



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**FLEP MODELİ OLUŞTURULMUŞ
SIÇANLARDA TIBBİ SÜLÜK VE
TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKT
UYGULAMASININ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MEHMET EMRE EROL

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

TEMMUZ 2023



**FLEP MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA TIBBİ SÜLÜK VE
TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKT UYGULAMASININ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Emre EROL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Mehmet Emre EROL
05/07/2023

FLEP MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA TIBBİ SÜLÜK VE TIBBİ SÜLÜK SALGI EKSTRAKT UYGULAMASININ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Mehmet Emre EROL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2023

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda tıbbi sülük ve tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulamasının dorsal random flep modeli oluşturulmuş sıçanlarda yara iyileşmesi üzerine etkilerinin *in vivo* şekilde araştırılması amaçlandı. **Yöntem:** Çalışmada *Hirudo verbana* türü steril tıbbi sülüklerden sağım yöntemi ile elde edilen sülük salgı ekstraktında, Bradford yöntemi ile total protein konsantrasyonu tayin edildi (50µg/ml). Çalışmaya 250 ± 30 g vücut ağırlıklarına sahip 24 dişi sıçan dâhil edildi. Sıçanların dorsal bölgelerine 6 x 2 cm boyutlarında deri flebi yapıldı. A (sülük), B (tıbbi sülük salgısı), C (fagostimülatör solüsyon) ve D (kontrol) olmak üzere dört deney grubu tanımlandı. Postoperatif 7. günde tüm hayvanlar sakrifiye edildi. Ardından biyokimyasal, histolojik ve immünohistopatolojik yöntemler için kan ve doku örnekleri alındı. **Bulgular:** ELISA yöntemi ile ölçülen; serum, distal doku ve proksimal doku örneklerine ait HIF1-α, TGFα ve IGF-1 parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu (p > 0,05). Epital rejenerasyon ve granülasyon dokusu kalınlığı açısından B grubu, D grubu'ndan anlamlı derecede yüksek bulundu, (p < 0.05). Neovaskülarizasyon açısından tüm gruplar, D grubundan anlamlı derecede yüksek tespit edildi. Ayrıca, inflamasyon skoru D grubunda, B grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksekti, (p < 0.05). İmmünohistokimyasal yöntem aracılığıyla tespit edilen VEGF (+) hücre yüzdesi; B grubunda en üst seviyede izlendi. Bu grubu sıra ile A, C, D grupları izledi, (p < 0.05). **Sonuç:** Histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemler ile araştırılan epitel rejenerasyonu, granülasyon dokusu kalınlığı, neovaskülarizasyon bulguları ve VEGF (+) hücre sayısı B grubunda en üst seviyede izlendi.

Bilim Kodu : 1090

Anahtar Kelimeler : Random flep, Tıbbi sülük tedavisi, Tıbbi sülük salgısı, VEGF, Yara iyileşmesi,

Sayfa Adedi : 86

Danışman : Doç. Dr. Kübranur ÜNAL

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF MEDICINAL LEECH AND MEDICINAL
LEECH SALIVA EXTRACT IN RATS WITH FLAP MODEL

(M. Sc. Thesis)

Mehmet Emre EROL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2023

ABSTRACT

Objective: In our study, it was aimed to investigate the effects of medical leech and medicinal leech saliva extract application on wound healing in rats with dorsal random flap model *in vivo*. **Method:** In this study, total protein concentration was determined by Bradford method (50µg/ml) in leech saliva extract obtained from *Hirudo verbana*. Twenty-four female rats with a body weight of 250 ± 30 g were included in the study. A skin flap of 6 x 2 cm was made on the dorsal regions of the rats. Four experimental groups were defined as A (leech), B (leech saliva extract), C (phagostimulatory solution) and D (control). All animals were sacrificed on the 7th postoperative day. Then, blood and tissue samples were collected for the experimental procedures. **Results:** Measured by ELISA method; there were no significant differences between the groups in terms of HIF1- α , TGF- α and IGF-1 parameters of serum, distal and proximal tissue samples ($p > 0.05$). A significant difference was found between the group B and group D in terms of epithelial regeneration and granulation tissue thickness ($p < 0.05$). The inflammation score was significantly higher in the group D compared to group B ($p < 0.05$). The percentage of VEGF (+) cells was observed at the highest level in the group B. This group was followed by the group A, C and D, respectively ($p < 0.05$). **Conclusion:** Epithelial regeneration, granulation tissue thickness, neovascularization findings and VEGF (+) cell count, which were investigated by histopathological and immunohistochemical methods, were observed at the highest level in group B.

Science Code : 1090

Key Words : Random Flap, Medical leech therapy, Medical leech saliva, VEGF, Wound healing

Page Number : 86

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Kübranur ÜNAL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren benden bilgi ve desteklerini esirgemeyen, Gazi Üniversitesi - Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı' nda görev yapan, Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. Kübranur ÜNAL' a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamızda bilgisini ve emeğini esirgemeyen, Gazi Üniversitesi - Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı' nda görev yapan, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Duygu DAYANIR' a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar çalışmalarında bilgi ve desteğinden faydalandığım, deneysel aşamalarda yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Leyla İBRAHİMKHANLI' ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamızın sülük ve sülük salgısı temini konusunda desteklerini bizden esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AYHAN' a ve plastik-rekonstrüktif cerrahi kısmında sorumluluk alan Sayın Dr. Erkan DENİZ' e teşekkür ederim.

Lisans eğitimimde ve sonraki dönemde üzerimde emekleri bulunan, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı' ndan kıymetli hocalarım; Sayın Prof. Dr. Emel USLU' ya, Prof. Dr. Serap MUTUN' a ve Prof. Dr. Ömer BOZDOĞAN' a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan, maddi-manevi desteklerini bir an üzerimden eksik etmeyen, başta annem olmak üzere; çok kıymetli aile üyelerime teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

TYL-2022-8029 no.lu proje ile tezimi destekleyen Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim. Ayrıca, çalışma süresince desteklerini esirgemeyen GÜDAM sorumlularına da teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ETİK BEYAN	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri ve Biyolojisi	3
2.1.1. <i>Hirudo verbana</i>	4
2.1.2. Tıbbi Sülük Tedavisinin Tarihçesi	4
2.1.3. Tıbbi sülük salgısının bileşenleri ve özellikleri	6
2.1.4. Tıbbi sülük tedavisinin endikasyonları ve komplikasyonları	8
2.2. Cilt Flepleri	9
2.3. Yara İyileşmesi	10
2.3.1. Yara iyileşmesinin aşamaları	10
2.3.2. Homeostaz ve inflamasyon fazı	11
2.3.3. Proliferasyon veya granülasyon fazı	12
2.3.4. Olgunlaşma ve yeniden şekillenme fazı	13
2.4. Anjiyogenez	13
2.4.1. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör (HIF)	14
2.5. Büyüme Faktörleri (Growth Factors - GFs)	14

	Sayfa
2.5.1. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)	15
2.5.2. Transforming büyüme faktörü (TGF).....	16
2.5.3. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF).....	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1. Kullanılan Cihazlar	19
3.2. Tıbbi Sülüklerin Temini	19
3.2.1. Tıbbi sülük salgısının elde edilmesi.....	20
3.2.2. Tıbbi sülük salgısında total protein tayini.....	21
3.3. Deney hayvanlarının temini ve laboratuvar koşulları	22
3.4. Cerrahi yöntem ve flep modeli.....	23
3.5. Deney Grupları.....	24
3.5.1. Tıbbi sülük uygulması	25
3.5.2. SSE Enjeksiyonu.....	25
3.5.3. FSS enjeksiyonu	26
3.6. Flep Nekroz Alanlarının Ölçümü Ve Görüntülerin Analizleri.....	26
3.7. Diseksiyon.....	27
3.8. Histolojik İncelemeler	27
3.9. İmmünohistokimyasal İncelemeler	28
3.10. Doku Homojenizasyonu.....	28
3.11. ELİSA Yöntemi ve Prensipleri.....	29
3.11.1. Standartların hazırlanması	29
3.11.2. Testin yapılışı.....	30
3.12. İstatistiksel Yöntem.....	32
4. BULGULAR	33
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	33
4.1.1. HIF-1- α	33

	Sayfa
4.1.2. TGF- α	36
4.1.3. IGF-1.....	38
4.2. Flep Nekroz Alanlarının Bulguları.....	41
4.3. Histopatolojik Bulgular	43
4.3.1. Epitel rejenerasyon	48
4.3.2. Granülasyon doku kalınlığı.....	50
4.3.3. Fibroblast proliferasyonu	52
4.3.4. Neovaskülarizasyon	54
4.3.5. İnflamatuvar hücre varlığı.....	56
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	58
4.4.1. VEGF (+) hücre yüzdesi (%).....	58
5. TARTIŞMA.....	63
6.1. Sonuçlar	71
KAYNAKLAR.....	73
EKLER	81
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Hirudinea'ya ait tıbbi sülük türleri	3
Çizelge 2.2. Tıbbi sülük tedavisinin uygulaması dışında kalan bireyler.....	9
Çizelge 2.3. Yara iyileşmesinin aşamaları	11
Çizelge 3.1. Kullanılan cihazların ve sarf malzemelerin listesi	19
Çizelge 4.1. Serum ve doku örneklerindeki HIF-1- α konstantrasyonları	34
Çizelge 4.2. Serum ve doku örneklerindeki TGF- α konstantrasyonları	36
Çizelge 4.3. Serum ve doku örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonları.....	39
Çizelge 4.4. Gruplara göre nekrotik alanların karşılaştırılması.....	41
Çizelge 4.5. Epitel rejenerasyon skor sonuçları.....	48
Çizelge 4.6. Granülasyon doku kalınlığı skor sonuçları.....	50
Çizelge 4.7. Fibroblast proliferasyonu skor sonuçları	52
Çizelge 4.8. Neovaskülarizasyon skor sonuçları	54
Çizelge 4.9. İnflamatuvar hücre varlığı skor sonuçları.....	56
Çizelge 4.10. VEGF (+) hücre (%) skor sonuçları.....	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Sülük salgı ekstraktında total protein tayini	22
Şekil 3.2. Deney Grupları	24
Şekil 3.3. ImageJ bilgisayar programı kullanılarak yapılan nekroz alanı hesaplamaları.	26
Şekil 3.4. HIF-1- α Standart Grafiği	31
Şekil 3.5. TGF- α Standart Grafiği	31
Şekil 3.6. IGF-1 Standart Grafiği.....	32
Şekil 4.1. Serum örneklerindeki HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması	34
Şekil 4.2. Proksimal doku homojenatlarındaki HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması	35
Şekil 4.3. Distal doku homojenatlarındaki HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması	35
Şekil 4.4. Serum örneklerindeki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması	37
Şekil 4.5. Proksimal doku homojenatlarındaki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması	37
Şekil 4.6. Distal doku homojenatlarındaki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.7. Serum örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması	39
Şekil 4.8. Proksimal doku homojenatlarındaki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması	40
Şekil 4.9. Distal doku homojenatlarındaki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.10. Proksimal flep dokusunda epidermal rejenerasyon skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.11. Distal flep dokusunda epidermal rejenerasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması	49

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. Proksimal flep dokusunda granülasyon doku kalınlığı skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması	51
Şekil 4.13. Distal flep dokusunda granülasyon doku kalınlığı skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.14. Proksimal flep dokusunda fibroblast proliferasyon skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.15. Distal flep dokusunda fibroblast proliferasyon skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.16. Proksimal flep dokusunda neovaskülarizasyon skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.17. Distal flep dokusunda neovaskülarizasyon skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	55
Şekil 4.18. Proksimal flep dokusunda inflamatuvar hücre varlığı skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması	57
Şekil 4.19. Distal flep dokusunda inflamatuvar hücre varlığı skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.20. Proksimal flep dokusunda VEGF (+) hücre (%) skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.21. Distal flep dokusunda VEGF (+) hücre (%) skorunun deney grupları arasında karşılaştırılması.....	60

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Hirudo verbana türüne ait tıbbi sülükler	4
Resim 3.1. Fagostimülatör solüsyon ile beslenmeleri sırasında tıbbi sülükler	21
Resim 3.2. Deney hayvanlarının dorsal bölgelerinde yapılan flep operasyonu.....	23
Resim 3.3. Flebin distaline ve proksimalime steril tıbbi sülük uygulaması	25
Resim 3.4. Flebin distaline ve proksimalime tıbbi sülük salgısı enjeksiyonu	25
Resim 4.1. Postoperatif 7. gün flep nekroz alanları	42
Resim 4.2. Hematoksilen-Eozin boyama metodu uygulanan fleplerin proksimal parçalarının görünümü	44
Resim 4.3. Hematoksilen-Eozin boyama metodu uygulanan fleplerin distal parçalarının görünümü	45
Resim 4.4. Masson's Trichrome boyama yöntemi uygulanan fleplerin proksimal parçalarının görünümü.....	46
Resim 4.5. Masson's Trichrome boyama yöntemi uygulanan fleplerin distal parçalarının görünümü.....	47
Resim 4.6. Proksimal flep dokusunun immünohistokimyasal yöntem sonuçları	61
Resim 4.7. Distal flep dokusunun immünohistokimyasal yöntem sonuçları.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
dk	dakika
g	gram
kDa	kilodalton
mg	miligram
mL	mililitre
mm	milimetre
ng	nanogram
µg	mikrogram
Kısaltmalar	Açıklamalar
FSS	Fagostmülatör Solüsyon
FDA-USA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi
SSE	Sülük Salgı Ekstraktı
GF's	Büyüme Faktörleri
GH	Büyüme Hormonu
HIF	Hipoksi ile İndüklenebilir Büyüme Faktörü
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IR	İskemi-reperfüzyon
LDTI	Sülük Türevi Triptaz İnhibitörü
PDGF	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
vWF	von Willebrand Faktörü
TGF	Transforming (Dönüştürücü) Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Hirudoterapi olarak da bilinen, hastalıkların tedavisinde yaşayan sülüklerin kullanıldığı tıbbi sülük tedavisi; asırlardır birçok kültürde ve coğrafyada varlığını sürdürmektedir. Antik Yunan, Hint, Çin, Anadolu medeniyetlerinin eski yazıtlarında ve Osmanlı döneminde hirudoterapiye rastlanmaktadır [1].

Sülük salgısının içeriğinde bulunan yüzün üzerindeki peptit ve protein yapıdaki biyoaktif bileşikler; anti-koagülan, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar ve analjezik etkiler göstermektedir. Sülük tedavisi, perfüzyonu arttırmadaki etkinliği nedeniyle yaraların hızla iyileşmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır [2]. Sülük salgısı bünyesinde barındırdığı hirudin, histamin benzeri maddeler, hiyalüronidaz, kalın ve kollajenaz gibi çeşitli özellikler gösteren maddeler ve peptit B, teromizin gibi anti-mikrobiyal maddeler sebebiyle yara iyileşmesinde çok önemli bir yere sahip olabilir [3]. Sülüğün bölgeden ayrılmasından sonra dahi etkisini göstermeye devam eden anti-koagülan ve vazodilaör maddeler, ısıruk bölgesindeki kan akışının artmasını sağlayarak yara iyileşmesinde olumlu etkiler gösterebilmektedir. Günümüzde, tıpta derin ven trombozu ve koroner anjiyoplastide pıhtılaşma karşıtı olarak kullanılmaktadır [4].

Yara, cilt veya doku bütünlüğünün bozulmasıdır. Yapı ve işlevin bozulması ile ilişkilendirilebilir. Kaza, ameliyat gibi durumlar yaranın başlıca nedenlerinden sayılabilir. Memelilerde yaralı bir organın onarımı; inflamatuvar hücre göçünü ve sitokin hareketlerini, kollajen ve hücre dışı matris birikimini ve yara izinin yeniden şekillenmesini içeren karmaşık bir sürece bağlıdır. Yara iyileşmesi; homeostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme dâhil olmak üzere ardışık ve örtüşen fazlar tarafından yönetilen, çok yönlü bir süreçtir. Doku yaralanmasından sonra başlatılan fizyolojik yara iyileşmesi, farklı hücre tipleri ve derinin bölümleri arasında bir sinyal ağı oluşturur [5].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotel hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve geçirgenliğini uyarak anjiyogenezi (yeni damarların oluşturulmasını) düzenleyen, yara iyileşmesinde önemli bir faktördür. Yetişkinlik döneminde, çoğu endotelial hücre hareketsiz olduğundan dolayı, çoğu dokuda VEGF ekspresyonu düşüktür.

Cilt, yumurtalıklar, rahim gibi devam eden aktif anjiyogenez bölgeleri bu açıdan bir istisnadır. VEGF seviyeleri, yara iyileşmesinin proliferatif fazı sırasında artar [6, 7].

Bir cilt flebi, hasarlı cilt bölgesini tedavi etmek amacıyla donör bölgeden alınarak bu bölgeye taşınan sağlam bir vasküler beslemeye sahip cilt ve subkutan doku yapısıdır. Dermatolojik cerrahide genellikle, tümörün çıkarılmasından kaynaklı yaraların veya yanık, kesik gibi doku hasarlarının onarılmasında kullanılan bir tekniktir [8].

Bu çalışmada; tıbbi sülüklerin ve tıbbi sülük salgı ekstraktının, flep bölgesindeki yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tıbbi Sülüklerin Genel Özellikleri ve Biyolojisi

Sülükler, halkalı solucanlar olarak bilinen Annelida filiminin, Hirudinea sınıfında yer alan omurgasız canlılardır. Hirudinea sınıfının dünyada 800'den fazla üyesi bulunsa da tıbbi amaçlar için kullanılabilen yalnızca 15 civarında sülük cinsi bulunmaktadır. Tıbbi özellik gösteren ve yaygınca kullanılan bu sülükler ise genellikle Hirudo cinsi altında sınıflandırılan sülük türleridir, (Çizelge 2.1.) [9-11].

Sülüklerde vücut dorso-ventral olarak düzleşmiş şekildedir ve vücutları daima 34 segmentten meydana gelmektedir. Tipik olarak sülüklerde, anterior çekmen ve posterior çekmen olmak üzere iki adet çekmen bulunur. Posterior çekmen tutunmadan sorumlu iken, anterior çekmende ise ağız yer alır. Anterior çekmen, hem tutunma hem de beslenme görevini üstlenir [12]. Sülüklerin, üç çeneden meydana gelmiş olan ağızlarında her bir çenede, toplamda 300 adet diş olmak üzere yüzer adet kalsifiye yapıda keskin dişler yer almaktadır. Bu özgün çene yapısının sonucunda ise sülük ısırığı, "Y" şeklinde bir iz bırakmaktadır [9, 13].

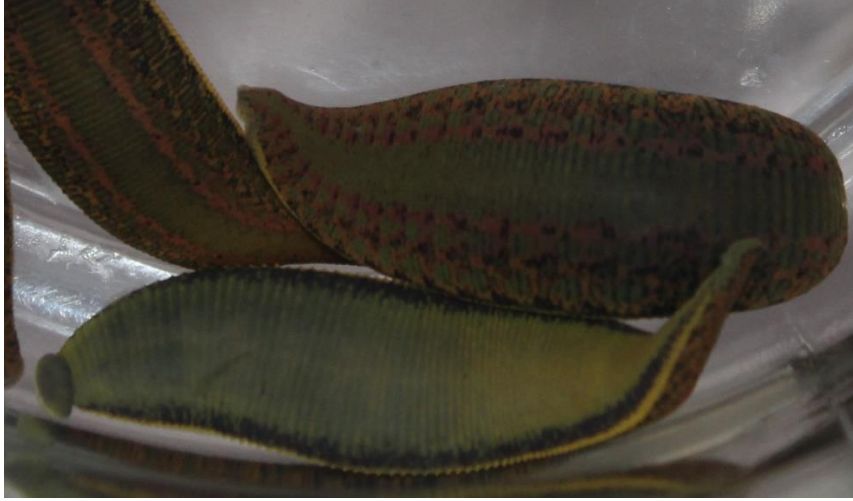
Yaşadıkları ortamdaki sıcaklık ve klor miktarı gibi ani değişimlere karşı son derece hassas olan sülükler, 0 °C ile 30 °C sıcaklığa sahip ortam koşullarında hayatlarını devam ettirirler. Yüksek klor içeriğine sahip ortam koşulları, sülükler için en elverişsiz ortamların başında gelir. Sülükler stresli koşullar altında vücut yüzeylerini kaplayarak tabaka oluşturan bir mukus salgılarlar [14]. Solunumlarını ise suda çözünmüş oksijeni veya atmosferdeki oksijeni vücut yüzeyinden aracılığıyla almak suretiyle kullanırlar [9, 13].

Çizelge 2.1. Hirudinea'ya ait tıbbi sülük türleri.

Hirudinea	<i>Hirudo medicinalis</i>
	<i>Hirudo verbana</i>
	<i>Hirudo orientalis</i>
	<i>Hirudo sulukii</i>
	<i>Hirudo nipponia</i>
	<i>Hirudo troctina</i>

2.1.1. *Hirudo verbana*

Hirudo verbana, Hirudinidae familyasının *Hirudo* cinsi altında sınıflandırılan bir sülük türüdür. Uzun süredir *Hirudo medicinalis* adı altında tıbbi sülük olarak kullanılmış olsa da sonraki dönemde bu adı taşıyan geleneksel Avrupa tıbbi sülüklerinden farklı, ayrı bir tür olarak kabul edilmiştir. İsviçre ve İtalya'dan Türkiye ve Özbekistan'a kadar dağılım göstermektedir. Türkiye'de yaygınca bulunan tıbbi sülük türü olan *H. verbana*, (Resim 2.1.) özellikle Kızılırmak ve Yeşilirmak Deltaları başta olmak üzere Bozalan Gölü (İzmir), .Poyrazlar, Işıklı gibi sulak .) alanlarda dağılım göstermektedir [15, 16].



Resim 2.1. *Hirudo verbana* türüne ait tıbbi sülükler

H. verbana türü tıbbi sülükler; sarı, kırmızı, yeşil ve siyah renklerden meydana gelen bir pigmentasyon göstermektedir. Vücutlarında dorsal kısımlarında kırmızı-turuncu veya siyah desenler bulunmaktadır [17].

2.1.2. Tıbbi Sülük Tedavisinin Tarihçesi

İngilizce' de "leech" olarak adlandırılan ve sülük anlamına gelen kelimenin kökenine inildiğinde, "hekim" veya "kan emici su solucanı" anlamlarına geldiği görülmektedir [18]. Hirudoterapi şeklinde de adlandırılan tıbbi sülük tedavisi, kadim bir geçmişe sahip olan ve günümüzde de geniş çapta kullanım alanları bulunan, tamamlayıcı ve destekleyici bir tedavi yöntemidir [19]. Sülüklerin tıbbi amaçlı kullanımının kesin olarak hangi yüzyılda başladığı

net değildir. Milattan öncesine tarihlenen Antik Mısır hiyerogliflerinde, tıbbi sülük tedavisine dair izler mevcuttur [20].

Kan ile beslenen ve parazitik canlılar olan sülükler, bu özellikleri nedeniyle flebotomi amacıyla asırlardır kullanılmaktadır. Hipokrat (~460-370 M.Ö.) tarafından ortaya atılan "hümorol patoloji" teorisine göre hastalıklar vücutta bulunan dört mizaçta meydana gelen dengesizliklerden kaynaklanmaktadır. Galen (129 – 216 M.Ö.) ise vücutta en fazla bulunan mizacın kan olduğunu ileri sürerek, çeşitli hastalıkların tedavisi için tıbbi sülük tedavisini tavsiye etmiştir [21]. İbn-i Sina (980-1037), "Tıbbın Kanunu" adlı eserinde tıbbi sülük tedavisine değinmiştir ve özellikle cilt hastalıkları için bu tedavi yöntemini önermiştir [22].

Birçok medeniyette rastlanılan tıbbi sülük tedavisinin Anadolu topraklarında kullanıldığına dair veriler de mevcuttur. Osmanlı padişahları, çeşitli hastalıklardan korunmak amacıyla yılın belirli dönemlerinde kendilerine tıbbi sülükleri uygulattırmışlardır. Bu dönemde, sülük soyunu korumak amacıyla da sülük ticareti üzerine gerekli düzenlemeler yapılmıştır [1].

18. Yüzyılda başta Fransa olmak üzere Avrupa'da tıbbi sülük kullanımı aşırı ve gereksiz şekilde bir artış göstermiştir. Tıbbi sülük tedavisinin endikasyonları gereksiz şekilde genişletilerek, yabani sülüklerin bu amaçlarla toplanmaları tehlikeli boyutlara ulaşmıştır. Bunun sonucunda, Orta Avrupa'daki *H. medicinalis* nesli tükenme riskiyle karşı karşıya kalmıştır ve bu dönem "*Leechmania* - sülük çılgınlığı" şeklinde anılmıştır [23, 24].

Azalmış sülük popülasyonlarına bağlı olmakla birlikte, tıpta ortaya çıkan yeni tedavi yöntemlerinin de etkisiyle sülük tedavisine olan talep gittikçe azalmıştır ve sülük tedavisi, yeniden keşfedilene dek göz ardı edilmiştir. 20. yy'nin ikinci yarısında başlayan, tıbbi sülük tedavisine ve tıbbi sülük salgısının bileşenlerine dair çalışmalar neticesinde, dikkatler tekrar bu kadim tedavi yöntemine yönelmiştir.

Özellikle, plastik-rekonstrüktif cerrahide sülüklerin, venöz drenaj ve flep sağ kalımı üzerindeki olumlu etkilerinin gösterildiği çalışmalar önemli bir yere sahip olmuştur. Bu çalışmaların neticesinde, 2004 yılında FDA-USA (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi), tıbbi bir araç olarak, *H. medicinalis*' in plastik-rekonstrüktif cerrahide, tedavi edici amaçlarla kullanımına onay vermiştir [25].

Dünyada tıbbi sülük üretimi ve ihracatında en büyük paya sahip olan Türkiye' de, 2014 yılında Sağlık Bakanlığı'nca yayımlanan “Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği” gereğince *H. medicinalis* ve *H. verbana* cinsi tıbbi sülüklerin, tedavi amacıyla kullanılmasının önü açılmıştır. Böylece, Tarım ve Orman Bakanlığı'nca onaylı çiftliklerden elde edilecek olan tıbbi sülüklerin, sertifikalı tıp doktorları tarafından uygulanabilir hâle gelmesi sağlanmıştır [26].

2.1.3. Tıbbi sülük salgısının bileşenleri ve özellikleri

Sülüklerin tedavi edici etki mekanizmaları, en eski zamanlardan günümüze kadar kapsamlı bir şekilde yorumlanmıştır. Sülük tedavisi, sülüğün ilk ısırıldığı anı ve sülüğün kan emdiği (yaklaşık 20 ila 45 dakikalık) bir bağlanma sürecini içerir. Sülüklerin kan emmeleri nedeniyle meydana gelen flebotomi etkisi başlangıçta bir rahatlama sağlasa da sülük tedavisinin ana faydaları, tıbbi sülüklerin tükürüğünde bulunan çeşitli biyoaktif maddeler dolayısıyla ortaya çıkmaktadır [27].

Sülükler vücutlarının baş ve kuyruk bölgelerinde bulunan çekmenleri ile konakçılarına tutunurlar. Isırık anı ile birlikte sülükler beslenmeye başlayarak damarları genişleten, kanın akışkanlığını arttıran kimyasallar ve analjezikler salgırlar [28]. Sonrasında sülükler, kolayca beslenmek amacıyla hücre dışı matriks degradasyonuna neden olan bileşikler sayesinde bir emme yolu oluşturlar (hücre dışı matris bozulması). Adezyon, agregasyon ve pıhtılaşmayı inhibe ederek (trombosit fonksiyonunun ve anti-koagülan etkinin inhibisyonu) ısırık bölgesinde kan akışını arttırırlar [29].

Tıbbi sülük salgısında bulunan biyoaktif maddeler aşağıda verildiği gibidir.

- Hirudin, tıbbi sülük salgısında bulunan ve en iyi bilinen bileşiklerden birisidir. *H. medicinalis* 'in tükürük bezleri tarafından salgılanır ve 9000 moleküler ağırlığa sahiptir. Bilinen en güçlü, doğal ve yalnızca trombine karşı seçici olan bir inhibitördür [30]. Doz aşımı zor meydana gelen bir durum olsa da hirudinin herhangi bir antagonisti bulunmadığı için terapötik amaçlarla kullanılırken dikkatli olunmalıdır [31].
- Gelin, trombine karşı inhibitör etki gösterir ve *Hirudinaria manillensis* ' in salgısından izole edilmiştir [30].

