

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ A.D**

**UZUN RANDOM PATERNLİ DERİ
FLEPLERİNİN YAŞAYABİLİRLİĞİNDE
TİMOKİNONUN ETKİSİ**

DENEYSEL ÇALIŞMA

**UZMANLIK TEZİ
DR GÜLSÜM ÇEBİ**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. YAĞMUR AYDIN**

**İSTANBUL
TEMMUZ 2014**

ÖNSÖZ

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum asistanlık eğitimim boyunca, birlikte çalışma şansına eriştiğim, bilgi ve deneyimlerini aktararak yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Muzaffer Altındaş, Prof Dr. M. Zeki Güzel, Prof. Dr. Oğuz Çetinkale, Prof. Dr O. Akın Yücel ve Doç. Dr Arif Türkmen'e sonsuz teşekkürlerimi arz ederim. Eğitim sürecimde yalnızca bilgi birikimini ve bilimsel tecrübelerini paylaşmakla kalmayıp her daim desteklerini hissettiren değerli abilerim Doç. Dr Hakan Arslan ve Uzm. Dr Semih Bağhaki'ye teşekkür ederim.

Asistanlığımın ilk gününden itibaren benden destek, birikim ve hoşgörülerini esirgemeyen tez sayın hocam, tez danışmanım Prof. Dr Yağmur Aydın'a, tez çalışması için yaptıkları katkılardan Gayrettepe Florence Nightingale hastanesi Patoloji Bölümü Prof Dr.Gülen Bülbül Doğusoy'a, Cerrahpaşa Tıp fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Prof. Dr.Dildar Konukoğlu'na, Dr. Eda Merve Kurtuluş'a, tezimin deney aşamasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Dr. Tuğba Feryal Yıldız'a, Dr. Hasan Kömürcü'ye, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Bölümü Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca acı tatlı pek çok şeyi paylaştığımız asistan arkadaşlarıma, servis, yanık ünitesi, poliklinik ve ameliyathanemizin değerli hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde desteğini esirgemeyen aileme, evimi ve tüm asistanlık hayatımı paylaştığım Dr. Nazan Değirmenci'ye, Dr. Gülin Haroğlu'na teşekkür ederim.

Dr.Gülsüm ÇEBİ

İstanbul 2014

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	5
TABLolar DİZİNİ.....	6
KISALTMALAR.....	6
ÖZET.....	8
ABSTRACT.....	9
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	10
2.. GENEL BİLGİLER	
2.1. Flep Tanımı.....	10
2.2. Tarihçe.....	11
2.3. Derinin Yapısı.....	14
2.4. Derinin Kan Dolaşımı.....	15
2.5. Deri Fleplerinin Sınıflandırılması.....	18
2.6.Flep Fizyolojisi.....	19
2.6.1. Flep kaldırılması sonrasında flepte meydana gelen değişiklikler.....	20
2.6.2 Flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik işlemler.....	24
2.6.3Antioksidanların etki mekanizmaları.....	26
2.6.4.Thymoquinone.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	
3.1 Anestezi tekniği.....	30
3.2. Cerrahi Yöntem.....	30
3.3.Sonuçların Değerlendirilmesi.....	33

3.3.1 Klinik Değerlendirme.....	33
3.3.2. Histopatolojik Değerlendirme.....	33
3.3.3. Biyokimyasal Değerlendirme.....	34
3.3.4 İstatistiksel Değerlendirme.....	37
4. SONUÇLAR	
4.1 Alan Öçümleri.....	37
4.2. Biyokimyasal Analizler.....	40
4.3. Histopatolojik İnceleme Sonuçları.....	43
5. TARTIŞMA.....	47
6.SONUÇ.....	51
7.KAYNAKLAR.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1: Rekonstrüksiyon merdiveni
- Şekil 2: Rekonstrüksiyon üçgeni
- Şekil 3: Derinin yapısı
- Şekil 4: Mathes Nahai sınıflaması
- Şekil 5: Nakajima sınıflaması
- Şekil 6: Kapiller yatakta arteriovenöz akım.
- Şekil 7: İlerletme ve rotasyon flebi
- Şekil 8: Ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi
- Şekil 9: Hücre içi kalsiyum yüklenmesi
- Şekil 10: Bipediküllü flep geciktirme
- Şekil 11: Geciktirme işlemi ile choke anastomozların açılması
- Şekil 12: Timokinon un kimyasal yapısı
- Şekil 13: Mc Farlane random sıçan deri flebi
- Şekil 14: Flep taslağının hazırlanması
- Şekil 15: Flebin kaldırılması ve yerine iade edilmesi.
- Şekil 16: Thymoquinone ticari formu
- Şekil 17: Image J programında alan ölçümü
- Şekil.18: MDA-TBA birleşigi
- Şekil 19: Elisa ile TAC çalışması
- Şekil.20: Total antioksidan kapasite ölçümü
- Şekil.21: günde fleplerde nekrotik alanların görünümü
- Şekil 22 : Gruplara Göre Nekroz Alanları Dağılımı
- Şekil 23 : Gruplara Göre Nekroz Yüzdesi Dağılımı
- Şekil 24: Gruplara Göre Doku ve serum TBARS Dağılımı
- Şekil 25: Gruplara Serum ve doku TAK Dağılımı
- Şekil 26: Flep proksimalinde PNL infiltrasyonu

Şekil 27: Flep distalinde lenfosit infiltrasyonu

Şekil 28: Flep distalinde fibroblast proliferasyonu

Şekil 29: Flep distalinde kollajen oluşumu

Şekil 30: Kollajen oluşumu bulgularının gruplara göre dağılımı

Şekil 31: Flep proksimalinde anjiogenez

Şekil 32: Flep distalinde anjiogenez

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1: Flep cerrahisinin tarihi gelişimi

Tablo 2. Gruplara göre Alan ölçümleri değerlendirmeleri

Tablo 3. Gruplara göre TBARS ve TAK değerlendirmeleri

Tablo 4 . Gruplara göre histopatoloji değerlendirmeleri

KISALTMALAR

DMSO: Dimetil Sülfüsit

MDA: Malondialdehid

M.Ö: Milattan önce

TxA₂: Tromboksan A₂

PGF_{2α}: Prostaglandin F 2 alfa

PGE₁: Prostaglandin E₁

PGI₂: Prostasiklin

LTD₄: Lökotrien D₄

LTC₄: Lökotrien D₄

LTB₄: Lökotrien B₄

ATP:Adenozin Trifosfat

cAMP:Siklik Adenozin Monofosfat

DNA:Deoksiribonükleik asit

O₂: Oksijen

H₂O₂:Hidrojen dioksit

OH:Hidrojen peroksit
AMP:Adenozin Monofosfat
NADPH: Nikotinamid Adenin Difosfat
MPO: Myeloperoksidaz
H: Hidrojen
Na: Sodyum
Ca: Kalsiyum
VEGF: Vasküloendotelyal Growth Faktör
FGF: Fibroblast Growth Faktör
PDGF: Platelet Derived Growth Faktör
NSAİİ: Non steroid antiinflamatuvar ilaç
GSH: Glutasyon
DHTQ:dihidrotimokinon
ABTS: 3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonik asit
PNL: Polimorf nüveli lökosit
HRP: Horseradish peroxidase
TBARS: Tiobarbitürik Asit Reaktif Substrat
KCl: Potasyum Klörür
TBA:Tiyobarbitürik asit
TCA: Trisiklik asit
HCL: Hidroklorik asit
TEP: tetraethoksi propan
TAK:Total Antioksidan Kapasite
ELISA: Enzim linked immünosorbent assay
NCSS: Number Cruncher Statistical System
TRAM: Transvers Rectus Abdominis Muscle
PASS: Power Analysis and Sample Size

ÖZET

RANDOM PATERNLİ DERİ FLEPLERİNİN YAŞAYABİLİRLİĞİNDE TİMOKİNONUN ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK ARAŞTIRILMASI

Giriş Ve Amaç: Deri defektlerinin kapatılmasında lokal flepler doku uyumu ve kolay uygulanabilirliği nedeni ile sıklıkla tercih edilmektedir. Bu fleplerin özellikle random beslenme paternli olanlarında distal kısımda perfüzyon yetersizliğine bağlı gelişen nekroz önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu da tedavi süresini uzatmakta ve ikincil cerrahi girişimlere ihtiyaç doğurmaktadır. Cerrahi geciktirme yöntemleri ve çeşitli farmakolojik ajanlarla flep yaşayabilirliğini artırmaya yönelik çok sayıda çalışmalar yapılmıştır ve değişik oranlarda başarı elde edilmiştir. Antioksidan ajanların serbest radikalleri yok etmek yolu ile flep yaşayabilirliğini arttırdığı bilinmektedir.

Bu deneysel çalışmanın amacı antioksidan özelliği bilinen thymoquinonun random flep yaşayabilirliği üzerine olası etkilerini göstermek ve bu sayede bu fleplerin klinik kullanımını arttırmaktır.

Materyal Ve Metod: Çalışmada ağırlıkları 200–250 gram arası değişen 24 adet Sprague Dawley cinsi dişi albino sıçan kullanıldı. Kontrol, sham ve deney grubu olmak üzere rastgele seçilmiş 8'er sıçandan oluşan 3 grup oluşturuldu. Sıçanlarda 3x9 cm.lik modifiye McFarlane flep modeli kullanıldı. Kontrol grubuna flep elevasyonu sonrası 10 gün boyunca sadece yara bakımı yapıldı. Sham grubundaki sıçanlara post operatif dönemde 10 gün boyunca intraperitoneal DMSO solüsyonu, deney grubuna 10 gün boyunca intraperitoneal thymoquinone enjekte edildi. 10 gün sonra deney sonlandırılarak fleplerde alan ölçümü için fotoğraflama, biyokimyasal inceleme için serum ve doku, histopatolojik inceleme için doku örnekleri alındı. Fleplerde nekroz alanları, inflammatuar hücre, kollajen, fibroblast yoğunluğu, anjiogenez, serum ve doku total antioksidan kapasite ve lipid peroksidasyon yıkım ürünü olan MDA düzey ölçümleri yapıldı.

Bulgular: Çalışma verileri değerlendirilirken biyokimyasal veriler ve alan ölçümlerinin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi, histopatolojik değerlerin karşılaştırılmasında Fisher Freeman Halton Exact test kullanıldı. Deney grubunda nekroz alanlarında diğer gruplara göre anlamlı derecede azalma tespit edildi. Biyokimyasal incelemelerde serum ve doku örneklerinde total antioksidan kapasitede anlamlı artış ve MDA düzeylerinde anlamlı azalma tespit edildi. Histopatolojik incelemelerde inflammatuar hücre düzeyinde, fibroblast oluşumunda, anjiogenezde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi. Deney grubunda kollajen yoğunluğu daha fazla ve kollajen yapısının daha düzenli olduğu görüldü.

Sonuç: Thymoquinonun antioksidan etkinlik göstererek flep yaşayabilirliğini arttırdığı ve anlamlı antiinflammatuar, anjiogenetik etki göstermemekle birlikte yara iyileşmesine olumlu katkı sağladığı çalışmamızda gösterilmiştir. Thymoquinon'un gelecekte klinikte yüksek riskli vakalarda distal flep nekrozunu azaltma amaçlı kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

ABSTRACT

Introduction : Local flaps are frequently preferred in the closure of skin defects due to better tissue compatibility and ease of application, However, tissue necrosis in distal portions of the flaps caused by insufficient vascular perfusion, especially in random patterned flaps, is still a major drawback. It may increase the duration of treatment and cause the need for secondary surgeries. Many clinical and experimental studies, including surgical delay methods and various pharmacological agents, have been carried out to improve the viability of skin flaps, with various success degrees. Antioxidants are known to increase flap viability by destroying free radicals.

The purpose of this study is to demonstrate the potential effects of thymoquinone, a well known antioxidant agent, on random flap viability and thus to improve the clinical use of these flaps.

Material and Methods: In this study, 24 Sprague Dawley female albino rats weighing between 200-250 grams were used. Three groups consisting of randomly selected 8 rats were formed, as study, sham and control groups. Modified McFarlane flap model sized 3x9 cm. was used. In control group, only local wound care was carried out for ten days after flap elevation. In sham group, daily intraperitoneal DMSO solution was injected in the post operative 10 day period. In the study group thymoquinone and DMSO solution were injected intraperitoneally together. 10 days later, the study was terminated and flaps were photographed for necrotic area measurements, tissue and blood samples were taken out for biochemical and histopathological studies. In biochemical studies, tissue and serum total antioxidant capacity and MDA levels were measured, as a degradation product of lipid peroxidation. Histopathological studies included inflammatory cell infiltration, collagen, fibroblasts formation and, angiogenesis.

Results: Data from the necrotic area measurements and biochemical analysis were evaluated with Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test. Fisher Freeman Halton Exact test was used for comparison of histopathological analysis results. There were significant decrease in the necrotic areas of flaps in the study group. Serum and tissue antioxidant levels were significantly high and MDA levels were significantly low. Histopathological examination showed no significant difference in inflammatory cell infiltration, fibroblast formation or angiogenesis between the groups. However collagen density in the study group were found to be more than the other groups and the structure was betterly formed.

Conclusion: Thymoquinone increases the flap viability due to its antioxidant properties and it has a positive contribution on wound healing although it has no significant anti-inflammatory or angiogenetic activity. In the future, we think that it can be clinically useful for preventing distal flap necrosis in patients with high risk.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Random paternli cilt flepleri kolay uygulanabilirliği nedeni ile cilt defektlerinin lokal dokular ile kapatılmasında sıkça kullanılmaktadır. Ancak özellikle uzun deri flepleri kaldırılırken distal flep nekrozu önemli bir problem olarak karşımıza çıkmakta ve bu nedenle belirli bir en-boy oranına sadık kalınarak kaldırılması gerekmektedir . Bu da random paternli fleplerin klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Random fleplerin yaşayabilirliğini artırmak için birçok deneysel ve klinik çalışma yapılmıştır.

Thymokinon; Nigella Sativa bitkisinden elde edilen anti-oksidan, anti- inflamatuvar, antikanserojen etkileri gösterilmiş bir maddedir ¹. Anti-oksidan etkisi nedeni ile daha önce kas fleplerinde iskemi reperfüzyon hasarına yönelik pozitif etkisi gösterilmiş² olan maddenin random fleplere etkisi üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu deneysel çalışmanın amacı thymokinon maddesinin random cilt fleplerinin sağ kalımında olası olumlu etkisini göstermek ve bu sayede bu fleplerin klinik kullanımını artırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Flep Tanımı

Flep, doku defektlerinin onarımı amaçlı vücudun çeşitli bölgelerinden hazırlanabilen, kendine ait besleyici arter ve veni bulunan cilt, ciltaltı, fasya, kas, kemik dokularını tek başına ya da kompozit olarak içerebilen doku parçasıdır. Flebin alındığı bölgeye verici (donör), flebin nakledildiği alana alıcı alan adı verilir. Flebi besleyen damarlara pedikül adı verilir. Flepler, kendilerine ait besleyici damarları bulunması nedeniyle genel olarak kanlanması yetersiz olan defekt alanlarına(deperioste kemik, perikondriumsuz kıkırdak) nakledilmekle beraber kas, kemik, sinir gibi yapıların transferine imkan sağladığı için fonksiyonel rekonstrüksiyon amaçlanan durumlarda (total alt dudak defekti, fasyal paralizi) da tercih edilmektedirler^{3,4,5}

2.2.Tarihçe

Rekonstrüktif cerrahide fleplerin kullanımı M.Ö. 600 ‘lü yıllara dayanmaktadır. Sushruta Samshita adlı Hint cerrahi kitabında pediküllü fleplerin burun defektlerinde kullanımına ait ilk kayıtlara rastlanmıştır^{6,7}. Gaspere Tagliacozzi 1597 yılında ilk plastik cerrahi kitabını yayınlamış ve bu kitapta iki aşamalı kol flebi ile burun defektlerinin onarımını detayları ile açıklamıştır⁸. Kullanılan ilk flepler subdermal vasküler pleksus dışında herhangi bir besleyici damar içermediğinden bu gün random flepler olarak adlandırılmaktadır. Bu ilk flepler daha çok sekonder iyileşmenin zor ve problemli olduğu baş, boyun, alt ekstremité bölgelerinde yoğunlaşmıştı.

19. yy da İngiliz cerrah Carpué alın flebinin burun rekonstrüksiyonunda kullanımını yayınlamış olan tekniği yeniden popülerize etmiştir⁹. 1818 de Von Grafe nin Rhinoplastik isimli yayınında bu teknikler ileriye taşınmıştır¹⁰.

1900 lü yılların erken döneminde tubularize random fleplerin kullanımı ön planda olmuştur. Bu dönemde yayınlanan, Gilles ve Filatov’a atfedilen makalelerde tubularize fleplerin kullanım teknikleri anlatılmış, ayrıca cerrahi geciktirme yönteminden de bahsedilmiştir. Carl Manchot 1889 da belirli damarlarla beslenen anatomik cilt bölgelerini tanımlamıştır¹¹. Tansini 1906 da latissimus dorsi nin cilt adasını tanımlamıştır¹². Davis 1919 da aksiyel ve pediküllü kas ve fasya fleplerinden, kompozit fleplerden bahsetmiştir¹³.

1950 -70 yılları arasında özellikle baş boyun bölgesinde birçok flep tanımlanmıştır. Mc Gregor ve Morgan 1972 de kasık flebini tanımlamıştır. Kendine ait besleyici damarı bulunan flepleri “aksiyel flep”, diğer flepleri “random flep” olarak tanımlamışlardır. Mc Gregor’un temporal flebi¹⁴, Bakamjian’ın 1965 te deltopektoral flebi¹⁵ tanımlaması baş boyun tümörlerinde eksizyon ile eş zamanlı onarım yaklaşımlarının gelişmesine öncülük etmiştir. Kas flebinin osteomyelite bağlı ektermite defektlerinde kullanımı ilk olarak Stark¹⁶ tarafından tanımlanmış, Ger tarafından popülerize edilmiştir¹⁷.

1972’de Orticochea muskulokutanöz perforan konseptini tanımlamıştır¹⁸. Bunu takiben fleplerin tanımı, ekspansiyon, kas, kas deri fleplerinin kullanımına yönelik çalışmalar yaygınlaşmıştır. Bu çalışmalar kasların anatomisi, rotasyon arkları üzerine yoğunlaşmış, meme , gövde, ekstremité, baş boyun rekonstrüksiyonunda kas kas deri fleplerinin kullanımına katkıda bulunmuştur⁷

1981’de Ponten septokutan perforanların cilt beslenmesine olan katkılarını göstermiş¹⁹ ve bundan yola çıkılarak fasyokutan flepler tanımlanmıştır.

