

**T.C.  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM  
DALI**

**FARKLI YARA KAPATIM MODELLERİNDE  
APOPTOSİS SÜRECİ  
(APOPTOSIS PROCESSES IN DIFFERENT  
WOUND REPAIR PROCEDURES)**

**Uzmanlık Tezi**

**Dr. Ercan Yavuz**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necmettin KUTLU**

**Trabzon-2001**

## İÇİNDEKİLER

<b>KISALTMALAR</b>	I
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	2-11
Yara İyileşmesi	3-5
Deri Greftleri	5-6
Deri Flepleri	6-8
Apoptosis	8-11
<b>MATERYAL VE METOD</b>	12-18
<b>BULGULAR</b>	19-32
<b>TARTIŞMA</b>	33-39
<b>SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	40
<b>ÖZET</b>	41
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b>	42
<b>KAYNAKLAR</b>	43-49

## KISALTMALAR

- PDGF** : Platelet Derived Growth Factor  
(Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü)
- EGF** : Epidermal Growth Factor  
(Epidermal Büyüme Faktörü)
- IGF-1** : Insulin-like Growth Factor-1  
(İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1)
- TGF- $\beta$**  : Transforming Growth Factor- $\beta$   
(Dönüştürücü Büyüme Faktörü-B)
- FGF** : Fibroblast Growth Factor  
(Fibroblast Büyüme Faktörü)
- KKDG** : Kısmi Kalınlıkta Deri Grefti
- TKDG** : Tam Kalınlıkta Deri Grefti
- PI** : Proliferative Index  
(Proliferatif İndeks)
- TNF** : Tumor Necrosis Factor  
(Tümör Nekroz Faktörü)
- IL-2** : Interleukin-2  
(İnterlökin-2)
- FCM** : Flowcytometry
- H.E.** : Hematoksilen Eozin

## GİRİŞ

İnsanlık kadar eski bir geçmişe sahip olan “yara iyileşmesi” yıllardır birçok araştırmalara konu olmasına karşın net olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Bugün bilinen iyileştirme yöntemleri ile ilgili çalışmalar oldukça fazladır. Yaranın açık bırakılarak iyileştirilmesi olarak tanımlanan sekonder yara iyileşmesi ile greftleme (hastanın bir başka vücut alanından, anatomik kanlanma desteğinden ayrılarak elde edilen epidermis ve dermisi içeren otojen doku yoluyla) veya fleple kapatım (çocuklukla ilerletme, döndürme veya pozisyon değiştirme şeklinde çevre deri -fasya -kas vb. dokular yoluyla) şeklindeki iyileşme arasında bilinen üstünlüklerin doğrulanması ve mekanizmalarının ortaya konması yönünde önemli çabalar gösterilmiştir (1,2). Fleplerin, sekonder iyileşme ve greftlemeye göre; renk uyumunun daha iyi olması, canlılığını koruma şansının fazla olması, daha az kontrakte olması, defekt için yeterli kütle sağlaması ve dış ortama daha dayanıklı olması gibi üstünlükleri vardır. Bunların yanında flepler, granülasyon dokusunun yeterince ve zamanında uzaklaştırılmasını da mı sağlamaktadır ve yine bu süreçte apoptosisin bir rolü var mıdır sorularına henüz cevap bulunamamıştır (3). Sekonder iyileşmeye göre greft ve flep cerrahisi sonrası yara zemininde granülasyon dokusundaki azalma birçok çalışmayla ortaya konmuş olup bunun apoptosis yoluyla olup olmadığı araştırmamıza konu olmuştur. Granülasyon dokusunun yeterince ve zamanında azalmaması veya ortadan kalkmaması; hipertrofik skar , kötü kozmetik görünüm, travmalara direnç azalması gibi istenmeyen durumlarla sonuçlanacaktır (4). Araştırmamızda apoptosisin granülasyon dokusunun ortadan kalkmasındaki rolü, farklı yara kapatım modelleri arasında apoptotik hücre yok olmasının farklılıkları, hücre proliferasyonunun bununla ilişkisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Apoptosisi indükleyen ya da inhibe eden etkenlere flep veya greft cerrahisinin etkileri tartışılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

Hekimlik sanatının önemli bir uğraş alanını oluşturan yara iyileşmesi, sanılanın aksine oldukça karmaşık bir süreçtir. Özellikle problemlili ve kompleks yaralarda bilinçli ve özenli bir yaklaşım başarıda önemli rol oynar. Farklı tanımlamalara her zaman rastlanılmakla birlikte yaranın kapatılması üç değişik şekilde gerçekleştirilmektedir (5).

**Primer kapama:** Yara dudaklarının karşılıklı yaklaştırılıp dikiş, zımba, bant vb. yardımıyla birbirine tutturulmasıdır. Cerrahi insizyonlar buna örnektir.

**Sekonder kapama:** Bazı durumlarda primer kapama mümkün olmaz ve yara içindeki canlı epiteliyal elementler (deri ekleri vb.) veya çevre epitelinin ilerlemesi yoluyla spontan reepitelizasyon beklenir. Aşırı fibroplazi ve kontraksiyonla sonuçlanan bu iyileşme şekli açık yara iyileşmesi olarak da bilinir.

**Tersiyer kapama:** Defekt alanına yakın ya da uzak bir başka vücut alanından anatomik kanlanma desteğinden ayrılarak veya ayrılmadan dokuların getirilerek yaranın kapatılmasıdır. Greftler ve flepler bunun örneğidir.

Yara bakım ve onarımı multidisipliner bir yaklaşımı gerektirse de özellikle günümüzde rekonstrüktif plastik cerrahinin temel uğraş alanıdır. Yaranın kapatılmasında bir algoritma olarak sunulan **rekonstrüktif basamak** basitten karmaşığa doğru şu yöntemleri kapsar: Primer kapama, deri grefti, lokal flep ve uzak flep (6). Direkt – primer kapama elverişli olan her durumda öncelikli bir yaklaşımdır. Ancak kompleks yaralarda ( doku defekti, enfeksiyon ve/veya nekroz varlığı ile primer kapama için öngörülen kritik zamanın aşılması gibi durumlarda ) diğer tedavi seçeneklerine olan gereksinim artmaktadır. Dikkat edilirse çağdaş yara tedavisinde sekonder iyileşmeye – en azından bu algoritmada – yer verilmemiştir. Ancak daha ileri tekniklerin uygulanamadığı durumlarda ya da o tekniklere hazırlık aşamalarında açık yara iyileşmesinin önemi büyüktür ve bilinmesi zorunludur.

## *YARA İYİLEŞMESİ*

Yumuşak doku yara iyileşmesi, doku hasarı sonrası başlayan ve oldukça karmaşık bir olaylar bütünüdür. Bu süreç anjiogenezisin hücrel koordinasyonunu, kollajen / matriks dönüşümünü ve epitelizasyonu kapsar (7). Bunlardan birisi yetersiz olursa normal yara iyileşmesi gerçekleşmeyecektir. Yara iyileşmesi aşağıdaki dört aşamayı içerir (8).

1. Hemostaz ( ilk dakikalar )
  - a. Platelet agregasyonu ve degranülasyonu
  - b. Kan pıhtılaşması
2. İnflamasyon ( 0 –3. günler )
  - a. Hücre göçü
  - b. Debridman ve infeksiyonla mücadele
3. Proliferasyon ( 3 – 12. günler )
  - a. Neovaskülarizasyon
  - b. Hücre proliferasyonu
  - c. Epitelizasyon
  - d. Granülasyon dokusu formasyonu
4. Remodelizasyon ( 3 gün – aylar )
  - a. Granülasyon dokusunun gerilemesi
  - b. Kollajen ve matriks remodelizasyonu
  - c. Kontraksiyon
  - d. Skar maturasyonu

Doku hasarı sonrası hemoraji ve kompleman aktivasyonu ile başlayan bu süreç aslında iç içe geçmiş bir dizi olaydır. Hücreler arası yoğun bir ilişki ve birbirini tetikleme mekanizması yoluyla yürümektedir (9,10). Bu hücrel koordinasyon olayında en önemli rolleri trombositler, makrofajlar, lenfositler ve hasarlı hücrelerden salınan büyüme faktörleri oynarlar.

**Hemostaz:** Yumuşak doku yaralanması sonrası kanamayı en aza indirmek için vazokonstriksiyon ve koagülasyon devreye girer. Kan ürünlerinin damar dışına çıkması trombosit agregasyonunu uyarır ve bu yolla pıhtı oluşumu ve hemostaz sağlar. Agrade trombositlerden fibrin uyarısıyla PDGF , EGF , IGF-1, TGF- $\beta$  ve FGF salınır. Bu

yolla epiteliyal ve endoteliyal hücreler ile fibroblastların proliferasyonu ve migrasyonu sağlanır (11). Bunu vazodilatasyon ve kan akımının artması izler.

**İnflamasyon:** Hasarlı ya da ölü parenkimal hücreler, inflamatuvar hücrelerin yara alanına göçüne sebep olurlar. Önce nötrofiller, daha sonra monositlerden köken alan makrofajlar iyileşme yanıtını desteklerler. Etkileri aslında bakteri yıkılımı ve yara debridmanı ile makrofajlardan salınan sayısız büyüme faktörleri yoluyla gerçekleşir (12). Lenfositler ve onların ürünleri de bu sürece yardımcı olurlar (13).

**Proliferasyon:** Yara kenarlarındaki damarlar anjiogenez yoluyla yara içersine doğru göç ederler. Fibroblastlar fibrin matriks boyunca yara içersine yolculuk ederler. Devamında granülasyon dokusu oluşur. Granülasyon dokusu fibroblastlar, makrofajlar ve yeni damarların içinde bulunduğu yumuşak konnektif doku matriksinden oluşur (7,14). Yaralanmadan sonraki ilk dört gün içinde en önemli matriks komponenti hyaluronik asittir. Sonra hyaluronik asit diğer proteoglikanlarla yer değiştirir (15).

**Remodelizasyon:** Yara iyileşmesinin en uzun fazıdır. Granülasyon dokusu aylar içinde geriler. Kollajen remodelizasyonu çerçevesinde fibronektin ve tip 3 kollajen düzeyleri düşer. Granülasyon dokusu tip 1 kollajen, elastin fibrilleri, proteoglikanlar ve glikoproteinlerle yer değiştirir (7,16). Kollajen ve ekstrasellüler matriks ürünleri devamlı değişim halindedirler (17). Yara remodelizasyonunda kollajenaz, hyaluronidaz, plazminojen aktivatörleri ve elastaz aktif rol alırlar. Matrikste hyaluronat, dermatan sülfat ve kondroitin sülfatla yer değiştirir. Bu değişiklik çevrede hücre migrasyonunu azaltır, hücre farklılaşmasını teşvik eder. Plazmin fibrini yıkar. Ürokinaz kollajenazı aktive eder. Bu da kollajenin yıkılımını artırır. Elastaz ise elastini yıkar. Bütün bunların sonucu skar dokusudur (18). Kollajen çapraz bağları yoluyla skar gerilme direnci artar. Özellikle deri yüzeyinde rastgele dağılım gösteren kollajen demetleri düzenli hale gelir. Yaralanmadan 6-12 ay sonra kollajen sentezi büyük oranda normale döner (7). İyileşmiş dokunun direnci asla yaralanmadan önceki düzeyine ulaşamaz (19).

Fibrozis normal yapısal dokunun yerini fonksiyonel olmayan skar dokusunun almasıdır. Bunun aşırı olması keloid ve hipertrofik skar olarak kliniğe yansır. Keloidden izole edilen fibroblastlar normal derininkilere göre 2-3 kez daha fazla kollajen üretirler (20). Bazı araştırmacılar keloidlerde kollajen yıkılımını, aşırı miktardaki alfa globulinlerin inhibe ettiğini bulmuşlardır (21). Normal dokulardaki kollajen oldukça güçlü ve organize edilmiştir. Skarlardaki kollajen ise küçük ve rastgele dizilmiştir. Yaralanmadan 4 hafta sonra epitel intakt olsa da gerilme kuvveti yalnız %25 dolayındadır. İyileşmiş

yaradaki maksimum gerilme kuvveti %80 civarındadır (22). Kollajen remodelizasyonu yaranın 2 yılına kadar devam edebilir (23).

Kompleks yaraların onarımı için sunulan rekonstrüktif basamak şemasında direkt kapamanın dışında önerilen deri greftleri ve flepleri tersiyer kapama ya da üçüncü yara iyileşmesinin şeklidirler. Bu konuları biraz irdelemek yerinde olacaktır. Vücuttaki birçok dokunun tek tek ya da kompozit formda greft veya flep şeklinde aktarılabilir. Problemlerinin iyileştirilmesinde ve travmatik ya da iatrojenik defektlerin onarımında bu seçeneklerden geniş şekilde yararlanılmaktadır.

### DERİ GREFTLERİ

Anatomik kanlanma desteğinden ayrılarak bir başka alana aktarılan dokuya greft denir. Deri greftleri, içerdikleri dokunun kalınlığına göre kısmi kalınlıkta deri greftleri (KKDG) ve tam kalınlıkta deri greftleri (TKDG) olarak sınıflandırılırlar. KKDG epidermisin tamamını ve dermisin kalınlığına göre bir kısmını içerir (24). İlk biyolojik deri transferini 1870 yılında Reverdin yayınlamıştır (25). Pollock ilk başarılı otogrefti rapor etmiştir (26). I.Dünya savaşı yıllarında çok ince deri greftini Thiersch kullanmıştır ve bu greftler daha çok bu adla anılmıştır (27). TKDG epidermis ve dermisin tamamını içerir ve ilk yayıncısı Wolff olarak bilinir.(28) Her iki çeşit greftin avantaj ve dezavantajları vardır (29). (Tablo 1)

**Tablo 1:** Farklı greftlerin birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları

	KKDG	TKDG
<b>Avantajları</b>	1.Daha elverişsiz alıcı alanda kullanabilme 2. Daha fazla elde edilebilme	1.Kontraksiyona dirençli olması 2.Pigment ve yüzey özelliklerinin daha iyi olması 3.Büyüme potansiyeli taşıması 4.Reinervasyon potansiyelinin daha fazla olması
<b>Dezavantajları</b>	1.Anormal pigmentasyon 2.Yetersiz kozmetik görünüm 3.Çevresel etkenlere duyarlılık 4.Kontraksiyona eğilim	1.Yeterli alıcı alan vaskülarizasyon ihtiyacı 2.Geniş alanlar için donör alan yetersizliği



KKDG dermatom yardımıyla alınabilirken, TKDG bistüri kullanılarak elde edilir. KKDG vücudun herhangi bir alanından alınabilir. Greftlenecek bölgeye göre renk uyumu göz önüne alınır ve donör alanda mümkün olan en az skar için çalışılır. TKDG için de aynı özelliklere dikkat edilmekle birlikte donör alan için en fazla tercih edilecek bölgeler; üst göz kapağı, postauriküler bölge, supraklaviküler alan, kasık, distal önkol, antekübital fossa ve prepisyumdur (29,30).

Deri greftlerinin tutması 3 fazda gerçekleşir. İlk 48 saatte greftin beslenmesi **plazmatik imbibisyon** yoluyla gerçekleşir. Bu erken postgreft dönem dolaşım gerçekleşinceye kadar devam eder. Bu süre sonrasında greft ile alıcı yatak arasında ince bir vasküler şebeke kurulur. **İnoskülasyon** diye adlandırılan bu dönemde damarlar arası anastomotik bağlantıların alt yapısı kurulur. Ancak aktif dolaşım henüz başlamamıştır. Eşzamanlı olarak alıcı yataktan greftin içine doğru damarların girip lümenlerinin akıma izin verecek şekilde karşılıklı açılması gözlenir ki bu döneme **penetrasyon (kapiller ingrowth)** adı verilir (31,32).

### *DERİ FLEPLERİ*

Deri fleplerini anlayabilmek için derinin vasküler anatomisinin iyi bilinmesi zorunludur. Subdermal vasküler pleksus ve onun uzantıları bütün vücutta deri altında uzanan kas ve fasyanın beslenme paternleriyle yakından ilişkilidir. Derinin kan desteği basit olarak üç önemli bileşenle şematize edilebilir.(33)

**Segmental damar yapı** aortanın dallarından oluşur. Femoral ve interkostal damarlar buna örnektir. **Perforan damarlar** segmental damar yapıdan köken alır ve üçüncü yapı olan **kütanöz damar yapı** ile bağlantı halindedir.

Kütanöz vasküler yapı, vücut derisinin çoğunu besleyen **muskülokütaneal sistem** ve yalnızca sınırlı bir alanını besleyen **direkt kütanöz sistem**den oluşan iki alt gruba ayrılır (34). Muskülokütaneal sistem deriye dikey olarak seyrederken direkt sistemde damarlar deriye paralel olarak yerleşirler.

Deri içerikli fleplerin sınıflandırılmaları kompozisyonlarına, kan desteklerine ve mobilizasyonlarına göre yapılır (35).

Kan desteklerine göre deri fleplerinin sınıflandırması (34,36);

**Random flep** spesifik arteriyel ve venöz sisteme sahip olmayan fleplerdir. Planlanmalarında uzunluk/genişlik oranları göz önünde bulundurulur. Müskülökütan perforanlarca desteklenen dermal-subdermal pleksus bu flebin perfüzyonunu gerçekleştirir.

