

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA MCFARLANE FLEP MODELİNDE
RİPASUDİL'İN FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. HALİL İBRAHİM KANLIKAMA

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ RAMAZAN HAKAN ÖZCAN

DENİZLİ-2022

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA MCFARLANE FLEP MODELİNDE
RİPASUDİL'İN FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. HALİL İBRAHİM KANLIKAMA

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ RAMAZAN HAKAN ÖZCAN

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 28.06.2022 tarih ve 2022TPF017 no'lu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2022

TEŞEKKÜR

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Ana bilim dalındaki eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bizlere aktaran Ana bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. B. İnci Gökalan KARA'ya, kliniğimizde göreve başladığı günden beri mesleki gelişimimde büyük katkıları olaran sayın Doç. Enver Arpacı'ya ve bizlere bildiği her şeyi öğretmek için çabalayan, hem mesleki hem de insani olarak örnek aldığım kıymetli hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi. Ramazan Hakan ÖZCAN'a;

Tezimin deney aşamalarını gerçekleştirdiğim PAÜ Deneysel Hayvan Araştırmaları Laboratuvarı çalışanlarına ve tezimi hazırlama sürecinde yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. Gülçin Abban Mete'ye, değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Gül Neşet'e, sayın Dr. Öğr. Üyesi Hande Şenol'a;

Anabilim dalında birlikte çalıştığımız asistan arkadaşlarıma, klinik hemşirelerine, sekreterlerine, personellerine ve başta çok değerli hemşiremiz Mine ŞEN olmak üzere tüm ameliyathane hemşirelerine ve personellerine;

Hayatımın her döneminde bana destek olan, çok sevgili annem, babam ve kardeşlerime ve;

Bu zorlu yolculuğumdaki son bir senelik serüvenimde her anımda yanımda olan, her şeyini ama en önemlisi çok değerli sevgisini benimle paylaşan Sevgilim, Aymila'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

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	2
FLEP TANIMLAMASI VE SINIFLANDIRMA.....	2
Flep Tanımı.....	2
Flep Tarihçesi	2
Fleplerin Sınıflandırılması	5
Flep fizyolojisi.....	6
Flep Kaybı.....	8
Flep Yaşayabilirliğini Etkileyen Faktörler ve Farmakolojik Ajanlar ..	8
Sıçan Kaudal Tabanlı McFarlane Flebi.....	10
RHO KİNAZLAR VE RHO KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ.....	11
Rho Kinaz Tanımı.....	11
Rho Kinazların Etkileri	12
Rho Kinaz İnhibitörleri.....	13
Rho Kinaz İnhibitörlerinin etkileri	14
RİPASUDİL	14
GEREÇ VE YÖNTEM	15
Deney Protokolü ve Deneklerin Gruplandırılması	15
Operatif Girişim.....	15
Sakrifikasyon protokolü	17
Değerlendirmeler	17
Yüzey Alan Değerlendirmesi	17
Histopatolojik Değerlendirme.....	18
Hematoksilen Eozin Boyanması	18

İmmünohistokimyasal boyama	19
Trizol Reagent ile Total RNA izolasyonu	19
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR).....	19
İstatistiksel Değerlendirme	21
BULGULAR	22
Hematoksilen Eozin Değerlendirmesi	22
PCR Sonuçları.....	28
Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu Sonuçları	28
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu(RT-PCR) Sonuçları	28
Yüzey Alan Değerlendirme Sonuçları.....	31
Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	32
TARTIŞMA	37
SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

Akt	: Protein kinaz B
AT III	: Antitrombin III
ARDS	: Akut Respiratuvar Stres Sendromu
ATP	: Adenozin Trifosfat
BAP	: Bilimsel Araştırma Projeleri
C	: Santigrat derece
cAMP	: Siklim Adenozin Monofosfat
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
cm	: Santimetre
COX	: Siklooksijenaz
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FDA	: Food and Drug Administration
GEF	: Guanin değişim faktörü
GTP	: Guanozin Trifosfat
GTPaz	: Guanozin Trifosfataz
IL-6	: İnterlökin 6
kDA	: Kilo Dalton
kg	: Kilogram
K-115	: Ripasudil
Mcp-1	: Monosit kemotaktik Faktör 1
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikro Mol

mm	: Milimetre
MLC	: Miyozin hafif zincir
MLCP	: Miyozin hafif zincir fosfataz
M.Ö.	: Milattan Önce
mRNA	: Mitokondrial Ribonükleik Asit
NFkB	: Nekrotizan Faktör Kappa B
ng	: Nanogram
nm:	: Nanometre
NO	: Nitrik Oksit
PAÜTF	: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE1	: Prostaglandin E1
PH	: Plekstrin homoloğu
RBB	: Rho bağlayıcı bölge
ROCK	: Rho kinaz
RT	: Reverse Transkriptaz
SPSS	: Sosyal Bilimler için İstatistik Programı
SZ	: Sisteince zengin
TNF alfa	: Tümör Nekrozis Faktör alfa
USA	: Amerika Birleşik Devletleri
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
vWF	: Von Willebrand faktör

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 1.Sushruta burun rekonstrüksiyonu.	2
Şekil 2.Gaspere Tagliacozzi burun rekonstrüksiyonu 16. yy.	3
Şekil 3. Carl Manchot, medial ve posterior bacak arteriyel kutanöz vasküler ağı[7]. 4	
Şekil 4. Derinin kan akımı.	5
Şekil 5. Kutanöz vasküler pleksuslar[18].	7
Şekil 6. Kaudal tabanlı Mcfarlane flep.	11
Şekil 7. Rho/Rho kinaz sinyal yolağı.....	11
Şekil 8. ROCK I ve II yapısı.....	12
Şekil 9. Gruplar arasında VEGF ekspresyon değişimleri.	29
Şekil 10. Gruplar arasında eNOS(nos3) ekspresyon değişimleri.	30
Şekil 11. Gruplar arasında Bax, Bcl-2 ekspresyon değişimleri.	30
Şekil 12. Grupların Flep yaşayan alanlarının grafiksel olarak karşılaştırması.	34
Şekil 13. Grupların Kapiller Dansitelerinin grafiksel olarak karşılaştırması.....	34
Şekil 14. Grupların Nötrofil sayılarının grafiksel karşılaştırması.....	35
Şekil 15.Grupların Total İnflamatuar hücre sayılarının grafiksel karşılaştırması.....	35
Şekil 16. Grupların granülasyon dokusu kalınlıklarının grafiksel karşılaştırması.....	36
Şekil 17. Grupların Kollajen yoğunluklarının grafiksel karşılaştırması.	36
Resim 1.Sıçan kaudal tabanlı 3x9 cm Mcfarlane flep tasarımı.	16
Resim 2. Flep elevasyonu.....	17
Resim 3. Flebin yerine iade edilmesi sonrası.	17
Resim 4. Adobe Photosop 2022 ile yüzey alan hesaplaması.....	18
Resim 5. Grup 1 Hematoksilen eozin boyamanın histopatolojik görüntüsü.	22
Resim 6. Grup 2 Hematoksilen eozin boyamanın histopatolojik görüntüsü.	23
Resim 7. Grup 3 Hematoksilen eozin boyamanın histopatolojik görüntüsü(20X)....	23
Resim 8. Grup 4 Hematoksilen eozin boyamanın histopatolojik görüntüsü(20X)....	24
Resim 9 A-D. Masson Trikrom ile boyamanın histopatolojik görüntüsü.	25
Resim 10 A-D. VEGF monoklonal antikoru ile boyama(20X).....	26
Resim 11 A-D. eNOS antikoru ile boyama.	27

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Housekeeping gen ve analiz edilen genlerin primer dizileri.....	20
Tablo 2. Histopatolojik skorlama kriterleri.	24
Tablo 3. Skor tablosu, 10 farklı alan sayımının ortalaması ile elde edilen puanlama.	25
Tablo 4. VEGF ekspresyonu.	27
Tablo 5. eNOS ekspresyonu.....	28
Tablo 6. Ripasudil etkinliğini belirlemek için izole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri.....	28
Tablo 7. Deney gruplarının Vegfa, Nos3, Bax ve Bcl-2 gen değerlerinin gruplar arasındaki değişim sonuçları.	29
Tablo 8. Grupların Flep yaşam oranlarının karşılaştırılması.....	31
Tablo 9. Grupların Flep yaşayan alan, Nötrofil sayısı, Kapiller Dansite ve Total İnflamatuar hücre sayılarının istatistiksel karşılaştırması.	32
Tablo 10. Grupların Granülasyon dokusu oluşumu ve Kollajen depoziti yoğunluklarının istatistiksel karşılaştırması.....	33

ÖZET

Sıçanlarda Mcfarlane Flep Modelinde Ripasudil'in Flep Yaşayabilirliğine Etkisi

Dr. Halil İbrahim KANLIKAMA

Flepler, kendi kan damarları bulunan ve doku defektlerinin onarımında kullanılan, rekonstrüktif plastik cerrahinin en temel yöntemlerinden biridir. Vücudun hemen her bölgesinde kullanılabilen fleplerin beslenmesi uzun yıllardır üzerinde çalışılan ve hala gelişime ihtiyaç duyan bir konudur. Flep yaşayabilirliğinin artırılması ve nekrozun önlenmesi için yüzlerce yöntem ve molekül üzerinde çalışmalar yapılmış ve ciddi başarılar elde edilmiştir. Kısmi ya da tam flep nekrozu, flep başarısızlığının hala en önemli sorunu olup ilgi konusu olmaya devam etmektedir. Rho kinazlar(ROCK), serin-treonin kinaz ailesine ait proteinlerdir. Esas olarak hücrenin şeklini ve hareketini belirlerler. Rho kinaz inhibitörlerinin ise koroner vazospazm, serebral vazospazm, anjina, pulmoner hipertansiyon, erektil disfonksiyon, glokom, insülin direnci gibi durumlarda potansiyel faydalı etkileri gösterilmiş, günümüze kadar iki ROCK inhibitörü, Fasudil 1995 yılında serebral vazospazm, Ripasudil 2014 yılında glokom tedavisi için Japonya'da onaylanmıştır. Ripasudil(K-115), yeni bir rho kinaz inhibitörü olup, göz içi basıncı azalttığı, retinal mikrosirkülasyonu ve oküler kan akımını artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca akut akciğer hasarında(ARDS), lipopolisakkaritlerle indüklenen apoptozisi ve endotel hasarını, inflamasyonu, koagülasyonu, kontraksiyonu ve ödemi azalttığı gösterilmiştir. Literatür taramasında Ripasudil'in flep yaşayabilirliği üzerine etkilerine dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 28 adet rat randomize olarak dört eşit gruba ayrıldı(n=7). Grup 1 kontrol grubu olup herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. Grup 2 plasebo grubu olup postoperatif 0, 1 ve 2. günlerde 12 saatlik aralıklarla günde iki doz olacak şekilde 2ml/kg serum fizyolojik uygulandı. Grup 3 düşük doz Ripasudil grubu olup postoperatif 0, 1 ve 2. günlerde 12 saatlik aralıklarla günde iki doz olacak şekilde toplam 2mg/kg Ripasudil uygulandı. Grup 4 yüksek doz Ripasudil grubu olup, postoperatif 0, 1 ve 2. günlerde 12 saatlik aralıklarla günde iki doz olacak şekilde toplam 8mg/kg Ripasudil uygulandı. Tüm flepler postoperatif 7. gün total olarak eksize edildi. Makroskopik olarak flep yaşayan alanları hesaplandı. Yaşayan ortalama

flep alanlarının Grup 2’de %50, Grup 3’te %62, Grup 4’te %70 olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında yaşayan flep alanı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı($p<0.05$). Histopatolojik olarak hematoxilen eozin, masson trikrom, immünohistokimyasal olarak ise VEGF ve eNOS antikorları ile boyamalar yapıldı. Alınan biyopsi örnekleri histopatolojik incelemede neovaskülarizasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, fibroblast proliferasyonu ve kollajen depolanması değerlendirilerek skorlama yapıldı. VEGF, eNOS, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonları PCR yardımıyla değerlendirildi. Yaşayan flep alanı, neovaskülarizasyon, nötrofil sayıları, total inflamatuvar hücre sayıları, fibroblast proliferasyonu ve kollajen depolanmalarından elde edilen değerler istatistiksel olarak analiz edildi. Yaşayan flep alanları, neovaskülarizasyon, nötrofil sayıları, total inflamatuvar hücre sayıları, PCR ile VEGF, eNOS, Bax ve Bcl-2 değerlendirmelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı($p<0.05$). Fibroblast proliferasyonu ve kollajen depolanmasında ise klinik farklılık olsa da istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Morfolojik ve histopatolojik değerlendirmeler sonucunda Ripasudil’in flep yaşayabilirliğine anlamlı katkı sağladığı görülmüştür. Artan dozlarda uygulama ile anlamlı sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçlar hipotezimizi desteklemekte ve Ripasudil’in flep yaşayabilirliğini artırmada kullanımını mümkün, potansiyel faydalı bir molekül olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Flep yaşayabilirliği, Mcfarlane Flep, Ripasudil, Rho kinaz inhibitörü.

ABSTRACT

The Effect of Ripasudil on Flap Viability in the Mcfarlane Flap Model in Rats

Dr. Halil İbrahim KANLIKAMA

Flaps are one of the most basic methods of reconstructive plastic surgery, which have their own blood vessels and are used to repair tissue defects. Nutrition of flaps, which can be used in almost every part of the body, is a subject that has been studied for many years and still needs improvement. In order to increase flap viability and prevent necrosis, studies have been carried out on hundreds of methods and molecules and serious successes have been achieved. Partial or complete flap necrosis is still the most important problem of flap failure and continues to be of interest. Rho kinases (ROCK) are proteins belonging to the serine-threonine kinase family. They mainly determine the shape and movement of the cell. On the other hand, the potential beneficial effects of Rho kinase inhibitors in conditions such as coronary vasospasm, cerebral vasospasm, angina, pulmonary hypertension, erectile dysfunction, glaucoma, insulin resistance have been demonstrated. Two ROCK inhibitors, Fasudil in 1995 for the treatment of cerebral vasospasm, Ripasudil in 2014 for the treatment of glaucoma, have been approved in Japan. Ripasudil (K-115) is a new rho kinase inhibitor and it has been shown in studies to decrease intraocular pressure, increase retinal microcirculation and ocular blood flow. It has also been shown to reduce lipopolysaccharide-induced apoptosis and endothelial damage, inflammation, coagulation, contraction and edema in acute lung injury (ARDS). In the literature review, there are no studies on the effects of Ripasudil on flap viability.

In our study, 28 rats were randomly divided into four equal groups(n=7). Group 1 was the control group and no surgical procedure was applied. Group 2 was the placebo group, and 2 ml/kg saline was administered twice a day at 12-hour intervals on postoperative days 0, 1 and 2. Group 3 was the low-dose Ripasudil group, and a total of 2mg/kg Ripasudil was administered twice a day at 12-hour intervals on postoperative days 0, 1 and 2. Group 4 was the high-dose Ripasudil group, and a total of 8mg/kg Ripasudil was administered twice a day at 12-hour intervals on postoperative days 0, 1 and 2. All flaps were completely excised on the 7th postoperative day. The areas of flap living were calculated macroscopically. It was observed that the average living flap area was 50% in Group 2, 62% in Group 3, and

70% in Group 4. A statistically significant difference was found between the groups in terms of living flap area ($p < 0.05$). Staining was done with Hematoxylin eosin, Masson trichrome histopathologically, and VEGF and eNOS antibodies immunohistochemically. Biopsy specimens were scored by evaluating neovascularization, inflammatory cell infiltration, fibroblast proliferation and collagen deposition in histopathological examination. VEGF, eNOS, Bax and Bcl-2 gene expressions were evaluated by PCR. Values obtained from living flap area, neovascularization, neutrophil counts, total inflammatory cell counts, fibroblast proliferation and collagen deposition were statistically analyzed. A statistically significant difference was found in the evaluations of living flap areas, neovascularization, neutrophil counts, total inflammatory cell counts, VEGF, eNOS, Bax and Bcl-2 by PCR ($p < 0.05$). Although there were clinical differences in fibroblast proliferation and collagen deposition, no statistically significant difference was found.

As a result of morphological and histopathological evaluations, it was seen that Ripasudil contributed significantly to flap viability. Significant results were obtained with increasing doses. These results support our hypothesis and suggest that Ripasudil is a potentially useful molecule that can be used to increase flap viability.

Keywords: Flap viability, Mcfarlane Flap, Ripasudil, Rho kinase inhibitor.

GİRİŞ

Konjenital ya da edinilmiş defektlerin uygun form ve fonksiyonda onarımı plastik cerrahinin en temel uğraşlarından biridir. Flepler uzun zamandan beri bu amaca yönelik olarak kullanılmaktadır. Her geçen yıl flep fizyolojisini ve sorunlarını irdeleyen çalışmalar yapılmasına rağmen, flep kaybı plastik ve rekonstrüktif cerrahi açısından önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Uygulanan serbest fleplerde total flep kaybı %1-6, kısmi flep kaybı serbest fleplerde %6-20, pediküllü fleplerde %20-35 oranındadır. Flep kaybı ve komplikasyonların gelişmesinde cerrahi tekniğe bağlı durumlar ile hastaya bağlı lokal ve sistemik faktörler önemli yer tutmaktadır. Komplikasyonların azaltılmasında delay yöntemleri, farmakolojik tedaviler, sistemik durumları iyileştirmeye yönelik müdahaleler dahil olmak üzere birçok yöntem uygulanmaktadır.

Rho kinazlar, serin-treonin ailesine ait olan ve inhibisyonları vücutta birçok maddenin üretimini etkileyen proteinlerdir. Rho kinaz inhibitörlerinin ise astım, kardiyak iskemi, erektil disfonksiyon, böbrek yetmezliği, insülin direnci, glokom, kanser gibi hastalıklarda potansiyel terapötik etkileri mevcuttur[1].

Ripasudil, selektif bir Rho kinaz inhibitörü olup 2014 yılında Japonya'da glokom tedavisi için onay almıştır. Glokom hastalarında hümör aközün dışa akışını artırdığı ve göz içi basıncı düşürdüğü gösterilmiştir[2]. Bunun yanında optik sinir başına kan akımını artırdığını ve akut akciğer hasarında inflamasyonu ve apoptozisi azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur[3,4].

GENEL BİLGİLER

FLEP TANIMLAMASI VE SINIFLANDIRMA

Flep Tanımı

Flepler, çok sayıda konfigürasyonu bulunan, vasküler kaynağı ile birlikte alıcı alandan donör alana transfer edilebilen dokulardır. Cilt gibi tek bir doku içerebileceği gibi kas, kemik, kıkırdak, fasya gibi yapıları ve bunların kombinasyonlarını içerecek şekilde planlanabilir. Travma ya da cerrahi rezeksiyona sekonder olarak gelişmiş yaralar ve doku defektleri ile kan akımı yetersiz olan ve kemik, kıkırdak gibi dış ortamla temasının komplikasyonlara neden olacağı yapıların onarımında kullanılırlar. Özellikle hem fonksiyon hem de estetiğin ön planda olduğu anatomik alanlar için en kullanışlı seçenekler fleplerdir.

Flep Tarihçesi

Fleplerin ilk kullanımı, M.Ö. 6-7. yüzyılda Hindistan'da yaşamış olan, burunda doku defekti bulunan genç bir kadına alın flebi ile rekonstrüksiyon gerçekleştiren Sushruta'ya dayandırılmaktadır (Şekil 1). 16. yüzyıla gelindiğindeyse İtalyan cerrah Gaspare Tagliacozzi yine burun rekonstrüksiyonu için koldan transfer ettiği iki aşamalı flebini tanımlamıştır.



Şekil 1.Sushruta burun rekonstrüksiyonu.

