

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA, BEVACİZUMAB'IN RANDOM-PATERN
FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Fuat USLUSOY

UZMANLIK TEZİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ A. D.

DANIŞMAN

Doç. Dr. Turgut ORTAK

ISPARTA- 2011

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA, BEVACİZUMAB'IN RANDOM-PATERN
FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Fuat USLUSOY

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

DANIŞMAN

Doç. Dr. Turgut ORTAK

**“Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 2093-TU-10 proje no.su ile desteklenmiştir”**

ISPARTA- 2011

ÖNSÖZ

Tıp eğitimini de almış bulunduğum SDÜ Tıp Fakültesinde ayrıca Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Uzmanlığı eğitimini tamamlamış olmaktan mutluluk duymaktayım. Maddi ve manevi her türlü desteklerini karşılıksız olarak gördüğüm aileme ve eşime teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimime büyük katkısı olan değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Turgut Ortak ve Yrd. Doç Dr. Ragıp Özdemir'e teşekkür ederim. Çalışmamda deneysel ve bilimsel alanda katkılarını esirgemeyen kıymetli asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmayı destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne, Deney Hayvanları Laboratuvarının yöneticilerine ve teknisyenlere teşekkür ederim.

Dr. Fuat USLUSOY
Şubat 2011, ISPARTA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Derinin Kanlanması	3
2.2. Flep Kan Akımının Düzenlenmesi	4
2.3. Dorsal Deri Fleplerinin Genel Özellikleri	5
2.4. İskemik Önkoşullama (Preconditioning)	7
2.4.1. Cerrahi Yöntemle İskemik Önkoşullama (Flep Geciktirmesi=Delay Fenomeni)	7
2.4.2. Farmakolojik Ajanlarla İskemik Önkoşullama	10
2.5. Yara İyileşmesi İçinde Anjiyogenez	10
2.6. ANJİYOGENEZİS	11
2.6.1. Hipoksi Inducible Faktör-1 (HIF-1)	16
2.6.2. Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)	17
2.6.2.1. VEGF Gen Ailesi	18
2.6.2.2. VEGF Reseptörleri	19
2.6.2.3. VEGF-A İzofomları	22
2.6.2.3.1. VEGF-A Fonksiyonları	23
2.6.3. PLGF (Plasenta Büyüme Faktörü)	24
2.6.4. Anjiyopetinler	25
2.6.5. Eph Reseptörleri ve Ephrinler	27
2.6.6. PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)	28
2.6.7. TGF- β transforme Edici Büyüme Faktörü- β	39

2.6.8. PLGF (Plasenta Büyüme Faktörü).....	30
2.7. ANTIANJİYOGENİK İLAÇLAR ve VEGF İNHİBİSYONU.....	30
2.7.1. VEGFR-2'i Hedef Alan Antikor... ..	32
2.7.2. VEGF Reseptör Kinaz İnhibitörleri.....	32
2.7.3. VEGF'e Yönelik Monoklonal Antikorlar.....	33
2.7.3.1. VEGF-trap.....	33
2.7.3.2. rhuMab VEGF (Bevacizumab, Altuzan®, Avastin®).....	33
3. MATERYAL ve METOD	36
3.1. Deney Hayvanı Modeli	36
3.2. Çalışma Tasarımı.....	36
3.3. İmmunohistokimyasal Boyama İşlemi	42
3.4. Hematoksilen-Eozin Boyama	43
3.5. İstatiksel Değerlendirme.....	44
4. BULGULAR	46
4.1. Flep Sağkalım Bulguları	46
4.2. Neovaskülarizasyonun Değerlendirilmesi İçin Damar Sayımı Bulguları.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	55
ÖZET	64
SUMMARY	65
KAYNAKLAR	66

SİMGELELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

bFGF:	Basic Fibroblast Growth Faktör
VEGF:	Vasküler Endotelyal Growth Faktör
TGF-β:	Transforming Growth Faktör- β
BVZM:	Bevacizumab
rhuMab VEGF:	Bevacizumab
FDA:	Food and Drug Administration
PGF2-α:	Prostaglandin F2- α
PGE1:	Prostaglandin E1
PMNL:	Polimorfonükleer Lökosit
EPH:	Endotelyal progenitör hücreler
ECM :	Ekstraselüler matriks
PA:	Plazminojen aktivatör
MMP:	Matriks metalloproteinaz
HRE:	Hipoxia responce element
HIF-1α:	Hipoksi Inducible Faktör
EPO:	Eritropoetin
PLGF:	Plasental Growth Faktör
SDF-1:	Stromal derived faktör-1
Ang-1:	Angiopoietin-1
TGF-β:	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
VPF:	Vasküler Geçirgenlik Faktörü
VEGFR1 (Flt-1):	VEGF reseptör 1
VEGFR2 (Flk-1/ KDR):	VEGF reseptör 2
VEGFR3:	VEGF reseptör 3
NO:	Nitrik Oksit
FGF-4:	Fibroblast Büyüme Faktörü-4
PDGF:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
TGF-α:	Transforming Growth Faktör- α
IGF-1:	İnsülin Like Growth Faktör-1

TNF-α:	Tümör Nekrozis Faktör- α
EDRF:	Endothelium-derived Relaxing Factor
EPI :	Perisitlerde stoplazmik bağlantılar
Ang:	Anjiopoetin
EGF:	Epidermal Growth Factor
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
IP:	İntraperitoneal
IV:	İntravenöz
H-E:	Hematoksilen-Eozin
HGF:	Hepatosit Growth Factor

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Ratlarda hazırlanan deri ve ada flepleri

Tablo 2: Endojen Anjiyogenik ve Antianjiyogenik Faktörler

Tablo 3: VEGF Reseptörleri

Tablo 4: Endotel Hücreleri Üzerinde VEGF Etkileri

Tablo 5: Klinikte Kullanılan Antianjiyogenik İlaçlar ve Mekanizmaları

Tablo 6: Flep yaşayabilirliği değerlendirilmesinde gruplar ve zaman alt gruplarına deney hayvanlarının dağılımı.

Tablo 7: *Damar sayımı yapılan gruplar ve zaman alt gruplarında deney hayvanlarının dağılımı.*

Tablo 8: Kontrol grubunda flep sağkalım sıklığı ve sağkalan alan oranları

Tablo 9: BVZM grubuna ait flep sağkalım sıklığı ve sağkalan alan oranları bulguları.

Tablo 10: İmmünohistokimya boyama sonrası damar sayımı sonuçları.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Reperfüzyon aşamasında oksijen radikallerinin oluşumu.

Şekil 2: Neovaskülarizasyon mekanizması. Erişkin kan damarları gelişimi *anjyogenez ve vaskülogenezin kombinasyonu ile gerçekleşebilir. (EPH, endotelyal progenitör hücreler)*

Şekil 3: Hipoksi durumunda artan HIF-1 α 'nın regüle ettiği olaylar.

Şekil 4: VEGF Sinyal Mekanizması

Şekil 5: İntravenöz (IV) yol ile BVZM verilmesi.

Şekil 6: Operasyon öncesi sıçanın sırt bölgesinin traş edilmesi (a). İşaretleme ve insizyonların yapılması (b). Kaudal bazlı olarak cilt flebinin kaldırılması (c). Flebin yerine iade edilerek sütüre edilmesi (d).

Şekil 7: Flebin pedikülünün (4. kenarının) kesilmesi (a) ve sütüre edilmesi(b).

Şekil 8: Fleplerin yaşayan alanlarının milimetrik asetat kağıdı ile ölçülmesi.

Şekil 9: İmmünohistokimyasal inceleme için örnek alınması işlemi.

Şekil 10: Histolojik çalışma için flebin lateral kenarlarından 3x10 mm'lik dikiş hattı ortada kalacak şekilde flep ve çevre dokuyu içeren örneklerin alınması. Örneklerden yine dikiş hattı ortada kalacak şekilde çevredeki 3 mm'lik yara dudaklarını içeren 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı.

Şekil 11: Tam flep sağ kalım sıklığının günlere göre analizi.

BVZM grubunun tam flep sağkalımı sıklığı; 2. günde kontrol grubuna göre daha fazladır. 3. günde ise tam flep yaşayabilirliği sağlanmasına rağmen kontrol grubunda ise bu 7. günde oluşabilmiştir.

Şekil 12: Toplam flep sağ kalım sıklığının günlere göre analizi.

BVZM grubunun toplam flep sağkalımı sıklığı; 2. günde kontrol grubuna göre daha fazlaydı.

Şekil 13: Yaşayan flep alanı oranının günlere göre analizi.

BVZM grubunda 4. gün alt grubunda % 76.3 iken 3. gün ve takip eden diğer günlerin hepsinde % 90'ın üzerindeidir. Kontrol grubuna göre yaşayan flep alan oranları daha fazlaydı.

Şekil 14: Fleplerin pedikülünün 2. gün kesilmesinden sonraki 7. günde kontrol grubu (a), BVZM grubu (b), için klinik gözlemler. Kontrol grubunda

fleplerin tamamında total nekroz görülürken BVZM grubunda ise flep yaşayabilirliğinin bariz şekilde artmış olduğu görülmektedir.

Şekil 15: *Fleplerin pedikülünün 3. gün kesilmesinden sonraki 7. günde kontrol grubu (a), BVZM grubu (b)' nun görünüşleri. Kontrol grubunda flep yaşayabilirliği yine kontrol grubunun 2. gününe göre artmış olarak izlenmektedir. BVZM grubundaki flep yaşayabilirliğinin kontrol grubuna göre bariz olarak arttığı görülmektedir*

Şekil 16: *Fleplerin pedikülünün 5. gün kesilmesinden sonraki 7. günde kontrol grubu (a), BVZM grubu (b)' nun görünüşleri. Kontrol grubunda flep yaşayabilirliğinde 3. güne göre artış olduğu, BVZM grubunda ise fleplerin tamamının yaşıyor olduğu ve kontrol grubuna göre artmış olduğu görülmektedir..*

Şekil 17: *Fleplerin pedikülünün 7. gün kesilmesinden sonraki 7. günde kontrol grubu (a), BVZM grubu (b)'nün postoperatif 7. gündeki görünüşleri. Kontrol ve BVZM gruplarında fleplerin tamamının tam olarak yaşadığı görülmektedir.*

Şekil 18: *Kontrol grubu (a), BVZM grubu (b)'na ait flep pediküllerinin kesileceği 2. günde alınan örneklerden hazırlanan CD31 immün boya ile boyanmış kesitlerin ışık mikroskobu altında görüntüsü (x20 büyütme ile). Oklar damarsal yapıları göstermektedir. Damar endotelleri CD31 ile kahverengi olarak boyanmıştır. Damar yapıları içerisinde eritrositler ayırt edilebilmektedir. BVZM grubunda, kontrol grubuna göre damarlanmanın daha yoğun ve damar kalibrasyonlarının daha bariz olduğu görülmektedir.*

Şekil 19: *Kontrol grubu (a), BVZM grubu (b) için fleplerin pediküllerinin kesileceği 2. günde alınan örneklerden hazırlanan Hematoksilen-Eozin boya ile boyanmış kesitlerin, ışık mikroskobu altında görüntüsü (x20 büyütme ile). Damarsal yapılar oklar ile gösterilmektedir. Damar endotelleri Hematoksilen-Eozin boya ile mavi renkli olarak seçilmektedir. Bazı damarların içerisinde eritrositler pembe renkli olarak ayırt edilebilmektedir. Damar yoğunluğunun BVZM grubunda daha yoğun olduğu ve kontrol grubuna göre bariz şekilde fazla olduğu görülmektedir.*

1. GİRİŞ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi'de flep yaşayabilirliğini artırmada kullanılan delay prosedürü'nün temelinde flebin iskemiye alıştırılması yatmaktadır. Cerrahi ve/veya farmakolojik ajanlarla yapılan delay prosedürü sonrası flep ihtiyaç duyulan sahaya aktarılmaktadır. İskemiye alıştırılan flebin aktarılması süresinde ise neovaskülarizasyonun hızı önem taşımaktadır (1). Neovaskülarizasyon olarak isimlendirilen yeni damar oluşumu, doku onarım ve rejenerasyonunda anahtar işlevi olan karmaşık bir süreçtir (2,3). Normal yara iyileşmesinde akut inflamatuvar cevabı izleyen proliferasyon evresi, yaralanmanın 2. veya 3. günü başlayıp yaklaşık 3 haftaya kadar devam eden bir dönemi içerir (4,5,6). Başlıca anjiyogenez, fibroplazi ve epitelizasyon olaylarını içeren bu aşama birtakım sitokinler tarafından düzenlenir. Anjiyogenez, vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonu, ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi, endotel hücre göçü ve kapiller tüp oluşumu olaylarını içerir (6,7,8). Bu süreç; büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks ve hücrel komponentlerin kompleks etkileşimleriyle kontrol edilmektedir ve net sonuç anjiyogenetik ve anjiyostatik elemanlar arasındaki denge tarafından belirlenmektedir (9,10).

Taşımali flep uygulaması gibi uzaktan flep taşıma işlemini flep neovaskülarizasyonu sonrası çevre dokulardan beslenmeye başladıktan sonra pedikülün kesilmesi işlemi takip etmektedir (11). Göz kapağı ve dudak rekonstrüksiyonlarında kullanılan Abbe flebi (12,13), ve burun rekonstrüksiyonunda kullanılan alın flebi (14,15,16,17) gibi uygulamalarda rekonstrüksiyonun tamamlanması neovaskülarizasyonun hız ve yeterliliğine bağlıdır. Neovaskülarizasyonun hızlandırılması için cerrahi ya da farmakolojik delay prosedürleri Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi'de uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Son yıllarda anjiyogenezi uyardığı gözlenen pek çok farmakolojik ajan bu süreçte yerini almaya başlamıştır (VEGF, adenozin vs.). Zhang ve ark. (18) sıçan, pediküllü tüp flep modelinde alıcı alana VEGF'nin subkutan yolla verilmesinin erken pedikül ayrılmasıyla cilt adası yaşamını

artırdığı, alıcı ve donör yatak arasındaki bileşkede anjiyogenezi uyardığını gözlemlemiştir.

Bevacizumab (BVZM) onkolojide antianjiyogenik olarak kullanılan ilk ajandır. Bir rekombinant insan anti-VEGF monoklonal antikoru (rhuMab VEGF) olan BVZM etkisini, anjiyogenez için güçlü bir uyarıcı olan VEGF'nin reseptörüne bağlanmasını engelleyerek gösterir ki, sonuçta damarlanmayı azaltarak tümör büyümesinin yavaşlamasına neden olur (19,20). Bu ajanın tümör dışı normal dokularda yara iyileşme süreci ile ilgili az sayıda çalışma yapılmıştır.

Deri kan akımının çok az bir kısmı derinin beslenmesinde rol aldığı göz önüne alındığında, sistemik olarak verilen ve antianjiyogenezis oluşturma yeteneği olan BVZM'nin deri flebi kan dolaşımına etkisini ortaya koyabilmek için bu çalışmayı planladık.

Bu doğrultuda, 1) BVZM'ın pedikülden beslenmesi ayrılmış olan random-pattern deri flebinde süreye bağlı olarak oluşan neovaskülarizasyon ile flep yaşayabilirliğini etkileyip etkilemediğinin gösterilmesi, 2) Flep yaşayabilirliği üzerinde bir etki gösterilirse, bunun flep insizyon bölgelerindeki mikrodamar histomorfometrisi ile uyumlu olup olmadığının araştırılması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Kanlanması

Cildin mikrovasküler çatısını; arterioller, terminal arterioller, postkapiller venüller, kollektör venüller ve musküler venüller içermektedir (21-24). Derinin kanlanması metabolik ihtiyaçlardan çok termoregülatuar mekanizmalar tarafından kontrol edilir. Derinin damar sistemi sinirsel veya kimyasal uyarana cevap verme yeteneğine sahip zengin bir sinir ağı ile çevrilidir. Arterioller, prekapiller sfinkterler ve arteriyovenöz şantlarda sempatik inervasyon bulunur. Bu şantlar yoluyla kan akımı kapiller yatağı atlar ve bir kapillerden 600 kat fazla kan akımına sahiptir (24,25). Deri kan akımının düzenlenmesinde en önemli etken sinir sistemidir. Damar duvarlarındaki α -adrenerjik ve serotoninerjik reseptörler vazokonstrüksiyon; β -adrenerjik reseptörler ise vazodilatasyona yol açarlar. Sempatik tonusun azalması, özellikle arteriovenöz anastomozlarda belirgin vazodilatasyona, artması da vazokonstrüksiyona neden olur.

Hümorale düzenleme sistemi içerisinde adrenalin, noreadrenalin doğrudan α -adrenerjik reseptörleri etkileyerek vazokonstrüksiyona neden olurlar. Serotonin vazokonstrüktör, histamin ve bradikinin ise vazodilatör etki gösterir. Araşidonik Asit metabolitlerinden Tromboksan A₂ ve PGF₂- α güçlü vazokonstrüktör, PGE₁ vazodilatör etkilidir. Prostaglandin güçlü bir vazodilatör ve trombosit agregasyon inhibitörüdür. Lökotrienlerin deri dolaşımını artırdıkları gösterilmiştir (26).

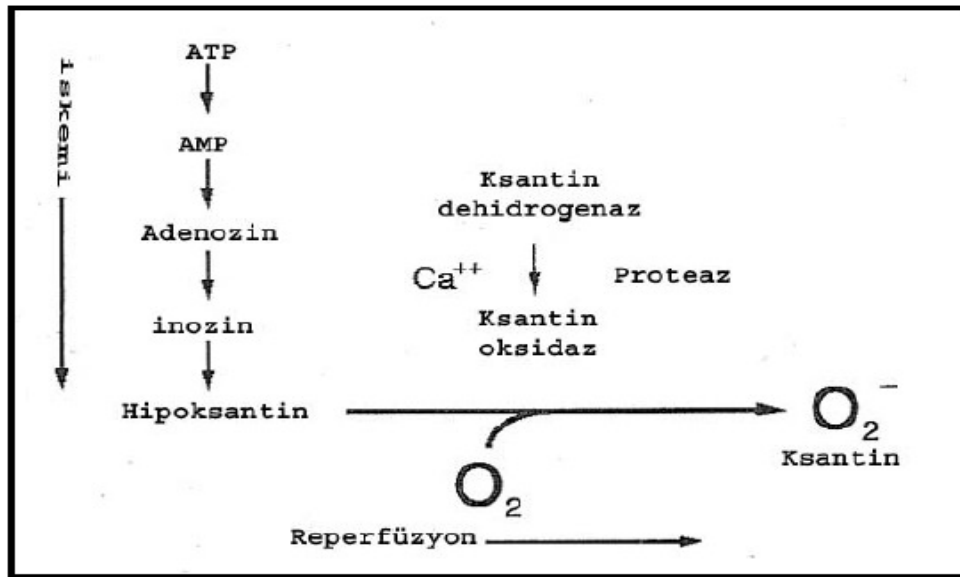
Metabolik düzenleme deride ikinci planda kalsa da hiperkapni, hipoksi, asidoz ve interstisyel potasyum artışı vazodilatasyona neden olur. Perfüzyon basıncının artışı damarlarda gerilmeye yol açarak vazokonstrüksiyonu tetikler. Lokal hipotermi kan akımını azaltır, bu da vazodilatasyonu uyarır. Viskozite ise kan akımını sadece ciddi iskemi durumlarında etkilemektedir (27).

2.2. Flep Kan Akımının Düzenlenmesi

Deri kan akımı esas olarak arterioler seviyede düzenlenir. Sempatik etki; prekapiller sfinkter, arteriol ve arteriovenöz anastomozlarda kan akımını düzenler. Sempatik etki sonrası prekapiller sfinkterin kasılmasıyla kan doğrudan arteriovenöz anastomoza yönelir (28,29).

Flep kaldırılmasını takiben flebin pedikülündeki akım korunsa bile, flebin ucundaki akım, ilk 6-12 saatte normalin %20'sinin altına düşer. İlk 12-18 saat; ilerleyen lökosit aracılı endotel hasarı, sempatik vazokonstrüktörlerin salınımı ve düşen perfüzyon basıncının kombinasyonu nedeniyle, özellikle flep distal kısımlarında akım dramatik olarak düşer. Uç kısmın yaşayabilmesi için yeterli akım, 6-12 saat devam etmelidir. Nörotransmitterlerin 12-24 saatte ortaya çıkması ve flep yatağından 2-3 gün inoskülasyonun gerçekleşmesiyle perfüzyon dereceli olarak düzelir. Uç kısımlar 6-12 saat süreyle ciddi seviyede iskemide kalırsa, akım geri dönmesi reperfüzyon hasarına yol açar, mikro damarlar iflas eder ve doku nekroze olur (35-38).

Flep kaldırıldıktan sonra distal kısımdaki lokal iskemi azami vazodilatasyona yol açar. Proksimal kısımdaki yetersiz perfüzyon basıncı flebin distalinde arteriyel yetersizlik ve kaybına neden olur (28,33). Random ve aksiyel paternli fleplerde hatalı flep planlaması, mikrodolaşımı etkileyen sistemik faktörler (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstrüktörler) veya flep üzerine fiziksel baskı (hatalı yerleştirme, pedikülde katlanma, hematoma) nedeniyle mikrodolaşım düzeyinde düşük akımın gelişmesine ikincil olarak tromboz oluşur (28,34-38). Anaerobik metabolizmayla birlikte toksik süperoksit radikallerin üretiminde artış olur. İskemi sonrası reperfüzyon aşamasında oksijen radikallerin oluşumu Şekil 1'de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 1: Reperfüzyon aşamasında oksijen radikallerinin oluşumu.

Süperoksit radikalleri, endotel ile doğrudan etkileşir ve lipid peroksidasyonu, membran proteinlerinde ayrışma, hücre geçirgenliğinde artış, sitoplazmik şişme ve işlev bozukluğuna yol açar (28,39,40).

Reperfüzyon ile birlikte kaynağı süperoksit radikali olan hidrojen peroksit ve hidrosil radikalleri oluşur. İnvitro ortamda oksijen radikalleri veya endotel hipoksisi nötrofillere etki eden kemotaksise neden olan maddeleri artırır. Böylece inflamatuvar nötrofil göçü artar. Hızlı olarak dolaşımda nötrofil artışı perfüzyonda ani azalmaya neden olmaktadır (41). Reperfüze alana nötrofil göçü olur. Nötrofil bu alanda doku parçalanmasına neden olur (41). Dolaşımdaki PMNL'ler yok edilerek iskemi sonrası reperfüzyon hasarının azaltıldığı bilinmektedir.

2.3. Dorsal Deri Fleplerinin Genel Özellikleri

Sırt bölgesi flepleri öze dönük yamyamlık olarak tanımlanabilecek "otokannibalizm" den korunabildikleri için tercih edilen modeller olmuştur (42). Ratlarda kullanılabilen deri ve ada flepleri Tablo1'de listelenmiştir. Laboratuar sıçanlarındaki ilk flep modeli 1965 yılında McFarlane tarafından ortaya konmuştur (43).

Tablo 1: *Ratlarda hazırlanan deri ve ada flepleri*

Random Deri Flepleri	Ada / Serbest Deri Flepleri
Sırt bölgesi flepleri - Dorsal sefalik - Dorsal kaudal	- Pektoral deri flebi. - Lateral Lomber ada flebi - Toraks arkası ada flebi - Sırt ortası ada flebi - Kasık flebi - Karın flebi - Torakoabdominal flep - Safenöz flep

Orijinal tanımlandığı haliyle tabanda derin kas fasyasına kadar uzanan ve pannikulus karnosus adı verilen tabakanın da flebe dahil olduğu kraniyal bazlı bir fleptir. Flep boyutlarının 10x4 cm olmasına rağmen esas hazırlanışı, flep tabanının skapula açısına denk gelecek şekilde planlanmasıyla ortaya çıkar. Deney esnasında birbirine yakın ağırlık ve boyutta hayvanların kullanılmasına rağmen, her hayvanın boyutu birbirinden farklı olacağından kesin rakamların yerine anatomik işaretlemeler standardizasyon açısından önem taşır (42). Sırt derisinin dolaşımı orta hattın iki yanında birer çift halinde bulunan üç ana damar sisteminden gelir (42). Kraniyalde aksiller arterden çıkan lateral torasik arterin dalı, kaudalde aorttan doğrudan çıkan iliolumber damarların iliak dalı ve ortada kalan bölgede dördüncüden on ikinciye kadar olan interkostal damarların dorsal dallarından gelen dallar sırt derisini kanlandırır.

Delay fenomenini araştırmak amacıyla kullanılan bu flep “random” dolaşım paternine sahip kabul edilmiş ve deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Gerek “delay” fenomeni araştırmaları, gerek flep sağkalımını arttırmaya yönelik araştırmalarda kullanılan sırt flebi, kolay hazırlanabilir oluşu ve distalde belli bir oranda nekroz alanını bulundurması nedeni ile sıkça tercih edilir.

2.4. İskemik Önkoşullama (Preconditioning):

Flep cerrahisinde, cerrahi prosedür ya da farmakolojik ajanlar neovaskülarizasyonun hızlandırılması için kullanılan yöntemlerdir.