**Aksiyel-arteriyel flep** tanımlanmış bir arteriyel-venöz sisteme sahiptir. Spesifik direkt kütanöz damarlar deri altında kasın yüzeyinde seyreder.

Kompozisyonlarına göre deri içerikli fleplerin sınıflandırması (37);

1. Deri flepleri
2. Kas-deri flepleri
3. Fasya-deri flepleri
4. Kemik-deri flepleri
5. İnerve (duyulu) deri flepleri

Mobilizasyonlarına göre deri fleplerinin sınıflandırması (34);

#### A. Lokal flepler

1. Sabit bir nokta etrafında hareket eden flepler
  - Rotasyon flepleri
  - Transpozisyon flepleri
  - İnterpolasyon flepleri
2. İletme flepleri
  - Tek pediküllü
  - Çift pediküllü
  - V-Y

#### B. Uzak flepler

1. Direkt flepler
2. İndirekt flepler
3. Serbest flepler

Yara iyileşmesi ile apoptosis arasındaki ilişkiyi ortaya koyan birçok araştırma rapor edilmiştir (38). İyileşmenin hangi fazında apoptosisin rol aldığı konusunda ortak görüşler olmasa da inflamatuvar safhanın erken sona ermesinde ve granülasyon dokusunda myofibroblastların sayısının azalmasında apoptosisin önemi çoğu araştırmacının ortak kanısıdır (39). Farklı yara iyileşme şekilleri hakkında verilen bilgiler dışında apoptosis konusunda bazı değerlendirmelerde bulunmak yerinde olacaktır.

### *APOPTOSIS*

Bütün çok hücreli organizmalar hücrel gelişimlerini sıkı kontrol altında devam ettirirler. Bir hücre topluluğunun büyüklüğü hücrelerin bölünme hızına olduğu kadar ölüm hızına da bağlıdır. Hücre sayılarının kontrolü çoğalma ve yok olma dengesiyle ayarlanır. Uzun yıllar hücre ölümü mekanizmalarına pek dikkat edilmemesine karşın günümüzde apoptosis; biyoloji, temel ve klinik tıp bilimlerinin ilgi odağı haline gelmiştir. Apoptosis, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, programlı, aktif RNA/protein sentezine ve enerjiye gereksinim gösteren bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Hücre uzaklaştırma sürecinin merkezi apoptosisdir. Komşu doku inflamasyonu olmaksızın hücre intiharının yegane yoludur (40). Bilinen tek fizyolojik ölüm şeklidir (41,42).

Kelime Grekçe 'apo' ayrı, bir tarafa ve 'ptosis' düşme, yağma sözcüklerinden türetilmiş olup sonbaharda yaprakların düşmesi, yayılması anlamına gelir. Bu terim ilk olarak 1972 yılında Edinburg Üniversitesi bilim adamlarından Kerry ve arkadaşları tarafından fizyolojik ölümler için kullanılmıştır (43). Apoptotik hücre ölümü programlı ve kontrollü self-destrüksiyondur, spesifik hücrel sinyal ve proteinlere ihtiyaç gösterir (44,45). Işık ve elektron mikroskopisi düzeyinde nekrozdan farklılıkları tanımlanmıştır (46). (Tablo 2)

**Tablo 2:** Apoptosis ve nekroz arasındaki farklar

	<b>Apoptosis</b>	<b>Nekroz</b>
<i>Mekanizma</i>	Aktif –genetik kontrollü	Kimyasal-fiziksel irritasyon
<i>Yaygınlık</i>	Tek tek hücreler halinde	Gruplar halinde
<i>Işık mikroskopisi özellikleri</i>	Kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon ve bazen hücresel baloncuklaşma, apoptotik cisimler	Hücre sel şişme, membran hasarı, nükleer piknoz, karyoliziz
<i>Elektron mikroskopisi özellikleri</i>	Kromatin ve stoplazmik yoğunlaşma, apoptotik cisimcikler, nükleer parçalanma	Hücre komponentlerinde şişme, kromatinde erime-kayıp
<i>Uyaran</i>	Fizyolojik ve/veya patolojik	Daima patolojik
<i>Hücre artıklarının temizlenmesi</i>	Komşu hücre fagositozu	Mikrosirkülasyon ve inflamatuvar hücrelerin bölgeye göçü

Apoptosis, embriyogenesis, normal doku turnover, immün gelişim ve defans ile tümör oluşumundan korunmada önemli rollere sahiptir. Daha uzun yaşama gereksinimi olmayan ve uzun süre ciddi hasara maruz kalan hücrelerde ölüm aktivasyonu başlar. Apoptosisin eksternal ve internal uyaranlar yoluyla indüksiyonu veya inhibisyonu mümkündür (40). Bu durum Tablo 3’de gösterilmiştir.

**Tablo 3:** Apoptosisin kontrolü

<b>Apoptosis aktivatörleri</b>	<b>Apoptosis inhibitörleri</b>
Fizyolojik aktivatörler TNF ailesi (Fas ligand, TNF) Growth faktör geri çekilmesi (IL-2) Glukokortikoidler	Fizyolojik inhibitörler Growth faktörler Regülatör proteinler Androjenler Östrojenler Bcl2 protein
Hasar ilişkili aktivatörler Tümör supressör gen (p53) Sitolitik T hücreler Serbest radikaller	Viral (adenovirus vb.) gen ürünleri
Terapötik ajanlar Kemoterapi Gama radyasyon UV radyasyon	Bazı farmakolojik ajanlar
Toksinler Etanol	

Apoptosisin oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak denebilir ki çevresel- genetik sinyallerin kontrolünde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri takiben plazma proteaz aktivasyonu apoptosisi oluşturmaktadır (46). Bugün apoptosisin saptanması ve ölçümü için birçok metod tarif edilmiştir. Ancak tek yöntemle ölçüm yerine birden fazla yöntemin kullanılması daha anlamlıdır. Bu yöntemler (41);

- 1. Işık mikroskopisi:** Morfolojik değişiklikleri izlemeye dayanır. Duyarlılığı çok, özgünlüğü az bir yöntemdir.
- 2. Elektron mikroskopisi:** Özgünlüğü yüksek, duyarlılığı az bir testtir.
- 3. DNA fragmantasyonunun saptanması:** Agaroz jel elektroforezi ve in situ TUNNEL yöntemi kullanılarak ölçülür.
- 4. Sistein proteaz aktivasyonunun ölçülmesi**

5. **Flowsitometrik analiz:** Değişik yöntemleri vardır. En sık kullanılanı DNA analizinde sub G-2 pikin (hipodiploidik pik) ölçümüne dayanan yöntemdir.
6. **İnvitro sistemlerde analiz**
7. **Sitoflorometrik analiz**

## MATERYAL VE METOD

Çalışma deneysel tipte olup, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma, Hematoloji ve Patoloji Laboratuvarlarında, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurul Başkanlığının 10.12.1999 tarih ve 37 toplantı numaralı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Denek olarak 21 adet, erişkin, ağırlıkları 250-325 gram olan , erkek, Spraque-Dawley ratları kullanılmıştır. Ratlar, İstanbul Üniversitesi DETAM laboratuvarından temin edilmiştir. Tüm ratlar standart rat yemi ve su ile beslenmiş ve ortalama 21°C sıcaklıkta hayvan laboratuvarında tutulmuşlardır.

Her bir grupta 7 adet olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur. Gruplar şu şekilde planlanmıştır:

Grup 1: Sekonder iyileşmeye bırakılan yaralar

Grup 2: Greftleme yoluyla kapatılan yaralar

Grup 3: Flep kullanılarak kapatılan yaralar

Ratlar, içine sülfirik eter damlatılmış plastik kovalarda 2-3 dakika bekletildikten sonra 26 G insülin enjektörü ile kalçalarına intramüsküler enjekte edilen 50mg/kg Ketamin ile uyutulmuşlardır. Operasyon masasına dört ekstremitelerinden sabitlendikten sonra sırtları traş edilmiştir. Her bir ratın dorsalinde 2cmx2cm (4cm<sup>2</sup>) olacak şekilde işaret kalemi ile çizim yapılmıştır (Resim 1). Operasyon sahaları usulüne uygun olarak %10'luk Povidon iyot ile boyandıktan sonra deri, No: 15 bistüri yardımıyla tam kalınlıkta uzaklaştırılarak cerrahi bir yara oluşturulmuştur . Bu yaralar tüm gruplarda salin (serum fizyolojik) ile ıslatılmış tamponlar kullanılarak bohça yöntemi ile pansuman (tie-over dressing) yapılmıştır. (Resim 2). Operasyon sonrası 3. günde pansumanlar açılmadan tamponlar serum fizyolojik ile ıslatılmıştır.

Operasyon sonrası 7. günde ratlar aynı şekilde uyutularak pansumanlar açılmış ve oluşan granülasyon dokuları gözlenmiştir (Resim 3). Bu aşamada saptanan enfeksiyon bulguları, ilgili ratın çalışma dışı tutulmasını sağlamıştır. Her üç gruptaki granülasyon dokularından bistüri yardımıyla sürüntü-kazıntı materyalleri alınıp flowcytometry ve

elektroforez tetkikleri için RPMI 1640 medium içinde Hematoloji laboratuvarına transfer edilmiştir. Yine Patoloji laboratuvarında incelenmek üzere bistüri ile kesilerek yaranın sağ alt köşesinden (farklı zamanlarda alınacak örneklerle çakışmaması için belirlenmiş bir bölge) spesimen alınmıştır. Transfer %10'luk nötral formaldehit solüsyonu içinde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem tamamlandıktan sonra Grup 1 ratları daha önce tarif edildiği şekilde yeniden pansuman yapılmışlardır. Grup 2 ratları daha önceden traş edilmiş ratın bir başka dorsal alanından bistüri yoluyla alınmış TKDG ile greftlenmişlerdir (Resim 4). Grup 3 de ise random paternli lokal transpozisyon flepleri kullanılarak yaralar kapatılmıştır (Resim 5).

Grup 2 ve 3'te yapılan bu ikinci cerrahi işlemden sonra 6 ve 24. saatlerde ratlar yeniden tarif edildiği şekilde uyutularak flowcytometry için spesimenler alınmıştır.

Her üç grupta ilk cerrahi girişimden sonra 10. günde ratlar uyutularak postoperatif 7. günde tarif edildiği şekilde üçer adet spesimen daha alınmıştır.

Her bir girişimden sonra ratlar uyanınca ayrı kafeslere alınarak bakımları yapılmıştır. Yapılan cerrahi işlemler nedeniyle hiç bir rat sakrifiye edilmemiştir.

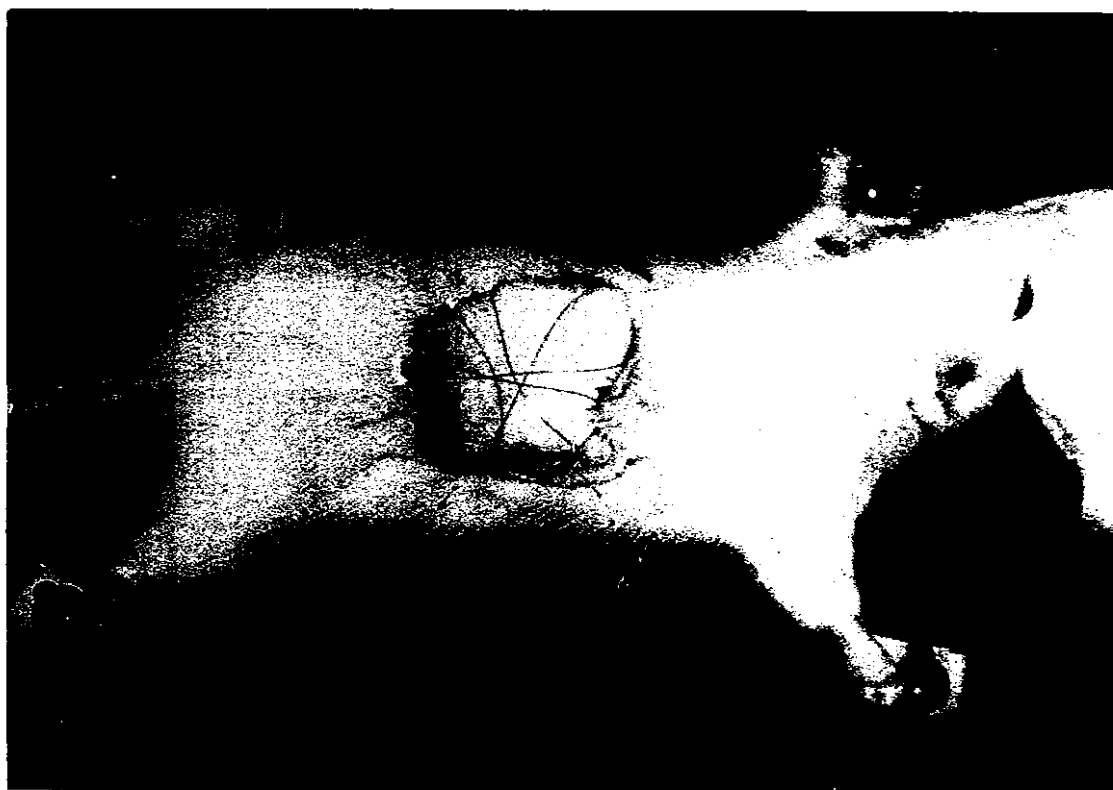
Çekimler Canon T70 fotoğraf makinesiyle 100 ASA Kodak ektachrome slide filmi kullanılarak yapılmıştır.



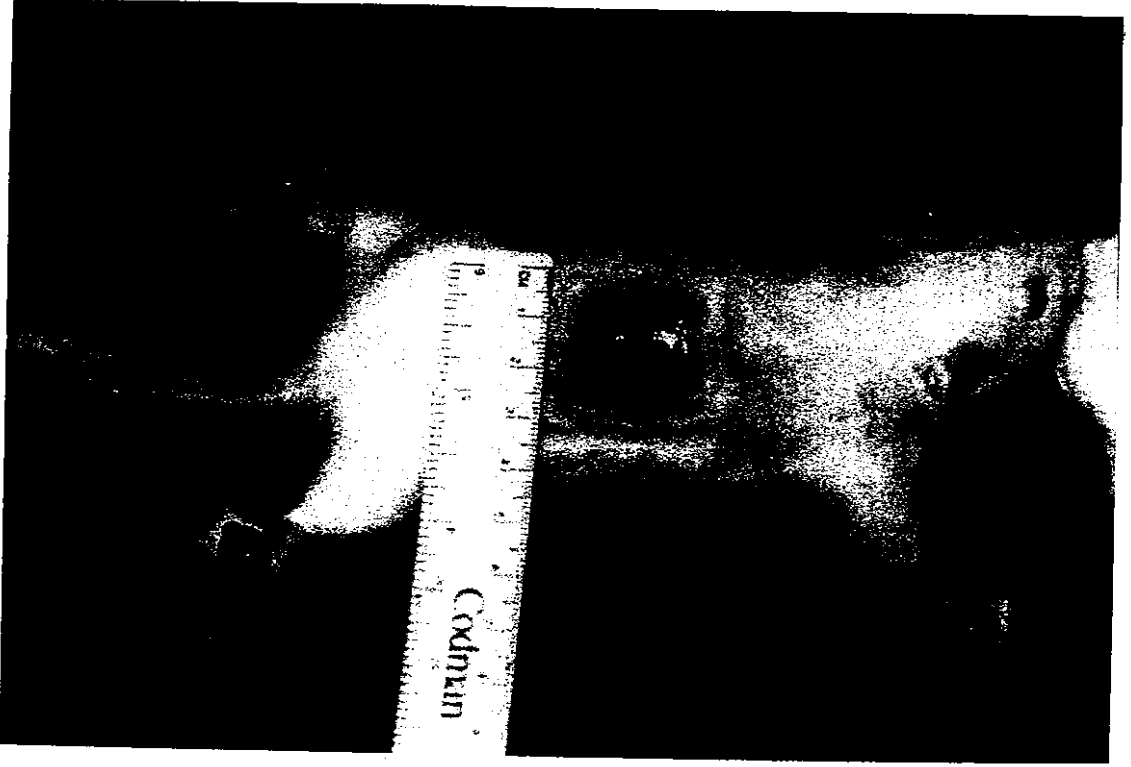
**Resim 1:** Rat sırtında oluşturulacak defektin planlanması