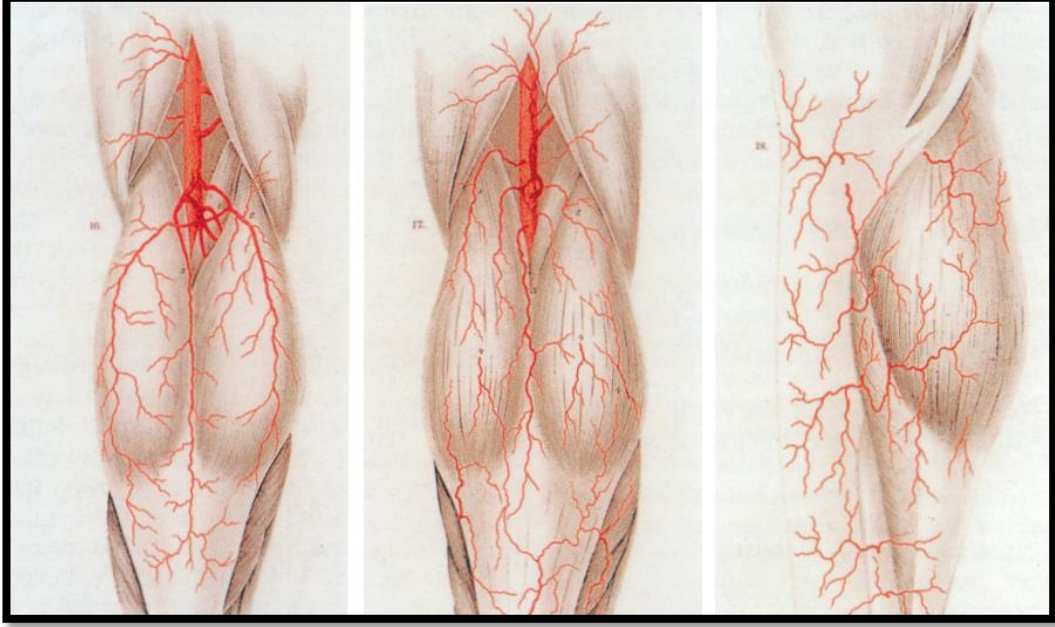


Şekil 2. Gaspare Tagliacozzi burun rekonstrüksiyonu 16. yy.

Uzun yıllar sessizliğini koruyan flep konusu nihayet ikinci dünya savaşı öncesi yeniden gündeme gelmiştir. Bu süreçte cerrahi konseptin deneysel olarak gelişimi, anatomik bilgi birikiminin artması, cerrahi anastomoz ve binoküler mikroskopun kullanıma girmesiyle önemli gelişme kaydedilmiştir. 1862 yılında ilk gerçek aksiyel paternli cilt flebi Londra Kraliyet Koleji'nde çalışmakta olan John Wood tarafından tanımlanmıştır. John Wood sekiz yaşında yanık nedeniyle elinde kontraktür gelişen hastaya groin flebini uygulayarak literatüre geçmiştir[5].

1892 yılında İtalyan cerrah İgnio Tansini, radikal mastektomi sonrası oluşan cilt defektini latissimus dorsi cilt flebi ile onarmıştır. Flepte kısmi nekroz gelişse de bu latissimus dorsi flebin temelini oluşturmuş ve Tansini'nin vasküler paterni araştırarak latissimus dorsi flebini kas ile beraber eleve etme fikrini geliştirmesini sağlamıştır[6]. 19. yüzyılın sonlarında Carl Manchot deri kanlanması, derin kutanöz arterleri ve kastan ayrılma paternlerini detaylı olarak tanımlamıştır[7](Şekil 3). 1930 yılında ise

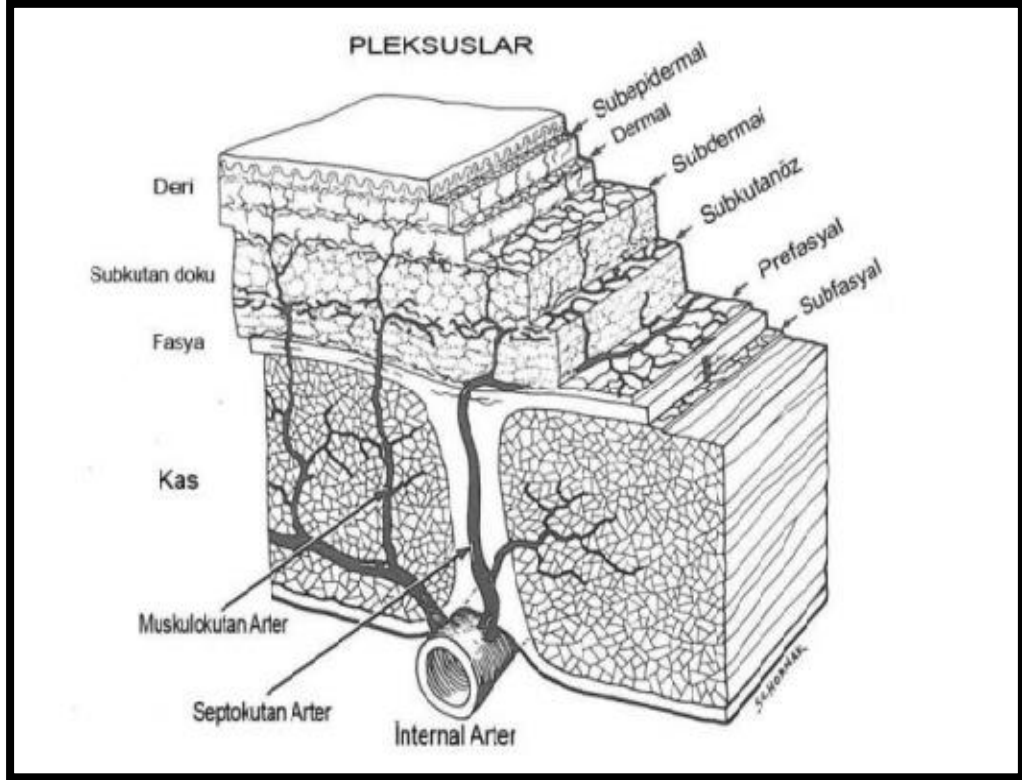
Fransız anatomist ve cerrah Michel Salmon kutanöz arterlerle ilgili en kapsamlı ve tanımlayıcı çalışmaları gerçekleştirmiştir ve günümüzde de bu tanımlamalar geçerliliğini korumaktadır[8].



Şekil 3. Carl Manchot, medial ve posterior bacak arteriyel kutanöz vasküler ağı[7].

1950-1975 yıllarında Gywn Mcgregor ve Ian A. Morgan fleplerde random ve aksiyel dolaşım paternlerini açıklamaya çalışmışlardır. Bunlara ek olarak ameliyat mikroskopunun kullanılmaya başlanması, uç-uca anastomoz denemeleri ile de mikrovasküler serbest doku aktarımı ortaya çıkmıştır[9]. 1950'lerin sonlarında Japonya, Amerika ve Sovyetler Birliğinde ampute uzuvların replantasyonu ile ilgili deneysel çalışmalar yapılmıştır. Tüm bu çalışmalar Jacobson ve Suarez'in 1960 yılında 1 mm'lik damar anastomoz üzerine başlamıştır[10]. 1960'larda mikrocerrahinin babası sayılan Buncke ilk başarılı ampute tavşan kulağı replantasyonunu, 1965'te Tamai ilk total ampute baş parmak replantasyonunu gerçekleştirmiştir[11]. Bunun yanında Bakamjiyan 1965'te deltopektoral flebi, Krizek ve arkadaşları superfisyal sirkümfleks damarlar üzerinden ilk serbest doku transferini, 1973'te Daniel ve Taylor serbest groin flebini, Ralph Ger ise başarılı bir takım kas fleplerini vaka serisi olarak tanımlamış ve yayınlamışlardır[12–15]. 1979'da Mathes ve Nahai, halen geçerli olan sistematik kas sınıflamasını tanımladılar[16]. 1981'de

Mathes ve Nahai kas fleplerini vasküler anatomilerine göre sınıflamışlardır. 1987'de Taylor anjiozom kavramını tanımlamış ve vücudu bir arterden kaynaklanan ve alt gruplara ayrılabilen 40 adet anjiozom bölgesine ayırmıştır. Kaynak damarın beslediği cilt adasına anjiozom denir. Taylor ve Palmer, bu anjiozom alanında fleplere kan akımı sağlayan üç boyutlu bir damar ağının varlığından bahsetmişlerdir[17](Şekil 4).



Şekil 4. Derinin kan akımı.

Fleplerin Sınıflandırılması

Flepler, genellikle kozmetik ya da diğer endişelerle deri greftlerinin kullanılmadığı, alıcı sahada vasküler sorunların olduğu kondisyonlarda kullanılırlar. Fleplerin sınıflaması bir takım farklı özelliklerine göre yapılmaktadır.

1. Dolaşımına göre fleplerin sınıflandırılması

- Direkt damarlar
 - ✓ Aksiyel
 - ✓ Septokütan

- ✓ Endosteal
- İndirekt damarlar
 - ✓ Myokütan
 - ✓ Periosteal

2. Kompozisyonuna göre fleplerin sınıflandırılması

- Deri flepleri
- Fasiyokütan flepler
- Kas-Kas deri flepleri
- Osseokütan flepler
- Visseral flepler

3. Hareket kabiliyetine göre fleplerin sınıflandırılması

A. Lokal flepler

- ✓ İlerletme flepleri
- ✓ Rotasyon flepleri
- ✓ Transpozisyon flepleri
- ✓ İnterpolasyon flepleri

B. Uzak Flepler

- ✓ Direkt flepler
- ✓ İndirekt flepler: Tüp flepler, interpolasyon flepleri
- ✓ Serbest flepler

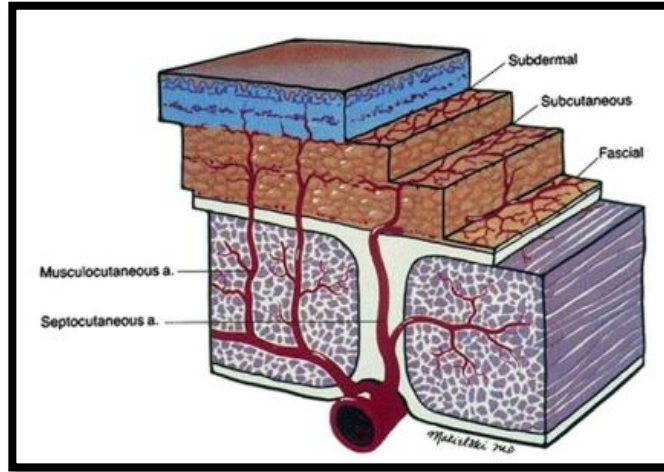
Flep fizyolojisi

Flep cerrahisinde bir cilt flebi elde edilirken normal cilde göre farklı stres durumları gelişir. Bu stres durumu, lokal doku travması ve azalmış nörovasküler destek nedeniyle oluşur. Cildin bu travmadan sağlıklı biçimde kurtulabilmesi cildin anatomisi ve fizyolojisinin yanı sıra cildin vereceği kutanöz tepkinin bir yansımasıdır.

Derinin termoregülasyon, koruma ve duyu olmak üzere üç ana görevi vardır. Termoregülasyon ve beslenme derinin benzersiz kan akımı sayesinde olur. Deriye kan akımı muskülokütan, direkt kütanöz ve septokütan olmak üzere üç ana yol ile gerçekleşir. Literatürde tanımlanan, cilt ve superfisyal yumuşak dokular içerisinde yerleşen, dermal, subdermal, subkutan, prefasyal ve subfasyal ağ olmak üzere beş

farklı vasküler pleksus mevcuttur. Flep cerrahisinde sağ kalımı etkileyen bu çok gelişmiş yapının sağladığı kan akımıdır (Şekil 4,5).

Deri, termoregülasyon ve hemostaz sağlamadaki rolünü kan akım hızını artırıp azaltarak gerçekleştirir. Deriye normal hemodinamik durumlarda bile olan kan akımı minimal ihtiyacın 10 katı olacak şekilde gerçekleşmektedir. Hipertermide kan akımı vazodilatasyon yolu ile hızlanırken hipotermide ise vazokonstrüksiyon yolu ile yavaşlar. Retiküler dermiste bulunan kapiller damar ağı ve arteriyoller sfinkter görevi görerek hipoksi ve artmış metabolik ihtiyaca cevap olarak gevşeyerek kan akımını artırır. Bunun yanında papiller dermiste arteriyovenöz şantlar bir ağ oluştururlar ve cildin termoregülasyon ve hemodinami fonksiyonunu gerçekleştirmesini sağlarlar. Arteriyoller, lokal otonom norepinefrin ve asetil kolin salgısına cevap olarak preşant kapiller görevi görerek sistemik kan basıncı ya da ısı değişikliği durumunda kan akımını artırıp azaltırlar[18].



Şekil 5. Kutanöz vasküler pleksuslar[18].

Derinin kan akımı sistemik ve lokal olarak düzenlenir. Sistemik olarak özellikle nöral kontrol ön plandadır. Primer olarak sempatik liflerin alfa adrenerjik lifleri vasıtasıyla vazokonstrüksiyon, beta adrenerjik liflerle de vazodilastasyon yaparlar. Düz kas tonusu bu yolla düzenlenerek kan akımı regüle edilir. Humoral regülasyon ise sistemik vazoaktif modülatörler olan epinefrin ve norepinefrinin reseptörleri üzerinden vazokonstrüksiyon ile gerçekleşir. Regülasyonda görevli diğer vazokonstrüktörler tromboksan A₂, prostaglandin f_{2α} ve serotonin, vazodilatörler ise

prostaglandin E1(PGE1), prostaglandin I2(prostosiklin), histamin, bradikinin, lökotrien C4 ve lökotrien D4'tür[19].

Flep Kaybı

Fleplerin parsiyel ya da total nekrozu önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Kerrigan ve ark.'larına göre flep kaybında ekstrensek ve intrensek faktörler rol oynamaktadır. Ekstrensek faktörler, sistemik olarak; enfeksiyon, ateroskleroz, malnütrisyon, hipotansiyon, lokal olarak; bası, gerilim, anastomoz hattında tromboz ve pedikül katlanması olarak özetlenebilir. Ekstrensek faktörlerin aksine bilinen tek intrensek faktör ise yetersiz kan akımıdır. Flep kaybını azaltmaya yönelik çalışmalar geciktirme fenomeninin farmakolojik olarak taklit edilmesi üzerine yoğunlaşmış ve bir çok ajan bu amaçla kullanılmıştır. Flep elevasyonu sonrası flep distalinde düşen perfüzyon basıncı ve salınan vazokonstriktör nörotransmitterler en distalde kan akımının azalmasına neden olmaktadır. Ekstrensek ve intrensek faktörlerin de negatif etkisiyle iskemi süresi uzadıkça nihai sonuç olarak en distalde nekroz gerçekleşir. Kerrigan ve ark.'ları, ekstrensek faktörlere ek olarak intrensek kan akımından daha büyük planlanan flepler ile arteriyel ve venöz tromboz durumlarında flebin nekroza gideceğini ifade etmişlerdir[20]. İşaretlenmiş mikrosferler ile gerçekleştirilen çalışmalar flep elevasyonunu takiben pediküllü flebin bazalinde akım devam ederken flep distalinde kan akımı ilk 6-12 saat içinde %20'nin altına kadar indiğini göstermektedir. Akım ilk iki hafta içinde normal kan akımının %75'ine ardından yaklaşık üç dört hafta içerisinde ise %100'e kadar yükselmektedir[21].

Flep Yaşayabilirliğini Etkileyen Faktörler ve Farmakolojik Ajanlar

Flep cerrahisi sırasında flep yaşayabilirliğini etkileyen çok sayıda faktör bulunmaktadır. Uygun donör alan seçimi, alıcı sahanın operasyon öncesi nekroze yapılar ve debrislere arındırılması, ödem ve bakteri yükünün azaltılması, alıcı saha kan akımının yeterli düzeyde olması, mevcut sistemik komorbiditelerin düzeltilmesi, özenli cerrahi teknik ve doğru flep seçimi ve dizaynı hastaya ve cerraha bağlı önemli kriterlerdir. Ayrıca non invaziv flep monitörizasyonu postoperatif dönemde önem kazanmaktadır[22].

Flep planlaması bir flebin başarısını belirleyen en önemli kriterlerden biridir. Planlamada ise dikkat edilmesi gereken en boy oranları mevcuttur. Genellikle cilt flepleri random pediküllü olarak planlanır ve en boy oranları arasındaki denge, baş ve

boyun fleplerinde 1:4, 1:5 olabilirken alt ekstremite fleplerinde güvenli oran 1:1, 1:2'dir.

Çevresel fiziksel etmenler olarak nemli ortam, yara iyileşmesine ve flep canlılığına, kuruyarak nekroze giden alanların canlılığını artırarak katkı sunar. Hipotermi metabolik ihtiyacı azaltsa da hipertermi kan reolojisini değiştirerek ve vizkoziteyi azaltarak fayda sağlayabilmektedir. Hiperbarik oksijen tedavisi de yine flep yaşayabilirliğini artıran bir başka yöntem olarak kullanılmaktadır.

Farmakolojik ajanlar uzun zamandır flep yaşayabilirliğini artırmak için kullanılmakta ve birçok başarılı ajan bulunmaktadır. 1944 yılında kan volüm replasmanı amacıyla kullanıma giren polisakkarit yapılı Dekstran günümüzde hala kullanılmaktadır. Dekstran 40 ve dekstran 70 olarak iki formu mevcuttur. Trombosit agregasyonunu azaltır, vWF'yi inhibe eder, fibrin yapısını ve kanın reolojik yapısını değiştirerek etki eder. Anafilaksi, pulmoner ödem, böbrek yetmezliği, kanama gibi yan etkileri mevcut olup süre ve doz bakımından dikkatle kullanılmaktadır[23].

Heparin, antitrombin III'e(AT III) bağlanarak etki eder. Trombini inhibe ederek pıhtılaşmayı bozar. Mikrovasküller anastomozda damar içi irrigasyon amacıyla ya da sistemik olarak sıkça kullanılmaktadır. Kanama ve hematoma komplikasyonları yapabilmektedir.

Özellikle venöz konjesyonda sülük tedavisi uygulanabilmekte, salgıladığı hirudin vasıtasıyla aktive trombine bağlanıp inhibe ederek antikoagülan etki gösterir ve venöz yükü azaltırlar. Hyalüronidaz vasıtasıyla ise vazodilatasyon yaparlar. Arteriyel yetmezlikte kontrendikedir. Enterik bir bakteri olan Aeromonas hydrophila ile yumuşak doku enfeksiyonuna neden olabilir. Bu nedenle tedaviye üçüncü kuşak sefalosporin ya da aminoglikozid eklenmesi gerekebilmektedir[24].

Aspirin bir siklooksijenaz(COX) inhibitörüdür, araşidonik asit, tromboksan ve prostasiklini dolayısıyla platelet agregasyonu ve vazokonstrüksiyonu azaltır.

Pentoksifilin, deri perfüzyon ve oksijenizasyonunu etkileyen reolojik özellikler gösteren bir ajandır. Periferik vasküler hastalıklarda kullanılmaktadır. Platelet agregasyonunu azaltır, fibrinojen seviyelerini düşürür, hafif vazodilatör etki gösterir ve eritrosit fleksibilitesini artırarak flep yaşayabilirliğini artırdığı düşünülmektedir. Fakat farklı çalışmalar farklı sonuçlar elde etmiş olup etkisinin sınırlı olduğunu düşünen araştırmacılar da mevcuttur[19,25,26].

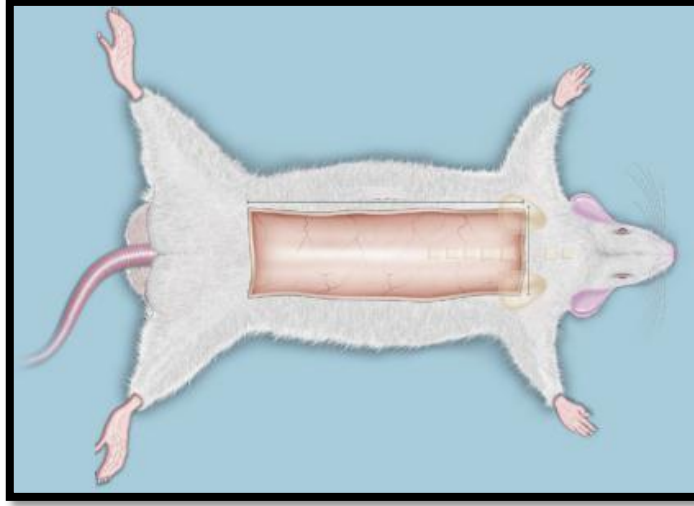
Nitrogliserin vazodilatör bir ajandır. Bu ajanın endotelial hücrelerden sentezlenen prostoglandin(PGI2) sentezini etkileyerek trombosit agregasyonunu inhibe ettiği düşünölmektedir. Hemodinamik etkisi daha ziyade venler üzerinedir[27].

Topikal vazodilatör olarak, özellikle mikrovasküler flep cerrahilerinde en sık Papaverin, Lidokain ve Kalsiyum kanal blokörleri(nifedipin ve verapamil) kullanılmaktadır. Papaverin, bir opioid alkaloidi olup arteryel iskemiye bağılı periferik iskemide düz kas gevşeticisi olarak etki eder. Kalsiyum kanallarına bağlanır ve cAMP'yi artırarak etki eder. Lidokain potent bir lokal vazodilatör ajandır, voltaj kapılı sodyum kanallarını inhibe ederek vazodilatasyon yaparlar, %2'lik solüsyonu mevcuttur. Kalsiyum kanal blokörleri, düz kas membranındaki L tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalları vasıtasıyla düz kas gevşemesi yapar. Yapılan bir çalışmada kalsiyum kanal blokörlerinin papaverin ve lidokain'den daha potent vazodilatasyon yaptığı ifade edilmiştir[28].