- Faktör Xa İnhibitörü, Pıhtılaşma kaskadında yer alan Faktör Xa' yı inhibe ederek anti-koagülan etki gösterir [32].
- Destabilaz, anti-mikrobiyal etki ile birlikte anti-koagülan etkiler de göstermektedir ve *H. medicinalis* salgısından izole edilmiştir [33].
- Hirustasin, doku kallikreini inhibe eden bir proteindir [34].
- LDTI (Sülük Türevi Triptaz İnhibitörü), astım, romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklarda artış gösteren tripsinin inhibitörüdür. Bunun yanı sıra LDTI, tripsini ve kemotripsini de inhibe etmektedir [35].
- Ghilantenler, *Haementeria ghilianii* ' den izole edilmiş olan, Tripsin ve Faktör Xa inhibe eden bir proteindir [36].
- Eglin C, kimotripsin ve subtilisin benzeri serin proteinazlar için inhibitör etki gösterir [34]
- Kompleman C1 İnhibitörü, fonksiyonuna dair yeterli veri bulunmuyor olsa da kompleman sisteminde önemli görevleri olduğu düşünülmektedir [28].
- Guamerin ve Piguamerin, Kore sülüğü - *Hirudo nipponia* türü tıbbi sülüklerden izole edilmiş olan proteinlerdir. Piguamerin; tripsin, plazma kallikrein ve doku kallikrein inhibitörüdür. Guamerin ise serin proteaz inhibitörüdür [30].
- Bdelinler, Bdelin A (Bdelastasin) ve Bdelin B şeklinde çeşitli formları mevcuttur. Potansiyel olarak tripsin, plazmin ve sperm akrosin inhibitörleridirler [34].
- Antistasin, ilk olarak *Haementeria officinalis* türü sülüklerden izole edilmiştir. *H. medicinalis* türü sülüklerin salgılarında da bulunduğu bilinmektedir. Faktör Xa inhibitörüdür. Kinin-kallikrein sistemi üzerinde de etki göstermektedir [28].
- Theromacin ve Theromyzin, *Theromyzon tessulatum* türü sülüklerden elde edilmiş ve antibiyotik etki gösteren maddelerdir [37].
- Hiyalüronidaz, antibiyotik etki de gösteren hyalüronidaz, ekstrasellüler matriksin yapısında bulunan hyalüronik asidin endoglukuronid bağlarını yıkar. Ekstrasellüler matriks degradasyonuna neden olur ve bir yayılma faktörü görevi görerek tıbbi sülük salgısında bulunan diğer bileşenlerin konakçı vücudunda etkinlik göstermesinin önü açar [38].
- Kollajenaz, kollajenin yıkılmasından sorumlu olan bir enzimdir [30].
- Asetilkolin ve Histamin-Benzeri Maddeler, ısırık bölgesine olan kan akışını arttırırlar. Ayrıca, uzamış kanamadan da sorumlu olabilirler [30].
- Saratin, *H. medicinalis* ' ten elde edilmiş olan bu protein, Von Willebrand Faktörü' ne (vWF) bağlanarak trombositlerin kollajen ile etkileşime girmesini engeller. Böylece, bölgesel olarak pıhtılaşmayı engelleyici bir etki gösterir [39].

- Calin, vWF' ye bağlanarak yara bölgesinde yaklaşık 12 saat boyunca pıhtılaşma karşıtı etki gösterir [40].
- Apiraz, ADP'yi adenosin monofosfata dönüştürerek agregasyonu inhibe eder. Bu nedenle dolaylı yoldan araşidonik asit, trombosit aktive edici faktör ve epinefrin karşıtı etki de göstermektedir [28].
- Kloromisetin, bakteriyel hücre duvarını hedef alarak parçalayıcı etki göstermesi nedeniyle anti-mikrobiyal olarak kabul edilmektedir [41].

2.1.4. Tıbbi sülük tedavisinin endikasyonları ve komplikasyonları

Asırlar boyunca tıbbi sülük tedavisi, çeşitli hastalıkların tedavi edilmesi amacıyla kullanıldıysa da tıbbi sülük tedavisinin etki mekanizması ve tıbbi sülük salgısının içeriğinin daha iyi anlaşılması ile birlikte bu geleneksel tedavi yönteminin endikasyon sınırları daha iyi belirlenmiştir.

Tıbbi sülük tedavisinin en modern uygulama alanlarından birisi plastik-rekonstrüktif cerrahidir. Flep operasyonları sonrasında, venöz drenajı sağlamak ve flep sağ kalımını arttırmak amacıyla kullanılan tıbbi sülük tedavisi, tatmin edici sonuçlar vermektedir. Tıbbi sülük tedavisinin, travma sonrası yaralanmalarda da olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. İnflamatuvar hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, varisli damarlar, artrit, osteoartrit, periartrit ve romatoit artrit gibi hastalıklar tıbbi sülük tedavisinin yaygınca kullanıldığı başlıca durumlardan sayılabilir [14].

Tıbbi sülük tedavisi nispeten daha az yan etkili olan geleneksel ve tamamlayıcı bir tedavi yöntemi olsa da farklı komplikasyonlarla karşılaşılabilir. Sülük uygulaması sonrası enfeksiyon oluşumu %2-36 oranında görülen bir durumdur. Kanama, alerjik reaksiyonlar ve bakteriyel enfeksiyonlar en yaygın endikasyonlardandır. Tıbbi sülük tedavisini her bireye uygulamak mümkün değildir. Tıbbi sülük tedavisinin uygulaması dışında kalan bireyler Çizelge 2.2.'de verilmiştir [25].

Sülük sindirim sistemindeki bakteriler zatürre, sepsisemi veya gastroenterite neden olabilir. Sülüklerin antibiyotik tedavisi olmaksızın uygulandığı vakalarda, %20 oranında bakteriyel enfeksiyona yol açabileceği bildirilmiştir [42]. Bazı çalışmalar, fleplerin venöz konjesyonunda ve replantasyonda sülük tedavisine bağlı olarak, *Aeromonas hydrophila*'nın

neden olduğu enfeksiyonları dile getirmektedir. Bu enfeksiyonların bir kısmı akut şekilde hafif seyrederken, kısmi flep kaybına neden olan enfeksiyonların varlığı da söz konusudur. Tıbbi sülük salgısında bulunan, pıhtılaşma karşıtı özellikleri nedeniyle hirudin ve histamin benzeri maddeler nedeniyle ortaya çıkan uzamış kanama da en sık bildirilen komplikasyonlardan birisidir [43, 44].

Çizelge 2.2. Tıbbi sülük tedavisinin uygulaması dışında kalan bireyler

Hematolojik Hastalıklar	Anti-koagülan ilaç tedavisi alan hastalar Kanamaya yatkınlık gösteren hastalar (Hemofili gibi) Ciddi anemiye sahip hastalar (Hb < 10) Aktif kanama odağı olan hastalar
Genel Hastalıklar	Aktif tüberküloz veya hipotansiyon Gelişmiş kronik hastalıklar Bozulmuş yara iyileşmesi Diyabet Arteriyel yetmezlik Akut dönemdeki mental hastalıklar
İmmünolojik Hastalıklar	AIDS Hastaları İmmünsüpresif tedavi alan hastalar
Diğer Durumlar	Cerrahi müdahale yapılacak hastalar 18 yaş altındaki bireyler Hamile ya da emzirme döneminde olan kadınlar

2.2. Cilt Flepleri

Kanser veya kaza, yanık gibi travmatik yaralanmalar sonucunda bütünlüğü bozulan cilt yapısının tedavi edilmesinin en iyi yöntemlerinden birisi cilt flebi uygulamasıdır. Donör bölgeden alıcı bölgeye nakledilen tam kalınlıkta deri kitlelerine cilt flebi adı verilmektedir. Flep sağ kalımının devam edebilmesini için kan dolaşımının sağlanması gerekmektedir. Bölgesel deri fleplerinde orijinal kan damarlarının bir kısmı sağlam tutulabilirken, serbest deri fleplerinde ise mikro-cerrahi yöntemler gerekli olabilmektedir [45]. Rastgele paternli flepler, subdermal pleksus dışında herhangi bir kan kaynağı bilinmeksizin ve dikkate alınmaksızın eleve edilen fleplerdir [46]. Dolayısıyla flebe vaskülarite sağlayan adlandırılmış bir kan damarı yoktur. Aksine, eksenel model flepler, kan beslemelerinin çoğu için adlandırılmış bir artere bağımlıdır.

Dikkatli cerrahi planlama ve uygulamaya rağmen, random flep nekrozu, vasküler yetmezlik veya iskemi-reperfüzyon (IR) gibi nedenlerle rekonstrüktif başarısızlık meydana gelebilir [47]. Nekroz nedeniyle ortaya çıkan flep kaybı ise bazı durumlarda ortaya çıkabilen ciddi bir durumdur ve bu genellikle; yetersiz kan akışı, inflamatuvar reaksiyonlar veya oksidatif stres nedeniyle ortaya çıkmaktadır [48].

2.3. Yara İyileşmesi

Temel rolü vücudu dış patojenlere ve aşırı su kaybına karşı kurumaktan sorumlu olan deri, vücudu bir bariyermişçesine sarmalayarak dış etmenlere karşı korur. Vücudun en büyük organlarından birisi olan deri, yapısında saç ve tırnakları da bulundurmaktadır. Bunların yanı sıra ultraviyole koruması, hormon ve enzim üretimi, homeostaz ve termoregülasyon gibi görevleri de bulunmaktadır [49].

Yara iyileşmesi, bir kaza, travma, hastalık veya ameliyat sonrası oluşan kusurların giderilerek, cilt veya dokunun bütünlüğünün ve işlevinin korunması için gerekli olan fiziksel bir süreçtir. Doku yaralanmasından sonra başlatılan fizyolojik yara iyileşmesi, farklı hücre tipleri ve derinin bölümleri arasında bir sinyal ağı oluşturur. Yara bölgesine göç etmek için inflamatuvar hücreler de dâhil olmak üzere bir grup hücreyi toplayan kemokinler ve hem bir yapı iskelesi hem de bir büyüme faktörü kaynağı olarak hizmet eden bir fibrin pıhtısı oluşumu ile homeostaz sona erer [50].

Doku rejenerasyonu yeteneğine sahip olmayan memelilerde yaranın onarılmasını sağlayan aşamalar; inflamatuvar hücre göçünü ve sitokin hareketlerini, kollajen ve hücre dışı matris birikimini ve yara izinin yeniden şekillenmesini içeren karmaşık bir sürece bağlıdır. Sağlıklı bir şekilde ilerleyen yara iyileşmesi aşamaları ise skar oluşumu ile sonuçlanır [51].

2.3.1. Yara iyileşmesinin aşamaları

Normal yara iyileşmesi; homeostaz + inflamatuvar faz, proliferatif faz ve yeniden şekillenme fazı olmak üzere birbirinden keskin çizgilerle ayrılamayan ardışık üç faz içerir, (Çizelge 2.3.).

Bozulmuş yara iyileşmesi ise hipertrofik skar ve keloidin gözlemlendiği aşırı yara iyileşmesi durumunda veya kronik yaralar (ülser) gibi yara iyileşmesinin sekteye uğradığı durumlarda ortaya çıkar [50].

Çizelge 2.3. Yara iyileşmesinin aşamaları

Fazlar	Süresi	Öne Çıkan Özellikleri
Homeostaz Fazı	Yaralanma ile birlikte aniden başlar ve birkaç saat boyunca devam eder	Kan pıhtısı oluşturularak kanamanın durdurulması
İnflamasyon Fazı	0 – 5 Gün	Yangı, kızarıklık, şişlik, acı Monositlerin, makrofajların, B ve T hücrelerinin varlığı
Proliferasyon (Granülasyon) Fazı	4 -21 Gün	Skar değişimi, yeni epidermis, granülasyon
Olgunlaşma ve Yeniden Şekillenme Fazı	21 Gün - Aylar	Matris bileşenlerinin üretimi, yaranın tamamına yakın şekilde onarılması

2.3.2. Homeostaz ve inflamasyon fazı

Yaralanmanın başladığı andan kanamanın durdurulduğu ana kadar gerçekleşen süreçleri içeren homeostaz fazı, inflamasyon fazından önce gelir. Yaralanma bölgesinde damarların yırtılması, subendotelyal kollajeni trombositlere maruz bırakır. Bu nedenle homeostazın ilk hedefi öncelikle kanamayı durdurmaktır. Bunun sonucunda pıhtılaşma kaskadının agregasyonu ve aktivasyonu gerçekleşir. Bölgesel şekilde oluşturulmuş fibrin pıhtısı; nötrofiller, monositler, fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi hücrelerin göç etmesi için bir iskele görevi görür, [50].

Ayrıca, yara iyileşmesinin sağlıklı bir şekilde devam ettirilmesi için oldukça önemli yere sahip olan sitokinlerin ve çeşitli büyüme faktörlerinin salgılandığı aşama homeostaz fazıdır [52].

İnflamasyon, yaralanma karşısında vücudun verdiği gerekli ve normal bir tepkidir. Başlangıçta, homeostaz fazı ile iç içe geçmiş şekilde hemen ortaya çıkar ve normal inflamatuvar faz 1. Günden 3. güne kadar devam eder. Erken faz ve geç faz olmak üzere iki faza ayrılır. Erken aşamada, tümör nekroz faktörü (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) üreten nötrofillerin gelişi gerçekleşir. Bu ayrıca inflamatuvar yanıtları tetikler ve kan damarlarını onaran vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve interlökin-8 (IL-8) salgılanmasını başlatır [53, 54].

Esas olarak bağışıklık sistemi elemanlarının görev aldığı inflamatuvar faz; artmış vasküler geçirgenlik, dolaşımdan yara ortamına hücrelerin kemotaksisi, sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin bölgesel salınımı ve göç eden hücrelerin aktivasyonu ile karakterize edilen bir evredir. Yaralanmadan yaklaşık altı saat sonra, kan dolaşımındaki bağışıklık hücreleri yara bölgesine göç eder. Yara bölgesine ilk ulaşan kan lökositleri nötrofillerdir [50]. Nötrofillerin ana işlevi, bakteri ve doku kalıntılarının fagositozudur. Bakteriyel kontaminasyon meydana gelmediği sürece, iyileşmenin gerçekleşmesi için nötrofillerin varlığı şart değildir [55].

Yara makrofajları, nötrofillerden çok daha uzun bir ömre sahiptir ve inflamasyon tamamlanana kadar yarada kalır. Makrofajlar, yara iyileşme kaskadının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar [56]. Görünümlerini, yaralanmadan sonraki beşinci gün civarında önemli sayılarda ortaya çıkan lenfositler takip eder.

2.3.3. Proliferasyon veya granülasyon fazı

Yaranın revaskülarizasyonu, fibroplaziye paralel şekilde ilerlerken; anjiyogenez, proliferasyon ve migrasyonun bir kombinasyonu ile gerçekleşir. Revaskülarizasyon, keratinositlerin göçünü ve çoğalmasına ihtiyaç duyar. Kılcal tomurcuklar yaraya bitişik kan damarlarından filizlenir ve yara boşluğuna uzanır. Venülün yaraya en yakın tarafındaki endotel hücreleri, anjiyojenik uyaranlara yanıt olarak göç etmeye başlar. Yaranın derinlerinde granülasyon dokusu ve kollajen sentezi ilerlerken, yara yüzeyinde epitel bütünlüğü yeniden sağlanır. Yaranın epitelizasyonu, yaralanmadan birkaç saat sonra başlar ve doku bütünlüğü sağlanıp, normal doku elde edilene kadar devam eder [57].

Yara iyileşmesi sırasında besine ve oksijene ihtiyaç duyulduğu için yara bölgesindeki damar sisteminin sağlıklı ve yeterli hale getirilmesi gerekmektedir. Bu aşamada, VEGF başta

olmak üzere anjiyogenezden sorumlu olan büyüme faktörleri devreye girer. Yara kenarlarından köken alan epitel hücreleri ve yara yatağı içindeki epitel kalıntıları, kabuk altında ve alttaki canlı bağ dokusu üzerinde göç etmeye başlar. Yaranın hemen bitişiğindeki epidermis, yaralanmadan sonraki 24 saat içinde kalınlaşmaya başlar. Hasar köprülendikten sonra, göç eden epitel hücreleri yassı görünümünü kaybeder, şekil olarak daha sütunlu hale gelir ve mitotik aktivitelerini artırır. Epitel tabakası yeniden oluşturulur ve yüzey sonunda keratinize olur [58].

2.3.4. Olgunlaşma ve yeniden şekillenme fazı

Granülasyon fazının sonrasına doğru olgunlaşma ve yeniden şekilleme fazı başlar. Başlangıçta yara matriksi esas olarak homeostaz ve makrofajdan kaynaklanan fibrin ve fibronektinden meydana gelir. Başlı başına kollajen fibrilleri, iyileşen yaradaki stres çizgileri boyunca yönlendirilerek, hizalanmış demetler halinde çapraz bağlanır ve yeniden düzenlenir [59].

Net kollajen sentezi yaralanmadan en az 4-5 hafta sonra artar. İyileşme sırasında artan kollajen sentezi oranı, yalnızca yaradaki artan fibroblast sayısından değil, aynı zamanda bireysel hücreler tarafından kollajen üretimindeki net artıştan da kaynaklanır [60].

2.4. Anjiyogenez

Anjiyogenez, yeni kılcal kan damarlarının daha öncesinde var olan vaskülatürden oluşturulduğu bir süreçtir. Yara iyileşmesi sırasında kritik öneme sahip olan anjiyogenez, granülasyon dokusu oluşumuna katılarak oluşan yeni dokuların beslenmesini ve oksijenlenmesini sağlar. Fizyolojik anjiyogenez, pozitif ve negatif anjiyogenezi düzenleyici moleküller tarafından sıkıca kontrol altında tutulur ve bu modülatörler tarafından düzenlenir [59].

Embriyonik gelişim döneminde fetüsün gelişiminden sorumlu olan bu süreç; yetişkinlik döneminde ise yara iyileşmesinde ve dişi üreme sisteminde oldukça önemli görevler üstlenir. Fizyolojik anjiyogenez, oldukça kısa sürelidir ve iki haftadan uzun sürmez. Yetişkin dokularında, vasküler büyüme (anjiyogenez) normalde yaraların ve kırıkların iyileşmesi gibi doku onarımı sırasında meydana gelir [61].

Retinopatiler ve tümör büyümesi de dâhil olmak üzere çok sayıda hastalığın önemli bir bileşeni olan patolojik anjiyogenez durumu ise tümör oluşumunda ve kronik inflamasyon durumunda gözlemlenir. Fizyolojik anjiyogenezin aksine, aylarca hatta yıllarca, kontrolsüz şekilde devam eder [62]. Anjiyogenez için başka bir itici güç ise hipoksi durumudur.

2.4.1. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör (HIF)

Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF), oksijene duyarlı şekilde indüklenebilir bir faktör HIF-1- α ve temel HIF-1- β olmak üzere iki alt birimden oluşur. HIF-1, hipoksiye tepki elemanlarına bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder [63]. Hipoksi sonucunda, bir hayatta kalma mekanizması olarak, Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1- α (HIF-1- α) miktarında artma meydana gelir. Böylece, anjiyogenezi düzenleyen bir mekanizma devreye girer [64]. Bununla birlikte, anjiyogenezde HIF-1- α aracılığıyla düzenlenen ana faktörlerden birisi, vasküler endotelial büyüme faktörüdür (VEGF) [65].

İyileşme süreci boyunca hücre migrasyonu, hipoksik koşullar altında hücrenin hayatta kalması, hücre bölünmesi, büyüme faktörlerinin salınması gibi önemli görevlere sahip olan HIF-1, yara iyileşmesinin ilk aşamalarında meydana gelen hipoksik koşullar altında artan salınım miktarı nedeniyle yara iyileşmesinin indüklenmesi açısından önemli etkiler gösterir. Fakat uzamış hipoksi durumu ise tam tersine yara iyileşmesinin gecikmesine neden olur [66]. Bazı normal hücre tiplerinde ve birçok kanser hücresinde HIF-1- α , mRNA'nın proteine translasyon hızı, protein kinaz mTOR kompleksi 1'in (mTORc1) aktivitesi ile düzenlenir [63].

Doku oksijen seviyesinin sağlıklı ve normal koşullarına dönmesi ile birlikte HIF-1- α görevini tamamlayarak degradasyona uğrar. Yara iyileşmesinin ilk aşamalarında ve hipoksi koşulları altında HIF-1- α oldukça büyük bir öneme sahiptir ve HIF-1 eksikliği kronik-iyileşmeyen yaralara neden olabilir [66].

2.5. Büyüme Faktörleri (Growth Factors - GFs)

Biyolojik bir ortamda çok özel hücrel tepkilerin gerçekleştirilmesi için talimat verebilen, bünyesinde çok sayıda molekül barındıran moleküller grubuna büyüme faktörleri (Growth Factors - GFs) adı verilmektedir. Bu moleküller, hedef hücrelerine göre belirli aktiviteler

gösterirler. Bu aktiviteler arasında; hücre kütleini veya büyüklüğünü arttırmak, mitojenik aktivite aracılığıyla hücre sayısını arttırmak ve apoptozu önleyerek, hücre sağ kalımını arttırmak bulunur [67, 68].

2.5.1. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)

Geçmişte somatomedinler olarak bilinen insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler) ailesi, karaciğer başta olmak üzere tüm vücut dokularında, otokrin mekanizmalar yoluyla üretilmektedirler [62].

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-1 ve IGF-2), disülfid bağları ile birbirine bağlanan iki alt birimden meydana gelen ve proinsülin ile yapısal homoloji paylaşan, 7-kDa ağırlığında proteinleridir. IGF'ler, akciğerler de dâhil olmak üzere birçok organın büyüme ve gelişmesinde yer alıp farklı dokulardaki endotel hücrelerinde bulunur ve mitojenik etki gösterirler [69].

Gebelik süresince IGF'ler, akciğer epitel hücre proliferasyonu üzerinde hem otokrin hem de parakrin yollarla hareket edebilir ve ayrıca bağ dokusunun olgunlaşmasını da uyarabilirler. Depolama granüllerinden salınan insülin ve diğer peptid hormonlarının aksine, IGF'ler üretildikçe salınır. IGF-1'in ve IGF-2'nin en yüksek konsantrasyonu dolaşımda bulunur ve başlıca karaciğerden elde edilirler [70].

IGF-1'in lineer kemik gelişimi için, GH'ye yanıt olarak endokondral kemikte yerel olarak üretilen IGF-1, epifiz plağının distal proliferatif bölgesinin klonal kondrosit genişlemesini uyarak iskelet büyümesini destekler. Ayrıca, anjiyogenez için oldukça önemli bir agonistik etki gösteren IGF'ler, farklı dokulardaki endotel hücrelerinde reseptörlere sahiptir. Hem insülin hem de IGF, endotel hücrelerinde VEGF mRNA sentezini uyarır. IGF, endotel hücre motilitesini ve tübül oluşumunu kolaylaştırır [71, 72].

IGF sentezi özellikle yara iyileşmesinin granülasyon fazı ile yeniden şekillenme fazının kesiştiği dönemde (yara iyileşmesinin başlamasından haftalar sonra) artarak granülasyon doku formasyonundan ve epitel rejenerasyondan sorumludur [73].

2.5.2. Transforming büyüme faktörü (TGF)

Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) adını, başlangıçta normal hücreleri kötü huylu hücrelere dönüştürdüğü kanısıyla almıştır. Daha sonra bu bilginin yanlış olduğu ortaya çıkmış olsa da ad değişikliğine gidilmemiştir [62]. Çeşitli hücreler ve dokular üzerinde önemli etkileri olan TGF- α 'nın başlıca hedefleri arasında epitelyal hücreler, gastrointestinal sistem, akciğer, karaciğer, böbrek, meme bezi, dermis, gonadlar bulunmaktadır. Diğer büyüme faktörleri gibi TGF- α da hücre göçü, büyümesi ve farklılaşmasında rol oynamaktadır. Ayrıca yara iyileşmesinin ilk aşamalarında TGF- α , epidermal büyüme faktörünün (EGF) salgılanmasını teşvik eder [74].

2.5.3. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)

Plasental büyüme faktörü ve Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF) ile yapısal homoloji gösteren Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF), PDGF üst ailesine aittir. VEGF, 3446 kDa ağırlığında heparin bağlayıcı bir glikoproteindir [62]. VEGF, yara iyileştirmesine katılan endotel hücreleri, fibroblastlar, düz kas hücreleri, trombositler, nötrofiller ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücre tipi tarafından üretilir [75].

VEGF, endotel hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve geçirgenliğini uyaran bir faktördür. Anjiyogenez için en önemli elemanlardan birisi olan VEGF, fetal gelişim sırasında ve yetişkinlik döneminde damarların spesifikasyonu, morfogenez, farklılaşması ve homeostazı için gereklidir. Hipoksi durumunda ise dokulara oksijen sağlanmasından sorumlu olan bir sistemin parçasıdır [76, 77]. Anjiyogenez farklı aşamalarında görev alan VEGF, özellikle vasküler geçirgenliği arttırmada kendine özgü ve güçlü bir etkinlik göstermektedir. Öyle ki vasküler geçirgenliği artırma üzerindeki etkisi histaminden bile daha güçlüdür [75].

VEGF, biyolojik etkilerini hücre yüzeyindeki VEGF reseptörleri (VEGFR'ler) adı verilen spesifik reseptörlere bağlanarak gösterir. VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 olmak üzere üç tip VEGFR mevcuttur. VEGFR-1 ve VEGFR-2 esas olarak kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan hücreler olan vasküler endotel hücrelerde eksprese edilir [78].

VEGF, özellikle proliferasyon fazında (7. gün dolaylarında) eksprese edilerek vasküler permeability arttırmaktan, granülasyon dokusu formasyonundan ve anjiyogenezen sorumludur [73].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışması *in vivo* koşullar altında yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler Gazi Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarları ve Gazi Üniversitesi, Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (GÜDAM) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler Çizelge 3.1’ de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazların ve sarf malzemelerin listesi

Cihaz veya Malzeme	Markası
+4 °C Buzdolabı	Arçelik
-20 °C Buzdolabı	Electrolux MF280
-80 °C Buzdolabı	Sanyo
İnvert Mikroskop	Leica DMIRB
Santrifüj	Nüve NF815
Vorteks	Nüve NM10
Otomatik Pipetler	Biologix
Hassas Terazî	Adventurer Pro
Şırınga Filtreleri (0.22 µm)	Sartorius Minisart
Görüntü Analiz Sistemi	Leica Qwin
Doku Takip Cihazı	Leica
Etüv	Nüve FN 055
Elisa Mikroplaka Yıkayıcı ve Okuyucu	Combiwash
Spektrofotometre	Hitachi U-2900
Homojinatör	Heidolph homogenizers
Işık Mikroskobu	Leica 400 DM 4000
Mikrotom Bıçağı	Feather
Doku Takip Kaseti	Superior
Hidrofobik Kalem	Pat Lab
Superfrost Mikroskop Lamı	Thermo Scientific

3.2. Tıbbi Sülüklerin Temini

Çalışmada Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından onaylı, steril tıbbi sülük üretim çiftliğinden temin edilen tıbbi sülük türlerinden *Hirudo verbana* örnekleri “Kameralı Stereozoom Mikroskop” aracılığıyla incelenerek teşhis edildiler.

Sülükler, klorsuz su ile dolu, havalandırması iyi olan plastik kaplarda muhafaza edildiler. Oda sıcaklığında muhafaza edilen plastik kaplardaki su, 2-3 günde bir değiştirilerek sülüklerin bakımları yapıldı.

3.2.1. Tıbbi sülük salgısının elde edilmesi

Sülüklerde salgı sekresyonuna sebep olan, fagostimülatör bir solüsyon ile sülüklerin beslenmesinin sağladık ve ardından sağma yöntemini kullandık. Bu yöntem literatürde, hakkında en çok araştırmanın bulunduğu yöntemdir, (Resim 3.1.). Özellikle I.P. Baskova ve arkadaşları tarafından yaygınca kullanılmış olan bir tekniktir [79].

37 °C sıcaklığında, 0.001 M arginin ve 0.15 M sodyum klorür solüsyonundan oluşan bir fagostimülatör solüsyon aracılığıyla sülüklerin telef olmadan salgılarının elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bahsedilen fagostimülatör solüsyonu, bir parafilm tabakası ile kaplanarak ters çevrilmiş olan bir huniye aktardık (Resim 3.1.). Sülükler doyuncaya ve kendilerini parafilminden ayırıncaya kadar bu solüsyonu emmelerine izin verdik. Fagostimülatör solüsyonu emmeden önce ve sonra sülüklerin ağırlığı kaydettik.

Parafilminden ayrılan doymuş sülükler, küçük bir plastik kaba aktarıldılar. Ardından bu kabı, buz küpleri içeren daha büyük bir kutuya yerleştirdik. 15-20 dakika boyunca sülükler bilincini kaybedip emdiği tüm solüsyonu kusana kadar beklettik. Salgı toplama işlemini tamamlamak için sülükleri, posterior (kuyruk) kısımlarından anterior (ağız) kısımlarında bulunan emici çekmenlerine doğru yumuşak bir şekilde sağarak tüm sıvıları topladık.

Elde edilen bu sıvı, 0.22 µm'lik filtreden geçirilerek 4°C'de 2500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu sıvı, içeriğindeki protein değerini kaybetmemesi amacıyla eppendorflara bölünerek, -20 °C'de ışık görmeyecek şekilde muhafaza edildi.



Resim 3.1. Fagostimülatör solüsyon ile beslenmeleri sırasında tıbbi sülükler

3.2.2. Tıbbi sülük salgısında total protein tayini

Sülük salgı ekstraktının total protein tayini, Bradford tarafından bildirilen Bradford yöntemine göre, Bradford Protein Assay Kit (ABP Biosciences - A.B.D.) aracılığıyla yapıldı [80].

