

TC
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

DİYABETİK RATLARDA AKSİYEL PATERNLİ
FLEPLERDE ERİTROPOİETİN VE VASKÜLER
ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN FLEP
YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR DAL

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. ADEM ÖZKAN

DENİZLİ-2016

TC
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

DİYABETİK RATLARDA AKSİYEL PATERNLİ
FLEPLERDE ERİTROPOİETİN VE VASKÜLER
ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN FLEP
YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZGÜR DAL


TEZ DANIŞMANI

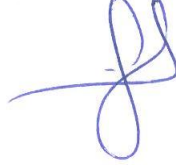
YRD. DOÇ. DR. ADEM ÖZKAN

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi'nin 2015TIPF00033 nolu kararı ile
desteklenmiştir.

DENİZLİ-2016

Yrd. Doç. Dr. Adem Özkan danışmanlığında **Dr. Özgür DAL** tarafından yapılan “**Diyabetik Ratlarda Aksiyel Paternli Fleplerde Eritropoietin ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Flep Yaşayabilirliği Üzerine Etkisi**” başlıklı tez çalışması 13/07/2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Plastik Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN: Prof. Dr. İnci Gökalp Kara


ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Selman Hekim ALTUNTAŞ


ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Adem Özkan


Yukarıda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

14/07/2016



Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı
Prof. Dr. İlgaz AKDOĞAN
Dekan

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi etik ve kültürünü bizlere yansıtan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. B. İnci Gakalan Kara'ya, mesleki bilgi ve becerilerini paylaşip tez çalışması boyunca her türlü destek ve yardımda bulunan tez hocam Yrd. Doç. Dr. Adem Özkan'a, mesleki gelişimimde her türlü cerrahi bilgi ve becerilerime katkıda bulunan değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. R. Hakan Özcan'a ve Yrd. Doç. Dr. Adem Topkara'ya; tez çalışmasının patolojik inceleme aşamasında mikroskopik incelemeleri yapan Patoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Metin Akbulut, asistan ve çalışanlarına;

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığımız, hocalarımdan sonra mesleki bilgi ve becerilerime büyük katkıları olan uzman kıdemlilerime; halen uzmanlık eğitimine devam eden asistan arkadaşlarım Dr. Ali Şimşek, Dr Adem Usta, Dr Başak Karasu ve Dr Erkan Kural'a; anabilim dalı ve poliklinik sekreterimiz Gülseren Solak'a; plastik cerrahi servisinde, polikliniğinde ve ameliyathanesinde çalışan hemşire, sekreter ve yardımcı sağlık personeli arkadaşlarıma; tezin deney kısımlarının gerçekleştirildiği PAÜ Deneysel Hayvan Araştırmaları Laboratuvarı çalışanlarına;

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan anneme, babama, abilerime ve ablama;

Asistanlık eğitimim boyunca ve tez hazırlama aşamasında sabrı ve sevigisiyle desteğini her zaman hissettiren sevgili eşim Elif Dal'a TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
ÖZET	XI
ABSTRACT	XIII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
YARA İYİLEŞMESİ	3
DİYABETES MELLİTUS.....	3
FLEPLERİN TANIMLAMASI ve SINIFLANDIRILMASI	5
Flep Tanımı ve Tarihçesi	5
Fleplerin Sınıflandırılması.....	6
Flep Fizyolojisi.....	7
Flep Kan Akımının Ayarlanması.....	9
Flep Kaybı ve İskemi Reperfüzyon Hasarı.....	10
Hayvan Modeli ve Deri Flebi.....	15
ERİTROPOİETİN	16
VASKULER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ.....	18
DENEYSEL MODELLERDE DİYABET ve FLEP DOLAŞIMI	21
Streptozocin	21
Diyabetik Ratlarda Flep Dolaşımı	22
GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI BÖLÜMLER	23
CERRAHİ İŞLEM.....	24
Ratlarda Deneysel Diyabetes Mellitus Oluşturulması	24
Cilt Flebinin Kaldırılması.....	24
GRUPLAR.....	27
SAKRİFİKASYON PROTOKOLÜ	30
DEĞERLENDİRMELER	30

Yüzey Alan değerlendirilmesi	30
Histopatolojik değerlendirme.....	31
İstatistiksel Değerlendirme.....	32
BULGULAR.....	33
Genel Değerlendirme Sonuçları.....	33
Yüzey Alan Değerlendirme Sonuçları.....	36
Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	38
TARTIŞMA.....	41
SONUÇ	53
KAYNAKLAR	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMP	: Adenozin-Mono-Fosfat
ATP	: Adenozin-Tri-Fosfat
AR	: Aldoz Redüktaz
AV şant	: Artriyo-Venöz Şant
BAP	: Bilimsel Araştırma Projesi
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
DAG	: Diaçil Gliserol
ECGF	: Endotelyal Hücre Büyüme Faktörü
EPO	: Eritropoietin
EPOR	: Eritropoietin Reseptörü
GFAT	: Glutamin:Fruktoz-6-Fosfat Amidotransferaz
GSH- Px	: Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
ICAM	: İntraselüler Adhezyon Molekülü
IL-1	: Interlökin-1
İ-R	: İskemi Reperfüzyon
KAT	: Katalaz
KDH	: Ksantin Dehidrojenaz
KO	: Ksantin Oksidaz
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MMSC	: Multipotent Mezenkimal Kök Hücre
MÖ	: Milattan Önce
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
Na-K-ATPaz	: Sodyumpotasyum ATPaz
NE	: Norepinefrin
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz

PAD	: Periferik Arteryal Hastalık
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
PAÜTF	: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
PBS	: Fosfat Buffer Solüsyon
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGE1	: Prostaglandin E1
PGF2 α	: Prostaglandin F2 α
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PKC	: Protein Kinaz C
PNL	: Polimorf Nüveli Lökositler
Pre-mRNA	: Öncü Mesajcı Rna
rHuEPO	: Rekombinant İnsan Kaynaklı Eritropoetin
SDH	: Sorbitol Dehidrogenaz
STZ	: Streptozocin
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Süperoksit Radikalleri
TNF α	: Tümör Nekrozis Faktör α
TGF- β	: Transforming Growth Faktör $-\beta$
TRAM	: Transvers Rektus Abdominis Kası
TXA2	: Tromboksan A2
VEGF	: Vasküler Endoteli Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
yy	: Yüzyıl

ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Derinin Kan Dolaşımı. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles And Physiology Of Skin Flap Surgery	7
Şekil 2: Derinin Mikrodolaşımı.....	8
Şekil 3: Reperfüzyon Sırasında Direkt Olarak Hücresel Hasar Oluşturabilen Toksik Oksijen Radikallerinin Oluşumu.....	12
Şekil 4: Kaudal Tabanlı Aksiyel Paternli McFarlen Fasyokutan Flebi.....	16
Şekil 5: VEGF'nin Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi	20
Şekil 6: Histopatolojik Skorlama Sonuçlarının Grafikselsel Karşılaştırması.....	38
Resim 1: Ratların Anestezi Sonrası Operasyon Bölgesinin Tıraşlanması ve Preop Flep Planlanmasının Yapılması	24
Resim 2: Flebin Kaldırılması.....	25
Resim 3: Sütürasyon Sonrası Flebin Pozisyonu.....	25
Resim 4: Grup-2 ve Grup-4'de Tedavide Kullanılan EPO Preperatı	26
Resim 5: Grup-3 ve Grup-4'de Tedavide Kullanılan VEGF Preperatı	26
Resim 6: Kontrol Grubu, Flep Kaldırıldıktan 7 Gün Sonra	27
Resim 7: EPO Tedavisi Uygulanan Rat, Flep Kaldırıldıktan 7 Gün Sonra.....	28
Resim 8: VEGF Tedavisi Uygulanan Rat, Flep Kaldırıldıktan 7 Gün Sonra...	28
Resim 9: EPO+VEGF Uygulanan Rat Flep Kaldırıldıktan 7 Gün Sonra.....	29
Resim 10: Flep Kaldırıldıktan 7 Gün Sonra Fleplerin Eksize Edilip, Köpük Zemin Üzerine Sabitlenmesi	29
Resim 11: Adobe Photoshop CS6 İle Flep Yüzey Alan Ölçümü.....	31
Resim 12: Grup 1 Hematoksilen Eosin Boyama Histopatolojik Kesit Görüntüsü.....	33
Resim 13: Grup 2 Hematoksilen Eosin Boyama Histopatolojik Kesit Görüntüsü.....	34
Resim 14: Grup 3 Hematoksilen Eosin Boyama Histopatolojik Kesit Görüntüsü.....	34
Resim 15: Grup 4 Hematoksilen Eosin Boyama Histopatolojik Kesit Görüntüsü.....	35
Resim 16.A-D: CD31 ile boyama	35
Resim 17.A-D: VEGF monoklonal antikor ile boyama.	36

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Histopatolojik Skorlama Kriterleri	32
Tablo 2: Grupların Flep Yaşam Oranlarının Karşılaştırmaları	37
Tablo 3: Grupların Flep Yaşam Oranlarının Yüzdeleri	38
Tablo 4: Grupların Kapiller Dansite Oranlarının Karşılaştırmaları	39
Tablo 5: Grupların Mikroskopik Nekroz Oranlarının Karşılaştırılması	39
Tablo 6: Grupların Konjesyon Oranlarının Karşılaştırılması	40
Tablo 7: Grupların Ödem Oranlarının Karşılaştırılması	40
Tablo 8: Grupların PMNL Oranlarının Karşılaştırılması	41
Tablo 9: Grupların Fibroblast Proliferasyonu Oranlarının Karşılaştırılması	41

ÖZET

Diyabetik Ratlarda Aksiyel Paternli Fleplerde Eritropoietin ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün Flep Yaşayabilirliği Üzerine Etkisi

Dr Özgür DAL

Diyabetes mellitus, mikrovasküler ve makrovasküler hasar sonucunda, rekonstrüksiyon cerrahisinde başarısızlıklara neden olmaktadır. Başarısız cerrahi sonucunda hastanın hastanede yatış ve işe dönüş süresi uzamakta, ilave cerrahi girişimlere bağlı maliyet artmaktadır. Özellikle diyabetik hastalarda sık karşılaşılan diyabetik ayak yaralarında başarısız rekonstrüktif cerrahi durumunda uzuv amputasyonu uygulanmak zorunda kalılabilmektedir. Yara iyileşmesinde ve flep cerrahisinde büyüme faktörleri uygulamasının olumlu etkileri, yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. Eritropoietin(EPO) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü(VEGF) angiyojenezi artırıcı, endotelyal hücre yenilenmesini artırıcı etkileri kanıtlanmış ajanlardır. Ancak literatür taramasında diyabetik ratlarda aksiyel paternli fleplerin yaşayabilirliği üzerine etkilerini gösteren çalışma bulunamamaktadır.

Çalışmamız her grupta eşit sayıda olacak şekilde, 4 grupta toplam 36 adet rat kullanıldı. Ratlarda, planlanan flep cerrahisinden 4 hafta önce diyabetes mellitus oluşturulmuştur. Grup-1 kontrol grubu, grup-2 EPO tedavisi, grup-3 VEGF tedavisi, grup-4 EPO ve VEGF kombine tedavisi uygulanan ratlardan oluşturuldu. Tüm flepler flep kaldırıldıktan 7 gün sonra eksize edildi. Makroskopik flep yaşam yüzdeleri hesaplandı. Hematoksilen eozin, CD31 ve VEGF monoklonal antikoru ile boyama yapıldı. Alınan biyopsi örnekleri histopatolojik kriterlere göre mikroskopik kapiller dansite, nekroz, ödem, konjesyon, PMNL, fibroblast proliferasyonu skorlaması yapıldı. Değerler istatistiksel olarak analiz edildi. Kapiller dansite kıyaslamasında; grup-1 ve grup-2 arasındaki fark grup-2 lehine, grup-1 ve grup-3 arasındaki fark grup-3 lehine anlamlı bulundu. Mikroskopik nekroz oranları kıyaslamasında grup-1 ve grup-2 arasındaki fark grup-2 lehine, grup-1 ve grup-4 arasındaki fark grup-4 lehine, grup-2 ve grup-3 arasındaki fark grup-2 lehine anlamlı bulundu. Makroskopik flep yaşam yüzdeleri grup-2, 3 ve 4'de grup-1'e göre yüksek bulundu.

Morfolojik ve histopatolojik değerlendirmeler sonucunda EPO ve VEGF'nin flep yaşayabilirliği üzerine pozitif etkileri olduğu bulundu. Histopatolojik

değerlendirmede kontrol grubuna göre tedavi gruplarında kapiller dansitenin yüksek, nekroz oranının düşük olması bu sonucu desteklemektedir. Kombine kullanımda ise EPO'nun tek başına etkisinden daha yüksek bir fayda sağlanamamaktadır.

Anahtar kelimeler: Diyabetes mellitus, Rat, Aksiyel Flep, Eritropoietin, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ABSTRACT

In The Diabetic Rats, The Application Effect of Erythropoietin and Vascular Endothelial Growth Factor on Axial Flap Viability

Dr Özgür DAL

Diabetes mellitus, as a result of microvascular and macrovascular complications, cause failure in reconstructive surgery. As a result of unsuccessful surgery prolonged duration of the patient's discharge and return to work, increases costs due to additional surgeries. Especially in the cases of diabetic foot ulcers failure in reconstructive surgery might result with limb amputation. Positive effects of the growth factors in wound healing and flap surgery practice are shown by many studies. Erythropoietin (EPO) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are angiogenic promoters, enhance endothelial cell remodelling as effective agents. However, we couldn't find any study that showing the EPO and VEGF effects on axial pattern flap viability in diabetic rats.

We use 36 rats in 4 groups. 4 weeks before the flap surgery, we created diabetes mellitus on the rats. We create group-1 as control group, group-2 as EPO therapy group, group-3 as VEGF therapy group, group-4 as EPO and VEGF combination therapy group. All flaps were excised on 7 days after post-elevation. Macroscopic healthy flap area percent was calculated. Specimens were marked with hematoxylin and eosin, CD31 and VEGF monoclonal antibody. Biopsy samples were scored microscopic and histopathological criteries based on capillary density, necrosis, edema, congestion, PMNL and fibroblast proliferation. Values were analyzed statistically. Statistical results of capillary density were; the difference between group 1 and group 2 was significantly in favor of group 2, the difference between group 1 and group 3 was significantly in favor of group 3. Statistical results of microscopic necrosis rates were; the difference between group 1 and group 2 was significantly in favor of group 2, between group 1 and group 4 was significantly in favor of group 4, between group 2 and group 3 was in favor of group 2. Macroscopic healthy flap percent of group 2, 3 and 4 was higher than group 1.

Morphological and histopathological examination results showed that; EPO and VEGF have positive effects on flap viability. The statistical results comparing

treatment group to control group; by high capillaries density and low rate of necrosis supports this conclusion. The effect of combined therapy does not provide a higher benefit than use of EPO therapy alone.

Keywords: Diabetes Mellitus, Rat, Axial Flap, Eritropoietin, Vascular Endothelial Growth Factor

GİRİŞ

Diyabetes mellitus, kalıtsal ve çevresel etkenlerin birleşimi ile oluşan, insülin salınımı, insülin bağlanması veya her ikisindeki patoloji sonucu hiperglisemi ile karakterize metabolik bir bozukluktur. Hastalığın akut komplikasyonları; hiperglisemi, ketoasidoz veya hiperosmolar non-ketotik komadır. Kronik komplikasyonları; kardiyovasküler hastalıklar (hipertansiyon, kalp yetmezliği, ateroskleroz),retinopati, nefropati, nöropati ve yara iyileşmesi ve impotansa sebep olan mikrovasküler bozukluklardır (1).

Flep cerrahisinde sistemik (yetersiz kan akımı, hipotansiyon, arteriyopati, enfeksiyon), çevresel (sıcaklık, kompresyon, gerginlik) ve teknik (hatalı flep planlaması ve uygulaması) nedenlere bağlı nekroz gelişebilmektedir (2-4). Diyabetin flep yaşayabilirliği üzerine olumsuz etkisi birçok çalışma ile gösterilmiştir (5, 6).

Çeşitli büyüme faktörlerinin bir dizi farklı uygulama yolları aracılığıyla flep sağkalımı üzerine olumlu etkileri bildirilmiştir. Angiyogenik büyüme faktörleri lokal olarak sekrete olan proteinlerdir ve embriyogenez, tümör büyümesi, yara iyileşmesi, damar büyümesinin düzenlenmesinde kilit rol oynarlar. Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), basic fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transforming büyüme faktörü β (TGF- β) ve vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri anjiogenezi aktive edebilir ve iskemik hasara uğramış olan deri fleplerinde fonksiyonel mikrodolaşımı yönlendirebilirler (7-10). Eritropoietin (EPO) antiapoptotik, antioksidan, angiyojenik ve nöroprotektif etkileri aracılığıyla iskemiye karşı koruyucu etki gösterir (11). Hematopoietik etkisi yanında EPO mitozu uyarır ve bir büyüme faktörü etkisi aracılığıyla endotel, miyokard, kas ve mezengial hücreler gibi pek çok hücre dizilerinin farklılaşmasını indükler (12). VEGF vasküler permeabiliteyi ve angiogenezi uyarıcı etkisi olan endojen uyarıcıdır. Gelişmekte olan kan damarlarında VEGF ekspresyonu olduğu ve özellikle endotelial hücrelerde VEGF reseptörlerinin olduğu gösterilmiştir (13). VEGF ailesine mensup olan proteinlerin vaskularite gelişiminde en önemli proteinler olduğuna inanılmaktadır. Vaskulagenezde, lenfangiyogenezde, fizyolojik ve patolojik angiogenezde esansiyel rolleri vardır (14). Flep nekrozunun birincil nedenleri yetersiz arteryal giriş, yetersiz

venöz çıkış ya da her ikisidir (3, 4). Flep perfüzyon sorununa yeni bir yaklaşım olarak, polipeptit büyüme faktörlerinin yara iyileşmesi ve kronik iskemik hasar üzerine neovaskülarizasyonu sağlayıcı etkisinden faydalanılması amaçlanmaktadır (15). Bu çalışmanın amacı, flep cerrahisinde başarısızlıkların sık görüldüğü diyabetik hastalar için rat modeli kullanarak EPO ve VEGF kullanılmasının flep yaşayabilirliği ve flep kalitesi üzerine olumlu etkisi olup olmadığını araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

YARA İYİLEŞMESİ

Yara iyileşmesi iyi organize edilmiş olayların ardı sıra gerçekleşmesi ile oluşur. Kompleks biyokimyasal reaksiyonlar ve interaktif hücre etkileşimi sonucu akut yara iyileşmesi; hemostazis, inflamasyon, proliferasyon ve remodelling evrelerinden oluşur. Kısaca dermal dokuda yaralanma sonrasında, intrinsek ve ekstrinsek koagülasyon yollarının aktivasyonu ile platelet aktivasyonu ve fibrin tabaka oluşumu ile hemostazis gerçekleşir. Olay yerine nötrofil ve makrofajların ulaşması ile inflamatuvar faz başlar. Nötrofil aktivasyonu sonucu salınan proteolitik enzimler (matriks metalloproteaz) ile nekrotik dokular, debrisle ve bakteriyel kontaminantlar uzaklaştırılır. Kontrollü ekstraselüler matriks (ECM) indirgenmesi ile hasarlı komponentler uzaklaştırılır, yeni hücre migrasyonu ve bazal membran oluşumu için uygun ortam oluşturulur. Proteinaz enzimleri ile latent fazdaki büyüme faktörleri de aktive olur ve prokollojen'den tropokollojen oluşumu başlar. İnflamatuvar fazın sonuna doğru nötrofiller yerlerini makrofajlara bırakır (16). Makrofajlar VEGF, TGF- β , PDGF gibi birçok büyüme faktörü salgılayarak yara iyileşmesini hızlandırır. Proliferatif faz boyunca yara tabanı yeni granülasyon dokusu, fibronektin, hyaluronik asit ve kollojen için anahtar elementleri barındıran matriks materyalleri ile donatılır. Yara iyileşmesi devam ederken doku sağlamlığı ve direncinin artması için fibroblastlar tarafından salgılanan prokollojen prekürsörlüğünde tip-3 kollojen dominant kollojen olan tip-1 kollojene dönüşür. Reepitelizasyon sağlandıktan sonra reorganizasyon ve remodelling gerçekleşmeye devam eder.

DİYABETES MELLİTUS

Diyabetik hastalarda yara iyileşmesi sıklıkla durmuştur veya olması gerektiği kadar sağlıklı ilerlemez. Diyabetik hastalardaki kötü yara iyileşme mekanizması tartışmalı ve net olamamakla birlikte lokal ve sistemik faktörlerin kombine etkisiyle oluşmaktadır (17). Diyabetik yara tedavisinde yara nedeninin ortadan kaldırılması ve hasta merkezli yaklaşımla lokal yara bakımı önemlidir. Lokal yara bakımının 3 ana komponenti vardır: debritleme, enfeksiyon ve inflamasyon kontrolü, nem kontrolü sağlanması (18).

