



T.C

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PROF. DR. DURSUN ODABAŞ TIP MERKEZİ

**RATLARDA RANDOM PATERNLİ FLEPLERDE THYMOQUİNONE
ETKEN MADDESİNİN FLEP SAĞKALIMI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Dr.Ömer Faruk KOÇAK

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Serdar YÜCE

VAN-2014

**Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığınca
“2013-TF-U078” proje numarası ile desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Tecrübelerinden faydalandığım tez danışmanı hocam Yrd. Doç. Dr. Serdar YÜCE'ye, asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktararak bana yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Bekir ATİK, Doç. Dr. Dağhan IŞIK, Yrd. Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a teşekkür ederim.

Göreve başladığım günden itibaren birlikte çalışmaktan keyif duyduğum uzman olmuş ağabeylerim ve asistan arkadaşlarıma; tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Patoloji bölümünden Yrd. Doç. Dr. Gülay BULUT'a, Histoloji-Embriyoloji bölümünden Prof. Dr. M. Çetin RAĞBETLİ'ye ve Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji bölümünden Tolga MERCANTEPE'ye, Biyokimya bölümünden Dr. Gönül TEKİN'e ve istatistik bölümünden Araştırma Görevlisi Kübra BAĞCI ve Burak GÖRENTAŞ'a teşekkür ederim.

Özveri ve sabırlarından dolayı sevgili eşim, can yoldaşım Seda'ya, beni cesaretlendiren değerli Anne ve Babama ve eğitimim boyunca benim için sonsuz fedakarlıklarda bulunan sevgili Ablalarım ve Ağabeyime sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Son olarak 2013-TF-U078 proje numarası ile bu çalışmayı yapmamı sağlayan Van Y. Y. Ü Bilimsel Araştırmalar Proje Daire Başkanlığına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	2
İÇİNDEKİLER.....	3
KISALTMALAR.....	5
ŞEKİL LİSTESİ.....	6
TABLO LİSTESİ.....	7
RESİM LİSTESİ.....	8
ÖZET.....	9
SUMMARY.....	10
1.GİRİŞ.....	11
2.GENEL BİLGİLER.....	12
2.1.Derinin Yapısı ve Kanlanma Paterni.....	12
2.2.Flepler.....	14
2.2.1.Flep Cerrahisinin Tarihçesi.....	14
2.2.2.Fleplerin Sınıflandırılması.....	15
2.2.2.A.Kanlanmalarına Göre Deri Flepleri	15
2.2.2.B.Defekte Olan Uzaklığına ve Hareketlerine Göre Deri Flepleri	17
2.2.2.C.İçeriğine ve Pedikül Özelliğine Göre Flepler	17
2.2.3.Flep Fizyolojisi.....	21
2.2.4.Fleplerde Kan Akımı Regülasyonu.....	23
2.2.5.Flep Kaybı ve Nedenleri.....	25
2.2.6.Flep Viabilitesini Arttıran Terapotik Ajanlar.....	27

2.3.Thymoquinone Etken Maddesinin Kimyasal ve Biyolojik Yapısı.....	28
2.4.Thymoquinone Etken Maddesinin Organ Sistemleri Üzerine Olan Etkileri.....	29
3.MATERYAL VE METOD.....	30
3.1.Gruplar.....	30
3.2.Deneyin Yapılışı.....	31
3.3.Fleplerin Kaldırılması.....	32
3.4.Ötenazi İşlemi ve Örneklerin Alınması.....	35
3.5.Yüzey alan ölçümleri.....	36
3.6.Histopatolojik Değerlendirme.....	36
3.7. Elektron Mikroskopisi.....	37
3.8. Biyokimyasal Değerlendirme.....	37
3.8.1.Katalaz.....	37
3.8.2.Malondialdehit.....	38
3.8.3.HIF-1a.....	38
3.9.İstatistik.....	39
4.BULGULAR.....	39
4.1.Makroskopik Bulgular.....	39
4.2.Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları.....	40
4.3.Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları.....	49
4.4.Elektron Mikroskopisi.....	50
5.TARTIŞMA.....	59
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
REFERANSLAR.....	65

KISALTMALAR

TQ: Thymoquinone etken maddesi.
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
MDA: Malondialdehit
HPLC: High-performance liquid chromatography (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi)
Cat: Katalaz
KCl: Potasyum klorür
IMA: İskemi modifiye albumin
HIF-1a: Hypoxia-inducible factors (Hipoksi uyarıcı faktör)
m: muscle
mm: musculus
R: random
Ax: aksiyel
ATP: Adenozin trifosfat
LT B₄: Lökotrien B₄
TX A₂: Tromboksan A₂
PG I₂: Prostaglandin I₂
PG E₂: Prostaglandin E₂
CCl₄: Karbon tetraklorür
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
EDTA: Ethane-1,2-diyl dinitrilo tetraacetic acid
O₂: Oksijen
Ca: Kalsiyum
CO₂: Karbondioksit
DMSO: Dimetilsulfoxit
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Y.Y.Ü: Yüzüncü Yıl Üniversitesi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1 : Derinin kan dolaşımı.....	13
Şekil 2 : Choke anastomozlar ve gerçek anastomozlar.....	14
Şekil 3 : Derinin kan dolaşımı.....	16
Şekil 4 : Deri fleplerinin sınıflandırılması.....	16
Şekil 5 : Vasküler anatominin düzeni (Mathes-Nahai Sınıflaması).....	18
Şekil 6 : Vasküler anatomi paternleri.....	19
Şekil-7: Aksiel fleplere göre random flepler.....	23
Şekil-8: Toksik oksijen radikallerinin oluşumu.....	26
Şekil-9: Thymoquinone(TQ) nun kimyasal yapısı.....	28
Şekil-10: TQ nun elde edildiği nigella sativa bitkisi.....	29
Şekil-11: TQ etken maddesinin katı formu.....	29
Şekil-12: Ratların Gruplandırılması ve Barınma Koşulları.....	31
Şekil-13: Dimetilsulfoksit(DMSO).....	32
Şekil-14:McFarlane Flebinin Topoğrafik Anatomisi.....	33
Şekil-15:McFarlane Flebinin Çizilmesi(3*10 cm).....	33
Şekil-16:Flebin Elevasyonu.....	34
Şekil-17:Flebin Kaldırılmış Hali.....	34
Şekil-18:Flep Damarlanması GÖsterilmesi.....	34
Şekil-19:Flebin Yerine Sütüre Edilmesi.....	35
Şekil-20: İntrakardiyak Ponksiyon Yapılması.....	35
Şekil-21: Asetat Kağıtlara Fleplerin Aktarılması.....	36
Şekil-22: HIF-1 Regülasyonu.....	38
Şekil-23: Her Grup İçin Fleplerde En Minimal Nekroz Görünümleri.....	39
Şekil-24;Gruplardaki PMNL-Lenfosit İnfiltrasyonları.(H&E.200 Büyütme).....	41
Şekil-25;Gruplardaki Dermal Ödem Görüntüleri(H&E.200 Büyütme).....	43
Şekil-26;Gruplardaki Damarlanma Artışı(CD 34 Antikoru İle Boyama.400 Büyütme)....	45
Şekil-27;Gruplardaki Kollajen Yoğunlukları(H&E.100 Büyütme).....	47

TABLO LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1 : Tip A Fasyal ve Fasyokutan Flepler.....	20
Tablo 2 : Tip B Fasyal ve Fasyokutan Flepler.....	20
Tablo 3 : Tip C Fasyal ve Fasyokutan Flepler.....	20
Tablo 4 : Abdominal Visseral Flep Sınıflaması.....	21
Tablo 5 : Flep Viabilitesi Üzerine Etkili Terapotik Faktörler.....	27
Tablo 6 : Flep Nekroz Yüzdeleri.....	39
Tablo 7 : Çalışma Parametreleri İçin Kullanılan Skorlar.....	40
Tablo 8 : Proksimal Biyopsilerin PMNL ve Lenfosit İnfiltrasyon Değerleri.....	42
Tablo 9 : Nekroz Geçiş Hattı Biyopsilerinin PMLN ve Lenfosit İnfiltrasyon Değerleri...	42
Tablo 10 : Proksimal Biyopsilerin Dermal Ödem Skorları.....	44
Tablo 11 : Nekroz Geçiş Hattı Biyopsilerinin Dermal Ödem Skorları.....	44
Tablo 12 : Nekroz Geçiş Hattındaki Damarlanma Artışı Skorları.....	46
Tablo 13 : Proksimal Biyopsilerdeki Kollajen Yoğunluğu Skorları.....	48
Tablo 14 : Nekroz Geçiş Hattındaki Kollajen Yoğunluğu Skorları.....	48
Tablo 15 : Gruplardaki HIF-1a Düzeyleri.....	49
Tablo 16 : Gruplardaki Katalaz Düzeyleri.....	49
Tablo 17 : Gruplardaki MDA Düzeyleri.....	50

RESİM LİSTESİ

Resim No

Sayfa No

Resim-1: Grup-1 mikrografında görülen normal mitokondri.....	50
Resim-2: Grup-2 mikrografında sitoplazma bütünlüğünü kaybetmiş nekrotik hücreler...	51
Resim-3: Grup-2 mikrografında deri dokusunda görülen hasarlı mitokondri.....	51
Resim-4: Grup-2 mikrografında deri dokusunda görülen hasarlı mitokondri.....	52
Resim-5: Grup-3 mikrografında deri dokusunda normal mitokondri.....	52
Resim-6: Grup-4 mikrografında deri dokusunda normal ve hasarlı mitokondriler.....	53
Resim-7: Grup-5 mikrografında deri dokusunda normal mitokondri.....	53
Resim-8: Grup-5 mikrografında deri dokusunda normal mitokondri.....	54
Resim-9: Grup-6 mikrografında görülen mitokondriler.....	54
Resim-10: Grup-6 mikrografında şişmiş mitokondri.....	55
Resim-11: Grup-6 mikrografında şişmiş mitokondri.....	55
Resim-12: Grup-6 mikrografında deri dokusunda normal mitokondri.....	56
Resim-13: Grup-6 mikrografında deri dokusunda hasarlı yapıdaki mitokondri.....	56
Resim-14: Grup-6 mikrografında deri dokusunda normal yapıdaki mitokondri.....	57

ÖZET

RATLARDA RANDOM PATERNLİ FLEPLERDE THYMOQUINONE ETKEN MADDESİNİN FLEP SAĞKALIMI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI-2014

Giriş ve Amaç: Vücudun değişik yerlerinde travma, kanser ablasyonları ve değişik faktörlere bağlı oluşan defektlerin kapatılmasında flepler plastik cerrahi uygulamalarında sıklıkla kullanılır. Geniş çaplı defektlerde kullanılacak fleplerin distalinde meydana gelen dolaşım yetmezliği gibi problemleri çözmek için literatürde oldukça fazla sayıda yayın bulunmaktadır. Yaptığımız bu çalışmada amacımız flep dolaşımı üzerine thymoquinone maddesinin etkilerini gözlemlemektir.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada ağırlıkları 200-250 gram arası olan 42 adet Norveç cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 7 sıçan olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. 1.gruptaki sıçanlara(Shame grup,n=7) herhangi bir işlem uygulanmadı. 2.gruptaki sıçanlara (Kontrol grubu.n=7) sadece cerrahi işlem uygulandı. 3. gruptaki sıçanlara (n=7) cerrahi işlem (3*10 cm Mc Farlane modeli flep kaldırılması) öncesi 10 gün boyunca oral 2 mg/kg DMSO (dimetilsulfoksit) çözeltisi içinde sıvı hale getirilmiş TQ(thymoquinone) verildi. 4.gruptaki sıçanlara (n=7) cerrahi işlemden sonraki 10 gün boyunca DMSO içinde çözülmüş ve sıvı hale getirilmiş 2 mg/kg oral TQ verildi. 5.gruptaki sıçanlara cerrahi işlem öncesi 10 gün ve sonrasında 10 gün boyunca günlük 2 mg/kg sıvı hale getirilmiş TQ oral yolla verildi. 6.gruptaki sıçanlara cerrahi işlem öncesi ve sonrası 10 günlük periyot boyunca 10 mg/kg DMSO verildi. Çalışma bitiminde fleplerin fotoğraflanmasından sonra biyokimyasal analizler için her sıçandan 3 cc kan örneği, elektron mikroskopi, biyokimya ve histopatoloji değerlendirmeleri için biyopsiler alındı.

Bulgular: Flep nekroz oranları olarak bakıldığında en az nekroz oranının grup-5 te olduğu en fazla nekroz oranının grup-2 ve 6 da olduğu gözlemlendi. (Grup-5;%8.42,Grup-2;%29.7,Grup-6;29.03,Grup-3;19.18,Grup-4;13.05). Bu değerler istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlıydı. Histopatolojik bulgulardan dermal ödem ve proksimal PMNL(polimorf nükleer lökosit infiltrasyonu) istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi. Ancak damarlanma artışı ve kollajen yoğunluğu TQ uygulanan gruplar lehine anlamlı olarak artmış izlendi. Elektron mikroskopi incelemelerinde mitokondri hasarının en fazla grup-2 ve grup-6 da olduğu en az grup-4 ve grup-5 gibi TQ uygulanan gruplarda olduğu gözlemlendi.

Sonuç: TQ maddesinin flep viabilitesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu düşünüldü. Çelişkili bulgular olmakla beraber TQ maddesinin antioksidan olmadığı, vaskülariteyi arttırdığı, nekroz oranını azalttığı gözlemlendi. Bu sonuçlara göre TQ maddesinin flepler üzerine olumlu etkilerinin olduğunu düşündüğümüz için plastik cerrahi uygulamalarında kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Thymoquinone, flep viabilitesi.

SUMMARY

THE INVESTIGATION ABOUT THE RATS IN RANDOM PATTERN FLAPS, THE EFFECTS OF ACTIVE SUBSTANCE THYMOQUINONE ON FLAP SURVIVAL-2014.

INTRODUCTION AND AIM: Flaps are often used in Plastic Surgery operations to closure the defects caused by trauma, cancer ablation and various factors in different parts of the body. There a lot of publications to solve the problems as the circulation failure in the distal flap which are used in large scale defects. Our aim in this work is to observe the effects of substance thymoquinone on flap circulation.

MATERIALS AND METHODS: In this study, 42 Norway Rats which weights between 200-250 grams were used 7 rats per group were divided into 6 groups . The rats in group 1 (shame group n:7), there was no operation. The rats in group 2 (control group n:7) underwent only surgical operation. The rats in group 3, (3*10 to remove the MC Farlane Model flap) were given TQ (Thyquinone) orally liquiefed in 2 mg/kg DMSO solution (dimethylsufoxide) 10 days before surgical operation. The rats in groups 4 (n:7) were given 2mg/kg TQ orally which dissolved and liquefied in DMSO 10 days after the surgical operation. The rats in group 5 were given 2 mg/kg liquefied TQ daily in a oral way 10 days ago from the surgical operation until 10 days after. Rats in group 6 were given 10 mg/kg DMSO during the 10 days period before and after the surgical operation at the end of the study, after the flap photographed 3cc blood samples were taken from each rats for biochemical analysis and biopsies were taken for electron microscopy, biochemistry and histopathological evaluation.

FINDINGS: As we look the rate of necrosis, the least necrosis rate-5 th group and the most necrosis rate in 2nd and 6th group were observed. (Group-5;%8.42, Group-2;%29.7, Group-6;29.03, Group-3;19.18, Group-4;13.05). These findings were significant statistically according to control group. When dermal edema and proximal PMNL (polymorph nuclear leukochyte infiltration) compared, there was no significant difference statistically between the groups. However, the rise of vascularity and collagen density increased significanty in favor of the group applied TQ. In analysis of electron microscopy , the most mitochondrial damage was observed in 2 and 6th groups and the least damage was observed in 4 and 5th groups which were applied TQ.

CONCLUSION: TQ Substance is thought that it has positive effects on viability of the flap. However, there are conflictive findings, we observe that TQ substance is not antioxidant but it increases the vascularity and it reduces the rate of necrosis. According to these results, we think that TQ substance has positive effects on flaps so we can use this substance in operations of plastic surgery.

KEYWORDS: Thymoquinone, flap viability

1.GİRİŞ

Travma, tümör ablasyonları, konjenital anomaliler sonrası oluşan defektlerin kapatılması için kullanım alanı bulan flepler plastik cerrahinin her zaman güncel konularından biri olmuştur.

İlk olarak 15.yüzyıl da Hint cerrah Sushruta Samita'nın yanak flebi kullanarak burun rekonstrüksiyonu yapması ile başlayan ve günümüze kadar gelen flepler hakkında gelişmeler hala devam etmektedir.

Bu gelişmeleri daha sonra lokal flepler, tüp flepler, serbest flepler ve son olarak perforatör flepler takip etmiştir. Ancak bütün bu gelişmelere rağmen bir bölgedeki doku kaybını o bölgenin yakınındaki lokal bir fleple onarma düşüncesi biz plastik cerrahlar için her zaman kozmetik uyum, düşük maliyet, hastanede yatış süresinin kısalığı gibi faktörler değerlendirildiği zaman öncelikli tercih olmuştur.

Özellikle lokal fleplerin uzak ve serbest fleplere göre kullanımı estetik kaygıların ön planda olduğu yüz ve benzeri bölgelerde tercih edilmektedir. Ayrıca yüz bölgesinde lokal fleplerin kullanılması renk ve doku uyumu açısından önemlidir. Bu amaçla kullanılan lokal fleplerin distalinde oluşan nekroz ve sonraki iyileşme sürecinde gelişen skar hastaların psikososyal yapılarını bozabilmektedir.

Bu nedenle fleplerde uzunluk/en oranının arttırılması ve buna yönelik yapılan çalışmaların artması önem arz etmektedir (1).

Lokal random fleplerde uzunluk/en oranı problemi lokal aksiel fleplere göre daha fazla karşımıza çıkmaktadır. Bu sorunun çözümü için antioksidan ajanlar, antikoagulan ajanlar, değişik enzim inhibitörleri vb. bir çok ajan deneysel çalışmalarda kullanılmıştır (2,3,4).

TQ nigella sativa bitkisinden elde edilen ve bir çok organ sistemlerine olumlu etkileri gösterilmiş bir ajandır. Daha çok gastrointestinal sistem, hematopoetik sistem, ürogenital sistem üzerine etkileri gösterilen TQ maddesinin ayrıca glukoz regülasyonu, lipit-kolesterol metabolizması ve bir çok kanser üzerinde olumlu etkileri çalışmalarda gösterilmiş ayrıca angiogenezi arttırdığı ve antioksidan olduğu belirtilmiştir (5,6).

TQ'nun süperoksit radikali ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olduğu ve 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği ve serbest radikal oluşumunu engelleyerek antioksidan etki gösterdiği kabul edilmektedir. Bir çok sistem üzerine etkileri tartışılan TQ'nun flep cerrahisi üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlamadık.

Bu nedenle çalışmamızda antioksidan ve neovaskülerizan etkileri gösterilmiş olan TQ maddesinin flepler üzerine etkilerini araştırmayı hedefledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.DERİNİN YAPISI ve KANLANMA PATERNİ

Deri vücudun en büyük organıdır. Epidermis ve dermisten oluşur. Epidermis üst tabakadır ve kalınlığı göz kapağında 0.04 mm ayak tabanında ise 1.4 mm olmak üzere değişmektedir. Dermisin tamamı epidermisten 15-40 kat daha kalındır. Dermis ve epidermisin birleşme yerinde papilla denilen uzantılar bulunur.

Dermis asellüler bağ doku elemanlarını içerir ve arasında sinirler, kan damarları, lenfatikler, kas üniteleri, pilosebase, ekrin ve apokrin üniteler vardır. Dermisin altında subkutan doku denilen içinde yağ hücrelerini içeren gevsek bağ dokusu bulunur.

Epidermis;

Epidermis çok katlı yassı keratinize epitelden oluşur. Aynı zamanda melanositleri, Langerhans hücrelerini ve Merkel hücrelerini de kapsar. Epidermis beş tabakadan oluşur.

1. Stratum bazale: En alt tabakadır. Bu tabakada yoğun mitotik aktivite vardır ve epidermisin sürekli yenilenmesinden sorumludur. Epidermis, lokalizasyon ve yasa bağlı olarak değişmekle beraber her 15-20 günde bir yenilenmektedir.

2. Stratum spinozum: Bu tabaka sitoplazması filamentlerle dolu olan poligonal hücrelerden oluşurlar. Bu filamentlere tonofibriller denilir ve sürtünme ile baskıya karşı direnç oluştururlar. Bu yüzden ayak tabanında daha bol miktarda bulunur. Stratum bazale ve Stratum spinozuma “Malpighi tabakası”denilir ve epidermisteki tüm mitozlar bu bölgede görülür.

3. Stratum granülozum: Sitoplazmalarında keratohyalin denilen madde bulunduran hücrelerden oluşur. Ayrıca lameller granüllerde bulunur. Bu granüller lipid içerir ve hücreler arası boşlukta bariyer görevi yaparak yabancı maddelerin penetrasyonunu engeller.

4. Stratum lucidum: Derinin kalın olduğu bölgelerde daha belirgin olan bir tabakadır. Yassı hücrelerden oluşur.

5. Stratum korneum: En üst tabakadır. Sitoplazması keratin ile dolu çekirdeksiz yassı hücrelerden oluşur. Bu hücreler keratini salgıladıktan sonra boynuzsu hücrelere dönüşürler. Daha sonra da yüzeyden dökülmeye başlarlar.