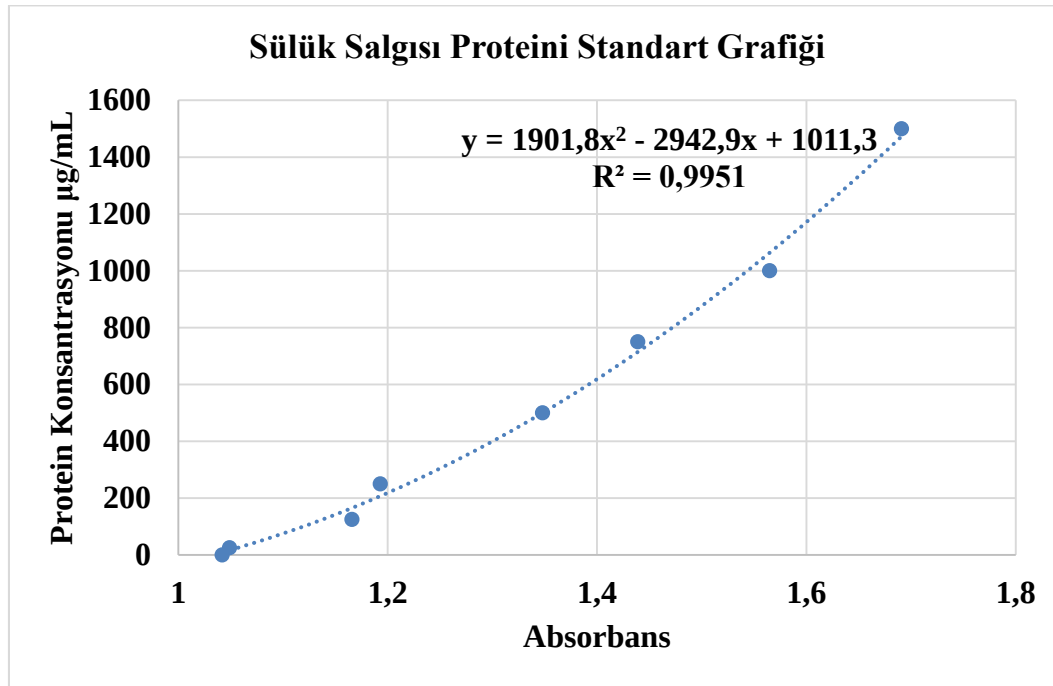
Protein-boya bağlanma ilişkisini baz alan bu teknik, proteinlerin mikrogram miktarlarının niceliklerinin belirlenmesi için oldukça pratik, hızlı ve hassas bir yöntemdir. Protein ve peptit içeriği yüksek olan tıbbi sülük salgısı için bu tekniği tercih etme sebebimiz ise çalışma sırasındaki bekleme süresinin mümkün olan en süreye indirilerek protein kaybının önüne geçmektir.

Uygulama Basamakları:

1. Konsantrasyonları 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arasında olan standartlar, seri dilüsyon ile 6 farklı konsantrasyonda hazırlandı.
2. Standartlar ve sülük salgı ekstraktı, 1 mL olacak şekilde etiketlenmiş test tüplerine pipetlendi.
3. Her bir tüpe 1 mL Bradford reaktifi eklenerek iyice karıştırıldı.

4. Örnekler 5 dakika boyunca, 37 °C’ de inkübe edildi.
5. Örneklerin absorbans değerleri 595 nm’de köre karşı spektrofotometrede ölçüldü.
6. Protein miktarları oluşturulan standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı. (Şekil 3.1.)

*Total Protein Miktarı Hesaplama: (Numune Absorbansı / Standart Absorbansı) * standart konsantrasyonu*



Şekil 3.1. Sülük salgı ekstrektında total protein tayini

Sonuçlar µg/ mL cinsinden verilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız sülük salgı ekstrektının total protein konsantrasyonu 50 µg/ mL olarak bulunmuştur, (Çizelge 3.2.).

3.3. Deney hayvanlarının temini ve laboratuvar koşulları

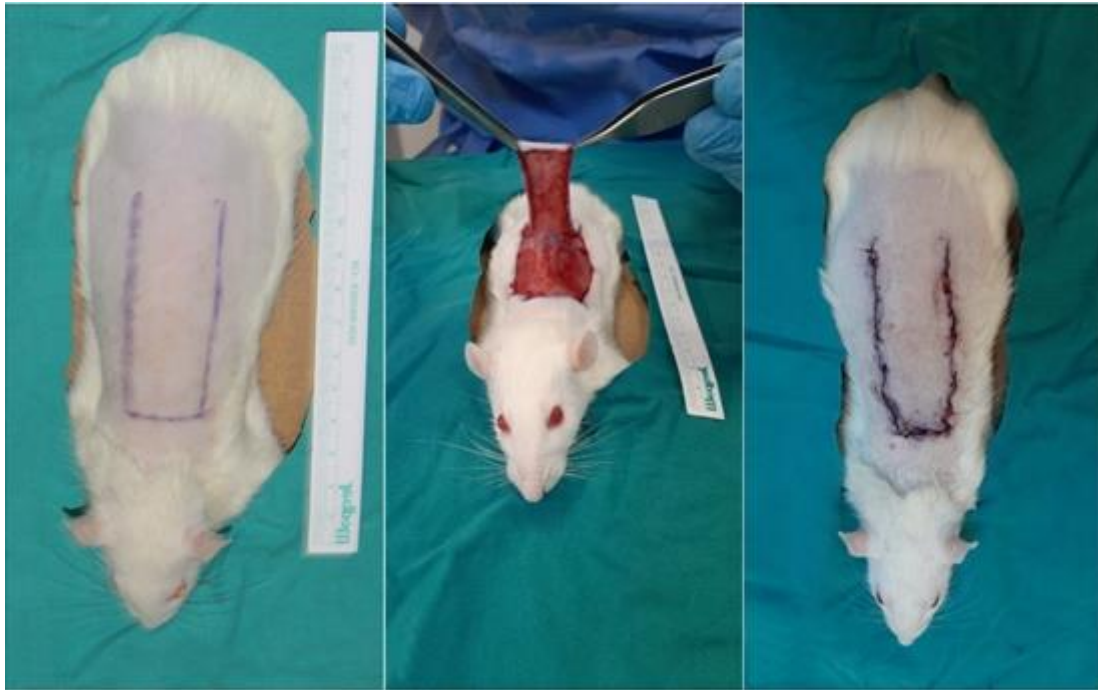
Hayvan deneyleri, Gazi Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından G.Ü.ET – 22.081 kod numarası ile alınmış olan etik kurul onayı ile; Gazi Üniversitesi - Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi’nde (GÜDAM) gerçekleştirildi. Tüm deneyler, ‘‘Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Yönergelerine’’ uygun olarak yapıldı.

Deney hayvanı olarak Wistar albino (*Rattus norvegicus*) türü, ağırlıkları 250 ± 30 g olan 24 adet dişi sıçan ile çalışıldı. Deney süresince ortam koşulları; 12 saat aydınlık 12 saat karanlık, $\%47 \pm 5$ nem ve sıcaklık $22\text{ C}^\circ \pm 4$ (klimalı oda) olacak şekilde sabit tutuldu. Deney boyunca *ad libitum* koşullar altında; içme suyu olarak çeşme suyu ve yem olarak ise normal pellet yem kullanıldı.

3.4. Cerrahi yöntem ve flep modeli

Gerekli anestezi maddelerinin; ketamin (80 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu ile tüm gruplardaki tüm sıçanların anestezisi uygun şartlarda gerçekleştirildi. Anestezi sonrası traş makinesi ile sıçanların kıl tıraşı yapıldı. Genel anestezi altında cerrahi operasyon tamamlandı. Tüm gruplardaki tüm sıçanlara Resim 3.2. 'de gösterildiği şekilde dorsal flep modeli uygulandı.

Sıçanların dorsal bölgelerine, boyutları 6 x 2 cm olacak şekilde planlanan flep modeli, cerrahi cetvel ile ölçülerek, cerrahi kalem yardımıyla çizildi. Fleplerin anatomik sınırlarının belirlenmesinin ardından, random dorsal flep derin kas fasyası üzerinden eleve edildi. Sonrasında tüm flepler basit dikiş ile ilk pozisyonlarına yeniden yerleştirildi.



Resim 3.2. Deney hayvanlarının dorsal bölgelerinde yapılan flep operasyon

3.5. Deney Grupları

Deney gruplarına ait bilgiler aşağıdaki gibidir, (Şekil 3.2.).

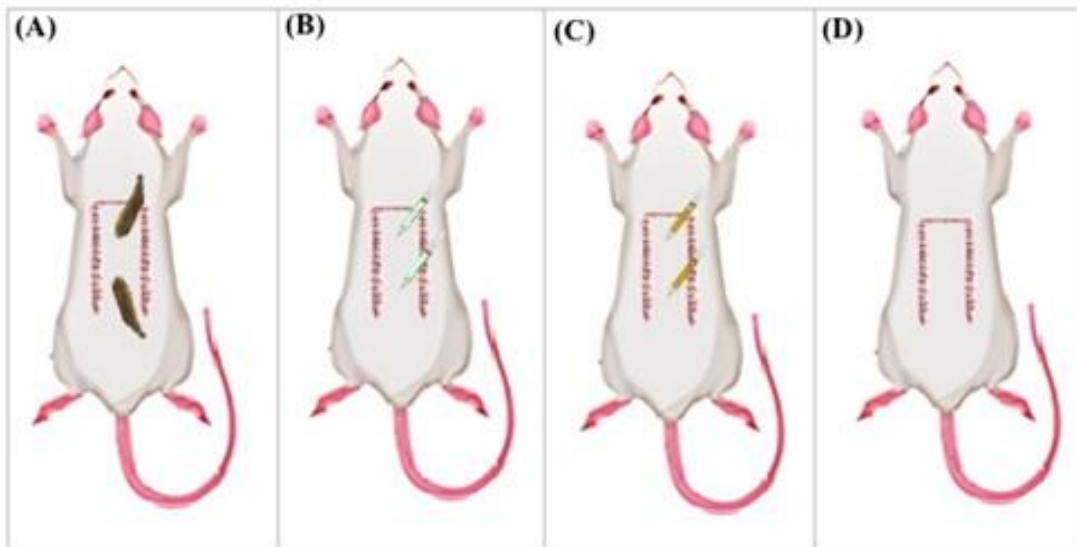
A Grubu: Tıbbi sülük uygulanan gruptur. Operasyon günü flep uygulaması sonrası, anestezi altında flebin distal ve proksimal merkezlerine birer tane olmak üzere küçük boy (~ 0.5 gr.) steril tıbbi sülük uygulandı.

B Grubu: Sülük salgı ekstraktı (SSE) enjekte edilen gruptur. Operasyon günü flep uygulaması sonrası, anestezi altında flebin distal ve proksimal merkezlerine birer tane olmak üzere 0,5 mL SSE subkutan şekilde enjekte edildi.

C Grubu: Fagostimülatör solüsyon (FSS) enjekte edilen gruptur. Operasyon günü flep uygulaması sonrası, anestezi altında flebin distal ve proksimal merkezlerine birer tane olmak üzere 0,5 mL FSS subkutan şekilde enjekte edildi.

D Grubu: Kontrol grubudur. Yalnızca flep uygulaması yapılmış olup herhangi bir işlem uygulanmadı.

Postoperatif yedinci günde tüm hayvanlar uygun anestezi ve etik koşullar altında disekte edildi.



Şekil 3.2. Deney Grupları

3.5.1. Tıbbi sülük uygulaması

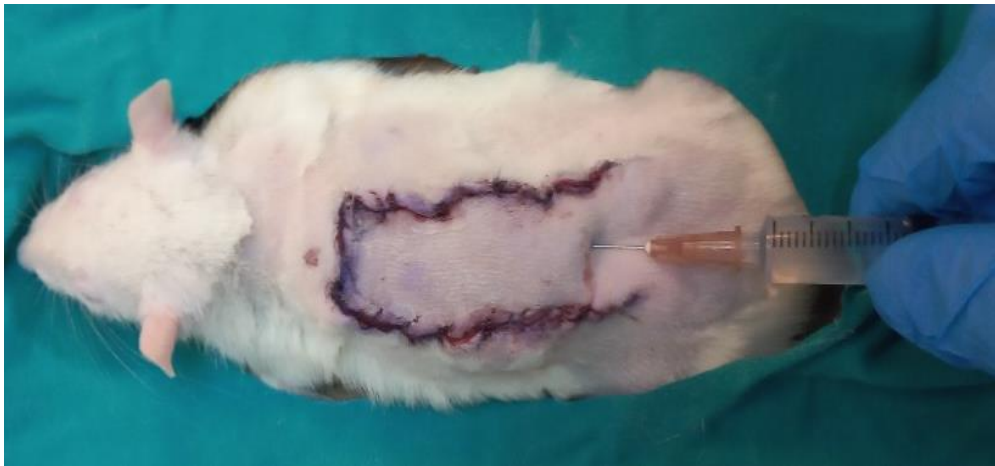
Tıbbi sülük uygulanan gruptur. Operasyon günü flep uygulaması sonrası, flebin distal ve proksimal merkezlerine birer tane olmak üzere küçük boy (ortalama 0.5 g) steril tıbbi sülük uygulandı, (Resim 3.3.). Sülükler beslenmelerini tamamladıktan sonra (ortalama 0.5 mL kan emdiler) kendiliğinden uygulandıkları bölgeden ayrıldılar. Sülüklerin ağırlıkları uygulama öncesinde ve sonrasında tartılarak kaydedildi. Uygulama sonrasında tıbbi sülükler %90 etanol içerisine koyularak imha edildiler.



Resim 3.3. Flebin distaline ve proksimaline steril tıbbi sülük uygulaması

3.5.2. SSE Enjeksiyonu

Operasyon günü flep uygulaması sonrası, flebin distal ve proksimal merkezlerine birer tane olmak üzere 0,5 mL Sülük salgı ekstaktı subkutan şekilde enjekte edildi, (Resim 3.4.).



Resim 3.4. Flebin distaline ve proksimaline tıbbi sülük salgısı enjeksiyonu

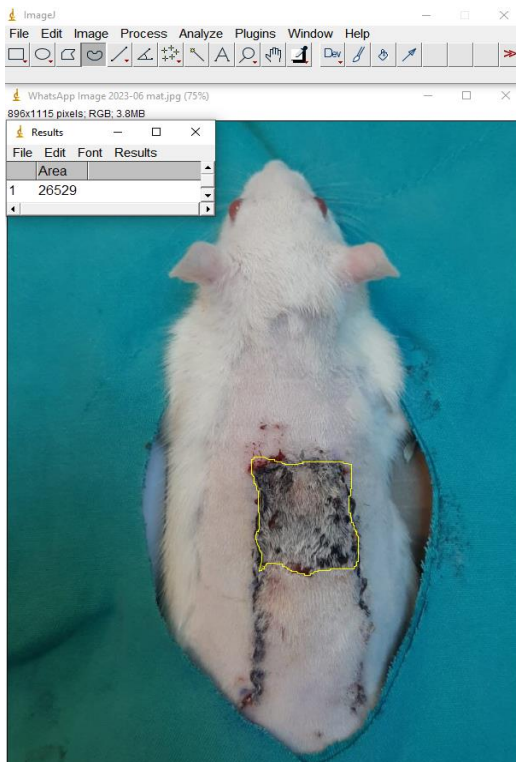
3.5.3. FSS enjeksiyonu

Fagostimülatör solüsyon; sülük salgısı elde etmek amacıyla sülükleri beslerken kullanılan, 0.001 M arginin ve 0.15 M sodyum klorürden oluşan bir besleme solüsyonudur. Operasyon günü flep uygulaması sonrası, flebin distal ve proksimal merkezlerine birer tane olmak üzere 0,5 mL FSS subkutan şekilde enjekte edildi. * Deney protokolünde SSE elde etmek için tıbbi sülükler FSS ile beslendi, bu nedenle tıbbi sülük salgısının etkilerini daha iyi anlamak amacıyla bu gruba FSS enjeksiyonu uygulandı.

3.6. Flep Nekroz Alanlarının Ölçümü Ve Görüntülerin Analizleri

Tüm gruptaki tüm sıçanların postoperatif 7. günde fotoğrafları çekildi. Ardından tüm gruplarda fotoğraf makinesiyle elde edilen bütün görseller incelendi. Tüm görüntülerdeki nekroza giden ve yaşayan flep alanları ImageJ v1.0 (Oracle Corporation, Amerika) bilgisayar programı kullanılarak analiz edildi. (Şekil 3.3.) Elde edilen nekroz alanı, toplam alana bölünerek bu oranı 100 ile çarpıldı ve ‘‘Nekroz Oranı (%)’’ şeklinde ifade edildi.

$$\text{Nekroz Alanı Oranı (\%)} = (\text{Nekroz Alanı} / \text{Toplam Alan}) * 100$$



Şekil 3.3. ImageJ bilgisayar programı kullanılarak yapılan nekroz alanı hesaplamaları

3.7. Diseksiyon

Flep cerrahisinin postoperatif 7. gününde tüm sıçanların anestezisi uygun şartlarda gerçekleştirildi. Hayvanların tamamen anestezi altına girmelerinin ardından, intrakardiyak şekilde kan alınarak ötanazi işlemi gerçekleştirildi. Kan örnekleri, kan tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj ardından kandan elde edilen serum örnekleri eppendorf tüplerine ayrıştırılarak, -80 °C’de muhafaza edildiler.

Dorsal cilt flepleri ötanazi sonrası sutureasyon hattının etrafından histopatolojik değerlendirme için proksimal ve distal olarak eksize edildi. Dokuların bir kısmı içerisinde %10’luk tamponlu formaldehit bulunan kaplar içerisinde muhafaza edildiler. Geriye kalan doku numuneleri ise biyokimyasal incelemeler için sıvı azotta dondurularak -80 °C’de muhafaza edildiler.

3.8. Histolojik İncelemeler

Alınan örnekler öncelikle %10 nötral formaldehit solüsyonunda 72 saat boyunca tespit edildiler. Tespit işleminin tamamlanmasını ardından, rutin takip işlemleri sağlandı. Tüm dokular, kasetlere konularak akarsu altında yıkanmalarının ardından, suyun uzaklaştırılması (dehidratasyon) için artan alkol serilerinden (%50, %70, %80, %90, %100) geçirildiler.

Dokular, parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirilerek erimiş parafine gömüldüler ve parafin bloklar haline getirildiler. Hazırlanan parafin bloklarından 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı.

Alınan kesitler, Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Masson’s trichrome yöntemleri ile boyanarak elde edilen örneklerdeki histomorfolojik değişimler ve OMP tutulumları, Leica DM4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde ışık mikroskobu ile incelendi. Histomorfolojik olarak incelenen alanlar, Leica – Qwin programında resimleri çekilerek değerlendirilmeleri yapıldı ve histomorfolojik değerlendirme için skorlamalar yapıldı [82].

3.9. İmmünohistokimyasal İncelemeler

4-5 mikron kalınlıkta elde edilen kesitler 2 kez, 15'er dakika ksilol içerisinde bekletildiler. Ksilolden çıkarılan örnekler sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve % 70 konsantrasyondaki etil alkol çözeltilerinde 10'ar dakika tutuldular. Daha sonra, 2 defa 5 dakika boyunca distile su içerisinde bekletilerek rehidrate edildiler.

Nemli ortamda immünohistokimya barına dizilen dokuların etrafı PAP-Pen ile çizilerek 3'er dakika boyunca 3 kez PBS (Phosphate Buffer Saline, pH: 7,4) ile yıkandı. Özgün olmayan bağlanmayı engeleyebilmek için 10 dakika serum blocking solution uygulanan örnekler VEGF (Cat: 114409 Lot: 05310) primer antikoru ile +4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonrası PBS ile yıkanan örneklerle endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 15 dakika boyunca % 3 hidrojen peroksit çözeltisi uygulandı.

Örneklere PBS ile yıkandıktan sonra biotinli sekonder antikor uygulandı. Yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkanan örneklerle diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen uygulanarak, örneklerde gözle görülebilir immün tepkime oluşana kadar bekletildiler. PBS ile yıkanan örneklerle zemin boyası olarak Mayer'in Hematoksileni kullanıldı.

Alkol serisinden geçirilerek dehidrate edilen örnekler, ksilolde bekletildikten sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

Tüm örnekler Leica DM4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sistemi yardımıyla, Leica Q Vin 3 programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildiler. Her slayt için seçilen bağımsız 10 alanda sağlanan hücre sayımlarında belirtilen antikorlara ait tutulumlar yüz hücre üzerinden değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirme için skorlamalar yapıldı [83].

3.10. Doku Homojenizasyonu

Flep bölgesinden alınan proksimal ve distal dokulardan homojenat elde etmek için doku homojenizasyon işlemi uygulanmıştır.

Uygulama basamakları:

1. Cilt dokusu ilk önce küçük parçalara ayrılmış daha sonra oluşan fazla kanın tayin sonucunu etkilememesi için PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır.
2. Fazla solüsyondan arındırılan dokudan her bir örnek için 100 mg tartılarak 900 µL PBS eklendi.
3. Deney tüpü içerisine aktarılan bu karışım, buz banyosu içerisinde bıçaklı homojenizatör (Heidolph, SilentCrusher) aracılığıyla homojenize edildi.
4. Homojenizatlar, buz üzerinde 15 dakika inkübe edilmelerinin ardından +4°C'de 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi (Nüve NF815). Santrifüj sonrasında süpernatant ivedi şekilde alikotlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

3.11. ELİSA Yöntemi ve Prensibi

Doku homojenizasyonu ile elde edilen süpernatantlardan ve serumlardan IGF-1, TGF- α ve HIF-1- α konsantrasyon tespiti için sandwich test prensibine sahip ELİSA yöntemi kullanıldı. Rat IGF-1 (Insulin Like Growth Factor-1), Cat: ELK1136; Rat TGF- α (Transforming Growth Factor Alpha, Cat: ELK2464 ve Rat HIF-1- α (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha) Cat: ELK1604, ELK Biotechnology marka ELISA kitleri kullanıldı.

Bu çalışmada kullanılan tüm ELISA kitleri aynı test prensibine ve basamaklara sahiptir. Kitlere ait mikrotitre plakası; Rat IGF-1, Rat TGF- α veya Rat HIF-1- α 'ya özgü antikor ile önceden kaplanmıştır.

3.11.1. Standartların hazırlanması

1. Standart, 1,0 mL standart seyreltici tampon ile sulandırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında tutularak ardından, köpürmeyecek şekilde hafifçe çalkalandı.

2. Stok solüsyondaki (konsantrasyonu HIF-1- α ve IGF-1 için; 10 ng/ mL ve TGF- α için; 500 pg/ mL) olan standarttan, 0,5 mL standart seyreltici tamponu içeren 7 tüp hazırlanarak çift dilüsyon serisi oluşturmak amacıyla seyreltilmiş standart kullanıldı.

3.a. 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,63 ng/mL, 0,32 ng/mL, 0,16ng/ mL ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi tüp hazırlandı, (HIF-1- α ve IGF-1).

3.b. 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL, 15,63pg/mL, 7,82pg/mL ve son olarak, 0 ng/ mL (blank; kör) olacak şekilde yedi tüp hazırlandı, (TGF- α).

4. Standart yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona dilüe edilirken, her dilüsyon için pipet ucunu değiştirildi. Son tüp, kör olarak kabul edildiği için hiçbir ekleme yapılmadı.

3.11.2. Testin yapılışı

Serum ve doku homojenatlarındaki HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1 konsantrasyonlarının tespiti için ELISA testinin basamakları aşağıda verildiği şekilde yapıldı.

1. Kit oda sıcaklığına geldikten sonra, her kuyucuğa 100 μ L olacak şekilde standart çalışma tamponu veya numune eklenerek 37°C'de 80 dakika inkübe edildi.

2. Plakadaki sıvıdan arındırılarak, her kuyucuğa 200 μ L 1 $\times$ wash buffer (Yıkama solüsyonu) eklenerek 3 kez yıkandı. Sıvının plakadan tamamen uzaklaştırılmasının ardından, her kuyucuğa 100 μ L Biotinlenmiş Antikor Çalışma Solüsyonu (1 $\times$) eklendi ve 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.

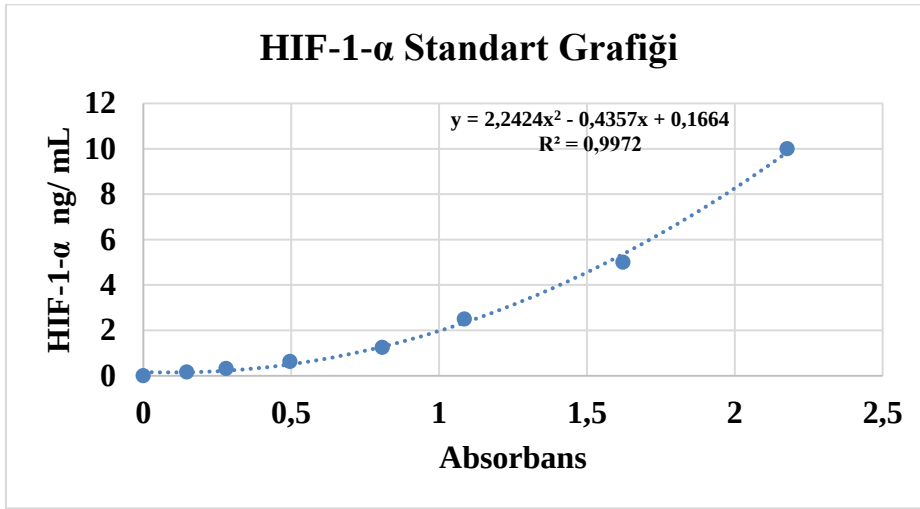
3. Plakanın ters çevrilerek bir zemine vurulması suretiyle solüsyon uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 200 μ L 1 $\times$ wash buffer eklendi ve plaka 3 kez yıkandı. Kuruduktan sonra her bir kuyucuğa 100 μ L 1 $\times$ Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklenerek 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.

4. Plakadaki sıvı uzaklaştırılarak, her kuyucuğa 200 μ L 1 $\times$ wash buffer eklendi ve plakayı beş kez yıkandı. Döndürerek kurutmanın ardından, her kuyucuğa 90 μ L TMB Substrat Solüsyonu eklendi ve karanlıkta 20 dakika 37°C'de inkübe edildi.

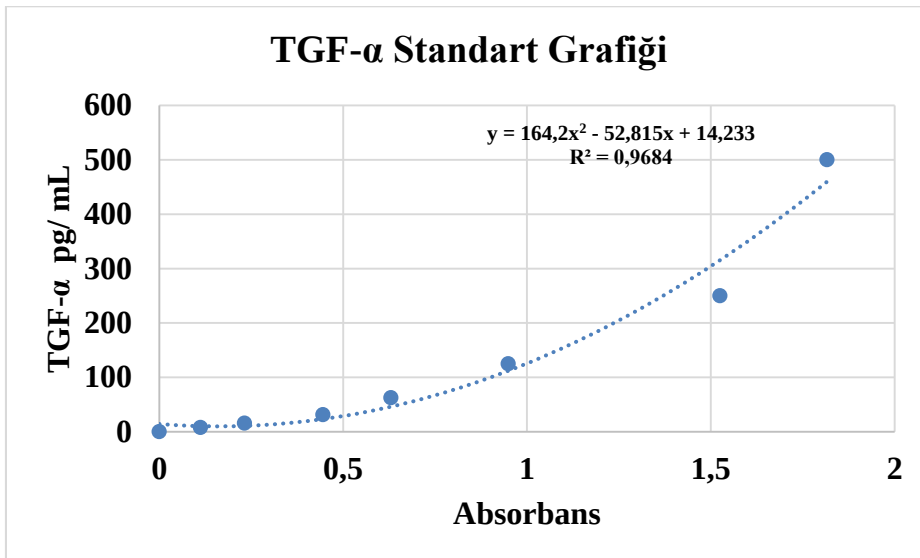
5. Her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi.

6. Ardından plaka, bir plaka çalkalayıcı üzerinde 1 dakika boyunca çalkalandı. Mikroplaka ivedilikle 450 nm'ye ayarlanmış olan Elisa Mikroplaka Okuyucuda okutularak, OD (optik yoğunluk – optical density), sonuçlarının kaydedilmesi suretiyle alındı.

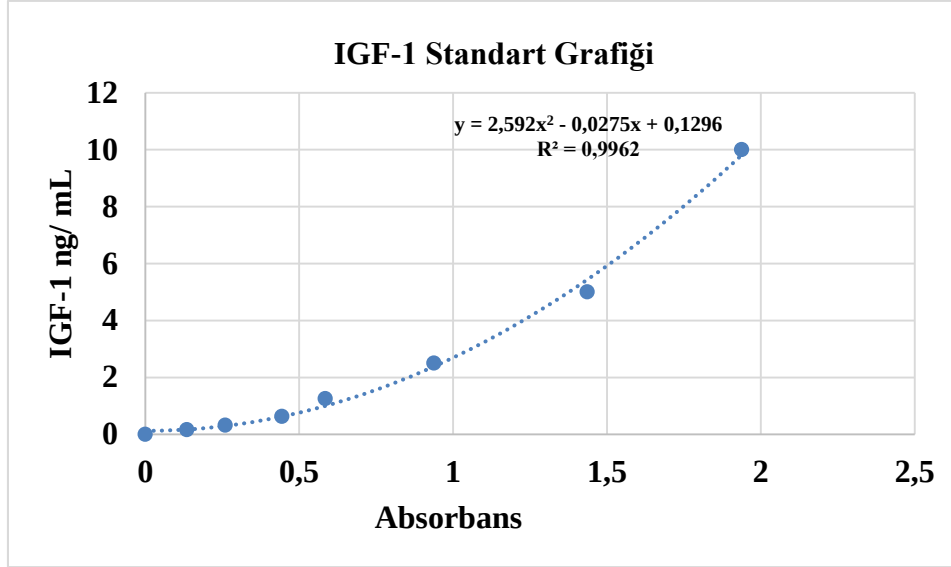
Standart konsantrasyonlar Y, standartlara ait absorbanslar X eksenine yerleştirilerek standart eğrisi çizildi. Örnek konsantrasyonları standart eğriden hesaplandı. HIF-1-α konsantrasyonu (Şekil 3.4.) ng/ mL, TGF-α konsantrasyonu (Şekil 3.5.) pg/ mL ve IGF-1 konsantrasyonu (Şekil 3.6.) ng/ mL olarak verildi.