Diyabete bağlı hiperglisemi sonucu metabolik olaylarda değişiklik ve hücreyel disfonksiyon gelişir: aldoz redüktaz aktivitesinde artış, oksidatif stres artışı, glikozilasyon son ürünlerinin (AGE) kontrolsüz artışı, protein kinaz c (PKC) aktivitesinde artış, heksozamin yolu ve polyol yolunda aşırı aktivasyon görülür (19, 20). Makrofajların fagositoz ve nekrotik dokuları temizleme kabiliyetinde azalma, sitokin ve büyüme faktörü üretiminde bozulma nedeniyle inflamatuvar faz uzar, proliferatif faza dönüşüm gecikir (21) Yara kenarlarındaki keratinositlerin göçü, çoğalması ve farklılaşmaları bozulur (22). Reepitelizasyon tam sağlanamaz ve yarada açıklık kalır. Dermal ve epidermal hücrelerle ilişki halinde olan derideki duyu sinirleri çeşitli nöropeptitler salgılayarak lokal kan akımını düzenlerler ve yara iyileşmesini uyarırlar. Diyabette bu duyu sinirlerinin kaybı angiyojenetik ve reepitelizasyonda zayıflamaya neden olarak yara iyileşmesindeki gecikmeye katkıda bulunur (22-24).

Diyabete bağlı hiperglisemi ve toksik metabolik ürünler sonucunda birçok vasküler bozukluk gelişir. Bunlardan başlıcaları; anormal kan akımı, apoptozis oranında artış, damar permeabilitesinde artış ve ekstraselüler matriks birikimidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda endojen vasküler koruyucu faktörlerin (insülin, VEGF, PDGF ve aktive protein C) hiperglisemik toksik ürünler tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (25).

Mikrovasküler hasar oluşumundan sorumlu temel mekanizmalar; polyol yolunda artış, heksozamin yolunda artış, oksidatif streste artış, PKC aktivitesinde artış ve AGE' de artıştır(26).

Polyol yolunda; hücre içi glukoz aldoz redüktaz (AR) tarafından sorbitole redükte edilir. AR reaksiyon için NADPH bağımlı bir enzimdir. Sorbitol, sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimi aracılığıyla fruktoza okside edilir. Normal hücre glukoz seviyesinde küçük miktarda glukoz bu yol ile metabolize edilir. Diyabete bağlı hiperglisemik durum, AR aktivitesinde artmaya bağlı ozmotik hasara ve Na-K-ATPaz aktivitesinde azalmaya neden olur. AR ve SDH reaksiyona girebilmek için kofaktör olarak NADPH ve NAD⁺ kullanır. Hücre içi NADPH seviyesinde artma ve NADH/NAD⁺ oranında artma sonucu hücre içi redoks dengesi bozulur. Hücre içi NO

üretiminde azalma ve oksidatif stres ürünlerinde artış olur. Redükte glutatyon ve NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonu oluşumunda rol oynar (26).

Diaçil gliserol (DAG) ve PKC hücre içi vasküler fonksiyonda önemli olan hücre içi sinyal molekülleridir. Hücre içi hiperglisemi sonucu glikoliz ara ürünlerinden olan gliseraldehit 3-fosfat gliserol-3 fosfata indirgenir ve açillir. DAG PKC'nin aktivatörü olduğundan konsantrasyonunun artması enzimin aktivasyonuna yol açar. PKC aktivasyonu sonucunda kan akımında değişiklik, damar geçirgenliğinde artma, ECM'de genişleme, apoptozda artma, bazal membran sentezinde artma, lökosit adhezyonunda artma olur (27).

Normoglisemik durumda çok az miktarda glukoz heksozamin yolu ile metabolize olur. Hiperglisemik durumda heksozamin yoluna glukoz akışında artış olur. Hücre içi hiperglisemide fruktoz 6-fosfat, glikoliz ile metabolize olmaz ve glukozamin 6-fosfata dönüşür. Bu dönüşüm glutamin:fruktoz-6-fosfat amidotransferaz (GFAT) tarafından katalize edilir. Glukozamin 6-fosfattan oluşan N-asetil glikozamin, damar endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde ve mezengial hücrelerde PAI1 ve TGF-beta1'in transkripsiyonlarını aktive eden Sp1 proteinini kovalent olarak modifiye ederek aktifleştirir. Bu modifikasyon gen ekspresyonunda ve protein fonksiyonunda değişikliklere neden olarak diyabet komplikasyonlarının patogenezeine katkıda bulunur (28).

Tip 1 diyabet, tip 2 diyabet ve obezite durumunda vasküler dokularda insülin direncinin kardiyovasküler hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir (29). Diyabetik ve obez hastalarda vasküler dokulardaki insülin direnci sonucunda, vasküler hemostazis için önemli bir faktör olan NO sentezi azalır (30).

FLEPLERİN TANIMLANMASI ve SINIFLANDIRILMASI

Flep Tanımı ve Tarihçesi

Flepler, doku eksikliklerinin onarımı için hazırlanan, tabanı veya pedikülünden giren arter ve venlerle dolaşımı sağlanan deri, deri altı, fasya, kas, kemik ya da bu dokuların kombinasyonunu içerebilen doku parçalarıdır.

Fleplerin rekonstrüktif cerrahide kullanımları M.O. 600'lu yıllara dayanır. İlk kayıtlı flep kullanımı, Sushruta Samhita'nın nazal rekonstrüksiyon amaçlı pediküllü

flepleri kullandığını işaret etmektedir. Vücudun çeşitli yerlerinde yara iyileşmesinde zorluklarla karşılaşıldığı için, bu bölgelerde random flepler denenmiştir (31).

19. yy'a kadar bir süreçte bu bilgilerin hepsi unutulmuş, durağan süreç başlamıştır. Carpue alın fleplerini başarılı bir şekilde kullanması ile 20. yy'da yeniden ilerleme dönemine girilmiş ve ilk kez random tüp flepler kullanılmaya başlanmıştır. Yine bu dönemde fleplerde delay ile flep yaşamını arttırma prosedürü yapılmaya başlanmıştır. Carl Manchot, bir Alman anatomist, 1889'da deride kanlanmayı sağlayan anatomik bölgeleri tanımlamıştır (32). Tansini 1906'da latissimus dorsi muskulokutan flebi tanımlamıştır (33).

1950-1975 yılları arasında dönemin en önemli gelişmesi McGregor ve Morgan tarafından random ve aksiyel paternli flep kavramlarının ortaya atılması ve tam olarak açıklayamasalar dahi aralarında bazı farkların olduğunu belirtmeleridir. Fasya-deri ve kas-deri fleplerindeki hızlı gelişmeye ek olarak ameliyat mikroskobunun kullanıma girmesiyle birlikte serbest doku aktarımları gündeme gelmiştir (34).

1977'de Ger Atlanta'da ilk kez kas ve kas-deri fleplerini, 1981'de Ponten fasyokutan flepleri tarif etmiştir. 1981'de Mathes ve Nahai kas fleplerini vasküler anatomiye göre sınıflamışlardır (35). 1987 de Taylor anjiozomları tarif etmiştir (36).

Fleplerin Sınıflandırılması

Flepler; taşınma şekli ya da hareket kabiliyetine göre, dolaşım şekline göre ve içerdiği dokuya göre tiplendirilirler (3, 37-39).

Flepler taşınma şekline göre: lokal ve uzak flepler olarak ikiye ayrılır. Lokal fleplere ilerletme flepleri, transpozisyon flepleri, rotasyon flepleri, interpolasyon flepleri örnek olarak gösterilebilir. Uzak flepler ise serbest flepler ve uzun pediküllü fleplerdir.

Flepler içerdiği doku tipine göre: cilt flepleri, fasya, fasya-cilt flepleri, adipofasyal flepler, kas ve kas-cilt flepleri, kemik dokusu içeren flepler, üç farklı dokuyu beraber içeren flepler olarak isimlendirilirler.

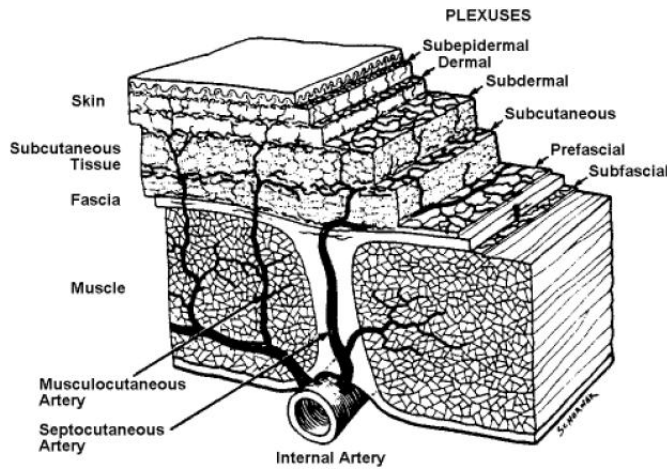
Deri flepleri dolaşım paternlerine göre: random paternli flepler ve aksiyel paternli flepler olarak ikiye ayrılmıştır. Random paternli fleplerde, flep dolaşımını sağlayan dominant belirgin bir pedikül yoktur. Flep, dermal ve subdermal pleksustan

beslenir. Aksiyel paternli fleplerde flebin içinde aksı boyunca seyreden özel direkt kutanöz arteri, anatomik arteryal-venöz damarları mevcuttur.

Flep Fizyolojisi

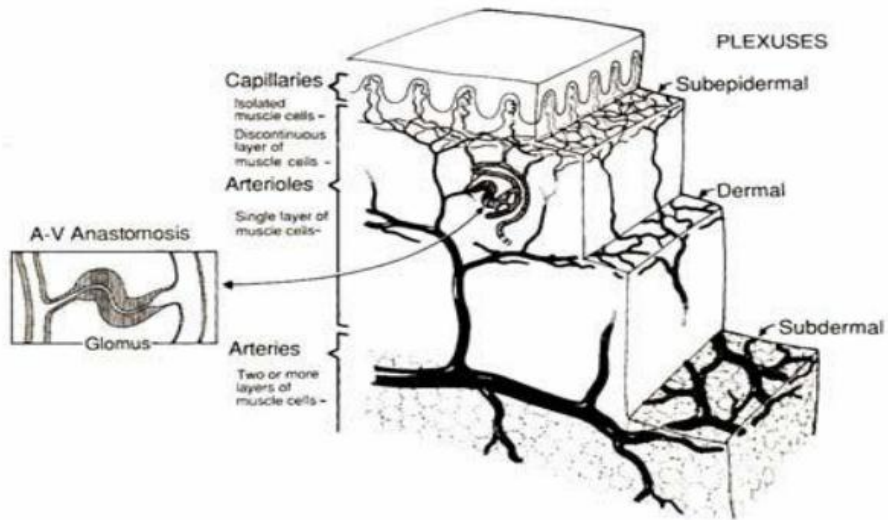
Fleplerin vasküler dolaşımı makrodolaşım ve mikrodolaşım kısımlarından oluşmaktadır. Her iki komponent de flep perfüzyonunu dolayısıyla yaşayabilirliğini etkileyen iç ve dış faktörlere bağlıdır. Makrodolaşım flebi besleyen ana arter ve venler sayesinde sağlanır. Makrodolaşımın anatomisi flebin tanımlanmasında ve tasarımında kullanılır. Flebin ana arteriyal akımı ve venöz geri dönüşü mikrodolaşım yatağı tarafından oluşturulur, böylece flebin beslenmesi ve oksijen ihtiyacı karşılanırken karbondioksit ve metabolik atıkların flepten uzaklaştırılması sağlanmış olur. Bu mikrodolaşım düzeyi arterioller, venüller, kapiller damarlar ile arteriovenoz anastomozlar seviyesindedir ve perfüzyon kontrolünün en fazla olduğu, asıl metabolik değişimin gerçekleştiği yerdir (40, 41).

Derinin beslenme alanları ile ilgili topografik tasvir çalışmaları ilk olarak bir Alman anatomist Manchot tarafından 1889'da kadavrular üzerinde yapılmıştır. 1983'de Spalteholz kaslar ve sonrasında fasyal septalar arasından deriye ulaşan arteriyel sistemleri tanımlamıştır (42). Bu çalışma da fasyokutanöz ve muskulokutanöz fleplerin temelini oluşturmuştur. Bu çalışmalar anatomik temelde açıklayıcı, ancak potansiyel bölgesel vasküler perfüzyon hakkında yetersizdi. Periferik vasküler topografik çalışmaları Manchot ve Salmon, Taylor ve arkadaşları yapmışlar ve zom konseptini tanımlamışlardır (36) (Şekil 1).



Şekil 1: Derinin kan dolaşımı.

Cilt mikrodolaşımı yüzeysel, derin ve orta pleksus olmak üzere üç pleksus ile sağlanır (43). Yüzeysel pleksusta arteriyel ve venöz yapılar bulunur, doku beslenmesi bu tabakadan sağlanır. Arteriyo-venöz şantlar (AV şantlar) derin pleksus seviyesinde bulunur. İki pleksus arasında bulunan ve orta pleksus adını verebileceğimiz pleksusta ise venöz komponent ağırlıklıdır. Deriye gelen kan akımının kontrolü arteriyoller düzeyindedir. Sempatik sistem arteriyoller ve AV şantlardaki düz kas tonusunu düzenleyerek etki gösterir. Her üç pleksusun en önemli görevlerinden biri ısı regülasyonu diğeri ise yeni damar oluşumunu sağlayarak yara iyileşmesine katkıda bulunmalarıdır. Yaşlanma, radyasyon, sigara ve yanıklar mikrodolaşımı olumsuz etkilerler. Mikrodolaşımın olumsuz etkilendiği her durum flep yaşayabilirliğini azaltacaktır (44)(Şekil 2).



Şekil 2: Derinin Mikrodolaşımı

Deri ve derin dokuları besleyen bir ana arterin oluşturduğu alan “anjiozom kavramı” olarak tanımlanır. Anjiozom olarak adlandırılan 3 boyutlu anatomik vasküler alanlar deri ve kemik arasında uzanan bir kaynak arter (segmental veya dağıtıcı) ve buna eşlik eden ven(ler) tarafından beslenir. Her anjiozom eşleşen arterizom (arteriyel alanlar) ve venozom (venöz alanlar) alt gruplarına ayrılabilir. Anatomik çalışmalar vücutta yaklaşık 374 ana perforatörün olduğunu dolayısıyla henüz tanımlanmamış pek çok potansiyel deri flebi alanının olduğunu göstermektedir. Anjiozom kavramı dinamik bir kavramdır. Her zom yanındaki zom

ile ya bağlantı halindedir ve anastomoz yapar buna “true anastomoses” denir ya da kalibrasyonu incelemek diğer anastomoz ile bağlantı kurar, buna da “choke anastomoses” adı verilir. Fleplere “delay” prosedürü uygulandığında “choke anastomoses”, “true anastomoses” kalibrasyonuna dilate olurlar. Bir sonraki aşamada Taylor ve Minabe vasküler bölgeleri tam olarak tanımlayabilmek için Salmon’un “retiform anastomoses” kavramını “choke anastomoses” kavramı ile birleştirmişlerdir. Arteriyel sisteme eşlik eden venöz bağlantıların (“oscillating veins”) olduğunu söylemişlerdir. Bu venlerin kapaksız venler olduğu ve her iki yönde kan akımına olanak sağladığı belirtilmiştir. Bu sayede ters akımlı flepler dizayn edilmiş ve fizyolojileri açıklanabilmiştir (44).

Deri kan akımının ana düzenlenmesi arteriolar düzeydedir. Sempatik tonus, prekapiller sfinkterler, arterioller ve arteriovenöz anastomozlardaki akımı düzenler. Lokal ya da sistemik sempatik tonusa cevap olarak prekapiller sfinkterlerin kontraksiyonu, kan akımının kapiller yatağı arteriovenöz anastomozlar aracılığıyla by-pass etmesine neden olur. Bunun dışında flep kan akımı; sistemik santral kan basıncı ve mikrodolaşımdaki endotel, trombosit, kan hücreleri gibi hücrel faktörlerden de etkilenir (44).

Flep Kan Akımının Ayarlanması

Deri kan akımı sistemik ve lokal etki mekanizmaları ile kontrol edildir. Sistemik kontrol nöral ve humoral regülasyonun kontrolü altındadır. Nöral regülasyon predominanttır ve primer olarak sempatik fiberler ile α -adrenerjik reseptörler üzerinden vazokonstriksiyon yaparak; β -adrenerjik reseptörler üzerinden vazodilatasyon yaparak etki ederler. Ek olarak α -adrenerjik reseptörler arteriovenöz anastomozlar üzerinde bulunurlar ve vazokonstriksiyon yaparlar. Bu mekanizma sayesinde, arteriyol ve arteriovenöz anastomozlarda bulunan düz kasların tonusu değiştirilerek regülasyon sağlanır (45).

Humoral regülasyonda sistemik vazoaktif maddeler spesifik reseptörleri üzerinden etkilidirler. En önemlilerinden epinefrin ve norepinefrin (NE) α -adrenerjik reseptörler aracılığı ile vazokonstriksiyon yaparlar. Kortizol ise bu yolları dolaylı olarak etkileyerek görevini yapar (45).

Endojen vazoaaktif maddeler ise kendilerine spesifik reseptörler üzerinden etki gösterir. Serotonin, tromboksan A2 (TXA2), prostoglandin F2 α (PGF2 α) vazokonstruksiyon yaparken; prostoglandin E1 (PGE1) prostoglandin I2 (prostosiklin), histamin, bradikinin, lökotrien C4 ve D4 vazodilatasyona neden olmaktadır (45).

Kan akımının lokal kontrolü başka deyişle otheregölasyonu, vücudun pek çok bölgesinde kontrol mekanizmasıdır. Özellikle metabolik hızın yüksek olduğu kas iskelet sistemi bu şekilde idare olunur. Hiperkapni, hipoksi, asidozis gibi metabolik faktörler vazodilatasyon nedenidirler. Ek olarak fiziksel faktörlerin pek çoğu da kan akımı regölasyonunda etkilidir. Artmış doku perfüzyon basıncı “myojenik refleks” i tetikler. Bu da vazokonstriksiyon ile sonuçlanır. Lokal hipotermi lokal kan akımını azaltarak direk vasküler düz kaslara vazokonstrüktör etkide bulunur. Hipertermide bunun tersi etkidedir. Reolojik (akış bilim=maddenin sıvı halini inceleyen bilim dalı) faktörler sadece anormal kondisyonlarda kan akımına etkilerler (45).

Flep Kaybı ve İskemi Reperfüzyon Hasarı

Fleplerde total sağkalım veya distal parsiyel nekroz oluşması, fleplerin doğal kan akımlarına ve iskemi toleransına bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Fleplerde nekrozun flep distalinde gerçekleşmesinin nedeni, elevasyon sonrası perfüzyon basıncının en düşük olduğu yerin flep distali olmasıdır. Fleplerde distalde arteriyollarda vazokonstriksiyon da bu sürece katkıda bulunmaktadır. Flep elevasyonu sonrası besleyen damarlar ve sempatik sinirler flepten ayrılır. İlk 12-18 saat içinde dramatik olarak flep distalinde kan akımı azalır. Kan akımı azalması sonrasında vazokonstriktör madde salınımları nedeni ile akım daha da azalır. Sempatik nörotransmitterler 12-24 saat içerisinde tükenirler. 2-3 gün sonra da flep yatağından revaskülarizasyon meydana gelir. Flep distalinde bulunan iskemi 6-12 saat boyunca devam ederse dolaşım sağlandığında reperfüzyon hasarı nedeni ile mikrovasküler kapanma meydana gelir ve genellikle dokularda nekroz gelişir (44).

Kihiabani (46) ve Kerrigan (3) yaptıkları çalışmada iskemi sonrası reperfüzyon yaralanması olayında kas ve deri fleplerinde farklılıklar tespit etmişlerdir. Kas fleplerinde reperfüzyon sonrasında erken hiperemik fazda vazoaaktif maddeler etkisi

ile kan akımının arttığını gösterirken, yine bu vazoaaktif maddeler nedeni ile deri fleplerinde vazokonstriksiyon olmaktadır.

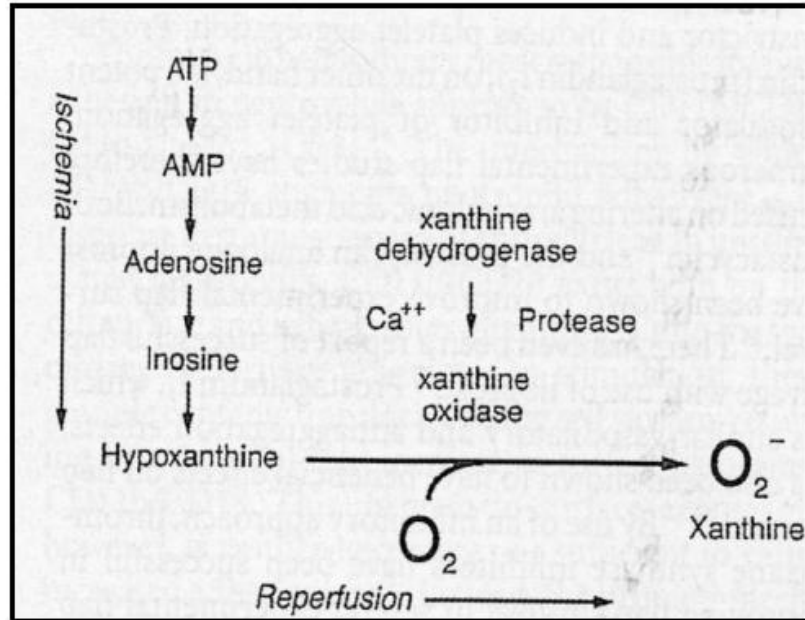
Arteriyel yetmezlikler flep nekrozunda oldukça önemli olmasına rağmen venöz dönüşte oldukça önemlidir. Serbest doku nakillerinden sonra venöz oklüzyona bağlı flep kayıpları daha ön plana çıkmaktadır (47). Yapılan hayvan çalışmalarda sekonder iskeminin primer iskemiye oranla flep kaybında daha kötü sonuçlar doğurduğu bilinmektedir.