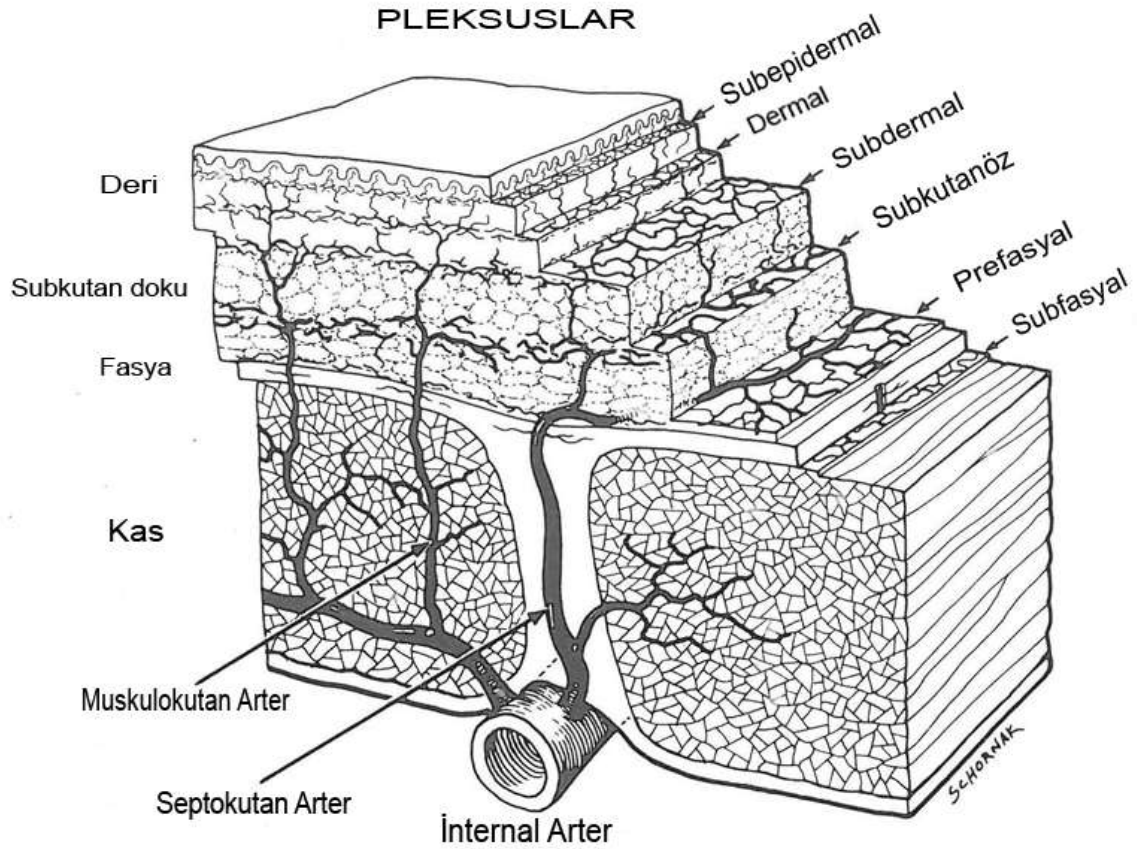
Langerhans hücreleri yıldız şekilli hücrelerdir ve özellikle stratum spinozumda bulunur. Bunlar kemik iliğinde yapılan makrofajlardır. Antijenleri T-lenfositlere tanıtırlar ve immün reaksiyonlarda rol oynarlar. Merkel hücreleri el ve ayaktaki kalın deride bulunan yoğun granül içeren hücrelerdir. Nöral krest orjinlidir ve duyuşal reseptör olarak çalışırlar (7).

Dermis;

Dermiste birbirinden tam olarak ayrılamayan iki tabaka bulunur. Bunlar papiller tabaka ile retiküler tabakadır. Papiller tabaka incedir ve gevsek bağ dokusundan oluşur. Fibroblast, mast hücreleri ve makrofaj içerir. Retiküler tabaka daha kalındır, düzensiz bağ dokusundan ve özellikle tip-1kollajenden oluşur. Papiller tabakaya göre daha az hücre bulundurur. Dermiste yaşlanma ile beraber kollajen lifler kalınlaşır ve sentezi azalır. Dermiste zengin bir kan ve lenf damar ağı vardır. Papiller tabakada bulunan zengin damarlar ise kendi damar ağı bulunmayan epidermisi besler. Dermiste ayrıca kıl follikülü, ter ve yağ bezleri gibi yapılar da bulunur. Dermis sinir bakımından da zengindir ve sempatik innervasyonu vardır. Parasempatik innervasyona sahip değildir (7).

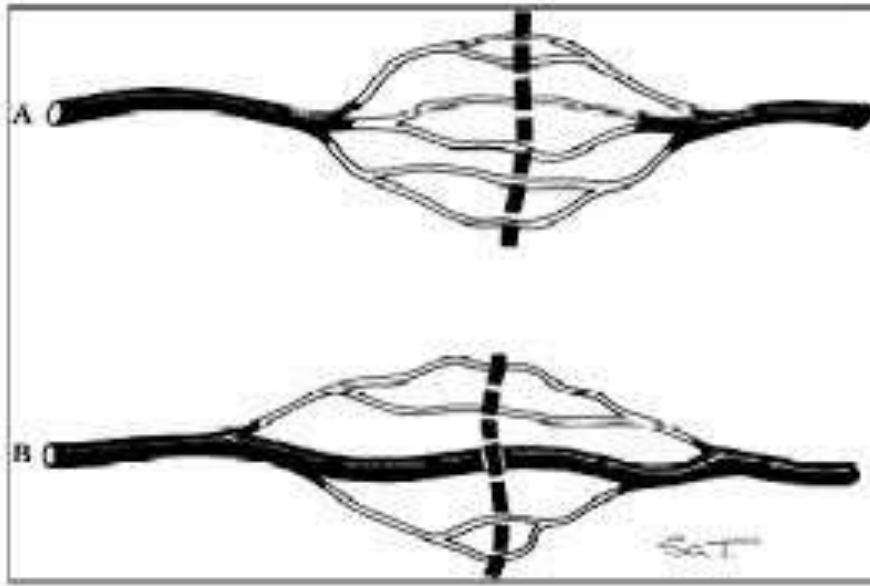
Derinin kan dolaşımının zengin ve geniş olmasına rağmen derinin metabolik ihtiyaçları azdır. Bu nedenle mevcut deri dolaşımının az bir kısmı derinin viabilitesi için yeterlidir. Bu da deri flepleri için bir avantajdır. Derideki normal kan akımı 20ml/dk/100gr, kapiller yoğunluğu ise 16-55/mm²'dir (8,9).

Derinin kanlanması ana kaynağı aortadan çıkan segmental damarlardır. Segmental damarlar derinden yüzeye doğru ilerlerler. Bu damarlar kaslar arasındaki fibröz septaları izleyerek bazıları direkt olarak deriye, çoğu ise kas içine giden dallara ayrılırlar. Direkt olarak deriye giden dallara septokutan damarlar, kaslar içinden geçerek deriye ulaşan damarlara muskulokutan damarlar adı verilir. Septokutan damarların bir kısmı deri altında yüzeyel olarak seyreder.



Şekil 1. Derinin kan dolaşımı. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and Physiology of Skin Flap Surgery. In: McCharty JG, Saunders WB. Plastic surgery. Philadelphia: 1990: 282

Birbirine komşu kutanöz damarlar arasında bağlantıyı sağlayan çapı değişmeyen gerçek anastomozlar veya çapı daralmış olan choke anastomozları vardır (Şekil 2). Bu choke damarları deride çok fazla sayıdadır ve derinin kan akım regülasyonunda önemlidirler (8, 9).



Şekil 2. A:Choke anastomozlar.B:Gerçek anastomozlar. Taylor GI. Derinin Kanlanması. In Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM, 6.Baskı. Grabb and Smith's. Plastic Surgery. Philadelphia. Lippincott Williams&Wilkins. 2009;35

Deri dolaşımı fasya, subkutan doku ve deri olmak üzere üç anatomik seviyede beş pleksustan oluşur (Şekil 1). Bu pleksuslar fasyal (subfasyal ve prefasyal), subkutanöz, subdermal, dermal, subepidermal olarak isimlendirilir ve septokutan veya muskulokutan damarlar tarafından beslenir.

Fasyal pleksus kutanöz arterin derin fasya düzeyinden geçerek oluşturduğu pleksusdur,subfasyal olan zayıf olup asıl baskın olan prefasyal pleksusdur ve flebe derin fasyanın dahil edilmesiyle flep yaşayabilirliği arttırılabilir. Prefasyal pleksus ekstremitelerde baskındır. Subkutanöz pleksus, subkutan yağ doku içerisinde yer alan yüzeyel fasya içindeki muskulokutan damarlardan oluşan pleksusdur. Gövdede baskın pleksusdur. Cildin insizyonu sırasında olan kanamanın kaynağıdır.

Subdermal pleksus, subkutan pleksusdan dermise uzanan damarlar tarafından oluşturulur. Derinin kanlanmasında primer role sahiptir. Üstte bulunan iki pleksusu besler. Yaygın anastomoz ağına sahiptir. Dermal pleksus arteriollerden oluşur, kas yapılarına sahiptirler ve ısı regülasyonunda fonksiyon görür. Subepidermal pleksus ise kapillerlerden oluşur ve derinin beslenmesini sağlar (8,9).

2.2.FLEPLER

2.2.1.FLEP CERRAHİSİNİN TARİHÇESİ

“Flep” kelimesi Flemenkçe olan “flappe” kelimesinden türemiş olup kanat anlamına gelmektedir. Plastik cerrahi literatüründe flep kullanımı ilk olarak milattan önce 600’lü yıllara dayanmaktadır. 15.yüzyıl da Hint cerrah Sushruta Samita’nın yanak flebi ile burun rekonstrüksiyonu ilk flep uygulaması olarak kabul edilmektedir.

Ardından 1597’de Tagliacozzi kol flebi ile burun rekonstrüksiyonunu bildirmiştir. Gaspare Tagliacozzi plastik cerrahi de ilk kitap olarak kabul edilen “De Curtorum Chirurgia Per Institionem (Venice, 1597)” adlı kitabında burun rekonstrüksiyonu için uyguladığı kol flebinden bahsetmiştir (10).

Bu tarihten 19. yüzyıla kadar duraklama dönemi yaşanmış ve 1816 yılında Corpue ve ardından Von Graefe ve Dieffenbach alın flebi ile nazal rekonstrüksiyonu tanımlamışlardır(11).

Sonrasında 1. dünya savaşında flep cerrahisi altın çağını yaşamış ve “tüp flepler” in popüleritesi artmıştır. Tüp flepler 1917’de Gillies ve Filatov tarafından kullanılmış ve bu flepler “Gillies-Filatov tüp flepleri” olarak anılmıştır.

Bu tarihten sonra çok çeşitli flepler (Deltapektoral flep-Bakamjian-1965, Groin flep-Mc Gregor ve Jackson-1972 vb.) tanımlanmaya devam edilmiş ancak serbest fleplerin kullanımı ilk defa Daniel ve Taylor tarafından 1973 de tanımlanmıştır. Ian Taylor 1970 lerin başlarında baş ve boyun kanserlerinde serbest fibula flebinin kullanımını düşünerek “free flap” teriminin literatüre kazanımını sağlamıştır(12).

Mathes ve Nahai 1981’de kas fleplerinin vasküler anatomilerine göre sınıflamalarını yaptılar. (13). Cormack ve Lamberty 1984 ve 1992’de yaptıkları çalışmalar ile vasküler anatominin detaylarını kutanöz (aksiyel), muskulokutanöz ve fasyokutanöz perforatörler olarak bilinen üç parçalı bir sistem şeklinde tanımlamışlardır(14,15).

1987 yılında Ian Taylor ve Palmer anjiozom konseptini plastik cerrahiye kazandırdı(16). Koshima ve Soeda 1989 yılında “İnferior epigastrik arter perforator flebi” ni kullanarak flep cerrahisine ilk kez perforatör flep tanımını kazandırdılar(17). Koshima ve Soeda perforatör flepler konusundaki çalışmalarını posterior tibial perforatör flep, paraumbilikal perforator flep, gluteal perforatör flep kullanımlarını tanımlayarak devam ettirdiler(18,19,20).

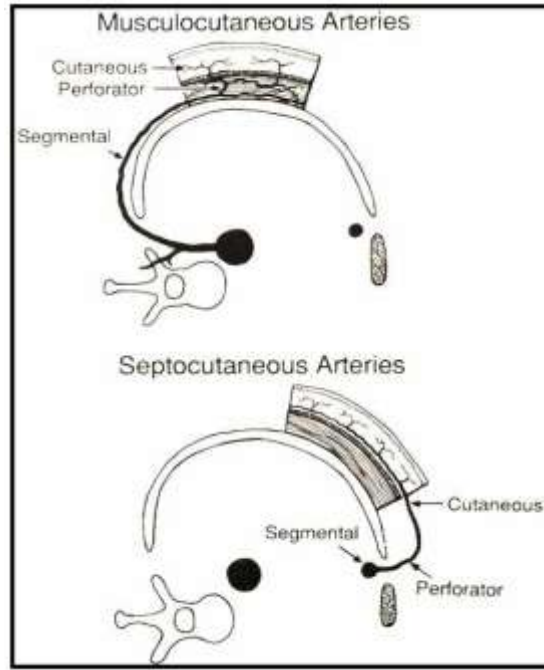
2.2.2.FLEPLERİN SINIFLANDIRILMASI

2.2.2.A.Kanlanmalarına Göre Deri Flepleri

Dokuların kanlanması 3 ana vasküler sistemden sağlanır; segmental, kutanöz ve perforatör arter sistemleri. Kutanöz arter sistemi de kendi içinde 2 ana dala ayrılır; muskulokutan ve septokutan damarlar. Segmental arterler doğrudan Aorta’dan orjin alır. Segmental damarlar ile kutanöz damarlar arasında bağlantıyı perforatör damarlar sağlar.

Kutanöz arterlerin muskulokutanöz komponenti kası besler ve dermal pleksusa doğru devam eder. Septokutan damarlar ise segmental ve ya muskuler damarlardan orjin alıp septalardan geçip fasya ve deriye doğru devam ederler(21).

Muskulokutan ve septokutan arter sistemi fasya, deri altı ve deri seviyelerinde beş pleksusun oluşumuna katkıda bulunurlar; fasyal pleksus, prefasyal pleksus, subkutan pleksus, subdermal ve subepidermal (dermal) pleksus(22).

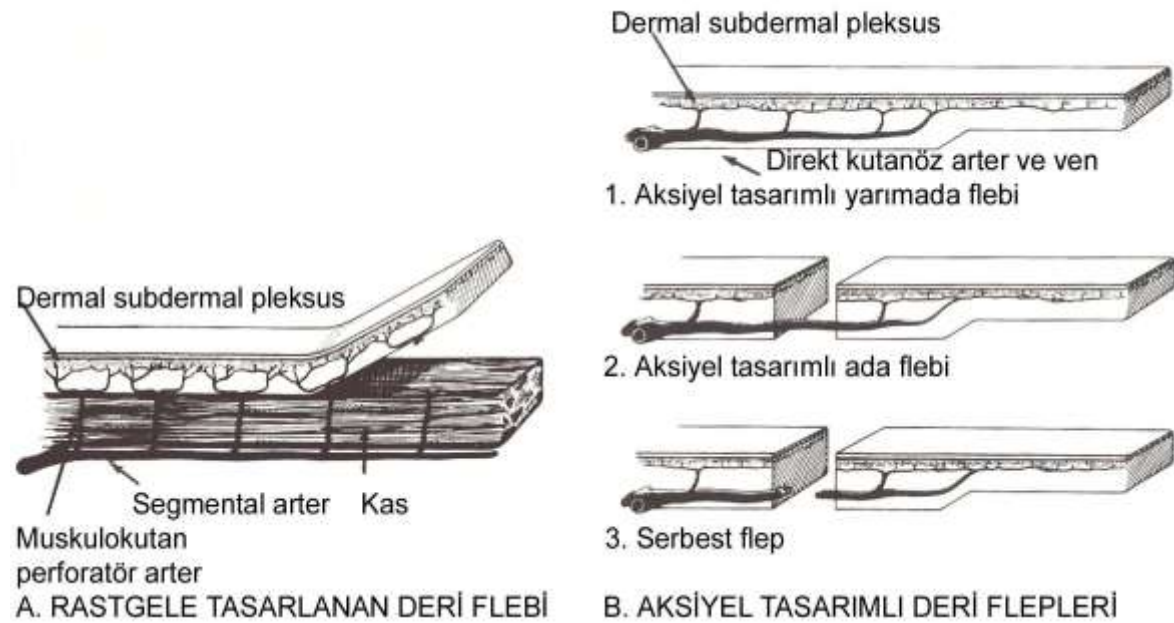


Şekil-3: Derinin Kan Dolaşımı.

Kanlanmalarına Göre Deri Flepleri; 2'ye ayrılırlar.

1. Random Paternli (Kutanöz) Flepler; Direkt kutanöz, muskulokutanöz veya fasyokutanöz damarlardan kaynaklanan arterioller tarafından perfüze edilen dermal, subdermal pleksus tarafından beslenilirler. Spesifik arteriel-venöz sistemleri yoktur(23).

2. Aksiyel Paternli Flepler; Flebin içinde seyreden spesifik direkt kutanöz arter yani tanımlanmış anatomik arteriel-venöz damarlar içerirler(23,24). Aksiyel flepler peninsular flepler ve ada (island) aksiyel flepler olmak üzere 2 gruba ayrılabilirler.



Şekil 4: Deri fleplerinin sınıflandırılması(25)

2.2.2.B. Defekte Olan Mesafesine ve Hareketlerine Göre Deri Flepleri

1.Lokal Flepler; Lokal flepler defekti kapatmak için sabit bir nokta etrafında döndürülen flepler ve iletme flepleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

a.Bir pivot nokta etrafında döndürülen flepler; rotasyon flepleri, transpozisyon flepleri ve interpolasyon flepleri olarak kendi içerisinde 3 gruba ayrılır.

b.İletme flepleri; tek pediküllü iletme flebi, bipediküllü iletme flebi , V-Y iletme flebi ve Y-V iletme flebi olmak üzere 4 gruba ayrılır(23).

2.Uzak flepler; Random paternli yada aksiyel paternli olabilirler. Flep verici alanı defekt bölgeden uzaktır. Direkt uzak flep ve indirekt uzak flepler olarak 2'ye ayrılırlar. Groin flep ve deltopektoral flep direkt uzak fleplere verilebilecek örneklerdir. İndirekt uzak flepler ise bir taşıyıcı ile yada migrasyonla transfer edilen ve mikrocerrahi bilgi ve deneyimlerinin artması ile güncel kullanımı olmayan fleplerdir.

2.2.2.C.İçeriğine ve Pedikül Özelliğine Göre Flepler

- a. Kas, kas-deri flepleri
- b. Fasial ve fasiyokutan flepler
- c. Perforator flepler
- d. Abdominal visseral flepler
- e.Modifiye flepler; Segmental transpozisyon flepleri, vaskularize kemik, fonksiyonel kas flepleri, sensoriyel flepler, kombine flepler, venöz flepler, prefabrike flepler, mikrovasküler kompozit doku flepleri, distal pediküllü ya da ters akımlı flepler(22,26).

a. Kas ve Kas-Deri Flepleri;

Mathes-Nahai sınıflamasına göre kas-deri flepleri 5 ana gruba ayrılır;

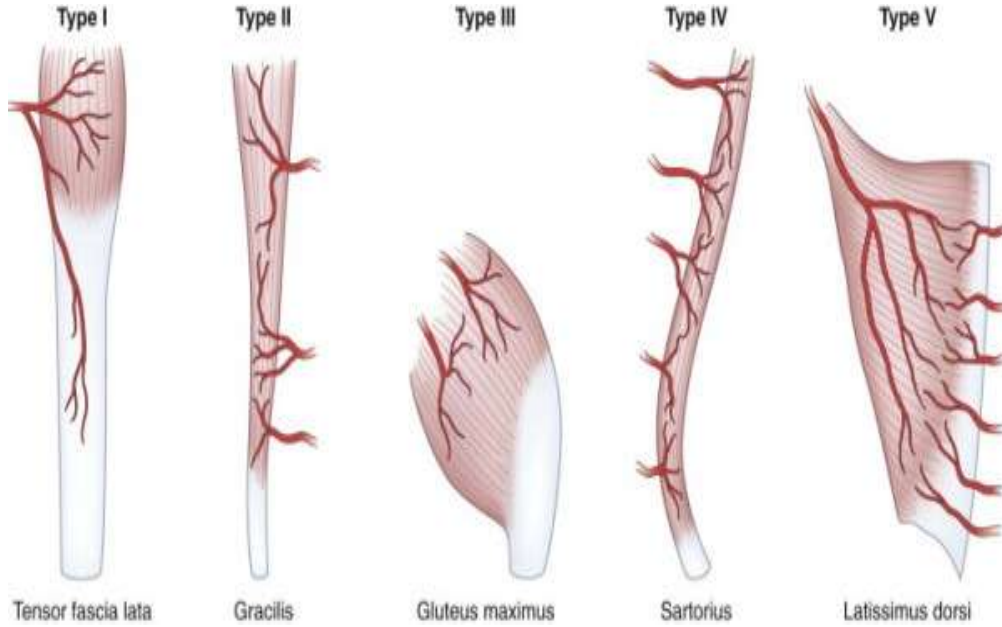
Tip-1-Tek Vasküler Pedikül: Kasa tek bir vasküler pedikül girer. Kas bu pedikül üzerinden güvenli olarak kaldırılabilir. Bu tür dolaşım paternine sahip olan kaslar; m.abductor digiti minimi ,m.abductor pollicis brevis, m.anconeus, birinci m.interosseus dorsalis, m.genioglossus , m.hyoglossus, m.longitudinalis linguae, m.gastrocnemius, m.styloglossus, m.tensor fascia latae, m.transversus ve verticalis linguae, m.vastus lateralis'dir.

Tip-2-Dominant Vasküler Pedikül(ler) ve Minör Vasküler Pedikül(ler): Tip-2 flebin kullanımı genellikle dominant pedikülün korunması için minör pediküllerin tamamının veya bir kısmının kesilmesini gerektirir. Tip-2 vasküler dolaşıma sahip kaslar; M.abductor digiti minimi(ayakta), m.abductor hallucis, m.brachioradialis, m.coracobrachialis, m.flexor carpi ulnaris, m.flexor digitorum brevis, m.gracilis, m.biceps femoris, m.peroneus brevis ve longus, platysma, m.rectus femoris, m.soleus, m.sternocleidomastoideus, m.trapezius, m.triceps brachii, m.vastus medialis.

Tip-3-Dominant Pediküller: Tip-3 kasların iki geniş vasküler pedikülü vardır, her biri ayrı olarak kasın tamamını besleyebilir. Tip-3 vasküler paterne sahip olan kaslar; M.gluteus maximus , mm.intercostales, m.orbicularis oris, m.pectoralis minör, m.rectus abdominis, m.serratus anterior ve m.temporalis.

Tip-4-Segmental Vasküler Pediküller: Bu grup kaslar ,kas boyunca giren genellikle eşit büyüklükte sıralı segmental pediküller içerirler. Her segmental pedikül kasın bir kısmının (segment) dolaşımını sağlar. Genellikle bir veya daha fazla pedikülün ayrılması kasın bir parçasının flep olarak aktarılmasına imkan tanır. Bununla beraber flep kaldırılması sırasında çok sayıda segmental pedikül kesilirse kas yaşamaz. Tip-4 vasküler paterne sahip kaslar; m.extensör digitorum longus, m.extensör hallucis longus, m.obliquus externus abdominis, m.flexor digitorum longus, m.flexor hallucis longus ve m.tibialis anterior'dur.

