinliği nedeniyle flep sağ kalımına olumlu etkilerini oksidatif stresi baskılayarak yapabileceğini antioksidan parametreler üzerindeki olumlu etkileri ile ortaya koyduk. Çalışmamızda, poloksamer 188 ve ploksamer 407 ile hazırlanan apelin-13 yüklü in situ jelin, random flep sağ kalımı üzerine ayrıntılı histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal verileri ile bir ilk niteliği taşımaktadır.



EFFECT OF APELIN HORMONE ON RANDOM FLEP VIABILITY IN RAT

Harun TEKİN

Afyonkarahisar Health Sciences University
Faculty of Medicine Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic
Surgery Medical Specialization Thesis
July 2024
Supervisor: Prof. Dr. Alpagan Mustafa YILDIRIM

ABSTRACT

Purpose: Due to the advantage of convenient procedure, randomly patterned skin flaps are often applied in extremity reconstruction and wound repair. Apelin-13 is a discovered endogenous peptide that has been shown to have potent multiple biological functions. Recently, thermosensitive gel-forming systems have attracted increasing attention as wound dressing materials due to their advantages. In this study, an in situ gel formulation was prepared using apelin-13 loaded, poloxamer 188 and poloxamer 407 to support the survival of the random skin flap, and its effect was examined in the random flap model.

Materials and Methods: Experimental animals were randomly divided into four groups. Animals in the first group were divided into control groups and the other groups were divided into subgroups according to the application of apelin-containing gel or apelin-free gel during the ischemia/reperfusion protocol in order to test the effect of applying apelin substance on gel formation in ischemia-treated flaps. 1st Group Control Group (n=6) 2nd Group Random flap ischemia-reperfusion group (n=12) 3rd Group Random flap Apelin-free gel group (n=12) 4th Group Random flap Apelin containing gel group (n= 12).

Random skin flaps, which are frequently used in daily practice, will be used as flaps. A 3x9 cm caudal pedicle dorsal peninsula flap (Mc Farlane flap) was removed from the rat dorsum. Then, the flaps would be returned to their original places, and the flaps, half of which were amputated on the 7th postoperative day and the other half on the 14th postoperative day, were subjected to detailed examination for macroscopic, histological and biochemical signs of ischemia-reperfusion damage. In the study, histological examinations will be performed using immunohistochemical markers VEGF, i-NOS and e-NOS, nNOS. Intracardiac blood samples were taken for biochemical analysis and hemogram VEGF, SOD, CAT, n-NOS, i-NOS, e-NOS, TNF- α , IL-1 β , MDA, IL-6, TGF β levels were obtained from blood and serum samples. was measured.

Results: In the immunohistochemical findings of the study, iNOS, eNOS and iNOS expression was determined immunohistochemically and expression levels were found to be lower in the flap group compared to the control group, suggesting that oxidative stress increases with I/R damage. In the gel and Apelin gel application group, it was observed that iNOS, eNOS and nNOS expressions increased.

iNOS and nNOS levels were analyzed in serum samples. While there was no significant difference in serum levels between the groups, eNOS levels were found to

be significantly higher in the apelin gel group than in the flap group ($p<0.001$). However, it was observed that the levels of antioxidant enzymes such as serum CAT and SOD decreased significantly in the flap group compared to the control group ($p<0.001$), and increased significantly in the apelin-loaded gel group ($p<0.001$).

Conclusion: We observed the positive effects of the prepared apelin-13 gel loaded flaps on flap-induced ischemia with histopathological and immunohistochemical data, and we also demonstrated that it can have positive effects on flap survival due to its antioxidant activity by suppressing oxidative stress, with its positive effects on antioxidant parameters. Our study is a first with detailed histological, immunohistochemical and biochemical data on random flap survival of the apelin-13 loaded in situ gel prepared with poloxamer 188 and poloxamer 407.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
GRAFİK LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. DERİ.....	2
2.1.1. Epidermis.....	2
2.1.1.1. Epidermisin Katmanları	3
2.1.1.2 Epidermisin Hücreleri.....	6
2.1.2. Dermis.....	9
2.2. DERİNİN BESLENMESİ.....	9
2.3. PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ'DE FLEPLER...	10
2.3.1. Flep Tarihçesi	10
2.3.2. Flep Tanımı.....	11
2.3.3. Fleplerin Sınıflandırılması	11
2.3.3.1. Kan akımına (Vaskülerizasyonuna) Göre Flepler.....	12
2.3.3.2. İçeriğine Göre Flepler	13
2.3.3.3. Şekline (Geometrisine) Göre Flepler	14
2.3.3.4. Hareket Şekline Göre Fleplerin Uzaklık Kategorileri	16
2.3.4. Flep Patofizyolojisi.....	17
2.3.5. Sıçanlarda Dorsal Flep Modeli	18
2.3.6. Dorsal Flep (McFarlane Flebi) Gelişimi.....	19
2.4. JELLER.....	23
2.4.1. Jellerin Formülasyonu	24
2.4.1.1. Jel Oluşumu	24
2.4.1.2. Jellerin Sınıflandırılması	25

2.4.1.3. Jel Oluşumunun Mekanizmaları	27
2.4.1.4. Jel Formülasyonlarının Avantajları.....	28
2.4.1.5. İn situ Jelleşen Sistemler.....	29
2.5. APELİNİN YAPISI.....	31
2.5.1. Apelinin Fonksiyonu	32
2.5.2 Apelinin Kardiyovasküler Sistem Üzerinde Etkileri	33
2.5.3. Apelin ve Anjiogenez	34
2.5.4. Apelin ve İnflamatuar Faktörler Arasındaki İlişki.....	34
2.6. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER.....	35
2.6.1. Süperoksit Radikali (O ₂ ⁻).....	35
2.6.2. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	35
2.6.3. Hidroksil Radikali (OH ⁻).....	36
2.6.4. Lipid Proksidasyonu ve Malondialdehit (MDA).....	36
2.7. ANTİOKSİDAN SİSTEMLER.....	36
2.7.1. Antioksidan Enzim Sistemleri	37
2.7.1.1. Süper Oksid Dismutaz (SOD).....	37
2.7.1.2. Katalaz (CAT).....	37
2.8. NİTRİK OKSİT (NO ₂)	38
2.9. APELİN VE OKSİDATİF STRES	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	40
3.2. KULLANILAN MALZEMELER.....	40
3.3. YÖNTEM.....	41
3.3.1. İn situ Jel Formülasyonlarının Hazırlanması	41
3.3.2. Karakterizasyon Çalışmaları.....	42
3.3.2.1. Fiziksel Görünüşün Değerlendirilmesi	42
3.3.2.2. pH Ölçümleri	42
3.3.2.3. Reoloji Analizleri.....	42
3.3.3.2. Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	42
3.3.3. Cerrahi Yöntem	43
3.3.4. Histopatoloji	45
3.3.5. Histopatolojik Morfometri.....	45
3.3.6. İmmunohistokimya	45
3.3.6.1. H-skor	46

3.3.7. Biyokimyasal Analizler	46
3.4. İSTATİSTİK	46
4. BULGULAR	47
4.1. REOLOJİ ANALİZLERİ	47
4.1.1. İn Situ Jel Formülasyonların Jelasyon Sıcaklığının Ölçülmesi Sonucunda Elde Edilen Grafik	47
4.1.2. İn Situ Jel Formülasyonların Akış Özellikleri	48
4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	49
4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	58
4.4. BİYOKİMYA ANALİZ BULGULARI	88
5. TARTIŞMA	92
6. SONUÇ	97
7. KAYNAKLAR	98

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.	Soğuk Yöntem Kullanılarak İn Situ Jel Formilasyonu	41
Tablo 2.	Ph Ölçümleri	43
Tablo 3.	7. Gün I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	60
Tablo 4.	14. Gün, HE boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	60
Tablo 5.	7. Gün MT boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	62
Tablo 6.	14. Gün MT boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	62
Tablo 7.	7. Gün iNOS boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	64
Tablo 8.	14. Gün iNOS boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	64
Tablo 9.	7. Gün eNOS boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	66
Tablo 10.	14. Gün eNOS boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	66
Tablo 11.	7. Gün VEGF boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	68
Tablo 12.	VEGF boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	68
Tablo 13.	7. Gün HE boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	70
Tablo 14.	14. Gün HE boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	70
Tablo 15.	7. Gün MT boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	72
Tablo 16.	14. Gün MT boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	72
Tablo 17.	7. Gün iNOS boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	74

Tablo 18. 14. Gün iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	74
Tablo 19. 7. Gün eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	76
Tablo 20. 14. Gün eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	76
Tablo 21. 7. Gün VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	78
Tablo 22. VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	78
Tablo 23. 7. Gün HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	80
Tablo 24. 14. Gün HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	80
Tablo 25. 7. Gün MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	82
Tablo 26. 14. Gün MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	82
Tablo 27. iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	84
Tablo 28. iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkisi	84
Tablo 29. eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	86
Tablo 30. eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	86
Tablo 31. 7. Gün VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	88
Tablo 32. 14. Gün VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri	88
Tablo 33. Hemogram ölçümlerinin gruplara göre karşılaştırılması	89
Tablo 34. MDA, IL6, TGF β , iNOS, nNOS, SOD, CAT, VEGF, TNF α , eNOS serum seviyeleri	91

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Derinin anatomisi	2
Şekil 2. Epidermisin yapısı.....	6
Şekil 3. Epidermisin Hücreleri ve katmanları	7
Şekil 4. Pediküllü uzak flep ile burun rekonstüksiyonunu	10
Şekil 5. Random dolaşım paternli flep	12
Şekil 6. Aksiyel dolaşım paternli flep	13
Şekil 7. Mathes ve Nahai ‘nin fasyokutan flep sınıflandırması	13
Şekil 8. İlerletme Flebi	14
Şekil 9. Rotasyon Flebi	14
Şekil 10. Transpozisyon flebi	15
Şekil 11. Bir interpolasyon flebi olan paramedian alın flebi.....	15
Şekil 12. Serbest flep dokusu	16
Şekil 13. Kraniyal pediküllü McFarlane flebi	20
Şekil 14. Sıçanlarda panniculus carnosus dokusunun yerleşimi	20
Şekil 15. McFarlane flebin her iki tarafındaki eş damarlanma	20
Şekil 16. McFarlane flep planlaması	21
Şekil 17. McFarlane flebinde standart nekroz alanı	21
Şekil 18. Farklı boyutlardaki McFarlane flepleri	23
Şekil 19. Jeller	24
Şekil 20. Hidrojel şişmesi.....	26
Şekil 21. Kimyasal olarak çapraz bağlı jel.	27
Şekil 22. Fiziksel olarak çapraz bağlı jel.....	28
Şekil 23. İyonik çapraz bağlama	28
Şekil 24. Apelin-13 molekülü	32
Şekil 25. Apelinin fizyolojik etkileri.....	33
Şekil 26. Apelin/APJ sinyal yolağının oksidatif stresi düzenlemesi.....	39
Şekil 27. Ratların preop, intraop ve postop aşamaları.....	44
Şekil 28. Kontrol HE küçük büyütmede histolojik görüntüsü. E: epidermis, Dm: dermis, C: kabuk, Fib: fibroblastlar, Kol: kollajen, K: Kas, Y: Yağ, B: Bez, KF: Kıl folikülü.....	50

Şekil 29. Kontrol HE büyük büyütmede normal epidermis histolojik yapısı. E: epidermis, Dm: dermis, C: kabuk, Fib: fibroblastlar, Kol: kollajen, K: Kas, Y: Yağ, B: Bez, KF: Kıl folikülü.	50
Şekil 30. Flep grubunda HE küçük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulgular	51
Şekil 31. Flep grubunda HE büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları	51
Şekil 32. Flep grubu MT Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları.	52
Şekil 33. Flep grubu MT Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları.	52
Şekil 34. Flep grubu MT Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulgular.	53
Şekil 35. Flep grubu MT Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları.	53
Şekil 36. Kontrol iNOS küçük büyütmede normal deride pozitif işaretlemesi.....	54
Şekil 37. Kontrol iNOS büyük büyütmede normal deride pozitif işaretlemesi	54
Şekil 38. Flep grubu iNOS küçük büyütmede yaralı deride pozitif işaretlemesi	55
Şekil 39. Flep grubu iNOS büyük büyütmede yaralı deride pozitif işaretlemesi.....	55
Şekil 40. Flep grubu eNOS küçük büyütmede hasara bağlı deride oluşan histopatolojik değişiklikler.....	56
Şekil 41. Flep grubu eNOS büyük büyütmede hasara bağlı deride oluşan histopatolojik değişiklikler.....	56
Şekil 42. Kontrol VEGF küçük büyütmede normal deri histolojisi.....	57
Şekil 43. Kontrol VEGF büyük büyütmede normal deri histolojisi.....	57
Şekil 44. Flep grubu VEGF küçük büyütmede hasara bağlı deride oluşan histopatolojik değişiklikler.....	58
Şekil 45. Flep grubu VEGF büyük büyütmede hasara bağlı deride oluşan histopatolojik değişiklikler.....	58
Şekil 46. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	59
Şekil 47. MT boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	61
Şekil 48. iNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	63
Şekil 49. eNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	65
Şekil 50. VEGF İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	67
Şekil 51. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	69
Şekil 52. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	71
Şekil 53. iNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	73
Şekil 54. eNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.	75

Şekil 55. VEGF İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri..	77
Şekil 56. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.....	79
Şekil 57. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.....	81
Şekil 58. iNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri..	83
Şekil 59. VEGF İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri..	85
Şekil 60. VEGF İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine olumlu etkileri.	87



GRAFİK LİSTESİ

Sayfa

Grafik 1.	Placebo in situ jel formülasyona ait jelasyon sıcaklığı grafiği.....	47
Grafik 2.	Apelin-13 Trifluoroacetate içeren in situ jel formülasyona ait jelasyon sıcaklığı grafiği.....	47
Grafik 3.	25°C de Placebo in situ jel formülasyona ait akış grafiği	48
Grafik 4.	25°C de Apelin-13 Trifluoroacetate içeren in situ jel formülasyona ait akış grafiği	48
Grafik 5.	37°C de Placebo in situ jel formülasyona ait akış grafiği	49
Grafik 6.	37°C de Apelin-13 Trifluoroacetate içeren in situ jel formülasyona ait akış grafiği	49

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Yumuşak doku defekti, plastik ve rekonstrüktif cerrahide travmatik veya kansere bağlı deformitelerin neden olduğu yaygın ve zor bir sorundur. Basit prosedürü nedeniyle rastgele deri flebi, plastik cerrahlar tarafından özellikle doku onarımı amacıyla transplantasyondan fonksiyonel ve estetik rekonstrüksiyona kadar yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kolay hazırlama, kolay uygulama, düşük toksisite, düşük maliyet ve kontrollü salım nedeniyle hidrojelin özel avantajlar sergilediği, ilaç kontrollü salımda kullanılan bir taşıyıcı olduğuna yaygın olarak inanılmaktadır (1).

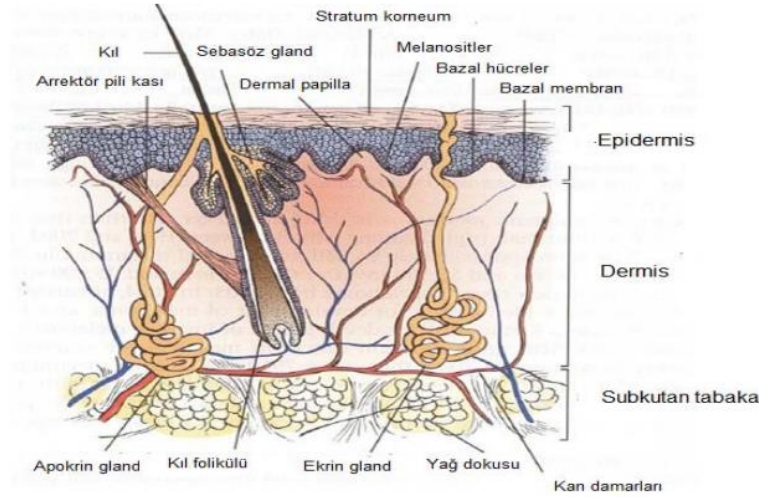
Apelin ilkel olarak sığır midesinden toplanan doku örneklerinden ayrıştırılmıştır. 77 amino asitlik bir prepropeptit öncüsünden türetilen apelinin birçok biyoaktif formu vardır (2, 3). Bunlar arasında apelin 13 en güçlü biyolojik aktiviteye sahiptir. İskemik felç sonrası apelin 13'ün intranazal uygulanmasının, farelerde lokal serebral kan akışını yeniden düzenleyerek, anjiyogenezi teşvik ederek ve inflamatuvar aktiviteleri azaltarak bu tür iskemik hasarı iyileştirdiği rapor edilmiştir (4).

Bu çalışmada, sıçan rastgele deri flep modelinin tedavisi için yeni bir ısıya duyarlı in situ jel oluşturmak üzere apelin-13 kullanıldı. Bunu takiben oluşturulan apelin-13 yüklü jelin, flep sağkalımı ve oluşan flep nekrozuna karşı, potansiyel antiinflamatuvar, antioksidan ve anjiyogeneze etkisini incelemek için, detaylı histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler ve biyokimyasal analizler yapıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DERİ

Deri, vücudun en büyük organı olup yetişkin vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Cildin görevleri arasında dış etkilere karşı koruma, aşırı su kaybını önleme ve termoregülasyon yer alır. Mukoza zarları ile kaplı olan cilt, sürekli bir örtü sistemi oluşturur (5). Cilt, deri ve onun türetilmiş yapılarından meydana gelir (şekil 1). Üç tabakadan oluşan derinin en dıştaki tabakası epidermis, keratinositler olarak bilinen özel hücreler tarafından sentezlenen koruyucu bir protein olan keratin içerir. Orta tabaka olan dermis, temel olarak kollajen adı verilen fibril yapısal proteinlerden oluşur. Dermis, deri altı dokusu veya panniculus üzerine yerleşmiş olup, içinde lipositler olarak bilinen küçük yağ hücreleri lobları barındırır. Bu tabakaların kalınlığı, vücut anatomisinin farklı bölgelerine bağlı olarak büyük ölçüde değişir. Örneğin, göz kapağı en ince deri tabakasına sahipken (0,1 mm'den az), avuç içi ve ayak tabanları en kalın epidermal tabakaya sahiptir (yaklaşık 1,5 mm). Dermis, sırtta en kalın tabakayı oluşturur ve epidermisten 30-40 kat daha kalındır (6).



Şekil 1. Derinin anatomisi

2.1.1. Epidermis

Epidermis, skuamöz bir epitel tabakası olup öncelikle keratinositler ve dendritik hücreler olmak üzere iki ana hücre tipinden oluşan çok katmanlı bir yapıya sahiptir. Keratinositler, "berrak" dendritik hücrelerden farklıdır çünkü hücreler arası köprülere ve bol miktarda boyanabilir sitoplazmaya sahiptirler (7). Epidermis,

melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri gibi çeşitli hücre popülasyonlarını içerir, ancak çoğunlukla keratinositlerden oluşur.

Epidermis, sürekli olarak yenilenen bir tabaka olup pilosebace ünite, tırnaklar ve ter bezleri gibi çeşitli türev yapıları oluşturur. Epiderminin bazal hücreleri, dış epiderminin yenilenmesini sağlamak için proliferasyon döngülerine girer. Cilt yüzeyine doğru hareket ettikçe, epiderminin farklı hücre popülasyonları birbirini değil sadece, aynı zamanda melanositler ve Langerhans hücrelerini de geçtikleri için hücreler dinamik bir dokuda sürekli olarak senkronize olmayan bir hareket içindedir (8).

2.1.1.1. Epiderminin Katmanları

Bazal Katman: Bazal tabaka ya da Stratum germinativum olarak adlandırılan bu katman, uzun eksenleri dermise dik olarak yerleşen ve bazal membran bölgesine bağlanan kolon şeklindeki keratinositleri içermektedir. Bu bazal hücreler, tek bir tabaka oluşturur ve dezmozomal bağlantılar aracılığıyla birbirlerine ve daha yüzeyde bulunan skuamöz hücrelere yapışırlar (7).

Bazal hücrelerin diğer belirgin özellikleri, koyu renkte olmaları, oval veya uzun çekirdek taşımaları ve bitişik melanositlerden aktarılan melanin pigmentinin varlığıdır (7). Bazal tabaka, epidermisteki mitotik olarak aktif hücrelerin ana yeridir ve dış epidermal tabakaların hücrelerini oluşturur. Ancak, tüm bazal hücreler bölünme yeteneğine sahip değildir (9, 10).

Bazal tabakadaki epidermal kök hücreler genellikle hücre döngüsü boyunca yavaş ilerleyen, uzun ömürlü klonojenik hücrelerdir. Hiperplaziojenik koşullar gibi yaralanmalar, kök hücrelerin bölünmesini uyararak epidermisteki döngü hücrelerinin sayısını artırabilir. Kanserojen ajanların neden olduğu DNA hasarı, hücre proliferasyon mekanizmasını değiştirebilir ve ayrıca hücresel bölünme oranını etkileyebilir. Bazal hücrenin bazal tabakadan göçü, insanlarda kornifiye tabakaya geçiş için en az 14 gün sürer ve kornifiye tabakadan en dış epidermise geçiş için ekstra 14 gün gerektirebilir (8).

Skuamöz Hücre Katmanı: Bazal hücre tabakasının üstünde, 5-10 hücre kalınlığında olan ve stratum spinosum veya skuamöz hücre tabakası olarak

adlandırılan bir epidermis tabakası bulunmaktadır (7). Skuamöz tabaka, konumlarına bağlı olarak farklı hücre tiplerinden oluşan çeşitli hücrelerle karakterizedir, bu hücrelerin şekli, yapıları ve hücre altı özellikleri değişiklik gösterir. Örneğin, suprabasal dikenli hücreler çok yüzlü bir şekle sahiptir ve yuvarlak bir çekirdeğe sahipken, üst dikenli tabakadaki hücreler genellikle daha büyük ve yassılaşılarak derinin yüzeyine doğru itilirler ve lamelli granüller içerirler (8).

Lamellar granüller, glikoproteinler, glikolipidler, fosfolipidler, serbest steroller, lipazlar, proteazlar, asit fosfatazlar ve glikosidazları içeren bir dizi asit hidrolaz içeren zar ile bağlantılı organellerdir. Hidrolitik enzimlerin varlığı, katmanlı granüllerin bir tür lizozom olduğunu gösterir. Lamellar granüller, genellikle granüler ve kornifiye tabakalar arasındaki arayüzde aktiftir, aynı zamanda üst dikenli tabakanın hücrelerinde stratum korneum lipidlerinin öncüllerini iletmek için de işlev görürler (11).

Dikenli hücreler arasındaki hücreler arası boşluklar, epidermis hücreleri arasındaki mekanik bağlantıyı destekleyen ve fiziksel streslere karşı direnç sağlayan desmozom adı verilen çok sayıda yapı ile köprülenir. Çekirdeğin etrafında düzenlenen sitoplazmadaki keratin filamentler, bir uçta dezmozomal plaklara bağlanır ve çekirdeğe yakın uçta serbest kalır (7). Dezmozomal plaklar, hücre zarının sitoplazmik tarafında bulunan ve dezmozomal yapı ve bakım için gereken kalsiyumun düzenlenmesinde önemli olan altı polipeptitten oluşur (12,13,14). Hücre kenarları boyunca çok sayıda desmozomun oluşturduğu yapı, stratum spinosum olarak adlandırılır (8).

Boşluk bağlantıları, epidermal hücreler arasındaki başka bir bağlantı türüdür ve genellikle hücreler arasında bir gözenek oluşturarak, hücre metabolizmasının, büyümesinin ve farklılaşmasının düzenlenmesinde hayati öneme sahip kimyasal sinyaller yoluyla fizyolojik iletişime izin verir (15).

Granüler Katman: Epidermisin en dış tabakasında bulunan canlı hücrelerden oluşan granüler tabaka veya stratum granulosum, yassı hücrelerden meydana gelir ve sitoplazmalarında bol miktarda keratohyalin granülleri içerir. Bu hücreler, inkeratinizasyona katılan proteinlerin sentezinden ve modifikasyonundan sorumludur (8). Granüler tabakanın kalınlığı, üstteki azgın hücre tabakasının kalınlığıyla orantılı

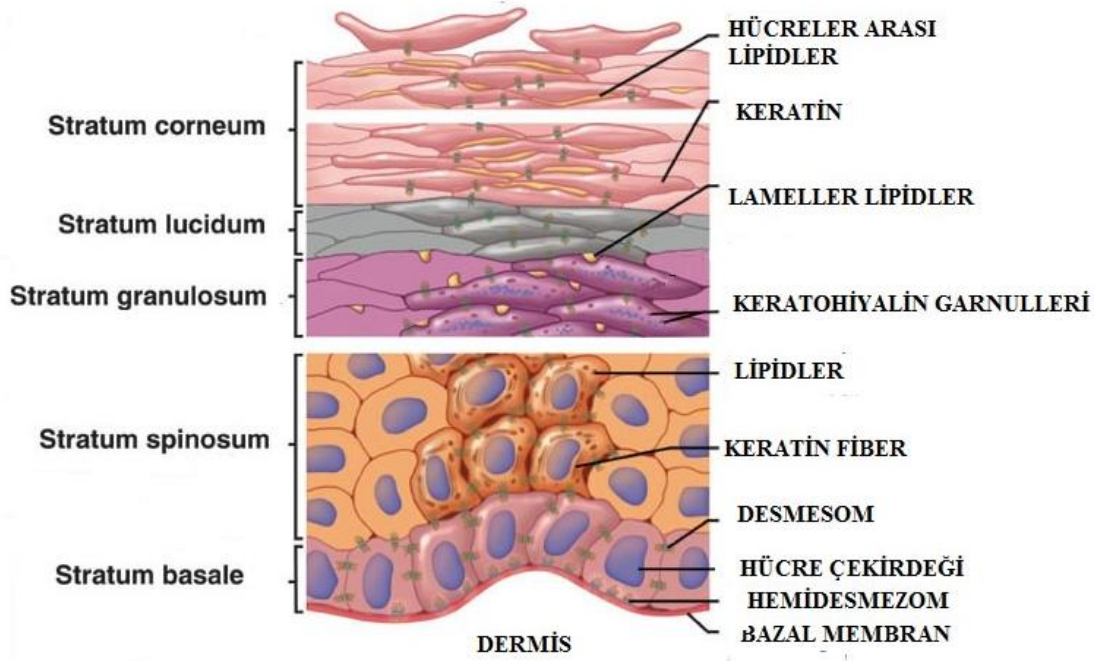
olarak değişir. Örneğin, kornifiye tabakanın ince olduğu bölgelerde granüler tabaka sadece 1-3 hücre tabakası kalınlığında olabilirken, avuç içi ve ayak tabanlarının altında granüler tabaka bu kalınlığın 10 katına kadar çıkabilir.

Keratohiyalin granülleri derin bazofiliktir, şekil ve boyut olarak düzensizdir ayrıca keratin filamentleri bir arada tutan lifler arası matrisin iç astarının oluşumunda gereklidirler. Keratin filamentlerinin periyodik olarak kesilmesini sağlayarak epidermiste keratin. Buna karşılık, sağ ve tırnaklar keratohiyalin granülleri içermez ve hücre sitoplazmasını kateden tonofibril filamentleri, disülfid bağlarının birleşmesi nedeniyle sertleşir ve bu yapılarda "sert" keratin üretir (16,17).

Lizozomal enzimler vücutta az miktarlarda bulunmakla birlikte stratum basalis, stratum spinosum ve stratum granulosumda yüksek seviyelerde bulunur, çünkü granüler tabaka epidermisin keratojen bölgesidir. Burada, granüler tabakanın hücreleri kornifiye tabakanın boynuzsu hücrelerine ani terminal farklılaşma sürecinden geğerken hücresel organellerin çözünmesi hazırlanır (8).

Kornifiye Katman: Keratinize tabakanın hücreleri olan korneositler, altındaki epidermise mekanik savunma sağlar ve su kaybını ile yabancı maddelerin istilasını önlemek için bir engel oluşturur (17). Protein bakımından zengin ve lipid içeriği düşük olan korneositler, sürekli bir hücre dışı lipid matrisi ile çevrilmiştir (8). Geniş, düz, çok kenarlı şekillenmiş hücreler, son farklılaşma sırasında çekirdeklerini kaybetmişlerdir ve teknik olarak pasif durumda kabul edilirler (7).

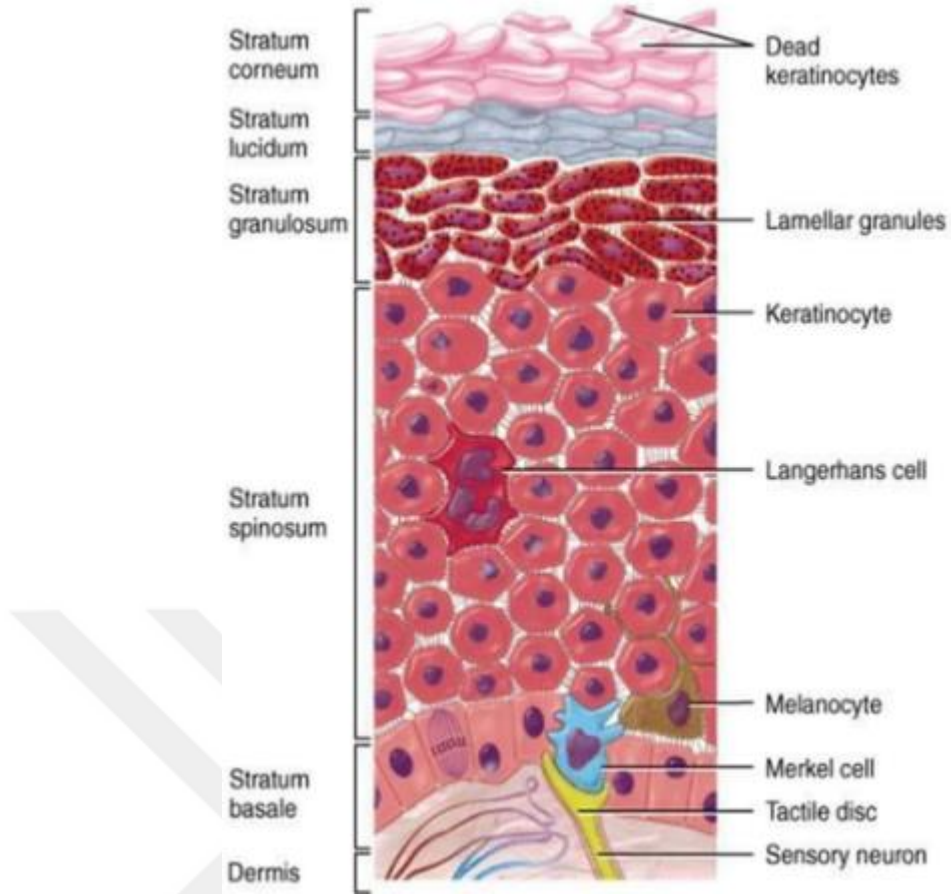
Kornifiye tabakadaki hücrelerin fiziksel ve biyokimyasal özellikleri, dışarı doğru hareket eden deskuamasyonu desteklemek için pozisyona göre değişir. Örneğin, orta tabaka hücrelerinin sitoplazmasında bulunan serbest amino asitlerin yüksek konsantrasyonu nedeniyle ortadaki hücreler, daha derin tabakalara göre çok daha yüksek su bağlama kapasitesine sahiptir. Derin hücreler ayrıca daha yoğun bir şekilde kompakttır ve daha yüzeysel katmanlara göre daha geniş bir hücreler arası bağlanma dizisi sergiler. Desmozomlar, hücreler dışı doğru ilerledikçe proteolitik bozunmaya uğrar ve bu da, deskuamasyon sırasında korneositlerin dökülmesine katkıda bulunur (11).



Şekil 2. Epiderminin yapısı

2.1.1.2 Epiderminin Hücreleri

Keratinositler: Epidermisteki hücrelerin büyük bir çoğunluğu, ektodermal kökenli keratinositlerdir, bu oran en az %80'i bulmaktadır. Hücrelerin bazal tabakadan cilt yüzeyine doğru göç etmeleri sırasında gerçekleşen diferansiyasyon süreci, keratinositin önce sentetik, daha sonra degradatif bir aşamadan geçerek keratinizasyon adı verilen bir süreçle sona erer (8). Sentez aşamasında, hücre, sitoplazmik bir keratin kaynağı oluşturur; bu, hücre iskeletinin bir parçası olarak hizmet eden alfa sarmal bir modelde düzenlenmiş lifli bir ara filamenttir. Bu keratin filament demetleri, hücreler arası bağlanma plakalarını oluşturan desmozomlar adı verilen plazma zarında birleşir ve burada son bulur. Keratinizasyonun parçalayıcı fazında, hücresel organeller kaybolur, hücrenin içeriği, filamentler ve amorf hücre zarflarının bir karışımı halinde birleştirilir ve hücre, nihayetinde korneosit olarak adlandırılır. Hücre ölümüyle sonuçlanan bu olgunlaşma sürecine, terminal farklılaşma denir (17).



Şekil 3. Epidermin Hücresi ve katmanları

Epidermin Nonkeratinosit Hücresi:

Melanositler: Melanosit, nöral krestten köken alan ve deride genellikle bazal tabaka ile sınırlı olan, dendritik özelliklere sahip ve pigment sentezi gerçekleştiren bir hücre tipidir (8). Melanosit uzantıları, daha yüzeysel katmanlara doğru ilerledikçe keratinositlerle temas etse de genellikle hücresel bağlantılar kurmazlar. Melanositler, pigment melanin üretiminden ve bunun keratinositlere transferinden sorumludur. Melanin, melanozom adı verilen yuvarlak, zarla çevrili bir organelde bir dizi reseptör aracılı, hormon uyarılı, enzim katalizli reaksiyonlar sonucunda üretilir (11).

Melanozomlar, cilt yüzeyine en yakın olan melanosit uzantıları tarafından üretilir ve daha sonra keratinositlere aktarılır. Beyaz tenli bireylerde, bu melanozomlar genellikle zarla çevrili melanozom kompleksleri içinde toplanırken, koyu tenli bireylerin keratinositlerinde melanozomlar bu komplekslerden daha hızlı bir şekilde ayrışma eğilimindedir. Yoğun pigmentli cilt, melanositlerde daha fazla melanozom üretimine, her bir melanozomda daha yüksek derecede melanizasyona ve daha büyük

melanozom boyutuna, açık tenle karşılaştırıldığında daha yavaş melanozom degradasyonuna bağlanabilir (18, 7, 19).

Artan ultraviyole ışınlarına maruz kalma, melanogeneze bir artışı tetikleyebilir ve melanozomların keratinositlere transferinde bir artışla sonuçlanabilir, bu da cildin bronzlaşmasına neden olur. Bu tepki, hücrenin ışığı absorbe etme yeteneğini artırarak çekirdek içindeki genetik bilgiyi zararlı radyasyondan koruma amacını taşır.

Merkel Hücreleri: Merkel hücreleri, desmozomal bağlantılarla bazal keratinositlere bağlanan yüksek dokunma hassasiyetine sahip bölgelerde bulunan oval şekilli, yavaş adapte olan tip I mekanoreseptörlerdir. Merkel hücreleri parmaklarda, dudaklarda, ağız boşluğunda ve kıl folikülünün dış kök kılıfında bulunur ve bazen dokunsal diskler veya dokunmatik kubbeler olarak bilinen özel yapılar halinde birleştirilir (20). Bitişikteki keratinositlerdeki nispeten küçük deformasyonlar, Merkel hücrelerinin bitişik afferent nöronda bir aksiyon potansiyeli oluşturan kimyasal bir sinyal salgılamasına ve bu sinyali beyne iletmesine yetecek kadar uyarıcıdır. Parmak uçları gibi belirli bölgelerdeki yüksek Merkel hücrelerinin konsantrasyonu, daha küçük ve daha yoğun bir şekilde paketlenmiş alıcı alanlara ve dolayısıyla daha yüksek dokunsal çözünürlük ve hassasiyete neden olur.

Langerhans Hücreleri: Langerhans hücreleri çeşitli T hücre yanıtlarında rol oynar. Kemik iliğinden köken alan bu hücreler, embriyonik gelişimin erken döneminde epidermiste bazal üstü bir pozisyona göç eder ve yaşam boyunca epidermiste dolaşmaya ve yeniden çoğalmaya devam eder.

Hücreler dendritiktir ve komşu hücrelerle hücresel bağlantı oluşturmazlar. Langerhans hücreleri toplam epidermal hücre popülasyonunun %2-8'ini oluşturur ve vücudun belirli bir bölgesinde neredeyse sabit sayı ve dağılıma sahiptir. Epidermiste hücreler esas olarak skuamöz ve granüler tabakalar arasında dağılmış olup, bazal tabakada daha az hücre bulunmaktadır. Langerhans hücreleri, epidermise ek olarak ağız boşluğu, yemek borusu ve vajina olmak üzere diğer skuamöz epitelde, ayrıca lenfoid organlarda ve normal dermiste bulunurlar (8).

2.1.2. Dermis

Damar açısından zengin olan dermis cilde gerilme direnci, esneklik ve mekanik destek sağlar. Dermis papiller ve retiküler tabakalardan oluşur. Papiller tabaka Tip IV kollajen, mast hücreleri, fibroblast ve dendritik hücrelerinin bir araya getirdiği ince, gevşek bağ dokusundan oluşur (21). Retiküler tabaka daha kalın olup düzensiz yoğun bir bağ dokusundan oluşur. Papiller dermise kıyasla daha az hücre bulundurur, ancak daha çok elastik ve kollajen lif bulundurur. Cilt altı bağ dokusunda büyük musküler arter ve venler bulunur. Bu damarlar cilde paralel seyrederek ve bunlardan çıkan daha küçük damarlar ise dermisin asıl kan dolaşımını sağlar. Bu küçük damarlardan oluşan ağ papiller dermiste papiller pleksusu, daha derinde ise retiküler pleksusu oluşturur. Epidermis bu zengin damarsal ağdan difüzyon yoluyla beslenir. Cilt lenfatikleri hem yüzeysel hem de derin pleksusta bulunup venüllere eşlik eder. Myelinize ve myelinize olmayan sinir liflerinden oluşan dallanmış sinir fasikülleri yaygın bir subpapiller dermal pleksusu oluşturur. Myelinli sinir lifleri epidermise ve dermisteki Meissner ve Pacini cisimcikleri dâhil duyu reseptörlerine sinir uçları sağlar (22). Epidermise giren sinir lifleri ya serbest sinir ucu olarak sonlanır veya dokunma duyusunu sağlayan Merkel hücrelerine yakın olarak sonlanır. Özellikle avuç içinde ve ayak tabanında papiller dermiste yoğun bir şekilde Meissner cisimcikleri bulunur, bunlar mekanoreseptör görevi görür. Pacini cisimcikleri ise dermisin daha alt tabakasında ve subkutan dokuda bulunup derin basınç duyusunu sağlar (22).