Kerrigan ve ark.'ları (3), üç durumda flebin tamamının nekroza gideceğini bildirmişlerdir. Bunlar; intrinsik kan akımından daha geniş hazırlanmış flepler, arteriyel tromboz ve venöz tromboz olarak sıralanmaktadır. Random ya da aksiyel tasarımlı pediküllü fleplerde tromboz genellikle hatalı flep planlaması sonucunda mikrodolaşımda düşük akım paterninin gelişmesine, iskemi reperfüzyon hasarına, mikrodolaşımı etkileyen sistemik faktörlere (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstrüktörler) ya da flebin fiziksel kompresyonuna (uygun olmayan adaptasyon, king, hematoma) sekonder olarak ortaya çıkar.

Flebin kaldırılmasından sonra özellikle flebin iskemik distal kısmında çok sayıda ve ileri derecede metabolik değişiklikler ortaya çıkar. İskemik dokularda oksijen düşüşü ile anaerobik metabolizma hızlanır, glikoz ve Adenozin-Tri-Fosfat (ATP) seviyelerinde hızlı düşüş, buna karşın karbondioksit ve laktik asit seviyelerinde artış meydana gelir. Prostaglandin ve tromboksan düzeyleri ciddi şekilde yükselir. Glikoz ve glikojen tüketimi flebin iskemik ancak yaşayan bölümlerinde, iskeminin derecesine göre artış gösterir. Glikoz tüketimi 3. günde pik yapar ve 7. günde normale döner (44).

İskemik kalan dokuda oksijen yetersizliği nedeniyle aerobik solunumun yerini anaerobik solunum alır, hücresel oksidatif fosforilasyon durur ve buna bağlı olarak ATP ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır (48). Dokuda hücresel yaşamın devamı için gereken enerjiyi sağlamak için çok daha fazla substrat kullanılmaya başlar buna sekonder olarak da dokuda karbondioksit (CO₂) ve laktik asit gibi hücresel atıklar birikir. Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan sodyumpotasyum ATPaz (Na-K-ATPaz) pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde sodyum (Na) ve kalsiyum (Ca) konsantrasyonları artar(49).

Hücre içinde Ca konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir (50). Bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile ve hücre zarındaki fosfolipidlerin katabolizmasının başlaması nedeniyle proinflamatuvar sitokinlerin ve lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış oluşur. İskemi döneminde ATP üretimi anaerobik yolla oldukça azalarak devam ettiği halde hücresel kullanımı devam ettiği için ATP'nin yıkım ürünleri olan adenosin-mono-fosfat (AMP) ve adenosin miktarı artar. Adenosin ise hücre dışında inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP ve fosfokeratin) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine hücre içinde inaktif durumda olan proteazların aktive olarak ksantin dehidrojenazın (KDH), ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar (51). Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle KDH, KO'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır. Sonuç olarak toksik süperoksit radikallerinin oluşumu da artar (52) (Şekil 3).



Şekil 3:İskemi reperfüzyon hasarı

İskemi-reperfüzyon (İ-R) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli teoriler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir.

İskemi reperfüzyon hasarını oluşturan dört ana bileşen:

1. Serbest oksijen radikalleri,
2. Polimorf nüveli lökositler (PNL),
3. Kompleman sistemi,
4. Endotel hücreleridir.

Serbest oksijen radikalleri

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar bir atom veya molekülde birbirlerini eşleyecek miktarda buldukları için atom veya molekül stabildir; ancak moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı oluşması molekülü reaktif hale getirir. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve hücrel mekanizmalarla olası zararlı etkileri önlenir. Hücrelerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranıdır (53).

Solunumla alınan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrielerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i de serbest radikallere dönüşmektedir . Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H₂O₂)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir. H₂O₂, katalaz (KAT) veya glutatyon peroksidaz (GSH- Px) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür veya Fenton reaksiyonu sonrası hücre için çok toksik olan hidroksi (OH-) molekülü oluşur. Hidroksil radikali negatif yüklü olması nedeni ile DNA, 21 protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Membran lipitlerinin peroksidasyonu ve hücre zarının sekonder olarak permeabilitesinde artma, hücrel proteinlerde çapraz bağ oluşumu ile proteinlerin yapı ve fonksiyonunun bozulması, DNA'nın yapısında bulunan timin

ile reaksiyona girerek sarmal yapının kırılması serbest radikallerin hücre içinde oluşturduğu etkilerdir. Süperoksit radikalleri (SOR) aynı zamanda PNL'ler için kemotaktik özellik gösterir (54).

Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde endotel hücrelerinde NO oluşumu azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF α gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur (54).

Polimorf Nüveli Lökositler (PNL)

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik yapılan çalışmalar, reperfüzyonda vasküler permeabilitedeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir (55, 56). İ-R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit adezyonu meydana gelir (57) . İskemi reperfüzyon hasarında PNLlerin rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür (55, 56). Bunlar:

- 1) Mikrovasküler oklüzyon,
- 2) SOR salınması,
- 3) Sitotoksik enzim salınması,
- 4) Vasküler permeabilite artışı,
- 5) Sitokin salınmasında artış,
- 6) Apoptozun tetiklenmesi.

Yapılan son çalışmalarda, nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur (58). PNLler damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktive olmuş trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya neden olurlar (59). İskemi arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, postkapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Sonuç olarak dokuya tekrar kan akımı sağlansa bile bu tıkaçlar dolaşımın hücrelere

ulaşmasını engelleyebilirler (59). Serbest radikallerin oluşumunda ve İ-R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerirler (60, 61). Bu enzimler oksidatif doku hasarında önemli roller üstlenir. PNLlerin aktivasyonu ile PNL sekonder granüllerden salınan apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kollajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır (60, 61). Bu da kısır döngünün bir parçasıdır.

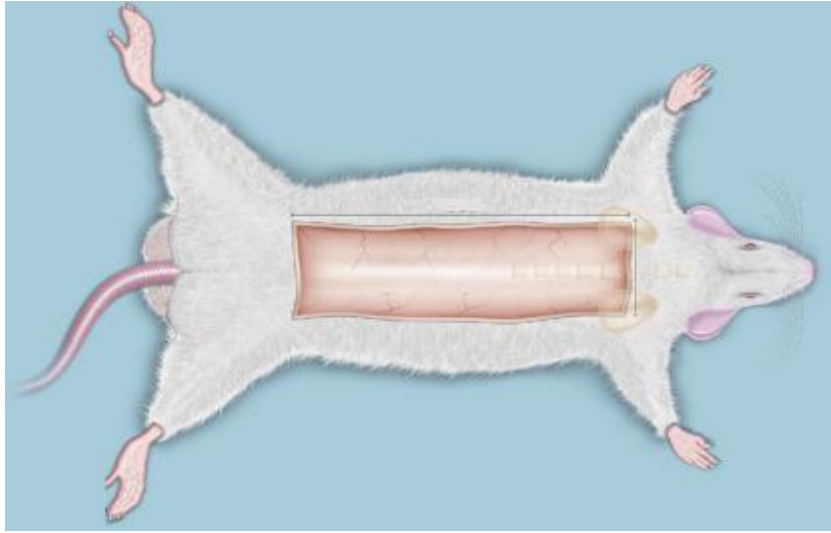
Hayvan Modeli ve Deri Flebi

Rat sırtından hazırlanan ilk flep modeli, 1965 yılında Robert McFarlane ve ark.' ları tarafından tanımlanan kraniyal tabanlı yarımada şekilli rat sırt deri flebidir. O yılların gözde konularından biri olan "geciktirme kavramını" araştırmak üzere geliştirilmiş olan bu model "random" dolaşım paternine sahip kabul edilmiş ve sonraki yıllarda çeşitli araştırmalarda kabul görmüştür. Flep beslenmesinin özellikle flep geciktirme kavramının araştırıldığı modellerde standart bir nekroz alanının bulunması ve kolay hazırlanması nedeniyle bu flep sıkça tercih edilmiştir. Fleplerin vasküler temelinin daha iyi anlaşılması ile random tasarımlı fleplerin rekonstrüktif cerrahide kullanımı azalmış, yerine aksiyel tasarımlı deri fleplerinin kullanımı artmıştır (62).

McFarlen ve ark.'nın orijinal tanımında kranyal tabanlı flep planlanması sabit orijinal noktalara dayanmaktaydı. Her iki skapula ve posterior iliak çıkıntılar işaretlenip flep bu noktalar arasında planlanmıştır. Sabit anatomik noktaların referans alınması hayvan büyüklüğünden bağımsız olarak flebin hep aynı damarlardan beslenmesini sağladığı için bir üstünlük olarak ileri sürülmesine rağmen nekroz oranları hep aynı büyüklükte olmuyordu. Sonraki çalışmalarda McFarlen'in flep tasarımını değiştirip daha tutarlı nekroz oranları sağlanması kaygısı öne çıktı. Rogwer khouri ve ark. ise sırttaki yarımada şeklindeki fleplerinde tutarlı nekroz oranı sağlayıp modeli standartize etmek için, eni 3 ve 4 cm olarak iki farklı yarımada flep tasarımını kaudal ve kranyal tabanlı olarak kullandılar. Yaptıkları çalışmada en tutarlı nekroz oranı kaudal tabanlı hazırlanan 3 cm enindeki fleplerde ortaya çıktı.

Nekroz oranlarının büyük varyasyonlar göstermemesi için kaudal tabanlı dar flepler avantajlı kabul edilmektedir (62).

Flep diseksiyonunda deri altındaki panniculus carnosus kası flebe dahil edilerek derin kas fasyası üzerine kadar kesilir. Deri ve altındaki panniculus carnosus kasından oluşan yarımada şeklindeki flep, kas üzerindeki gevşek ve nisbeten avasküler anatomik planda kolayca kaldırılır. Kaudalden flebe gelen dallar korunur (62)(Şekil 4).



Şekil 4:Kaudal tabanlı aksiyel paternli McFarlen fasyokutan flebi

ERİTROPOİETİN (EPO)

1906 yılında iki Fransız doktor Carnot ve Deflandre memelilerde kan üretiminin “hemopoietin” adında faktör tarafından regüle edildiği hipotezini ortaya atmıştır (63). Yaklaşık 40 yıl sonra Finlandiyalı nefrologlar Bonsdorff ve Jalavisto bu faktörü eritropoietin (EPO) olarak adlandırdı (64). Ancak EPO’nun ortaya çıkarılması, anemisi olan tavşanlardan elde ettiği serumun eritropoezi uyardığını bulan Danimarkalı fizyolog Allan Jacob Erslev’e atfedilir (65). 1977 yılında Miyake ve ark. aplastik anemili hastaların idrarından EPO’yu ayrıştırabilmeyi başardı (66). Sonraki yıllarda EPO, kronik böbrek yetmezliği, kanser, şiddetli ve kronik enfeksiyonu olan anemik hastaların tedavisinde kullanıldı (67).

EPO mitozu uyarıcı faktör ve farklılaştırıcı hormon olarak kaynak hücre bölümünün prekürsörlerinden eritrosit oluşumunu uyaran ve eritrositler için sitokin

görevi gören bir glikoprotein hormondur. EPO üretimi ve regülasyon mekanizması dokuya özeldir. Yetişkinlerde dominant olarak böbrek korteksi peritübüler dokuda fibroblast benzeri hücrelerde sentezlenir. Fetusta öncelikli olarak karaciğerde sentezlenir (68). Böbrek dışında az miktarda karaciğer, kemik iliği, dalak, gastrointestinal sistem, kalp, akciğer, testis, overler ve santral sinir sisteminde de üretilir (69). EPO, eritroid öncü hücrelerde proliferasyon, geç eritroid hücrelerde apoptozis inhibisyon yaparak hematopoezisi sağlar (70). Eritropoietini kodlayan gen 7. kromozom üzerinde yer alır ve 3000 baz çifti içerir. Salınımı esnasında 28 aminoasitini yitirir, matür protein 165 aminoasit içerir. Genin transkripsiyon hızı oksijen bağımlı bir mekanizma ile kontrol edilir. İnsanda normal EPO serum konsantrasyonu 10-30mu/ml (1-7pmol/l)'dir. Endojen üretim hızı 2-4 u/kg/gün'dür (69).

Eritropoezis'de EPO'nun hücre yüzeyine bağlanması eritropoietin reseptör (EPOR)'nün dimerizasyonuna neden olur. Sonrasında doku koruyucu etkisi olan JAK-Kinase yolağı aktive olur (71). Buna paralel olarak aktive olan EPOR ile lizozomal degradasyon sonucu hücrel proteolizis gerçekleşir (72). EPO non-hematopoetik reseptörler aracılığıyla pleotrofik ve doku yıkımını önleyici etki gösterir (73). İskemi reperfüzyonu sınırlandırarak kalp, böbrek, karaciğer ve bağırsaklarda antiinflamatuvar ve antioksidatif etki gösterir (74-76). Bu koruyucu etkileri, oksijen radikal konsantrasyonunu düşürerek, lipoperoksidasyon indüksiyonu yaparak, intraselüler adhezyon molekül (ICAM) ekspresyonu sağlayarak, lökositlerin dokuya infiltrasyonu sonucu TNF- α , interlökin (IL)-1 β ve IL-6 salınımı sağlayarak gerçekleştirir (74, 77-79). EPO'nun VEGF ile kıyaslanabilecek derecede proangiogenik etki gösterdiği tesbit edilmiştir (80). Yapılan çalışmalar sonucunda EPO'nun proinflamatuvar sitokinlerden IL-2, IL-6 ve IL-8, IFN- γ ve TNF- α üretimini inhibe ederek antiinflamatuvar etki oluşturduğu ve yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (81, 82).

EPO'nun angiogenik aktivitesi hem *invivo* hem *invitro* rat aortik-ring modelinde tanımlanmıştır. *In vitro* yapılan çalışmalar yeni damarları oluşturacak fare aortunun enlemesine kesitinden alınan endotelial hücrelerin rHuEPO (rekombinant insan eritropoietini) tarafından uyarıldığını göstermektedir (83).

EPO'nun yara iyileşmesi üzerine etkisine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda: anlamlı derecede yara epitelizasyonunda hızlanma, ekstraselüler matriks kalitesinde artış, angiogenik aktivitede artma sonucunda epitelyal hücre profilerasyonunda artış görülmüş. Bu etkinin moleküler mekanizması endotelial nitrik oksit sentaz (NOS) ve iNOS ekspresyonunda artış ve yara bölgesinde VEGF artışına bağlı olduğu düşünülmektedir (84).

Klinik uygulamalarda, Keast ve Fraser evre-4 bası yarası (kemik dokunun ekspoze olduğu tam kalınlıkta doku defekti) olan anemik hastalara EPO tedavisi uygulanmış. Sistemik EPO uygulaması sonucunda hemoglobin seviyesinde artış tesbit edilmiş. Ülser derinliğinde 2.3 ila 1.2 cm azalma gözlemlenmiş. Bu etkinin sadece oksijen taşınmasının artışına bağlı olmadığı EPO'nun non-hematopoetik etkilerinin de sonucu olduğu düşünülmektedir (85). Ayrıca sklerodermaya bağlı kronik parmak ülseri olan hastaların tedavisinde, ülser iyileşmesini anlamlı derece artırdığı, daha az ağrı hissi ve artmış eklem hareketliliği sonucunda hasta yaşam kalitesinde artış olduğu bildirilmiş (86).

EPO'nun, vücutta otokrin ve parakrin döngü içinde angiogenik etkisi ile tümör büyümesini uyarıcı etkisi olduğu kabul edilebilir. Ancak EPO'nun tümör büyümesi ile doğrudan etkisi net olarak açıklanabilmiş değildir. EPO'nun tümör büyümesi üzerine etkisi multifaktöryel olabilir ve tümör tipine göre üzerindeki EPOR ekspresyonuna bağlı etki derecesi değişebilir (87).

VASKÜLER ENDOTELYA BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

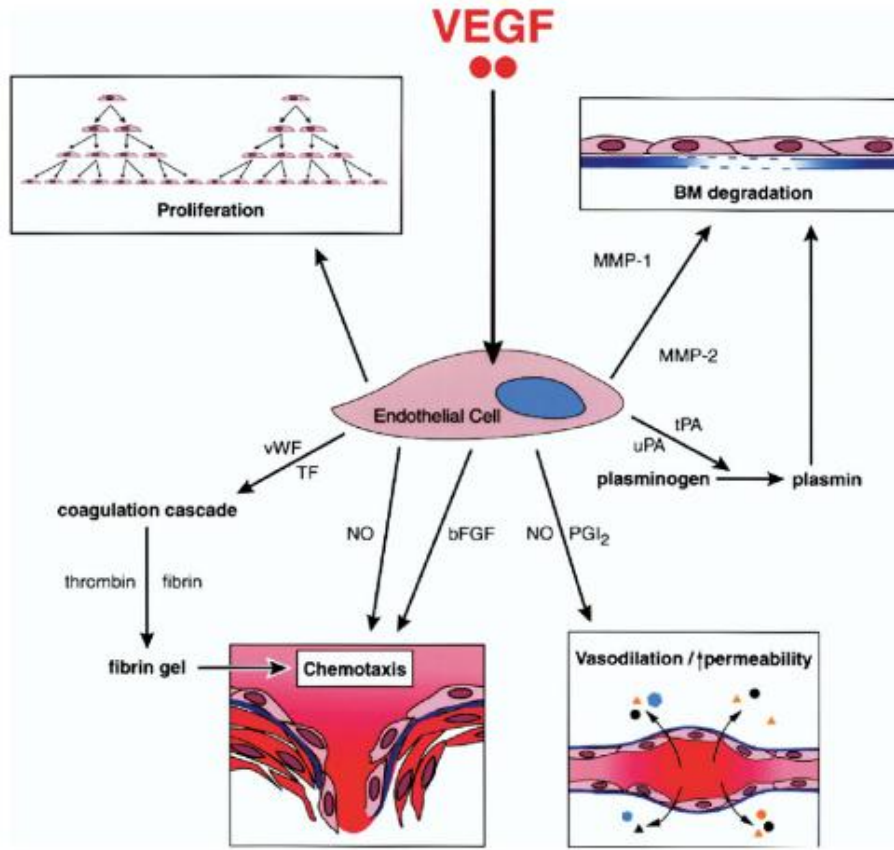
Angiogenik büyüme faktörleri hipoksiyi önleyerek ve vasküler gelişimi destekleyerek kronik yara iyileşmesini destekler (88-90). Büyüme faktörlerinden VEGF'nin vaskularite gelişiminde en önemli protein olduğuna inanılmaktadır. Vaskulogenezde, hem fizyolojik hem de patolojik angiogenezde ve lenfangiyogenezde önemli rolleri vardır (14). VEGF, endotelial hücrelere mitojenik etkisi (91), kemotaktik ajan etkisi (92), vasküler geçirgenliği arttırıcı etkisi (93) ile bu faktörlerin başında gelmektedir. VEGF yara iyileşmesinde görevli birçok hücre tarafından sentezlenmektedir: endotel hücreleri, fibroblastlar, düz kas hücreleri, plateletler, nötrofiller ve makrofajlar (94-99).

VEGF'nin klinik kullanımında, faz-I çalışmalarda ekstremitte iskemisinde, Burger hastalığında, miyokardiyal iskemide kullanılmıştır (100-102). 1996'larda diyabetik olmayan alt ekstremitte arteryal okluzyonu olan hastalarda VEGF₁₆₅ plasmid balon transferi sonrasında kollateral gelişimi ve alt ekstremitte kan akımında artış, intimal kalınlaşma olmadığı tesbit edildi. Ancak gangrenöz ekstremitte geri dönüş sağlanamadı ve ekstremitte ampute edildi (100). Bu çalışma insanlarda deneysel angiogenezis yapılabilirliği açısından önemlidir.

VEGF geni 6p21.3 kromozomu üzerinde bulunur. Tek bir pre-mRNA'nın alternatif splicing'i çok sayıda farklı VEGF türünü oluşturur (103) VEGF reseptör ailesi, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D ve plasental büyüme faktöründen (PIGF) oluşmaktadır. Son yapılan çalışmalar sonucu makrofajlar tarafından salınan VEGF-C alt tipi de keşfedildi (94). VEGF-A'nın bu konuda en önemli faktör olduğu düşünülmektedir. Koroner arter gelişiminde rolü haricinde VEGF-B hakkında çok fazla bilgi yoktur. VEGF-C ve D lenfatik sistem gelişiminde önemlidir, angiogenezi ve artmış vasküler permeabiliteyi indükleyebilir. PIGF ilk kez plasentada tesbit edilmiştir, normal embriyonik ya da erişikin dokularında yüksek düzeyde üretilmemektedir. PIGF'nin patolojik angiogenezde VEGF-A aktivitesini potansiyelize edebildiği gösterilmiştir (104).