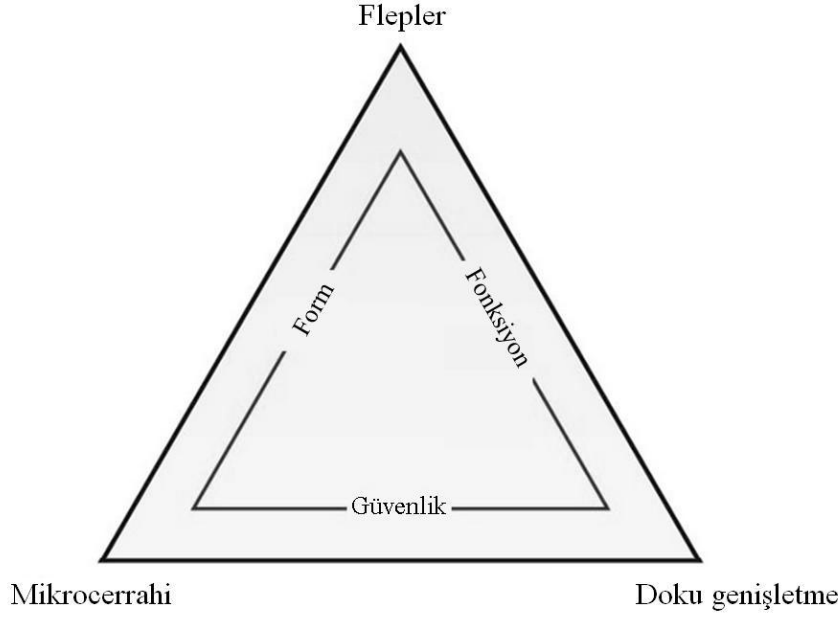
1970 ‘lerin sonundan itibaren flep cerrahisi tekniklerinin hızla gelişimi ile birlikte rekonstrüksiyon yaklaşımlarında da büyük değişiklikler olmuştur. 1982’de tanımlanan rekonstrüktif merdiven²⁰ yumuşak doku onarımında en güvenli onarım yönteminin seçiminde kullanışlı olmaktadır. Damarların kas, fasyokutan seviyeye dek izole edilebilmesi ve cerrahi mikroskopun kullanıma girmesiyle serbest doku nakilleri gündeme gelmiş ve rekonstrüktif cerrahide yeni bir çağ açılmıştır. Taylor, Buncke, Harii, Daniel ve diğerleri öncülüğünde mikrovasküler serbest doku nakilleri gerçekleştirilmiştir

Fasyokutan, muskulokutan vasküler zonların tanımlanması sayesinde doku genişletme yöntemleri ile flep boyutlarının arttırılabilmesi ve donör alanın primer kapatılması mümkün olabilmektedir. Yakın dönemde perforatör flep kavramının tanımlanması ve gelişimi, “free style” flep kavramının, süpermikrocerrahi tekniklerinin gelişmesi ile estetik ve fonksiyonel onarım için ihtiyaca en uygun dokunun uygun boyut ve kalınlıkta minimal donör alan morbiditesi yaratarak transfer edilebilmesi mümkün olmuştur.



Şekil 1:Rekonstrüksiyon merdiveni

1997 de rekonstrüktif üçgen kavramı tanımlanmıştır²¹. Bu kavram alıcı alanda uygun şekil ve fonksiyonu sağlamak için, donör alan morbiditesinden kaçınarak ,güvenlikten taviz vermeyecek şekilde mikrocerrahi, transplantasyon, doku genişletme yöntemlerinden birinin tercih edilmesi prensibine dayanmaktadır.



Şekil 2:Rekonstrüksiyon üçgeni

Flep cerrahisinin gelismisi

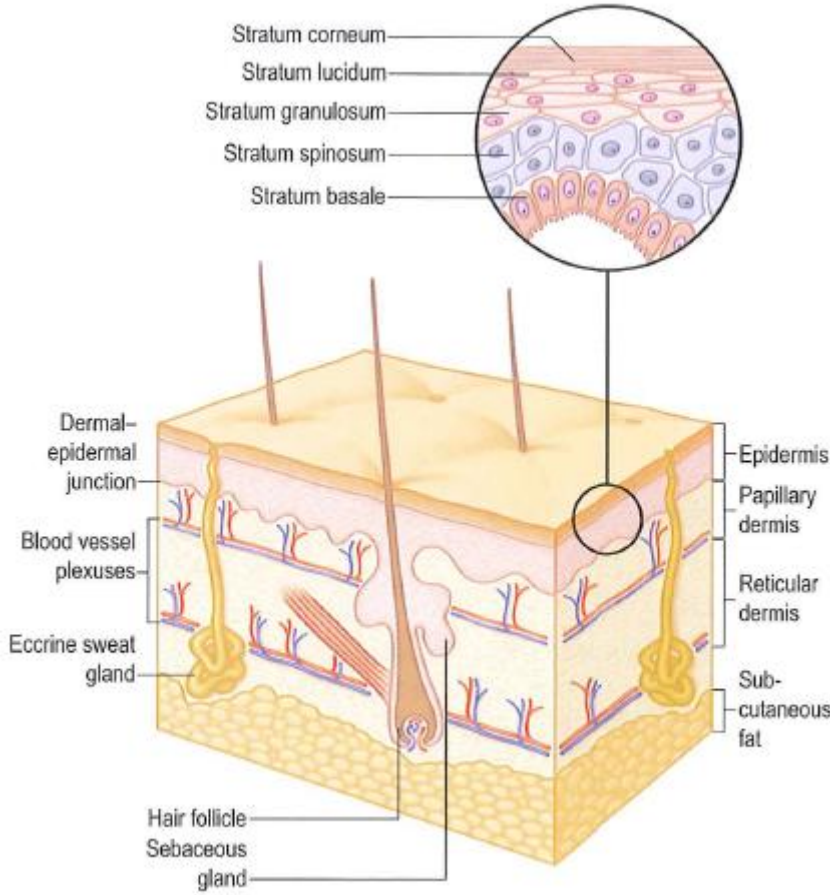
M.ö 600	Sushruta Samhita	Yüz ve alında lokal pediküllü flepler
1597	Tagliacozzi	Tubularize kol flebi ile nazal rekonstrüksiyon
1896	Tansini	Meme rekonstruksiyonunda latissimus dorsi flebi
1920	Gillies	Tubularize pediküllü flep
1946	Stark	Osteomyelit için kas flebi
1955	Owens	Bileşik boyun flebi
1963	Mc Gregor	Temporal flep
1965	Bakamjian	Deltapektoral flep
1971	Ger	Alt ekstremitte muskulokutan flep
1972	Mc Gregor ve Jackson	Kasık flebi
1972	Orticochea	Muskulokutan flepler

1977	McCraw ve ark	Muskulokutanöz zonlar
1981	Mathes ve Nahai	Kas fleplerinin vasküler anatomiye göresınıflandırılması
1981	Ponten	Fasyokutan flepler

Tablo 1:Flep cerrahisinin tarihi gelişimi⁷

2.3.Derinin yapısı

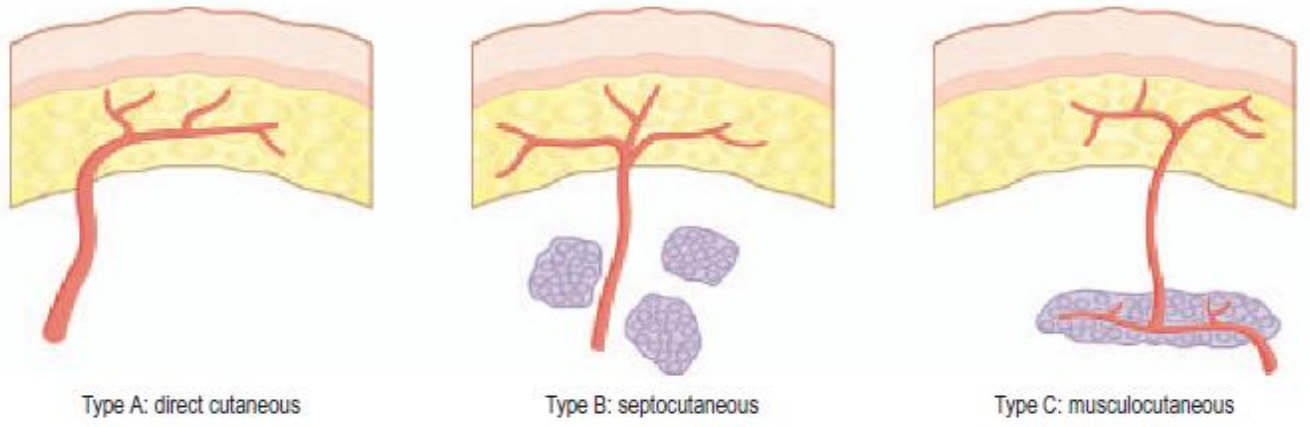
Deri, ektodermden ve mezodermden köken alıp, epidermis, papiller dermis,retiküler dermis ve subkutan dokudan oluşan 4 temel tabakadan oluşur²². Deri, insan vücut ağırlığının yaklaşık %16 sını oluşturur. Derinin kalınlığı anatomik bölgeye göre 1.5-4mm arasında değişim gösterir. Dermis ve epidermis geçiş zonu düzensizdir ve papilla denen uzantılar bulundurur. Dermiste bağ dokusu elemanları, sinirler, lenfatikler, pilosebace, erkin, apokrin glandlar, kas üniteleri bulunur²³. Derinin temel kan akımı hem yüzeysel hem derin vasküler pleksuslar tarafından sağlanır. Derin vasküler pleksus(subdermal)retiküler dermis ile subkutan yağ dokusu arasına yerleşikken, yüzeysel(dermal)vasküler pleksus papiller dermisin yüzeysel dermal papilla kısmında ilerler. Epidermis daha yüksek metabolik aktiviteye sahiptir ve süperfisyal pleksustan difüzyon yolu ile beslenir. Dermal ve subdermal pleksus damarları cilt yüzeyine paralel olarak seyreder ve direkt kutanöz damarlar, derin septokutan ve muskulokutan arterlerden kan alır²².



Şekil 3:Derinin yapısı²²

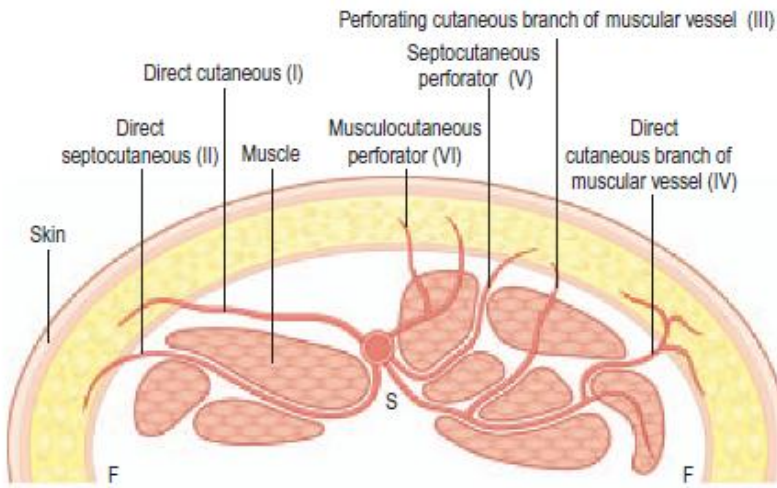
2.4 Derinin kan dolasımı

Cilt kanlanması temelde aortadan çıkan segmenter arterlerdir. Bu arterler fibroz intermuskuler septaları izleyerek, bir kısmı direkt deriye, bir kısmı kasların içine giden dallar verirler. Deriyi besleyen damarlar Mathes ve Nahai tarafından direkt kutanöz, septokutanöz ve muskulokutanöz damarlar olarak 3 gruba ayrılmıştır^{24,25}.



Şekil 4.Mathes Nahai sınıflaması²⁴

Nakajima cildi besleyen damarları 6 gruba ayırmıştır²⁶:



Şekil 5:Nakajima sınıflaması²⁴

- 1.Direkt kutanoz damarlar
- 2.Direkt septokutanoz damar

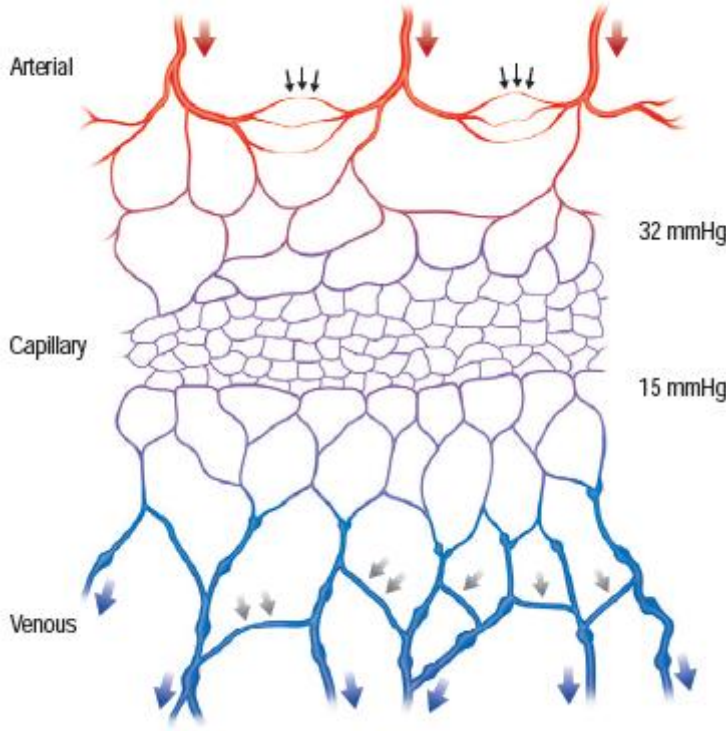
3.Muskuler arterin perforan kutanöz dalı

4.Muskuler arterin direkt kutanöz dalı

5.Septokutan perforator damar

6.Muskulokutan perforator damar

Vücutun belirli bir bölgesindeki deri ve yumuşak dokuları besleyen ana damarların her biri Taylor tarafından kaynak (source) arterler, kaynak arterler tarafından beslenen her bir bölge anjiozom olarak adlandırılmıştır²⁷. Bu anjiozomların kanlanması septokutan, direkt kutanöz ya da muskulokutanöz kaynaklı olabilir. Komsu anjiozomlar değişik seviyelerde oluşan anastomozlarla birbirine bağlanmaktadır. Ian Taylor bu anastomozları "choke" anastomozlar olarak adlandırmıştır. Venöz dolaşım da arteriyel dolaşıma benzer şekilde dağılım göstermektedir. Kan dolaşımının bu şekilde dağılımı sayesinde tek bir arter ve ven pedikülü üzerinde deri, kas, kemik gibi dokuları barındıran kompozit fleplerin kaldırılmasına olanak sağlamaktadır.



Şekil 6:Kapiller yatakta arteriovenöz akım. Küçük oklar “choke” anastomozları göstermektedir⁷.

2.5.Deri Fleplerinin Sınıflandırılması

Flepler kanlanmaları, hareket yöntemi ve doku içeriklerine göre üç ayrı kategoride sınıflandırılabilir²⁸

1. Kanlanmasına göre flepler

A.Random flepler

Belirli bilinen bir besleyici damarı olmadan dermal ve subdermal pleksustan beslenen fleplerdir

B.Aksiyel flepler

Dolaşımı eksenî boyunca seyreden damarlar ile sağlanan fleplerdir.

2.Hareket şekline göre

A.Lokal flepler

- Rotasyon flepleri
- İlerletme flepleri
- İnterpolasyon flepleri

B.Uzak flepler

- Direkt
- Tubularize
- Serbest flepler

3.İçerdiği dokulara göre flepler

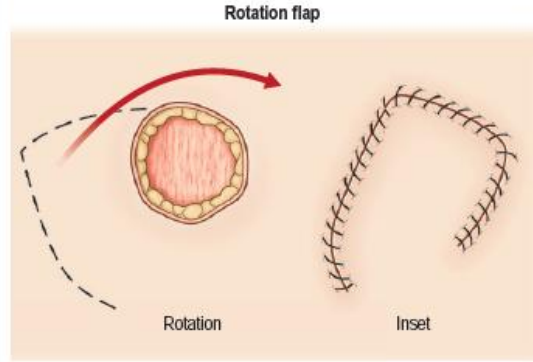
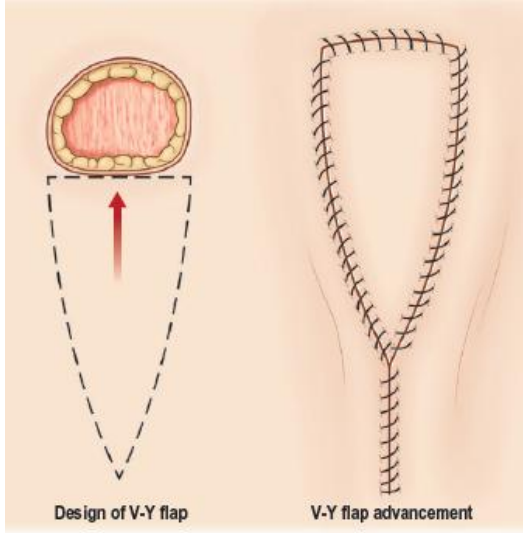
A.Kutanöz flepler

B.Fasyokutan flepler

C.Kas deri flepleri

D.Kas flepleri

E.Kompozit flepler



Şekil

Şekil 7: İlerletme ve rotasyon flebi⁷

2.6.Flep Fizyolojisi

Flepler kendi vasküler kaynağı ile birlikte taşınan dokulardır. Bu nedenle flebin yaşayabilirliğinin sağlanması için flep dolaşımının anlaşılabilmesi ve korunması gerekmektedir. Vücuttaki diğer dokularda olduğu gibi flepte de makrodolaşım ve mikrodolaşım komponentleri mevcuttur. Flebin üzerinde kaldırıldığı ana arter ve ven flebin makrodolaşımının kaynağını oluşturur. Arteriol, kapiller, venül ve arterivenöz anastomozlardan oluşan mikrodolaşım, hücrel metabolizma için gerekli besin, oksijen, karbondioksit ve atık maddelerin değiş tokuş yapılmasından sorumludur ve flep perfüzyonunun kontrolü büyük oranda burada gerçekleşir²⁹.