Sıçan Kaudal Tabanlı McFarlane Flebi

1965 yılında Robert Mcfarlane ve ark. tarafından tanımlanan flep özellikle geciktirme fenomeni üzerine çalışmalarda sıkça kullanılmıştır. Random dolaşım paternine sahip bu flep kolay elde edilmesi ve standart nekroz oranları sayesinde sonraki yıllarda da popüler olmuştur. İlk olarak kranial tabanlı tasarlanan flep her iki skapula ve posterior iliak çıkıntılar arasında planlanmaktaydı. Flepte standart nekroz oranlarını yakalamak amacıyla Roger Khouri ve ark. kaudal tabanlı, eni üç ve dört cm olarak modifiye halini tanımladılar. Bu çalışmada üç cm eninde kaudal tabanlı flebin tutarlı nekroz oranları sağladığını bildirdiler.

Flep diseksiyonu, deri altında bulunan pannikulus karnozus kası flebe dahil edilerek derin fasyaya kadar gerçekleştirilir. Flep bu alandaki avasküler, areolar plandan eleve edilir. Kaudal dallar korunarak prosedür tamamlanır[29](Şekil 7).

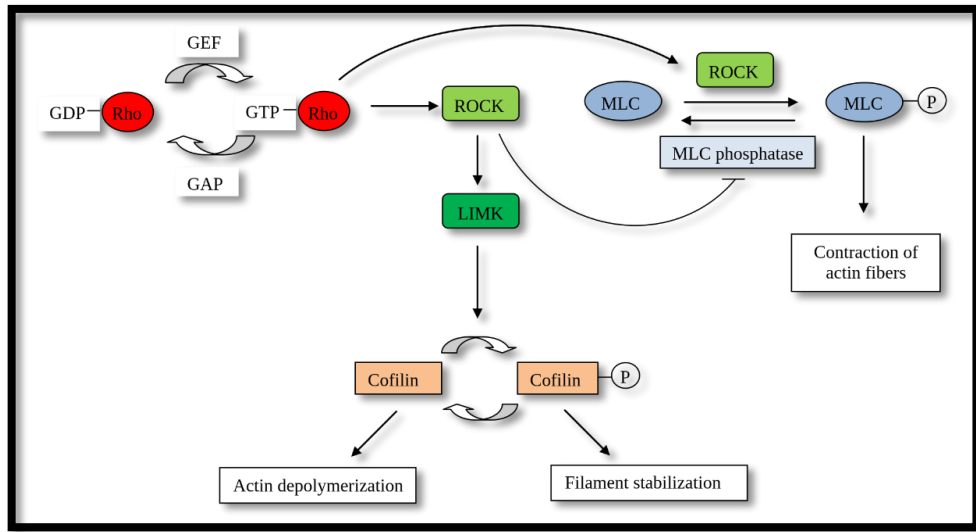


Şekil 6. Kaudal tabanlı Mcfarlane flep.

RHO KİNAZLAR VE RHO KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

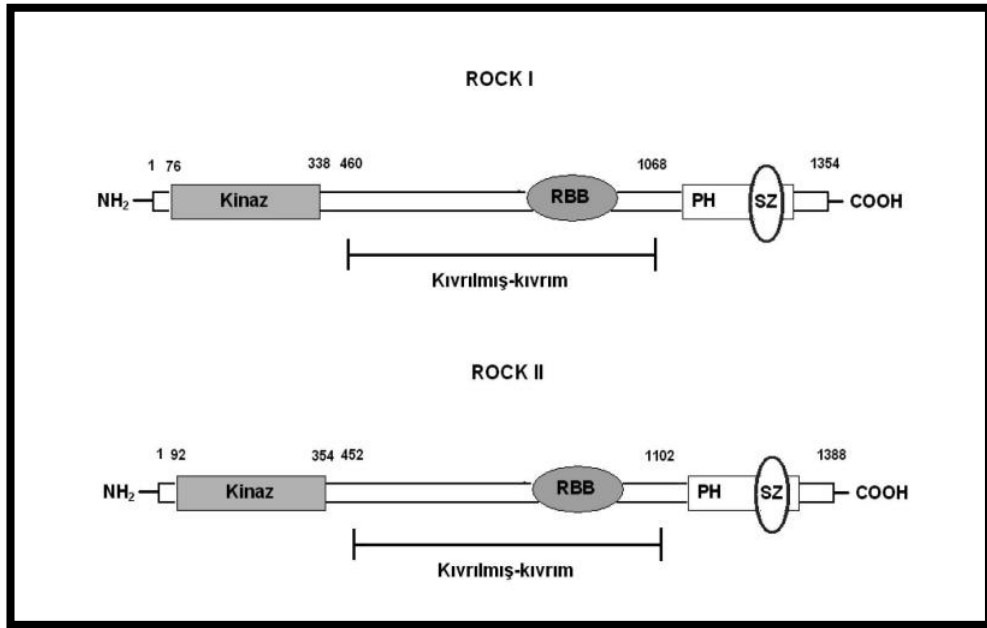
Rho Kinaz Tanımı

Rho, guanin nükleotid değişim faktörleri(GEF) tarafından aktive edilebilen küçük bir GTPaz'dır. GTP'ye bağlı RhoA çeşitli substratları fosforile etmek için Rho Kinazları aktive eder. Örnek olarak miyozin hafif zincir fosfatazın(MLCP) myosin bağlanma alt biriminin ROCK tarafından fosforilasyonu, aktin hücre iskeleti değişikliklerine aracılık eden myosin hafif zincir(MLC) fosforilasyonunu inhibe eder. ROCK ayrıca miyozin hafif zinciri direkt olarak da fosforile edebilir. LIM kinazlar(LIM Kinaz 1 ve 2) ise aktin filamanların regülasyonunda etkilidirler(Şekil 7).



Şekil 7. Rho/Rho kinaz sinyal yolağı.

ROCK, ağırlığı yaklaşık 160kDA olan cAMP bağımlı protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Rho kinaz N-terminal bölgesindeki katalitik(kinaz) alan, orta bölümde bulunan kıvrılmış-kıvrım(coiled coil) alan, C-terminal bölgesinde bulunan ve sisteince zengin(SZ) bölümden oluşan plekstrin homologu(PH) alan olmak üzere üç ana bölümden oluşur. Rho kinaz üzerinde Rho'nun bağlandığı bölge(RBB) C-terminal bölgededir. RhoA-GTP etkileşimiyle ROCK-1 ve ROCK-2 olarak iki formu izole edilmiştir. ROCK izoformlarının total aminoasit dizisinin %60'ı aynı olup, kinaz bölgesi %90 benzerlik göstermektedir. Bunun yanında miyozin hafif zincir(MLC), miyozin hafif zincir fosfataz(MLCP), LIM kinaz(LIMK) ve S6 peptid gibi bazı substratlarda da benzerlik taşırlar ve bu durum biyolojik aktivitelerindeki benzerliği de açıklamaktadır. ATP bağlayıcı kısımlarında ise benzerlik %100'dür. Bu durum selektif inhibitörün olmadığı durumlarda ikisinin de inhibe olması açısından önem kazanmaktadır[1,30](Şekil 8).



Şekil 8. ROCK I ve II yapısı.

Rho Kinazların Etkileri

1996 yılında Narumiya ve ark. insan hücrelerinde ROCK-1 ve ROCK-2'yi keşfettiklerini açıkladılar. Northern blot yöntemi ile ROCK-1'in beyinde bulunmadığını ancak kalp, akciğer, karaciğer, pankreas, iskelet kası ve böbrekte ifade edildiğini gösterdiler[22,23]. Çalışmada ayrıca tüm fare dokularında ROCK-1 ve

ROCK-2 mRNA ekspresyonu olduğunu, ROCK-1'in özellikle karaciğer, dalak, böbrekte, ROCK-2'nin ise beyin ve iskelet kasında olduğunu gösterdiler. 1999 yılında Takahashi ve ark. insan ROCK-2 izoformunu beyin cDNA kültüründe izole ettiklerini bildirdiler[33].

ROCK-1 ve ROCK-2'nin benzer özelliklerinin yanı sıra farklılıklarının da olabileceği konusunda teori üreten Narumiya ve ark. sonraki çalışmalarında ROCK-2 sentezi olmayan fareler ürettiler. Bu fareler %90 oranında abortusla sonuçlandı. Yaşayan fareler ise cüce fakat normal gelişim gösteren ve fertil olan canlılardı. Ölümünün ise embriyo plasenta arasında tromboz ve trofoblast kaybına bağlı olduğunu ifade ettiler[34]. Benzer bir çalışmada ROCK-1'den yoksun farelerde ise doğumda gözlerin açık olduğu ve neonatal omfalosel bulunduğu gözlemlendi.

Bu durum ise göz kapağında aktomyozin dağılım kusuru ve göbek bağında aktin birleşim defekti ile açıklandı[35]. 2013 yılında Shi ve ark. yaptığı çalışmada, ROCK-1 ve ROCK-2'den yoksun fare embriyonik fibroblastları ile çalıştılar. ROCK-1 yokluğunda ciltte büzüşme, detaşman ve apoptoz olduğunu, ROCK-2 yokluğunda ise hücre adezyon bozukluğu olduğunu ifade ettiler. Bu yolla ROCK-1'in aktin hücre iskeleti destabilizasyonundan, ROCK-2'nin ise kofilin fosforilasyonu vasıtasıyla aktin hücre iskeleti stabilizasyonundan sorumlu olduğunu gösterdiler[36].

Rho Kinaz İnhibitörleri

1954 yılında protein kinazların keşfinden yaklaşık 50 yıl sonra ilk selektif tirozin kinaz inhibitörü olan Gleevec(İmatinib) KML dahil birçok kanser için onay aldı[37]. 2009 yılında ilk sekiz kinaz inhibitör ilacın yeniden gözden geçirildiği kapsamlı çalışma sonrasında, 19 küçük moleküllü protein kinaz inhibitör ilaç daha FDA onayı aldı. Bunun yanında son 20 senede birçok Rho kinaz inhibitörü keşfedilmiştir. Farklı hedef molekülleri mevcut olmasına rağmen tüm kinaz inhibitörleri ATP'nin terminal fosfatını hedef moleküle transfer ederler. Protein kinaz inhibitör ailesi aksiyon mekanizmalarına göre dört grupta sınıflandırılmıştır. Bunlar; Tirozin, serin, treonin ve histidin kinazlardır. Serin-Treonin ailesine ait olan Rho kinaz inhibitörleri de aynı şekilde ATP kompetitif kinaz inhibitörüdür. Günümüze kadar 170'in üzerinde Rho kinaz inhibitörü keşfedilmiştir. Klasik Rho kinaz inhibitörleri izokinolin bazlı Fasudil(28) ve onun deriveleridir. Fasudil 1995 yılında Çin'de ve

Japonya'da klinik kullanım alan ilk Rho kinaz inhibitörüdür. Ripasudil ise 2014 yılında Japonya'da glokom tedavisi için onay almıştır[1].

Rho Kinaz İnhibitörlerinin etkileri

Rho kinaz inhibitör molekülleri, çok geniş etki alanına sahip, görece yeni sayılabilecek ve potansiyel terapötik etkileri geniş bir alandır. Hali hazırda faz I ve faz II aşamalarında çok sayıda molekülün çalışmaları devam etmektedir. Rho kinazların etki alanında olan düz kas hücre kontraksiyonu, hücre proliferasyonu, adezyon ve migrasyonu gibi durumlar, Rho kinaz inhibitörlerinin hedefidir. Bu durumla bağlantılı olarak kardiyovasküler hastalıklar[29,30], pulmoner arteriyel hipertansiyon[40], özellikle glokom olmak üzere oküler hastalıklar[32,33], erektil disfonksiyon[43], kanser[35,36], gastrointestinal hastalıklar[46] gibi patolojilerde potent terapötik etkileri mevcuttur. Benzer şekilde yakın dönem çalışmalarda Rho kinaz inhibitörlerinin idiyopatik pulmoner fibrosis[47] ya da intestinal fibrozis[48] gibi fibrotik durumların tedavisindeki rolleri artan ilgiyle takip edilmektedir.

RİPASUDİL

Ripasudil, fasudil derivativesi olan, yüksek spesifik ve selektif bir ROCK-1 ve ROCK-2 inhibitörüdür. Rho, efektör proteini Rho kinaz ile Rho/Rho kinaz kompleksini oluşturarak düz kas kontraksiyonu, kemotaksis, nöral hücre büyümesi ve gen ekspresyonu gibi fizyolojik fonksiyonları düzenler. İlk olarak 2014 yılında, Japonya'da glokom ve oküler hipertansiyon tedavisi için onay almıştır[49]. Trabeküler ağda ifade edilen rho kinazları inhibe ederek hümör aközün dışı akımını artırır, hücre gövdesinin hareketini ve şeklini değiştirir ve trabeküler ağdaki aktin demeti yapısını bozarak düz kas gevşemesi ve dolayısıyla göz içi basıncının düşmesini sağlar[50]. Glokom tedavisinde yan etki olarak ise hafif hiperemi yaptığı gözlenmiştir. 2018 yılında Wada ve ark. yaptıkları çalışmada Ripasudil'in ratlarda vasküler dilatasyon yoluyla optik sinir başına giden kan akımını artırdıklarını açıklamışlardır[3]. Ripasudil'in dokularda proinflamatuvar sitokinleri, apoptozisi ve oksidatif stresi azaltıcı etkileri gösterilmiştir[51]. Ayrıca spinal kord yaralanması sonrası nöropatik ağrı üzerine olumlu etkileri mevcuttur[52].

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma için, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 05.04.2022 tarih ve 2022/03 sayılı kararı ile onay alınması sonrası çalışmanın yürütülebilmesi amacıyla Pamukkale Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri(BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'nden destek alındı.

Çalışmada 28 adet 250-300 gram ağırlığında Sprague Dawley suşu dişi sıçanlar kullanıldı. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi(PAÜTF) Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı tarafından sağlanan hayvanlar yine aynı laboratuvarında 'PAÜTF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş Esasları' doğrultusunda bakım ve değerlendirmeye alındı.

Sıçanlar uygun kafeslerde, 22 ± 2 °C sıcaklıkta, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanların beslenme ihtiyaçları standart hayvan yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı. Sıçanlar randomize bir biçimde her grupta yedişer adet denek olacak şekilde dört gruba eşit olarak dağıtıldı.

Deney Protokolü ve Deneklerin Gruplandırılması

Deneyde kullanılan 28 adet sıçan randomize olarak her grupta eşit denek olacak şekilde gruplara ayrıldı(n=7).

Grup 1: Kontrol grubu, herhangi bir işlem uygulanmadı.

Grup 2: Plasebo grubu, cerrahi ve 0. 1. ve 2. günler, 0. ve 12. saatlerde intraperitoneal 1ml/kg %0.9 serum fizyolojik enjeksiyonu uygulandı.

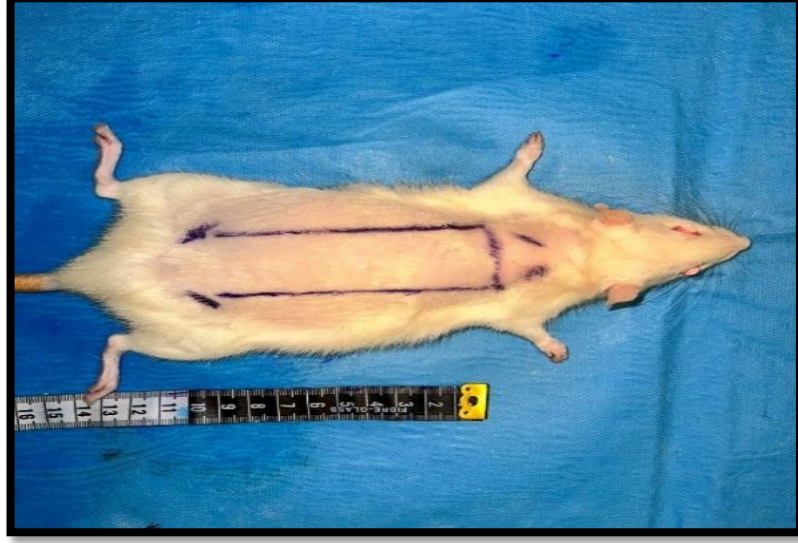
Grup 3: Düşük doz ilaç grubu, cerrahi ve 0. 1. ve 2. günler, 0. ve 12. saatlerde intraperitoneal 2mg/kg Ripasudil uygulandı.

Grup 4: Yüksek doz ilaç grubu, cerrahi ve 0. 1. ve 2. Günler 0. ve 12. saatlerde intraperitoneal 8mg/kg Ripasudil uygulandı.

Operatif Girişim

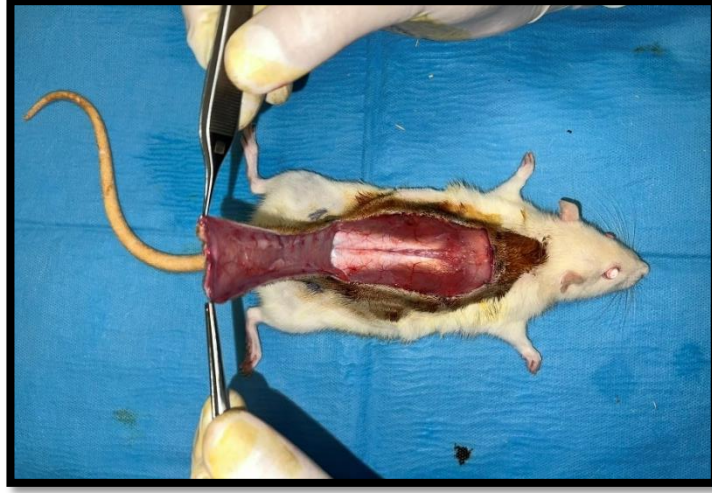
Cerrahi işlemler steril koşullar altında PAÜTF Hayvan Deneyleri Laboratuvarında gerçekleştirildi. Sıçanlara genel anestezi amacıyla 50 mg/kg ketamin hidroklorür ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorür uygulandı. Sıçanların sırt bölgeleri tıraşlandı. Cilt kalemi ile süperiyor sınır bilateral skapula alt sınırı, inferiyorda posteriyor iliak çıkıntılar işaretlenerek 3x9 cm'lik kaudal tabanlı McFarlane flep

sınırları çizildi. Povidon iyot solüsyon ile silindi ve steril olarak örtülerek operasyona başlandı



Resim 1.Sıçan kaudal tabanlı 3x9 cm Mcfarlane flep tasarımı.

Kraniyal ve lateral sınırların insizyonu sonrası deri ve pannikulus karnozus kası içerecek şekilde 3x9 cm'lik kaudal tabanlı flep künt diseksiyonla eleve edildi. Ardından flep yerine iade edilerek 4.0 prolene ile suture yapıldı. Kapalı pansuman yapılarak operasyon sonlandırıldı. Operasyon sonrası sıçanlar tekli kafeslere alındı. Grup 2'deki sıçanlara postoperatif 0, 1, ve 2. günlerde 0. ve 12. saatte 1 ml/kg intraperitoneal serum fizyolojik, Grup 3'teki sıçanlara 2mg/kg Ripasudil, Grup 4'teki sıçanlara 8 mg/kg Ripasudil intraperitoneal uygulandı. Standart koşullar altında ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, %40-60 bağıl nem ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodu) yeteri kadar yem ve su verilerek bakımaları sağlandı.



Resim 2. Flep elevasyonu.



Resim 3. Flebin yerine iade edilmesi sonrası.