Tip-5-Dominant Vasküler Pedikül ve Sekonder Segmental Vasküler Pediküller: Bu dolaşım paterninde kasın geniş bir vasküler pedikülü vardır ve yalnızca bu vasküler pedikül üzerinden kaldırıldığında güvenilir bir şekilde kasın dolaşımını sağlar. Bununla beraber genellikle dominant vasküler pedikülün kasa girdiği yerin karşı tarafından kasa giren sekonder vasküler pedikülleri vardır. Dominant pediküller bağlandığında bu ikincil vasküler pediküller kasın beslenmesini sağlar. Bu şekilde kas iki ayrı dolaşım kaynağından flep olarak kullanılabilir. Tip-5 dolaşım paternine sahip kaslar; m.obliquus internus abdominis, m.latissimus dorsi ve m.pectoralis major'dur(27).



Şekil-5: Vasküler anatominin düzeni: tip-1, tek vasküler pedikül; tip-2, dominant pedikül ve minör pediküller; tip-3, iki vasküler pedikül; tip-4, segmental vasküler pedikül; tip-5, tek dominant pedikül ve ikincil segmental pediküller. (classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation, Plast Reconstr Surg. 1981; 67: 177)

b. Fasyal ve Fasyokutan Flepler:

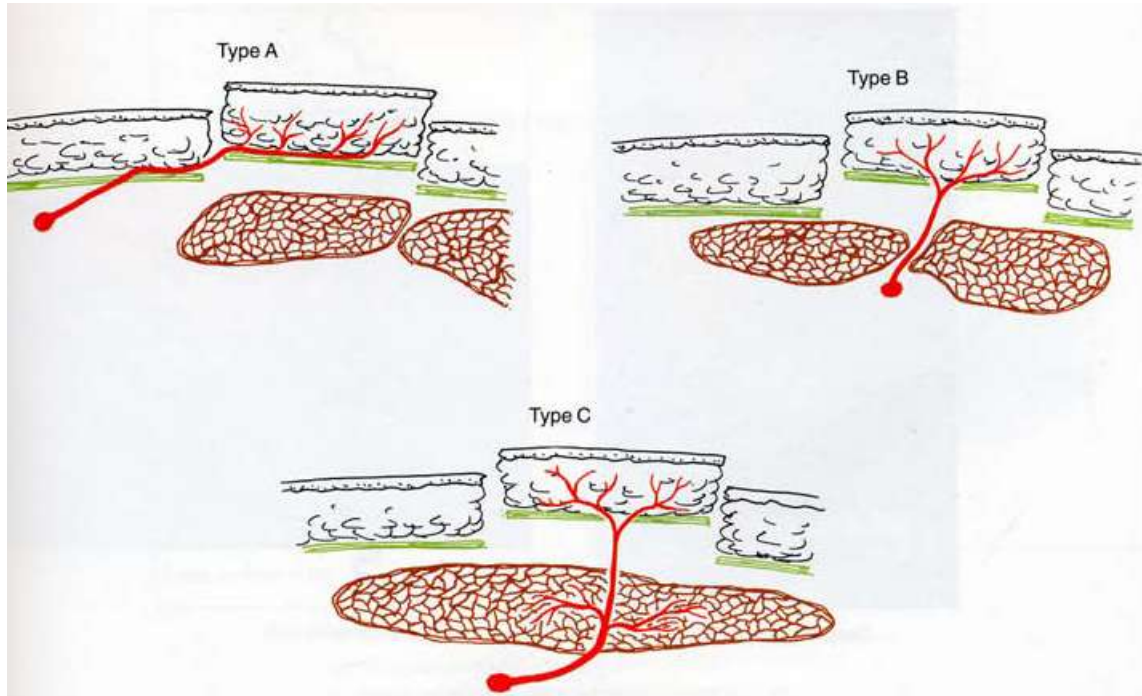
Derinin, altındaki derin fasya ile birlikte kaldırılması flep dizaynında yeni bir vasküler kaynağın ortaya çıkmasını sağlamıştır. Orijinal aksiyel flep olarak isimlendirilen fasyokutan flepler deri,subkutan doku ve altta uzanan kası örten fasya dan oluşmaktadır.Bu fleplerde kan akımı flep tabanındaki muskulokutan perforatörlerden ya da major arterlerin septokutan dallarından sağlanır.İlk fasyal ve fasyokutan flep alt ekstremité rekonstrüksiyonu için 1981’de Ponten ve gövde, aksiller bölge rekonstrüksiyonu için 1983’de Tolhurst tarafından tanımlanmıştır.

Fasyokutan sistem, bölgesel arterlerin perforatör dallarının kas gövdeleri ya da kas kompartmanlarının arasındaki fibroz septalardan geçen damarları içerir. Derin fasya düzeyinde bu perforatör dallar fasyanın üzerine ve altına doğru dağılarak pleksuslar oluştururlar. Mathes ve Nahai fasyal ve fasyokutanöz flepleri tip A,B ve C olarak 3'e ayırmışlardır(28).

Tip A: Anatomik çalışmaların da gösterdiği gibi tip-A fleplerde pedikül derin fasyanın altında seyrettikten sonra derin fasyanın üst kısmına dağılır. Bu pedikül deriye pek çok sayıda fasyokutan perforatör verir. Direkt kaynak arterden çıkan vasküler pedikül kaynak arterden çıktıktan sonra longitudinal şekilde cilde dağıldığından bu tipteki flepler aksiyel paternli olarak kabul edilir. Dominant pedikülün uzun ve yüzeyel yerleşimi palpasyonla ya da Doppler probu ile saptanabilmesine olanak verir.

Tip B: Major kas grupları arasındaki intermusküler septumda veya komşu kaslar arasında ilerleyen septokutanöz pediküle sahiptir. Bu pedikül intermusküler septum içinde yada komşu kaslar arasındaki potansiyel boşlukta bulunur ve rejonel fasyal vasküler sistem tarafından desteklenir. En geniş septokutanöz pedikül spesifik fasyokutan fleplerin dominant pedikülü olarak kabul edilir ve sabit lokalizasyonda bulunurlar.

Tip C: Deriyi ve derin fasyayı besleyen muskulokutan perforatöre sahiptirler. Tip C fasyokutan flepler perforatör fleplerin anatomik modelini oluştururlar. Fasya/Fasyokutanöz fleplerin Mathes-Nahai sınıflaması şekil-6 da gösterilmiştir.



Şekil-6. Vasküler Anatomi Paternleri. Tip-A, direkt kutanöz pedikül; Tip-B, septokutanöz pedikül; Tip-C, muskulokutanöz pedikül. (Mathes SJ.Nahai F: Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy and Technique. New York. Churchill Livingstone, 1997). Mathes-Nahai Classification of Fascia/Fasciocutaneous Flaps.

Bunlara ilave olarak Cormack ve Lamberty Tip D fasyokutan flepleride tanımlamışlardır. Tip D flep diğer adıyla osteomuskulofasyokutan flepler tip C deki gibi birden fazla küçük perforatörleri olan ancak komşu kasın bir kısmı ve kemiği içeren fleplerdir(28,29).

*Deep external pudendal artery
*Digital artery
*Dorsal metacarpal artery
*Gluteal thigh
*Great toe(hallux)
*Groin
*Lateral thoracic(axillary)
*Pudendal-thigh
*Saphenous
*Scalp
*Second toe
*Standard forehead
*Superficial external pudendal artery
*Superficial inferior epigastric artery
*Sural artery
*Temporoparietal fascia

Tablo-1. Tip A Fasyal ve Fasyokutan Flepler(30)

*Anterior lateral thigh
*Anterior tibial artery
*Deltoid
*Dorsalis pedis
*Inferior cubital artery (antecubital)
*Lateral arm
*Lateral plantar artery
*Lateral thigh
*Medial arm
*Medial plantar artery
*Medial thigh
*Peroneal artery
*Posterior interosseus
*Posterior tibial artery
*Radial forearm
*Radial recurrent
*Scapular
*Ulnar recurrent

Tablo-2. Tip B Fasyal ve Fasyokutan Flepler(30)

*Anterior lateral thigh
*Deltopectoral
*Nasolabial
*Median forehead
*Thoracoepigastric (transverse abdominal)
*Transverse back

Tablo-3. Tip C Fasyal ve Fasyokutan Flepler(30)

c. Perforatör Flepler:

Bir terminoloji oluşturmak amacıyla perforatör damarlar Fu Chan Wei ve arkadaşları tarafından derinde yer alan kaynak arterlerin fasyokutanöz dokulara direkt kan taşıyan ve deriye ulaşmak için üstteki kas dokusundan geçen dalları olarak tanımlanmıştır(31). 2002 yılında perforatör çeşitleri 3 başlık altında sınıflandırılmış ve bu sınıflama 2003 yılında yayınlanmıştır(32,33). Bu sınıflamaya göre perforatörler;

- İndirekt kas perforatörleri (perimisyal perforatörleri de içerir): Derin fasyayı delmeden önce kasın içinden geçen perforatörlerdir.

- İndirekt septal perforatörler: Derin fasyayı delmeden önce intermusküler septumdan geçen perforatörlerdir.

- Direkt perforatörler: Yalnızca derin fasyayı delen perforatörlerdir.

Perforatör fleplerin kas fonksiyonlarının korunması, buna bağlı verici alan morbiditesinin az olması, gerekli olan doku miktarından fazlasının kullanılmaması ve iyileşme sürecinin daha hızlı olması gibi avantajları ile diğer fleplere oranla kullanımları son zamanlarda hızla artmaktadır(34).

d. Abdominal Visseral Flepler:

Abdominal visseral flepleri sınıflama konusunda tam olarak bir görüş birliği olmamasına rağmen kabul edilen sınıflama Mathes'e göre(35);

Flep	Tipi	Dolaşım Paterni	Boyutları
Kolon	Bağırsak	Tip-1	20-25 cm uzunluk 8 cm lümen çapı
Jejunum	Bağırsak	Tip-1	7-25 cm(belki bir pedikülle transfer edilebilir) 3-5 cm lümen çapı
Omentum	Omentum	Tip-3	Değişken. 40*60 cm e kadar.

Tablo-4. Abdominal Visseral Flep Sınıflaması

2.2.3.FLEP FİZYOLOJİSİ

Flepler plastik cerrahinin temelini oluşturur. Bir plastik cerrah plastik cerrah yapan, flepleri başarılı bir şekilde kavrayabilme, dizayn edebilme, uygulama ve takip etme becerisidir. Bir flebi greftten ayıran özelliği, flebin canlılığını sağlayan kendisine ait bir kan kaynağı olmasıdır; greft ise kendi damarlanması yeniden oluşana kadar diffüzyon ile beslenir(36).

İntrinsik vaskülerite esneklik ve potansiyalite anlamına gelir; bu durum fleplere kompleks defektlere vaskülarize örtü, form ve fonksiyonun yeniden sağlanmasında, neredeyse sınırsız olanak tanır. Bir flebin canlılığı kendi dolaşımına bağlı olduğundan, flebin vasküler fizyolojisinin tamamıyla anlaşılabilir optimize edilebilmesi, başarı ile başarısızlık arasındaki farkı yaratır(36).

Bütün dokularda olduğu gibi fleplerde de kanlanma makrodolaşım ve mikrodolaşım öğelerinden oluşur. Bunların ikisi de içsel ve dışsal faktörlerden etkilenebilir ve bu etkilenimler perfüzyonu ve dolayısıyla canlılığı dramatik olarak etkileyebilirler. Makrodolaşımın anatomisi bir flebin tanımlanıp dizayn edilmesinde kullanılır. Flebe majör arteriyel giriş ve venöz çıkış, flebin bütünündeki hücrel metabolizmanın temelini oluşturan besinlerin ve oksijenin taşınması ve karbon dioksit (CO₂) ve atıkların uzaklaştırılmasına yarayan mikrodolaşım yatağını meydana getirir. Bu değişimin çoğu ve perfüzyon kontrolünün büyük kısmı arteriol, kapiller, venül ve arteriovenöz anastomozlardan oluşan mikrodolaşım düzeyinde olmaktadır.

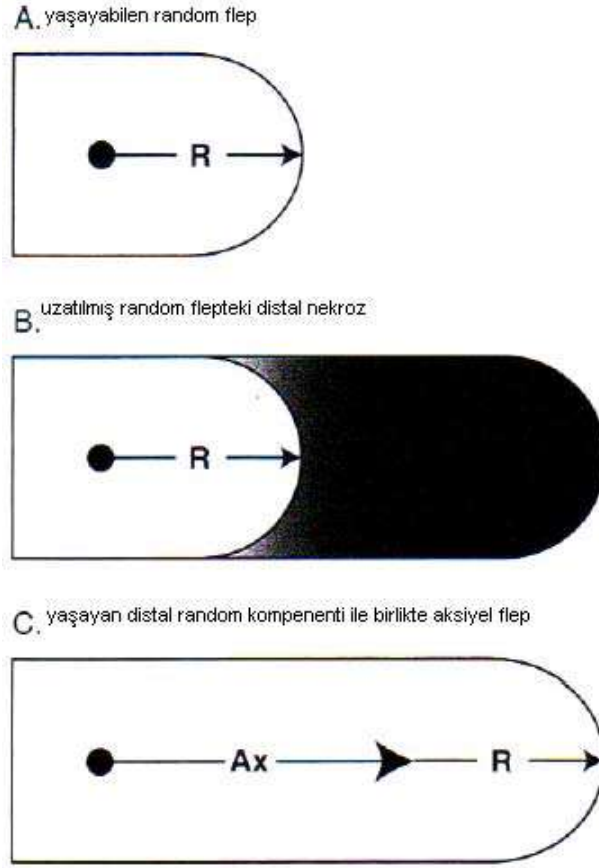
Taylor ikna edici bir şekilde flepler için potansiyel kan akımının sadece deri değil, aynı zamanda tüm doku katmanlarındaki sürekli devam eden üç boyutlu damarsal ağ ile sağlandığını göstermiştir(37). Derinin primer dolaşım desteği değişik bölgelerde kalibrasyonu, uzunluğu ve dansitesi değişmekle beraber direkt kutanöz arterlerden olmaktadır. Bu primer kan desteği derin dokularda arterlerin terminal dallarının olduğu çok sayıdaki küçük indirekt damarlarla olmaktadır.

Dikkatli anatomik çalışmalar insanda 374 büyük perforator ortalaması olduğunu göstererek çok daha fazla potansiyel deri fleplerinin henüz tanımlanabilir olduğunu ortaya koymuştur. Bu yolla tanımlanan anjiyozomlar kompozit aktarım için dokuları kullanılabilir hale getirmişlerdir. Derinin primer fonksiyonu termoregülasyonun kontrol edilmesidir ve bu deri kan akımının düzenlenmesi ile kontrol edilir. Isı deriye artan kan akımı ile azaltılırken deriye giden kan akımının azaltılması ile korunur. Deriye giden kan akımının birincil kontrol edildiği nokta arteriyoller düzeyindedir. Arteriyollerde, prekapiller sfinkterlerde ve arteriovenöz anastomozlarda sempatik tonus ile kan akımı kontrol edilir.

Lokal veya sistemik sempatik etkilerle prekapiller sfinkter kasıldığında kan akımı kapiller yatak yerine arteriovenöz anastomozlara doğru yönlendirilir. Ayrıca flep dolaşımını kontrol eden diğer faktörler arasında sistemik kan basıncı ve mikrodolaşımı etkileyen endotel, trombositler ve nötrofiller gibi hücrel faktörler yer alır. Derideki ortalama kan akımı 100 gr dokuya 20 ml kandır. Bu kas dokusunda daha fazladır(38).

Kan akımı, kas ve derinin metabolik ihtiyaçlarına göre değişir. Kaslar oksijen ve metabolitleri gibi metabolik ihtiyaçlara daha fazla gereksinim gösterir. Bu yüzden flep canlılığı kan akımı ve metabolik ihtiyaçlar arasındaki kritik balansa bağlıdır. Bu ihtiyaç ve kan akımı oranlarına bağlılığından dolayı, flep canlılığını korumak açısından yapılan müdahaleler, flep planlaması ve flep oluşturulmasında bu durum doku özelliklerine göre dikkate alınmalıdır. Mikrodolaşım perfüzyonunun etkinliği besleyici artere yakın olup olmaması ile ilgilidir ve bu nedenle aksiyel flepler subfasyal ve subdermal pleksuslar ile beslenen random fleplere göre daha güvenlidirler.

Random flepler ise dominant bir artere sahip olmayıp ancak bunun yerine subdermal ya da subfasyal pleksuslardan beslenen fleplerdir. Sonuç olarak random flepler aksiyel fleplere oranla daha az güvenilir flepler olup uzunlukları pedikül orijinine olan kısacık bir mesafe ile sınırlanmıştır. Flepleri sınıflamada tek en önemli faktör fleplerin random veya aksiyel oluşudur.



Şekil-7. Aksiyel fleplere göre random flepler.(39-40)

2.2.4.FLEPLERDE KAN AKIMI REGÜLASYONU

Deri kan akımının kontrolü sistemik ve lokal düzeyde olmak üzere iki seviyede meydana gelmektedir. Sistemik regülasyon nöral ve humoral mekanizmalar ile düzenlenir. Bunlardan baskın olan nöral regülasyon primer olarak vazokonstriksiyon yapan sempatik lifler ve alfa adrenerjik reseptörler ile ve vazodilatasyon yapan beta adrenerjik reseptörler ile sağlanmaktadır. Ayrıca arteriyovenöz anastomozlarda yer alan serotonerjik reseptörler de vazokonstriksiyona neden olur. Tüm bu mekanizmaların hepsini arteriol ve arteriyovenöz anastomozlardaki düz kas tonusunu düzenler.

Humoral regülasyon sistemik vazoaaktif maddelerin spesifik reseptörler aracılığı ile kendi reseptörlerine etki etmeleri sayesinde meydana gelir. Adrenalin ve noradrenalinin alfa reseptörler üzerine olan etkileri buna örnektir. Serotonin, tromboxan A2 ve prostaglandin F2 diğer sistemik vasokonstriktörler olarak sayılabilir. Vazodilatasyon yapanlar ise prostaglandin E1, prostaglandin I2 (prostosiklin), histamin, bradikinin ve lökotrien C4 ve D4 tür. Kan akımının lokal kontrolü tüm vücutta birçok doku için özellikle iskelet kasları gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip dokular için çok önemlidir. Deri kan akımını etkileyen metabolik faktörler arasında hiperkapni, hipoksi ve asidoz bulunmaktadır ve tüm bu faktörler vazodilatasyona neden olur.

Bunlara ilave olarak bir kısım fiziksel faktörler kan akımı regülasyonunu etkileyebilirler. Ayrıca artmış doku basıncı kapiller düzeyde kan akımının belirli seviyede tutulması için “myojenik refleksi” tetikler ve arteriel perfüzyon basıncından bağımsız olarak vazokonstriksiyona neden olur. Lokal hipotermi de doğrudan damar düz kasına etki ederek vazokonstriksiyona neden olurken lokal hipertermi vasodilatasyona yol açar.

Sadece anormal durumlarda olsa da reolojik faktörlerin kan akımına etkisi vardır. Mevcut olan anemi durumu reolojik faktörleri artırır ve flep kan akımını artırır. Bazı çalışmalarda bu durumun distal flep canlılığını artırdığı gösterilmiştir(41). Ancak bazı çalışmalarda bu etkinin minimal olduğu ya da hiç olmadığı, muhtemel azalmış O₂ sunumuna bağlı olarak azalmış reolojik faktörlere bağlı olarak gösterilmiştir(42).

Polisitemi veya orak hücreli anemide olduğu gibi anormal düzeyde artmış reolojik faktörler özellikle flebin merjinal kısımlarında perfüzyonu ve canlılığını baskılayabilir. Bazı farklılıklara rağmen kas flepleri için de aynı prensipler geçerlidir. Kaslarda deriye göre daha fazla kapiller yoğunluk olmasına rağmen arteriovenöz şantlar yoktur. Kaslar metabolik gereksinimi fazla olan diğer dokular gibi, mevcut metabolik gereksinimini karşılamakta gerekli kan akımını sağlamak için otoregülasyon mekanizmalarına oldukça bağımlıdır.

Epinefrin ciltteki etkilerinden farklı olarak “vur veya kaç” mekanizmasına uygun olarak kas dokusunda vazodilatasyona neden olur. Çünkü kas, deri gibi ısı regulasyonu sağlayan bir organ olmadığından ısının kas dolaşımı üzerine etkileri oldukça kısıtlıdır. Endotel vasoaktif maddeler salgılayarak (43), nötrofil ile trombositler ile etkileşerek kan akımının düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Endotel yaralanmasına cevap olarak oluşan, beyaz küre ve trombositlerdeki değişiklikler, flep dolaşımının etkilenmesinde önemli bir patofizyolojik rol oynamaktadırlar.

Flep cerrahisi sırasında flebin kaldırılmasının flep dolaşımı üzerine belirgin etkileri vardır. Sempatik liflerin kesilmesi sonrası meydana gelen nörotransmitter deşarjı flepte vazokonstriksiyona neden olur(44). Perfüzyonun besleyici arterden kesilmesi ile flebin periferik kısımlarında akut iskemi meydana gelir. Bu periferik kısımların mikrodolaşımında ilk 24 saat içinde meydana gelen değişimler flebin hangi kısımlarının sağkalacağını belirler. Başlangıçtaki akut hiperadrenerjik fazı belirgin vazodilatasyonun görüldüğü adrenerjik olmayan faz ile artmış kapiller perfüzyon izler. Son fazda ise vazoaaktif maddelere aşırı duyarlılık mevcuttur. Bu trifazik prosedürü Banbury ve ark. ları kremaster kas flebinde mikrodolaşımında dinamik, trifazik cevapların meydana geldiğini göstererek bildirmişlerdir(45).

Flep kaldırılmasından sonra oluşan hemodinamik, anatomik ve metabolik değişiklikler sonucu belirler. Hemodinamik değişiklikler en kapsamlı çalışılmış olan gruptur. Palmer, Nathanson, Kerrigan ve diğerlerinin yaptığı işaretli mikrosferleri kullanan mükemmel çalışmalar mevcuttur(46,47). Bu çalışmalar göstermiştir ki flebin tabanındaki dolaşım, kaldırıldıktan sonra da korunmasına karşın flebin ucundaki dolaşım ilk 6-12 saat içinde çoğunlukla normalin %20'sine kadar düşmektedir. Akım 1-2 hafta içerisinde normalin %75'ine, 3-4 haftada ise normalin %100'üne kadar yükselmektedir. Flebin iskemik kısmına pedikülden longitudinal olarak dolaşım dönmekte ve aynı zamanda inoskölasyon ve neovaskülarizasyon yoluyla flep yatağından ek bir akım da sağlanmaktadır.