Taylor, fleplerin kanlanması için deri ve diğer dokularda devamlılık gösteren üç boyutlu bir damar ağı ile sağlandığını göstermiştir²⁷. Damarlar vücudun bağ dokusu çatısını takip ederek ilerlerler. Derinin esas vasküler kaynağı direkt kutanöz arterlerdir. Bunların yanında derin dokuları besleyen arterlerin uç dalları olan çok sayıda küçük damar deriyi indirekt olarak beslemektedir. Derinin başlıca görevlerinden biri olan termoregülasyon arterioller seviyede düzenlenen kan akımındaki artış ve azalma ile sağlanır. Sempatik uyarı prekapiller sfinkterlerin kapanmasına, kan akımının kapiller yatağı by-pass ederek arteriyovenöz anastomozlar aracılığıyla gerçekleşmesine neden olur. Bunun yanında kan basıncı gibi sistemik faktörlerin, endotel, trombositler ve lökositler gibi hücrel faktörlerin de flep dolaşımı üzerine etkileri mevcuttur.

Flep mikrodolaşımının etkinliği besleyici damara olan mesafe ile birebir ilişkili olduğundan belirli bir damar ekseninde kaldırılan aksiyel flepler daha güvenlidir. Random flepler ise dermal veya subdermal pleksustan beslendiğinden daha az güvenlidir ve sınırlı bir en/ boy oranı(1/2-1/4) ile kaldırılmalıdır.

Flep perfüzyonunun düzenlenmesi lokal ve sistemik olmak üzere iki sistem üzerinden gerçekleşir. Sistemik düzenlemede nöral ve humoral mekanizmalar rol oynamakla beraber nöral düzenleme daha baskındır. Nöral düzenleme, sempatik lifler ve α -adrenerjik reseptörlere bağlı vazokonstriksiyon ve β -adrenerjik reseptörlere bağlı vazodilatasyon ile gerçekleşir. Arteriovenöz anastomozlarda yerleşik serotonin reseptörleri de vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Humoral düzenleme ise bir takım sistemik vazoaaktif maddelerin spesifik reseptörler üzerine etkisi ile gerçekleşir. Bunlara örnek olarak vazokonstriksiyona yol açan α -adrenerjik reseptörler üzerine etki eden epinefrin ve norepinefrin, serotonin, Tx A₂ ve PG F₂ α ; vazodilatasyona yol açan PG E₁, PG I₂(prostasiklin), histamin, bradikinin, LT C₄ ve LTD₄ verilebilir²⁹.

Kan akımının lokal kontrolü özellikle iskelet kası gibi metabolik hızı yüksek dokularda önemlidir. Derinin kan akımını etkileyen lokal faktörler içerisinde vazodilatasyona sebep olan asidoz, hipoksi, hiperkapni, sayılabilir. Bir takım fiziksel faktörler de lokal kan akımının düzenlenmesinde rol oynar. Artmış doku perfüzyon basıncı, arteryel perfüzyon basıncından bağımsız şekilde, kapiller kan akımını sabit tutabilmek amacıyla “myojenik refleks”i tetikleyerek vazokonstriksiyona neden olabilir. Lokal hipotermi de benzer şekilde vasküler düz kas hücreleri üzerine direkt etki ederek vazokonstriksiyona ve dolayısıyla lokal kan akımında azalmaya sebep olur.

Endotel, kan akımının düzenlenmesinde hem kan hücreleri ve trombositler üzerine olan etkileri hem de direkt vazoaaktif madde salınımı aracılığıyla önemli bir rol oynamaktadır³⁰.

Flep kaldırma işlemi, doku perfüzyon dengesini bozarak ciddi değişikliklere neden olur. Ani sempatik innervasyonun kaybı vazokonstriksiyon mekanizmalarının aktiflenmesi ile sonuçlanır. Flebe giren damar sayısında ani azalma perfüzyon basıncında düşmeye, bu da flebin periferik kısımlarında akut iskemiye neden olur. Flebin kaldırılmasını takip eden 24 saat içinde mikrodolaşım düzeyinde meydana gelecek değişiklikler bu iskemik bölgelerin ne kadarının hayatta kalacağını belirler. Sonucu belirleyen ana faktörler flebin kaldırılmasını takiben olan hemodinamik, anatomik ve metabolik değişikliklerdir. Akut dönemde flep periferinde gelişen iskemi hem alıcı alandaki inoskölasyon ve neovaskülarizasyon ile hem de gelen kan akımının artışı ile zaman içinde ortadan kalkacaktır²⁹

2.6.1.Flep kaldırılması sonrasında flepte meydana gelen değişiklikler

a)Anatomik değişiklikler

Cerrahi travmanın yarattığı inflamatuvar yanıt sonucu flepte damar sayısı artar, transvers yerleşimli damarlar arasında varolan anastomozlarda dilatasyonlar olur. Bu süreç yaklaşık 2-3 hafta devam eder.4- 5 gün sonra komşu dokulardan ilerleyen yeni damarlar ile flep damarları arasında bağlantılar oluşur.Akut dönemde salınan katekolaminler 30 saat içerisinde ortadan kaybolurlar. Tekrar ortaya çıkmaları yaklaşık 4- 8 hafta sonra reinnervasyonun gelişmesi birlikte olur^{29,31}.

b)Metabolik degisiklikler

Flebin uç kısımlarına ilerledikçe lokal oksijen, ATP ve glukoz düzeyi hızla düşer. Glukoz tüketimi ilk 3 gün en yüksek düzeyde olur. 7. Gün sonunda normale iner. Laktat sentezi artar. cAMP düzeyi akut dönemde düşerken 12 saat sonra canlı kısımlarda artar. Araşidonik asit metabolizması ve trombosit agregasyonunda bozuklular meydana gelir ve ilk 24 saatte fibrinolitik aktivite belirgin olarak azalır^{29,32}.

c)Hemodinamik degisiklikler

Flep pedikülünde kan akımı % 100 iken ilk gün flep distalinde % 18 e düşer. 1. Haftada % 65 ikinci hafta % 75-90a çıkar. Yaklaşık 1 ay içinde normal kan akım düzeyine ulaşır. Flebin kaldırılmasını takip eden ilk 12-18 saat süresince ilerleyen sempatik vazokonstriktörlerin deşarjı, lökosit aracılı endotel hasarı, ve perfüzyon basıncında düşme nedeni ile özellikle distal kısımlarda iskemi olur. Nörotransmitterlerin 12 -24 saatte ortaya çıkması ve 2-3. günde flep yatağından inoskulyasyon gelişmesi ile perfüzyon göreceli olarak düzelir. Uç kısımlardaki iskeminin 6-12 saat sürmesi halinde akımın geri dönmesi reperfüzyon hasarına ve doku nekrozuna yol açar. Fleplerde nekrozun distalde gelişmesinin nedeni kaldırıldıktan sonra flepte doku perfüzyon basıncının distalde en düşük olmasıdır^{29,33}.

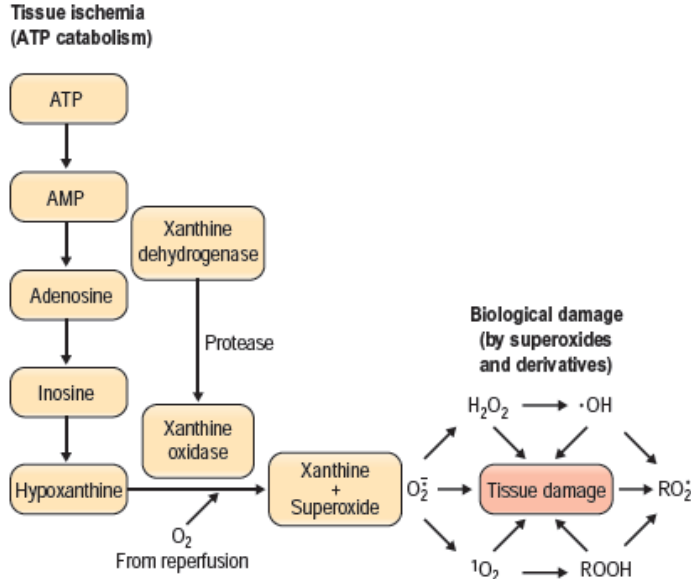
Flep distalinde hipoksi sonucu aerobik metabolizma anaerobik metabolizmaya dönerek süperoksit radikallerin sentezi ile sonuçlanır. Eşleşmemiş elektron taşıyan ve diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girme eğilimi taşıyan atom ve moleküllere serbest radikal adı verilmektedir³⁴. Bu moleküller, kararsız, kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya ihtiyaç duyan ve diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren moleküllerdir. Bir molekülle karşılaştığında onun elektronu ile etkileşerek okside eder ve bu molekülün kendisini de bir serbest radikal haline dönüştürür. Bu şekilde birbirini takip eden zincirleme reaksiyonlar hücre hasarı ile sonuçlanır³⁵. Bu moleküller hücrenin lipit, DNA, karbonhidrat, protein gibi bütün önemli elemanlarının yapılarında bozulmaya neden olurlar. Serbest radikallerin yoğunlukları süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyonun antioksidan aktiviteleri ile düzenlenirler^{36,37}.

Flepte iskemi reperfüzyon hasarına bağlı serbest radikal oluşuma neden olan birkaç mekanizmadan söz edilmiştir³⁸.

1.Ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi

Uzayan iskemide ATP hipoksantine metabolize olur, buna eşzamanlı olarak sitozolik kalsiyum artışı bir sitozolik proteazı aktifleyerek ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Reperfüzyon esnasında ksantin oksidaz hipoksantin varlığında moleküler oksijeni

süperokside dönüştürür. Anstabil süperoksit hidrojen peroksit oluşturur ve hidrojen peroksit ile Fenton reaksiyonu yoluyla etkileşerek güçlü sitotoksik hidroksil radikali oluşturur. Sıçanlarda yapılan deneysel çalışmalarda hipoksantin/ksantin enzim sisteminin oksijen radikallerinin temel kaynaklarından biri olduğu gösterilmişse de insan deri ve kas dokusunda ana oksiradikal kaynağı olmadığı gösterilmiştir³⁸.



Şekil 8. Ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz sistemi³⁸

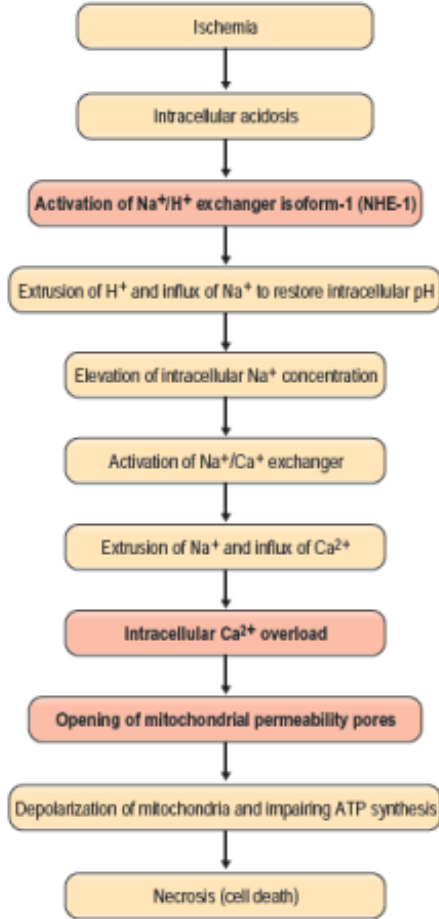
2.Nötrofilik nikotinamid difosfat (NADPH) ve Myeloperoksidaz(MPO) enzim sistemi

Nötrofillerin NADPH oksidaz aracılığı ile büyük miktarda süperoksit ürettiği gösterilmiştir. Nötrofillere özgü ve bolca bulunan myeloperoksidaz hidrojen peroksidin sitotoksik olan hipokloroz aside dönüşümünü katalize eder. Nötrofil endotel adezyon moleküllerine karşı geliştirilen monoklonal antikora uygulanan tedavilerin deneysel çalışmalarda sıçan deri , tavşan kulağı, domuz muskulokutan fleplerde iskemi reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir^{38,39,40,41}.

3.İntrasellüler Kalsiyum yüklenmesi

Uzamış iskemide mitokondrial ATP sentezi durur, glikoliz olur ve sonuçta hücre içi ATP yıkımı, laktat ve intrasellüler H birikimi ile intrasellüler asidoz olur. Bunu kompanse etmek

için NA/H pompası aktive olur ve hücre içine Na girişi, hücre dışına H atılmasına yol açar.İntrasellüler Na artışı Na/Ca pompasını aktive eder ve hücre içi Ca artışı olur. Bu sürecin tekrarlaması halinde hücre içinde kalsiyum yüklenmesi olur , bu da mitokondrial membran depolarizasyonuna ve hücre nekrozuna yol açar^{38,42,43,44}.



Şekil 9.Hücre içi kalsiyum yüklenmesi³⁸

4.“No reflow” fenomeni

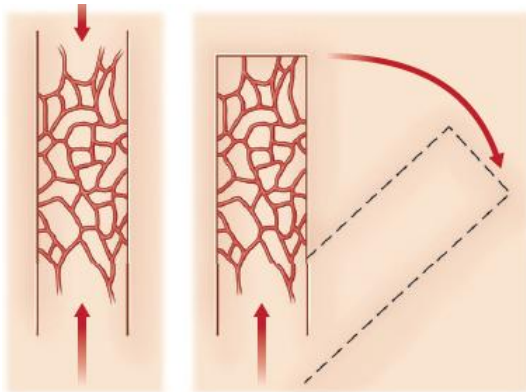
İskemiye sekonder endotel ve parankimal hücrelerde şişme, kapiller lümen daralması, kan hücrelerinin intravasküler kümelenmesi, intravasküler sıvının interstisyel alana kaçıışı ödem oluşturur. İskemi zamanının uzaması ile bu patolojik süreç de ilerler ve kan akımındaki tıkanıklık 12 saat sonra geri dönüşümsüz bir noktaya gelerek flep nekrozu gerçekleşir⁴⁵.

2.6.2 Flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik işlemler

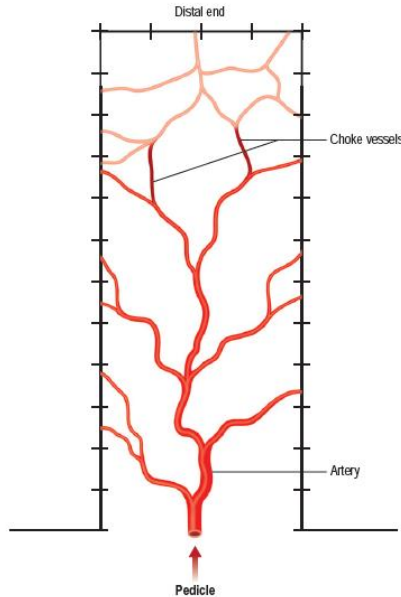
a)Geciktirme Yöntemleri

Cerrahi ve vasküler geciktirme flep yaşayabilirliğini artırmada etkinliği kanıtlanmış yöntemlerdir⁴⁶. Günümüzde daha çok obez, radyoterapi görmüş, sigara alışkalığı olan, uzun flep gereksinimi olan riskli hastalarda tercih edilmektedir. Cerrahi geciktirme genellikle iki veya üç aşamalı operasyonları içerir. İlk aşamada flep kısmi olarak kaldırılarak iskemiye duyarlılıkta azalma ve kapiller kan akımında artış sağlanır^{38,47,48}. Vasküler geciktirme iki veya daha fazla dominant arteri olan fleplerde arterlerden birinin cerrahi bağlama ve da anjiyografik embolizasyon ile iptal edilerek diğer arter üzerinden flep kaldırılmasını daha güvenli hale getirme prensibine dayanır^{38,49,50}. Cerrahi geciktirme ile akut flep cerrahisinde gözlenen vazokonstriktör ve trombotik ajanların salınımında azalma ve flebe adaptasyon için zaman kazandırılmaktadır. Pang ve arkadaşları delay yapılan random fleplerde özellikle distal kısımlarda kapiller kan akımında artış olduğunu göstermiştir. Taylor ve ark. geciktirme uygulanan flepte önceden bulunan “choke” damarların açıldığını göstermiştir. Cerrahi geciktirmenin VEGF ve FGF gen ekspresyonunu artırarak flepte anjiogenezi ve vasodilatasyonu artırdığı da gösterilmiştir³⁸.

Cerrahi ve vasküler geciktirmenin klinik etkinliği ispatlanmış olmasına karşın birkaç aşamalı cerrahi işlem geciktirmesi, pahalı ve zaman alıcı olması nedeni ile günümüzde kullanımı sınırlıdır. Günümüzde flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik farmakolojik ajanların kullanımına yönelik çalışmalar yapılmaktadır³⁸.



Şekil 10. Bipediküllü flep geciktirme⁷



Şekil 11: Geciktirme işlemi ile choke anastomozların açılması³⁸

b)Farmakolojik ajanlar

Flep cerrahisinde norepinefrin, Tromboxan A2, serotonin ve Endotelin 1 gibi vazokonstiktör ve protrombik maddelerin artışı olduğu ve bu maddelerin akut dönemdeki vazokonstriksiyon ve trombozdan sorumlu olduğu bilinmektedir³¹. Flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik ilaç çalışmaları vazodilatasyon, antitromboz, nötrofil kümelemesi ve yapışmasını önleme üzerine yoğunlaşmıştır³⁸. Kullanılan ilaçlar:

- Akson blokerleri(guanetidin, dopamin, rezerpin),
- Reseptör blokerleri(fentolamin, fenoksibenzamin, talazolin)
- Beta blokerler(metoproteronol, propranolol, izoproteronol)
- Direkt vazodilatatör ajanlar(nitdogliserin, hidralazin)
- Kalsiyum kanal blokerleri(nifedpin, verapamil)
- Antikoagülanlar
- Hemoreolojik ilaçlar
- Vazodilatatör eikozanoidler
- Antiinflamatuvar ilaçlar
- Antioksidanlar(mannitol, allopurinol, desferoksamin)
- Glukokortikoidler
- Vasküler düz kas gevşeticileri
- Tromboksan A2 sentez inhibitörleri
- Tromboksan A2 reseptör antagonistleri
- Serotonin reseptör antagonistleri

Bu ilaçların etkinlikleri tavşan ve sıçanlarda deneysel olarak gösterilmişse de flep yaşayabilirliğini artırmadaki klinik etkinliği geciktirme yöntemlerinin önüne geçememiştir³⁸. Yakın zamandaki çalışmalar lokal anjiogenik sitokin protein (VEGF, PDGF) tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır ve bu terapilerin flep yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir^{51,52}.