VEGF fragmanının x-ışını kristalografisi VEGF'nin, dimerik sistein boğumlu büyüme faktörü süperailisine dahil olduğunu göstermektedir. Bu süper ailenin alt bölümleri mevcuttur. VEGF, bu alt bölümlerden PDGF ailesine mensuptur (105). İnsanlardaki VEGF reseptörleri, tirozin kinaz reseptör ailesine dahil, Flt-1 (VEGFR-1), KDR (VEGFR-2) ve Flt-4 (VEGFR-3)'dür (106-108).

VEGF'nin yara iyileşmesindeki önemli rolünden birisi de angiogenezi stimule etmesidir. Yara iyileşmesi angiogenezinin bir çok basamağında etkilidir: vazodilatasyon, bazal memebran degradasyonu, endotel hücre migrasyonu ve endotelial hücre çoğalması. Paralel kapiller damar filizlerinin anastomozu (loop formasyonu) ile kapiller tüp formasyonunu ve yeni bazal membran formasyonu oluşumunu sağlar (109)(Şekil-5).



Şekil 5: VEGF'nin yara iyileşmesi üzerine etkisi (109)

Hipoksik süreç, hipoksi ile indüklenebilir $1-\alpha$ proteinin aracılığı ile VEGF ve reseptöründe up-regülasyona neden olur. Diyabetik ratlarda oluşan komplikasyonlar sonucunda yara iyileşme bölgesinde hipoksik ortam olması sonucu VEGF ekspresyonu ve reseptör sayısında artma beklenmektedir (110). Hipoksik kondisyondaki diyabetik ve diyabetik olmayan hastaların serum VEGF seviyeleri karşılaştırılmasında, diyabetiklerde daha düşük olduğu görülmüş (111).

VEGF'nin en önemli fonksiyonlarından birisi vasküler geçirgenliği arttırmasıdır (112). VEGF, aminoasit dizilimi bilinmeden önce vasküler permeabilite faktörü olarak tanımlanmıştı. Vasküler geçirgenlikte histaminden daha potanttır (113, 114). KDR reseptörüne bağlanarak nitrik oksit sentaz ve siklooksijenaz aktivitesini stimüle eder (112). Nitrik oksit (NO) ve prostosiklin aracılığıyla eşzamanlı olarak vazodilatasyon ve vasküler permeabiliteyi sağlar (115). VEGF endotelial hücrelerden prokoagulan faktör (Von Willebrand Factor) salınımı sağlayarak platelet adhezyonu ve agregasyonunu başlatır (116). Proteinlerin lokal konsantrasyon artışı

sonucu koagülasyon zinciri aktive olur ve trombin ve fibrin tıkaçlar oluşur. Trombin endotelial hücrelerde progelatinaz A'yı aktive eder. VEGF direkt olarak endotelial hücrelerden, interstisyel kollojenaz (matrix metalloproteinaz [MMP]-1), doku metalloproteinaz inhibitörü ve gelatinaz A(MMP-2) sekresyonunu uyarır. Enzimatik yükseltgeme ve inhibisyon ile endotelial migrasyon için uygun ortam oluşturur. MMP-2, bazal membran ana çatısını oluşturan tip-4 kollojen degradasyonunu sağlar. MMP-1, tip 1-3 kollojen yıkımı yapar (117). Proteolitik aktivite sonucunda bazal membran ve ekstraselüler matriksde yıkım yapar, ekstraselüler alana endotelial hareketi kolaylaştırır. Kemotaksis ve vazodilatasyon etkisi ile yara bölgesine endotelial hücre hareketini sağlar (109, 118). VEGF'nin endotelial hücreler için seçici mitogenik etkisi olduğu düşünülmektedir. Ancak hangi moleküller üzerinden mitogenik sinyalin iletildiği net olmamakla birlikte, NO ve siklik guanosine monofosfat üzerinden etki gösterdiği düşünülmektedir (119). Ayrıca yaşlılığı geciktirici ve endotelial hücrelerin proliferatif kapasitesini onarıcı etkisi mevcuttur (120).

DENEYSEL MODELLERDE DİYABET ve FLEP DOLAŞIMI

Streptozocin

Streptozocin (STZ), N-(methylnitrosocarbamoyl)- α -Dglukozamin yapısındadır, ışıktan korunmalıdır. Nötral pH'da hızla dekompoze olduğu için optimum stabilitesi için ortamın pH'sı 4-4,5 olmalıdır. Bu nedenle STZ çözündürülürken sitrat tamponu kullanılmalıdır. Pankreas β hücrelerini hasarlayarak hem insüline bağımlı hem de insülininden bağımsız diyabet oluşturmaktadır. Yetişkin ratlarda tek doz (40-60 mg/kg) damar içi yolla STZ uygulamasının insüline bağımlı diyabete, yeni doğan ratlarda tek doz periton içi veya damar içi yolla 100 mg/kg STZ uygulamasının insülininden bağımsız diyabete neden olduğu bildirilmiştir (121).

Ratlarda STZ ile diyabet oluşturulmak için, 20mM sodyum sitrat tamponu (pH:4,5) içersinde taze olarak hazırlanmış STZ (buzlu ortamda saklamak koşulu ile) 65mg/kg damar içi yolla ratlara enjekte edilerek diyabet oluşturulmuştur (122). STZ uygulamasından sonra yem ve su alımının serbest bırakıldığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada 50mg/kg tek doz STZ uygulandığında ve açlık kan şekeri seviyesi 250 mg/dL'nin üzerinde olan ratların çalışmaya alındığı bildirilmiştir (123)

Diyabetik Ratlarda Flep Dolaşımı

Diyabetik ratlarda flep iskemi toleransı ile ilgili yapılan çalışmada (5); diyabetik ve sağlıklı ratlarda epigastrik ada flebinde iskemik durum oluşturulduktan 7 gün sonra flep yaşam yüzdeleri ve glukoz metabolizmasında görevli enzimlerin (heksokinaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz) aktiviteleri ölçülmüş. Diyabetik grupta flep yaşam yüzdelerinin daha düşük, enzim aktivitelerinin daha yüksek olduğu görülmüş. Bunun nedeni olarak diyabetik ratların iskemik oksidatif strese yanıtta başarısız ve venöz obstrüksiyona sekonder olarak flep iskemi toleransının düşük olduğu bildirilmiştir.

Farmakolojik olarak diyabet oluşturulan ratlarla yapılan flep cerrahisi ve yara iyileşmesi çalışmalarında, diyabet oluşturulduktan sonra cerrahi uygulama aşamasına kadar kaç gün beklenmesi gerektiği konusunda ortak bir uygulama bulunmamaktadır. Bekleme süreleri 10 gün (124), 14 gün (125), 32 gün (126), 42 gün (127), 56 gün (128) arasında değişmektedir. Biz de çalışmamızda ratlarda diyabet oluşturduktan sonra 4 hafta bekledik.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma için, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 14/10/2015 tarih ve 60758568-020/60004 sayılı yazısı ile onay alınması sonrası çalışmanın yürütülmesi amacıyla Pamukkale Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'nden destek alındı.

Çalışma 40 adet 250-300 g ağırlığında Wistar suşu ratlar üzerinde yapıldı. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi (PAÜTF) Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanan hayvanlar yine aynı laboratuvarda 'PAÜTF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş Esasları' doğrultusunda bakım ve değerlendirmeye alındı.

Ratlar uygun kafeslerde, 22 ± 20 C sıcaklıkta ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanların beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı.

ÇALIŞMANIN YAPILDIĞI BÖLÜMLER

Tüm cerrahi işlemler steril koşullar esasları göz önüne alınarak PAÜTF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Ratların flep materyallerin histomorfolojik ve immunhistokimyasal incelemeleri PAÜTF Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

CERRAHİ İŞLEM

Ratlarda Deneysel Diyabetes Mellitus Oluşturulması

Planlanan cerrahi işlemden 4 hafta önce ortalama 300 grağırlığında ratlar sabah açlık kan şekeri ölçümü yapılması sonrasında 50 mg/kg STZ 1cc sitrat çözeltisi içinde uygulandı. STZ uygulamasından 3 gün sonra rat kuyruk veninden alınan açlık kan şekeri değeri 250 mg/dL üzerinde ölçülen ratlar diyabetik olarak kabul edildi. Toplam 45 adet ratta bu prosedüre (123) uygun diyabet oluşturulduktan sonra, ratlar random olarak 9'arlı 4 gruba bölündü. 9 adet rat olası rat ölümünde yedekte hazır diyabetik rat bulundurmak amacıyla saklandı. 4 hafta boyunca yemek ve sıvı alımında kısıtlama yapılmadan diyabet komplikasyonlarının oluşması için beklendi.

Cilt Flebinin Kaldırılması

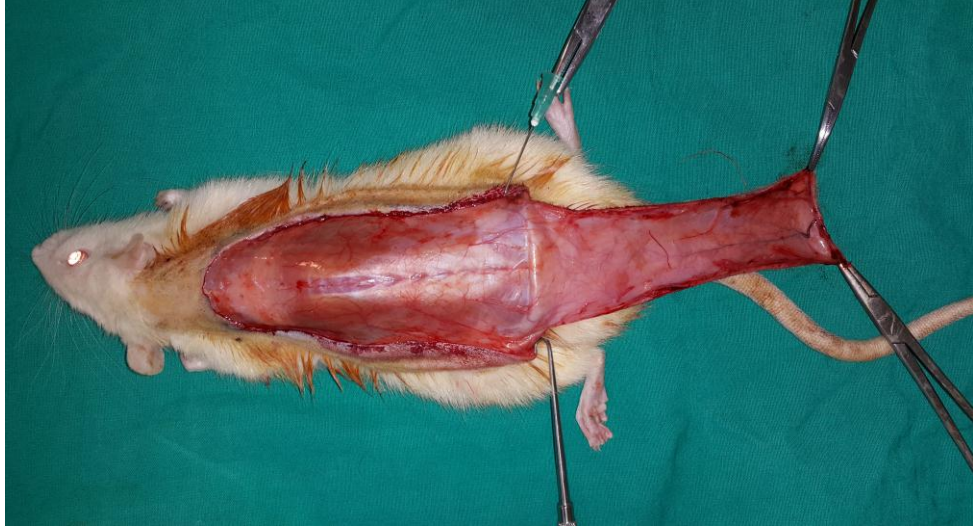
Cerrahi işlemler steril koşullarda PAÜTF Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Ratlar, hipotermiden korunmak amacıyla cerrahi işlemler sonrası anestezi etkisi azalana kadar ışık kaynağı altında ısıtılarak hipotermiden korundu. Tüm cerrahi işlemler, diyabet oluşturulduktan 4 hafta sonra gerçekleştirildi. Ratlara 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi yapıldı. Anestezi altında ratların sırt bölgeleri tıraşlanarak cerrahi yapılacak saha ortaya çıkarıldı.

Cilt kalemi ile süperior kısmı bilateral skapula alt ucu, aşağıda posterior iliak çıkıntılar alt kenarı olacak şekilde 9x3 cm'lik insizyon hattı işaretlendi (Resim 1).



Resim 1: Ratların anestezi sonrası operasyon bölgesinin tıraşlanması ve preop flep planlanmasının yapılması

Cerrahi yapılacak alanda Polyvinylpyrolidone iod (batticon solüsyon) ile lokal saha temizliği yapıldı. Flebin kraniyal ve medial kenarları kesilip, deri ve pannikulus karnosusu içerecek şekilde 9x3 cm'lik sahaya künt diseksiyon yapıldı (Resim 2).



Resim 2: Flebin kaldırılması

Grup 1'de kaldırılan cilt flepleri 1cc izotonik enjeksiyonu yapıldıktan sonra tekrar aynı sahaya 4/0 vicrille suture edildi (Resim 3).



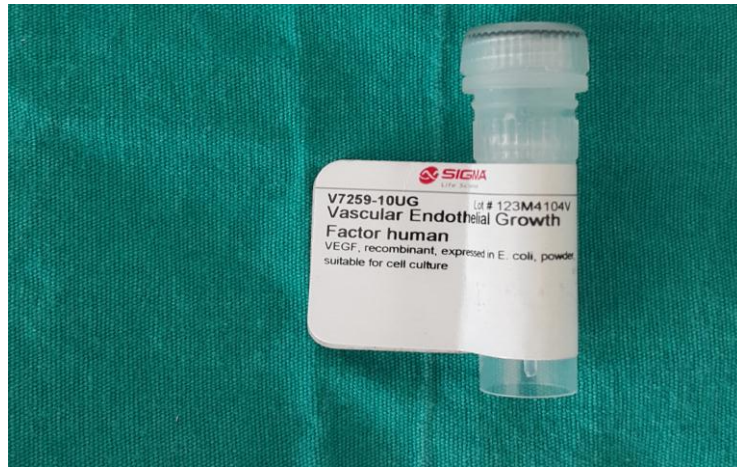
Resim 3: Sütürasyon sonrası flebin pozisyonu

Grup 2’de cerrahiden 48 saat önce, flep eleve edildiğinde ve eleve edildikten 48 saat sonra 300 IU/kg intraperitoneal EPO infiltre edildi.



Resim 4:Grup-2 ve grup-4’de tedavide kullanılan EPO preparatı

Grup 3’de cerrahi işlemden 5 gün önce planlanan flep bölgesine simetrik toplam 10 noktaya subkutan 1cc çözelti içinde 1µg VEGF verildi. 5. günde cilt flepleri kaldırıldı ve aynı yerlerine 4/0 vikril ile sütüre edildi.



Resim 5:Grup-3 ve grup-4’de tedavide kullanılan VEGF preparatı

Grup 3’de cerrahi işlemden 5 gün önce planlanan flep bölgesine simetrik toplam 10 noktaya subkutan 1cc çözelti içinde 1 μ g VEGF verildi. 5. günde cilt flepleri kaldırıldı ve aynı yerlerine 4/0 vikril ile suture edildi.

Grup 4’de cerrahiden 5 gün önce planlanan flep bölgesine simetrik toplam 10 noktaya 1cc çözelti içinde subkutan1 μ g VEGF, flep eleve edilmeden 48 saat önce, eleve edildiğinde ve eleve edildikten 48 saat sonra intraperitoneal EPO infiltrasyonu yapıldı.

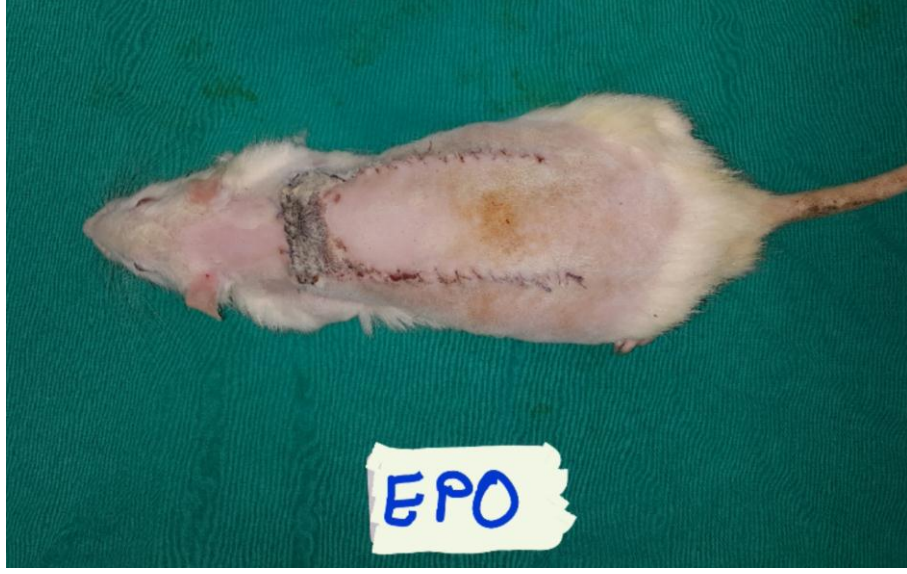
Tüm gruplarda cerrahinin 7. günü 50 mg/kg Ketalar (Ketamin) + 10 mg/kg Ksilazol (Ksilazin) ile anestezi sonrası flepler suturasyon hattının etrafından sağlam cildi de içerecek şekilde total olarak eksize edildi. Flep eksizyonlarının tamamlanması sonrası ratların tümü sakrifiye edildi.

GRUPLAR

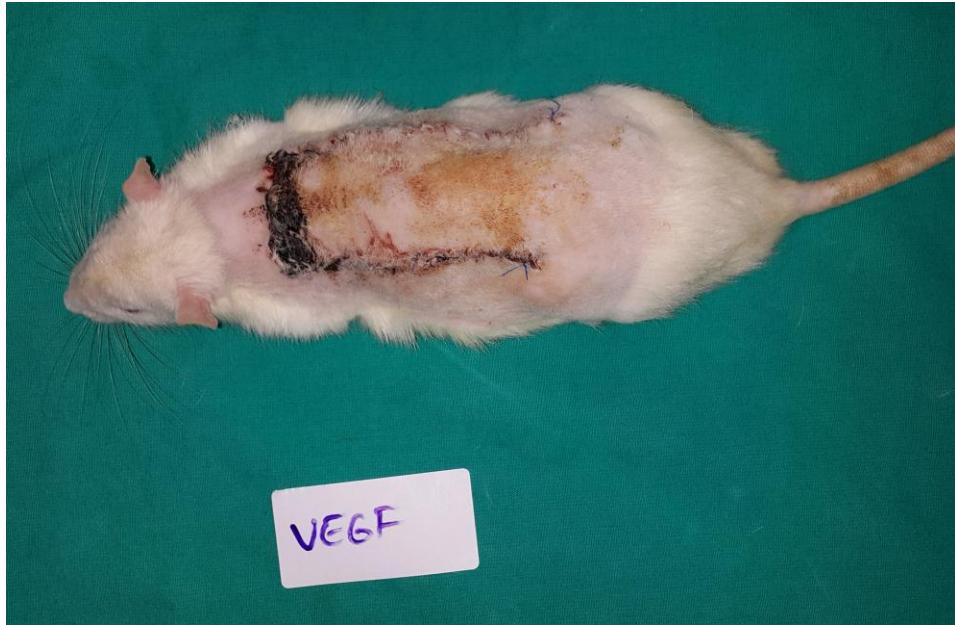
Gruplar 9 adet 250-300 g ağırlığında Wistar ratlardan oluşmuştur. Ratlar diyabet oluşturulduktan sonra randomize şekilde 9’arlı 4 gruba ayrıldı. Kontrol amacıyla 1. grubu oluşturuldu. 2. grup EPO’nun, 3. grup VEGF’ün, 4. grup EPO ve VEGF’ün kombine kullanılmasının diyabetik ratlarda flep yaşayabilirliği üzerine etkisini araştırmak amacıyla oluşturuldu.



Resim 6: Kontrol grubu, flep kaldırıldıktan 7 gün sonra.



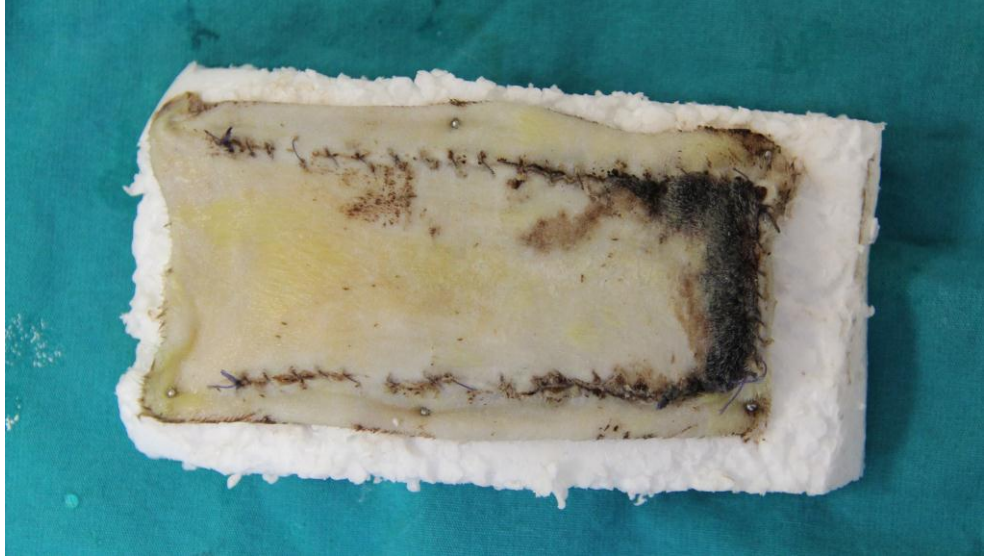
Resim 7:EPO tedavisi uygulanan rat, flep kaldırıldıktan 7 gün sonra.



Resim 8:VEGF tedavisi uygulanan rat, flep kaldırıldıktan 7 gün sonra.



Resim 9:EPO+VEGF uygulanan rat, flep kaldırıldıktan 7 gün sonra.