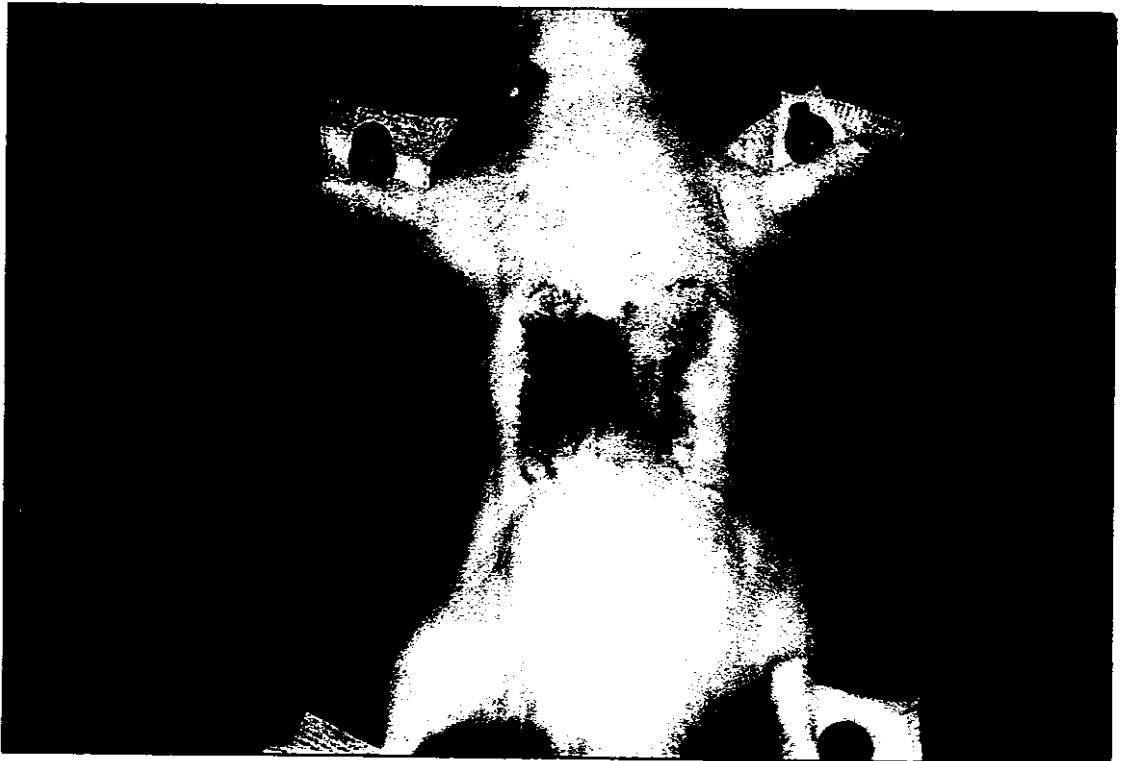
**Resim 2:** Defektin pansumanla kapatılması



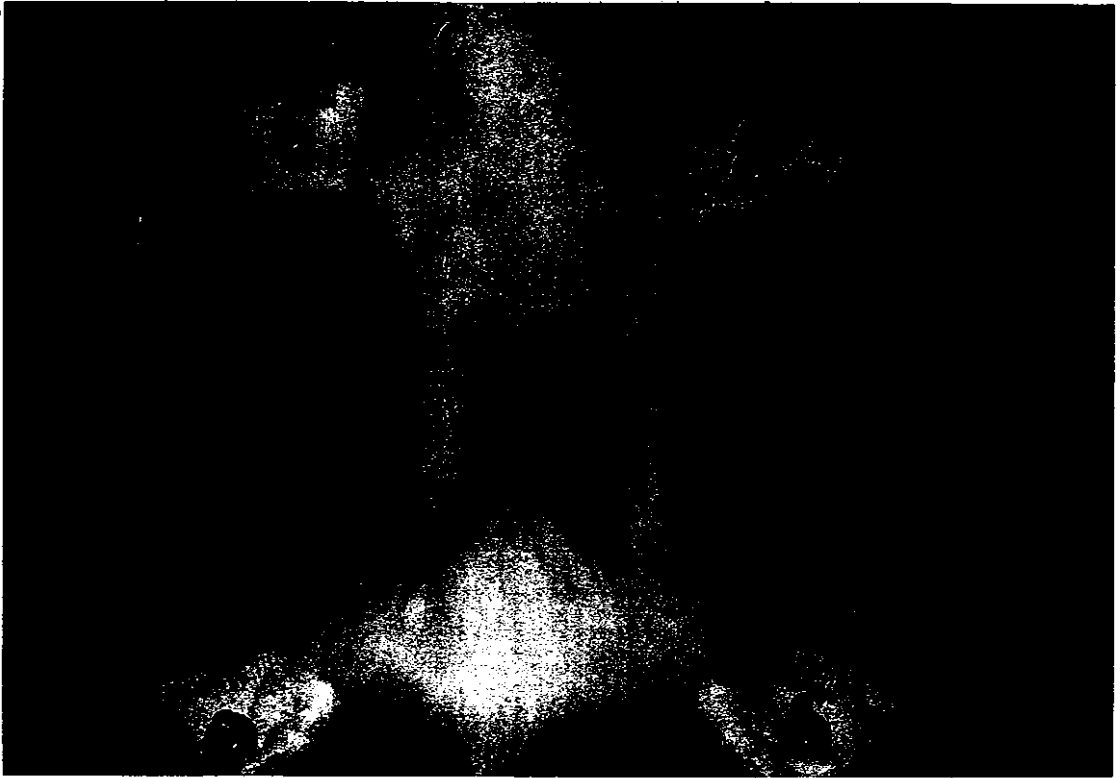
**Resim 3:** Oluşan granülasyon dokusunun 7 gün sonraki görünümü



**Resim 4:** Defektin TKDG ile kapatılması



**Resim 5:** Defektin transpozisyon flebi ile kapatılması



## **FCM ile Apoptosis ve DNA indekslerinin saptanması:**

Hücrelerin  $G_0/G_1$ ,  $G_2/M$  ve sentez safhasındaki yüzdeleri saptandı. FCM ile çalışma için inkübasyon sonrası elde edilen hücreler PBS ile yıkandı ve hücre sayıları en az  $3 \times 10^3$ /ml olacak şekilde ayarlandı. Hücreler daha sonra 'DNA-prep work station'da işleme tabi tutuldu. Bu işlem sırasında otomatize olarak ilk solüsyon olan LPR solüsyonu ile hücre membran permeabilitesi artırılarak, ikinci solüsyon olan DNA-prep stain karıştırıldı. Bu solüsyonda kırmızı floresan içeren promidium iodide (Pİ) ve ribonükleaz bulunmakta olup LPR solüsyon ile membranında porlar açılmış hücrelerin DNA ve RNA'sının Pİ ile boyanması sağlandı. Ribonükleaz vasıtasıyla boyanmış olan RNA'ların ortadan kaldırılması sağlandı. Böylece DNA içeriğinin Pİ ile işaretlenmesi amaçlandı. 15 dakikalık Pİ ile inkübasyondan sonra FCM'de X ekseninde PmT-4 peak ve Y ekseninde PmT-4 integral kullanılarak çalışmaya alınacak hücre grupları kapı ile belirlendi. Böylece çift hücreler elimine edildikten sonra PmT-4 integral X ekseninde; hücre sayısı Y ekseninden yer alacak şekilde grafiklendirildi. Çıkan sonuçların değerlendirilmesi multicycle DNA analiz programıyla yapıldı (47,48).

Hücrelerin  $G_0/G_1$ ,  $G_2/M$  ve sentez safhalarındaki yüzdeleri saptandıktan sonra aşağıdaki formül ile proliferatif indeks hesaplandı.

$$\text{Proliferatif İndeks(PI)} = S + G_2/M$$

Apoptosis için hücreler panmyeloid marker (CD33FTIC) ile boyandı. DNA analizinde sub G-2 piki (hipodiploidik pik ) apoptosis piki olarak değerlendirildi (49).

## **DNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi:**

Denek ratların granülasyon dokularından 7 ve 10. günlerde sürüntü- kazıntı örnekleri 2 ml RPMI 1640 mediumlu tüplere alındı. Standart protokollere göre Macherey-Nagel filtre sistemi ile DNA izole edildi (50). DNA'ların saflığı 260/280 nm' de UV spektrofotometrede ölçülüp belirlendi, konsantrasyonu 50 ng/ml'ye ayarlandı. DNA örnekleri deney tamamlanana kadar  $-30^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. DNA örneklerinden 10 mikrolitre alınıp 2 mikrolitre loading buffer eklenerek 1X TBE tamponuyla hazırlanmış %1'lik DNA grade agaroz jelde yürütüldü (70 V, 50 A, 2 saat). Agaroz jeli UV transilluminatörde değerlendirildi ve fotoğraflandı. DNA jelinde yayılma (smear)

tespit edilen örnekler apoptosis olarak değerlendirildi ve FCM sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

### **Histopatolojik değerlendirme:**

Aynı şekilde 7 ve 10. günlerde alınan granülasyon dokusu örnekleri %10 nötral formaldehitte tesbit edildi. Rutin takip sonrası parafin blok yapıldı. 5 mikronluk kesitler hazırlanıp Hematoksilen Eozin ve Masson Trichrome ile boyandı. Işık mikroskobu (Olympus BH-2) ile hücrelenme (PMN, lenfosit, histiosit vb.), kollajen formasyonu, ödem, myofibroblastlar ve vasküler yapılar açısından kalitatif olarak değerlendirildi. Gruplar birbiriyle karşılaştırıldı.

### **Verilerin istatistiksel analizi:**

Apoptosis (Ap) ve Proliferatif İndeks (PI) gibi ölçümsel veriler yönünden 3 grup karşılaştırılırken gruplar bağımsız ve parametrik koşulları yerine getirmediğinden Kruskal Wallis Varyans Analizi uygulandı. Gruplar değişen zamanlarda aynı parametreleri yönünden karşılaştırılırken veriler bağımlı ve parametrik koşulları taşımadığından Freidman testi kullanıldı. Post-hoc ikili karşılaştırma için anlamlılık düzeyi aşağı çekilerek Wilcoxon Testi kullanıldı. Post-hoc karşılaştırmalar için anlamlılık düzeyi karşılaştırma sayısına bölünerek bulundu. ( $p=0.05/1=0.05$ ) Grup 1'de 7 ve 10. gün değerlerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon Testi kullanıldı. Tüm testler için anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alındı. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirtildi.

## BULGULAR

### FCM sonuçları:

FCM DNA analizinde tüm gruplarda Ap ve PI ölçümleri yapıldı. 7 ve 10. günlerde Grup 1'in Ap sonuçları Tablo 4'de, PI sonuçları Tablo 5'de verilmiştir.

**Tablo 4:** Grup 1 ( sekonder iyileşme )'in Ap sonuçları

Rat no	Postop. 7. gün	Postop. 10. gün
1	4.0	6.0
2	8.0	12.8
3	1.9	3.1
4	1.0	12.3
5	2.3	8.7
6	24.9	36.5
7	2.3	0.9

Yapılan istatistiksel analizde sekonder iyileşmeye bırakılan yaraların 7.gün Ap verileri  $6.34 \pm 3.21$  iken bu değer 10. günde  $11.47 \pm 4.49$  olarak bulundu. Ap değerlerindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı idi. Bulunan p değeri anlamlılık düzeyi olan 0.05 'den küçüktü. ( $p < 0.05$ ).

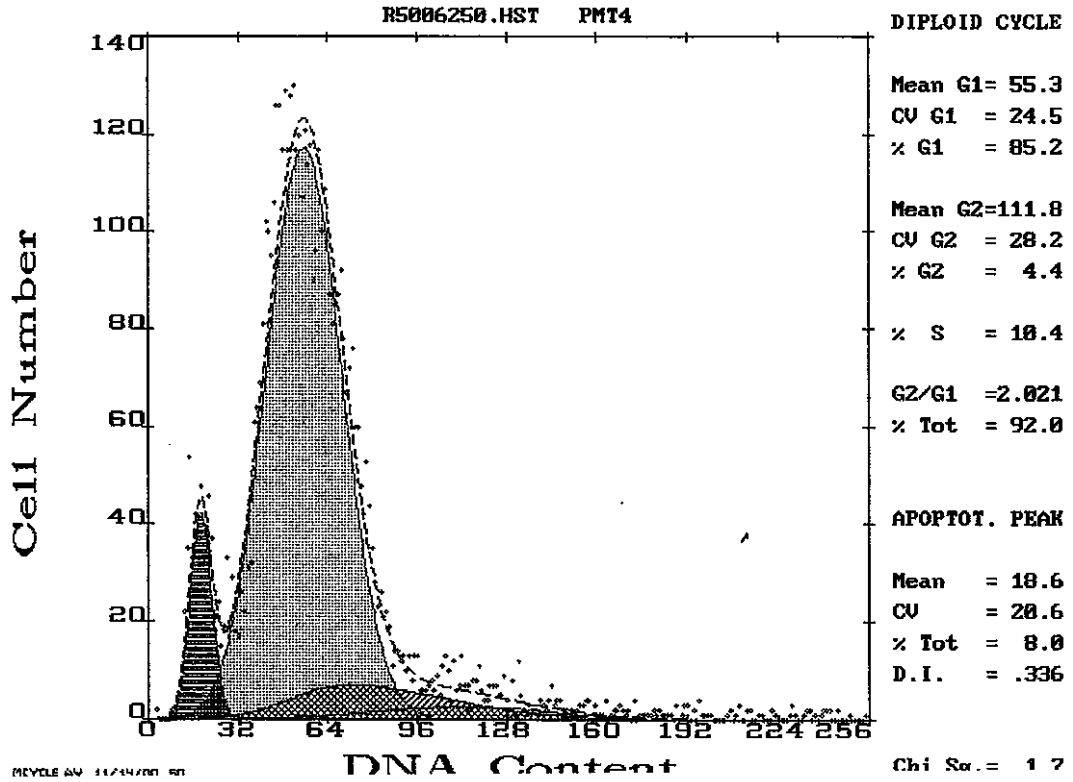
**Tablo 5:** Grup 1 ( sekonder iyileşme )'in PI sonuçları

Rat no	Postop. 7.gün	Postop. 10.gün
1	5.3	8.4
2	14.8	19.4
3	7.1	12.1
4	8.6	8.7
5	5.0	9.4
6	10.7	3.8
7	3.8	1.5

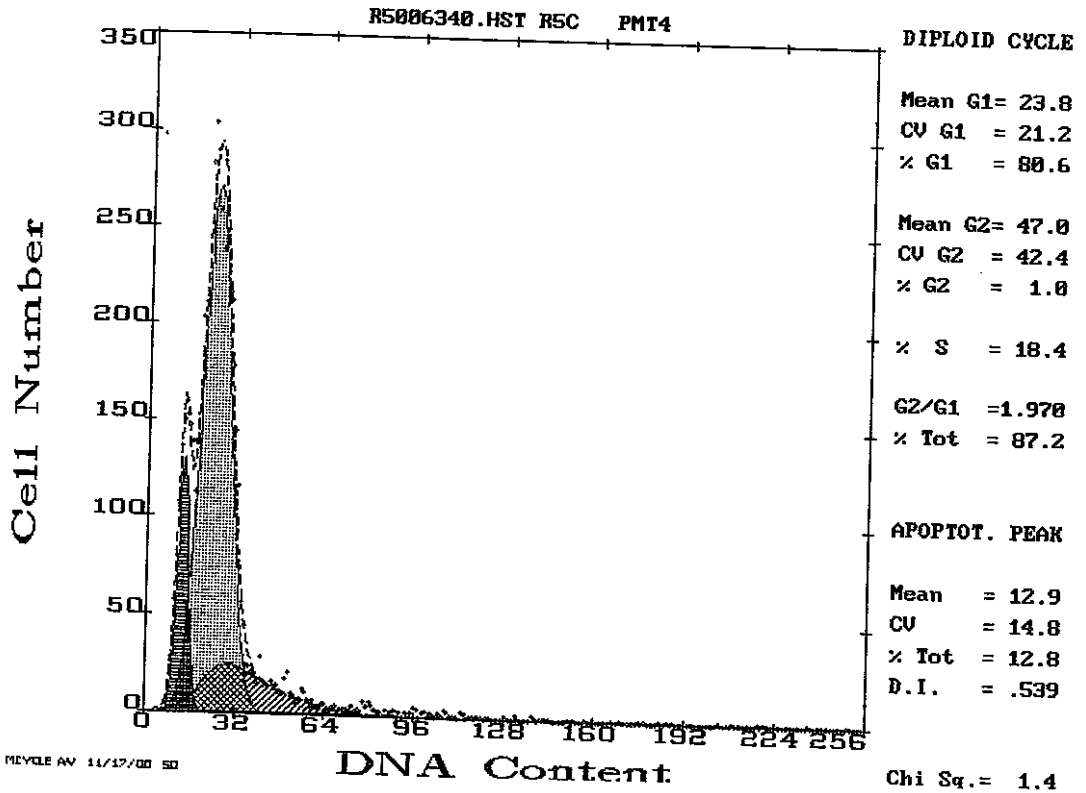
Aynı grubun PI değerleri istatistiksel analizde 7. gün için  $7.9 \pm 1.45$ , 10. gün değeri  $9.04 \pm 2.19$  olarak bulundu. Gözlenen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. ( $p>0.05$ ).

Grup 1'in 2 numaralı ratının (rnek amacıyla) FCM 7. gün histogram sonuçları Şekil 1'de, 10. gün sonuçları Şekil 2'de gösterilmiştir.

Şekil 1: Grup 1'in 2 no'lu ratının 7.gün histogram sonucu



Şekil 2: Grup 1'in 2 no'lu ratının 10.gün histogram sonucu





Grup 2'nin Ap sonuçları Tablo 6'da, PI sonuçları Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 6:** Grup 2 ( greftleme )'nin Ap sonuçları

Rat no	Postop. 7. gün	7. gün + 6.h.	7. gün + 24.h.	10. gün
1	1.7	1.9	1.0	2.5
2	0.5	6.3	13.1	1.1
3	1.3	1.4	8.2	12.8
4	1.2	3.1	4.1	5.2
5	10.7	1.8	1.1	5.6
6	2.9	4.9	1.4	9.3
7	1.8	1.0	1.6	1.9

Yaraların greftle onarıldığı bu grubun analizinde 7.gün Ap değeri  $2.78 \pm 1.25$  iken 10.günde  $5.49 \pm 1.61$  olarak bulundu. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. ( $p>0.05$ ). Bunun dışında farklı zamanlarda alınan spesimenlerde ölçülen Ap değerlerinin analizinde gözlenen artış da anlamlı değildi. ( $p>0.05$ ).