2.6.3 Antioksidanların etki mekanizmaları

Antioksidanlar 4 ayrı mekanizma ile etki gösterir. Bunlar temizleyici (scavenging), söndürme(quenching), onarıcı (repair), zincir kırıcı (chain breaking) etkidir. Temizleyici etki oksidanlarla etkileşip onları daha zayıf moleküllere çevirme etkisidir. Trakeobronşial mukus, doğal antioksidan enzimler bu etki prensibiyle çalışır. Söndürme etkisi oksidanlara hidrojen iyonu vererek inaktif hale getirme etkisidir. Glutasyon, vitaminler (A,E) bu şekilde etki gösterir. Onarıcılar serbest radikallerce zedelenen proteinleri parçalar, DNA hasarlarını onarır. Zincir kırıcılar oksidanlar bağlanarak elektron çalma zincirlerini kırarlar. Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin bu şekilde etki gösterir^{53,54,55}.

Antioksidanlar eksojen ve doğal antioksidanlar olarak iki grupta toplanabilir. Eksojen antioksidanlara ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol, tungsten, folik asit), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, kalsiyum kanal blokerleri, NSAİİ, lokal anestetikler), desferoksamin, seruloplazmin, barbitüraller, non enzimatik radikal toplayıcılar (mannitol, albümin, dimetil dulfoksit), glutasyon peroksidaz aktivitesini arttıran(asetil sistein) ajanlar örnek verilebilir.

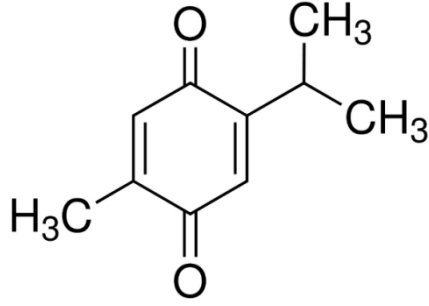
Doğal antioksidanlar enzimatik ve non enzimatik olarak ikiye ayrılır. Non enzimatik olanlara vitamin E, vitamin C, beta karoten, koenzim Q, melatonin, ürik asit, ferritin, bilirubin, albümin, glutasyon örnek verilebilir. Enzimatik olanlara mitokondrial sitokrom oksidaz, katalaz, glutasyon peroksidaz, hidroksiperoksidaz, süperoksit dismutaz örnektir.

2.6.4. Thymoquinone

Thymoquinone Orta Doğu ve Uzak Doğu da yetişen, halk arasında çörek otu olarak bilinen *Nigella Sativa* bitkisinin tohumlarından elde edilir. Çörek otu, halk arasında yemeklerde kullanılmasının yanında eklem ağrıları, deri enfeksiyonları, diare, hazımsızlık, karaciğer hastalıkları, akciğer hastalıklarında doğal ilaç olarak da kullanılmaktadır^{56,57}. *Nigella sativa* bitkisi % 37 oranında uçucu olmayan yağ, alkaloid, sabun, protein ve % 0.4-2.5 oranında temel yağlardan oluşur. Temel yağlardan carvacol, p-cymene, 4-terpineol, t-anetholeu içermekle birlikte en fazla bulunan komponenti Thymoquinone dir⁵⁸. (% 27-57)

a) Kimyasal yapısı

*Nigella sativa*nın ana komponenti timokinon ($C_{10}H_{12}O_2$), (2-isopropil 1-5metil-1,4 benzoquinone) olmakla birlikte ditimokinon ve timol bileşiklerini de içermektedir. Timokinon sarı renkli kristalize uçucu bir kinondur. Molekül ağırlığı 164,201 g/m dir^{59,60}.



Şekil 12:Timokinon un kimyasal yapısı

b)Antioksidan etkisi

Timokinon NADH, NADPH, GSH ile fizyolojik şartlarda reaksiyona girerek iki ürün oluşturur. GSH ile dihidrotimon gluatyon, NADPH, NADH ile dihidrotimokinon (DHTQ) oluşturur. 2,2-difenil-1-pikrilhidrozil ve 3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonik asit(ABTS) gibi oksiradikallere karşı indirgenmiş antioksidan aktivite ve dihidrotimokinon glutatyonun potansiyel süpürücü antioksidan etkisi saptanmıştır⁶¹. Bu sonuçlarla timokinonun hücre içi non-enzimatik antioksidan sisteminde rol oynadığı düşünülmüştür. Timokin lizozomal lipid peroksidasyonunu önlemektedir. Süperoksit radikallerinin açığa çıkması halinde timokinon nötrofilleri uyarma aracılığıyla oksiradikal yakalayıcılığı görevi görmektedir^{2,62}. Bu antioksidan etki karbondotetraklorür hepatotoksitesine karşı da gözlenmiştir⁶³.

c)Antikarsinojenik etkisi

Nigella sativa ve timokinonun antikarsinojenik etkisi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır^{1,64}. Timokinonun antikarsinojenik etkisinin sahip olduğu anti oksidan özelliğinden dolayı olduğu teorisi öne sürülmüştür. Ait ve arkadaşlarının tümörlü farelerde yaptıkları çalışmada tümör dokusu içine uygulanan nigella sativa ekstresinin tümör boyutunda küçülme, metastaz oranında azalmaya sebep olduğunu gözlemiştir⁶⁵. Ivankovic ve arkadaşları skuamöz hücreli karsinom ve fibrosarkom üzerine yaptıkları in vitro çalışmalarda timokinonun hücre kültürlerinde fibroblastlara göre daha belirgin sitotoksikite gösterdiğini bulmuştur. Timokinonun sitotoksik aktivitesinin doz bağımlı olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmanın in vivo kısmında intratümöral olarak uygulanan timokinonun kontrol grubu ile kıyaslandığında skuamöz hücreli karsinomda %52, fibrosarkomda %43 oranında büyüme inhibisyonu izlenmiştir⁶⁶. Başka bir çalışmada farelerde ifosfamide bağlı renal toksisiteyi azalttığı ve ifosfamidin antitümöral etkinliğini artırdığı gösterilmiştir⁶⁷.

d) Analjezik ve antiinflamatuvar etkisi

Timokinonun antiinflamatuvar etkisi üzerine yapılan çalışmalarda hem lipooksijenaz, hem siklooksijenaz enzim inhibisyonu ile TXA₂ ve LT B₄ üretimini azalttığı bulunmuştur⁶⁸. Oral, intraperitoneal ve intraserebroventriküler uygulanan timokinonun supraspinal kappa ve mü reseptörlerinin etkileyerek indirekt analjezik etkinliği olduğu gösterilmiştir⁶⁹.

e) Antinefrotoksik etkisi

Sisplatin uygulamasından 5 gün önce ve beş gün sonra 50 mg/kg dozunda uygulanan timokinonun sisplatin nefrotoksitesinde fizyolojik ve biyokimyasal olarak düzelme sağladığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada timokinonun sisplatinin antitümoral etkisini artırdığı ve terapötik indeksini genişlettiği belirtilmiştir⁷⁰. Baska bir çalışmada nefrotoksik etkisinin süperoksit radikaller aracılığıyla olduğu düşünülen merkurik kloridin nefrotoksik etkisini azalttığı gösterilmiştir⁷¹.

f) Antihepatotoksik etkisi

Yapılan araştırmalar timokinonun antihepatotoksik etkisini lipid peroksidasyonunu önleme, antioksidan sistemi güçlendirme yoluyla olduğunu göstermiştir. Sıçanlarda içme suyuna işlem öncesi ve sonrası eklenen timokinonun karbontetraklorüre bağlı karaciğer hasarını düzelttiği gösterilmiştir. Bu etki timokinonun antioksidan özelliğine bağlanmıştır⁷². Ayrıca timokinonun terbutolhidroperoksit ile olan hepatotoksitede önleyici etkisi olduğu gösterilmiş ve araştırmacılar bu etkinin timokinonun hücre içi glutatyon seviyesini korumasına bağlamışlardır⁷³.

g) Antidiabetik etki

Meral ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diabetli tavşanlarda nigella sativadan elde edilen ekstrenin serum glukoz düzeylerini azalttığı, glutatyon, seruloplazminin etkilerini artırdığı gösterilmiştir⁷⁴. Al Hader ve ark. nın yaptıkları çalışmada intraperitoneal olarak verilen nigella sativa ekstresinin normoglisemik ve hiperglisemik tavşanlarda serum glukoz düzeylerinde önemli düzeyde azalmaya yol açtığını göstermiştir⁷⁵.

h) Antimikrobiyal etkisi

Nigella sativa yağının E.coli, satphylococcus albus, salmonella typhi, vibrio cholerea, shigella nigere karşı etkinliği in vitro ortamda gösterilmiştir. Gram pozitif etkinliğinin gram negatiften daha baskın olduğu bilinmektedir. Ayrıca aspergillus specise karşı antifungal, sciehtosoma mansoniye karşı antiparaziter etkinliği gösterilmiştir⁷⁶.

i)Kardiovaskuler sistem üzerine etkisi

Timokinonun genel anestezi altında sıçanlarda hipotansif ve bradikardik etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu etkilerinin santral yolla değil direkt etki olduğu düşünülmektedir⁷⁷. Enomoto ve ark.nın yaptığı çalışmada timokinonun araşidonik asit tarafından indüklenen platelet agregasyonunu inhibe edici ve aspirinden daha güçlü antikoagülan etkisinin olduğu gösterilmiştir⁷⁸.

Bunların yanı sıra timokinonun trakeobronşial sistemde spazmolitik ve bronkodilatatör, antihistaminik, mide mukozasında antiülserojenik olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır. Selçuk ve ark. nın yaptığı çalışmada subkutan ve sistemik olarak verilen timokinonun sıçan derisinde yanığa bağlı yara iyileşmesinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir⁷⁹.

j)Timokinon toksisitesi

Son zamanlarda timokinona olan ilginin artması üzerine timokinon toksisitesi üzerine çalışma ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Al Ali ve ark. timokinonu LD50 değerinin tespiti için oral ve enjeksiyon yoluyla hayvanlara vermiş ve karaciğer, böbrek, akciğerleri incelemiş, çalışma sonucunda kronik dönemde herhangi bir toksik etki saptamamıştır. Ayrıca timokinonun oral alımda toksisitesinin olmadığı ve kanda etkin düzeye ulaşabildiği için oral yolla kullanımı önerilmiştir. Timokinonun akut toksisitesinde LD50 değeri 2.4 gr/kg olarak bulunmuştur⁸⁰. Uzun süreli kullanımda gözlenmiş olan tek yan etki hipoglisemidir⁸¹.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

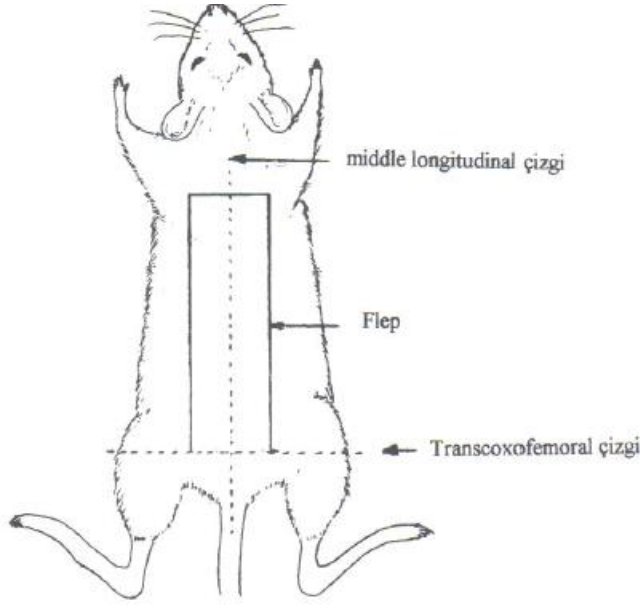
Bu çalışma için İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 02.09.2014 tarihli 2014/88 karar no ile onay alındı. Çalışmada İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 24 adet, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen dişi, erişkin Sprague Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'nde ortalama 20-25 derece sıcaklıkta, her kafeste bir hayvan olacak şekilde, 12 saatlik gece gündüz ritmine uyacak şekilde barındırıldı. Tüm hayvanlar musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslendi. Cerrahi girişimler İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Laboratuvarında yapıldı. Hayvanlar deney grubu, kontrol grubu ve sham grubu olmak üzere 8'er sıçanlık üç gruba ayrıldı.

3.1 Anestezi Tekniği

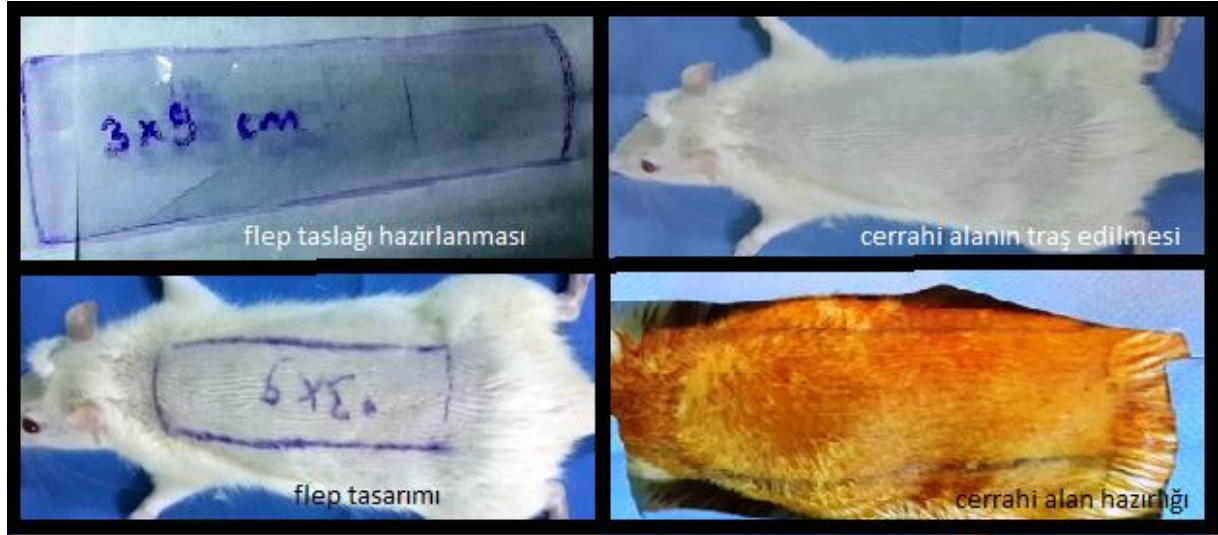
Tüm sıçanlarda anestezi intramusküler 35 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® –Pfizer) ve 10 mg/ kg xylazine hidroklorür (Rompun® %2 –Bayer) ile sağlandı. Gerektiğinde bu dozun 1/3'ü kadar idame dozu uygulandı.

3.2 Cerrahi Yöntem

Tüm sıçanlar, rastgele seçilmiş 8'er sıçandan oluşan üç gruba ayrıldıktan sonra anestezi işlemi uygulandı. Anesteziyi takiben cerrahi alan tıraş makinesi ile tıraş edildi, povidon iyot ile temizlendi. Sıçanlar cerrahi masasına yüz üstü yatırılarak kuyruk ve dört ekstremiteden flaster ile tespit edildi. Cerrahi işlem öncesi tüm hayvanlara 150 mg/kg tek doz subkutan ampicilin enjeksiyonu ile profilaksi uygulandı. Deney ve kontrol grubundaki tüm hayvanların sırt bölgesine Khouri'nin modifiye ettiği⁸² 3x9 cm lik Mc Farlane flebi⁸³ kaudal tabanlı olacak şekilde daha önce hazırlanmış olan taslak yardımı ile çizildi.

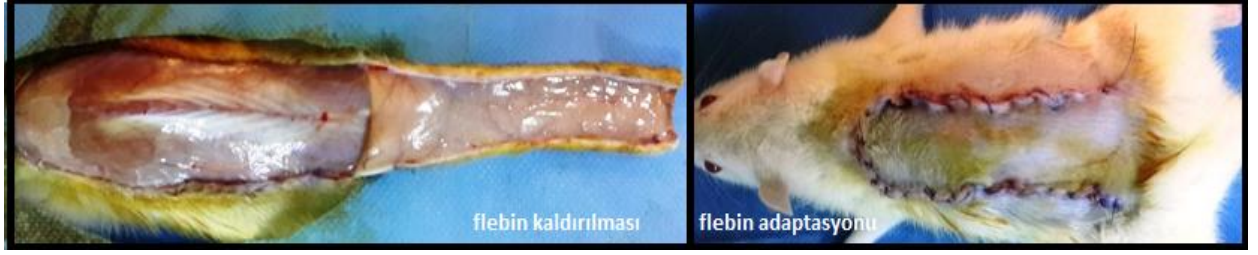


Şekil 13.Mc Farlane random sıçan deri flebi⁸³



Şekil 14:Flep taslağının hazırlanması

Flepler 15 numara bistüri yardımı ile pannikulus karnosus tabakası da dahil edilerek derin kas fasyası üzerinden kaldırıldı. Flepler 3.0 keskin polipropilen dikişlerle kendi yerlerine adapte edildi (Şekil15). Sıçanlar post operatif dönemde her biri ayrı kafeste olacak şekilde yerleştirildi. Her sıçana post operatif dönemde povidon iyot ile günlük yara bakımı yapıldı.



Şekil 15. Flebin kaldırılması ve yerine iade edilmesi.

Cerrahi işlem sonrası ilaç tedavisine göre gruplar aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Kontrol grubu: Operasyon sonrası sadece yara bakımı ile takip edilen grup

Sham grubu: Operasyon sonrası sadece DMSO (dimetil sulfoksit) solusyonu enjekte edilen grup

Deney grubu: Operasyon sonrası DMSO solusyonunda çözülmüş Thymoquinone[®] (Sigma Aldrich) enjekte edilen grup

Postoperatif dönemde, deney grubuna 28G insülin enjektörü yardımı ile 0.1 cc DMSO solusyonunda çözülmüş 5mg/kg thymoquinone, sham grubuna 0.1 cc DMSO solusyonu intraperitoneal olarak enjekte edildi. Operasyon sonrası 10 gün boyunca her gün aynı saatte olmak üzere günde bir kez aynı enjeksiyonlar tekrarlandı.