2.2. DERİNİN BESLENMESİ

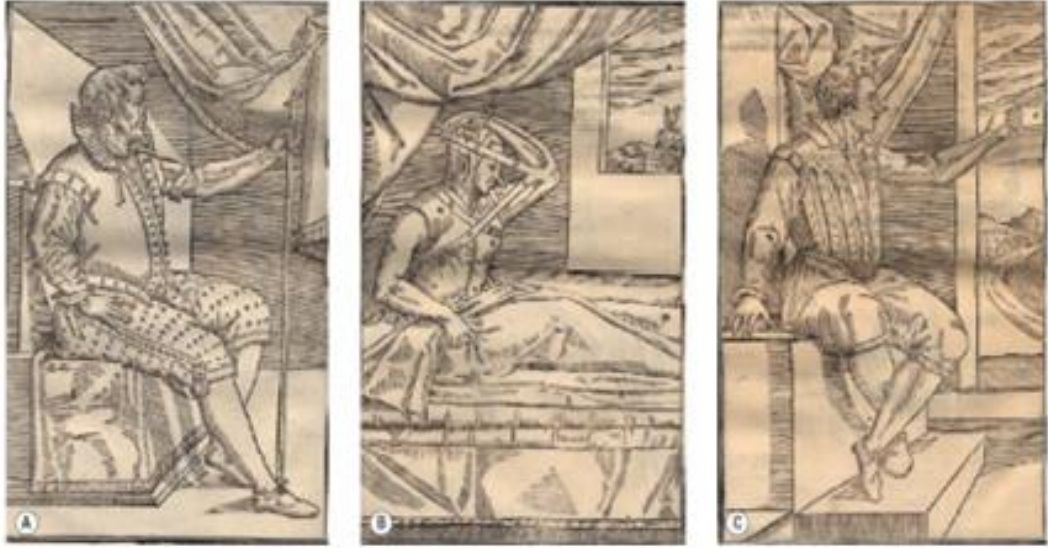
İnsan gibi kara canlıları için derinin en önemli işlevi vücudun su miktarını ve sıcaklığını dış ortama karşı korumaktır. Bu yüzden derinin oldukça iyi kanlanan bir organ olması gerekmektedir. Deri, birbirleri ile sıkı ilişkili damar ağları sayesinde oldukça iyi beslenmekte olan bir organdır. Bu damar ağlarına pleksuslar denilmektedir. Deride 6 pleksus bulunmaktadır; subepidermal, dermal, subdermal, subkutanöz, prefasyal, subfasyal olmak üzere. Derinin en dış tabakası olan epidermiste kan damarları bulunmamaktadır ve diğer tabakalarda yerleşmiş olan pleksuslardan difüzyon yolu ile beslenir. Subdermal pleksusa ayrıca değinmek gerekir çünkü bu pleksus random yapıya sahip deri fleplerinin beslenmesinden esas sorumlu pleksustur.

2.3. PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ'DE FLEPLER

2.3.1. Flep Tarihçesi

Hollandaca bir sözcük olan “flappe”den köken alan flep terimi, bir ucundan tutunan, gevşek olarak boşlukta sallanan anlamına gelmektedir.

M.Ö. 6-7.yüzyılda alın flebi ile burun rekonstrüksiyonu yapan Sushruta bu alanda tarihe geçen ilk isimdir. Aulus Cornelius Celsus’un bilateral ilerletme flepleri ile dudak rekonstrüksiyonunu tariflediği, kulak ve burun defektlerinin onarımının nasıl yapılabileceğini açıkladığı görülmektedir. Plastik cerrahi ve flep denildiğinde adı anılması gereken bir başka isim de Gaspere Tagliacozzi’dir. 16.yüzyılda yaşamış olan İtalyan cerrah 1597’de yayınladığı *De Curtorum Chirurgia per Insitionem* (Greftleme ile Yaralanma Cerrahisi Üzerine) isimli kitap ile plastik cerrahinin başlangıcı ile ilişkilendirilmektedir. En bilinen örnek olarak koldan tüp pediküllü uzak flep ile burun rekonstrüksiyonunu tarif etmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Pediküllü uzak flep ile burun rekonstrüksiyonunu

Ünlü cerrah Sushruta tıbbi ve cerrahi bilgilerini Sushruta Samhita adlı kitapta özetlemiştir (23). Bu kitapta birçok temel cerrahi uygulamalardan bahsedilmiştir (23). Aynı zamanda bu kitapta çeşitli şekil ve boyutlardaki alın fleplerinin, burun ve kulak doku eksikliklerinin onarımında kullanılmasını tarif etmiştir. Yazdığı kitabında, temel ilkelerini ortaya koyduğu ve çeşitli rotasyon ve pedikül flep tiplerini tanımladığı için

plastik cerrahiye yaptığı katkıları önemlidir. Burun kesmek, antik Hindistan'da yaygın bir cezaydı ve Sushruta, modern plastik cerrahi tekniklerinin çoğuna benzer şekilde, böyle bir hasarı onarmak için 15'ten fazla yöntemden bahsetmiştir. Bu durum Sushruta'yı, rekonstrüktif rinoplastinin öncüsü haline getirmiştir.

1970'lerde, fleplerin fizyolojisi ve patofizyolojisinin anlaşılması yönünde önemli araştırmaların odaklandığı bir dönem olarak öne çıkar. Bu yıllarda, rastgele flepler ve aksiyel flepler arasındaki farklar ve bu flep türlerinin nasıl beslendiği konusunda birçok inceleme gerçekleştirilmiştir.

Günümüzde gelişen mikrocerrahi teknikleri ile “free style free flap” olarak adlandırılan kısa ve küçük perforatör tabanlı fleplerin kullanılması flep cerrahisinde gelinen son aşama olmuştur (24,25).

2.3.2. Flep Tanımı

Flep kendi kan desteği ile birlikte alıcı bölgeden verici bölgeye transfer edilen bir doku ünitesidir. Çok sayıda sınıflandırma mevcuttur. Flepler kompozisyonuna (örn; kutanöz, muskulokutan ve osseokutan), defekt ile olan ilişkisine (lokal, bölgesel, uzak veya serbest), kan desteğinin mahiyetine (random-gelişigüzel vs. aksiyel) ve son olarak defekti kapatmak için gerekli flep hareketlerine (örn; ilerletme, transpozisyon ve interpolasyon) göre tanımlanabilirler.

2.3.3. Fleplerin Sınıflandırılması

Flepler, tarih boyunca birçok farklı şekilde sınıflandırılmıştır. En yaygın sınıflandırmada, dört ana kategoriye ayrılabilirler. Aşağıdaki gibi bu dört ana başlık incelenebilir:

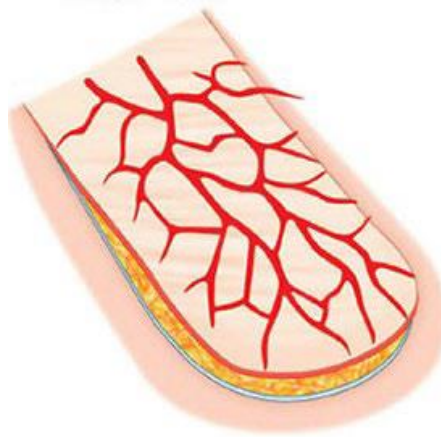
- Fleplerin kan akımına (vaskülerizasyonuna) göre sınıflandırılması
- Fleplerin içerdikleri dokuya (kompozisyonlarına) göre sınıflandırılması
- Fleplerin şekline (geometrisine) göre sınıflandırılması
- Fleplerin defekt uzaklığına (hareket şekline) göre sınıflandırılması

2.3.3.1. Kan akımına (Vaskülerizasyonuna) Göre Flepler

Cilt ve altındaki dokuların beslenmesi, ana arterler üzerinden gerçekleşir. Bu ana arterler, vücudun farklı bölgelerine ve uzuvlara yayılarak aortadan köken alırlar. Bunun yanı sıra, perforatör damarlar sayesinde segmental arterler ile kutanöz damarlar arasında bir bağlantı sağlanır. Kutanöz damarlar, muskulokutan ve septokutan olmak üzere iki temel gruba ayrılır.

Random yapılı flepler: Bu tür fleplerin kanlanmasını sağlayan belirgin bir vasküler yapının adı bulunmamaktadır. Flep, sadece deri ile kaldırıldığında subdermal pleksustan, subkutan yağ dokusu ile alındığında ise diğer pleksuslardan da destek alarak beslenir. Bu tip fleplerde, geleneksel literatürde boy/en oranı sınırlaması önem taşır. Yani yüz, baş ve boyun bölgelerinde 4/1 oranını aşmadan, gövde ve ekstremitelerde ise 2/1 oranını aşmadan tasarlanmaları önerilir.

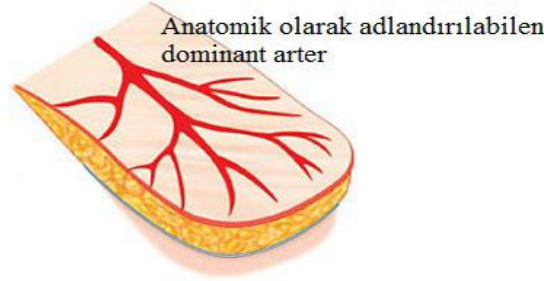
Ancak güncel çalışmalar, flep beslenmesindeki en önemli faktörün flep pedikülündeki arteriyollerin perfüzyon basıncı olduğunu göstermektedir. Rastgele yapılan flepler neredeyse her zaman lokal flep olarak kullanılır ve özellikle yüz bölgesinde tercih edilirler. Nadiren bölgesel veya uzak flep olarak da kullanılabilmektedirler.



Şekil 5. Random dolaşım paternli flep

Aksiyal Flepler: Kan dolaşımını sağlayan özgün bir damara sahip olan fleplere "aksiyal flepler" adı verilir. Bu tür flepler, perforozomlara ve anjiozomlara göre özel olarak tasarlanır. Aksiyal flepler, tamamen herhangi bir boy/en oranından bağımsız olarak kullanılabilmektedirler. Örneğin, el üst bölgesindeki Quaba perforatörü gibi küçük bir

alanı besleyebildiği gibi, alt karın bölgesindeki derin inferior epigastrik arter perforatörleri gibi oldukça geniş bir alanı da besleyebilirler. Perforatör flepler, propeller flepler, ters akım flepler, serbest flepler gibi birçok flep türü, basit rastgele desenli flepler dışında, genel olarak aksiyal yapıda flepler olarak sınıflandırılır.

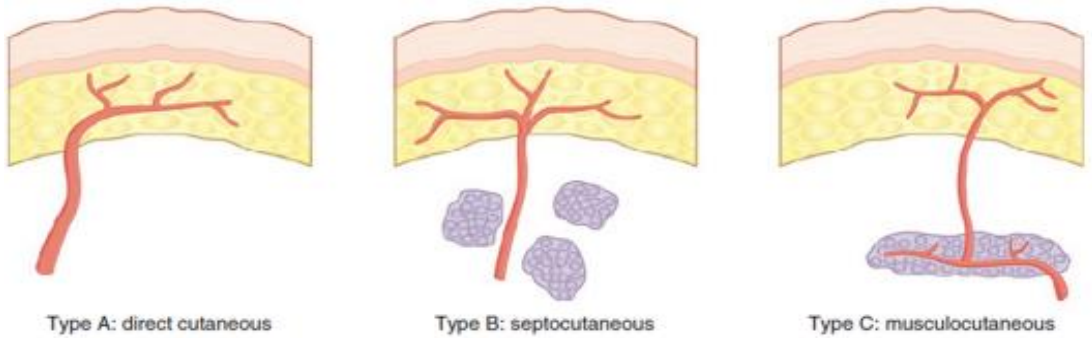


Şekil 6. Aksiyel dolaşım paternli flep

2.3.3.2. İçeriğine Göre Flepler

Flep türlerinin dokusal bileşimine göre yapılan bir sınıflamadan bahsedebiliriz. Flepler genellikle deri, fasya, kas ve kemik gibi tek bir dokuya dayalı olarak sınıflandırılır. Ayrıca, farklı doku türlerinin bir araya gelmesiyle oluşan flepler de bulunur; bu tür fleplere "kompozit flepler" denir. Kompozit fleplerin çeşitliliği, cerrahın yeteneklerine ve tercihlerine bağlı olduğundan kesin bir sayı vermek mümkün değildir.

Fasyokutan fleplerin sınıflandırması, Mathes ve Nahai tarafından geliştirilmiştir ve Şekil 7 'de gösterilmiştir. Tip A, doğrudan kutanöz damarlarla beslenen flepleri temsil ederken; Tip B, septokutanöz damarlarla beslenen flepleri ifade eder; Tip C ise muskulokutanöz damarlarla beslenen flepleri tanımlar. Bu sınıflama daha sonra Nakajima tarafından daha detaylı bir şekilde ele alınmış ve tip sayısı 6'ya çıkarılmıştır.

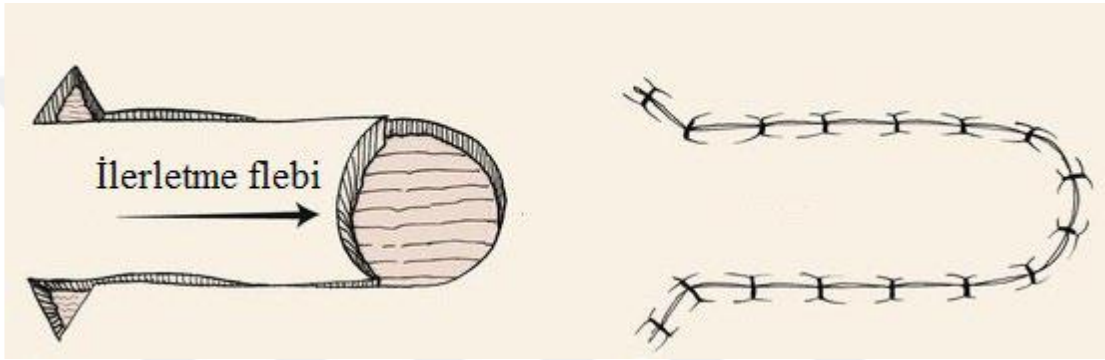


Şekil 7. Mathes ve Nahai 'nin fasyokutan flep sınıflandırması

2.3.3.3. Şekline (Geometrisine) Göre Flepler

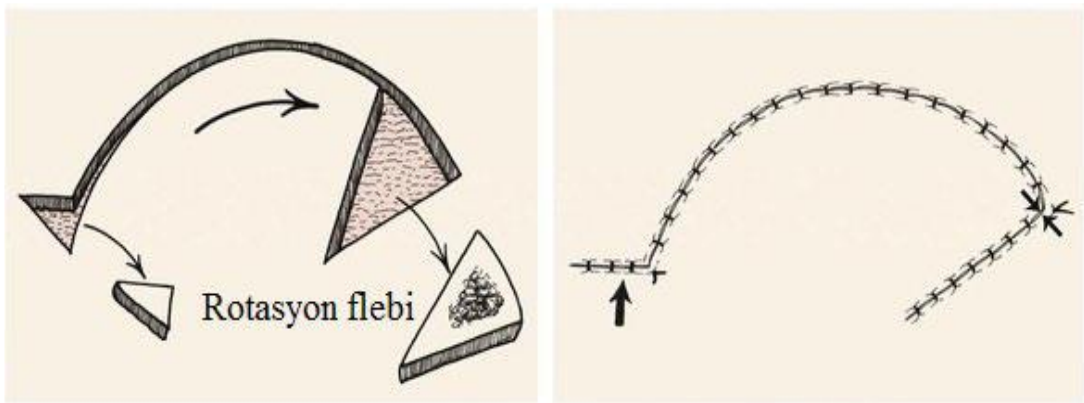
Flepler, gerçekleştirdikleri hareket şekline bağlı olarak ilerletme, rotasyon, transpozisyon, interpolasyon olarak sınıflandırılır.

İlerletme Flepleri: İlerletme flepleri, deriyi öne doğru tek yönlü bir şekilde hareket ettirerek defekt bölgesini doldurur. Bu tür fleplerde dönme ya da lateral hareket yoktur. Flep ilerletilmesi, tek bir pedikül üzerinden, çift pedikül üzerinden veya farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilir. İlerletme flepleri, derinin viskoelastik özelliklerine dayanmaktadır. Şekil 8'de ilerletme fleplerine örnek verilmiştir.



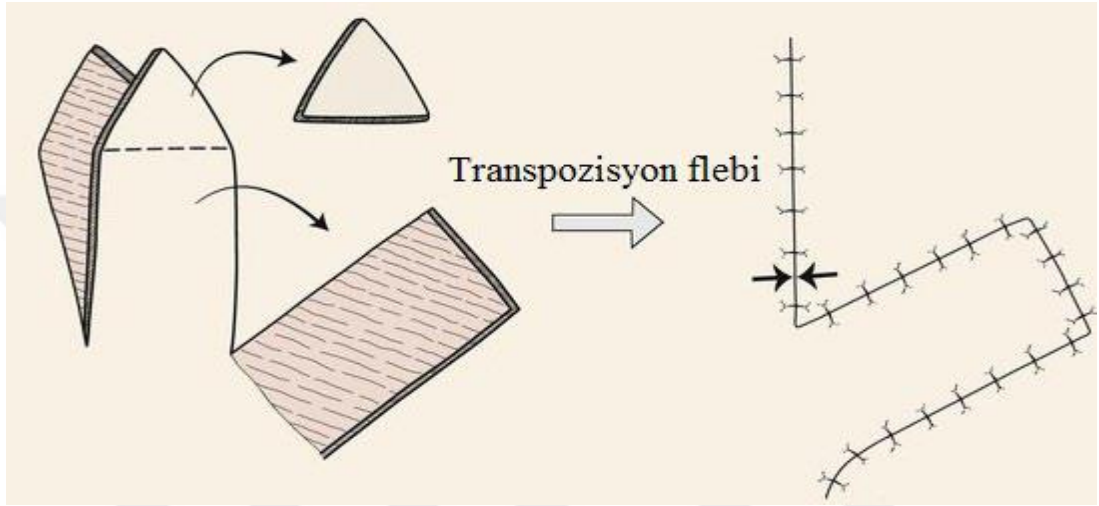
Şekil 8. İlerletme Flebi

Rotasyon Flepleri: Defektin düzeltilmesi için kullanılan rotasyon flepleri, flebin bir pivot noktası etrafında yarım daire şeklinde döndürülerek defekt bölgesine taşındığı tekniklerdir. Bu fleplerde esas defekt, planlanan yarım dairenin üçgen şeklindeki bir bölümünü oluşturur. Rotasyon flepleri tasarlarken temel bir kural, döndürülecek yarım dairenin çevresinin, üçgen defektin tabanının 5-8 katı kadar olmasıdır. Döndürme miktarı arttıkça, flep üzerinde birim alana düşen gerilim de artar. Şekil 9'da rotasyon fleplerine dair bir örnek gösterilmektedir.



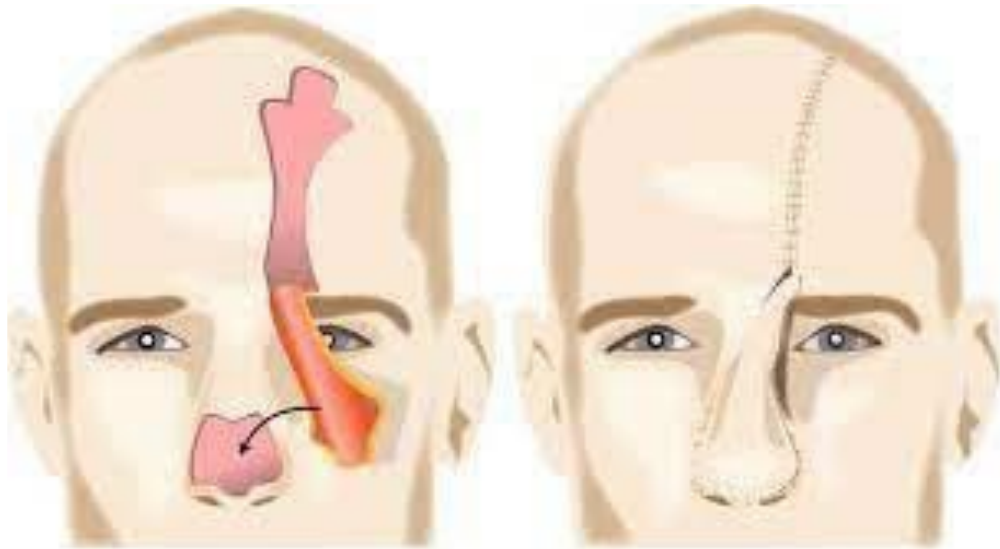
Şekil 9. Rotasyon Flebi

Transpozisyon Flepleri: Civarındaki defektin kapatılmasında kullanılan transpozisyon flepleri, yan yönde hareket ettirilen fleplerdir ve genellikle dikdörtgen şeklinde tasarlanırlar. Flebin gerçek uzunluğu, ileride hareket ettirildiğinde daha kısa hale gelir. Bu sebeple flebin rahatça defekte ulaşabilmesi için, flep defektten daha uzun olacak şekilde tasarlanmalıdır. Z plasti, Limberg flebi, Dufourmental flebi ve diğer romboïd flep türleri, transpozisyon fleplerine örnek olarak verilebilir. Şekil 10 'da, transpozisyon fleplerine bir örnek sunulmuştur.



Şekil 10. Transpozisyon flebi

İnterpolasyon Flepleri: Flebin alındığı verici bölge ile defekt bölgesi arasında sağlam dokunun bulunması, bu flepleri diğerlerinden ayıran bir özelliktir. Paramedian alın flebi, interpolasyon flepleri için başarılı bir örnektir ve Şekil 11'de görülebilir.



Şekil 11. Bir interpolasyon flebi olan paramedian alın flebi

2.3.3.4. Hareket Şekline Göre Fleplerin Uzaklık Kategorileri

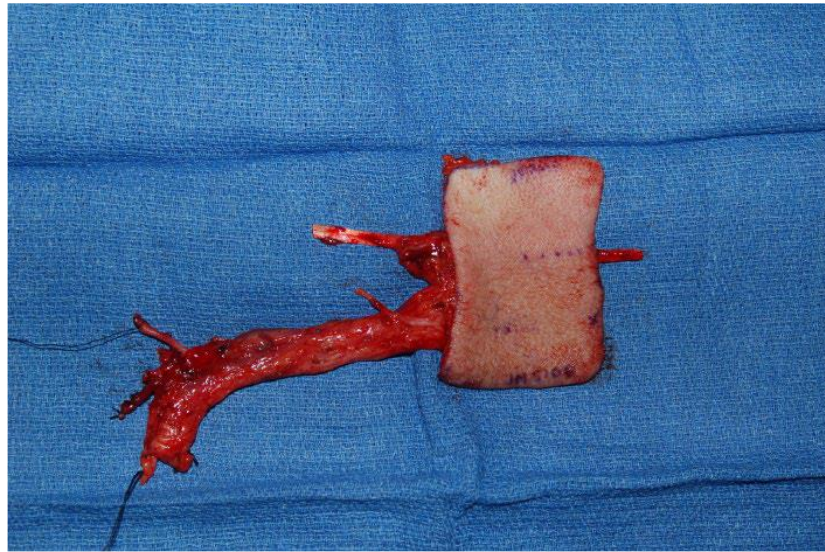
Lokal Flepler: Bu tür flepler, defekt bölgesinin ve flebin alındığı verici dokunun birbirine yakın olduğu fleplerdir. Alıcı ve verici bölgeler, deri özellikleri, renk, kalınlık, kıl içeriği ve terleme gibi faktörler açısından benzerlik taşır.

Uzak Flepler: Defekt alanından uzakta hazırlanan fleplerdir. Otojen doku naklinin öncülerinden Tagliacozzi'nin burun onarımında kullandığı kol flepleri gibi örnekler verilebilir. Bu tür flepler direkt, indirekt ve serbest olmak üzere üç alt gruba ayrılır.

Direkt Flepler: Flebin taşınabilmesi için donör bölgesinin defekte yaklaştırıldığı flepleri içerir. Örnek olarak tenar flep, kas flebi, çapraz bacak flebi ve çapraz parmak flebi bu gruba örnek olarak verilebilir.

İndirekt Flepler: Donör bölgesinden alıcı bölgeye direkt transfer edilemeyen ara bir bölgenin kullanıldığı fleplerdir. Genellikle bu ara bölge olarak el bileği bölgesi kullanılır. Flep transferi sırasında daima tüp şeklinde hazırlanması gereklidir ve birden çok seansta gerçekleştirilir.

Serbest Flepler: Mikrocerrahi teknikler kullanılarak gerçekleştirilen bu flepler, flebi besleyen arter ve venin kesilip alındığı pedikülden oluşur. Bu dokular, alıcı bölgedeki damarlarla mikrovasküler anastomoz ile birleştirilerek transfer edilir. Serbest flep dokusu, Şekil 12 'de gösterildiği gibi mikrocerrahiye dayalı bir işlemdir.



Şekil 12. Serbest flep dokusu

2.3.4. Flep Patofizyolojisi

Flebin kaldırılmasıyla ortaya çıkan en önemli fizyolojik etkilerden biri, deriye yönelik kan akışının kısmen kesilmesi sonucu deriye beslenme akışında belirgin bir azalmanın oluşmasıdır. Bu vasküler dengesizlik, flebin en uzak bölümünde arteriyel yetmezliğe neden olur. Bu etki, flebin proksimal kesimindeki yetersiz perfüzyon basıncının, distaldeki arteriyel zayıflıktan kaynaklandığı bir mekanizmayla oluşur. Deri fleplerindeki kan akışındaki değişimlerde dikkate alınması gereken ek faktörler arasında sempatik sinirlerin kaybı, lokal inflamatuvar değişiklikler ve alıcı bölgedeki neovaskülarizasyon da yer almaktadır (26).

Flep kaldırılması sadece derinin duyuşal innervasyonunu bozmakla kalmaz, aynı zamanda ilgili dokuların sempatik sinirlerinin de kaybına neden olur. Sempatik denervasyon, sinir terminallerinden katekolaminlerin salınımını artırır ve nörotransmitter geri alımını bozar. Bu durum rölatif olarak fazla adrenalin üretilen bir duruma ve yerel olarak damarların daralmasına yol açar (27). Bu hiperadrenerjik etki, zaten vasküler sorunlarla mücadele eden distal segmentin iskemik hâlini daha da kötüleştirir. Katekolaminlerin kaybı yaklaşık 30 saat sürer. Bu süre sonunda sempatik tonus kaybı ve lokal doku metabolitlerindeki artış, flebi besleyen damar ağlarının genişlemesine yol açar. Bu durumda distal segmentteki dokulardaki oksijen, glukoz ve ATP seviyeleri hızla düşerken, laktat seviyesi artar. Katekolaminlerin yeniden salınması, yeniden sinir uyarımının geri döndüğünün bir göstergesi olarak 4 ila 8 hafta arasında meydana gelir.

Flep kaldırılması gibi bir yumuşak doku travması meydana geldiğinde, belirgin bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkar. Bu yanıtın arkasında histamin, serotonin ve kinin gibi inflamatuvar mediatörlerin hücre dışına salınması yatar. Bu mediatörler mikrovasküler geçirgenliği artırarak ödeme neden olur. Bu ödem, flebin perfüzyonunu daha da azaltır. İnflamatuvar yanıt, prostaglandin üretiminin başlamasına ve pedikül etrafındaki damarlarda vazodilatasyona yol açar. Sonuç olarak, inflamasyon, fleplerin perfüzyonunu hem olumlu hem de olumsuz yönde etkileyebilir (28).

Flep kaldırılması ardından yaklaşık 5 gün içinde yeni damarlar, flebin kaynak damarlarına bağlanmaya başlar ve yaklaşık 7 gün içinde flep pedikülünden bağımsız olarak beslenmeye başlar. Neovaskülarizasyon mekanizması hâlâ tam olarak

anlaşılamamış olsa da, var olan damarların yeni dallanmalarını içeren anjiyojenik ve kemik iliği kökenli endotel hücrelerden yeni damar oluşumunu içeren vaskülojenik mekanizmaları içerebileceği düşünülmektedir. Dokunun iskemi durumunda, FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü) ve VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) gibi büyüme faktörlerinin salınımı, endotel hücrelerini ve endotel progenitor hücrelerini çoğaltarak yeni kapiller kanalların oluşumuna yönlendirebilir (26).

2.3.5. Sıçanlarda Dorsal Flep Modeli

Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi alanında, flep kaldırılmasını içeren operasyonlar klinik uygulamaların büyük bir kısmını oluşturur. Flep kaldırılması ve yeni yerine adaptasyonun ardından, yara açılması, doku nekrozu ve enfeksiyon gibi özellikle iskemi kaynaklı komplikasyonlar postoperatif dönemde sıkça görülen problemlerden bazılarıdır. Gelişen flep anatomisi ve cerrahi teknikler sayesinde geçmişe göre daha nadir olsa da iskemi ve doku nekrozu hala klinik uygulamalarda karşımıza çıkar (29). Bu olumsuz durum, hastaların morbiditesinin artmasına, hastane süreçlerinin uzamasına ve sağlık sisteminde artan ekonomik yüke neden olur (29).

DeneySEL flep modelleri, bu komplikasyonların tedavisi ve önlenmesi için tasarlanmıştır. Bilimsel geçmişe bakıldığında, bu deneySEL modeller Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi alanında, özellikle mikrocerrahi dâhil, flep içeren tüm operasyonların daha iyi cerrahi tekniklerle gerçekleştirilmesine katkı sağlamıştır. Günümüzde ise bu deneySEL modeller, sadece cerrahi tekniklerin geliştirilmesinde değil, aynı zamanda flep patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasında, flep anatomisinin ve vasküler yapıların araştırılmasında, iskemi sonucu ortaya çıkan hipoksik ortamdaki flep metabolizmasının incelenmesinde de önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, bu araştırmalar flep dolaşımını etkileyen ilaçların keşfi ve değerlendirmesinde de deneySEL flep modellerine büyük bir önem kazandırmıştır.

DeneySEL flep modelleri, kemirgenler ve özellikle sıçanlar üzerinde geliştirilmiştir. Bu deneySEL modeller, uzun bir bilgi birikiminin sonucu olarak günümüze gelmiştir. Sıçanlar gibi kemirgen türlerinin kullanılmasının avantajları, diğer deney hayvanlarına göre daha kolay elde edilebilir olmaları, genetik modifikasyon potansiyellerinin yüksek olması, hastalıklara karşı daha dirençli olmaları ve laboratuvar koşullarında kolayca bakılabilmeleridir (30).

Ancak sıçanların insanlardan farklı anatomik ve fizyolojik özelliklere sahip olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Özellikle deri yapısındaki farklılıklar, deneysel sonuçların insanlarda klinik uygulamalara dönüştürülmesi aşamasında dikkate alınmalıdır. Bununla birlikte, sıçanlar ve insanlar arasındaki deri yapısı farklılıkları, doku iskemisi mekanizmalarının incelendiği deneylerde kullanımlarını engellemez (31).

Özellikle flep patofizyolojisi ve mikrodolaşım araştırmalarında elde edilen veriler, iskemisi sırasında ortaya çıkan moleküler, hücresel ve vasküler düzeydeki mekanizmaların anlaşılmasına büyük katkı sağlar. Deneysel çalışmaların hipotezin test edilmesi sürecinde tekrarlanabilirlik önemli bir faktördür. Farklı flep tipleri, tekrarlanabilirlik açısından farklı sonuçlar üretebilir ve bu faktör dikkate alınmalıdır. Özellikle sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar, iskemiyeye bağlı mekanizmaların anlaşılmasında önemli bir role sahiptir ve klinik uygulamalara yansımaları büyük bir değere sahiptir (32).

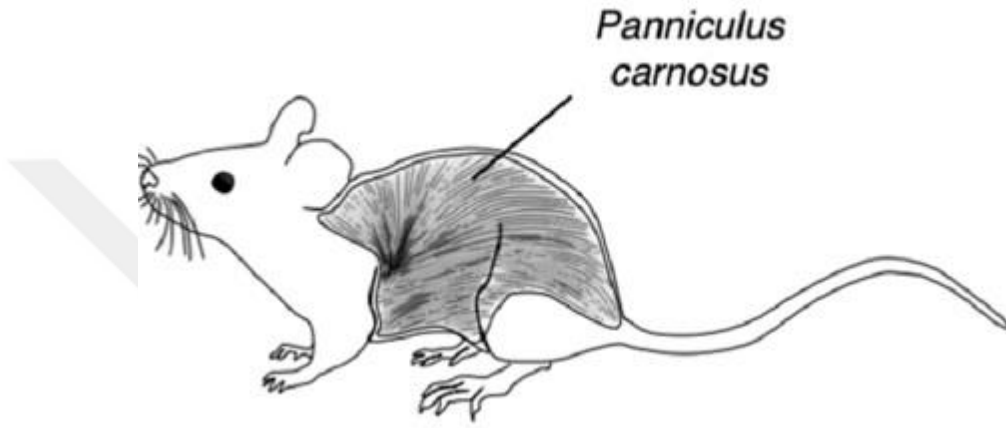
2.3.6. Dorsal Flep (McFarlane Flebi) Gelişimi

Kanadalı cerrah Dr. Robert Bob McFarlane (1927-2006), 1965 yılında, sıçanların sırt dokusundan kaldırılan dorsal deri flebi modelini ilk kez tanımlayarak bu alandaki önemli bir adım atmıştır (33). Bu model, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi alanında büyük etki yaratmış ve klinik uygulamaların geliştirilmesine katkı sağlamıştır.

Başlangıçta kraniyal pedikülüne sahip olan bu flep, ilk geliştirildiğinde random beslenen bir yapıydı ve derin kas fasyası üzerinden kaldırılıyordu. Kraniyal pediküllü McFarlane flebi, bu özellikleriyle karakterize edilir ve bu flep modeli özel bir sıçan dokusu olan panniculus carnosus (panniculus adiposus) içerir. Söz konusu panniculus carnosus dokusu, sıçanlarda özel bir yerleşim gösterir (Şekil 13). Kısacası, McFarlane flebi, ilk oluşturulduğunda kraniyal pedikülüne sahip olan ve derin kas fasyası aracılığıyla kaldırılan bir flep modelidir. Bu model ayrıca sıçanlara özgü bir doku olan panniculuscarnosus'uda içermektedir.

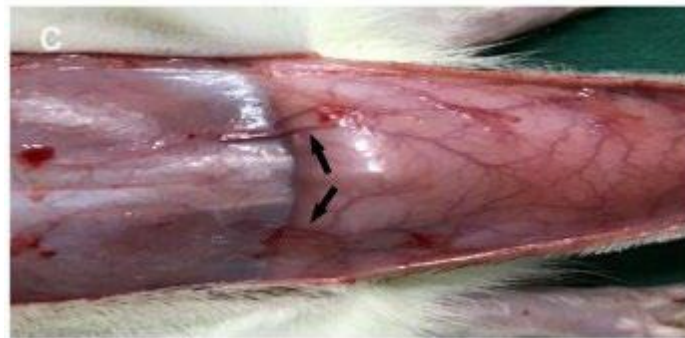


Şekil 13. Kraniyal pediküllü McFarlane flebi



Şekil 14. Sıçanlarda panniculus carnosus dokusunun yerleşimi

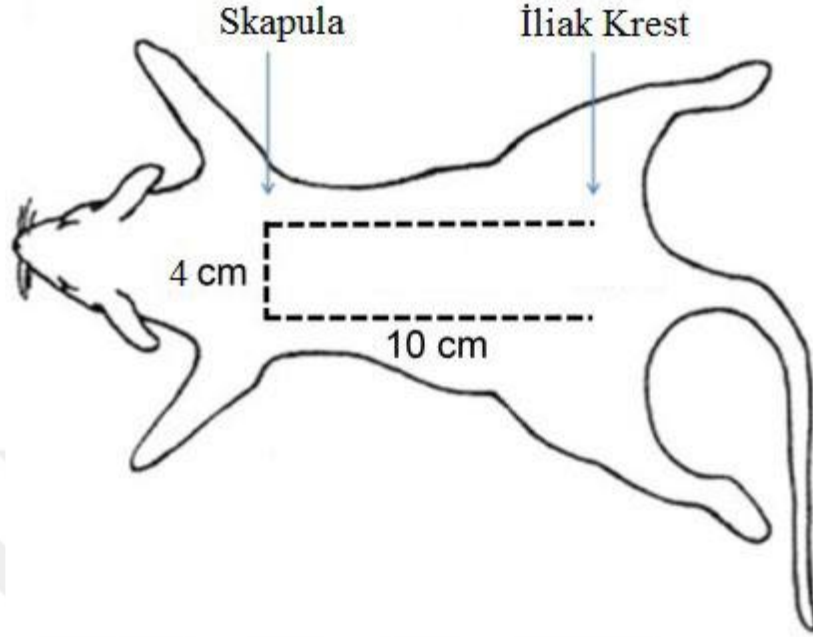
Flep, sıçanın sırt bölgesinin orta hattına eşit uzaklıkta olan lateral sınırlara sahiptir. Bu durum teorik olarak flebin her iki tarafında eşit damarlanma olduğu anlamına gelir. Bu eşit damarlanma durumu, Şekil 15'te gösterilmiştir (32).



Şekil 15. McFarlane flebin her iki tarafındaki eş damarlanma

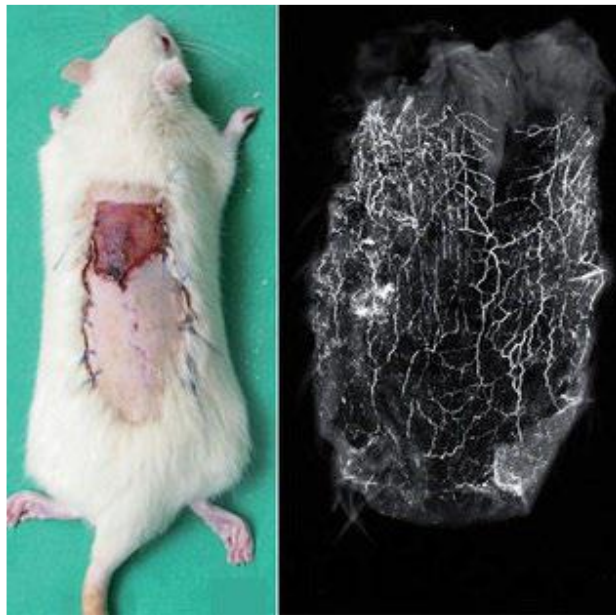
Dorsal flep, genellikle ortalama olarak 10 x 4 cm boyutlarına sahip olup en uzunlukları ile karakterize edilir. Bu flebin sınırları, sırt bölgesinin alt skapular açısı

ve iliak krest gibi kemik noktalarının palpasyonu ile belirlenir ve planlanır (32). McFarlane flebinin nasıl planlandığı, Şekil 16’da gösterilmiştir.