2.4.1. Cerrahi Yöntemle İskemik Önkoşullama (Flep Geciktirmesi=Delay Fenomeni)

Bir flebin elevasyon ve transferinden önce ayrı seanslarda mekanik ve/veya cerrahi işlemlere yönelik kan akımı azaltılarak flep yaşayabilirliğinin artırılmasına "cerrahi delay prosedürü" denir. Bu işlem sonrasında elde edilen kazanç "delay fenomeni" olarak adlandırılır (44). Böylece, flebin tamamı akut olarak kaldırıldığında oluşması beklenen distal nekrozun, bu yöntem sonrasında, flebin tamamı kaldırıldığında oluşmadığı gösterilmiştir.

Bu yöntem sayesinde, flebin damarsal pedikülünün flep distaline ulaşımını artırarak distalde daha fazla yaşayabilen random cilt adasının elde edilmesi sağlanır.

Cerrahi flep geciktirmesi ilk kez 16. yüzyılda Tagliacozzi tarafından koldan kaldırılıp burun rekonstrüksiyonunda kullanılan deri flebinde kullanılmıştır (45). Blair, 1921'de bu girişimi "delay transferi" olarak tanımlamıştır (46). Milton, 1965'de flepte 4 farklı delay yönteminin karşılaştırmalı çalışmasını yapmış ve en etkili yöntemin cilt insizyonları arasında flep altının tabandan ayrılmasıyla uygulanan delay olduğunu belirtmiştir (47). Delay tanımlanması ise 1967 yılında Myers ve Chery tarafından yapılmıştır. Myers 1967'de tavşanlarda bipedikül deri flebi modelinde geciktirme yöntemini uygulamış, geciktirme yönteminin, random-pattern fleplerin boy-en oranını arttırdığı, aksiyel fleplerde daha fazla miktarlarda doku transferini mümkün kıldığını belirtmiştir (48-51). Klasik cerrahi geciktirme tekniği flep kaldırılacak alana yapılan iki adet paralel insizyonla yapılması gerektiği savunulmuştur. Callegari, 1992'de yaptığı

çalışma sonucuna göre fleplerdeki cerrahi geciktirme uygulama esaslarını belirtmiştir (50).

- Flebin yaşayabilen uzunluğu perforatörler arasındaki uzunluğa bağlıdır.

- Nekroz bölgesi genellikle "choke" damarların komşu bölge ile yaptıkları anastomoz hattındadır.

- Geciktirme, mevcut damarlarda dilatasyona neden olur ve bu etki komşu anjiozomları birbirine bağlayan "choke arter" lerin bulunduğu bölgede maksimumdur.

- En etkin geciktirme işlemi flebin basamaklar halinde elevasyonu ile elde edilir.

- Doku genişletme işlemi bir tür cerrahi geciktirmedir.

- Benzer değişiklikler kas delay işleminde de görülür.

Geciktirme yöntemi (delay fenomeni) birçok teoriyle açıklanmaya çalışılmıştır. İskemiye tolerans teorisinde random-patern deri flebinin periferinde kan akımı kesildiğinde flep pedikülünün aksı boyunca kan akımının güçlendiği ve delay prosedürü sonrasında hücrelerin hipoksik ortama alışmış olduğu, böylece asıl operasyondan sonra doku nekrozunun azaldığı belirtilmektedir (52,53).

Sempatektomiye bağlı vazodilatasyon teorisinde prosedür esnasında yapılan kesi sayesinde sempatik lifler flebin sınırından kesilmiş olduğundan vazodilatasyon oluştuğu ve kan desteğinin arttığı belirtilmektedir. Flep içine şant hipotezi, insizyonlar sonrası oluşan sempatektominin A-V anastomozları prekapiller sfinkterlerden daha fazla dilate ettiği varsayımına dayanır. Kapiller yatak "bypass" edilerek sonuçta besleyici olmayan kan akımı artar. Böylece oluşan iskemik duruma doku alışır (54).

Hiperadrenerjik durum teorisine göre cerrahi sonrası adrenalin ve noradrenalin gibi vazokonstrüktör ajanların doku konsantrasyonları artar. Geciktirme prosedüründen sonra kan desteği azalır, fakat doku nekrozuna yol açacak ölçüde değildir. İkinci prosedür öncesine kadar vazokonstriktör maddelerin seviyesi normale döner. İkinci prosedürde vazokonstriktör

maddelerdeki yükselme, geciktirmesiz kaldırılan fleplerdeki kadar değildir. Bu yüzden geciktirme yapılan fleplerde distal nekroz gelişimi daha azdır (54).

Delay edilmiş bir flepteki dolaşım değişikliklerinin zamana göre saptanan bulguları şunlardır.

- İlk 24 saat: Arteriyel kan akımında azalma, arteriyel ve kapillerler de belirgin dilatasyon

- 1-3 gün: Longitudinal anastomozların genişlik ve sayısında artışla birlikte pedikül içindeki küçük damarların artması

- 3-7 gün: Fonksiyon gören damarların çapı ve sayısında artış. Flebin uzun eksen boyunca damarların reoryantasyonu

- 7-14 gün: Flep ile yatak arasında dolaşımın sağlanması, vaskülarite artışının durması

- 14-21 gün: Vasküler sistemde ilerleyici regresyon. Flep ve yatak arasındaki anastomozların olgunlaşması

- 21 gün sonrası: Flep dolaşımı olması gerekenin % 90'ına ulaşmıştır.

Yapılan araştırmalarda vasküler pedikülün ligasyonu veya embolizasyonu, flep alanı çevresine sütür atma, flep alanına çeşitli sistemik ve topikal kimyasal ajanlar uygulama, lazer gibi çeşitli yöntemler denenmiştir (55,56).

Fleplerdeki geciktirme işlemi sonrası oluşan mikroanjiyografik çalışmalar insanlarda, domuzlarda, tavşanlarda, köpeklerde gösterilmiştir. Geciktirme işleminin zamanlamasına ait bilgiler farklılık gösterebilmektedir. 5'nci günden, 3-4 haftaya kadar olan zaman aralığında uygulanabileceği bildirilmiştir (57). Callegari ve Taylor ise çalışmalarında standart bir geciktirmenin 5'nci günde yapılmasının uygun olacağını savunmuşlardır (58,59). Fisher, deneysel çalışmalarında bu işlemi takiben 7 gün sonrasında kanlanmanın artışının en üst seviyeye ulaştığı göstermiştir (60).

2.4.2. Farmakolojik Ajanlarla İskemik Önkoşullama

Flep yaşam oranlarının arttırılması için kullanılabilir bir yöntem, farmakolojik iskemik önkoşullama yöntemidir. İlk olarak Murry ve ark. (61), subletal dozda iskemiye uğratılan dokunun daha sonraki letal olabilecek iskemik duruma karşı koruyucu etkisini myokard kasında göstermişlerdir. Koruyucu etki adenozin ve opioidler gibi inhibitör G proteinlerinin reseptör bağımlı stimülasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır (62). Adenozin (63), monofosforil lipid (64) ve dexamethazone (65) kullanılarak gerçekleştirilen iskemik ön koşullanmanın Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi'ye uyarlanması ise serbest ve pediküllü fleplerin proksimal pedikülünün geçici klempenmesi ile flep yaşam oranlarının arttırılması şeklinde ortaya çıkmıştır (63).

Genel olarak sempatotikler, vazodilatörler, kalsiyum kanal blokerleri, prostoglandin inhibitörleri, antikoagülanlar, glukokortikoidler ve serbest radikal önleyiciler bu grupta yer alırlar (66-72). Son zamanlarda anjiyogenik tedavi ve büyüme faktörleri de kullanılmaya başlanmıştır (73-78). Bu ajanlar belirli bir noktaya kadar flep sağ kalımını arttırmış olsa da sistemik olarak verilmesi, istenilen etkiyi ortaya koymak için yüksek doz kullanma zorunluluğu ve sistemik yan etkileri, kullanımlarını kısıtlamaktadır (79). Rohrich (80) flep sağ kalımlarının arttırılmasında kullanılabilir farmakolojik ajanların özelliklerini; "kolay bulunmalı, kolay uygulanabilmeli, yüksek güvenilirliğe sahip olmalı, tekrar uygulamalarda aynı sonuçları doğurmalı, pahalı olmamalı, etki mekanizması biliniyor olmalı ve nekroz oranlarında azalma göstermeli" şeklinde özetlemiştir.

2.5. Yara İyileşmesi İçinde Anjiyogenez

Doku yaralanmasına akut cevap niteliğindeki yara iyileşmesinin hemostatik ve inflamatuvar evrelerinden sonra daha uzun bir süreç olan

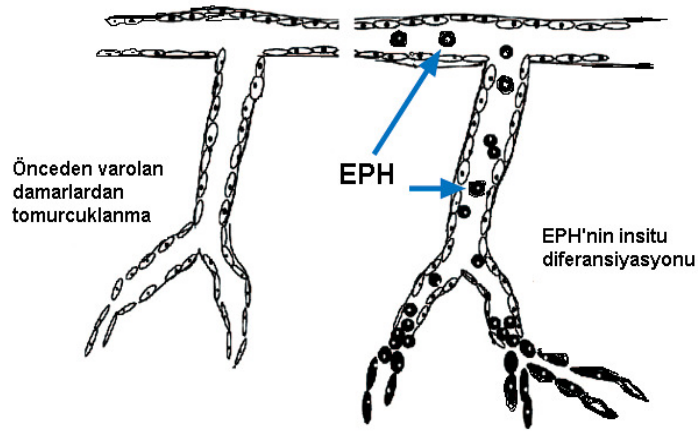
proliferatif evre devreye girer. Proliferasyon evresi yaralanmadan sonraki iki ile üçüncü gün arasında başlayarak, ortalama olarak 3 haftada sonlanır.

Yara iyileşmesinin bu anabolik fazının en önemli temel basamakları epitelizasyon, anjiyogenezis ve fibroplazidir. Bu alt fazlar bir öncelik sırası olmaksızın iç içe gelişir ve her biri bir diğerinin indikatörüdür (81-86).

2.6. ANJİYOGENEZİS

Anjiyogenezis önceden var olan kan damarlarından yeni kapiller kan damarlarının gelişmesi olarak tanımlanır (2,3). Fizyolojik anjiyogenez, embriyonun gelişmesi ve büyümesi, yara iyileşmesi ve iskemik dokuların revaskülarizasyonunda kritik bir rol oynarken, patolojik anjiyogenez, kanser, ateroskleroz, romatoid artrit, bazı göz hastalıkları gibi pek çok hastalıklar ve oküler neovaskülarizasyonla birlikte olabilir (87).

Kan damarlarının oluşum süreci, vaskülogenez ve anjiyogenez olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir. Vaskülogenez daha önce avasküler olan dokunun ilk kez damarlanması süreci iken, anjiyogenez mevcut damarlardan yeni damarların oluşması sürecidir (88). Primordial damarsal sistemin gelişimi vaskülogenezis olarak tanımlanır ve endotelial progenitor hücrelerin (anjiyoblastlar), embriyonik ve embriyo dışı mezoderm içerisinde, ilkel damarsal ağı oluşturmak üzere farklılaşmasını kapsar. Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi anlamına gelen anjiyogenez, vücutta fizyolojik sürecin bir parçası olabildiği gibi, patolojik süreçlerin bir parçası olarak da gerçekleşebilir (89). Vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizması Şekil 2'de şematize edilmiştir.



Şekil 2: Neovaskülarizasyon mekanizması. Erişkin kan damarları gelişimi anjiyogenez ve vaskülogenezin kombinasyonu ile gerçekleşebilir. (EPH, endotelial progenitör hücreler)

Anjiyogenez, vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonu, ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi, endotel hücre göçü ve kapiller tüp oluşumu ile meydana gelmektedir. Bu süreç, büyüme faktörleri, ekstrasellüler matriks ve hücrel komponentlerin kompleks etkileşimleriyle kontrol edilmektedir ve net sonuç anjiyogenetik ve anjiyostatik elemanlar oranındaki denge tarafından belirlenmektedir (9).

Anjiyogenezin ilk basamağı damarlarda dilatasyon ve permeabilite artışıdır. Çevredeki matriksin degradasyon ile birlikte endotel hücreleri göç etmek ve tüpler oluşturmak üzere aktifleşir ve çoğalırlar (10). Takiben matürasyon ve yeniden şekillenme fazı ile birlikte yeni bir damar ağı oluşur. Endotel hücre göçü ve invazyonu ürokinaz tip plazminojen aktivatörü, matriks metalloproteinazları ve muhtemelen sistein proteinaz sistemlerinin ortak aktivitesini gerektirir (8).

Proteaz genlerinin ekspresyonu sitokinler, fibroblast büyüme faktörü ve VEGF-A gibi anjiyogenetik faktörlerle artarken proteoliz artışı bir taraftan proproteinazların aktive olmasıyla, diğer taraftan plazminojen aktivatörü inhibitörleri, metalloproteinaz doku inhibitörleri ve sistatinlerin down regülasyonu ile sağlanır. Aktive olmuş endotel hücreleri, avb3 gibi anjiyonezi artıran integrinlerin salınımını artırarak yıkılmış olan matriks içinde yayılır ve daha sonra çoğalmaya başlar. Takiben yeni oluşmuş

kapillerlerin endotel hücreleri yeni bazal membran sentezler. Yeni kapillerlerin sağlamlığını ise perisit ve düz kas hücrelerinin sağladığı düşünülmektedir (90). Bu süreç platelet kaynaklı büyüme faktörü tarafından düzenlenmektedir (91).

Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenez süreci içinde yer alan temel hücredir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarlarını oluştururlar ve ana damarları, dalları ve kapiller ağı oluşturucu genetik bilgileri içerirler (92,93).

Yara yatağı içine kapillerlerin göçü, kusursuz yara iyileşmesi için esastır. Hasarlı doku kapillerlere muhtaçtır. Çünkü yeni kapillerler yaraya besinleri ve oksijeni götürerek granülasyon dokunun sürdürülmesine yardımcı olur. Bundan dolayı kronik olarak iyileşmeyen yaralarda meydana gelen anjiyogenez büyük ihtimalle başarısızdır (81,93, 94,95).

Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstrasellüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynar. Henüz tüm anjiyogenik etkileşimlerin niteliği açıklığa kavuşmamıştır. En büyük olasılık anjiyogenik uyarıcılar ve anjiyogenez inhibitörleri arasındaki dengenin, normalde damarsal bileşenlerin sessiz halde kalmalarını sağlıyor olmasıdır. Anjiyogenik uyarıcıların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalması anjiyogenezi başlatmaktadır (87).

Yeni damar oluşumu aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir:

1. Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması,
2. Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü,
3. Tübül oluşumu ve olgunlaşması, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi (87).

1. Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkılması

Anjiyogenez süreci damar endotelini döşeyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan oluşan bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlar. Endotel hücreleri göç etmek ve

çoğalmak üzere uyarıldığında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka oluştururlar. Ancak anjiyogenez sırasında çoğalıp yayılma gösterirler (87).

Normal, hastalıklı ya da hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Anjiyogenik büyüme faktörleri, yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenlerinin yıkımına neden olur. ECM'in enzimatik yıkılmasını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler (87).

Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metalloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirir. ECM bileşenlerinin yıkılması ve MMP-1, MMP-3, MMP-9, elastaz gibi matriks metalloproteinazlarının aktivasyonu da plazminin işlevleri arasındadır (87).

2. Endotel Hücrelerinin Göçü ve Çoğalma

Anjiyogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive eder. Endotel hücreleri ekstrasellüler matrikse göç eder ve çoğalır. Bu süreçte en etkili anjiyogenik faktör vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'dür. Endotel hücreleri daha sonra sağlam bölgedeki kapillerler ile birleşerek yara bölgesinde kapiller ağ oluştururlar (87, 96).

3. Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması

Endotel hücre çoğalmasından sonra ECM bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstrasellüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme oluştuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. Bazal membranın yıkılması endotel hücre göçüne ve filiz oluşumuna izin verir. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi

ve hücreler arası boşlukta, sonunda kendilerinden damarların oluştuğu lümenler gelişir. Böylece, ekstrasellüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar. Bu nedenle, endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ECM'e tutunma gereksinimi vardır. İntegrinler gibi membran proteinleri de bu süreç içinde yer alır ve endotel hücrelerinin birbirine ve ECM'ye tutunmalarına yardımcı olurlar, böylece yeni kapillerler oluşur (87).

Damar olgunlaştıktan ve uygun anjiyogenez ortaya çıktıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece ECM'in proteolitik yıkımı inhibe olur ve yeni oluşmuş kapillerler etrafında matriks bileşenleri sentez edilir, endotel hücreleri sessiz bir hale bürünür ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olur (87). Endojen anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler Tablo 2'de gösterilmektedir.

Çok aşamalı anjiyogenez, pozitif ve negatif etkili birçok dinamik faktörün etkisi ile dengededir.

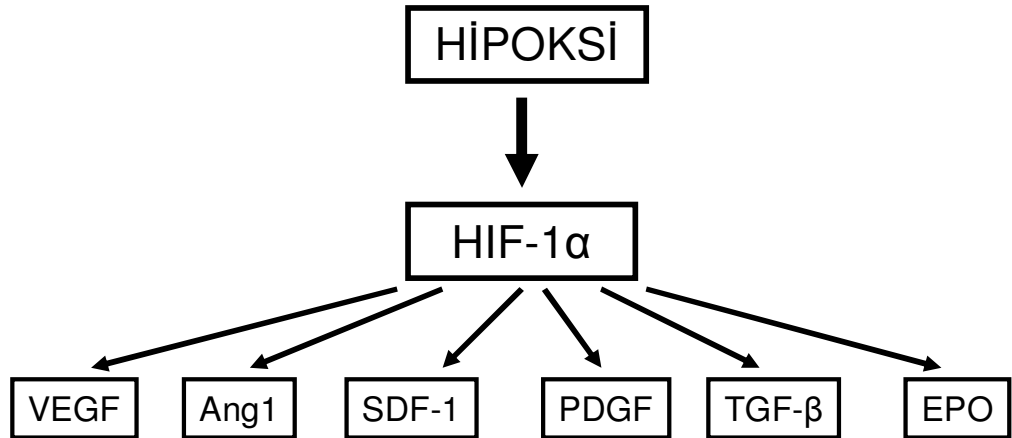
Tablo 2: Endojen anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler (97).

Anjiyogenik Faktörler	Antianjiyogenik Faktörler
VEGF	Trombospondin-1 ve 2
bFGF	Endostatin
TGF- α ve β	Angiostatin
PDGF	İnterferon-alfa ve beta
HGF/SF	İnterlökin-12
TNF-alfa	Platelet Faktör-4 fragmanı
EGF'ler	Angiopoietin-2
Plasental Büyüme Faktörü	İnsan Makrofaj Metalloelastazı
Doku Faktörü	TIMP-1 ve 2
IL-6 ve IL-8	VEGF İnhibitörü
Angiogenin	Vasostatin
Angiopoietin-1	Antithrombin-3 fragmanı
Siklooksijenaz-2 (COX-2)	
Nitrik Oksit (NO)	

2.6.1. Hipoksi Inducible Faktör-1 (HIF-1)

Hipokside anahtar transkripsiyon faktörü HIF-1 α 'dır. HIF-1 hipoxia response element (HRE) tanımlanmasıyla keşfedildi (98). Devam eden çalışmalar hipoksik koşullar altında HRE'ye bağlanan proteini HIF-1 olarak ortaya koymuştur. Bu heterodimerik kompleks hipoksik olarak uyarılabilen HIF-1 α subuniti ve sürekli eksprese edilen subunit HIF-1 β 'dan oluşmaktadır (98,99). Vihanto ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, segmental hipoksik flep modelinde hipoksik maruziyetten 6 saat sonra HIF-1 α mRNA seviyelerinin maksimuma ulaştığı görülmüş. Hipoksi maruziyetinden 24 saat sonra ise immünfloresan çalışmalarda, normal ciltte herhangi bir boyanma görülmezken, hipoksik alanda endotelial ve eşlik eden hücrelerde HIF-1 α 'nın güçlü bir şekilde biriktiği görülmüş (100). Hipoksik koşullar altında, HIF-1 α tarafından anjiyogenez, eritropoez ve glukoz metabolizmasında rol oynayan VEGF, eritropoetin(EPO) ve glikolitik enzimler gibi genlerin ekspresyonu uyarılmaktadır. EPO'nun ekspresyonunun artması eritrosit oluşumunu artırarak dokulara oksijen gönderilmesini artırır. Hipoksi, transferrini artırarak hücrelere Fe⁺³ transportunu artırır; yine HIF-1 α uyarısıyla VEGF ve diğer proanjiyogenik faktörler vasküler dansitede artış ve oksijen difüzyon uzaklığında azalmaya neden olur. Ek olarak HIF-1 α nitrik oksit sentaz (101), hemoksijenaz (102), endotelin-1 (103), adrenomedulin (104) ve α 1B adrenerjik reseptör (102) gibi vasküler tonus üzerinde etkili genleri regüle eder. HIF aktivitesinin aktivasyonu organ ve doku hasarına cevapta pozitif rol oynadığı iskemik, hipoksik ve inflamatuvar durumlara fizyolojik yanıtları geniş bir aralıkta gösterilmiştir. Örneğin, HIF-1 α ve VEGF akut koroner arter tıkanıklığı olan hastaların miyokardiyumunda artmış olarak gösterilmiş (105). HIF-1 α ekspresyonu ve HIF ile uyarılan genlerin artışı rat ve koyun miyokardiyal ve serebral iskemi modellerinde gözlenmiştir (106). Kely ve ark.'nın (107) yaptığı çalışmada HIF aktivitesi; kardiyak miyositler, kardiyak fibroblastlar ve kardiyak endotelial hücrelerde VEGF, anjiyopoetin ve PIGF(Plasental Growth Faktör) seviyelerini artırmış. Yara iyileşmesinde

fibroblast ve endotelial hücrelerde HIF aktivitesi, doku onarımına yardım için, yaralanma bölgesine progenitör hücrelerin yerleşmesinde önemli rol almaktadır (108-110). Periferik dokuların çoğunda hipoksiye cevap neovaskülarizasyon yoluyla hipoksik bölgeye lokal oksijen ve besin gönderilmesini sağlamak için HIF tarafından yürütülür (111-115). Bu transkripsiyon faktörü metabolik aktivite artışı, antioksidan üretimi, ve apoptozun modüle edilmesiyle hücresel proliferasyonunu artırma fonksiyonuna sahiptir (116). Hipoksida HIF-1 α 'nın regüle ettiği olaylar şematik olarak Şekil 3'te gösterilmiştir. HIF-1 α , iskemi bölgesine dolaşımdaki vasküler progenitör hücrelerin yerleşmesinde etkili major sitokin olan stromal derived faktör-1 (SDF-1)'i uyarır. Yeni damar oluşumunu ve remodelingi uyaran büyüme faktörü olan Angiopietin-1 (Ang-1) de HIF-1 α ile uyarılır. PDGF immatür vasküler progenitör hücrelerin matür yeni damarlara proliferasyonunda major stimülatör rol oynar. TGF- β yeni damarların gelişimini, morfogenezi ve proliferasyonu regüle eden anahtar bir sitokindir (116).



Şekil 3: Hipoksi durumunda artan HIF-1 α 'nın regüle ettiği olaylar.

2.6.2. Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)

VEGF, damar endotel hücrelerine özgü homodimer glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. VEGF-A, vasküler

endotelyum için yaşamsal öneme sahip 43-46 kDa ağırlığında bir glikoproteindir (117,118). VEGF terimi yedi proteinden oluşan bir büyüme faktörü ailesini ifade etmektedir: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve PlGF (Plasental Büyüme Faktörü).

İlk olarak 1983 yılında Senger, deneysel kobay tümörünün yol açtığı batındaki asit sıvısından damar geçirgenliğini artırıcı faktör (VPF) denilen bir protein izole ederek saflaştırmıştır (119). 1989 yılında Ferrara ve Henzel, ayrı bir çalışmada, endotel hücrelerine özgün bir mitojen bulmuşlar ve adına "vasküler endotel büyüme faktörü" demişlerdir. Güçlü bir in vitro endotel hücre büyüme stimülatörü ve in vivo neovaskülarizasyon stimülatörü olduğu gösterilmiştir (120). Daha sonra yapılan dizilim çalışmalarında Connolly, VEGF ve VPF'nin aynı protein olduğunu göstermiştir (121).

Vasküler geçirgenlikte histaminden 50.000 kat daha güçlü olduğu saptanmıştır.

2.6.2.1. VEGF Gen Ailesi

VEGF gen ailesi içinde 7 VEGF üyesi tanımlanmıştır. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve PlGF'den oluşur. Temel olarak anjiyogenez, lenfanjiyogenez ve damar geçirgenliğini düzenleyen bu faktörlerin tanımlanan VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır. Üç farklı transmembran tirozin kinaz reseptörüne (VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3) bağlanarak biyolojik fonksiyonlarını gösterirler. Bunlardan VEGFR-1 ve -2 endotel hücreleri üzerinde, VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (122,123,124).

VEGF-A; anjiyogenezle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan faktördür. Anti-VEGF tedavilerin çoğu bu faktör üzerinde yoğunlaşmaktadır (125). Genellikle VEGF diye kısaca ifade edilen faktör aslında VEGF-A'dır. VEGFR1 ve VEGFR2 yoluyla etki eder ve hipoksi ile aktive olduğu gösterilen tek VEGF üyesidir.