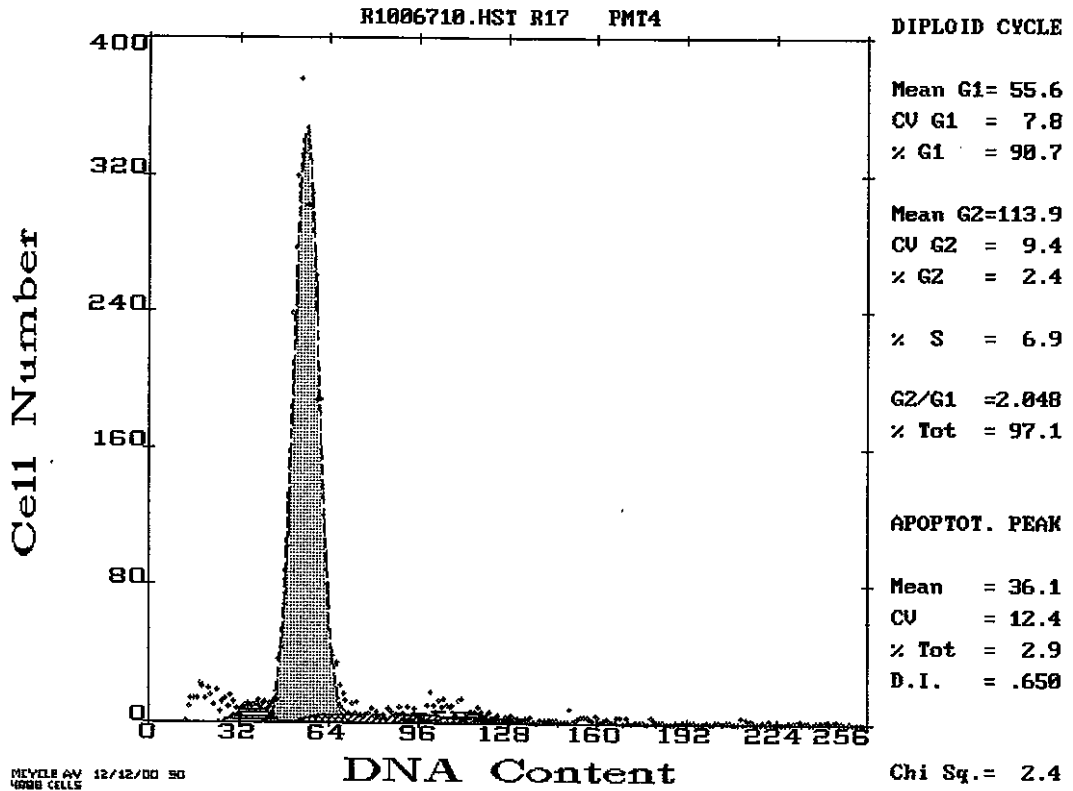
**Tablo 7:** Grup 2 ( greftleme )'nin PI sonuçları

Rat no	Postop. 7.gün	7.gün + 6.h.	7.gün + 24.h.	10.gün
1	0.9	4.1	1.3	0.6
2	11.9	5.2	4.5	2.2
3	14.6	3.0	9.0	5.3
4	12.0	3.2	2.8	7.7
5	7.0	2.2	1.3	4.0
6	9.3	7.0	2.1	3.7
7	1.6	3.3	3.8	3.9

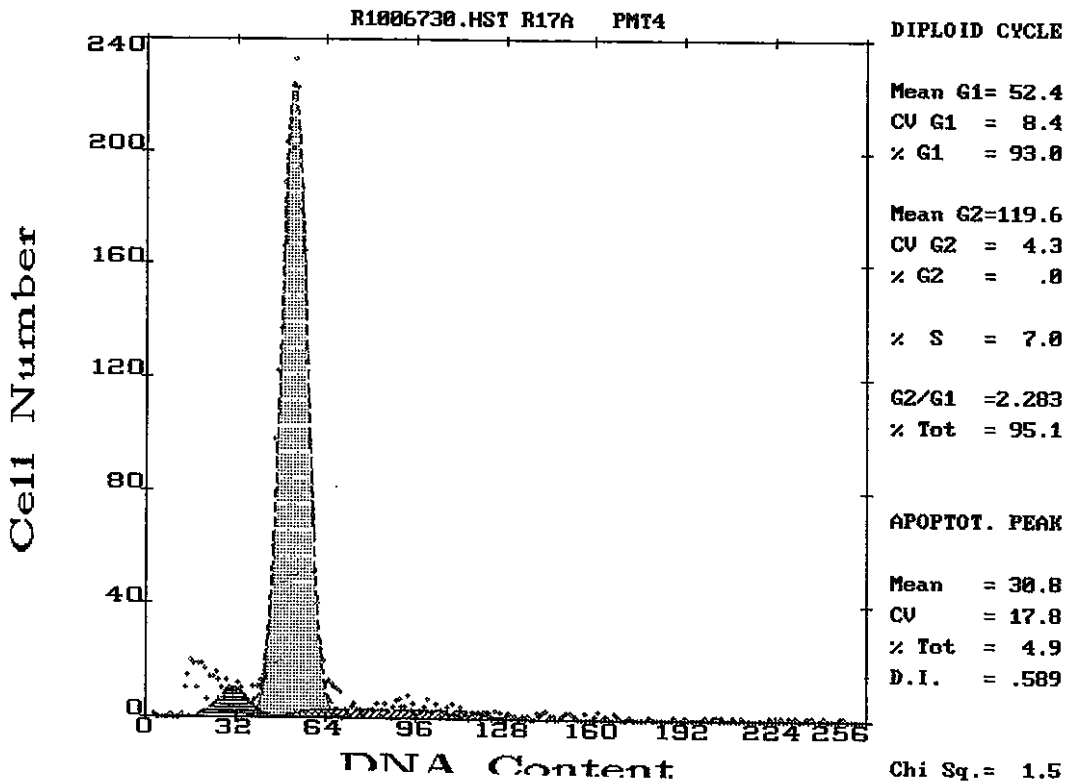
Aynı grubun PI sonuçları analizlere göre 7.günde  $8.19 \pm 2.00$ , 10.günde  $3.91 \pm 0.85$  idi. Gözlenen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ( $p<0.05$ ). Alınan dört ayrı spesimen için ölçülen PI değerlerindeki düşme ise anlamlı değildi. ( $p>0.05$ ).

Grup 2'nin 6 numaralı ratının (örnek amacıyla) FCM 7. gün sonuçları Şekil 3, 7.gün + 6.h. sonuçları Şekil 4, 7.gün +24.h. sonuçları Şekil 5 ve 10.gün sonuçları Şekil 6'da gösterilmiştir

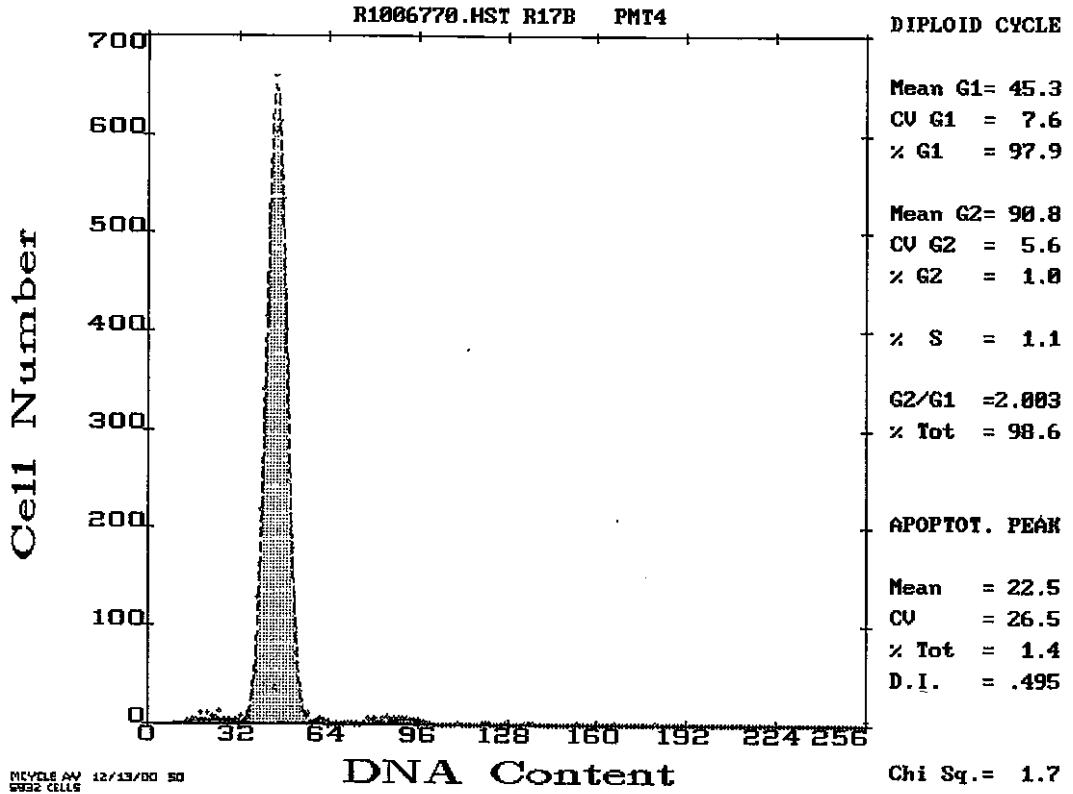
Şekil 3: Grup 2'nin 6 no'lu ratının 7.gün histogram sonucu



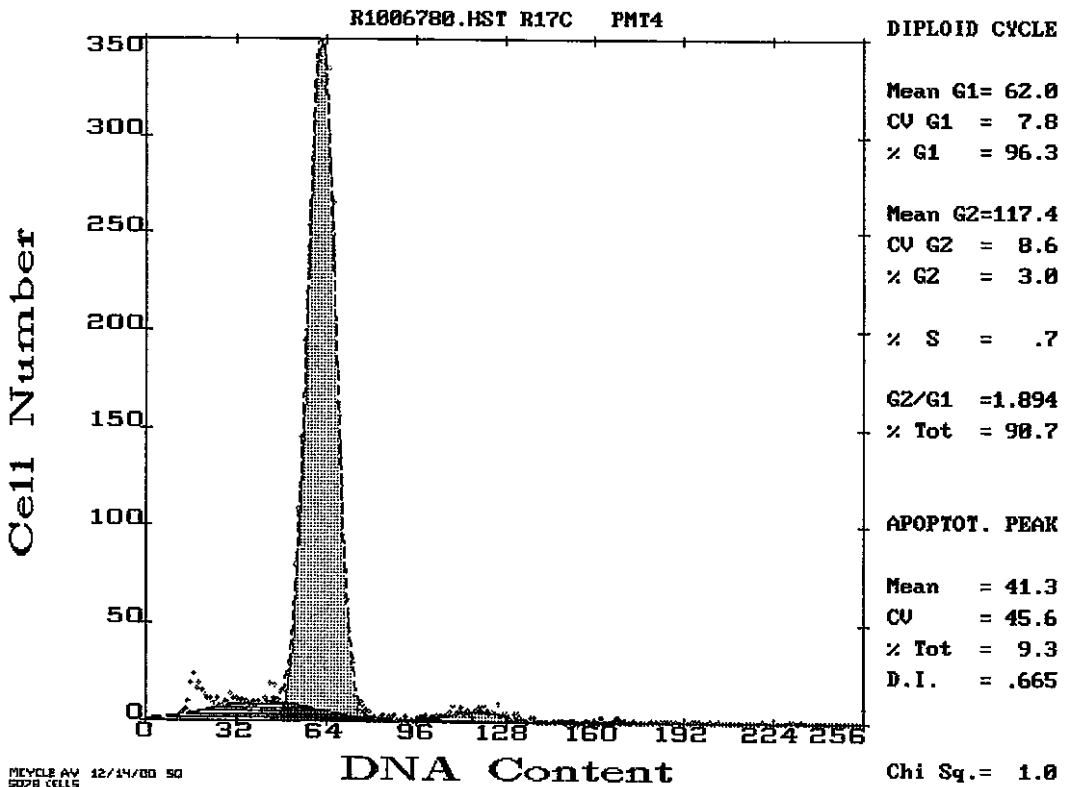
Şekil 4: Grup 2'nin 6 no'lu ratının 7.gün+6.h.histogram sonucu



Şekil 5: Grup 2'nin 6 no'lu ratının 7.gün+24.h. histogram sonucu



Şekil 6: Grup 2'nin 6 no'lu ratının 10.gün histogram sonucu



Grup 3'ün Ap sonuçları Tablo 8'de, PI sonuçları Tablo 9'da gösterilmiştir.

**Tablo 8:** Grup 3 ( fleple kapatım )'ün Ap sonuçları

Rat no	Postop. 7.gün	7.gün + 6.h.	7.gün + 24.h.	10.gün
1	23.4	6.1	3.6	4.8
2	3.8	0.4	7.0	3.1
3	1.8	1.0	0.9	1.7
4	4.5	1.4	4.0	1.3
5	4.0	6.7	0.3	1.1
6	1.8	0.9	0.4	1.0
7	3.3	2.7	1.7	2.9

Fleple kapatımları yapılan Grup 3'ün Ap değerlerinin analizinde 7.günde  $6.09 \pm 2.91$ , 10.günde  $2.27 \pm 0.53$  sonuçlarına ulaşıldı. Gözlenen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı idi. ( $p < 0.05$ ). Dört farklı zaman için yapılan analizde de Ap değerlerinde gözlenen değişiklik istatistiksel olarak anlamlı idi. ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 9:** Grup 3 ( fleple kapatım )'ün PI sonuçları

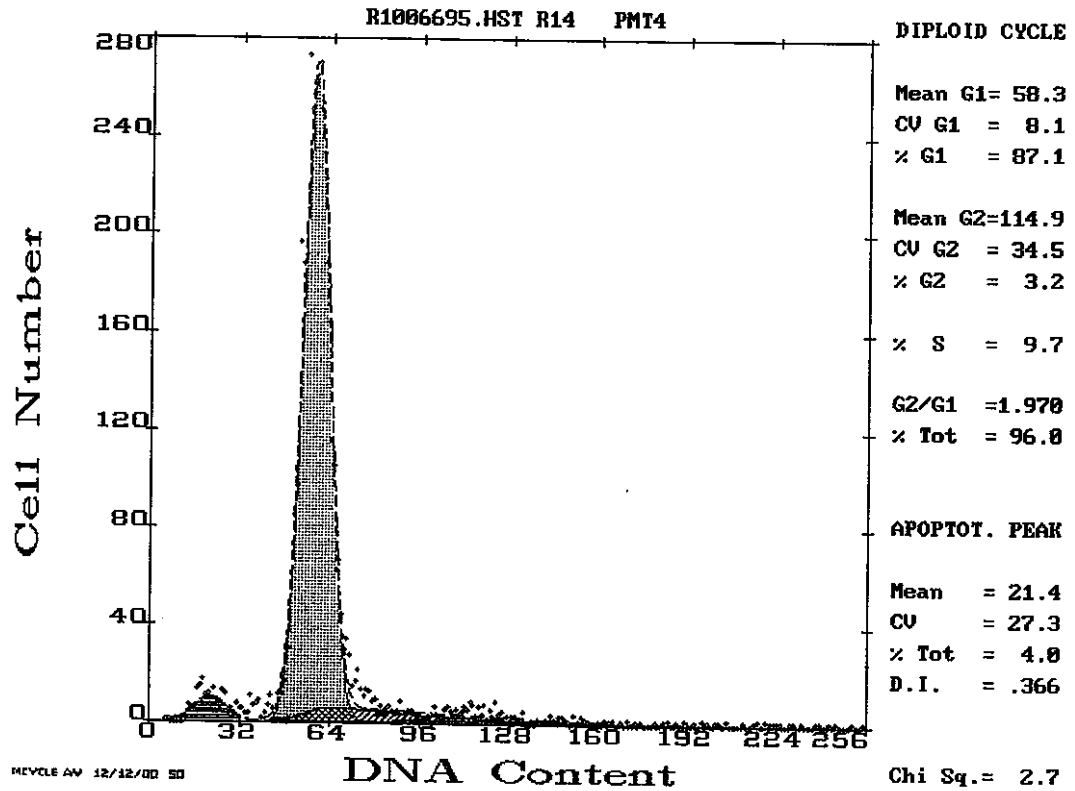
Rat no	Postop. 7.gün	7.gün + 6.h.	7.gün + 24.h.	10.gün
1	9.9	8.0	2.1	1.8
2	5.4	6.6	15.9	3.0
3	20.6	19.6	14.2	15.3
4	11.5	2.1	1.8	1.0
5	12.9	2.9	0.5	1.7
6	11.7	2.2	0.7	4.7
7	8.6	3.3	2.1	7.2

Aynı grubun PI istatistiksel değerleri 7.günde  $11.51 \pm 1.78$ , 10.günde ise  $4.96 \pm 1.90$  olarak bulundu. Bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı idi. ( $p < 0.05$ ). Dört farklı zamandaki PI değerlerindeki düşüşler de anlamlı idi. ( $p < 0.05$ ).