Sakrifikasyon protokolü

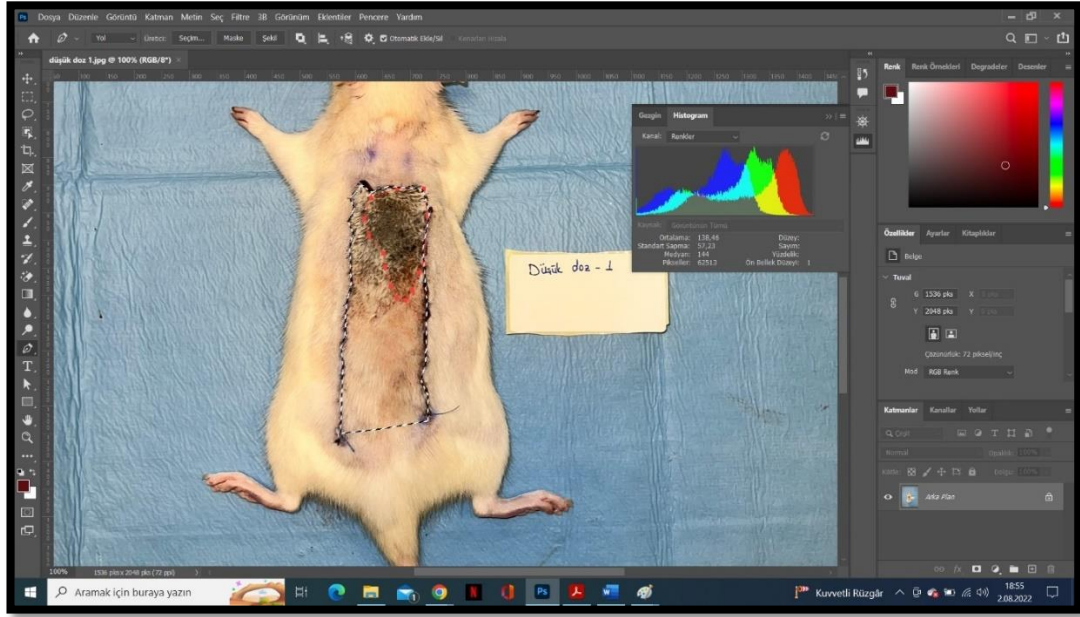
Flep cerrahisinin postoperatif 7. günü tüm sıçanların cilt flepleri, sutureasyon hattının etrafından histopatolojik değerlendirme için total olarak eksize edildi. Flep eksizyonlarının tamamlanması sonrası sıçanların tümü servikal dislokasyonla sakrifiye edildi.

Değerlendirmeler

Yüzey Alan Değerlendirmesi

Çalışmada flep nekroz oranlarının belirlenmesi amacıyla postoperatif 7. günün sonunda cilt flepleri, etrafında bir cm sağlam doku içerecek şekilde total olarak eksize edildi. Alınan flepler köpük bloklar üzerine iğnelenerek tespit edildikten sonra eşit

mesafeden fotoğraflandı. Fotoğraflar Adobe Photoshop 2022(Adobe Systems. USA) ve Windows 10(Microsoft Corporation. USA) yardımıyla grafikleştirildi.



Resim 4. Adobe Photosop 2022 ile yüzey alan hesaplaması.

Histopatolojik Değerlendirme

Fleplerin histopatolojik olarak değerlendirilmesi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ana Bilim Dalında görevli bir histoloji öğretim üyesi tarafından değerlendirilen preparatın hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin semikantitatif olarak yapıldı.

Hematoksilen Eozin Boyanması

Tüm çalışma gruplarından canlı-nekroze alan geçişinden alınan doku örneklerinin bir bölümü %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisi içine konularak saklandı. Bu dokulara ışık mikroskopik takip yöntemi uygulandı ve parafin bloklama işleminden sonra, deri dokusu histolojik değerlendirmesi için dokular 5 µm seri kesitler halinde hazırlandı. Kesitler hematoxilen eozin ile boyandı. Olympus BX-51 ışık mikroskobu ve Olympus PP72 Dijital Kamera ile incelenerek alınan görüntüler kaydedildi.

İmmünohistokimyasal boyama

Doku örneklerinin bir bölümü ise ayrılarak immün boyama yapılmak üzere hazırlandı. Daha önceden tarif edildiği gibi %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisi içinde saklanan dokulardan elde edilen 5 µm seri kesitlerin immunhistokimyasal boyamasında ise VEGF ve eNOS ticari antikor kitlerinin önerilen protokolü uygulandı ve antikorlarına özel skorlamalar kullanılarak değerlendirmeleri yapıldı. Olympus BX-51 ışık mikroskobu ve Olympus PP72 Dijital Kamera ile incelenerek alınan görüntüler kaydedildi.

Trizol Reagent ile Total RNA izolasyonu

Çalışmamızda kontrol grubu, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'ten 50 mg ağırlığında, nekrotik sağlıklı doku geçişinden olacak şekilde dokular alınıp 15 ml Falkon tüpü içinde 1 ml Trizol içine konularak -80⁰C de muhafaza edildi.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo) yardımı ile tespit edildi. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesinde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/µl'dir) RNA örnekleri tespit edildi. Ardından 1µl RNase free water ile Nanodrop cihaz kadesi üzerine bir damla bırakıldı ve bilgisayardaki program analizi (ND1000 V3.6.0) ile kör alındı. Sonrasında RNA örneklerinden 1µl olacak şekilde pipetlenip 260,280 nm'de okuma yapıldı. Elde edilen RNA'lar ependorf içinde -80⁰C'de saklandı. Nanodrop cihazında 260-280 dalga boyunda ve konsantrasyon için ng/µl olarak bakıldı.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR)

Gen ekspresyon ürününün kantitasyonu amacıyla kullanılan hassas moleküler bir metottur. Bu yöntem ile RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek çalışılabilmektedir. Gerçek zamanlı RT-PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu yüzden elektroforez, PCR ürününün mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlere gerek kalmamaktadır. Çalışmamızda 96 kuyucuklu mikropılaka okuyabilen RT-PCR sistemi kullanılmıştır. Düşük ve yüksek dozlu Ripasudil uygulaması sonrasında ilgili hücre dizini kullanılarak, hücre döngüsünde rol alan genlerin RNA düzeyindeki ekspresyonları belirlenmiştir. Hücre dizininden total RNA izolasyonu yapılmış ve

takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi tespit edilmiştir. Sonrasında, total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle aynı anda ve kantitatif olarak RT-PCR (Thermo Scientific PikoReal 96) ile analiz yapılabilmektedir. Her panelde referans-housekeeping genler PCR kontrol grubunda yer alarak hedef genlerdeki rölatif değışikliği analiz etme imkânımız olmaktadır. PCR sırasında elde edilen amplikonlar, doğrudan logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısına göre değerlendirilmiştir. Önce konsantrasyonları bilinen beta-katenin housekeeping geni ile bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturulmuş ardından çalışılan örnekteki geçiş noktasına göre cDNA'nın rölatif miktarı kantasyon software tarafından belirlenmiştir. Elde edilen veriler Cq olarak kaydedilmiştir. Analizi gerçekleştirilen genlerin ve referans gen olarak normalizasyonda kullanılan housekeeping genin(beta-actin) primer dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Housekeeping gen ve analiz edilen genlerin primer dizileri.

Genler	Primer Dizisi
Beta-actin	F: GCGAGTACAACCTTCTTGCAGCTC R: TGGCATGAGGGAGCGCGTAA
Vegfa	F: AAATCCTGGAGCGTTCACCTGT R: TCTGCGGATCTTGGACAAACA
Nos3	F: CGCCAGGCTCTCACTTACTT R: TGCTCAGCAGTCGAAGAAGG
Bax	F: AGCTCTGAACAGATCATGAAGAC R: TCCTCTCTGCTCGATCCTGG
Bcl2	F: AGTTCGGTGGGGTCATGTG R: AGAGCGATGTTGTCCACCAG

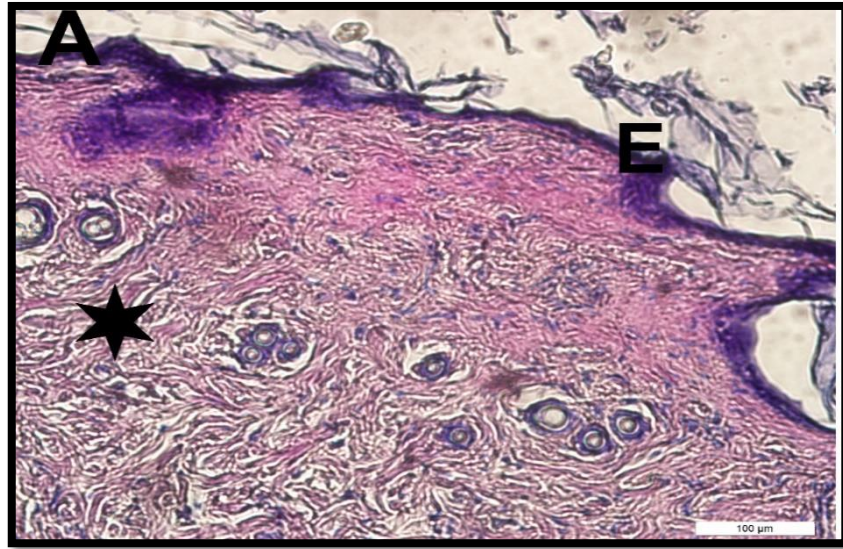
İstatistiksel Değerlendirme

Veriler SPSS25.0(IBMSPSS Statistics25 software (Armonk,NY: IBM Corp.) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca(25 ve 75. yüzdellikler), en küçük - en büyük değerler ve kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Bağımsız grup incelemelerinde; parametrik test varsayımları sağlandığından Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc: Tukey testi) kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki farklılıkların incelenmesinde Ki-kare testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

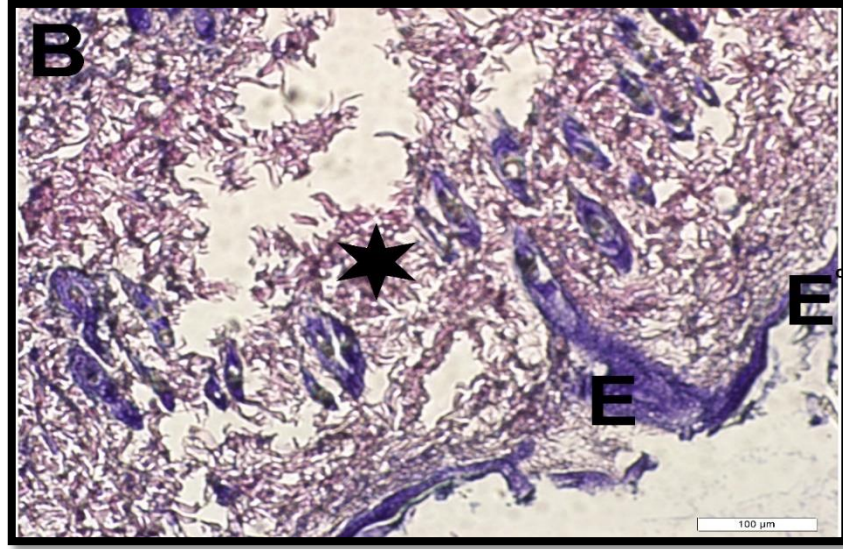
Hematoksilen Eozin Değerlendirmesi

Grup 1'den alınan deri dokusu normal histolojik yapıdaydı. Kollajen lifler demetler halinde izlenmekteydi. Grup 2'de yara bölgesinde kollajen liflerde ayrılmalar ve lif demetleri arasında boşluklar bulunmaktaydı. Epidermiste bütünlük kaybolmuştu. Bununla birlikte ter ve yağ bezlerinde dejenerasyona rastlanmadı. Tüm alanda belirgin infiltrasyon gözlemlendi. Damarlanmanın oldukça az olduğu belirlendi. Grup 3'te epidermisteki bütünlük kaybının halen devam ettiği izlendi. Kollajen liflerdeki ayrılmaların azaldığı ve demetler oluşturduğu gözlemlendi ancak infiltrasyon az da olsa devam etmekteydi. Yeni damar oluşumları izlendi. Grup 4'te dejenerasyonun belirgin şekilde azaldığı tespit edildi. Epidermis normal yapıdaydı. Kollajen lifler demetler halinde izlendi. İnfiltrasyon'un plasebo grubuna göre oldukça azaldığı tespit edildi. Yeni damar sayısında belirgin artış izlendi. Sonuçların Tablo 2'deki histopatolojik kriterlere göre skorlaması Tablo 3'te gösterilmiştir.



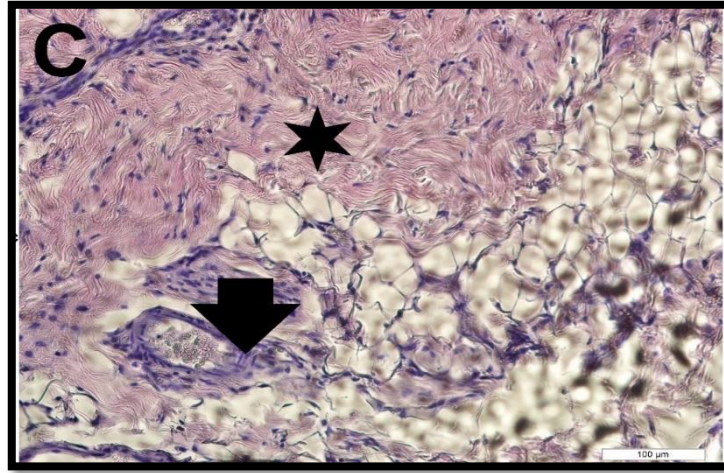
Resim 5. Grup 1 Hematoksilen eozin boyamanın histopatolojik görüntüsü.

E: Epitel, Yıldız: Kollajen lifler, Normal deri dokusu görüntüsü, kollajen lifler demetler halinde (20X).



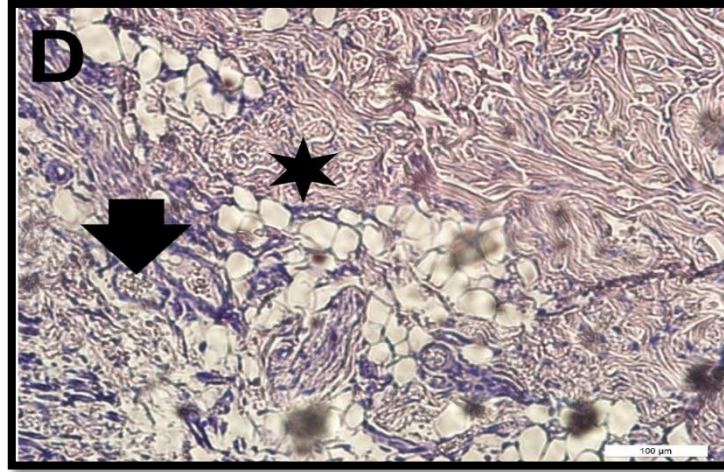
Resim 6. Grup 2 Hematoksilen eozin boyamanın histopatolojik görüntüsü.

E: Epitel, Yıldız: Kollajen lifler, Kollajen liflerde ayrılmalar ve lif demetleri arasında boşluklar bulunmakta. Epidermiste bütünlük kaybolmuş, yoğun infiltrasyon mevcut. Damarlanma oldukça az izlenmekte(20X).



Resim 7. Grup 3 Hematoksilen eozin boyamanın histopatolojik görüntüsü(20X).

Yıldız: Kollajen lifler, Kalın ok: Kapiller. Epidermisteki bütünlük kaybı devam etmekte. Kollajen liflerdeki ayrılmalar ve infiltrasyon azalmış durumda. Neovaskülarizasyon görülmekte.



Resim 8. Grup 4 Hematoksilen eozin boyamanın histopatolojik görüntüsü(20X).

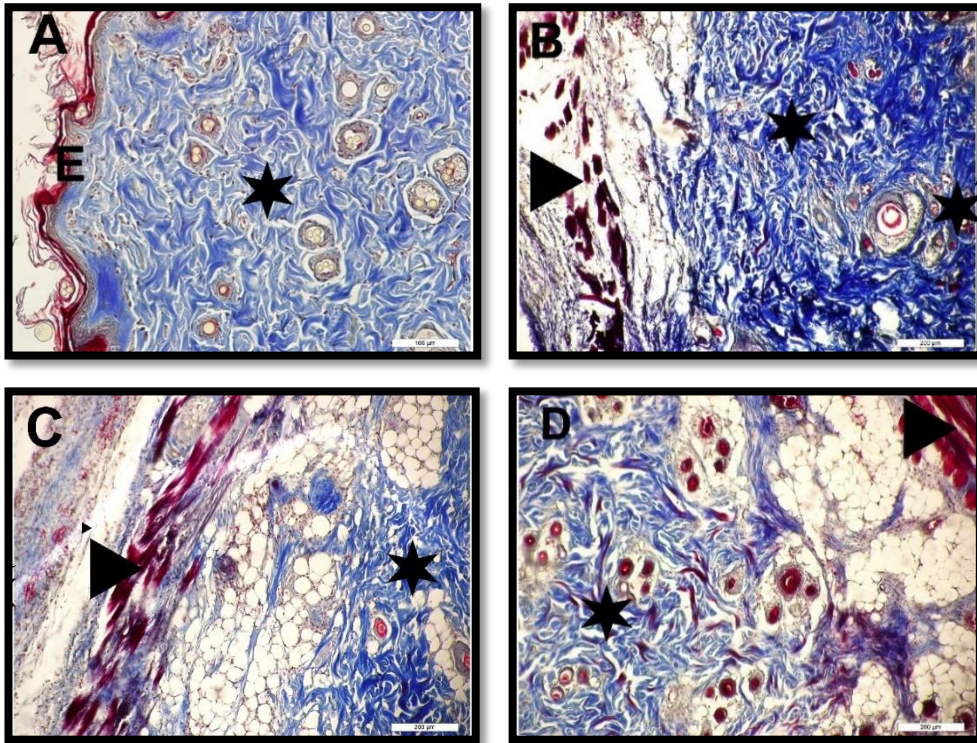
Yıldız: Kollajen lifler, Kalın ok: Kapiller. Dejenerasyon belirgin şekilde azalmış, epidermis normal yapıda, kollajen lifler demetler halinde izlenmekte. İnfiltrasyonun ciddi ölçüde azaldığı ve neovaskülarizasyonun önemli ölçüde arttığı görülmekte.

Tablo 2. Histopatolojik skorlama kriterleri.

Kriter	Kapiller dansite	Fibroblast proliferasyonu	İnflamatuar hücre infiltrasyonu	Kollajen yoğunluğu
0	Kapiller yok	Aktif fibroblast proliferasyonu yok	Hiç inflammatuar hücre yok	Kollajen depolanması yok
1	1-25 arası kapiller oluşumu	Çok ince granülasyon dokusu	1-5 arası inflammatuar hücre	Minimal kollajen depolanması
2	26-50 arası kapiller oluşumu	Normal granülasyon dokusu	6-10 arası inflammatuar hücre	Normal kollajen depolanması
3	51-75 arası kapiller oluşumu	Kalın granülasyon dokusu	11-20 arası inflammatuar hücre	Yüksek kollajen depolanması
4	76-100 arası kapiller oluşumu	Çok kalın granülasyon dokusu	>20 inflammatuar hücre	Çok yüksek kollajen depolanması

Tablo 3. Skor tablosu, 10 farklı alan sayımının ortalaması ile elde edilen puanlama.

Skor Tablosu	Kapiller dansite	Fibroblast proliferasyonu	İnflamatuar hücre infiltrasyonu	Kollajen yoğunluğu
Grup 1	0	0	0	4
Grup 2	1	1	4	1
Grup 3	2	2	3	2
Grup 4	4	3	1	3

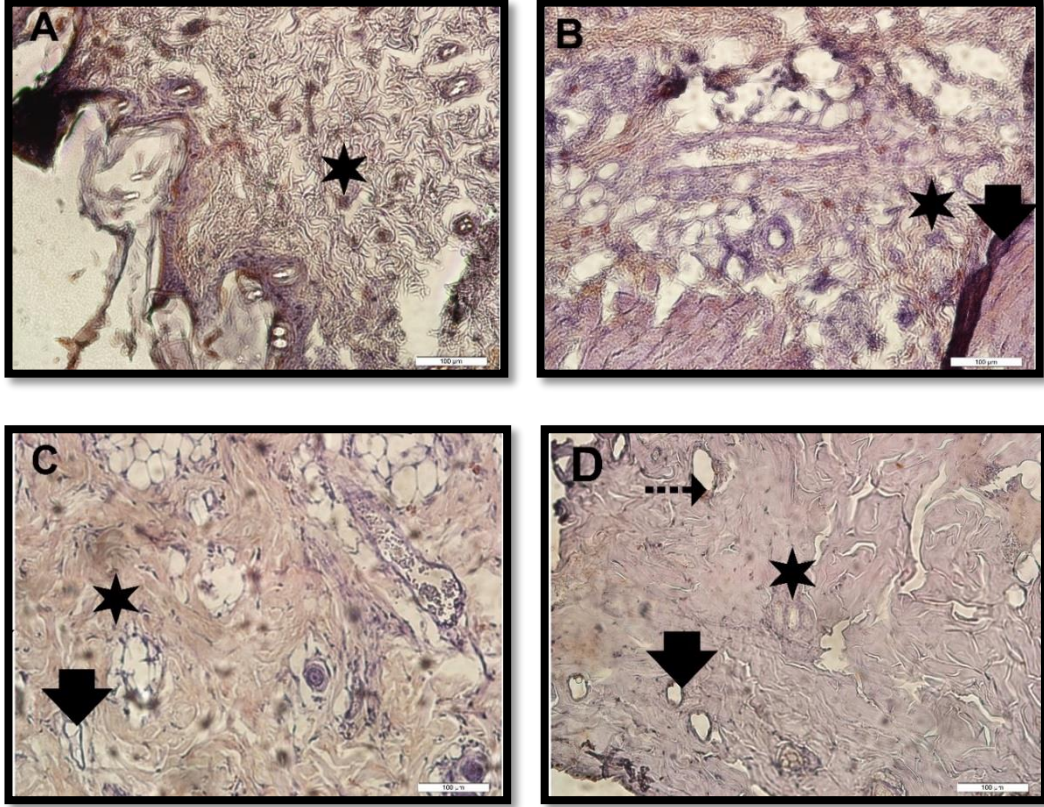


Resim 9 A-D. Masson Trikrom ile boyamanın histopatolojik görüntüsü.