VEGF-B; VEGFR1'e bağlanarak etki eder. Hücre dışı matriks degradasyonu, hücre adezyonu ve göçünde rol oynar. Kalp, iskelet kası ve pankreasta fazla miktarda bulunur, endotel hücre fonksiyonunu düzenler (125).

VEGF-C ve VEGF-D; VEGFR1 ve VEGFR2'e bağlanarak lenfanjiyogenezi düzenler. VEGF-C ayrıca yara iyileşmesinde rol oynar (123).

VEGF-E ve VEGF-F; VEGF-A'nın insanlar dışındaki canlılardaki homologlarıdır (125). VEGF-E yapısal olarak VEGF-A'ya benzeyen viral homoloğudur (126).

Plasental büyüme faktörü; VEGFR1'e bağlanır ve endotel hücrelerinde en çok bulunan VEGF üyesidir. VEGF-A'ya bağlı endotel hücre çoğalmasını indükler ve kendi başına zayıf mitojenik etkilidir (123,127).

2.6.2.2. VEGF Reseptörleri

VEGF reseptörleri ilk olarak endotel hücrelerinde saptanmıştır (124). VEGF hücre dışına salgılanarak 3 tirozin kinaz, 2 nörofilin reseptörüne bağlanır (120,121,124).

VEGF reseptör 1 (VEGFR1) (Flt-1), pozitif ve negatif anjiyogenik etkisi vardır (128). Endotel hücreleri dışında monositler, osteoblastlar, makrofajlar, perisitler, hemopoetik kök hücreleri, damar düz kas hücreleri ve kolorektal tümör hücrelerinde bulunur (124).

VEGFR2 (Flk-1/ KDR), VEGF-A'nın mitojenik, anjiyogenik ve vasküler geçirgenlik artışı etkilerinden sorumludur. Endotel hücre büyümesi, farklılaşması, göçü ve tübül oluşumunu düzenler (128). Endotel hücrelerine ek olarak hemopoetik kök hücrelerde, megakaryositlerde, retina prekürsör hücrelerinde, damar düz kas hücrelerinde, bazı tümör hücrelerinde (küçük hücreli olmayan akciğer tümörleri, nöroblastom, meme ve mide kanserlerinde) bulunur (124).

VEGFR3, lenfatik damarlarda anjiyogenik etkiden sorumludur (127).

Nörofilin-1, VEGF165'in VEGFR2'ye ilgisini ve bu faktöre bağlı kemotaksisini artırır (125). Endotel, nöron ve tümör hücrelerinde bulunur (124,129).

Nörofilin-2, VEGF165 ile birlikte VEGF145'i ve plesental büyüme faktörünü de bağlar (124).

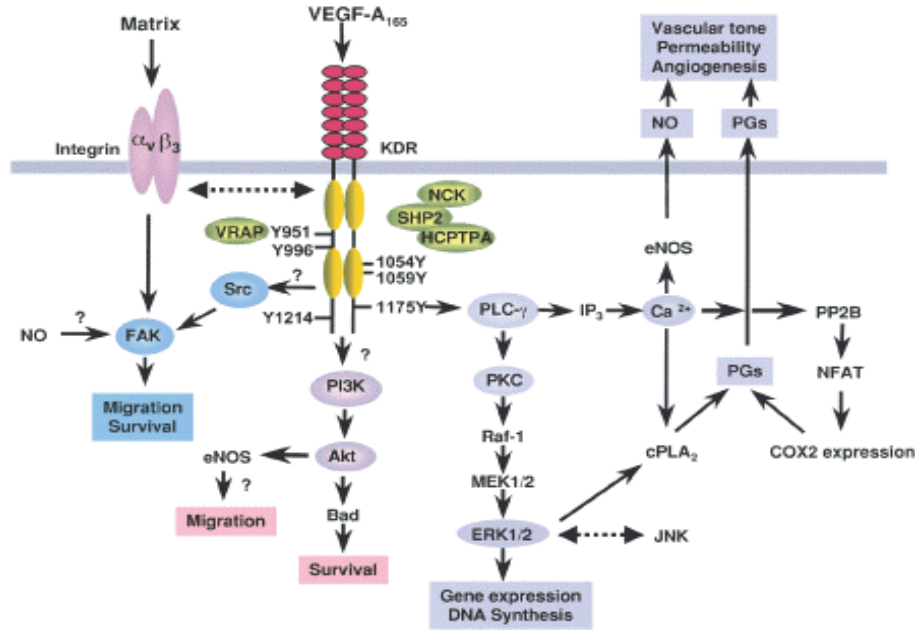
VEGF-A'nın hücre yüzeyindeki bağlantı noktaları ise VEGFR-1 (Flt-1 ya da fms-benzeri tirozin kinaz), VEGF-R2 (Flk-1/KDR ya da fetal liver kinaz), VEGF-R3 (flt-4) ile nörofilin-1 ve nörofilin-2 koreseptörleridir. VEGF reseptörleri ve etkileri Tablo 3'te gösterilmektedir.

VEGFR-1 ve VEGFR-2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (130,131).

Tüm bu reseptörler endotel hücrelerinde transmembran proteini olarak bulunurlar ve VEGF eksprese eden hücrelerle yakın komşuluk gösterirler. Bu komşuluk VEGF'ün jukstakrin/parakrin sinyal mekanizmasıyla çalıştığını düşündürmektedir (132). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve *ras* GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlar (133). VEGF sinyal mekanizması Şekil 4'te şematize edilmiştir.

Tablo 3: VEGF Reseptörleri.

Reseptör	Etki
VEGFR-1	Gelişimsel (embriyojenik) anjiyogenezi uyarır
VEGFR-2	Proliferasyon Migrasyon Sağkalım Anjiyogenez
VEGFR-3	Lenfanjiyogenezi başlatır



Şekil 4: VEGF sinyal mekanizması.

Nitrik oksit (NO) ise anjiyogenezin VEGF-bağımlı bir mediyatördür. VEGF'in NO sentez enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO endotel hücre migrasyonunda rol alır (134,135). VEGF düzeyi, başta RAS, SRC ve HER-2 onkogenleri olmak üzere, p53 gen mutasyonu, IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- α , IGF-1, TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır. Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (111).

Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiyogenik faktör olma özelliği yanında, VEGF'ye maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında pencere, veziküler organeller ve transsellüler aralık oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırır (136).

VEGF, endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanı sıra, hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile ürokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (137).

Serumda fizyolojik düzeyde VEGF bulunmasının vasküler endotelial hücre homeostazı için çok önemli olduğu düşünülmektedir (138).

VEGF, endotel hücresinde nitrik oksit (NO) ve vazodilatatör prostasiklinleri indükleyerek vasküler tonusu ve buna bağlı olarak kan basıncını düşürür. VEGF'ün reseptörüne bağlanması endotel hücresinde sitozolik kalsiyum artışına yol açar. Bu kalsiyum artışının tetiklediği EDRF (endothelium-derived relaxing factor) ve NO salınımı vazodilatasyon ve vasküler tonusta düşme ile sonuçlanır. VEGF'nin vasküler endotel üzerine olan etkileri Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4: Endotel hücreleri üzerinde VEGF'nin etkileri.

Fonksiyon	Mekanizma
Proliferasyon	Mitojen-bağımlı protein kinaz aktivasyonu
Geçirgenlik	Vezikovasküler organeller Endotelyal fenestrasyonlar Bitişik endotel hücreleri arasındaki bağlantıların açılması
İnvazyon	Metalloproteinazlar uPA, uPAR, TTPA'nın indüksiyonu
Migrasyon	FAK, p38 ve nitrik oksit aktivasyonu
Sağkalım	P13K/Akt, Bcl2, A1, Survivin, XIAP ya da FAK indüksiyonu Karpazların inhibisyonu
Aktivasyon	İntegrin ekspresyonunun up-regülasyonu Hücre sitoskeletonunun değişmesi

2.6.2.3. VEGF-A İzofomları

VEGF-A 36-46 kD ağırlığında bir glikoproteindir ve fizyolojik olarak menstrüel siklusta, embriyo gelişiminde ve yara iyileşmesinde etkilidir. VEGF-A'nın insanlarda tanımlanan 9 izoformu vardır. VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF162, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189, VEGF206. Bu izoformlar içinde VEGF165b, diğerlerinden farklı olarak endojen inhibitördür ve VEGFR2 üzerinden etkilidir (139). En çok bilinen major izoformlar VEGF121, VEGF165, VEGF189, VEGF206'dır (140,141). VEGF-A izoformlarının içerdikleri aminoasit sayıları ve heparine bağlanma özellikleri farklıdır. İzofomlar içerdikleri aminoasit sayılarıyla numaralandırılır (142).

VEGF165 ve daha büyük izoformlar reseptör bağlayıcı bölge ve heparin bağlayıcı bölge içerirken daha küçük diffüze olabilen izoformlar, heparine bağlanmazlar, sadece reseptör bağlayıcı bölge içerirler. Büyük izoformlar (Örn: VEGF189, VEGF206) heparin bağlayıcı bölge ile hücre dışı matrikse bağlanırlar ve depo izoform olarak adlandırılır (143). VEGF165 ise ara bölgededir, hem diffüze olabilir hem de kısmen hücre dışı matrikse bağlanabilir. Çalışmalar en çok bulunan ve anjiyogenezde ana rolü oynayan izoformun VEGF165 olduğunu göstermektedir.

En küçük izoform olan VEGF121 heparine bağlanmadığı için hücre yüzeyinde ve bazal membranlarda yer alır ve diffüze olabilir (139). Biyolojik aktivitesi VEGF165'e göre daha azdır (144).

Heparine bağlanan VEGF-A izoformları plazmin gibi preteolitik enzimlerle hızla parçalanır. Bu nedenle, hücre dışı proteolizin, VEGF biyoyararlanımını düzenlemede önemli rol oynadığı düşünülmektedir (139).

Plazmin etkisiyle VEGF121 dışındaki izoformlar daha küçük olan VEGF110'a dönüşürler (143). VEGF110 endotel hücre büyümesini uyarır ve damar geçirgenliğini artırır. Mitojenik aktivitesi VEGF165'den daha azdır. Farelerde 3 değişik izoform saptanmıştır. VEGF120, VEGF164, VEGF188. Bu izoformların insanlardaki eşdeğerleri sırasıyla VEGF121, VEGF165, VEGF189'dur (123).

2.6.2.3.1. VEGF–A Fonksiyonları

- Vaskülogenez, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezini düzenler (166,143).
- VEGF-A, yara iyileşmesi süresince anjiyogenezis ve vaskülogenezisin majör regülatörü olarak tanınır (147).
- Damar geçirgenliğinde artış, lökostaza neden olur (145).
- Endotel hücrelerinin büyüme ve farklılaşması için gereklidir. Ayrıca monositler için kemotaktiktir.
- Endotel hücrelerinde apoptozisi engelleyerek hücre devamlılığını sağlar (147).
- Nöron koruyucu etkileri vardır (145). VEGF'in inaktive edildiği farelerde

nörodejeneratif hastalık gelişmesi, hipoksi ile indüklenen VEGF'in nöron koruyucu etkisinin olduğunu düşündürmektedir (146).

-Pro-inflamatuar etkilidir. VEGF lökositlere bağlanabilir. VEGF reseptörleri inflamatuvar hücrelerde ve trombositlerde gösterilmiştir (147).

Diğer büyüme faktörleriyle karşılaştırıldığında, VEGF çok etkili ve uzun vadeli olarak anjiyogenezi başlatan sinyal olarak düşünülmektedir. Dermal hasardan sonra keratinositler ve makrofajlar VEGF gen ekspresyonunu çok artırır ve VEGF reseptörler yara granülasyon dokusu içindeki kan damarlarında bulunur. VEGF temel anjiyogenik faktör olma özelliği yanında (VEGF'ye maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve transsellüler gap oluşumuna olanak sağlanarak) vasküler permeabilite artırılır (92, 145). Endotel hücreleri için migratuvar özelliğinin yanı sıra, hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile ürokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır (145).

Yara iyileşmesinde VEGF-A ekspresyonu, dermal hasar sonrasında, majör üreticileri olan keratinositler ve makrofajlarda güçlüdür. Reseptörleri ise granülasyon dokunun kan damarlarında ortaya çıkar. Bu VEGF-A'nın parakrin tarzdaki yara anjiyogenezisini stimüle ettiğini gösterir. VEGF-A ekspresyonunun azaltılması ya da yara iyileşmesi ile ilişkili olduğu bulunan degranülasyonunun hızlanmasıyla ilgili yapılan birkaç çalışma, iyileşme sürecinde VEGF-A'nın önemli rolünü desteklemiştir (95,149).

2.6.3. PLGF (Plasenta Büyüme Faktörü);

VEGF-A'ya ek olarak PLGF son zamanlarda yara anjiyogenezisinin bir regülatörü olarak tanınır. Yaraya komşu kapillerlerin endotel hücreleri tarafından sentezlenir. PLGF'nin akut insan derisi yaralarındaki keratinosit migrasyonunu güçlü bir şekilde düzenlediği belirtilmiştir. PLGF knock-out farelerde, anjiyogenezisteki defektle birlikte yara iyileşmesinin bozulması karakterizedir. VEGF-A ve PLGF arasındaki sinerji oldukça ilginçtir. İyileşme

mekanizmasında her iki büyüme faktörünün de bulunmasının normal yara angiyojenезisi için önemli olduğu çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (148,149).

2.6.4. Anjiyopoetinler

Anjiyogeneze önemleri bilinmesine rağmen, perisitler endotel hücrelerden daha az dikkati çekmiştir ve onların fonksiyonları şimdi anlaşılmaya başlanmıştır (150-154). Perisitler endotel hücrelerle bazal membranı paylaşırlar ve bazal membranda delikler yoluyla kontak kurmaktadır. İnsan ve maymun türlerinin dokularının anjiyogenik bölgelerinde çok sayıda endotel hücre ve perisitlerde stoplazmik bağlantılar (EPI) sık olarak gösterilmiştir (155-162). EGF, TGF- β , plazminojen, ürokinaz, plazminojen aktivatörün bu intersellüler EPI aralığında bulunduğu gösterilmiştir (163).

Kan damarlarının oluşumunu düzenleyen intersellüler sinyal mekanizmaları, moleküler düzeyde çok yakın zamanda çalışılmaya başlanmıştır. Anjiyogeneze birçok büyüme faktörünün rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle vasküler regülatuar mekanizmalardan ikisi, patolojik ve fizyolojik kan damarları oluşumunda yoğun araştırma konularından olmuştur. Bunlardan biri VEGF, diğeri ise Ang/Tie-2 sistemidir (164-169). Tie-2, vasküler endotel hücreler tarafından eksprese edilen reseptör tirozin kinazlardan bir tanesidir (165,170,171) ve anjiopoetin-1 (Ang-1) ve anjiopoetin-2 (Ang-2)'nin Tie-2'ye bağlanmasının mikrodamar gelişiminde önemli olduğu bildirilmiştir (172-174). Ang-1 endotel hücre kültüründe Tie-2'nin otofosforilasyonunu uyarır (166) ve perisitlerin yerleşmesine neden olduğu, mikrodamar stabilizasyonunu artırdığı ve perisit ve endotel hücreler arasındaki bağlantıları destekleyerek matürasyonu sağladığı öne sürülmektedir; fakat perisitlerin detaylı biyolojik karakteri net değildir (172-175). Ang-2 ise bir antagonist olarak hareket eder ve endotel hücrelerde Tie-2 reseptörlerinin fosforilasyonunu uyararak Ang-1'i inhibe eder. Bunun sonucunda, Ang-2 perisitlerin ayrılması ve vasküler

destabilizasyonla sonuçlanan yaygın anjiyogenezi başlatır. Yapılan bir çalışmada, Tie-2'nin endotelial hücrelerin stoplazmasında, hücre membranında, plazmalemmal çukurluk ve veziküllerde lokalize olduğu gözlenmiştir (176). Endotelial hücreler, endotelial hücre fonksiyonlarının bir otokrin düzenleyicisi olarak rol aldığı öne sürülen Ang-2 için primer kaynak olarak gösterilmiştir (138,177-180). Ang-1 için ise perisitler primer kaynak olarak gösterilmiştir (167).

Huang ve ark. yaptığı bir çalışmada VEGF blokajı sırasında damar yaşamı ve tümör büyümesine Ang-1/Tie-2 aktivasyonunun katkısı araştırılmış. VEGF inhibisyonu sırasında hem Ang-1 aşırı ekspresyonu oluşmuş ve Ang-1 agonisti verilmesiyle tümörleri ve damarlanmayı regresyondan korumuştur (181). Bu bağlamda Ang-1/Tie-2 aktivasyonu tümör hipoksisini sınırlamış, damar kalibrasyonunu artırmış ve mural hücrelerin yerleşmesini uyarmıştır. Böylece bu çalışmalar VEGF bağımlı damarlanmanın baskılandığı zaman tümör ve damar yaşamı için Tie-2 aktivasyonunun önemli olduğu bir modeli desteklemiştir (181). Bu çalışmada Ang-1 ekspresyonu tümör boyutunu değiştirmeden damar remodelizasyonunu uyarmıştır ve VEGF Trap ile oluşan vasküler ablasyonu önlemiştir (181). Birçok grup VEGF inhibisyonunun vasküler remodelizasyon ve tümör Ang-1 ekspresyonunu uyurabileceğini bildirmiştir. Tie-2 aktivasyonu gelişmekte olan embriyolar (182) ve erişkin damarlanmanın damar integrasyonunda kritik rol oynar ve endotelial hücreleri yaşamsal yolları (183,184) aktive ederek ve mural hücre toplanmasını stimüle ederek (182-185) mikroçevresel baskıdan koruyabilir. Ang-1'in aşırı ekspresyonu VEGF eşliğinde parsiyel antagonist olan Ang-2 tarafından vasküler duvarların geçici destabilizasyonunu gerektiren yeni kapiller tomurcuklanmanın oluşumunu sınırlayabilir (186-188). Ang-1'in aşırı ekspresyonu iskemik kasta istirahat akımının değişmemesine rağmen maksimal kan akımını artırmış (189). Dahası Ang-1 perisitlerin olmadığı zaman bile retinal damarlara hiyerarşi sağlayarak yüksek seviyede damar ağlarının bir araya gelmesini stimüle edebilir. Yapılan bir çalışma Ang-1'in önceden var olan damarların genişlemesini sağlayan endotelial proliferasyona neden olabildiği

gösterilmiştir (190). Postnatal dönemde trakeada Ang-1, VEGF Trap ile damarlanmayı regresyondan koruyabilir. Bütün bu etkilerle birlikte neoplastik hücrelerin yaşaması ve kanlanması sürdürülmesi, tümör damarlanmasının VEGF'ye bağımlılığının azaldığı yönündedir. Ang-1 endotelial hücrelerin proliferasyonunu uymamasına rağmen (191) invitro olarak Ang-1'in güçlü bir proanjyogenik faktör olabileceğini düşündüren endotelial migrasyon (192) tübül formasyonu (193) ve tomurcuklanmayı (194,195) uyarabilir.

2.6.5. Eph Reseptörleri ve Ephrinler

Eph reseptörleri 1980'lerin sonunda ortaya konmuştur ve tirozin kinaz reseptörlerinin en geniş ailesi olarak bilinir (196). Anjiyogenezde Eph/Ephrin sinyali ile ilgili olarak EphB4/EphrinB2' nin parçası anahtar rol oynuyor gözükmektedir. Erken gelişim dönemlerinde ephrinB2 arterler üzerinde, ephB4 venler üzerinde olmak üzere karşılıklı dağılımlarından dolayı vasküler sınırları tanımladığı farzedilmiştir (197-199). Ephrin B2 ekspresyonu arteryel endotelial hücrelerden çevresindeki düz kas hücreleri ve perisitlere uzayarak dağılmasıyla geç embriyogenez ve erişkinliğe kadar devam eder (200,201). Endotelial hücreler ve perivasküler destek hücreler arasındaki EphrinB2/Eph sinyali ile düzenlenen karşılıklı etkileşim vasküler gelişim için kritiktir (202). Füller ve ark. endotelial ephrinB2 ve ephB4'ün ileri ve geri itici etkili fonksiyonlarının anjiogenez ve damar birleşmesi sırasında uzaysal pozisyon sinyallerini düzenlediğini ve hücrelerin birbirine karışmasını önlediğini iddia etmiştir (203).

EphB4/ephrinB2 yanında diğer B sınıfı eph ve ephrinler de vaskülarizasyon ve anjiyogenezde rol oynar. Bu açıdan, ephrinB1, B3 ve Eph B2, B3, B4 kardiyovasküler gelişim sırasında vasküler ağın oluşumunun regülasyonu ve kadın üreme sisteminde vaskülarizasyon süreci için gereklidir (204-206). Dahası ephrinB1 integrinlerin aktivasyonu ile ekstrasellüler matriks üzerinde endotelial hücre bağlantılarını düzenlediği kabul edilmektedir (207).

A sınıfı Eph/ephrinlerden başlıca EphA2 ve ephrinA1'in anjiyogenik proçes için önemli olduğu görölmektedir. Örneğin embriyogenez sırasında endokardiyumda vasküler gelişimde, dorsal aorta ve primer baş venlerinde, intersoitik damarlarda ve ekstremitte tomurcuğunda ephrinA1 eksprese edilmiştir (208). Bu, ephrinA1 ekspresyonunun vaskülogenez ve/veya anjiyogenez bölgelerine karşılık geldiğini ve muhtemelen anjiyogenezi artırdığını ima etmektedir (097,208). Cheng ve ark. tarafından EphA2-Fc reseptörlerinin VEGF ile uyarılan endotelial hücrelerin yaşamı, göçü ve tomurcuklanmayı ve korneal anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiş (209). Dahası TNF-alfa'nın endotelial hücrelerde ephrinA1 ekspresyonunu uyardığı gösterilmiştir (210). EphA2/ephrinA1'in erişkin anjiyogenezindeki rolü çeşitli invitro olarak daha ileri analizleri yapılmıştır (211,212).

2.6.6. PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)

Trombositlerin alfa granülleri içinde bulunur. 32000 dalton ağırlığında bir glikoprotein olan PDGF, 2 disülfid bağıyla bağlanmış bölümden oluşur. A ve B adını alan bu üniteler %56 oranında benzerlik gösterirler (81, 111, 213, 214). PDGF'ler PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD içeren homodimerik ya da heterodimerik büyüme faktörleri ailesidir (137, 213). AA, AB ve BB şekillerinde ifade edilen faktörün her üç formunun biyolojik aktiviteleri temelde benzer olup B ünitesi mitogenezi biraz daha güçlü uyarabilir. Fonksiyonlarını üç farklı transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirirler (α ve β zincilerin homo ya da heterodimerleri) (122, 215).

Endotel hücreleri, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF salgırlar. Fibroblast ve düz kas hücrelerinde kemotaksisin yanında mitogenezi de uyarırlar (85, 122, 213).

Yara iyileşmesinde PDGF'nin iki önemli rolü daha vardır. İlki; fibroblast proliferasyonunu stimüle etmek için erkenci bir fonksiyon, ikincisi ise; miyofibroblast fenotipini uyarmaktır. PDGF'ler fibroblast proliferasyonu ve bu hücrelerden kollajen, hyalüran ve fibronektin sentezini uyararak ekstrasellüler

matriks üretimini artırırlar. Ayrıca kollajenaz aktivitesini arttırarak ve miyofibroblast kontraksiyonu için fibroblastları stimüle ederek matürasyon fazında rol oynarlar. Ayrıca timidin fosforilaz etkisi gösterir ve timidini timine defosforilleyerek serbest radikal oluşumunu arttırmak suretiyle anjiyogenez genlerini aktive ederler. PDGF yara iyileşmesinin majör mediatörleri kabul edilir (122).

2.6.7. TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü- β)

TGF- β süper ailesinin çoğu gelişim, hemostazis, hastalık ve tamirde önemli rol oynayan proteinlerin etrafını farklı şiddette çevirerek etki gösterirler. TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere en az 3 izoformu vardır (122, 213, 214). Yaralanmadan hemen sonra TGF- β 1 plateletlerden geniş miktarda salgılanır. Trombositlerin alfa granülleri içinde yoğun miktarda bulunur ve hasarlanan bölgeye degranülasyonla salınır. Plateletlerden aktif TGF- β 1'in salgılanmaya başlanması ilk olarak nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlar için kemoatraktan olarak görev yapar ve bu hücreler çeşitli hücre tiplerindeki TGF- β 1 seviyesini daha da arttırır. Makrofajlar kendi ürettikleri TGF- β 'yı otokrin yolla düzenlerler. TGF- β ayrıca monositleri uyararak FGF, PDGF, TNF- α , IL-1 gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlar. Aktif formları kadar latent TGF- β 'lar ayrıca yara matriksi içine yerleşir ve üretilir. Farklı hücre kaynakları ve geçici stokların bu kombinasyonu tamir süreci boyunca TGF- β 'nın aralıksız tamirini sağlarlar (122, 213, 216, 217, 218).

Tüm üç izoformun ekspresyonu tamir boyunca birçok farklı hücre tipinde tanımlanmıştır ve her üç izoformun yara dokusunda karakteristik bir dağılımı vardır.