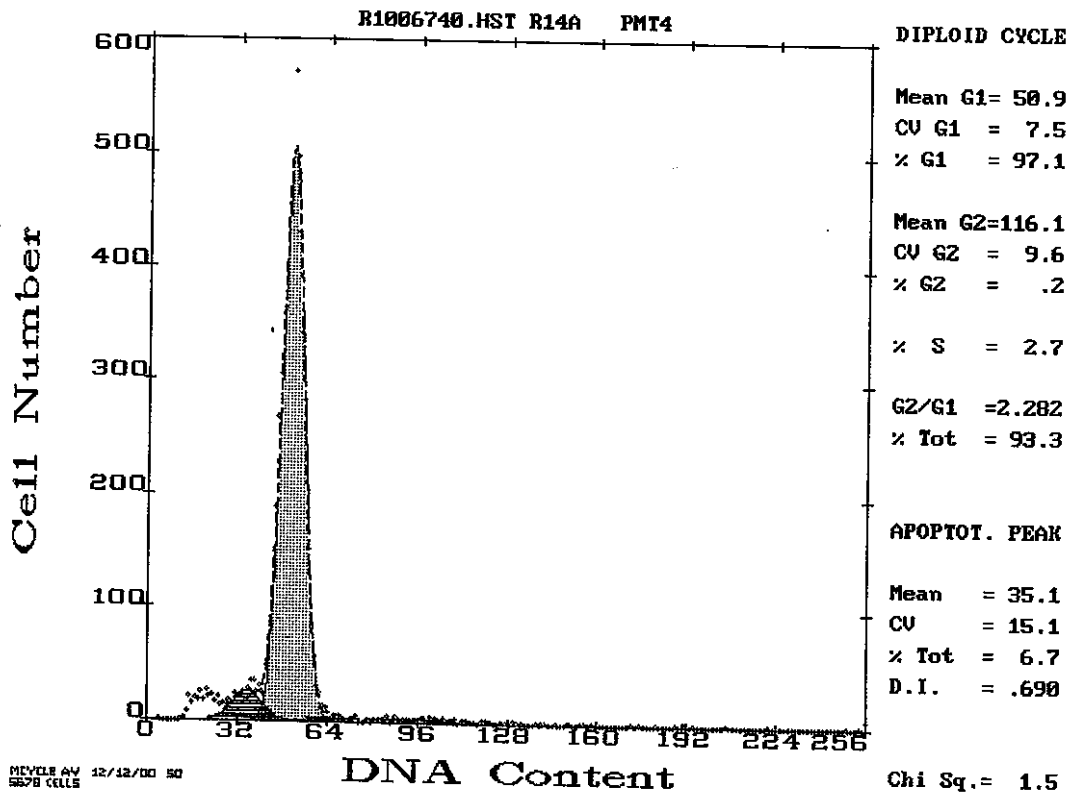
Üç grup birbirleriyle karşılaştırılınca; Ap 7.gün ( $p > 0.05$ ) ve 10.gün ( $p > 0.05$ ) ile PI 7.gün ( $p > 0.05$ ) ve 10.gün ( $p < 0.05$ ) arasındaki farklılıkların anlamlı olmadığı görüldü.

Grup 3'ün 5 numaralı ratının (örnek amacıyla) FCM 7.gün histogram sonuçları Şekil 7, 7.gün + 6.h. sonuçları Şekil 8 , 7.gün + 24.h. sonuçları Şekil 9 ve 10.gün sonuçları Şekil 10'da gösterilmiştir.

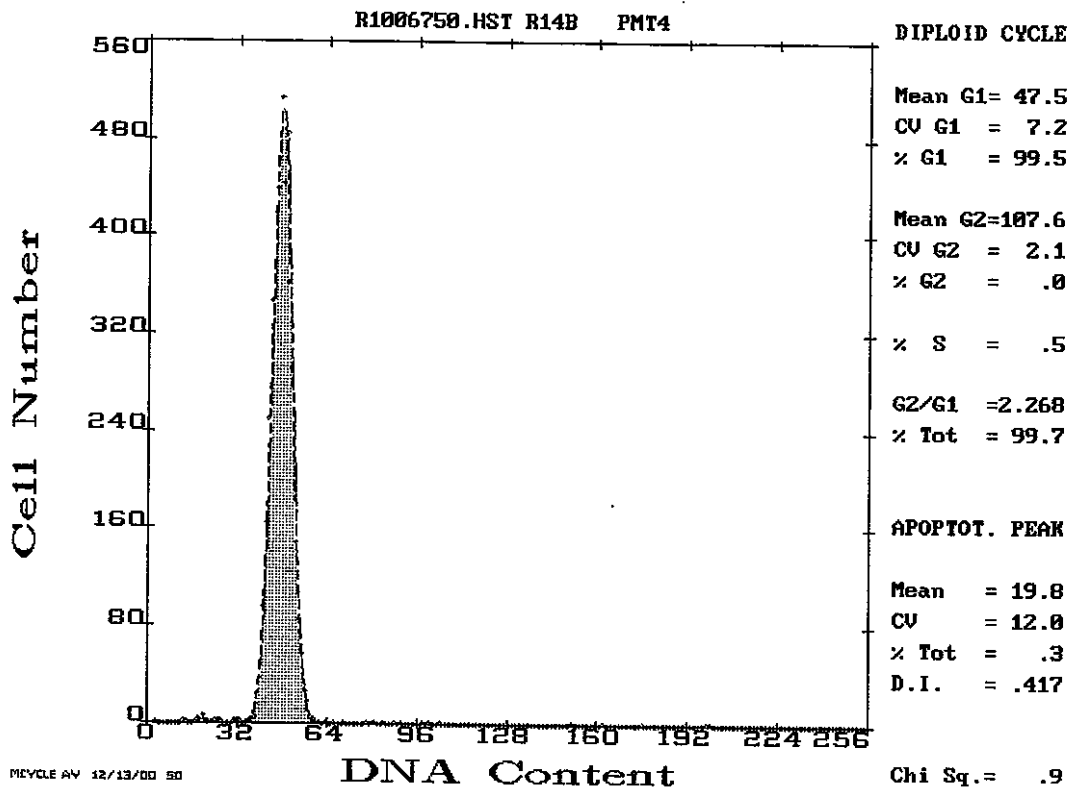
Şekil 7: Grup 3'ün 5 no'lu ratının 7.gün histogram sonucu



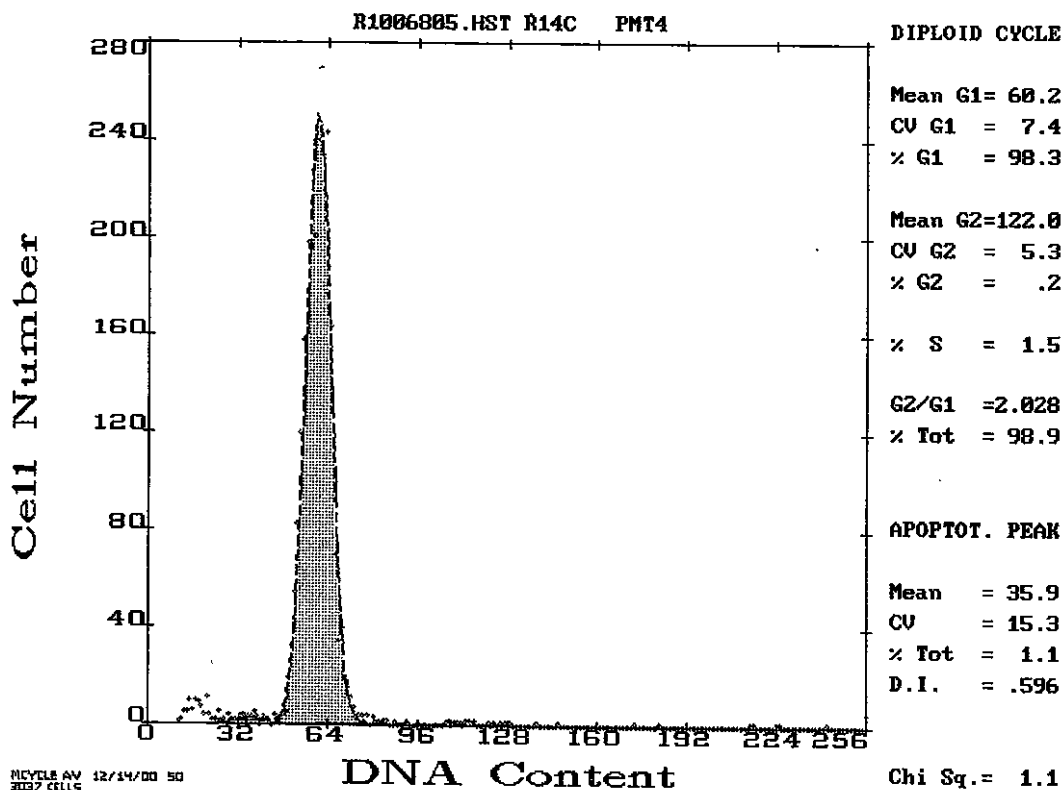
Şekil 8: Grup 3'ün 5 no'lu ratının 7.gün+6.h. histogram sonucu



Şekil 9: Grup 3'ün 5 no'lu ratının 7.gün+24.h. histogram sonucu



Şekil 10: Grup 3'ün 5 no'lu ratının 10.gün histogram sonucu



Tüm FCM sonuçlarına göre yapılan değerlendirmelerde sekonder iyileşen yaralarda Ap'in arttığı ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu, PI'in arttığı ve bunun anlamlı olmadığı görüldü. Greftle kapatılan yaralarda Ap'in arttığı ancak bunun anlamlı olmadığı ile PI'in düştüğü ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Fleple kapama yapılan yaralarda ise Ap'in ve PI'in istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi.

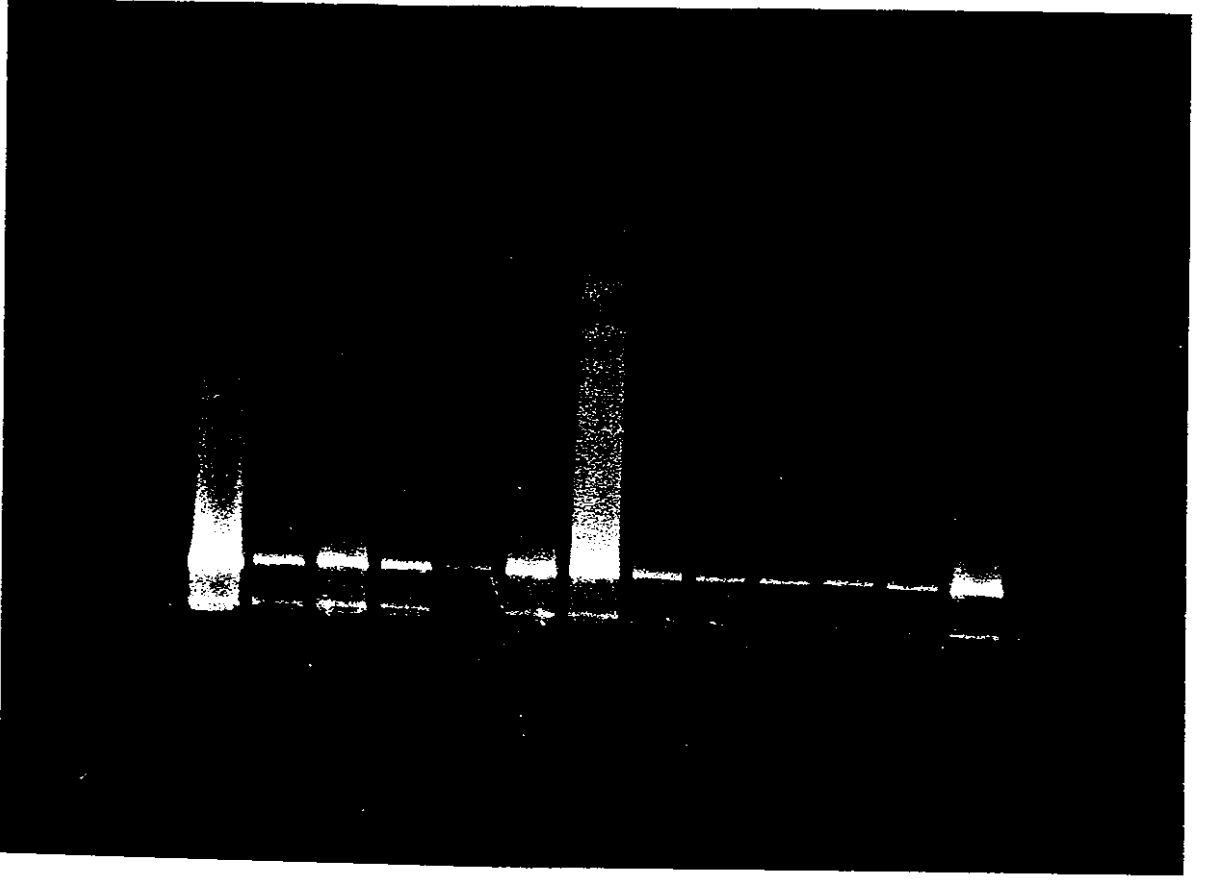
### **Agaroz jel elektroforez değerlendirmesi:**

FCM ile gösterilen bu apoptosis sonuçları tayinde bir başka önemli test olan agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi. Postoperatif 7. günde apoptosis olarak kabul edilen DNA jelindeki smear görüntüleri Resim 6 'da, 10. gündeki görüntüler ise Resim 7 'de gösterildi.

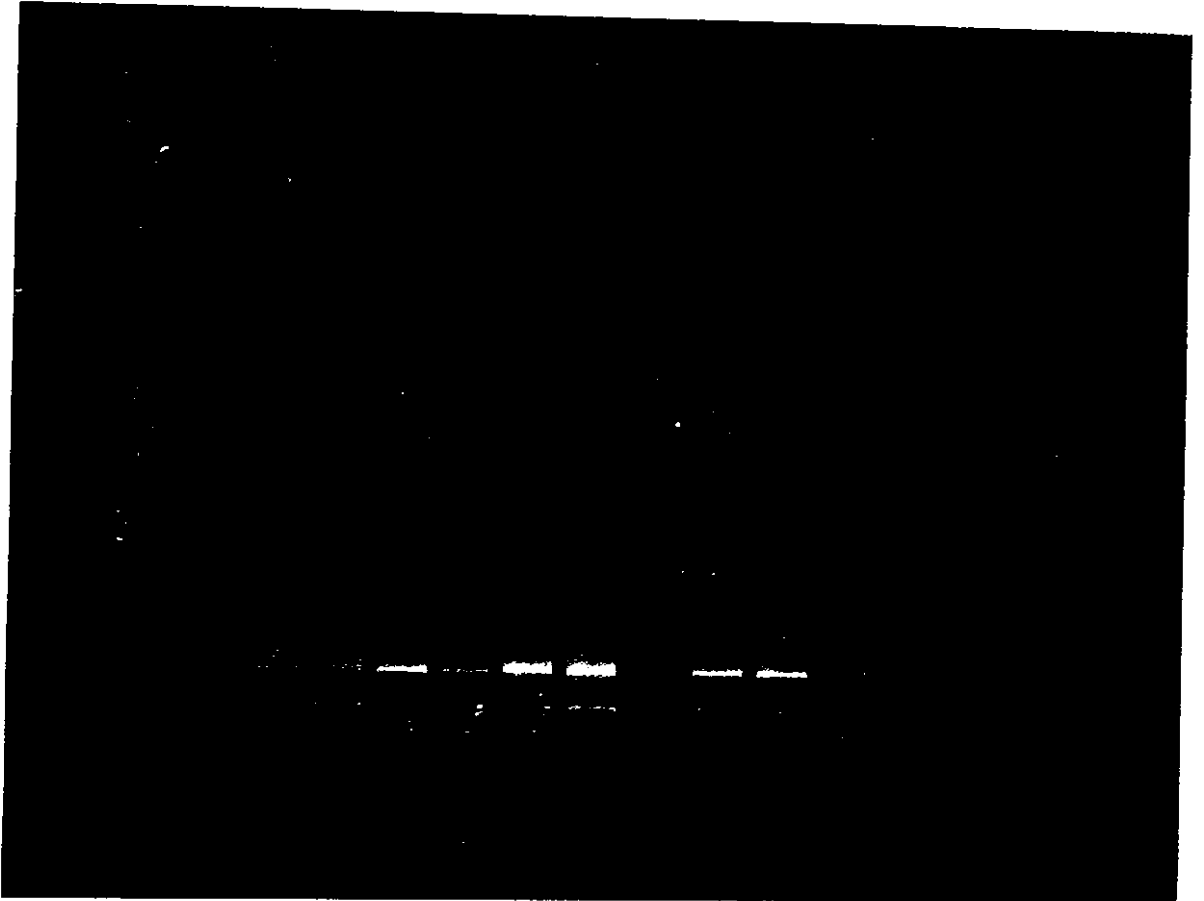
Bu fotoğraflarla ortaya konan görüntüler (jeldeki ilerlemeler) FCM sonuçlarıyla birebir karşılaştırıldı ve apoptosis ölçümleri ile uyumlu sonuçlara ulaşıldı.