Şekil 3.4. HIF-1-α Standart Grafiği



Şekil 3.5. TGF-α Standart Grafiği



Şekil 3.6. IGF-1 Standart Grafiği

3.12. İstatistiksel Yöntem

Çalışmadan elde edilen veriler, IBM SPSS 21 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL) programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Veriler ortalama (mean) ve SEM (standard error of mean - ortalamanın standart hatası) olarak ifade edildi. Bağımsız grup incelemelerinde; parametrik test varsayımları sağlandığından Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc: Tukey testi) kullanılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılığın kaynağını bulmak için gruplar kendi aralarında da tek tek karşılaştırıldı. Tüm analizler %95 güven aralığında ve 0.05 anlamlılık düzeyinde kabul edilmiş olup, bu değerin altında kalan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. MedCalc – version 20.305 Programı aracılığıyla istatistiksel verilerden figürler çizildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamızda sülük, SSE, FSS ve kontrol gruplarına ait hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde, flep bölgesinden alınan proksimal ve distal dokulardan elde edilen homojenatlarda HIF-1- α , TGF- α ve IGF-1 parametreleri değerlendirildi.

4.1.1. HIF-1- α

Serum örneklerinde, deney grupları arasında HIF-1- α (ng/mL) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,523$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; sülük (A) grubu ($0,18 \pm 0,01$), SSE (B) grubu ($0,16 \pm 0,002$), FSS (C) grubu ($0,20 \pm 0,02$) ve kontrol (D) grubu ($0,22 \pm 0,06$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.1.).

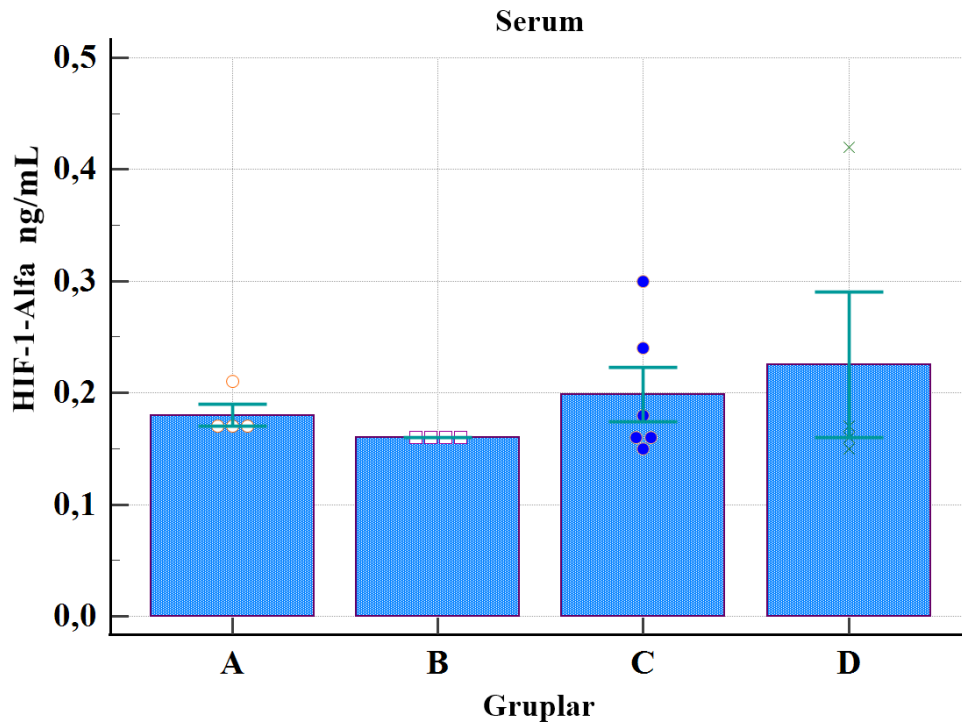
Proksimal flep dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında HIF-1- α açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,152$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Sülük (A) grubu ($2,87 \pm 0,90$), SSE (B) grubu ($1,90 \pm 0,70$), FSS (C) grubu ($4,30 \pm 1,35$) ve kontrol (D) grubu ($0,77 \pm 0,48$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.2.).

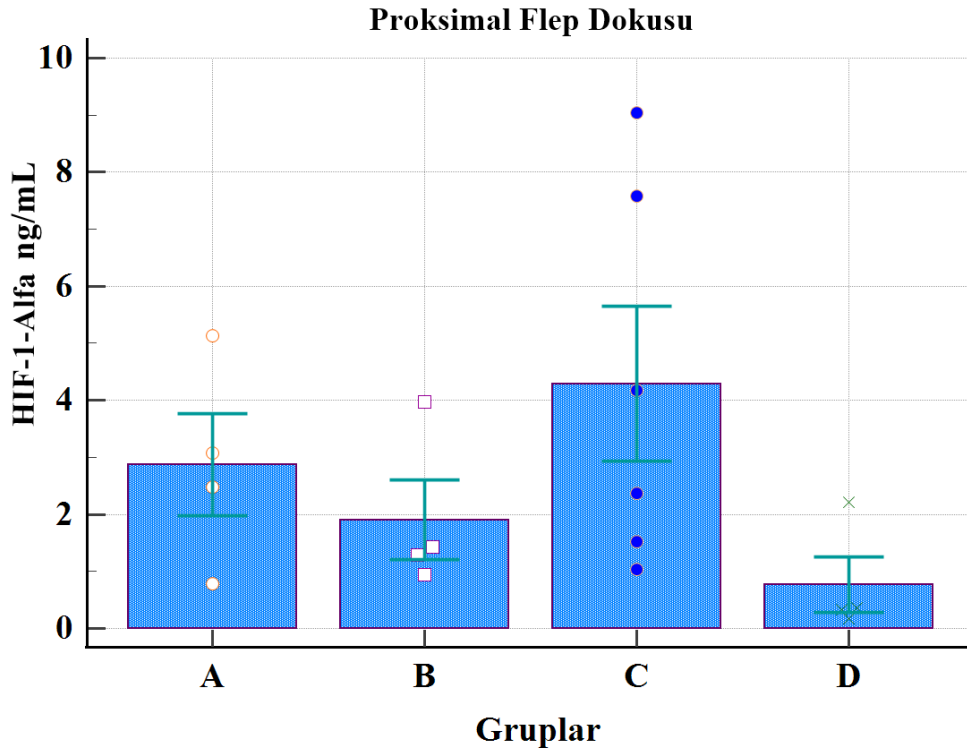
Distal flep dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında HIF-1- α açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,598$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; Sülük (A) grubu ($2,04 \pm 0,66$), SSE (B) grubu ($0,58 \pm 0,16$), FSS (C) grubu ($1,50 \pm 0,95$) ve kontrol (D) grubu ($1,51 \pm 1,13$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.3.).

Serum ve doku örneklerindeki HIF-1- α konsantrasyonları Çizelge 4.1.' de sunulmuştur.

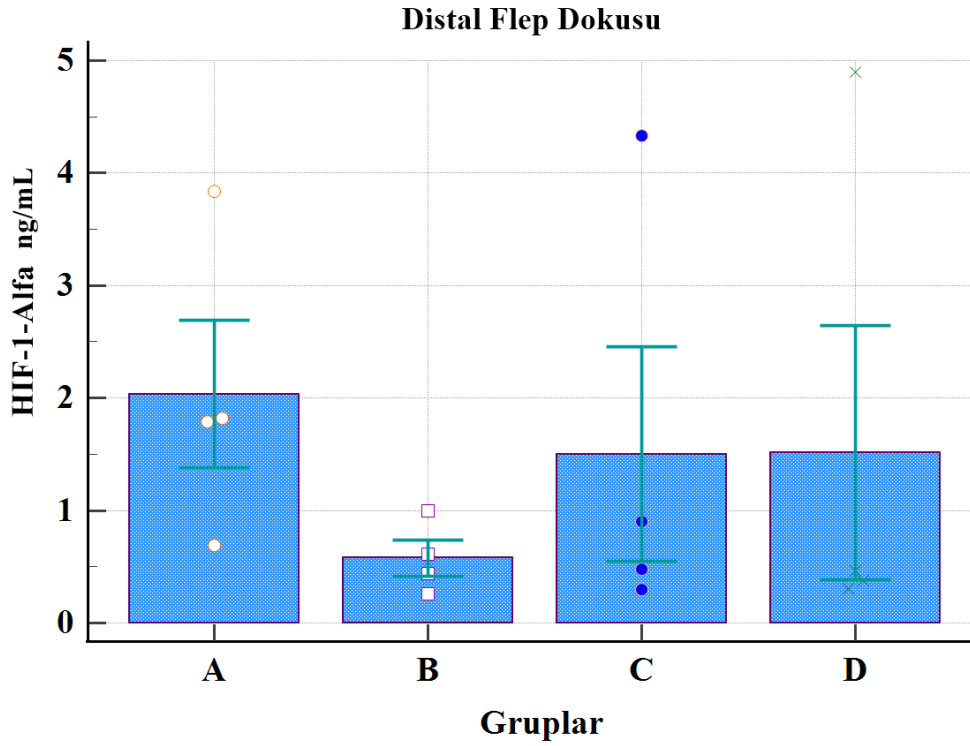
Çizelge 4.1. Serum ve doku örneklerindeki HIF-1- α konstantrasyonları

HIF-1- α (ng/mL)	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
Serum	(A) Sülük Grubu	0,18 $\pm$ 0,01	0,523
	(B) SSE Grubu	0,16 $\pm$ 0,002	
	(C) FSS Grubu	0,20 $\pm$ 0,02	
	(D) Kontrol Grubu	0,22 $\pm$ 0,06	
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	2,87 $\pm$ 0,90	0,152
	(B) SSE Grubu	1,90 $\pm$ 0,70	
	(C) FSS Grubu	4,30 $\pm$ 1,35	
	(D) Kontrol Grubu	0,77 $\pm$ 0,48	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	2,04 $\pm$ 0,66	0,598
	(B) SSE Grubu	0,58 $\pm$ 0,16	
	(C) FSS Grubu	1,50 $\pm$ 0,95	
	(D) Kontrol Grubu	1,51 $\pm$ 1,13	

Şekil 4.1. Serum örneklerindeki HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması



Şekil 4.2. Proksimal doku homojenatlarında HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması



Şekil 4.3. Proksimal doku homojenatlarında HIF-1- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

4.1.2. TGF- α

Serum örneklerinde, deney grupları arasında TGF- α (pg/ mL) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,53$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; sülük (A) grubu ($10,61 \pm 0,18$), SSE (B) grubu ($10,07 \pm 0,04$), FSS (C) grubu ($10,08 \pm 0,02$) ve kontrol (D) grubu ($10,07 \pm 0,04$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.4.).

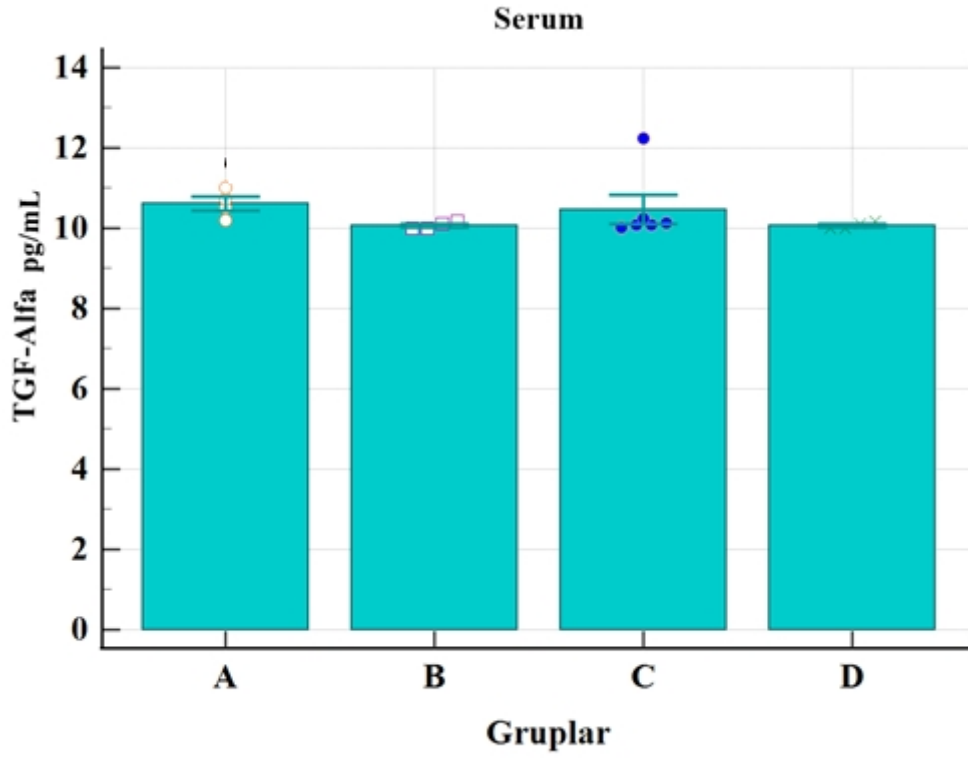
Proksimal flep dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında TGF- α açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,279$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; sülük (A) grubu ($77,37 \pm 15,73$), SSE (B) grubu ($85,04 \pm 41,62$), FSS (C) grubu ($214,52 \pm 94,52$) ve kontrol (D) grubu ($30,40 \pm 6,80$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.5.).

Distal flep dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında TGF- α açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,104$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; sülük (A) grubu ($110,82 \pm 24,73$), SSE (B) grubu ($18,63 \pm 2,69$), FSS (C) grubu ($45,90 \pm 22,12$) ve kontrol (D) grubu ($56,55 \pm 39,10$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.6.).

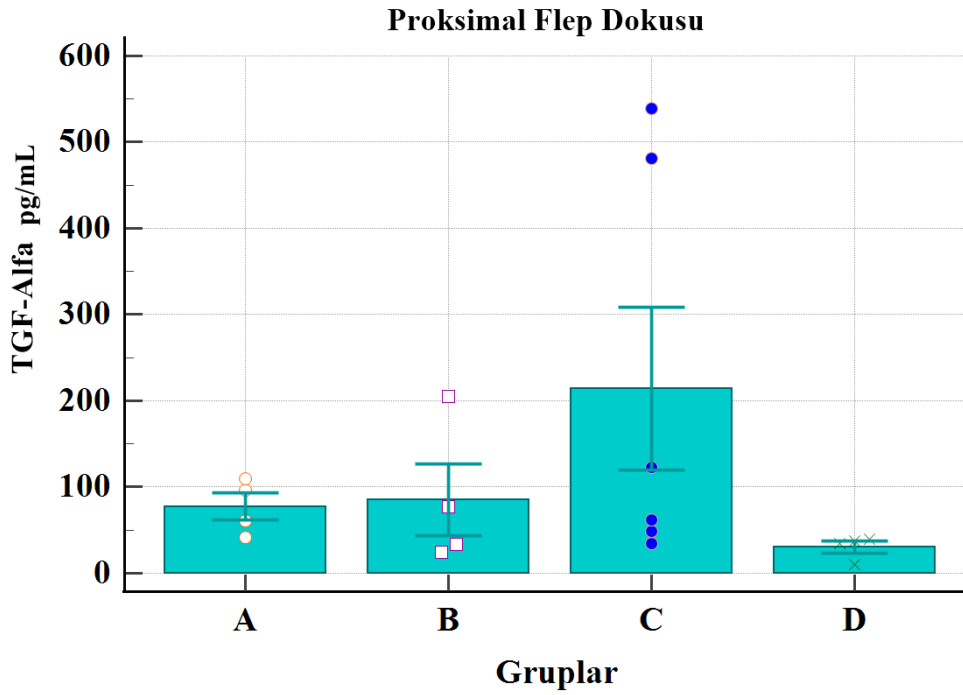
Serum ve doku örneklerindeki TGF- α konantrasyonları Çizelge 4.2.' de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Serum ve doku örneklerindeki TGF- α konantrasyonları

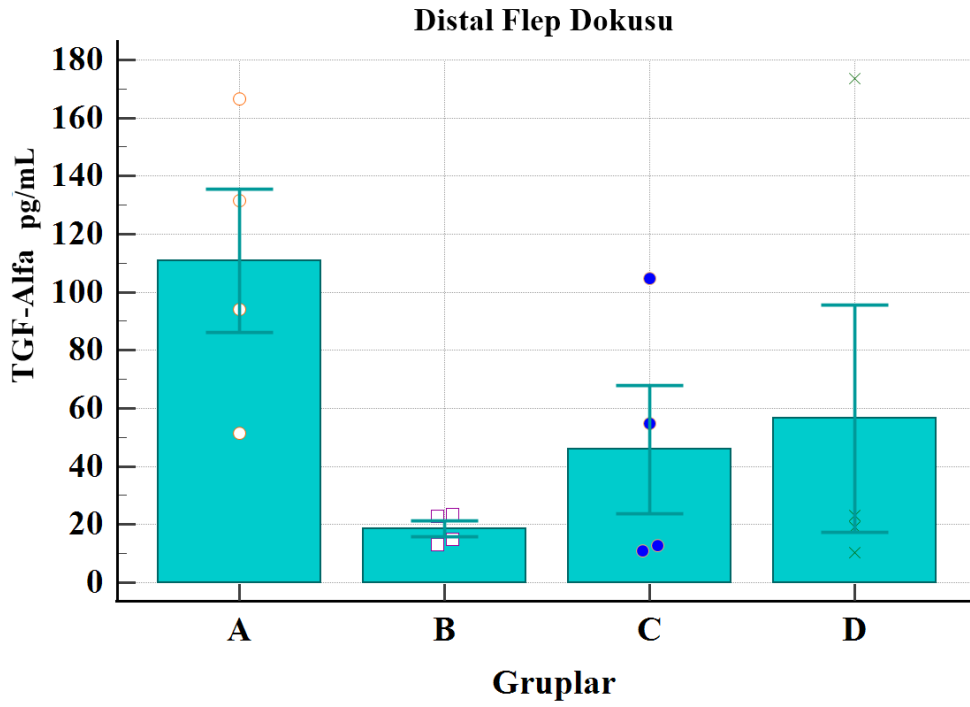
TGF- α (pg/ mL)	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
Serum	(A) Sülük Grubu	$10,61 \pm 0,18$	0,53
	(B) SSE Grubu	$10,07 \pm 0,04$	
	(C) FSS Grubu	$10,08 \pm 0,02$	
	(D) Kontrol Grubu	$10,07 \pm 0,04$	
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	$77,37 \pm 15,73$	0,279
	(B) SSE Grubu	$85,04 \pm 41,62$	
	(C) FSS Grubu	$214,52 \pm 94,52$	
	(D) Kontrol Grubu	$30,40 \pm 6,80$	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	$110,82 \pm 24,73$	0,104
	(B) SSE Grubu	$18,63 \pm 2,69$	
	(C) FSS Grubu	$45,90 \pm 22,12$	
	(D) Kontrol Grubu	$56,55 \pm 39,10$	



Şekil 4.4. Serum örneklerindeki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması



Şekil 4.5. Proksimal doku örneklerindeki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması



Şekil 4.6. Distal doku örneklerindeki TGF- α konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

4.1.3. IGF-1

Serum örneklerinde, deney grupları arasında IGF-1 (ng/ mL) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,150$). Deney gruplarındaki ortalama $\pm$ SEM değerleri; sülük (A) grubu ($0,28 \pm 0,02$), SSE (B) grubu ($0,43 \pm 0,15$), FSS (C) grubu ($0,23 \pm 0,01$) ve kontrol (D) grubu ($0,32 \pm 0,05$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.7.).

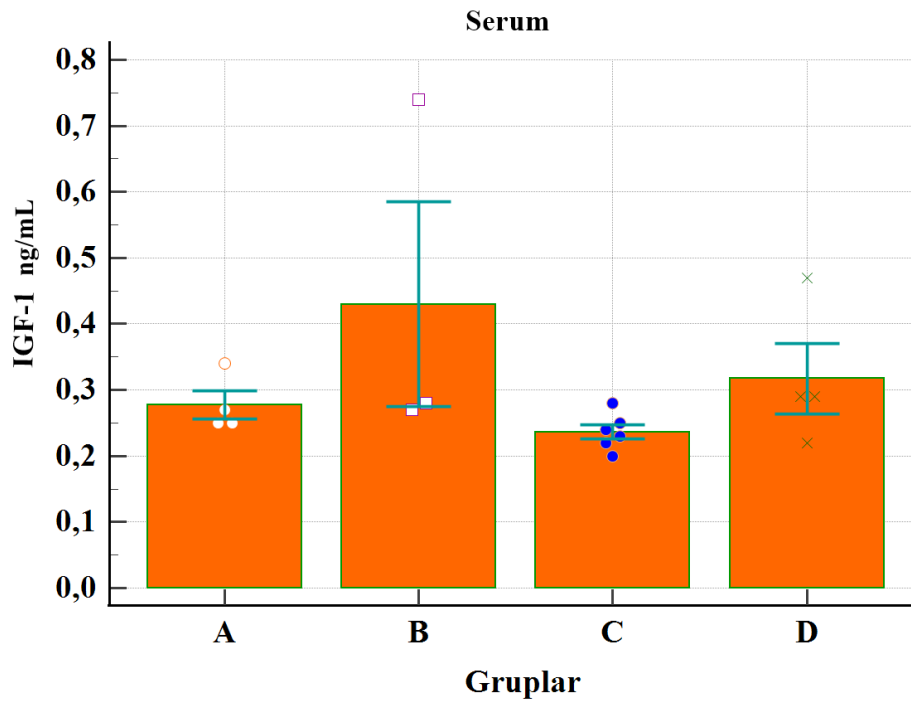
Proksimal flep dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında IGF-1 açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,195$). Deney gruplarındaki ortalama ve SEM değerleri; sülük (A) grubu ($2,32 \pm 0,63$), SSE (B) grubu ($4,29 \pm 1,57$), FSS (C) grubu ($2,18 \pm 0,85$) ve kontrol (D) grubu ($0,70 \pm 0,21$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.8.).

Distal flep dokusundan elde edilen homojenatlarda, deney grupları arasında IGF-1 açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p = 0,727$). Deney gruplarındaki ortalama ve SEM değerleri; sülük (A) grubu ($1,86 \pm 0,42$), SSE (B) grubu ($1,82 \pm 1,39$), FSS (C) grubu ($1,02 \pm 0,35$) ve kontrol (D) grubu ($0,74 \pm 0,23$) olarak tespit edildi, (Şekil 4.9.).

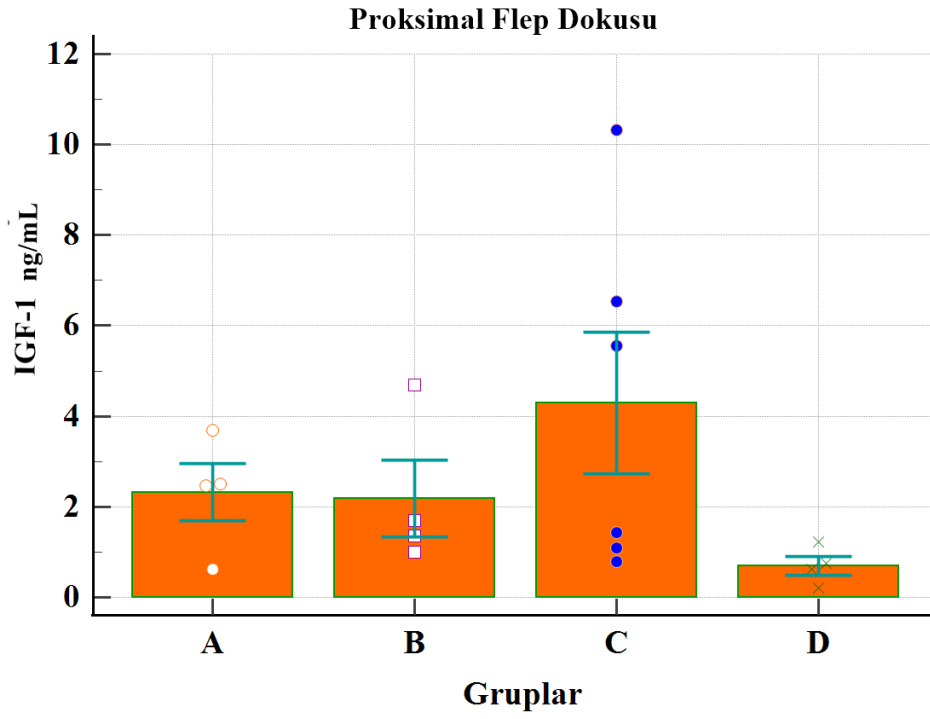
Serum ve doku örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonları Çizelge 4.3.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Serum ve doku örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonları

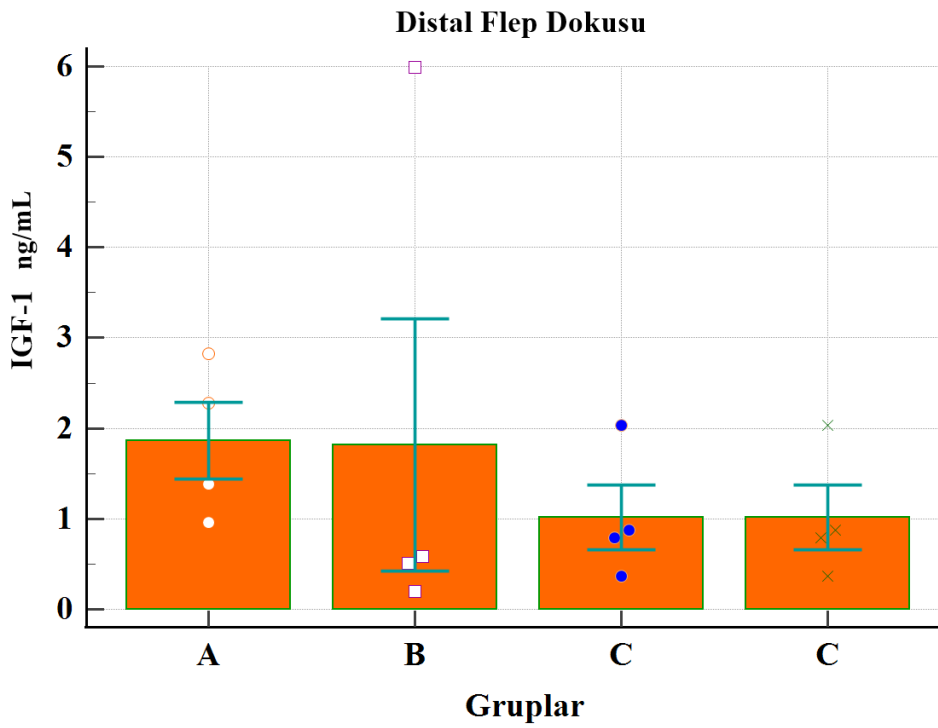
IGF-1 (ng/ mL)	Gruplar	Ortalama± SEM	p değeri
Serum	(A) Sülük Grubu	0,28 ± 0,02	0,150
	(B) SSE Grubu	0,43 ± 0,15	
	(C) FSS Grubu	0,23 ± 0,01	
	(D) Kontrol Grubu	0,32 ± 0,05	
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	2,32 ± 0,63	0,195
	(B) SSE Grubu	4,29 ± 1,57	
	(C) FSS Grubu	2,18 ± 0,85	
	(D) Kontrol Grubu	0,70 ± 0,21	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	1,86 ± 0,42	0,727
	(B) SSE Grubu	1,82 ± 1,39	
	(C) FSS Grubu	1,02 ± 0,35	
	(D) Kontrol Grubu	0,74 ± 0,23	



Şekil 4.7. Serum örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması



Şekil 4.8. Proksimal doku örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması



Şekil 4.9. Distal Doku örneklerindeki IGF-1 konsantrasyonlarının deney grupları arasında karşılaştırılması

4.2. Flep Nekroz Alanlarının Bulguları

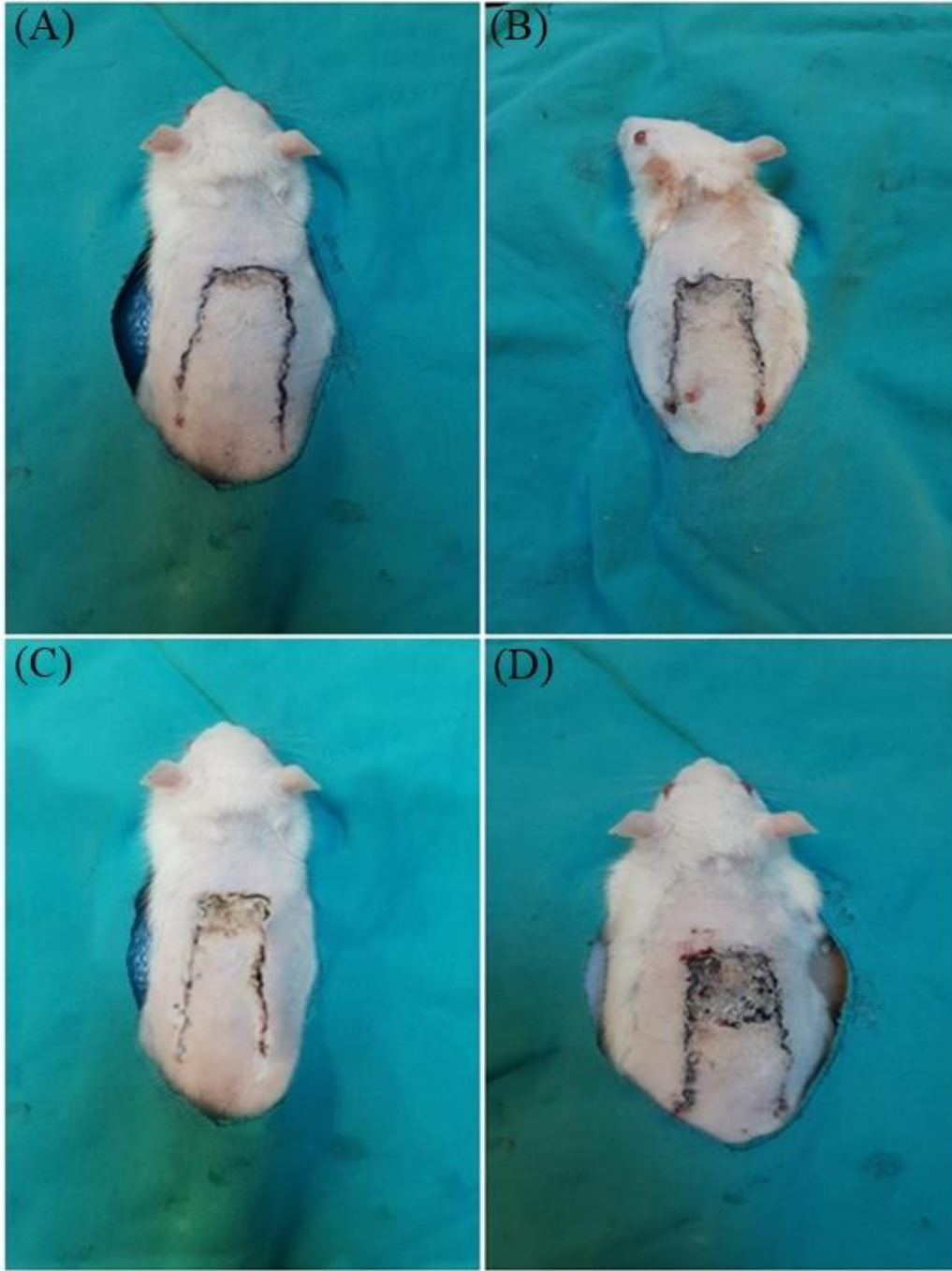
Gruplar arasında nekroz alan yüzde değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü, ($p < 0,028$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı.