Birçok çalışmada tamirin sonraki fazlarında TGF- β 3 ifadesinde bir artma gözlenirken, TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin hızlı indüksiyonu gözlenmiştir. TGF- β 'nın 3 izomeri, kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak bilinir ve ekstrasellüler matrikste depolanır. Özellikle TGF- β 1 ve TGF- β 2 ekstrasellüler matrix depolanmasında ve dermal skar oluşumuna yardımcı olur. Fakat TGF- β 3 skar oluşumunun engellenmesine neden olur. Ayrıca kollajenazı aktive eden

diğer faktörlerin uyarıcı etkisini azaltır. Transforme edici faktör- β tek başına, endotel hücre proliferasyonunu inhibe ederken, başka bir kofaktörle birlikte anjiyogenezi stimüle eder. TG- β fibroblastlarca fibronektin ve proteoglikan sentezini; keratinositlerce de fibronektin sentezini uyarır. İntegrinler ve ekstrasellüler matris proteinleri için çok güçlü stimülatörlerdir. Yara kontraksiyonunda rol oynar, ECM'yi organize edebilme özelliği nedeni ile yeniden yapılanma olayında görev yapar. Sonuç olarak TGF- β 'lar yara iyileşmesinde çok çalışılan moleküller arasındadır (122, 213, 214).

2.6.8. PLGF (Plasenta Büyüme Faktörü)

VEGF-A'ya ek olarak PLGF son zamanlarda yara anjiyogenezisinin bir regülatörü olarak tanınır. Yaraya komşu kapillerlerin endotel hücreleri tarafından sentezlenir. PLGF'nin akut insan derisi yaralarındaki keratinosit migrasyonunu güçlü bir şekilde düzenlediği belirtilmiştir. PLGF knock-out farelerde, anjiyogenezisteki defektle birlikte yara iyileşmesinin bozulması karakterizedir. VEGF-A ve PLGF arasındaki sinerji oldukça ilginçtir. İyileşme mekanizmasında her iki büyüme faktörünün de bulunmasının normal yara anjiyogenezisi için önemli olduğu çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (219).

2.7. ANTİANJİYOGENİK İLAÇLAR ve VEGF İNHİBİSYONU

VEGF etkisi bir çok seviyede bloke edilebilir. Klinikte VEGF'i hedef alan ilaçları VEGF inhibitörleri, VEGFR inhibitörleri ve tirozin kinaz reseptör inhibitörleri olarak üç grupta toplayabiliriz. VEGF ve VEGFR inhibitörleri monoklonal antikorlardır. VEGF sistemi aynı zamanda monoklonal antikorlarla ya da spesifik tirozin kinaz inhibitörleri aracılığıyla inhibe edilebilir. VEGF reseptörleri içinde en önemlisi, özellikle tümör dokusunda endotel hücre proliferasyonu ve kemotaksisinden sorumlu olan VEGFR-2 (Flk-1)'dir. Klinikte kullanılan antianjiyogenik ilaçlar ve mekanizmaları Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5: Klinikte kullanılan antianjiyogenik ilaçlar ve mekanizmaları.

İLAÇ	HEDEF	KLİNİK ÇALIŞMALAR
VEGF'i hedef alan monoklonal antikorlar		
Bevacizumab(Altuzan)	VEGF	Faz I,II,III
VEGF-Ttrap	VEGF	Faz I
VEGFR-2'i hedef alan antikorlar		
IMC-ICII	VEGFR-2	Faz I
Reseptör tirozin kinaz inhibitörleri		
SU5416	VEGFR-2	Faz I,II,III
SU6668	VEGFR-2, b FGFR, PDGFR	Faz I
SU11248	VEGFR-2, PDGFR	Faz I,II
PTK787/ZK22854	VEGFR-1, VEGFR-2	
ZD6474	VEGFR-2, EGFR	Faz I,II
CP-547,632	VEGFR-2, EGFR, PDGFR	Faz I
Endotel hücre proliferasyonu inhibitörleri		
ABT-510	Endotelial CD-36	Faz I,II
Angiostatin		Faz I
Endostatin		Faz II
TNP-470	Met-aminopeptidaz, CDK-2	Faz I
Thalidomide	TNF-alfa oluşumunun inhibisyonu	Faz I,II,III
İntegrin aktivitesinin inhibisyonu		
Vitaxin	İntegrin avb3	Faz I,II
Medi-552	İntegrin avb3	Faz I
Cilengitide	İntegrin avb3	Faz I
Damar ağını hedef alan ilaçlar		
Combretastatin A4	Endotelial tubulin	Faz I
AVE8062A	Endotelial tubulin	Faz I
ZD6126	Endotelial tubulin	Faz I
DMXAA	TNF-alfa oluşumunun uyarımı	Faz I

2.7.1. VEGFR-2'i Hedef Alan Antikor

IMC-IC11: Kanserin olası tedavisi için kullanılan, kolorektal kanserler için faz1 çalışmaları yapılan, VEGFR-2'ye spesifik kimerik monoklonal antikordur (220). VEGFR bağımlı endotelyal proliferasyonu inhibe eder.

2.7.2. VEGF Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörleri

SU5416, klinik olarak test edilmiş ilk VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür. Parenteral uygulanan kinolon derivesi olarak SU5416, VEGFR-2 (Flk-1)'i inhibe eder (221).

SU6668, VEGF, bFGF ve PDGF reseptörlerini inhibe eden oral kullanımlı antianjiyogenik ajandır (222).

SU11248 (Sunitinib), ise geniş spektrumlu oral tirozin kinaz inhibitörüdür ve VEGF, PDGF, c-Kit ile Flt-3 kinaz aktivitesini inhibe eder. Böbrek kanseri ve gastrointestinal stromal tümörlerin tedavisinde etkiliği gösterilmiştir (223).

PTK787/ZK222584, oral VEGFR-1 ve 2 reseptör inhibitörüdür. İntratümöral mikrovasküler dansitede dramatik azalmaya (%30-40 arası) yol açar. Hepatik metastazı olan kolorektal kanserli hastalarda kan akımını belirgin azalttığı gözlemlenmiştir. Kombine faz II ve III çalışmaları sürmektedir (224).

ZD6474(vandetanib), ise hem VEGFR2 hem de Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor=EGFR) inhibitörü. Deneysel çalışmalarda yumuşak doku sarkomlarında etkinliği invivo ve invitro olarak gösterilmiş olmasına karşın, tedavi protokollerine girmesini sağlayacak klinik çalışmalar henüz sürmektedir (224).

CP-547,632, ise selektif VEGFR-2 tirozin kinaz inhibitörüdür. Hayvan deneylerinde tümör büyümesinin önlenmesinde çok olumlu sonuçlar alınmıştır (225). Ancak çok merkezli bir Faz II çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında paklitaksel ve karboplatin ile kullanımı tedaviye yanıt oranında artış sağlamamıştır (226).

2.7.3. VEGF'e Yönelik Monoklonal Antikorlar

2.7.3.1. VEGF-trap

Potent VEGF blokörüdür. Monoklonal antikorlara göre VEGF'e olan affinitesi çok daha yüksektir. Kanser tedavisinde klinik kullanımıyla ilgili çalışmalar halen devam etmektedir (227).

2.7.3.2. rhuMab VEGF (*Bevacizumab, Altuzan, Avastin*)

Rekombinant insan anti-VEGF-A monoklonal antikor olan BVZM'ın, faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettiği saptanmıştır. Sağkalımı uzattığı çeşitli faz III çalışmalarda klinik olarak kanıtlanmış ve kanser tedavisinde kullanılmak üzere onay almış ilk antianjiyogenik ajandır (228).

BVZM (Altuzan® 100mg/4ml) insan VEGF'ne spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur. 214 aminoasitten oluşur, molekül ağırlığı 149 Kda'dur ve VEGF için iki bağlanma bölgesi içerir. VEGF'ün endotel hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanmalarını önleyerek tüm VEGF-A izoformlarını ve onların aktif degradasyon ürünlerini inhibe eder (229). BVZM VEGF'ün biyolojik aktivitesini nötralize ederek tümörlerin damarlanmalarını ve dolayısı ile tümörlerin büyümelerini yavaşlatır. Vasküler geçirgenliği azaltır.

İlk defa metastatik kolorektal kanserlerin tedavisinde kullanılmıştır. Bevacizumab'ın kolon kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı vardır. Meme, akciğer, böbrek kanserleri için BVZM faz III klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir (230). Hiçbir klinik çalışmada BVZM'a karşı immünojenik antikor yanıtı oluştuğunun kanıtı yoktur.

Gözde kullanım ruhsatı olmamakla birlikte, BVZM birçok klinikte korneal neovaskülarizasyon tedavisinde ve diğer oküler neovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (231).

VEGF'e bağlanarak endotel hücre yüzeyinde VEGF ile reseptöleri (Flt-1 ve KDR) arasındaki etkileşimi engeller. BVZM + FOLFOX4 (5-FU, lekoverin ve oksaliptin) alan kolorektal kanser hastalarında, yalnızca FOLFOX4 alan hastalara kıyasla sağkalımda anlamlı artış olduğunun gösterilmesinin ardından, 2006'da kullanım onayı metastatik kolon ve rektum kanserinin ilk ya da ikinci sıra tedavisi olarak genişletilmiştir. Metastatik akciğer kanserinde; BVZM ile birlikte karboplatin ve paklitaksel kombinasyon kemoterapisi alan hastalarda, yalnızca karboplatin ve paklitaksel kemoterapisi alan hastalara göre, sağkalımda anlamlı artış sağlandığı gösterilmiştir (232). Bu kanıta dayanarak rezeke edilemeyen, lokal-ileri, rekürren ya da metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin ilk sıra tedavisinde karboplatin ve paklitaksel ile kombinasyon rejiminde kullanım onayı almıştır. Günümüzde ileri evre metastatik meme kanserinin tedavisinde de kombinasyon tedavilerine giren BVZM'ın; renal hücreli karsinom, pankreas kanseri, over kanseri ve hormona yanıt vermeyen prostat kanserinde klinik etkinliğine dair çalışmalar halen sürmektedir (233).

BVZM, metastatik kolorektal kanser kombinasyon tedavisinde 5 mg/kg iki haftada bir (228), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri kombinasyon tedavisinde 15 mg/kg üç haftada bir (229), metastatik meme kanser kombinasyon tedavisinde 15 mg/kg dozunda iki ya da üç haftada bir (229) kullanılmaktadır. Bu klinik çalışmalar kombinasyon tedavisine BVZM eklenmesinin, kemoterapinin yalnız başına kullanımına kıyasla toksisitede belirgin artışa neden olmadığı ve iyi tolere edildiğini göstermiştir. Bu çalışmalarda ortaya çıkan en belirgin yan etkiler hipertansiyon, proteinüri,

tromboz, kanamaya meyil, yara iyileşmesinde gecikme olarak ortaya çıkmaktadır. Daha nadiren hayatı tehdit edici olaylar (arteriyel trombotik olaylar, gastrointestinal perforasyon ve masif hemoptizi) bildirilmiştir. Yan etkiler açısından yüksek risk taşıyan hastaların yakın takibi önerilmektedir.

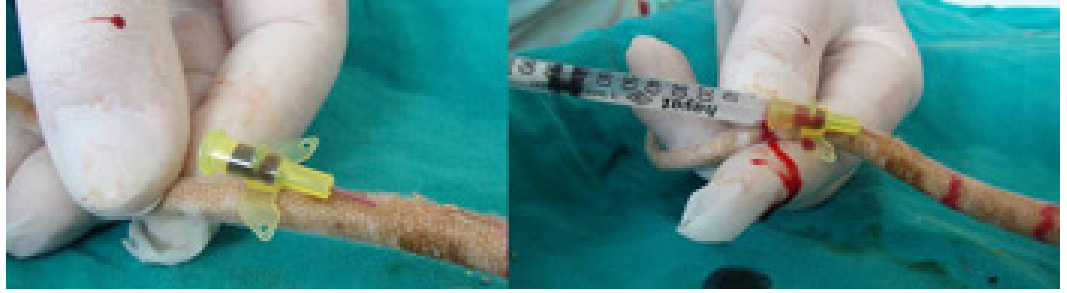
3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanı Modeli

Çalışmada 150-250 gr ağırlığında 180 adet dişi Wistar Albino sıçanlar kullanıldı. Deneysel flep modeli olarak, sıçan sırtında kaldırılan kaudal bazlı random-patern deri flebi seçildi. Tüm cerrahi işlemler ve cerrahi sonrası takipler 25 derece oda sıcaklığında yapıldı. Anestezi için sıçanlara Ketamin 90 mg/kg ve Xylazin 10 mg/kg intraperitoneal (IP) verildi. İşlemler sırasında asepsi kurallarına uyuldu. Çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanı Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarında (SDÜ-HÜDAL) gerçekleştirildi. Çalışma 1964 Helsinki Bildirgesi ve takip eden güncellemelerine, Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlarla Kullanılacak Omurgalı Hayvanların Korunmasına İlişkin Avrupa Anlaşmasına (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, ETS No. 123) ve 25464 sayılı “Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Deney Hayvanları'nın Korunması, Deney Hayvanlarının Üretim Yerleri ile Deney Yapacak olan Laboratuvarların Kuruluş, Çalışma, Denetleme, Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” e uygun olarak yürütüldü.

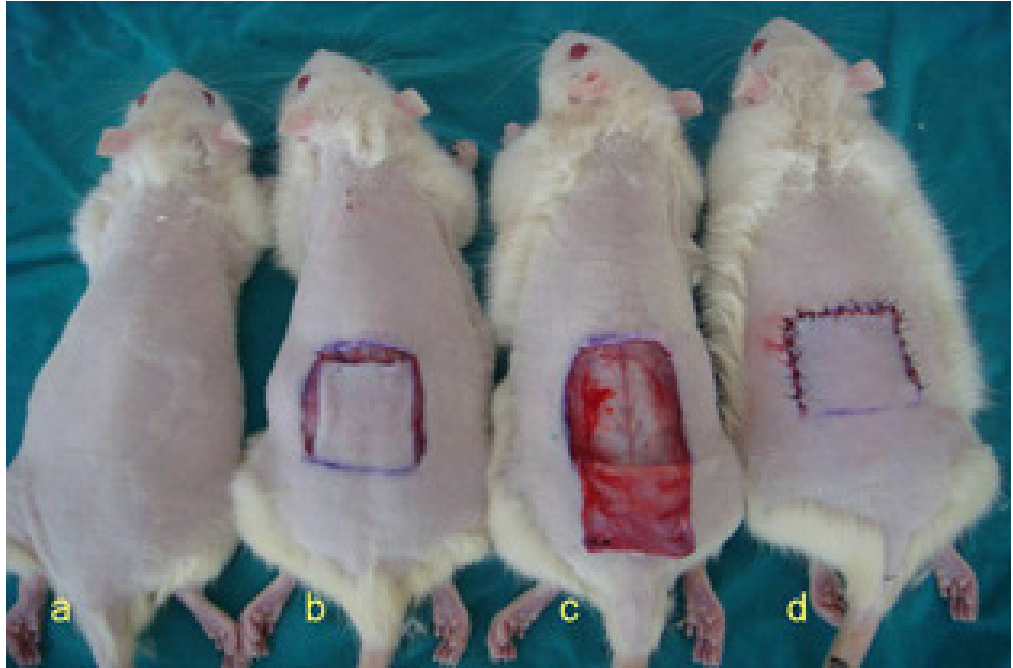
3.2. Çalışma Tasarımı

Deneye dahil edilen tüm sıçanlarda, BVZM'nin neovaskülarizasyon üzerine olan etkisinin ortaya çıkabilmesi için, kontrol gruplarında SF, çalışma gruplarında BVZM, cerrahi işleme başlamadan önceki 10., 7., 4., ve 0. günlerde kuyruktan IV olarak toplam 4 doz uygulandı (Şekil 5).

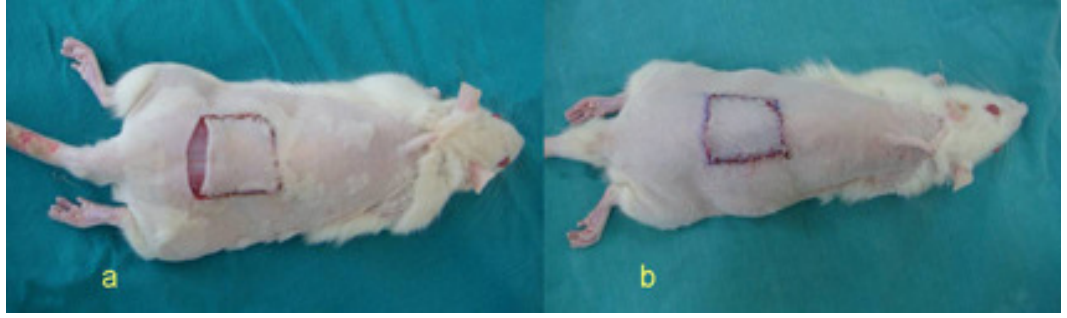


Şekil 5: İntrevenöz (IV) yol ile BVZM verilmesi.

Sıçanlar (s=180) 2 çalışma grubuna ayrıldı (Flep yaşayabilirliği değerlendirilmesi ve Neovaskülarizasyon değerlendirilmesi için damar sayımı grupları). Tüm gruplarda, 3x3 cm'lik kaudal bazlı random-patern deri flebi, sırt tüyleri traşlandıktan sonra flep pedikülü posterior iliak çıkıntı hizasında olacak şekilde kaldırıldı (Şekil 6). Sonra flep yerine iade edilerek 5/0 prolene ile sütüre edildi. Flep yaşayabilirliğini değerlendirmek üzere 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. günlerde fleplerin pedikülleri tam olarak kesilerek tekrar sütüre edildi (Şekil 7).



Şekil 6: Operasyon öncesi sıçanın sırt bölgesinin traş edilmesi (a). İşaretleme ve insizyonların yapılması (b). Kaudal bazlı olarak cilt flebinin kaldırılması (c). Flebin yerine iade edilerek sütüre edilmesi (d).

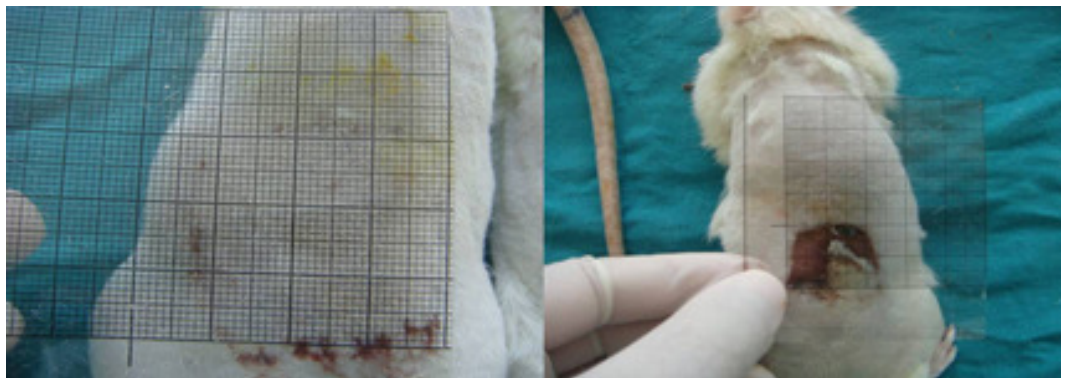


Şekil 7: Flebin pedikülünün (4. kenarının) kesilmesi (a) ve suture edilmesi(b).

1) Flep Yaşayabilirliği Değerlendirilmesi Grubu

- a- Kontrol Grubu: 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. günler için toplam 55 sıçan kullanıldı.
- b- BVZM Grubu: 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. günler için toplam 61 sıçan kullanıldı.

Bu grupta, cerrahi sonrası 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. günlerde random-patern sırt deri fleplerinin pedikülleri kesilerek flep yaşayabilirliği pedikülden bağımsız hale getirildi. Pediküllerin kesildiği günden sonraki 7. günlerde (2. gün kesilen için 9. gün, 3. gün kesilen için 10. gün...) flepte, milimetrik asetat kağıdı ile değerlendirerek, sağkalan alan oranları ölçüldü (Şekil 8). Yaşayan alanın ameliyat öncesi flep alanına (9 cm²) oranı kaydedildi (sağ kalan/toplam alan). Flep sağ kalan alan oranı % 80 den büyük ise tam sağkalım olarak kabul edildi. Flep sağ kalan alan oranı % 20 den küçük ise total nekroz olarak kabul edildi. Sağ kalan alan oranı % 20-80 olan flepler ise parsiyel sağ kalan flepler olarak kabul edildi.



Şekil 8: Fleplerin yaşayan alanlarının milimetrik asetat kağıdı ile ölçülmesi.

Çalışmaya dahil edilen sıçanlar, ölçümlerin yapıldığı 9., 10., 11., 12., 13., 14., 15. günlerde sakrifiye edildiler.

Flep yaşayabilirliği değerlendirilmesi için gruplar ve zaman alt gruplarında hayvan dağılımı Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6: *Flep yaşayabilirliği değerlendirilmesinde gruplar ve zaman alt gruplarına deney hayvanlarının dağılımı.*

Günler	Kontrol grubu hayvan sayısı	BVZM grubu hayvan sayısı
2	7	7
3	10	9
4	10	13
5	8	13
6	8	7
7	7	6
8	5	6
Toplam	55	61

2) Neovaskülarizasyon Değerlendirilmesi için Damar Sayımı Grubu

Flep yaşayabilirliğinin değerlendirildiği I. grupta flep nekroz oranlarında azalmanın gözlenmeye başlandığı 2., 3., 4., 5. günler baz alınarak (neovaskülarizasyonun progresyon gösterdiği günler)

- a- Kontrol Grubu: 2., 3., 4., 5. günler için toplam 32 sıçan,
- b- BVZM Grubu: 2., 3., 4., 5. günler için toplam 32 sıçan kullanıldı.

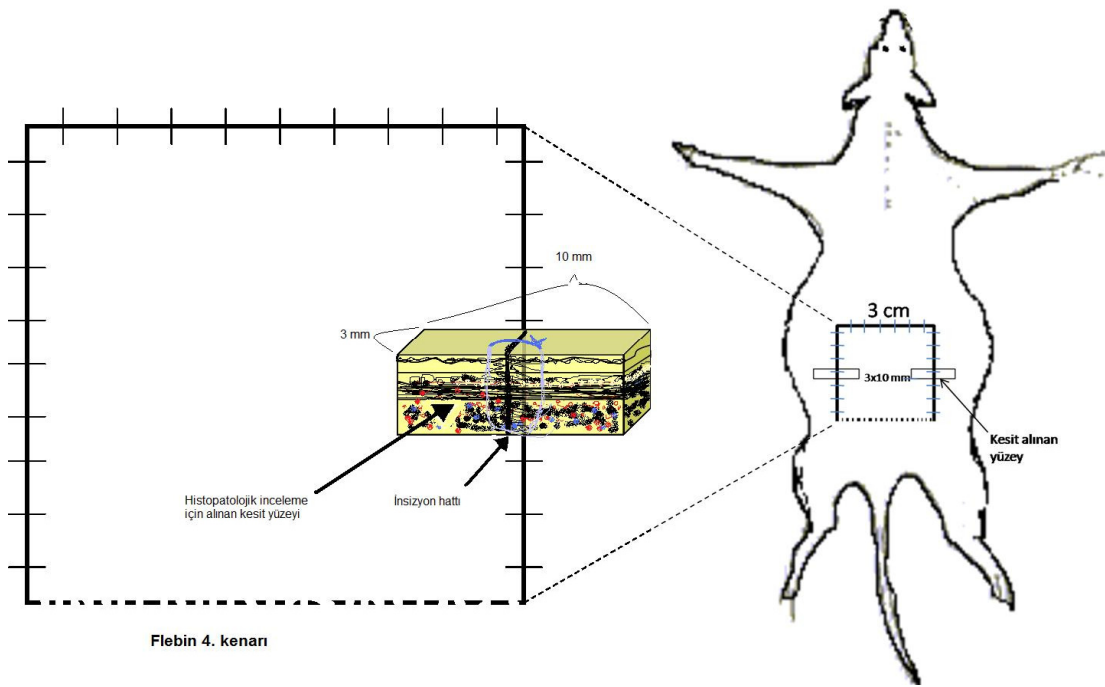
Random-pattern sırt deri fleplerinde neovaskülarizasyonun değerlendirilebilmesi için 2., 3., 4., 5. günlerde, flep pedikülleri kesilmeden, histolojik analiz için çevrede 0.5-1 cm'lik bir normal deri dahil edilerek kaudal bazlı dorsal cilt flepleri panniculus carnosus'u içerecek şekilde eksize

edildi (Şekil 9). Spesmenler %10'luk formaldehit içine kondu. Bu işlem sonrasında sıçanlar sakrifiye edildi.



Şekil 9: İmmünohistokimyasal inceleme için örnek alınması işlemi.

%10'luk formaldehite konan spesmenlerden, flep lateral kenarlarından, dikiş hattı ortada kalacak şekilde 3x10 mm'lik, flep ve çevre dokuyu içeren örnekler histolojik inceleme için alındı (Şekil10).



Şekil 10: Histolojik çalışma için flebin lateral kenarlarından 3x10 mm'lik dikiş hattı ortada kalacak şekilde flep ve çevre dokuyu içeren örneklerin alınması. Örneklerden yine dikiş hattı ortada kalacak şekilde çevredeki 3 mm'lik yara dudaklarını içeren 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı.