Şekil 16. McFarlane flep planlaması

McFarlane tarafından geliştirilen bu flep cerrahisi geciktirme çalışmaları için özel olarak tasarlanmıştır, bu nedenle flebin boyutu ve eni belirli bir oranla ayarlanmıştır. Bu oran sayesinde her seferinde teorik olarak benzer bir nekroz (doku ölümü) bölgesi oluşturulması amaçlanmıştır (33). McFarlane flebinin standart nekroz bölgesi, Şekil 17’de gösterildiği şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 17. McFarlane flebinde standart nekroz alanı

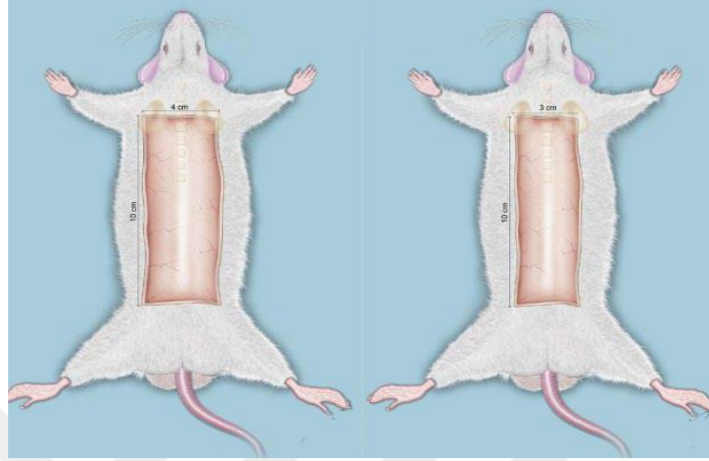
Cerrahi geciktirme çalışmalarında, ilk olarak lateral tarafta bulunan flebin uzun insizyonlar yapıldı. Bu kenarlar daha sonra tekrar eski yerlerine dikildi. Daha sonra flep tamamen kaldırıldı ve tekrar orijinal pozisyonuna dikildi (34). Kontrol grubunda ise sadece flep kaldırılıp eski yerine dikildi. Bu şekilde cerrahi geciktirme uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla daha az nekroz oranı elde edildi.

Bu flep tasarımında ilk değişiklik, 1967 yılında Adamson tarafından gerçekleştirildi. Flebin pedikülü kraniyal yönden kaudale alındı. Zamanla flep boyutları 2 x 7 cm'den 5 x 10 cm'ye kadar değişti. Günümüzde ise dorsal flep veya McFarlane flebi, pediküllü deri flepleri için standart bir deney modeli haline geldi (35).

Ancak ideal bir flep modeli olmaması nedeniyle dorsal flep modelinin dezavantajları da bulunmaktadır. Dorsal flebin, tabandan yukarıya doğru olan beslenme ve canlı kalma mekanizmaları nedeniyle bilimsel verilerde karmaşıklığa ve tutarsızlığa yol açabilen bir özelliği bulunmaktadır. Bu, greftin beslenmesi ve yaşamı için gerekli mekanizmalarla bağımsız olarak distal kısmının canlı kalmasına neden olabilir (35, 36). Bu soruna çözüm arayan bir araştırmacı, Hammond, kontrol grubundaki sıçanlardan dorsal flep boyutlarında tam kalınlıkta deri greftleri aldı. Bu greftleri alındıkları yere geri yerleştirdi. Deney grubunda ise aynı boyutta dorsal flep kaldırdı ve flep ile greftlerin nekroz oranlarını karşılaştırdı. Sonuç olarak, iki gruptaki nekroz oranları benzer çıktı.

Bu nedenle araştırmacılar, dorsal flebin kendi tabanına temasının tamamen kesilmesi gerektiğini ve flebin sadece pedikül bağımlı olması gerektiğini düşündüler. Bu sorunu çözmek için flebin altına sıvı geçirgen olmayan bir tabaka yerleştirilmesi önerildi. Ancak bu yaklaşım, inflamatuvar reaksiyonlar, yabancı cisim reaksiyonları, artmış salgı ve enfeksiyon gibi komplikasyonlara yol açabildi. (37, 38). Hammond, flebi kaldırdıktan sonra flebin neden olduğu doku defektini her iki uzun kenardan sütürleyerek yani defekti primer olarak onararak küçülttü. Bu şekilde flebin taban ile temasını kesmeyi başardı. Bu yöntem, hızlı, güvenilir ve tam bir nekroz alanı elde etmeyi sağladı. Kelly ise bu sorunu çözmek için dorsal flebin uzun kenarlarını birbirine sütürledi ve flebin en distal kısmını yine distal kısa kenara sütürledi. Bu şekilde dorsal flep tüp şeklini aldı ve flebin taban ile teması kesildi. Bu tüp flep yöntemi, daha az değişkenlik gösteren, tahmin edilmesi daha kolay ve demarkasyon hatları daha belirgin ve keskin sınırlı tam bir nekroz alanı oluşturmayı mümkün kıldı.

Dorsal flebin taban genişliği 3 ya da 4 cm olarak belirlendi ve pedikül ya kaudalde ya da kraniyalde tutuldu. Bu modellerin geliştirilmesinden sonra Conoyer, sıçanların boyutlarının flep nekroz oranıyla anlamlı bir ilişkisi olmadığını gösterdi. Farklı boyutlardaki McFarlane flepleri Şekil 18’de örneklenmiştir.



Şekil 18. Farklı boyutlardaki McFarlane flepleri

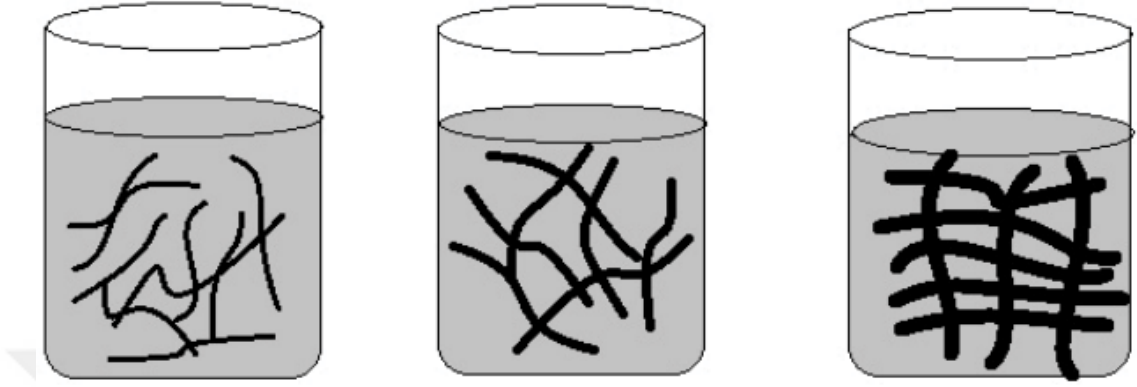
Ancak dorsal flep modelinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Öncelikle sıçanların flebe erişmesini engellemek ve kendilerine zarar verme riskini önlemek için sıçanlara boyunluk takılması gerekmektedir. Bu nedenle dorsal flep modelleri tercih edildiğinde, deneylerde sıçanlara boyunluk takılması önerilmektedir.

Sonuç olarak, dorsal flep veya diğer adıyla McFarlane flebi, kolay bir şekilde kaldırılması, çeşitli modifikasyonlara açık olması, lokal ve sistemik ilaçların nekroz ve cerrahi geciktirme çalışmalarında test edilmesine olanak sağlaması gibi özellikleri nedeniyle günümüzde flep araştırmalarında sıkça ve başarılı bir şekilde kullanılan değerli bir deneysel flep modelidir. Ayrıca, flebin kaldırılmasının ardından oluşan nekroz alanının, planimetrik analizler, Doppler görüntüleme, lazer destekli görüntüleme yöntemleri veya immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesi de mümkündür (39).

2.4. JELLER

Jeller, cilde veya ağız boşluğu gibi erişilebilir mukoza zarlarına uygulanmak üzere tasarlanmış yarı katı preparatlardır. Jeller, jelleştirici veya galant olarak da bilinen kolloidal parçacıkların, jel olarak bilinen üç boyutlu bir matris oluşturan bir dispersiyon ortamı veya çözücü boyunca düzgün bir şekilde dağıldığı iki iç içe geçmiş

sistemden oluşur (40,41). Jeller, organik, inorganik veya sulu bir çözücü veya çözücü sistemlerine doğal, sentetik veya yarı sentetik polimer veya düşük moleküler ağırlıklı küçük moleküller olabilen bir jelleştiricinin (jelatör) eklenmesiyle hazırlanır (Şekil 19) (42,43).



Şekil 19. Jeller

Jellerdeki polimer, jel matrisinin omurgası gibi davranır. Bu Polimerik ağ örgüsü jele yapısal mukavemetini verir, uygulandığı yüzeye daha fazla yapışma sağlar ve daha büyük moleküllerin daha az nüfuz etmesini sağlar, dolayısıyla tutmayı mümkün kılar (44).

Jeller, bağlanma tipine bağlı olarak tersinir veya tersinmez olabilir. Tersinir jeller genellikle hidrojen bağlı sistemlerdir. Aksine tersinmez jeller genellikle kovalent olarak bağlanır. Bir jel, belirgin sınırları olmayan tek bir sistem olarak veya ayrı parçacıkların yumakları ile iki fazlı bir sistem olarak görünebilir (42, 45).

Jel oluşumu sırasında, polimer ağının gerilmesine ve şeklini korumasına ve içlerindeki ilaç partiküllerini sarmasına neden olan solvent penetrasyonunun bir sonucu olarak şişme meydana gelir (44,45). Viskozite, jel oluşumunda ayrılmaz bir rol oynar. Çözelti formundaki bir jel, jelin viskozitesini arttırmak için belirli bir polimer konsantrasyonu gerektirir (45).

2.4.1. Jellerin Formülasyonu

2.4.1.1. Jel Oluşumu

Polimer ve çözücü arasında bir denge oluşturularak bir jel oluşturulur. Kritik bir konsantrasyon, jelleşme noktası olarak da bilinen jeli verir, bu noktanın altında jel oluşamazken, bu noktanın üzerinde viskozite büyük ölçüde artar. Jelleşme noktası,

polimerin hidrofilik ve lipofilik dengesi, çözücü ve polimer etkileşimi, yapıdaki homojenlik, polimerin moleküler ağırlığı ve polimer zincirinin esnekliği kullanılarak belirlenebilir. Esneklik ve jelleşme noktası arasındaki ilişki doğru orantılıdır. Jelleşme noktası, o polimere olan afiniteyi değiştiren çözücüler kullanılarak artırılabilir veya azaltılabilir (47).

Bazı jeller, oluşumları için sıcaklık manipülasyonu gerektirir. Sıvının ısıtılması ve ardından polimerin iyice karıştırılarak içine katılması ve ardından çökmesi için soğumaya bırakılması, bunların oluşumu için temel bir prosedürdür. Bu yöntemin aksine, sıcaklığın artması bağları (örneğin hidrojen bağları) bozacağından bazı jeller ısıtmadan uzak tutulmalıdır.

Jelleri formüle etmek için başka bir teknik flokülasyon olabilir. Bu, lipofilik çözeltilere tuzlar eklenerek ve böylece jel oluşturularak yapılabilir (47, 48). Bu türün örneği, hidrojen bağı yoluyla parçacık-parçacık etkileşimi yoluyla bir jel oluşturmak için füme silika içeren mineral yağı içerir (49). Başka bir örnek, etil selüloza benzen eklenerek ve homojen bir jel elde etmek için kuvvetlice karıştırılarak jel oluşumu olabilir. Elektrolitin mevcudiyetinin, smektit grubunun Na^+ -montmorillonit kili (bentonit) ve demir ve magnezyum hidroksitlerinde olduğu gibi, reolojik değişikliklere ve ardından jel oluşumuna neden olduğu da gözlenmiştir (50,51). Jeller, titanyumun H_2O_2 / 0.1M HCl ile işlenmesi gibi kimyasal reaksiyonlarla da hazırlanabilir. Bu reaksiyon titanyum yüzeyinde bir jel oluşturur ve yüzeydeki H_2O_2 / 0.1 M HCl çözeltisinin artmasıyla jel tabakasının kalınlığı artar (52).

2.4.1.2. Jellerin Sınıflandırılması

Çözücünün doğasına, afinitesine ve fiziksel durumuna bağlı olarak jeller, organojeller ve hidrojeller olmak üzere iki temel gruba ayrılır.

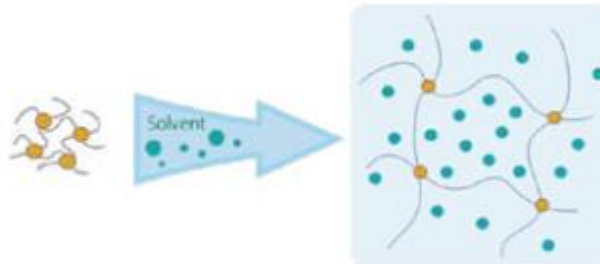
Organojeller: Organojeller yağlı jeller olarak da adlandırılabilir. Hem polar hem de apolar grumlardan oluşurlar ancak apolar kısmın oranı çok yüksektir. Jeller suda şişme eğiliminde olduğundan %35 su içerebilirler. Organojelatörler genellikle organik çözücülerde kalınlaşma yeteneğine sahip düşük moleküler ağırlıklı küçük moleküllerdir (53). Fiziksel organojellerde, organik çözücüler düşük konsantrasyonlarda jelleştirebilen çok sayıda farklı molekülün keşfi ve sentezi ile hızla büyümüştür. Jelatör molekülleri, çubuklar, tübüller, lifler ve trombositler gibi çeşitli

agregatlar halinde kendiliğinden bir araya gelmelerinin ardından büyük miktarlarda sıvıyı hareketsiz hale getirir.

Mevcut organojellerin çoğu farmasötik açıdan kabul edilemez organik sıvılardan ve/veya kabul edilemez/denenmemiş jelleştiricilerden oluştuğundan, ilaç/aşı dağıtım araçları olarak şu anda yalnızca birkaç organojel üzerinde çalışılmaktadır. Bunlar, transdermal dağıtım için incelenen mikroemülsiyon bazlı jelleri ve lesitin jellerini içerir. Organojeller, gliserol esterleri gibi lipidlerle hazırlanır. Su, 3 boyutlu bir matristeki lipid çift katmanı arasında hapsedilir. Oda sıcaklığında mumlar halinde görünürler. Hem polar hem de polar olmayan varlıkların varlığı, preparatın hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçlarla kullanılmasını sağlar (53).

Hidrojeller: Hidrojeller, adından da anlaşılacağı gibi, toplam jel içeriğinin %90'ına kadar çıkabilen büyük miktarda su içerir (44). Biyouyumlu olarak kabul edilirler ve yüzey değiştirici sistemler olarak uygulama söz konusu olduğunda en faydalı ve destekleyici seçenek olarak kabul edilirler (44).

Hidrojinin çekirdeği, Şekil 3'te gösterildiği gibi sulu bir çevreye maruz bırakıldığında şişmeyle sonuçlanan homopolimerlerin veya kopolimerlerin fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanması yoluyla oluşturulabilen bir polimerik kanal sistemidir.



Şekil 20. Hidrojel şişmesi

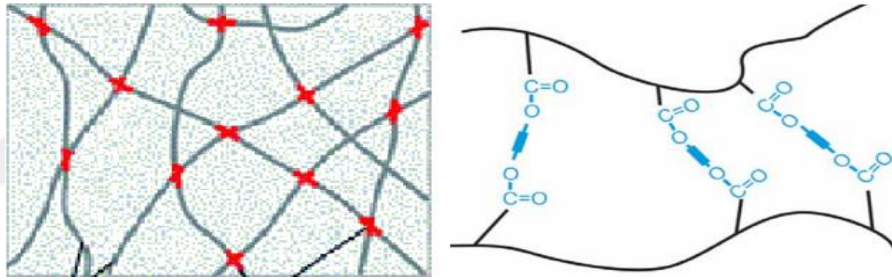
Hidrojeller, polimerin çekirdek ağının büyük miktarda su emme yeteneğine sahip olduğu üç boyutlu karmaşık sistemlerdir (54). Polimer ve çözücünün tercihi ve çapraz bağlanmanın türü ve kapsamı, hidrojellerdeki şişme derecesini belirler (44). Doğaları gereği oldukça gözeneklidirler, bu da kolloidler halinde dağılan veya suda çözünebilen aktif ilacı ve diğer maddeleri tutma yeteneklerini artırır.

Mevcut polimerin tipi ve konsantrasyonuna göre, hidrojellerin kalınlıkları ve reolojileri farklılık gösterebilir (42). Hidrojel levhaları, mikropartiküller, nanopartiküller, kaplamalar ve filmler gibi birçok farklı hidrojel fiziksel formu tasarlanabilir.

2.4.1.3. Jel Oluşumunun Mekanizmaları

Jeller, aşağıda açıklanan üç tip çapraz bağlama yoluyla oluşturulabilir;

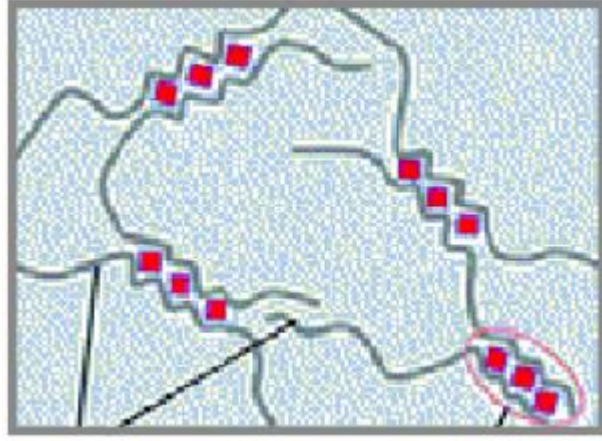
Kimyasal çapraz bağlama: Bazen bir polimerde bulunan ikili veya çok işlevli monomerler, büyük moleküler kütleyle sahip değiştirilemez bir kimyasal çapraz bağın oluşmasına neden olur (Şekil 21). Bu polimerler genellikle çözücü içinde çözünmezler, ancak belirli çözücüler dahil edildiklerinde yalnızca şişmeye ve dolayısıyla bir jel oluşumuna neden olur, örn. poliakrilamid jeller. Bu jeller kovalent olarak bağlıdır ve doğada geri dönüşümsüzdür.



Şekil 21. Kimyasal olarak çapraz bağlı jel.

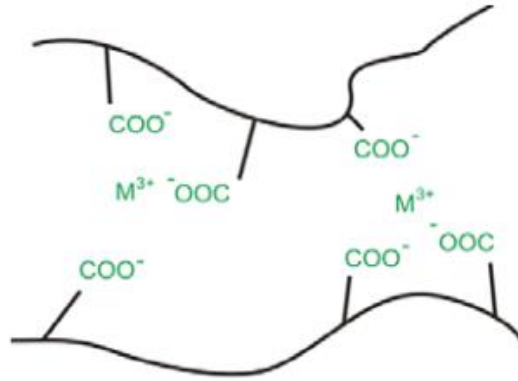
Yapılarında bağlı olmayan gruplar bulunan polimerler ile de kimyasal çapraz bağlanma elde edilebilir. Bir çapraz bağlama bileşiği, bu tür polimerlere eklendiğinde, serbest grup ile eklenen bileşen arasında geri döndürülemez bir kimyasal reaksiyona yol açar. Bu geri dönüşü olmayan reaksiyon, viskozitede bir artışa neden olur ve belirli bir konsantrasyona ulaştıktan sonra bir jel oluşur; poliakrilik asit (çoklu karboksilik asit ile) ve glikoller (hidroksil grupları ile) bu tür kimyasal çapraz bağlayıcı jeller oluşturur (54).

Fiziksel Çapraz Bağlama: Bazı durumlarda, çözeltiden jele geçiş hidrojen bağı oluşumu, kristal bileşen çözünmesi, konsantrasyon değişimi, sıcaklık değişimi geçişi veya hidrofobik etkileşimler ile gerçekleşir. Bu tür jellerin örnekleri arasında dekstran jeller, poli (N-izopropilakrilamid) jeller, selüloz jeller vb. yer alır (54) . Fiziksel çapraz bağlama, Şekil 22'de gösterilmiştir.



Şekil 22. Fiziksel olarak çapraz bağlı jel

İyonik Çapraz Bağlama: Çapraz bağlanma, bir jel oluşturmak üzere birbirini çekebilecek polimer(ler) veya diğer moleküller (çözücü) üzerinde yükler oluşturarak da elde edilebilir (Şekil 23). Bu tür moleküller üzerindeki yüklerin bir sonucu olarak iyonik bağlar oluşur. Örneğin, kalsiyum iyonlarının varlığında polisakarit aljinat, belirli bileşenleri (enzimler, vb.) kapsülleyebilen bir jel matrisi üretir. İyonik jelleşme, ortamın (çözücü) pH'ını değiştirerek de elde edilebilir. Bu tür karışımların pH'ının değiştirilmesi, örn. pektin, uygun bir ortamda asidik pH'a tabi tutulduğunda bir jel oluşturur (54) .



Şekil 23. İyonik çapraz bağlama

2.4.1.4. Jel Formülasyonlarının Avantajları

Jel formülasyonlarının dozaj formlarına göre önemli avantajlarından bazıları aşağıdaki gibidir (54).

- i) Diğer yarı katı dozaj formlarıyla karşılaştırıldığında jellerin formüle edilmesi kolaydır.
- ii) Jel, zarif, yağsız bir formülasyondur.

iii) Polimerin birden fazla kez dolanmasıyla kontrollü salım formülasyonu olarak kullanılabilir.

iv) Jellerin uygulama alanına iyi yapışma özelliği vardır.

v) Biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumludurlar.

vi) Jellerin alıkonma süresi diğer topikal dozaj formlarına göre daha yüksektir.

vii) Belirli stres koşullarına karşı mükemmel toleransa sahiptirler.

viii) Uygulama yerinde koruyucu bir tabaka oluşturlar.

ix) Yıkanebilir ve toksik değildirler.

x) Solvent buharlaşması nedeniyle mükemmel yayılabilirlik ve soğutma etkisi sağlarlar.

xi) Nispeten daha az uzun vadeli istikrar sorunlarına sahiptirler.

xii) Hem polar hem de polar olmayan ilaçları uygulamak için kullanılabilirler.

2.4.1.5. İn situ Jelleşen Sistemler

Herhangi bir ilaç dağıtım sisteminin temel amacı, ilacın farmakokinetik parametrelerini ve doku dağılımını yararlı bir şekilde değiştirmektir (55). Son 60 yılda, kontrollü ve sürekli salım sağlayan ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesine büyük önem verilmiştir. İn situ jel ilaç dağıtım sistemi, en iyi yeni ilaç dağıtım sistemlerinden biri olarak ortaya çıkmıştır. İn situ jel ilaç dağıtım sistemi, "Sol'dan Jel'e" geçiş gibi özel karakteristik özelliği sayesinde ilaçların sürekli ve kontrollü salınımına, hasta uyumunun ve konforun iyileştirilmesine yardımcı olur.

In situ jelleşme sistemi vücuda girmeden önce solüsyon halinde olan ancak çeşitli fizyolojik koşullar altında jel formuna dönüşen bir formülasyondur. Oral, oküler, nazal, rektal, vajinal, enjekte edilebilir, parenteral ve intraperitoneal yollardan çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İlaç verme kapasitesine sahip birçok polimerik sistem geliştirilmiştir.

Bu polimerler fizyolojik uyarılarla temasa geçtiklerinde sol-jel geçişine uğrarlar. Yerinde jel ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi için çeşitli doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır (56).

İnsitu jelleştirme sisteminin önemi

- 1) Yerinde jel, 'Sol-Gel' geçişi sayesinde ilaçların kontrollü ve sürekli salınımına yardımcı olur.
- 2) Vücuttaki ilaç uygulama sıklığının azaltılmasına yardımcı olur.
- 3) İlaçların düşük dozları gerekir ve ilaç birikimi ve yan etkisi olmaz.
- 4) İlaçların biyoyararlanımını artırır.
- 5) Jel oluşumu nedeniyle ilacın kalma süresi artacaktır.
- 6) Yerinde jel ilaç dağıtım sistemi ilacın israfını azaltır
- 7) İlaç salınımını sürdürebilen ve hedeflenen alanla uzun süre temas halinde kalabilen sıvı dozaj formu idealdir (56) .

İnsitu Jel Sisteminin Avantajları

- 1) İlacın kontrollü ve sürekli salınımını sağlar
- 2) İlaç uygulamasının kolaylığı
- 3) Bilinci kapalı hastalara uygulanabilir
- 4) Artan hasta uyumu ve konforu
- 5) Doz sıklığını ve ilaç toksisitesini azaltır
- 6) Artan biyoyararlanım
- 7) Doğal polimerlerin kullanımı nedeniyle biyouyumluluk ve biyolojik bozulmayı sağlar
- 8) Doğal polimerler, biyolojik uyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve hücrel aktiviteleri destekleyen biyolojik olarak tanınabilir kısımlar gibi karakteristik özelliklere sahiptir.
- 9) Sentetik polimerler genellikle tolere edilebilir bozunabilirlik ve işlevsellik sağlayacak şekilde değiştirilebilen iyi tanımlanmış yapılara sahiptir.
- 10) Yerinde jeller ayrıca, invaziv olmayan ilaç uygulaması için özellikle mukus membranları yoluyla ilaç hedeflemeyi kolaylaştırmak amacıyla biyo-yapışkanlık sergileyecek şekilde tasarlanabilir.
- 11) Yerinde jeller, konakçının bağışıklık tepkisinden kaçınarak ve fagositik aktiviteleri azaltarak dağıtım cihazının in vivo dolaşım süresini artıran hidrofilikleri nedeniyle in vivo önemli bir "gizlilik" özelliği sunar (56) .

İnsitu Jel Sisteminin Dezavantajları

- 1) Yüksek düzeyde sıvı gerektirir.

- 2) İlacın sol formu bozulmaya daha duyarlıdır.
- 3) Kimyasal bozunma nedeniyle stabilite sorunları olasılığı.
- 4) İlacın yerleştirilmesinden sonra birkaç saate kadar yeme ve içme kısıtlanabilir.
- 5) Hidrojellere ilaç yüklemesinin miktarı ve homojenliği, özellikle hidrofobik ilaçlar için sınırlı olabilir.
- 6) Sadece küçük doz gereksinimi olan ilaçlar verilebilir.
- 7) Daha düşük mekanik mukavemet, erken çözünmeye veya hidrojin hedeflenen yerel bölgeden akmasına neden olabilir .

İnsitu Jel Hazırlanması İçin Polimerlerin İdeal Özellikleri

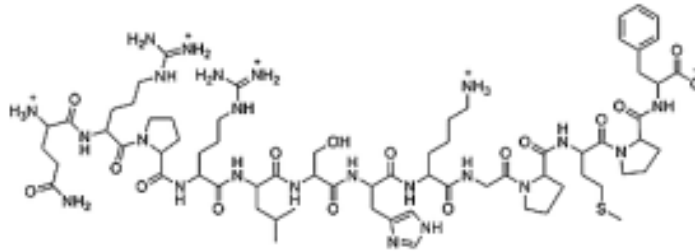
- 1) Polimer mukoza zarına yapışabilmelidir.
- 2) Uyumlu olmalı ve toksik etki yaratmamalıdır.
- 3) Sahte plastik davranışa sahip olmalıdır.
- 4) Polimer, kayma hızının artmasıyla birlikte viskoziteyi azaltabilmelidir.
- 5) Polimerin tercih edilen sahte plastik davranışı.
- 6) İyi tolerans ve optik berraklık daha çok tercih edilir

2.5. APELİNİN YAPISI

1998 yılında sığır mide özsuyunda keşfedilen apelin, başlangıçta APJ reseptörü için tek endojen ligand olarak tanımlanmıştır (57). Apelin-77 farmakolojik olarak aktif çeşitli apelin izoformlarının (örneğin apelin-12, -13, -17 ve -36) öncüsüdür ve sıçan, fare ve insan dahil olmak üzere çeşitli türler arasında %75-95 dizi homolojisini paylaşır (58). Apelin-77'nin N-terminal kalıntıları, endopeptidaz tarafından pro-apelin-55'i oluşturmak için translasyonel olarak modifiye edilir, bu da apelin-36 -17, -13 ve -12'ye bölünür. Bu fragmanların her biri, APJ reseptör bağlanması ve fonksiyonel aktivite için gerekli olan korunmuş bir C-terminal bölgesine sahiptir (59). Apelin-13'ün N-terminal kalıntısının translasyonel modifikasyonu, enzimatik bozunmadan kaçınan ve daha uzun bir biyolojik etki süresine neden olan siklik glutamin formları [Pyr]-apelin-13 ile birlikte farklı apelin izoformları (yani apelin-12, -13, -17 ve -36) değişken potansiyele sahiptir, ancak apelin-13, kardiyovasküler sistemde daha baskın ve güçlü izoformlar olarak tanımlanmaktadır (57).

Apelin güçlü vasküler etkilere sahiptir, ancak proteolitik bozulmaya oldukça eğilimlidir, bu durum etki süresini sınırlar (60). Çalışmalar göstermiştir ki; çinko içeren bir karboksi monopeptidaz olan anjiyotensin dönüştürücü enzim tip-2 (ACE-2), apelin metabolizmasından kısmen sorumludur (Vickers, et al., 2002; Wang, vd., 2016; Yang, vd., 2017a). [Pir] -apelin-13, ACE-2 bozunmasına apelin-17'den daha hassastır ve sırasıyla fonksiyonel aktiviteyi azaltan metabolitler, yani [Pyr]-apelin-12 ve apelin-16 ile sonuçlanır (61). Yakın tarihli bir başka rapor, ACE-2'nin [Pyr 1]-apelin-13'ü biyolojik olarak aktif [Pyr 1]-apelin-13'e (¹⁻¹²) metabolize ettiğini ve kardiyovasküler hastalıklar sırasında artan ACE-2 ekspresyonunun yararlı bir etkisini gösterdiğini göstermiştir (62).

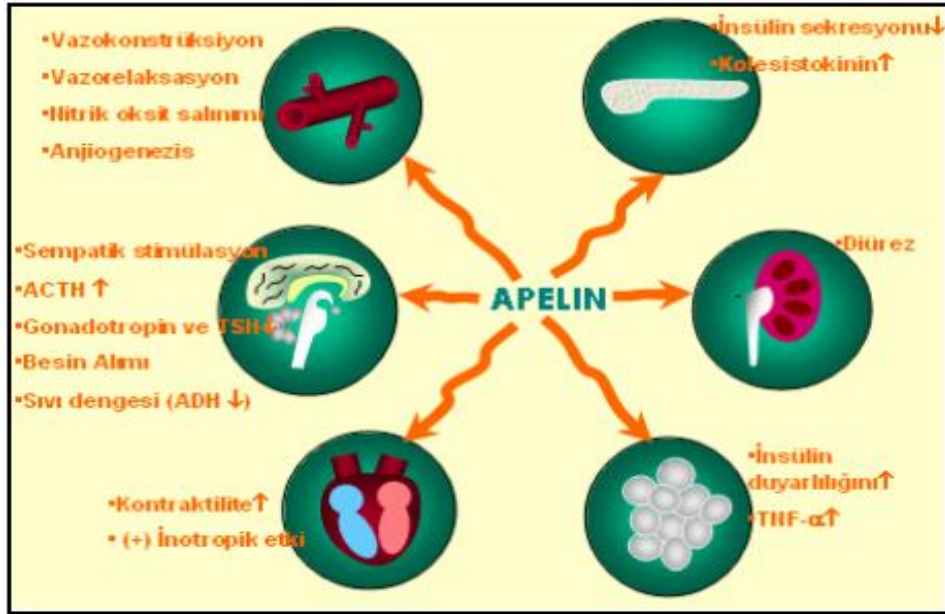
Apelin-13 formu, postranslasyonel modifikasyona uğrayarak, N-terminal pozisyonundaki glutaminin piroglutamine dönüşmesi ile piroglutamatlanmış Apelin-13'ü (Pyr1 Apelin-13) oluşturabilmektedir. Şekil 24'de Apelin-13 molekülünün kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 24. Apelin-13 molekülü

2.5.1. Apelinin Fonksiyonu

Sığır mide ekstraktından türetilen bir peptit olan apelinin, doku dağılımına ve APJ reseptör yapısına (63) dayalı olarak CVD'nin fizyolojisi ve homeostazında yer aldığı inanılmaktadır (Şekil 25). Apelin, yağ dokusu tarafından salgılanan adipokinler olarak bilinen biyoaktif mediatör ailesinin bir üyesidir. Apelin ve reseptörleri dokularda yaygın olarak bulunur ve kan basıncının kontrolü, sıvı dengesi, anjiyogenez, kalp kasılması ve enerji tüketimi dâhil olmak üzere bir dizi fizyolojik süreçte rol oynayabilir. Ayrıca bu peptid, kanser, diyabet, obezite ve kalp yetmezliği gibi patolojik durumlarda da yer almaktadır (63).



Şekil 25. Apelinin fizyolojik etkileri

2.5.2 Apelinin Kardiyovasküler Sistem Üzerinde Etkileri

Apelinin en çok incelendiği alan kardiyovasküler sistemdir, çünkü sıçan deneylerinde apelinin arter, ven ve küçük damarlar dahil olmak üzere tüm endotellerde tespit edilmiştir (64). İnsan damar endotel hücrelerinde yüksek düzeyde APJ varlığı belirlenmiş, aynı şekilde bu durumun apelin ligandı için de geçerli olduğu gösterilmiştir (64).

Yapılan çalışmalar, apelinin NO üzerinde etkileyerek vazodilatatör ve kalp üzerinde pozitif inotropik etkilere sahip olduğunu göstermiştir (57). Apelinin damarlar boyunca, arterlerden venlere ve küçük damarlara kadar endotel hücrelerinde tespit edilmesi, özellikle sıçan endotel hücrelerinde önemli miktarda bulunması, apelinin kardiyovasküler sistemde önemli rol oynayabileceği düşüncesini ortaya koymaktadır. Ayrıca, apelinin düşük dozlarda arteriyel basıncı önemli ölçüde etkilemediği, ancak yüksek dozlarda bifazik bir arteriyel basınç cevabı oluşturduğu, yani önce hipertansiyon sonra hipotansiyon meydana getirdiği gösterilmiştir (63). Apelinin damarlarda vazodilatatör etkilere sahip olduğu ve kalp üzerinde pozitif inotropik etkileri olduğu tanımlanmıştır (57). Lee ve arkadaşları peptidin hipotansif etkilerini belirlemişlerdir (58), Tatamoto ve arkadaşları ise bu etkinin nitrik oksit (NO) aracılığıyla olabileceğini ortaya koymuştur (57).

2.5.3. Apelin ve Anjiogenez

Apelin ve APJ'nin fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynamasının yanı sıra, patolojik süreçlerde de anjiyogenik bir faktör olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar, Apelinin, gelişmekte olan segmentler arası damarların belirli bir alt grubunda eksprese edildiğini göstermiştir. Ayrıca, Apelin veya APJ ekspresyonunun deneysel olarak bastırılmasının, embriyolarda segmentler arası damarlarda hasara neden olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca, Apelinin tümörlerde, sirozda, retinal hastalıklarda, miyokard enfarktüsünde, iskemik inmede, obezite ve diyabette anjiyogenezi artırıcı bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (65,66). Bu çalışmalar, Apelin ve APJ'nin patolojik koşullar altında damar oluşumu üzerinde önemli bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

2.5.4. Apelin ve İnflamatuvar Faktörler Arasındaki İlişki

Proinflamatuvar faktörler apelin ekspresyonunu etkileyebilir. Örneğin, TNF- α 'nın izole edilmiş insan ve fare adipositlerinde apelin mRNA ekspresyonunu yukarı regüle ettiği ve TNF- α 'nın intraperitoneal enjeksiyonunun farelerde hücrelerde ve plazmada apelin ekspresyonunu arttırdığı keşfedilmiştir (67).

Heinonen ve ark. (68) metabolik sendromlu hastalar üzerinde yaptıkları bir deneyde apelinin in vivo olarak TNF- α ve MAP ekspresyonu ile korele olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, apelin makrofajların aktivitesini etkiler. Hem normal hem de hipoksik koşullarda RAW264.7 hücreleri üzerinde yapılan bir in vitro deneyde, apelinin monosit kemotaktik protein 1 (MCP1), monosit kemotaktik protein 3 (MCP3), makrofaj inflamatuvar protein 1 (MIP1 α , MIP1 β), vasküler endotel büyüme faktörü A (VEGFA), anjiyopoietin 2 (Ang2) ve TNF- α . Ayrıca apelin, RAW264.7'de kaspaz 9/3 ekspresyonunu baskılayarak makrofajları apoptozdan korur (69). Primer sıçan peritoneal makrofajlarının (Pyr1)-apelin-13 ile inkübasyonu, pro-inflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-6) ve fagositozu azaltır. Ayrıca, peritoneal makrofajların tedavisi (Pyr1)-apelin-13 artırır, proinflamatuvar sitokin ekspresyonunun üretimindeki azalmayı önler ve aynı zamanda apelinin makrofaj fonksiyonlarını etkileyen bir aracı olarak rolünün altını çizerek (69).

2.6. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER

Oksidatif stres, hücre içindeki oksidan dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. Bu dengenin bozulması durumunda, hücre içindeki serbest radikallerin düzeyi artar ve çeşitli moleküllere bağlanarak oksidatif stres oluşturur (70).

Serbest radikaller, kısa ömürlü, kararsız ve reaktif özelliklere sahip moleküllerdir ve dış orbitalinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunur. Biyolojik sistemde en iyi bilinen radikaller oksijen kaynaklı süperoksit, peroksit ve tek değerlikli oksijen olup, ayrıca geçiş metal iyonları ve hidroksil gibi diğer radikaller de bulunmaktadır. Hücrelerde metabolik dengeyi sağlamak amacıyla sürekli olarak sentezlenen serbest radikaller, hücrelerin farklı bölgelerinde yapıları ve etki ettikleri yerlerin farklılığı nedeniyle çeşitli risklere neden olabilir (71).

2.6.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Süperoksit radikali, normal aerobik metabolizmanın bir yan ürünüdür ve moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Süperoksit radikali, reaktivitesi büyük ölçüde olduğu ortamdaki çevresel koşullara bağlı olarak hem çok iyi hem de zayıf bir oksitleyici molekül olabilir (72).

Bu radikal molekül, hücresel aktiviteler ve oksidatif reaksiyonlar sırasında üretilebilir. Süperoksit radikalının çevresel koşullara bağlı olarak değişen reaktivitesi, hücre içindeki metabolik dengeyi etkileyebilir ve oksidatif stresin gelişimine katkıda bulunabilir. Bu nedenle, süperoksit radikali ve benzer reaktif oksijen türlerinin hücresel düzeyde nasıl düzenlendiği ve etkileşimde bulunduğu, hücresel sağlık ve hastalıkların anlaşılması açısından önemlidir.

2.6.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, genellikle ökaryotik hücre peroksizomlarında bir dizi oksidazın katalizlediği reaksiyon sonucunda iki molekül O_2 'nin indirgenmesiyle ortaya çıkar (71). Ayrıca, süperoksit radikalının bir elektron almasıyla meydana gelen peroksitin, iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu elde edilir (71).

Bu kimyasal reaksiyonlar, hücresel metabolizmanın bir parçasını oluşturur ve hidrojen peroksitin oluşumu, hücre içindeki oksidatif süreçlerle yakından ilişkilidir.

Hidrojen peroksit, hücre içinde çeşitli biyolojik fonksiyonlarda görev alabilir ve oksidatif stresin bir belirteci olarak da önem taşıyabilir. Bu nedenle, hidrojen peroksitin hücresel düzeyde nasıl düzenlendiği ve hücresel süreçlerle nasıl etkileşime girdiği, hücresel sağlık ve hastalıkların anlaşılması açısından önemlidir.