Resim 10: Flep kaldırıldıktan 7 gün sonra fleplerin eksize edilip, köpük zemin üzerine sabitlenmesi

SAKRİFİKASYON PROTOKOLÜ

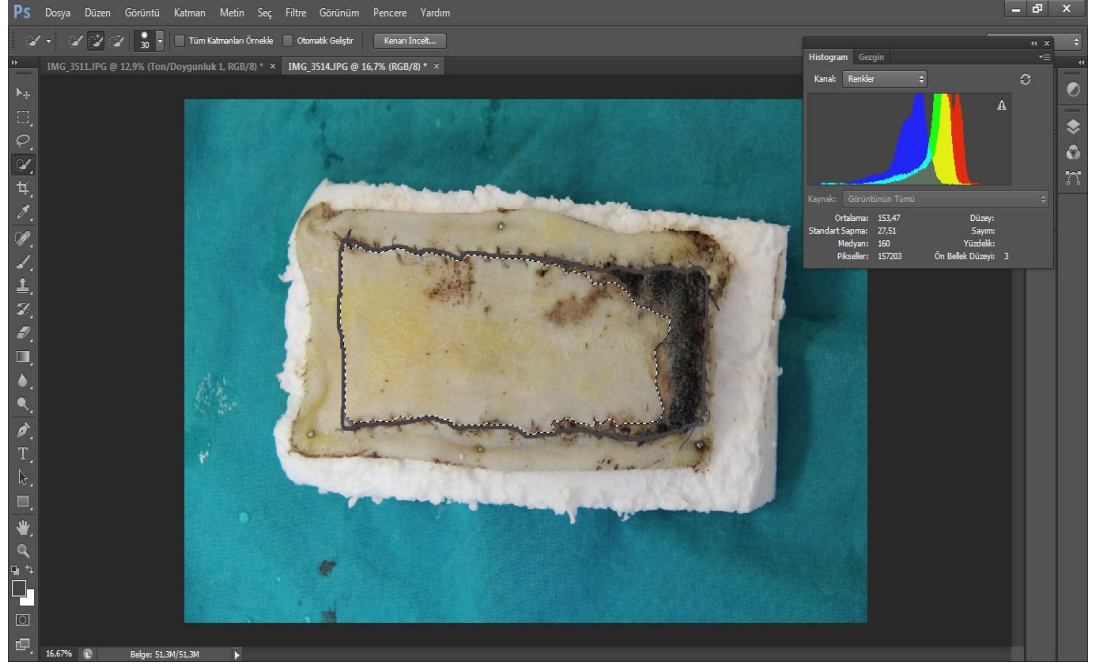
Flep cerrahisinin 7. gününde tüm ratlar anestezi sonrası cilt flepleri suturasyon hattının etrafından histopatolojik değerlendirme için total olarak eksize edildi (Resim 10). Flep eksizyonlarının tamamlanması sonrası ratların tümü servikal dislokasyonla sakrifiye edildi

DEĞERLENDİRMELER

Ratlarda diyabet oluşturulduktan sonraki 4 haftalık süreçte kilo kaybı, belirgin polidipsi, poliüri olduğu gözlemlendi. Flep kaldırıldıktan 7 gün sonra sağlam flep yüzey alanının total flep alanına oranları ve histopatolojik olarak kapiller dansite, ödem, konjesyon, nekroz, polimorf nüveli lökosit ve fibroblast aktivitesi değerlendirildi.

Yüzey Alan değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen tüm ratlar flep kaldırılmasının 7. Gününde 9x3 cmlik cilt flepleri etrafındaki sağlam cildi de dahil edecek şekilde eksize edildi. Eksizyon esnasında grup-1 ratların flep tabanında makroskopik olarak damarlanmanın daha az olduğu, grup-2, grup-3 ve grup-4’de kapiller damarlanmanın belirgin fazla olduğu görüldü. Alınan bu flepler köpük bloklar üzerine iğnelenerek sabitlendikten sonra eşit mesafeden Canon 65D (Canon Corp. JAPAN) digital fotoğraf makinası ile fotoğraflama yapıldı. Fotoğraflar Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems. USA) ve Windows 8 (Microsoft Corporation. USA) programı kullanılarak grafikleştirildi (Resim 11). Photoshop programında, önce sağlıklı alan çizimi sonra tüm flebin alan çizimi yapılarak piksel sayıları kaydedildi. Değerler birbirine oranlandı ve yüzde alan olarak ifade edildi. Fleplerde şüpheli olarak görülen alanlar nekrotik olarak değerlendirildi.



Resim 11: Adobe photoshop CS6 ile flep yüzey alan ölçümü

Histopatolojik değerlendirme

Fleplerin histopatolojik değerlendirmesi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bir patoloji öğretim üyesi tarafından, değerlendirilen materyalin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin semikantitatif yapıldı.

Postoperatif yedinci günde flep nekroz-normal doku geçiş zonundan alınan doku örnekleri %10'luk formalinde tespit edildikten sonra parafin bloklara gömüldüler. Mikrotomla 4 mikronluk kesitler alındı. Kesitler hematoxilen eozin, CD31ve VEGF monoklonal antikoru ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Örneklenen preparatlara 20x büyütmedeTablo-1'deki kriterlere göre skorlama yapıldı.

Tablo 1: Histopatolojik Skorlama Kriterleri

Kriter	Kapiller dansite	Konjesyon	Ödem	Nekroz	PMNL infiltrasyonu	Fibroblast proliferasyonu
0	Kapiller yok	Konjesyon yok	Perivasaküler sıvı yok	Tam iyileşme	0 PMNL infiltrasyonu	Aktif fibroblast proliferasyonu yok
1	0-5 eritrosit ile dolu kapiller	<%25 konjesyon	<%25 perivasküler sıvı	Epidermis ve dermiste tam remodelling	0-5 PMNL infiltrasyonu	Çok ince granülasyon dokusu
2	5-10 arası eritrosit ile dolu kapiller	%25-%50 konjesyon	%25-%50 perivasküler sıvı	Epidermis ve dermiste erozyon, orta seviyede hücrel organizasyon	5-10 PMNL infiltrasyonu	Normal granülasyon dokusu
3	10-20 arası eritrosit ile dolu kapiller	%50-%75 konjesyon	%50-%75 perivasküler sıvı	Nekrotik fakat çok az epidermal ve dermal organizasyon	10-20 PMNL infiltrasyonu	Kalın granülasyon dokusu
4	>20 eritrosit ile dolu kapiller	%75-%100 konjesyon	%75-%100 perivasküler sıvı	Sağlıksız ve enfekte doku	>20 PMNL infiltrasyonu	Çok kalın granülasyon dokusu

İstatistiksel Değerlendirme

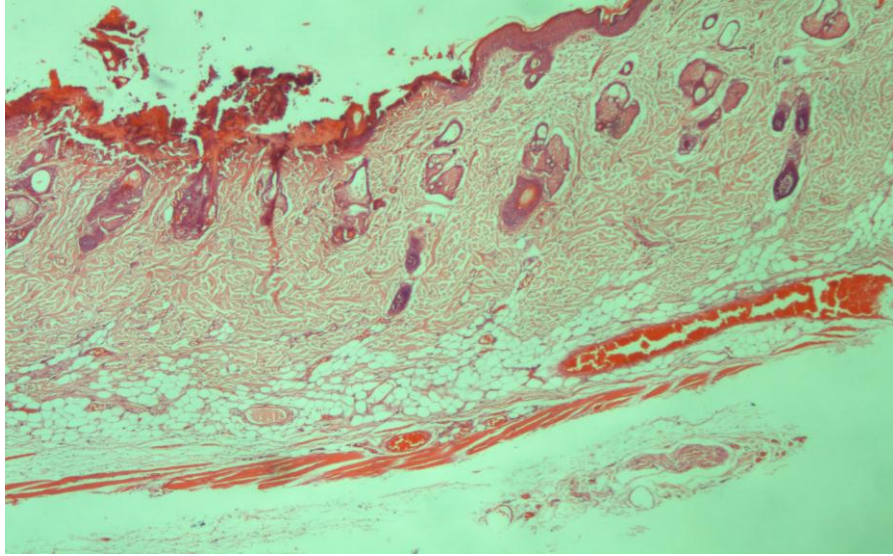
Çalışmada elde edilen tüm veriler SPSS paket programıyla analiz edildi. Gruplar için sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, medyan(min –maks. değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Kruskal Wallis Varyans Analizi için $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

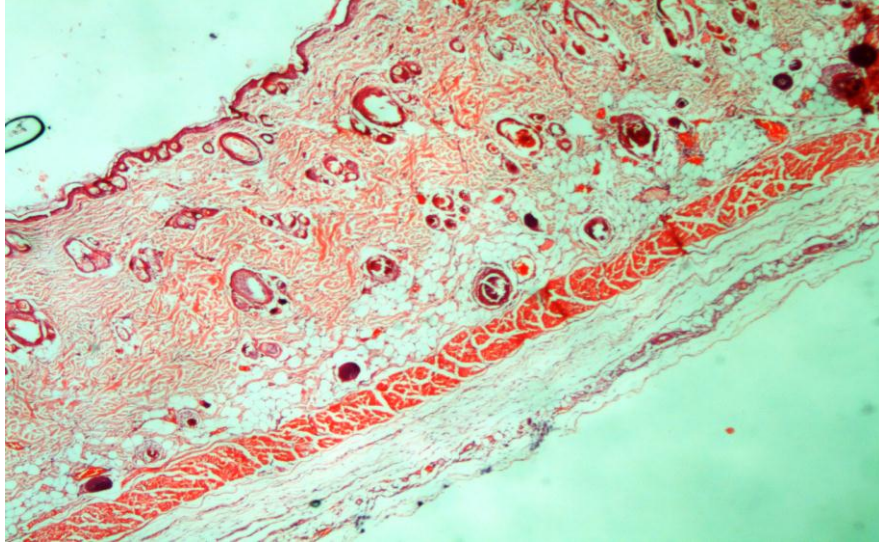
Genel Değerlendirme Sonuçları

Grup-1'in mikroskopik incelemesinde epitelizasyonun yer yer kesintiye uğradığı, subepitelyal alanda belirgin iltihabi hücre infiltrasyonu ve iltihabi granülasyon dokusu artışı izlendi. Makroskopik bakıda kapiller damar yoğunluğunun grup-2,3 ve 4'e kıyasla daha az olduğu gözlemlendi. Subepitelyal alanda diğer gruplara kıyasla daha yoğun nekroz alanları mevcuttu (Resim 12) .

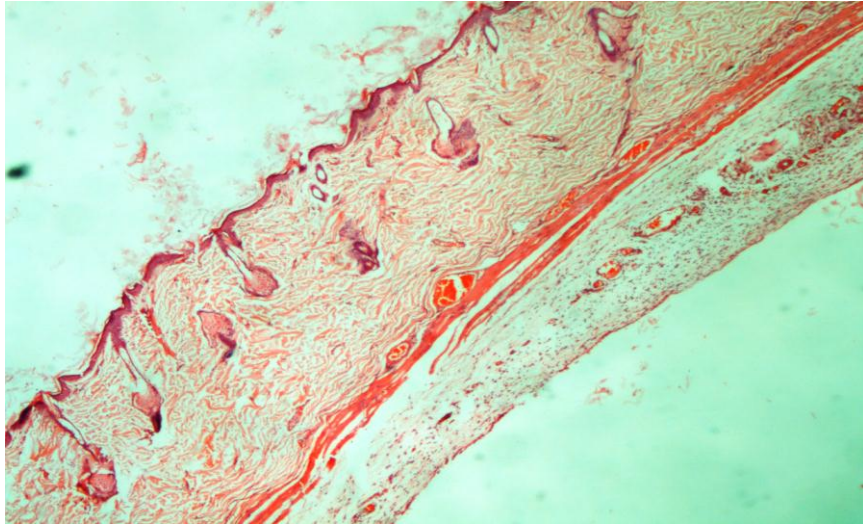
Grup-2,3,4'de kapiller damar yoğunluğunda kontrol grubuna göre belirgin arttığı, yüzey epitelizasyonunun tama yakın olduğu, iltihabi hücre infiltrasyonunun daha düşük düzeyde olduğu, subepitelyal alanda sınırlı sayıda nekroz odakları olduğu görüldü (Resim 13,14,15).



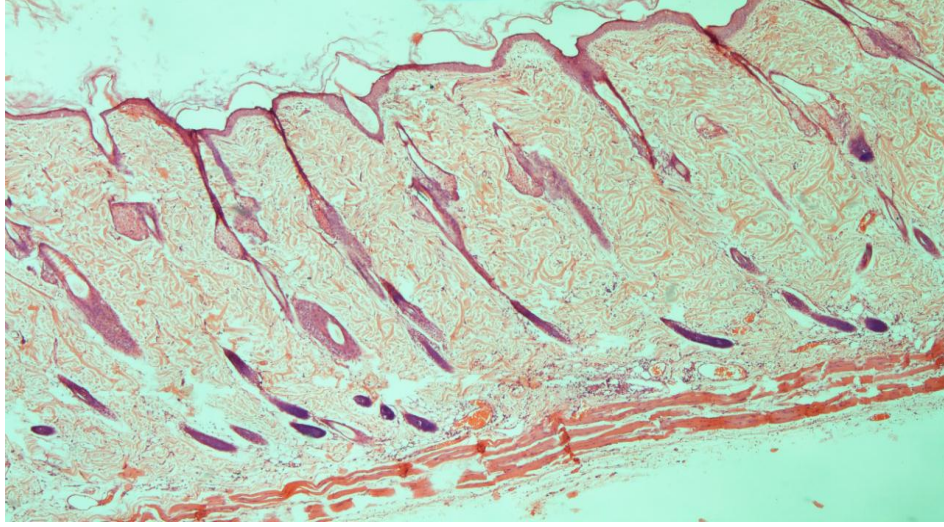
Resim 12: Grup 1 hematoksilen eosin boyama histopatolojik kesit görüntüsü. Epitelizasyonun kesintiye uğradığı, enfekte ve nekroze doku odakları olduğu, kapiller damar yoğunluğunun düşük seviyede olduğu görülmekte.



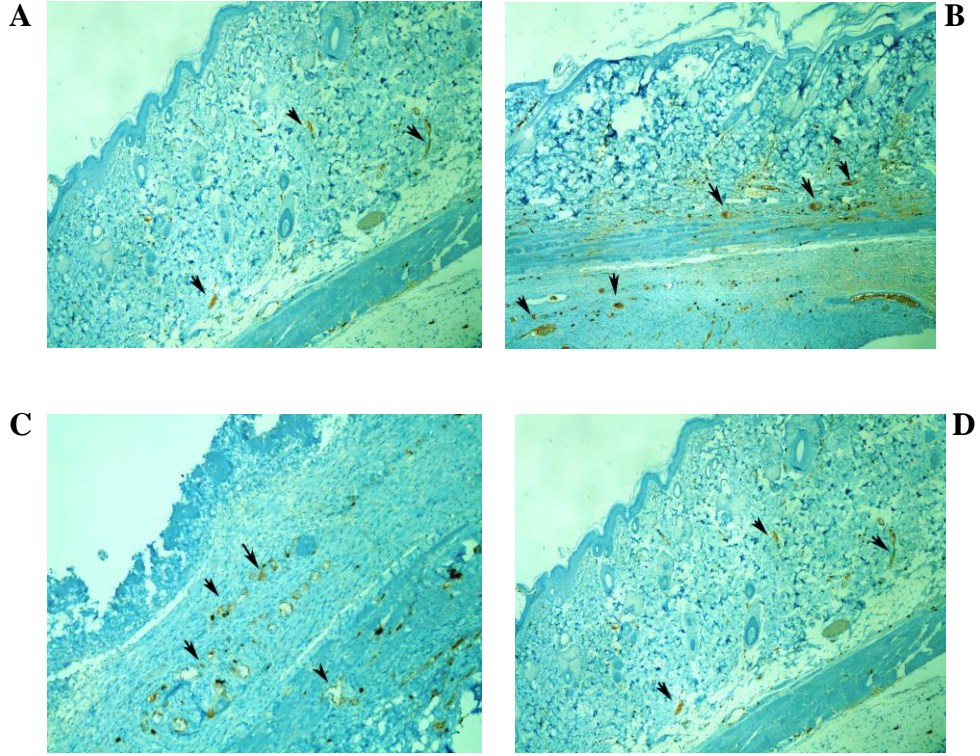
Resim 13: Grup 2 hematoksilen eosin boyama histopatolojik kesit görüntüsü. Epitelizasyonun düzenli olduğu, iltihabi hücre infiltrasyonunun düşük düzeyde olduğu, kapiller yoğunluğun yüksek düzeyde olduğu görülmekte.



Resim 14: Grup 3 hematoksilen eosin boyama histopatolojik kesit görüntüsü. Epitelizasyonun düzenli olduğu, bazı kısımlarda epitelizasyonun kesintiye uğradığı, kapiller damar yoğunluğunun orta düzeyde olduğu görülmekte.

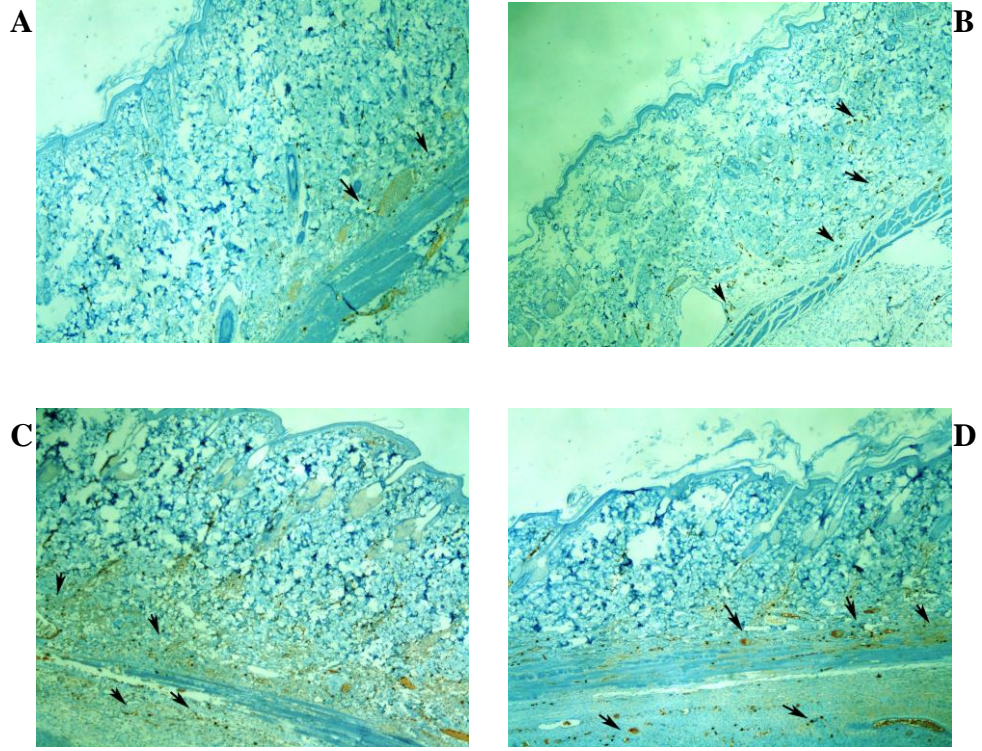


Resim 15: Grup 4 hematoksilen eosin boyama histopatolojik kesit görüntüsü. Epitelizasyonun düzenli olduğu, kapiller damar yoğunluğunun orta seviyede olduğu görüldü.



Resim 16. A-D: CD31 ile boyama. A, grup 1; B, grup 2; C, grup 3; D, grup 4.

Grup-2, 3 ve 4'de grup-1'den daha fazla CD31 tutulumu olması, damar yoğunluğunun grup1'de düşük olduğunu göstermektedir. Oklar tutulum olan alanları göstermekte (Resim 16 A-D).



Resim 17. A-D: VEGF monoklonal antikor ile boyama. A, grup 1; B, grup 2; C, grup 3; D, grup 4.

Grup-1’de, diyabetin hiperglikozilasyon ürünlerine bağlı VEGF reseptör sayısında azalma olduğu görülmekte. Grup-2,3 ve 4’de EPO ve VEGF tedavisine bağlı VEGF reseptör sayısı daha fazla. Oklar tutulum olan alanları göstermekte (Resim 17 A-D).

Yüzey Alan Değerlendirme Sonuçları

Grupların ortalama flep yaşam oranları grup-1’de $68 \pm 20,73$, grup-2’de $82,67 \pm 6,8$, grup-3’de $72,22 \pm 5,93$, grup-4’de $78,11 \pm 10,51$ tesbit edildi (Tablo 2,3). İstatistiksel olarak toplam flep yaşam oranları arasında anlamlı farklılık tesbit edilemedi. Ancak klinik makroskopik gözlemlerde tedavi grupları ile kontrol grubu arasında flep yaşam oranları arasında farklılık mevcuttu.