### **Histopatolojik inceleme:**

Tüm gruplara ait granülasyon dokusu örnekleri Hematoksilen Eozin ve Masson Trichrome boyamalarından sonra değerlendirildi. Her üç grupta da postoperatif 7. günde myofibroblast miktarlarının birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Ödem mevcudiyeti ve vaskülarizasyon açısından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. Ancak postoperatif 10. günde özellikle Masson Trichrome boyamalarında gözlenmek üzere Grup 2 ve 3'de Grup 1'e göre myofibroblastların azaldığı buna karşın kollajen formasyonunda artış olduğu saptandı. Bu durum özellikle fleple onarımı yapılmış grupta belirgindi. 7 ve 10. günler arasındaki bu farklılıklar gruplar da göz önüne alınarak Resim 8-13'de gösterildi.

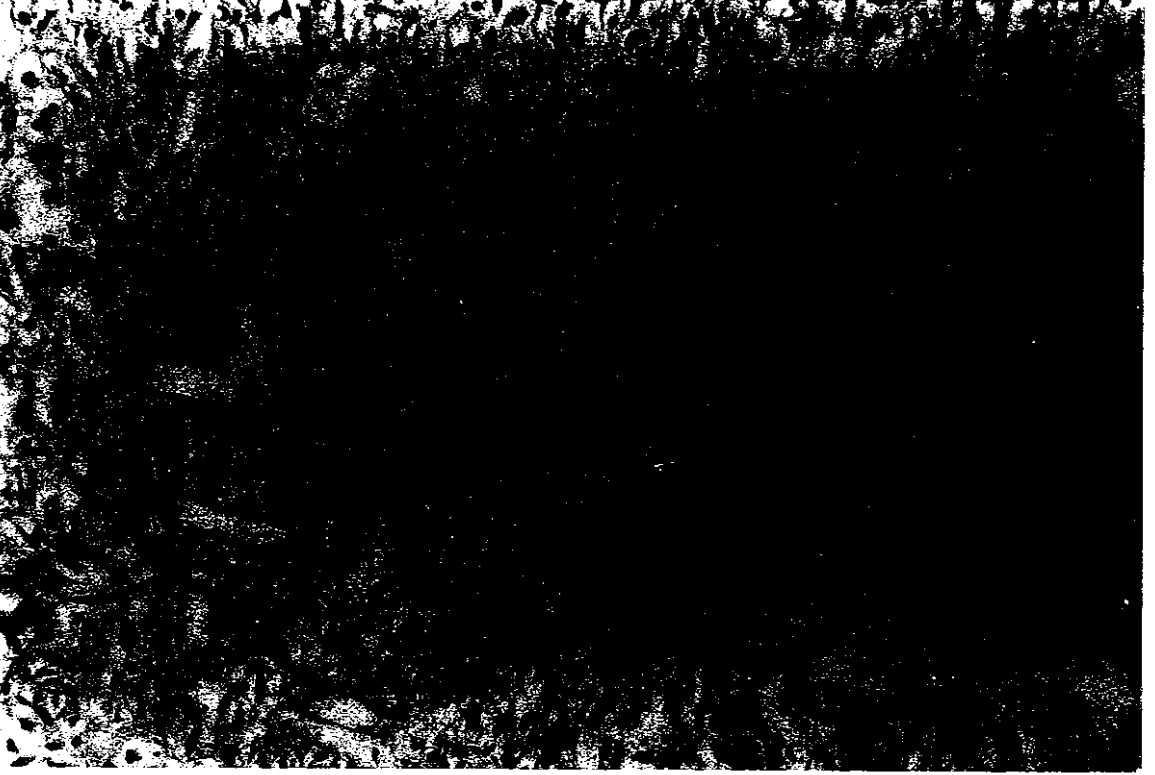


Resim 7: Agaroz jel elektroforezde smear görüntüleri ( 10. gün )





**Resim 8:** Granülasyon dokusu ışık mikroskopisi görüntüsü  
( Grup 1-7.gün-M.TrichromeX20 )



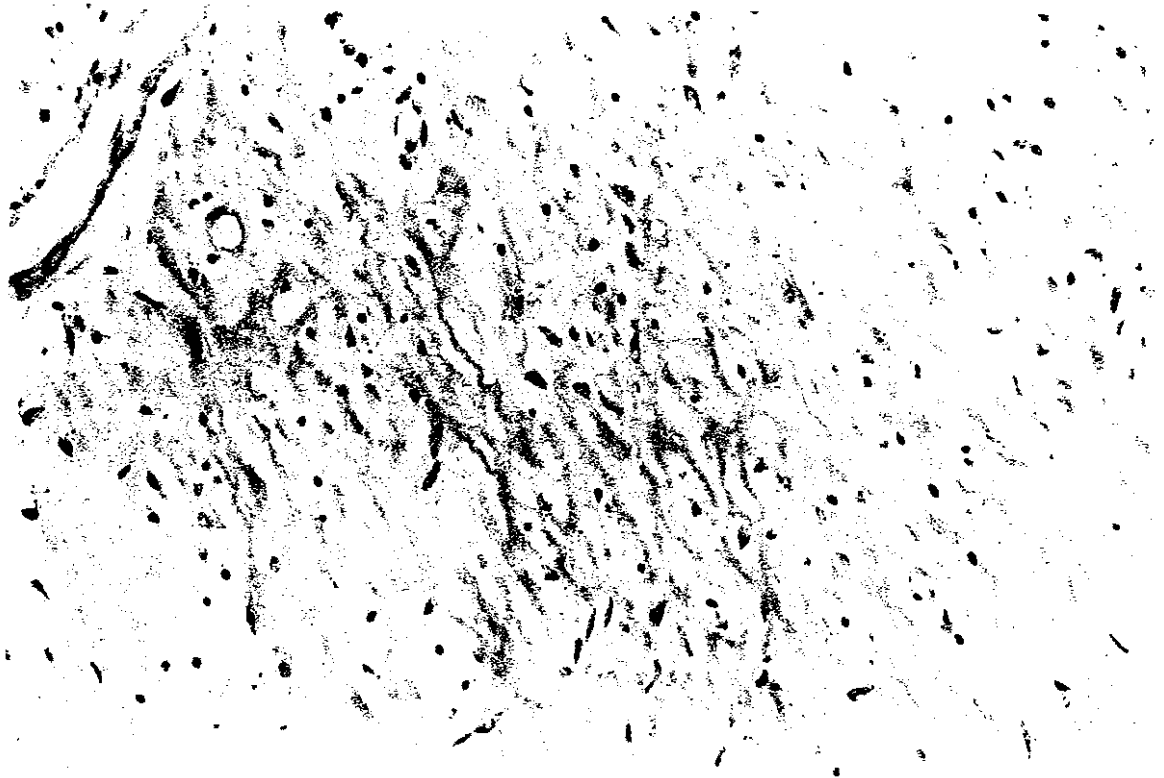
**Resim 9:** Granülasyon dokusu ışık mikroskopisi görüntüsü  
(Grup 2-7.gün-M.TrichromeX20)



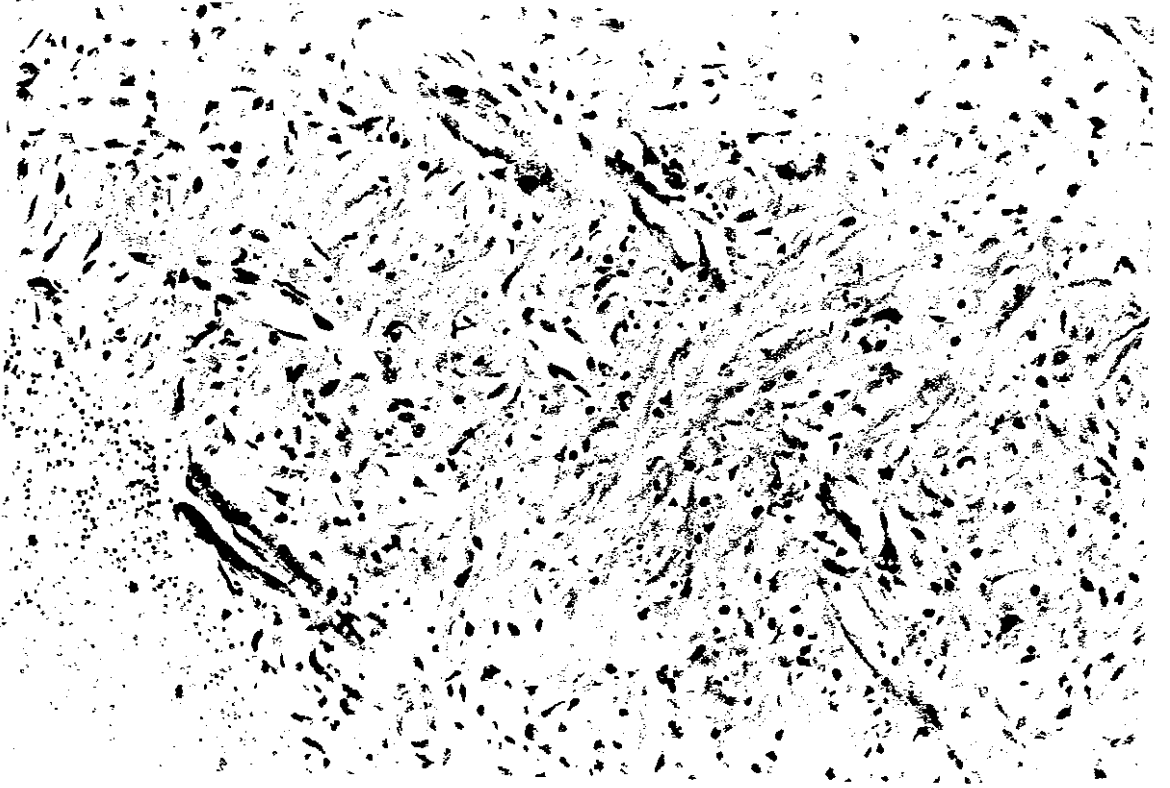
**Resim 10:** Granülasyon dokusu ışık mikroskopisi görüntüsü  
( Grup 3-7.gün-M.TrichromeX20 )



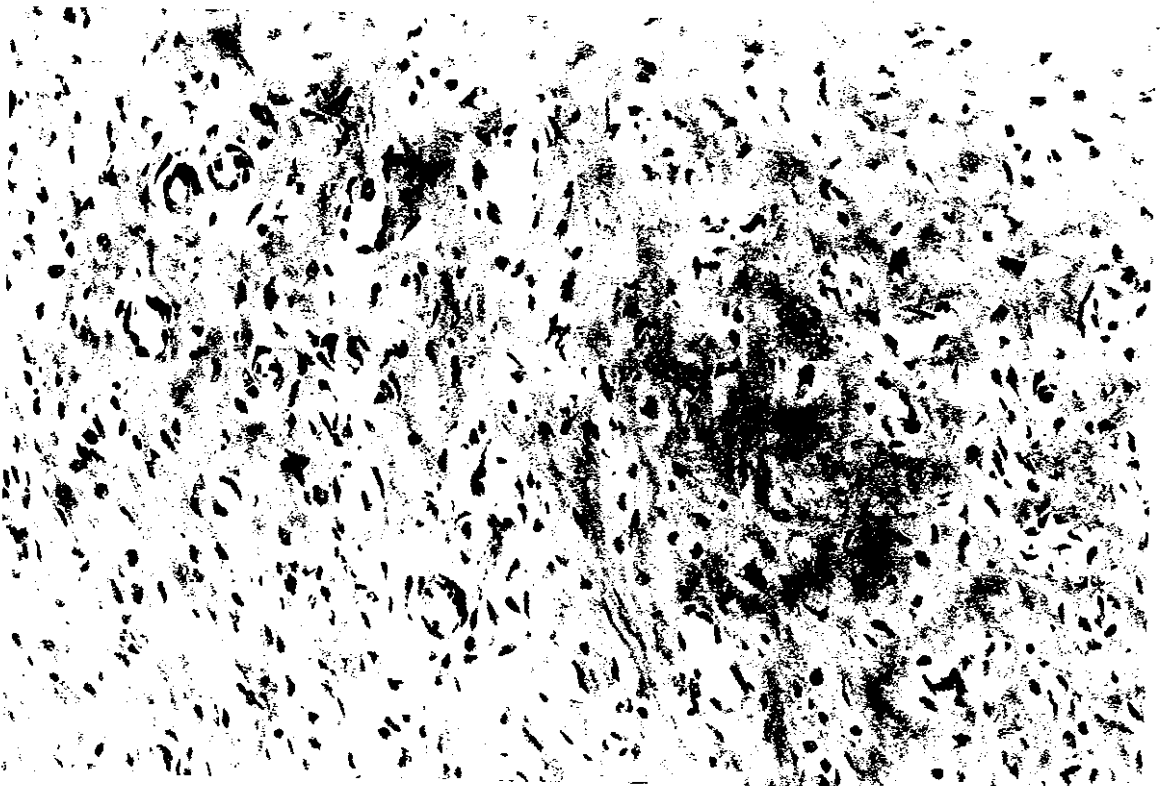
**Resim 11:** Granülasyon dokusu ışık mikroskopisi görüntüsü  
( Grup 1-10.gün-M.TrichromeX20 )



**Resim 12:** Granülasyon dokusu ışık mikroskopisi görüntüsü  
( Grup 2-10.gün-M.TrichromeX20 )



**Resim 13:** Granülasyon dokusu ışık mikroskopisi görüntüsü  
( Grup 3-10.gün-M.TrichromeX20 )



## TARTIŞMA

Yumuşak doku yara iyileşmesi henüz bütün aşamaları aydınlatılamamış oldukça kompleks bir olaylar dizisidir. Yara iyileşmesinde optimal kalite için 5 parametre kullanılmaktadır (51):

1. Hızlı iyileşme
2. İyi biyomekanik özellikler
3. Elastisite
4. Epidermis-dermis arasındaki adhezyonun yeterince sıkı olması
5. Estetik sonucun iyi olması.

Yumuşak dokularda meydana gelen yaraların onarımı eğer mümkünse primer onarım diye adlandırılan yara dudaklarının karşılıklı birleştirilmesi yoluyla yapılır. Bu, sözü edilen parametrelerin en iyi sonuç verdiği onarım şeklidir. Ancak bazı durumlarda bu onarım uygun değildir ve başka seçenekler gündeme gelmektedir. Plastik cerrahinin önemli ilgi alanlarından birini oluşturan greft ve flep tekniklerinin kullanımı her zaman akılda bulundurulmalıdır. Primer tamir ile kıyaslanmasa bile konvansiyonel bir yöntem olan ve hala çok iyi bilinmesi gereken sekonder yara iyileşmesi ile karşılaştırılınca üstünlükleri tartışılmaz olan bu cerrahi yöntemlerin yara iyileşme sürecinde meydana getirdikleri biyokimyasal değişimler bir çok araştırmanın konusu olmuştur. Schilling'e göre dört aşamada gerçekleşen yumuşak doku yara iyileşme olayı iç içe geçmiş ve birbirini aktive eden biyolojik bir süreçtir (8). Her bir aşamanın başlaması bir önceki safhanın hücresel elemanlarının eliminasyon hızına bağlıdır (52). Günümüze kadar çok yoğun araştırmaların konusu olan yaranın, erken fazları üzerinde yapılan biyokimyasal ve fizyolojik çalışmalar remodeling fazından fazladır (53,54,55).

Yara iyileşmesinin asıl süreci inflamasyondur. Hücresel infiltrasyon önemlidir ve varlığı normal erken onarımın habercisidir. İnflamasyonun gerilemesindeki eksiklik hipertrofik skar ve keloide yol açabilir (38).

Yaşayan organizmaların dengesi yalnız hücresel büyüme ve çoğalmayla değil aynı zamanda hücre ölümü ve destrüksiyonuyla da sağlanır. Tanımlanmış iki türlü hücre ölümü vardır: Nekroz ve apoptosis. Nekroz osmotik denge değişikliğine bağlı hücre

hasarın oluşumudur. Hücreler şişer ve lizize uğrar. Salınan intrasellüler içerik inflamasyonu uyarır. Programlı hücre ölümü ya da apoptosis daha fazla yaşamaya ihtiyacı olmayan hücrelerin kendi kendini yok etmesidir. Bunda hücresel içerik salınmaksızın spesifik bir gen aktivasyonu ile nükleer kondensasyon ve DNA fragmentasyonu gelişir. İnflamasyon oluşmaz. Fagositoz makrofaj ve diğer komşu hücrelerce sağlanır (38).

Son zamanlarda apoptosis ; timus, intestinal mukoza, prostat, uterus, adrenal korteks, granuloza hücreleri, hematopoietik hücreler ve nöronlarda tanımlanmıştır (56-61). Apoptosis embriyogenez, diferansiyasyon, metamorfoz, yaşlanma, nöral gelişim, epitelyal turnover, immün sistem hücre popülasyon regülasyonu ve tümör regresyonunda önemli görevler üstlenir (62). Apoptosis ile bazı hastalıklar ve durumlar arasındaki ilişkiler ortaya konmuştur. Bunlar; kanser, AİDS, otoimmün hastalıklar ve greft rejeksiyonudur (63-66).