Alınan bu örneklerin histolojik çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Kesitlere CD31 immünohistokimyasal boyama ve hematoksilin-eozin boyama uygulandı.

İmmünohistokimyasal boyamada damar endoteline karşı CD31 antikoru (1:100, mouse monoclonal, Neomarkers Fremont CA. USA, klon: JC/708, kot: MS-353-S) kullanılarak boyanmış kesitlerde, ışık mikroskobu altında (Model U-DO3 T2 SN 7C24635 Olympus Corporation Tokyo, JAPAN) x20 büyütme ile tüm alanlarda damar sayımı yapıldı. H-E ile boyamada vasküler yapıların histomorfometrisi değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal boyama prosedürü özetle aşağıdaki gibi uygulandı.

3.3. İmmunohistokimyasal Boyama İşlemi:

- Parafin kesitler 60 derecedeki etüvde 1 saat bekletildi.
- Ksilende iki kez 15'er dakika bekletildi.
- Saf alkolden iki kez 10'ar dakika geçirilerek dehidrate edildi.
- Preparatlar distile suyla yıkandı.
- Antijen retrieval aşaması uygulandı (PT modulle cihazında pH=6'da 98 °C'de 20 dakika ısıtıldı).
- Distile suda yıkandı.
- %3'lük H₂O₂ ile 10 dakika muamele edildi.
- Distile su ile 5 dakika yıkandı.
- Fosfatla tamponlanmış salin (PBS) solüsyonunda iki kez 5'er dakika yıkandı.
- Ultra V blok solüsyonu 5 dakika uygulandı.
- Ultra V blok solüsyonu akıtılarak primer antikorlar damlatıldı.
- CD31 (1:100, mouse monoclonal, Neomarkers Fremont CA. USA, klon: JC/708) kot: MS-353-S için 60 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı
- CD31 (1:100, mouse monoclonal, Neomarkers Fremont CA. USA, klon: JC/708) kot: MS-353-S için gece boyunca buzdolabında 4 °C'de nemli ortamda inkübasyon yapıldı.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- Biotinylated goat anti-polyvalent solüsyonu 20 dakika bekletildi.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- Streptavidin peroksidaz solüsyonunda 20 dakika bekletildi.
- PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- Diaminobenzidin (DAB) kromojeni 5 dakika.
- Kesitler distile suyla yıkandı.
- Mayer'in hematoksileni ile 30 sn süreyle zıt boya yapıldı.
- Çeşme suyunda yıkandı.
- Artan konsantrasyondaki alkollerden (70°, 80°, 96°) geçirilerek rehidratasyon yapıldı.

- Ksilenle yıkandı.
- Mounting medium kullanılarak kapatıldı.
- Negatif kontrol için pozitif kontrol kesitlere primer antikor yerine dilüent solusyon damlatılarak immünohistokimyasal boyama işlemi yapıldı.

3.4. Hematoksilen-Eozin Boyama

Örneklemelerden hazırlanan kesitler, %10'luk formaldehit ile tespit edildikten sonra rutin takibe alındı ve hematoksilen-eozin ile boyama işlemine başlandı. Örnekler, küçük parçalara ayrılıp plastik doku takip kasetlerine konularak %10'luk formaldehitte 24 saat süre ile fikse edildi. Fiksasyon işleminin bitmesini takiben parçalar 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Daha sonra yükselen dereceli alkollerde dehidrate edilerek, ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldüler. Parafin bloklardan mikrotom yardımıyla kesitler alındı. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemlemek amacıyla Hematoksilen ve eozin boyanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelendi.

Hematoksilen-Eozin Boya Prosedürü

Ksilen-----5 dk.+ 5 dk. + 5 dk.
 Saf Alkol-----3 dk.
 Alkol 96 °-----3 dk.
 Alkol 80 °-----3 dk.
 Alkol 70 ° -----3 dk.
 Distile su ----- 5-10 sn çalkalanır
 Hematoksilen -----12-13dk.
 Çeşme suyu -----25 dk.
 Eozin -----2 dk.
 Alkol 96 ° -----3 dk. + 3 dk.

Saf Alkol -----3 dk. + 3 dk. + 3 dk

Ksilen -----5 dk. + 5 dk. + 5 dk.

Neovaskülarizasyon değerlendirilmesi için damar sayımı yapılan gruplar ve zaman alt gruplarında hayvan dağılımı Tablo 7’de özetlenmiştir.

Tablo 7: Damar sayımı yapılan gruplar ve zaman alt gruplarında deney hayvanlarının dağılımı.

Günler	Kontrol grubu hayvan sayısı	BVZM grubu hayvan sayısı
2	8	8
3	8	8
4	8	8
5	8	8
Toplam	32	32

3.5. İstatiksel Değerlendirme

Flep yaşayabilirliği hem sağ kalan alan oranı sürekli değişkeni hem de tam sağkalım oranı kategorik değişkenleri ile araştırıldı. Sağ kalan alan oranı değişkeni 0-100 arasında bir değer ile ifade edildi. Flep pedikülünün kesildiği her bir gün için gruplar arasında fark bulunup bulunmadığı Krusger-Wallis ve Mann-Whitney U nonparametrik testleriyle araştırıldı. Krusger Wallis testi 2 gruptan birinin farklı olduğunu gösteriyorsa Mann-Whitney U testi ile BVZM grubunun kontrol grubundan farklı olup olmadığı araştırıldı. F değerinin kritik değerinin altında olduğu durumlarda ikişerli mukayeseler için Bonferroni post-hoc testi kullanıldı. Flep sağ kalan alan oranı değişkeninden üç adet kategorik değişken üretildi. Flep sağ kalan alan oranı % 80 den büyük ise tam sağkalım olarak kabul edildi. Flep sağ kalan alan oranı % 20 den küçük ise total nekroz olarak kabul edildi. Sağ kalan alan oranı % 20-80 olan flepler ise parsiyel sağ kalan flepler olarak kabul edildi. Gruplar bu kategorik değişkenler açısından Fisher’s Exact Test veya Chi Square testleri ile

karşılaştırıldı. Flep pedikülünün kesildiği günler dikkate alınarak gruplar arasında damar sayımı farkları ANOVA ve Bonferroni post-hoc testleri ile araştırıldı. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edildi. Analizler SPSS 16.0 istatistiksel paketi (Chicago, IL, USA) kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Flep Sağkalım Bulguları

Kontrol grubunda flep sağ kalan alan analizi sonuçları Tablo 8'de gösterilmiştir. Random-pattern dorsal deri flebinin kaldırılıp yerine iade işlemini takiben 2. günde pedikülleri kesilen fleplerin tamamında (n=7) total nekroz meydana geldi. Pedikülün 3. gün kesildiği 10 flepten 3'ünün tam, 1'inin parsiyel olarak yaşadığı, 6'sının total nekroz olduğu gözlemlendi. Pedikülün 4. gün kesildiği 8 flepten 1'inin tam, 2'sinin parsiyel olarak yaşadığı, 5'inin total nekroz olduğu gözlemlendi. Pedikülün 5. gün kesildiği 8 flepten 2'sinin tam, 3'ünün parsiyel olarak yaşadığı, 3'ünün total nekroz olduğu gözlemlendi. Pedikülün 6. gün kesildiği 8 flebin 6'sının tam, 2'sinin parsiyel olarak yaşadığı; hiçbirinde total nekrozun olmadığı gözlemlendi. Pedikülün 7. gün kesildiği 7 flebin tamamının tam olarak yaşadığı; hiçbirinde total nekrozun olmadığı görüldü. Pedikülün 8. gün kesildiği 5 flebin tamamının tam olarak yaşadığı; hiçbirinde total nekrozun olmadığı görüldü.

Ortalama sağkalan alan oranı 2. gün %0, 3. gün %34.2, 4. gün %32.6, 5. gün %40.4, 6. gün %86.5, 7. gün % 100, 8. gün %100 olarak değerlendirildi.

Tablo 8: Kontrol grubunda flep sağkalım sıklığı ve sağkalan alan oranları.

Grup	Değişkenler		Günler						
			2	3	4	5	6	7	8
Kontrol (n=60)	Flep sağkalım sıklığı	Tam	0/7	3/10	1/8	2/8	6/8	7/7	5/5
		Parsiyel	0/7	1/10	2/8	3/8	2/8	0/7	0/5
		Toplam	0/7	4/10	3/8	5/8	8/8	7/7	5/5
		Nekroz	7/7	6/10	5/8	3/8	0/8	0/7	0/5
	Ortalama sağkalan alan oranı (%)		0	34.2	32.6	40.4	86.5	100	100
	Sağ kalan alan oranı aralığı (min-mak)		0-0	0-100	0-100	0-100	41.7-100	100-100	100-100

BVZM grubunda flep sağkalım analizi sonuçları Tablo 9'da gösterilmiştir. Pedikülün 2. gün kesildiği 7 flebin 2'sinin tam, 2'sinin parsiyel olarak yaşadığı; 3'ünün total nekroz olduğu gözlemlendi. Pedikülün 3. gün kesildiği 9 flebin tamamının tam olarak yaşadığı; hiçbirinde total nekroz olmadığı gözlemlendi. Pedikülün 4. gün kesildiği 13 flebin 10'unun tam, 1'inin tam olarak yaşadığı; 2'sinin total nekroz olduğu görüldü. Pedikülün 5. günde kesildiği 13 flebin tamamının tam olarak yaşadığı; hiçbirinde total nekrozun olmadığı görüldü. Pedikülün 6. günde kesildiği 7 flebin tamamının tam olarak yaşadığı; hiçbirinde total nekrozun olmadığı görüldü. Pedikülün 7. günde kesildiği 6 flebin tamamının tam olarak yaşadığı; hiçbirinde total nekrozun olmadığı görüldü. Pedikülün 8. günde kesildiği 6 flebin tamamının tam olarak yaşadığı; hiçbirinde total nekrozun olmadığı görüldü.

Ortalama sağkalan alan oranı 2. günde %43.9, 3. günde %100, 4. günde %76.3, 5. günde %94.6, 6. günde %95.5, 7. günde %98.7, 8. günde %98.6 olarak bulundu.

Tablo 9: BVZM grubuna ait flep sağkalım sıklığı ve sağkalan alan oranları bulguları.

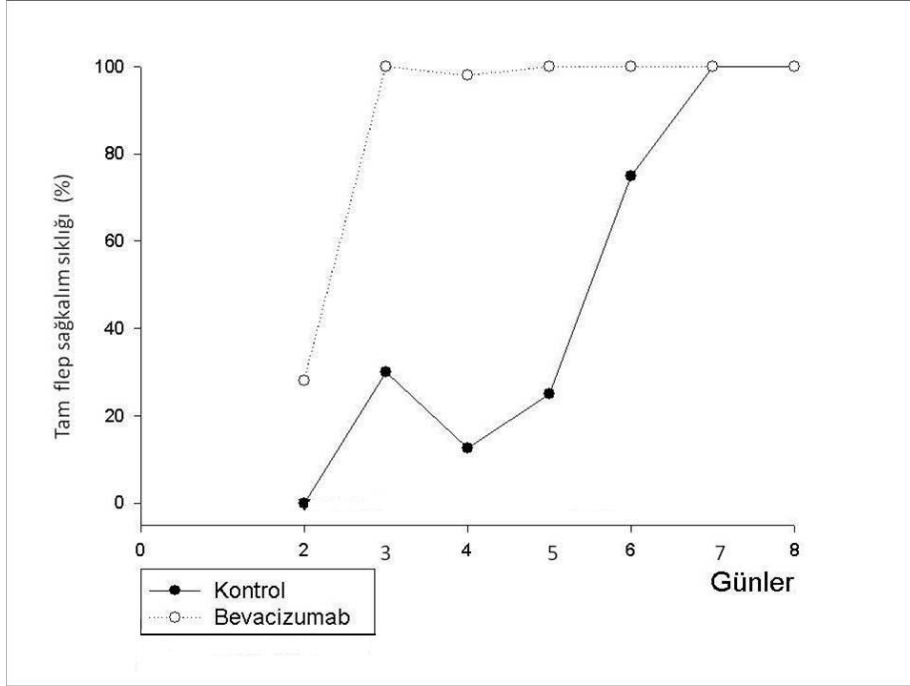
Grup	Değişkenler		Günler							
			2	3	4	5	6	7	8	
Bevacizumab (n=61)	Flep sağkalım sıklığı	Tam	2/7	9/9*	10/13*	13/13*	7/7	6/6	6/6	
		Parsiyel	2/7	0/9	1/13	0/13	0/7	0/6	0/6	
		Toplam	4/7*	9/9*	11/13*	13/13*	7/7	6/6	6/6	
		Nekroz	3/7	0/9	2/13	0/13	0/7	0/6	0/6	
	Ortalama sağkalan alan oranı (%)		43.9*	100*	76.3*	94.6*	95.5	98.7	98.6	
	Sağ kalan alan oranı aralığı (min – maks)		0-100	100-100	0-100	84.4-100	86.1-100	93.3-100	92.8-100	

- *: Kontrol grubuna göre anlamlı istatistiksel fark ($p<0,05$)

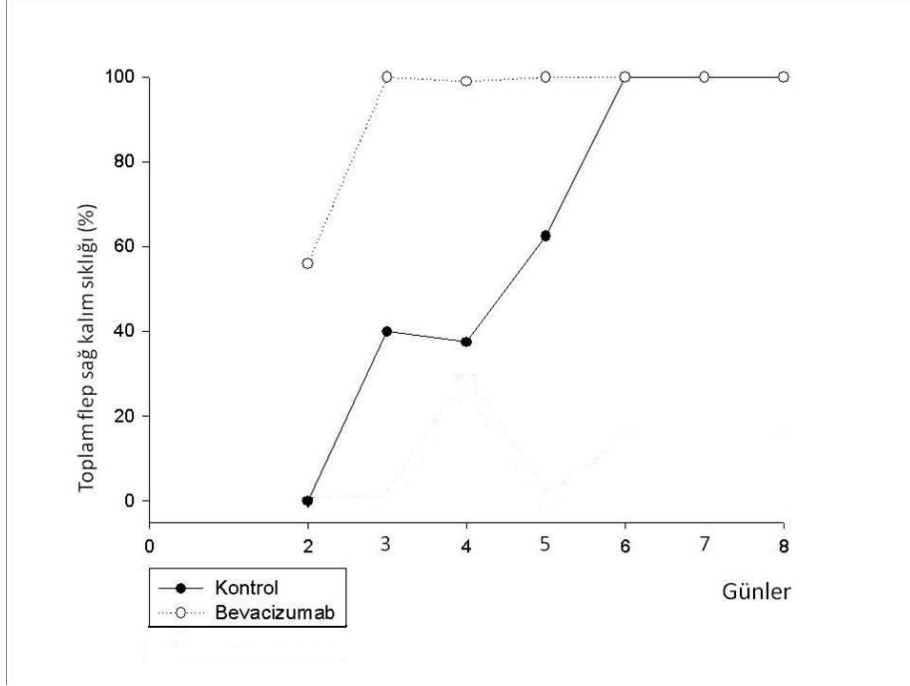
BVZM grubunda; 2., 3., 4., 5. günlerin her birinde flep yaşayabilirliği oranları ve ortalama sağ kalan alan oranlarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,05$).

Bu bulgular doğrultusunda toplam flep sağ kalım sıklığı ve ortalama sağ kalan alan oranı 2., 3., 4. ve 5. günlerin herbirinde BVZM grubunda kontrol

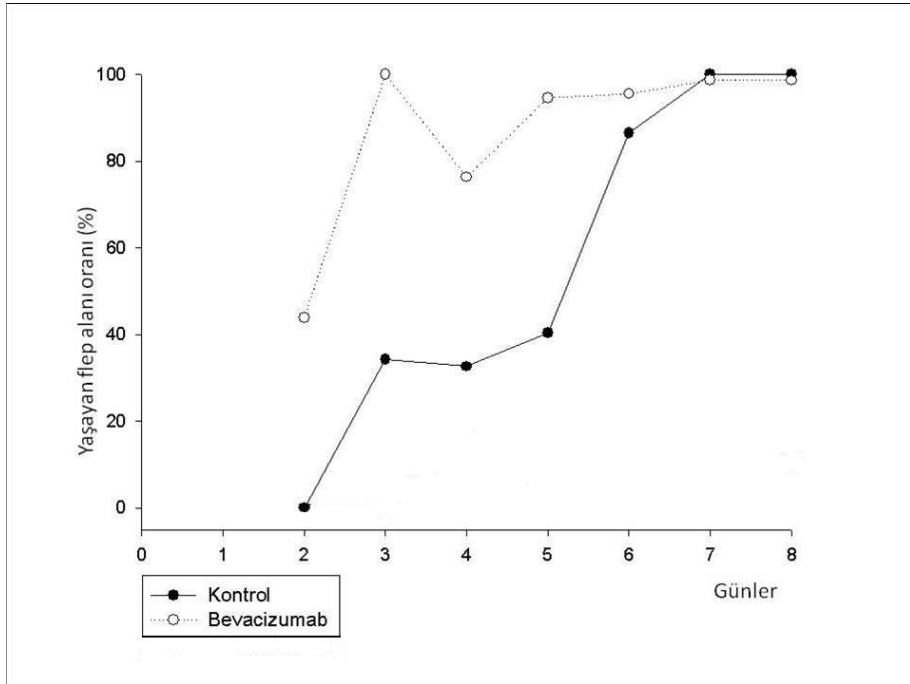
grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu. Tam flep sağkalımı oranı ise 3., 4., ve 5. günlerin herbirinde BVZM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış idi. Bu değişkenlerin gruplar arasında ve günler içinde değişimi Şekil 11, 12 ve 13'te grafik halinde gösterilmiştir.



Şekil 11: Tam flep sağ kalım sıklığının günlere göre analizi. BVZM grubunun tam flep sağkalımı sıklığı; 2. günde kontrol grubuna göre daha fazladır. 3. günde ise tam flep yaşayabilirliği sağlanmasına rağmen kontrol grubunda ise bu 7. günde oluşabilmiştir.



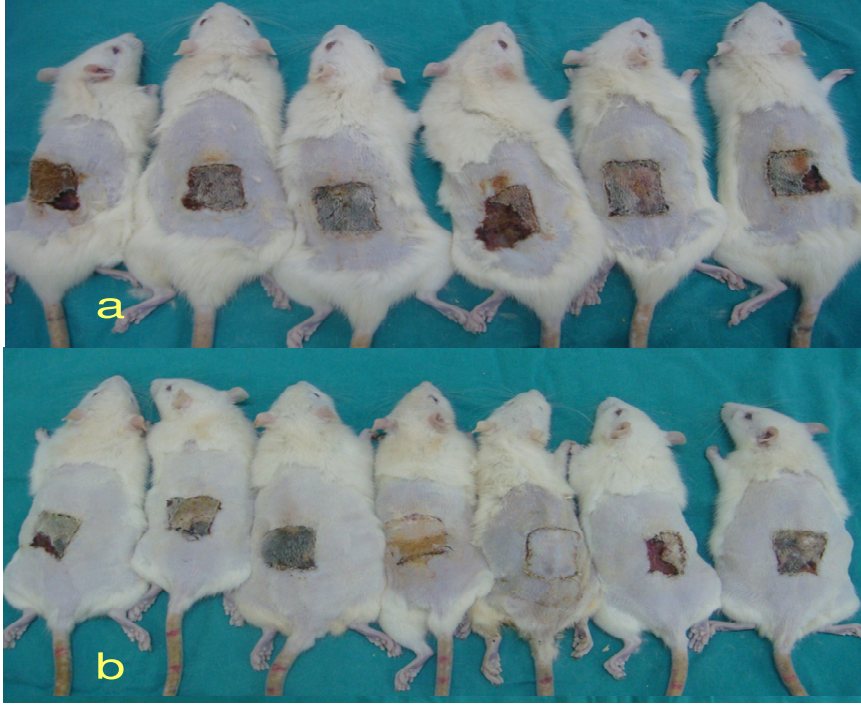
Şekil 12: Toplam flep sağ kalım sıklığının günlere göre analizi. BVZM grubunun toplam flep sağkalımı sıklığı; 2. günde kontrol grubuna göre daha fazlaydı.



Şekil 13: Yaşayan flep alanı oranının günlere göre analizi.

BVZM grubunda 4. gün alt grubunda % 76.3 iken 3. gün ve takip eden diğer günlerin hepsinde % 90'ın üzerindedir. Kontrol grubuna göre yaşayan flep alan oranları daha fazlaydı.

Flep pediküllerinin 2., 3., 5. ve 7 günlerde kesildiği kontrol ve BVZM gruplarında flep yaşayabilirliklerinin karşılaştırmalı fotoğrafları Şekil 14, 15, 16 ve 17'de gösterilmiştir.



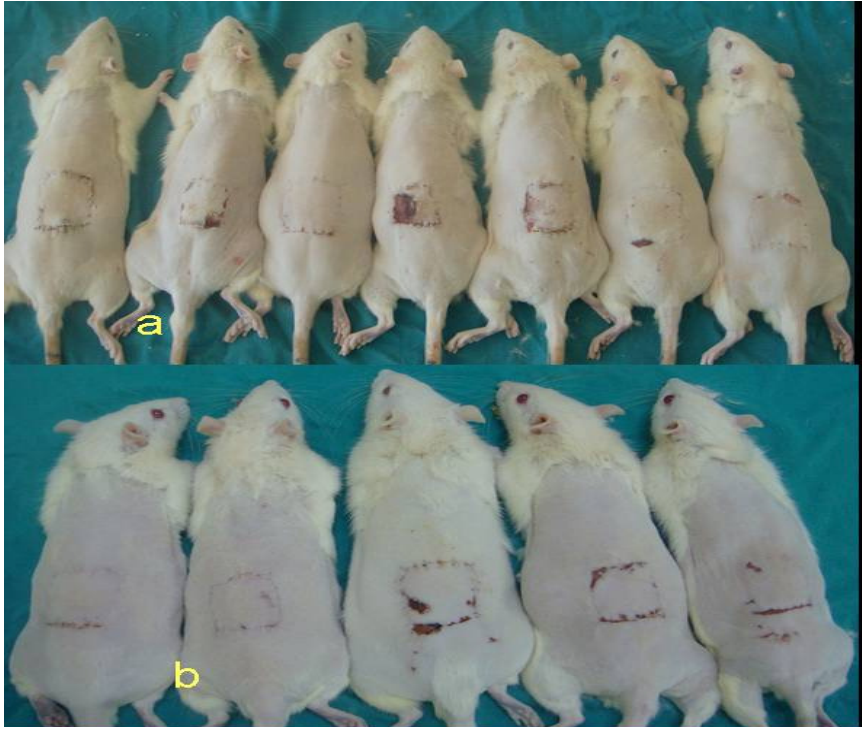
Şekil 14: Fleplerin pedikülünün 2. gün kesilmesinden sonra kontrol grubu (a), BVZM grubu (b), için klinik gözlemler. Kontrol grubunda fleplerin tamamında total nekroz görülürken BVZM grubunda ise flep yaşayabilirliğinin bariz şekilde artmış olduğu görülmektedir.



Şekil 15: Fleplerin pedikülünün 3. gün kesilmesinden sonraki 7. günde kontrol grubu (a), BVZM grubu (b)'nin görünüşleri. Kontrol grubunda flep yaşayabilirliği yine kontrol grubunun 2. gününe göre artmış olarak izlenmektedir. BVZM grubundaki flep yaşayabilirliğinin kontrol grubuna göre bariz olarak arttığı görülmektedir.



Şekil 16: Fleplerin pedikülünün 5. gün kesilmesinden sonraki 7. günde kontrol grubu (a), BVZM grubu (b)'nin görünüşleri. Kontrol grubunda flep yaşayabilirliğinde 3. güne göre artış olduğu, BVZM grubunda ise fleplerin tamamının yaşıyor olduğu ve kontrol grubuna göre artmış olduğu görülmektedir.



Şekil 17: Fleplerin pedikülünün 7. gün kesilmesinden sonraki 7. günde kontrol grubu (a), BVZM grubu (b)'nin postoperatif 7. gündeki görünüşleri. Kontrol ve BVZM gruplarında fleplerin tamamının tam olarak yaşadığı görülmektedir.

4.2. Neovaskülarizasyonun Değerlendirilmesi İçin Damar Sayımı Bulguları

CD31 için immünohistokimyasal boyama yapılmış kesitlerde yapılan damar sayımlarının gruplara dağılımı Tablo 10'da gösterilmiştir. Flep kenarlarında damar sayıları 2. günde, BVZM grubunda kontrol grubuna göre artmış bulundu. Hematoksilen eozin kesitleri kantitatif damar sıklığı analizini destekler görünümde idi.