Flep kaldırıldıktan sonra meydana gelen olaylar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

İlk olarak besleyici damarlar ve sempatik sinirler kesilir. İlk 12-18 saat içerisinde, özellikle flebin distalinde, giren damarların akut kesilmesi, sempatik vazokonstrüktörlerin salınımı ve lökositler tarafından oluşturulan ilerleyici endotel hasarı nedeniyle perfüzyon basıncı düşerek flebe giden akım dramatik olarak azalır.

Distal kısım eğer yaşayacaksa, etkilenen dokuya da bağlı olmak üzere ilk 6-12 saatlik zaman diliminde yeterli besin akımı gerçekleşmelidir, aksi takdirde bu doku nihai olarak ölecektir. 12-24 saat içerisinde sempatik nörotransmitterler tükeneceğinden ve 2-3 gün içerisinde flep yatağından inoskölasyon ve yeni damar oluşumuyla besleneceğinden flep dolaşımı basamaklı olarak yeniden düzenlenir. Ancak ilk 6-12 saat içerisinde iskemik kalmış dokularda dolaşımın geri dönmesi reperfüzyon hasarına katkıda bulunmakta, bu da sonunda mikrovasküler kapanmaya ve doku nekrozuna yol açmaktadır(48).

2.2.5.FLEP KAYBI ve NEDENLERİ

Bazı fleplerin tamamı yaşarken bazı fleplerin distal veya periferindeki doku kaybına ne yol açmaktadır? Cevap çok faktörlü ve anlaşılması zordur. Elbette flebin kompozisyonu, flebe gelen kan akımını ve iskemiye direncini belirlediğinden, kritik bir faktördür. Cilt flepleri, kas fleplerine oranla daha az kan akımına sahip olmalarına rağmen kas fleplerine göre daha az metabolik ihtiyaçları vardır ve iskemi periyoduna olan dirençleri kas fleplerinden çok daha iyidir.

Distal cilt flebi canlılığını artırmada, sonucu kestirilebilir ve klinik uygulanabilir birkaç metoddan biri olduğu için, flep canlılığını ilgilendiren pekçok çalışma delay fenomeni üzerine odaklanmıştır. Reinisch (49) tarafından yapılan ilk çalışmalar distal flep canlılığını belirleyen önemli faktörlerden birinin arteriovenöz şantlar olduğunu ve flep kaldırıldıktan sonra distaldeki arteriovenöz şantların kapiller yatağa yeterli kan akımını engellediğini göstermekteydi.

Geciktirilmiş fleplerde ise bu şantların kapandığı ve bu sayede flep distaline yeterli kan akımının korunduğu düşünülmekteydi. Kerrigan, Sasani ve Pang'ın çalışmalarının da içinde olduğu, takip eden birkaç çalışma ise distal flep canlılığının belirlenmesinde arteriovenöz şantların ufak bir rolü olduğunu kanıtlamıştır(50,51). Distal flep nekrozu küçük arterioller seviyesinde vazokonstriksiyon veya pedikülden uzaklaştıkça düşen perfüzyon basıncı nedeniyle yetersiz kan akımı sonucunda gelişmektedir.

Pediküllü fleplerin eleve edilmesinden sonra proksimal kısımda gerçekleşen sempatektomi,katekolamin salınımı ve oluşan hasara verilen lokal cevap sonucunda kan akımı azalır. Distal kısımda ise lokal iskemi her ne kadar maksimal vasodilatasyona neden olsa da proksimal kısımdaki yetersiz perfüzyon basıncı distalde akımın azalmasına neden olur. Bu yol distal flep yetmezliği nedeninin sonuç olarak yetersiz arteriel kan akımı olduğunu gösterir(52,53,54).

Khiabani ve Kerrigan deneysel deri fleplerine karşılık kas fleplerinin iskemi reperfüzyona verdikleri cevapların birbirinden farklı olduklarını göstermişlerdir(55). Flep iskelet kasında, reperfüzyon boyunca oluşan erken hiperemik faz, tüm dokunun kan akımının devamlılığını sağlar. Flep derisinde ise akım oranında ciddi düşme vardır. Bu farklılık flep viabilitesinin artırılması için intravenöz yolla verilen terapotik ajanların uygulanmalarında önem taşır. Arteriyelerle karşın venöz yetmezliğin pediküllü fleplerde başlıca nekroz nedeni olduğu çalışmalarda gösterilmiştir.

Açıkça görülmektedir ki yeterli arteriel akım olmasına rağmen yetersiz venöz çıkış olduğu zaman flep nekroza gider(56). Serbest doku aktarımlarında venöz oklüzyon arteriel oklüzyona göre daha sık görülür ve flep kaybıyla sonuçlanır. Deneysel primer venöz ve arteriyel iskemi çalışmaları venöz iskeminin flep nekrozu açısından çok daha tehlikeli olduğunu göstermektedir(57-58). Benzer olarak sekonder iskemi modellerinde, sekonder iskeminin primer iskemiden, venöz yetersizliğin aynı oranda yaratılan arteriyel yetersizlikten çok daha tehlikeli olduğu saptanmıştır.

Kerrigan ve arkadaşları üç durumda total flep iskemisinin meydana gelebileceğini bildirmişlerdir. Bunlar; İntrinsik kan akımından daha geniş planlanmış flepler, arteriyel tromboz ve venöz tromboz olarak sıralanmaktadır(59). Random ya da aksiyel paternli pediküllü fleplerde tromboz genellikle yanlış flep planlaması sonucunda mikrosirkülasyonda düşük akım paterninin gelişmesine, iskemi reperfüzyon hasarına, mikrosirkülasyonu etkileyen sistemik faktörlere (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstriktörler) ya da flebin fiziksel kompresyonuna (uygun olmayan adaptasyon, kink, hematoma) sekonder olarak ortaya çıkar.

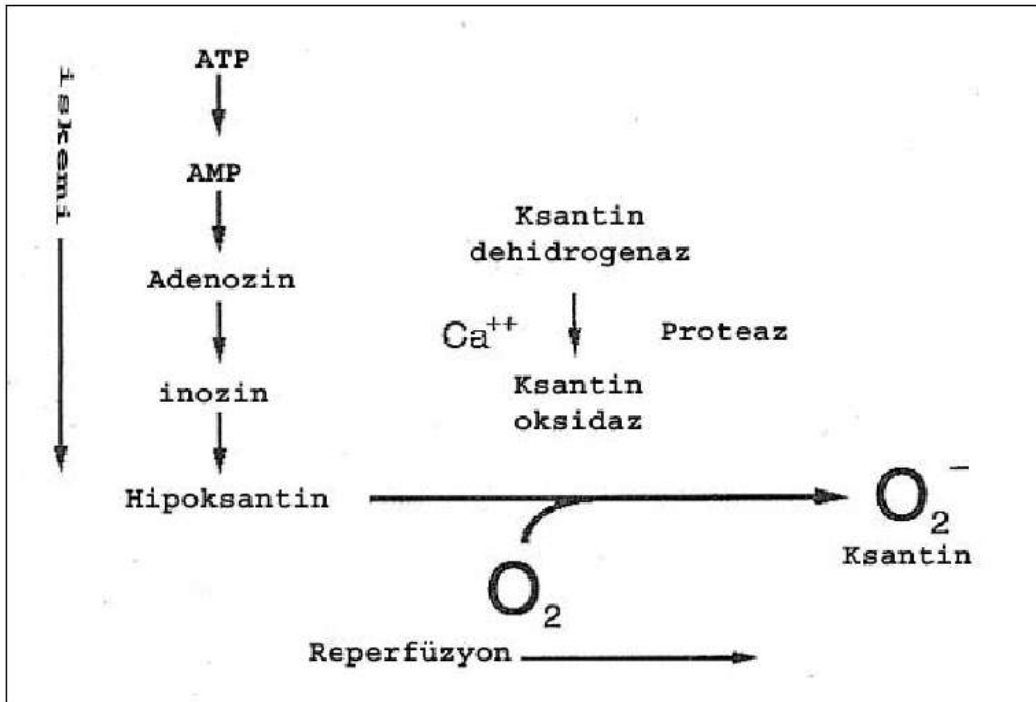
Serbest fleplerde ise aksiyel arteriyel ya da venöz tromboz sonucunda total flep nekrozu ortaya çıkar ve bu tromboz sıklıkla anastomoz hattından kaynaklanır. Bu durum genellikle zayıf mikrocerrahi teknik nedeniyle damarın protrombotik adventisya veya media tabakasının lümen kan akımıyla teması, bunu takiben trombosit ve fibrin birikimi sonucunda ortaya çıkar. Bu nedenle mikrovasküler fleplere antitrombotik, antitrombotik tedavi eklenir.

Flep elevasyonundan sonra ortaya çıkan metabolik değişiklikler özellikle flebin iskemik kalan distal kısmında daha belirgin ve fazladır. İskemik dokular oksijen, glukoz ve ATP seviyelerinin hızlı düşüşü, buna karşın karbondioksit ve laktik asit seviyelerinin artışı sonucunda anaerobik metabolizmaya geçiş yaparlar. Prostaglandin ve tromboksan düzeyleri ciddi şekilde yükselir.

Glukoz ve glikojen tüketimi flebin iskemik ancak yaşayan kısımlarında, iskeminin derecesine göre artış gösterir. Glukoz tüketimi 3. günde pik yapar ve 7. günde normale döner(60,61). Anaerobik mekanizmaya geçişle ilişkili olarak toksik süperoksit radikallerinin üretimi artar(61,62).

Oluşan toksik oksijen radikalleri direkt sitotoksik etkiye neden olabilecekleri gibi, daha önemli olarak lokal akut inflamasyonu tetikleyip lökositlerin adezyon ve birikimine, bunu takiben endotelial hasara neden olup hücresel düzeyde mikrovasküler dolaşımı durdurabilir. Vücudun anahtar koruyucu enzimi olan “süperoksit dismutaz” enzimi, akut flebin distal kısmında doku koruyucu mekanizma nedeniyle süperoksiti oksijene çevirerek tüketilir(63). İskemi sonrasında reoksijenasyon esnasında pek çok mekanizma kullanılır. Ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür, ksantin oksidaz enzimi de oksijenle birlikte iskemi boyunca ATP’nin yıkılması sonucunda ortaya çıkan hipoksantini ksantine ve yan ürün olarak süperoksit anyonuna dönüştürür(64).

Süperoksit anyonu başka oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olur ve bu durum direkt hücre hasarıyla sonuçlanır. İskemik periyotta düşen enerji seviyeleri, iyon konsantrasyonunun bozulmasına neden olur. Sitoplazma içine kalsiyum girişi artar. Kalsiyum sitozolik enzimleri aktive eder. Böylece endotelde bulunan ksantin dehidrogenaz ksantin oksidaza dönüşür. Bu enzimde normalde, ATP yıkımı sonrasında oluşan hipoksantini redükte edeceği yerde iskemiye takip eden reperfüzyon ile ortama gelen oksijeni reaksiyona sokarak, okside eder ve oksijen radikallerini oluşturur(Şekil-8).



Şekil-8:Toksik oksijen radikallerinin oluşumu (65)

Bir kez metabolitler oluştuktan sonra hücre hasarının iki mekanizmadan birisiyle gerçekleştiğine inanılmaktadır;

Birincisi; süperoksit radikallerinin direkt endotel membranıyla reaksiyonunun lipid peroksidasyonuna neden olup membran proteinlerinin yıkımına, hücre geçirgenliğinin artmasına ve bunların sonucunda sitoplazmik şişme ve disfonksiyonun ortaya çıkmasıdır.

İkincisi; oksijen radikallerinin özellikle süperoksit anyonunun kemotaktik özellik göstermesi, reperfüze alanlara nötrofil migrasyonuna neden olmasıdır.

Deneyisel fleplerin iskemik distal alanlarında ksantin oksidaz ve serbest radikal formasyonunun göstergesi olarak kabul edilen diğer bir indiktor olan malonildialdehit düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır(66,67). Deneyisel fleplerde tek doz süperoksit dismutaz uygulamasının random fleplerin yaşayabilirliğini % 38-% 76 oranında arttırdığı saptanmıştır(68). Reperfüzyon hasarının başka bir mekanizması arasıdonik asit ve türevlerini kullanmaktadır. Lipooksijenaz'ın aktivasyonu potent bir kemoatraktan olan LTB₄ ün oluşumuna yol açar. LTB₄ süperoksit anyonu oluşumunu ve nötrofil degranülasyonunu uyarır. Aktive olan nötrofiller ise kısır döngüye yol açacak şekilde lökotrienlerin oluşumunu artırır.

Benzer olarak iskemik dokularda siklooksijenaz etkisiyle tromboksan A₂ sentezi gerçekleşir. Tx A₂ potent bir vazokonstriktördür ve trombosit agregasyonuna yol açar; diğer yandan prostasiklin (Prostaglandin I₂) potent bir vazodilatördür ve trombosit agregasyonunu inhibe eder. Birçok deneyisel flep çalışması arasıdonik asit metabolizmasının değiştirilmesi üzerine kurulmuştur.

2.2.6.FLEP VİABİLİTESİNİ ARTTIRAN TERAPOTİK AJANLAR

Flep yaşayabilirliğini sağlamak için bilinen en önemli operatif faktörler; flep seçiminin ve dizaynının iyi yapılması, alıcı sahaya dikkatli debridman uygulanması, sistemik parametrelerin uygun hale getirilmesi, bakteri yükünün azaltılması, kan akımının optimize edilmesi, ödemin azaltılması, flebin dikkatli elevasyonu ve yerleştirilmesi post operatif dönemde de flebin takibinde non invaziv monitörizasyon metodlarının uygulanmasıdır. Hasta ısı, kontrollü kan basıncı, hemodinamiyi bozacak parametrelerin elimine edilmesi (sepsis, nikotin, efedrin, kokain gibi vasoaktif ajanlar) flep cerrahisi öncesi ve sonrasında önem arz etmektedir.

Faktör	Olumlu Etkileri	Riskleri
Hipotermi	Metabolik hızın düşmesi İskemi periyodunun uzaması	
Delay Prosedürü	İskemik önkoşullanma Reperfüzyon boyunca etki	Bir çok prosedürü artırma
Steroidler	Membranı stabilize etme Antiinflamatuvar Ödem kontrolü	Enfeksiyon artışı
Dextran	Volüm artışı Platelet adezyonunda azalma Platelet agregasyonunda azalma	Anafilaksi Pulmoner ödem KontROLSÜZ volüm artışı
Aspirin	Platelet agregasyonu inhibisyonu Yüksek dozda vasodilatasyon	Kanama
Heparin	Pıhtılaşma faktörleri inaktivasyonu	Kanama ve hematoma
Hirudo medicinalis (Sülük)	Vazodilatasyon Mekanik dekompresyon	Kanama ve enfeksiyon

Tablo 5 : Flep Viabilitesi Üzerine Etkili Terapotik Faktörler.

Heparin; Bir antifibrin ajan olup antitrombin III'e bağlanarak etkisini gösterir. Bu sayede trombin gibi birçok pıhtılaşma faktörü inhibe olur. Anastomoz hatlarında lokal irrite edici olarak yada sistemik olarak kullanımları mevcuttur. Mikrocerrahide irrigasyonda 100 Ü/ml dozunda kullanılmaktadır. Kanama ve hematoma neden olabilir.

Hirudo Medicinalis; Heparin dışındaki diğer antikoagulan ajan olan sülükler ısırıkları yerde venöz konjesyonu önlemek, buna bağlı dekompresyon yapmak, vasodilatatör etkiler göstermek gibi etkileri ile özellikle serbest fleplerde kullanılmaktadırlar. Isırıkları yere enjekte ettikleri hirudin antikoagulan etkilere sahiptir ve aktive olmak için heparin gibi anti-trombin III'e ihtiyaç duymaz. Vazodilatatör etkilerini ise hyaluronidaz ile gösterirler. Ayrıca hyaluronidaz bağ dokuda parçalanma sağlar ve heparinin derin venöz dokulara ulaşmasını sağlar. Arteriyel yetmezlikte kontrendikedir. Kanama ve "Aeromonas hydrophila" gibi bakteriyel enfeksiyonlara yol açabilecek komplikasyonlara neden olabilir. Bu etkisini önleyebilmek için ikinci kuşak sefalosporinlerin tedavi sürecinde verilmesi yeterli olacaktır(69).

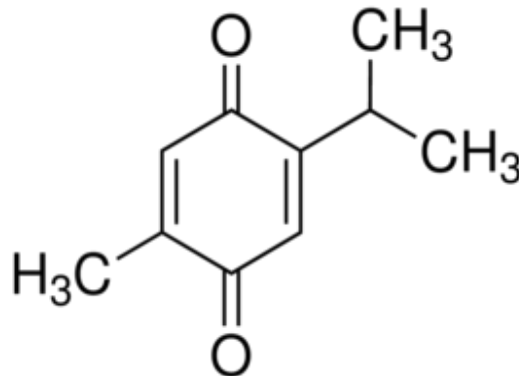
Bu tabloda bahsedilmeyen ancak flep viabilitesi üzerine etkisi olduğu bilinen serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlayan antioksidan ajanlarda flepteki kan dolaşımını artırırlar. Oksijen metabolitleri ve onların doku hasarına etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır (62,70) . Fleplerin distallerinde ksantin oksidaz ve diğer bir serbest radikal oluşumunu gösteren malonildialdehit düzeylerinde artış gözlenen çalışmalar mevcuttur(71,72). Süperoksit dismutaz uygulaması ile flep sağkalımının arttığı gözlenmiştir (70,73). Bu bulgulara dayanarak allopurinol (ksantin oksidaz inhibitörü) ve desferoksamin (demir şelatörü ve serbest radikal temizleyicisi) kullanılmıştır.

Buna rağmen insan dokusundaki ksantin oksidazın sıçandakinin 1/40'ı kadar olması nedeniyle bu çalışmaların klinik etkinlikleri belirsizdir (72,74,75). Hemoglobin ve demir, hidroksil radikali başta olmak üzere birçok serbest radikalin oluşacağı kimyasal reaksiyonlara katılırlar. Desferoksaminin deneysel olarak hematom varlığında flep sağkalımını artırdığı gösterilmiştir(75).

Bu çalışmamızda kullanılan thymoquinone etken maddesinin yapılan çalışmalara göre (84,85) süperoksit radikali ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olduğu ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği ve serbest radikal oluşumunu engellediği bildirilmektedir.

2.3. THYMOQUINONE ETKEN MADDESİNİN KİMYASAL ve BİYOLOJİK YAPISI

Timokinon (TQ) (C₁₀H₁₂O₂, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon) çörek otu yağında % 18.4-24 oranında bulunan en önemli biyoaktif bileşendir(76).



Şekil-9;TQ'nun kimyasal yapısı



Şekil-10;TQ'nun elde edildiği nigella sativa bitkisi



Şekil-11;TQ etken maddesinin katı formu

2.4.THYMOQUINONE ETKEN MADDESİNİN ORGAN SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

A.Lipit-Kolesterol Metabolizmasına Etkileri; Çalışmalarda kullanılan 0,1,1.5 g/kg TQ'nun plazmadaki total kolesterol ve LDL miktarını azalttığı (77); HDL miktarını arttırdığı ve bu nedenle kardiyovasküler hastalık gelişim riskini azalttığı gösterilmiştir(78).

B.Glukoz Regülasyonu Üzerine Etkileri (Antidiyabetik); Yapılan bir çalışmada(79) ratlarda (0.5, 1, 2, 4, 6 ve 8 mg/kg) artan dozlarda intraperitoneal yolla verilen TQ'nun glikoz düzeylerini düşürdüğü bildirilmektedir. Timokinonun mekanizması tam anlaşılamamış olmakla beraber insülin sekresyonunu artırarak glikoz kullanımında artışa ve glikoneogenezi engelleyerek kan glikozunun düşmesine neden olduğu belirtilmektedir(76).

Başka bir çalışmada TQ'nun diyabetin neden olduğu oksidatif stresin azalmasında ve β -hücre bütünlüğünün korunmasında tedavi edici etki gösterdiği ve bunun sonucunda da TQ'nun oksidatif strese karşı β -hücrelerinin korunmasında klinik olarak kullanımının faydalı olabileceği belirtilmektedir(80).

C.Gastrointestinal Sisteme Etkileri; Akut alkolün yol açtığı gastrik mukozal lezyonlara karşı TQ'nun ve Nigella Sativa yağının gastroprotektif etkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(81). Karbon tetraklorür(CCl_4) başta olmak üzere diğer hepatotoksik ajanlara bağlı oluşan hepatotoksiteye karşı TQ'nun antioksidan etkisine bağlı koruyucu etki gösterdiği çalışmalarda gösterilmiştir(82).

Ayrıca antioksidan ve antiinflatuar özelliğinden dolayı alkolün indüklediği karaciğer hastalıklarının tedavisinde etkin bir bileşik olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (83).

D.Antioksidatif Etkileri: Kararsız elektron yapısına sahip serbest radikallerin hücre membranından kolaylıkla geçmesi nedeni ile protein, nükleik asit ve enzimlerle reaksiyona girmesi sonucunda kanser başta olmak üzere bir çok sistem hastalıkları ortaya çıkmaktadır.TQ'nun süperoksit radikali ve hidroksil radikallerini içeren birçok reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olduğu ve 5-hidroksieikozatetraenoik asit ile 5-lipoksijenaz sentezini inhibe ettiği ve serbest radikal oluşumunu engellediği bildirilmektedir (84,85).

E.Dolaşım Sistemine Etkileri: TQ'nun ratlarda doza bağlı olarak arteriel kan basıncını ve kalp atışını azalttığı bildirilmektedir(86).

F.Antikanserojenik Etkileri: Göğüs ve yumurtalık adenokarsinomu (87), kolorektal kanser (88), osteosarkom (89), fibrosarkoma, akciğer karsinomu, prostat kanseri (90) gibi bir çok kanser türüne Thymoquinone'nin hücre G1 fazında iken apoptozisi indükleyip gidişatı engellemesi ile faydalı olduğu çalışmalarda gösterilmiştir.

G.Diğer Sistemlere Etkileri: TQ'nun immün sistem, boşaltım sistemine olumlu etkilerinin yanında analjezik ve antiinflatuar olduğu çalışmalarda gösterilmiştir.