Bazı araştırmacılara göre hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengenin bozulması p53 geninde mutasyon ve apoptosis ilişkili genlerdeki down-regülasyon yoluyla olmaktadır (67).

Araştırmamızda farklı yara kapatım modelleri sonrası granülasyon dokusu hücrelenme durumları ve apoptosis miktarlarını şu şekilde ortaya koyduk:

1. Sekonder yara iyileşmesinde apoptosis artmıştır. Proliferatif indeks artmış ancak bunun istatistiksel anlamı olmamıştır.
2. Greftleme sonrası proliferatif indeks azalmıştır. Apoptosis artmış ancak bu istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.
3. Fleple kapama yapılan yaralarda apoptosis ve proliferatif indeks anlamlı derecede azalmıştır.

Yaralanma sonrası doku onarımı; inflamasyon, granülasyon dokusu formasyonu ve skar dokusu oluşumu ile gerçekleşir (68). Deri yaralarında fibroblast birikimi belirgin bir durumdur. Yaralanmaya yanıt olarak ilk 3 gün içinde çevre dokularda fibroblastlar proliferere olur. Dördüncü günde bu fibroblastlar yara alanına göç ederler. 7. güne kadar ekstrasellüler matriks formasyonu belirir. Bu aşamadan sonra fibroblastlar apoptosis yoluyla azaltılmaya başlanır. Kütanöz yara onarımında fibroblastlar 4 fenotipik görünüm sahibidirler (69):

1. Proliferasyon
2. Migrasyon
3. Ekstrasellüler matriks molekül sentezi
4. Kalın aktin bantlarının oluşumu

Granülasyon dokusu hasarlı alanın etrafındaki bağ dokudan gelişir ve küçük damarlar , inflamatuvar hücreler, fibroblastlar ve myofibroblastlardan oluşur.

Tam kalınlıkta bir yara açık iyileşmeye terk edilirse kontraksiyon görülür. Bunun nedeni olarak bazı araştırmacılar özelleşmiş myofibroblastların içerdikleri kontraktıl proteini (aktin) suçlarken bazıları da fibroblastlar ile hasarlı kollajen matriks arasındaki etkileşimi sorumlu tutmaktadırlar (70,71).

Araştırma yumuşak doku yara iyileşmesinin 7 ve 10. günleri arasında apoptosis ve proliferatif indeks değerlendirmelerine dayanmaktadır. Bu günler iyileşmenin proliferasyon aşamasını göstermektedir. Bu dönemde (3-12.günler arası) neovaskülarizasyon, hücrel proliferasyon, epitelizasyon ve granülasyon dokusu formasyonu gözlenmektedir. Bu aşamanın sonuna doğru hücrelenmede azalma ve bir sonraki skar maturasyonuna hazırlık başlamaktadır.

Desmouliere ve arkadaşları apoptosisin skar maturasyonunda önemli bir rolü olduğunu yayınlamışlardır (72). Onlara göre apoptosis burada düzenleyici bir rol oynamaktadır. Granülasyon dokusundaki hücrel azalma skar maturasyonunun başlaması için gereklidir. Bu azalma özellikle fibroblastlar, endotelial hücreler ve perisitler için söz konusudur. Bundaki araçların ise growth faktörler ve sitokinler olduğunu ileri sürmüşlerdir. Granülasyon dokusunun eliminasyonundaki yetersizlik hipertrofik skar ve keloidle sonuçlanır. Hipertrofik skar dokusunda hücrelenme keloidle karşılaştırılınca daha yüksek bulunmuştur (73).

Brown ve arkadaşlarına göre apoptosisin yara iyileşmesinde iki belirgin rolü vardır (56). İlki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun inhibisyonudur. Bu inflamatuvar dönemin bittiğini ve proliferatif dönemin başladığını gösterir. İkinci önemli rol ise fibroblast ve kollajen depozisyonunun azaltılmasıdır.

Aynı araştırmacılara göre ilerlemiş epitelyum altında apoptotik hücre konsantrasyonu sınırlı olup epitelin ilerlemesiyle apoptotik süreç yaranın ortalarına doğru göç etmektedir. Yaranın orta kısmının inflamasyonu epitel örtüsü oluşuncaya kadar devam etmektedir ve bu inflamasyonun down-regülasyonundan apoptosis sorumludur.

Brown ve arkadaşları bir başka çalışmada diabetik yaralardaki iyileşme gecikmesinin yetersiz hücreyel infiltrasyon ve granülasyon dokusu formasyonuna bağlamışlardır (74). İnflamasyonun regülasyonunda apoptosisin etkin rol aldığını savunan yazarlar diabetik farelerde oluşturulan tam kalınlıktaki yaralarda apoptosisin önemli derecede azaldığını göstermişlerdir. Bu yaralara topikal growth faktör uygulanmasıyla bu sürecin tersine çevrildiğini rapor etmişlerdir. Growth faktörün major etkisinin hücreyel infiltrasyonu artırması ve bununda apoptosisi uyarması olduğu gösterilmiştir.

Harada ve arkadaşları yanık sonrası gecikmiş yara iyileşmesinin ilerleyici nekroz ve bunun olası nedeninin de kan akımındaki yetersizlik ve dehidrasyon olduğunu düşünüp bir çalışma yapmışlardır. İkinci derece yanıklarda yapılan kontrollü bir çalışmada hipernatremi varlığında 24 saat sonra immünokimyasal ölçüm ve elektron mikroskopisi ile kıl follikülü hücrelerinde belirgin apoptosis varlığını göstermişlerdir (75).

Luo ve arkadaşları in situ işaretlenmiş DNA'larla yaptıkları çalışmalarda aynı yaş grubundaki normal dermal fibroblastlarla karşılaştırmada keloid kökenli fibroblastlarda belirgin apoptosis azalması olduğunu saptamışlardır. Ancak keloid dokusunun farklı alanlarında apoptosis oranlarında anlamlı değişiklik olmadığını göstermişlerdir (76).

Araştırmamızda sekonder yumuşak doku yara iyileşmesinde 7 ve 10. günler arasında granülasyon dokusu hücreyel elemanlarında apoptosisin belirgin derecede arttığını gözlemledik. Proliferasyon indeksinde gözlenen ancak belirgin olmayan artış yara iyileşmesinin ilgili dönemlerine uygun bir durumdur ve bizzat bunun apoptosisi uyardığı belirtilmelidir. Artık bu aşamadan sonra apoptosis yoluyla gerçekleşecek hücre ölümü granülasyon dokusunun azalması ve skar maturasyonunun başlamasına yol açacaktır.

Hinrichsen ve arkadaşları domuz karnında yaptıkları bir çalışmada sekonder iyileşme ile grefti karşılaştırmışlar ve sekonder iyileşmenin 22, greftin 10 günde yarayı kapattığını rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar kontraksiyon oranlarını sekonder iyileşen grupta %68, greftleme ile iyileşen grupta ise %49 olarak bulmuşlardır. Her iki grupta da normal deriye göre strese dayanıklılıkta azalma olduğunu göstermişlerdir (51).

Yayınlanan bir başka çalışmada açık bırakılan yaraların 10 gün sonrasında ilk alanlarının %70'ine gerilediği gösterilmiştir (77).

Hom'a göre ise greft yara iyileşmesinin inflamatuvar ve proliferatif aşamalarını uzatır. Böylece greft etrafında kronik inflamasyon , fibrosis ve konnektif doku yapımı artar. Greft ayrıca yabancı cisim reaksiyonuna sebep olur. Greftlemede kronik inflamasyonun uzun süre devamı destrüksiyon veya rejeksiyona yol açar (78).

Rudolph yaranın greftle kapatılması sonrası myofibroblastik hücrelerin sayılarının hızla azaldığını rapor etmiştir (79).

Greftleme sonrası hücresel elemanlardaki azalma ile apoptosis ilişkisini tartışmak için yapılan bir çalışmada tüm greftlerin nekrozu ile karşılaşmış ve sonuçlar değerlendirilmemiştir. Aynı çalışmada sekonder iyileşme ve fleple onarım sonrası apoptosis oranları üzerinde anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır (80).

Çalışmamızda 7 gün sekonder iyileşmeye terk edilen yaraların otogreftle kapatılması sonrası yapılan ölçümlerde proliferatif indeksin ve dolayısıyla hücresel proliferasyonun önemli ölçüde azaldığını tesbit ettik. Bu durum cerrahi girişimden sonraki 6, 24 ve 72. saatlere kadar devam etmiştir. Yine bu sonuç yara iyileşmesinin proliferasyon aşamasının bu günlerden başlayarak yerini maturasyona bıraktığının delilidir. Eş zamanlı yapılan ölçümlerde apoptosisin artmış olduğunun tesbiti bu hücresel azalmanın bu yolla gerçekleştiğini düşündürmüştür. Aynı şekilde farklı saatlerde apoptosis artışı düzenli olarak devam etmiştir. İyileşmenin bir sonraki fazına geçişteki hızın, hücresel azalmayla ilişkili olduğu ve bunun da iyileşmenin olumsuz sonuçlarının baskılanması demek olduğu göz önüne alınırsa greftin sekonder iyileşmeye göre yara kapamadaki üstünlüğü daha iyi anlaşılacaktır.

Garbin ve arkadaşları granülasyon dokusu üzerine uygulanan total deri fleplerinin 6,24 ve 48. saatlerde myofibroblastların apoptotik sürecini önemli ölçüde arttırdığını rapor etmişlerdir. Ancak bu artış 72. saatlere doğru azalma eğilimine girmiştir. Yine fibroblast dışında kapiller endotelial apoptosisin de uyarıldığı saptanmıştır.

Aynı araştırmacılar deri flebi ile kapatılmış yaralarda granülasyon dokusu kalınlığının hızla azaldığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca uygulanmasından 24 saat sonra flebin altındaki granülasyon dokusu ile iyice yapıştığı gözlenmiştir (80).

Araştırmamızda ilk 7 gün açık olarak izlenen yaraların random paternli bir transpozisyon flebi ile kapatılmasını takiben yapılan ölçümlerde apoptotik sürecin azalma eğilimine girdiği görüldü. Kapatımdan 3 gün sonra gözlenen apoptosis oranlarındaki düşüş ilk 6 saat ve 24 saat sonraki ölçümlerde de vardı. Bütün ölçümlerde



hücre proliferasyonunda da azalmanın mevcudiyeti açıklanmaya muhtaç bir durumu ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda gözlenen hücre proliferasyonundaki azalmanın bu literatürle uyumlu olduğu söylenmelidir. Özellikle fleple kapatılmış yaralarda histopatolojik olarak da hücresel azalma ve kollajenizasyonda artma ortaya konmuştur. Ancak buradaki hücresel azalmadan apoptosisin sorumlu olduğunu gösteren bir bulguya rastlanmaması bu noktanın aydınlığa kavuşması için yeni araştırmaların gereğini ortaya koymuştur.

Atıfta bulunulan literatürde granülasyon dokusunda sadece myofibroblastların ve kapiller endotelial hücrelerin apoptosisinden söz edilmektedir. Çalışmamızda ise granülasyon dokusunun tüm hücresel elemanları değerlendirilmiştir. Ayrıca yazarlar bu durumun granülasyon dokusuna selektif olduğu ve flepte apoptosis gözlenmediğini vurgulamışlardır. Ancak flep uygulanımından 24 saat sonra total deri fleplerinin alttaki granülasyon dokusuna tam olarak yapıştığının kabul edilmesine karşın, spesimenlerin granülasyon dokusuna mı yoksa flebe mi ait olduğu ya da bunun nasıl ayırt edildiği noktasında bir bilgi yoktur. Dolayısıyla buradaki verilerin bizim sonuçlarımızla karşılaştırılmasında zorluk bulunmaktadır. Bize göre flep uygulamasını izleyen saatlerde apoptosisin azalması; flebin, apoptosisi indükleyen bazı olumsuz faktörleri elimine etmesine bağlıdır. Bu faktörler; beslenme bozukluğu, inflamatuvar siklus (TNF), fiziksel ve kimyasal bazı ajanlar (serbest radikaller vb.) olarak belirtilebilir. Açık halde bulunan bir yaranın spesifik bir beslenme paterni tariflenmemiş de olsa anatomik kanlanma desteğinden ayrılmamış canlı bir doku ile örtülmesi bu olumsuz faktörlerden yaranın korunduğunu göstermektedir.

Ashoori ve arkadaşları random deri fleplerinin patofizyolojisini anlamak için yaptıkları çalışmada venöz sistemden çok arteriyel sistemde olmak üzere devamlı hipoksinin fleplerde apoptosisle sonuçlandığını rapor etmişlerdir. Onlara göre devamlı hipoksi kısmi metabolik değişim ve oksiradikal üretime sebep olur. Bu da kollajen demetlerinin artması sonucu fibrosis ve DNA'nın oligonükleozomal parçasının degradasyonu sonrası apoptosis ile sonuçlanır (81).

Yine bir başka çalışmada Shimizu ve arkadaşları hipoksinin hem apoptosisi hem de nekrozu indüklediğini rapor etmişlerdir (82)

Çalışmamızda bütün fleplerimiz gözden geçirildi ve hiçbirinde beslenme sorunu, enfeksiyon ya da benzeri bir olumsuzluğa rastlanmadı. Uygulamadan 24 saat geçtikten

sonra alınan örneklerin kısmen ya da tamamen flep dokularına ait olması durumunda fleplerimizde gözlenen yeterli viabilite yani hipoksinin yokluğu apoptosis oranlarındaki düşmeyi açıklayacaktır.

Yara iyileşmesi her ne şekilde tamamlanırsa tamamlansın karşılaşılabilecek en sıkıntılı noktaların başında hipertrofik skar ve keloid gelir. Deitch ve arkadaşlarına göre hücrel infiltrasyondaki aberasyon anormal yara iyileşmesi ile sonuçlanır. Yaradan inflamatuvar hücrelerin temizlenmesindeki yetersizlik hipertrofik skar ve keloide neden olur (83).

Kozmetik görünümün yanısıra kaşıntı ve ileri dönemlerde malignleşme potansiyeli taşıması gibi birçok istenmeyen duruma sebep olabilen bu iki anormal yara iyileşmesinin anlaşılması ve yok edilmesi için oldukça yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Kischer hipertrofik skar ve keloid dokusunda mikrovasküler oklüzyondan söz etmiş ve bunun endotelial hücre proliferasyonu yoluyla olduğunu savunmuştur. Oklüzyon hipoksiye neden olarak kollajen üretimini arttırmaktadır. Bu da karşımıza kitle olarak çıkmaktadır. Ona göre keloid tedavisinde kullanılan hafif topikal baskı tedavisi dejenerasyon ya da apoptosis yoluyla etkili olmakta ve fibroblast ölümü ile lizozomal enzimlerin salınımı gerçekleşmektedir (84).

Ladin ve arkadaşları keloid lezyonlarının ve keloid fibroblastlarının normal kontrollere göre daha az apoptosise uğradığını rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar tedavi amaçlı kullanılan hidrokortizon, gama interferon ve hipoksinin apoptosisi arttırdığını yayınlamışlardır (85).

Yine bir çok araştırmada fibroblastların farklı ajanlarca apoptosilerinin indüklendiği gösterilmiştir. Bunlar; butirat, oksijen radikalleri, anti Fas antikoru ve interferon alfa'dır (86-89).

İyonize radyasyonun keloid rekürrensi üzerindeki etki mekanizması için yapılan çalışmalar, küçük ve orta dozda gama ışınlarının insanın normal hücrelerinde ve keloid dokusunda apoptosisi arttırdığını göstermiştir (90).

Hipertrofik skar ve keloidin kontrol altına alınabilmesi ya da tedavisi için yapılan çalışmalar apoptosisten bağımsız değildir. İyileşme sürecini etkileyebilmek oldukça önemlidir. Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bunun olanaklı olduğunu göstermektedir.

## SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yumuşak dokuda yara iyileşmesi spesifik hücre popülasyonunun hızla artması, yeni matriksin deposiyonu ve maturasyonla sağlanır. İyileşmenin fazları arasındaki geçişin kontrolörü apoptosistir ve bunu hücrel down-regülasyon yoluyla gerçekleştirir.

Apoptosis doku hasarına veya inflamatuvar yanıtı neden olmaksızın hücre popülasyonunun eliminasyonuna izin verir.

Çalışmamızda yara iyileşmesinin proliferatif döneminin sonuna doğru (7-10.günler) sekonder yara iyileşmesi, greftleme ve fleple kapatım sonrası hücrelenmede meydana gelen değişiklikler ve bunun apoptosis ile ilişkisi tartışılmıştır.

1. Sekonder yara iyileşmesinde sözü edilen dönemlerde granülasyon dokusunda gözlenen hücrel artış apoptosisin aktivasyonunu sağlamıştır.

2. Greftlenen yaralarda alttaki granülasyon dokusunda apoptosis hızla artmış ve bu hücrel proliferasyonun azalmasına neden olmuştur.

3. Fleple kapama yapılan yaralarda hücrel proliferasyon ve apoptosis azalmıştır. Bu cerrahiden yaklaşık 24 saat sonra flepler alttaki granülasyon dokularına yapışmıştır. Bu noktadan sonraki sonuçlar tartışmaya açıktır ve yeni araştırmaların konusu olmaya adaydır. İlk 24 saatte gözlenen apoptosis azalması flebin granülasyon dokusunda apoptosisi indükleyen bazı olumsuz parametreleri ortadan kaldırmasına bağlanabilir.