Tablo 2: Gruplarda flep yaşam oranları yüzdeleri

Gruplar	Denekler	Oran	Gruplar	Denekler	Oran
Grup-1 (Kontrol)	1	85	Grup-3 (VEGF)	1	73
	2	64		2	73
	3	94		3	75
	4	73		4	78
	5	37		5	61
	6	35		6	80
	7	79		7	65
	8	83		8	73
	9	62		9	72
Grup-2 (EPO)	1	78	Grup-4 (EPO+VEGF)	1	97
	2	78		2	81
	3	86		3	66
	4	83		4	91
	5	80		5	67
	6	72		6	81
	7	96		7	73
	8	86		8	75
	9	85		9	72

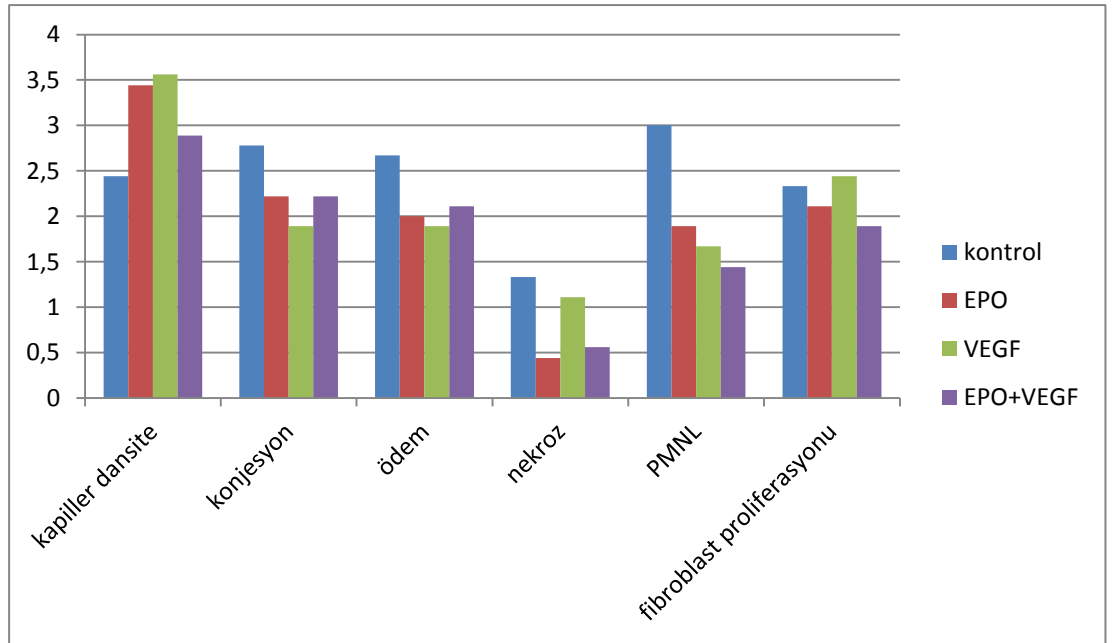
Tablo 3: Grupların flep yaşam oranlarının karşılaştırmaları

	Grup 1(n=9)	Grup 2(n=9)	Grup 3(n=9)	Grup 4(n=9)	p
	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
flep yaşam (%)	68 \pm 20,73	82,67 \pm 6,8	72,22 \pm 5,93	78,11 \pm 10,51	0,082
	73 (35-94)	83 (72-96)	73 (61-80)	75(66-97)	

Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Postoperatif yedinci günde flep distalinden nekroz ve normal doku geçiş zonundan alınan doku örnekleri tablo-1'deki kriterlere göre puanlandı.

Şekil 6: Histopatolojik skora sonuçlarının grafiksel karşılaştırması



Yapılan istatistiksel analize göre kapiller dansite oranlarında grup-1 ile grup-2, grup-1 ile grup-3 arasındaki fark grup-1 aleyhine anlamlı bulundu (Tablo 4).

Tablo 4: Grupların kapiller dansite oranlarının karşılaştırmaları

	Grup 1(n=9)	Grup 2(n=9)	Grup 3(n=9)	Grup 4(n=9)	p
	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
Kapiller dansite	2,44±1,01	3,44±0,88	3,56±0,53	2,89±0,78	0,037
	3 (1-4)	4 (2-4)	4 (3-4)	3(2-4)	

Mikroskopik nekroz oranı puanlaması sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizi sonucunda grup-1 ile grup-2, grup-1 ile grup-4 ve grup-2 ile grup-3 arasındaki fark anlamlı bulundu (Tablo 5).

Tablo 5: Grupların mikroskopik nekroz oranlarının karşılaştırmaları

	Grup 1(n=9)	Grup 2(n=9)	Grup 3(n=9)	Grup 4(n=9)	p
	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
nekroz	1.33±0,87	0,44±0,53	1,11±0,6	0,56±0,53	0,024
	1 (0-4)	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-1)	

Konjesyon oranları kıyaslamasında en düşük oran grup-3'de bulundu. Grup 2'de $2,22\pm 1,3$, grup 4'de $2,22\pm 0,83$, grup-1'de $2,78\pm 0,97$ tesbit edildi (Tablo 6). Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 6: Grupların konjesyon oranlarının karşılaştırmaları

	Grup 1(n=9)	Grup 2(n=9)	Grup 3(n=9)	Grup 4(n=9)	p
	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
konjesyon	$2,78\pm 0,97$	$2,22\pm 1,3$	$1,89\pm 0,93$	$2,22\pm 0,83$	0,312
	3 (1-4)	3 (0-4)	2 (0-3)	2 (1-3)	

Ödem oranı karşılaştırmasında en düşük oran grup 3'de görüldü. Sonra sırasıyla grup 2, grup 4 ve grup 1'de tesbit edildi (Tablo 7). Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 7: Grupların ödem oranlarının karşılaştırmaları

	Grup 1(n=9)	Grup 2(n=9)	Grup 3(n=9)	Grup 4(n=9)	p
	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	ortalama \pm Std. Sapma	
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
ödem	$2,67\pm 0,87$	$2\pm 1,32$	$1,89\pm 0,93$	$2,11\pm 0,78$	0,35
	3 (1-4)	2 (0-4)	2 (0-3)	2 (1-3)	

PMNL skoru karşılaştırmasında en düşük oran grup 4’de görüldü. Sonra sırasıyla grup 3, grup 2 ve grup 1’de tebit edildi. (Tablo 8). Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 8: Grupların PMNL oranlarının karşılaştırmaları

	Grup 1(n=9)	Grup 2(n=9)	Grup 3(n=9)	Grup 4(n=9)	p
	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
PMNL	3±1	1,89±1,83	1,67±0,87	1,44±1,13	0,078
	3 (1-4)	1 (0-4)	1 (1-3)	1 (0-4)	

Fibroblast proliferasyonu skoru karşılaştırmasında en yüksek oran grup 3’de tesbit edildi. Sonra sırasıyla grup 1, grup 2 ve grup 4’de tesbit edildi (Tablo 9). Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 9: Grupların fibroblast proliferasyonu oranlarının karşılaştırmaları

	Grup 1(n=9)	Grup 2(n=9)	Grup 3(n=9)	Grup 4(n=9)	p
	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	ortalama ± Std. Sapma	
	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	medyan (min - maks)	
Fibroblast proliferasyonu	2,33±1	2,11±1,62	2,44±1,01	1,89±0,78	0,71
	2 (1-4)	1 (0-4)	3 (1-4)	2 (1-3)	

TARTIŞMA

Diyabetes mellitus, kalıtsal ve çevresel etkenlerin birleşimi ile oluşan, insülin salınımı, insülin bağlanması veya her ikisindeki patoloji sonucu hiperglisemi ile karakterize metabolik bir bozukluktur. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar diyabetik hastaların %15'inde diyabetik ayak ülseri geliştiğini ve travmatik olmayan ayak amputasyonu nedenlerinin en başında diyabetin olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda diyabetik hastalarda oluşacak diğer yaralanma gibi akut yaralarla kronik yaraların kapatılması gerekliliği flep yaşayabilirliği sorununu gündeme getirmektedir. Bu sorunu en aza indirebilmek için pekçok deneysel ve klinik çalışma yapılmaktadır (5, 19, 125, 129-137).

Diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları sonucunda yara iyileşmesi sorunu oluşmaktadır. Endotelial disfonksiyon, aterosklerozis, ve periferik nöropati diyabete bağlı yara oluşumuna predispozan durumlardır. Diyabet gibi kronik hastalıklara bağlı yaraların tedavi planlamasında, yara iyileşme fazlarındaki defektif aşama düzeltilebilir veya desteklenebilir. Angiyogenik büyüme faktörleri hipoksiyi önleyerek ve vasküler gelişimi uyararak diyabetik yara iyileşmesini düzeltebilir. Diyabetik hayvanlarla sağlıklı hayvanların tam kalınlıkta yara modeli üzerinden yara iyileşmesinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, diyabetik olmayanlarda yara iyileşmesinin kontraksiyon ile gerçekleştiği, buna karşılık diyabetik grupta zayıf selülarite, azalmış angiyogenez, granülasyon formasyonu ve yara reepitelizasyonunda belirgin gecikme olduğu bildirilmiştir (133, 138). Hiperglisemik durum insülin, VEGF, PDGF, aktive protein-C gibi toksik glikalizasyon son ürünlerini nötralize eden, vasküler homeostazisi organize eden endojen koruyucu faktörlerin etkisini inhibe eder (139). Periferik arteriyel hastalığı (PAD) olan diyabetik (PAD-DM+), PAD olup diyabetik olmayan (PAD-DM-) ve sağlıklı insanlardan oluşan(kontrol grubu) klinik çalışmada, plazma proangiyogenik faktör VEGFA ve angiyogenezis inhibitörü olan soluble VEGF reseptör tip1 (sVEGFR-1) ve tip2 (sVEGFR-2) seviye ölçüm karşılaştırması yapılmış. PAD-DM+ ve PAD-DM- grupta kontrol grubuna göre VEGFA seviyesinin yüksek, VEGFR-2 seviyesinin düşük olduğu görülmüş. PAD olup diyabeti olan ve olmayan grup karşılaştırmasında VEGFA'nın düşük, VEGFR1 ve VEGFR2 seviyesinin yüksek olduğu görülmüş. Çalışma sonucunda hipoksik sürecin angiyogenetik faktörde (VEGFA) yükselme,

angiyojenezis inhibitörlerinde(VEGF1, VEGF2) düşmeye neden olduğu, ancak diyabete bağlı hiperglisemik durumun angiyojenezisi olumsuz etkilediği sonucuna varmışlar (111). Anemisi olan, aynı hemoglobin seviyesi ve anemi etiyojisi olan diyabetik ve diyabetik olmayan hastalarda serum EPO seviyesinin, diyabetik grupta daha düşük olduğu bulunmuştur (140). Diyabetik hastalarda her iki faktörün de eksik olması yara iyileşmesini olumsuz etkilediği gibi flep yaşayabilirliğini de olumsuz etkileyebilir. EPO ve VEGF'nin diyabetik olmayan ratlarda flep yaşayabilirliğini araştıran pekçok araştırma yapılmıştır (141-150). Ulaşılabilen literatürde diyabetiklerde flep yaşayabilirliği üzerine bu iki ajanın etkilerini araştıran makale bulunamadı. Bu çalışmanın amacı diyabetik ratlarda aksiyel flepler üzerine EPO ve VEGF'nin etkilerini araştırmaktır.

Flep cerrahisi doku eksiliğini tamamlama, fonksiyon geri kazanımı sağlama ve daha estetik görünüş sağlama açısından plastik cerrahinin başlıca uğraş alanı olmuştur. Rekonstrüksiyon merdiveni prensibine uygun olarak tedavi seçeneklerinden birisi de aksiyel patern deri flebi kullanarak onarım yapmaktır. Günümüzde farklı vücut bölgelerinde derinin kanlanma paternini bilmek aksiyel paternli deri fleplerin kullanılmasını olanaklı hale getirmiştir. Çoğunlukla aksiyel paternli fleplerde flep sağkalımında sıkıntı beklenilmese de, diyabet gibi predispozan faktörler varlığında flep distalinde oluşacak kritik iskemi ve sonrasında reperfüzyon hasarı ile doku hasarının daha da yaygınlaşması sonucu flep distalinde nekroz meydana gelebilmektedir. Nekroz oluşunca ilave cerrahi girişimler, hospitalizasyon süresinde artış, artan tedavi masrafları gibi istenmeyen sonuçlar meydana gelmektedir. Fleplerin distal kısmında gelişen hasarı azaltarak flebin yaşayabilir kısmını arttırmak, klinik olarak önemli bir hedefdir.

Flep cerrahisinde oluşan nekrozların sebepleri intrensek ya da ekstrensek olmak üzere iki grupta incelenmiştir. Yetersiz kan akımı ana intrinsek faktör olarak kabul edilmekte ve en sık flep kaybına neden olan sebep olarak göze çarpmaktadır. Ekstrensek nedenler ise sistemik, çevresel ve teknik olarak üç grupta toplanabilir. Sistemik nedenler arasında hipotansiyon, arteriyopati ve enfeksiyon, çevresel nedenler arasında sıcaklık, kompresyon ve gerginlik, teknik nedenler arasında ise planlama ve uygulama hataları olarak bildirilmiştir (3, 4). Diyabetin flep yaşayabilirliği üzerine olumsuz etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir (5, 6).

Bunlardan en sık olanı distal flep nekrozudur. Birkaç seansa ihtiyaç duyulan geciktirme fenomeni (135) gibi cerrahi işlemler uygulanabilir olmasına rağmen, tek seansta sorunsuz bir şekilde işlemlerin sonlandırılması, morbidite ve maliyet açısından önemlidir. Bu nedenle diyabetiklerde flep yaşayabilirliğini artıracak ilaç çalışmaları devam etmektedir

Parsiyel flep nekrozu plastik cerrahi operasyonlarında önemli problemlerin başında gelmektedir. Yetersiz kan akımı ve iskemi reperfüzyon hasarı flep nekrozunda major nedenler olarak görülmektedir (151). Geçtiğimiz 3 dekad boyunca deri flebi yaşayabilirliğini artırmaya yönelik sempatotik ajanlar, vazodilatatorler, kalsiyum kanal blokerleri, hemarolojik ajanlar, antitrombotik ajanlar ve serbest radikal temizleyici ajanları içeren birçok pahalı medikal ilaç araştırması yapılmıştır (152). Rohrich ve ark. (153) flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik kullanılacak ilaç veya uygulama için; kolay uygulanabilir olmalı, güvenilir olmalı, postoperatif olarak kullanılabilirmeli, ucuz olmalı, etki mekanizması tam olarak bilinmeli, elde edilebilir olmalı ve flep nekrozundan koruyucu olmalı şeklinde özetlemiştir. VEGF klinik tedavi uygulaması olarak, seçili vakalarda kritik alt ekstremitte iskemisi olan ve burger hastalarında gen terapi şeklinde uygulanmış. Her iki hasta grubunda da kollateral damarlanmada artış tesbit edilmiş (100, 101). Ancak bu tedavi şekli ileri mühendislik ürünü olan yüksek maliyetli protokollerdir. EPO kronik böbrek yetmezliği hastalarında anemi tedavisinde kullanılması dolayısı ile VEGF'ye kıyasla daha kolay elde edilebilir ve maliyeti daha uygun bir ajandır. VEGF ise hayvan deneyleri için bile elde edilebilirliği uzun süren ve pahalı bir büyüme faktörüdür. Bu nedenle maliyet fayda açısından EPO ile tedavi daha uygun görünmektedir.

Babovic ve ark. (5) diyabetik ratlarda epigastrik ada fleplerinde, flep iskemi toleransını araştırdıkları çalışmada; ratlarda diyabet oluşturulduktan 3, 6 ve 12 hafta sonra epigastrik ada flebi kaldırılmış. 1 saat süre ile flep arter ve venine mikroklempten koyularak primer iskemik durum oluşturulmuş. 18 saat sonra sadece flep venine 3 saat mikroklempten koyulmuş. Flep kaldırıldıktan 7 gün sonra flep yaşam yüzdeleri, glukoz metabolizmasında görevli enzim (heksokinaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, glutatyon redüktaz) aktiviteleri ölçülmüş. Diyabetik grupta flep yaşam yüzdeleri daha düşük, enzim aktiviteleri daha yüksek bulunmuş. Enzim aktivitelerinin yüksek olmasına rağmen, diyabetik ratların iskemiye bağlı oksidatif strese yanıtta başarısız

olduklarını bildirmişler. Diyabetik ratların venöz obstrüksiyona sekonder olarak flep iskemi toleransının düşük olduğunu bildirmişler.

Diyabetik ratlarda yapılan çalışmalarda, farmakolojik olarak diyabet oluşturulduktan sonra, diyabetin komplikasyonlarının belirginleşmesi için beklenmesi gereken süre konusunda değişik uygulamalar vardır. Carvalho ve ark. (154) sağlıklı ve diyabetik ratlarda random patern dorsal cilt flebinin yaşayabilirliğini kıyasladıkları çalışmada, ratlarda alloxan ile diyabet oluşturulduktan 10 gün sonra flep cerrahisi uygulamışlar. Ortalama flep yaşam oranı kontrol grubunda %36,4, diyabetik grupta %52,1 bulmuşlar. İstatistiksel analizde aradaki farkın anlamlı olduğunu bulmuşlar. Babovic ve ark. (5) diyabetik ve sağlıklı ratlarda fleplerin iskemi toleransını araştırdıkları çalışmada, diyabet oluşturulduktan 3, 6 ve 12 hafta sonra epigastrik ada flebi kaldırmışlar. Diyabetik grupta 3. haftada ortalama flep yaşam yüzdesi %40, kontrol grubunda %85 bulmuşlar. 6. haftada diyabetik grupta %25, kontrol grubunda %72, 12. haftada diyabetik grupta %17, kontrol grubunda %78 bulmuşlar. Bu çalışmalardan yola çıkarak, biz de çalışmamızda ratlarda diyabet oluşturulduktan sonra flep cerrahisi zamanına kadar 4 hafta bekledik.

Büyüme faktörlerinin yara iyileşmesini olumlu etkiledikleri, deri ve kas fleplerinde yaşayabilirliği arttırdıkları yapılan çalışmalar sonucunda ayrıntılı olarak kanıtlanmıştır. PDGF, bFGF, TGF- β ve VEGF gibi büyüme faktörleri angiyojenezi aktive eder ve iskemik hasara uğramış olan deri fleplerinde fonksiyonel mikrodolaşımı artırır (7-10). Most ve ark. (155) rat dorsal flebinde iskemi süresince büyüme faktörleri ekspresyonu araştırması sonucunda, cilt flebindeki iskemi sonrasındaki süreçte sitokinlerde önemli derece artış olduğunu göstermiştir. Çalışma sonucunda büyüme faktörlerinin iskemi sonrasındaki süreçte önemli rolleri olabileceğine kanaat getirmişlerdir.

Angiyojenezis primer vasküler sistem oluşumunda gerekli olduğu kadar, organizmanın olası iskemik koşullarda savunma mekanizması olarak sekonder vasküler değişikliklerin oluşumu için de gereklidir. Yara iyileşme bölgesinde artan angiyojenezis sonucunda yararlı metabolik ürünlerin ve mediatörlerin ilgili bölgeye girişleri, zararlı metabolitlerin bölgeden uzaklaştırılması kolaylaşır. Angiyojenezis sonucunda doku perfüzyonu ve mikrosirkülasyonu yeniden sağlanır, lokal oksijen

konsantrasyonu yükselir. Alt ekstremitte ve kardiyak iskemik problemlerin tedavisinde terapötik angiyojenesis oluşturmak amacıyla büyüme faktörlerinin de olduğu birçok eksojen ajan kullanılmıştır (156). Cerrahi ile oluşturulan delay fenomeninde ve doku genişletilmesi uygulanmış dokularda preoperatif flep angiogenezisinde artış olduğu görülmüştür. Buna benzer etkiyi farmakolojik ajanlar kullanarak da elde etmek mümkündür. Bu amaca yönelik ilk çalışmalardan biri Hom ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada endotelial hücre growth faktörünün (ECGF) tavşan kulak deri flebi üzerinde neovaskularizasyon üzerine etkisi araştırılmış ve salın uygulanan gruba kıyasla ECGF uygulanan grupta %100 flep yaşayabilirliğinin daha başarılı olduğu gösterilmiştir (157). Daha önce yapılan çalışmalarda EPO ve VEGF'nin flep yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir (7, 144-146, 158, 159). Ancak bu çalışmalar iskemik flep modellerinde yapılmıştır. Bizim çalışmamız diyabetik flep modeli üzerinde etkilerini göstermeleri açısından önemlidir.

Sağlıklı yara iyileşmesi inflamasyon, koagülasyon, proliferasyon ve remodelingten oluşan düzenli biyolojik aşamalar sonucunda gerçekleşir. Enfeksiyon, tromboz, iskemi gibi faktörler bu düzenin bazı aşamalarında duraksamaya neden olur. Diyabetik hastalarda nöropati, damarsal problemler, enfeksiyon, kontrolsüz basınç, kallus formasyonu gibi faktörlere bağlı olarak yara iyileşmesi aşamalarından bir veya birkaçı etkilenecek kronik yara oluşmaktadır. Hastalığın erken evrelerinde kapiller damar çapında daralma, bazal membranda kalınlaşma, arteriyolar hiyalinizasyon sonucu mikrovasküler patolojiler oluşmaya başlar. Endotelial disfonksiyon sonucunda NO sentaz aktivitesinde azalma meydana gelir. Bütün bu predispozan faktörlerin altında yatan patolojik triadı nöropati, iskemi ve travmadır. Bunlardan bir tanesi mevcutsa, kısır döngü şeklinde diğer patolojiler de oluşur (130).

EPO ve VEGF'nin angiyojenesis arttırıcı etkileri olduğu yapılan birçok çalışma sonucunda kanıtlanmıştır. EPO'nun moleküler etki mekanizmalarından bir tanesi endotelial ve indüklenbilir nitrik oksit (NO) sentaz aktivitesi artışıdır. VEGF'nin de NO aracılığı ile vasküler permeabilite artışı ve vazorelaksasyon etkisi vardır. Biyomoleküler ve fizyolojik çalışmalar sonucu ispat edilen ortak etki yolu NO üzerinden görülmektedir. Bu çalışmada aynı etki mekanizması ile flep yaşayabilirliğini arttırdığı düşünülen EPO ve VEGF kullanılması amacı; daha önce çalışılmamış olmalarının yanında, diyabetik ratlarda flep yaşayabilirliğini

arttırma etkileri eşit/benzer mi olduğunu görmek, kombine kullanıldığında etkilerinin artıp artmadığını araştırmaktı.