3.MATERYAL ve METOD

3.1.GRUPLAR

Çalışmamızda 60 adet norveç ratı kullanıldı.Ancak çalışmanın 1.haftası içinde 60 ratın toplamda 15 tanesinin bilinmeyen bir nedenden dolayı ölmesi sonucunda homojenizasyonu sağlamak için rat sayısı her grupta 7 adet rat olacak şekilde 42 ye düşürüldü.Çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deney Hayvanları Labaratuarında normal oda ısısında yapıldı.Bu çalışmada ratlar 6 gruba ayrıldı;

1.grup: Shame grubu olarak kabul edildi. 7 adet ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen ratlar normal yemleri ile beslendi ve bu gruba her hangi bir cerrahi prosedür uygulanmadı.

2.grup: Kontrol grubu olarak kabul edildi. 7 adet olarak gruplanan bu ratlar normal yemleri ile beslendi ve bu gruba 11.gün cerrahi müdahale uygulandı. 10 gün takip edildi.

3.grup: Bu gruptaki ratlar cerrahi işlemden 10 gün önce ısı,güneş ışığı ve açık havadan korunan (antioksidan özelliğın kaybolmaması için) günlük thymoquinone etken maddesi (2 mg/kg) ile oral yolla beslendi. (TQ maddesi inert olarak kabul edilen DMSO çözeltisi içinde sıvı hale getirildi).

4. grup: 11.gün uygulanan cerrahi işlemden 10 gün sonrasına kadar 2 mg/kg oral thymoquinone ile beslenen grup olarak değerlendirildi. Bu grup için 7 adet rat kullanıldı.

5. grup: Cerrahi işlemden 10 gün önce başlanıp cerrahi işlemden 10 gün sonrasına kadar oral 2 mg/kg thymoquinone ile beslenen grup olarak kabul edildi ve 7 adet rat kullanıldı. Bu grup için de cerrahi işlem 11.gün uygulandı.

6. grup: Cerrahi işlemden 10 gün önce oral 10 mg/kg DMSO (dimetilsulfoksit) ile beslenmeye başlanan ve 10 gün sonrasına kadar beslenmeye devam edilen grup olarak değerlendirildi.Bu gruptaki ratlarda thymoquinone etken maddesinin katı halden sıvı hale geçmesi için kullanılan DMSO solventinin ratlar üzerinde etkilerinin incelenmesi planlandı. Bu grup için de cerrahi işlem 11.gün uygulandı.

3.2.DENEYİN YAPILIŞI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Laboratuvarında 24 C'de bakımları yapılan ratlar bir kafeste en fazla 5 adet olacak şekilde gruplara ayrıldı(Şekil-12). 3 ve 5.gruplara 2 mg/kg/gün olacak şekilde ilk 10 gün, 4 ve 5. gruplara cerrahi işlemden sonraki 10 gün boyunca DMSO (dimetilsulfoxit) içinde çözülmüş TQ etken maddesi oral yolla verildi. 6.gruba cerrahi işlemden 10 gün önce ve sonrasında 10mg/kg/gün DMSO verildi(Şekil-13). Ratlarda 3x10 cm lik kaudal tabanlı dorsal McFarlane flep modeli kullanıldı(Şekil-14).

İntraperitoneal %10 50 mg/kg ketamin hidroklorid uygulanıp anestezi sağlandıktan sonra 1. gruptakilere (shame grubu) çalışma boyunca son gün alınan biyopsiler ve intrakardiyak kan örnekleri haricinde ek bir cerrahi müdahalede bulunulmadı. 1.gruptaki ratlar normal yem ile beslendi.

2-3-4-5-6. gruplara 11.gün cerrahi işlem uygulandı. Flepler pannikulus karnosus altından kaldırıldı, makroskopik olarak değerlendirildi ve eşit mesafeden Canon EOS 500 D fotoğraf makinası ile fotoğraflandı. Bütün gruplarda cerrahi işlem uygulanmasından 10 gün sonra tekrar fotoğraflama yapıp Sasaki'nin "papertemplate" metodu ile nekroz/total flep alanı asetat kağıtları yardımı ile hesaplandıktan sonra makroskopik incelemeler tamamlandı.Çalışmanın bitiminde doku örnekleri ve kan örnekleri alınarak sıçanlar sakrifiye edildiler.

Biyokimyasal analiz için alınan kan örneklerinde oksidatif stres belirteci olan malondialdehit (MDA) düzeyi HPLC yöntemi ile, alternatif olarak da Okhawa ve arkadaşlarının modifiye spektrofotometrik yöntemi ile, antioksidan bir enzim olan katalaz (Cat) düzeyi Goth ve arkadaşlarının modifiye spektrofotometrik yöntemi ile çalışıldı. HIF-1a çalışması için alınan biyopsiler HIF-1a'nın kan örneklerinden çalışılması nedeni ile kullanılmadı. Ayrıca çalışılması planlanan IMA (iskemi modifiye albumin) daha önce yapılmış olan bir çalışmada ratlarda anlamlı sonuçlar vermediği için çalışmadan çıkarıldı(92).

Elektron mikroskobu ile hücre mitokondrisi ve hücre membranı incelendi ve hücre düzeyindeki iskemi değerlendirildi. İn situ hibridizasyon yöntemi ile neovaskülarizasyon göstergesi olan CD34 düzeyinin dokularda immünohistokimyasal olarak tespiti yapıldı. Ayrıca histopatolojik olarak dermal ödem, kollajen yoğunluğu, damarlanma artışı ve PMNL ve lenfosit infiltrasyonu değerlendirildi.



Şekil-12:Ratların Gruplandırılması ve Barınma Koşulları

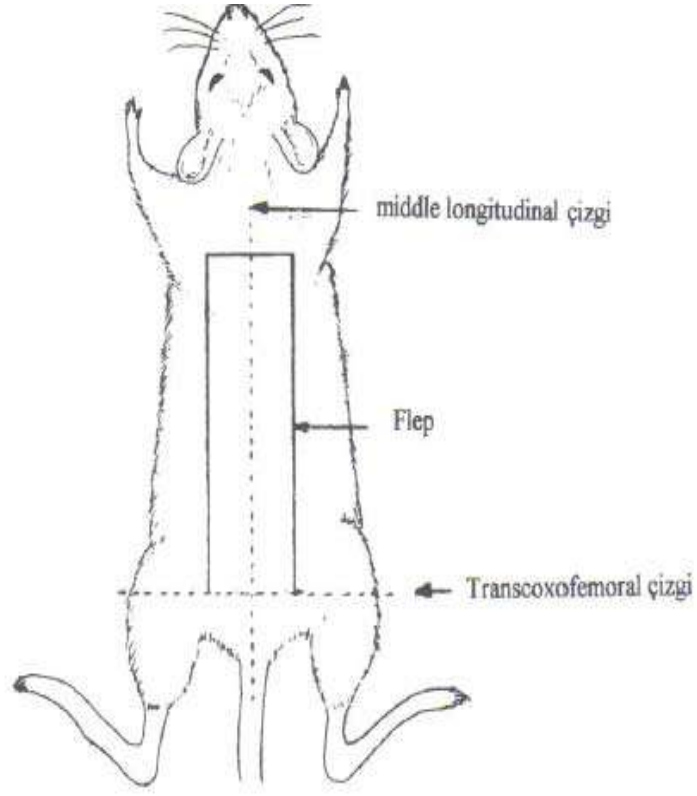


Şekil-13:DMSO(Dimetilsulfoxit)

3.3.FLEPLERİN KALDIRILMASI

İlk aşamada uygun oda koşulları (ısı vb) sağlandıktan sonra deneklere %10 luk 50 mg/kg dozunda ketamin hidroklorid ile anestezi yapıldıktan sonra yüzükoyun pozisyonunda cerrahi masasına yatırılıp dört ekstremite ve kuyruklarından flaster ile tespit edildi. Tüm gruplardaki ratların sırtlarındaki tüyler tıraşlandı. Polyvinylpyrrolidone iyot (Batticon sol 1000ml Adeka, Türkiye) ile uygun saha temizliği yapıldı. McFarlane flebi (şekil-14) üst sınırı 7.servikal vertebra alt sınırı transcoxofemoral çizgi olacak şekilde distal(kaudal) pediküllü olmak üzere 3×10 cm boyutlarında cerrahi kalemle çizildi . İnsizyonlar 15 numara bistüri ile pannikulus karnosus da dahil edilmek üzere yapıldı ve künt diseksiyonla flepler eleve edildi.

Hemostaz sağlandıktan sonra 4/0 ipek sütür materyali ile flepler kontinü yerine sutureedildi. Operasyon sırasında sıçanın idrar ve dışkı çıkarması durumunda uygulanan ilk dozun üçte bir oranında yeniden anestezi ajan verilerek anestezinin devamı sağlandı. Tüm deney gruplarına bu işlemlerin hepsi asepsi kurallarına özen gösterilerek uygulandı.Sonrasında ratlara 150 mg/kg ampicilin profilaksi amacıyla verildi.



Şekil-14: Mc Farlane flebi topografik anatomisi(91)



Şekil-15:McFarlane Flebinin Çizilmesi(3.10 cm)



Şekil-16:Flebin Elevasyonu



Şekil-17:Flebin Kaldırılmış Hali



Şekil-18:Flep Damarlanmasının Gösterilmesi



Şekil-19: Flebin Yerine Sütüre Edilmesi

3.4.ÖTENAZİ İŞLEMİ ve ÖRNEKLERİN ALINMASI

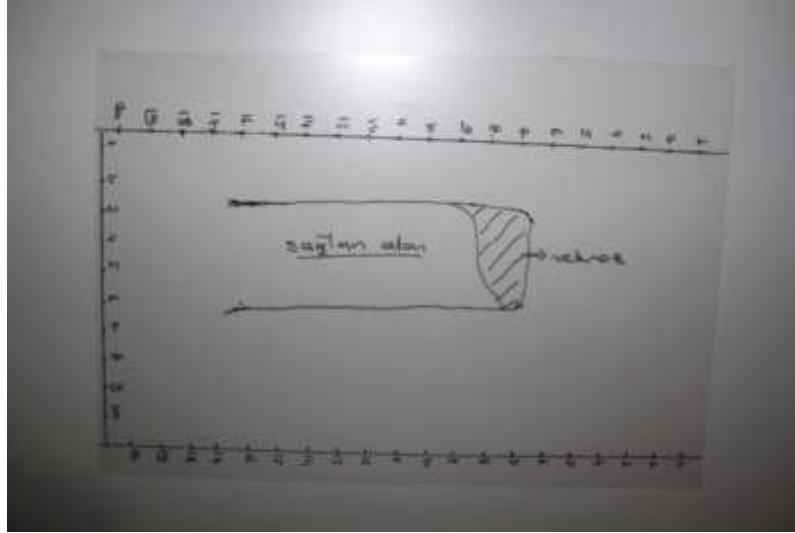
Çalışmanın bitiminde anestezi verilmesinden sonra flepler pedikülünden kesildi. Her flepten elektron mikroskopi incelemeleri için 1 adet proksimalden 2 mm'lik punch ile, biyokimyasal analiz için çalışılacak olan HIF-1a için orta hattan 2'şer adet 5 mm'lik punch ile (daha sonra biyopsilere ihtiyaç duyulmayıp kandan çalışıldı), histokimyasal analiz için 2 adet proksimal ve nekroz geçiş zonundan 1 cm² 'lik toplamda bir rat için bir flep'ten 5 adet örnek alındı. Son olarak biyokimyasal analizler için 1 cc biyokimya ve 2 cc hemogram tüplerine konulmak üzere toplamda 3 cc intrakardiak kan örnekleri alınıp sıçanlar sakrifiye edildi.



Şekil-20: İnttrakardiak Ponksiyon Yapılması

3.5.YÜZEY ALAN ÖLÇÜMLERİ

Cerrahi işlem uygulanmayan 1.grup ta dahil olmak üzere bütün gruplarda cerrahi işlem uygulanmasından 10 gün sonra Canon EOS 500D fotoğraf makinası ile eşit mesafeden (40 cm) fotoğraflama yapıp,Sasaki'nin "papertemplate" metodu ile nekroz/total flep alanı asetat kağıtları yardımı ile yüzde olarak hesaplandıktan sonra makroskopik incelemeler tamamlandı ve her grup için ortalama değerler hesaplandı.



Şekil-21:Asetat Kağıtlara Fleplerin Çizilmesi

3.6.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME METODU

Yüzüncü Yıl üniversitesi Tıp fakültesi Patoloji Laboratuarında %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edilen dokular ışık mikroskobunda incelenmek üzere otomatik vakumlu doku takip cihazı ile takip edildi. Parafin bloklara gömüldü. Dört mikron kalınlığında kesitler alındı. Lamlara alınan bu kesitler histopatolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin ile boyandı.

İmmünohistokimyasal boyama için dört mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler etüvde 60 derecede 15 dakika bekletildikten sonra CD34 antikoru (Novocastra™ Ready-to- Use Mouse Monoclonal Antibody Endothelial Cell Marker, Clone:QBEnd) ile Leica Bond Max cihazında Avidin-Biotin- Complex yöntemi ile boyama yapıldı. Örneklerde PMNL (polimorfonükleer lökosit) ve lenfosit yoğunluğu, kapiller damar proliferasyonu ve dermiste ödem varlığı olmak üzere 4 adet parametre incelendi . Histolojik parametrelerden PMNL ve lenfosit yoğunluğunu ile dermisteki ödemi değerlendirmek için tablo-7'deki skorlama yapıldı.

Ayrıca kollojen yoğunluğu skorlaması:

- 1+: Azalmış
- 2+: Normal
- 3+: Artmış
- 4+: Yoğun şeklinde yapıldı.

Damar yoğunluğu geçiş bölgesinden alınan örneklerde CD34 boyamasında 40'lık objektifte en az 4 alanda damarlar sayılıp ortalaması alınarak hesaplandı.

3.7.ELEKTRON MİKROSKOPİK İNCELEMELER

Elektron mikroskopik değerlendirme Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji bölümlerinde yapılmıştır. Elektron mikroskopik incelemeler ile hücre mitokondrisindeki yapısal değişiklikler incelendi ve görüntüler alındı. Tüm gruptaki sıçanlardan alınan deri numunelerini 1mm³ boyutlarına trimlenip aşağıda sıralanan işlemlere tabi tutuldu.

- 1-% 2,5'lük Glutaraldehit (Merck) ® 1,5 saat prefiksasyon
- 2-Fosfat Tamponun da yıkama (Ph:7,4) (1 saat)
- 3-%1'lik Osmium tetra oksit (OsO₄) (Merck) ® 1 gece,
- 4-%50'lik Alkolde 20 dk.
- 5-%80'lik Alkol'de 20 dk.
- 6-%96'lik Alkolde 20 dk.
- 7-%100'lük Alkolde 1 saat,
- 8-%100'lük Alkolde 1 saat,
- 9-%100'lük Alkolde 1 saat bekletildi.
- 10-Propilen Oksit (Merck) ® 1 saat,
- 11-Propilen Oksitte 1 saat,
- 12-Propilen Oksitte 1 saat
- 13-3 birim Propilen Oksitte – 1 birim Araldit (Electron Microscopy Science Araldit CY 212 Kit) ® karışımında 1 saat,
- 14-1 birim Propilen Oksitte – 1 birim Araldit karışımında 1 saat,
- 15-1 birim Propilen Oksitte – 3 birim Araldit karışımında 1 saat,
- 16-Saf aralditte 1 gece bekletildi
- 17-Ertesi gün saf araldit ile kapsüllere gömüldü
- 18-Etüvde 45° de 1 gün bekletildi,
- 19-Etüvde 65°C'de 2 gün bekletildi.
- 20-Araldit bloklardan ultramikrotom (LKB nova- isveç) ile kesilen 450 nm'lik kesitler cam lamalar üzerine alındı ve Toluidin blue ile boyandı.

Yarı ince kesitlerde belirlenen bölgelerden 30-40 nm kalınlığında ince kesitler alınıp, kesitler uranyl asetat ve kontrastı artırmak amacı ile Reynold'un kurşun sitrat boyaları ile boyandı. Bu kesitler elektron mikroskopunda (Jeol 100SX- Japonya) incelenerek, bulgular fotoğraflandırıldı (Kodak 4048).

3.8.BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRMELER

3.8.1.Katalaz: Ratlardan antikoagülsiz tüplere alınan kan numuneleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, serumları alınıp çalışma gününe kadar -40°C'de korundu. Serum katalaz aktivitesi Goth (93)'ün klorometrik metoduna göre ölçüldü. Bu yöntemde serum H₂O₂ substratıyla inkübe edilir ve reaksiyonu amonyum molibdat eklenerek durdurulur. Molibdat ve H₂O₂ tarafından oluşturulan sarı renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de spektrofotometrede (UV-Visible spektrofotometre, Shimadzu UV-2600, Kyoto, Japonya) ölçüldü.

Reaktifler:

- Sodyum potasyum fosfat tamponu pH 7,4 60 mM
- H₂O₂ (fosfat tamponunda çözülür) 65 µmol/ml
- Amonyum molibdat (Sigma A-7302, Steinheim, Germany) 32,4 mM

Çalışmanın yapılışı:

0,2 ml numune üzerine 1 ml substrat eklenir ve bir dakika 37°C’de inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 1 ml amonyum molibdat eklenir, enzimatik reaksiyon durdurularak 405 nm’de kör 3’e karşı absorbanası ölçülür.

Kör 1: 1 ml substrat + 1 ml amonyum molibdat + 0,2 ml numune

Kör 2: 1 ml substrat + 1 ml amonyum molibdat + 0,2 ml tampon

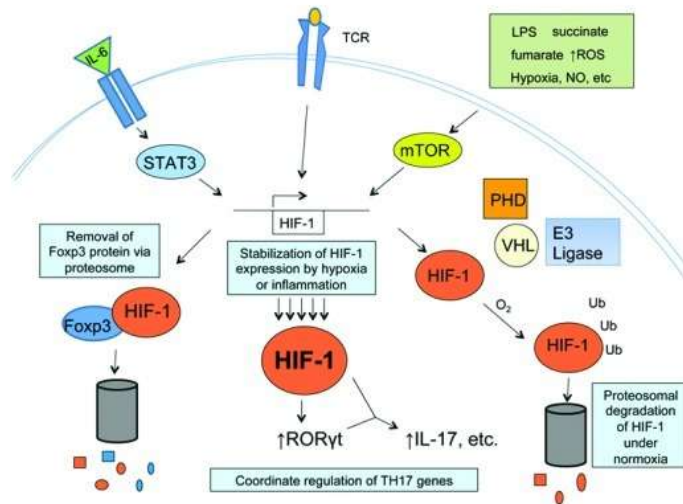
Kör 3: 1 ml tampon + 1 ml amonyum molibdat + 0,2 ml tampon

Hesaplama:

$$\text{Katalaz aktivitesi (kU/L)} = \frac{A(\text{kör1}) - A(\text{numune})}{A(\text{kör2}) - A(\text{kör3})} \times 271$$

3.8.2.MDA: Sağlıklı dokularda çok düşük düzeylerde olan lipid peroksidasyonun artmış serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu doku hasarının göstergesi olarak kullanılabilir. Lipid peroksidasyonu yıkım ürünlerinden birisi de MDA’dır. Serumdaki MDA düzeyinin ölçümü in vivo serbest oksijen radikalleri aracılı doku hasarının bir göstergesi olarak kullanılabilir(94). Ratlardan jelli tüplere alınan numuneler, 10 dakika 1500 g/dk santrifüj edildikten sonra serumlarına ayrıldı, çalışma gününe kadar -40°C’de korundu. Serumlarda MDA düzeyi Cayman Chemical Company TBARS ticari kiti (Katalog no: 10009055) ile kolorimetrik olarak ölçüldü. MDA sonuçları µM düzeyinde verildi.

3.8.3.HIF-1a: HIF-1 heterodimerik transkripsiyon faktörü olup oksijene afinitesi en fazla olan alt tipi 1a’dır.HIF-1a ayrıca hipoksiye cevap olarak glukoz transportu ve glikolizdeki bir çok metabolik genin regülasyonundan sorumludur(95). Ratlardan K2-EDTA antikoagülanlı tüplere alınan numuneler, 10 dakika 1500 g/dk santrifüj edildikten sonra plazmaları ayrıldı, çalışma gününe kadar -40°C’de korundu. Plazmada Hif-1α düzeyi USCNLIFE Rat HIF-1α Elisa kiti (Katalog no: E0789r) ile çalışıldı. HIF-1α sonuçları pg/mL düzeyinde verildi.



Şekil-22:HIF-1 regülasyonu.Oksijenin normal olduğu durumda CD₄ T hücrelerinde HIF-1 in proteazomal degradasyon için işaretlenmesi ve yıkılması(95).

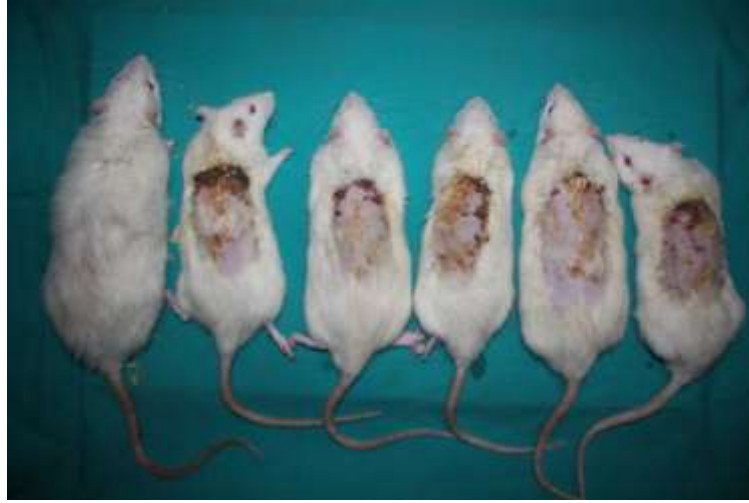
3.9.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışma sonunda elde edilen veriler SPSS 17.0 Windows programı kullanılarak değerlendirildi. Her grup için ortalama değer, standart sapma ve median değerler bulundu. Bağımsız ikili grup karşılaştırmaları için non-parametrik testlerden Friedman testi kullanıldı. Ayrıca anlamlı fark var ise farkın hangi gruplardan kaynaklandığını bulmak için Wilcoxon Signed Ranks Test (Wilcoxon Sıralı İşaret Testi) kullanıldı. $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Fleplerdeki nekroz/total flep alanı yüzdelерinin en minimal olduğu her gruptan ratlar aşağıdaki şekilde gösterilmektedir.