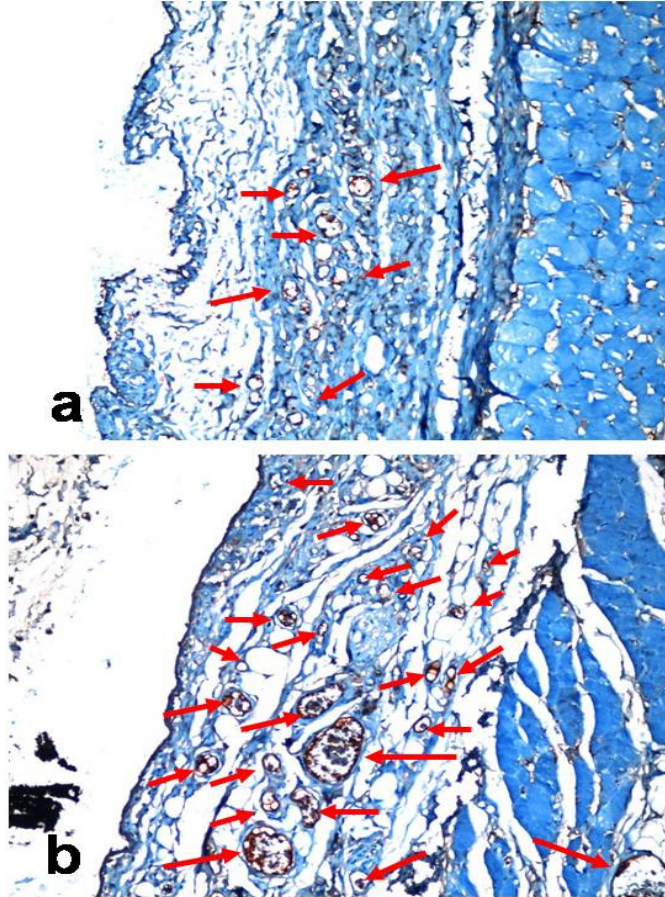
CD31 ve H-E ile boyama yapılmış, pedikülü 2. gün kesilmiş kontrol ve BVZM gruplarına ait fleplerin ışık mikroskopunda X20 büyütmedeki görünüşleri Şekil 18 ve 19'da gösterilmektedir.

Tablo 10: İmmünohistokimya boyama sonrası damar sayımı sonuçları.

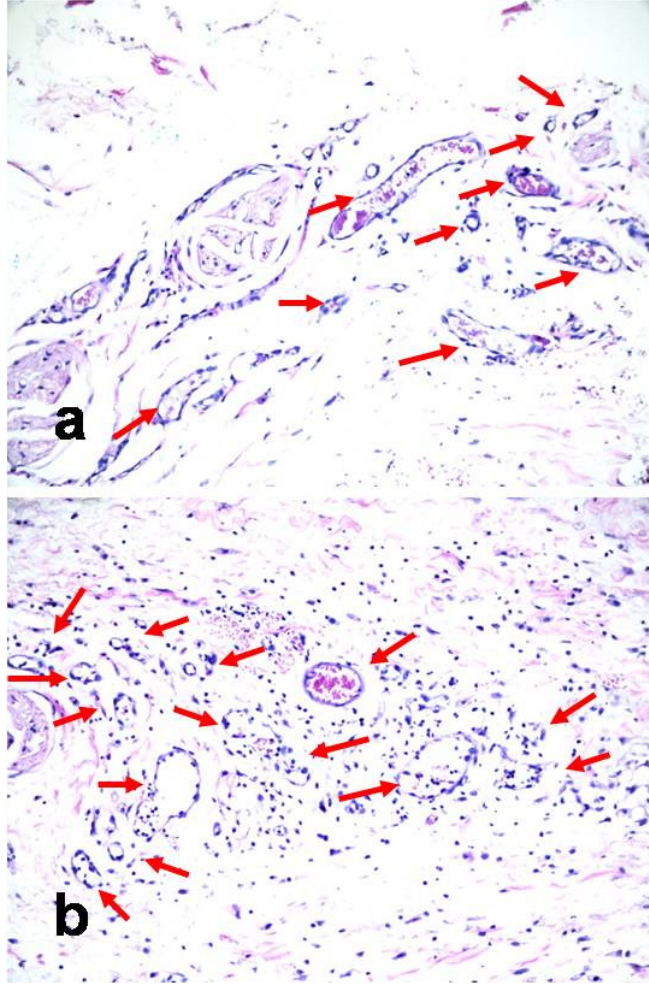
Günler	Kontrol (n=32)	BVZM (n=32)
2 (n=8)	91.1±7.9	247 ± 30.8*
3 (n=8)	121.5 ± 11.1	133.6 ± 7.4
4 (n=8)	132.4 ± 9.5	132.7 ± 8.01
5 (n=8)	140.6 ± 15.2	150.5 ± 16.6

*: Kontrol grubuna göre anlamlı istatistiksel fark ($p < 0,05$)

Damar sayımları sonucu; BVZM grubundaki damar sayısı, kontrol grubundaki damar sayısına göre 2. gün alt grubunda damar sayısı, artmış olarak bulundu. İstatistiksel olarak da anlamlı fark olduğu görüldü ($p < 0,05$).



Şekil 18: Kontrol grubu (a), BVZM grubu (b)'na ait flep pediküllerinin kesileceği 2. günde alınan örneklerden hazırlanan CD31 immün boya ile boyanmış kesitlerin ışık mikroskobu altında görüntüsü ($\times 20$ büyütme ile). Oklar damarsal yapıları göstermektedir. Damar endotelleri CD31 ile kahverengi olarak boyanmıştır. Damar yapıları içerisinde eritrositler ayırt edilebilmektedir. BVZM grubunda, kontrol grubuna göre damarlanmanın daha yoğun ve damar kalibrasyonlarının daha bariz olduğu görülmektedir.



Şekil 19: Kontrol grubu (a), BVZM grubu (b) için fleplerin pediküllerinin kesileceği 2. günde alınan örneklerden hazırlanan Hematoksilen-Eozin boya ile boyanmış kesitlerin, ışık mikroskobu altında görüntüsü (x20 büyütme ile). Damarsal yapılar oklar ile gösterilmektedir. Damar endotelleri Hematoksilen-Eozin boya ile mavi renkli olarak seçilmektedir. Bazı damarların içerisinde eritrositler pembe renkli olarak ayırt edilebilmektedir. Damar yoğunluğunun BVZM grubunda daha yoğun olduğu ve kontrol grubuna göre bariz şekilde fazla olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sıçanda kısa random-patern dorsal cilt flebi kullanılarak, pedikülden bağımsız (neovaskülarizasyona bağımlı) flep yaşayabilirliğinin değerlendirildiği çalışmada, ortalama sağ kalan alan oranı (canlı alan/toplam alan) kontrol grubunda; 2. gün %0, 3. gün %34.2, 4. gün %32.6, 5. gün %40.4, 6. gün %86.5, 7. ve 8. günlerde ise %100 olarak bulundu (Tablo 8). BVZM verilen grupta bu oranlar; 2. gün %43.9, 3. gün %100, 4. gün %76.3, 5. gün %94.6, 6. gün %95.5, 7. gün %98.7, 8. gün %98.6 olarak bulundu (Tablo 9). Anjiyogenezi baskıladığı bilinen bir ajan olan BVZM'in pedikülden beslenmesi ayrılmış olan random-patern deri flebinde süreye bağlı olarak oluşan neovaskülarizasyonu azaltacağını beklerken beklenenin tam tersi olarak, flep yaşayabilirliğinde belirgin artış gösterdi.

Deney öncesinde 7 adet sıçanda, flep pedikülü de aynı anda kesilerek nonvaskülarize edildi ve yerine dikildi. Böylece flebin sadece greft neovaskülarizasyon süreçleri ile yaşayabilirliğinin olmadığı gösterildi.

BVZM grubunda klinik olarak elde edilen artmış flep yaşayabilirliğinin gerçek bir damarlanma artışına bağlı olup olmadığını araştırmak üzere, neovaskülarizasyonun değerlendirilmesi için damar sayımı grubunda, histopatolojik ve immunhistokimyasal çalışmalar yapıldı. Damar endoteline spesifik olan CD31 ile yapılan immunhistokimyasal boyama yapılan kesit alanlarında, flep yaşayabilirliğinin değerlendirildiği gruplar arasındaki farkın çok olduğu ve neovaskülarizasyonun progresyon gösterdiği 2., 3., 4. ve 5. günlerde damar sayımı yapıldı.

Damar sayıları; kontrol grubunda, 2. gün 91.1 ± 7.9 , 3. gün 121.5 ± 11.1 , 4. gün 132.4 ± 9.5 , 5. gün 140.6 ± 15.2 olarak bulundu (Tablo 10). BVZM grubunda 2. günde 247 ± 30.8 , 3. gün 133.6 ± 7.4 , 4. gün 133.6 ± 7.4 , 5. gün 150.5 ± 16.6 olarak bulundu (Tablo 10). Histolojik incelemelerden elde ettiğimiz bu sonuçlar, damarlanmanın kontrol grubuna göre BVZM grubunda artmış olması, ortalama sağ kalan alan oranları sonuçlarını desteklemektedir. Bu durumda, VEGF inhibisyonu yaparak, antianjiyogenik etkili olduğu bilinen

bir ajanın verilmesiyle damarlanmanın artması olası birtakım mekanizmaların izahını gerektirmektedir.

Bilindiği üzere VEGF ve VEGF reseptörleri patolojik ve fizyolojik anjiyogenezde merkezi bir rol almaktadır. VEGF ve VEGF reseptörlerinin fonksiyonel inhibitörleri kolorektal, akciğer, böbrek ve karaciğer kanserli hastaların tedavilerinde kullanılmak için yakın zamanda onay almıştır. Fakat şu ana kadar hastaların tam olarak iyileşmediği, ve bu ilaçlara karşı bir direnç olabileceğinden bahsedilmektedir (234). Bu nedenle sadece VEGF-VEGFR sinyalinin değil aynı zamanda VEGF'den bağımsız anjiyogenez regülasyonunun altında yatan daha ileri moleküler mekanizmaların anlaşılması önemlidir.

VEGF sinyali bloke edildiği zaman alternatif proanjiyogenik mekanizmaların tümör damarlarını destekleyebileceği sorusunu akla getirmiştir (181). VEGF'nin çekilmesi perisitleri eksik olan küçük endotelial damarların hızlı apoptozise gitmesine neden olabilirken, mural hücrelerle birlikte olanların tercihen yaşamasına neden olabilir (235,236). VEGF blokajı sırasında damarlanmanın sebat etmesi, vasküler remodelizasyonda mural hücre toplanması ve Ang-1'i de içeren moleküllerin perivasküler ekspresyonunun olaya dahil olduğunu göstermektedir (237-240). Şu ana kadar farklı tümör sistemlerinde Ang-1'in aşırı ekspresyonunu geniş bir aralıkta değişen sonuçlarla birlikte tümör oluşumundaki Ang-1 sinyalinin rolünü tanımlamak oldukça güç olmuştur. Bazı araştırmacılar deneysel kolon kanseri ve skuamoz hücreli karsinom modellerinde anjiyogenez ve tümör büyümesinin önemli olarak sınırlandırıldığını bulmuşlar (241,242). Bunun tam tersi olarak Machein ve ark. ve Shin ve ark. servikal kanser ve glioma modellerinde tümör büyümesinin arttığını bildirmişlerdir (243,244). Bu farklılıkların potansiyel bir izahı; Ang-1'in etkilerinin koşula bağımlı olması şeklinde açıklanabilir. Örneğin; Tie-2 aktivasyonu, mikroçevresel stres durumlarında, diğer sinyaller rölaf olarak eksik olduğu zaman tümör perfüzyonu ve endotelial yaşamsal uyarıları artırabilir (245-247). Bu konseptte destek olarak Winkler ve ark. VEGF inhibisyonunun artmış tümör perfüzyonu ile ilişkili olan Ang-1'in ekspresyonunu uyarabileceğini

bildirmişlerdir (248). Casanovas ve ark. anti-VEGFR-2 antikorunu ile tedavi sırasında progresyon gösteren tümörlerin hipoksik olmadığını ve ayrıca Ang-1'in eksprese olduğunu bildirmişlerdir (248). VEGF, Tie-2'nin ekstrasellüler etkisinin örtülmesini ve proteolitik sürecini başlatabilir. VEGF kaybının bu reseptörün kullanılabilirliğini artırabileceği öne sürülmüştür (249). Bütün bunların bir araya getirilmesiyle bu gözlemlerin Ang-1/Tie-2 aktivasyonunun VEGF blokajının spesifik koşulunda tümör damarlanmasını desteklemek için bir fonksiyon gösterdiği ihtimalini artırmaktadır. Bu ihtimali güçlendirmek için yapılmış bir çalışmada Huang ve ark., VEGF blokajı sırasında damar yaşamı ve tümör büyümesine Ang-1/Tie-2 aktivasyonunun katkısını araştırmışlar; VEGF inhibisyonu sırasında hem Ang-1 aşırı ekspresyonu oluşmuş ve Ang-1 agonisti verilmesiyle tümörleri ve damarlanmayı regresyondan koruduğunu göstermişlerdir (181). Bu bağlamda Ang-1/Tie-2 aktivasyonu tümör hipoksisini sınırlamış, damar kalibrasyonunu artırmış ve mural hücrelerin bir araya gelmesini uyarmıştır (181). Huang ve ark. yaptığı çalışmada VEGF bağımlı damarlanmanın baskılandığı zaman tümör ve damar yaşamı için Tie-2 aktivasyonunun önemli olduğu bir modeli desteklemiştir (233). Bu çalışmada Ang-1 ekspresyonu tümör boyutunu değiştirmeden damar remodelizasyonunu uyarmıştır ve VEGF Trap ile oluşan vasküler ablasyonu önlemiştir (206). Biz de incelediğimiz CD31 ile immünohistokimyasal boyama yapılan kesitlerde, BVZM grubunda damar kalibrasyonlarının kontrol grubuna göre bariz bir şekilde artmış olduğunu gözlemledik (Şekil 19).

Endotelial hücre reseptör tirozin kinazları anjiyogenezin kritik mediyatörleri olarak bilinmektedir. Bunlardan VEGF/VEGFR ve Angiopoetinler/Tie2 reseptör ailelerinin vasküler gelişimde ve anjiyogenezdeki fonksiyonları detaylı çalışılmıştır. Fakat eph reseptör tirozin kinaz ailesi, reseptör tirozin kinazların daha yeni bir sınıfı olarak karşımıza çıkmaktadır ve anjiyogenezdeki rolü, özellikle erişkin organizmasında ortaya çıkmaya başlamıştır (250). Eph reseptörleri ve ephrinlerin gelişen bir organizmada önemli biyolojik süreçleri idare ettiği gösterilmiştir. Özellikle endotelial ve mezenkimal hücreler arasında Eph/ephrin moleküllerinin karşılıklı ekspresyonu mezenkimal hücrelerin matür damarların stabilitesi için

kritik olan perivasküler hücelere diferansiyasyonu için önemli olabilir (251). EphA2 ve EphB2'nin meme, cilt, beyin ve kolorektal kanser gibi çeşitli tümörlerde yükseldiği gösterilmiştir (252-255). Eph/ephrin ekspresyonu regülasyonunun hipoksi aracılığıyla olabileceği hipotezini destekleyen bir çalışmada, farede dorsal cilt flep modelinde hipoperfüzyonla sonuçlanan lokal hipoksinin biyolojik etkilerinin çalışıldığı bir model geliştirilmiştir (256). Bu çalışmada hipoksiden 24 saat sonra EphB4, ephrinB2, EphA2 ve ephrinA1'in anlamlı olarak yükseldiği immünohistokimyasal analizlerle doğrulanmıştır. Ve Eph reseptörleri ve ephrinlerin ekspresyonunun kan damarlarının sayısını artırdığını bulmuşlardır. Bu bulguların onların tümör neovaskülarizasyonunun ötesinde erişkin anjiyogenezindeki fonksiyonlara uzanan yara iyileşmesi ve doku tamirinde Eph/ephrinlerin potansiyel rolünü desteklediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada hipoksik koşullar altında HIF-1 α 'nın Eph/ephrin ekspresyonunda anahtar bir düzenleyici olduğu gösterilmiştir (256).

Yakın zamandaki çalışmalar anjiogenezde bir Delta-Notch yolunun varlığını ve bu yolun sadece arter-ven diferansiyasyonunu düzenlemediğini aynı zamanda damar oluşumunu stimüle ettiğini göstermiştir. Delta-like (Dll)4 ve Delta-like 4 bağlayıcısının endotelial hücelerden salındığı ve vasküler endotelial hücelerin fonksiyonel olmayan tomurcuklanmasını baskılayarak anjiyogeneze katkı sağladığı ortaya çıkarılmıştır (257). Dll4 eksik olan fareler zayıf bir dolaşım sistemine neden olarak kan damarlarının daha az fonksiyonel olmasıyla birlikte daha çok anormal tomurcuklanma göstermiştir (258). Dll4 için bir inhibitör fonksiyonel olmayan endotelial tomurcuklanma ve dallanmayı artırarak bir antianjiyogenik etkiye sahip olabilir (259).

FGF, EGF, HGF (Hepatosit Growth Factor) gibi büyüme faktörleri vasküler endotelial hücelere spesifik değildirler. Fakat endotelial hüceleri de içeren çeşitli hüceleri stimüle ederler. Fizyolojik koşullara yakın koşullar altında insan umbilikal ven endotelial hüceleri ve normal insan fibroblastları içeren bir kültür sisteminde bu büyüme faktörleri sadece VEGF varlığında anjiyogenezi stimüle ettiği bildirilmiştir (260). Fakat belirli patolojik durumlarda bu faktörlerin bazılarının VEGF sinyalinden bağımsız olarak anjiyogenezi

uyarıp uyarmadığı hala soruya açıktır. PDGF perisit ve düz kas hücre yaşam ve proliferasyonunun stimülasyonu ile anjiyogenezin önemli bir düzenleyicisidir. Fakat en azından belli kültür ortamlarında PDGF, endotelial hücre büyümesini doğrudan uyarmaktadır. Bu durum, patolojik koşullar altında veya masif anti-VEGF tedavi sonrası PDGF'nin vasküler endotelial hücrelerin proliferasyonunu uyarmak için major bir rol oynayıp oynamadığı ile ilişkili olabilir (255).

Nitrik Oksit (NO) vazomotor tonus ve normal ve patolojik damarlarda proliferasyon ve apoptozis arasında dengeyi de içeren vasküler hemostazda temel bir rol oynar. eNOS tümör anjiyogenezinde ve tümör damarlarında vazodilatasyonun sürdürülmesinde katkısı bulunmaktadır (261-263) ve tümör oluşumunda NO'nun rolü geniş bir şekilde araştırılmıştır (264,265). NO'nun, vasküler endotelial hücrelerde eNOS'u aktive eden VEGF gibi anjiyogenik faktörlerden sonra rol aldığı gösterilmiştir (266-268). Böylece VEGF'nin BVZM ile terapötik blokajı NO yolunu ve dolayısıyla endotelial fonksiyonu inhibe etmektedir. Baffert ve ark. fare trakeasının kapillerlerinde VEGF sinyali inhibisyonu sonrası görülen en erken değişiklikler arasında kan akımının kesilmesi ve damarın daralması olduğunu bildirmişlerdir (269). VEGF inhibisyonu sonrası kan akımının kesilmesi endotelial hücre apoptozunun eşlik ettiği kapillerlerin regresyonunun erken bir işareti olarak bildirilmiştir. Benzer özellikler endotelial hücre apoptozunun neden olduğu kan akımının kesilmesi sıçanın gözünün pupiller membranında gözlenmiştir (270).

BVZM ile tedavi edilen hastalarda gözlenen dermal kapiller seyrelme mikrovasküler endotelial hücrelerin apoptoz ve regresyonunu içerebileceği hipoteziyle yola çıkan Mourad ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada BVZM ile yapılan VEGF blokajı tümör olmayan dokularda yapılan incelemede endotelial fonksiyon ve dermal kapiller dansitede belirgin değişikliklerle sonuçlanmış (271). Bu anjiyogenik faktör olan VEGF'nin etkisiz hale gelmesi ve dolayısıyla, NO yolunun nonspesifik blokajı ile açıklanabilir. Endotelial disfonksiyon ve mikrovasküler seyrelmenin bu hastalarda esansiyel hipertansiyonla birlikte gözlenmesi; bütün sistemik vasküler ağda endotelial

fonksiyonda değişme ve kapiller seyrelmeyle açıklanabilecek BVZM kaynaklı arteryel basınçta artışla ilişkili olabilir (271).

Yukarıdaki çalışma bize, çalışmamızdaki BVZM grubunda elde ettiğimiz artmış flep yaşayabilirliğinde, BVZM ile oluşturulan bir önkoşullandırma mekanizmasının rol alıp alamayacağını düşündürmüştür. İskemik önkoşullama olayı ve farmakolojik önkoşullama, esas cerrahi işlemden önce dokunun belli epizodlarda iskemi veya farmakolojik manipölasyonlarla koşullandırılması olup letal iskemiyeye karşı bir koruma sağlar. Adenozin (272), monofosforil lipid A (273), epinefrin(274), deksametazon (275), fenoksibenzamin (276), fentolamin (276), karnitin, nitrogliserin içeren çeşitli farmakolojik önkoşullamalar cilt ve kas fleplerinde denenmiştir.

Matsumura H. ve ark. sıçanda bipediküllü random paternli dorsal deri flebi modelinde Adenozin (0,5 mg/ml) kullanarak farmakolojik önkoşullamayı iskemik önkoşullama ile kıyasladıkları çalışmada postoperatif 7. günde flep yaşayabilirliğini değerlendirmişler. Her iki önkoşullama grupları arasında önemli farklılık olmadığını ancak kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu bulmuşlar. Bu sonucu, Adenozin; A1 reseptör aktivitesini, nötrofil aracılı iskemi-reperfüzyon hasarını önlemekte, ATP bağımlı K⁺ kanallarını açarak hücreye K⁺ girişini arttırmakta, hücre zarında hiperpolarizasyona yol açmaktadır. Bu sayede Ca⁺² kanalları açılarak reperfüzyon sırasındaki Ca⁺² girişi sınırlanmaktadır. ATP bağımlı K⁺ kanallarının açılması; ATP tüketimini, glikojen yıkılımını ve anaerobik glikolizi engelleyerek hücre enerji kaynaklarını korumaktadır (272).

Maldonado C. ve ark. sıçan latissimus dorsi kas flebi modelinde, iskemik önkoşullama ve sistemik IV bolus monofosforil lipid A' yı kullanarak yaptıkları çalışmada kastaki nekroz oranlarını değerlendirmişler. İskemik önkoşullama grubunda kontrol grubuna göre nekroz oranı %57 daha az olarak, Monofosforil lipid A grubunda kontrol grubuna göre nekroz oranı %58 daha az olarak bulmuşlardır. Monofosforil lipid A'nın kas flebinde nekroz azaltıcı etkisinin hücre içi sinyal araçlarının tetiklenmesine ve nitrik oksit artışına bağlı olduğu belirtilmiştir (273).

Karacaoğlu E. ve ark. sıçan TRAM flebi modelinde cerrahi delay prosedürüne alternatif olarak epinefrin yüklü mikrokürelerin TRAM flebi altına enjeksiyonuyla yaptıkları farmakolojik delay'i karşılaştırmışlar. Yaşayan yüzey alanı değerlendirilmesinde farmakolojik geciktirme ile cerrahi geciktirme arasında benzer sonuçlar elde etmişler; kimyasal delay daha az invazif, daha az zaman alan, ve çok daha cost efektif olduğu sonucuna ulaşmışlardır (274).

Hostuner M. ve ark. sıçan rectangular random-pattern bipediküllü flep modelinde cerrahi iskemik önkoşullamayı, flep içine 2.5 mg/kg deksametazon enjeksiyonu ile yapılan farmakolojik önkoşullamayı ve cerrahi ile beraber farmakolojik önkoşullamayı, postoperatif 7. günde flepte yaşayan alanlarını hesaplayarak değerlendirmişlerdir. Yaşayan alan; cerrahi iskemik önkoşullama ve farmakolojik önkoşullama gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmış olarak; iskemik önkoşullama ve deksametazon ile farmakolojik önkoşullamanın birlikte oluşturdukları koruyucu etkinin her iki yöntemin etkisinin toplamı kadar olduğu ve bunun sonucu olarak farklı mekanizmalar ile etki gösterdiklerini vurgulamışlardır (275).

Wexler ve ark. sıçanda kranial bazlı random patern flep modelinde; fenoksibenzamin, fentolamin, 6-hidroksidopamin kullanarak flep yaşayan alanları postoperatif 8. günde değerlendirmişlerdir. Fenoksibenzamin, Fentolamin ve 6-hidroksidopamin grupları, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında flep yaşayabilirliklerinin daha iyi olduğunu göstermişlerdir (276).

Tellioğlu ve ark. sıçan random paternli dorsal deri flebi modelinde; 50 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün karnitin kullanarak postoperatif 8. günde fleplerdeki nekroz alanlarını değerlendirmişlerdir. Karnitin'in doza bağlı olarak flep nekroz alanlarında anlamlı olarak azalma yaptığını gözlemişlerdir (277).

Rohrich ve ark. rat ve domuz dorsal cilt flep modellerinde Nitrogliserin'i lokal olarak kullanarak yaşayan alan oranlarını değerlendirmişlerdir. Nitrogliserin'in yaşayan alan oranlarını anlamlı derecede artırdığını gözlemişler ve bunun tedavi sırasında ölçülen plazma nitrogliserin seviyeleri ile uyumlu olduğunu bulmuşlardır (278).