A: Grup 1, B: Grup 2, C: Grup 3, D: Grup 4. Yıldız: Kollajen lifler, E: Epitel, Üçgen: Kas dokusu(20X).

Kollajen lifleri belirlemek için kullanılan Masson üçlü boyamasında Grup 1’de kollajen liflerin normal yapıda olduğu izlendi. Grup 2’de kollajenlerin liflerde ayrılmalar ve kas dokusu ile arasında boşlukların oluştuğu gözlemlendi. Aynı zamanda kas dokusunda da bütünlüğün kaybolduğu dikkati çekti. Grup 3’te kas liflerinin demetler halinde izlenmekle birlikte demetler arasında yer yer boşlukların varlığı

dikkati çekti. Grup 4'te hem kollajen lifler hem de kas dokusu normale yakın görünüm sergiledi.



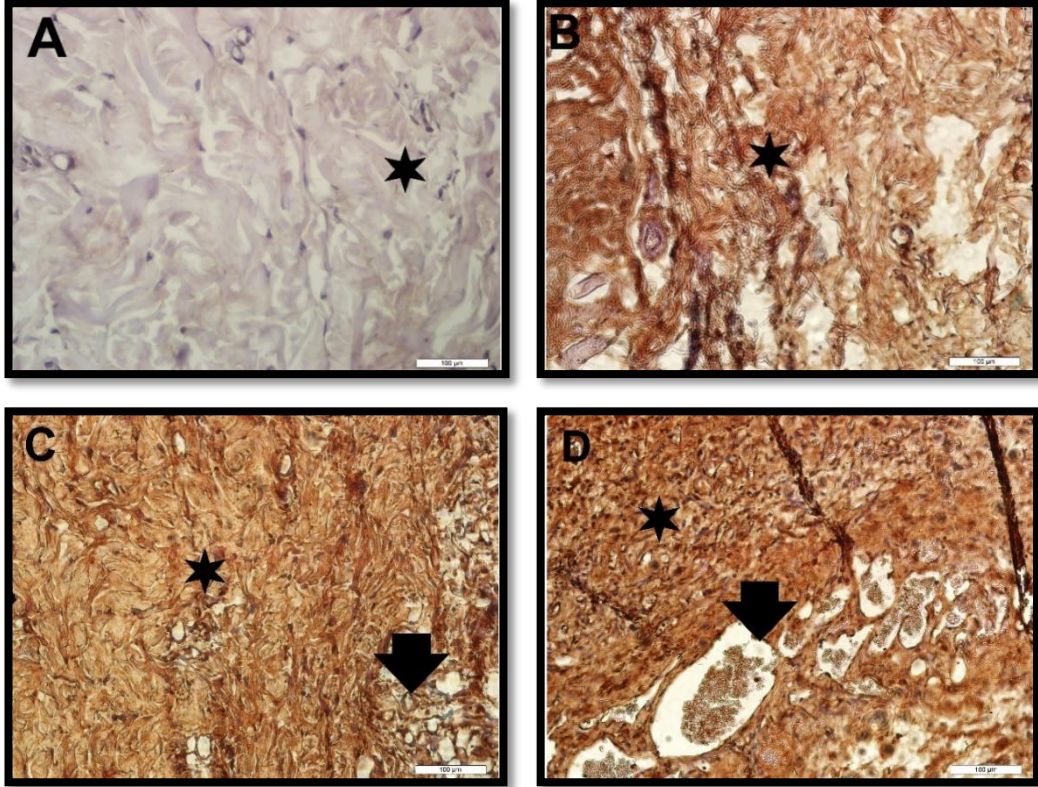
Resim 10 A-D. VEGF monoklonal antikorü ile boyama(20X).

A: Grup 1, B: Grup 2, C: Grup 3, D: Grup 4. Yıldız: Kollajen lifler, Kalın ok: Kapiller, Kesik ok: Pozitif ekspresyon gösteren endotel.

Grup 1'de VEGF genel olarak zayıftı. Pozitif boyanmanın sadece epiderminin apikal bölümünde olduğu belirlendi. Kollajen lifler negatif ekspresyon gösterdi. Grup 2'de ve Grup 3'te epidermis, kollajen lifler ve damar negatif ekspresyon gösterdi. Grup 4'te ise epidermis, kollajen lifler negatif ekspresyon gösterirken damar endotelinde yoğun boyanma dikkat çekiciydi(Resim 9 A-D) (Tablo 4).

Tablo 4. VEGF ekspresyonu.

VEGF Ekspresyonun derecesi ve yerleşimi				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Epidermis	++	-	-	-
Kollajen lifler	-	-	-	-
Damar endoteli	-	-	-	+++
Damar duvarı	-	-	-	-



Resim 11 A-D. eNOS antikoruna boyama.

A: Grup 1, B: Grup 2, C: Grup 3, D: Grup 4. Yıldız: Kollajen lifler, Kalın ok: Kapiller.

eNOS ekspresyonunun Grup 1’de epidermis dışında negatif olduğu gözlemlendi. Grup 2, Grup 3 ve Grup 4’te ise pozitif ve yüksek olarak saptandı. Grup 2, Grup 3 ve Grup 4’te kollajen liflerde ve epidermiste yoğun boyanma izlendi. Endotel hücrelerinin ve damar duvarının sadece Grup 3 ve Grup 4’te boyandığı gözlemlendi (Resim 10 A-D) (Tablo 5).

Tablo 5. eNOS ekspresyonu.

e-NOS Ekspresyonun derecesi ve yerleşimi				
	K	P	DD	YD
Epidermis	++	+++	+++	+++
Kollajen lifler	-	++	+++	+++
Damar endoteli	-	-	+++	+++
Damar duvarı	-	-	+++	+++

PCR Sonuçları

Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu Sonuçları

Trizol Reagent yardımı ile Grup 2 serum fizyolojik, Grup 3 ve Grup 4 Ripasudil uygulanan ratlardan elde edilen flep dokularının RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları Nanodrop ile saptanmıştır. Sonuçlar Tablo 6' deki gibidir.

Tablo 6. Ripasudil etkinliğini belirlemek için izole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri

Grup	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280 nm (OD)
Grup 1(Kontrol)	856,6	1,71
Grup 2(Plasebo)	1761	1,73
Grup 3(Düşük doz)	1962,2	1,77
Grup 4(Yüksek doz)	1432	1,73

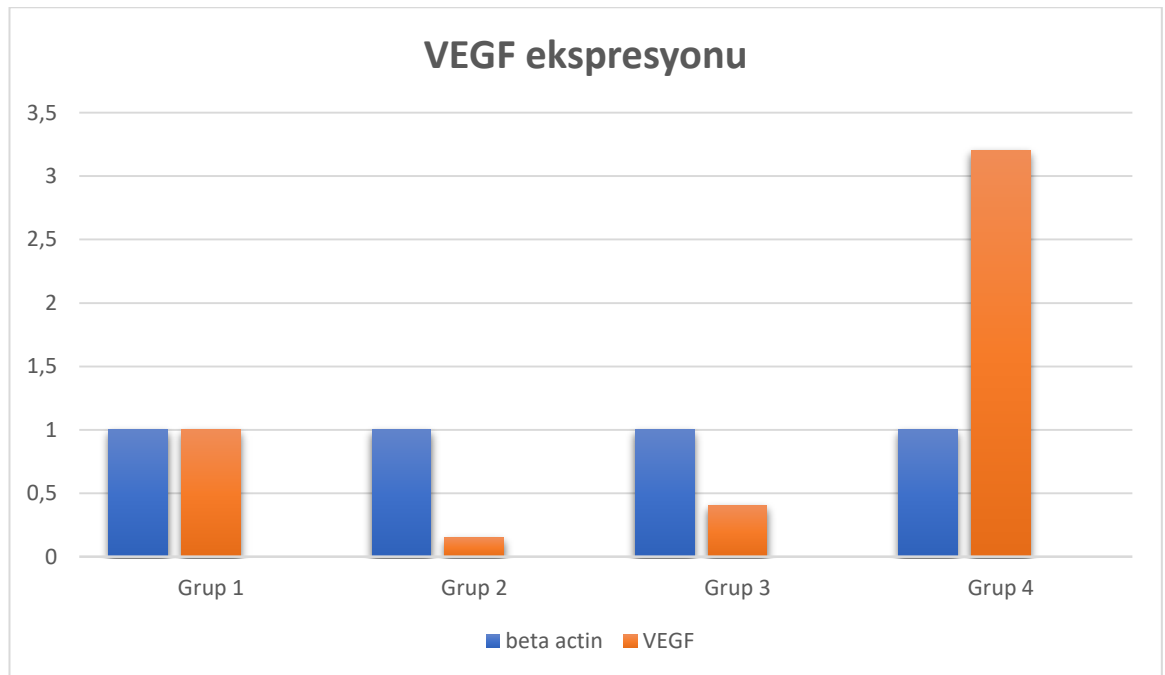
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu(RT-PCR) Sonuçları

Deneylelerin prosedürü materyal metotta belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen Cq değeri dikkate alınarak değişik konsantrasyonlardaki gen ifadelerindeki değişim hesaplanmıştır. Çalışmamız sonucunda araştırmamızda incelediğimiz genlerden değişim görülen genler ve değişim durumları tablo 7'de ve şekil 9, 10 ve 11'de verilmiştir.

Tablo 7. Deney gruplarının Vegfa, Nos3, Bax ve Bcl-2 gen değerlerinin gruplar arasındaki değişim sonuçları.

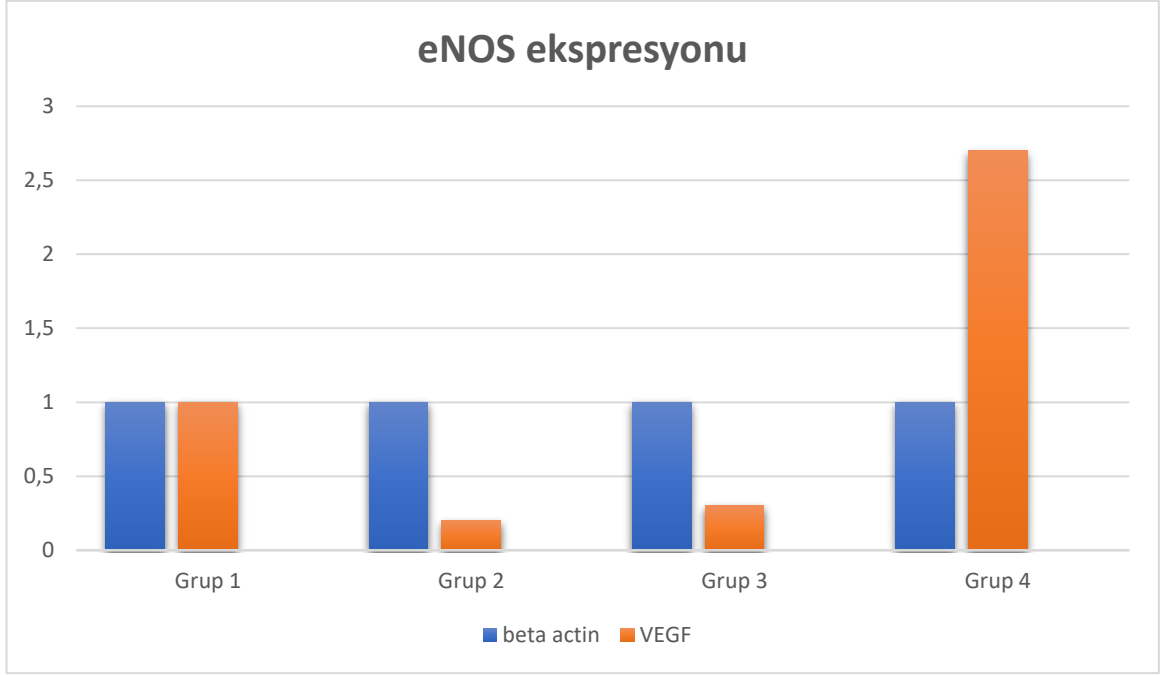
(Grup 1 plasebo, Grup 2 düşük doz, Grup 3 yüksek doz).

Position	Gene Symbol	Fold Regulation (comparing to control group)								
		Group 1			Group 2			Group 3		
		Fold Regulation	p-Value	Comments	Fold Regulation	p-Value	Comments	Fold Regulation	p-Value	Comments
1	beta-actin	1.00	nan		1.00	nan		1.00	nan	
2	Vegfa	-7.14	0.004133		-2.20	0.019897		3.17	0.030673	
3	Nos3	-6.53	0.000001		-3.73	0.000025		2.74	0.000049	
4	Bax	-3.48	0.026354		-4.34	0.020889		1.79	0.109012	
5	Bcl2	-2.08	0.002472	A	1.48	0.064328	A	1.84	0.031613	



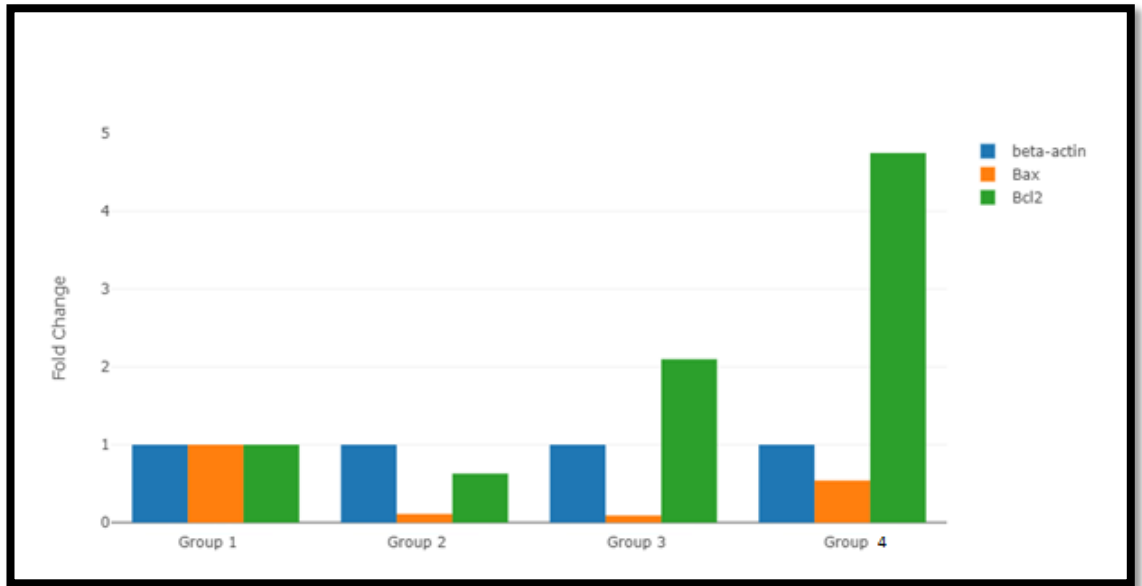
Şekil 9. Gruplar arasında VEGF ekspresyon değişimleri.

Grup 4'te Vegfa ekspresyonunun anlamlı ölçüde arttığı görülmektedir.



Şekil 10. Gruplar arasında eNOS(nos3) ekspresyon değişimleri.

Grup 4’te eNOS(nos3) ekspresyonununun anlamlı ölçüde arttığı görülmektedir.



Şekil 11. Gruplar arasında Bax, Bcl-2 ekspresyon değişimleri.

Grup 2, Grup 3 ve Grup 4’te Bax seviyeleri azalmış, Grup 3 ve Grup 4’te Bcl-2 seviyeleri artmış olarak bulundu. Grup 3 ve Grup 4’te Bax/Bcl-2 oranları anlamlı ölçüde azalmış olup doz bağımlı olarak Ripasudil tedavisinin apoptozisi azalttığını göstermektedir.

Yüzey Alan Değerlendirme Sonuçları

Grupların ortalama flep yaşam oranları, Grup 2’de 49.92 ± 8.13 , Grup 3’de 61.97 ± 8.69 , Grup 4’te 69.9 ± 14.01 olarak tespit edildi. Grup 1’de herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadığı için hesaplamaya dahil edilmedi. İstatistiksel olarak toplam flep yaşam oranları arasında anlamlı farklılık mevcuttur($p<0.05$). Ayrıca klinik makroskopik gözlemlerde tedavi grupları ile plasebo grubu arasında flep yaşam oranları arasında anlamlı farklılık mevcuttur.

Tablo 8. Grupların Flep yaşam oranlarının karşılaştırılması.

Gruplar	Denekler	Oran	Gruplar	Denekler	Oran
Grup 1	1	100	Grup 3	1	75
	2	100		2	63
	3	100		3	66
	4	100		4	50
	5	100		5	60
	6	100		6	68
	7	100		7	53
Grup 2	1	49	Grup 4	1	85
	2	58		2	61
	3	46		3	57
	4	37		4	64
	5	62		5	90
	6	47		6	57
	7	53		7	79

Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Tablo 9. Grupların Flep yaşayan alan, Nötrofil sayısı, Kapiller Dansite ve Total İnflamatuar hücre sayılarının istatistiksel karşılaştırması.

		grup 1	grup 2	grup 3	grup 4	p
Flep yaşayan alan	A.O. ± S.S	100 ± 0	49.92 ± 8.13	61.97 ± 8.69	69.9 ± 14.01	0.0001*
	Med (min - maks)	100 (100 - 100)	48.96 (61.46 - 49.92)	63.03 (74.79 - 61.97)	63.16 (89.83 - 69.9)	e
Nötrofil sayısı	A.O. ± S.S	3.29 ± 0.95	24.14 ± 3.48	16.57 ± 2.37	9.86 ± 2.04	0.0001*
	Med (min - maks)	3 (5 - 3.29)	24 (30 - 24.14)	17 (20 - 16.57)	10 (13 - 9.86)	abcdef
Kapiller dansite	A.O. ± S.S	0 ± 0	0.67 ± 0.18	5.37 ± 0.53	20.51 ± 3.17	0.0001*
	Med (min - maks)	0 (0 - 0)	0.7 (1 - 0.67)	5.4 (6.1 - 5.37)	21 (24.5 - 20.51)	bcdef
İnf. Hücre	A.O. ± S.S	0 ± 0	27.2 ± 2.85	18.94 ± 2.2	3.06 ± 1.07	0.0001*
	Med (min - maks)	0 (0 - 0)	26.7 (30.9 - 27.2)	18.5 (22.9 - 18.94)	3.1 (5 - 3.06)	abcdef

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; Tek Yönlü Varyans Analizi ile inceleme yapılmıştır. a: Grup 1 – Grup 2 arası anlamlı farklılık; b: Grup 1 – Grup 3 arası anlamlı farklılık; c: Grup 1 – Grup 4 arası anlamlı farklılık; d: Grup 2 – Grup 3 arası anlamlı farklılık; e: Grup 2 – Grup 4 arası anlamlı farklılık; f: Grup 3 – Grup 4 arası anlamlı farklılık.

Yaşayan alan incelemelerine bakıldığında; Grup 4 değerleri grup 2'ye göre anlamlı şekilde yüksektir.

Nötrofil incelemelerine bakıldığında; Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 değerleri Grup 1'e göre anlamlı şekilde yüksektir. Ayrıca Grup 2 değerleri Grup 3 ve Grup 4'e göre anlamlı şekilde yüksektir. Grup 3 değerleri de Grup 4'e göre anlamlı şekilde yüksektir.

Kapiller dansite incelemelerine bakıldığında; Grup 3 ve Grup 4 değerleri Grup 2'ye göre anlamlı şekilde yüksektir. Grup 4 değerleri de Grup 3'e göre anlamlı şekilde yüksektir.

Total inflamatuvar hücre sayılarının incelemelerine bakıldığında; Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 değerleri Grup 1'e göre anlamlı şekilde yüksektir. Ayrıca Grup 2 değerleri Grup 3 ve Grup 4'e göre anlamlı şekilde yüksektir. Grup 3 değerleri de Grup 4'e göre anlamlı şekilde yüksektir.

Tablo 10. Grupların Granülasyon dokusu oluşumu ve Kollajen depoziti yoğunluklarının istatistiksel karşılaştırması.