Diyabetik ratlarda rekombinant insan epidermal büyüme faktörü (EGF) ve EPO'nin kombine etkisinin araştırıldığı çalışmada, toplam 30 rat, 3 gruba ayrılmış. Ratların dorsumunda 2x2 cm²'lik simetrik 2 adet tam kalınlıkta yara oluşturulmuş. Sol taraf kontrol amaçlı, sağ taraftaki yaraya ilaç tedavisi uygulanmış. 1. Gruba 20 IU/gün topikal EPO, 2. Gruba 20µg/gün EGF, 3. Gruba aynı dozlarda günde 2 defa kombine tedavi uygulanmış. Her grup yara iyileşme aşamaları, yara boyutu, tam iyileşme zamanı açısından takip edilmiş. İmmünohistokimyasal olarak KI-67 değerleri ölçülmüş. Kombine tedavi grubunda, diğer gruplara kıyasla daha kısa %50 yara dokusu iyileşme zamanı, yara boyutunda daha hızlı küçülme tesbit edilmiş (125). Yaptığımız çalışmada EPO ve VEGF'ün birbirlerinin etkilerini potansiyelize edip etmediklerini araştırmak amacıyla grup-4'deki ratlara kombine EPO ve VEGF tedavi rejimi uygulandı. Flep sağkalım oranları grup-1'de %68, grup-2'de %82, grup-3'de %72, grup-4'de %78 olarak bulundu. Bu sonuçlara göre gruplar arasında flep sağkalımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Flep sağkalım oranları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmamasının nedeni, fleplerin aksiyel paternde planlanmasına bağlı genel flep sağkalım oranının yüksek olmasına bağlanabilir. Diğer 3 grupta kontrol grubuna göre yüksek oran bulunması, ilaçların flep yaşayabilirliğini artırıcı etkilerine işaret etmektedir.

Zhang ve ark. (147) ratlarda transver rectus abdominus kas deri flebi (TRAM) üzerinde VEGF uygulama zamanının flep yaşayabilirliği üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında; 1. gruba flep eleve edildikten hemen sonra femoral venden, 2. gruba flebi besleyen superior epigastrik arterden flep eleve edildikten hemen sonra, 3. gruba flep elevasyonu planlanan günden 7 gün önce flep bölgesine subkutanöz fasyal planda VEGF enjeksiyonu uygulamışlar. 4. grup kontrol grubu olarak oluşturulmuş ve flepler eleve edilip aynı yerlerine tekrar suture edilmiş. Gruplar arasında en yüksek ve anlamlı oran operasyondan 7 gün önce subkutanöz VEGF verilen 3. grupta olduğunu bildirmişlerdir. Takeshita ve ark. (160) VEGF'ün en yüksek angiogenetik etkiyi oluşturması için operasyondan ne kadar süre önce verilmesi gerektiğini araştırmışlar. Alt ekstremitte iskemisi oluşturdukları 41 tavşan üzerinde, ilgili ekstremitenin femoral arteri ve tüm dalları ligate edilmiş. Ekstremitte

beslenmesi internal iliak arterden giden kollateral dallar aracılığıyla sağlanmış. İskemi oluşturulmasından 10 gün sonra internal karotis arterden iliak artere kateter yerleştirilmesi sonrasında 500µg ile 1000µg arasında bolus şeklinde VEGF enjeksiyonu yapılmış. İskemi oluşturulduktan 3, 5 ve 7 gün sonra endotelyal ve düz kas hücre aktivasyonu ve alt ekstremitte hücrel perfüzyon artışı ile ilgili ölçümler yapılmış. En yüksek endotelyal ve düz kas aktivite artışını 5. günde, ekstremitede en yüksek hücrel perfüzyon artışını 7. günde tespit etmişler. Biz de çalışmamızda flep bölgesinde en yüksek angiyojenetik etkiyi elde etmek amacıyla VEGF enjeksiyonunu flep elevasyonundan 5 gün önce uyguladık.

Kryger ve ark. (144) VEGF'ün verilme şeklinin random patern flep yaşayabilirliği üzerine etkisini araştırmak amacıyla 6 grup üzerinde çalışma yapmışlar. 1. gruba femoral venden sistemik 1 ml (50µg/ml), 2. gruba flep elevasyonu sonrasında multipl (flepe eleve edildiğinde, eleve edildikten 24 ve 48 saat sonra) sistemik 1ml (50µg/ml), 3. gruba subdermal flep içine 1ml (1µg/ml), 4. gruba subfasyal flep yatağına 1,5 ml (1µg/ml), 5. gruba topikal flep yatağına 1,5 ml (1µg/ml) VEGF verilmiş ve kontrol amaçlı 6. grup oluşturulmuş. Takip eden 5 gün sonunda yaşayan flep alan ölçümleri yapılmış. Tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranlar tesbit edilmiş. Sırasıyla gruplarda ortalama flep yaşam yüzdeleri %88, %91, %88, %86, %78, %66 olarak ölçülmüş. En yüksek oran sistemik multipl doz uygulanan grupta bulunmuş. Tedavi grupları arasında anlamlı farklılık 2. ve 5. gruplar arasında görülmüş. Topikal uygulama yapılan grupta düşük oranın nedenini VEGF yarılanma ömrünün kısa (5-10 dakika) olmasına bağlanmış. Subdermal ve multipl sistemik doz uygulaması arasında anlamlı fark olmadığını bildirmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda VEGF subdermal olarak uygulandı.

Saray ve ark. (146) ratlarda random patern flepler üzerinde EPO'nun uygulanma dozu ve uygulama zamanı değişkenlerinin flep yaşayabilirliği üzerine etkilerine yönelik yaptıkları kapsamlı araştırmada 7 grupta toplam 84 rat üzerinde çalışmışlar. Kronik tedavi rejimi olarak operasyondan 3 hafta önce ve flep kaldırıldıktan 1 hafta sonra, haftada 3 gün EPO uygulanmış. Akut tedavi rejimi olarak ilk doz operasyondan 30 dakika önce ve hafta boyunca 3 defa, 1 hafta boyunca uygulanmış. Kronik tedavi rejimi uygulanan Grup-1 placebo kontrol grubu, grup-2'ye 50 IU/kg, grup-3'e 100 IU/kg, grup-4'e 150 IU/kg EPO verilmiş. Akut

tedavi rejimi uygulanan grup-5'e 50 IU/kg, grup-6'ya 100 IU/kg, grup-7'ye 150 IU/kg EPO tedavisi verilmiş. Tedavi verilen tüm gruplarda sistolik kan basıncında ve hematokrit değerlerinde artış görülmüş, ancak anlamlı artış kronik tedavi gruplarında tesbit edilmiş. Kronik EPO tedavisi uygulanan gruplarda distal nekroz oranını anlamlı derece arttığı, kısa süreli ve terapötik doz uygulanan grup-5 ve 6'da flep yaşayabilirliğinin anlamlı derece yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda EPO tedavisi flep elevasyonundan 2 gün önce, flep eleve edildiğinde ve flep kaldırılmasının 2. gününde terapötik doz olarak kabul edilen 100 IU/kg olarak uygulandı.

Galeano ve ark. (132) genetik olarak diyabetik ratlar üzerinde EPO'nin yara iyileşmesi üzerine yaptıkları çalışmada, EPO uygulanan grupta EPO uygulanmayan gruba kıyasla angiyoeneziste, yara iyileşmesinde, yara gerim kuvvetinde anlamlı derecede artış tesbit etmişlerdir. Padubidri ve ark. (159) VEGF'ün ratlarda random patern epigastrik flep yaşayabilirliği üzerine yaptıkları çalışmada, flep elevasyonundan sonra epigastrik artere 5µg VEGF verilen ve kontrol grubuna serum fizyolojik verilen 2 grubu karşılaştırmış. VEGF grubunda %71,9 sağlıklı flep alanı varken, kontrol grubunda %53,7 bulmuşlar. Histopatolojik incelemelerinde kapiller dansite oranlarının VEGF grubunda daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Kim ve Hong'un (143) EPO'nun rat TRAM flep modelinde iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada flep elevasyonundan 10 gün sonra alınan biyopsi örnekleri mikroskopik olarak incelenmiş. Flep yaşayabilirliği ile ilgili parametrelerinden bir tanesi de kapiller damar yoğunluğu olarak belirlemişler. EPO ile tedavi edilen grupta, kontrol grubuna göre daha yüksek yoğunlukta kapiller damar yoğunluğu tesbit etmişler. EPO'nun endotelial hücreler üzerine mitogenik etkisi sonucunda angiyojenetik etki oluşturup flep yaşayabilirliği üzerine olumlu katkı sağladığını bildirmişlerdir. Flep yaşayabilirliği ile ilgili yapılan başka çalışmalarda da histopatolojik parametrelerden kapiller dansite oranı, flep yaşayabilirliği ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (159, 161). Çalışmamızda flepten alınan kesitin tablo-1'deki kriterlere göre semikantitatif flep yaşamı parametrelerinden kapiller dansite skorlaması sonucu, grup 2 ve grup 3'de grup 1'e göre anlamlı olarak yüksek bulunması, EPO ve VEGF'nin flep yaşayabilirliği üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir.

VEGF, endotelyal hücelere mitojenik etkisi, kemotaktik ajan etkisi, vasküler geçirgenliği arttırıcı etkisi ile neovaskularizasyonda en önemli büyüme faktörüdür (91-93). VEGF yara iyileşmesini angiyojenezis, epitelizasyon ve kollojen depolanması gibi birçok basamağı olumlu etkileyerek hızlandırabilir(162). Yara iyileşmesinde angiyojenezisi stimüle ederek vazodilatasyon, bazal membran degradasyonu, endotelyal hücre migrasyonu ve proliferasyonunu artırır (163). Diyabetiklerde multifaktöryel nedenlerle yara iyileşmesi bozulmuştur. Hazırlanan flebin defekt alanına transferi sonrası flep yaşayabilirliği yanı sıra alıcı alanla olan yara iyileşmesi de önemlidir. Bu nedenle EPO ve VEGF kullanımının yara iyileşmesini olumlu etkileyebileceği düşünülmektedir.

VEGF uygulanma zamanını akut(operasyon esnasında) ve sürekli(operasyondan 24 saat veya daha önce) olarak yapılan çalışmaların karşılaştırmasında, akut dönemde uygulamalarda deri flebinde, kas flebinde, tam kalınlıkta deri grefti iyileşmesinde, arka bacak replantasyonunda canlılık belirteçlerinde, önemli sitokin supresyonunda artış ve değişken nitrik oksit sentaz ekspresyonu görülmüş. Sürekli VEGF uygulaması yapılan çalışmalarda TRAM flep sağlıklı cilt adası alanında artış, tüp pediküllü flep maturasyonunda hızlanma, angiogeneziste artma görülmüş (148). Bu sonuç planlı flep operasyonlarında preoperatif 5-7 gün önce VEGF uygulaması flep nekroz riskini düşürebileceğini göstermektedir.

EPO ve VEGF endotelyal hücre onarımında anahtar rolleri olan ajanlardır. Fibroblast ve multipotent mezenkimal stromal hücreler (MMSC) endotelyal onarımda ve doku rejenerasyonunda önemli hücrelerdir. Bunların migrasyonu ve proliferasyonu VEGF ve EPO'nun da içinde bulunduğu birçok ajan tarafından regüle edilir. VEGF ve EPO'nun insan yağ dokusundaki fibroblast proliferasyon aktivitesi ve MMSC düzeyi üzerine etkisinin kıyaslandığı çalışmada; EPO'nun fibroblast proliferasyon aktivitesini ve MMSC miktarını daha fazla arttırdığı tesbit edilmiş (164). Mikroskopik nekroz oranı flep sağkalımı ve kalitesi açısından ters orantı gösteren bir parametredir. Tablo-1'deki kriterlere göre semikantitatif nekroz skor oranının istatistiksel analizinde, grup-1'de $1,33\pm 0,87$, grup-2'de $0,44\pm 0,53$, grup-3'de $1,11\pm 0,6$, grup-4'de $0,56\pm 0,53$ ortalama değer tesbit edildi. Grup-1 ile grup-2, grup-1 ile grup-4, grup 2 ile grup-3 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı

bulundu. Grup-1’de mikroskopik nekroz oranının daha yüksek çıkması EPO ve VEGF’nin mikroskoik düzeydeki nekroz oranını düşürerek flep sağkalımını arttırdığını göstermektedir. Grup-2 ve Grup-3arasındaki mikroskopik nekroz oranının grup-2 lehine olmasının nedeni; EPO’nun yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu için önemli olan fibroblast aktivitesi ve MMSC aktivitesini VEGF’e göre daha fazla arttırmasına bağlıdır (164). Ancak çalışmada uyguladığımız VEGF dozu’nun (1µg) arttırılarak yapılacağı yeni karşılaştırma çalışmalarının, nekroz oranına nasıl etki edeceğinin araştırılmasının faydalı olacağını düşünüyoruz.

VEGF inhibitörü ilaçlar kanser tedavisinde patolojik angiyojenезisi inhibe etmek için kullanılır. Bu hastalardaki hemoglobin yükselmesi nedeni araştırılması sonucunda, VEGF sinyal yolunun inhibe edilmesinin, hepatotik EPO sentezini arttırdığı gösterilmiştir (165). Kombine tedavi uygulanan grup-4’de EPO verilen grup-2’ye kıyasla daha düşük flep sağkalım oranı çıkmasının bir nedeni olarak, VEGF ve EPO’nun bazı aşamalarda birbirlerinin etkisini antagonize etmesi veya VEGF uygulaması esnasında ratlarda ilave stres faktörü oluşturulması sebep olabilir. Grup 2 ve 3 arasındaki farkın nedeni VEGF tedavisinin düşük doz ve sıklıkta uygulanmış olması nedenlerden biri olabilir. Toplam flep sağkalım yüzdeleri göz önüne alındığında grup-4 grup-2’nin altında, grup-3’ün üzerinde yer aldı.

Sayısal verilerin analizinde konjesyon, ödem, PMNL, fibroblast proliferasyonu histopatolojik değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bunun nedenlerinden biri olarak, kontrol grubu ile ilaç grupları arasındaki fark değerlendirme şeklinin semikantitatif olmasına bağlı olabilir. Ayrıca değerlendirmeye alınan biyopsi kesit sayısının arttırılması, en az 2 patoloğ tarafından biyopsi kesitlerinin yorumlatılması, bireysel değerlendirme farklılığını minimize edebilir. Başka bakış açısından değerlendirme yapılması sonucunda daha istikrarlı histopatolojik sonuçlar alınabilir. Gruplar oluşturulurken diyabet oluşturma kriteri, kan şekeri değerinin 250 mg/dl üzerinde olması olarak belirlendi. Kiloya uygun dozda STZ yapılması sonrası yaptığımız kontrol kan şekeri ölçümlerinde tüm ratların kan şekeri değer aralığı 140-550 mg/dl arasındaydı. Kan şekeri değeri 250mg/dl altındaki ratlar çalışmadan çıkarılmıştı. Ratların biyolojik olarak diyabetik durumdan etkilenme oranlarında farklılık olması da, anlamsız histopatolojik değerlere neden olabilir. Buna engel

olmak açısından ilerdeki yapılacak çalışmalarda diyabet oluşturma kriteri olarak kan şekeri alt ve üst sınırı belirlenmesi (örneğin 250-350mg/dl) faydalı olabilir.

Zhang ve ark. (166) gelecekte plastik cerrahi açısından yapılacak çalışmaların 2 alanda yoğunluk kazanacağını öne sürmüşlerdir. İlki anjiogenezis sağlamak için kullanılan büyüme faktörlerinin aktivite ve etkilerini optimize ve standartize etmektir. İkincisi stabil ve devamlılık sağlayacak yöntemlerle damar matürasyonu ve sabilezasyonu sağlayarak tamamen fonksiyonel vasküler sistem sağlamaktır. Koordineli şekilde birçok büyüme faktörünün angiogenetik sürece katkı sağlayacak tedavi rejimleri, tek büyüme faktörü ile sağlanacak etkiden daha efektif sonuçlar doğurabilir. Büyüme faktörlerinin birçoğunun yarılanma ömrü kısa olması dolayısı ile endojen metabolizmanın ürettiği büyüme faktörleri daha etkili sonuçlar doğurabilir. Bu amaç doğrultusunda hedefe yönelik büyüme faktörü konjuge edilmiş plazmitler, transfeksiyonize edilmiş DNA, virüs aracılı gen transferi gibi yöntemler kullanılarak daha uzun etkili, eksojen uygulamaya gerek kalmadan endojen üretim sağlanabilir (158).

EPO'nun direk olarak Ki67 antijen proliferasyonu ve mikrodamar yoğunluğunu arttırıcı, tümöral dokuda hipoksiyi engelleyici, endotelial öncü hücre mobilizasyonunu arttırıcı etki sağlayarak tümör genезisini uyarabileceği kabul edilir (87). Benzer şekilde VEGF etkisi ile tümöral dokuda büyüme, anti VEGF antikoru olan bevacizumab ile yapılan çalışmalarda tümöral dokularda küçülme gözlenmiştir (167). EPO ve VEGF'ün angiogenetik etkileri dolayısı ile sistemik kullanımlarında tanı konmamış tümör vakalarında tümör büyümesini hızlandırabilirler. Sistemik kullanımdan kaynaklanacak bu etki lokal uygulama ile engellenebilirliği, yapılacak çalışmalar ile araştırılabilir. İlerleyen yıllardaki olası klinik kullanımda, hastaların tanı konmamış tümöral durumlar açısından dikkatlice değerlendirilmesinde fayda olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda EPO ve VEGF'nin flep dolaşımı üzerindeki etkileri açısından incelediğimiz diğer histopatolojik kriterlerde (konjesyon, ödem, PMNL ve fibroblast proliferasyonu) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilemedi.

Flep cerrahisinde güncel uygulamalar olan delay fenomeni ve ekspander uygulamasının, flep angiogenezisinde artış sağladıkları bilinmektedir (168, 169). Bu

tarz uygulamalar flep prefabrikasyonu olarak adlandırılabilir. Yapılan çalışmalardan yola çıkarak flep cerrahisinde preoperatif VEGF veya EPO gibi angiyojenik etkili ajanlar, medikal vasküler flep prefabrikasyonu amacıyla kullanılabilir.

SONUÇ

Diyabetes mellitus kan şekeri regülasyon bozukluğu sonucu çoklu organ tutulumu olan kronik bir hastalıktır. Etkilenen insan sayısı her geçen gün katlanarak artmaktadır. Ülkelerin sağlık harcamalarının büyük kısmını bu hastalık ve komplikasyonlarının tedavisi oluşturmaktadır. Özellikle diyabetik ayak tedavisi debridman, kan şekeri regülasyonu, enfeksiyon kontrolü, lokal yara bakımı ve cerrahi rekonstrüksiyonu kapsayan oldukça zor ve zahmetli bir tedavi programıdır. Diyabetin vasküler hasarlarından dolayı rekonstrüksiyon cerrahisinde kullanılan fleplerde komplikasyon görülme ihtimali, sağlıklı bireylere göre daha yüksektir. Flep cerrahisinde EPO ve VEGF güncel tedavi programlarında rutin kullanımda olmayan, ancak pozitif etkileri kanıtlandıkça ilerleyen zamanlarda rutin tedavi rejimi olarak kullanılabilme ihtimali yüksek ajanlardan bazılarıdır. Bu çalışmada diyabetik rat modeli kullanarak, EPO ve VEGF'nin tek tek ve kombine kullanımında aksiyel patern flep sağkalımı üzerine etkileri araştırıldı. Morfolojik ve histopatolojik değerlendirmeler sonucunda flep yaşayabilirliği üzerine pozitif etkileri olduğu bulundu. Histopatolojik değerlendirmede kontrol grubuna göre tedavi gruplarında kapiller dansitenin yüksek, nekroz oranının düşük olması bu sonucu desteklemektedir. Kombine kullanım ise EPO'nun tek başına etkisinden daha yüksek bir fayda sağlamamaktadır.

KAYNAKLAR

1. American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2008;31 Suppl 1:S55-60.
2. VEGF Inhibitors for AMD and Diabetic Macular Edema. *Jama*. 2015;314(20):2184-5.
3. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plastic and reconstructive surgery*. 1983;72(6):766-77.
4. Myers MB, Cherry G. Causes of necrosis in pedicle flaps. *Plastic and reconstructive surgery*. 1968;42(1):43-50.
5. Babovic S, Shin M-S, Angel MF, Im MJ, Vander Kolk CA, Manson PN. Flap tolerance to ischaemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *British journal of plastic surgery*. 1994;47(1):15-9.
6. Isken T, Ozgentas HE, Gulkesen KH, Ciftcioglu A. A random-pattern skin-flap model in streptozotocin diabetic rats. *Annals of plastic surgery*. 2006;57(3):323-9.
7. Angelos PC, Winn SR, Kaurin DS, Holland J, Wax MK. Evaluating revascularization and flap survival using vascular endothelial growth factor in an irradiated rat model. *Archives of facial plastic surgery*. 2011;13(3):185-9.
8. Hom DB, Assefa G. Effects of endothelial cell growth factor on vascular compromised skin flaps. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 1992;118(6):624-8.
9. Ishiguro N, Yabe Y, Shimizu T, Iwata H, Miura T. Basic fibroblast growth factor has a beneficial effect on the viability of random skin flaps in rats. *Annals of plastic surgery*. 1994;32(4):356-60.
10. Nall AV, Brownlee RE, Colvin CP, Schultz G, Fein D, Cassisi NJ, et al. Transforming growth factor beta 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 1996;122(2):171-7.
11. Ates E, Yalcin AU, Yilmaz S, Koken T, Tokyol C. Protective effect of erythropoietin on renal ischemia and reperfusion injury. *ANZ journal of surgery*. 2005;75(12):1100-5.
12. Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, et al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*. 2004;53(9):2509-17.
13. Flamme I, von Reutern M, Drexler HC, Syed-Ali S, Risau W. Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Developmental biology*. 1995;171(2):399-414.
14. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Seminars in oncology*. 2002;29(6 Suppl 16):10-4.
15. Hebda PA, Klingbeil CK, Abraham JA, Fiddes JC. Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. *The Journal of investigative dermatology*. 1990;95(6):626-31.
16. Ochoa O, Torres FM, Shireman PK. Chemokines and diabetic wound healing. *Vascular*. 2007;15(6):350-5.