Kontrol (D) grubundaki nekroz alan (%) oranı ($45,43 \pm 9,17$); sülük (A); ($12,04 \pm 0,90$) ve SSE (B); ($16,25 \pm 0,92$) gruplarından anlamlı derecede yüksek bulundu, (sırasıyla * $p = 0,026, 0,046$). Nekroz alan oranının (%) en yüksek kontrol (D) grubunda olduğu belirlendi, (Resim 4.1.).

Gruplara ait nekrotik alanların ortalama $\pm$ SEM değerleri Çizelge 4.4.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Gruplara göre nekrotik alanların karşılaştırılması

Nekroz Alanı Oranı (%)	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
	(A) Sülük Grubu	$12,04 \pm 0,90$	0,028
	(B) SSE Grubu	$16,25 \pm 0,92$	
	(C) FSS Grubu	$24,65 \pm 3,34$	
	(D) Kontrol Grubu	$45,43 \pm 9,17$	



Resim 4.1. Postoperatif 7. gün flep nekroz alanları (A) Sülük grubu, (B) SSE grubu, (C) FSS grubu, (D) Kontrol grubu

4.3. Histopatolojik Bulgular

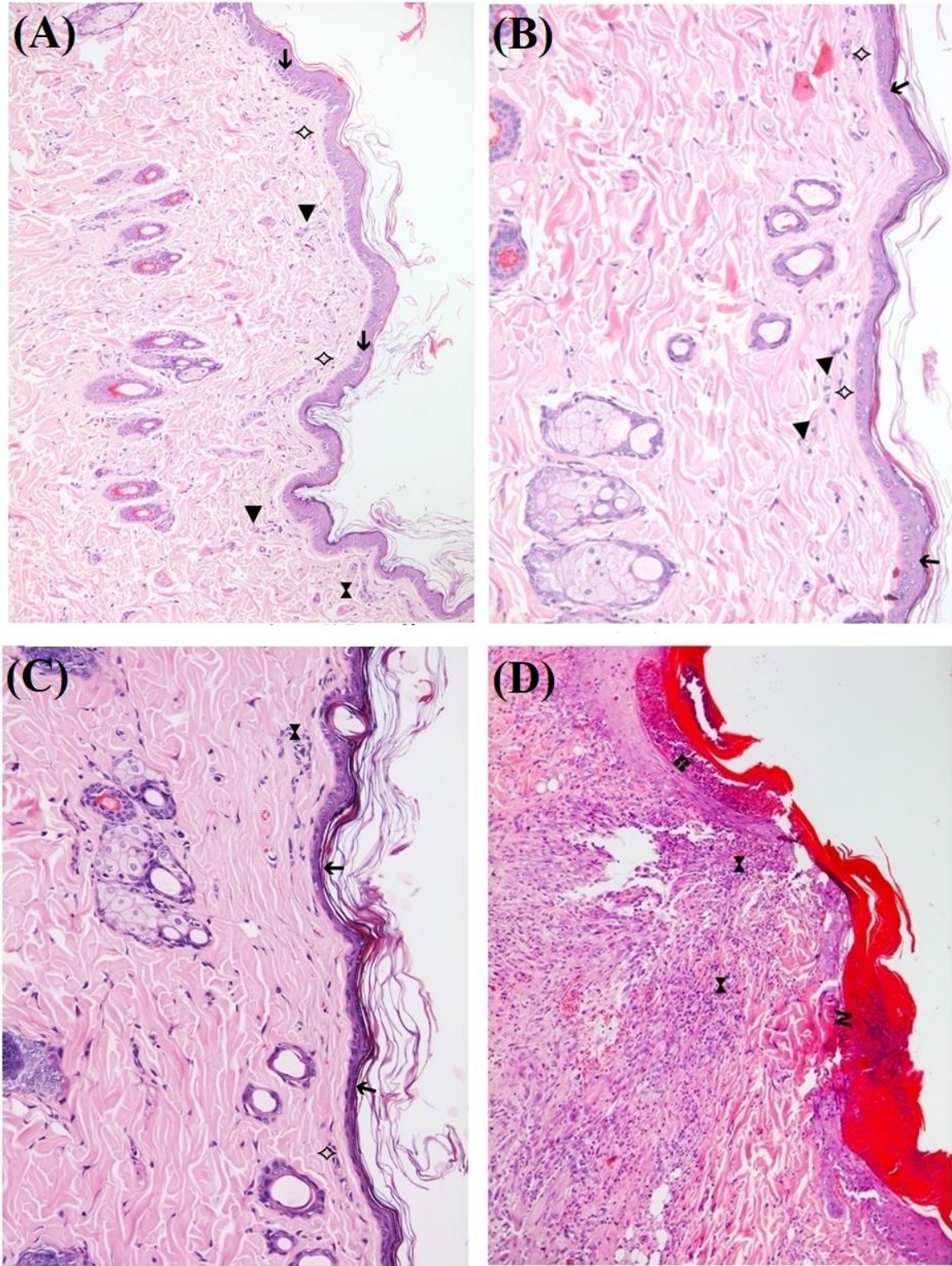
Fleplerin proksimal ve distal parçaları; epitel rejenerasyon, granülasyon dokusu kalınlığı, fibroblast proliferasyonu, neovaskülarizasyon ve inflamatuvar hücre varlığı parametreleri açısından değerlendirildi. Epitel rejenerasyonu, granülasyon doku kalınlığı, yeni damar neovaskülarizasyon bulguları SSE (B) grubunda en üst seviyede izlendi. Bu grubu sırasıyla sülük (A) ve FSS (C) grupları izledi.

Epitel rejenerasyonu, granülasyon doku kalınlığı, fibroblast proliferasyonu, yeni damar oluşumu (neovaskülarizasyon) bulgularının yüksek olarak izlendiği örneklerde; kollajen yoğunluğunda azalma diğerlerine nispeten daha düşük seviyede tespit edildi.

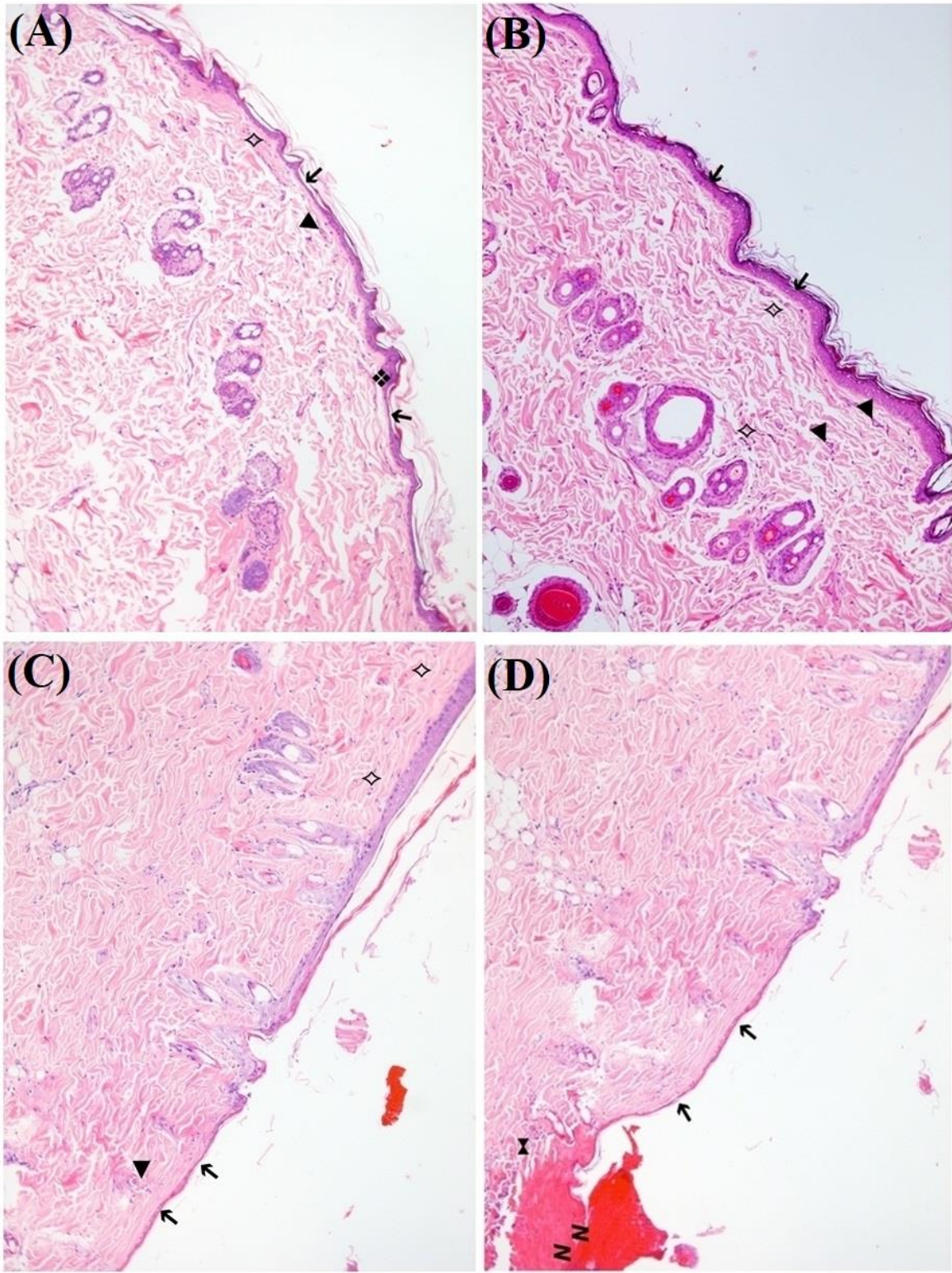
İnflamatuvar hücre ve nekroz varlığı kontrol (D) grubunda en yüksek oranda tespit edilirken, en sınırlı ölçüde SSE (B) grubunda izlendi. Tüm gruplar için yaranın proksimalinde, distal dokuya kıyasla, yeni damar oluşumu daha ileri düzeyde izlenirken nekroz daha sınırlı ölçüde tespit edildi. Bu bulgu yara distalinde neovaskülarizasyonun kısıtlı olmasına bağlı olarak nekroz riskinin daha yüksek olabileceğini akla getirdi.

Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi uygulanan fleplerin proksimal ve distal parçalarının ışık mikroskobu altındaki görünimleri Resim 4.2. ve Resim 4.3.' de sunulmuştur.

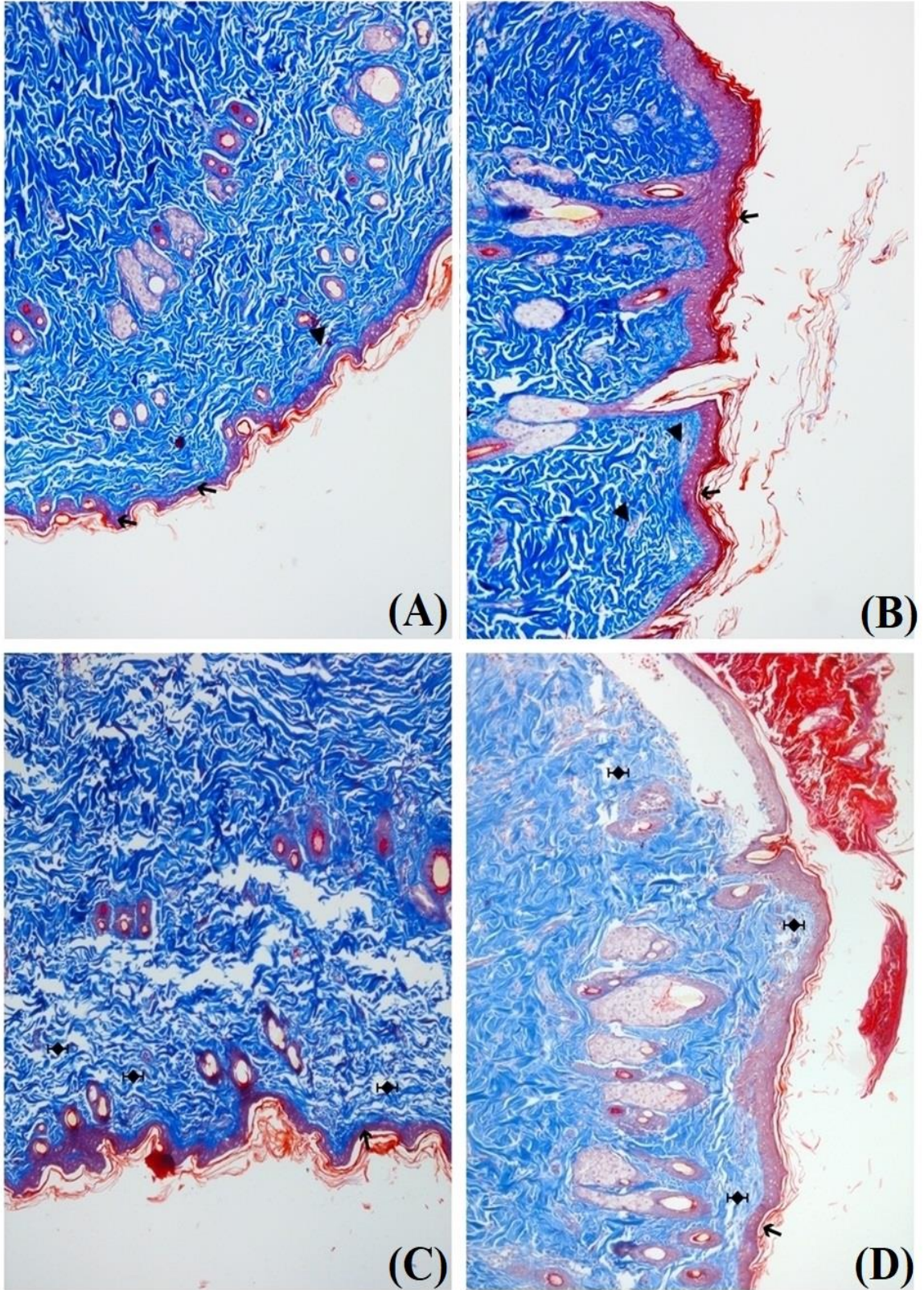
Masson's Trichrome boyama yöntemi uygulanan fleplerin proksimal ve distal parçalarının ışık mikroskobu altındaki görünimleri Resim 4.4. ve Resim 4.5.' de sunulmuştur.



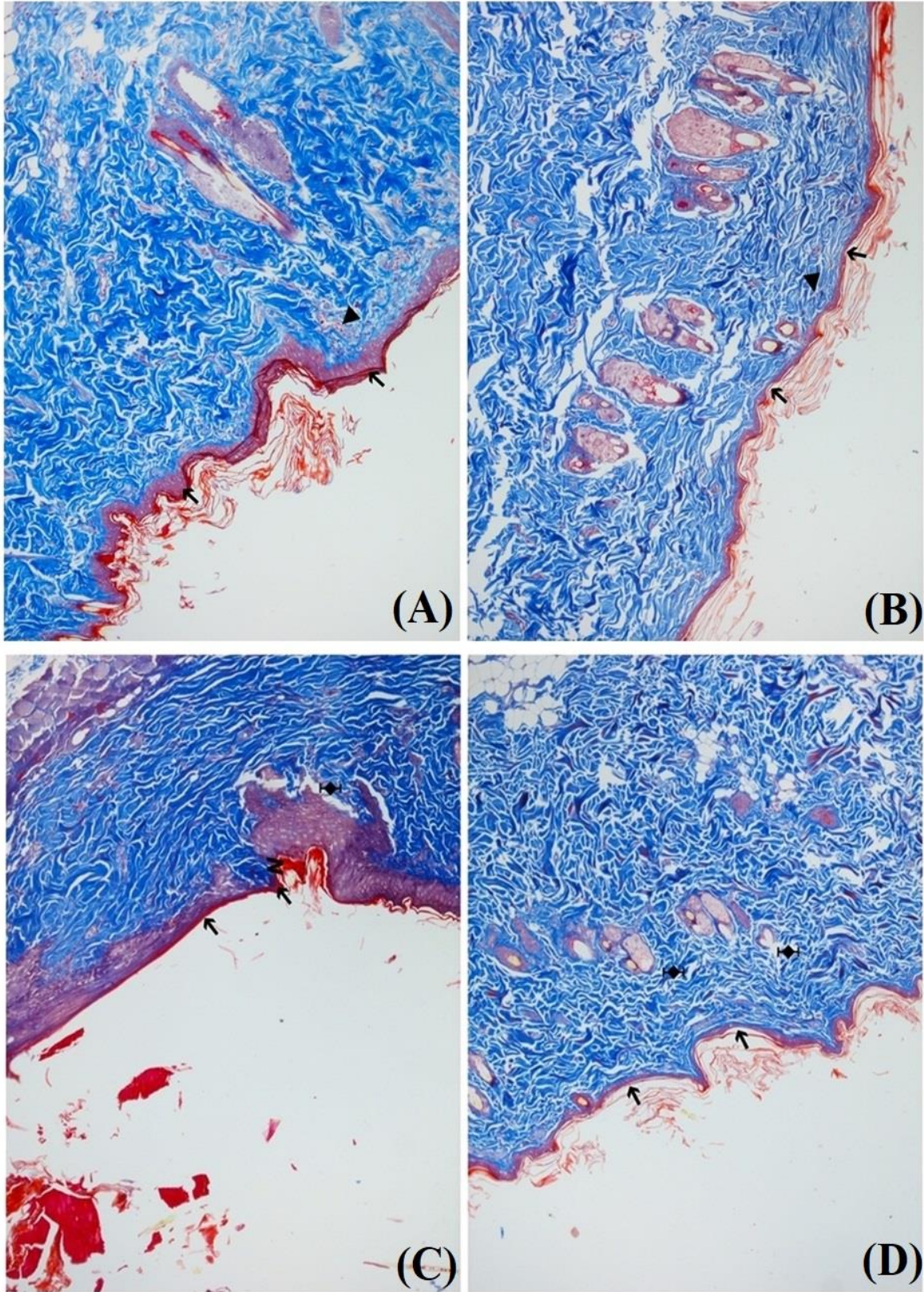
Resim 4.2. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi uygulanan fleplerin proksimal parçalarının görünümü. (A) Sülük grubu, (B) SSE grubu, (C) FSS grubu, (D) Kontrol grubu - Epitel rejenerasyon: →, Neovaskularizasyon: ►, Kollajen yoğunluğunda azalma: ◄, Granülasyon dokusu: ◆, Fibroblast proliferasyonu: ◇, İnflamatuvar hücre: ■, Nekroz: N



Resim 4.3. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi uygulanan fleplerin distal parçalarının görünümü. (A) Sülük grubu, (B); SSE grubu (C) FSS grubu (D) Kontrol grubu Epitel rejenerasyon: →, Neovaskularizasyon: ►, Kollajen yoğunluğunda azalma: ◈, Granülasyon dokusu: ◆, Fibroblast proliferasyonu: ◇, İnflamatuvar hücre: ►, Nekroz: N



Resim 4.4. Masson's Trichrome boyama yöntemi uygulanan fleplerin proksimal parçalarının görünümü. (A) Sülük grubu, (B) SSE grubu, (C) FSS grubu, (D) Kontrol grubu - Epitel rejenerasyon: →, Neovaskularizasyon: ▶, Kollajen yoğunluğunda azalma: ↔



Resim 4.5. Masson's Trichrome boyama yöntemi uygulanan fleplerin distal parçalarının görünümü. (A) Sülük grubu, (B) SSE grubu, (C) FSS grubu, (D) Kontrol grubu - Epitel rejenerasyon: →, Neovaskülarizasyon: ►, Kollajen yoğunluğunda azalma: ◆, Nekroz: N

4.3.1. Epitel rejenerasyon

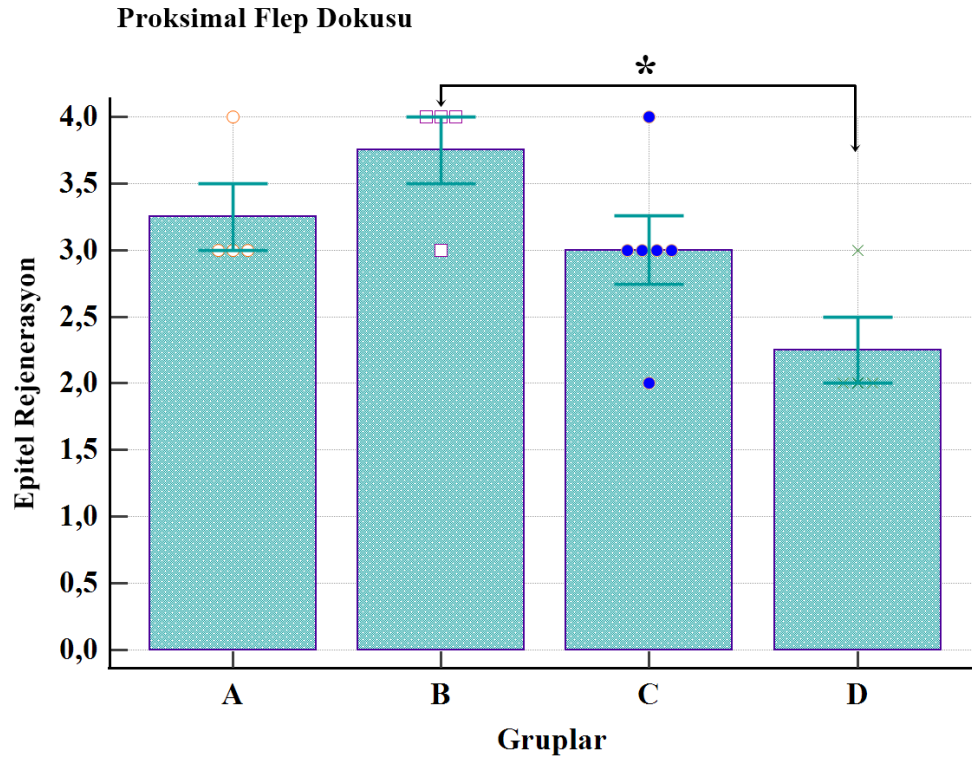
Proksimal flep dokusunda, deney grupları arasında epitel rejenerasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü, ($p = 0,013$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. SSE (B) grubundaki epitel rejenerasyon skorunun ($3,75 \pm 0,25$), kontrol (D) grubundan ($2,25 \pm 0,25$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($*p = 0,008$). Diğer gruplar arasında epitel rejenerasyon skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü, (Şekil 4.10.).

Distal flep dokusunda, deney grupları arasında epitel rejenerasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olduğu görüldü, ($p = 0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. Sülük (A); (3,00), SSE (B); ($3,50 \pm 0,29$), ve FSS (C); ($2,67 \pm 0,21$) gruplarındaki epitel rejenerasyon skorlarının, kontrol (D) grubundan ($1,75 \pm 0,25$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($**$ sırasıyla $p = 0,010$; $0,001$; $0,040$), (Şekil 4.11.).

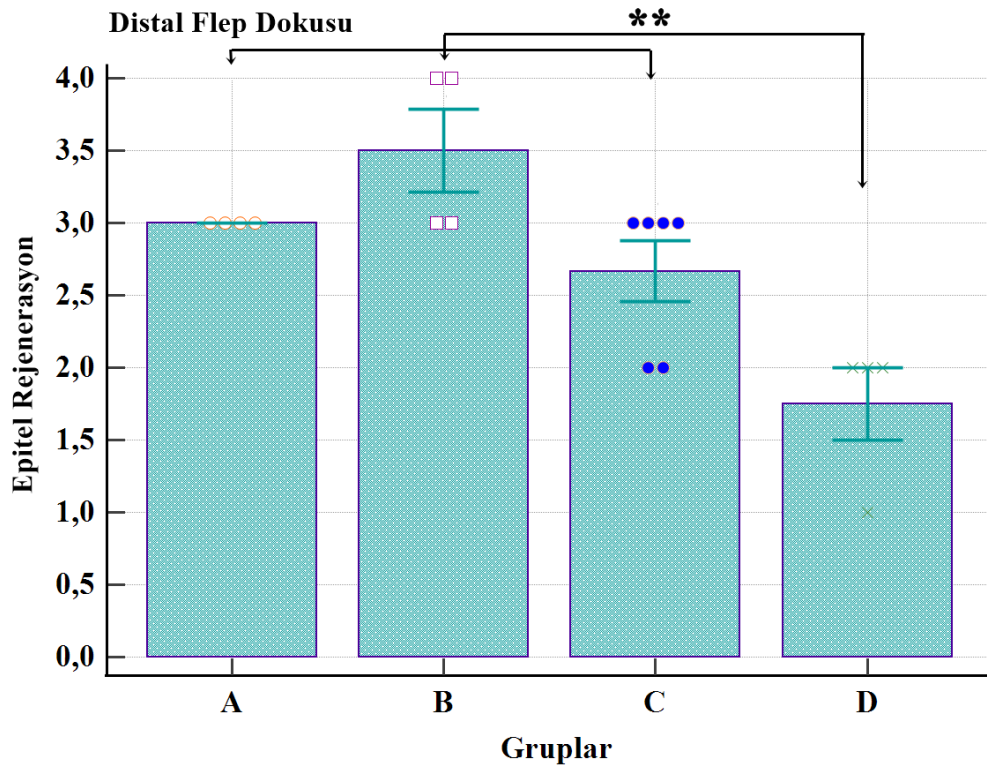
Deney gruplarına ait epitel rejenerasyon skorlarının Ortalama $\pm$ SEM değerleri Çizelge 4.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Epitel rejenerasyon skor sonuçları

Epitel Rejenerasyon	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	$3,25 \pm 0,25$	0,013
	(B) SSE Grubu	$3,75 \pm 0,25$	
	(C) FSS Grubu	$3,00 \pm 0,26$	
	(D) Kontrol Grubu	$2,25 \pm 0,25$	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	3,00	0,001
	(B) SSE Grubu	$3,50 \pm 0,29$	
	(C) FSS Grubu	$2,67 \pm 0,21$	
	(D) Kontrol Grubu	$1,75 \pm 0,25$	



Şekil 4.10. Proksimal flep dokusunda epitel rejenerasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 4.11. Distal flep dokusunda epitel rejenerasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.3.2. Granülasyon doku kalınlığı

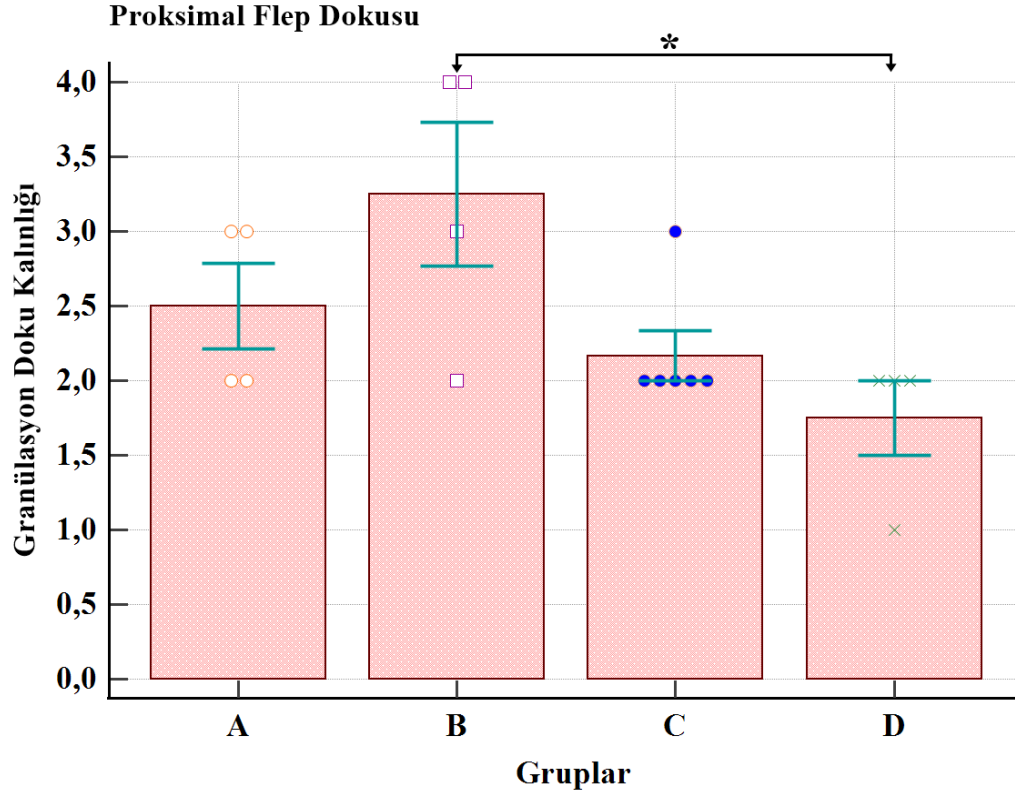
Proksimal flep dokusunda, deney grupları arasında granülasyon dokusu kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,023$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. SSE (B) grubundaki granülasyon dokusu kalınlığı skorunun ($3,25 \pm 0,48$), kontrol (D) grubundan ($1,75 \pm 0,25$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($*p = 0,019$). Diğer gruplar arasında granülasyon dokusu kalınlığı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü, (Şekil 4.12.).