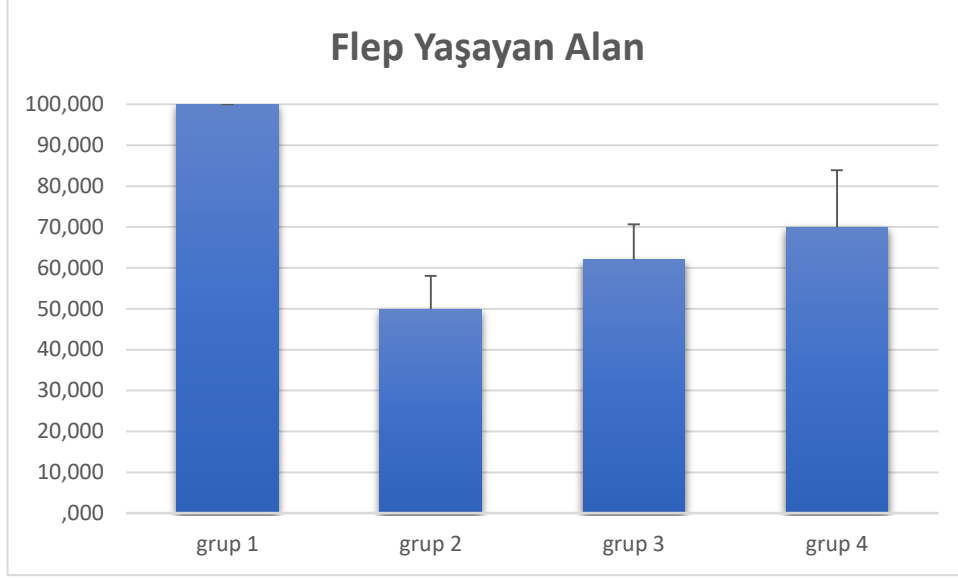
		Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Total	p
Granülasyon dokusu	Çok ince	0 (%0)	2 (%28.6)	1 (%14.3)	0 (%0)	3 (%10.7)	0.043* a
	Normal	0 (%0)	3 (%42.9)	3 (%42.9)	3 (%42.9)	9 (%32.1)	
	Kalın	7 (%100)	2 (%28.6)	3 (%42.9)	4 (%57.1)	16 (%57.1)	
Kollajen yoğunluğu	Düşük	0 (%0)	3 (%42.9)	1 (%14.3)	0 (%0)	4 (%14.3)	0.009* a
	Normal	0 (%0)	3 (%42.9)	3 (%42.9)	2 (%28.6)	8 (%28.6)	
	Yüksek	7 (%100)	1 (%14.3)	3 (%42.9)	5 (%71.4)	16 (%57.1)	

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; Ki-kare analizi ile inceleme yapılmıştır.

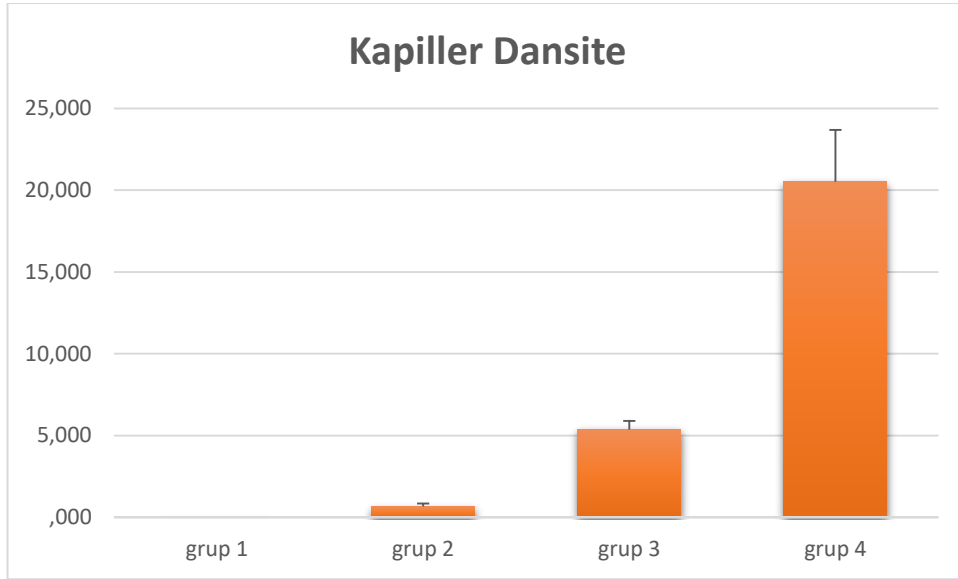
a: Grup 1 ve Grup 2 arası anlamlı farklılık.

Granülasyon dokusu oluşumu incelemelerine bakıldığında; Grup 1 ve Grup 2 arasında anlamlı fark mevcuttur. Bu durum plasebo grubunda kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde yeterli granülasyon dokusu gelişimi olmadığını işaret etmektedir. Tedavi gruplarında klinik olarak fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

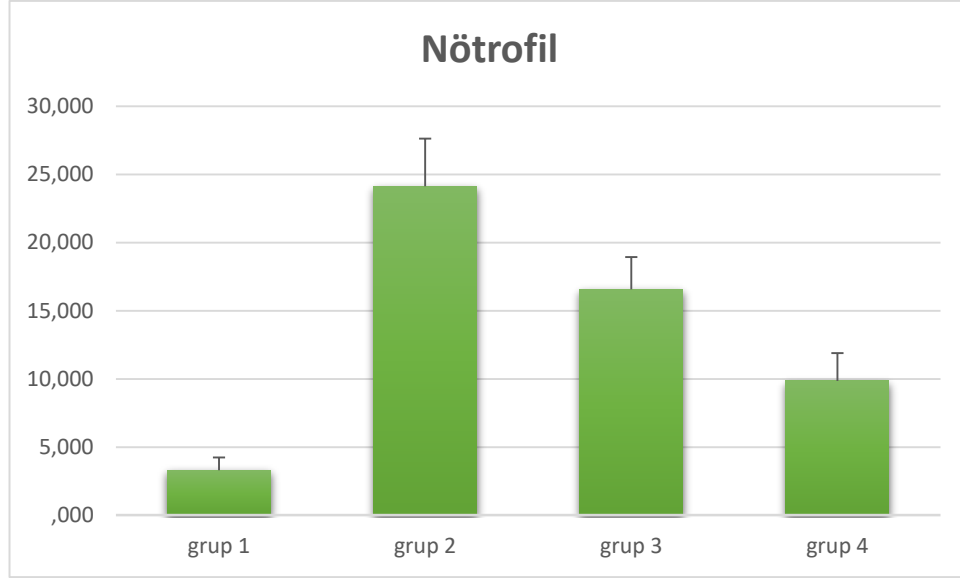
Kollajen yoğunluğu incelemelerine bakıldığında; Grup 1 ve Grup 2 arasında anlamlı fark mevcuttur. Bu durum plasebo grubunda kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde kollajen sentezi ve depolanmasının yetersiz olduğunu işaret etmektedir. Tedavi gruplarında klinik olarak fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.



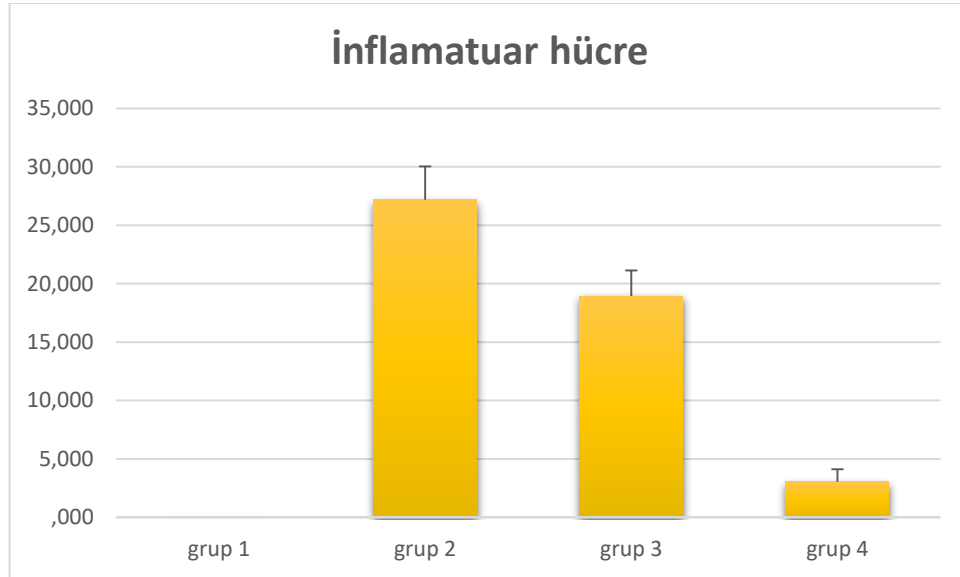
Şekil 12. Grupların Flep yaşayan alanlarının grafiksel olarak karşılaştırması.



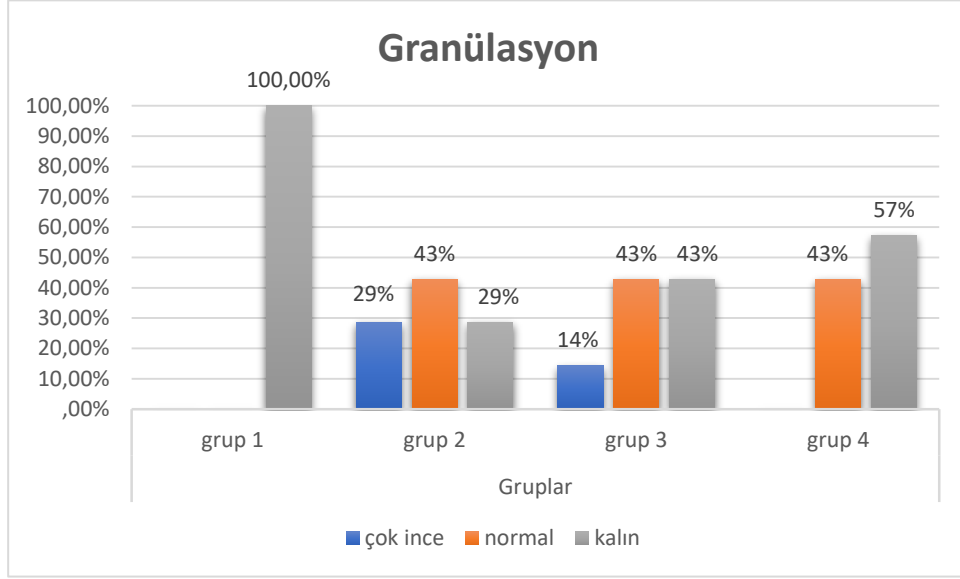
Şekil 13. Grupların Kapiller Dansitelerinin grafiksel olarak karşılaştırması.



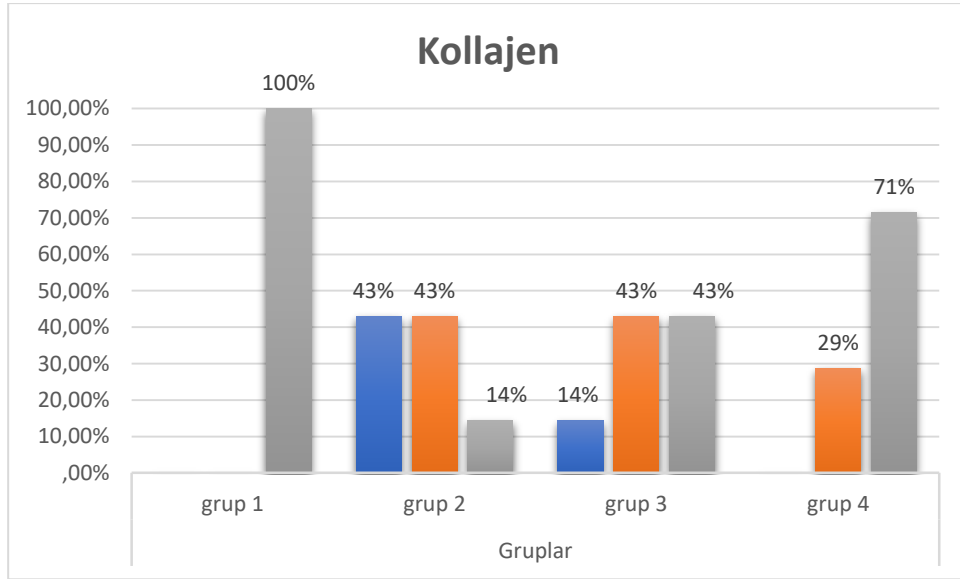
Şekil 14. Grupların Nötrofil sayılarının grafiksel karşılaştırması.



Şekil 15. Grupların Total İnflamatuar hücre sayılarının grafiksel karşılaştırması.



Şekil 16. Grupların granülasyon dokusu kalınlıklarının grafiksel karşılaştırması.



Şekil 17. Grupların Kollajen yoğunluklarının grafiksel karşılaştırması.

TARTIŞMA

Flepler, rekonstrüktif plastik cerrahi pratiğinde en sık başvuru alan yöntemlerin başında gelir. Travma ya da tümör rezeksiyonuna sekonder gelişen doku defekti ya da doku bütünlüğünün bozulduğu durumlarda estetik uyum, yeterli kan akımı ve yumuşak doku örtüsü sağlanmasıyla her bölgede onlarca çeşit farklı flep seçeneğiyle önemini yitirmeden kullanılmaya devam etmektedir. Flep cerrahisindeki operatif başarısızlığın total ya da parsiyel nekroz ile sonuçlanması, cerrahların çeşitli yöntemler araştırma ve geliştirme konusunda ilgisini çekmeye devam etmektedir. Yapılan çalışmalar flep cerrahisinde başarı oranının %90-95'lere ulaştığını ifade etse de pediküllü fleplerde bu oranın %70-75 dolaylarında olduğunu göstermektedir[53-55]. Flepte nekroz gelişiminin nedenleri sistemik ya da lokal olabilir. Nekrozun nedeni sistemik olarak periferik vasküler hastalıklar, diyabetis mellitus, enfeksiyon, hipotansif seyreden durumlar olabilirken, lokal olarak vasküler pedikülde tromboz, pedikül basısı ya da katlanma, yanlış planlama sayılabilir. Flep cerrahisi esnasında ve özellikle ilk 24 saatte flebe gelen kan akımı azalmaktadır. Sempatik innervasyonun sekteye uğraması ile vazokonstrüktör salınımı artmakta bu nedenle de özellikle en distalde kan akımı ciddi oranda düşmektedir. Vazokonstrüktör mediatörlerin azalması revaskülarizasyonun başladığı zamana kadar geçen sürede iskemi uzarsa durum doku hasarı ve flepte nekroz ile sonuçlanmaktadır.

Flep yaşayabilirliğini artırabilmek ve nekroz sorununu azaltabilmeye yönelik olarak temelde iki yöntemle sıklıkla başvurulmaktadır. Bunlar; delay fenomeni ve flebe kan akımını farmakolojik olarak artırmaya yönelik işlemlerdir. Flep kaybını azaltmaya yönelik olarak tanımlanan ilk işlemlerden biri olan delay fenomeni, flep aksına horizontal damarların kesilerek longitudinal damarların dilatasyonunu sağlayan bir yöntemdir. Erken dönemde sempatik liflerin kesilmesiyle hiperadrenerjik faz gelişmekte ve vazokonstriksiyon olmakta, daha ileri fazda ise tükenen katekolaminler sonrası vazodilatasyon gelişmekte ve büzülmüş olan anastomozların genişlemesine ve kan akımının artmasına sebep olmaktadır[56,57]. İntraoperatif karar verilebileceği gibi preoperatif planlama ile de profektik olarak gerçekleştirilebilen yöntemin dezavantajı iki aşamalı cerrahi gerektirmesidir.

Farmakolojik olarak, flep kaybını azaltmaya yönelik olarak, dekstran, aspirin, heparin, steroidler sıklıkla başvuru alan ilaçlar olarak literatürde yerlerini

almışlardır[22,23]. Bunun yanında birçok farklı molekül ve yöntem ile yapılan çalışmalar ise devam etmektedir[58–62]. Flep yaşayabilirliğini artırmada kullanılacak ilaç, kolay elde edilebilir ve kullanılabilir olmalı, postoperatif kullanıma uygun olmalı, ucuz ve güvenilir olmalıdır[63].

Rho kinazlar, ROCK I ve ROCK II olmak üzere iki formu olan hücre şeklini, motilitesini, sekresyonunu, gen ekspresyonunu ve proliferasyonu düzenleyen proteinlerdir. Vasküler tonusun düzenlenmesinde, inflamasyon, proliferasyon ve oksitadif stres üzerinde etkileri mevcuttur. Rho kinaz sinyal yolağının inhibisyonunun kardiyovasküler hastalıklar, erektil disfonksiyon, tümör metastazı, hipertansiyon, glokom, insülin direnci, böbrek yetmezliği, astım, nöral dejenerasyon ve osteoporoz gibi hastalıklarda potansiyel yararlı etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur[1,64]. Günümüzde Fasudil, serebral vazospazm için Çin’de, Fasudil derivesi olan ve ROCK I ve ROCK II için Fasudil’den daha yüksek selektivite gösteren ve daha potent olan Ripasudil, Japonya’da glokom ve oküler hipertansiyon için klinik kullanım onayı alan iki Rho kinaz inhibitörüdür.

Tada ve ark. yaptıkları olgu sunumu çalışmasında, sol diz çevresinden sinoviyal sarkom eksizyonu yapılan hastanın defekt rekonstrüksiyonu amacıyla serbest latissimus dorsi flep planladılar. Alıcı damarların ortaya konması sonrası arteryel akım olmaması nedeniyle vazospazm geliştiğini düşünerek ısıtma, heparin ve %2 lidokain uyguladılar. 15 dakika beklenmesine rağmen arteryel akım görülmedi. Sonrasında 5 ml’lik 15 kat sulandırılmış Fasudil’i alıcı damar etrafına topikal olarak uyguladılar. Yaklaşık bir dakika sonra arteryel kan akımı ve pulsasyon elde ederek başarılı bir anastomoz gerçekleştirdiler. Postoperatif dönemde herhangi bir kanama ya da hematoma komplikasyonu ile karşılaşmadıkları flep, nekroz görülmezsizin yaşadı. Vazospazmın giderilmesini ve kan akımının sağlanmasını, ROCK inhibisyonu yoluyla elde edilen düz kas relaksasyonu ile açıkladılar[65].

Encheng ve ark. yaptıkları çalışmada sıçanlarda derin sirkümfleks iliak arter tabanlı flep dizayn ederek nekrozu azaltmaya yönelik 8mg/kg dozunda Fasudil uyguladılar ve nekroz oranlarında anlamlı azalma elde ettiler[66]. Ripasudil ile ilgili olarak literatüre bakıldığında çalışmalar ağırlıklı olarak glokom üzerinde yoğunlaşsa da elde edilen veriler ve etki mekanizmaları değerlendirildiğinde çıkarılacak farklı

sonuçların mümkün olduğu dikkati çekmektedir. Nakabayashi ve ark. 20 adet erişkin kedi ile yaptıkları çalışmada intravitreal olarak sırasıyla 5 µM, 50 µM ve 5mM Ripasudil uygulaması sonrası lazer doppler yardımıyla kan akımını hesapladılar. Artan dozlarda Ripasudil uygulamasının retinal kan akımını artırdığı sonucuna ulaştılar[67]. ROCK aktivasyonu myozin hafif zincir fosfatazı inhibe ederek düz kas kontraksiyonunun ve vasküler tonusun devamlılığını sağlar[68]. Bu mekanizmayı göz önüne alarak sonuçları, Ripasudil uygulaması sonrası ROCK inhibisyonu ile vasküler tonus ve düz kas kontraksiyonunun azalmasıyla retinal kan akımının arttığı şeklinde değerlendirdiler.

Çalışmamızda Ripasudil tercih edilmesinin nedeni, bahsi geçen çalışmalarda da anlatıldığı üzere vasküler düz kas tonusu üzerine etkileri, bu sayede gerçekleşen vazodilatasyon, inflamasyon ve apoptozisi azaltıcı, hücre yaşayabilirliğini artırıcı etkilerinin gösterilmiş olmasıdır. Bunun yanında yan etki potansiyeli düşük olan Ripasudil, korneal hiperemi, damla benzeri korneal ödem gibi komplikasyonlara neden olmuş fakat tüm bu hafif komplikasyonlar kısa yarılanma ömrü sayesinde geçici olarak gözlenmiştir[69–71]. Çalışmalar göz önüne alındığında, literatürde flep yaşayabilirliği ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmayan ve Fasudil'den daha potent ve selektif olan Ripasudil kullanarak flep yaşayabilirliğini artırmayı amaçladığımız hipotezimizi oluşturduk.