2.6.3. Hidroksil Radikali (OH⁻)

H₂O₂'nin oksijen bağlarına bir elektron eklenmesi, bu molekülü ayırmak için bir mekanizma sağlar. Bu ayrışma sürecinde, H₂O₂, Fenton reaksiyonu ile nispeten zararsız hidroksit anyonuna ve oldukça reaktif hidroksil radikaline dönüşebilir (73,74,75,76). Bu kimyasal dönüşümler, hücresel düzeyde potansiyel oksidatif stres kaynaklarını temsil eder ve bu reaktif türlerin hücre içindeki etkileşimlerini anlamak, hücresel sağlık ve hastalıkların anlaşılması açısından önemlidir.

2.6.4. Lipid Proksidasyonu ve Malondialdehit (MDA)

Süperoksit radikali ve hidroksil radikali, mitokondri, nükleus, sitoplazma ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyon sürecini başlatır. Bu durum, membran permeabilitesinde artışa neden olur. Oluşan lipid hidroperoksitler (LOOH), iltihap hücrelerini dokuya doğru çekerek kemotaktik etki gösterir ve inflamatuvar reaksiyonu tetikler. LOOH'un parçalanmasıyla çoğu biyolojik olarak aktif aldehitler ortaya çıkar. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. MDA, kanda ve idrarda bulunur ve lipid peroksidasyon seviyesi ile ilişkilidir. Bu nedenle MDA düzeyi, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir (75).

2.7. ANTİOKSİDAN SİSTEMLER

Antioksidanlar, oksidatif zincir reaksiyonlarının başlatılmasını veya çoğalmasını inhibe ederek diğer moleküllerin oksidasyonunu engelleyebilen bileşiklerdir (77). Antioksidan defans sistemi, biyolojik sistemde oksidatif stresin oluşmasını baskılama veya olası bir hasarı önleme gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Antioksidanlar hücre içinde ve hücre dışında bulunduğu gibi membranlarda da görev yapar (78). Örneğin, hücre içinde katalaz, süperoksit dismutazlar, glutatyon redüktaz; hücre dışında albümin, seruloplasmin, bilirubin, hemopeksin; membranda ise E vitamini, β karoten gösterilebilir. Antioksidanlar, endojen (hücre içi) ve eksojen (hücre

dışı) kaynaklı olmak üzere iki kategoride incelenir. Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik olarak iki gruba ayrılır. Enzimatik antioksidanlar arasında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz ve mitokondrial oksidaz sistemi bulunur. Nonenzimatik olanlar ise bilirubin, albümin, ürik asit, α -tokoferol, selenyum, askorbik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir. Eksojen kaynaklı antioksidanlar arasında allopurinol, folik asit, C vitamini, E vitamini, asetilsistein, mannitol, adenozin, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antiinflatuar ilaçlar ve demir şelatörleri yer alabilir (78).

2.7.1. Antioksidan Enzim Sistemleri

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon redoks siklus enzimlerinden oluşan glutatyon peroksidaz (GSH-Px), GSH redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, reaktif oksijen radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştürebilen antioksidan enzim sistemleridir (79).

2.7.1.1. Süper Oksid Dismutaz (SOD)

Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Oluşan H₂O₂, az miktarda ise indirgenmiş GSH-Px tarafından suya ve oksijene dönüştürülerek, fazla miktarda ise katalaz enzimi devreye girerek aynı şekilde yok edilebilir. Eğer yok edilemezse vücuttaki demir ve bakır iyonları tarafından hidroksil radikale dönüştürülür (80).

2.7.1.2. Katalaz (CAT)

Katalaz enzimi, peroksizomlarda yer alan ve yapısında hem grubu içeren hemoproteinlerdir. Karaciğer ve böbrek, CAT'ın en fazla fonksiyon gösterdiği organlardır. Katalaz, hidrojen peroksiti, okside edici enzimler ile birlikte suya dönüştürür. Hidrojen peroksit seviyesinin artmasıyla birlikte katalaz enziminin aktivitesinde artış görülür. Ortamdaki hidrojen peroksit (H₂O₂) konsantrasyonu düştüğünde ise hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan GSH-Px gibi diğer antioksidan enzimlerle etkileşim göstererek hidrojen peroksitin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlarlar (80).

2.8. NİTRİK OKSİT (NO.)

Nitrik oksit (NO), argininin bir substrat olarak kullanıldığı reaksiyon sonucunda meydana gelir. Sitokrom P-450 redüktaz homoloğu ve nitrik oksit sentaz adı verilen enzimler, arginini NO'ya dönüştüren enzimlerdir. Sitokrom P-450 benzeri enzim, demir protoporfirin 9 içeren muhtemelen sistein aksiyel ferrik ligandına sahiptir. NO oluşturan enzimler L-arjininden türeyen NOS izoenzimleri olarak bilinir (81). NO gazının yapısı nedeniyle hızla çevre hücrelere diffüze olabilir ve etkisi ortadan kaldırılana kadar devam edebilir. Fazla miktarda üretimi dokular için toksik olduğundan hızla etkisiz hale getirilir. Kan içine salınan NO'nun büyük kısmı esas olarak eritrositler tarafından metabolize edilir. Hemoglobin ve myoglobine bağlanan NO, nitrit (NO₂) ve nitrat (NO₃) olarak atılır (82,83). NO'nun yarı ömrü büyük değişiklik gösterir ve bu değişkenlik, dokulardaki oksijenli bileşiklerin oranındaki farklılıklardan kaynaklanır. NO'nun gerçekleştirdiği reaksiyonlara bağlı olarak yarı ömrü yaklaşık 10-30 saniyedir (82).

Nitrik oksit sentazın üç farklı izoenzimi vardır:

a) Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS): İlk olarak sinir dokusunda bulunmuştur, yapısal olarak tanımlanabilmiştir ve kalsiyuma bağımlıdır.

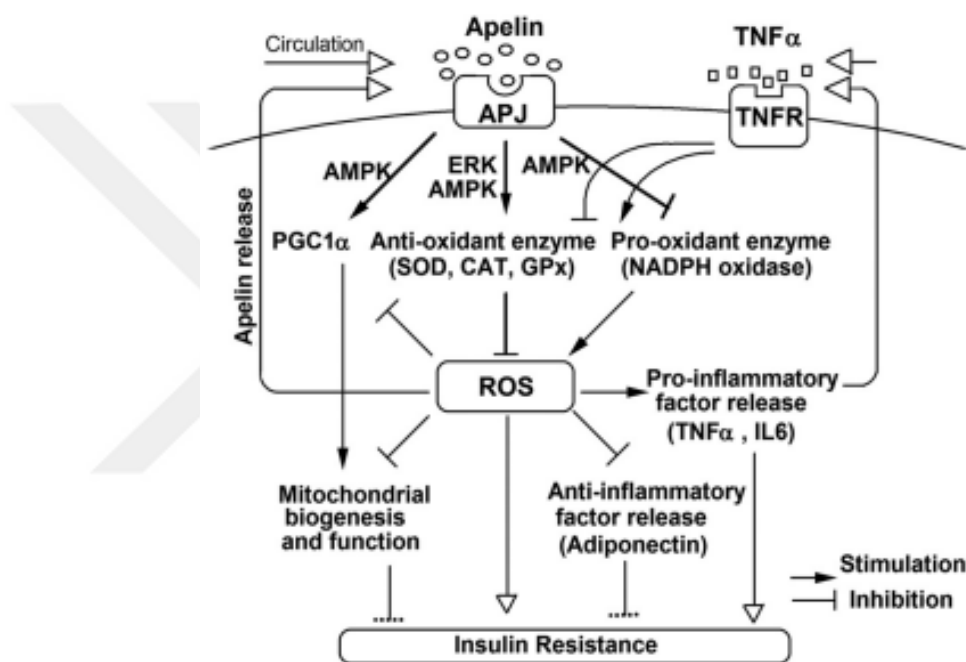
b) Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS): İlk olarak vasküler endotel hücrelerinde tanımlanmıştır ve yapısal olarak kalsiyuma bağımlıdır.

c) İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS): İlk olarak endotoksinler ve sitotoksinler aracılığıyla karaciğer hücreleri ve makrofajlarda uyarılan bir enzim olarak tanımlanmıştır.

Bu izoform fizyolojik şartlarda kalsiyuma bağlı değildir, çünkü kalmodulin ile sıkı bir şekilde bağlanmıştır. Son zamanlarda, her üç izoenzimin değişik hücrelerde bulunabildiği ve uyarılabildiği gösterilmiştir. Örneğin; eNOS endotel hücreleri, nöronlar, barsak interstisyel hücrelerinde bulunabilir. eNOS ve nNOS aktivasyonu Ca²⁺ / kalmodulin bağımlıdır, iNOS aktivasyonu ise transkripsiyonel indüksiyon yoluyla etkilidir (85).

2.9. APELİN VE OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin aşırı birikmesi ile oluşan normal dinamik homeostatik bir durumdur. Oksidatif stres, inflamatuvar hastalıkların altında yatan mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektedir. Apelin/APJ ile oksidatif stres arasında güçlü bağlantılar vardır (şekil 26). Apelin adipositlerde ROS üretimini ve salınımını baskılayabilir (86) ve kardiyomiyositlerde oksidatif stresi azaltabilir (87). Apelin, aşırı üretimi oksidatif stresle ve yağ dokusundaki inflamasyonla yakın ilişkili olan ROS proinflamatuvar adipositokinlerin salınımını azaltır (88).



Şekil 26. Apelin/APJ sinyal yolağının oksidatif stresi düzenlemesi

Spesifik olarak adipo sitlerden salgılanan proinflamatuvar adipositokinler, adipositlerde ROS oluşumunu artırır; Öte yandan ROS'un aşırı üretimi, proinflamatuvar faktörlerin adipositlerden salınmasını uyarır (89,90). Böylece adipositlerdeki oksidatif stres ve inflamasyon, pozitif bir kısır döngü oluşturur. Şekil 26 da apelinin TNF kaynaklı ROS üretimini baskılayabildiğini göstermektedir. Apelin sinyallemesinin adipozdaki oksidatif strese karşı faydalı bir fizyolojik yanıt olduğu fikri, obezitede plazma apelin seviyesinin yükseldiğine ilişkin önceki gözlemle desteklenmektedir (91,92). Bu aynı zamanda farelerde apelin tedavisinin plazma lipid hidroperoksitinde (sistemik oksidatif stresin bir indeksi) (93) önemli bir azalmaya yol açtığı ve yağ dokusunda glikoz alımını iyileştirdiği (91) yönündeki önceki gözlemleri de açıklamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel tez çalışması için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 30/11/2022 tarih ve 49533702/118 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayını takiben Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'nden destek alınmıştır. Proje no: 23.TUS.001 Çalışmaya, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı ve Afyon Kocatepe Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı katkılarını sağlamıştır. Deney aşaması Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.1. DENEY HAYVANLARI

Çalışmada, 3-4 aylık ve 250-350 gram erkek Wistar-Albino rat (42 adet) kullanılmıştır. Deney süresince polikarbonat kafeslerde (her kafeste 12 adet olmak üzere), 12 saat aydınlık/12 saat karanlık odalarda ve 22 ± 0.5 °C sıcaklıkta ve uygun nemde barındırılmıştır. Ratlar, bazal rat besini ile beslenmiş deneklere ad libitum su verilmiştir. Bir haftalık adaptasyonu takiben çalışmaya başlanmıştır. Aşağıda yazılan şekilde denekler arasında rastgele 4 çalışma grubu oluşturulmuştur.

- 1.Grup Kontrol Grubu (n=6)
- 2.Grup Random flep iskemi-reperfüzyon grubu (n=12)
- 3.Grup Random flep Apelin içermeyen jel grubu (n=12)
- 4.Grup Random flep Apelin içeren jel grubu (n=12)

3.2. KULLANILAN MALZEMELER

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri ve ilaçlar;

- 1- Temel cerrahi aletler (bistüri, bistüri sapı, portegü, penset vs)
- 2- Steril cerrahi eldiven
- 3- Steril enjektör
- 4- Steril gazlı bez
- 5- 4/0 keskin iğneli emilemeyen mono flaman polipropilen sütür

- 6- Tıraş makinesi
- 7- Flaster
- 8- 3x9cm'lik ölçü kalıbı
- 9- Çizim kalemı
- 10- Povidone-iodine
- 11- Serum fizyolojik
- 12- Ampisilin/Sulbaktam
- 13- Meperidin
- 14- Ketamin
- 15- Ksilazin
- 16- Apelin-13 trifluoroacetate
- 17- Iphone 12 pro kamera.

3.3. YÖNTEM

3.3.1. İn situ Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Aseptik şartlarda soğuk yöntem kullanılarak in situ jel formülasyonları tablo1’de verilen miktarlara göre hazırlandı (94,95). Jel formülasyonun oluşturulması amacıyla Poloksamer 188 ve Poloksamer 407 kullanıldı. Mikroorganizma üremesini engellemek için formülasyona benzalkonyum klorür ilave edildi. Belirtilen miktarlarda Poloksamer 188 ve Poloksamer 407 tartılarak 4°C distile suya ilave edilerek karıştırıldı. Belirtilen miktarda benzalkonyum klorür ilave edilerek berrak, homojen bir çözelti oluşuncaya kadar karıştırma işlemi sürdürüldü. Karıştırma süresince sıcaklık buz aküleri yardımıyla 2-8°C aralığında tutuldu. Hazırlanan çözeltiler 24 saat boyunca 4°Cde bekletildi.

Tablo 1. Soğuk Yöntem Kullanılarak İn Situ Jel Formilasyonu

	Poloksamer 188 (%)	Poloksamer 407 (%)	Benzalkonyum Klorür (%)	Apelin-13 Trifluoroacetate (µg)	Distile su q.s.
Plasebo in situ jel formülasyon	5	18	0,1	-	40 g
Apelin-13 Trifluoroacetate içeren in situ jel formülasyon	5	18	0,1	600 µg	40 g

3.3.2. Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.2.1. Fiziksel Görünüşün Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığında (25°C) ve vücut sıcaklığındaki (37°C) görünüş, renk, homojenlik ve akışkanlıkları görsel olarak değerlendirildi.

3.3.2.2. pH Ölçümleri

Hazırlanan formülasyonların pH değerleri pH metre (Thermo Scientific-Orion 5 Star pH Meter) ile oda sıcaklığında ölçüldü. Ölçümler 3 tekrarla gerçekleştirildi ve ölçümler arası pH metre probu distile su ile yıkanıp kurulandı.

3.3.2.3. Reoloji Analizleri

İn Situ Jel Formülasyonların Jelasyon Sıcaklığının Ölçülmesi: Jel formülasyonların jelasyon sıcaklığının saptanması için AR 2000 stres/hız kontrollü reometre ile çalışıldı (Haake Mars, Thermo Electron Corporation, Almanya). Çalışma, 35 mm çapındaki çelik prob (plate/plate) ile 0.3 mm sabit aralıkta gerçekleştirildi. Test esnasında sıcaklık dakikada 2°C arttırılarak 20-40°C arasında değiştirildi ve örneklerin bu sıcaklıklardaki viskozite değişimleri izlendi. Her örnek için çalışma en az üç tekrarla gerçekleştirildi.

İn Situ Jel Formülasyonların Akış Özelliklerinin İncelenmesi: Jel formülasyonlarının 25°C ve 37°C'deki akış özelliklerinin incelenmesi reometre cihazı (TA TX Discovery HR1) kullanılarak 40 mm çapındaki çelik prob, 0.3 mm sabit aralıkta ve kayma oranı 10-2000 1/s arasında değiştirilerek gerçekleştirildi. Kayma oranı bu değerler arasında değişirken 40 adet kayma gerilimi (Pa) ölçüldü. Kayma gerilimi kayma hızı grafikleri çizildi ve akış eğrileri elde edildi. Her örnek için çalışma en az üç tekrarla gerçekleştirildi.

3.3.3.2. Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Fiziksel Görünüşün Değerlendirilmesine Ait Bulgular: Hazırlanan formülasyonlar değerlendirildiğinde oda sıcaklığında homojen, renksiz, berrak ve hafif viskoz çözelti formunda oldukları gözlemlendi. Vücut sıcaklığına ısıtıldığında ise yine homojen, renksiz ve berrak oldukları görülürken yarı katı, sürülebilir bir jel

formunda oldukları görüldü. Etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar arasında görünüşte herhangi bir farklılık gözlemlenmedi.

pH Ölçümleri: Formülasyonların pH ölçümlerine ait değerler tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Ph Ölçümleri

Placebo in situ jel formülasyon	7,164
Apelin-13 Trifluoroacetate içeren in situ jel formülasyon	7,353

3.3.3. Cerrahi Yöntem

Preoperatif ve postoperatif profilaksi amaçlı tüm sıçanlara subkutan yolla günlük tek doz 150mg/kg Ampisilin uygulandı. Cerrahi öncesi anestezi amacıyla sıçanlara intramüsküler yolla 13mg/kg Ksilazin HCl ve 87 mg/kg Ketamin HCl verildi. Gereklik halinde bu dozların 1/3’ü tekrarlandı. Her sıçan pron pozisyonunda sabitlenip, sırt bölgesi tıraş edildi ve Povidone-iodine ile boyanarak preoperatif hazırlandı. Tüm cerrahi işlemler antisepsi kurallarına uygun olarak aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi.

Sıçan dorsumunda her iki skapula ve posterior iliak çıkıntılar işaretlendi. 3x9 cm’lik kaudal pediküllü dorsal yarımada flebi (Mc Farlane flebi) kalıp yardımıyla çizildi. Patoloji alınacak bölgeyi belirlemek için operasyon sonrası başlangıç noktasının yanıtıcı olmasını engellemek amacıyla proksimalden 3. ve 6. Santimetrede her iki kenara prolen ile kalıcı işaretleme yapıldı. Kaldırmış olduğumuz flepler proksimalden distele doğru 3x3 cm boyutlarında Alan I, Alan II ve Alan III olarak 3 eşit parça olarak isimlendirildi. Flep kenarları deri altındaki pannikulus karnosus kasından oluşan flep, kas üzerindeki gevşek ve nispeten avasküler anatomik planda ilerlenerek kaldırıldı. Ardından sadece deney grubunda flep altına hazırlanan formülasyonlar grup isimlerine göre uygulandı. Sonrasında her grubun flepleri 4/0 keskin iğneli atravmatik cerrahi prolen ile yerlerine sütürize edildi, Povidone-iodine ile pansuman yapıldı ve uyanmaya bırakıldı (Şekil 27).



Şekil 27. Ratların preop, intraop ve postop aşamaları

Cerrahi sonrası deney grupları sütür hattına günlük Povidone-iodine ile pansumanları yapıldı. Postoperatif 7. Günde uygulama gruplarının kendi içinde rastgele yarısına cerrahi öncesi, anestezi amacıyla intramüsküler yolla 13mg/kg Ksilazin ve 87mg/kg Ketamin verildi. Flepler her biri 3x3 cm boyutunda olacak şekilde Alan I, Alan II Alan III olarak kesildi ve prolenler ile işaretlendi. Makroskopik incelemelerini takiben formaldehit solüsyonu içerisinde konularak fiksede edildi ve rutin histolojik takip prosedürü uygulandı. Deney protokolü tamamlandığında denekler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

Postoperatif 14. günde uygulama gruplarında kalan deneklere cerrahi öncesi anestezi amacıyla intramüsküler yolla 13mg/kg Ksilazin ve 87mg/kg Ketamin verildi. Flepler her biri 3x3 cm boyutunda olacak şekilde Alan I, Alan II Alan III olarak kesildi ve prolenler ile işaretlendi. Makroskopik incelemelerini takiben formaldehit solüsyonu içerisinde konularak fiksede edildi ve rutin histolojik takip prosedürü uygulandı. Deney protokolü tamamlandığında denekler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

3.3.4. Histopatoloji

Hazırlanan derinin tam kalınlığı eksize edildi ve %10 Neutral Buffer Formaldehit ile tespit edildi. Parafine gömüldü ve 4 mm kalınlığında kesitler hematoksilin ve eozin (HE) ve Mason Trikrom (MT) ile boyandı. Mikroskop görüntüleri (şekil 26-33) bilgisayar ortamına alınıp histolojik değerlendirme ve morfometrik inceleme iki uzman tarafından kör bir şekilde yapıldı. (96,97,98,99,100).

3.3.5. Histopatolojik Morfometri

HE boyamada epidermal ve dermal rejenerasyonun histolojik skorları değerlendirildi. Görüntüleri alınan örnekler yarı niceliksel bir puanlama sistemi kullanılarak 0 ile 4 arasında kör olarak iki araştırmacı tarafından değerlendirildi. Epitel rejenerasyonu, damarlanma, bez ve kıl oluşumu ve fibrosiz açısından skorlandı. Skorlamada 5 = yok veya minimal düzeyde, 4= hafif, 3 = orta, 2 = belirgin ve 1 = şiddetli derecede olarak kullanıldı (102,103,99).

3.3.6. İmmünohistokimya

İndirek immünohistokimya ile deparafinizasyon ve antijen kurtarma sonrası kesitler TBST (Twin Tampon Çözeltisi Tampon, ph 7.4) içinde 15 dakika bekletildikten sonra TBST ile yıkandı. Nonspesifik bağlanmayı önlemek için 20 dakika ve %3 hidrojen peroksit (Lab Vision, Thermo Scientific, Fremont, ABD) ile uygulandı. Bloklama aşamasını takiben kesitler primer antikor **iNOS**, **eNOS** ve **VEGF** (Santa Cruz, Biotechnology) 1:100 oranında seyreltildi ve doku kesitlerine konuldu. Primer antikor ile gece boyunca +4 C'de inkübe edildi. Örnekler daha sonra biyotinlenmiş sekonder antikor (Lab Vision, Thermo Scientific) ile 20 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 20 dakika streptavidin peroksidaz enzimi ile reaksiyona sokuldu (Lab Vision, Thermo Scientific). Kesitler, TBST ile yıkandı. Son olarak, diaminobenzidin (DAB) içeren kromojen substrat ile inkübasyon yoluyla renk reaksiyonu geliştirildi. Oda sıcaklığında yaklaşık 5-10 dakika. Mayer hematoksilin ile zıt boyama yapıldı (şekil 34-37). İmmünreaktivite alınan görüntülerde h-skor ile değerlendirildi (104).

3.3.6.1. H-skor

İmmünohistokimyasal boyamaların semi-kantitatif sonuçları h-skor ile incelendi. Bu amaçla boyanma şiddetleri sırasıyla zayıf (1), orta (2) ve güçlü (3) olarak değerlendirildi ve her yoğunluk için üç farklı mikroskopik alanda hücreler sayıldı. İlgili puan daha sonra H-skoru = $\sum P_i$ (boyama yoğunluğu + 1) formülü kullanılarak hesaplandı. P_i , %0 ile %100 arasında değişen yoğunluk için işaretli hücrelerin yüzdesi olarak ifade edildi (105,106,107).

3.3.7. Biyokimyasal Analizler

Ratlardan alınan tam kan örneklerinin hemogram analizleri (Human, Humancount-80, Wiesbaden, Germany) hemogram cihazı ile yapıldı. Serum örneklerinden, iNOS (SLO 365 RA), eNOS (SEA868 RA USCN), nNOS (SL 1253 Ra (Sunlong), IL6 (201-11-0336 (SunRed), MDA (E0156Ra (BT LAB), SOD (SES134 Ra (USCN), CAT (SEC418 Ra (USCN), VGEF (SEA143 Ra (USCN), TGF β (BLS-2311 Ra (Bostonchem), TNF α (E-EL-R0019 (Elebscience) seviyeleri rat ELISA ticari kitleri kullanılarak belirlenmiştir.

3.4. İSTATİSTİK

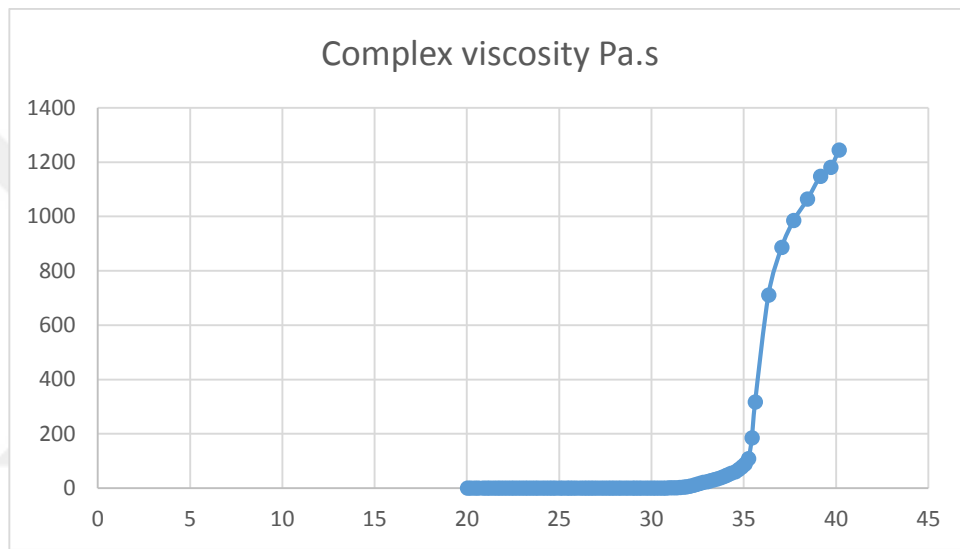
Histopatolojik ve immünohistokimyasal analizlerde, Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans (ANOVA) analizi kullanılarak yapıldı ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Türkiye post hoc testi uygulandı. Anlamlılık $p \leq 0,05$ olarak gösterildi. Biyokimyasal verilerin analizinde, bağımsız örneklemeler için varyans analizi (One Way ANOVA) kullanıldı. Her bir grubun ikili karşılaştırılmasında ise Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık (önemlilik) düzeyi 0,05 olarak alındı. Araştırmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi Windows için SPSS 26 paket programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

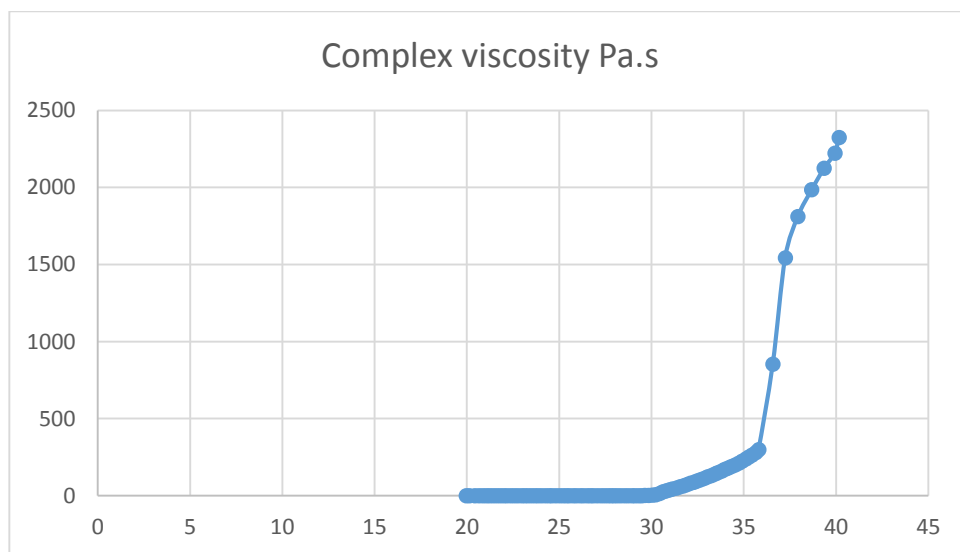
4.1. REOLOJİ ANALİZLERİ

4.1.1. İn Situ Jel Formülasyonların Jelasyon Sıcaklığının Ölçülmesi Sonucunda Elde Edilen Grafik

Hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığında ve vücut sıcaklığındaki viskozite ölçümleri ile reoloji analizleri yapılmıştır. Jelasyon sıcaklıklarının ölçümüne ait veriler Grafik 1,2, 3,4,5,6'da verilmiştir.

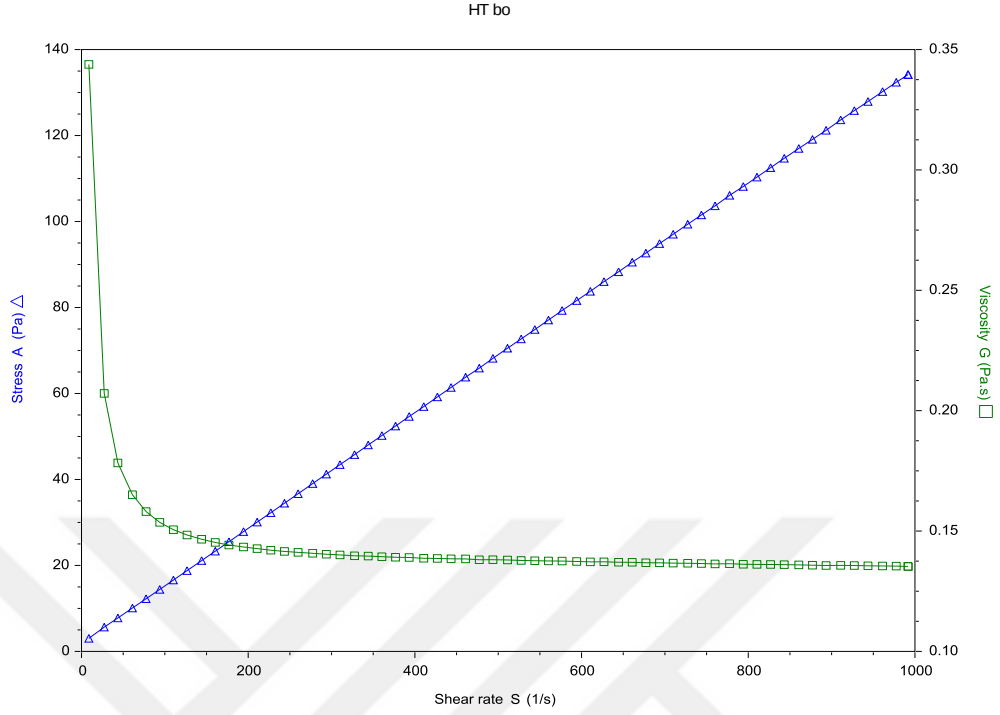


Grafik 1. Placebo in situ jel formülasyona ait jelasyon sıcaklığı grafiği

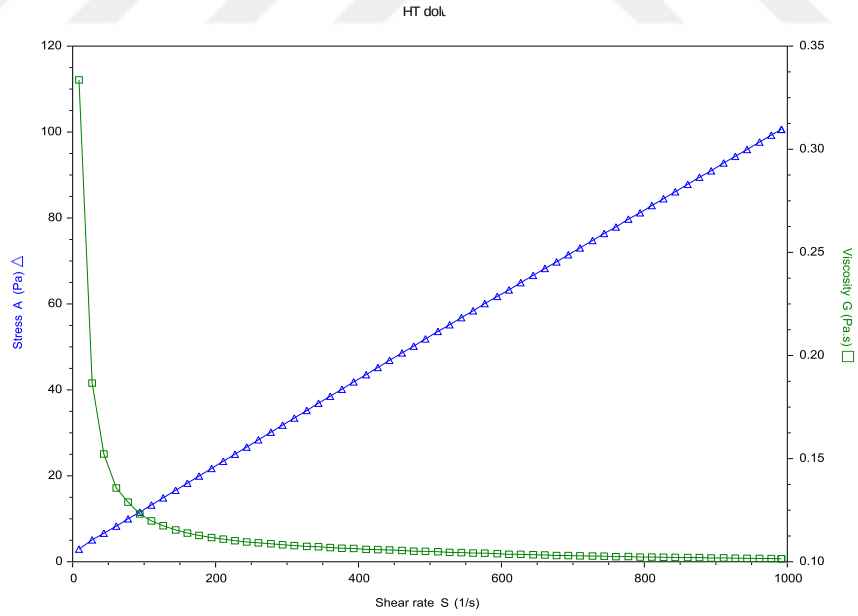


Grafik 2. Apelin-13 Trifluoroasetate içeren in situ jel formülasyona ait jelasyon sıcaklığı grafiği

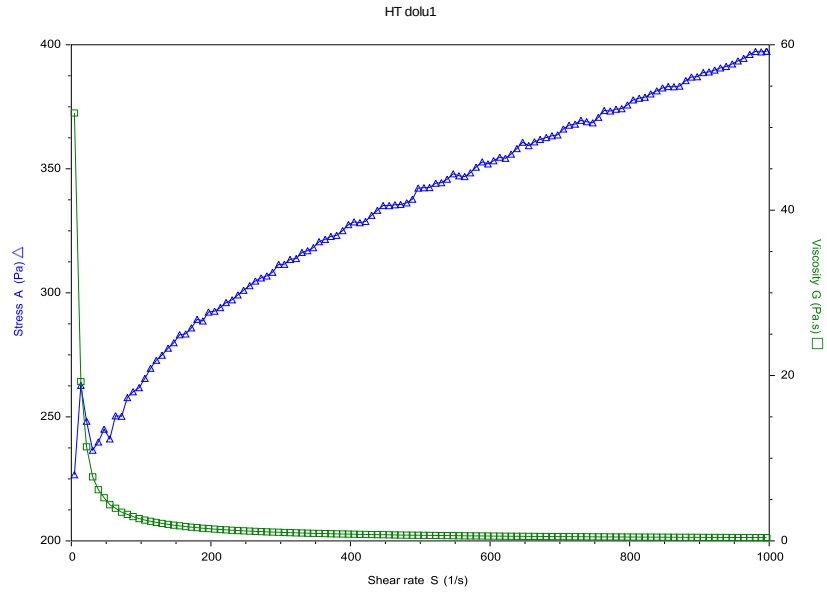
4.1.2. İn Situ Jel Formülasyonların Akış Özellikleri



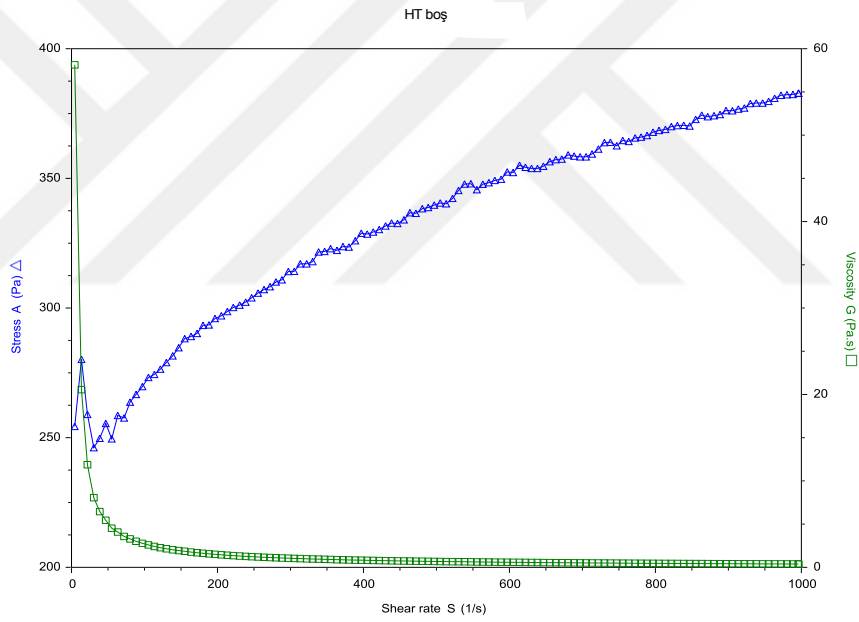
Grafik 3. 25°C'de Placebo in situ jel formülasyona ait akış grafiği



Grafik 4. 25°C'de Apelin-13 Trifluoroacetate içeren in situ jel formülasyona ait akış grafiği



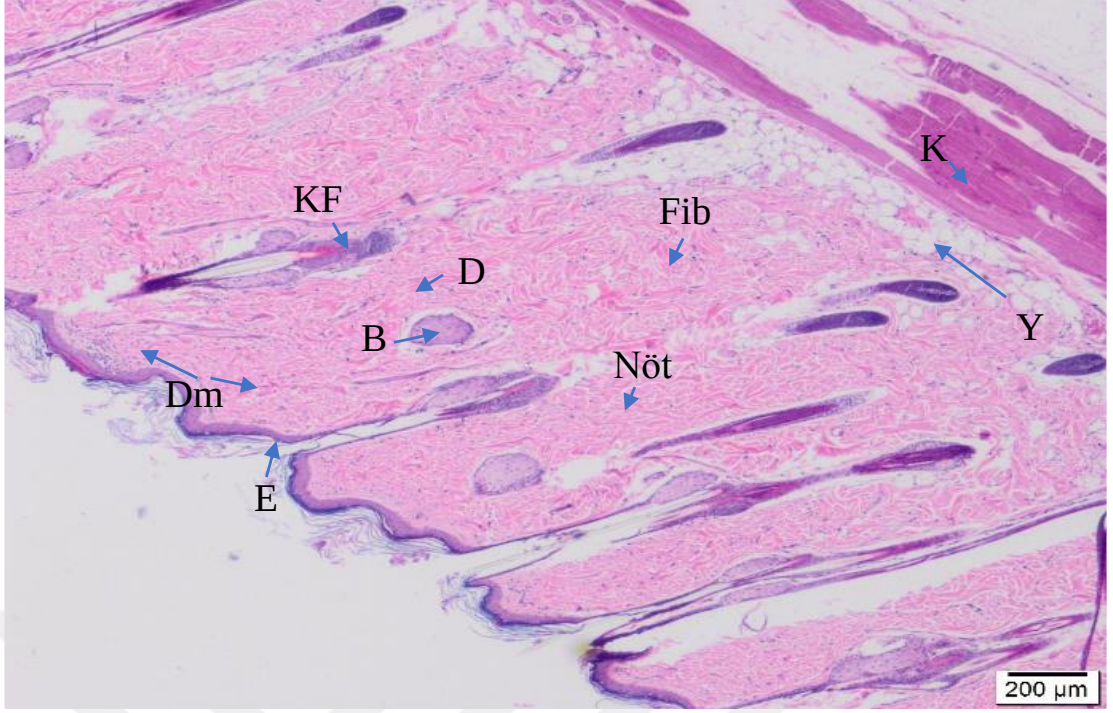
Grafik 5. 37°C’de Placebo in situ jel formülasyona ait akış grafiği



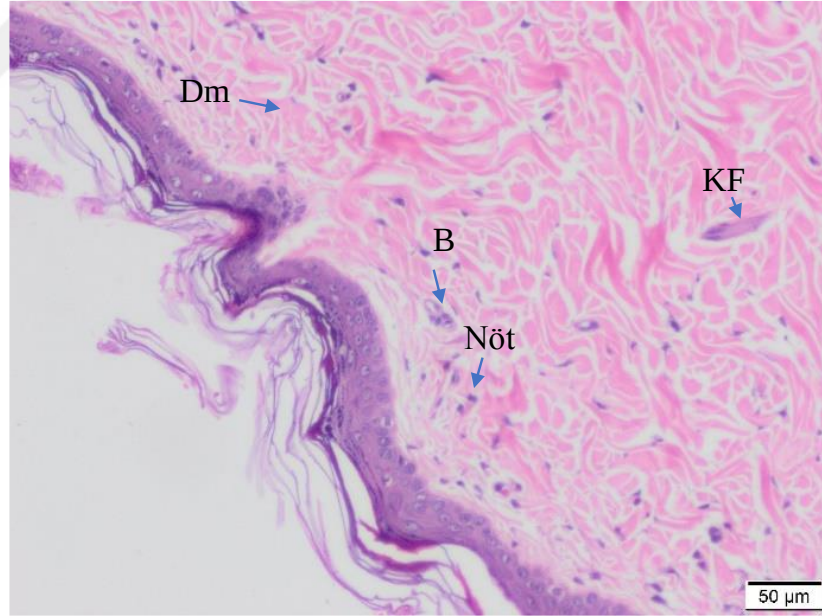
Grafik 6. 37°C’de Apelin-13 Trifluoroacetate içeren in situ jel formülasyona ait akış grafiği

4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Değerlendirmeler flep uç alana bölünerek yapıldı (Cui H ve ark 2020, Fang M ve ark 2020). Kontrol grubu (KR) normal histolojik yapısı olarak epidermis, yağ bezleri, kıl folikülleri ve düzensiz sıkı kollajen doku ile altta yağlı hipodermis ve kas izlendi (şekil 28-29).