17. Gary Sibbald R, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2008;24 Suppl 1:S25-30.
18. Woo K, Ayello EA, Sibbald RG. The edge effect: current therapeutic options to advance the wound edge. *Advances in skin & wound care*. 2007;20(2):99-117; quiz 8-9.
19. Blakytyn R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2006;23(6):594-608.
20. Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2006;22(4):257-73.
21. Liu BF, Miyata S, Kojima H, Uriuhara A, Kusunoki H, Suzuki K, et al. Low phagocytic activity of resident peritoneal macrophages in diabetic mice: relevance to the formation of advanced glycation end products. *Diabetes*. 1999;48(10):2074-82.
22. Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *The American journal of pathology*. 2005;167(1):59-69.
23. Lindsay RM, Harmar AJ. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*. 1989;337(6205):362-4.
24. Lindsay RM, Lockett C, Sternberg J, Winter J. Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience*. 1989;33(1):53-65.
25. Rask-Madsen C, King GL. Kidney complications: factors that protect the diabetic vasculature. *Nature medicine*. 2010;16(1):40-1.
26. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
27. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47(6):859-66.
28. Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(9):2173.
29. Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2007;3(1):46-56.
30. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(9):1341-8.
31. Hallock GG. Direct and indirect perforator flaps: The history and the controversy. *Plastic and reconstructive surgery*. 2003;111(2):855-66.
32. Manhot C. *Die Hautarterien des menschlichen Körpers*: Vogel; 1889.
33. Tansini I. Sopra il mio nuovo processo di amputazione della mammella. *Gazz Med Ital*. 1906;57:141.
34. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *British Journal of Plastic Surgery*. 1973;26(3):202-13.
35. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. *Plastic and reconstructive surgery*. 1981;67(2):177-87.

36. Taylor GI, Palmer J. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *British journal of plastic surgery*. 1987;40(2):113-41.
37. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *British journal of plastic surgery*. 1973;26(3):202-13.
38. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. *Plastic and reconstructive surgery*. 1981;67(2):177-87.
39. Gaboriau HP, Murakami CS. Skin anatomy and flap physiology. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2001;34(3):555-69.
40. Sloan G, Reinisch J. Flap physiology and the prediction of flap viability. *Hand clinics*. 1985;1(4):609-19.
41. Vedder N. Flap physiology. *Plastic surgery*. 2006;1:483-506.
42. Spalteholz W, Spanner R. *Atlas Anatomi Manusia*. EGC, Jakarta. 1987.
43. Chu E, Byrne P, Goding G. *Skin flap physiology and wound healing*. Cummings otolaryngology: head and neck surgery Elsevier, Philadelphia. 2010.
44. Mathes SJ, Hentz VR. *Plastic surgery*: Saunders; 2006.
45. Daniel R. Principles and physiology of skin flap surgery. *Plastic surgery*. 1990;1:275-328.
46. Khiabani KT, Kerrigan CL. Differing flow patterns between ischemically challenged flap skin and flap skeletal muscle: implications for salvage regimens. *Plastic and reconstructive surgery*. 2002;109(1):220-7.
47. Smith J, Pribaz J. Flaps. Achauer BM. *Plastic Surgery Indications, Operations and Outcomes*. 2:261-90.
48. Jennings RB, Reimer KA. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annual review of medicine*. 1991;42(1):225-46.
49. Green C, Gower J, Healing G, Cotterill L, Fuller B, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radical Research*. 1989;7(3-6):255-64.
50. Onténiente B, Rasika S, Benchoua A, Guégan C. Molecular pathways in cerebral ischemia. *Molecular neurobiology*. 2003;27(1):33-72.
51. Mccord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clinical biochemistry*. 1993;26(5):351-7.
52. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1988;254(5):G768-G74.
53. Dundar Y, Aslan R. *Hekimlikte oksidatif stress ve antioksidanlar*. 112 pages. TC Afyon Kocatepe Universitesi Yayın. 2000(29).
54. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. *Mimoza Yayınları*, Konya. 1995;1.
55. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circulation Research*. 1990;66(5):1436-44.
56. Lee C, Kerrigan CL. Neutrophil localization following reperfusion of ischemic skin flaps. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992;89(5):910-5.
57. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1989;257(5):G683-G8.

58. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K, Korthius RJ. Inflammatory responses to ischemia, and reperfusion in skeletal muscle. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998;179(1-2):169-87.
59. Zamboni WA, Stephenson LL, Roth AC, Suchy H, Russell RC. Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: CD18-dependent neutrophil-endothelial adhesion and arteriolar vasoconstriction. *Plastic and reconstructive surgery*. 1997;99(7):2002-7.
60. Cetin C, Kose AA, Aral E, Colak O, Ercel C, Karabagli Y, et al. Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Annals of plastic surgery*. 2001;47(5):540-6.
61. Askar Im, Oktay MF, Gurlek A, Bac Bl. Protective effects of some antineoplastic agents on ischemia-reperfusion injury in epigastric island skin flaps. *Microsurgery*. 2006;26(3):193-9.
62. Bayramiçli M. Deneysel mikrocerrahi: Temel araştırma, doku ve organ nakli modelleri. İstanbul: Ofset Matbaacılık; 2005.
63. Carnot P, Deflandre C. Sur l'activité hémopoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang. *CR Seances Acad Sci*. 1906;143:432-5.
64. Bonsdorff E, JALAVISTO E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1948;16(2-3):150-70.
65. ERSLEV A. Humoral regulation of red cell production. *Blood*. 1953;8(4):349-57.
66. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*. 1977;252(15):5558-64.
67. Adamson JW, Eschbach JW. Erythropoietin for end-stage renal disease. *New England Journal of Medicine*. 1998;339(9):625-7.
68. Maxwell PH, Ferguson D, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, et al. Sites of erythropoietin production. *Kidney international*. 1997;51(2):393-401.
69. Cameron JS. *Oxford textbook of clinical nephrology: ERA-EDTA*; 1998.
70. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1999;14(suppl 2):22-8.
71. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*. 1999;283(5404):990-3.
72. Walrafen P, Verdier F, Kadri Z, Chrétien S, Lacombe C, Mayeux P. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood*. 2005;105(2):600-8.
73. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005;6(6):484-94.
74. Akisu M, Küllahçioğlu GF, Baka M, Hüsseyinov A, Kültürsay N. The role of recombinant human erythropoietin in lipid peroxidation and platelet-activating factor generation in a rat model of necrotizing enterocolitis. *European journal of pediatric surgery: official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery[et al]= Zeitschrift für Kinderchirurgie*. 2001;11(3):167-72.
75. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(8):4802-6.

76. Abdelrahman M, Sharples EJ, McDonald MC, Collin M, Patel NS, Yaqoob MM, et al. Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia. *Shock*. 2004;22(1):63-9.
77. Bany-Mohammed FM, Slivka S, Hallman M. Recombinant human erythropoietin: possible role as an antioxidant in premature rabbits. *Pediatric research*. 1996;40(3):381-7.
78. Solaroglu A, Dede F, Okutan E, Bayrak A, Haberal A, Kilinc K. A single dose of erythropoietin attenuates lipid peroxidation in experimental liver ischemia-reperfusion injury in the rat fetus. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. 2004;16(4):231-4.
79. Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, et al. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia–reperfusion. *Life sciences*. 2006;78(19):2255-64.
80. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck K-H. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvascular research*. 2002;64(2):326-33.
81. Strunk T, Härtel C, Temming P, Matzke N, Zimmer J, Schultz C. Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes. *Acta Paediatrica*. 2008;97(1):16-20.
82. Yazihan N, Karakurt O, Ataoglu H. Erythropoietin reduces lipopolysaccharide-induced cell damage and midkine secretion in U937 human histiocytic lymphoma cells. *Advances in therapy*. 2008;25(5):502-14.
83. Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro. *Kidney international*. 1995;47(3):740-5.
84. Galeano M, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L, Calò M, Cascio PL, et al. Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds*. *Critical care medicine*. 2006;34(4):1139-46.
85. Keast DH, Fraser C. Treatment of chronic skin ulcers in individuals with anemia of chronic disease using recombinant human erythropoietin (EPO): a review of four cases. *Ostomy/wound management*. 2004;50(10):64-70.
86. Ferri C, Giuggioli D, Sebastiani M, Colaci M. Treatment of severe scleroderma skin ulcers with recombinant human erythropoietin. *Clinical and experimental dermatology*. 2007;32(3):287-90.
87. Ribatti D. Erythropoietin and tumor angiogenesis. *Stem cells and development*. 2010;19(1):1-4.
88. Debus ES, Schmidt K, Ziegler UE, Thiede A. [The role of growth factors in wound healing]. *Zentralblatt für Chirurgie*. 2000;125 Suppl 1:49-55.
89. Carter K. Growth factors: the wound healing therapy of the future. *British journal of community nursing*. 2003;8(9):S15-6, S8-9, S22-3.
90. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, Redmer DA, Reynolds LP, Abdullah A, et al. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs of today*. 2003;39(10):787-800.
91. Miller BW, Hay JM, Prigent SA, Dickens M. Post-transcriptional regulation of VEGF-A mRNA levels by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) during metabolic stress associated with ischaemia/reperfusion. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012;367(1-2):31-42.

92. Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;334(2):561-8.
93. Sirois MG, Edelman ER. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *The American journal of physiology*. 1997;272(6 Pt 2):H2746-56.
94. Berse B, Brown LF, Van De Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Molecular biology of the cell*. 1992;3(2):211-20.
95. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*. 1994;90(2):649-52.
96. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(52):31189-95.
97. Gaudry M, Br gerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocidalo M-A, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood*. 1997;90(10):4153-61.
98. Banks R, Forbes M, Kinsey S, Stanley A, Ingham E, Walters C, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *British journal of cancer*. 1998;77(6):956.
99. Nissen NN, Polverini P, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *The American journal of pathology*. 1998;152(6):1445.
100. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF 165 in patient with ischaemic limb. *The Lancet*. 1996;348(9024):370-4.
101. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *Journal of vascular surgery*. 1998;28(6):964-75.
102. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98(25):2800-4.
103. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996;93(8):1493-5.
104. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine*. 2001;7(5):575-83.
105. Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G. The alpha-helical domain near the amino terminus is essential for dimerization of vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(18):11115-20.

106. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 1992;255(5047):989-91.
107. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, et al. FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer research*. 1992;52(20):5738-43.
108. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;187(3):1579-86.
109. Snyderman R, Gallin JI, Goldstein IM. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*: Raven Press; 1992.
110. Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(21):12607-13.
111. Wiczór R, Gadowska G, Ruszkowska-Ciastek B, Stankowska K, Budzyński J, Fabisiak J, et al. Impact of type 2 diabetes on the plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors type 1 and type 2 in patients with peripheral arterial disease. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2015;16(11):948-56.
112. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*. 1998;97(1):99-107.
113. Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, et al. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(24):9679-83.
114. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino J, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1989;84(5):1470.
115. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*. 1997;95(4):1030-7.
116. Brock TA, Dvorak H, Senger D. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *The American journal of pathology*. 1991;138(1):213.
117. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *Journal of cellular physiology*. 1992;153(3):557-62.
118. Yebra M, Parry GC, Strömblad S, Mackman N, Rosenberg S, Mueller BM, et al. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin $\alpha\beta 5$ -directed cell migration. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(46):29393-9.
119. Morbidelli L, Chang C-H, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium.

- American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1996;270(1):H411-H5.
120. Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, Ajioka I, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells. *Oncogene*. 1997;14(17):2025-32.
 121. Portha B, Levacher C, Picon L, Rosselin G. Diabetogenic effect of streptozotocin in the rat during the perinatal period. *Diabetes*. 1974;23(11):889-95.
 122. Benwahhoud M, Jouad H, Eddouks M, Lyoussi B. Hypoglycemic effect of *Suaeda fruticosa* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2001;76(1):35-8.
 123. Cetto AA, Wiedenfeld H, Revilla MC, Sergio IA. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;72(1):129-33.
 124. Qiu Z, Kwon A-H, Kamiyama Y. Effects of plasma fibronectin on the healing of full-thickness skin wounds in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Surgical Research*. 2007;138(1):64-70.
 125. Hong JP, Park SW. The combined effect of recombinant human epidermal growth factor and erythropoietin on full-thickness wound healing in diabetic rat model. *International wound journal*. 2014;11(4):373-8.
 126. Yang M-Y, Chiang Y-C, Huang Y-T, Chen C-C, Wang F-S, Wang C-J, et al. Serum Proteomic Analysis of Extracorporeal Shock Wave Therapy-Enhanced Diabetic Wound Healing in a Streptozotocin-Induced Diabetes Model. *Plastic and reconstructive surgery*. 2014;133(1):59-68.
 127. Bagdas D, Cam Etoz B, Inan Ozturkoglu S, Cinkilic N, Ozyigit MO, Gul Z, et al. Effects of systemic chlorogenic acid on random-pattern dorsal skin flap survival in diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2014;37(3):361-70.
 128. Demiot C, Sarrazy V, Javellaud J, Gourloi L, Botelle L, Oudart N, et al. Erythropoietin restores C-fiber function and prevents pressure ulcer formation in diabetic mice. *Journal of Investigative Dermatology*. 2011;131(11):2316-22.
 129. Bartus CL, Margolis DJ. Reducing the incidence of foot ulceration and amputation in diabetes. *Current diabetes reports*. 2004;4(6):413-8.
 130. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*. 2005;366(9498):1736-43.
 131. Freudenberg U, Zieris A, Chwalek K, Tsurkan MV, Maitz MF, Atallah P, et al. Heparin desulfation modulates VEGF release and angiogenesis in diabetic wounds. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;220(Pt A):79-88.
 132. Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calò M, Bitto A, et al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*. 2004;53(9):2509-17.
 133. Greenhalgh DG, Sprugel K, Murray M, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *The American journal of pathology*. 1990;136(6):1235.
 134. Li X, Gan K, Song G, Wang C. VEGF gene transfected umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improve the lower limb vascular lesions of diabetic rats. *Journal of diabetes and its complications*. 2015;29(7):872-81.

135. Tosun Z, Özkan A, Karaçor Z, Savaci N. Delaying the reverse sural flap provides predictable results for complicated wounds in diabetic foot. *Annals of plastic surgery*. 2005;55(2):169-73.
136. Wu F, He Z, Ding R, Huang Z, Jiang Q, Cui H, et al. Danhong Promotes Angiogenesis in Diabetic Mice after Critical Limb Ischemia by Activation of CSE-H 2 S-VEGF Axis. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2015;2015:276263.
137. Zhou Z, Ju H, Sun M, Chen H, Ji H, Jiang D, et al. Serum fetuin-A concentrations are positively associated with serum VEGF levels in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Endocrine journal*. 2015;62(10):879-85.
138. Albertson S, Hummel 3rd R, Breeden M, Greenhalgh D. PDGF and FGF reverse the healing impairment in protein-malnourished diabetic mice. *Surgery*. 1993;114(2):368-72; discussion 72-3.
139. Kitada M, Zhang Z, Mima A, King GL. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *Journal of diabetes investigation*. 2010;1(3):77-89.
140. Symeonidis A, Kouraklis-Symeonidis A, Psiroyiannis A, Leotsinidis M, Kyriazopoulou V, Vassilakos P, et al. Inappropriately low erythropoietin response for the degree of anemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Annals of hematology*. 2006;85(2):79-85.
141. Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Yilmaz O, Cerami A, Coleman T, Brines M. Nonerythropoietic tissue protective compounds are highly effective facilitators of wound healing. *Molecular medicine*. 2009;15(7-8):235.
142. Erdmann D, Sweis R, Wong MS, Niklason LE, du Laney TV, Levin LS, et al. Vascular endothelial growth factor expression in pig latissimus dorsi myocutaneous flaps after ischemia reperfusion injury. *Plastic and reconstructive surgery*. 2003;111(2):775-80.
143. Kim EK, Hong JP. The effect of recombinant human erythropoietin on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat TRAM flap model. *Plastic and reconstructive surgery*. 2007;120(7):1774-81.
144. Kryger Z, Zhang F, Lineaweaver WC, Dogan T, Cheng C, Buncke HJ. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *British journal of plastic surgery*. 2000;53(3):234-9.
145. Rezaeian F, Wettstein R, Amon M, Scheuer C, Schramm R, Menger MD, et al. Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. *Annals of surgery*. 2008;248(6):919-29.
146. Saray A, Ozakpinar R, Koc C, Serel S, Sen Z, Can Z. Effect of Chronic and Short-Term Erythropoietin Treatment on Random Flap Survival in Rats: An Experimental Study. *The Laryngoscope*. 2003;113(1):85-9.
147. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W, et al. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Annals of plastic surgery*. 2001;46(3):314-9.
148. Zhang F, Lineaweaver W. Acute and sustained effects of vascular endothelial growth factor on survival of flaps and skin grafts. *Annals of plastic surgery*. 2011;66(5):581-2.
149. Komorowska-Timek E, Timek TA, Brevetti LS, Zhang F, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effect of single administration of vascular endothelial growth factor

or L-arginine on necrosis and vasculature of the epigastric flap in the rat model. *British journal of plastic surgery*. 2004;57(4):317-25.

150. Pang Y, Lineaweaver WC, Lei M-P, Oswald T, Shamburger S, Cai Z, et al. Evaluation of the mechanism of vascular endothelial growth factor improvement of ischemic flap survival in rats. *Plastic and reconstructive surgery*. 2003;112(2):556-64.

151. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery*. 1993;14(3):165-75.

152. Waters LM, Pearl RM, Macaulay RM. A comparative analysis of the ability of five classes of pharmacological agents to augment skin flap survival in various models and species: an attempt to standardize skin flap research. *Annals of plastic surgery*. 1989;23(2):117-22.

153. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. *Plastic and reconstructive surgery*. 1984;73(6):943-8.

154. Carvalho ENd, Ferreira LM, Carvalho NASd, Abla LEF, Liebano RE. Viability of a random pattern dorsal skin flap, in diabetic rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20(3):225-8.

155. Most D, Hoyt J, Sibley RK, Press BH. Parenchymal cytokine expression precedes clinically observed ischemia in dorsal flaps in the rat. *Plastic and reconstructive surgery*. 1996;98(5):856-61.

156. Kusumanto Y, Hospers G, Mulder N, Tio R. Therapeutic angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral and coronary artery disease: a review. *International journal of cardiovascular interventions*. 2003;5(1):27-34.

157. Hom DB, Baker SR, Graham LM, Mcclatchey KD. Utilizing angiogenic agents to expedite the neovascularization process in skin flaps. *The Laryngoscope*. 1988;98(5):521-6.

158. Lubiatowski P, Gurunluoglu R, Goldman CK, Skugor B, Carnevale K, Siemionow M. Gene therapy by adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 promotes perfusion of muscle flaps. *studies*. 2002;5:7.

159. Padubidri A, Browne Jr E. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Annals of plastic surgery*. 1996;37(6):604-11.

160. Takeshita S, Rossow ST, Kearney M, Zheng LP, Bauters C, Bunting S, et al. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *The American journal of pathology*. 1995;147(6):1649.

161. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;121(1):50-8.

162. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*. 2009;153(2):347-58.

163. Folkman J, Brem H. Angiogenesis and inflammation. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. 1992;2:821-39.

164. Bondarenko N, Nikonorova YV, Surovtseva M, Lykov A, Poveshchenko O, Poveshchenko A, et al. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor and Erythropoietin on Functional Activity of Fibroblasts and Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2016;160(4):498.

165. Bhatta SS, Wroblewski KE, Agarwal KL, Sit L, Cohen EE, Seiwert TY, et al. Effects of vascular endothelial growth factor signaling inhibition on human erythropoiesis. *The oncologist*. 2013;18(8):965-70.
166. Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC. Growth factors and flap survival. *Microsurgery*. 2004;24(3):162-7.
167. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(5):1011-27.
168. McFarlane E, Heagy F, Radin S, Aust J, Weemuth E. A study of the delay phenomenon in experimental pedicle flaps *Plastic and reconstructive surgery*. 1965;35(3):245-62.
169. Cherry GW, Austad E, Pasyk K, McClatchey K, Rohrich RJ. Increased survival and vascularity of random-pattern skin flaps elevated in controlled, expanded skin. *Plastic and reconstructive surgery*. 1983;72(5):680-5.