1965 yılında McFarlane ve arkadaşları tarafından tanımlanan McFarlane flep orijinal tanımlamasında sabit anatomik noktalara dayanmaktaydı. Her iki skapula ve posteriyor ilyak çıkıntılar işaretlenip flep bu noktalar arasında planlanmaktaydı. Sabit anatomik noktalar flep beslenmesini her zaman aynı damarlardan sağladığı gerekçesiyle üstünlük olarak kabul edilse de nekroz oranları tutarlı olmuyordu. Nekroz oranları %22 ile %50 arasında oluyor, bu geniş farklar ise çalışmaların istatistiksel olarak anlamlı olmasını imkânsız kılıyordu. Khouri ve arkadaşları ise flebi modifiye ederek, kaudal tabanlı 3 cm eninde fleplerle en tutarlı nekroz oranlarını elde ettiler. Kaudal tabanlı 3x9 cm'lik McFarlane flep, sıçan sırt derisi kullanılarak dizayn edilen, kolay hazırlanması ve sabit nekroz oranları elde edilebilmesi nedeniyle avantajlı olan, birçok çalışmada standart halini almış bir fleptir[29].

Kaudal tabanlı 3x9 cm'lik McFarlane flep planladığımız çalışmamızda 28 adet 250-300 gram ağırlığında Sprague Dawley suşu dişi sıçanlar randomize olarak dört eşit gruba ayrıldı(n=7). Grup 1 kontrol grubu olarak belirlendi ve herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. Grup 2 plasebo grup olarak belirlendi ve flep elevasyonu ve yerine adaptasyonu sonrası postoperatif 0, 1 ve 2. günlerde 12 saat aralıklarla iki doz şeklinde 2mg/kg intraperitoneal serum fizyolojik uygulandı. Grup 3 düşük doz Ripasudil grubu olarak belirlendi ve flep elevasyonu ve yerine adaptasyonu sonrası postoperatif 0, 1 ve 2. günlerde 12 saat aralıklarla iki doz şeklinde 2mg/kg intraperitoneal Ripasudil uygulandı. Grup 4 yüksek doz Ripasudil grubu olarak belirlendi ve ve flep elevasyonu ve yerine adaptasyonu sonrası postoperatif 0, 1 ve 2. günlerde 12 saat aralıklarla iki doz şeklinde 8mg/kg intraperitoneal Ripasudil uygulandı. Tedavi gruplarında dozlar bahsi geçen çalışmalarla benzer doz rejimi baz alınarak hesaplandı. Postoperatif olarak 7. günde makroskopik değerlendirme ve yaşayan alan hesaplaması amacıyla sabit mesafeden fotoğraflamalar sonrası flepler sağlam deri adası içerecek şekilde total olarak eksize edildi. Eksizyonlar sonrası tüm hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Kontrol grubunda sırt derisinden random olarak, diğer gruplardan ise nekroz/yaşayan alan sınırından histopatolojik inceleme amacıyla doku örnekleri alındı.

Encheng ve ark. yaptıkları çalışmada sıçan sırt derisinden lateral tabanlı bir flep hazırladılar. Torakodorsal arter ve interkostal arterleri bağlayarak flebin derin sirkümfleks arterden beslenmesini sağlayarak ligate edilen damarlar ile flep pedikülü arasındaki kapalı damarların Fasudil tedavisi ile flep yaşayabilirliğine etkisini hesaplamayı hedeflediler. Kontrol, Flep ve Fasudil grupları oluşturarak Fasudil grubuna 8mg/kg Fasudil uyguladılar. Flep grubunda yaşayan flep oranını %79, Fasudil grubunda ise %94 olarak buldular. Western blot yöntemi ile elde ettikleri sonuçta Fasudil grubunda VEGF ve iNOS seviyelerinin yüksek olduğunu, yüksek iNOS seviyesinin de Akt/eNOS/NO yolağını aktive ettiğini buldular. Postoperatif 3. günde topladıkları doku örneklerinde Beclin-1, Bax ve Bcl-2 seviyelerini ölçtüler. Fasudil grubunda Beclin-1 seviyesini yükselmiş, Bax/Bcl-2 oranını ise azalmış olarak buldular. Yüksek yaşayan flep oranı, artmış VEGF ve NOS seviyeleri ve azalan Bax/Bcl-2 oranı fasudil tedavisinin kanlanmayı ve flep yaşayabilirliğini artırdığını, neovaskülarizasyonu artırdığını, apoptozisi azalttığını göstermekteydi[66]. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde flep sağkalım oranları, Grup 2'de %50, Grup 3'te

%62, Grup 4'te ise %70 olarak bulundu. Encheng ve ark. yaptığı çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki yaşayan flep alanları arasındaki fark flep seçimindeki farklılığa bağlandı. Çalışmamızdaki sonuçlara bakıldığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark mevcuttu. Bu fark tedavi gruplarında doza bağımlı olarak artan iyileştirici etkiye işaret etmektedir.

Yang ve ark. yaptıkları çalışmada, pulmoner mikrovasküler endotelial hücrelerde lipopolisakkaritlerle indüklenen apoptoz ve inflamasyonun artan dozlarda Ripasudil tedavisi ile iyileşme gösterebileceğini öne sürdüler. Elde ettikleri insan pulmoner mikrovasküler endotelial hücrelerini lipopolisakkaritlerle muamele ettikten sonrası sırasıyla artan dozlarda 25 µmol/l, 50 µmol/l ve 75 µmol/l Ripasudil ile muamele ettiler. Çalışma sonucunda Ripasudil'in doz bağımlı NO üretimini artırdığını, insan pulmoner mikrovasküler endotelial hücrelerinde hücre yaşayabilirliğini artırdığını buldular. Aynı zamanda doz bağımlı olarak apoptozisi azalttığı, kaspaz 3, NFκB, IL-6 ve TNFα düzeylerini azaltarak inflamasyonu baskıladıgı sonucuna ulaştılar. Ayrıca vasküler endotelial fonksiyonu düzenleyen ve inflamasyonu azaltan ve NO üretimini artıran eNOS ve Bcl-2 seviyelerini ise artmış olarak saptadılar[4]. Benzer bir çalışmayı immünkompetan, lipopolisakkaritle indüklenmiş pnömoniye sahip farelerle gerçekleştiren He ve ark. artan dozlarda Ripasudil uygulaması sonrası eNOS ve Bcl-2 seviyelerinin arttığını, pulmoner ödemin ve hasarın azaldığını, inflamatuvar sitokinlerin baskılandığını buldular[51]. Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak VEGF ve eNOS antikor ekspresyonları değerlendirildi. eNOS Grup 1'de sadece epidermiste, Grup 2'de epidermis ve kollajen liflerde, Grup 3 ve Grup 4'te ise epidermis, kollajen lifler, damar endoteli ve damar duvarında güçlü pozitif boyanma gösterdi.

Çalışmamızda alınan örnekler PCR değerlendirmesine tabi tutuldu. Beta actin gen temel alınarak, VEGF, eNOS, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonları değerlendirildi. Grup 4'te VEGF ekspresyonu artmış, Grup 2 ve Grup 3'te Grup 1'e göre daha düşük seviyelerde izlendi. Bulgular histopatolojik inceleme ile uyum içindeydi. Grup 4'te eNOS ekspresyonu yüksek, Grup 2 ve Grup 3'te Grup 1'e kıyasla daha düşük seviyelerde eksprese edilmişti. İncelemede apoptozisi gösteren Bax ve Bcl-2 ekspresyonları oranı birbirlerine kıyasla Grup 2'de yüksek, Grup 3'te düşük, Grup 4'te ise en düşük oranda saptandı. Bulgular artan dozda Ripasudil tedavisi ile apoptozisin

azaldığını göstermekteydi. Hem histopatolojik sonuçlar hem de PCR sonuçları Yang ve Encheng'in yaptığı çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Yapılan çalışmalar neovaskülarizasyonun geniş bir grup anjiogenik büyüme faktörü tarafından düzenlendiğini göstermektedir. VEGF ise neovaskülarizasyonda bilinen en önemli büyüme faktörlerinden biridir. Vasküler permeabiliteyi artırır, endotelial hücrelerin büyümesini stimüle eder ve anjiogenezi uyarır. Hücre yüzeyindeki reseptörleri uyararak endotel hücre göçünü, proliferasyonu ve kapiller köklerin yeni damar oluşturmak üzere invazyonuna öncülük eden ekstraselüler matriks enzimlerinin üretimini uyarır. Padubidri yaptığı çalışmada tek doz VEGF enjeksiyonunun sıçan deri flebinde nekroz oranını önemli ölçüde azalttığını ifade etmiştir[72]. Yaptığımız immünohistokimyasal VEGF antikoru ekspresyonu, Grup 1'de sadece epidermis apikalinde VEGF pozitif boyanma olduğunu, Grup 2 ve Grup 3'te VEGF'in epidermis, kollajen lifler, damar endoteli ve damar duvarında negatif olduğunu, Grup 4'te ise damar endotelinde güçlü pozitif boyanma olduğunu ortaya koymuştur. Yüksek doz grubunda endoteldeki VEGF antikoru ile pozitif boyanma yine doz bağımlı artışa işaret etmektedir. Ayrıca Grup 4'teki yüksek VEGF seviyeleri, hem PCR sonuçları, hem neovaskülarizasyon hem de yaşayan flep alan artışıyla paralel olarak saptanmıştır.

Okumura ve ark. kültüre edilmiş insan korneal endotelial hücreleri ve korneal endotelial hasar oluşturulmuş tavşan modeli çalışmasında, Ripasudil uygulaması ile her iki grupta da korneal endotelial hücrelerde kontrol gruplarına göre artan iyileşme gözlemlenildi. Ripasudil ile tedavi edilen tüm alanlarda korneal endotelial hücre dansitesi ve proliferasyonu daha yüksek olarak bulundu. Fibroblastik dönüşüm ise anlamlı derece azalmış olarak gözlemlendi. Çalışma Ripasudil'in yara iyileşmesine yapabileceği potansiyel katkı açısından anlamlı olarak yorumlandı[73].

Uchida ve ark. yaptıkları çalışmada endotoksinle indüklenmiş üveit oluşturulmuş ratlarda Ripasudil'in antiinflamatuvar etkisini araştırdılar. Lipopolisakkarit uygulaması sonrası üveit gelişen ratlara Ripasudil tedavisi uygulayarak antiinflamatuvar hücre sayılarını hesapladılar. Elde ettikleri sonuçlarda, Ripasudil tedavisinin hücresel infiltrasyonu, IL-6, TNF alfa, monosit kemotaktik faktör 1(Mcp-1) seviyelerini ve protein konsantrasyonunu azalttığı sonucunu elde

ettiler. Bulgular Ripasudil tedavisinin antiinflamatuvar etkisini ortaya koydu[74].

Çalışmamızdaki histopatolojik bulgular, Grup 1'den alınan deri dokusunun normal histolojik yapıda olduğunu göstermekteydi. Kollajen lifler demetler halinde izlenmekteydi. Fibroblast proliferasyonu gözlenmedi. Grup 2'de sağlıklı doku ile nekrotik doku geçiş zonunda kollajen liflerde ayrılmalar ve lif demetleri arasında boşluklar bulunmaktaydı. Epidermiste bütünlük kaybolmuştu. Bununla birlikte ter ve yağ bezlerinde dejenerasyona rastlanmadı. Tüm alanda belirgin inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Granülasyon dokusu çok ince ve yer yer kesintiye uğramış görünümdeydi. Damarlanmanın oldukça az olduğu belirlendi. Grup 3'te epidermisteki bütünlük kaybının halen devam ettiği izlendi. Kollajen liflerdeki ayrılmaların azaldığı ve demetler oluşturduğu gözlemlendi. Fakat inflamatuvar hücre infiltrasyonu azalmış olsa da devam etmekteydi. Normal kalınlıkta granülasyon dokusu göze çarpmaktaydı. Yeni damar oluşumları izlendi. Grup 4'te dejenerasyonun belirgin şekilde azaldığı tespit edildi. Epidermis normal yapıdaydı. Kollajen lifler demetler halinde izlendi. İnflamatuvar hücre infiltrasyonunun Grup 2'ye göre oldukça azaldığı tespit edildi. Kalın granülasyon dokusu izlendi. Yeni damar sayısında belirgin artış izlendi. Bulgular artan dozlarda uygulanan Ripasudil'in iyileşmeyi ve neovaskülarizasyonu artırıcı etkisine dair hipotezimizi desteklemektedir. Grup 2'de neovaskülarizasyonun zayıf olduğunu, Grup 3'te artış gösterdiğini, Grup 4'te ise en yüksek oranda olduğunu ortaya koymuştur.

Sayısal verilerin analizinde, histopatolojik olarak kapiller dansite, neovaskülarizasyon, granülasyon dokusu ile ifade edilen fibroblast proliferasyonu, nötrofil sayısı, total inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kollajen yoğunluğu ve PCR yardımıyla VEGF, eNOS, Bax ve Bcl-2 seviyeleri değerlendirildi.

Neovaskülarizasyon; Grup 1 ve Grup 2 kıyaslamasında klinik fark olsa da istatistiksel anlamlı fark bulunamadı. Grup 2 ve Grup 3 kıyaslamasında Grup 3 lehine anlamlı, Grup 3 ve Grup 4 kıyaslamasında Grup 4 lehine anlamlı olarak bulundu($p<0.05$). Sonuçlar düşük doz Ripasudil ile tedavi edilen grupta yeni damar oluşumunun arttığını, yüksek doz Ripasudil ile tedavi edilen grupta da düşük doz tedavi grubuna göre yine anlamlı derecede arttığını göstermektedir. Bu sonuçla en yüksek neovaskülarizasyon Grup 4'te izlenmiştir ve yüksek doz Ripasudil tedavisinin

neovaskularizasyonu anlamlı derecede artırdığına kanıt olarak yorumlanmıştır.

Fibroblast proliferasyonu(granülasyon dokusu oluşumu); Grup 1 ve Grup 2 arasında anlamlı fark mevcuttur($p<0.05$). Bu durum plasebo grubunda kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde yeterli granülasyon dokusu gelişimi olmadığını işaret etmektedir. Tedavi gruplarında klinik olarak fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Total inflamatuvar hücre infiltrasyonu; Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 değerleri Grup 1'e göre anlamlı şekilde yüksektir. Ayrıca Grup 2 değerleri Grup 3 ve Grup 4'e göre anlamlı şekilde yüksektir. Grup 3 değerleri de Grup 4'e göre anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.05$). Bu durum plasebo grubunda inflamasyonun yüksek olduğunu, düşük doz Ripasudil ile tedavi edilen grupta inflamasyonun anlamlı derecede azaldığını, yüksek doz Ripasudil ile tedavi edilen grupta ise yine düşük doz tedavi grubuna göre inflamasyonda anlamlı derecede azalma olduğunu işaret etmektedir($p<0.05$).

Kollajen yoğunluğu; Grup 1 ve Grup 2 arasında anlamlı fark mevcuttur($p<0.05$). Bu durum plasebo grubunda kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde kollajen sentezi ve depolanmasının yetersiz olduğunu işaret etmektedir. Tedavi gruplarında klinik olarak kollajen sentezi, depolanması ve fibril dizilimlerinde fark olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

İmmünohistokimyasal olarak VEGF ve eNOS antikorlarının klinik olarak değerlendirmesinde; VEGF için Grup 1, Grup 2, Grup 3 arasında fark saptanmadı. Grup 4'te ise diğer gruplara göre klinik olarak anlamlı derecede fark mevcuttu. Bulgular Grup 4'teki yüksek neovaskularizasyon seviyeleri ile örtüşmektedir. eNOS için; Grup 1 ile Grup 2 arasında klinik olarak anlamlı fark saptanmadı. Grup 3 ile Grup 4 kendi aralarında kıyaslandığında klinik anlamlı fark saptanmadı. Fakat Grup 1 ve Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 4 arasında Grup 3 ve Grup 4 lehine sonuçlar klinik olarak anlamlı bulundu. Tedavi gruplarında artan eNOS seviyeleri, azalan inflamasyon ve artan kan akımı ile yaşayan flep oranlarındaki bulguları desteklemektedir.

Apoptozis, VEGFa ve eNOS gen ekspresyon seviyelerini gösteren PCR sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; VEGFa ve eNOS için, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te Grup 1'e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı($p<0.05$). Bu fark Grup 2'de azalan, Grup 3 ve Grup 4'te ise artan VEGF ve eNOS seviyelerini

göstermektedir. Grup 4 ile diğer gruplar arasında da istatistiksel fark saptandı($p<0.05$). Bulgular en yüksek VEGF ve eNOS ekspresyon seviyelerinin Grup 4'te olduğunu göstermektedir. Bax için; Grup 2 ve Grup 3, Grup 1'e kıyasla istatistiksel anlamlı fark gösterdi. Bcl-2 için; Grup 2 ve Grup 4, Grup 1'e kıyasla istatistiksel anlamlı fark gösterdi($p<0.05$). Bu bulgular Bax, Bcl-2 ve Bax/Bcl-2 oranları birlikte değerlendirildiğinde Grup 2'de apoptozisin kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğunu, artan Ripasudil dozları ile giderek azaldığını göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar, artan dozlarda Ripasudil uygulamasının makroskopik olarak yaşayan flep alan yüzdelerini artırdığını, neovaskülarizasyonu artırdığını, özellikle yüksek dozda VEGF ekspresyonunu ve dolayısıyla yeni damar oluşumunu stimüle ettiğini, eNOS seviyelerini artırarak NO vasıtasıyla inflamasyonu azalttığını ve vasküler tonusta gevşemeye katkı sağladığını, Bax/bcl2 oranını azalttığını, bu sayede apoptozisi baskıladığını, inflamasyonu geriletip, kollajen sentez ve regülasyonunu artırdığını göstermektedir.

Görece yeni bir ilgi alanı olan Rho kinaz inhibitörlerinin bir çok sisteme etki etmesi, vücudun farklı bölgelerinde eksprese edilerek çok geniş bir spektruma sahip ve potent moleküller olması, yan etki potansiyelinin düşük olması avantajları olarak sayılabilir[2,67,69,73,75–80]. Kısa yarılanma ömrü ise kimi durumlarda avantajlı kimi durumlarda ise dezavantajlı olarak görülebilir. Kullanımının birkaç ülke ile sınırlı olması, görece pahalı bir molekül olması ve özellikle flep cerrahisi alanında yapılan bizim çalışmamız haricinde herhangi bir çalışma olmaması ise rutin kullanımın önündeki engeller olarak görülebilir. Biz Ripasudil ile ilgili çalışmaların genişletilerek, farklı birçok durumda yeni hipotezlerle desteklenerek flep yaşayabilirliğinin artırılması konusunda umut vaat eden bir molekül olduğu kanısındayız.

SONUÇ

Flepler, plastik cerrahların sıklıkla ihtiyaç duyduğu, etkili kullanıldığında yüz güldürücü sonuçlar sağlayan, rekonstrüksiyonun en temel yöntemlerinin başında gelmektedir. Flep nekrozu ise hastanede yatış sürelerini uzatan, hem hasta hemde cerrah açısından fiziksel ve psikolojik bir yük, sağlık merkezleri içinse ek maliyet anlamı taşımaktadır. Flep salvajında başarılı yöntemler mevcut olsa da günümüzde sorunu azaltmaya yönelik arayış ve ihtiyaç devam etmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar artan dozlarda Ripasudil uygulamasının flep yaşayabilirliğini artırdığını, inflamasyonu ve apoptozisi baskıladığını, yeni damar oluşumlarını artırdığını göstermiştir. Bu sonuçlarla Ripasudil'in flepler konusunda yapılacak yeni çalışmalarla birlikte cerrahların elini güçlendiren bir ilaç olarak ileride rutin kullanıma girebilecek potansiyel taşıdığını söylemek mümkündür.