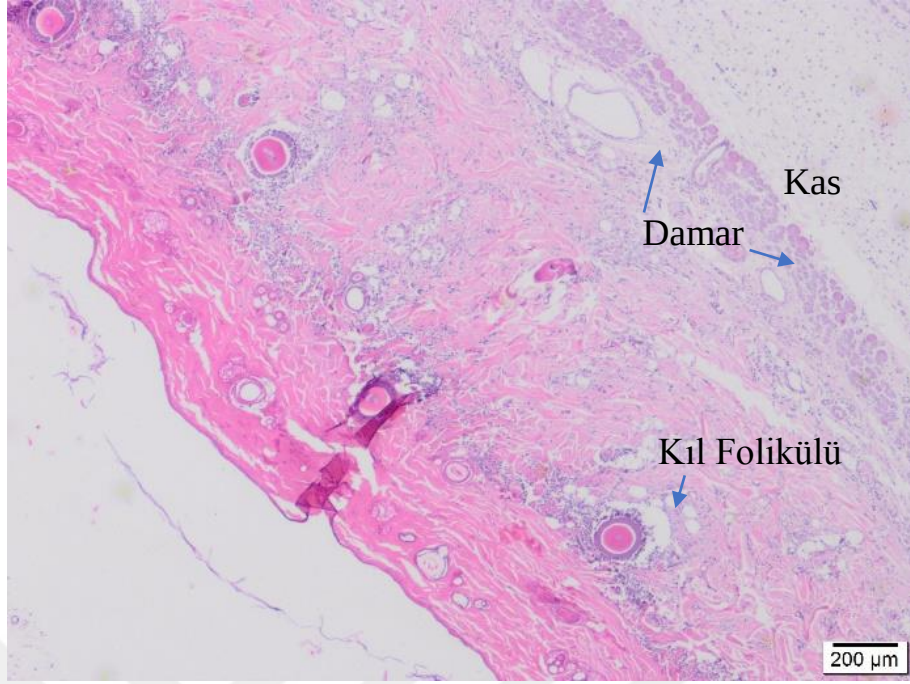


Şekil 28. Kontrol HE küçük büyütmede histolojik görüntüsü. E: epidermis, Dm: dermis, C: kabuk, Fib: fibroblastlar, Kol: kollajen, K: Kas, Y: Yağ, B: Bez, KF: Kıl folikülü.

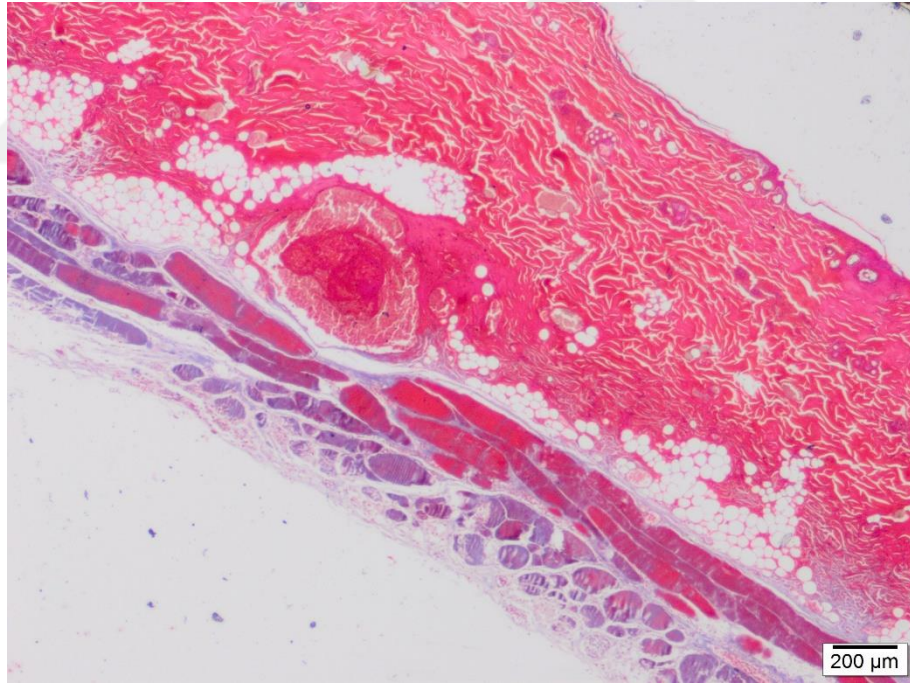


Şekil 29. Kontrol HE büyük büyütmede normal epidermis histolojik yapısı. E: epidermis, Dm: dermis, C: kabuk, Fib: fibroblastlar, Kol: kollajen, K: Kas, Y: Yağ, B: Bez, KF: Kıl folikülü.

Flep (FL) örneklerinde nekroz, ödem, polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu, epidermal kalınlıkta, kollajen yoğunluğunda, vaskülarizasyon ve kıl kökü yoğunluğunun azalma izlendi (Şekil 30-31).

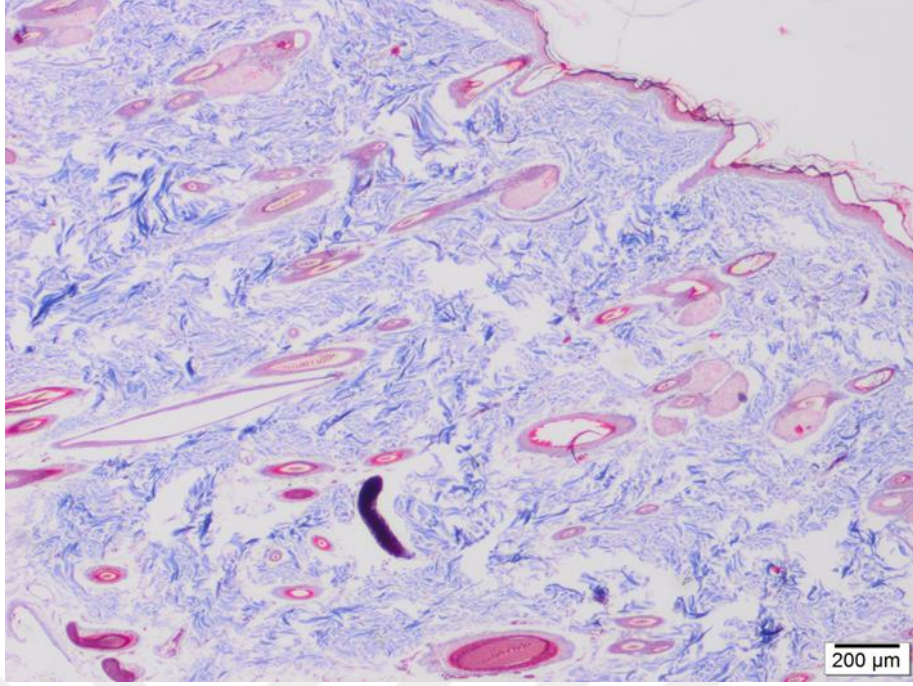


Şekil 30. Flep grubunda HE küçük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulgular

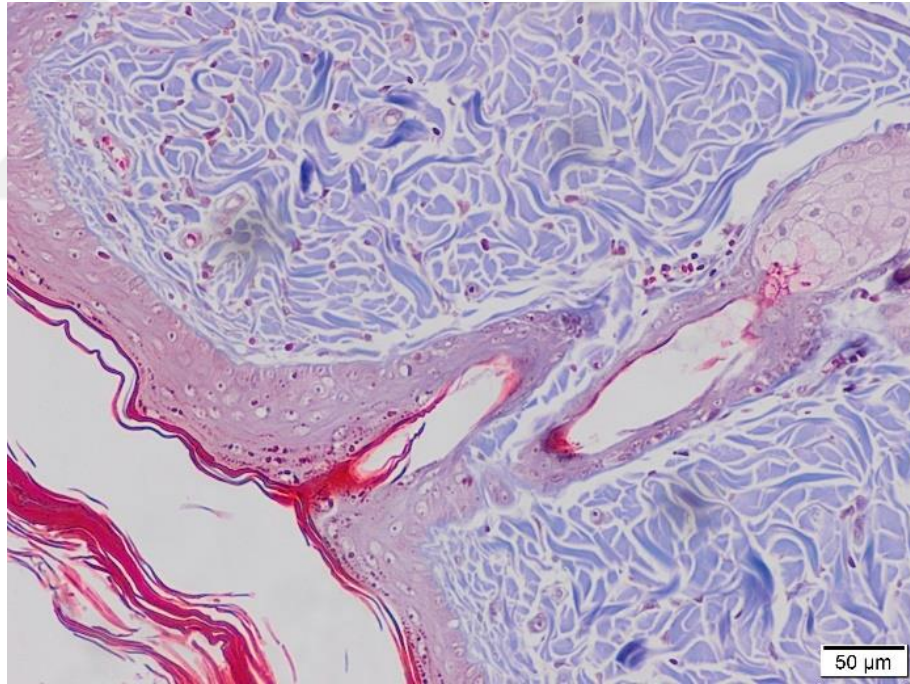


Şekil 31. Flep grubunda HE büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları

Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları gözlemlendi. Küçük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları gözlemlendi. HE boyama ile makrofajlar, nötrofiller, lenfositler, plazma hücreleri, yabancı cisim reaksiyonu, çok çekirdekli dev hücreler ve fibroblastlar gibi yara iyileşmesi veya inflamatuvar süreçlerde rol oynayan farklı hücreler izlendi (Şekil 32-33).

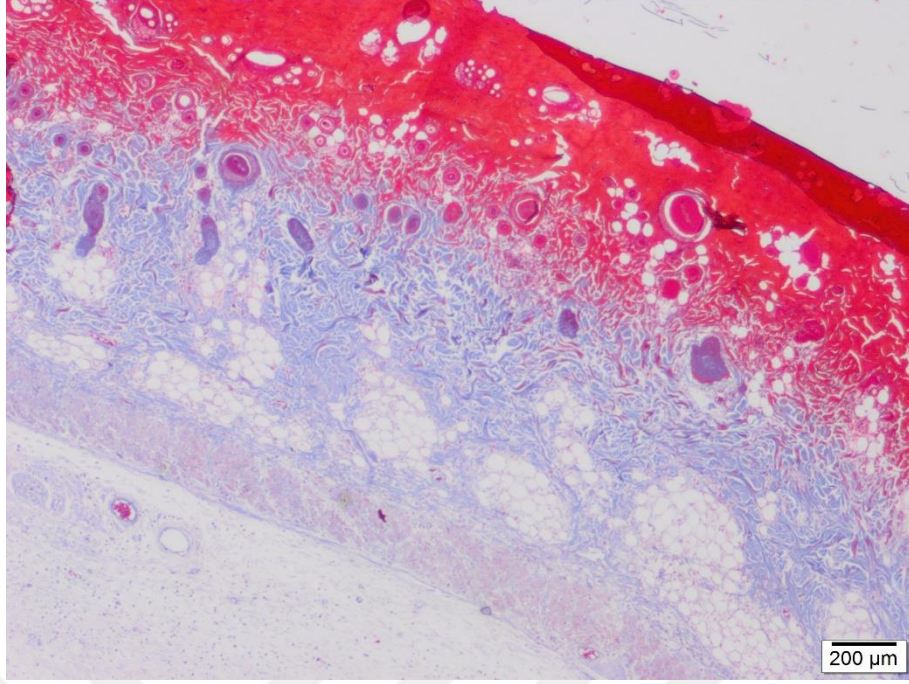


Şekil 32. Flep grubu MT Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları

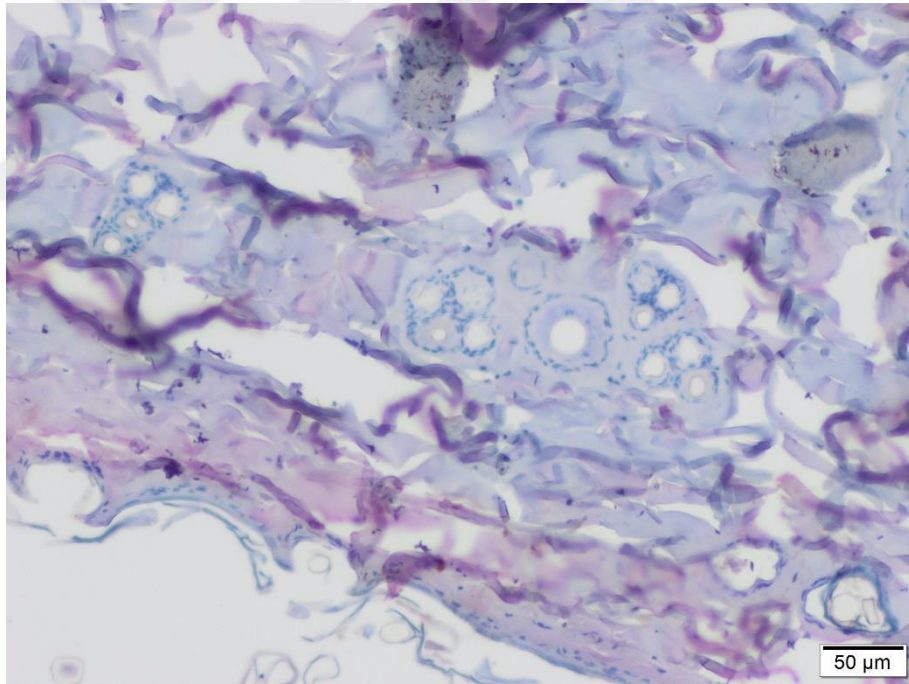


Şekil 33. Flep grubu MT Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları

Küçük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları gözlemlendi. Küçük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları gözlemlendi. HE boyama ile makrofajlar, nötrofiller, lenfositler, plazma hücreleri, yabancı cisim reaksiyonu, çok çekirdekli dev hücreler ve fibroblastlar gibi yara iyileşmesi veya inflamatuvar süreçlerde rol oynayan farklı hücreler izlendi (şekil 34-35).

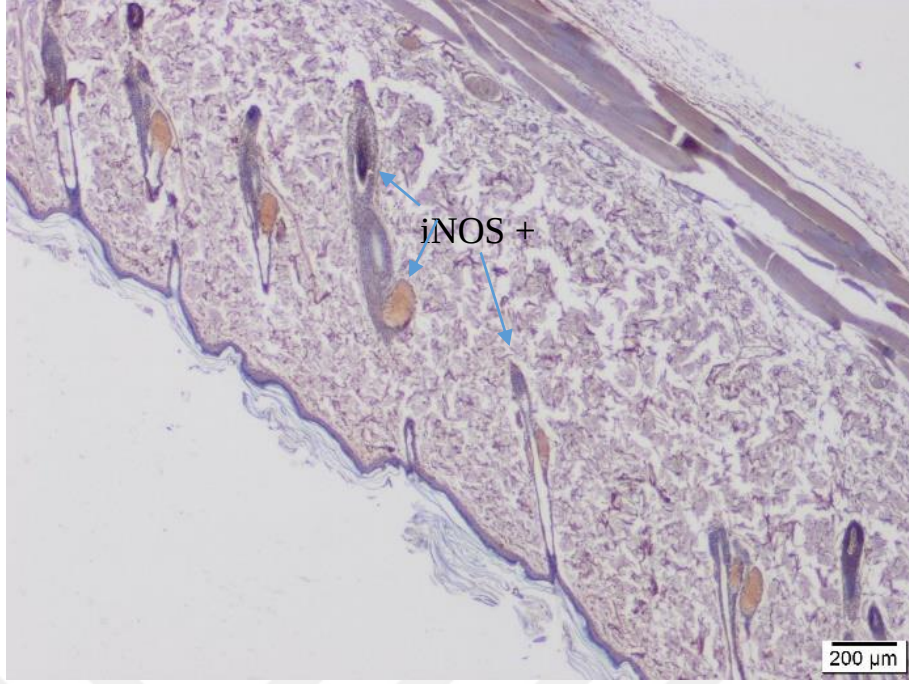


Şekil 34. Flep grubu MT Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulgular

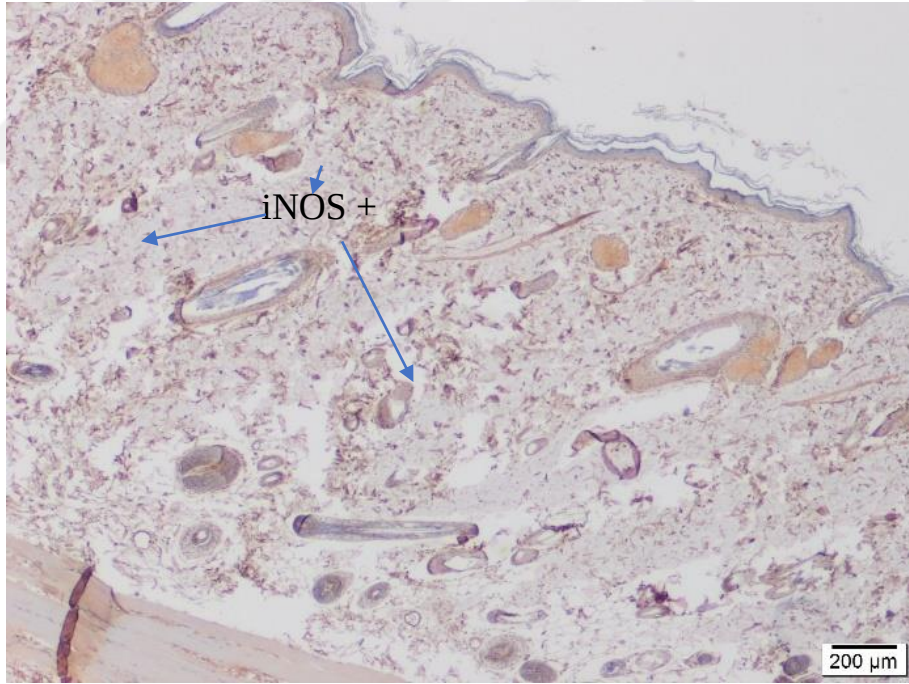


Şekil 35. Flep grubu MT Büyük büyütmede yaraya bağlı histopatolojik bulguları

Kontrol grubunda (KR) iNOS İHK ile işaretletmesi yağ bezlerinde, kıl foliküllerinde ve epidermiste pozitif immün reaksiyon olarak saptandı (şekil 36-37).

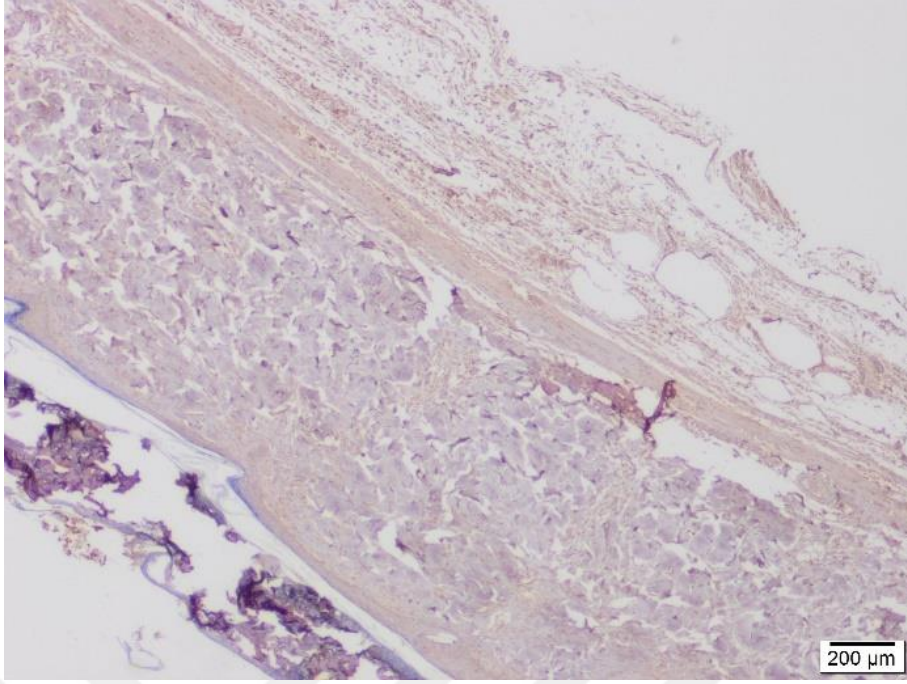


Şekil 36. Kontrol iNOS küçük büyütmede normal deride pozitif işaretlemesi

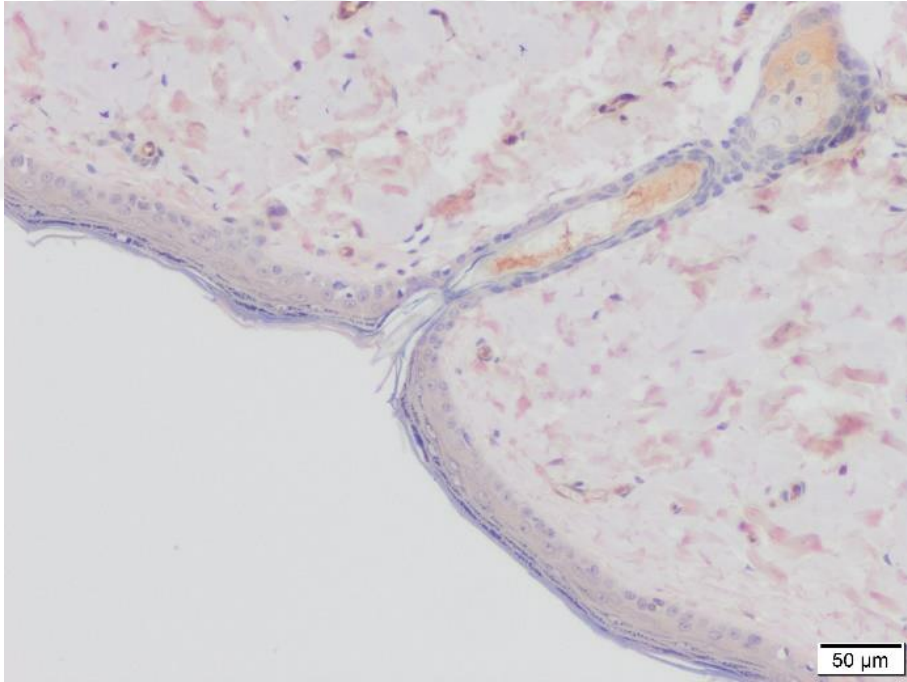


Şekil 37. Kontrol iNOS büyük büyütmede normal deride pozitif işaretlemesi

Flep örneklerinde **iNOS** İHK ile işaretlemesi az miktarda bulunan yağ bezlerinde, kıl foliküllerinde ve epidermiste pozitif immün reaksiyon olarak saptandı (şekil 38-39).

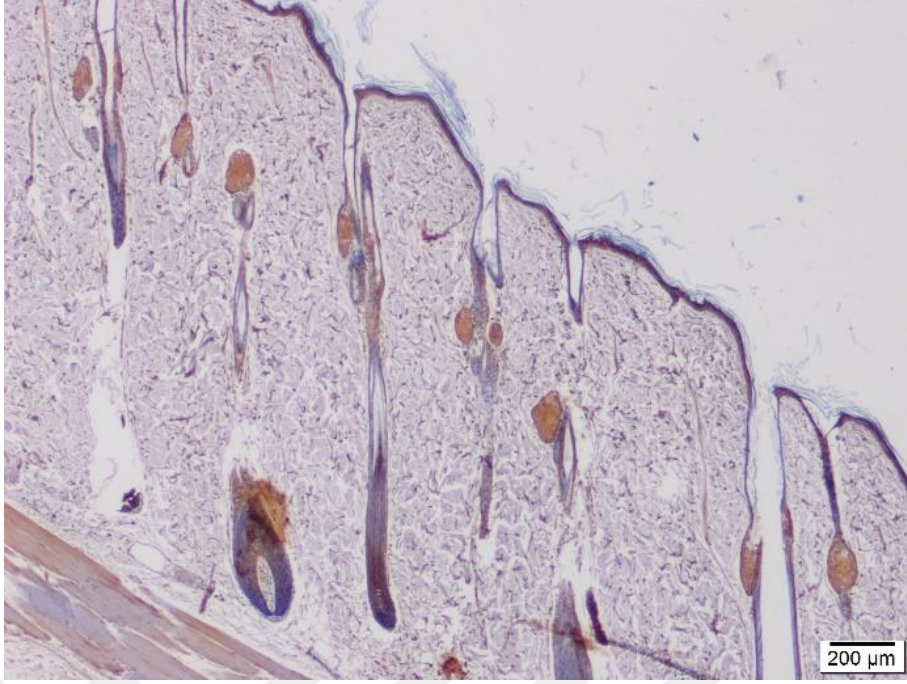


Şekil 38. Flep grubu iNOS küçük büyütmede yaralı deride pozitif işaretlemesi

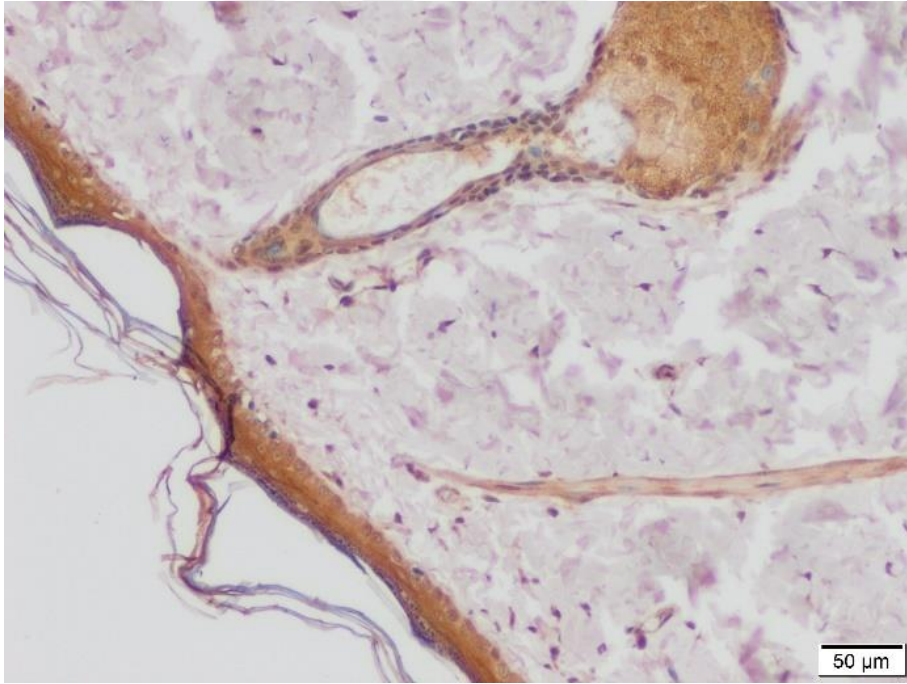


Şekil 39. Flep grubu iNOS büyük büyütmede yaralı deride pozitif işaretlemesi

Flep örneklerinde **eNOS** İHK ile işaretletmesi yağ bezlerinde, kıl foliküllerinde ve epidermiste pozitif immün reaksiyon olarak saptandı (şekil 40-41).

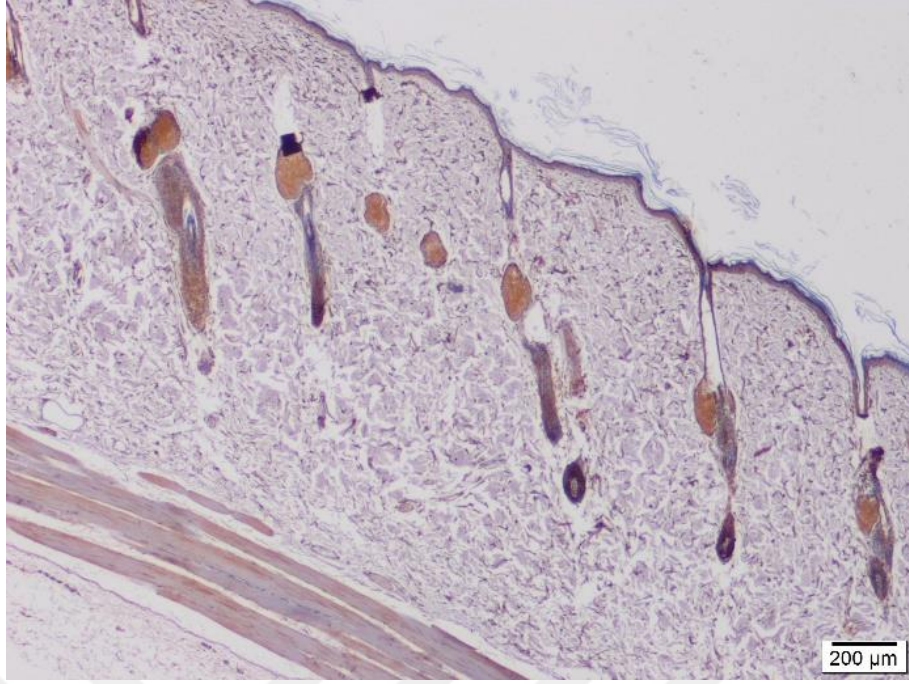


Şekil 40. Flep grubu eNOS küçük büyütmede **hasara** bağlı deride oluşan histopatolojik değişiklikler.

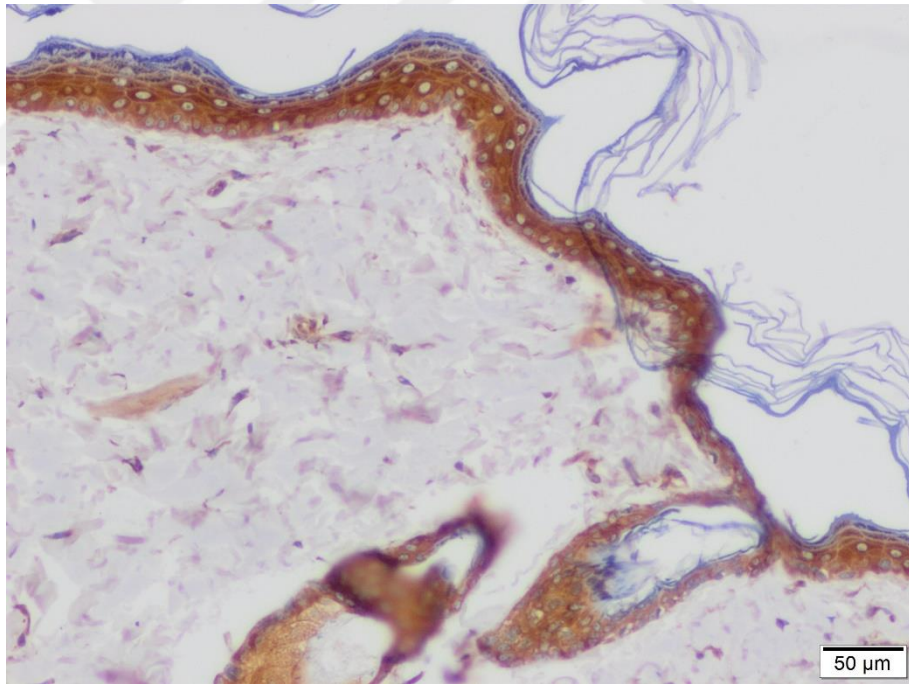


Şekil 41. Flep grubu eNOS büyük büyütmede hasara bağlı deride oluşan histopatolojik değişiklikler.

Kontrol örneklerinde **VEGF** İHK ile işaretletmesi epidermiste, yağ bezlerinde, kıl foliküllerinde ve epidermiste pozitif immün reaksiyon olarak saptandı (şekil 42-43).

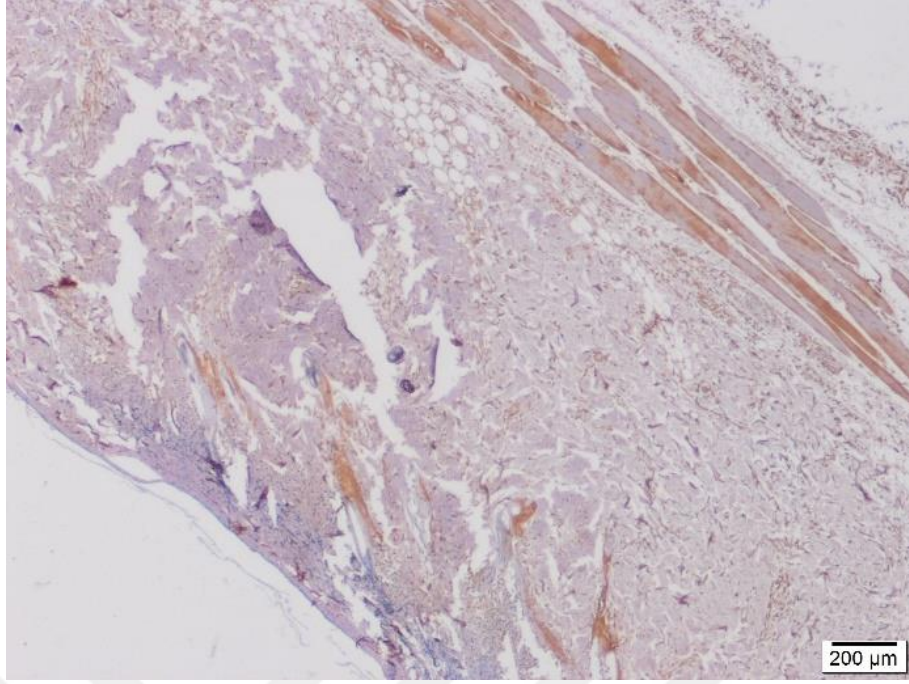


Şekil 42. Kontrol VEGF küçük büyütmede normal deri histolojisi.

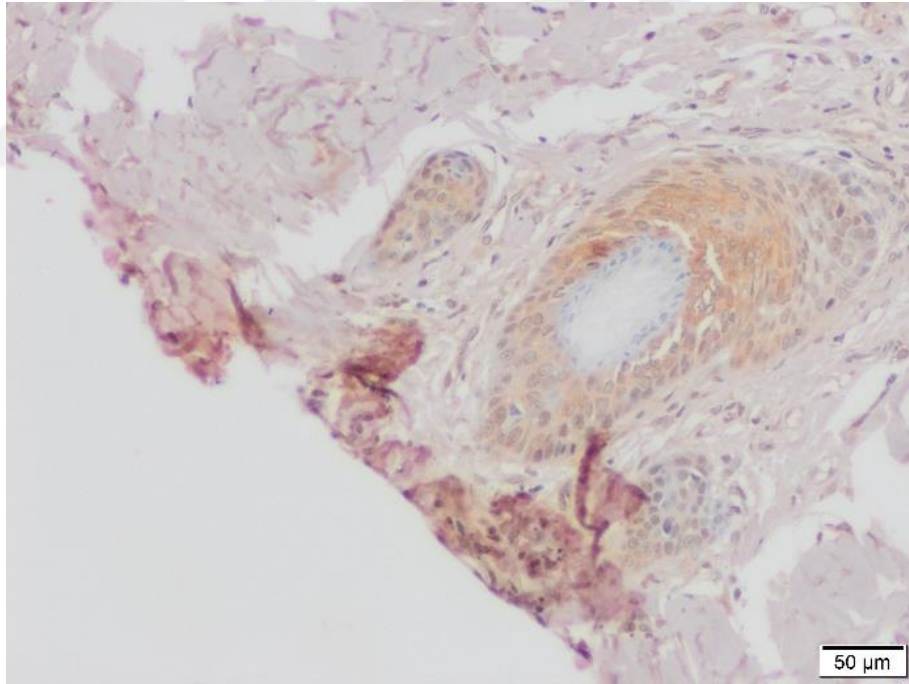


Şekil 43. Kontrol VEGF büyük büyütmede normal deri histolojisi

Flep örneklerinde **VEGF** İHK ile işaretletmesi epidermiste, yağ bezlerinde, kıl foliküllerinde ve epidermiste pozitif immün reaksiyon olarak saptandı (şekil 44-45).



Şekil 44. Flep grubu VEGF küçük büyütmede hasara bağlı deride oluşan histopatolojik değişiklikler.

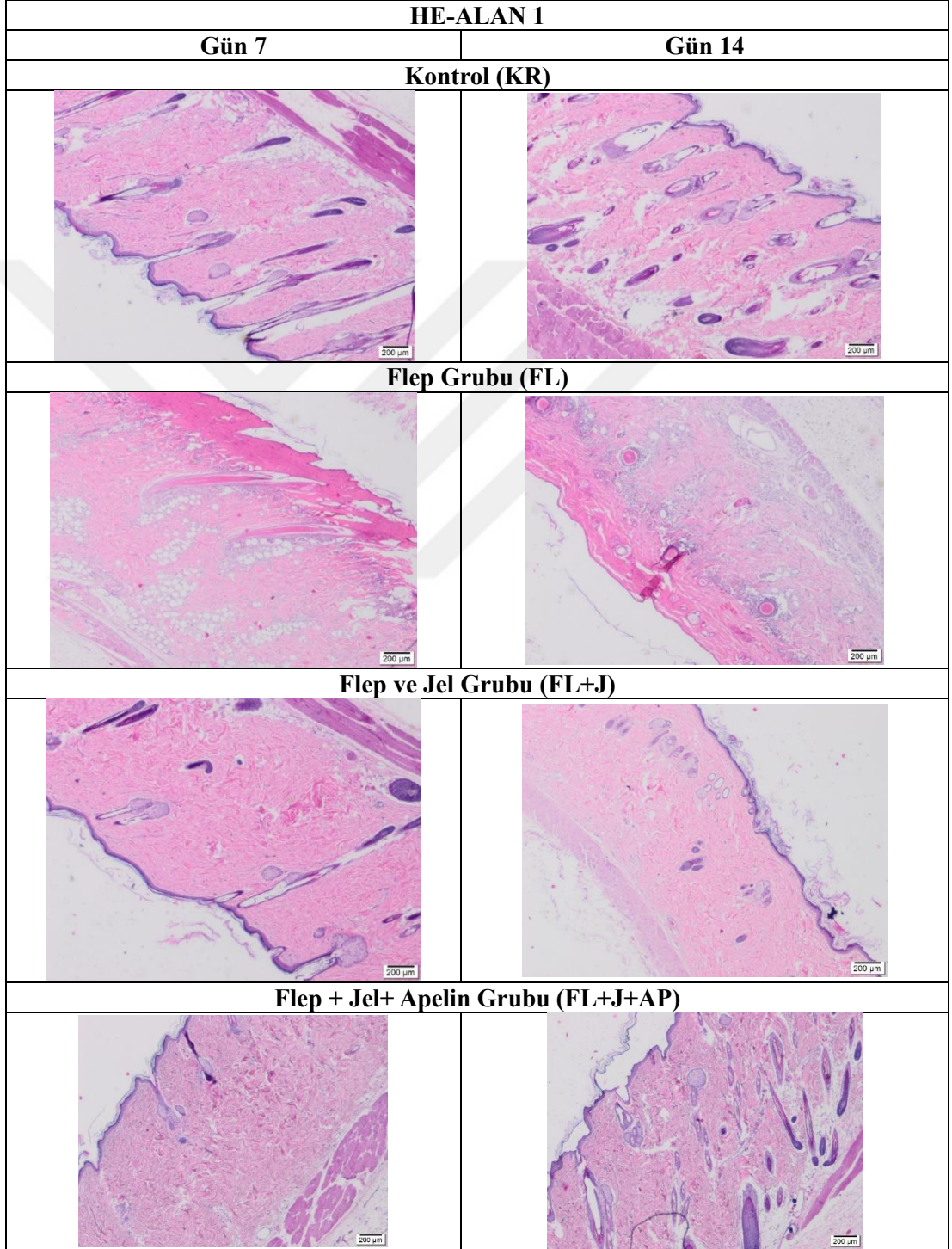


Şekil 45. Flep grubu VEGF büyük büyütmede **hasara** bağlı deride oluşan histopatolojik değişiklikler

4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

HE boyamalarda, flep örnekleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile epidermis ve dermis atrofik, ödemli, çok sayıda genişlemiş mikrodamarlar, fibroblastların düzensiz çoğalması ve organizasyonu ile nötrofil infiltrasyonu izlendi.