Distal flep dokusunda, deney grupları arasında granülasyon dokusu kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,007$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. SSE (B) grubundaki granülasyon dokusu kalınlığı skorunun ($2,75 \pm 0,25$), kontrol (D) grubundan ($1,50 \pm 0,29$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($**p = 0,005$). Diğer gruplar arasında granülasyon dokusu kalınlığı skoru açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı görüldü, (Şekil 4.13.)

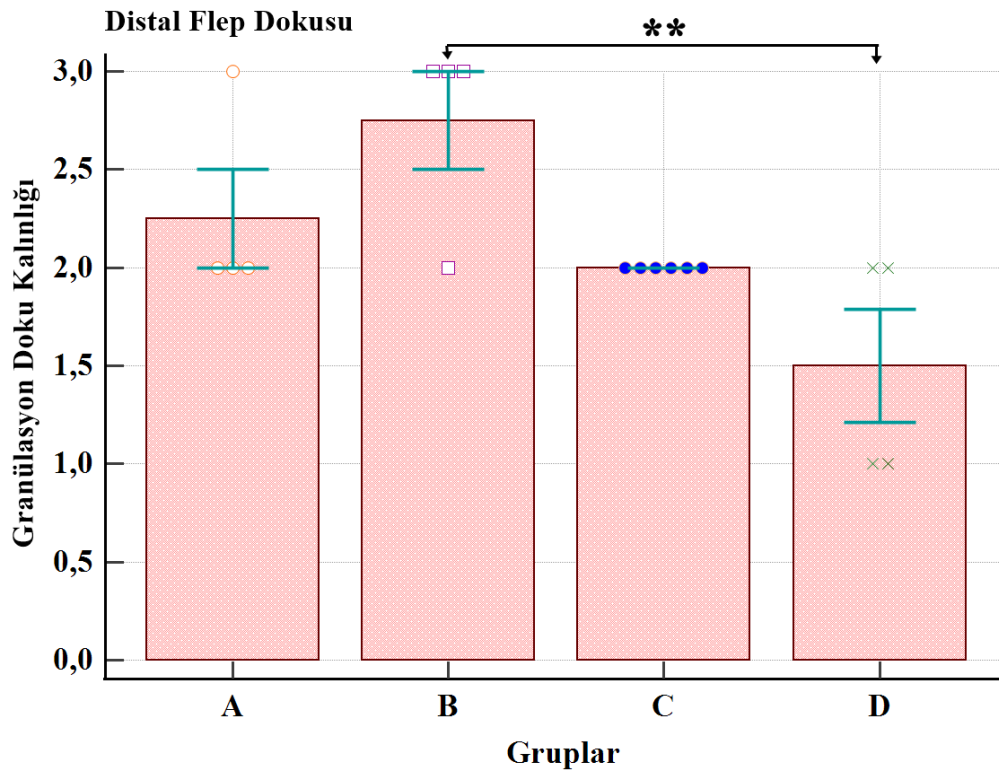
Deney gruplarına ait granülasyon doku kalınlığı skorlarının Ortalama $\pm$ SEM değerleri Çizelge 4.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Granülasyon doku kalınlığı skor sonuçları

Granülasyon Dokusu Kalınlığı	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	$2,50 \pm 0,29$	0,023
	(B) SSE Grubu	$3,25 \pm 0,48$	
	(C) FSS Grubu	$2,17 \pm 0,17$	
	(D) Kontrol Grubu	$1,75 \pm 0,25$	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	$2,25 \pm 0,25$	0,007
	(B) SSE Grubu	$2,75 \pm 0,25$	
	(C) FSS Grubu	2,00	
	(D) Kontrol Grubu	$1,50 \pm 0,29$	



Şekil 4.12. Proksimal flep dokusunda granülasyon doku kalınlığı skorunun gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 4.13. Distal flep dokusunda granülasyon doku kalınlığı skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.3.3. Fibroblast proliferasyonu

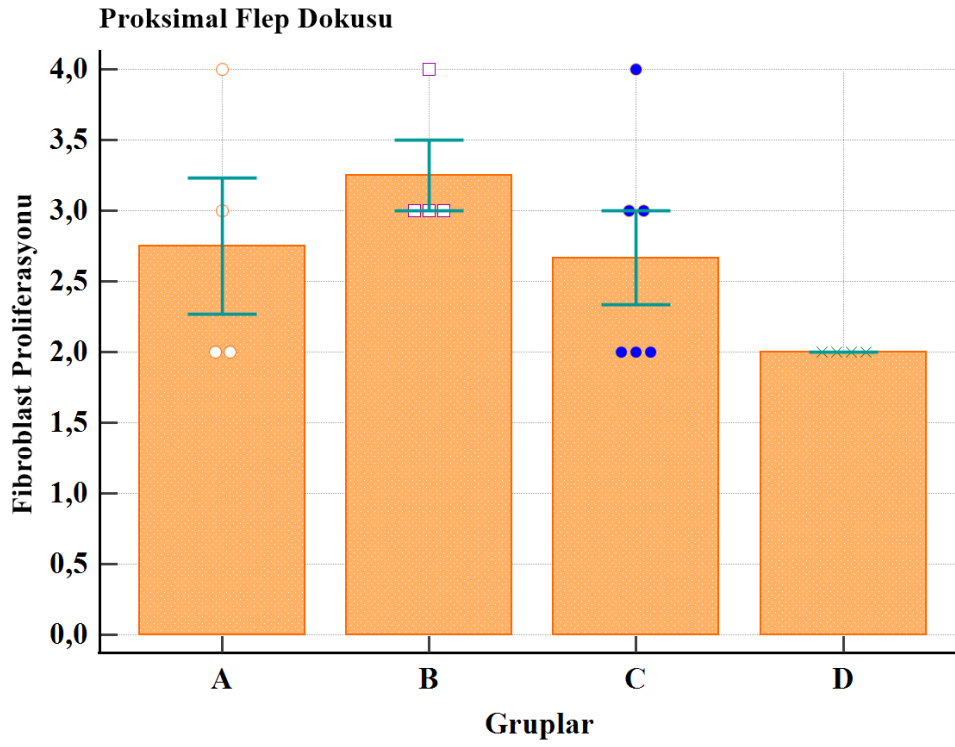
Proksimal flep dokusunda, deney grupları arasında fibroblast proliferasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü, ($p = 0,138$), (Şekil 4.14.).

Distal flep dokusunda, deney grupları arasında fibroblast proliferasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü, ($p = 0,070$), (Şekil 4.15.).

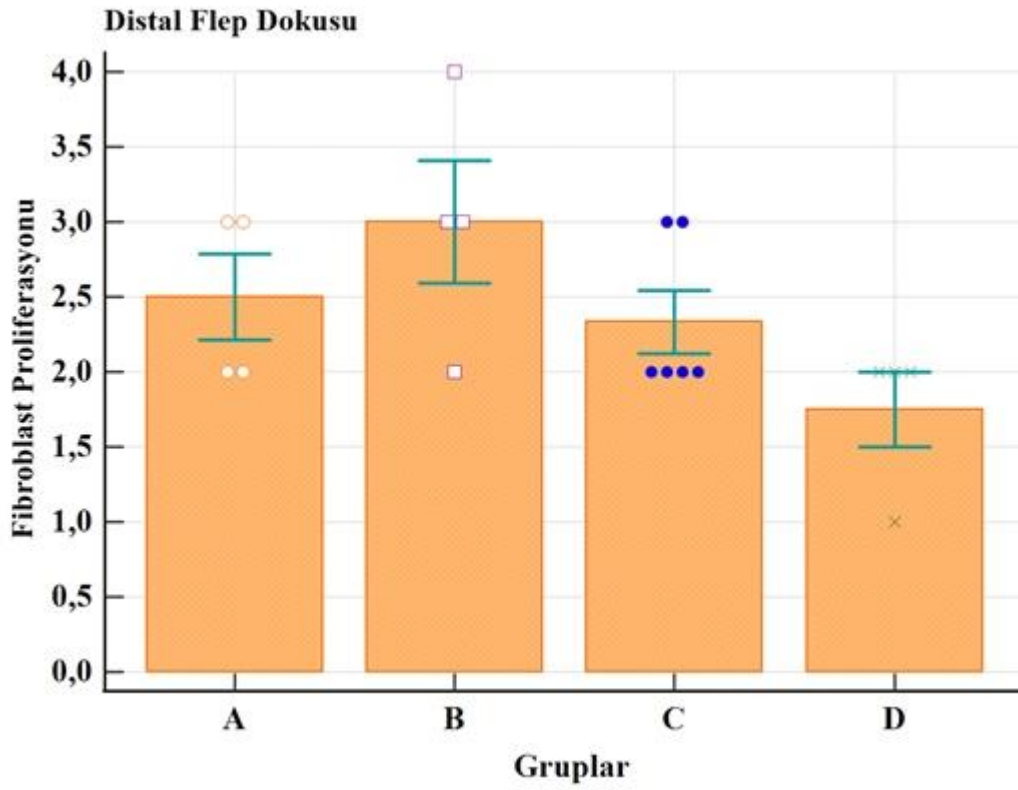
Deney gruplarına ait fibroblast proliferasyonu skorlarının Ortalama $\pm$ SEM değerleri Çizelge 4.7.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Fibroblast proliferasyonu skor sonuçları

Fibroblast Proliferasyonu	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	2,75 $\pm$ 0,48	0,138
	(B) SSE Grubu	3,25 $\pm$ 0,25	
	(C) FSS Grubu	2,67 $\pm$ 0,33	
	(D) Kontrol Grubu	2,00	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	2,50 $\pm$ 0,29	0,070
	(B) SSE Grubu	3,00 $\pm$ 0,41	
	(C) FSS Grubu	2,33 $\pm$ 0,21	
	(D) Kontrol Grubu	1,75 $\pm$ 0,25	



Şekil 4.14. Proksimal flep dokusunda fibroblast proliferasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 4.15. Distal flep dokusunda fibroblast proliferasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.3.4. Neovaskülarizasyon

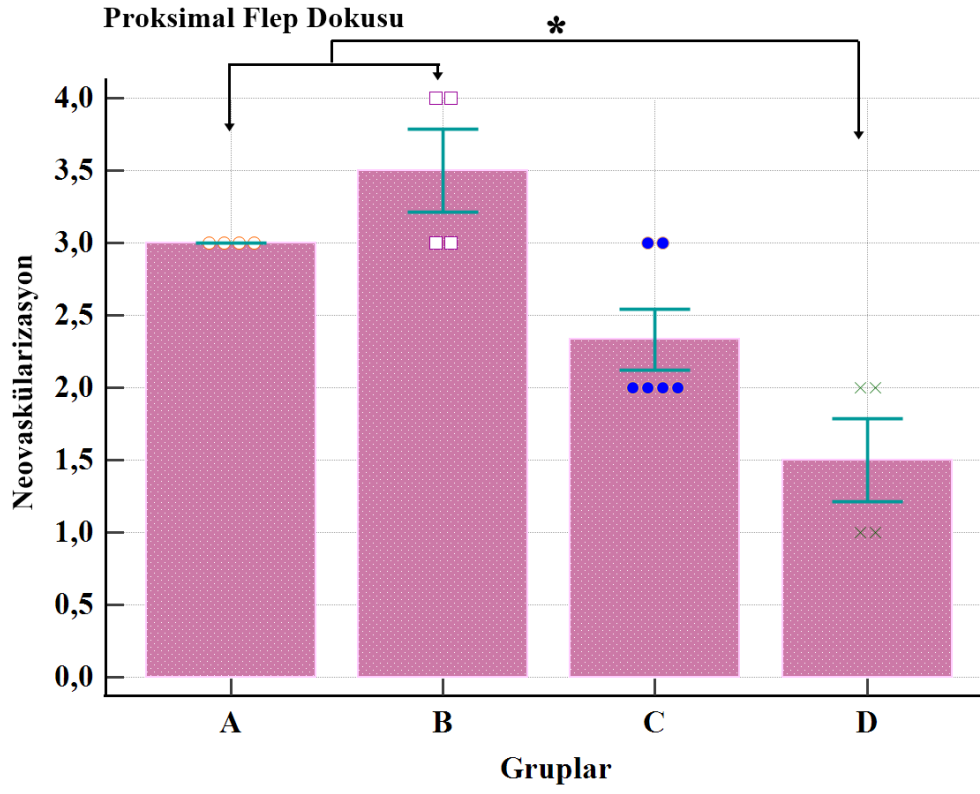
Proksimal flep dokusunda, deney grupları arasında neovaskülarizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. Sülük (A); (3,00) ve SSE (B); ($3,50 \pm 0,29$) gruplarındaki neovaskülarizasyon skorlarının, kontrol (D) grubundan ($1,50 \pm 0,29$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, (* sırasıyla $p = 0,03$; $0,001$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi, (Şekilde 4.16.).

Distal flep dokusunda, deney grupları arasında neovaskülarizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. Sülük (A); ($2,50 \pm 0,29$), SSE (B); ($3,25 \pm 0,25$), FSS (C); ($2,17 \pm 0,17$) gruplarındaki neovaskülarizasyon skorlarının, kontrol (D) grubundan ($1,25 \pm 0,25$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, (** sırasıyla $p = 0,013$; $0,001$; $0,050$), (Şekilde 4.17.). Ayrıca, SSE (B) grubundaki neovaskülarizasyon skorunun, FSS (C) grubundan da anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).

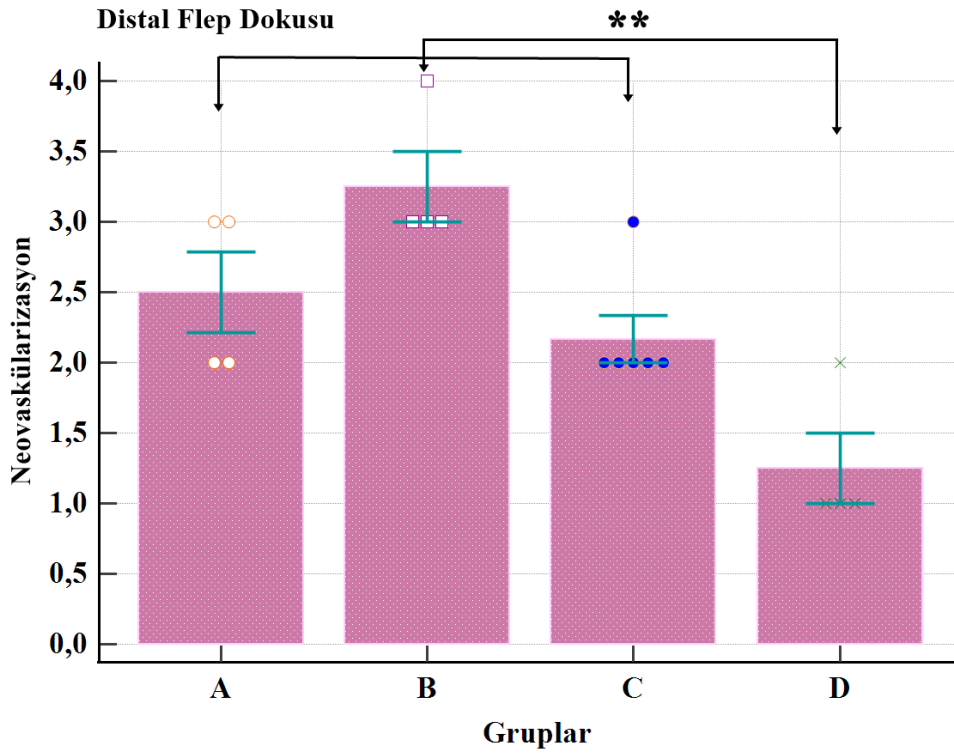
Deney gruplarına ait neovaskülarizasyon skorlarının Ortalama $\pm$ SEM değerleri Çizelge 4.8.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Neovaskülarizasyon skor sonuçları

Neovaskülarizasyon	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	3,00	0,0001
	(B) SSE Grubu	$3,50 \pm 0,29$	
	(C) FSS Grubu	$2,33 \pm 0,21$	
	(D) Kontrol Grubu	$1,50 \pm 0,29$	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	$2,50 \pm 0,29$	0,0001
	(B) SSE Grubu	$3,25 \pm 0,25$	
	(C) FSS Grubu	$2,17 \pm 0,17$	
	(D) Kontrol Grubu	$1,25 \pm 0,25$	



Şekil 4.16. Proksimal flep dokusunda neovaskülerizasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 4.17. Distal flep dokusunda neovaskülerizasyon skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.3.5. İnflamatuvar hücre varlığı

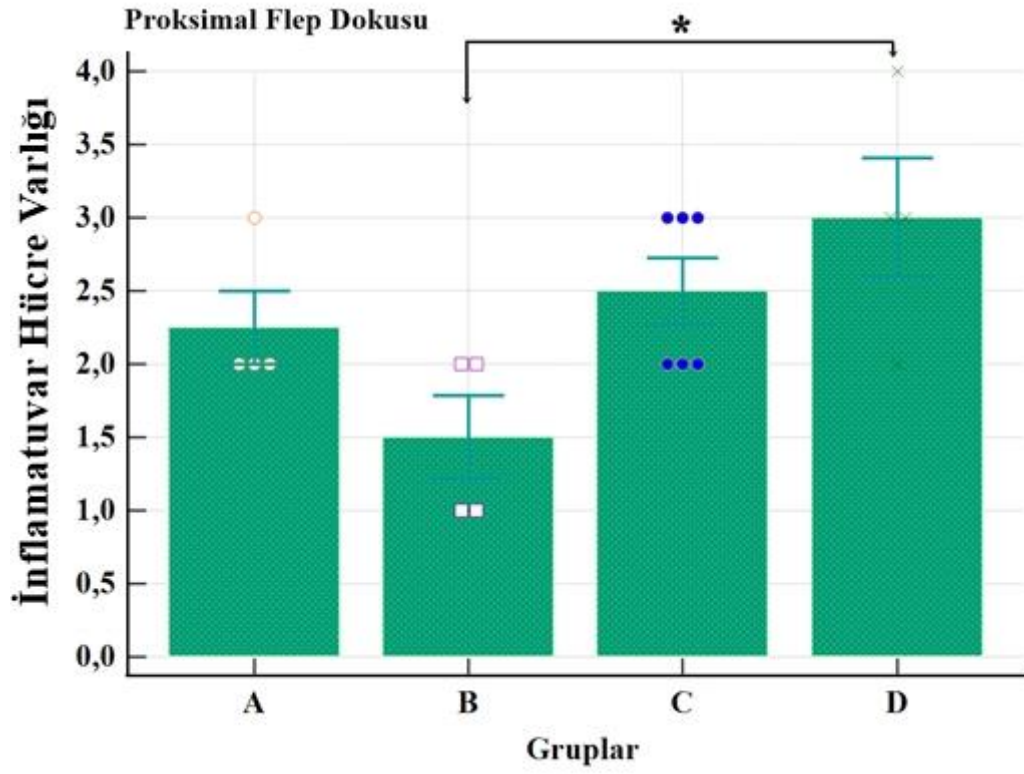
Proksimal flep dokusunda, deney grupları arasında inflamatuvar hücre varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,025$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. Kontrol (D) grubundaki inflamatuvar hücre varlığı skorunun ($3,00 \pm 0,41$), SSE (B) grubundan ($1,50 \pm 0,29$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($*p = 0,018$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi, (Şekil 4.18.)

Distal flep dokusunda, deney grupları arasında inflamatuvar hücre varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü, ($p = 0,146$), (Şekil 4.19.)

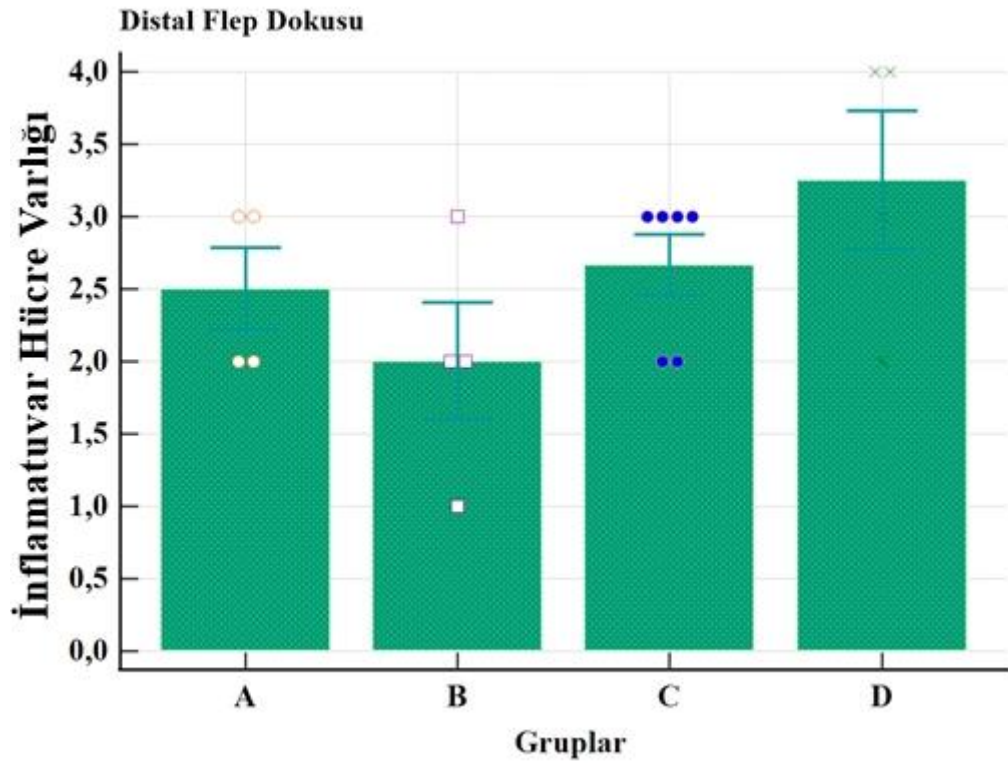
Deney gruplarına ait inflamatuvar hücre varlığı skorlarının Ortalama $\pm$ SEM değerleri Çizelge 4.9.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. İnflamatuvar hücre varlığı skor sonuçları

İnflamatuvar Hücre Varlığı	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	$2,25 \pm 0,25$	0,025
	(B) SSE Grubu	$1,50 \pm 0,29$	
	(C) FSS Grubu	$2,50 \pm 0,22$	
	(D) Kontrol Grubu	$3,00 \pm 0,41$	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	$2,50 \pm 0,29$	0,146
	(B) SSE Grubu	$2,00 \pm 0,41$	
	(C) FSS Grubu	$2,67 \pm 0,21$	
	(D) Kontrol Grubu	$3,25 \pm 0,48$	



Şekil 4.18. Proksimal flep dokusunda inflamatuvar hücre varlığı skorunun gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 4.19. Distal flep dokusunda inflamatuvar hücre varlığı skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Fleplerin proksimal ve distal parçaları; Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) (+) Hücre (%) açısından değerlendirildi, (Çizelge 4.10.). VEGF (+) hücre %'si B grubunda en yüksek seviyede tespit edildi.

4.4.1. VEGF (+) hücre yüzdesi (%)

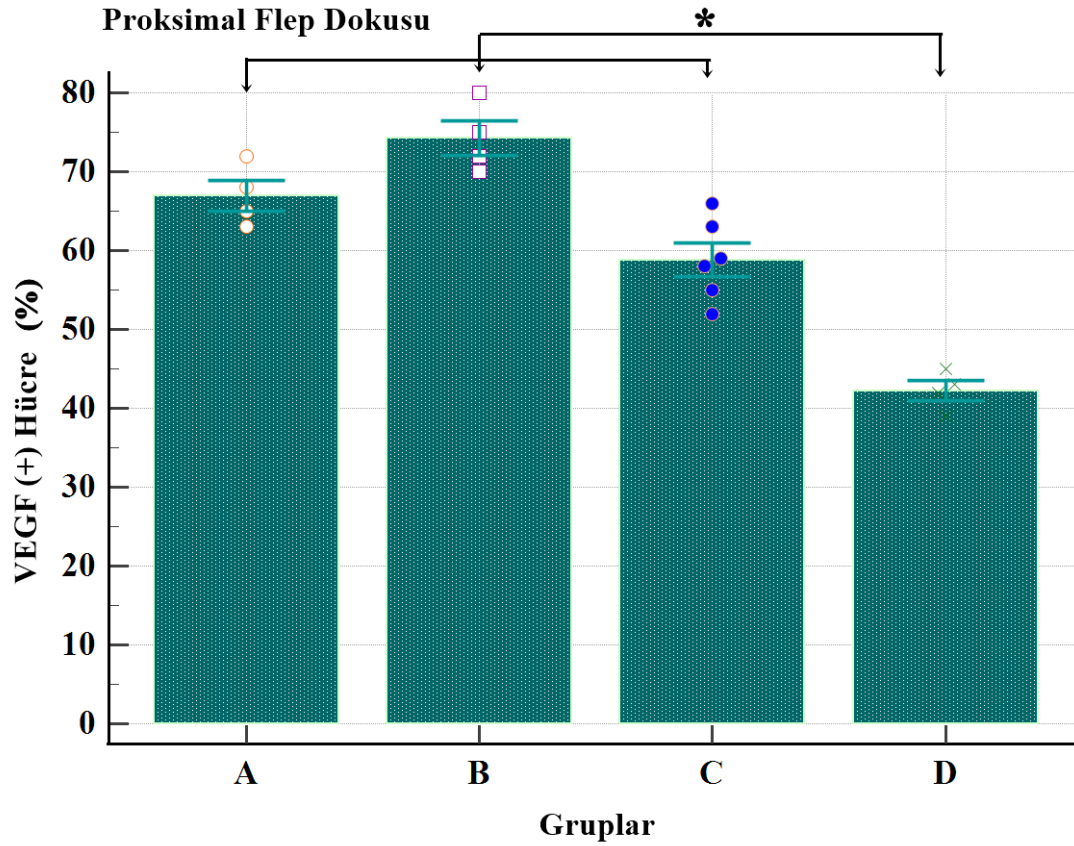
Proksimal flep dokusunda, deney grupları arasında VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,0001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. Sülük (A); ($67,00 \pm 1,96$), SSE (B); ($74,25 \pm 2,17$) ve FSS (C); ($58,83 \pm 2,09$) grubundaki VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) skorlarının kontrol (D) grubundan ($42,25 \pm 1,25$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, (* $p = 0,001$), (Şekil 4.20.). A ve B grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemekle birlikte; A ve B grupları, C grubundan anlamlı derecede yüksek tespit edildi, ($p = 0,001$).

Distal flep dokusunda, deney grupları arasında VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü, ($p = 0,0001$). Anlamlı farkın kaynağını bulmak amacıyla gruplar kendi aralarında tek tek karşılaştırıldı. Sülük (A); ($63,25 \pm 1,38$), SSE (B); ($69,00 \pm 1,68$) ve FSS; ($53,33 \pm 0,99$) gruplarındaki VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) skorlarının, kontrol (D) grubundan ($38,50 \pm 1,55$) anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, (** $p = 0,001$), (Şekil 4.21.). A ve B grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemekle birlikte; A ve B grupları, C grubundan anlamlı derecede yüksek tespit edildi, ($p = 0,001$).