Şekil 16. Thymoquinone ticari formu

Post operatif 10. günde denekler intramuskuler 30 mg/kg Ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı) ve Xylazine hidroklorid (Rompun®, Bayer,) 10 mg/kg. ile uyutularak histopatolojik inceleme için sırt flebi alanlarının distal ve proksimal 1/3 kısımlarından, biyokimyasal inceleme için orta kısımdan 1x1 cm.lik doku örnekleri alındı. Kardiak ponksiyonla 4cc kan alınarak deney sonlandırıldı. Deneklere anestezi altında servikal dislokasyon uygulanarak ötenazi yapıldı. Ölüm kalp atımı kontrol edilerek doğrulandı.

Histopatolojik inceleme için alınan doku örnekleri %10 formaldehit solusyonu içinde patoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Kan örnekleri 5000 devirde 5 dakika santrifüj edilek serum ayrıştırıldı. Biyokimyasal inceleme için alınan doku örnekleriyle serumlar kuru buz içerisinde biyokimya laboratuvarına ulaştırıldı.

3.3.Sonuçların Değerlendirilmesi

3.3.1.Klinik değerlendirme

Tüm sıçanlardaki dorsal fleplerin dolaşımı günlük inspeksiyonla takip edildi. Flep distallerinde 4. günden itibaren demarkasyon hattı oluşumu izlendi. 10. günde tüm flepler eşit mesafeden Nikon D5100 fotoğraf makinası yardımı ile fotoğraflandı. Fotoğraflar bilgisayar ortamında Image J programına aktarılaraq alan canlı doku, nekrotik alan ve nekrotik alan yüzdesi ölçümleri yapıldı.(Şekil.17)



Şekil 17.Image J programında alan ölçümü

3.3.2 Histopatolojik Değerlendirme

Operasyon sonrası 10. günde fleplerin proksimalinden ve distalde nekroz-sağlam doku geçiş bölgelerinden histolojik çalışma için 1x1 cm lik doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri %10'luk nötral formaldehit içerisinde fiske edildi. Fiksasyonu takiben tüm dokular rutin histolojik takip yöntemleri kullanılarak dehidrate edildi ve parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alındı. Tüm kesitlere rutin histolojik boyama ve immunhistokimyasal boyama yöntemlerine tabi tutuldu. Hematoksilen+ Eozin (H+E) boyası ile epidermis ve dermisteki nekroz alanları, PNL(polimorf nüveli lökosit), lenfosit, fibroblast, kollajen oluşumu yönünden değerlendirildi. Anjiogenez değerlendirmesi için VEGF (Vasküler Endotelyal Growth Factor, VEGF Antibody (A-20), 200 µg/ml, SantaCruz sc-152, SensiTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek SHP125) boyası ile kesitlerdeki damar miktarı sayıldı. Hücre yoğunluğu 1 den 3 e kadar numaralandırılan skora sistemi ile değerlendirildi (1:hafif, 2:orta, 3:ileri). VEGF için mm²'de hücre sayısı; 50'nin altında ise 1, 50-100 arası 2, 100'ün üzerinde 3 olarak skorlandı. Her denek için proksimal ve distal kısımlardan elde edilen verilerin ortalamaları alınarak gruplar arasında kıyaslama yapıldı. Elde edilen histolojik preparatlar Olympus BX61 araştırma mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP72 model mikroskop kamerası ile fotoğraflandı.

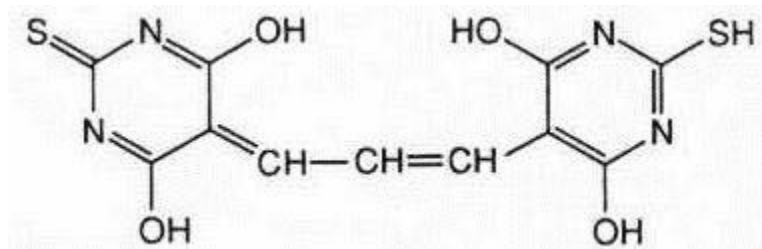
3.3.3Biyokimyasal Değerlendirme

a)Doku ve Serumda TBARS Ölçümü

Prensip:

Lipid peroksidasyonu hücre hasarını göstermede sıklıkla kullanılan iyi çalışılmış bir mekanizma olup, lipid peroksitler, kompleks formlar ve Malondialdehit (MDA) gibi reaktif birleşikler oluşturan unstabil indikatörlerdir. Lipid peroksidasyonunun son ürününün ölçülmesi oksidatif hasarın gösterilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Tiobarbitürik Asit Reaktif Substratlarının ölçümü (TBARS)yöntemi de lipid peroksidasyonu için kullanılan bir yöntem olup, bu yöntemde göre örneklerdeki MDA 1:2 oranında TBA ile birleşik oluşturur (Şekil 18). Bu oluşan birleşik kolorimetrik ya da florometrik yöntemlerle tayin edilir (OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)).



Şekil.18.MDA-TBA birleşği

Method

Serum ve doku TBARS miktarlarının ölçümü İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda aşağıdaki yöntemle yapılmıştır. Sıçanlardan alınan deri dokuları serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra sıvı azottan geçirildi. Alınan kan örnekleri 5000 devirde 5 dk santrifüj serumlar ayrıştırıldı.

Tartımlar sonucu 0,08-0,340 gr arasında ağırlıktaki dokular, TBARS yöntemi ile MDA tayin edilmesi için Ohkawa ve ark. yöntemine göre soğuk %1,15'lik KCl , %20'lik Asetik asit ve %8.1'lik Sodyum Dodesil Sülfat çözeltisinde %10'luk homojenat olacak şekilde homojenize edildi^{84,85}. Homojenat ve serumlardan 250 µl alınarak ve Buege and Aust (1978)⁸⁶ yöntemine göre 1,5 ml %0,75'lik TBA, 1 ml %30'luk TCA ve 0,2 ml 5N HCl çözeltisinde 15 dakika süreyle sıcak su banyosunda bekletildi. 3000 rpmde 10 dakika santrifüj edilen örneklerde sıcak su banyosu sonrası oluşan renk 532 nm'de eşit oranda aynı çözeltilerden oluşturulan köre karşı okutuldu (Schimadzu® UV 20000). TBARS için standart olarak 1,1,3,3 – tetraethoksi propanın (TEP) kullanıldı. Standardın molar ekstinksiyon kat sayısı ($1,56 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak TBARS konsantrasyonları hesaplandı. TBARS konsantrasyonları nmol/mL homojenat cinsinden verildi.

b)Total Antioksidan Kapasite Ölçümü

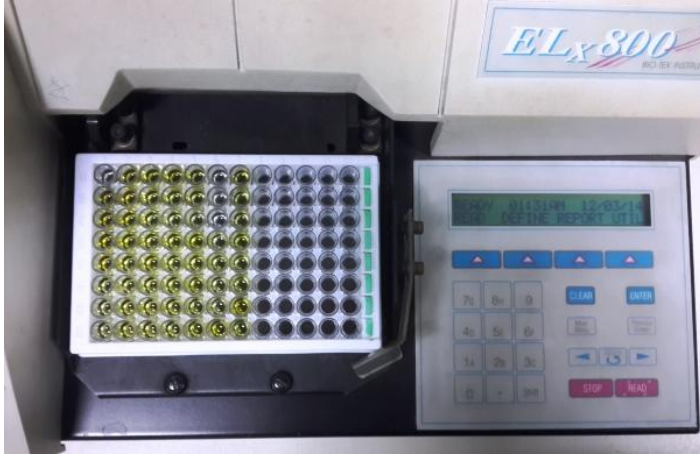
Serum ve doku Total Antioksidan Kapasite (TAK) ölçümü Sun Red Marka (Katolog No: 201-11-1187) Rat T – AOC enzim linked immünosorbent assay (ELISA) kiti kullanılarak İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

Prensip:

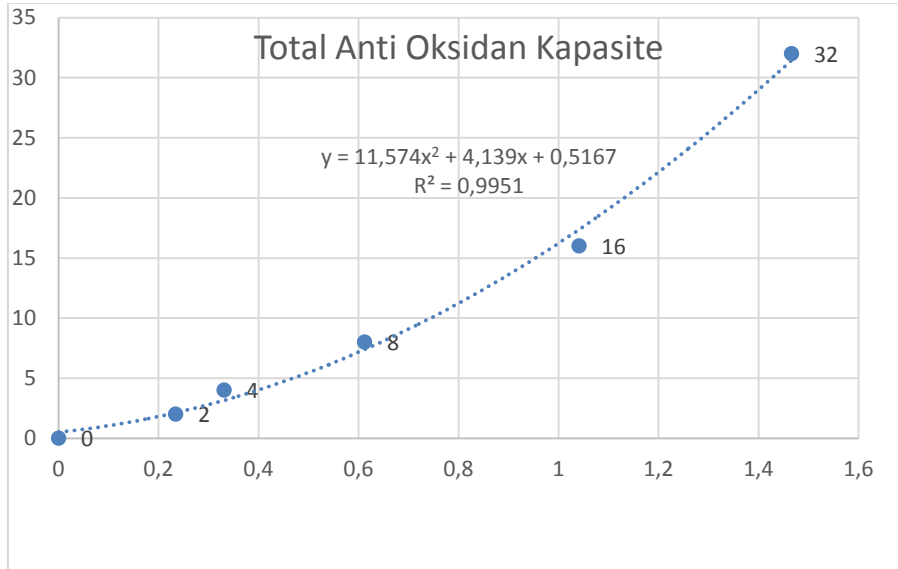
Kit, çift antikorlu sandviç Elisa yöntemine göre ölçüm yapmaktadır. Monoklonal rat total antioksidan antikorlu ile önceden kaplı kuyucuklara serum ya da doku örnekleri yüklenerek inkübasyona bırakılır. Daha sonra biotin ile işaretli ikinci TAK antikorlu eklenir ve Streptavidin-Horse radish peroksit ile immün kompleks oluşumu için inkübe edilir. Tutunmamış antikor ve substratlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra kromojen A ve B ile inkübe edilen kite stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonra erdirilir ve 450 nm dalga boyunda absorbans okuması yapılır (Sun red Assay Kit TAK) .

Yöntem

Stok solüsyonundan seri dilüsyon ile 32 U/mL, 16 U/mL, 8 U/mL, 4 U/mL ve 2 U/mL olacak şekilde standartlar hazırlanarak kuyucuklara eklendi . Serum örneklerinden ve %1,15'lik KCl ile hazırlanmış %10 luk doku homojenatlarından 40µl'lik örnek alınarak kuyucuklara eklendi. Sadece örneklerin olduğu kuyucuklara 50 µl. biotin ile işaretli TAK antikoru eklenerek 37C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Mikro ELİSA yıkayıcısı (Bio-Tek, ELx50) ile yapılan 5 yıkama sonrasında kör dahil tüm kuyucuklara kromojen A ve B'den 50'şer µl eklenerek 10 dakika inkübasyona bırakıldı. 50 µl stop solüsyonu eklenerek Mikro ELİSA okuyucusu (Bio-Tek, FL 600) cihazında 450 nm dalga boyunda okuma yapılarak standartlara göre oluşturulan standart eğriden konsantrasyonlar hesaplandı (Şekil 19). Sonuçlar U/mL olarak verildi.



Şekil 19.Elisa ile TAC çalışması



Şekil.20.Total antioksidan kapasite ölçümü

3.3.4.İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS (Power Analysis and Sample Size) 2008 Statistical Software (NCSS LLC, Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma, medyan, sıklık ve oran) yanı sıra alan ve biyokimyasal değişkenlerin üç gruba göre değerlendirmelerinde Kruskal Wallis test ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Histopatolojik değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Fisher Freeman Halton (Monte Carlo) Exact test kullanıldı. Sonuçlar % 95’lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4.SONUÇLAR

Operasyon sonrası 10. Gününde çalışma tamamlandı. Deneklerde anestezi veya cerrahi işleme ilişkin herhangi bir komplikasyon izlenmedi. Çalışma sonuna kadar tüm sıçanlar hayatta kaldı. Kontrol, sham, deney grubunda 8’er sıçan üzerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

4.1Alan Ölçümleri

Gruplardaki tüm flep alanları ve nekroz alanları tek tek ölçüldü, nekrotik alan/flep alanı yüzdeleri hesaplandı.(Tablo.2)

GRUP		Flep Alanı	Nekroz Alanı	Nekroz Yüzdesi (%)
Kontrol	Ortalama	805975,13	393870,50	48,98
	SD	23184,53	34794,24	3,51
	Median	800752,50	390236,50	50,0
	Min	782151	342979	42,10
	Max	849721	452802	53,20
Deney	Ortalama	811114,13	93415,38	11,46
	SD	16538,65	20829,26	2,40
	Median	813727,50	94088,50	11,65

	Min	783840	61750	7,80
	Max	834417	128551	15,40
Sham	Ortalama	797578,50	265461,75	33,06
	SD	32011,25	58899,54	7,45
	Median	791169,50	263309,00	31,70
	Min	761303	169210	21,60
	Max	865860	348052	43,40
^aP		0,277	0,001**	0,001**
^bPost Hoc				
Kontrol-Deney		0,529	0,001**	0,001**
Kontrol-Sham		0,345	0,001**	0,001**
Deney-Sham		0,115	0,001**	0,001**

^aKruskal Wallis test ^bMann Whitney U test

* $p < 0,01$

** $p < 0,05$

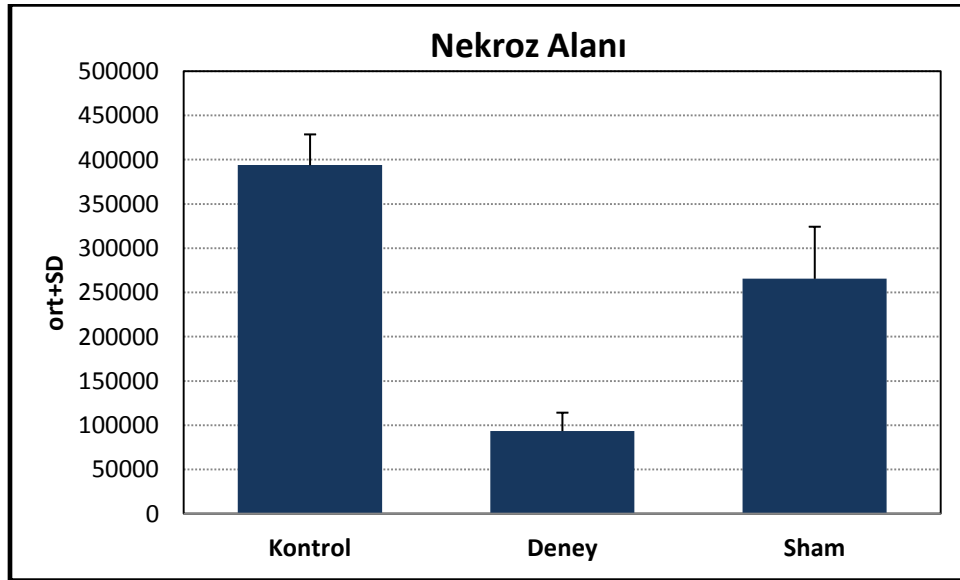
Tablo 2. Gruplara göre Alan ölçümleri değerlendirmeleri

Nekroz alanları gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0,01$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için yapılan ikili karşılaştırmalarda, deney grubunun nekroz alanları kontrol ve sham grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır ($p<0,01$). Sham grubu olguların nekroz alan ortalaması kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır ($p<0,01$).

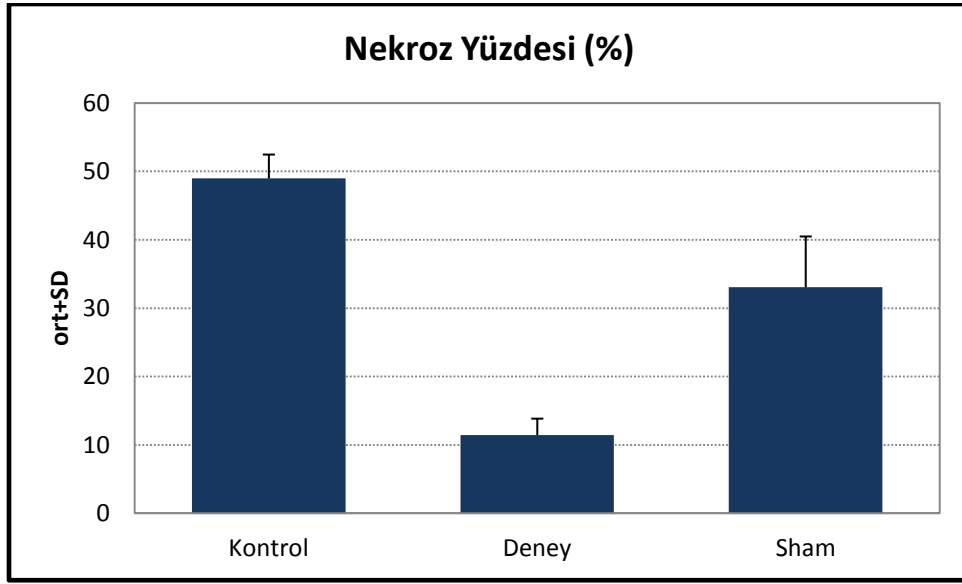


Şekil.21: 10. günde fleplerde nekrotik alanların görünümü

Nekroz yüzdesi gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p<0,01$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için yapılan ikili karşılaştırmalarda, deney grubunun nekroz yüzdesi, Kontrol ve sham grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır ($p<0,01$). Sham grubu olguların nekroz yüzdesi ortalaması kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır ($p<0,01$).