Jel uygulanan ve Jel +Apelin uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 46). Aynı zamanda, I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo3). HE boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 4).



Şekil 46. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

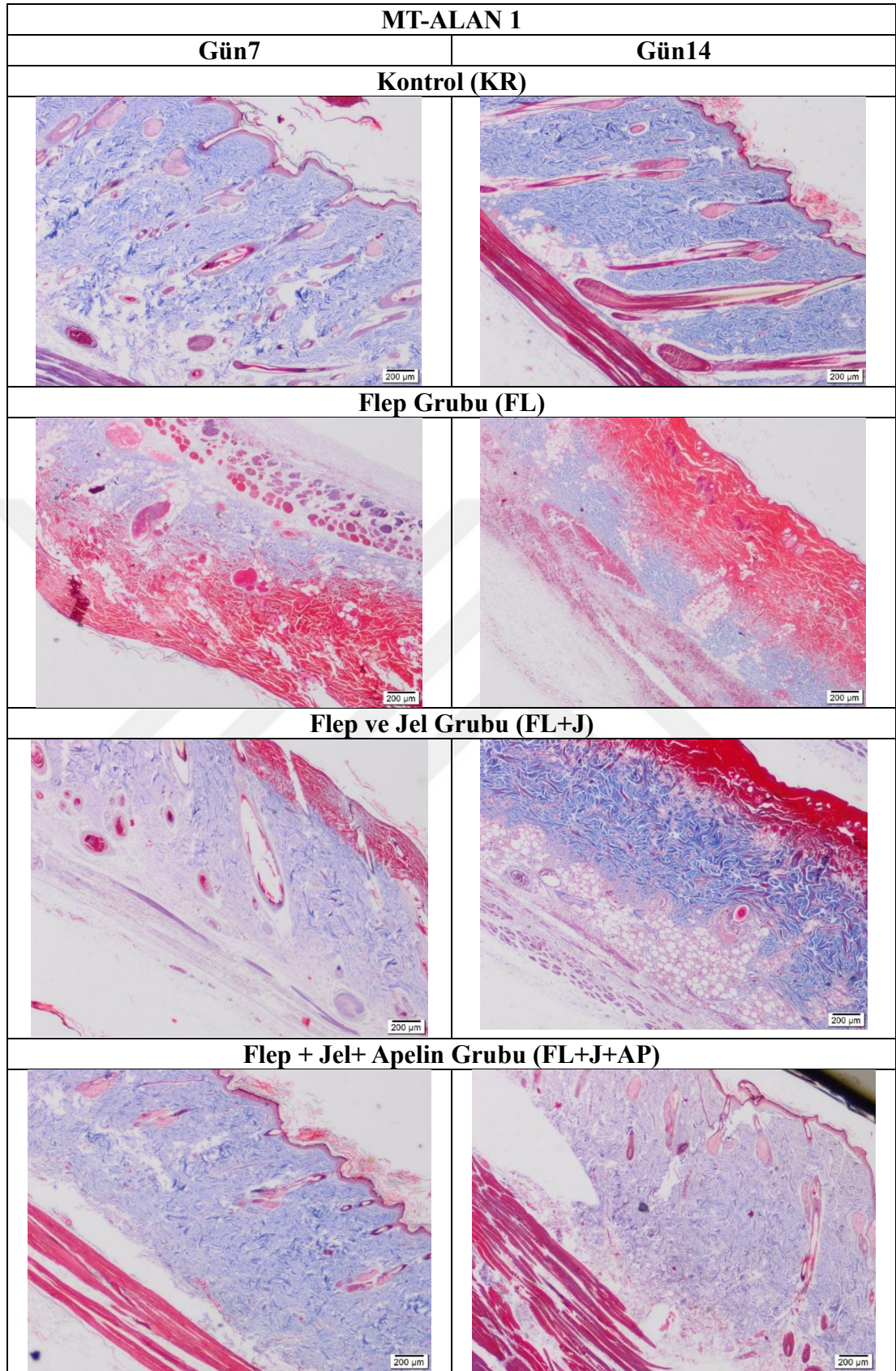
Tablo 3. 7. Gün I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
KR	2	4.480	0.4950	0.3500	4.480
FL	6	2.378	0.4126	0.1684	2.275
FL-J	6	2.360	0.3853	0.1573	2.330
FL-J-AP	6	3.287	0.5084	0.2076	3.225
Comparison		Difference		q	P value
=====					
KR vs FL		2.102		8.229 ***	P<0.001
KR vs FL-J		2.120		8.301 ***	P<0.001
KR vs FL-J-AP		1.193		4.673 *	P<0.05
FL vs FL-J		0.01833		0.1015 ns	P>0.05
FL vs FL-J-AP		-0.9083		5.030 *	P<0.05
FL-J vs FL-J-AP		-0.9267		5.131 *	P<0.05

Tablo 4. 14. Gün, HE boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	4.450	0.6647	0.4700	4.450
FL	6	3.072	0.5330	0.2176	3.100
FL-J	6	3.383	0.3615	0.1476	3.435
FL-J-AP	6	4.223	0.3757	0.1534	4.340
Comparison	Difference		q	P value	
=====					
KR vs FL	1.378		5.321 **	P<0.01	
KR vs FL-J	1.067		4.117 *	P<0.05	
KR vs FL-J-AP	0.2267		0.8750 ns	P>0.05	
FL vs FL-J	-0.3117		1.701 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP	-1.152		6.287 **	P<0.01	
FL-J vs FL-J-AP	-0.8400		4.586 *	P<0.05	

MT boyamalarda FL örnekleri Kontrol ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile epidermis ve dermis atrofik, ödemli, çok sayıda genişlemiş mikrodamarlar, fibroblastların düzensiz çoğalması ve organizasyonu ile nötrofil infiltrasyonu izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 47). MT boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı. MT boyamalarda I/R hasarında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı.



Şekil 47. MT boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

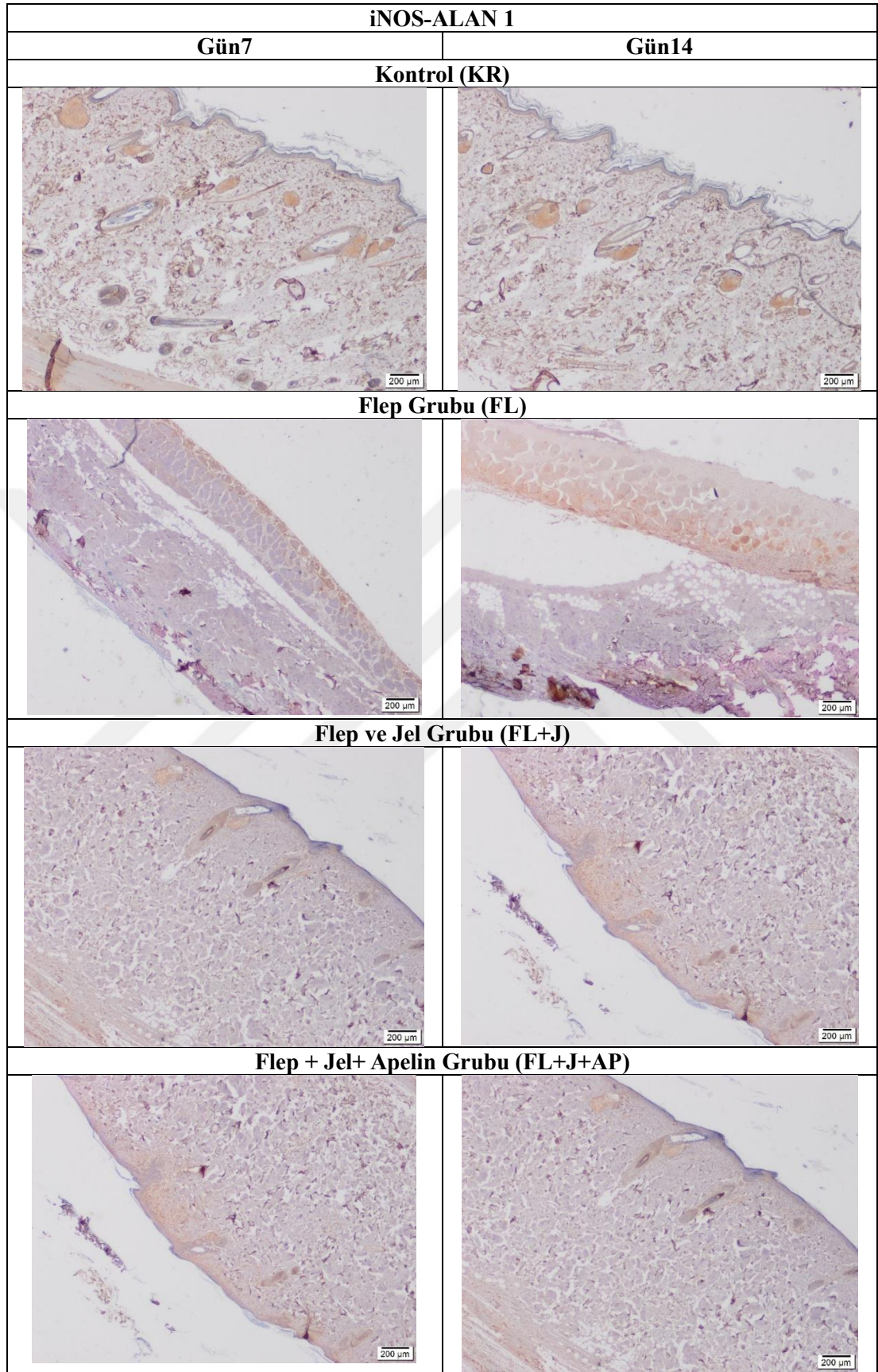
Tablo 5. 7. Gün MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	4.365	0.5728	0.4050	4.365
FL	6	2.380	0.4987	0.2036	2.445
FL-J	6	2.382	0.8291	0.3385	2.560
FL-J-AP	6	3.640	0.7321	0.2989	3.665
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		1.985	4.960 *	P<0.05	
KR vs FL-J		1.983	4.956 *	P<0.05	
KR vs FL-J-AP		0.7250	1.811 ns	P>0.05	
FL vs FL-J		-0.001667	0.005889 n	P>0.05	
FL vs FL-J-AP		-1.260	4.452 *	P<0.05	
FL-J vs FL-J-AP		-1.258	4.446 *	P<0.05	

Tablo 6. 14. Gün MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	4.435	0.5445	0.3850	4.435
FL	6	3.157	0.6098	0.2490	3.105
FL-J	6	3.213	0.4511	0.1842	3.250
FL-J-AP	6	4.070	0.3276	0.1337	4.000
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		1.278	4.598 *	P<0.05	
KR vs FL-J		1.222	4.394 *	P<0.05	
KR vs FL-J-AP		0.3650	1.313 ns	P>0.05	
FL vs FL-J		-0.05667	0.2883 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP		-0.9133	4.646 *	P<0.05	
FL-J vs FL-J-AP		-0.8567	4.358 *	P<0.05	

iNOS İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (Şekil 48). iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için anlamlı (P<0.05) olarak saptandı (tablo 7). iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı (P<0.05) olarak saptandı (tablo 8).



Şekil 48. iNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

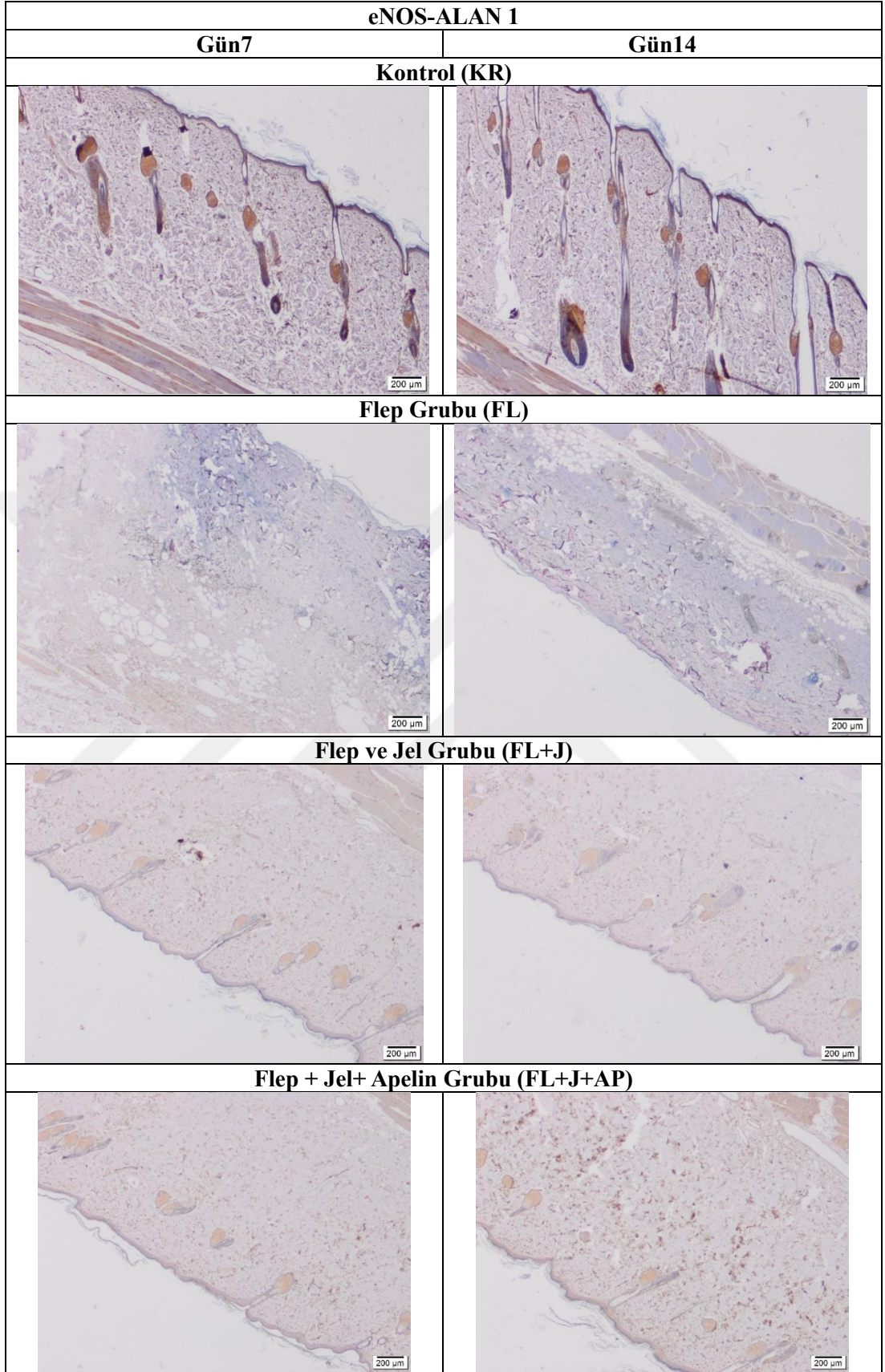
Tablo 7. 7. Gün iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
KR	2	125.72	28.362	20.055	125.72
FL	6	175.04	25.312	10.334	179.66
FL-J	6	132.13	22.213	9.068	129.12
FL-J-AP	6	127.16	28.887	11.793	123.95
Comparison	Difference		q	P value	
KR vs FL	-49.323		3.312 ns	P >0.05	
KR vs FL-J	-6.410		0.4304 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP	-1.447		0.09713 ns	P>0.05	
FL vs FL-J	42.913		4.075 *	P<0.05	
FL vs FL-J-AP	47.877		4.546 *	P<0.05	
FL-J vs FL-J-AP	4.963		0.4713 ns	P>0.05	

Tablo 8. 14. Gün iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	111.78	23.893	16.895	111.78
FL	6	174.78	19.463	7.946	176.27
FL-J	6	129.07	33.437	13.650	136.45
FL-J-AP	6	108.55	27.003	11.024	107.55
Comparison	Difference		q	P value	
KR vs FL	-63.000		4.035 ns	P>0.05	
KR vs FL-J	-17.298		1.108 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP	3.230		0.2069 ns	P>0.05	
FL vs FL-J	45.702		4.140 *	P<0.05	
FL vs FL-J-AP	66.230		5.999 **	P<0.01	
FL-J vs FL-J-AP	20.528		1.859 ns	P>0.05	

eNOS İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 47). 7. ve 14. gün eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri tablo 9,10 da verilmiştir.



Şekil 49. eNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

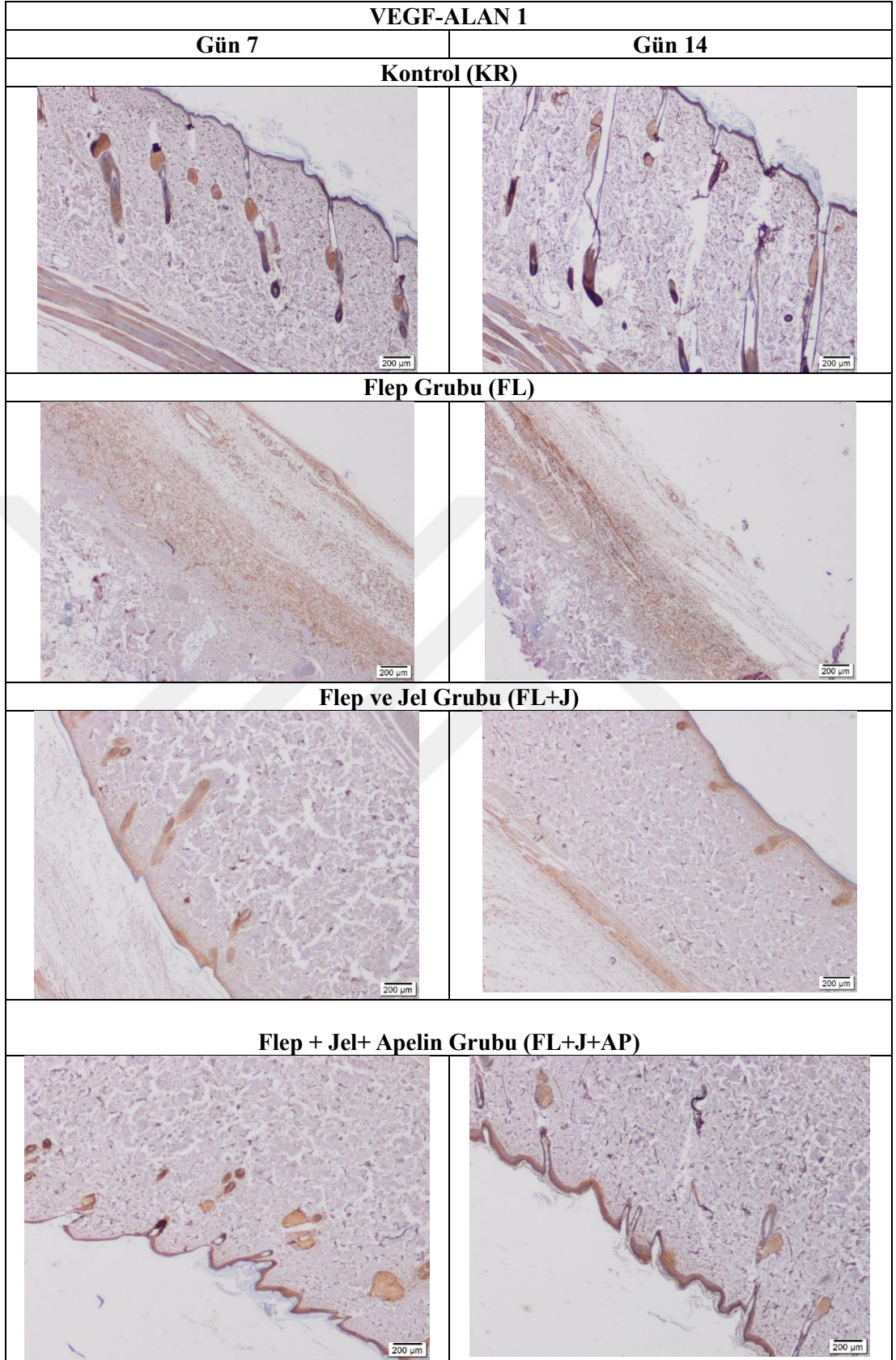
Tablo 9. 7. Gün eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	156.75	31.240	22.090	156.75
FL	6	153.05	22.488	9.181	153.78
FL-J	6	107.37	26.380	10.770	102.78
FL-J-AP	6	86.598	19.274	7.869	81.870
Comparison	Difference		q	P value	
KR vs FL	3.697		0.2724	ns	P>0.05
KR vs FL-J	49.382		3.639	ns	P>0.05
KR vs FL-J-AP	70.152		5.169	*	P<0.05
FL vs FL-J	45.685		4.760	*	P<0.05
FL vs FL-J-AP	66.455		6.925	***	P<0.001
FL-J vs FL-J-AP	20.770		2.164	ns	P>0.05

Tablo 10. 14. Gün eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
FL	6	117.81	20.275	8.277	117.28
FL-J	6	87.065	20.804	8.493	82.875
FL-J-AP	6	78.847	16.208	6.617	81.210
Comparison	Difference		q	P value	
KR vs FL	30.077		2.050	ns	P>0.05
KR vs FL-J	60.825		4.145	*	P<0.05
KR vs FL-J-AP	69.043		4.705	*	P<0.05
FL vs FL-J	30.748		2.963	ns	P>0.05
FL vs FL-J-AP	38.967		3.756	ns	P>0.05
FL-J vs FL-J-AP	8.218		0.7921	ns	P>0.05

VEGF İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile damarlanmanın azaldığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 50). 7 ve 14. günler VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri tablo 11,12 verilmiştir.



Şekil 50. VEGF İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

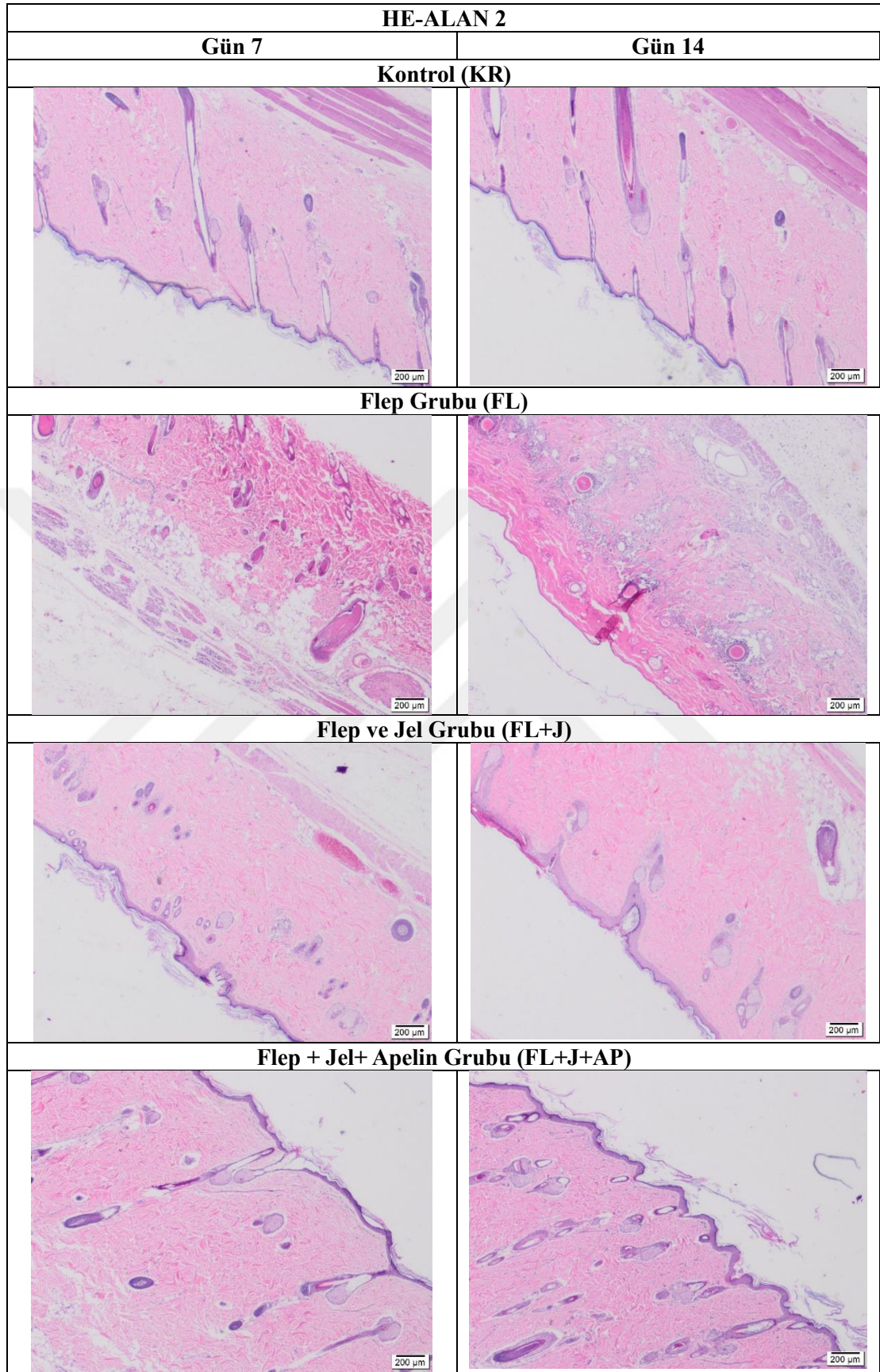
Tablo 11. 7. Gün VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	206.59	25.032	17.700	206.59
FL	6	125.71	15.299	6.246	129.06
FL-J	6	161.28	11.749	4.797	161.28
FL-J-AP	6	203.37	25.650	10.472	196.10
Comparison	Difference		q	P value	
KR vs FL	80.878		7.372 ***	P<0.001	
KR vs FL-J	45.310		4.130 *	P<0.05	
KR vs FL-J-AP	3.223		0.2938 ns	P>0.05	
FL vs FL-J	-35.568		4.585 *	P<0.05	
FL vs FL-J-AP	-77.655		10.011 ***	P<0.001	
FL-J vs FL-J-AP	- 42.087		5.425 **	P<0.01	

Tablo 12. VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	207.66	43.515	30.770	207.66
FL	6	137.89	22.945	9.367	134.73
FL-J	6	169.92	15.621	6.377	167.56
FL-J-AP	6	216.70	28.449	11.614	210.78
Comparison	Difference		q	P value	
KR vs FL	69.770		4.885 *	P<0.05	
KR vs FL-J	37.737		2.642 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP	-9.038		0.6328 ns	P>0.05	
FL vs FL-J	-32.033		3.172 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP	-78.808		7.803 ***	P<0.001	
FL-J vs FL-J-AP	46.775		4.631 *	P<0.05	

ALAN 2 HE boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile epidermis ve dermis atrofik, ödemli, çok sayıda genişlemiş mikrodamarlar, fibroblastların düzensiz çoğalması ve organizasyonu ile nötrofil infiltrasyonu izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 51). HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo 13). HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 14).



Şekil 51. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

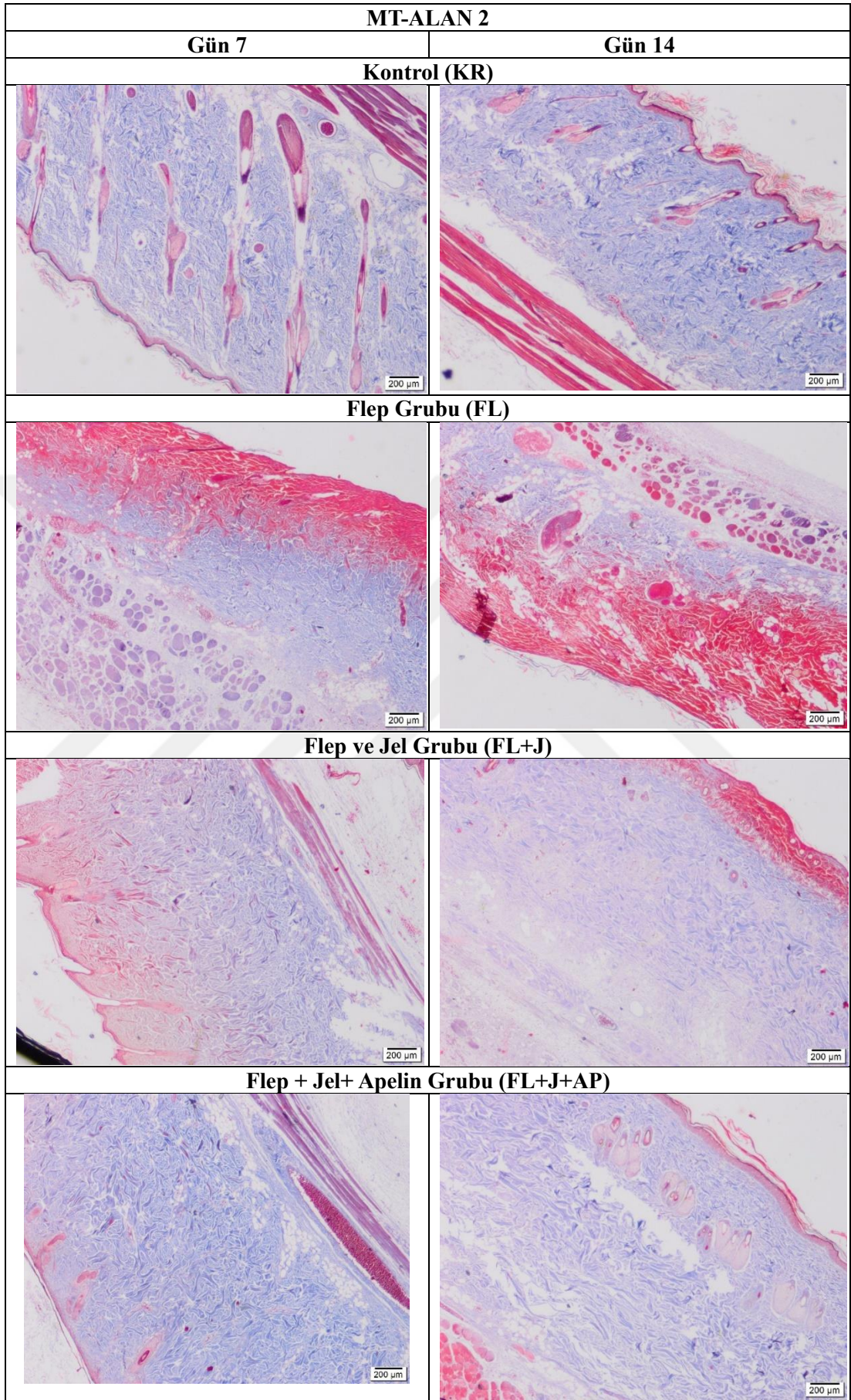
Tablo 13. 7. Gün HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	4.100	0.4525	0.3200	4.100
FL	6	2.635	0.4313	0.1761	2.675
FL-J	6	3.542	0.3137	0.1281	3.540
FL-J-AP	6	4.172	0.2447	0.09988	4.190
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		1.465	7.313	***	P<0.001
KR vs FL-J		0.5583	2.787	ns	P>0.05
KR vs FL-J-AP		-0.07167	0.3577	ns	P>0.05
FL vs FL-J		-0.9067	6.401	**	P<0.01
FL vs FL-J-AP		-1.537	10.848	***	P<0.001
FL-J vs FL-J-AP		-0.6300	4.447	*	P<0.05

Tablo 14. 14. Gün HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	4.525	0.4313	0.3050	4.525
FL	6	3.423	0.2522	0.1030	3.365
FL-J	6	3.960	0.4856	0.1983	3.870
FL-J-AP	6	4.465	0.2244	0.09161	4.420
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		1.102	5.487	**	P<0.01
KR vs FL-J		0.5650	2.814	ns	P>0.05
KR vs FL-J-AP		0.06000	0.2988	ns	P>0.05
FL vs FL-J		0.5367	3.780	ns	P>0.05
FL vs FL-J-AP		1.042	7.337	***	P<0.001
FL-J vs FL-J-AP		-0.5050	3.557	ns	P>0.05

MT boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile epidermis ve dermis atrofik, ödemli, çok sayıda genişlemiş mikrodamarlar, fibroblastların düzensiz çoğalması ve organizasyonu ile nötrofil infiltrasyonu izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 52). MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo 15). MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 16).



Şekil 52. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

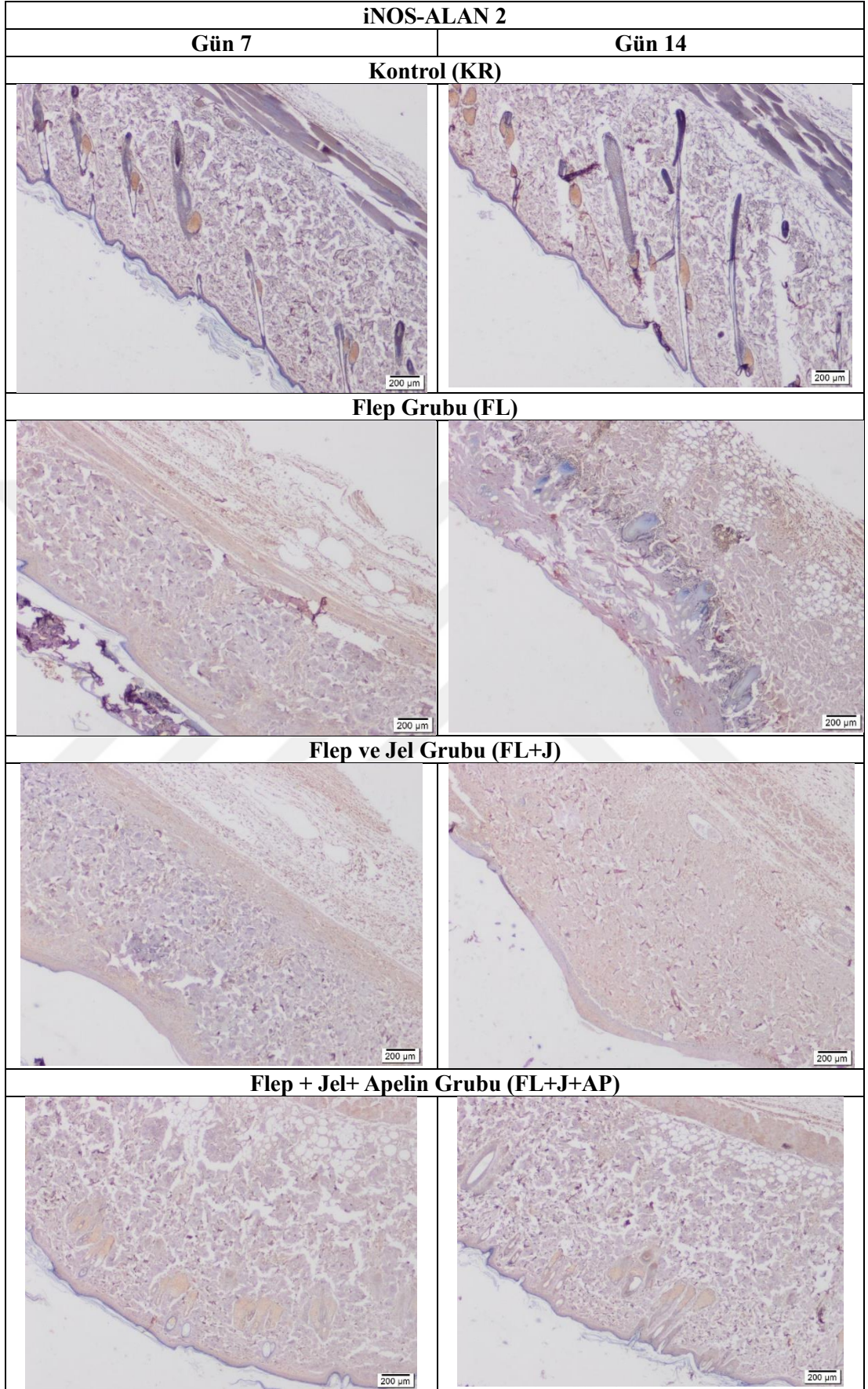
Tablo 15. 7. Gün MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	4.575	0.3465	0.2450	4.575
FL	6	2.828	0.4997	0.2040	2.860
FL-J	6	3.287	0.2656	0.1084	3.320
FL-J-AP	6	4.002	0.1814	0.07405	3.965
Comparison		Difference		q	P value
KR vs FL		1.747		8.813 ***	P<0.001
KR vs FL-J		1.288		6.500 **	P<0.01
KR vs FL-J-AP		0.5733		2.893 ns	P>0.05
FL vs FL-J		-0.4583		3.270 ns	P>0.05
FL vs FL-J-AP		-1.173		8.372 ***	P<0.001
FL-J vs FL-J-AP		-0.7150		5.102 *	P<0.05

Tablo 16. 14. Gün MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	4.110	0.3111	0.2200	4.110
FL	6	2.528	0.3356	0.1370	2.590
FL-J	6	2.933	0.2649	0.1081	2.920
FL-J-AP	6	3.730	0.3167	0.1293	3.830
Comparison		Difference		q	P value
KR vs FL		1.582		8.911 ***	P<0.001
KR vs FL-J		1.177		6.629 **	P<0.01
KR vs FL-J-AP		0.3800		2.141 ns	P>0.05
FL vs FL-J		-0.4050		3.227 ns	P>0.05
FL vs FL-J-AP		-1.202		9.574 ***	P<0.001
FL-J vs FL-J-AP		-0.7967		6.348 **	P<0.01

iNOS İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 53). iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo 17). iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 18).