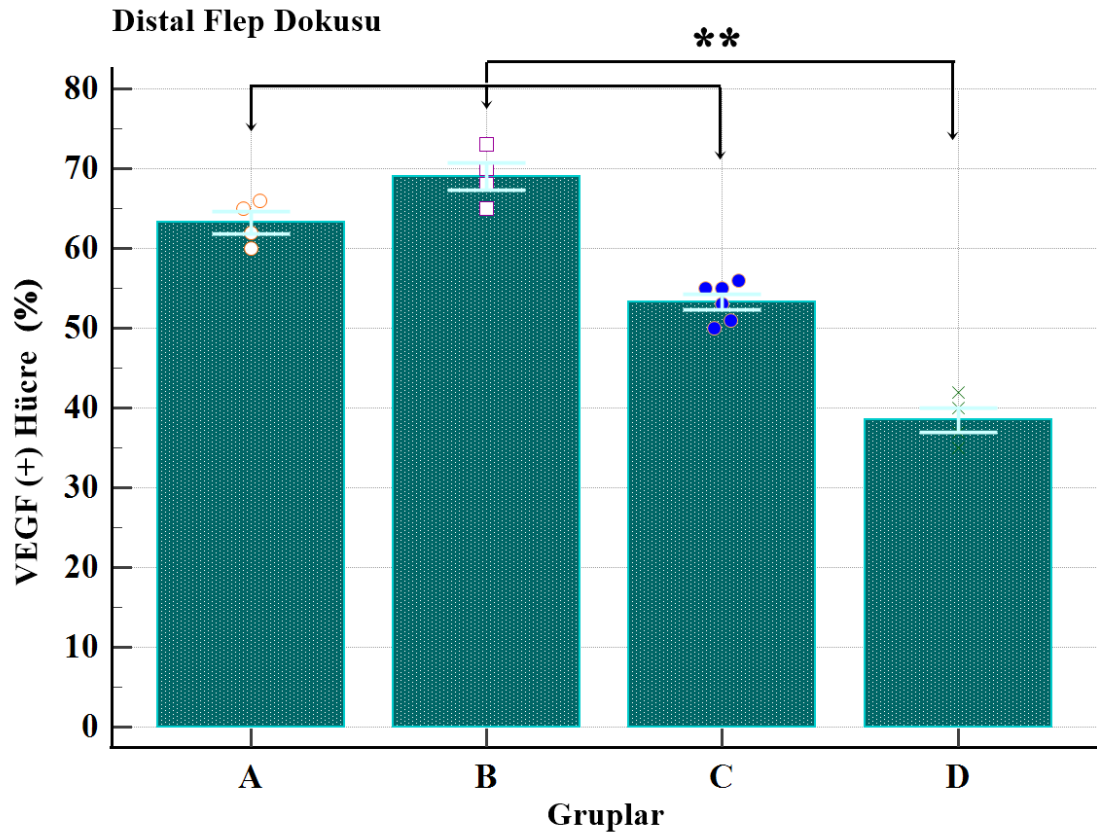
Deney gruplarına ait VEGF (+) hücre (%) skorlarının Ortalama $\pm$ SEM değerleri Çizelge 4.10.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. VEGF (+) hücre (%) skor sonuçları

VEGF (+) Hücre (%)	Gruplar	Ortalama $\pm$ SEM	p değeri
Proksimal Doku	(A) Sülük Grubu	67,00 $\pm$ 1,96	0,0001
	(B) SSE Grubu	74,25 $\pm$ 2,17	
	(C) FSS Grubu	58,83 $\pm$ 2,09	
	(D) Kontrol Grubu	42,25 $\pm$ 1,25	
Distal Doku	(A) Sülük Grubu	63,25 $\pm$ 1,38	0,0001
	(B) SSE Grubu	69,00 $\pm$ 1,68	
	(C) FSS Grubu	53,33 $\pm$ 0,99	
	(D) Kontrol Grubu	38,50 $\pm$ 1,55	

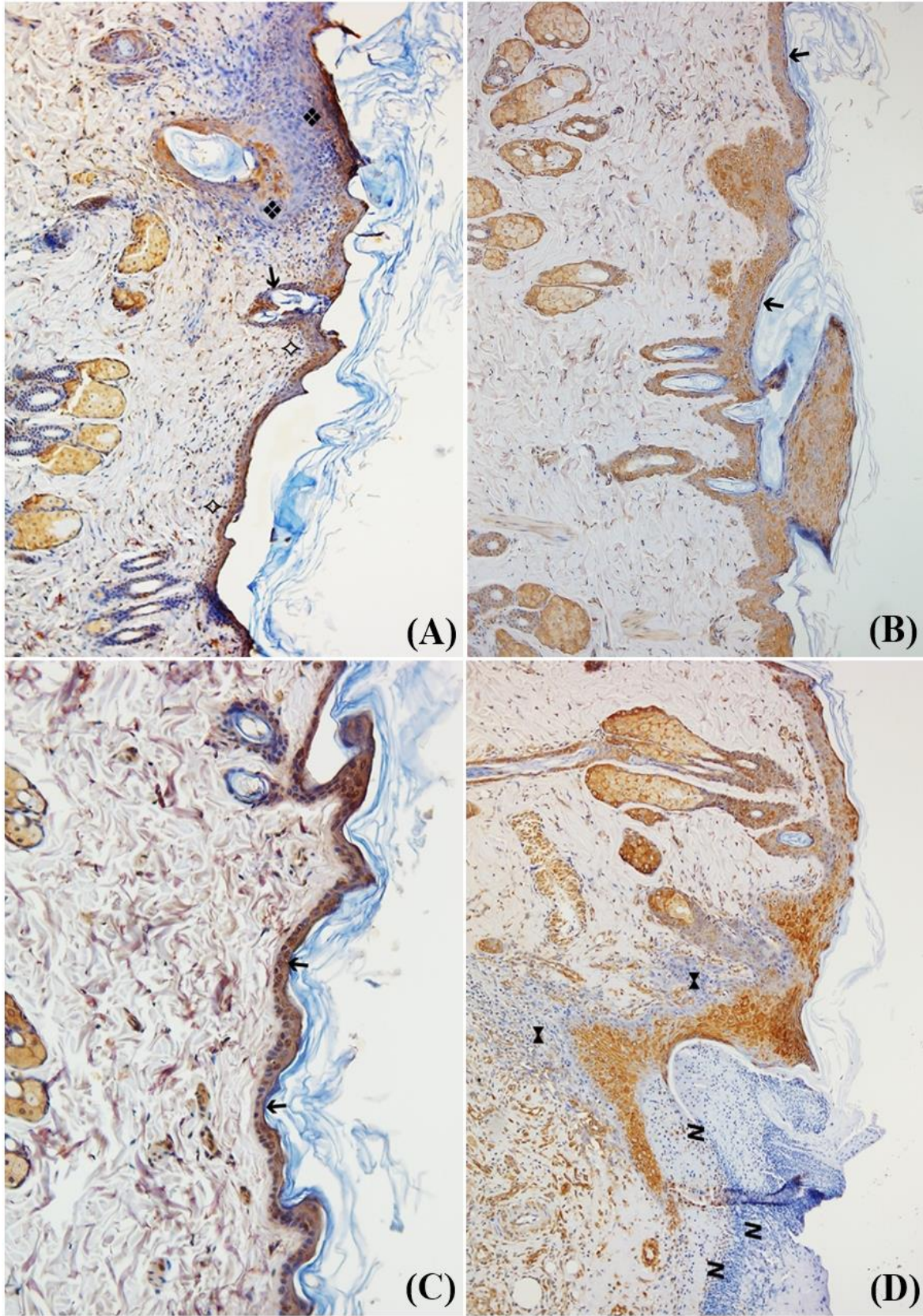


Şekil 4.20. Proksimal flep dokusunda VEGF (+) hücre (%) skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

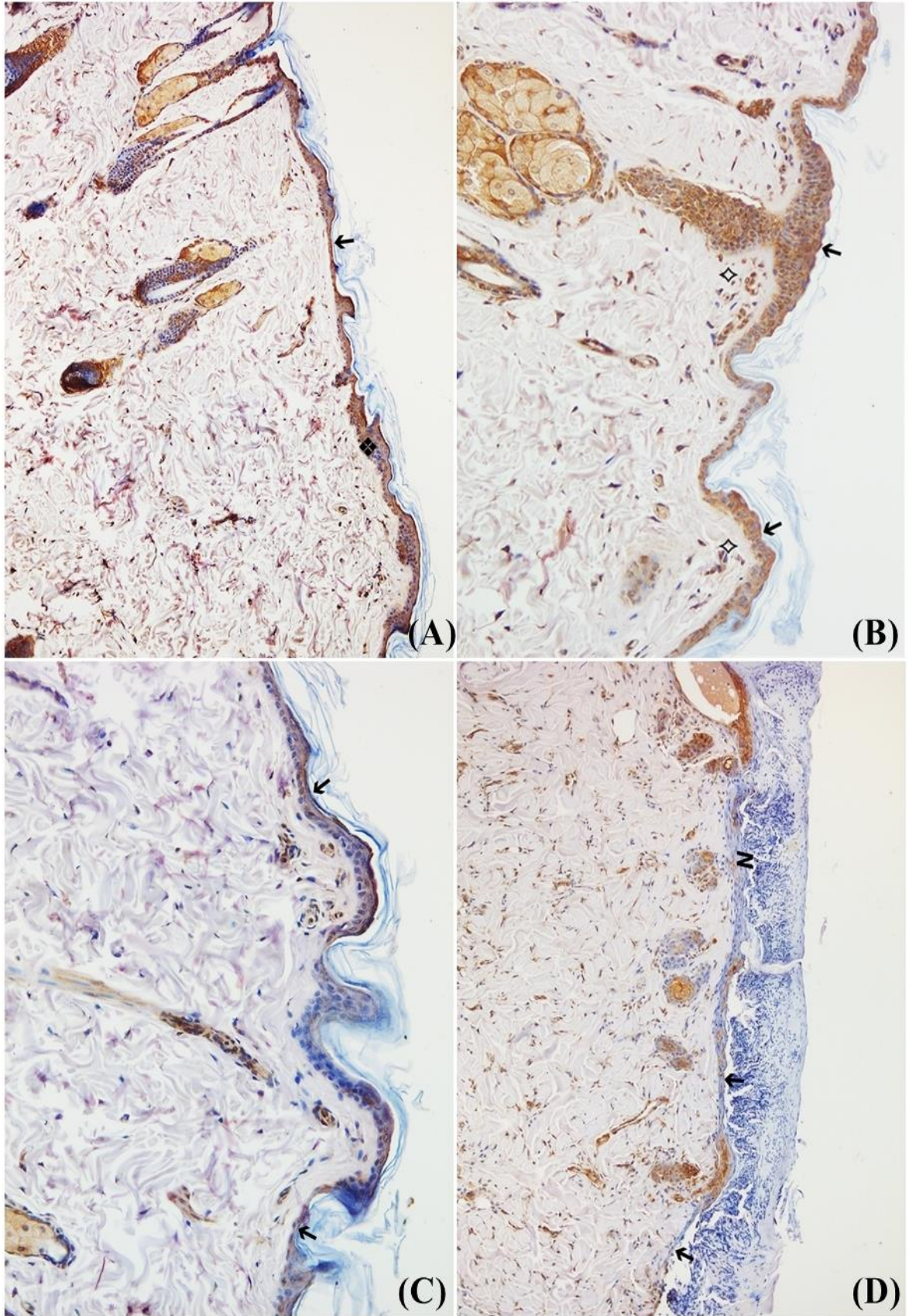


Şekil 4.21. Distal flep dokusunda VEGF (+) hücre (%) skorunun gruplar arasında karşılaştırılması

İmmünohistokimyasal yöntem uygulanan fleplerin proksimal ve distal parçalarının ışık mikroskobu altındaki görünüşleri Resim 4.6. ve Resim 4.7.' de sunulmuştur.



Resim 4.6. Proksimal flep dokusunun immünohistokimyasal yöntem sonuçları: (A) Sülük grubu, (B) SSE grubu, (C) FSS grubu, (D) Kontrol grubu - Epitel rejenerasyon: →, Granülasyon dokusu: ◆, Fibroblast proliferasyonu: ◇, İnflamatuvar hücre: ◆, Nekroz: N



Resim 4.7. Distal flep dokusunun immünohistokimyasal yöntem sonuçları: (A) Sülük grubu, (B) SSE grubu, (C) FSS grubu, (D) Kontrol grubu - Epitel rejenerasyon: →, Granülasyon dokusu: ◆, Fibroblast proliferasyonu: ◆, Nekroz: N

5. TARTIŞMA

Günümüzde tıbbi sülük tedavisi ve tıbbi sülüklerden elde edilen ürünler Türkiye ve tüm dünyada kullanılmaktadır. İçeriğinde 100'ün üzerinde biyoaktif madde barındıran tıbbi sülük salgısının etki mekanizmaları halen merak konusu olup, tıbbi sülüklere ve tıbbi sülük salgısına dair çeşitli bilimsel çalışmalar yürütülmektedir.

Plastik-rekonstrüktif cerrahide doku defektlerini tamir etmek amacıyla yaygınca kullanılan random cilt fleplerinin özellikle distal bölgeleri nekroza gitme eğilim göstermektedir. Oluşan nekroz flep kaybına yol açabilmektedir. Bu nedenle nekroz oranını azaltmaya ve flep sağ kalımını arttırmaya yardımcı olacak çeşitli yöntemler tüm dünyada araştırılmaktadır. Bunların başında tamamlayıcı ve destekleyici tedavi yöntemleri gelmektedir [83, 84].

Bu çalışmada, tıbbi sülüklerin ve tıbbi sülük salgı ekstraktının; flep bölgesindeki yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle incelenmesi amaçlandı. Çalışmamızda *H. verbana* cinsi steril tıbbi sülükler kullanıldı. Sülüklerin fagostimülatör solüsyon ile beslenmelerinin ardından sülük sağım yöntemi ile salgı toplandı. Elde edilen salğıdaki total protein konsantrasyonu, Bradford yöntemi ile 50 µg/ mL şeklinde saptandı. Çalışmamızda tüm deney gruplarındaki tüm hayvanların dorsal bölgelerine random paternli flep yapılarak; A grubundaki hayvanlara steril tıbbi sülük uygulaması, B grubundaki hayvanlara SSE enjeksiyonu ve C grubundaki hayvanlara FSS enjeksiyonu yapıldı. D grubu ise kontrol grubu olup, bu gruptaki hayvanlara başka bir müdahalede bulunulmadı.

Çalışmamızın ilk aşamasında tüm gruplardaki tüm hayvanlardan serum örnekleri alındı. Ayrıca flep bölgelerinin proksimal ve distal kısımlarından doku örnekleri alınarak doku homojenatları elde edildi. Tüm bu örneklerden ELİSA testi ile HIF-1-α, TGF-α ve IGF-1 parametrelerini analiz edildi.

Serum örnekleri ile birlikte proksimal ve distal flep dokularına ait doku homojenat örneklerinde, deney grupları arasında HIF-1-α, TGF-α ve IGF-1 konsantrasyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi. HIF-1-α, TGF-α ve IGF-1; yara iyileşmesinin belirli aşamalarında (proliferasyon, anjiyogenez gibi) görevleri olan ve

mitojenik etkiler gösteren moleküllerdir. HIF-1- α özellikle hipoksik koşullar altında hücrelerin sağ kalımlarında önemli roller oynarken, yara iyileşmesinin tüm aşamalarında (hücre bölünmesi, büyüme faktörü salınımı ve matris sentezi) görev alan bir faktördür ve oksijen homeostazının ana düzenleyicisidir [67]. TGF- α 'da normal iyileşmenin doğal sürecinde bulunan ve belirli roller üstlenen önemli bir büyüme faktörüdür. TGF- α 'nın ve reseptörlerinin yüksek düzeyde eksprese edildiği dokuların başında ise cilt dokusu gelmektedir [74]. Endotel hücreleri için kemotaktik bir ajan görevi gören IGF-1 ise fibroblastların ve keratinositlerin proliferasyonunu ve göçünü teşvik ederek yara iyileşmesinde önemli görevler üstlenen, insülin ile yapısal benzerlik gösteren bir büyüme faktörüdür [85]. Bizim çalışmamızda tüm hayvanlarımız 7. Günde sakrifiye edilip, örneklerimiz bu günde toplanmıştır. Yara iyileşmesini değerlendirme amacı ile deney sürecinde herhangi bir örnek alınması yapılmamıştır. Çalışmamızda bahsi geçen büyüme faktörleri açısından deney grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmeyişinin sebebi, HIF-1- α ve TGF- α 'nın yara iyileşme sürecinin erken dönemlerinde sentezlenmesi; IGF-1'in ise yara iyileşmesinin geç dönemlerinde sentezlenmesi şeklinde yorumladık.

Çalışmamızın ikinci aşamasında deney gruplarının flep bölgelerindeki nekroz alanını ölçmek amacıyla post-operatif 7. günde çekilmiş fotoğraflarda hesaplamalar yapıldı. Nekroz alanı toplam flep alanına oranlandığında, bu oranın (%) gruplar içerisinde en yüksek kontrol grubunda olduğu belirlendi. Sülük (A) ve SSE (B) gruplarındaki nekroz alan oranı, kontrol (D) grubundan anlamlı derecede düşük bulundu. Bu sonuçlar tıbbi sülük ve tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulamasının flep bölgesinde nekroz oranını azaltarak flep sağ kalım oranını arttırabileceğini düşündürdü.

Bekircan ve arkadaşları tarafından yapılan tez çalışmasında; tıbbi sülük tedavisinin, ozon tedavisinin ve bunların kombine etkisinin flep sağ kalımı üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, tıbbi sülük tedavisinin ve ozon tedavisinin flepte oluşabilecek nekrozu azalttığı tespit edilmiştir [88]. Bizim çalışmamızda da bu çalışmayı destekler nitelikte bulgular elde edildi. Sülük (A) ve SSE (B) gruplarında nekroz alan oranı, kontrol (D) grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük tespit edildi. Tıbbi sülük salgısı içeriğinde barındırdığı hirudin, destabilaz ve Faktör Xa inhibitörü gibi anti-koagülan maddeler ile birlikte; histamin-benzeri maddeler ve asetilkolin gibi vazodilatör maddeler nedeniyle kan akışını arttırmaktadır [27]. Bunun sonucunda bizim çalışmamızda, uygulama yapılan bölgelerdeki kanlanmanın artması

nedeniyle, toplam nekroz alanlarının azaldığını ve flep sağ kalımı oranlarının arttığını düşünüyoruz.

Çalışmamızın üçüncü aşamasında ise deney gruplarının flep bölgelerinden elde edilen proksimal ve distal dokular parafin içine gömülerek doku blokları elde edildi ve ardından bu bloklardan kesitler alındı. Alınan bu kesitler H&E ve Masson's Trichrome yöntemleri ile boyanarak; epitel rejenerasyon, granülasyon dokusu kalınlığı, fibroblast proliferasyonu, neovaskülarizasyon ve inflamatuvar hücre varlığı parametreleri açısından değerlendirildi.

Epitel rejenerasyonu, granülasyon doku kalınlığı, neovaskülarizasyon bulguları SSE (B) grubunda en üst seviyede izlendi. Bu grubu sırası ile Sülük (A), FSS (C) ve kontrol (D) grupları izledi. SSE (B) grubunda yukarıda bahsedilen yara iyileşmesi ile ilgili olumlu bulguların en üst seviyede izlenmiş olması ve bunu sülük uygulaması yapılan A grubunun takip etmesi; sülüğün ve SSE' nin yara iyileşme sürecine olumlu bir katkı yapmış olduğunu göstermektedir.

İnflamatuvar hücre sayısının kontrol (D) grubunda yüksek seviyede tespit edilmesi, özellikle sülük (A) ve SSE (B) gruplarına uygulanan yöntemlerin anti-inflamatuvar etkisi olabileceğini akla getirdi.

Literatürde hayvanlar üzerinde yara modeli yapılarak direkt tıbbi sülük uygulamasının etkisinin incelendiği çeşitli çalışmalar eskiden beri mevcuttur [89, 90]. Literatür incelendiğinde, bizim çalışmamızda *H. verbana* türü sülük kullanılması ve gruplarımızdan birine direkt sülük salgı enjeksiyonu uygulanması açısından araştırmamız bir ilk teşkil etmektedir.

Darestani ve arkadaşları tarafından yapılan Wistar albino türü sıçanların kullanıldığı bir hayvan modelinde sülük tedavisi ve topikal fenitoin (PHT) uygulamasının yara iyileşmesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Tıbbi sülük ile tedavi edilen gruptaki sıçanların yara iyileşme sürecinin, topikal fenitoin (PHT) ile tedavi edilen gruba ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha hızlı olduğu gösterilmiştir [89]. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak yara iyileşmesi insizyonel cilt yarası üzerinde, farklı bir sülük türü olan *H. orientalis* ile gerçekleştirilmiştir. Histolojik incelemede, tıbbi sülük ile tedavi edilen grupta kontrol grubunda görülen inflamasyon ve fibroblast proliferasyonuna rastlanmaksızın yara

iyileşmesi hızlı bir şekilde tamamlanmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, bu çalışmada da tıbbi sülük uygulamasının yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu görülmektedir. Zakian ve arkadaşları, sıçanların dorsal bölgelerinde oluşturdukları yara modelinde tıbbi sülük tedavisinin ve 1% sodyum fenitoin tedavisinin etkinliğini hiç bir tedavi almayan negatif kontrol grubu ile karşılaştırarak araştırmışlardır. Operasyonun 6. ve 16. günlerinde yara bölgesinden alınan örnekler incelenmiştir. Tıbbi sülük tedavisi, yara iyileşme sürecini hızlandırarak kollajen olgunlaşmasını arttırmıştır [90]. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak yara iyileşmesi tam kat eksizyonel yara modeli üzerinde, farklı bir sülük türü olan *H. medicinalis* ile gerçekleştirilmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, bu çalışmada da tıbbi sülük uygulaması epitel rejenerasyonu arttırırken inflamatuvar hücre varlığını azaltmıştır. Hayvan modelinde yara iyileşme sürecinde tıbbi sülük uygulamasının yüksek bir başarı oranı olduğu düşünülmektedir.

Moosavian ve arkadaşları, fare modelinde fleplerde tıbbi sülük tedavisinin etkinliğini değerlendirdikleri bir çalışma yürütmüşlerdir. Tıbbi sülük tedavisi grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nekroz oranı tatmin edici derecede azalmıştır ve flep sağ kalım oranı ise ortalama 88 % şeklinde yükselmiştir [91]. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışma fare modeli üzerinde gerçekleştirilmiş, dorsal bölgede 2 x 4 cm boyutlarında daha küçük bir flep boyutu tercih edilerek, flep bölgesi uzun süre iskemiye maruz bırakılmıştır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, bu çalışmada da tıbbi sülük uygulanan grupta nekroz oranı azalarak flep sağ kalım oranı artmıştır.

Mousavi ve arkadaşları, tıbbi sülük tedavisinin ve heparin tedavisinin etkinliğini ratlarda venöz akut konjesyon modelinde incelemişlerdir [92]. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak sıçanların bacaklarında deneysel olarak oluşturulmuş venöz tıkanıklığa bağlı gerçekleşen konjesyon, *H. medicinalis* türü sülük ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Sülük ve heparin uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ödem miktarının önemli derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, bu çalışmada da inflamatuvar hücre varlığı, nekroz ve doku hasarı tıbbi sülük uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük tespit edilmiştir. Bu, tıbbi sülük salgısında bulunan ve anti-inflamatuvar etkileriyle öne çıkan bdelinler, hirustasin, eglinler ve LCI (sülük karboksipeptidaz inhibitörü) gibi maddelerden kaynaklanıyor olabilir.

Amani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *H. orientalis* türü tıbbi sülüklerden elde edilen sülük salgı ekstraktı, krem içerisine katılarak ratlarda oluşturulan yara modelinde denenmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak, sıçanların antral bölgelerinde oluşturulan 1 x 1 cm boyutlarındaki yara modelinde bu kremin etkisi değerlendirilmiştir [95]. 14 Gün süren bu çalışmanın sonucunda, sülük salgı ekstraktı içeren kremin uygulandığı grupta diğer gruplara göre epitel rejenerasyon, anjiyogenez ve yara iyileşmesi daha yüksek tespit edilmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde sülük salgısından elde edilen bir ekstrakt kullanılmasına rağmen bizim çalışmamızda olduğu gibi enjeksiyon şeklinde değil, krem formunda yara bölgesine haricen uygulanmıştır. Sülük salgı ekstraktı ve bunlardan elde edilen ürünlerin yara iyileşmesi modelinde farmasötik ürünler şeklinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Cottler ve arkadaşları tarafından, flep modeli oluşturulmuş ratlarda iki seanslık tıbbi sülük tedavisinin flep sağ kalımı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. [96]. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak flep bölgesi olarak abdominal bölge seçilmiştir. Ayrıca, flep bölgesi iki seans şeklinde iskemiye maruz bırakılmıştır ve 48 saat arayla iki defa sülük tedavisi uygulanmıştır. Tıbbi sülük uygulanan gruptaki hayvanlarda flep sağ kalım oranının kontrol grubuna kıyasla yüksek olduğu bulunmuştur.

Schlaudraff ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada tıbbi sülük tedavisinin flep sağ kalımı üzerine etkileri araştırılmıştır [95]. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak random flepler iskemiye maruz bırakılmış ve *H. medicinalis* türü tıbbi sülükler flebin distal bölgesine uygulanmıştır. Ayrıca bizim çalışmamızda deney boyunca bir kez sülük veya sülük salgı ekstraktı uygulanmışken, bu çalışmada kontrol grubu dışında bir kez sülük uygulanan ve üç kez sülük uygulanan grup olmak üzere iki farklı grup mevcuttur. Bu çalışmanın sonucunda; fleplere sekizer saat arayla üç sülük uygulanan grupta, kontrol grubu ve fleplere birer sülük uygulanan gruba kıyasla flep sağ kalımında anlamlı bir azalma bulunmuştur. Çalışmanın araştırmacıları, bizim çalışmamızın sonuçlarına tamamen zıt olan bu sonuçları; iskemik flep modelinde çoklu sülük uygulamasının uygun bir yaklaşım olmayacağı şeklinde yorumlamışlardır. Sülük uygulamasının faydalı olabilmesi için, arteriyel beslenmenin yeterli olması gerektiğini düşünmektedirler. Bizim çalışmamızda da, sülük salgı ekstraktı uygulanan grupta direkt tıbbi sülük uygulanana kıyasla flep sağ kalımının ve yara iyileşmesinin daha iyi olmasının sebebi, yeterli arteriyel beslenme ile ilişkili olabilir.

Literatüre bakıldığında tıbbi sülüklerinin farklı iskemi modelleri üzerine etkilerinin incelendiği hayvan çalışmaları da mevcuttur [98, 99]. Ayrıca başta hirudin olmak üzere tıbbi sülüklerden elde edilen çeşitli moleküllerin etkilerinin; kan hiperviskozitesi ve diyabetik nefropati gibi farklı hastalıklarda incelendiği farklı çalışmalarda görülmektedir [98, 99].

Tıbbi sülük tedavisi; rekonstrüktif işlemlerden birisi olan flep uygulamalarında, özellikle travma sonrası oluşan yaraların tedavisinde insanlarda da yaygın şekilde kullanılmaktadır. Sülük tedavisinin kullanıldığı ve travmatik yaralanmalar nedeniyle zarar görmüş organların tedavi edilerek kurtarıldığı çeşitli insan vaka sunumları literatürde mevcuttur [100, 101].

Facchin ve arkadaşları tarafından bildirilen vaka raporunda, araç kazası sonrası sağ kulağında laserasyon meydana gelen hastanın kulağı replante edilerek, yara bölgesindeki venöz tıkanıklığı azaltmak amacıyla tıbbi sülük tedavisi uygulanmıştır. Tıbbi sülük tedavisinin ardından yara bölgesinde sağlıklı revaskülarizasyon belirtileri gözlemlenmeye başlamıştır [102]. Tıbbi sülük salgısı deyince akla ilk gelen maddelerden birisi olan hirudin başta olmak üzere, diğer bileşikler ve bunların kombine etkilerinden ortaya çıkan anti-koagülan ve anti-platelet etkiler nedeniyle venöz tıkanıklığın ortadan kalkmış olabileceği düşünülmektedir [11]. Tachi ve arkadaşlarının bildirdiği başka bir vaka raporunda, köpek saldırısı nedeniyle travmatik dudak amputasyonu geçiren bir kadın hastaya mikrocerrahi dudak replantasyonu uygulanmıştır. Ameliyat sonrası venöz tıkanıklık bulguları görülmesi üzerine tıbbi sülük tedavisi uygulanmıştır. Tıbbi sülük tedavisi, yara bölgesinde venöz drenajı ve revaskülarizasyonu desteklemiştir [103]. Hayvan modeli üzerinde gerçekleştirdiğimiz çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında, sülük ve sülük salgısı uygulanan gruplarda neovaskülarizasyon skorunun kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olması bahsettiğimiz insan vaka raporlarında aktarılan sonuçları doğrular niteliktedir.

Çalışmamızın dördüncü aşamasında ise tüm deney gruplarındaki tüm hayvanların flep bölgelerinden alınan proksimal ve distal doku örnekleri üzerinde immünohistokimyasal yöntem ile çalışılarak VEGF pozitif hücre yüzdesi değerlendirildi.

Yingxin ve arkadaşları tarafından, flep modeli oluşturulmuş ratlarda doğal ve rekombinant hirudin uygulamasının VEGF gen ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, sülük salgısından elde edilen doğal hirudin uygulanan grup; kontrol ve rekombinant hirudin grubu ile kıyaslandığında, VEGF gen ekspresyonlarının anlamlı

derecede arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte doğal hirudin uygulaması, flep bölgesinde nekroz oranını azaltarak, flep sağ kalım oranını arttırmıştır [106]. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak; tıbbi sülüklerden elde edilen ve doğal bir anti-koagülan madde olan hirudinin VEGF üzerindeki etkisi PCR yöntemi ile gen ekspresyonu bakımından değerlendirilmiştir. Bizim immünohistokimyasal yöntem ile tespit ettiğimiz VEGF (+) hücre (%) sayısı, tıbbi sülük ve sülük salgı ekstraktı uygulanan gruplarda en yüksek seviyede izlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonucun sebebinin; tıbbi sülüklerin salgısında bulunan ve anti-koagülan özelliği olan "hirudin" olduğunu düşünmekteyiz. Heparin gibi diğer anti-koagülan ilaçların aksine hirudin, herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymayan, bilinen en güçlü, doğal ve spesifik trombin inhibitörüdür [29]. Tıbbi sülük salgısında bulunan hirudinin anjiyogeneze oldukça önemli bir yere sahip olan VEGF miktarını arttırdığı düşünülmektedir. Literatürde SSE'nin VEGF ekspresyonu arttırdığına dair *in vitro* çalışma da mevcuttur. Tırık ve arkadaşları tarafından yapılan bir tez çalışmasında SSE'nin, sağlıklı bir hücre hattı olan HUVEC hattında etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, VEGF gen ekspresyonunu ve yara iyileşmesini artırırken, apoptoza veya nekroza neden olmadığı gösterilmiştir [105].