Şekil 22 : Gruplara Göre Nekroz Alanları Dağılımı



Şekil 23 : Gruplara Göre Nekroz Yüzdesi Dağılımı

4.2Biyokimyasal Analizler

		Doku TBARS Miktarı (Nmol/mL)	Serum TBARS (Nmol/mL)	TAK-Serum (U/mL)	TAK-Doku grafik (U/mL)
Kontrol	Ortalama	2,78	4,38	4,54	2,12
	SD	0,46	0,54	1,31	0,94
	Median	2,85	4,30	4,17	2,26
	Min	1,9230	3,82681	3,28	1,06
	Max	3,3461	5,36521	7,40	3,37
Deney	Ortalama	0,96	2,94	6,94	6,09
	SD	0,27	0,47	1,25	1,51
	Median	0,96	2,79	6,63	5,62
	Min	,5769	2,42290	5,59	4,65
	Max	1,4807	3,52000	9,09	9,52
Sham	Ortalama	1,49	3,77	3,92	3,99

	SD	0,41	0,96	0,92	1,00
	Median	1,32	3,73	4,11	3,78
	Min	1,1153	2,38452	2,28	3,00
	Max	2,1400	5,20000	4,99	5,61
^a P		0,001**	0,001**	0,001**	0,001**
^b Post Hoc					
Kontrol-Deney		0,001**	0,001**	0,006**	0,001**
Kontrol-Sham		0,002**	0,208	0,529	0,005**
Deney-Sham		0,005**	0,141	0,001**	0,009**

^aKruskal Wallis test

^bMann Whitney U test

* $p < 0,01$

** $p < 0,05$

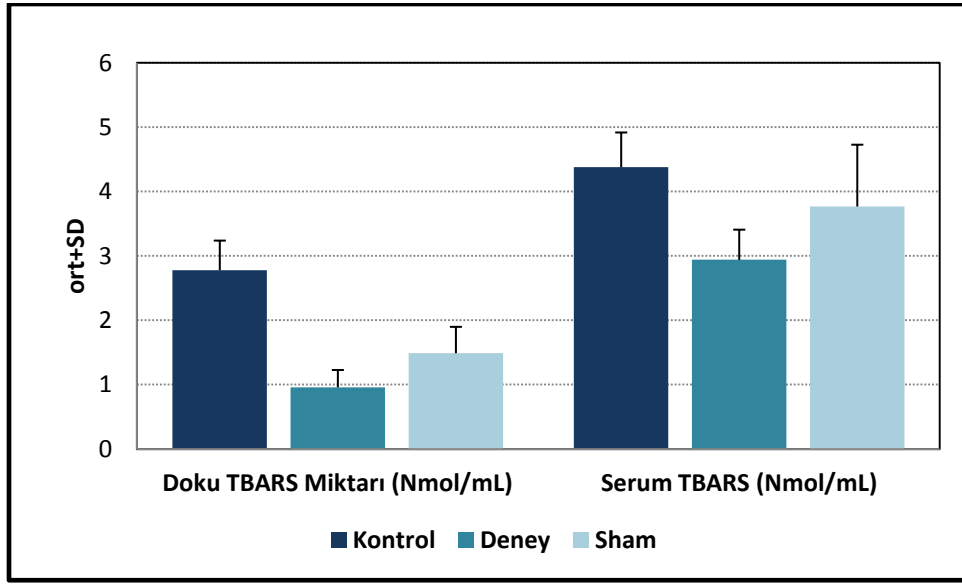
Tablo 3. Gruplara göre TBARS ve TAK değerlendirmeleri

Doku TBARS miktarı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,01$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için yapılan ikili karşılaştırmalarda, deney grubunun doku TBARS miktarı, Kontrol ve sham grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır ($p < 0,01$). Sham grubu olguların Doku TBARS miktarı ortalaması kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır ($p < 0,01$).

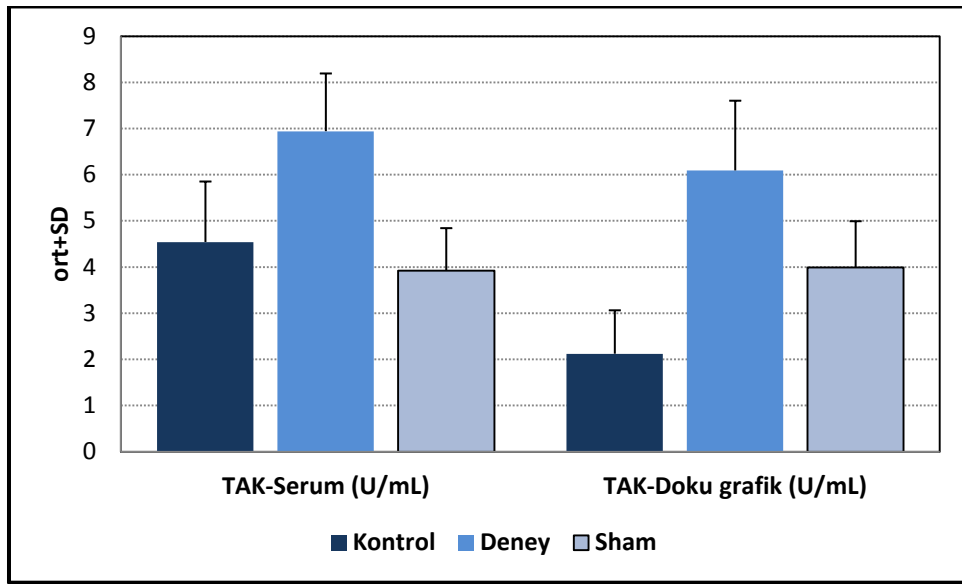
Serum TBARS miktarı gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,01$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için yapılan ikili karşılaştırmalarda, deney grubunun serum TBARS miktarı, kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük olarak saptanmıştır ($p < 0,01$). Sham grubu serum TBARS ölçümleri ile deney ve kontrol grubu olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

TAK serum ölçümleri gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,01$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için yapılan ikili karşılaştırmalarda, deney grubunun TAK serum ölçümleri, kontrol ve sham grubundan anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0,01$). Sham grubu ile kontrol arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

TAK doku ölçümleri gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ($p < 0,01$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için yapılan ikili karşılaştırmalarda, deney grubunun TAK doku ölçümleri, kontrol ve sham grubundan anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0,01$). Sham grubu olguların TAK doku ortalaması da kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0,01$).



Şekil 24: Gruplara Göre Doku ve serum TBARS Dağılımı



Şekil 25: Gruplara göre serum ve doku TAK dağılımı

4.3 Histopatolojik inceleme sonuçları

		Kontrol	Deney	Sham	<i>P</i>
PNL Proksimal	Hafif	8 (100)	7 (87,5)	6 (75,0)	0,745
	İleri	0	1 (12,5)	2 (25,0)	
PNL Distal	Hafif	7 (87,5)	6 (75,0)	7 (100,0)	1,000
	Orta	1 (12,5)	1 (12,5)	0	
	İleri	0	1 (12,5)	1 (12,5)	
Lenfosit Proksimal	Hafif	7 (87,5)	6 (75,0)	5 (62,5)	0,836
	Orta	1 (12,5)	2 (25,0)	3 (37,5)	
Lenfosit Distal	Hafif	3 (37,5)	7 (87,5)	6 (75,0)	0,163
	Orta	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25,0)	
Fibroblast proksimal	Hafif	6 (75,0)	3 (37,5)	3 (37,5)	0,111
	Orta	2 (25,0)	5 (62,5)	2 (25,0)	
	İleri	0	0	3 (37,5)	
Fibroblast distal	Hafif	6 (75,0)	3 (37,5)	4 (50,0)	0,387
	Orta	2 (25,0)	2 (25,0)	3 (37,5)	
	İleri	0	3 (37,5)	1 (12,5)	
Kollogen Oluşumu Proksimal	Hafif	6 (75,0)	0	5 (62,5)	0,013*
	Orta	2 (25,0)	6 (75,0)	3 (37,5)	
	İleri	0	2 (25,0)	0	
Kollagen Oluşumu distal	Hafif	6 (75,0)	1 (12,5)	3 (37,5)	0,037*
	Orta	2 (25,0)	4 (50,0)	5 (62,5)	
	İleri	0	3 (37,5)	0	
VEGF Damar proksimal	Hafif	6 (75,0)	4 (50,0)	5 (62,5)	0,870
	Orta	2 (25,0)	3 (37,5)	3 (37,5)	

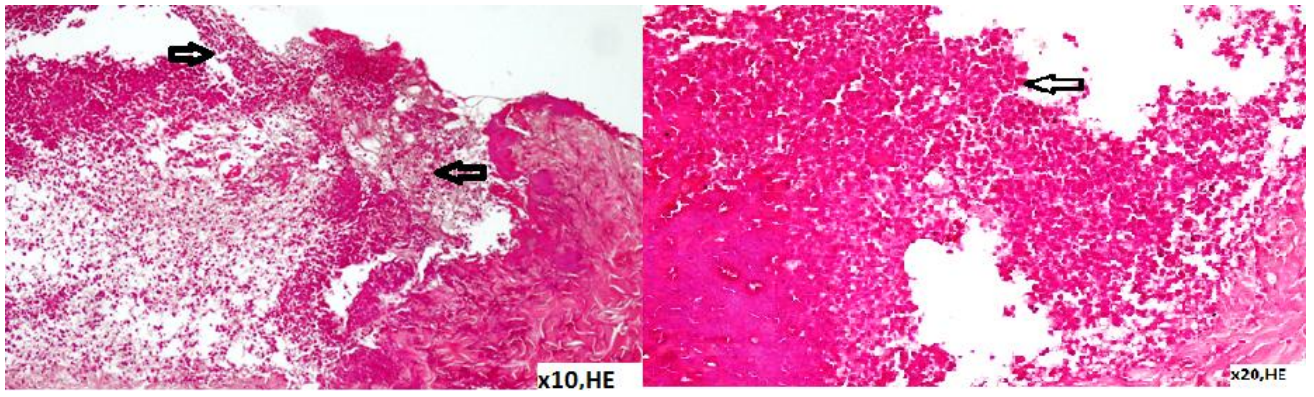
	İleri	0	1 (12,5)	0	
VEGF Damar Distal	Hafif	5 (62,5)	1 (12,5)	4 (50,0)	0,051
	Orta	3 (37,5)	3 (37,5)	4 (50,0)	
	İleri	0	4 (50,0)	0	

Fisher Freman Halton (Monte Carlo) test

* $p < 0,05$

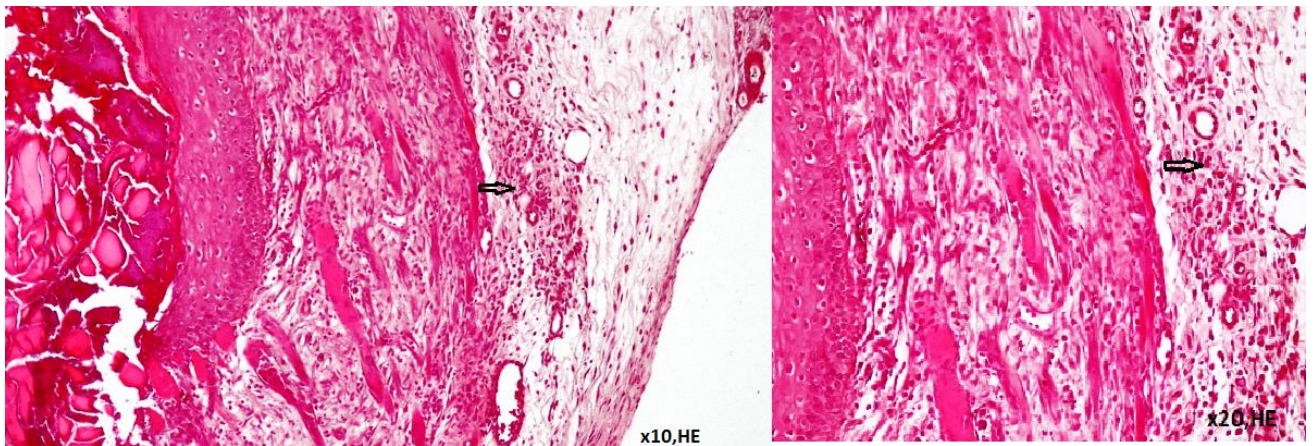
Tablo 4 . Gruplara göre histopatoloji değerlendirmeleri

PNL proksimal ve distal sınıflamaları gruplara göre anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$).



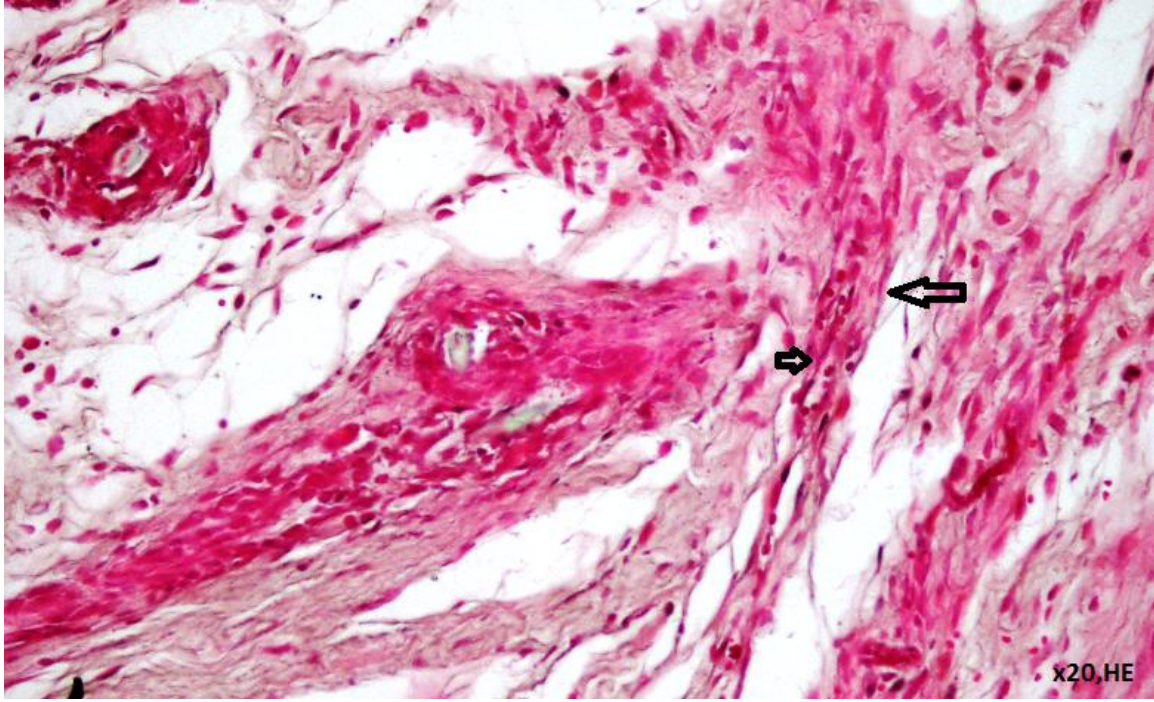
Şekil 26: Flep proksimalinde PNL infiltrasyonu (K1)

Lenfosit proksimal ve distal sınıflamaları da gruplara göre anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$).



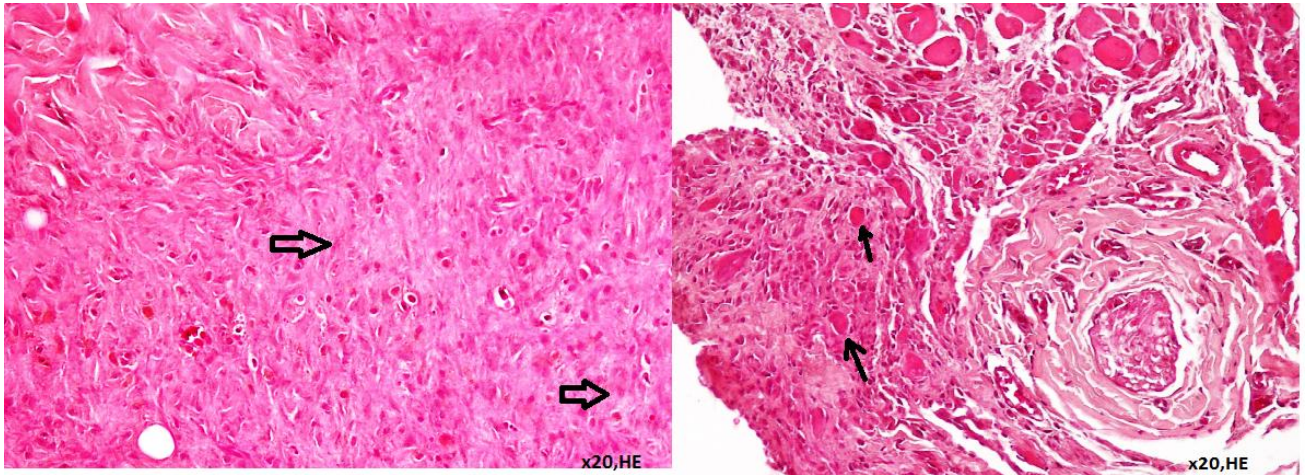
Şekil 27: Flep distalinde lenfosit infiltrasyonu (D8)

Fibroblast proksimal ve distal sınıflamaları yine gruplara göre anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

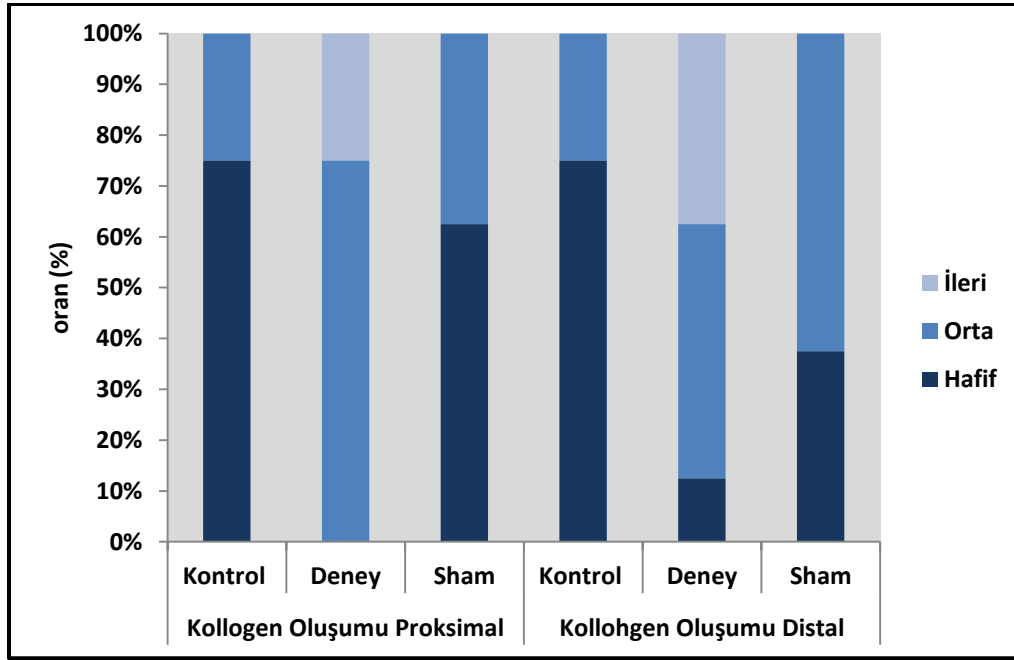


Şekil 28: Flep distalinde fibroblast proliferasyonu(D4)