Şekil 53. iNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

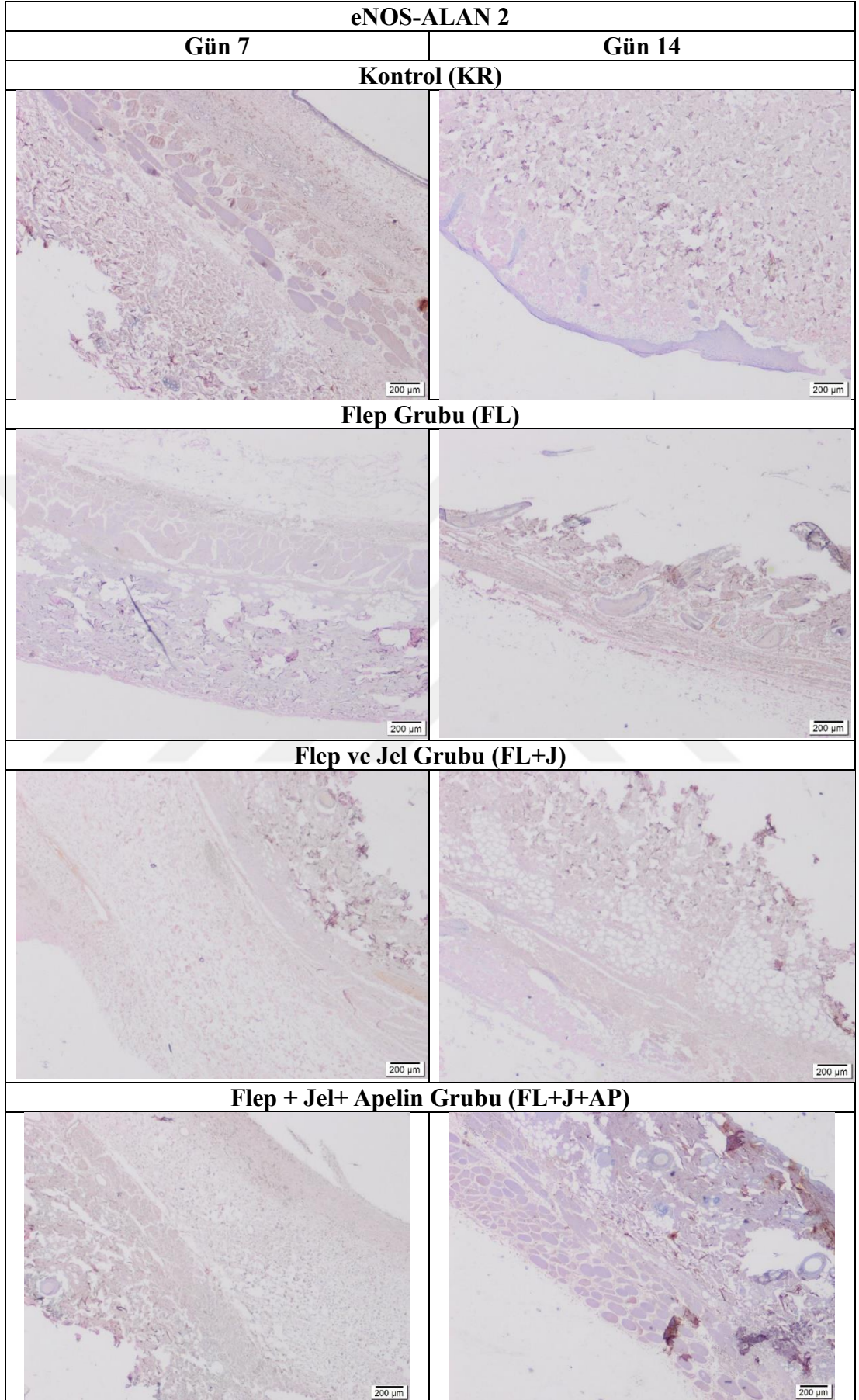
Tablo 17. 7. Gün iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	225.45	27.818	19.670	225.45
FL	6	135.03	28.099	11.471	136.58
FL-J	6	125.05	30.719	12.541	125.16
FL-J-AP	6	154.32	31.728	12.953	147.45
Comparison	Difference	q	P value		
KR vs FL	90.420	5.207 **	P<0.01		
KR vs FL-J	100.40	5.782 **	P<0.01		
KR vs FL-J-AP	71.128	4.096 *	P<0.05		
FL vs FL-J	9.980	0.8128 ns	P>0.05		
FL vs FL-J-AP	-19.292	1.571 ns	P>0.05		
FL-J vs FL-J-AP	-29.272	2.384 ns	P>0.05		

Tablo 18. 14. Gün iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	244.20	31.367	22.180	244.20
FL	6	145.91	22.123	9.032	150.83
FL-J	6	128.53	22.495	9.184	126.55
FL-J-AP	6	176.44	25.599	10.451	182.09
Comparison	Difference	q	P value		
KR vs FL	98.292	7.085 ***	P<0.001		
KR vs FL-J	115.67	8.338 ***	P<0.001		
KR vs FL-J-AP	67.765	4.885 *	P<0.05		
FL vs FL-J	17.380	1.772 ns	P>0.05		
FL vs FL-J-AP	-30.527	3.112 ns	P>0.05		
FL-J vs FL-J-AP	-47.907	4.884 *	P<0.05		

eNOS İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi. eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı (P<0.001) olarak saptandı (tablo 19). eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı (P<0.05) olarak saptandı (tablo 20).



Şekil 54. eNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri

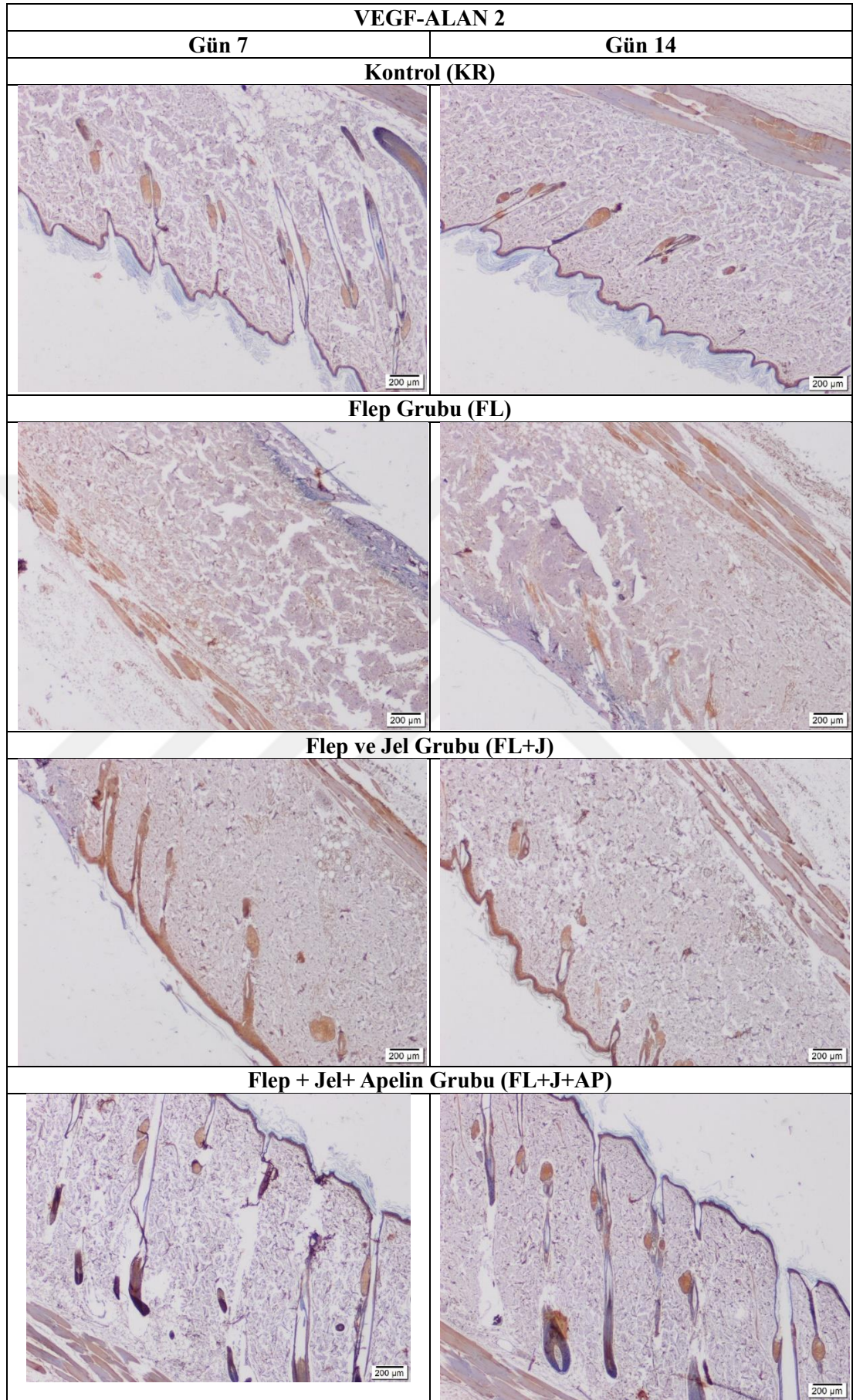
Tablo 19. 7. Gün eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	225.45	27.818	19.670	225.45
FL	6	135.03	28.099	11.471	136.58
FL-J	6	125.05	30.719	12.541	125.16
FL-J-AP	6	154.32	31.728	12.953	147.45
Comparison		Difference	q	P value	
=====					
KR vs FL		90.420	5.207	**	P<0.01
KR vs FL-J		100.40	5.782	**	P<0.01
KR vs FL-J-AP		71.128	4.096	*	P<0.05
FL vs FL-J		9.980	0.8128	ns	P>0.05
FL vs FL-J-AP		-19.292	1.571	ns	P>0.05
FL-J vs FL-J-AP		-29.272	2.384	ns	P>0.05

Tablo 20. 14. Gün eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	244.20	31.367	22.180	244.20
FL	6	145.91	22.123	9.032	150.83
FL-J	6	128.53	22.495	9.184	126.55
FL-J-AP	6	176.44	25.599	10.451	182.09
Comparison	Difference		q	P value	
KR vs FL	98.292	7.085	***	P<0.001	
KR vs FL-J	115.67	8.338	***	P<0.001	
KR vs FL-J-AP	67.765	4.885	*	P<0.05	
FL vs FL-J	17.380	1.772	ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP	-30.527	3.112	ns	P>0.05	
FL-J vs FL-J-AP	-47.907	4.884	*	P<0.05	

VEGF İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 56). VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo21). VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 22).



Şekil 55. VEGF İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

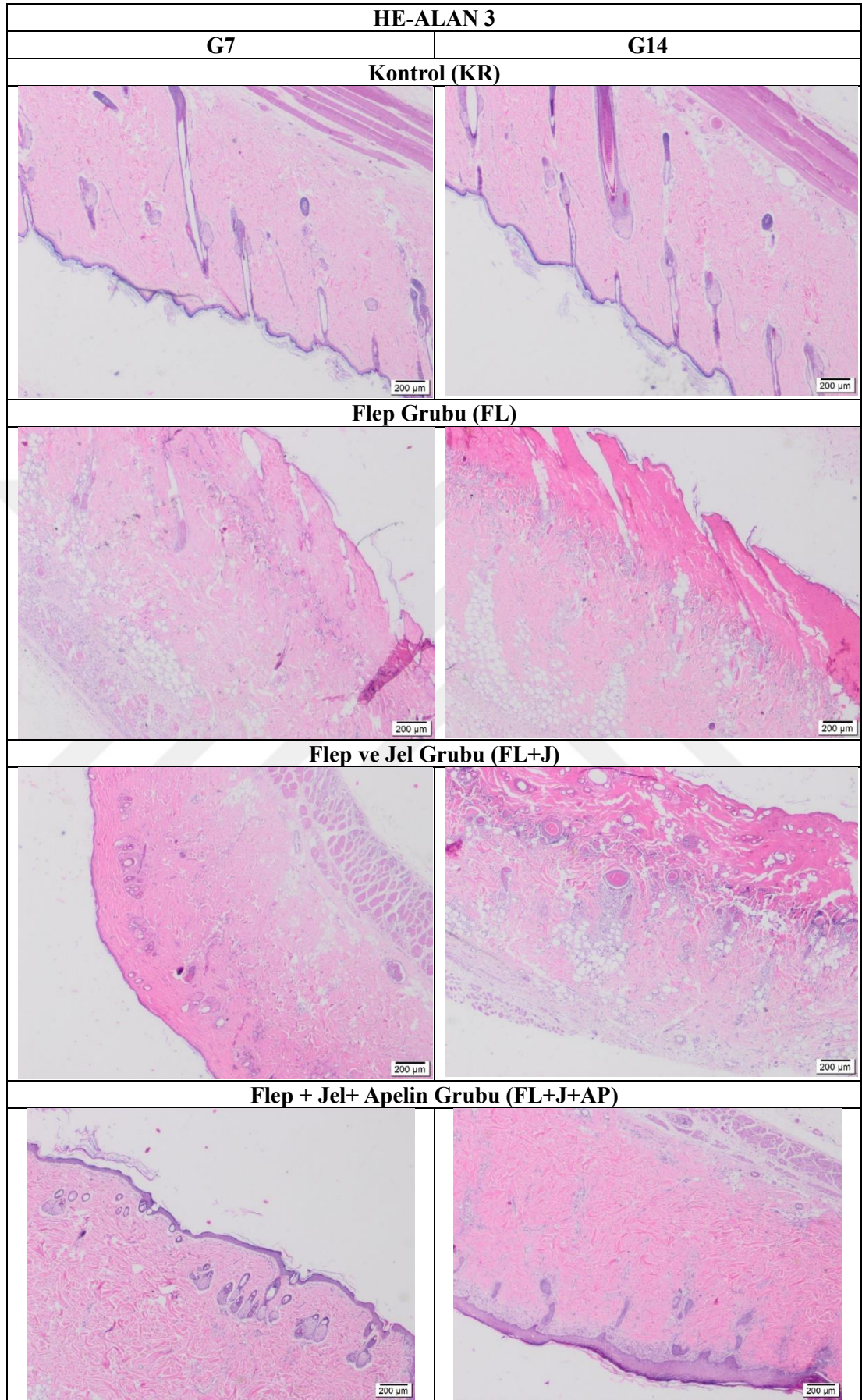
Tablo 21. 7. Gün VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	221.38	50.346	35.600	221.38
FL	6	142.26	21.111	8.619	142.27
FL-J	6	183.76	20.301	8.288	183.40
FL-J-AP	6	237.79	31.819	12.990	234.28
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		79.122	5.028 *	P<0.05	
KR vs FL-J		37.622	2.391 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP		-16.412	1.043 ns	P>0.05	
FL vs FL-J		-41.500	3.730 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP		-95.533	8.586 ***	P<0.001	
FL-J vs FL-J-AP		-54.033	4.856 *	P<0.05	

Tablo 22. VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	242.11	51.682	36.545	242.11
FL	6	148.04	29.137	11.895	142.27
FL-J	6	188.17	26.109	10.659	183.40
FL-J-AP	6	245.26	27.203	11.106	241.62
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		94.068	5.503 **	P<0.01	
KR vs FL-J		53.940	3.156 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP		-3.153	0.1845 ns	P>0.05	
FL vs FL-J		-40.128	3.320 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP		-97.222	8.044 ***	P<0.001	
FL-J vs FL-J-AP		-57.093	4.724 *	P<0.05	

ALAN 3 HE boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile epidermis ve dermis atrofik, ödemli, çok sayıda genişlemiş mikrodamarlar, fibroblastların düzensiz çoğalması ve organizasyonu ile nötrofil infiltrasyonu izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 57). HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo 23). HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 24).



Şekil 56. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

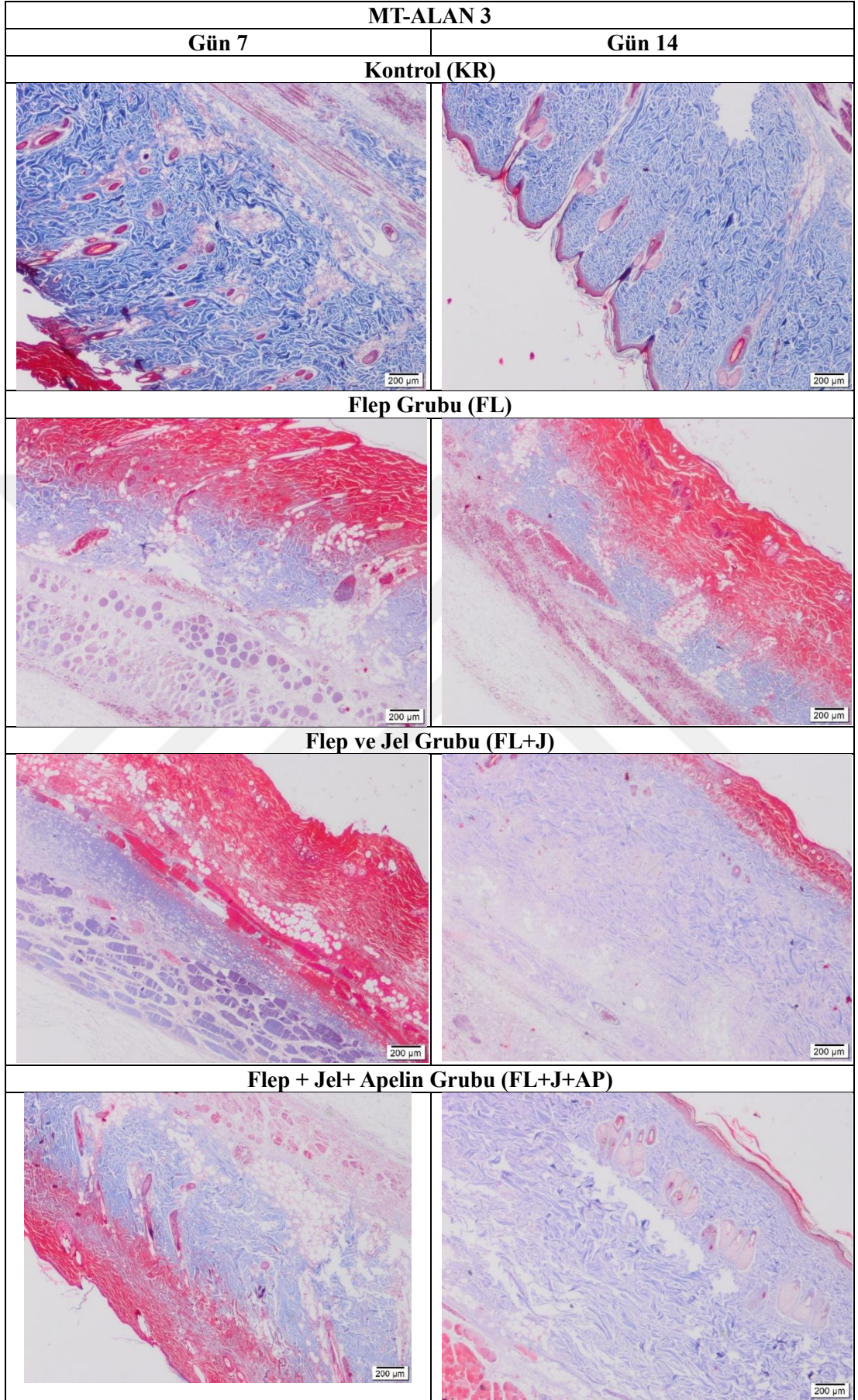
Tablo 23. 7. Gün HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	4.500	0.3818	0.2700	4.500
FL	6	3.301	0.3718	0.1518	3.277
FL-J	6	3.562	0.4218	0.1722	3.660
FL-J-AP	6	4.273	0.3040	0.1241	4.280
Comparison		Difference		q	P value
KR vs FL		1.199	5.617	**	P<0.01
KR vs FL-J		0.9383	4.394	*	P<0.05
KR vs FL-J-AP		0.2267	1.062	ns	P>0.05
FL vs FL-J		-0.2611	1.729	ns	P>0.05
FL vs FL-J-AP		-0.9728	6.443	**	P<0.01
FL-J vs FL-J-AP		-0.7117	4.713	*	P<0.05

Tablo 24. 14. Gün HE boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====					
KR	2	4.465	0.5020	0.3550	4.465
FL	6	3.482	0.3620	0.1478	3.507
FL-J	6	3.752	0.3720	0.1519	3.820
FL-J-AP	6	4.407	0.2932	0.1197	4.475
Comparison		Difference		q	P value
KR vs FL		0.9828	4.780	*	P<0.05
KR vs FL-J		0.7133	3.469	ns	P>0.05
KR vs FL-J-AP		0.05833	0.2837	ns	P>0.05
FL vs FL-J		-0.2694	1.853	ns	P>0.05
FL vs FL-J-AP		-0.9244	6.358	**	P<0.01
FL-J vs FL-J-AP		-0.6550	4.505	*	P<0.05

MT boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile epidermis ve dermis atrofik, ödemli, çok sayıda genişlemiş mikrodamarlar, fibroblastların düzensiz çoğalması ve organizasyonu ile nötrofil infiltrasyonu izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 58). MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo 25). MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 26).



Şekil 57. HE boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

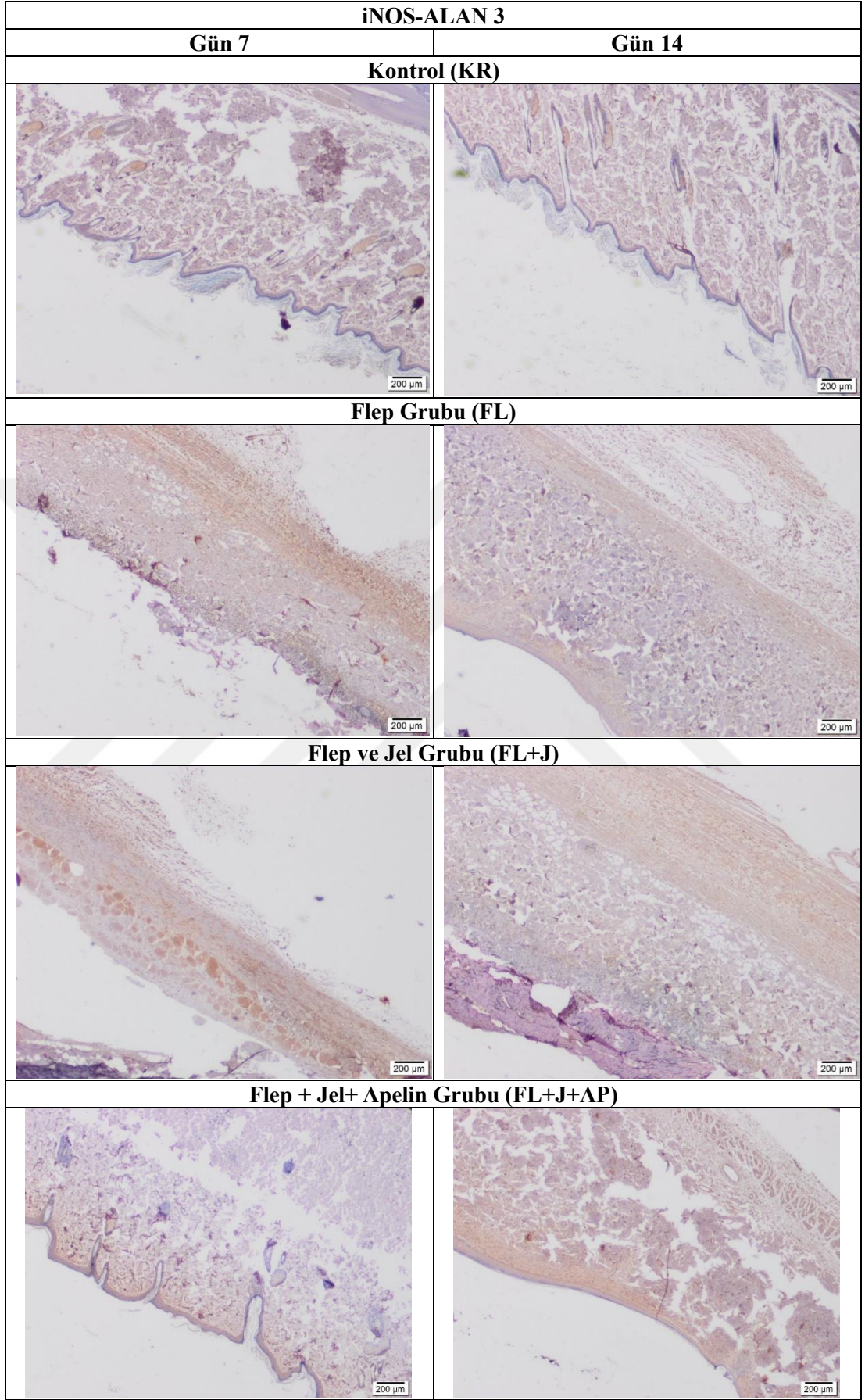
Tablo 25. 7. Gün MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	4.230	0.2970	0.2100	4.230
FL	6	3.139	0.3371	0.1376	3.095
FL-J	6	3.430	0.3513	0.1434	3.385
FL-J-AP	6	3.822	0.4401	0.1797	3.825
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		1.091	5.049 *	P<0.05	
KR vs FL-J		0.8000	3.702 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP		0.4083	1.889 ns	P>0.05	
FL vs FL-J		-0.2911	1.905 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP		-0.6828	4.468 *	P<0.05	
FL-J vs FL-J-AP		-0.3917	2.563 ns	P>0.05	

Tablo 26. 14. Gün MT boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	4.240	0.5940	0.4200	4.240
FL	6	3.267	0.4592	0.1875	3.215
FL-J	6	3.600	0.3123	0.1275	3.660
FL-J-AP	6	4.262	0.3220	0.1315	4.170
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		0.9733	4.341 *	P<0.05	
KR vs FL-J		0.6400	2.854 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP		-0.02167	0.09662 ns	P>0.05	
FL vs FL-J		-0.3333	2.102 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP		-0.9950	6.275 **	P<0.01	
FL-J vs FL-J-AP		-0.6617	4.173 *	P<0.05	

iNOS İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 59). iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo 27). iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 28).



Şekil 58. iNOS İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

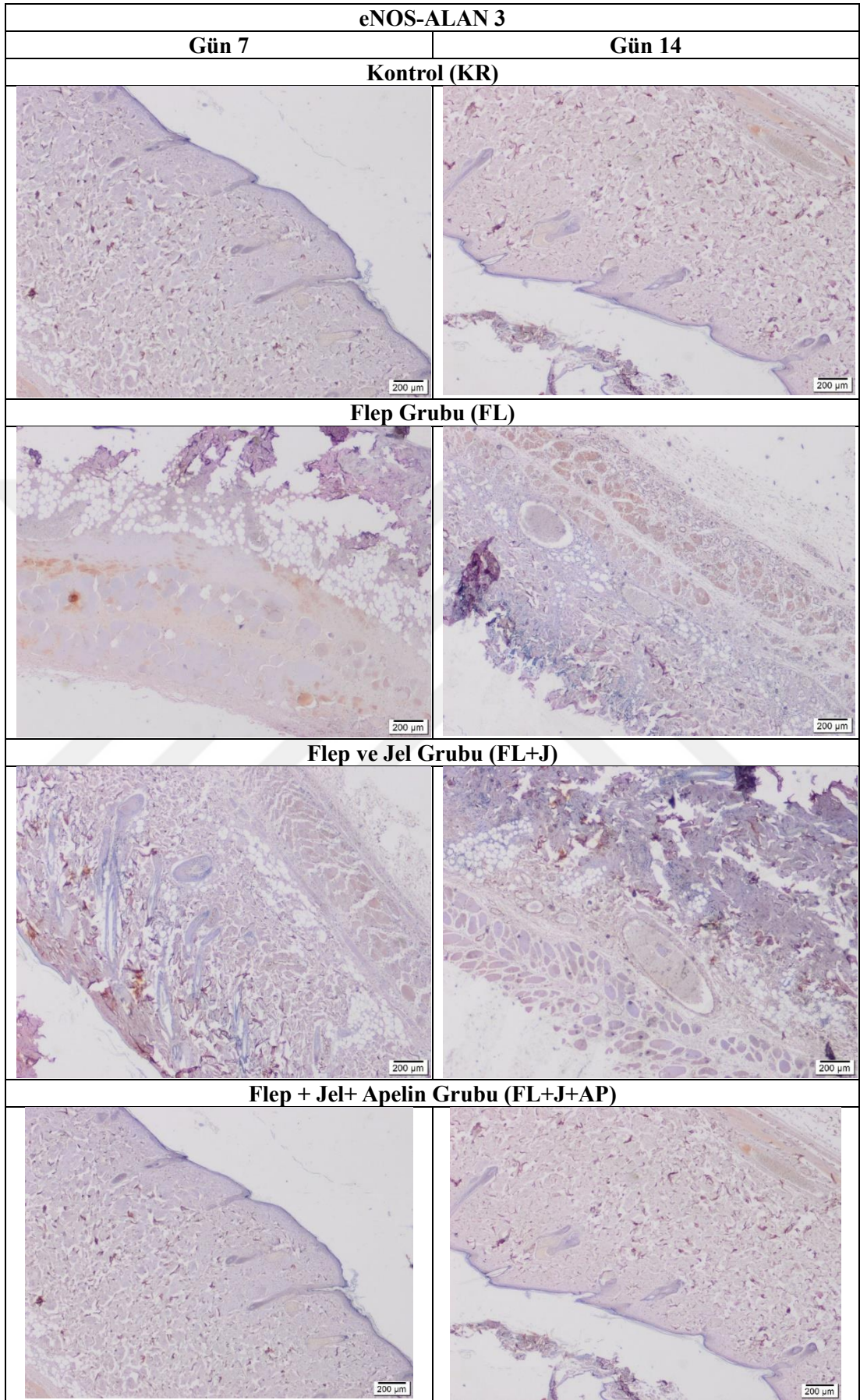
Tablo 27. iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
KR	2	163.95	26.630	18.830	163.95
FL	6	215.05	18.420	7.520	218.33
FL-J	6	193.02	16.686	6.812	190.72
FL-J-AP	6	214.84	20.806	8.494	215.90
Comparison	Difference	q	P value		
KR vs FL	-51.102	4.585 *	P<0.05		
KR vs FL-J	-29.073	2.609 ns	P>0.05		
KR vs FL-J-AP	-50.885	4.566 *	P<0.05		
FL vs FL-J	22.028	2.795 ns	P>0.05		
FL vs FL-J-AP	0.2167	0.02749 ns	P>0.05		
FL-J vs FL-J-AP	-21.812	2.768 ns	P>0.05		

Tablo 28. iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkisi

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
KR	2	162.28	33.870	23.950	162.28
FL	6	224.20	16.777	6.849	226.63
FL-J	6	202.80	20.525	8.379	196.90
FL-J-AP	6	223.29	16.710	6.822	223.74
Comparison	Difference	q	P value		
KR vs FL	-61.923	5.512 **	P<0.01		
KR vs FL-J	-40.520	3.607 ns	P>0.05		
KR vs FL-J-AP	-61.013	5.431 **	P<0.01		
FL vs FL-J	21.403	2.695 ns	P>0.05		
FL vs FL-J-AP	0.9100	0.1146 ns	P>0.05		
FL-J vs FL-J-AP	-20.493	2.580 ns	P>0.05		

eNOS İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 60). iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo 29). iNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 30).



Şekil 59. VEGF İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine etkileri.

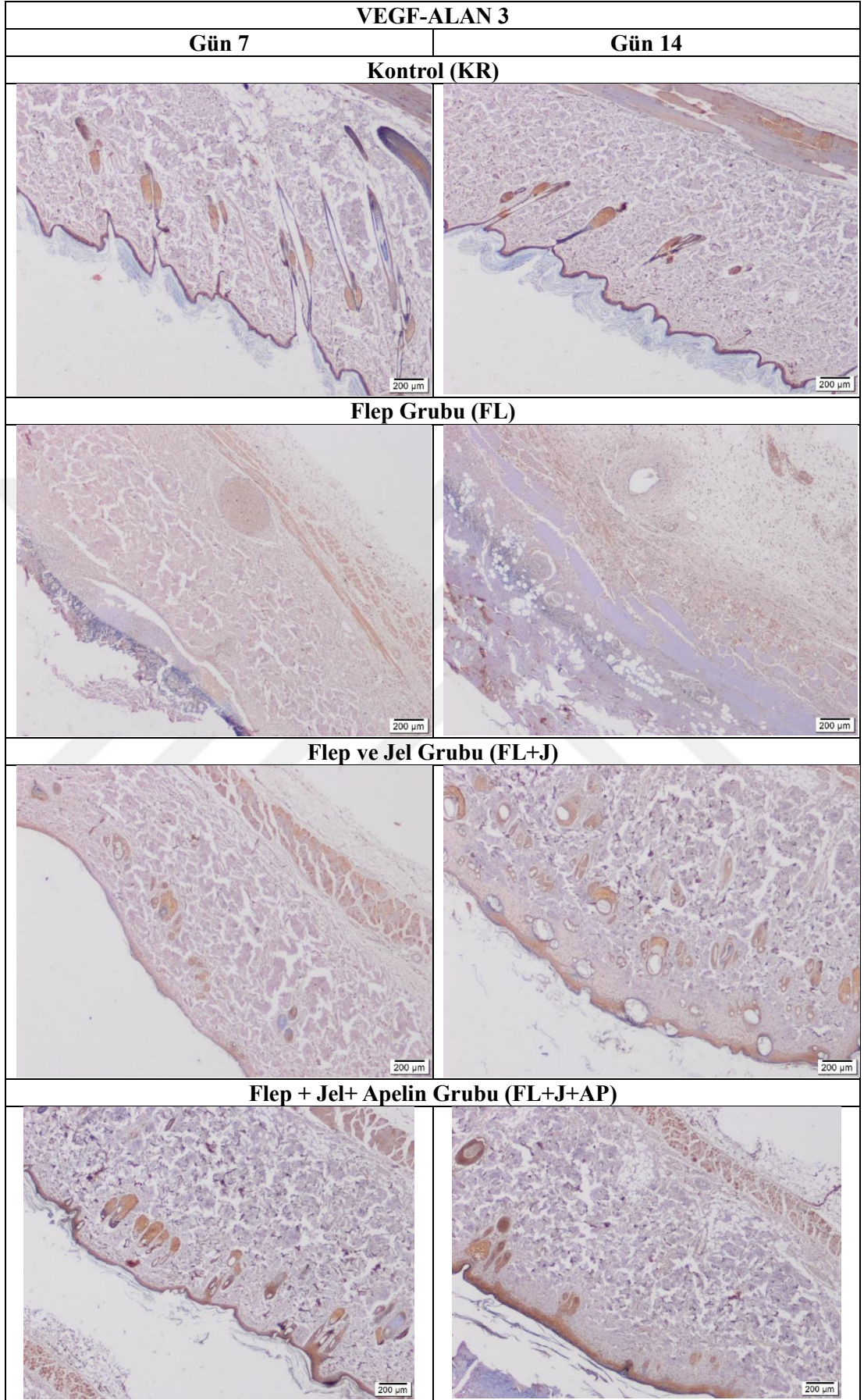
Tablo 29. eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
KR	2	163.95	26.630	18.830	163.95
FL	6	215.05	18.420	7.520	218.33
FL-J	6	193.02	16.686	6.812	190.72
FL-J-AP	6	214.84	20.806	8.494	215.90
Comparison	Difference	q	P value		
KR vs FL	-51.102	4.585 *	P<0.05		
KR vs FL-J	-29.073	2.609 ns	P>0.05		
KR vs FL-J-AP	-50.885	4.566 *	P<0.05		
FL vs FL-J	22.028	2.795 ns	P>0.05		
FL vs FL-J-AP	0.2167	0.02749 ns	P>0.05		
FL-J vs FL-J-AP	-21.812	2.768 ns	P>0.05		

Tablo 30. eNOS boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
KR	2	162.28	33.870	23.950	162.28
FL	6	224.20	16.777	6.849	226.63
FL-J	6	202.80	20.525	8.379	196.90
FL-J-AP	6	223.29	16.710	6.822	223.74
Comparison	Difference	q	P value		
KR vs FL	-61.923	5.512 **	P<0.01		
KR vs FL-J	-40.520	3.607 ns	P>0.05		
KR vs FL-J-AP	-61.013	5.431 **	P<0.01		
FL vs FL-J	21.403	2.695 ns	P>0.05		
FL vs FL-J-AP	0.9100	0.1146 ns	P>0.05		
FL-J vs FL-J-AP	-20.493	2.580 ns	P>0.05		

VEGF İHK boyamalarda FL örneklerinde KR ile karşılaştırıldığında I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı izlendi. J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri gözlemlendi (şekil 61). VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G7 için oldukça anlamlı ($P<0.001$) olarak saptandı (tablo 31). VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına olumlu etkileri G14 için anlamlı ($P<0.05$) olarak saptandı (tablo 32).



Şekil 60. VEGF İHK boyamalarda J ve J+AP uygulamasının I/R üzerine olumlu etkileri.

Tablo 31. 7. Gün VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	242.67	42.589	30.115	242.67
FL	6	181.47	22.611	9.231	182.89
FL-J	6	215.31	21.007	8.576	211.20
FL-J-AP	6	256.13	23.286	9.506	255.23
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		61.193	4.399 *	P<0.05	
KR vs FL-J		27.358	1.967 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP		-13.463	0.9679 ns	P>0.05	
FL vs FL-J		-33.835	3.440 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP		-74.657	7.590 ***	P<0.001	
FL-J vs FL-J-AP		-40.822	4.150 *	P<0.05	

Tablo 32. 14. Gün VEGF boyamalarda I/R hasrında J ve J+AP uygulamasının I/R hasarına etkileri

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
KR	2	258.51	47.850	33.835	258.51
FL	6	188.75	19.445	7.939	192.67
FL-J	6	220.93	17.999	7.348	223.72
FL-J-AP	6	266.79	22.583	9.219	269.45
Comparison		Difference	q	P value	
KR vs FL		69.752	5.289 **	P<0.01	
KR vs FL-J		37.578	2.849 ns	P>0.05	
KR vs FL-J-AP		-8.287	0.6283 ns	P>0.05	
FL vs FL-J		-32.173	3.450 ns	P>0.05	
FL vs FL-J-AP		-78.038	8.368 ***	P<0.001	
FL-J vs FL-J-AP		-45.865	4.918 *	P<0.05	

4.4. BİYOKİMYA ANALİZ BULGULARI

Yapılan biyokimyasal analizlerdeki gruplandırma aşağıdaki gibi yapılmıştır.