Çalışmamızda VEGF pozitif hücre sayısı, epitel rejenerasyonu ve neovaskülarizasyon bulguları birbirleriyle uyumlu izlenmiştir. Bu sonuçlar, flep modelinde uyguladığımız yöntemlerinin yara iyileşme sürecine etki ettiğini ve yeni damar oluşumunu sağladığını akla getirmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *in vivo* şekilde flep modeli yapılan sıçanlarda tıbbi sülük ve tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulamasının yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırdık. Çalışma kapsamında deney gruplarında yara iyileşmesine dair parametrelere biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle bakıldı.

Literatürde tıbbi sülüklere ve tıbbi sülük salgısından elde edilen bileşiklere dair çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar mevcuttur. Özellikle plastik-rekonstrüktif cerrahide yara iyileşmesinde sülüklerin etkinliğine dair çalışmalar olsa da, çalışmamızda *H. verbana* türü sülük kullanılması ve gruplarımızdan birine direkt sülük salgı enjeksiyonu uygulanması açısından literatürde bir ilk teşkil etmektedir. Çalışma sonucunda tıbbi sülük salgı ekstraktı uygulamasının yara iyileşmesi açısından etkili bir ajan olabileceğine dair veriler elde ettik.

Yayınlanmış diğer makalelere bakıldığında, çalışmamızda tıbbi sülük salgı ekstraktının *in vivo* koşullar altında kullanılmasının ve bu deney hayvanlarında bakılan parametrelerin çeşitliliği açısından araştırmamız mevcut literatür bilgisine önemli katkılar sağlamaktadır. Bahsedilen sonuçlar ilk kez raporlanmakta ve daha sonraki çalışmalara kapı aralamaktadır. Yine de tıbbi sülük salgısının etki yolları ve moleküler mekanizmaları daha detaylı incelenmelidir.

6.1. Sonuçlar

1. Tıbbi sülük, sülük salgı ekstraktı ve fagostimülatör solüsyon uygulanan deney grupları ile kontrol grubunda; serum örnekleri, proksimal ve distal flep dokusu homojenatlarında, deney grupları arasında HIF-1- α (ng/mL) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p > 0,05$).
2. Tıbbi sülük, sülük salgı ekstraktı ve fagostimülatör solüsyon uygulanan deney grupları ile kontrol grubunda; serum örnekleri, proksimal ve distal flep dokusu homojenatlarında, deney grupları arasında TGF- α (pg/mL) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p > 0,05$).
3. Tıbbi sülük, sülük salgı ekstraktı ve fagostimülatör solüsyon uygulanan deney grupları ile kontrol grubunda; serum örnekleri, proksimal ve distal flep dokusu homojenatlarında,

deney grupları arasında IGF-1 (ng/mL) konsantrasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi, ($p > 0,05$).

4. Gruplar arasında nekroz alanı (%) değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Kontrol (D) grubundaki nekroz alan oranı (%); sülük grubu (A) ve SSE (B) grubundan anlamlı derecede yüksek bulundu, ($p < 0,05$). Nekroz alan oranının (%) en yüksek D grubunda olduğu bulundu.

5. Gruplar arasında epitel rejenerasyon skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Proksimal dokuda; SSE (B) grubundaki epitel rejenerasyon skorunun, kontrol (D) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$). Distal dokuda; sülük (A), SSE (B) ve FSS (C) gruplarındaki epitel rejenerasyon skorlarının, kontrol (D) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).

6. Gruplar arasında granülasyon dokusu kalınlığı skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Proksimal ve distal dokuda; SSE (B) grubundaki granülasyon dokusu kalınlığı skorunun, kontrol (D) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).

7. Gruplar arasında fibroblast proliferasyonu skorları açısından proksimal ve distal dokuda istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü, ($p > 0,05$).

8. Gruplar arasında neovaskülarizasyon skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Proksimal dokuda; sülük (A) ve SSE (B) gruplarındaki neovaskülarizasyon skorlarının, kontrol (D) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$). Distal dokuda; sülük (A), SSE (B) ve FSS (C) gruplarındaki neovaskülarizasyon skorlarının, kontrol (D) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).

9. Gruplar arasında inflamatuvar hücre varlığı skorları açısından proksimal dokuda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Kontrol (D) grubundaki inflamatuvar hücre varlığı skorunun SSE (B) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$). Distal dokuda gruplar arasında inflamatuvar hücre varlığı skoru açısından anlamlı bir fark bulunmadı, ($p > 0,05$).

10. Gruplar arasında VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü. Proksimal ve distal dokuda; sülük (A), SSE (B) ve FSS (C) gruplarındaki VEGF (+) Hücre Yüzdesi (%) skorlarının, kontrol (D) grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu, ($p < 0,05$).

KAYNAKLAR

1. Parlakpınar, H. ve Polat, S. (2021). *Hirudoterapi (Tıbbi Sülük Uygulaması) Tarihçesi*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 1-6.
2. Nair, H. K., Ahmad, N. W., Lee, H. L., Ahmad, N., Othamn, S., Mokhtar, N. S. H. M., and Chong, S. S. Y. (2022). Hirudotherapy in wound healing. *The International Journal of lower Extremity Wounds*, 21(4), 425-431.
3. Cooper, E. L., and Mologne, N. (2017). Exploiting leech saliva to treat osteoarthritis: A provocative perspective. *Journal of Traditional and complementary Medicine*, 7(3), 367-369.
4. Kastin, A. (2013). *Handbook of biologically active peptides*. Cambridge: Academic Press.
5. Biermann, J.S., and Siegel, G.W. (2020). *Orthopaedic knowledge update®: Musculoskeletal tumors 4*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
6. Yaniz-Galende, E., and Hajjar, R. (2014). Stem cell and gene therapy for cardiac regeneration. In R.K. Li, and R.D. Weisel (Eds.), *Cardiac regeneration and repair - Volume 1: Pathology and therapies*. UK: Elsevier, 347-379.
7. Laurent, G.J., and Shapiro, S.D. (2006). *Encyclopedia of respiratory medicine*. Cambridge: Academic Press, 3.
8. Chilukuri, S. and Leffell, D.J. (2007). Basic principles in flap reconstruction. In T.E. Rohrer, DVD Editor, J.L. Cook, M.R. Migden, T.H. Nguyen, and J.R. Mellette Jr. (Eds.), *Flaps and grafts in dermatologic surgery*. Philadelphia: Elsevier, 15-29.
9. Ayhan, H. and Mollahaliloğlu, S. (2018). Tıbbi sülük tedavisi: Hirudoterapi. *Ankara Medical Journal*, 18(1), 141-148.
10. Baskova, I. P., Kostrjukova, E. S., Vlasova, M. A., Kharitonova, O. V., Levitskiy, S. A., Zavalova, L. L. and Lazarev, V. N. (2008). Proteins and peptides of the salivary gland secretion of medicinal leeches *Hirudo verbana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. *Biochemistry*, 73, 315-320.
11. Ünal, K. ve Erol, M.E. (2022). Tıbbi Sülük tedavisinin bilimsel değeri. *Anadolu Tıbbi Dergisi*, 1(3), 37-45.
12. Abdulkader, A. M., Ghawi, A. M., Alaama, M., Awang, M. and Merzouk, A. (2013). Leech therapeutic applications. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(2), 127.
13. Aloto, D. and Eticha, E. (2018). Leeches: A review on their pathogenic and beneficial effects. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 9(01), 511.
14. Abdullah, S., Dar, L. M., Rashid, A. and Tewari, A. (2012). Hirudotherapy/leech therapy: applications and indications in surgery. *Arch Clin Exp Surg*, 1(3), 172-180.

15. Sağlam, N. (2011). *Bazı Tıbbi Sülük Türlerinin (Hirudo medicinalis L., 1758 ve Hirudo verbana Carena, 1820) İhracatı, Koruması ve Sürdürülebilirliği*. *Journal of Fisheries Sciences*, 5(1), 1.
16. Ceylan, M. ve Çetinkaya, O. (2021). Size and structure of the Mediterranean medicinal leech, *Hirudo verbana* populations inhabiting wetlands around Lake Eğirdir, Turkey. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(4), 437-447.
17. Sağlam, N. (2019). Internal and external morphological characteristics of the medicinal leech species *Hirudo sulukii* and *Hirudo verbana*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 43(4), 204.
18. Mory, R.N., Mindell, D. and Bloom, D.A. (2000). The leech and the physician: biology, etymology, and medical practice with *Hirudinea medicinalis*. *World Journal of Surgery*, 24, 878-883.
19. Alam, S.S., Ahmad, W. and Yunus, S.S. (2016). Irsal-e-Alaq (Leech Therapy/Hirudo therapy) in Surgical Diseases: A review. *International Journal of Medicine Research*, 1(4), 23-27.
20. Papavramidou, N. and Christopoulou- Aletra, H. (2009). Medicinal use of leeches in the texts of ancient Greek, Roman and early Byzantine writers. *Internal Medicine Journal*, 39(9), 624-627.
21. Bujalkova, M., Straka, S. and Jureckova, A. (2001). Hippocrates' humoral pathology in nowadays reflections. *Bratislavske Lekarske Listy*, 102(10), 489-492.
22. Lone, A. H., Ahmad, T., Anwar, M., Habib, S., Sofi, G. and Imam, H. (2011). Leech therapy-a holistic approach of treatment in unani (greeko-arab) medicine. *Ancient Science of Life*, 31(1), 31.
23. Hildebrandt, J.P. and Lemke, S. (2011). Small bite, large impact—saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften*, 98(12), 995-1008.
24. Younis Munshi, I.A., Rafique, H. and Ahmad, Z. (2008). Leeching in the history-a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(13), 1650-1653.
25. Mumcuoglu, K.Y. (2014). Recommendations for the use of leeches in reconstructive plastic surgery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 205929.
26. Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği. (2014, 27 Ekim). *Resmi Gazete*, Sayı:29158.
27. Ünal, K., Erol, M. ve Ayhan, H. (2023). Literature Review on the Effectiveness of Medicinal Leech Therapy in the Wound Healing. *Ankara Medical Journal*, 23(1), 151-164.
28. Sig, A. K., Guney, M., Guclu, A. U. and Ozmen, E. (2017). Medicinal leech therapy—an overall perspective. *Integrative Medicine Research*, 6(4), 337-343.

29. Ünal, K. ve Erol, M. (2022). *Tıbbi Sülük Salgısının Biyokimyası*, in *Sağlık & Bilim 2022 Medikal Araştırmalar-IV*. İstanbul: Efe Akademik Yayıncılık, 215-228.
30. Zaidi, S. M., Jameel, S. S., Zaman, F., Jilani, S., Sultana, A. and Khan, S. A. (2011). A systematic overview of the medicinal importance of sanguivorous leeches. *Altern Medicine Review*, 16(1), 59-65.
31. Gross, U. and Roth, M. (2007). 11 The Biochemistry of leech saliva. *Medicinal Leech Therapy*, 131.
32. Eldor, A., Orevi, M. and Rigbi, M. (1996). The role of the leech in medical therapeutics. *Blood Reviews*, 10(4), 201-209.
33. Nikonov, G.I. and Titova, E.A. (1999). Destabilase complexes- natural liposome produced by medicinal leeches *Hirudo medicinalis*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 13(1), 102-106.
34. Baskova, I. and Zavalova, L. (2001). Proteinase inhibitors from the medicinal leech *Hirudo medicinalis*. *Biochemistry (Moscow)*, 66(7), 703-714.
35. Michalsen, A., Roth, M., and Dobos, G. J. (2011). *Medicinal leech therapy*. Stuttgart: Thieme.
36. Brankamp, R. G., Manley, G. G., Biankenschap, D. T., Bowlin, T. L. and Cardin, A. D. (1991). Studies on the anticoagulant, antimetastatic and heparin-binding properties of ghilanten-related inhibitors. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 2(1), 161-166.
37. Tasiemski, A., Vandenbulcke, F., Mitta, G., Lemoine, J., Lefebvre, C., Sautiere, P. E. and Salzert, M. (2004). Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 30973-30982.
38. Hovingh, P. and Linker, A. (1999). Hyaluronidase activity in leeches (*Hirudinea*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 124(3), 319-326.
39. Gronwald, W., Bomke, J., Maurer, T., Domogalla, B., Huber, F., Schumann, F. and Kalbitzer, H. R. (2008). Structure of the leech protein saratin and characterization of its binding to collagen. *Journal of Molecular Biology*, 381(4), 913-927.
40. Öner Küçük, M. ve Yaman, O. (2019). Tıbbi sülük terapisi (Hirudoterapi). *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 3, 29-46.
41. Abdisa, T. (2018). Therapeutic importance of leech and impact of leech in domestic animals. *MOJ Drug Design Development & Therapy*, 2, 235-242.
42. Gödekmerdan, A., Arusan, S., Bayar, B. ve Sağlam, N. (2011). Medicinal leeches and hirudotherapy. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 35(4), 234.

43. Schnabl, S. M., Kunz, C., Unglaub, F., Polykandriotis, E., Horch, R. E. and Dragu, A. (2010). Acute postoperative infection with *Aeromonas hydrophila* after using medical leeches for treatment of venous congestion. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 130, 1323-1328.
44. Chepeha, D. B., Nussenbaum, B., Bradford, C. R. and Teknos, T. N. (2002). Leech therapy for patients with surgically unsalvageable venous obstruction after revascularized free tissue transfer. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 128(8), 960-965.
45. Välisuo, P. (2015). Optical methods for assessing skin flap survival. *Biophotonics for Medical Applications*, 331-346.
46. Hashimoto, I., Abe, Y., Ishida, S., Kashiwagi, K., Mineda, K., Yamashita, Y. and Keyama, T. (2016). Development of skin flaps for reconstructive surgery: random pattern flap to perforator flap. *The Journal of Medical Investigation*, 63(3.4), 159-162.
47. Francis, A. and Baynosa, R. C. (2017). Hyperbaric oxygen therapy for the compromised graft or flap. *Advances in Wound Care*, 6(1), 23-32.
48. Zhou, K. L., Zhang, Y. H., Lin, D. S., Tao, X. Y. and Xu, H. Z. (2016). Effects of calcitriol on random skin flap survival in rats. *Scientific reports*, 6(1), 18945.
49. Xu, H., Timares, L., and Elmets, C.A. (2019). Host defenses in skin. In R.R. Rich, T.A. Fleisher, W.T. Shearer, H.W. Schroeder Jr, A.J. Frew, and C.M. Weyand (Eds.), *Clinical immunology e-book: Principles and practice*. Amsterdam: Elsevier, 273-283.
50. Horng, H. C., Chang, W. H., Yeh, C. C., Huang, B. S., Chang, C. P., Chen, Y. J. and Wang, P. H. (2017). Estrogen effects on wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2325.
51. Lindley, L. E., Stojadinovic, O., Pastar, I. and Tomic-Canic, M. (2016). Biology and biomarkers for wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 138(3), 18.
52. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), 585-601.
53. Ghosh, B., Mukhopadhyay, M. and Bhattacharya, D. (2021). Biopolymer-based nanofilms for the treatment of burn wounds. In *Biopolymer-Based Nano Films*, 311-336.
54. Davis, J. and McLister, A. (2016). Sensors for Detecting and Combating Wound Infection. *Smart Bandage Technologies: Design and Application*, 8(1), 195.
55. Phillipson, M. and Kubes, P. (2019). The healing power of neutrophils. *Trends in Immunology*, 40(7), 635-647.
56. Brancato, S.K. and Albina, J.E. (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *The American Journal of Pathology*, 178(1), p. 19-25.

57. Lau, K., Paus, R., Tiede, S., Day, P. and Bayat, A. (2009). Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatology*, 18(11), 921-933.
58. Li, J., Zhang, Y. P. and Kirsner, R. S. (2003). Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy Research and Technique*, 60(1), 107-114.
59. Landén, N.X., Li, D. and Stähle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 3861-3885.
60. Ribatti, D. (2013). Angiogenesis. In S. Maloy, and K. Hughes (Eds.), *Brenner's encyclopedia of genetics* (Second Edition). Cambridge: Academic Press, 130-132.
61. Favier, J. and Corvol, P. (2001). Physiological angiogenesis. *Thérapie*, 56(5), 455-463.
62. Grazul-Bilska, A. T., Johnson, M. L., Bilski, J. J., Redmer, D. A., Reynolds, L. P., Abdullah, A. and Abdullah, K. M. (2003). Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today*, 39(10), 787-800.
63. Semenza, G. L. (2013). *Regulation of gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. In W.J. Lennarz, and M.D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of biological chemistry* (Second Edition). Cambridge: Elsevier Academic Press, 67-71.
64. Martini, L. (Ed.) (2004). *Encyclopedia of endocrine diseases*. Cambridge: Elsevier Academic Press.
65. Chao, Y., Zhong, Z. F., Sheng-Peng, W., Chi-Teng, V., Bin, Y. and Yi-Tao, W. G. (2021). HIF-1: Structure, biology and natural modulators. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 19(7), 521-527.
66. Hong, W. X., Hu, M. S., Esquivel, M., Liang, G. Y., Rennert, R. C., McArdle, A. and Longaker, M. T. (2014). The role of hypoxia-inducible factor in wound healing. *Advances in Wound Care*, 3(5), 390-399.
67. De, P., Dey, N., and Leyland-Jones, B. (2013). *Growth factor and signaling networks*. In S. Maloy, and K. Hughes (Eds.), *Brenner's encyclopedia of genetics* (Second Edition). Cambridge: Academic Press, 365-369.
68. Norman, A.W. and Henry, H.L. (2014). *Hormones* (Third Edition). Cambridge: Academic Press.
69. Ha, C.E., and Bhagavan, N.V. (2011). *Essentials of medical biochemistry: With clinical cases*. Cambridge: Academic Press.
70. Norman, A.W., and Litwack, G. (1987). *Cell growth factors*. In A.W. Norman, and G. Litwack (Eds.), *Hormones*. Cambridge: Elsevier Academic Press, 719-748.
71. Brill, A., and Varon, D. (2007). Angiogenesis. In A.D. Michelson (Ed.), *Platelets* (Second Edition). Cambridge: Academic Press, 757-768.

72. Alcorn, J.L. (2003). Cell-to-cell interactions in lung. In R.A. Bradshaw, and E.A. Dennis (Eds.), *Handbook of cell signaling*. Cambridge: Academic Press, 509-514.
73. Sinno, H. and Prakash, S. (2013). Complements and the wound healing cascade: An updated review. *Plastic Surgery International*, 2013, 146764.
74. Schultz, G., Clark, W. and Rotatori, D. S. (1991). EGF and TGF- α in wound healing and repair. *Journal of Cellular Biochemistry*, 45(4), 346-352.
75. Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M. S., Ehrlich, H. P. and Brem, H. (2009). The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, 153(2), 347-358.
76. Iruela-Arispe, M. L., and Lee, S. (2010). Mechanisms underlying context-dependent VEGF signaling for distinct biological responses. In R.A. Bradshaw, and E.A. Dennis (Eds.), *Handbook of cell signaling*. Cambridge: Elsevier Academic Press, 1919-1925.
77. Fitzgerald, K. A., O'Neill, L.A., Gearing, A.J. and Callard, R.E. (2001). *The cytokine factsbook and webfacts* (Second Edition). Cambridge: Elsevier Academic Press, 498-504.
78. Apte, R. S., Chen, D. S. and Ferrara, N. (2019). VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development. *Cell*, 176(6), 1248-1264.
79. Baskova, I. P., Zavalova, L. L., Basanova, A. V. and Sass, A. V. (2001). Separation of monomerizing and lysozyme activities of destabilase from medicinal leech salivary gland secretion. *Biochemistry*, 66, 1368-1373.
80. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
81. Tan, W. S., Arulselvan, P., Ng, S. F., Mat Taib, C. N., Sarian, M. N. and Fakurazi, S. (2019). Improvement of diabetic wound healing by topical application of Vicenin-2 hydrocolloid film on Sprague Dawley rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1), 1-16.
82. Mao, Y., Zhang, D. W., Wen, J., Cao, Q., Chen, R. J., Zhu, J. and Feng, Z. Q. (2012). A novel LMP1 antibody synergizes with mitomycin C to inhibit nasopharyngeal carcinoma growth in vivo through inducing apoptosis and downregulating vascular endothelial growth factor. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2), 2208-2218.
83. Yun, I. S., Kim, Y. S., Roh, T. S., Lee, W. J., Park, T. H., Roh, H. and Rah, D. K. (2017). The effect of red ginseng extract intake on ischemic flaps. *Journal of Investigative Surgery*, 30(1), 19-25.
84. Kirkil, C., Yigit, M. V., Özercan, I. H., Aygen, E., Gültürk, B. ve Artas, G. (2016). The effect of ozonated olive oil on neovascularization in an experimental skin flap model. *Advances in Skin & Wound Care*, 29(7), 322-327.

85. Garoufalia, Z., Papadopetraki, A., Karatza, E., Vardakostas, D., Philippou, A., Kouraklis, G. and Mantas, D. (2021). Insulin-like growth factor-I and wound healing, a potential answer to non-healing wounds: A systematic review of the literature and future perspectives. *Biomedical Reports*, 15(2), 1-5.
86. Fırat, C. ve Bekircan, K. (2020). *Sıçanlarda flepte oluşan iskemi-reperfüzyon hasarında süllük ve ozon uygulamasının etkilerinin araştırılması*. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje 2020-2021, İnönü Üniversitesi, Malatya.
87. Lee, C., Mehran, R. J., Lessard, M. L. and Kerrigan, C. L. (1992). Leeches: controlled trial in venous compromised rat epigastric flaps. *British Journal of Plastic Surgery*, 45(3), 235-238.
88. Lozano, D. D., Stephenson, L. L. and Zamboni, W. A. (1999). Effect of hyperbaric oxygen and medicinal leeching on survival of axial skin flaps subjected to total venous occlusion. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 104(4), 1029-1032.
89. Darestani, K. D., Mirghazanfari, S. M., Moghaddam, K. G. and Hejazi, S. (2014). Leech therapy for linear incisional skin-wound healing in rats. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 7(4), 194-201.
90. Zakian, A., Ahmadi, H. A., Keleshteri, M. H., Madani, A., Tehrani-Sharif, M., Rezaie, A. and Pasha, M. B. M. (2022). Study on the effect of medicinal leech therapy (*Hirudo medicinalis*) on full-thickness excisional wound healing in the animal model. *Research in Veterinary Science*, 153, 153-168.
91. Moosavian, H. R., Mirghazanfari, S. M. and Moghaddam, K. G. (2014). Effect of ischemia preconditioning and leech therapy on cutaneous pedicle flaps subjected to prolonged ischemia in a mouse model. *Aesthetic Plastic Surgery*, 38, 1024-1029.
92. Mousavi, S. A., Ghasemi, M., Mousavi, S. J., Mousavi Darka, S. S. and Bagheri, V. (2016). Comparison of leeching and heparin therapy in management of acute venous congestion of limbs in rat. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 2(3), 25-30.
93. Amani, L., Motamed, N., Ardakani, M. M., Shasaltaneh, M. D., Malek, M., Shamsa, F. and Amin, M. (2021). Semi-solid product of medicinal leech enhances wound healing in rats. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(4).
94. Cottler, P. S., Gampper, T. J., Rodeheaver, G. T. and Skalak, T. C. (1999). Evaluation of clinically applicable exsanguination treatments to alleviate venous congestion in an animal skin flap model. *Wound Repair and Regeneration*, 7(3), 187-195.
95. Schlaudraff, K. U., Bezzola, T., Montandon, D., Pepper, M. S. and Pittet, B. (2008). Mixed arterio-venous insufficiency in random skin flaps in the rat: is the application of medicinal leeches beneficial?. *Journal of Surgical Research*, 150(1), 85-91.
96. Liu, X., Wang, Q., Cui, Y., Li, X. and Yang, H. (2020). In-depth transcriptomic and proteomic analyses of the hippocampus and cortex in a rat model after cerebral ischemic injury and repair by Shuxuetong (SXT) injection. *Journal of Ethnopharmacology*, 249, 112362.

97. Davoodi, F., Taheri, S., Raisi, A., Rajabzadeh, A., Zakian, A., Hablolvarid, M. H. and Ahmadvand, H. (2021). Leech therapy (*Hirudo medicinalis*) attenuates testicular damages induced by testicular ischemia/reperfusion in an animal model. *BMC Veterinary Research*, 17, 1-15.
98. Wang, X., Niu, M., Wu, S. N., Liu, X. Y., Ma, S. Y., Liu, J. and Ma, L. (2019). Leeches attenuate blood hyperviscosity and related metabolic disorders in rats differently than aspirin. *Journal of ethnopharmacology*, 238, 111813.
99. Han, J., Pang, X., Zhang, Y., Peng, Z., Shi, X. and Xing, Y. (2020). Hirudin protects against kidney damage in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats by inhibiting inflammation via P38 MAPK/NF- κ B pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 3223-3234.
100. Jose, M., Varghese, J. and Babu, A. (2015). Salvage of venous congestion using medicinal leeches for traumatic nasal flap. *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery*, 14, 251-254.
101. Gustafsson, J., Lidén, M. and Thorarinsson, A. (2016). Microsurgically aided upper lip replantation—case report and literature review. *Case Reports in Plastic Surgery and Hand Surgery*, 3(1), 66-69.
102. Facchin, F., Lancerotto, L., Arnež, Z. M., Bassetto, F. and Vindigni, V. (2018). Leeching as salvage venous drainage in ear reconstruction: clinical case and review of literature. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, 6(11).
103. Tachi, K., Mori, M., Tsukuura, R. and Hirai, R. (2018). Successful microsurgical lip replantation: Monitoring venous congestion by blood glucose measurements in the replanted lip. *JPRAS Open*, 15, 51-55.
104. Yingxin, G., Guoqian, Y., Jiaquan, L. and Han, X. (2013). Effects of natural and recombinant hirudin on VEGF expression and random skin flap survival in a venous congested rat model. *International Surgery*, 98(1), 82-87.
105. Tırık, N. ve Ünal, K. (2022). *Farklı hücre hatlarında tıbbi sülük salgı ekstraktının in vitro etkisinin araştırılması*. Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje 2021-2022, Gazi Üniversitesi, Ankara, 1-2.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 22.07.2022-E.415111



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-415111
Konu : Değerlendirme ve Onay

22.07.2022

Sayın Doç. Dr. Kübranur ÜNAL
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Kübranur ÜNAL, Mehmet Emre EROL, Erkan DENİZ, Duygu DAYANIR, Hüseyin AYHAN, Leyla MAMMADOVA ve Kemal FİNDİKÇİOĞLU'ndan oluşan, G.Ü.ET-22.081 kod numaralı ve "*Flap Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Tıbbi Sülük ve Tıbbi Sülük Salgı Ekstraktı Uygulamasının Etkilerinin Araştırılması*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-22.081 and entitled "*Investigation of the Effects of Medicinal Leech and Medicinal Leech Saliva Extract in Rats With Flap Model*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Sıçan Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 48

Prof. Dr. Mustafa ARSLAN
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Belge Doğrulama Kodu :BSU0YR8852

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/gazi-universitesi-etys>

Emniyet Mahallesi Bandırma Caddesi No 6/1 06560 Yenimahalle/ANKARA
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :ladyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://ladyek.gazi.edu.tr/
Kep Adresi :gaziuniversitesi@h01.kep.tr

Bilgi için :Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:202 20 57



Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Onay Belgesi

Karar Tarih ve Sayısı: 22.07.2022-E-418111 GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ
--

TOPLANTI TARİHİ : 21/07/2022	TOPLANTI SAYISI : 07
ADI-SOYADI	
Prof.Dr.Mustafa ARSLAN (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.İlker ŞEN	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTCU	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.İpek SÜNTAR	
Prof.Dr.Serkan YAVUZ	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER	
Doç.Dr.Elvan ANADOĞ	
Doç.Dr.Yeliz KILINÇ	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Öğr.Gör.Dr.Şevki Mustafa DEMİRÖZ	
Öğr.Gör.Dr.Zeliha Aycan ÖZDEMİRKAN	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : EROL, Mehmet Emre
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı	Devam Ediyor
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi/ Fen- Edebiyat Fakültesi/ Biyoloji (İngilizce)	2017
Lise	İstanbul Fatih Vatan Lisesi	2012

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. "Tıbbi Sülük Tedavisinin Bilimsel Değeri", Anadolu Tıbbi Dergisi, cilt.1, sa.3, ss.37-45, 2022
2. "The Investigation of Effects of Medicinal Leech Saliva Extract on the Breast Fibroblast Cell Line *in vitro*: An Experimental Study' J Tradit Complem Med. DOI: 10.5336/jtracom.2022-92875
3. "Literature Review on the Effectiveness of Medicinal Leech Therapy in the Wound Healing." Ankara Medical Journal 23.1 (2023).
4. Tıbbi Sülük Salgısının Biyokimyası, "Sağlık & Bilim 2022 Medikal Araştırmalar-IV", Karaman Onur, Editör, Efe Akademik Yayıncılık, İstanbul, Ss.215-228, 2022. Uluslararası Kitapta Bölüm Yazarlığı

Sözlü Bildiriler

1. "Effects of Lyophilized Leech Saliva Extract on *in vitro* Cell Migration and Apoptotic/ Necrotic Cell Death on the Human Breast Cancer Cell Line (MDA-MB-231)".

International Conference of Biochemists and Molecular Biologists in Bosnia and Herzegovina – ABMBBIH Conference 2023, Sarajevo, Bosna-Hersek, 18 - 20 Mayıs 2023, cilt.7

2. “Investigating the Effects of Medicinal Leech and Medicinal Leech Saliva Extract Application on Rats with Flap Model” - Ankara International Congress On Scientific Research-VIII, Ankara, Türkiye, 9 - 11 Haziran 2023

Sertifikalar

1. Deney Hayvanları Kullanımı Sertifikası



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