Apoptosis yara iyileşmesinin inflamatuvar ve proliferasyon safhalarında etkindir ve bir sonraki safhaya geçişi kolaylaştırır. Granülasyon dokusunda başta myofibroblastlar olmak üzere hücrel azalmanın yeterince ve zamanında yapılmaması hipertrofik skar ve keloid formasyonuna neden olacaktır. Apoptosisin buradaki rolünün doğru tanımlanması indüksiyonu ve inhibisyonu mümkün olan bu parametrenin değiştirilmesi yoluyla yara iyileşmesini kontrol etme imkanı sağlayabilir.

Apoptosis günümüzün ilgi odağıdır ve bakir bir araştırma alanıdır. Bir çok hastalıkla ilişkisi saptanmıştır. Doku onarımı ve apoptosisin kontrolü skar azaltılması ve bazı hastalıkların terapötik modaliteleri açısından yararlı olabilir.

## ÖZET

### FARKLI YARA KAPATIM MODELLERİNDE APOPTOSİS SÜRECİ

Yumuşak doku yaralarının iyileştirilmesi primer tamir, greft ve flep yöntemiyle onarım ve sekonder iyileşme yoluyla sağlanmaktadır. Primer kapama en iyi onarım şeklidir. Bu mümkün değilse yaralar sekonder iyileşmeye bırakılmaktansa greft ve flep cerrahisiyle onarılmalıdır.

Çalışmada yara iyileşmesinin granülasyon dokusu oluşumu aşamasında farklı yara kapatım modellerinde hücresel proliferasyon ve apoptosis araştırıldı. Bunun için her biri 7 rattan oluşan 3 grup oluşturuldu.

Grup 1; sekonder iyileşen yaralar, Grup 2; 7 gün açık bırakıldıktan sonra tam kalınlıkta deri grefti ile kapatılan yaralar ve Grup 3; random paternli bir transpozisyon flebiyle onarımı yapılan yaralar şeklindeydi. Her gruptan 7 ve 10. günlerde alınan örneklerden FCM yoluyla apoptosis ve PI ölçümleri yapıldı. İstatistiksel anlamlılık oranı  $P < 0.05$  olarak alındı. Buna öre Grup 1'de apoptosis oranlarında belirgin bir artış vardı ve bu istatistiksel olarak anlamlıydı. ( $p=0.0425$ ) PI artmıştı ancak bu anlamlı değildi. Grup 2'de apoptosis artmıştı fakat bu istatistiksel olarak anlamsızdı. PI azalmıştı ve bunun anlamlılık derecesi  $P=0.0425$  idi. Grup 3'de hem apoptosis ( $P=0.0180$ ) ve hem de PI ( $P=0.0180$ ) değerleri anlamlı derecede azalmıştı.

Ölçülen apoptosis değerlerinin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile karşılaştırılarak yapıldı. Histopatolojik incelemelerle yara iyileşmesinin ilgili safhalarına uygunluğu ve grupların karşılaştırılabilir olduğu saptandı.

Sonuç olarak sekonder iyileşen yaralarda granülasyon dokusundaki hücresel dengenin apoptosis yoluyla sağlandığı, yaraların greftlemeden sonra hücrelenmelerinde belirgin bir azalma olduğu ve apoptosis oranlarının arttığı, flep cerrahisi yapılan yaralarda hücre proliferasyonu ve apoptosisin azaldığı saptandı.

## SUMMARY

### APOPTOSIS PROCESSES IN DIFFERENT WOUND REPAIR PROCEDURES

Healing of soft tissue injuries is achieved by primary repair, grafts, flaps and secondary intention. Primary repair is the best model of repair. If it is not possible, repair should be performed using grafts and flaps rather than leaving the wound to heal by secondary intention.

In this study, we investigated the cellular proliferation and apoptosis occurring during formation of granulation tissue in various wound healing models. The study included three groups, each of which was composed of seven rats.

Group 1 consisted of rats with wounds healing by secondary intention, group 2 of rats with wounds repaired with full thickness skin grafts after being left open for seven days and group 3 of rats with wounds repaired with random patterned transposition flaps. Measurements of apoptosis and proliferation index were made by flow cytometry in samples obtained from each group at 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> days respectively. In statistical analysis,  $P < 0.05$  was considered significant. Group 1 had a significant increase in apoptosis ( $p = 0.0425$ ). Although not significant, Group 1 also had an increase in proliferation index. Group 2 had an insignificant increase in apoptosis but significant decrease in proliferation index ( $p = 0.0425$ ). And Group 3 had significant decrease in both apoptosis ( $p = 0.0180$ ) and proliferation index ( $p = 0.0180$ ).

Confirmation of the values obtained from flow cytometric measurements of apoptosis were done with agarose gel electrophoresis. In histopathological examination, it was found that myofibroblasts decreased and collagen formation increased in groups 2 and 3 as compared with group 1.

Thus, these results explain why wounds repaired with flaps heal better than wounds repaired with grafts and much better than wounds healed by secondary intention. The main process affecting the healing result is the early elimination of the granulation tissue and its substitutes.

## KAYNAKLAR

1. Grabb WC and Smith JW: Plastic Surgery. Third ed. Little, Brown and Company. Boston, 1979, pp.3-75.
2. Georghiade GS, Riefkohl R, Levin LS: Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery. Third ed. Williams and Wilkins. Baltimore. 1997, pp.3-99.
3. Bosman FT, Visser BC, Van Oeveren: Apoptosis : pathophysiology of programmed cell death. *J Pathol Res Pract* 192(7):491-501, 1995.
4. Silver IA: The Mechanics of Wound Healing. *Equine Vet* 11(2): 93-6, 1979.
5. Weinzweig J: Plastic Surgery Secrets. Hanley and Belfus, Inc; Philadelphia 1999, pp.29-33
6. Mathes SJ and Nahai F: Reconstructive Surgery. Second ed. Churchill Livingstone, New York , 1997, p.11.
7. Hom DB: Wound healing in relation scarring. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 6(2):111-24, 1988.
8. Schilling J: Wound healing. *Surg Clin* 56:859, 1976.
9. Clark R: Wound repair. The molecular and cellular biology of wound repair. New York, Plenum Press, 1996, pp.3-50.
10. Martin G, Peacock E: Current perspectives in wound healing. In Cohen I; Diegelmann R, Lindblad W, eds. *Wound healing*. Philadelphia, WB Saunders, 1992, pp.1-4.
11. Diegelmann R: Cellular and biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. *J Urol* 157:298-302, 1997.
12. Pierce G: Macrophages: Important physiologic and pathologic sources of polypeptide growth factors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 233-4, 1990.
13. Herndon D, Hayward P, et al: Growth hormones and factors in surgical patients. *Adv Surg* 25:67-97, 1992.
14. Zitelli J: Wound healing for the clinician. *Adv Dermatol* 2:243-67, 1987

15. Goslen J: Physiology of wound healing and scar formation . In Thomas J, Holt G, eds. Facial scars. St Louis , CV Mosby , 1989,pp.10-26.
16. Kirsner RS, Eaglstein WH: The wound healing process. *Dermatol Clin* 11(4):629-40,1993
17. Martin P: Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309):75-81,1995.
18. Steed DL: The role of growth factors in wound healing. *Surg Clin North Am* 77(3):575-86,1997.
19. Sandblom P: Tensile strength of healing wounds. *Acta Chirurgica Scandinavia suppl* 89:1,1994.
20. Diegelmann R, Cohen I, et al: Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts in vitro. *J Cell Physiol* 98:341,1979.
21. Diegelmann R, Bryant C, et al : Tissue alpha globulins in keloid formation. *Plast Reconstr Surg* 59:418,1997.
22. Omo-Dare P: Genetic studies on keloids. *J Natl Med Assoc* 76:428-32,1975.
23. Mutsaers S, Bishop J, et al: Mechanisms of tissue repair. *Int J Biochem Cell Biol* 29:5-17,1997.
24. Georgiade GS, Riefkohl R, Levin LS: *Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery*. Third ed. Williams and Wilkins. Baltimore.1997, pp.13-18.
25. Freswater FM, Krizek TJ: Skin grafting of burns: a centennial. *J Trauma* 2:862,1971.
26. Blair VP, Brown JB: Uses of large split skin grafts of intermediate thickness. *Surg Gynecol Obst* 49:82,1929.
27. Thiersch : *Über Hautverpflanzung*. *Verh Dtsch Chir* 15:17,1886.
28. Fazio MJ,Zitelli ZA: Full thickness skin grafts. Clinical observations on the impact of using epinephrine in local anesthesia of the donor site. *Arch Dermatol* 131:691-4,1995.
29. Kelton P:Skin grafts. *Sel Read Plast Surg* 8:1-23,1995.
30. Place MJ, Herber SC,Hardesty RA: Basic techniques and principles. In Aston SJ, Beasley RW,Thorne CHM (eds) *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, Lippincott-Raven,1997, pp.17-9.

46. Riley RS, Mahin EJ, Ross W: DNA ploidy and cell cycle analysis, In *Clinical applications of Flow Cytometry*, Eds Riley RS, Mahin RJ, Ross W. Igaku-Shoin New York-Tokyo, 1993,251-322.
47. Christine M. Eischen, Timothy J. Kottke, Luis M. Martins. et all, Comparison of Apoptosis in Wild – Type and Fas – Resistant Cells: Chemotherapy – Induced Apoptosis Is Not Dependenton Fas/Fas Ligand Interactions. *Blood*, Vol 90, No 3 ( August 1 ), 1997: pp 935-943
48. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure of extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215, 1998.
49. Hinrichsen N, Sorensen LB, Balslev E: Healing by secondary intention versus split-thickness skin graft. Description of a study in pigs. *J of Scandinavian Surgery*. 20,34-37,1997.
50. Greenhalgh DG: The role of apoptosis in wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. Sep;30(9):1019-30, 1998.
51. Gottrup F, Andreasen J.O: Wound healing subsequent to injury. In *Textbook of Traumatic Injury of Teeth*, eds J.O. Andreasen and F.M. Andreasen. Munksgaard, Copenhagen, 1993.
52. Hunt K: The physiology of wound healing. *Ann. Emerg. Med*. 17;1265-1273,1988.
53. Albritton J. S: Complications of wound repair. *Clin. Podiatr. Med. Surg*. 8;773-785,1991.
54. Brown D.L, Kao W.W-Y, Greenhalgh D.G: Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: Delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors. *Surgery*. 121(4):372-380, 1997.
55. Compton MM, Cidlowski JA: Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*. 118:38-45,1986.
56. Kyprianou N, Isaacs JT: Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology*.122:522-62,1988.
57. Rotleeb RJ, Hocker MB, Gerschenson LE: Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol*. 134:491-5,1989.
58. Wyllie AH, Kerr JFR, Macaskill IAM, Currie AR: Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. *J Pathol*. 111:85-94,1973.



31. Rudolph R, Klein L: Healing processes in skin grafts. *Surg Gynecol Obstet* 136:641-51,1973.
32. Rudolph R, Ballantyne DL: Skin grafts. In McCarthy JG(ed): *Plastic Surgery*. Philadelphia, WB Saunders,1990, pp.221-74.
33. Daniel RK, Williams HB: The free transfer of skin flaps by microvascular anastomoses.*Plast Reconstr Surg* 52:16,1973.
34. McGregor IA, Morgan G: Axial and random pattern flaps.*Br J Plast Surg* 57:502,1970.
35. Stotland MA, Kerrigan CL: Principles of skin flap surgery. *Plastic Surgery Secrets*. Weinzwieg J.Hanley Belfus. Philadelphia,1999, pp.414-9.
36. Grabb WC: Classification of skin flaps.In: Myers MB, Grabb WC eds.*Skin Flaps* .Boston: Little Brown145-154,1975.
37. Daniel RK, Kerigan CL: Principles and physiology of skin flap surgery. In McCarthy JG (ed): *Plastic Surgery*, Philadelphia, WB Saunders, 1990,p.275.
38. Fleisher TA: Apoptosis. *Ann of Allergy, Asthma, Immunol* 78:245-249,1997.
39. Williams GT, McCarty NJ, Grimes EA: Apoptosis: Final control point in cell biology. *Trends Cell Biol* 2:263-267,1992.
40. Wyllie Ah; Kerr JFR, Currie AR: Cell death.: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-305,1980.
41. Ellis RE, Yuan J, Horvity HR: Mechanisms and function of cell death. *Ann Rev Cell Biol* 7:663-698,1991.
42. Steller H: Mechanisms and genes of cell suicide. *Science* 267:1445-9,1995.
43. Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2239-44,1996.
44. Kerry JFR, Wyllie AH, Currie AR et al: Apoptosis . A basic pathological phenomenon with mideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57,1972.
45. Bauer KD: DNA and nuclear antigen analysis of tissue specimens. 1987 Annual Course in Flow Cytometry, Applications in immunobiology and cell biology. Los Alomos NM, National Flow Cytometry Resource and Smith Kline and French Laboratires 1987.

59. Hughes FM Jr, Gorospe WC: Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*. 129:2415-22,1991.
60. Koury MJ, Bondurant MC: Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science* 248: 378-81,1990.
61. Singh N, Anand S: Cell death by apoptosis. *Indian J Exp Biol*.32:843-7,1994.
62. Del Vecchio MT, Leoncini L, Buerki K, et al: Diffuse centrocytic and/or centroblastic malignant non-Hodgkin's lymphomas: comparison of mitotic and pyknotic (apoptotic) indices. *Int J Cancer*.47:38-43,1991.
63. Szepeshazi K, Lapis K, Schally AV: Effect of combination treatment with analogs of leutinizing hormone releasing hormone (LH-RH) or somatostatin and 5-fluorouracil on pancreatic cancer in hamsters. *Int J Cancer* 49:260-6,1991.
64. Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC: Activation-induced death by apoptosis in CD<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 175:331-40:1992.
65. Mac Donald HR, Lees RK: Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature*. 343:642-4,1990.
66. Knoop M, McMahon RFT, Jones CJP, Hutshinson IV: Apoptosis in pancreatic allograft rejection – ultrastructural observations. *Exp Pathol* 41:219-24,1991.
67. Sayah DN, Soo C, Shaw WW: Down-regulation of apoptosis-related genes in keloid tissues. *J Surg Res* 87:209,1999.
68. Desmouliere A, Badid C, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G: Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol* 29(1):19-30:1997.
69. Clark RA: Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* 306(1):42-8;1993.
70. Gabbiani G, Hirschel B, Ryan B, et al: Granulation tissue as a contractile organ. *J Exp Med* 135:719,1972.
71. Ehrlich H: Wound closure: Evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye* 2:149,1988.

72. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G: Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146:56-66,1995.
73. Ehrlich HP, Desmouliere A, Diegelmann RF; et al: Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 145:105-13,1994.
74. Brown DL, Kao WW, Greenhalgh DG: Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors. *Surgery* 121(4):372-80,1997.
75. Harada T, Izaki S, Tsutsumi , et al: Apoptosis of hair follicle cells in the second-degree burn wound under hypernatremic conditions. *Burns* 24(5):464-9,1998.
76. Shengkang L, Messod B, Wassim R, et al: abnormal balance between proliferation and apoptotic cell death in fibroblasts derived from keloid lesions. *Plast Reconstr Surg* 107(1):87-96,2001.
77. Darby I, Skalli O, Gabbiani G: Alfa smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63:21-9,1990.
78. Hom DB: The wound healing response to grafted tissues. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 27(1):13-24,1994.
79. Rudolph R: Inhibition of myofibroblasts by skin grafts. *Plast Reconstr Surg* 63:473-80,1979.
80. Garbin S, Pittet B, Montandon D, et al: Covering by a flap induces apoptosis of granulation tissue myofibroblasts and vascular cells. *Wound Repair and Regeneration* 4(2):244-251,1996.
81. Faramarz A, Shigehiko S, Jain Z, et al: Possible contributions of mastocytosis, apoptosis, and hydrolysis in pathophysiology of randomized skin flaps in humans and Guinea Pigs. *Plast Reconstr Surg* 98(3):491-501, 1996.
82. Nakatsuka T, Pang CY, Neligan P, et al: Effect of glucocorticoid treatment on skin capillary blood flow and viability in cutaneous and myocutaneous flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 76(3):374-85,1985.
83. Deitch EA, Wheelahan TM, Rose MP; et al: Hypertrophic burn scars: analysis of variables. *J Trauma* 23:895-8,1983.

85. Ladin DA, Hou Z, Patel D, et al: p53 and apoptosis alterations in keloid fibroblasts. *Wound Repair Regen* 6(1):28-37,1998.
86. Chung DH, Zhang F, Chen F, et al: Butyrate attenuates BCLX(L) expression in human fibroblasts and acts in synergy with ionizing radiation to induce apoptosis. *Radiat Res* 149:187,1998.
87. Gansauge S, Gansauge F, Gause H, et al : The induction of apoptosis in proliferating human fibroblasts by oxigen radicals is associated with a p53 and p21WAF1CIP1 induction. *FEBS Lett* 404:6,1997.
88. Jelaska A, Korn JH: Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: Differences between foreskin and adult fibroblasts. *J Cell Physiol* 175:19,1998.
89. Freiberg RA, Spencer DM, Choate KA, et al:Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 17:215,1997.
90. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013,1994.