Şekil-23:Sırasıyla grup-1,2,3,4,5,6.Gruplardaki en minimal nekroz oranlarının görüldüğü ratlar.Grup-5 te hiç nekroz görülmezken,grup-2 de en fazla nekroz oranı mevcut.

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	-	40	20	11.66	5	23
2.Rat	-	8.3	20	10.36	13.01	53.3
3.Rat	-	17	32.5	3.33	10	21.6
4.Rat	-	35	2.3	12.34	12.56	35
5.Rat	-	35	22	16.88	0.33	2.7
6.Rat	-	37	27.5	17.5	12.33	40.3
7.Rat	-	35.6	10	19.33	5.75	27.33
Ortalama	-	29.7	19.18	13.05	8.42	29.03
SD(Standart Deviasyon)	-	12.038	10.207	5.447	4.835	16.017
Median Değer	-	35	20	12.34	10	27.33

Tablo-6:Flep Nekroz Yüzdeleri

Sıçanlarda nekroz/total flep yüzdesinin en fazla grup-2’de görüldüğü, en az grup-5’te görüldüğü gözlemlendi. İstatistiksel olarak bakıldığında flep nekroz yüzdeleri için $p=0,014$ ve $\alpha=0,05$, $p<\alpha$ olduğu için gruplar arasında istatistiksel olarak farklar anlamlı bulundu. Buna göre;

1-Grup-2 ile Grup-3 arasında, Grup-2 ile Grup-6 arasında, Grup-3 ile Grup-4 arasında, Grup-3 ile Grup-5 arasında, Grup-3 ile Grup-6 arasında, Grup-4 ile Grup-5 arasında, Grup-4 ile Grup-6 arasında istatistiksel anlamda fark izlenmedi.

2-Grup-2 ile Grup-4 arasında, Grup-2 ile Grup-5 arasında ve Grup-5 ile Grup-6 arasında anlamlı fark izlendi.

Bu sonuçlara göre en fazla thymoquinone verilen 5.grupta flep nekroz oranları en az; thymoquinone verilmeyen grup-2 de en fazla nekroz oranı saptandı. Grup-6 daki nekroz oranının grup-2 ye yakın olduğu gözlemlendi. Bu sonuca göre DMSO maddesinin nekroz gelişimine olumlu etkisinin olmadığı düşünüldü. İlk 10 gün thymoquinone verilen 3.gruptaki nekroz oranının 4. ve 5.gruba göre yüksek bulunması süre faktörünün bu çalışmada etkili olduğunu göstermektedir.

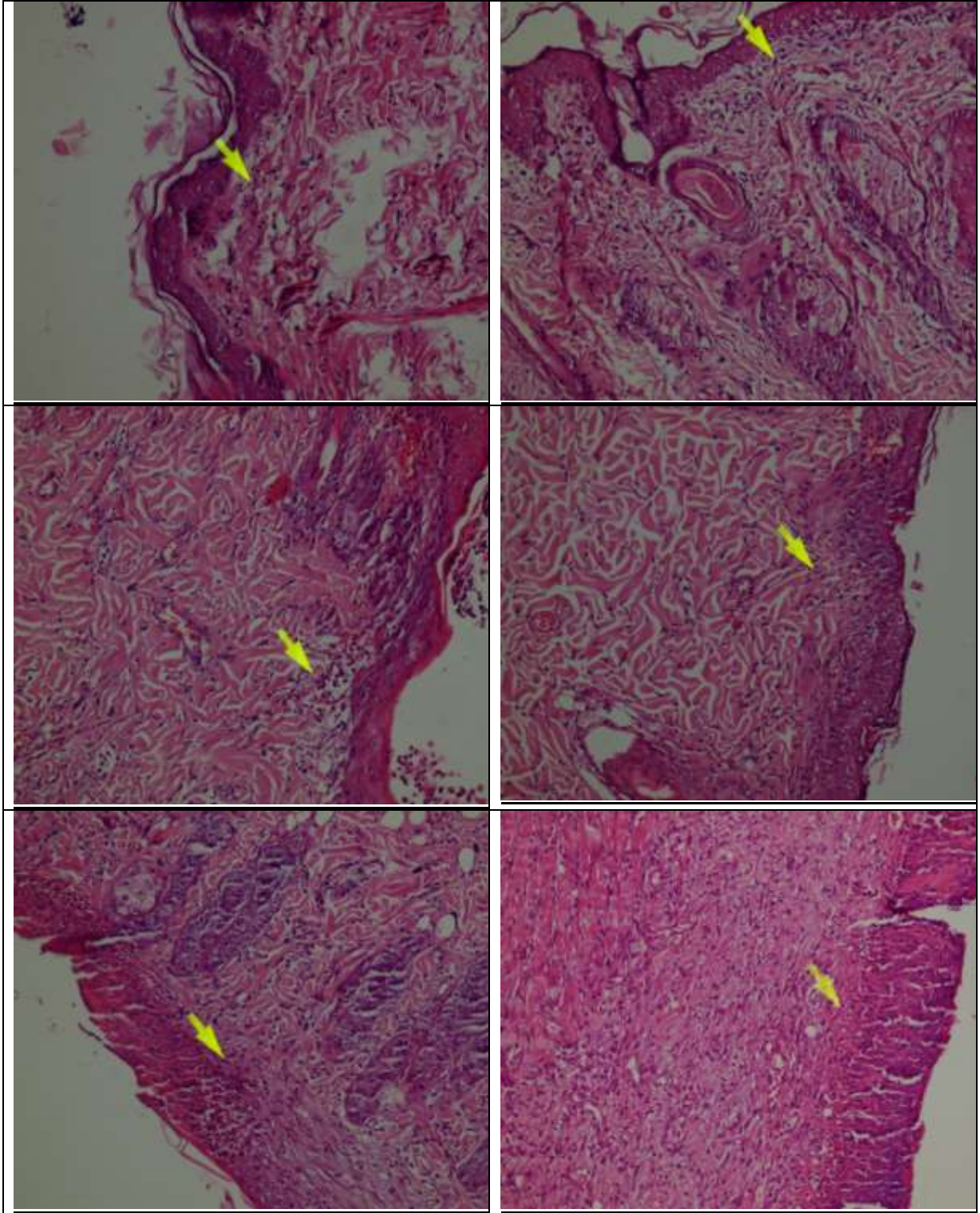
4.2. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik bulguların gruplar arası değerlendirilmesinde tablo-7’de kullanılan skala kullanıldı.

	YOK	AZ	ORTA	YOĞUN	ÇOK YOĞUN
PMNL ve lenfosit yoğunluğu	0	1+	2+	3+	4+
Dermiste ödem	0	1+	2+	3+	4+

Tablo-7;Çalışma Parametreleri İçin Kullanılan Skorları

a.PMNL-Lenfosit İnfiltrasyonu



Şekil-24;Gruplardaki PMNL-Lenfosit İnfiltrasyonları.(H&E.200 Büyütme)

a.1.Proksimal

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	1	1	2	1	2	1
2.Rat	1	1	2	1	2	2
3.Rat	1	1	4	2	1	2
4.Rat	1	1	2	1	4	1
5.Rat	1	2	1	2	2	2
6.Rat	1	2	3	1	1	1
7.Rat	1	2	1	1	2	1
Ortalama	1	1.42	2.142	1.285	2	1.42
SD	0,00	0,534	1,069	0,487	1,00	0,534
Median Değer	1	1	2	1	2	1

Tablo-8;Proksimal Biyopsilerin PMNL ve Lenfosit İnfiltrasyonu Değerleri

Proksimal biyopsilerdeki PMNL-Lenfosit infiltrasyonu en fazla grup-3 ve grup-5'te izlendi.Ancak istatistiksel olarak $p=0,066$ ve $a=0,05$ ($p>a$) olduğu için gruplar arasında fark olmadığı görüldü.

a.2.Nekroz Geçiş Hattı

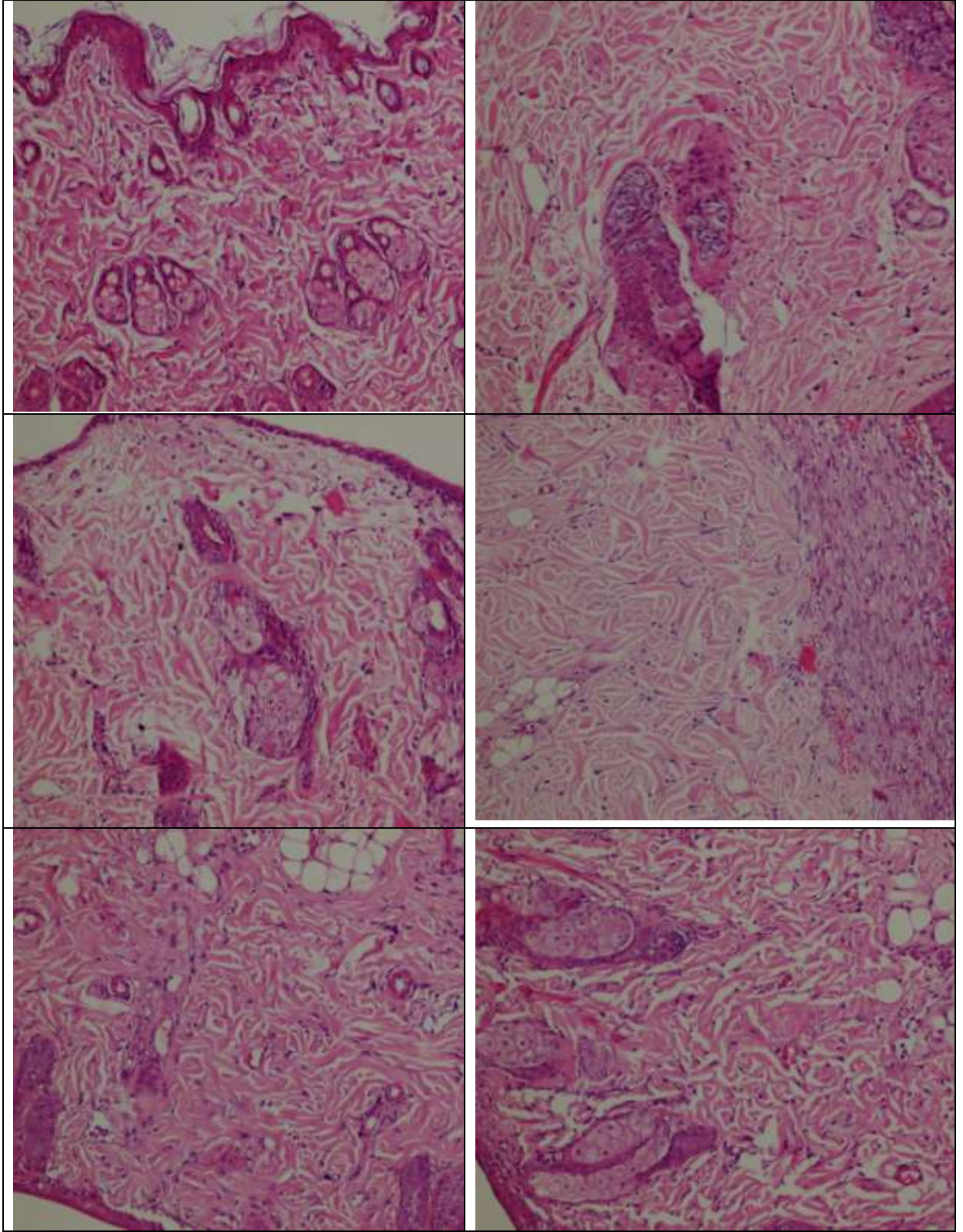
	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	1	3	2	2	4	3
2.Rat	1	2	3	4	4	4
3.Rat	2	4	2	1	3	4
4.Rat	1	2	2	3	4	4
5.Rat	2	3	4	3	3	4
6.Rat	2	4	2	2	2	3
7.Rat	2	3	4	2	3	4
Ortalama	1.571	3	2.714	2.428	3.285	3.714
SD	0,534	0,816	0,951	0,975	0,755	0,487
Median Değer	2	3	2	2	3	4

Tablo-9;Nekroz Geçiş Hattı Biyopsilerinin PMNL ve Lenfosit İnfiltrasyonu Değerleri

Nekroz geçiş hattı biyopsilerindeki PMNL-Lenfosit infiltrasyonlarına bakıldığında en yüksek değer 6.grupta olduğu en düşük değerin 1.grupta olduğu gözlemlendi. İstatistiksel olarak Grup-1 ve Grup-2 arasında, Grup-1 ile Grup-3 arasında, Grup-1 ile Grup-5 arasında, Grup-1 ile Grup-6 arasında anlamlı fark vardır.

Ayrıca Grup-3 ile Grup-6 arasında, Grup-4 ile Grup-6 arasında anlamlı fark vardır. Diğer gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi. Bu sonuçlar thymoquinone uygulanan gruplarda inflamatuvar yanıtın 6.gruba göre düşük olduğunu gösterir. İnflamatuvar yanıt (PMNL-Lenfosit infiltrasyonu) nekroz yüzdesi ile korelasyon göstermemektedir.

b.Dermal Ödem



Şekil-25;Gruplardaki Dermal Ödem Görüntüleri(H&E.200 Büyütme)

b.1.Proksimal

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	1	1	2	2	1	2
2.Rat	1	2	1	2	2	1
3.Rat	2	1	3	3	1	1
4.Rat	1	2	2	1	2	1
5.Rat	3	2	3	2	1	2
6.Rat	2	3	2	3	2	1
7.Rat	1	3	2	2	1	2
Ortalama	1.571	2	2.142	2.142	1.428	1.428
SD	0,786	0,816	0,690	0,690	0,534	0,534
Median Değer	1	2	2	2	1	1

Tablo-10;Proksimal Biyopsilerin Dermal Ödem Skorları

Proksimal biyopsilerdeki dermal ödem skorlarına bakıldığında en yüksek 3. ve 4. gruplarda izlendi. Ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark yoktur (Asymp.Sig.=0,182.p>0,05).

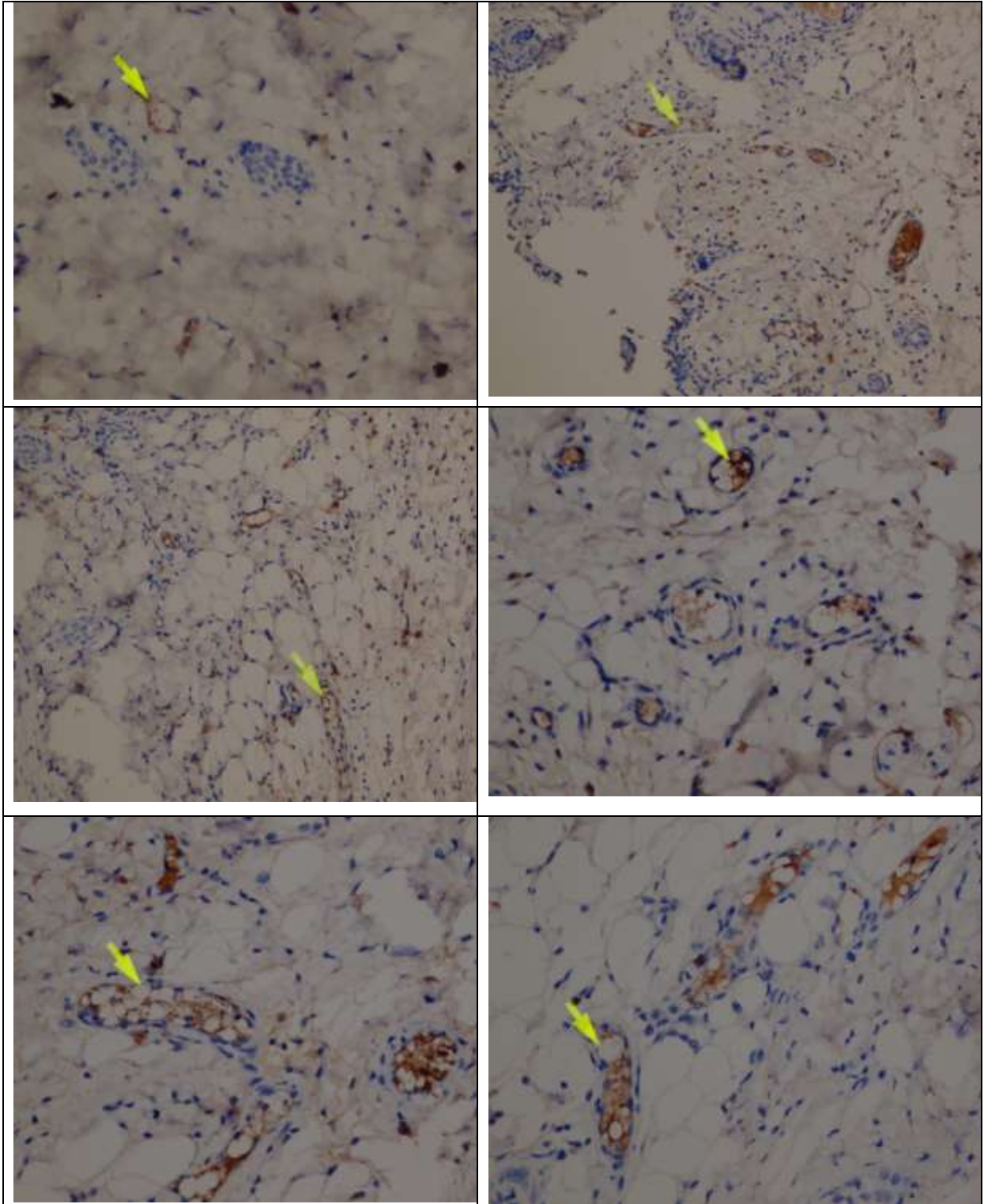
b.2.Nekroz Geçiş Hattı

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	1	2	2	1	1	2
2.Rat	2	1	1	2	3	1
3.Rat	1	1	2	2	2	1
4.Rat	1	3	1	2	1	2
5.Rat	2	1	1	2	2	3
6.Rat	1	2	1	3	2	2
7.Rat	1	2	3	1	1	1
Ortalama	1.285	1.714	1.571	1.857	1.714	1.714
SD	0,487	0,755	0,786	0,690	0,755	0,755
Median Değer	1	2	1	2	2	2

Tablo-11;Nekroz Geçiş Hattı Biyopsilerinin Dermal Ödem Skorları

Nekroz hattında en yüksek dermal ödem grup-4'te izlendi. Ancak istatistiksel anlamda gruplar arasında anlamlı fark yoktur (Asymp.Sig.=0,709.p>0,05).

c.Damarlanma Artışı



Şekil-26;Gruplardaki Damarlanma Artışı(CD 34 Antikoru İle Boyama.400 Büyütme)

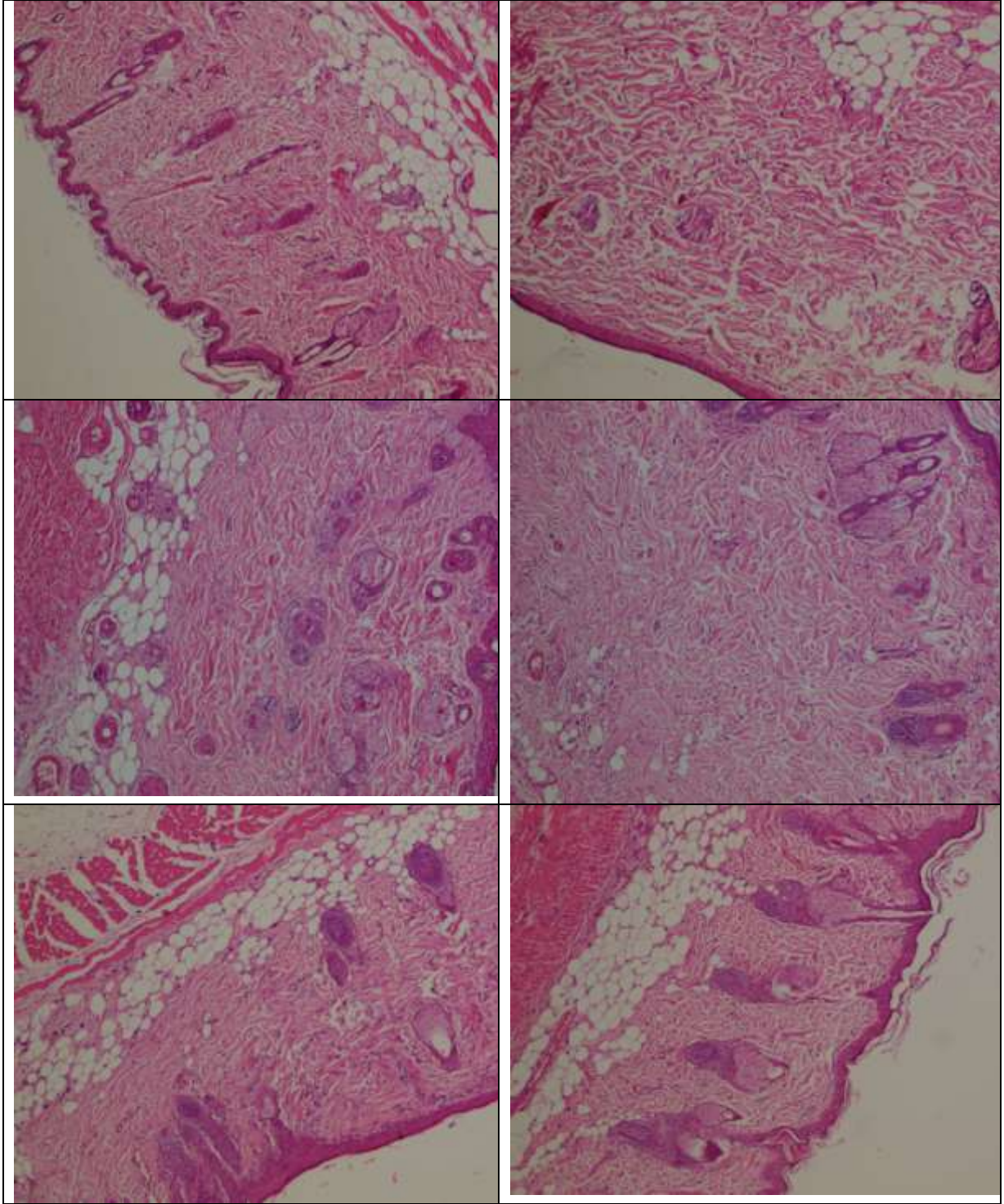
c.1.Nekroz Geçiş Hattı

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	5.5	10.75	9.75	11.75	15	8.25
2.Rat	5.75	5	16.5	17	16.25	14.5
3.Rat	4	12.75	11.5	12.5	7.5	11.5
4.Rat	5.75	8.5	17.25	12	16	18.5
5.Rat	6.5	14.5	14.5	8.5	12.75	9.25
6.Rat	6	13.25	11	14	7.75	11
7.Rat	5.25	12	13.5	11	11.25	10.25
Ortalama	5.535	10.964	13.428	12.392	12.357	11.892
SD	0,783	3,257	2,838	2,629	3,687	3,520
Median Değer	5,75	12	13,5	12	12,75	11