Nezami B.G. ve ark. yaptıkları çalışmada, immunofilin bağlayıcı ajanlar olarak sınıflandırılan siklosporin-A ve tacrolimus (FK-506) ile random patternli cilt fleplerinde yapılan lokal farmakolojik önkoşullandırmanın, ortalama doku yaşamını artırmada, klempleme ile yapılan iskemik önkoşullandırmadan daha etkili olduğu gösterilmiştir. Siklosporin-A ve FK-506 ile önkoşullandırmadan sonra ve esas cerrahi prosedürden hemen önce Nitrik Oksit Sentaz (NOS) substratı olan L-Arginine verilmesinin bu etkiyi potansiyelize ettiği bildirilmiştir (279). Bazı araştırmalar siklosporin-A ve FK-506'nın dokularda NO üretimini azaltabileceğini göstermiştir (280-283). Yazara (279) göre iskemik dokuda NO'in bilinen koruyucu etkisi ve bu çalışmada siklosporin-A ve FK-506 ile elde edilen koruyucu etki ilk bakışta bir paradoks arz etmektedir. Fakat NO üretimini, siklosporin-A ve FK-506'nın azaltıcı etkisinden başka doku yaşamını artırıcı bağımsız bir yolun göz önüne alınması bu olayı açıklayabileceği söylenmektedir. Siklosporin veya FK-506 ve subefektif dozlarda L-arginine'in kombinasyonu sonrası artmış flep yaşamının, siklosporin-A ve FK-506 etkisiyle azalmış NO seviyelerinin kompanzasyonu nedeniyle olabileceği bildirilmiştir (279). Daha önce bahsedilen çalışmadan da elde edilen endotelial disfonksiyon ve dermal kapiller seyrelme bulgularının, BVZM ile VEGF'in ortadan çekilmesi ve dolayısıyla NO yolunun blokajı nedeniyle olabileceği bildirilmiştir (271).

Çalışmamızda elde edilen artmış flep yaşayabilirliği de siklosporin ve FK-506 gibi BVZM'ın da benzer mekanizma ile farmakolojik önkoşullama oluşturabileceği bu tür çalışmalarla açıklığa kavuşturulabilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda BVZM grubunda, kontrol grubuna göre elde edilen pedikülden beslenmesi ayrılmış olan random-pattern deri flebinde süreye bağlı olarak oluşan neovaskülarizasyon ile flep yaşayabilirliğindeki anlamlı artış, beklenenin tersine bir bulgu olarak karşımıza çıkmıştır. BVZM'ın bu etkisi, bir farmakolojik önkoşullama ile izah edilebileceği gibi, VEGF blokajı nedeniyle Anjiopoetin 1/Tie-2, Eph/ephrin veya Delta-notch yolağı gibi alternatif anjiyogenez yolları ve nonspesifik büyüme faktörlerinin, VEGF'den bağımsız bir kompensatuar anjiyogenez mekanizması üzerinden açıklanması, yapılacak farklı çalışmalarla açıklığa kavuşturulabilir. Elde

ettiğimiz bulguların, BVZM ile ilgili tartışmalara farklı bir ivme katacağı düşüncesindeyiz.

ÖZET

Sıçanlarda, Bevacizumab'ın Random-Patern Flep Yaşayabilirliği Üzerine Etkisinin Araştırılması

Vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ve reseptörleri patolojik ve fizyolojik anjiyogenezde merkezi bir rol almaktadır. Bevacizumab (Altuzan® 100mg/4ml) ilk kez kolon ve rektum kanserlerinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı alan ve insan VEGF'e spesifik olarak bağlanarak onun biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant insan monoklonal antikorudur (rhuMAb VEGF)'dur. Sıçanda pedikülden bağımsız neovaskülarizasyona bağlı flep yaşayabilirliğini gösteren dorsal kaudal bazlı random-patern bir cilt flep modelinde, Bevacizumab'ın etkisinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmamızda 150-250 gr ağırlığında dişi Wistar Albino sıçanlar kullanıldı. Flep Yaşayabilirliği Değerlendirilmesi Grubu ve Neovaskülarizasyon Değerlendirilmesi için Damar Sayımı Grubu olarak 2 ana grupta kontrol ve BVZM grupları çalışıldı.

DeneySEL flep modeli olarak, sıçan sırtında kaldırılan kaudal bazlı random-patern deri flebi seçildi. Sıçanların bir kısmında ameliyat sonrası 2.- 8. günlerde fleplerin pedikülleri kesilerek pedikülden bağımsız flep yaşayabilirliği değerlendirildi. Gruplarda geriye kalan hayvanlar ameliyat sonrası 2.-5. Günlerde sakrifiye edilerek histolojik analiz için örnekler alındı.

Flep sağ kalım sıklığı ve ortalama sağ kalan alan oranı 2., 3., 4. ve 5. günlerin herbirinde BVZM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu. Tam flep sağkalımı oranı ise 3., 4., ve 5. günlerin herbirinde BVZM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış idi. CD31 için immünohistokimyasal boyama yapılmış kesitlerde yapılan damar sayımlarının sonucu; 2. gün alt grubunda BVZM grubunda kontrol grubuna göre artmış bulundu.

VEGF inhibisyonu yaparak antianjiyogenik etkili olduğu bilinen bir ajanın verilmesiyle damarlanmanın artması olası birtakım mekanizmaların izahını gerektirmektedir. BVZM'ın bu etkisi, bir farmakolojik önkoşullama ile izah edilebileceği gibi, VEGF blokajı nedeniyle Anjiopoetin 1/Tie-2, Eph/ephrin veya Delta-notch yolağı gibi alternatif anjiyogenez yolları ve nonspesifik büyüme faktörlerinin, VEGF'den bağımsız bir kompensatuar anjiyogenez mekanizması üzerinden açıklanabilir.

Anahtar Sözcükler: Bevacizumab, neovaskülarizasyon, VEGF, pedikülden bağımsız flep yaşayabilirliği.

SUMMARY

The Investigation Of The Effect Of Bevacizumab On Random-Patterned Flap Viability, In Rats

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is a central role in pathological and physiological angiogenesis. Bevacizumab (Altuzan® 100mg/4ml) is a recombinant human monoclonal antibody which specifically bind to human VEGF and neutralizes biological activity. It has approval from FDA for the treatment colon and rectal cancers. We aimed to investigate the effect of Bevacizumab on neovascularization independent of pedicles caudally based dorsal random-pattern skin flap viability of the flap showing the model in rats.

We used weighing 150-250 g female Wistar albino rats in our study. Control and BVZM groups were studied in 2 main groups the Evaluation of flap viability group and the assessment of neovascularization for vascular census group.

As an experimental flap model, caudal circulation-based random-pattern skin flap which removed from rats back was chosen. Some of the rats after surgery 2-8 regardless of the viability of the flap pedicles were cut from the days flaps pedicles. The rest of the animals in groups after surgery were sacrificed at 2-5. days and samples were taken for histological analysis.

The frequency of flap survival and the mean rate of the survival area were significantly increased in BVZM group than the control group at 2., 3, 4 and 5th days. Full flap survival rate increased in BVZM group than the control group at 3., 4., and 5th days. The vessel counts of crosssections which are stained with immunohistochemical for CD31 were increased in BVZM group than the control group at 2nd day.

The increase in vascularization when given chemical agent which is known to antiangiogenic by inhibition of VEGF requires on explanation of possible mechanisms. BVZM's this effect can be explained by such as a pharmacological preconditioning or Anjiopoetin 1/Tie-2, Eph / ephrin or the delta-notch pathways and non-specific growth factors such as alternative ways of angiogenesis due to the blockage of VEGF or VEGF independent mechanism of compensatory angiogenesis can be explained through an.

Keywords: Bevacizumab, Neovascularization, VEGF, The viability of regardless of flap pedicle.

KAYNAKLAR

1. Jurell G. *Adrenergic nerves and the delay phenomenon*. Ann Plast Surg 17(6): 493-497, 1986.
2. The Hoang N, Kloeppel M, Staudenmaier R, Schweinbeck S, Biemer E. *Neovascularization in prefabricated flaps using a tissue expander and an implanted arteriovenous pedicle*. Microsurgery. 2005;25(3):213-9.
3. Roh C, Lyle T. *Cutaneous Stem Cells and Wound Healing*. Pediatric Research 2006; Vol. 59, No. 4, Pt 2. 2006 International Pediatric Research Foundation, Inc.
4. Diegelmann RF, Evans MC. *Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing*. Front Biosci. 2004 Jan 1;9:283-9.
5. Yao F, Visovatti S, Johnson CS, Chen M, Slama J, Wenger A. *Age and Growth Factors in Porcine Full-Thickness Wound Healing*. Wound Repair and Regeneration (Wound Rep. Reg.), 2001;9(5), 371-377.
6. Desmoulière A., Chaponnier C., Gabbiani G. *Tissue Repair, Contraction, and Myofibroblast*. Wound Rep. Reg. 2005; 13: 7-12.
7. Ashcroft GS, Horan MA, Ferguson MWJ. *The Effects of Ageing on Wound Healing: Immunolocalisation of Growth Factors and Their Receptors in a Murine Incisional Model*. J. Anat. (Ageing and wound healing), 1997;190, 351-365.
8. Folkman J, Klagsbrun M. *Angiogenic factors*. Science. 1987 Jan 23;235(4787):442-7.
9. Koch, A E. *Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1998; 41: 951-962.
10. Ferrara, N. and Alitalo, K. *Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors*. Nat Med. 1999;5: 1359-1364.
11. Abbé R. *A new plastic operation for the relief of deformity due to double harelip*. Med Rec 1898; 53: 477.
12. Zapater E, Simon E, Ferrandis E, Vendrell JB. *Reconstruction of the upper lip, columella and premaxilla with an extended Abbé flap*. Auris Nasus Larynx. 2002; 29(3): 305-308.
13. Rohrich RJ, Zbar RI. *The evolution of the Hughes tarsoconjunctival flap for the lower eyelid reconstruction*. Plast Reconstr Surg. 1999 Aug;104(2):518-22; quiz 523; discussion 524-6.

14. Oo KK, Park SS. *The midline forehead flap in nasal reconstruction*. Facial Plast Surg Clin North Am. 2011 Feb;19(1):141-55.
15. Moyer JS. *Reconstruction of extensive nasal defects with staged bilateral paramedian forehead flaps*. Ann Plast Surg. 2010 Aug;65(2):188-92.
16. Fudem GM, Montilla RD, Vaughn CJ. *Single-stage forehead flap in nasal reconstruction*. Ann Plast Surg. 2010 May;64(5):645-8.
17. Kleintjes WG. *Forehead anatomy: arterial variations and venous link of the midline forehead flap*. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2007;60(6):593-606.
18. Zhang F, Lei MP, Oswald TM, et al. *The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischemic skin wounds*. Br J Plast Surg. 2003;56:334.
19. Shih T, Lindley C. *Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies*. Clin Ther. 2006 Nov;28(11):1779-802.
20. Van Meter ME, Kim ES. *Bevacizumab: current updates in treatment*. Curr Opin Oncol. 2010 Nov;22(6):586-91.
21. Rhodin J. *Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules and small collecting veins*. J Ultrastr Res 15:452-5000, 1968.
22. Braverman IM, Keh-Yen A. *Ultrastructure of the human dermal microcirculation. III. The vessel in the mid-and lower dermis and subcutaneous fat*. J Invest Dermatol 77:297-304, 1981.
23. Braverman IM, Yen A. *Ultrastructure of the human dermal microcirculation. II. The capillary loops of dermal papillae*. J Invest Dermatol 68:44-52, 1977.
24. Cormack GC, Lamberty BG. *Cadaver studies of correlation between vessel size and anatomical territory of cutaneous supply*. Br J Plast Surg. 1986 Jul;39(3):300-6.
25. Mathes sj. *Flap Physiology*. In: Hentz VR, editor. *Mathes plastic surgery*. Philadelphia. 483-506, 2006.
26. Daniel RK, Kerrigan CL. *Principles and physiology of skin flap surgery*. In: Plastic Surgery (Vol 1: General Principles), Mc Carthy JG (ed), W. B. Saunders Company. 275–328, 1990.
27. Spalteholz W. *ie Vertheilung der Blutgefasse in der Haut*. Arch Anat Entwcklungs-Gesch (Leipz) 1:54, 1893.

28. Kerrigan CL. *Skin flap failure: pathophysiology*. *Plast Reconstr Surg* 72(6): 766-777, 1983.
29. Myers MB, Cherry G. *Design of skin flaps to study vascular insufficiency*. *J Surg Res.*7:399-405, 1967
30. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. *Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery*. *Plast Reconstr Surg* 79(6): 990-997, 1987.
31. Nathanson SE, Jackson RT. *Blood flow measurements in skin flaps*. *Arch Otolaryngol* 1975: 101(6): 354-357.
32. Bakamjian VY. *A two-stage method for pharyngoesophageal reconstruction with a primary pectoral skin flap*. *Plast Reconstr Surg* 36: 173-184, 1965.
33. Kerrigan CL, Daniel RK. *Skin flap research: a candid view*. *Ann Plast Surg* 13(5): 383-387, 1984.
34. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. *Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282(6): 88-95, 2002.
35. Blaisdell FW. *The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review*. *Cardiovasc Surg* 10(6): 620-630, 2002.
36. Maeda M, Fukui A, Tamai S. *Combined therapy with antithrombotic agents and radical scavengers for reperfusion injury of flaps*. *J Reconstr Microsurg* 7(3): 233-243, 1991.
37. Olivas TP, Saylor TF, Wong HP, Stephenson LL, Zamboni WA. *Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion*. *Plast Reconstr Surg* 107(3): 785-788, 2001.
38. Hashimoto I, Nakanishi H, Shono Y, Yamano M, Toda M. *The features of thrombus in a microvessel injury model and the antithrombotic efficacy of heparin, urokinase, and prostaglandin E1*. *Plast Reconstr Surg* 111(7): 2307-2314, 2003.
39. May JW, Jr., Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV. *The no-reflow phenomenon in experimental free flaps*. *Plast Reconstr Surg* 61(2): 256-267, 1978.
40. Calhoun KH, Tan L, Seikaly H. *An integrated theory of the no-reflow phenomenon and the beneficial effect of vascular washout on no-reflow*. *Laryngoscope* 109(4): 528-535, 1999

41. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog*. Circulation. 67(5):1016-1023, 1983.
42. Bayramicli M. *Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri*(1. Baskı). İstanbul: Argos, May 1995, p. 455.
43. McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA. *The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention*. Plast Reconst Surg. 1965 Feb;35:177-82.
44. Thompson FM, Berakha RJ, Guthrie RH Jr. *The effective duration of the delay phenomenon in the rat*. Plast Reconst Surg. 1977;60:384.
45. Tagliacozzi G. e *Curtorum Chirurgia per Insitionem*. Venetiis: G Bindonus, 1597
46. Stelnicki EJ, Youg VL, Francel T, Randall P: *Vilray P. Blair, his surgical descendants, and their role in plastic surgical development*. Plast Reconstr Surg 1999; 103:1990
47. Milton SH. *The effects of "delay" on the survival of experimental pedicled skinflaps*. Br J Plast Surg 22:244-252, 1965
48. Myers MB, Cherry G. *Augmentation of tissue survival by delay: an experimental study in rabbits*. Plast Reconstr Surg. 1967 pr;39(4):397-401.
49. Myers MB, Cherry G. *Design of skin flaps to study vascular insufficiency*. J Surg Res.7:399-405, 1967
50. Myers M. B., and Cherry G. *Mechanism of the delay phenomenon*. Plast. Reconstr. Surg. 44: 52, 1969.
51. Myers M. B., and Cherry G. *Differences in the delay phenomenon in the rabbit, rat, and pig*. Plast. Reconstr. Surg. 47: 73, 1971
52. Daniel RK, Kerrigan CL. *Principles and physiology of skin flap surgery*. In: *Plastic Surgery* (Vol 1: General Principles), Mc Carthy JG (ed), W. B. Saunders Company. 275 – 328, 1990.
53. Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, Zienowicz RJ. *Chemical delay: an alternative to surgical delay experimental study*. Ann Plast Surg 49(1): 73-80, 2002
54. Hosnuter M, Babuccu O, Kargi E, Altinyazar C. *Dual preconditioning: effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival*. Ann Plast Surg 50(4): 398-402, 2003.

55. Smith RJ, Birndorf M, Gluck G, Hammond D, Moore WD. *The effect of lowenergy laser on skin-flap survival in the rat and porcine animal models.* Plast Reconstr Surg 89(2): 306-310, 1992.
56. Adanali G, Seyhan T, Turegun M, Senen D, Sensoz O. *Effects of Different vascular patterns and the delay phenomenon on rat ventral island flap viability.* Ann Plast Surg. 2002 Jun;48(6):660-4.
57. Callegari PR, Taylor GI. *An anatomical review of the delay phenomenon: I. Experimental studies.* Plast Reconstr Surg 1992; 89: 397
58. Callegari PR, Taylor GI, Caddy CM, et al. *An anatomic review of delay phenomenon. I. Experimental studies.* Plast Reconstr Surg 89:397-407, 1992.
59. Morris SF, Taylor GI. *The time sequence of the delay phenomenon: when is a surgical delay effective? An experimental study.* Plast Reconstr Surg 1995; 95:526
60. Fisher J., Gingrass M.K.: *Basic Principles of skin flaps. Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery* Ed.:Georgiade,G.S., Riefkohl,R.Levin ,L.S.Third. Ed. Williams & Wilkins .p. 19,1997
- 61 Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ishemic myocardium.* Circulation. 1986;74:1124-1136.
62. Nakano A, Cohen MV, Downey JM. *Ishemic preconditioning: from basic mechanisms to clinical applications.* Pharmacol Ter. 2000;86:263-275.
63. Matsumura H, Yoshizawa Y, Vedder NB, et al. *Preconditioning of the distal portion of a rat random-pattern skin flap.* Br J Plast Surg. 2001; 54:58-61.
64. Maldonado C, Stadelmann WK, Ramirez S, et al. *Preconditioning of latissimus dorsi muscle flaps with monophosphorly lipid a.* Plast Reconst Surg. 2003;111:267-274.
65. Hosnuter M, Babuccu O, Kargi E, et al. *Dual preconditioning: Effcets of pharmacological plus ishemic preconditioning on skin flap survival.* Ann Plast Surg. 2003;50:398-402.
66. Kerrigan CL, Daniel RK. *Pharmacologic treatment of the failing skin flap.* Plast Reconst Surg. 1982;70:541.
67. Davis RE, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. *Comparison of topical anti-ishemic agnets in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats.* Arch Facial Plast Surg. 1999;1:27.

68. Emery FM, Kodey TR, Bomberger RA, McGregor DB. *The effect of nifedipine on skin-flap survival*. *Plast Reconstr Surg*. 1990;85:61.
69. Shalom A, Westreich M. *Effect of high dose and low dose aspirin on survival of random pattern flaps in rats*. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2001 Jun;35(2):117-21.
70. Miyawaki T, Jackson IT, Elmazar H, Bier UC, Barakat K, Andrus L, Williams F. *The effect of low-molecular-weight heparin in the survival of a rabbit congested skin flap*. *Plast Reconstr Surg*. 2002 May;109(6):1994-9.
71. Nakanishi Y, Nakajima T, Yoshimura Y, Okamoto Y, Yamada T. *The transepidermal absorption of prostaglandin E1 as a topical ointment: An experimental study of application over a rat skin flap*. *Ann Plast Surg*. 1998;40:44.
72. Karacaoğlan N, Akbaş H. *Effect of parenteral pentoxifylline and topical nitroglycerin on skin flap survival*. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;120:272.
73. Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B. *Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia*. *Gene Ther*. 2001;8:523.
74. Hijjawi J, Mogford JE, Chandler LA. *Platelet derived growth factor B but not fibroblast growth factor 2, plasmid DNA improves survival of ischemic myocutaneous flaps*. *Arch Surg*. 2004;139:142
75. Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. *The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: Examination of various routes of administration*. *Br J Plast Surg*. 2000;53:234.
76. Shimpo M, Ikeda U, Maeda Y, et al. *AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model*. *Cardiovasc. Res*. 2002;53:993.
77. Zhang F, Lei MP, Oswald TM, et al. *The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischemic skin wounds*. *Br J Plast Surg*. 2003;56:334.
78. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, et al. *Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps*. *Plast Reconstr Surg*. 1998;102:2033.
79. Huemer GM, Wechselberger G, Otto-Schoeller A, Gurunluoglu R, Piza-Katzer H, Schoeller T. *Improved dorsal random-pattern skin flap survival in*

rats with a topically applied combination of nonivamide and nicoboxil. Plast Reconstr Surg. 2003 Mar; 111(3):1207-11.

80. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. *Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment.* Plast Reconstr Surg. 1984; 73:943.

81. Roh C, Lyle S. *Cutaneous stem cells and wound healing.* Pediatr Res. 2006 Apr;59(4 Pt 2):100R-3R.

82. Laurence R. *Wound Healing, Growth Factors*, Department of Surgery, University of Alabama at Birmingham Hospital, February 17, 2006.

83. Meier K, Nanney LB. *Emerging New Drugs for Wound Repair.* Expert Opinion Emerging Drugs 11(1):23-37(2006).

84. Nursal TZ, Baykal A, Hamaloğlu E. *Wound Healing in the Elderly: Is there a difference?* Turkish Journal of Geriatrics Geriatri, 2(1):29-32, 1999.

85. Gabriel A. et al. *Wound Healing, Growth Factors.* eMedicine Specialties. 2009 May 27.

86. Yao F, Visovatti S, Johnson CS, Chen M, Slama J, Wenger A. *Age and Growth Factors in Porcine Full-Thickness Wound Healing.* Wound Repair and Regeneration (Wound Rep. Reg.), 2001; 9(5), 371-377.

87. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H. *Angiogenesis: an update.* Histol Histopathol 1994;9:807 - 843.

88. Carmeliet P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.* Nat Med. 2000 Apr;6(4):389-95.

89. Carmeliet P. *Angiogenesis in life, disease and medicine.* Nature. 2005 Dec 15;438(7070):932-6.

90. Crocker DJ, Murad TM, Geer JC. *Role of the pericyte in wound healing. An ultrastructural study.* Exp Mol Pathol 1970;13: 51-65.

91. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H. *Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis.* J Cell Biol 2001;153:543–553

92. Lin RC, Rosenfeld PJ. *Antiangiogenic therapy in neovascular age-related macular degeneration.* Int Ophthalmol Clin 2007;47:117–137

93. Zhanga F, Leia MP, Oswalda TM, Pangb Y, Blaina B, Caib ZW, Lineaweaver WC. *The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on the Healing of Ischaemic Skin Wounds.* The British Association of Plastic Surgeons, 56, 334–341(2003).

94. Mathes sj. Flap Physiology. In: Hentz VR, editor. Mathes plastic surgery. Philadelphia. 483-506, 2006.
95. Robinson CS, Stringer SE. *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci 2001;114:853-865.
96. Zhanga F, Leia MP, Oswalda TM, Pangb Y, Blaina B, Caib ZW, Lineaweaver WC. *The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on the Healing of Ischaemic Skin Wounds*. The British Association of Plastic Surgeons, 56, 334–341(2003).
97. Poon RT, Fan ST, Wong J. *Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches*. Ann Surg. 2003;238:9-28
98. Semenza GL.. *Vascular Responses to Hypoxia and Ischemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:648-652.
99. Ke Q, Costa M. *Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1)*. Mol Pharmacol :70:1469-1480.
100. Vihanto MM, Plock J, Erni D, Frey BM, Frey FJ, Huynh-Do U. *Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin*. The FASEB Journal express article 10.1096/fj.04- 647fje. Published online August 4, 2005.
101. Ferrara N. *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors*. Nat Rev Cancer. 2002; 2:795-803.
- 102., Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA. *Vascular endothelial growth factor: a new member of the Platelet-derived growth factor gene family*. Biochem Biophys Res Commun 1989;165:1198 - 1206.
103. Spinella F, Rosanò L, Del Duca M, Di Castro V, Nicotra MR, Natali PG, Bagnato A. *Endothelin-1 inhibits prolyl hydroxylase domain 2 to activate hypoxia-inducible factor-1alpha in melanoma cells*. PLoS One. 2010 Jun 21;5(6):e11241
104. Fang HY, Hughes R, Murdoch C, Coffelt SB, Biswas SK, Harris AL, Johnson RS, Imityaz HZ, Simon MC, Fredlund E, Greten FR, Rius J, Lewis CE. *Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia*. Blood. 2009 Jul 23;114(4):844-59.

105. Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. *Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction*. N Engl J Med. 2000 Mar 2;342(9):626-33.
106. Rey S, Semenza GL. *Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling*. Cardiovascular Research. 2010; 86, 236–242
107. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S et al. *Cell typespecific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1*. Circ Res 2003;93:1074–1081.
108. Simon MP, Tournaire R, Pouyssegur J. *The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1*. J Cell Physiol 2008;217:809–818.
109. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ et al. *Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1*. Blood 2005; 105:659–669
110. Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley JB, Sarkar K, Kimura H, Liu YV et al. *Effects of aging and hypoxia-inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia*. Circ Res 2007;101:1310-1318.
111. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol. 1996 Sep;16(9):4604-13.
112. Semenza GL. *Perspectives on oxygen sensing*. Cell. 1999 Aug 6;98(3):281-4.
113. Semenza GL. *Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1*. J Clin Invest. 2000 Oct;106(7):809-12.
114. Hickey MM, Simon MC. *Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors*. Curr Top Dev Biol. 2006;76:217-57.
115. Semenza GL. *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):721-32.
116. . Glotzbach JP, Levi B, Wong VW, Longaker MT, Gurtner GC. *The basic science of vascular biology: implications for the practicing surgeon*. Plast Reconstr Surg. 2010 Nov;126(5):1528-38.