Fibroblast kollogen oluşumu; deney grubu olgularda orta ve ileri olarak saptanması oranı, kontrol ve Sham grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$). Distal kollogen oluşumu ise; kontrol grubu olgularda hafif olarak saptanması oranı, deney ve sham grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$). Deney ve sham grubu distal kollogen oluşumu oranları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

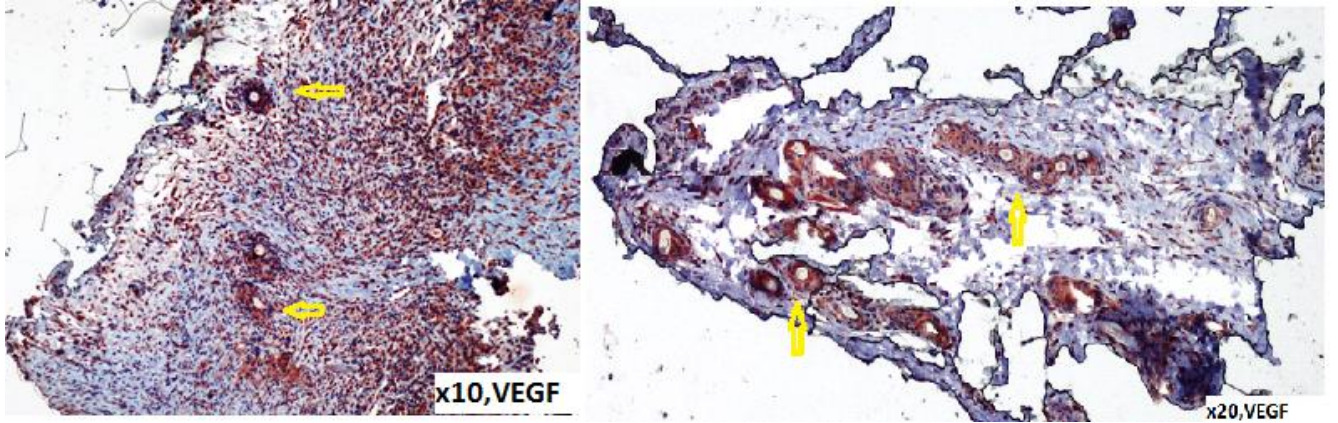


Şekil 29: Flep distalinde kollajen oluşumu(D2)

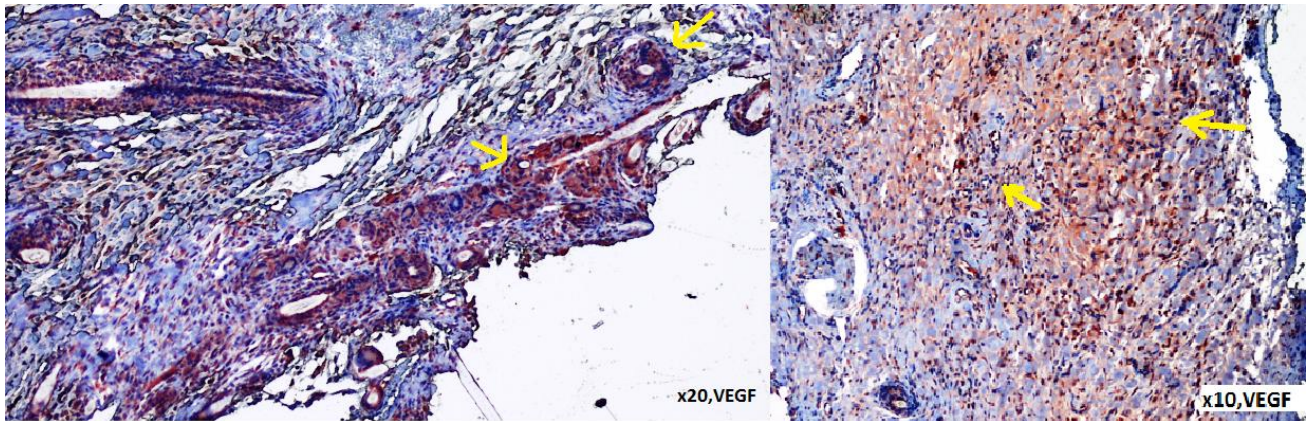


Şekil 30: Kollogen oluşumu bulgularının gruplara göre dağılımı

VEGF Damar proksimal ve distal sınıflamaları gruplara göre anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).



Şekil 31: Flep proksimalinde anjiogenez (Ş3)



Şekil 32: Flep distalinde anjiogenez(D3)

5.TARTIŞMA

Doku defektleri travma, tümör, enfeksiyon gibi çok çeşitli nedenlerle karışımına çıkmaktadır. Bu defektlerin bir çoğu primer, sekonder onarım, greftleme yöntemleri ile onarılabilirken, damar, tendon, kemik gibi damarlanma açısından fakir dokuların ekspoze olduğu defektlerde ve fonksiyonel, estetik geri kazanımın öncelikli olduğu durumlarda flep cerrahisi tercih edilmektedir. Flepler defekt alanına komşu alanlardan kaldırılabilirdiği gibi uzak bölgelerden mikrocerrahi tekniklerle flep nakilleri de yapılabilir. Defektlerin içeriği ve bulunduğu anatomik bölgeye göre onarım seçenekleri değişkenlik göstermektedir. Kaybedilen dokunun benzeri ile onarılması prensibine dayanarak defekt onarımında öncelikle benzer yapıda olan lokal doku seçenekleri ile onarım tercih edilmelidir. Ancak flebin yaşayabilirliği üzerinde taşıdığı arteriovenöz yapılara bağlı olduğundan defekte komşu alanlarda vaskülarizasyon yetersizliği, yeterli dokunun bulunmayışı gibi nedenler lokal dokuların kullanımını kısıtlamaktadır. Lokal flepler kullanılarak mevcut vasküler kaynaklar ile maksimum sağkalım oranı ile defektlerin kapatılmasına yönelik doku genişletme, cerrahi, medikal ön koşullandırma gibi pek çok teknik üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Günümüze dek yapılan çalışmalara rağmen halen distal flep nekrozu bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

Cerrahi sonrası dönemde flep nekrozunun primer etyolojisinin perfüzyon yetersizliği olduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Flep nekrozuna giden süreç flep kaldırılması sonrası flebi besleyen damarların ve sempatik liflerin flepten ayrılması ile başlar. Sempatik innervasyon ile birlikte Endotelin 1, tromboksan A₂, PG F_{2α} gibi vasokonstriktör maddelerin salınması ile flebin distalindeki kan akımı azalır. Sempatik nörotransmitterlerin 12-24 saat içinde tükenmesi ile birlikte flep perfüzyonu normale döner. Flep distalindeki iskeminin 6-12 saat sürmesi sonrası dolaşım sağlandığında flep nekrozunda ikinci patogenetik faktör olan reperfüzyon hasarı ortaya çıkar²⁹. İskemik dokuda değişik mekanizmalarla serbest oksijen radikalleri açığa çıkmakta bu radikaller doku hasarına yol açmaktadır. Ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz enzim sistemi, nötrofilik nikotinamid difosfat, myeloperoksidaz enzim sistemi aracılığıyla nötrofil endotel adezyonu, intrasellüler kalsiyum yüklenmesi bu süreçte başlıca rol alan mekanizmalardır³⁸.

Flep yaşayabilirliğini artırmaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda etkinliği en fazla görülmüş olan yöntem geciktirme(delay) yöntemleridir⁴⁶. Geciktirme cerrahi ya da vasküler olarak yapılabilirmekte, genellikle iki veya üç aşamalı operasyonlarla akut flep cerrahisinde gözlenen vazokonstriktör ve trombotik ajanların salınımında azalma, flebe iskemiye adaptasyona zaman kazandırma, distal kan akımında artış, flepte neoanjiogenez ve vazodilatasyonu arttırma yoluyla flep yaşayabilirliğini arttırmaktadır. Pang ve arkadaşları cerrahi geciktirme uygulanmış random paternli domuz cilt fleplerinde özellikle flep distalinde kan akımında artış olduğunu göstermiştir⁸⁷. Taylor ve ark. domuz, tavşan, köpek, insanlarda da vasküler geciktirme ile önceden varolan “choke” anastomozların açıldığını göstermiştir^{88,89}. Lineaweaver ve ark. vasküler geciktirmenin TRAM flebinin cilt adasının yaşayabilirliğini artırdığını göstermiş ve bunun VEGF, FGF gen ekspresyonunu artırarak vasodilatasyon ve

anjiogenezi indüklemeye aracılığıyla olduğunu göstermişlerdir⁹⁰. Cerrahi geciktirme yöntemleri klinik etkinliği ıspatlanmış olmasına karşın çok aşamalı cerrahi gerektirmesi, pahalı ve zaman alıcı olması geciktirme işlemlerinin klinik kullanım alanını daraltmaktadır. Günümüzde geciktirme işlemlerine alternatif olarak flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik farmakolojik ajanların kullanımı üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla vazodilatatör, antitrombotik ajanlar, nörofil kümelenemsi, ve yapışmasını önlemeye yönelik ajanlar⁹¹, hemoreolojik ajanlar, antiinflamatuvar ajanlar, antioksidan ajanlar denenmiştir⁹².

Bu ilaçların etkinlikleri hayvanlarda deneysel olarak gösterilmişse de flep yaşayabilirliğini artırmadaki klinik etkinliği geciktirme yöntemlerinin önüne geçememiştir. Yakın zamandaki çalışmalar lokal anjiogenik sitokin protein (VEGF, PDGF) tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır ve bu tedavilerin flep yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir^{51,52}. İskemi/reperfüzyon sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri yaşlanma süreci, kardiovasküler hastalıklar, kanser, akciğer hastalıkları, inflamatuvar, romatizmal hastalıklar gibi pek çok hastalığın patogeneğinde etkilidir. Vücutta oksiradikallere karşı değişik antioksidan sistemler mevcuttur .Antioksidanlar endojen ve eksojen olarak iki grupta toplanabilir. Bunlar etkilerini 4 temel mekanizma ile gerçekleştirirler. Bunlar temizleyici (scavenging), söndürme(quenching), onarıcı (repair), zincir kırıcı (chain breaking) etkidir. Antioksidanların değişik mekanizmalar üzerinden flep yaşayabilirliğini arttırması üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çetin ve arkadaşları fucoidinin lökosit adezyonunda ilk basamak olan “rolling” fazını doza bağlı inhibe ederek cilt flebinde iskemi reperfüzyon hasarını azalttığını göstermişlerdir⁹³. Arıcı ve arkadaşları quercetin’in ksantin oksidaz enzim aktivitesini inhibe ederek kas fleplerindeki iskemi reperfüzyon hasarını azalttığını göstermişlerdir⁹⁴. Karnitin, desferoksamin, vitamin E, C, koenzimQ gibi birçok ajanın antioksidan aktivite ile deneysel olarak flep yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir^{95,96}. Özkan ve arkadaşları metilen mavisinin ksantin oksidaz inhibisyonu yoluyla sıçan epigastrik ada flebinin yaşayabilirliğini olumlu etkilediğini göstermişlerdir⁹⁷. Özbebit ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada midazolamın VEGF düzeyini artırma yoluyla flep yaşayabilirliğini arttırdığını göstermişlerdir⁹⁸.

Thymoquinone, halk arasında çörek otu olarak bilinen, eklem ağrıları, daire, dispepsi, karaciğer, akciğer hastalıkları tedavisinde doğal ilaç olarak kullanılan Nigella Sativa bitkisinin tohumlarından elde edilmektedir. Özellikle antikarsinojenik etkisi üzerine çok sayıda deneysel çalışma yapılmıştır. Ait ve arkadaşları, tümörlü farelerde intratümöral uygulanan nigella sativa ekstresinin tümör boyutunda küçülme, metastaz oranında azalma sağladığını göstermişlerdir⁶⁵. Ivankovic ve arkadaşları skuamöz hücreli karsinom ve fibrosarkom üzerinde yaptıkları in vitro ve in vivo çalışmalarda timokinonun tümör hücrelerinde doz bağımlı sitotoksik etki ve büyüme inhibisyonuna yol açtığını bulmuşlardır⁶⁶. Badary timokinonun ifosfamide bağlı renal toksisiteyi azalttığı ve ifosfamidin antitumoral aktivitesini arttırdığını göstermiştir⁶⁷. Peng ve arkadaşları timokinonun osteosarkomda tümör proliferasyon ve anjiogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir⁹⁹. Ayrıca ovarian adenokarsinom¹⁰⁰, uterin sarkom¹⁰¹, insan osteosarkomu¹⁰², fibrosarkom, prostat kanserinde¹⁰³ tümör proliferasyonunda inhibitör etkisi gösterilmiştir. Bunların dışında timokinonun antimikrobial, antihepatotoksik, antinefrotoksik, antidiabetik, vasküler sistem üzerinde araşidonik asit metabolizması üzerinden antiagregan etki gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmalar

timokinonun antikanserojen, antihepatotoksik, antinefrotoksik özelliklerini mevcut antioksidan kapasitesine bağlamışlardır. Houghton ve arkadaşları timokinonun hücre kültüründe non enzimatik lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir⁶⁸. Meral ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada diabetik tavşanlarda timokinonun süperoksit radikal düzeyini azalttığını, lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir⁷⁴. Sayed ve arkadaşlarının timokinonun sıçanlarda oluşturulmuş gentamisin nefrotoksisitesine etkisi üzerine yaptığı çalışmada doku glutatyon peroksidaz, katalaz, glutatyon, ve lipid peroksidasyon göstergesi olan tiyobarbiturik asit-reaktif substance (TBARS) değişimini incelemiş ve timokinon grubunda anlamlı azalma saptamışlardır¹⁰⁴. Hosseinzadeh ve arkadaşlarının yaptığı sıçan iskelet kasında iskemi reperfüzyon hasarında timokinonun etkisi üzerine yaptıkları çalışmada 20mg/kg, 40mg/kg, 80 mg/kg dozlarında sistemik intraperitoneal timokinon uygulaması sonrası iskemi reperfüzyon hasarında anlamlı azalma, total sülfidril grubunda, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyinde anlamlı azalma, total antioksidan kapasitede artış tespit etmişlerdir². Çalışmada timokinonun antioksidan etkisinin doz bağımlı olarak artış gösterdiği de belirtilmiştir. Kirui ve arkadaşları sürekli salınlı timokinon tedavisi altında kemik iyileşmesinde artış olduğunu saptamışlardır¹⁰⁵. Kara ve arkadaşları çalışmalarında sıçanlarda hızlı maksiller ekspansiyon prosedüründe uygulanan timokinonun maksiller suturlerde yeni kemik formasyonunda, kapiller sayısında ve inflamatuvar hücre yoğunluğunda artışa sebep olduğunu tespit etmişlerdir¹⁰⁶. Selçuk ve arkadaşları sıçanda oluşturulan 2. derece yanık modelinde 21 gün boyunca 2 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal ve %0.5 lik solusyon olarak topikal uygulanan timokinon etkisi üzerine çalışma yapmışlardır. Sonuçta timokinonun kombine sistemik ve topikal olarak uygulandığı grupta minimum nekroz, daha düşük total oksidatif stres seviyesi ve minimum bakteri sayısının ölçüldüğünü belirtmişlerdir. Sonuç olarak timokinonun sistemik veya topikal uygulamada inflamasyon ve oksidatif stresi azaltarak yara iyileşmesi ve reepitelizasyonu hızlandırdığını belirtmişlerdir⁷⁹.

Bu verilerden yola çıkılarak timokinonun sıçanlarda flep sağkalımına etkisini araştırmak amaçlı bu çalışma planlandı. Literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak sıçanlarda 3x9 cm'lik kaudal tabanlı dorsal modifiye Mc Farlane flepleri tasarlandı. Timokinon ile yapılan deneysel flep çalışması olmaması nedeni ile literatürde bulunan yanık yara iyileşmesi⁷⁹ ve kas iskemi reperfüzyon hasarı üzerine yapılan çalışmalardaki efektif dozlar dikkate alınarak² post operatif ilk günden itibaren 10 gün boyunca 5mg/kg (toplamda 50 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyon yapıldı. Sıçanlarda Mc Farlane flebinde nekrozun demarkasyon süreci genelde 7-10 gün olması nedeni ile sıçanlar 10. günde kurban edilerek fleplerde nekrotik alan ölçümleri ve histolojik inceleme amaçlı flep proksimalinden ve distalde sağlam doku- nekroz geçiş zonundan doku örnekleri alındı. Yine 10. günde biyokimyasal inceleme amaçlı serum ve doku örnekleri alındı.

Abla ve arkadaşlarının sıçan deri fleplerinde asetilsistein ile yaptığı çalışmada asetilsisteinin flep nekrozunu %14 oranında azalttığını saptamışlardır¹⁰⁷. Angel ve arkadaşlarının antioksidan olan desferoksamin ile yaptığı çalışmada flep nekroz alanlarında belirgin azalma tespit edilmiştir¹⁰⁸. Çalışmamızda timokinon enjekte edilen grupta kontrol ve sham grubuna oranla nekrotik alan ölçümlerinde ve nekroz/flep alanı yüzdelerinde istatistiksel olarak

anlamli derecede azalma saptanmifstir. Sadece DMSO uygulanan sham grubunda da kontrol grubuna oranla nekroz yuzdelerinde anlamli azalma tespit edilmitstir. Bu da thymoquinonun antioksidan ozelligi sayesinde distal flep nekrozunu azalttigini dusundurmektedir. Bu sonuc literatürdeki flep yasayabilirliği üzerine yapılan diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda thymoquinonun antioksidan etkinliğini göstermek için serum ve fleplerden alınan doku örneklerinde total antioksidan kapasite ve ve lipid peroksidasyon göstergesi olan tiyobarbiturik asit-reaktif substance (TBARS) değişimini incelenmiş ve timokinon grubunda kontrol grubuna ve sham grubuna oranla anlamli ölçüde düşük olduğu saptanmifstir. Antioksidan etkinlik gösterdiği bilinen DMSO'nun¹⁰⁹ tek başına uygulandığı sham grubunda doku (TBARS) ve doku total antioksidan kapasite ölçümünde kontrol grubuna oranla anlamli değişiklik saptanırken, serum ölçümlerinde anlamli fark saptanmamifstir. Bu thymoquinonun serum ve doku düzeyinde antioksidan kapasiteyi arttırdığını göstermektedir. Bu sonuçlar timokinonun antioksidan etkinliğine ilişkin literatürdeki diğer çalışmalarla uyum göstermektedir^{2,70,71}.