KAYNAKLAR

- [1] Y. Feng, P. V. LoGrasso, O. Defert, ve R. Li, “Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential”, *J Med Chem*, c. 59, sy 6, ss. 2269-2300, Mar. 2016, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00683.
- [2] M. Yasuda, K. Takayama, T. Kanda, M. Taguchi, H. Someya, ve M. Takeuchi, “Comparison of intraocular pressure-lowering effects of ripasudil hydrochloride hydrate for inflammatory and corticosteroid-induced ocular hypertension”, *PLoS One*, c. 12, sy 10, s. e0185305, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0185305.
- [3] Y. Wada, T. Higashide, A. Nagata, ve K. Sugiyama, “Effects of ripasudil, a rho kinase inhibitor, on blood flow in the optic nerve head of normal rats”, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, c. 257, sy 2, ss. 303-311, Şub. 2019, doi: 10.1007/s00417-018-4191-6.
- [4] J. Yang, F. Ruan, ve Z. Zheng, “Ripasudil Attenuates Lipopolysaccharide (LPS)-Mediated Apoptosis and Inflammation in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells via ROCK2/eNOS Signaling”, *Med Sci Monit*, c. 24, ss. 3212-3219, May. 2018, doi: 10.12659/MSM.910184.
- [5] J. Wood, “Case of Extreme Deformity of the Neck and Forearm, from the Cicatrices of a Burn, cured by Extension, Excision, and Transplantation of Skin, adjacent and remote”, *Med Chir Trans*, c. 46, ss. 149-159, 1863, doi: 10.1177/095952876304600114.
- [6] G. P. Maxwell, “Iginio Tansini and the origin of the latissimus dorsi musculocutaneous flap”, *Plast Reconstr Surg*, c. 65, sy 5, ss. 686-692, May. 1980, doi: 10.1097/00006534-198005000-00027.
- [7] C. Manchot ve R. K. Daniel, “The Cutaneous Arteries of the Human Body”, *Plastic and Reconstructive Surgery*, c. 77, sy 3, s. 495, Mar. 1986.
- [8] M. Salmon, “Arteres de la peau”, *Arteres de la peau*, ss. 246-246, 1936.
- [9] I. A. McGregor ve G. Morgan, “Axial and random pattern flaps”, *Br J Plast Surg*, c. 26, sy 3, ss. 202-213, Tem. 1973, doi: 10.1016/0007-1226(73)90003-9.
- [10] J. Jh, “Microsurgery in anastomosis of small vessels”, *Surg Forum*, c. 11, ss. 243-245, 1960.
- [11] H. J. Buncke ve W. P. Schulz, “Total ear reimplantation in the rabbit utilising microminiature vascular anastomoses”, *British Journal of Plastic Surgery*, c. 19, ss. 15-22, Oca. 1966, doi: 10.1016/S0007-1226(66)80003-6.
- [12] V. Y. Bakamjian, “A two-stage method for pharyngoesophageal reconstruction with a primary pectoral skin flap”, *Plastic and Reconstructive Surgery*, c. 36, sy 2, ss. 173-184, Ağu. 1965.
- [13] T. J. Krizek, T. Tani, J. D. Desprez, ve C. L. Kiehn, “Experimental transplantation of composite grafts by microsurgical vascular anastomoses”, *Plastic and Reconstructive Surgery*, c. 36, sy 5, ss. 538-546, Kas. 1965.
- [14] R. K. Daniel ve G. I. Taylor, “Distant transfer of an island flap by microvascular anastomoses”, *Plastic and Reconstructive Surgery*, c. 52, sy 2, ss. 111-117, Ağu. 1973.
- [15] R. Ger, “The technique of muscle transposition in the operative treatment of traumatic and ulcerative lesions of the leg”, *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, c. 11, sy 6, ss. 502-510, Haz. 1971.
- [16] S. J. Mathes, F. Nahai, ve V. M. Friedman, *Clinical atlas of muscle and musculocutaneous flaps*, c. 91. Mosby St. Louis, 1979.
- [17] G. I. Taylor ve J. H. Palmer, “The vascular territories (angiosomes) of the

- body: experimental study and clinical applications”, *British Journal of Plastic Surgery*, c. 40, sy 2, ss. 113-141, Mar. 1987, doi: 10.1016/0007-1226(87)90185-8.
- [18] J. B. Lucas, “The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps”, *Facial Plast Surg Clin North Am*, c. 25, sy 3, ss. 303-311, Ağu. 2017, doi: 10.1016/j.fsc.2017.03.003.
- [19] Daniel, R. K. “Principles and physiology of skin flap surgery.” *Plast Reconstr Surg* 73 (1990): 225-378.
- [20] C. L. Kerrigan, “Skin flap failure: pathophysiology”, *Plast Reconstr Surg*, c. 72, sy 6, ss. 766-777, Ara. 1983, doi: 10.1097/00006534-198312000-00003.
- [21] M. R. Kayser ve P. L. Hodges, “Surgical flaps”, *Selected readings in plastic surgery*, c. 9, sy 2, s. 3, 1999.
- [22] S. J. Mathes ve V. R. Hentz, “Plastic Surgery (8 volume set)”, *Philadelphia, PA: Saunders Elsevier*, 2006.
- [23] S. Wolfort, M. Angel, K. Knight, L. Amiss, ve R. Morgan, “The Beneficial Effect of Dextran on Anastomotic Patency and Flap Survival a Strongly Thrombogenic Model”, *J reconstr Microsurg*, c. 8, sy 05, ss. 375-378, Eyl. 1992, doi: 10.1055/s-2007-1006721.
- [24] C. Herlin, N. Bertheuil, F. Bekara, F. Boissiere, R. Sinna, ve B. Chaput, “Leech therapy in flap salvage: Systematic review and practical recommendations”, *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique*, c. 62, sy 2, ss. e1-e13, Nis. 2017, doi: 10.1016/j.anplas.2016.06.004.
- [25] M. Topalan, A. Arinci, M. Erer, ve H. Guvenc, “The effect of parenteral pentoxifylline therapy on skin flap survival”, *Eur J Plast Surg*, c. 16, sy 1, ss. 33-35, Oca. 1993, doi: 10.1007/BF00192704.
- [26] R. E. Hayden ve B. J. Snyder, “Pharmacologic manipulation of random skin flaps with pentoxifylline”, *Laryngoscope*, c. 103, sy 2, ss. 185-188, Şub. 1993, doi: 10.1002/lary.5541030211.
- [27] B. Çeliköz, M. Deveci, ve N. Selmanpakoğlu, “Flep Canlılığı Üzerine Topikal Nitrogliserin Uygulamasının Direkt ve İndirekt Etkisi”, *Türk Plastik Rekonstrüktif Ve Estetik Cerrahi Dergisi*, c. 2, sy 2, Art. sy 2, Ağu. 1994.
- [28] J. Rinkinen ve E. G. Halvorson, “Topical Vasodilators in Microsurgery: What Is the Evidence?”, *J Reconstr Microsurg*, c. 33, sy 1, ss. 1-7, Oca. 2017, doi: 10.1055/s-0036-1592191.
- [29] Bayramiçli M. *Deneyisel mikrocerrahi: Temel araştırma, doku ve organ nakli modelleri. İstanbul: Ofset Matbaacılık; 2005.*
- [30] J. Shi ve L. Wei, “Rho kinase in the regulation of cell death and survival”, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, c. 55, sy 2, ss. 61-75, Nis. 2007, doi: 10.1007/s00005-007-0009-7.
- [31] O. Nakagawa, K. Fujisawa, T. Ishizaki, Y. Saito, K. Nakao, ve S. Narumiya, “ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice”, *FEBS Lett*, c. 392, sy 2, ss. 189-193, Ağu. 1996, doi: 10.1016/0014-5793(96)00811-3.
- [32] K. Fujisawa, A. Fujita, T. Ishizaki, Y. Saito, ve S. Narumiya, “Identification of the Rho-binding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase”, *J Biol Chem*, c. 271, sy 38, ss. 23022-23028, Eyl. 1996, doi: 10.1074/jbc.271.38.23022.
- [33] N. Takahashi, H. Tuiki, H. Saya, ve K. Kaibuchi, “Localization of the gene

- coding for ROCK II/Rho kinase on human chromosome 2p24”, *Genomics*, c. 55, sy 2, ss. 235-237, Oca. 1999, doi: 10.1006/geno.1998.5344.
- [34] D. Thumkeo *vd.*, “Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death”, *Mol Cell Biol*, c. 23, sy 14, ss. 5043-5055, Tem. 2003, doi: 10.1128/MCB.23.14.5043-5055.2003.
- [35] Y. Shimizu *vd.*, “ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles”, *J Cell Biol*, c. 168, sy 6, ss. 941-953, Mar. 2005, doi: 10.1083/jcb.200411179.
- [36] J. Shi *vd.*, “Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment”, *Cell Death Dis*, c. 4, s. e483, Şub. 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.10.
- [37] R. Capdeville, E. Buchdunger, J. Zimmermann, ve A. Matter, “Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug”, *Nat Rev Drug Discov*, c. 1, sy 7, ss. 493-502, Tem. 2002, doi: 10.1038/nrd839.
- [38] M. Surma, L. Wei, ve J. Shi, “Rho kinase as a therapeutic target in cardiovascular disease”, *Future Cardiol*, c. 7, sy 5, ss. 657-671, Eyl. 2011, doi: 10.2217/fca.11.51.
- [39] S. Hartmann, A. J. Ridley, ve S. Lutz, “The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease”, *Front Pharmacol*, c. 6, s. 276, 2015, doi: 10.3389/fphar.2015.00276.
- [40] M. Sardana, M. Moll, ve H. W. Farber, “Novel investigational therapies for treating pulmonary arterial hypertension”, *Expert Opin Investig Drugs*, c. 24, sy 12, ss. 1571-1596, 2015, doi: 10.1517/13543784.2015.1098616.
- [41] R. K. Donegan ve R. L. Lieberman, “Discovery of Molecular Therapeutics for Glaucoma: Challenges, Successes, and Promising Directions”, *J Med Chem*, c. 59, sy 3, ss. 788-809, Şub. 2016, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00828.
- [42] P. V. Rao, P. P. Pattabiraman, ve C. Kocpozynski, “Role of the Rho GTPase/Rho kinase signaling pathway in pathogenesis and treatment of glaucoma: Bench to bedside research”, *Exp Eye Res*, c. 158, ss. 23-32, May. 2017, doi: 10.1016/j.exer.2016.08.023.
- [43] M. Albersen, A. W. Shindel, K. B. Mwamukonda, ve T. F. Lue, “The future is today: emerging drugs for the treatment of erectile dysfunction”, *Expert Opin Emerg Drugs*, c. 15, sy 3, ss. 467-480, Eyl. 2010, doi: 10.1517/14728214.2010.480973.
- [44] L. Wei, M. Surma, S. Shi, N. Lambert-Cheatham, ve J. Shi, “Novel Insights into the Roles of Rho Kinase in Cancer”, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, c. 64, sy 4, ss. 259-278, Ağu. 2016, doi: 10.1007/s00005-015-0382-6.
- [45] N. Rath ve M. F. Olson, “Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy”, *EMBO Rep*, c. 13, sy 10, ss. 900-908, Eki. 2012, doi: 10.1038/embor.2012.127.
- [46] Y. Huang, S. Xiao, ve Q. Jiang, “Role of Rho kinase signal pathway in inflammatory bowel disease”, *Int J Clin Exp Med*, c. 8, sy 3, ss. 3089-3097, 2015.
- [47] R. S. Knipe, A. M. Tager, ve J. K. Liao, “The Rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational targets for new therapies for pulmonary fibrosis”, *Pharmacol Rev*, c. 67, sy 1, ss. 103-117, 2015, doi: 10.1124/pr.114.009381.
- [48] T. Holvoet *vd.*, “Treatment of Intestinal Fibrosis in Experimental

- Inflammatory Bowel Disease by the Pleiotropic Actions of a Local Rho Kinase Inhibitor”, *Gastroenterology*, c. 153, sy 4, ss. 1054-1067, Eki. 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.013.
- [49] K. P. Garnock-Jones, “Ripasudil: first global approval”, *Drugs*, c. 74, sy 18, ss. 2211-2215, Ara. 2014, doi: 10.1007/s40265-014-0333-2.
- [50] Y. Ohta, S. Takaseki, ve T. Yoshitomi, “Effects of ripasudil hydrochloride hydrate (K-115), a Rho-kinase inhibitor, on ocular blood flow and ciliary artery smooth muscle contraction in rabbits”, *Jpn J Ophthalmol*, c. 61, sy 5, ss. 423-432, Eyl. 2017, doi: 10.1007/s10384-017-0524-y.
- [51] P. He, Y. Guo, J. Wang, L. Yan, ve A. Feng, “Protection of ripasudil, a Rho kinase inhibitor, in lipopolysaccharides-induced acute pneumonia in mice”, *Am J Transl Res*, c. 11, sy 10, ss. 6433-6443, 2019.
- [52] K. Kishima *vd.*, “Role of Rho-associated coiled-coil containing protein kinase in the spinal cord injury induced neuropathic pain”, *Spine J*, c. 21, sy 2, ss. 343-351, Şub. 2021, doi: 10.1016/j.spinee.2020.08.011.
- [53] A. Banic *vd.*, “Late results of breast reconstruction with free TRAM flaps: a prospective multicentric study”, *Plast Reconstr Surg*, c. 95, sy 7, ss. 1195-1204; discussion 1205-1206, Haz. 1995.
- [54] M. A. Schusterman, S. S. Kroll, ve M. E. Weldon, “Immediate breast reconstruction: why the free TRAM over the conventional TRAM flap?”, *Plast Reconstr Surg*, c. 90, sy 2, ss. 255-261; discussion 262, Ağu. 1992.
- [55] P. A. Watterson, J. Bostwick, T. R. Hester, J. T. Bried, ve G. I. Taylor, “TRAM flap anatomy correlated with a 10-year clinical experience with 556 patients”, *Plast Reconstr Surg*, c. 95, sy 7, ss. 1185-1194, Haz. 1995, doi: 10.1097/00006534-199506000-00007.
- [56] K. Hamilton *vd.*, “The Delay Phenomenon: A Compilation of Knowledge across Specialties”, *Craniofacial Trauma Reconstr*, c. 7, sy 2, ss. 112-118, Haz. 2014, doi: 10.1055/s-0034-1371355.
- [57] R. M. McFarlane, F. C. Heagy, S. Radin, J. C. Aust, ve R. E. Wermuth, “A STUDY OF THE DELAY PHENOMENON IN EXPERIMENTAL PEDICLE FLAPS”, *Plast Reconstr Surg*, c. 35, ss. 245-262, Mar. 1965, doi: 10.1097/00006534-196503000-00001.
- [58] A. Aryannejad *vd.*, “Cannabidiol Improves Random-Pattern Skin Flap Survival in Rats: Involvement of Cannabinoid Type-2 Receptors”, *J Reconstr Microsurg*, Tem. 2022, doi: 10.1055/s-0042-1749338.
- [59] G. Dong, H. Wu, J. Hu, ve L. Teng, “Stromal Vascular Fraction Promotes Viability of Co-grafted Axial Skin Flaps in Rats Model”, *Aesthetic Plast Surg*, Tem. 2022, doi: 10.1007/s00266-022-02812-y.
- [60] Y. Li *vd.*, “Ginsenoside Rb3 attenuates skin flap ischemia-reperfusion damage by inhibiting STING-IRF3 signaling”, *J Mol Histol*, c. 53, sy 4, ss. 763-772, Ağu. 2022, doi: 10.1007/s10735-022-10081-x.
- [61] Z. Chen *vd.*, “Activating Parkin-dependent mitophagy alleviates oxidative stress, apoptosis, and promotes random-pattern skin flaps survival”, *Commun Biol*, c. 5, sy 1, s. 616, Haz. 2022, doi: 10.1038/s42003-022-03556-w.
- [62] M. Ahmadzadeh, Z. Esmaeilzadeh, M. R. Khezri, A. Jafari, ve M. Ghasemnejad-Berenji, “The Promising Effect of Topiramate on Random-Pattern Skin Flap Survival in Rats”, *Aesthetic Plast Surg*, Haz. 2022, doi: 10.1007/s00266-022-02969-6.

- [63] R. J. Rohrich, G. W. Cherry, ve M. Spira, “Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment”, *Plast Reconstr Surg*, c. 73, sy 6, ss. 943-948, Haz. 1984, doi: 10.1097/00006534-198406000-00016.
- [64] J. K. Liao, M. Seto, ve K. Noma, “Rho Kinase (ROCK) Inhibitors”, *J Cardiovasc Pharmacol*, c. 50, sy 1, ss. 17-24, Tem. 2007, doi: 10.1097/FJC.0b013e318070d1bd.
- [65] K. Tada, T. Nakajima, M. Nakada, M. Matsuta, ve H. Tsuchiya, “Topical Application of Fasudil Hydrochloride for Vasospasm during Soft Tissue Reconstruction Using a Free Flap”, *Case Rep Orthop*, c. 2019, s. 5929281, 2019, doi: 10.1155/2019/5929281.
- [66] E. Ji, J. Wang, L. Wang, Z. Pan, ve W. Gao, “Pharmacological Effects of Fasudil on Flap Survival in a Rodent Model”, *J Surg Res*, c. 255, ss. 575-582, Kas. 2020, doi: 10.1016/j.jss.2020.03.044.
- [67] S. Nakabayashi *vd.*, “Effect of intravitreal Rho kinase inhibitor ripasudil (K-115) on feline retinal microcirculation”, *Exp Eye Res*, c. 139, ss. 132-135, Eki. 2015, doi: 10.1016/j.exer.2015.07.008.
- [68] A. P. Somlyo ve A. V. Somlyo, “Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase”, *Physiol Rev*, c. 83, sy 4, ss. 1325-1358, Eki. 2003, doi: 10.1152/physrev.00023.2003.
- [69] H. Tanihara *vd.*, “Additive intraocular pressure-lowering effects of the Rho kinase inhibitor ripasudil (K-115) combined with timolol or latanoprost: a report of 2 randomized clinical trials”, *JAMA ophthalmology*, c. 133, sy 7, ss. 755-761, 2015.
- [70] H. Tanihara *vd.*, “Intra-ocular pressure-lowering effects of a Rho kinase inhibitor, ripasudil (K-115), over 24 hours in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension: a randomized, open-label, crossover study”, *Acta Ophthalmol*, c. 93, sy 4, ss. e254-260, Haz. 2015, doi: 10.1111/aos.12599.
- [71] H. Tanihara *vd.*, “Phase 2 randomized clinical study of a Rho kinase inhibitor, K-115, in primary open-angle glaucoma and ocular hypertension”, *Am J Ophthalmol*, c. 156, sy 4, ss. 731-736, Eki. 2013, doi: 10.1016/j.ajo.2013.05.016.
- [72] A. Padubidri ve E. Browne, “Effect of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on Survival of Random Extension of Axial Pattern Skin Flaps in the Rat”, *Annals of Plastic Surgery*, c. 37, sy 6, ss. 604-611, Ara. 1996, doi: 10.1097/00000637-199612000-00006.
- [73] N. Okumura *vd.*, “Effect of the Rho-Associated Kinase Inhibitor Eye Drop (Ripasudil) on Corneal Endothelial Wound Healing”, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, c. 57, sy 3, ss. 1284-1292, Mar. 2016, doi: 10.1167/iovs.15-18586.
- [74] T. Uchida, M. Honjo, R. Yamagishi, ve M. Aihara, “The Anti-Inflammatory Effect of Ripasudil (K-115), a Rho Kinase (ROCK) Inhibitor, on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats”, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, c. 58, sy 12, ss. 5584-5593, Eki. 2017, doi: 10.1167/iovs.17-22679.
- [75] K. Akaiwa *vd.*, “Topical Ripasudil Suppresses Retinal Ganglion Cell Death in a Mouse Model of Normal Tension Glaucoma”, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, c. 59, sy 5, ss. 2080-2089, Nis. 2018, doi: 10.1167/iovs.17-23276.
- [76] V. Galvis, A. Tello, J. P. Fuquen, C. A. Rodríguez-Barrientos, ve J. M. Grice, “ROCK Inhibitor (Ripasudil) as Coadjuvant After Descemetorhexis Without an Endothelial Graft”, *Cornea*, c. 36, sy 12, ss. e38-e40, Ara. 2017, doi:

10.1097/ICO.0000000000001381.

- [77] Z. Gao, Q. Li, Y. Zhang, X. Gao, H. Li, ve Z. Yuan, “Ripasudil alleviated the inflammation of RPE cells by targeting the miR-136-5p/ROCK/NLRP3 pathway”, *BMC Ophthalmol*, c. 20, sy 1, s. 134, Nis. 2020, doi: 10.1186/s12886-020-01400-5.
- [78] Y. Hida, S. Nakamura, A. Nishinaka, Y. Inoue, M. Shimazawa, ve H. Hara, “Effects of ripasudil, a ROCK inhibitor, on retinal edema and nonperfusion area in a retinal vein occlusion murine model”, *J Pharmacol Sci*, c. 137, sy 2, ss. 129-136, Haz. 2018, doi: 10.1016/j.jphs.2018.06.010.
- [79] Y. Kaneko *vd.*, “Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm’s canal endothelial cells”, *Sci Rep*, c. 6, s. 19640, Oca. 2016, doi: 10.1038/srep19640.
- [80] B. Limratchatamorn, K. Asakawa, K. Mashimo, S. Uga, ve H. Ishikawa, “Effects of 0.4% ripasudil hydrochloride hydrate on morphological changes in rabbit eyes”, *Int J Ophthalmol*, c. 12, sy 10, ss. 1637-1642, 2019, doi: 10.18240/ijo.2019.10.18.