117. Ferrara N. *Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications*. Semin Oncol. 2002;29:10-4.
118. Ferrara N. *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors*. Nat Rev Cancer. 2002; 2:795-803.
119. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science 1983;219:983 - 985
120. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA. *Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family*. Biochem Biophys Res Commun 1989;165:1198-1206.
121. Oosthuysen B, Moons L, S torkebaum E,, et al. *Dilatation of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration*. Nat Gene 2001;28:131-138.
122. Werner S, Grose R. *Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines*. Physiol Rev. 2003;83, 835–870.
123. Bhisitkul RB. *Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatment*. Br J Ophthalmol 2006;90:1542-1547.
124. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)*. J Cell Mol Med 2005;777 - 794.
125. Shams N, Ianchulev T. *Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis*. Ophthalmol Clin N Am 2006;19:335-344.
126. Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, et al. *Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease*. Prog Retin Eye Res 2003;22:1-29.
127. Kaiser PK. *Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease*. Am J Ophthalmol 2006;142:660-668
128. Rahimi N. *Vascular endothelial growth factor receptors: Molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials*. Exp Eye Res 2006; 83:1005-1016.
129. Soker S, Takashima S, Miao HQ, et al. *Neuropilin- 1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isiform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell 1998;92:735 - 745.

130. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. *Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis*. Nat Med. 2001;7:192-8.
131. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. *VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics*. Nat Med. 2001;7:186-91.
132. Folkman J. *Tumor angiogenesis: Therapeutic implications*. N Eng J Med 1971;285:1182-6.
133. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. Am J Pathol. 1995;146:1029-39
134. Lala PK, Chakraborty C. *Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression*. Lancet Oncol. 2001;2:149-56.
135. Bates DO. *Vascular endothelial growth factors and vascular permeability*. Cardiovasc Res. 2010 Jul 15;87(2):262-71..
136. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. *Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors*. J Anat. 2002;200:581-97.
137. Ferrara N, Davis-Smyth T. *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev. 1997;18:4-25.
138. Ferrara N. *Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Jun;280(6):C1358-66.
139. Konopatskaya O, Churchill AJ, Harper SJ, et al. *VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice*. Mol Vis 2006;12:626-632.
140. Bhisitkul RB. *Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments*. Br J Ophthalmol. 2006 Dec;90(12):1542-7.
141. Zhang SX, Ma JX. *Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy*. Prog Retin Eye Res 2007;26:1-37.
142. Shams N, Ianchulev T. *Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis*. Ophthalmol Clin N Am 2006;19:335 - 344.

143. Kaiser PK. *Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease*. Am J Ophthalmol 2006;142:660-668.
144. Tong JP, Yao YF. *Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: A need for balanced expressions*. Clin Biochem 2006;39:267 - 276.
145. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. *Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2000;97:10242-10247.
146. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciort R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P. *Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration*. Nat Genet. 2001 Jun;28(2):131-8.
147. Ng YS, Krilleke D, Shima DT. *VEGF function in vascular pathogenesis*. Exp Cell Res 2006;312:527-537.
148. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. *Molecular mechanisms of blood vessel growth*. Cardiovasc Res 2001;49:507-521.
149. Rosenberg L. *Wound Healing, Growth Factors*. (2006).
151. Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. *PDGF, TGF- β and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to smooth muscle cell fate*. J Cell Biol 1998;141:805-814.
152. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. *A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF*. Development 1998;125:1591-1598.
153. Nguyen LL, D'Amore PA. *Cellular interactions in vascular growth and differentiation*. Int Rev Cytol 2001;204:1-48.
154. Gerhardt H, Betsholz C. *Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis*. Cell Tissue Res 2003;314:15-23.
155. Wakui S. *Two and three dimensional ultrastructural observation of two cell angiogenesis in human granulation tissue*. Virchow Arch B 1988;56:127-139.

156. Wakui S, Furusato M, Hasumura M, et al. *Two and three dimensional ultrastructure of endothelium and pericyte interdigitation in capillary of human granulation tissue*. J Electron Microsc 1989;38:136-142.
157. Furusato M, Wakui S, Suzuki M, et al. *Three dimensional ultrastructural distribution of cytoplasmic interdigitation between endothelium and pericyte of capillary in human granulation tissue by serial reconstruction method*. J Electron Microsc 1990;39:86–91.
158. Wakui S, Furusato M, Nikaido T, et al. *Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in human granulation tissue, with special reference to capillary development*. Cell Struct Funct 1990;15:201–210.
159. Wakui S, Furusato M, Tanaka M, et al. *Endothelium and pericyte interdigitation: pathway for epidermal growth factor?* Microvasc Res 1990;40:285–291.
160. Wakui S. *Epidermal growth factor receptor at endothelial cell and pericyte interdigitation in human granulation tissue*. Microvasc Res 1992;44:255–262.
161. Wakui S, Furusato M, Ohshige H, et al. *Endothelial pericyte interdigitations in rat subcutaneous disc implanted angiogenesis*. Microvasc Res 1993;46:19–27.
162. Wakui S, Muto T, Ohshige H, et al. *Capillary fenestration in BBN-induced rat bladder carcinoma is promoted by vascular endothelial growth factor*. J Toxicol Pathol 2000;13:219–224
163. Wakui S, Furusato M, Muto T, et al. *TGF-beta and plasminogen activator at endothelial cell and pericyte interdigitation in human granulation tissue*. Microvasc Res 1997;54:262–269.
164. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, et al. *Tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors*. Oncogene 1992;7:1471–1480.
165. Sato TN, Qin Y, Kozak CA, et al. *Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system*. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:9355–9358.
166. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. *Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning*. Cell 1996;87:1161–1169.

167. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. *Science* 1997;277:55–60.
168. Asahara T, Chen D, Takahashi T, et al. *Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization*. *Circ Res* 1998;83:233–240.
169. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, et al. *Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro*. *Curr Biol* 1998;8:529–532.
170. Schnurch H, Risau W. *Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage*. *Development* 1993;119:957–968.
171. Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, et al. *Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase dimaly*. *Oncogene* 1993;8:1631–1637
172. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, et al. *Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation*. *Nature (London)* 1995;376:70–74.
173. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. *Cell* 1996;87:1171–1180
174. Korhonen J, Polvi A, Partanen J, et al. *The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis*. *Oncogene* 1994;9:395–403.
175. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, et al. *Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo*. *Genes Dev* 1994;8:1897–1909.
176. Wakui S et al. *Localization of Ang-1, -2, Tie-2, and VEGF expression at endothelial-pericyte interdigitation in rat angiogenesis*. *Laboratory Investigation* 2006; 86, 1172–1184
177. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, et al. *Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage*. *Nat Med* 2000;6:460–463.
178. Kim I, Moon SO, Park SK, et al. *Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression*. *Circ Res* 2001;89:477–479.

179. Mandriota SJ, Pepper MS. *Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia*. *Circ Res* 1998;83:852–859.
180. Hackett SF, Ozaki H, Strauss RW, et al. *Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization*. *J Cell Physiol* 2000;184:275–284.
181. Huang J. Et . *Angiopoietin-1/Tie-2 activation contributes to vascular survival and tumor growth during VEGF blockade*. *International Journal of Oncology* 2009;34: 79-87.
182. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN and Yancopoulos GD. *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. *Cell* 1996; 87: 1171-1180.
183. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ and Koh GY. *Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway*. *Circ Res* 2000; 86: 24-29.
184. Daly C, Wong V, Burova E, Wei Y, Zabski S, Griffiths J, Lai KM, Lin HC, Ioffe E, Yancopoulos GD and Rudge JS. *Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1)*. *Genes Dev* 2004; 18:1060-1071.
185. Junttila TT, Sihombing L, Sundvall M, Maatta JA, Laine VJ, Yla-Herttuala S, Higashiyama S, Alitalo K and Elenius K. *Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor*. *FASEB J* 2003; 17: 1609-1621.
186. Holash J, Wiegand SJ and Yancopoulos GD. *New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF*. *Oncogene* 1999; 18: 5356-5362.
187. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland CR, Alexander D, Yancopoulos GD and Weigand SJ. *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF*. *Science* 1999; 284: 1994-1998.
188. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ and Holash J: *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. *Nature* 2000;407: 242-248.
189. Shyu KG, Manor O, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. *Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb*. *Circulation* 1998;98: 2081-2087.

190. Thurston G, Wang Q, Baffert F, Rudge J, Papadopoulos N, Jean-Guillaume D, Wiegand S, Yancopoulos GD and McDonald DM. *Angiopoietin 1 causes vessel enlargement, without angiogenic sprouting, during a critical developmental period.* Development 2005;132: 3317-3326.
191. Metheny-Barlow LJ, Li L. Y. *The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis.* Cell Research 2003; 13(5):309-317.
192. Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. *Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2.* J Biol Chem 1998; 273(29):18514-21.
193. Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang D, Lippman Meli LY. *Angiopoietin-1 and its receptor tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells.* Microvasc Res 1999; 58(3):224-37.
194. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch UR, Isau W. *Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro.* Curr Biol 1998; 8(9):529-32.
195. Kim I, Kim HG, Moon S-O, et al. *Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion.* Circ Res 2000; 86(9):952-59.
196. Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, Nishida J, Takaku F. *A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene.* Science. 1987 Dec 18;238(4834):1717-20.
197. Brantley-Sieders DM, Chen J. *Eph receptor tyrosine kinases in angiogenesis: from development to disease.* Angiogenesis. 2004;7(1):17-28.
198. Kim YH, Hu H, Guevara-Gallardo S, Lam MT, Fong SY, Wang RA. *Artery and vein size is balanced by Notch and ephrin B2/EphB4 during angiogenesis.* Development. 2008 Nov;135(22):3755-64.
199. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. *Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4.* Cell. 1998 May 29;93(5):741-53.
200. Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, DeChiara TM, McDonald DM, Yancopoulos GD. *Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells.* Dev Biol. 2001 Feb 15;230(2):151-60.
201. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation.* Nature. 2000 Sep 14;407(6801):242-8.

202. Chen J, Zhuang G, Frieden L, Debinski W. *Eph receptors and Ephrins in cancer: common themes and controversies*. Cancer Res. 2008 Dec 15;68(24):10031-3.
203. Füller T, Korff T, Kilian A, Dandekar G, Augustin HG. *Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells*. J Cell Sci. 2003 Jun 15;116(Pt 12):2461-70.
204. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R. *Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis*. Genes Dev. 1999 Feb 1;13(3):295-306.
205. Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL. *Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta*. Mol Cell Endocrinol. 2002 Feb 22;187(1-2):207-12.
206. Egawa M, Yoshioka S, Higuchi T, Sato Y, Tatsumi K, Fujiwara H, Fujii S. *Ephrin B1 is expressed on human luteinizing granulosa cells in corpora lutea of the early luteal phase: the possible involvement of the B class Eph-ephrin system during corpus luteum formation*. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Sep;88(9):4384-92.
207. Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP, Daniel TO. *Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through α v β 3 and α 5 β 1 integrins*. EMBO J. 1999 Apr 15;18(8):2165-73.
208. McBride JL, Ruiz JC. *Ephrin-A1 is expressed at sites of vascular development in the mouse*. Mech Dev. 1998 Oct;77(2):201-4.
209. Cheng N, Brantley DM, Liu H, Lin Q, Enriquez M, Gale N, Yancopoulos G, Cerretti DP, Daniel TO, Chen J. *Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis*. Mol Cancer Res. 2002 Nov;1(1):2-11.
210. Cheng N, Brantley DM, Chen J. *The ephrins and Eph receptors in angiogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev. 2002 Feb;13(1):75-85.
211. Daniel TO, Stein E, Cerretti DP, St John PL, Robert B, Abrahamson DR. *ELK and LERK-2 in developing kidney and microvascular endothelial assembly*. Kidney Int Suppl. 1996 Dec;57:S73-81.

212. Dobrzanski P, Hunter K, Jones-Bolin S, Chang H, Robinson C, Pritchard S, Zhao H, Ruggeri B. *Antiangiogenic and antitumor efficacy of EphA2 receptor antagonist*. Cancer Res. 2004 Feb 1;64(3):910-9..
213. Meier K, Nanney LB. *Emerging New Drugs for Wound Repair*. Expert Opinion Emerging Drugs 2006;11(1):23-37.
214. Ciğer S. *Yara İyileşmesi ve Büyüme Faktörler.*, Alsancak Devlet Hastanesi Dermatoloji Kliniği Uzmanı.
215. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound Repair Regen. 2008 Sep-Oct;16(5):585-601.
216. Philips N, Keller T, Gonzalez S. *TGF β -Like Regulation of Matrix Metalloproteinases by Anti-Transforming Growth Factor- β , and Anti-Transforming Growth Factor- β 1 Antibodies in Dermal Fibroblasts: Implications for Wound Healing*. Wound Repair and Regeneration, 2004;12, 53–59.
217. Meulmeester E, Ten Dijke P. *The dynamic roles of TGF- β in cancer*. J Pathol. 2011 Jan;223(2):205-18..
218. Schuster N, Kriegelstein K. *Mechanisms of TGF- β -Mediated Apoptosis*. Cell Tissue Res. 2002; 307: 1-14.
219. Odorisio T, Cianfarani F, Failla CM, Zambruno G. *The Placenta Growth Factor in Skin Angiogenesis*. Journal of Dermatological Science 2006; 41, 11-19.
220. Lam T, Hetherington JW, Greenman J, Little S, Maraveyas A. *Metronomic chemotherapy dosing-schedules with estramustine and temozolomide act synergistically with anti-VEGFR-2 antibody to cause inhibition of human umbilical venous endothelial cell growth*. Acta Oncologica, 2007; 46: 1169-1177
221. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G. *SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types*. Cancer Res. 1999;59:99-106.
222. Herbst RS, Hidalgo M, Pierson AS, Holden SN, Bergen M, Eckhardt SG. *Angiogenesis inhibitors in clinical development for lung cancer*. Semin Oncol. 2002 Feb;29(1 Suppl 4):66-77.
223. Patyna S, Arrigoni C, Terron A, Kim TW, Heward JK, Vonderfecht SL,

Denlinger R, Turnquist SE, Evering W. *Nonclinical Safety Evaluation of Sunitinib: A Potent Inhibitor of VEGF, PDGF, KIT, FLT3, and RET Receptors*. *Toxicol Pathol*. 2008;3;29:66-77.

224. Ren W, Korchin B, Lahat G, Wei C, Bolshakov S, Nguyen T, Merritt W, Dicker A, Lazar A, Sood A, Pollock RE, Lev D. *Combined vascular endothelial growth factor receptor/epidermal growth factor receptor blockade with chemotherapy for treatment of local, uterine, and metastatic soft tissue sarcoma*. *Clin Cancer Res*. 2008;14:5466-75.

225. Beebe JS, Jani JP, Knauth E, Goodwin P, Higdon C, Rossi AM, Emerson E, Finkelstein M, Floyd E, Harriman S, Atherton J, Hillerman S, Soderstrom C, Kou K, Gant T, Noe MC, Foster B, Rastinejad F, Marx MA, Schaeffer T, Whalen PM, Roberts WG. *Pharmacological characterization of CP-547,632, a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for cancer therapy*. *Cancer Res*. 2003;63:7301-9177.

226. Cohen RB, Langer CJ, Simon GR, Eisenberg PD, Hainsworth JD, Madajewicz S, Cosgriff TM, Pierce K, Xu H, Liao K, Healey D. *A phase I/randomized phase II, noncomparative, multicenter, open label trial of CP-547,632 in combination with paclitaxel and carboplatin or paclitaxel and carboplatin alone as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;60:81-9

227. Aita M, Fasola G, Defferrari C, Brianti A, Bello MG, Follador A, Sinaccio G, Pronzato P, Grossi F. *Targeting the VEGF pathway: Antiangiogenic strategies in the treatment of non-small cell lung cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;68(3):183-96

228. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*. 2004;350:2335-42.

229. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. *Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration*. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2005; 36(4);270-1

230. Hampton T. *Monoclonal antibody therapies shine in breast cancer clinical trials*. *JAMA* 2005;.293, 2985–2989.).

231. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. *Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration*. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2005 Jul-Aug;36(4):331-5.

232. Cohen MH, Gootenberg J, Keegan P, Pazdur R. *FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer*. *Oncologist*. 2007 Jun;12(6):713-8.
233. Van Meter ME, Kim ES. *Bevacizumab: current updates in treatment*. *Curr Opin Oncol*. 2010 Nov;22(6):586-91.
234. Shibuya M. *Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis*. *BMB reports* 2008; 41(4):278-286.
235. Benjamin LE, Hemo I and Keshet E: *A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF*. *Development* 125: 1591-1598, 1998.
236. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D and Keshet E: *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. *J Clin Invest* 103: 159-165, 1999
237. Huang J, Soffer SZ, Kim ES, McCrudden KW, Huang J, New T, Manley CA, Middlesworth W, O'Toole K, Yamashiro DJ, Kandel JJ. *Vascular remodeling marks tumors that recur during chronic suppression of angiogenesis*. *Mol Cancer Res*. 2004 Jan;2(1):36-42.
238. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P. *Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms*. *FASEB J*. 2004 Feb;18(2):338-40.
239. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. *Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors*. *Cancer Cell*. 2005 Oct;8(4):299-309.
240. Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA and Ferrara N: *Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor*. *Cancer Res* 2000; 60: 6253-6258,
241. Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, Reinmuth N, Kawaguchi M, Bucana CD and Ellis LM: *Angiotensin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors*. *Cancer Res* 2003; 63: 3370-3377.
242. Hawighorst T, Skobe M, Streit M, Hong YK, Velasco P, Brown LF, Riccardi L, Lange-Asschenfeldt B, Detmar M. *Activation of the tie2 receptor*

by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. Am J Pathol. 2002 Apr;160(4):1381-92.

243. Machein MR, Knedla A, Knoth R, Wagner S, Neuschl E, Plate KH. *Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model.* Am J Pathol. 2004 Nov;165(5):1557-70.

244. Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, Takagi H, Honda Y, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Nishikawa S. *Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells.* J Clin Invest. 2002 Dec;110(11):1619-28.

245. Baluk P, Lee CG, Link H, Ator E, Haskell A, Elias JA, McDonald DM. *Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways.* Am J Pathol. 2004 Oct;165(4):1071-85.

246. Zhou YF, Stabile E, Walker J, Shou M, Baffour R, Yu Z, Rott D, Yancopoulos GD, Rudge JS, Epstein SE. *Effects of gene delivery on collateral development in chronic hypoperfusion: diverse effects of angiopoietin-1 versus vascular endothelial growth factor.* J Am Coll Cardiol. 2004 Aug 18;44(4):897-903.

247. Sandhu R, Teichert-Kuliszewska K, Nag S, Proteau G, Robb MJ, Campbell AI, Kuliszewski MA, Kutryk MJ, Stewart DJ. *Reciprocal regulation of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 following myocardial infarction in the rat.* Cardiovasc Res. 2004 Oct 1;64(1):115-24.

248. Winkler F, Kozin SV, Tong RT, Chae SS, Booth MF, Garkavtsev I, Xu L, Hicklin DJ, Fukumura D, di Tomaso E, Munn LL, Jain RK. *Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases.* Cancer Cell. 2004 Dec;6(6):553-63.

249. Findley CM, Cudmore MJ, Ahmed A, Kontos CD. *VEGF induces Tie2 shedding via a phosphoinositide 3-kinase/Akt dependent pathway to modulate Tie2 signaling.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Dec;27(12):2619-26.

250. Gale NW, Yancopoulos GD. *Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development.* Genes Dev. 1999 May 1;13(9):1055-66.

251. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R. *Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis.* Genes Dev. 1999 Feb 1;13(3):295-306.

252. Mao W, Luis E, Ross S, Silva J, Tan C, Crowley C, Chui C, Franz G, Senter P, Koeppen H, Polakis P. *EphB2 as a therapeutic antibody drug target for the treatment of colorectal cancer*. *Cancer Res*. 2004 Feb 1;64(3):781-8.
253. Straume O, Akslen LA. *Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression*. *Am J Pathol*. 2002 Mar;160(3):1009-19
254. Zelinski DP, Zantek ND, Stewart JC, Irizarry AR, Kinch MS. *EphA2 overexpression causes tumorigenesis of mammary epithelial cells*. *Cancer Res*. 2001 Mar 1;61(5):2301-6.
255. Nakada M, Niska JA, Miyamori H, McDonough WS, Wu J, Sato H, Berens ME. *The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells*. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3179-85.
256. Vihanto MM, Plock J, Erni D, Frey BM, Frey FJ, Huynh-Do U. *Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin*. *FASEB J*. 2005 Oct;19(12):1689-91.
257. Shibuya M. *Vascular endothelial growth factor-dependent and – independent regulation of angiogenesis*. *BMB Rep*. 2008 Apr 30;41(4):278-86.
258. Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, Murphy AJ, Adams NC, Lin HC, Holash J, Thurston G, Yancopoulos GD. *Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 9;101(45):15949-54.
259. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, Lin HC, Yancopoulos GD, Thurston G. *Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis*. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1032-7.
260. Saito M, Hamasaki M, Shibuya M. *Induction of tube formation by angiopoietin-1 in endothelial cell/fibroblast co-culture is dependent on endogenous VEGF*. *Cancer Sci*. 2003 Sep;94(9):782-90.
261. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA et al. *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. *J Clin Invest* 1997; 100: 3131–3139.
262. Murohara T, Asahara T, Silver M et al. *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia*. *J Clin Invest* 1998; 101: 2567–2578.

263. Gratton JP, Lin MI, Yu J et al. *Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice*. *Cancer Cell*. 2003; 4: 31–39.
264. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. *The role of nitric oxide in tumour progression*. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 521–534.
265. Lala PK, Chakraborty C. *Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression*. *Lancet Oncol* 2001; 2: 149–156.
266. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R et al. *Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis*. *J Clin Invest* 1997; 99: 2625–2634.
267. Tamarat R, Silvestre JS, Kubis N et al. *Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb*. *Hypertension* 2002; 39: 830–835.
268. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A et al. *Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2604–2609.
269. Baffert F, Le T, Sennino B et al. *Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H547–H559.
270. Meeson AP, Argilla M, Ko K et al. *VEGF deprivation-induced apoptosis is a component of programmed capillary regression*. *Development* 1999; 126:1407–1415
271. Mourad JJ, des Guetz G, Debbabi H, Levy BI. *Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation*. *Ann Oncol*. 2008 May;19(5):927-34.
272. Matsumura H, Yoshizawa N, Vedder NB, et al. *Preconditioning of the distal portion of a rat random-pattern skin flap*. *Br J Plast Surg*. 2001;54:58–61.
273. Maldonado C, Stadelmann WK, Ramirez S, et al. *Preconditioning of latissimus dorsi muscle flaps with monophosphoryl lipid A*. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111:267–274.

275. Hosnuter M, Babuccu O, Kargi E, et al. *Dual preconditioning effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival. Ann Plast Surg.* 2003;50:398–402.
276. Wexler MR, Kalisman M, Yeschua R, Neuman Z. *The effect of phenoxybenzamine, phentolamine and 6-hydroxydopamine on skin flap survival in rats. J Surg Res.* 1975 Aug;19(2):83-6.
277. Tellioglu AT, Uras KA, Yilmaz T, Alagözlü H, Tekdemir I, Karabağ O. *The effect of carnitine on random-pattern flap survival in rats. Plast Reconstr Surg.* 2001 Sep 15;108(4):959-62.
278. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. *Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. Plast Reconstr Surg.* 1984 Jun;73(6):943-8.
279. Nezami BG, Rahimpour S, Gholipour T, Ghasemi M, Sadeghipour H, Mehr SE, Emami-Razavi SH, Dehpour AR. *Pharmacologic preconditioning of random-pattern skin flap in rats using local cyclosporine and FK-506: interaction with nitric oxide system. Ann Plast Surg.* 2007 Oct;59(4):435-40.
280. Lessio C, de Assunção Silva F, Glória MA, Di Tommaso AB, Gori Mouro M, Di Marco GS, Schor N, Higa EM. *Cyclosporine A and NAC on the inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide synthesis in rat renal artery cultured cells. Kidney Int.* 2005 Dec;68(6):2508-16.
281. Trajkovic V. Modulation of inducible nitric oxide synthase activation by immunosuppressive drugs. *Curr Drug Metab.* 2001;2:315–329.
282. Diaz-Ruiz A, Vergara P, Perez-Severiano F, et al. *Cyclosporin-A inhibits inducible nitric oxide synthase activity and expression after spinal cord injury in rats. Neurosci Lett.* 2004;357:49 –52.
283. Diaz-Ruiz A, Vergara P, Perez-Severiano F, Segovia J, Guizar-Sahagún G, Ibarra A, Ríos C. *Cyclosporin-A inhibits constitutive nitric oxide synthase activity and neuronal and endothelial nitric oxide synthase expressions after spinal cord injury in rats. Neurochem Res.* 2005 Feb;30(2):245-51.