Literatürde timokinonun antiinflamatuvar özellik gösterdiğine dair çalışmalar olmasına karřın⁶⁸ bizim çalışmamızda gruplar arasında flep proksimal ve distallerinde PNL ve lenfosit düzeylerinde anlamli fark saptanmamif ve anlamli düzeyde antiinflamatuvar etkinlik gösterilememiştir.

Fibroblast düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli fark olmamasına karşın deney grubunda flep distallerindeki proliferasyonun diğer gruplara göre daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Bu da bize thymoquinonun fibroblast proliferasyonuna az da olsa olumlu katkı sağladığını dusundurmektedir.

Kesitlerdeki kollajen düzeyleri incelendiğinde flep distallerinde deney grubunda kollajen yoğunluğunun anlamli derecede daha fazla olduğu, lif yapılarının belirmeye başlamif, yer yer demetler yapmif durumda olduğu gözlenmiştir. Bu da timokinonun kollajen sentezini stimüle ettiğini göstermektedir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar literatürdeki diğer antioksidan ve antiinflamatuvar ajanlarla yapılmif çok sayıda çalışmayla paralellik göstermektedir. Her antioksidanın farklı ve çok çeşitli mekanizmalarla etkinliğini göstermesi nedeni ile etkinliklerini standardize etmek mümkün değildir.

Peng ve arkadaşları yaptıkları invivo ve in vitro çalışmalarda timokinonun osteosarkomda antitümör ve antianjiogenetik etkisi olduğunu göstermiřlerdir⁹⁹. Timokinonun fleplerde neoanjiogenetik etkisi üzerine literatürde yapılmif çalışma yoktur. Bizim çalışmamızda antiVEGF antikoru ile yapılan boyamada özellikle deney grubunda flep distallerinde daha yoğun damarlanma görölmesine (Tablo 4) karşın gruplar arasında istatistiksel olarak anlamli fark görölmemiştir. Bu timokinonun fleplerde belirgin neoanjiogenetik etkisi olmadığını dusundurmektedir.

6.SONUÇ

Timokinon binlerce yıldır pek çok hastalığın tedavisinde doğal ilaç olarak kullanılmakta olan nigella sativa bitkisinden elde edilmiştir. Günümüzde özellikle antioksidan kapasitesi nedeni ile kanser tedavisine yönelik deneysel çalışmalarda çokça kullanılmış ve olumlu yanıtlar alınmıştır. Antioksidan özelliğini özellikle enzimatik lipid peroksidasyonu inhibisyonu aracılığıyla gösterir.

Çalışmamızda thymokinonun sıçandan oluşturulan dorsal random paternli fleplerinde distal nekroz alanını anlamlı derecede azalttığı ve yara iyileşmesine olumlu katkı sağladığı saptanmıştır. Bu nedenle plastik cerrahinin büyük bir parçası olan flep cerrahisi operasyonlarında flep yaşayabilirliğini arttırıcı bir ilaç olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz. Ancak timokinonun flep sağ kalıma etkisi üzerine başka çalışma olmaması nedeni ile timokinonun değişik dozlarda etkileri, minimum ve maksimum etkinliğin görüldüğü dozlar, topikal veya oral uygulamada etkinliği hakkında bilgi yoktur. Klinik kullanım öncesi çeşitli doz aralıkları ve uygulama yolları ile yapılacak çalışmaların gerekli olduğunu kanaatindeyiz.

7.KAYNAKLAR

- 1.Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH, Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol.* 2012 Feb 15;83(4):443-51
- 2.Hosseinzadeh H, Taiari S, Nassiri-Asl M. Effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* L., on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* ,May 2012, Volume 385, Issue 5, pp 503-508
- 3.Smith JD, Pribaz JJ. Flaps.Achauer BM, Eriksson E(ed.) *Plastic surgery: Indications, operations and outcomes.* St. Louis-Missouri. Mosby. 2000; 1: 261–290.
- 4.Kayser M. R., Hodges P. L., *Surgical Flaps.* (In). *Selected Readings in Plastic Surgery*, 1995; 8 (3), 1-58 p.
- 5.McCarthy JG. *Introduction to plastic surgery.* Plastic Surgery. W.B. Saunders Company, 1th edition 1990;49: 1-68.
6. Bhishagratna KK. *An English translation of the Sushruta Samhita based on original Sanskrit text.* Calcutta: Bose;1916
7. Hansen SL,Young DM, Lang P, Sbitany H, Flap classification and applications,Gurtner G.C, Nelligan P (ed.), *Plastic Surgery* ,Vol. One:Principles , Vol.1 Third Edition , Philadelphia, Elsevier Saunders, 2013; 24:512-574
8. Tagliacozzi G. *De curtorum chirurgia per institutione.* Venice: Gaspare Bindoni; 1597.
9. Carpue JC. *An account of two successful operations for restoring a lost nose from the integuments of the forehead.* London: Longman; 1816.
- 10.Von Graefe CF. *Rhinoplastik, oder die kunst den verlust der nase organisch zu ersetzen.* Berlin:Realschulbuchhandlung; 1818.
11. Manhot C. *Die hautarterien des menschlichen korpers.* Leipzig: Vogel; 1889.
12. Tansini I. *Sporo il mio nuova processo di amputazione della mammella.* Gazz Med Ital. 1906;57:141.
13. Davis JS. *Plastic surgery: its principles and practices.* Philadelphia: Blakiston; 1919.
14. McGregor IA. *The temporal flap in intra-oral cancer: its use in repairing the post-excisional defect.* Br J Plast Surg. 1963;16:318.
15. Bakamjian VY. *A technique for primary reconstruction of the palate after radical maxillectomy for cancer.* Plast Reconstr Surg. 1963;31:103.
16. Stark WJ. *The use of pedicled muscle flaps in the treatment of chronic osteomyelitis resulting from compound fractures.* J Bone Joint Surg. 1946;28:343.

17. Ger R. The technique of muscle transposition in the operative treatment of traumatic and ulcerative lesions of the leg. *J Trauma*. 1971;11:502.
18. Orticochea M. The musculocutaneous flap method: an immediate and heroic substitute for the method of delay. *Br J Plast Surg*. 1972;25:106.
19. Ponten B. The fasciocutaneous flap: its use in soft tissue defects of the lower leg. *Br J Plast Surg*. 1981;34:215.
20. Mathes SJ, Nahai F. Vascular Anatomy of muscle classification and applications. Mathes SJ, Nahai F (ed.) *Clinical applications for muscle and musculocutaneous flaps*. St. Louis: MO: Mosby; 1982:16-52
21. Mathes, S. J., and Nahai, F. The reconstructive triangle: a paradigm for surgical decision making. Mathes SJ, Nahai F (ed.) In *Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy, & Technique*. New York: Churchill Livingstone, 1997. Pp. 9–36.
22. Budd, M.E, Hovsepian B, Basseri B, Evans GRD, Flap. Guyuron B, Eriksson E, Persing J (ed.) *Plastic Surgery, Indications and Practice*, Saunders/Elsevier, New York, 2009:67-79
23. Cormack, GC, and Lamberty, BGH The fasciocutaneous system of vessels. Cormack GC, Lamberty BGH (ed.). *The arterial anatomy of skin flaps*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994:105-129
24. Hallock GG. Classification of flaps. Wei FC, Mardini S. (ed.) *Flaps and reconstructive surgery*. Saunders Elsevier. 2009; 7-17
25. Mathes SJ, Nahai F. Flap selection: analysis of features, modifications, and applications. Mathes SJ, Nahai F (ed.) *Reconstructive surgery: principles, anatomy, and technique*. Churchill Livingstone, New York, 1997 :37–160
26. Nakajima H, Fujino T, Adachi S. A new concept of vascular supply to the skin and classification of skin flaps according to their vascularization. *Ann Plast Surg* 1986 ;16:1– 17.
27. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg* 1987 ;40 : 113 – 141 .
28. Altındaş M. Deri Graftleri ve Flepler, Güzel, MZ (ed.) *İ.Ü. Plastik ,Rekonstrüktif, Estetik Cerrahi Ders Kitabı*, İstanbul 2011: 47-63
29. Vedder, N. B., Flap Physiology. Mathes Plastic Surgery, 2nd ed., volume 1, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2006; 483-506 p.
30. Burnstock G, Ralevic V. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *Br J Plast Surg* 1994; 47: 527-543.
31. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and physiology of skin flap surgery. Mc Carthy JG (editor). *Plastic Surgery*. Philadelphia. W.B. Saunders 1990; 1: 275–328.

32. Lamberty B.G.H., Healy C. : Flaps : Physiology , principles of design and pitfalls. Cohen M.(ed.) Mastery of Plastic Reconstructive Surgery.,vol.1 Little,Brown and Co.,Boston,56-70
33. Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 1980; 65: 152-158
34. Akyol, Ö., Şizofrenide Oksidatif Stres, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5 (Ek Sayı) 2004; 15-25 s
35. Gökpinar, Ş., Koray T., Akçiçek, E., Göksan T., Durmaz, Y., Algal antioksidanlar, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi* 2006; 23, 85-89
36. Altan N., Dinçel, A. S., Koca,C., Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres, *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry)*, 2006; 31 (2); 51–56 s.
- 37.. Khalil, A. A., Aziz, F. A., Hall, J. C., Reperfusion Injury, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2006; 117 (3), 1024-1033 p.
38. Pang Cy,Neligan PC, Flap pathophysiology and pharmacology, Nelligan, Gurtner (ed.)*Plastic Surgery Third Ed. Vol. One:Principles , Vol.1 Third Edition , Philadelphia, Elsevier Saunders*, 2013: 573-586
39. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, et al. Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:2643–2646.
40. Tosa Y, Lee WP, Kollias N, et al. Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects skin flaps against ischemia-reperfusion injury: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg*. 1998;101:1586–1594; discussion 1595–6.
41. Stotland MA, Kerrigan CL. E- and L-selectin adhesion molecules in musculocutaneous flap reperfusion injury.*Plast Reconstr Surg*. 1997;99:2010–2020.
42. Miyamae M, Camacho SA, Weiner MW, et al. Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca²⁺]_m overload in rat hearts. *Am J Physiol*. 1996;271:H2145–H2153.
43. Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. The role of the Na⁺/ H⁺ exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na⁺ concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart. *J Biol Chem*. 1984;259:8880–8885.
44. du Toit EF, Opie LH. Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion. *Circ Res*.1992;70:960–967.
45. May Jr JW, Chait LA, O’Brien BM, et al. The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1978;61:256–267.
46. O’Shaughnessy KD, Mustoe TA. The surgical TRAM flap delay: reliability of zone III using a simplified technique under local anesthesia. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122:1627–1630

47. Thorne CH, Techniques and principles in plastic surgery. Thorne CH(ed). Grabb and smith's Plastic Surgery. 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2014:1-13
48. Bakamjian VY. The deltopectoral flap. In: Grabb WC, Smith JW, eds. Skin Flaps. Boston, Massachusetts: Little, Brown; 1975:225–258.
49. Barker JH, van Aalst VC, Keelen PC, et al. Vascular delay in skeletal muscle: a model for microcirculatory studies. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100:665–669
50. Morris SF, Yang D. Effect of vascular delay on viability, vasculature, and perfusion of muscle flaps in the rabbit. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104:1041–1047.
51. Im MJ, Kim YS, Edwards RJ, et al. The effect of bovine basic fibroblast growth factor on skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg*. 1992;28:242–245.
52. Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, et al. Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H946–H954
53. Kayser M R. Surgical flaps. *Selected Readings in Plastic Surgery*. 1999;9(2):165-78.
54. Fridovich I. The Biology of Oxygen Radicals. *Science*. 1978; 201: 875-880
55. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve Lipid Peroksidasyonu. *Klinik Gelişim*. 1995:3906-3911.
56. Sayed MD. Traditional medicine in health care. *J Ethnopharmacol* 1980; 2: 19-22.
57. Ramadan MF (2007). Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*N sativa*) L: An overview. *Int J Food Sci Tech*, 42, 1208-1218.
58. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 2000; 14: 323-328.
59. Hosseinzadeh H, Parvardeh S (2004). Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *N sativa* seeds in mice. *Phytomedicine*, 11, 56-64.
60. Ghosheh OA, A Houdi, PA, Crooks (1999). High performance liquid chromatography analysis of the pharmacologically active quinines and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa*). *J Pharm Biomed*, 19, 757-762
61. Khalife KH, Lupidi G (2007). Nonenzymatic reduction of thymoquinone in physiological conditions. *Free Radic Res*, 41, 153-161.
62. Ragheb A, Attia A, Eldin WS, Elbarbry F, Gazarin S, Shoker A (2009). The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: A review Saudi. *J Kidney Dis Transpl*, 20, 741-52
63. F- Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced

hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 110: 239-251

64. Gali-Muhtasib H, Roessner A, Schneider-Stock R (2006). Thymoquinone promising anticancer drug from natural sources. *Int J Biochem, Cell Biol*, 38, 1249-1253

65. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, AbufatimaR, et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 839-847

66. Ivankovic S, Stojkovic R, Jukic M, Milos M, Milos M, Jurin M. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. *Exp Oncol* 2006; 28: 220-224.

67. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activities in mice. *J Ethnopharmacol* 1999; 67: 135-142

68. Houghton PJ, Zarka R, las Heras B, Hoult JRS. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med* 1995; 61: 33-36.

69. Abdel Fatah M, Matsumoto K, Watanake H. Antinociceptive effect of *Nigella sativa* oil and its major components in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 400: 89-97.

70. Badary OA, Nagi MN, al Shabanah OA, al Sawaf HA, al Sohaibani MO, al Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 1356-1361.

71. Fouda AM, Daba MH, Dahab GM, Sharaf El-Din OA. Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 109-118.

72. Mansour MA Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sci* 2000; 66: 2583-2591.

73. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 1998; 95: 23-29.

74. Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2001; 48: 593-599.

75. Al-Hader A, Agel M, Hasan Z. Hypoglycemic effect of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacog* 1993; 31: 96-100.

76. Agrawal R, Kharya MD, Shrivastava R. Antimicrobial and antihelminthic activity of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol* 1979; 17: 1264-1265.

77. el Tahir KE, Ashour MM, al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 1123-1131.
78. Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, Narui T, Okada Y, Singab AN et al. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 307-310.
79. Selçuk CT, Durgun M, Tekin R, Yolbas L, Bozkurt M, Akçay C, Alabalk U, BASarali MK, Evaluation of the Effect of Thymoquinone Treatment on Wound Healing in a Rat Burn Model, *J Burn Care*, 2013 Sep-Oct; 34(5): e274-81
80. Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA (2008). Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 20, 252-257
81. Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Bekairi AM, Almazar MMA. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Develop Res* 1998; 44-61.
82. Khouri RK, Angel MF, Edström LE. Standardizing the dorsal rat flap. *Surg Forum*. 37:590, 1986
83. McFarlane RM, De Young G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and prevention. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1965; 35: 177- 182
84. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., *Anal. Biochem.*, 95, 351—358 (1979).
85. Tanaka et al. Quantitative Measurements of Oxidative Stress in Mouse Skin Induced by X-Ray Irradiation. *Chem. Pharm. Bull.* 53(11) 1411—1415 (2005)
- 86 Buege JA, Agust SD. Determination of Tissue Lipid Peroxidation 1978).
87. Pang CY, Forrest CR, Neligan PC, et al. Augmentation of blood flow in delayed random skin flaps in the pig:
effect of length of delay period and angiogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 1986; 78:68—74.
88. Callegari PR, Taylor GI, Caddy CM, et al. An anatomic review of the delay phenomenon: I. Experimental studies. *Plast Reconstr Surg*. 1992; 89:397—407; discussion 417—8
89. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, et al. An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg*. 1992; 89: 408—416; discussion 417—8.
90. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, et al. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg*. 2004; 239:866—873; discussion 873—5.
91. Vedder NB, Bucky LP, Richey NL, et al. Improved survival rates of random flaps in rabbits with a monoclonal antibody that blocks leukocyte adherence. *Plast Reconstr Surg*. 1994; 93:1035—1040.

92. Suarez Nieto C, Suarez Garcia MJ, Barthe Garcia P. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg*. 1992;45: 113–116.
93. Çetin C, Köse AA, Aral E: Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg*, 2001; 47:540-546.
94. Arıcı, M.: The Effects Of Quercetin In Ischemia Reperfusion Injury Of Muscle Flaps: experimental Study, Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery, Eskişehir, 2006.
95. Kargi E, Deren O, Babuccu O, Hosnuter M, Erdogan B. Dual synergistic effect: the effect of dexamethasone plus carnitine on skin flap survival. *Ann Plast Surg*, 2004;53(5):488-491.
96. Kayser MRMD. Surgical flaps. *Selected Readings in Plastic Surgery*, 1999; 9(2).
97. Özkan M. et al. The investigation of methylene blue effects on survival increase of random pattern dermal flaps on rats. *Uzmanlık Tezi, Elazığ*, 2006.
98. Özbebit Ü. et al. The effect of midazolam on flap survival on rat McFarlane flap model. *Uzmanlık Tezi, Kayseri*, 2007.
99. Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying XZ, Liao W, Liu HX, Lin ZQ, Chen QY, Cheng SW, Shen WD. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncol Rep*. 2013 Feb;29(2):571-8. doi: 10.3892/or.2012.2165. Epub 2012 Dec 4.
100. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. *Int J Oncol*. 2003 Jan; 22(1):107-13. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone.
101. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res*. 1998 May-Jun; 18(3A):1527-32.
102. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, et al. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2007;6:160–9.
103. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, et al. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research*. 2007;67:7782–8.
104. Sayed –Ahmed MM, Nagi MN. The thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 399-405.

105. Kirui PK1, Cameron J, Benghuzzi HA, Tucci M, Patel R, Adah F, Russell G. Effects of sustained delivery of thymoquinone on bone healing of male rats. *Biomed Sci Instrum.* 2004;40:111-6.
106. Kara MI, Erciyas K, Altan AB, Ozkut M, Ay S, Inan S. Thymoquinone accelerates new bone formation in the rapid maxillary expansion procedure. *Arch Oral Biol.* 2012 Apr;57(4):357-63. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.09.012.
107. Abla LE, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* 2005; 20: 121123
108. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, Ramasastry SS, Kuhns DB, Basford RE, Futrell JW. Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischaemic flap surgery. *Br J Plast Surg* 1986; 39(4):469-472
109. Brayton CF Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review., *Cornell Vet.* 1986 Jan;76(1):61-90.