Kontrol; Hiçbir uyguma yapılmayan grup

2A Grubu: 7. Gün sakrifiye edilen flep kontrol grubu

2B Grubu: 14. gün sakrifiye edilen flep kontrol grubu

3A Grubu: Jel uygulanan 7. gün sakrifiye edilen grup

3B Grubu: Jel uygulanan 14. gün sakrifiye edilen grup

4A Grubu: Jel ve apelin uygulanan 7. Gün sakrifiye edilen grup

4B Grubu: Jel ve apelin uygulanan 14.. Gün sakrifiye edilen grup

Ratlardan alınan kan örneklerinde ilk olarak hemogram ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar tablo 33 de gösterilmiştir. Kontrol grubuyla uygulama yapılan grupların trombosit düzeyleri karşılaştırıldığında uygulama yapılan gruplar kontrol grubuna göre ($p<0.001$) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Grupların hemoglobin seviyeleri karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre uygulama yapılan gruplarda hemoglobin seviyeleri anlamlı olarak ($p<0.001$) düşük bulunmuştur. Gruplar arasında eritrosit seviyelerinde anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 33. Hemogram ölçümlerinin gruplara göre karşılaştırılması

Gruplar	WBC	LYM%	MID%	GRA%	LYM	MID	GRA	Hb	RBC	MCV	HCT	PLT	MPV
Kontrol	4,83±0,88	0,72±0,04	0,09±0,02	0,20±0,05	3,45±0,62	0,42±0,12	0,97±0,32	14,22±0,89	8,43±0,51	50,08±3,79	0,42±0,04	392,33±171,23	7,57±1,17
2A	4,48±1,52	0,57±0,13	0,10±0,04	0,33±0,10	2,51±0,9	0,48±0,29	1,49±0,71	12,67±0,69	7,38±0,33	49,95±3,66	0,37±0,03	572,33±181,67	6,40±0,64
2B	5,16±1,71	0,58±0,08	0,12±0,03	0,31±0,07	3,03±1,13	0,57±0,16	1,56±0,67	12,47±0,66	7,38±0,41	47,93±1,18	0,35±0,02	768,00±170,81	6,50±0,22
3A	6,72±3,59	0,36±0,21	0,22±0,22	0,39±0,30	2,30±1,37	1,89±2,87	2,54±2,27	13,18±1,62	7,58±1,04	49,45±1,93	0,38±0,06	581,67±242,76	6,95±0,36
3B	5,39±2,14	0,44±0,21	0,11±0,03	0,45±0,19	2,60±1,63	0,59±0,36	2,21±0,93	13,03±0,44	7,79±0,37	47,35±1,24	0,37±0,02	863,83±56,04	6,43±0,26
4A	6,18±2,64	0,47±0,10	0,14±0,03	0,39±0,11	2,73±0,62	0,82±0,15	2,64±2,04	13,05±0,82	7,76±0,61	48,97±1,61	0,38±0,03	628,33±88,36	6,42±0,45
4B	4,30±2,02	0,53±0,16	0,16±0,09	0,31±0,12	2,42±1,50	0,65±0,49	1,22±0,49	11,82±1,93	6,95±1,30	47,50±2,22	0,33±0,06	722,00±194,21	6,57±0,34
p	0,470	0,006*	0,218	0,179	0,660	0,312	0,182	0,037*	0,054	0,273	0,024*	0,001*	0,011*

*: $p<0,05$, a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).

Yapılan çalışmada ratlardan alınan serum örneklerinden biyokimyasal parametreler çalışılmıştır, sonuçlar tablo 34 de verilmiştir. Çalışma bulgularına göre, SOD ve CAT seviyeleri, kontrol grubu ve flep grupları karşılaştırıldığında, flep grubu kontrolden anlamlı olarak düşük ($p<0,05$), jel ve apelin jel uygulanan gruplar ise flep grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Serum VEGF seviyeleri, jel uygulanan ve jel ile birlikte apelin uygulanan gruplar kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.05$) yüksek bulunmuştur. eNOS seviyeleri karşılaştırıldığında, jel uygulanan ve jel ile birlikte apelin uygulanan gruplar kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.05$) yüksek bulunmuştur.



Tablo 34. MDA, IL6, TGFβ, iNOS, nNOS, SOD, CAT, VEGF, TNF α, eNOS serum seviyeleri

Gruplar	MDA (nmol /ml)	IL6 (pg/ml)	TGFβ (pg /ml)	iNOS (ng/ml)	nNOS (pg/ml)	SOD (ng/ml)	CAT (ng / ml)	VEGF (pg/ml)	TNFα (pg/ml)	eNOS (ng/ml)
Kontrol	0,65 ^a ±0,07	22,02±1,26	36,57±5,68	3,31±0,66	167,67±4,46	1,28 ^a ±0,10	0,79±0,12	36,37 ^a ±5,11	38,24 ^a ±7,49	79,87 ^a ±12,66
2A	0,74 ^a ±0,07	28,29±6,18	37,86±7,34	3,57±0,63	160,47±13,34	1,13 ^b ±0,15	0,76±0,10	45,66 ^{bc} ±3,79	59,43 ^b ±10,92	81,25 ^b ±7,47
2B	0,74 ^a ±0,07	24,39±0,98	40,08±4,15	3,26±0,82	166,55±15,49	1,16 ^b ±0,06	0,61 ^b ±0,04	47,27 ^b ±7,81	43,39 ^b ±4,74	88,19 ^b ±4,80
3A	0,69±0,05	25,88±2,11	40,89±6,05	3,24±0,84	158,99±12,84	1,24 ^a ±0,07	0,71 ^a ±0,04	40,92 ^{bc} ±8,85	41,75 ^b ±1,81	95,42 ^b ±11,83
3B	0,51 ^b ±0,11	24,75±2,60	46,00±7,45	3,26±0,51	162,14±11,12	1,07 ^b ±0,14	0,77 ^a ±0,04	53,62 ^c ±3,71	36,34 ^c ±5,90	103,48 ^c ±13,20
4A	0,72 ^a ±0,12	25,38±2,23	42,25±8,28	3,73±0,86	171,07±33,87	1,24 ^a ±0,05	0,71 ^a ±0,02	50,04 ^c ±5,25	41,86 ^c ±4,10	98,94 ^c ±7,92
4B	0,72 ^a ±0,12	25,77±2,99	45,64±9,81	3,77±0,68	175,41±19,63	1,28 ^a ±0,07	0,80 ^a ±0,06	54,75 ^c ±10,16	35,34 ^c ±6,81	106,40 ^c ±9,63
p	0,001*	0,060	0,204	0,702	0,787	0,004*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

5. TARTIŞMA

Yumuşak doku defektlerinin rekonstrüksiyonunda lokal rastgele desenli deri flepleri yaygın olarak kullanılır. Ancak flep nekrozu plastik cerrahlar için zor bir sorun olmaya devam etmektedir. Flep nekrozundan genellikle kan akımı eksikliği ve iskemik-reperfüzyon hasarı sorumludur (108). Flep nekrozunu azaltmak ve optimal sonuçlara ulaşmak için birçok çalışma yapılmıştır (108,109).

Eğer hücrelerde geri dönüşlü hasar gerçekleşmişse, kan akışının yeniden sağlanması sayesinde hücreler iyileşebilirler. Ancak belli koşullarda iskemik ve canlı olan dokulara yeniden kan akışının sağlanması, çelişkili şekilde geri dönüşümsüz olarak hasarlanmamış olan hücrelerin ölümüyle sonuçlanır. İskemi-reperfüzyon hasarı (I/R) olarak adlandırılan bu durum, miyokard ve beyin iskemisinde gelişen doku hasarında önemli payı olan aynı zamanda klinik açıdan önemli bir süreçtir (2).

Apelin, güçlü çoklu biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiş, endojen polipeptid bir hormondur (110). Apelinin anjiyogenezde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Örneğin apelin iskemik felçli farelerde anjiyogenezi teşvik edebileceği ve lokal serebral kan akışını koruyup ve inflamatuvar aktiviteleri inhibe edebileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur (89). Özellikle iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (62). Kalpte oluşan iskemi hasarına karşı apelin; mitokondriyal oksidatif hasarı ve lipid peroksidasyonunu azaltmada etkilidir (111). Genitoüriner sistemde böbrek dokularında apelinin tedavisi, antioksidan sistemlerin aktivitesini doza bağımlı olarak artırır. Ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarı sonrasında böbrek fonksiyonlarının iyileşmesinde etkilidir (112). Beyinde de apelinin iskemi reperfüzyon hasarında oksidatif stress ve sonraki süreçlerde oluşan inflamasyona karşı apelin mekanizmaları incelenmiştir (113) ve beyinde serebral iskemik hasara karşı koruyucu etkileri ortaya konmuştur. Çeşitli çalışmalarda apelinin damarlanma artışı gösterdiği, oksidatif stres parametrelerini azalttığı gösterilmiştir (114).

Son zamanlarda ısıya duyarlı jel oluşturuıcı sistemler, kolay hazırlanmaları, düşük maliyetleri, düşük toksisite, kullanım kolaylıkları ve kontrollü salım gibi avantajlarından dolayı yara onarımı olarak giderek artan bir ilgi görmektedir (95). Özellikle enjekte edilebilir ve ısıya duyarlı hidrojeller, ön-jel çözeltisinin basit bir

enjeksiyonu yoluyla rastgele flepten kaynaklanan cilt kusurlarını ve nekrozu doldurma kapasitesine sahiptir. Bu çalışmada, random deri flebinin hayatta kalmasını desteklemek için apelin-13 yüklü bir jel hazırladık.

Daha önce, apelin yüklü hidrojellerin farklı formülasyon çalışmaları yapılmıştır (114,94). Ancak, poloksamer 188 ve plokamer 407 ile hazırlanan apelin yüklü jel formülasyonu flep altı enjeksiyon yöntemi ile random flepler üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığında ve vücut sıcaklığındaki viskozite ölçümleri ile reoloji analizleri yapılmıştır. Jelasyon sıcaklıklarının ölçümüne ait veriler Grafik 1,2, 3,4,5,6'da verilmiştir. Yapılan ölçümlerde plasebo formülasyonun jelasyon sıcaklığı 31.53 °C bulunmuştur ve elde edilen sonuçlar literatürle uyumludur. Plasebo ve Apelin-13 trifluoroasetate içeren formülasyonların 25°C'de ve 37°C'deki kayma hızı-kayma gerilimi grafiklerine göre Grafik 1,2,3,4,5 te formülasyonlar oda sıcaklığında (25°C) Newtonian akış gösterirken vücut sıcaklığında (37°C) psödoplastik akış özelliği göstermiştir. Elde edilen akış özellikleri literatürle uyumludur (2–4) . Bu verilere göre formülasyonlar oda sıcaklığında sıvı özelliktedir ve bu durumda formülasyon enjektör iğnesinden kolaylıkla geçerek uygulama bölgesinde kolaylıkla yayılır. Vücut sıcaklığında ise formülasyon jelleşerek uygulama bölgesinde uzun süre kalır ve bu sayede kontrollü ilaç salınımı sağlanmış olur.

Zheng ve arkadaşlarının çalışmasında hazırlanan apelin yüklü hidrojel oluşturulurken, jel yapıcı ajan olarak kitosan ve β -gliserofosfat ile apelin-13 içeren in situ jel formülasyonu geliştirilmiş ve etkinliği incelenmiştir. Yaptığımız çalışmada ise, poloksamer 188 ve plokamer 407 kullanılarak in situ jel formülasyonu hazırlanmış ve random flep modelinde etkisi incelenmiştir.

Yapılan bu çalışmada, apelin içeren jel, deney hayvanlarına uygulandı ve uygulamanın sonunda alınan örnekler histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi. Histopatolojik inceleme sonucunda flep grubunda makrofajlar, nötrofiller, lenfositler, plazma hücreleri, yabancı cisim reaksiyonu, çok çekirdekli dev hücreler ve fibroblastlar gibi yara iyileşmesi veya inflamatuvar süreçlerde rol oynayan farklı hücreler izlendi. Aynı zamanda epidermis ve dermis atrofik, ödemli, çok sayıda

genişlemiş mikrodamarlar, fibroblastların düzensiz çoğalması ve organizasyonu ile nötrofil infiltrasyonu izlendi. Bu durum deride iskeminin varlığını göstermiştir.

İskemi çalışmalarında genellikle rat modelleri kullanılmıştır. Deri veya kas hedef dokularının kullanıldığı çalışmalarda, flebe bağlı oluşan I/R ye karşı kullanılan ajanların olumlu etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Örneğin, sildenafil'in doza bağımlı etkilerini karşılaştıran bir çalışma, bu ajanın sıçanlarda rastgele deri fleplerinde I/R'yi azalttığını göstermiştir (115). Yapılan farklı çalışmalarda flep kaynaklı I/R hasarına karşı kullanılan özellikle antioksidan içeren maddelerin olumlu sonuçlarını bildirmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada, apelin-13 içeren in situ jel formülasyonunun serbest fleplerin neden olduğu iskemi üzerine etkisi histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmiştir (94). Bu çalışmada hazırlanan apelin yüklü jelin hazırlanması ve formülasyonu yaptığımız çalışmada kullandığımız jel formülasyonu ile benzerdir fakat kullanılan apelin miktarları farklıdır. Ayrıca yapılan çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak serbest flep kullanmıştır. Uygulanan apelin jel formülasyonun I/R hasarını azalttığı immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir. Çalışmamızda, farklı olarak kullandığımız apelin miktarlarını daha da arttırarak farklı iki boyama tekniği kullanarak iNOS, eNOS ve nNOS ve VEGF için ayrıntılı immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılmış aynı zamanda biyokimyasal bulgular ile desteklenmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızda, iNOS, eNOS ve nNOS ekspresyonu immünohistokimyasal olarak belirlenmiş ve flep grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında immünoreaktivitenin yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumun flep kaynaklı I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığını düşündürmektedir. Ayrıca apelin jel ve sadece jel uygulanan gruplarda ise immünoreaktivitenin flep grubuna göre düşüş gösterdiği de görülmüştür. Bulgularımız 7. ve 14. günler için benzer sonuçlar vermiştir. Demir serbest flepler üzerinde yaptığı çalışmasında, iskemi grubunda eNOS ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre yüksek, apelin içeren jel uygulaması yapılan iskemi grupta immünoreaktivite düşük-orta seviyede saptanmıştır. (Demir; 2021). Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumludur.

Çalışmamızda gruplardan alınan serum örneklerinden, iNOS ve nNOS seviyeleri analiz edilmiş, gruplar arasında serum seviyelerinde anlamlı fark bulunmazken eNOS seviyeleri apelin jel grubunda flep grubuna göre anlamlı ($p<0,001$) olarak yüksek bulunmuştur. eNOS kardiyovasküler sistemdeki en etkin NOS tipidir ve arteriyal kan akımı arttığında oluşan damar duvar stresine cevap olarak ekspresyonu artmaktadır bu nedenle apelin jel grubundaki flep grubuna göre eNOS serum seviyelerinde ilk gözlemlenen artış olmuş olabilir. Sonuçlarımız uygulama süresinin artışıyla immünohistokimyasal gözlemler daha net olarak serum seviyelerinde gözlemlenebileceğini düşündürmüştür.

Çeşitli çalışmalar VEGF'nin endotel hücrelerinin çoğalma gibi aktivitelerindeki işlevini ortaya çıkarmıştır. VEGF, revaskülarizasyonu ve iskemik fleplere kan akışını teşvik eder, böylece flep sağkalımını artırır (116). Çalışmamızda, VEGF ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelenmiş olup sonuçlarımıza göre, flep grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Apelin jel uygulanan grup flep uygulanan gruplara göre anlamlı olarak yükselmiştir ($p<0,05$). İmmünohistokimyasal sonuçlarımızı serum VEGF seviyeleri de desteklemiştir. Apelin jel grubu VEGF seviyeleri flep uygulanan gruba göre anlamlı olarak ($p<0,001$) yüksek bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada geliştirdiğimiz jel formülasyonundan farklı bir apelin yüklü hidrojel uygulayan Zheng ve arkadaşlarının sonuçları ile VEGF sonuçlarımız uyumludur.

Demir apelin jel uyguladığı serbest fleplerde, VEGF ekspresyonu kontrol grubunda düşük seviyede, iskemi uygulanan grup orta seviyede olduğunu görmüştür. İskemi sonrası sadece boş jel uygulaması yapılan grupta ise immün reaktivitenin orta yüksek şiddette olduğu ve apelin içeren jel uygulanan grupta ise yüksek olduğu görülmüştür (94). Bu çalışmanın bulguları da yaptığımız çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir.

Çalışmamızın sonuçları ve literatürde yapılan farklı çalışmaların bulguları, apelin-13'ün VEGF'nin indüklediği anjiyogenez yoluyla flep sağkalımını destekleyebileceğini göstermektedir.

İnflamatuvar yanıt, rastgele deri fleplerinin hayatta kalmasında temel bir rol oynar (117). Rastgele deri fleplerinin epidermisinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile orta derecede koagülatif nekroz belirgindir. Nekrozun boyutu ne kadar büyük olursa inflamasyon da o kadar belirgin olur ve bu da flep başarısını tehlikeye atar (118).

Çalışmamızda apelin jel uygulanan grubun serum TNF α seviyeleri, flep uygulanan gruba göre anlamlı olarak ($p<0.001$) düşmüştür. Flep uygulanan grubun TNF- α seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek çıkması, flep kaynaklı inflamasyonu göstermiştir ve apelin yüklü jelin oluşan inflamasyona karşı etkisi görülmüştür.

Sonuçlarımıza göre, apelin-13'ün rastgele deri fleplerinin iskemik alanlarında güçlü antiinflamatuvar etkiler gösterdiği sonucuna vardık.

SOD ve CAT organizmalarda çok önemli antioksidan enzimlerdir ve in vivo serbest radikalleri temizleyen birincil maddelerdir. Çalışmamızda, immünohistokimyasal olarak I/R hasarı ile oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. Oksidatif stres, serbest radikallerdeki artış veya antioksidanlardaki azalma olarak tanımlanır. Oksidatif stres biyobelirteçlerinden en önemlisi lipid preoksidasyon ürünü olan MDA dır. Çalışmamızda immünohistokimyasal sonuçlarımız oksidatif stresin varlığını göstermiştir fakat serum MDA seviyelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte, serum CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin seviyelerinde ise, flep grubu kontrol grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ($p<0,001$), apelin yüklü jel grubunda ise anlamlı olarak arttığı ($p<0,001$) görülmüştür.

MDA seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark görülmemiş olsa da, flep grubu kontrol grubuna göre antioksidan enzimlerdeki azalma flep uygulamasının serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozduğunu ve oksidatif strese hücreleri götürdüğünü söyleyebiliriz. Apelin yüklü jel uygulamasının antioksidan enzimlerini arttırması ise apelinin antioksidan sisteme olan olumlu etkisi nedeniyle olabilir.

Bulgularımız apelin-13'ün desteklediği flep sağkalımının, rastgele deri fleplerinde oksidatif stresin baskılanması yoluyla olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak;

Çalışmamızda, apelin yüklü formüle edilen jelin flep kaynaklı I/R hasarına ve I/R hasarına bağlı oluşan inflamasyon ve oksidatif stres üzerine etkisini araştırdık.

Histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal sonuçlarımıza göre apelin yüklü jelin, deri flepleri için etkili bir tedavi seçeneği olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Merino S, Martin C, Kostarelos K, Prato M, Vazquez E. 2015. Nanocomposite hydrogels: 3D Polymer-nanoparticle synergies for ondemand drug delivery. *ACS Nano*.9:4686–97.
2. Li Z, Guan J. 2011. Thermosensitive hydrogels for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 8:991–1007.
3. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, et al. 1998. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human 41 APJ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 251(2): 471-476.
4. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W. et al. 2001. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg*. 46:314–9.
5. Kanitakis, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12(4), 390–401.
6. James, W.D, Berger, T.G. & Elston, D.M. 2006. *Andrews' diseases of the skin: Clinical dermatology* (10th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
7. Murphy, G.F. 1997. Histology of the skin. In D. Elder, R. Elenitsas, C. Jaworsky, & B. Johnson, Jr. (Eds.), *Lever's histopathology of the skin* (8th ed., pp. 5–45).
8. Chu, D.H, In K. Wolff, L.A. Goldsmith, S.I. Katz, B.A. Gilchrest, A.S. Paller, & D.J. Leffell (Eds.). New York: McGraw-Hill. (2008). Overview of biology, development, and structure of skin. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine* (7th ed., pp. 57–73).
9. Jones, P.H. 1996. Isolation and characterization of human epidermal stem cells. *Clinical Science*, 91(2), 141–146.
10. Lavker, R.M. & Sun, T.T. 1982. Heterogeneity in basal keratinocytes: Morphological and functional correlations. *Science*, 215(4537), 1239–1241.
11. Haake, A.R., & Hollbrook, K. (1999). The structure and development of skin. In I.

12. Fairley, J.A., Scott, G.A., Jensen, K.D., Goldsmith, L.A., & Diaz, L.A.1991. Characterization of keratocalmin, a calmodulin-binding protein from human epidermis. *Journal of Clinical Investigation*, 88(1), 315–322
13. Hennings, H. & Holbrook, K.A.1983. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture: An ultrastructural study. *Experimental Cell Research*, 143(1), 127–142.
14. Lin, M.S., Mascaro, J.M., Jr., Liu, Z., Espana, A., & Diaz, L.A. 1997. The desmosome and hemidesmosome in cutaneous autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology*, 107(Suppl. 1), 9–15.
15. Caputo, R., & Peluchetti, D. (1977). The junctions of normal human epidermis: A freeze-fracture study. *Journal of Ultrastructure Research*, 61(1), 44–61.
16. Matoltsy, A.G. 1976. Keratinization. *Journal of Investigative Dermatology*, 67(1), 20–25.
17. Schwarz, E.1979. Biochemie der epidermalen keratinisation. In A. Marchionini (Ed.), *Handbuch der hautund geschlechtskrankheiten* (Vol. I). Berlin: Springer-Verlag.
18. Flaxman, B.A., Sosis, A.C., & Van Scott, E.G. 1973. Changes in melanosome distribution in Caucasoid skin following topical application of nitrogen mustard. *Journal of Investigative Dermatology*.60(5), 321–326.
19. Olson, R.L., Nordquist, J., & Everett, M.A. 1970. The role of epidermal lysosomes in melanin physiology. *British Journal of Dermatology*, 83(1), 189–199.
20. Moll, I. 1994. Merkel cell distribution in human hair follicles of the fetal and adult scalp. *Cell and Tissue Research*, 277(1), 131–138.
21. Mescher AL, Junqueira LCU. 2013. Junqueira’s basic histology: text and atlas. 13. ed. New York, NY: McGraw-Hill Medical. 544 p.
22. Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH. 2021. Netter’s essential histology with correlated histopathology.
23. Tewari M, Shukla H.2005.Sushruta:'The Father of Indian Surgery'. *Indian Journal of Surgery*.67(4):229-30.

24. Wei FC, Mardini S. Free-style free flaps. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114:910-6.
25. Mardini S, Tsai FC, Wei FC. The thigh as a model for free style free flaps. *Clin Plast Surg* 2003; 30:473-80.
26. Lucas JB. 2017. The physiology and biomechanics of skin flaps. *Facial Plastic Surgery Clinics*. 25(3):303-11.
27. Kerrigan CL. 1983. Skin flap failure: pathophysiology. *Plastic and reconstructive surgery*. 72(6):766-77.
28. Daniel R. Principles and physiology of skin flap surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1990;73:225-378.
29. Harder Y, Schmauss D, Wettstein R, Egaña JT, Weiss F, Weinzierl A, et al. 2014. Ischemic tissue injury in the dorsal skinfold chamber of the mouse: a skin flap model to investigate acute persistent ischemia. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. (93):e51900.
30. Kawamata S, Ozawa J, Hashimoto M, Kurose T, Shinohara H. 2003. Structure of the rat subcutaneous connective tissue in relation to its sliding mechanism. *Archives of histology and cytology*. 66(3): 273-279.
31. Houseman ND, Taylor GI, Pan W-R. 2000. The angiosomes of the head and neck: anatomic study and clinical applications. *Plastic and reconstructive surgery*. 105(7):2287-313.
32. Schmauss D, Weinzierl A, Schmauss V, Harder Y. 2018. Common rodent flap models in experimental surgery. *European Surgical Research*. 59(3-4):255-64.
33. McFarlane R, DeYoung G, Henry R, McFarlane R. 1965. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plastic and reconstructive surgery*. 35(2):177-82.
34. Adamson J., Horton C., Crawford H., Ayers Jr WT. 1967. Studies on the action of dimethyl sulfoxide on the experimental pedicle flap. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 39(2):142-6.
35. Hammond DC, Brooksher RD, Mann RJ, Beernink JH. 1993. The dorsal skin-flap model in the rat: factors influencing survival. *Plastic and reconstructive surgery*. 91(2):316-21.

36. Kelly CP, Gupta A, Keskin M, Jackson IT. 2010. A new design of a dorsal flap in the rat to study skin necrosis and its prevention. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*. 63(9):1553-6.
37. Jones M, Zhang F, Blain B, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W, et al. 2001. Influence of recipient-bed isolation on survival rates of skin-flap transfer in rats. *Journal of reconstructive microsurgery*. 17(08):653-60.
38. Kaufman T, Angel MF, Eichenlaub E, Levin M, Hurwitz DJ, Futrell JW. 1985. The salutary effects of the bed on the survival of experimental flaps. *Annals of plastic surgery*. 14(1):64-73.
39. Fourman MS, Gersch RP, Phillips BT, Nasser A, Rivara A, Verma R, et al. 2015. Comparison of laser Doppler and laser-assisted indocyanine green angiography prediction of flap survival in a novel modification of the McFarlane flap. *Annals of Plastic Surgery*. 75(1):102-7.
40. Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS. 1998. *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York.
41. Buerkle LE, Rowan SJ. 2012. Supramolecular gels formed from multi-component low molecular weight species. *Chem Soc Rev*. 41:6089–6102.
42. Allen L, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2014. *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. Lippincott.
43. Vintiloiu A, Leroux JC. 2008. Organogels and their use in drug delivery: A review. *J Control Release*. 125,179–192.
44. Labarre D, Ponchel G, Vauthier C. 2010. *Biomedical and Pharmaceutical Polymers*. Pharmaceutical Press, London, UK.
45. Felton L. 2013. *Remington: Essentials of Pharmaceutics*. Pharmaceutical Press, London, UK.
46. Florence AT, Attwood D. 2007. *FASTtrack: Physical Pharmacy*. Pharmaceutical Press, London, UK.
47. Florence AT, Attwood D. 2011. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Pharmaceutical Press, London, UK,

48. Martinez MA, Gallardo J, Benavides MM, López-Duran JDG, Lara GV. 2007. Rheological behavior of gels and meloxicam release. *Int J Pharm.* 333:17–23.
49. Khan SA, Zoellera NJ. 1993. Dynamic rheological behavior of flocculated fumed silica suspensions. *J Rheol.* 37:1225–1235.
50. Jain SK, Soni V. 2012. *Bentley's Textbook of Pharmaceutics.* Elsevier Health Sciences, India.
51. Luckham PF, Rossi S. 1999. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions. *Adv Colloid Interface Sci.* 82:43–92.
52. Wang X, Hayakawa S, Tsurub K, Osaka A. 2002. Bioactive titania gel layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H₂O₂/HCl solution. *Biomaterials.* 23:1353–1357.
53. Murdan S. 2005. Organogels in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2:489–505.
54. Maarten van Dijk, Cornelius F van Nostrum, Wim E Hennink, Dirk T S Rijkers, Rob M J. 2010. Synthesis and characterization of enzymatically biodegradable PEG and peptide-based hydrogels prepared by click chemistry. *Biomacromolecules.* 14;11(6):1608-14.
55. Soniya Devasani; Asish Dev; S. Rathod Rathod; Ganesh Deshmukh. 2016. An overview of in situ gelling systems. *Pharmaceutical and Biological Evaluations.* 1.3;6-7.
56. H. B. Nirmal, S. R. Bakliwal, S. P. Pawar. 2010. In-Situ gel: New trends in controlled and sustained drug delivery system. *International Journal of PharmTech Research* 2(2):1398-1408
57. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K & Fujimiya M. 2001. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory Peptides* 99 87–92. (doi:10.1016/S0167-0115(01)00236-1).
58. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH. 2000. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *Journal of Neurochemistry* 74 34–41. (doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x).

59. Pitkin SL, Maguire JJ, Kuc RE & Davenport AP. 2010. Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man. *British Journal of Pharmacology* 160 1785–1795. (Doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00821.x).
60. Alan G Japp . David E Newby. 2008. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol.* 15;75(10):1882-92.
61. Wang L, Jin Z, Wang J, Chen S, Dai L, Lin D, Wu L, Gao W. 2017 Sep 18. Detrimental effect of Hypoxia-inducible factor-1 α -induced autophagy on multiterritory perforator flap survival in rats. *Sci Rep*,7(1):11791. doi: 10.1038/s41598-017-12034-x. PMID: 28924179; PMCID: PMC5603514.
62. Yang M, Sheng L, Li H, Weng R, Li QF.2010. Improvement of the skin flap survival with the bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in a rat model. *Microsurgery* ,30:275- 81.
63. Zhou, Y., Wang, Y. and Qiao, S. 2014. Apelin a potential marker of coronary artery stenosis and atherosclerotic plaque stability in acs patients. *International Heart Journal*, 13-234.
64. Odowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HHQ, Tsui LC, Kennedy JL, Shi XM, Petronis A, George SR, Nguyen T. 1993. A Human Gene That Shows Identity with the Gene Encoding the Angiotensin Receptor Is Located on Chromosome-11. *Gene*. 136(1-2): 355-360.
65. Chapman NA, Dupré DJ, Rainey JKJB, biology c. 2014. The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR. 92:431-40.
66. Kleinz MJ, Skepper JN, Davenport APJRp.2005. Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. 126:233-40.
67. Daviaud, J. Boucher, FASEB J. S. Gesta, et al., 20. 2006. TNF α up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. 1528–1530.
68. M V Heinonen , D E Laaksonen, T Karhu, L Karhunen, T Laitinen, S Kainulainen, A Rissanen, L Niskanen, K H Herzig. 2008. Effect of diet-induced weight loss on

- plasma apelin and cytokine levels in individuals with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 19(9):626-33.
69. Young IS, Woodside JV. 2001. Antioxidants in Health and Disease. *J Clin Pathol.* 54(3): 176-186.
70. Çakatay, U., & Kayalı, R. (2006). Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37: 162-167.
71. Flora SJ. 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell. Mol. Biol.* 53(1), 1-2.
72. Miller DM, Buettner GR, Aust SD. 1990. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radic Biol Med.* 8(1), 95-108.
73. Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism.* 49(2 Suppl 1): 3-8.
74. Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 31(4), 261-272.
75. Halliwell B, Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition.* 57: 715S-724S; discussion 724S-725S.
76. Lloyd RV, Hanna PM, Mason RP. 1997. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med.* 22(5), 885-888.
77. Velioğlu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D. 1998. “Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products”, *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4113-4117.
78. Kartal, Ş. 2013. “Karbonmonoksit zehirlenmesi hastalarda oksidan/antioksidan ve oksidatif stres indeks seviyelerinin değerlendirilmesi”, *Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gaziantep*, 14-20.
79. Limon-Pacheco J, Gonshebat ME. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res.* 674(1-2): 137-147.
80. I S Young , J V Woodside. 2001. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* ;54(3):176-86.

81. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 26: 1898-1902.
82. Anggard E. 1994. Nitric oxide Mediator, murder, and medicine. *Lancet*. 343: 1199 -1206. 32.
83. Darley-USmar V, Halliwell B. 1996. Blood radicals-Reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. *Pharmacol Res*. 13: 649-662.
84. Kerwin JF Jr, Lancaster JR Jr, Feldman PL. 1995. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J Med Chem*. 38: 4343-4362.
85. Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051-3064.
86. Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigné, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpéné, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, J. S., and Valet, P. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146, 1764–1771.
87. Castan-Laurell, I., Dray, C., Attané, C., Duparc, T., Knauf, C., and Valet, P. (2011). Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 40, 1–9.
88. Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., EsquivelSoto, J., Morales-González, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sánchez-Rivera, G., Valadez-Vega. 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.*;12(5):3117-32.
89. Chen D, Lee J, Gu X, Wei L, Yu SP. 2017. Intranasal delivery of Apelin-13 is neuroprotective and promotes angiogenesis after ischemic stroke in Mice. *ASN Neuro*.1759091415605114.
90. Park, J., Choe, S. S., Choi, A. H., Kim, K. H., Yoon, M. J., Suganami, T., Ogawa, Y., and Ranjbar-Mohammadi M, Rabbani S, Bahrami SH, Joghataei MT, Moayer F. 2016 Dec..Antibacterial performance and in vivo diabetic wound healing of curcumin loaded gum tragacanth/poly(ε-caprolactone) electrospun nanofibers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 1;69:1183-91. doi: 10.1016/j.msec.2016.08.032. Epub 2016 Aug 13. PMID: 27612816.

91. Castan-Laurell, I., Vítková, M., Daviaud, D., Dray, C., Kováčiková, M., Kovacova, Z., Hejnova, J., Stich, V., and Valet, P. (2008). Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur. J. Endocrinol.* 158, 905–910.
92. Soriguer F., Garrido-Sanchez L., Garrido-Sanchez Sara L. 2009. Apelin Levels Are Increased in Morbidly Obese Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Obesity Surgery* 19(11):1574-80.
93. Foussal, C., Lairez, O., Calise, D., Pathak, A., Guilbeau-Frugier, C., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. 2010. Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett.* 584, 2363–2370.
94. Demir OF. 2021. İskemi Reperfüzyon Hasarında Apelinin Etkilerinin Araştırılması. *Tıpta Uzmanlık. Ege Üniversitesi.*
95. Garala K, Joshi P, Patel J, Ramkishan A, Shah M. 2013. Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. *Int J Pharm Investig.*(1):29.
96. Cui H, Feng Y, Shu C, Yuan R, Bu L, Jia M, Pang B. 2020 Jan 22. Dietary Nitrate Protects Against Skin Flap Ischemia-Reperfusion Injury in Rats via Modulation of Antioxidative Action and Reduction of Inflammatory Responses. *Front Pharmacol.*10:1605. doi: 10.3389/fphar.2019.01605. PMID: 32038262; PMCID: PMC6987438.
97. Chen Z, Zhang C, Ma H, Huang Z, Li J, Lou J, Li B, Tu Q, Gao W. 2020 Jun 26. Detrimental Effect of Sitagliptin Induced Autophagy on Multiterritory Perforator Flap Survival. *Front Pharmacol.* 11:951. doi: 10.3389/fphar.2020.00951. PMID: 32670067; PMCID: PMC7332881.
98. Fang M, He J, Ma X, Li W, Lin D. 2020 Aug. Protective effects of dexmedetomidine on the survival of random flaps. *Biomed Pharmacother.*128:110261. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110261. Epub 2020 May 20. PMID: 32446114.
99. Fan W, Liu Z, Chen J, Liu S, Chen T, Li Z, Lin D. 2021 Nov . Effect of memantine on the survival of an ischemic random skin flap and the underlying mechanism. *Biomed Pharmacother.* 143:112163. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112163. Epub 2021 Sep 10. PMID: 34517281.

100. Bali U, Aydemir I, Keçeci Y, Yoleri L, Tuğlu Mİ. 2021 Oct. Effects of oxidative stress and apoptosis on vascularity and viability of perforator flaps. *Biotech Histochem.* 96(7):526-535. doi: 10.1080/10520295.2020.1831066. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33107764.
101. Özcete E, Altunci YA, Karabey F, Cavusoglu T, Meral A, Yigitturk G, Oyku Cetin E. Effects of Silk Sericin on Incision Wound Healing in a Dorsal Skin Flap Wound Healing Rat Model.
102. Jouybar A, Seyedjafari E, Ardeshtyrlajimi A, Zandi-Karimi A, Feizi N, Khani MM, Pousti I. 2017. Nov. Enhanced Skin Regeneration by Herbal Extract-Coated Poly-L-Lactic Acid Nanofibrous Scaffold. *Artif Organs.* 41(11):E296-E307. doi: 10.1111/aor.12926. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28621889.
103. Mirzaei-parsa, M.J. Ghanbari, H., Alipoor, B. et al. 2019. Nanofiber-acellular dermal matrix as a bilayer scaffold containing mesenchymal stem cell for healing of full-thickness skin wounds. *Cell Tissue Res* 375, 709–721.
104. Chen, X. H., Zhao, Y. P., Xue, M., Ji, C. B., Gao, C. L., Zhu, J. G., Qin, D. N., Kou, C. Z., Qin, X. H., Tong, M. L., and Guo, X. R. 2010. TNF- induces mitochondrial dysfunction in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 328, 63–69.
105. Acar B, Köse Ö, Aytaç G, Öztürk S, Göksu AK, Tanrıover G, Sindel M. 2018 Dec. Diabetes mellitus accelerates fatty degeneration of the supraspinatus muscle after tendon tear: An experimental study in rats. *Eklem Hastalik Cerrahisi.* 29(3):176-83. doi: 10.5606/ehc.2018.62388. PMID: 30376803.
106. Mirzaei-parsa, M.J. Ghanbari, H., Alipoor, B. et al. 2019. Nanofiber-acellular dermal matrix as a bilayer scaffold containing mesenchymal stem cell for healing of full-thickness skin wounds. *Cell Tissue Res* 375, 709–721.
107. Mirzaei-Parsa MJ, Ghanbari H, Alipoor B, Tavakoli A, Najafabadi MRH, Faridi-Majidi R. 2019 Mar. Nanofiber-acellular dermal matrix as a bilayer scaffold containing mesenchymal stem cell for healing of full-thickness skin wounds. *Cell Tissue Res.* 375(3):709-721. doi: 10.1007/s00441-018-2927-6. Epub 2018 Oct 18. PMID: 30338376.

108. Davis RE, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. 1999. Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. *Arch Facial Plast Surg*. 1:27-32.
109. Nakanishi Y, Nakajima T, Yoshimura Y, Okamoto Y, Yamada T. 1998. The transepidermal absorption of prostaglandin E1 as a topical ointment: an experimental study of application over a rat skin flap. *Ann Plast Surg*. 40:44-7.
110. Beeres SL, Bengel FM, Bartunek J, Atsma DE, Hill JM, Van- derheyden M et al. 2007. Role of imaging in cardiac stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol*. 49:1137–48.
111. Simpkin JC, Yellon DM, Davidson SM, Lim SY, Wynne AM, Smith CCT. 2007 Nov. Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemiareperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 102(6):518–28.
112. Bircan B, Çakır M, Kırbağ S, Gül HF. 2016. Effect of apelin hormone on renal ischemia/reperfusion induced oxidative damage in rats. *Ren Fail*. 38(7):1122–8.
113. Gu Q, Zhai L, Feng X, Chen J, Miao Z, Ren L, et al. 2013. Apelin-36, a potent peptide, protects against ischemic brain injury by activating the PI3K/Akt pathway. *Neurochem Int*. 63(6):535–40.
114. Zheng W, Wang J, Xie L, Xie H, Chen C, Zhang C, et al. 2019 Sep. An injectable thermosensitive hydrogel for sustained release of apelin-13 to enhance flap survival in rat random skin flap. *J Mater Sci Mater Med*. 1;30(9).
115. Tao Y, Wang P, Wang Y, Kadam SU, Han Y, Wang J, Zhou J, 2016. Power ultrasound as a pretreatment to convective drying of mulberry (*Morus alba* L.) leaves: Impact on drying kinetics and selected quality properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31: 310–318.
116. Zhang F, Lineaweaver W. 2011. Acute and sustained effects of vascular endothelial growth factor on survival of flaps and skin grafts. *Ann Plast Surg*. 66:581–2.
117. Kuo YR, Wu WS, Hsieh YL, Wang FS, Wang CT, Chiang YC et al. 2007. Extracorporeal shock wave enhanced extended skin flap tissue survival via increase of topical blood perfusion and associated with suppression of tissue pro-inflammation. *J Surg Res*. 143:385–92.

118. Zhou T, Wang N, Xue Y, Ding T, Liu X, Mo X, Sun J. 2016 Jul. Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing keratinocytes proliferation and differentiation. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1;143:415-422. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.0.