Tablo-12;Nekroz Geçiş Hattındaki Damarlanma Artışı Skorları

Damarlanma artışı en fazla TQ uygulanan grup-3'te sonra grup-4 ve grup-5'te izlendi.Damarlanma artışının süre faktörüne bağlı olmadığı gözlemlendi. İstatistiksel olarak Grup-1 ile Grup-2 arasında, Grup-1 ile Grup-3 arasında, Grup-1 ile Grup-4 arasında , Grup-1 ile Grup-5 arasında ve Grup-1 ile Grup-6 arasında anlamlı fark vardır. Diğer gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi.

d.Kollajen Yoğunluğu



Şekil-27;Gruplardaki Kollajen Yoğunlukları(H&E.100 Büyütme)

d.1.Proksimal

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	2	3	3	4	3	2
2.Rat	2	3	4	4	2	2
3.Rat	2	4	3	4	2	2
4.Rat	2	4	3	4	3	3
5.Rat	2	2	2	4	3	2
6.Rat	2	4	4	4	3	2
7.Rat	3	4	4	4	3	2
Ortalama	2.142	3.428	3.285	4	2.714	2.142
SD	0,377	0,786	0,755	0,000	0,487	0,377
Median Değer	2	4	3	4	3	2

Tablo-13;Proksimal Biyopsilerdeki Kollajen Yoğunluğu Skorları

Kollajen yoğunluğu yara iyileşme kriteri olarak değerlendirilir. Gruplardaki değerlere bakıldığı zaman en yüksek yara iyileşme hızı TQ uygulanan 4.grup'ta en düşük yara iyileşme hızı grup-1 ve grup-6'da izlenmektedir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde grup-1 ile grup-2 arasında, grup-1 ile grup-3 arasında, grup-1 ile grup-4 arasında, grup-1 ile grup-5 arasında anlamlı fark vardır.Ayrıca grup-2 ile grup-6 arasında, grup-3 ile grup-6 arasında, grup-4 ile grup-5 arasında, grup-4 ile grup-6 arasında ve grup-5 ile grup-6 arasında anlamlı fark vardır.

d.2.Nekroz Geçiş Hattı

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	2	2	4	2	2	2
2.Rat	2	4	3	4	1	3
3.Rat	3	2	2	4	3	2
4.Rat	3	3	4	3	3	2
5.Rat	3	3	3	4	2	2
6.Rat	3	4	4	4	2	3
7.Rat	3	4	3	4	3	3
Ortalama	2.714	3.142	3.285	3.571	2.285	2.428
SD	0,487	0,899	0,755	0,786	0,755	0,534
Median Değer	3	3	3	4	2	2

Tablo-14;Nekroz Geçiş Hattındaki Kollajen Yoğunluğu Skorları

Nekroz geçiş hattındaki kollajen yoğunluğu skorlarına bakıldığında en yüksek değerlerinTQ uygulanan grup-3 ve grup-4'de olduğu görülmektedir. Ancak TQ uygulanan grup-5'de kollajen değerlerinin düştüğü görülmektedir. Kollajen yoğunluğu ile süre faktörü ve nekroz oranları arasında korelasyon saptanmadı. İstatistiksel olarak grup-1 ile grup-4 arasında, grup-2 ile grup-6 arasında, grup-4 ile grup-5 arasında ve grup-4 ile grup-6 arasında anlamlı fark vardır.

4.3.Biyokimyasal Bulgular

a.HIF-1a Düzeyi

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	13.08	12.58	12.42	11.27	13.41	11.27
2.Rat	11.1	11.27	13.9	12.75	11.1	12.91
3.Rat	11.43	11.76	12.40	10.44	12.25	11.27
4.Rat	11.74	11.1	12.58	13.24	11.93	13.74
5.Rat	11.43	12.09	12.09	10.44	12.37	10.44
6.Rat	12.42	10.61	11.43	11.43	12.35	12.09
7.Rat	10.94	12.09	11.93	10.94	13.08	12.42
Ortalama	11.73	11.642	12.392	11.501	12.355	12.02
SD	0,763	0,682	0,768	1,096	0,753	1,120
Median Değer	11,43	11,76	12,40	11,27	12,35	12,09

Tablo-15;Gruplardaki HIF-1a Düzeyleri

Hipoksiye sekonder damarlanma artışının indirekt göstergesi kabul edilen (89) HIF-1a düzeyleri TQ uygulanan grup-3 ve grup-5'te diğer gruplara göre yüksek bulundu.Ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (Asymp.Sig=0,258).

b.Katalaz Düzeyi

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	105,832	32,617	143,133	114,507	99,933	33,311
2.Rat	230,402	197,784	61,070	30,361	33,311	95,626
3.Rat	139,204	48,578	40,944	72,868	65,080	102,36
4.Rat	160,803	150,594	76,338	178,700	30,535	204,724
5.Rat	135,906	98,545	75,470	18,217	154,064	100,25
6.Rat	38,169	136,020	92,820	100,627	82,598	65,234
7.Rat	206,806	62,458	48,578	20,125	51,354	94,381
Ortalama	145,303	103,799	76,907	76,486	73,839	99,412
SD	63,804	60,434	34,127	59,425	43,385	52,721
Median Değer	139,204	98,545	75,470	72,868	65,080	95,626

Tablo-16;Gruplardaki Katalaz Değerleri

Antioksidan olarak bilinen katalaz düzeyleri en düşük olarak TQ uygulanan grup-3,4,5'te izlendi.Bu bulgu TQ maddesinin antioksaidan özelliğinin olmadığını düşündürmektedir. Ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (Asymp.Sig.=0,495.p>0,05).

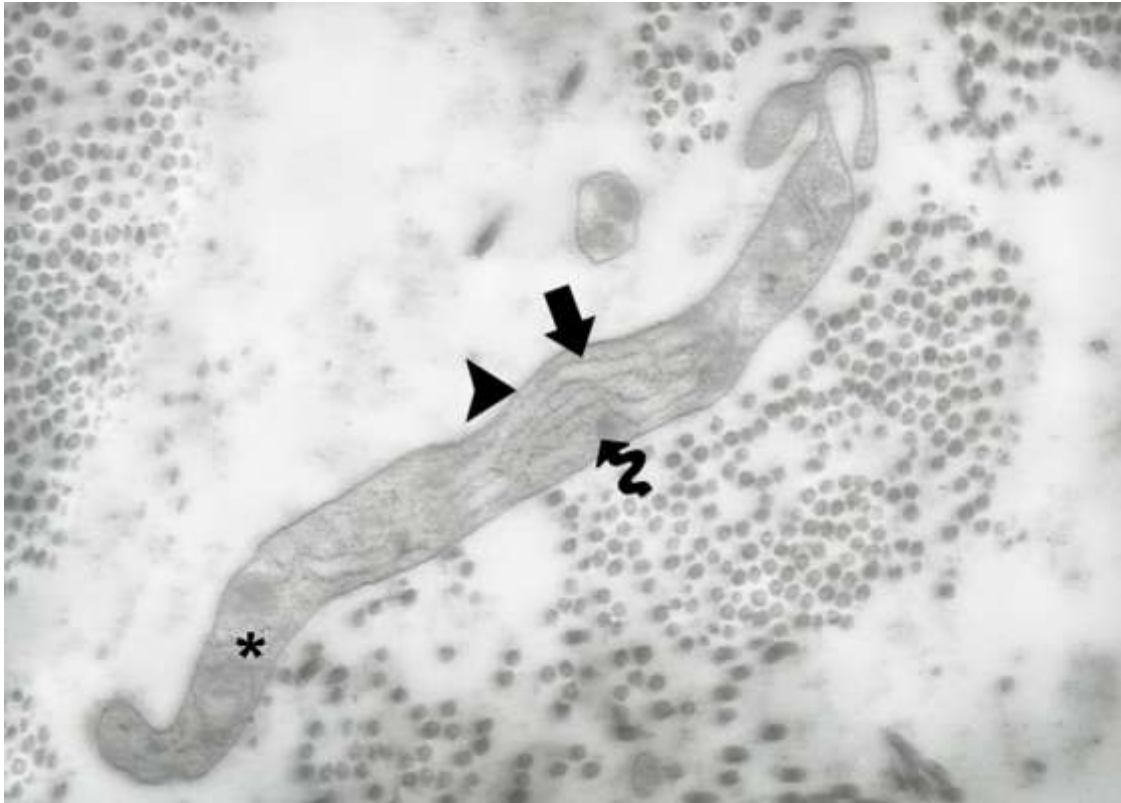
c.MDA Düzeyi

	Grup-1	Grup-2	Grup-3	Grup-4	Grup-5	Grup-6
1.Rat	43.457	29.308	34.79	32.389	37.333	32.651
2.Rat	21.908	41.281	24.53	60.356	50.136	27.290
3.Rat	41.481	33.661	47.944	27.002	39.560	29.764
4.Rat	26.775	33.415	18.014	44.190	37.316	31.234
5.Rat	31.125	19.523	29.412	55.164	33.805	38.995
6.Rat	22.1	23.531	30.018	22.093	35.554	32.585
7.Rat	25.744	26.275	18.838	68.202	29.209	23.011
Ortalama	30.370	29.570	29.078	44.200	37.559	30.79
SD	8,847	7,268	10,307	17,707	6,456	4,966
Median Değer	26,775	29,308	29,412	44,190	37,316	31,234

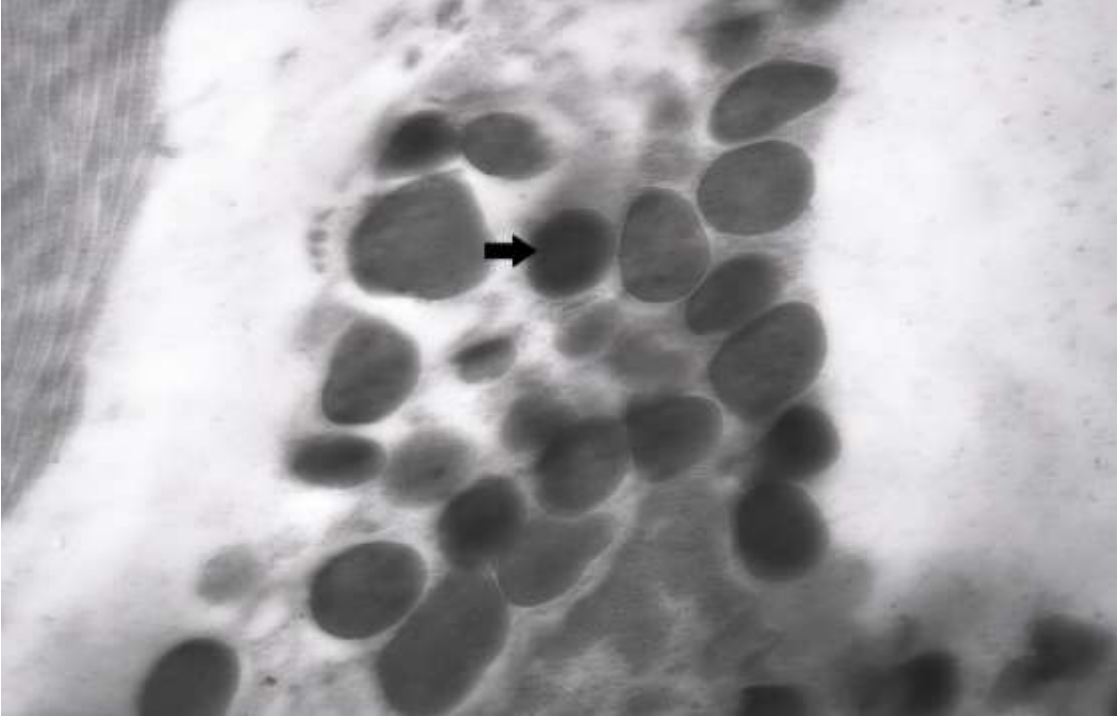
Tablo-17;Gruplardaki MDA Düzeyleri

Lipit peroksidasyonu ürünü olan oksidan ajan MDA (malondialdehit) düzeylerine bakıldığı zaman en yüksek TQ uygulanan grup-4'te ve grup-5'te izlendi. Bu TQ maddesinin oksidatif hasarı arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak istatistiksel anlamda gruplar arasında fark izlenmedi (Asymp.Sig.=0,289,p>0,05).

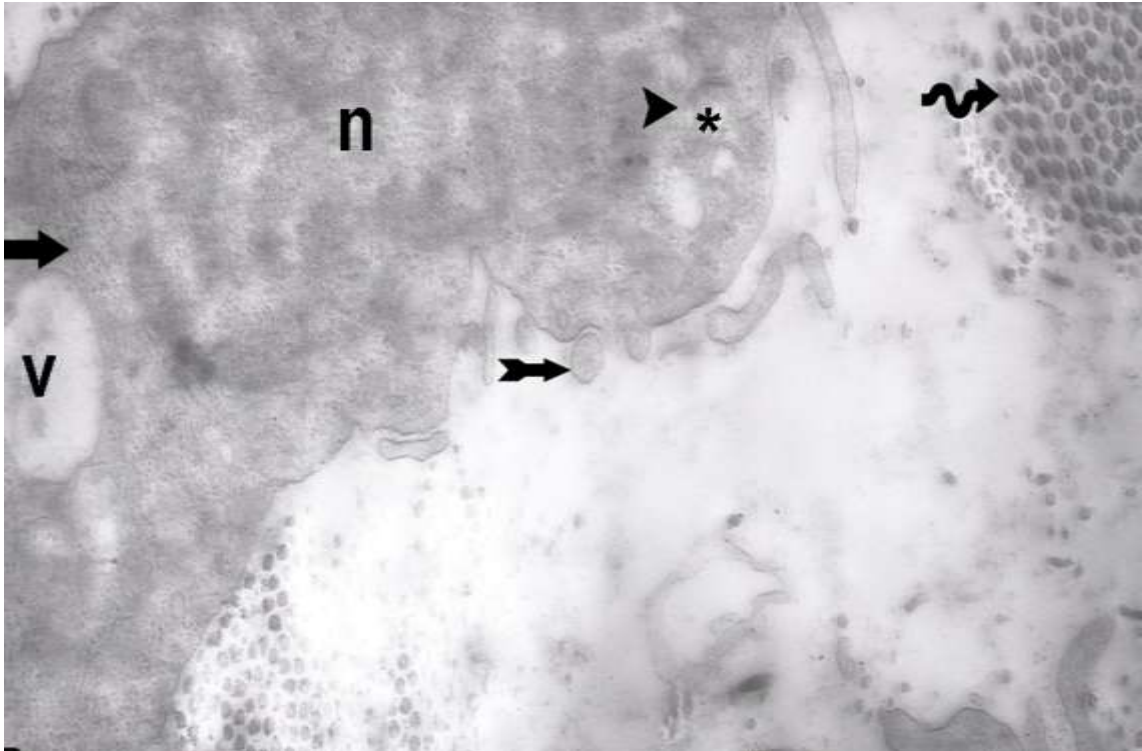
4.4.Elektron Mikroskopi Bulguları



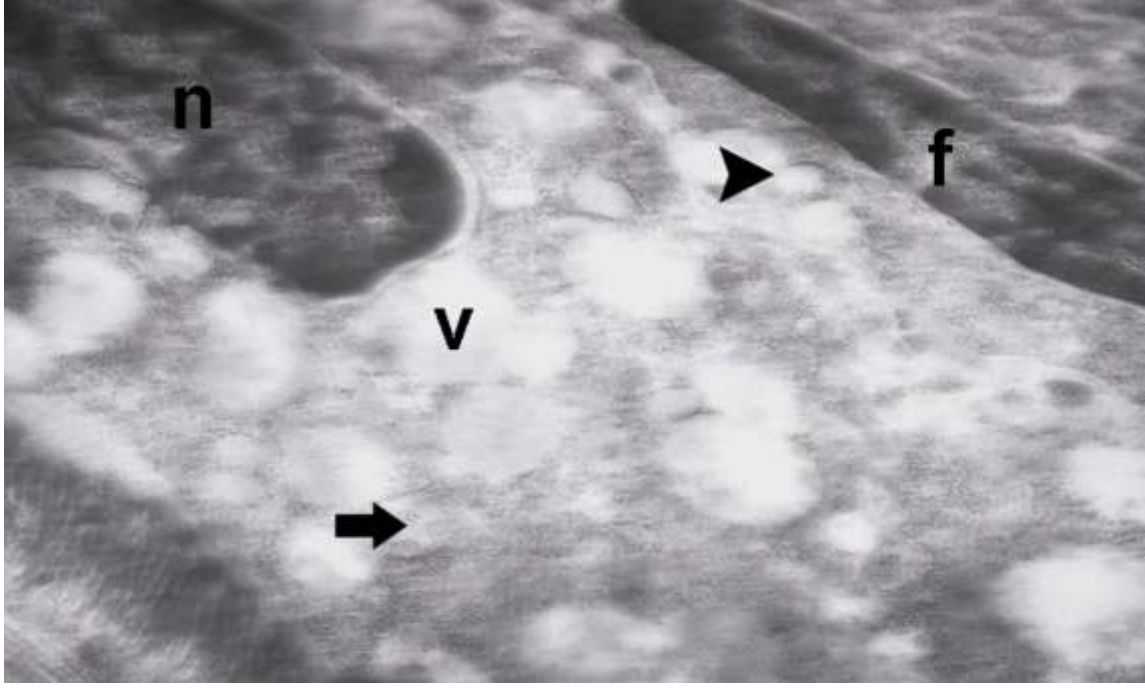
Resim 1. 1. Grup mikrogramında deri dokusunda normal mitokondri izlenmekte. Mitokondrial matriksideki granüller gözlenmekte (spiral ok). Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran izlenmekte. Kristaların tübüler yapıdaki uzantısı seçilmekte (ok). X15000.



Resim 2. 2.Grup mikrografında sitoplazma bütünlüğünü kaybetmiş nekrotik hücre izlenmekte. Lizozom (ok). X15000.



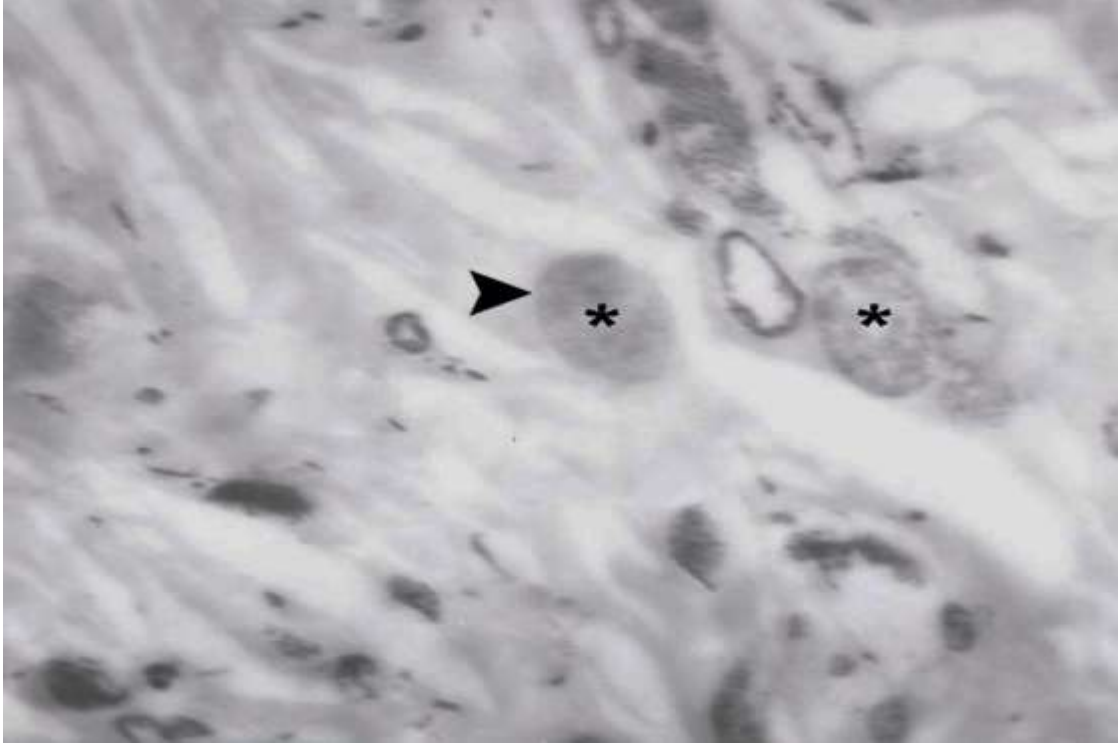
Resim 3. 2. Grup mikrografında deri dokusunda hasarlı yapıdaki mitokondri izlenmekte. Mitokondrial matriksde kayıpla beraber vakuol oluşumu izlenmekte (asteriks). Hücre sitoplazması içinde oldukça geniş çapta vakuol oluşmu izlenmekte (v). Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran izlenmekte. Sitoplazmadaki endoplazmik retikulum görülmekte. Nukleus (n) (ok).x15000.



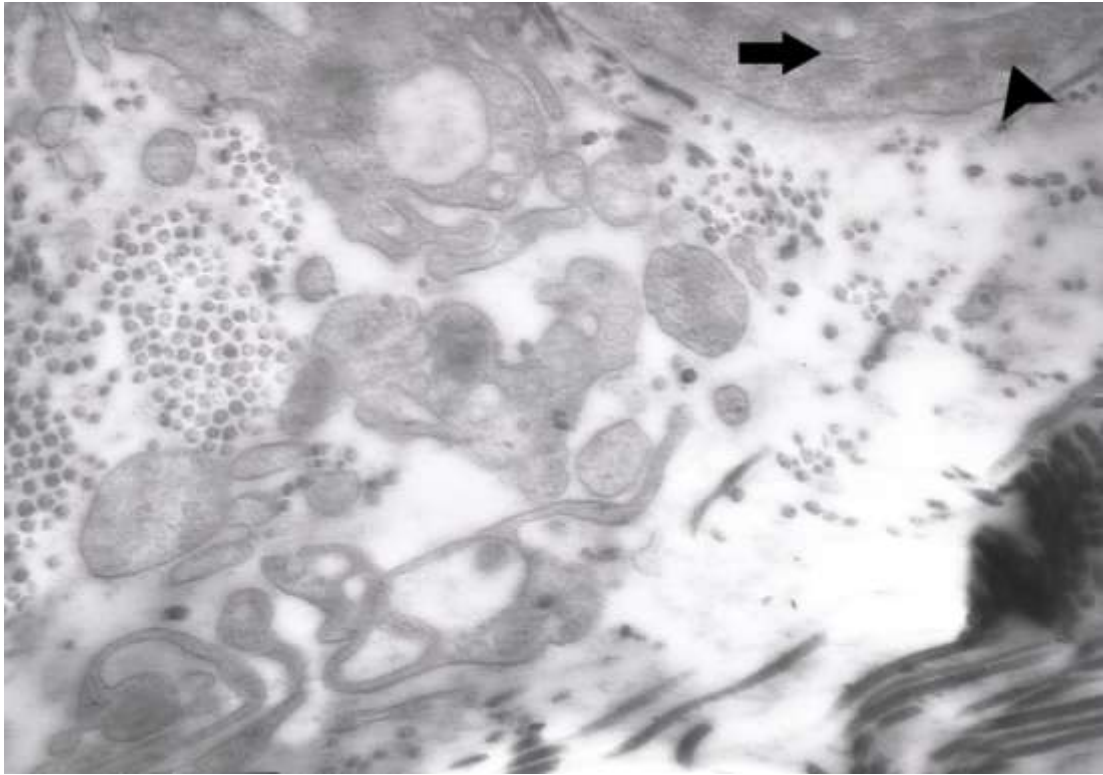
Resim 4. 2. Grup mikrografında deri dokusunda hasarlı yapıdaki mitokondri izlenmekte. Mitokondrial matriksde kayıpla beraber vakuol oluşumu izlenmekle beraber mitokondriyal iç ve dış membran bütünlüğünün kaybolduğu izlenmekte (ok başı). Hücre sitoplazması içinde oldukça geniş çapta vakuol oluşumları izlenmekte (v). Sitoplazmadaki endoplazmik retikulumlarda dilatasyonlar görülmekte (ok). Nukleus (n). Fibroblast (f) (ok). X15000.



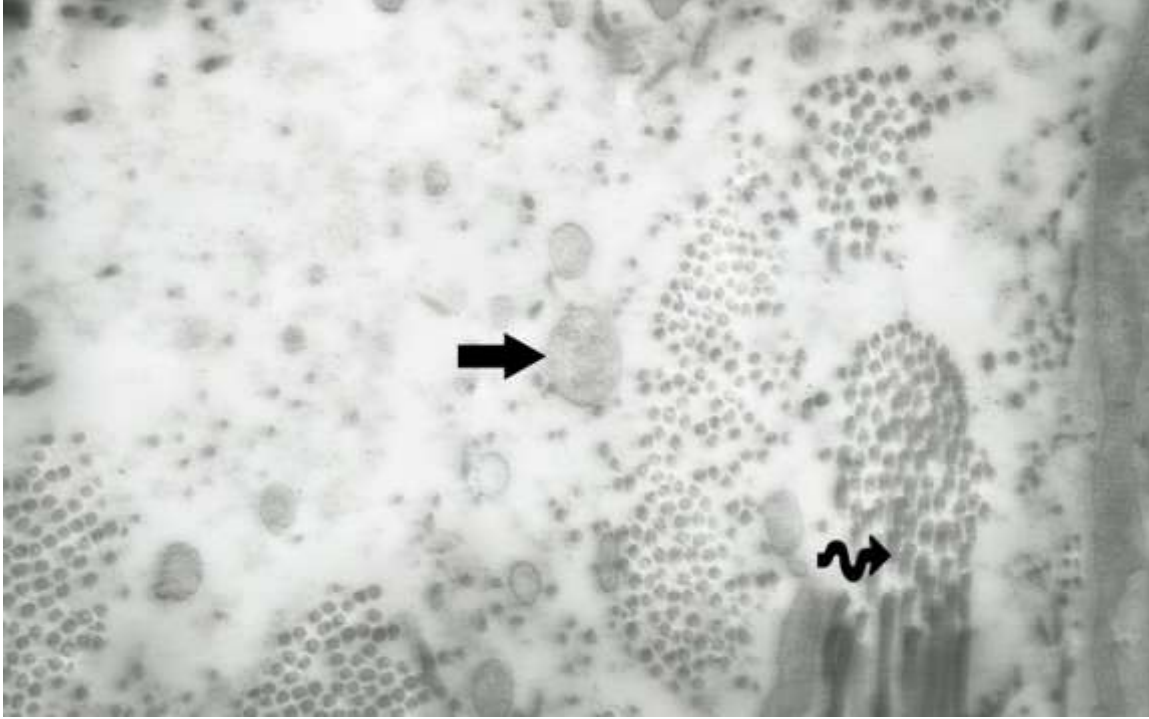
Resim 5. 3. Grup mikrografında deri dokusunda normal mitokondri izlenmekte. Mitokondrial matriksiin az yoğun yapıda olduğu gözlenmekte (asteriks). Mitokondriyal iç (ok) ve dış membran izlenmekte. Kristaların tübüler yapıdaki uzantısı seçilmekte (kuyruklu ok).x15000.



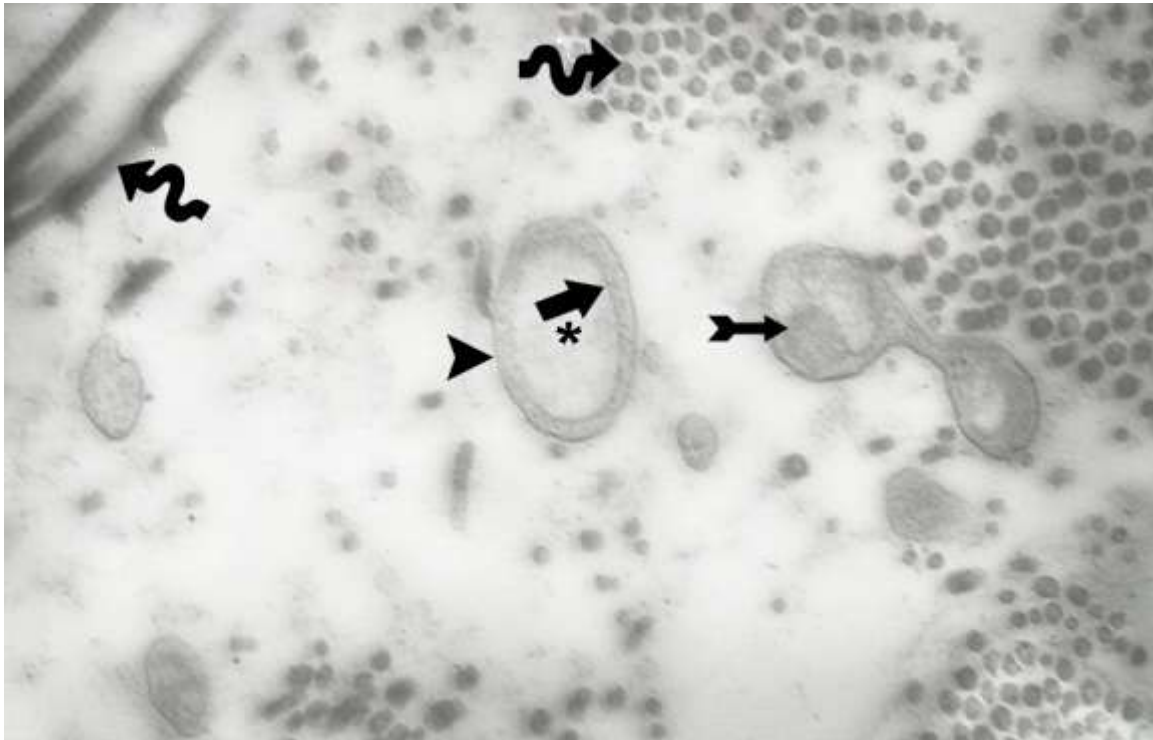
Resim 6. 4. Grup mikrografında deri dokusunda normal ve hasarlı yapıdaki mitokondriler izlenmekte. Mitokondrial matriksde kayıpla beraber vakuol oluşumu izlenmekle(asteriks). Mitokondriyal iç ve dış membran bütünlüğünün kaybolduğu izlenmekte (ok başı).x15000.



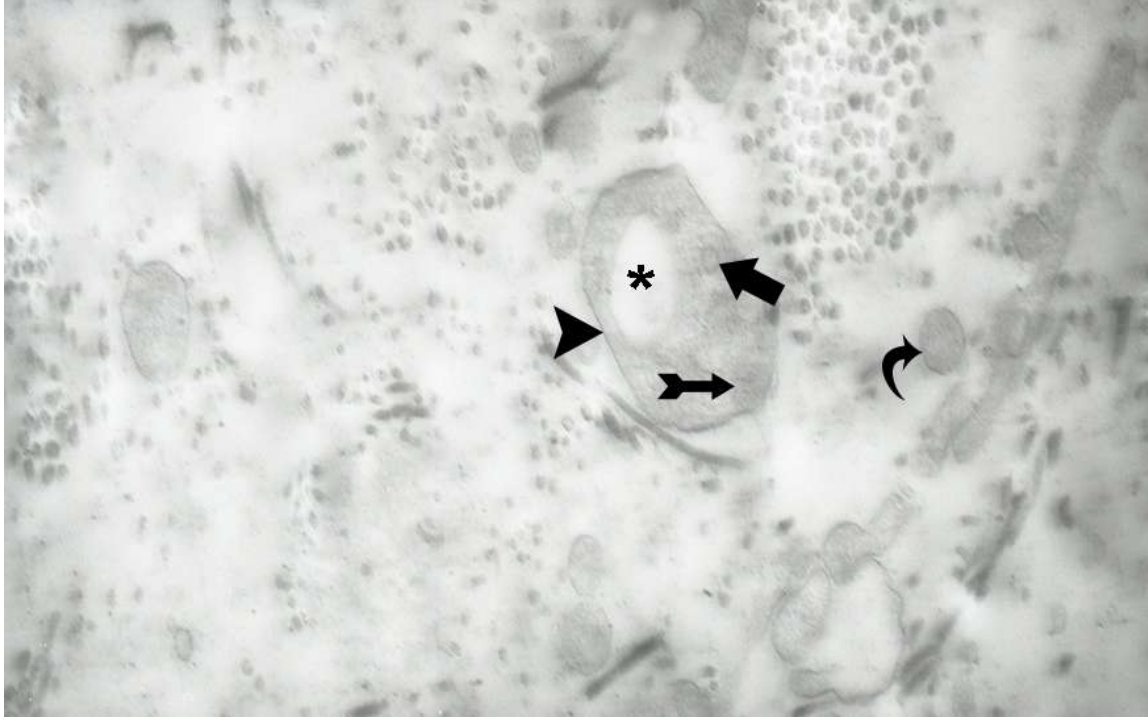
Resim 7.5.Grup mikrografında deri dokusunda normal mitokondri izlenmekte.Mitokondrial matriks yoğun yapıda olduğu ve mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran izlenmekte. Kristaların tübüler yapıdaki uzantısı seçilmekte.Normal yapıdaki endoplazmik retikulumlar izlenmekte (ok). X15000.



Resim 8. 5. Grup mikrografında deri dokusunda normal mitokondri izlenmekte. Mitokondrial matriks yoğun yapıda olduğu gözlenmekte. Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran izlenmekte. Kristaların tübüler yapıdaki uzantısı seçilmekte (ok). Kollajen fibriller (spiral ok). X15000.



Resim 9. 6. Grup mikrografında mitokondriler izlenmekte. Mitokondrial vakulazisyon gözlenmekte (asteriks). Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran (ok) izlenmekte. Mitokondriyal elektron yoğun alan (Area densa) (kuyruklu ok) gözlenmekte. X25000.



Resim 10. 6. Grup mikrografında şişmiş mitokondri izlenmekte. Mitokondrial vakulazisyon gözlenmekte (asteriks). Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran izlenmekte. Mitokondriyal DNA mitokondriyal matriks içinde seçilmekte (ok). Normal boyuttaki mitokondri görünmekte (eğik ok). x15000.



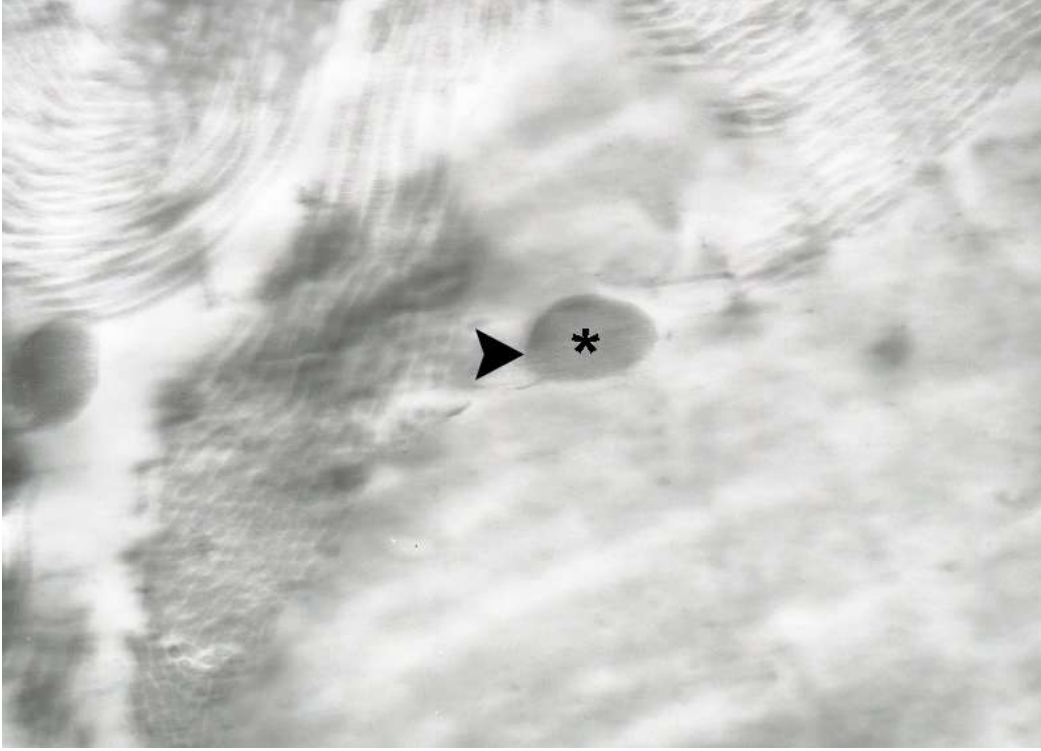
Resim 11. 6. Grup mikrografında şişmiş mitokondri izlenmekte. Mitokondrial vakulazisyon gözlenmekte (asteriks). Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran izlenmekte. Mitokondriyal DNA mitokondriyal matriks içinde seçilmekte (ok). Normal boyuttaki mitokondri görünmekte (eğik ok). X20000.



Resim 12. 6. Grubu mikrogramında deri dokusunda normal mitokondri izlenmekte. Mitokondrial matriks yoğun yapıda olduğu gözlenmekte (asteriks). Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran izlenmekte. Kristaların tübüler yapıdaki uzantısı seçilmekte (ok). X15000.



Resim 13. 6. Grup mikrogramında deri dokusunda hasarlı yapıdaki mitokondri izlenmekte. Mitokondrial matriksde kayıpla beraber vakuol oluşumu izlenmekte (asteriks). Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran (ok) izlenmekte. Salgı vezilülü izlenmekte (kuyruklu ok). X30000.



Resim 14. 6. Grup mikrografında deri dokusunda normal yapıdaki mitokondri izlenmekte. Yoğun mitokondrial matriks görülmekte (asteriks). Mitokondriyal iç (ok başı) ve dış membran izlenmekte. X15000.

Elektron mikroskopi bulgularına göre kontrol grubuna (1. Grup) ait deri bloklarından alınan ince kesitler tarayıcı elektron mikroskobun da incelendiğinde mitokondrilerin ince yapısının normal olduğu gözlemlendi. Mitokondriyal iç ve dış membran sınırları oldukça belirgin olduğu gözlemlendi. Bunun yanında mitokondriyal matriksindeki granüller belirgindi. Mitokondriyal kristallerin tübüler yapıdaki uzantısı seçilmekteydi (**Resim 1**).

Yalnızca cerrahi işlem uygulanan sıçanlardan elde edilen (2. Grup) bloklarından alınan ince kesitler tarayıcı elektron mikroskobun da incelendiğinde nekrotik hücreler gözlemlendi (**Resim 2-4**).

Hücre sitoplazmalarında geniş sitoplazma kayıplarıyla beraber endoplazmik retikulum dilatasyonları saptandı. Mitokondriyal iç ve dış membran sınırlarının bütünlüğünü kaybettiği saptandı (**Resim 3**).

3. grup mikrografları incelendiğinde mitokondriyal matriksin az yoğun yapıda olduğu gözlemlendi. Mitokondriyal iç (ok) ve dış membran sınırları oldukça kesin sınırlı olduğu izlendi. Kristallerin tübüler yapıdaki uzantısı seçilmekteydi (**Resim 5**).

Cerrahi işlem sonrası 10 günlük periyotta TQ (thymoquinone) maddesi ile beslenen (4. Grup) gruba ait numuneler tarayıcı elektron mikroskobun da incelendiğinde normal ve hasarlı mitokondriler gözlemlendi. Mitokondriyal iç ve dış membran sınırları belirgin değildi. Mitokondriyal matriksde kayıpla beraber vakuol oluşumu izlendi (**Resim 6**).

5. Grup deri numunelerinden alınan bloklar tarayıcı elektron mikroskobun da incelendiğinde normal yapıda mitokondriler gözlemlendi.

Mitokondrilerin ince yapısına bakıldığında matriks yoğun yapıda olduğu ve mitokondriyal iç ve dış membranın belirgin olduğu ve kristaların tübüler yapıdaki olduğu izlendi. Normal yapıdaki endoplazmik retikulumlar gözlemlendi **(Resim 7,8)**.

Grup-6'ya ait örnekler tarayıcı elektron mikroskopun da incelendiğinde mitokondrilerin hasarlı olduğu saptandı **(Resim 9)**. Mitokondriyal vakulazisyon ile beraber mitokondriyal elektron yoğun alan (Area densa) gözlendi **(Resim 10)**. Mitokondriyal iç ve dış membranlar bir çok mitokondrilerde belirgin az da olsa bir kısım mitokondrilerde belirgin olmadığı gözlemlendi **(Resim 10-14)**.

Sonuç olarak mitokondrilerin ince yapısı tarayıcı elektron mikroskopun da incelendiğinde 1. grup, 4. grup , 5. grupların birbirine benzer özellikte olduğu gözlemlendi. 2. Grup'ta nekrotik hücrelerin yanında mitokondriler oldukça hasarlı olarak izlendi. 3. grup ve 6. grup mitokondrilerin ise 2. gruptaki kadar olmasa da hasarlı olduğu gözlemlendi.

5. TARTIŞMA

Flepler plastik cerrahi uygulamalarının büyük bir bölümünde önemli yer edinmektedir. Rekonstrüktif merdivene sadık kalınarak yapılan planlamalarda flep bazında öncelikli tercih lokal fleplerdir. Lokal flepler içerisinde ise en sık kullanılanları random paternli yani bilinen bir kan damarı olmayan fleplerdir.

Ancak random paternli fleplerde uzunluk/en oranı hala plastik cerrahinin çözüme muhtaç sorunlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Buradan yola çıkarak flep cerrahisi sonrası gelişen distal nekrozu önlemek, yapılan cerrahi işlemlerde flep boyutlarını arttırmak ve fleplerden maksimum kazanç elde ederek defektlerin onarımını sağlamak adına literatürde yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır.

Bu amaçla dextran-40, melatonin, sildenafil, kırmızı kore ginsengi çalışmalarda flep yaşayabilirliğini arttırmak için kullanılan ajanlardan sadece birkaçıdır (92,96,97,98). Flep distalindeki nekrozun oluşumunu önlemenin yollarını bulmak için öncelikle distalde neden nekroz gelişir sorusunun cevabını bulmak gerekir.

Reinisch (49) tarafından yapılan çalışmalar flep distalindeki canlılığı belirleyen önemli faktörlerden birinin arteriovenöz şantlar olduğunu ve flep kaldırıldıktan sonra distaldeki arteriovenöz şantların kapiller yatağa yeterli kan akımını engellediğini göstermekteydi. Delay uygulanmış fleplerde ise bu şantların kapandığı ve bu sayede flep distaline yeterli kan akımının korunduğu düşünülmekteydi. Kerrigan, Sasani ve Pang'ın çalışmalarının da içinde olduğu, takip eden birkaç çalışma ise distal flep canlılığının belirlenmesinde arteriovenöz şantların ufak bir rolü olduğunu kanıtlamıştır (50,51). Ayrıca flep cerrahisi sonrasında gelişen stres yanıtı (katekolamin salınımında artış) ile de flep distalinde kan akımında azalma meydana gelebilir.

Distal kısımda lokal iskemi her ne kadar maksimal vasodilatasyona neden olsa da proksimal kısımdaki yetersiz perfüzyon basıncı distalde akımın azalmasına neden olur. Bu yol distal flep yetmezliği nedeninin sonuç olarak yetersiz arteriel kan akımı olduğunu gösterir (52,53,54). Aksine diğer bir çalışmada flep distalinde gelişen nekrozun asıl nedeninin arteriyel yetmezlik değil de venöz yetmezliğe bağlı ortaya çıktığı fikri Khiabani ve Kerrigan tarafından çalışmalarında savunulmuştur (55,56).

Flep nekrozu gelişebilen durumlar olarak yanlış flep planlaması sonucunda mikrosirkülasyonda düşük akım paterninin gelişmesi, iskemi reperfüzyon hasarı, mikrosirkülasyonu etkileyen sistemik faktörler (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstriktörler) ya da flebin fiziksel kompresyonu (uygun olmayan adaptasyon, kink, hematoma) şeklinde referans alınan kaynaklarda belirtilmiştir (39). Bu faktörlerin dışında hücresel düzeyde oluşan toksik oksijen radikalleri inflamatuvar yanıtı hızlandırıp trombositlerin adezyonuna ve mikrovasküler tromboza neden olabilir.

Thymoquinone maddesi *Nigella Sativa* yani halk arasında çörek otu olarak bilinen bitkiden elde edilir. Doğu Akdeniz ülkelerinde yetiştirilen bu bitkinin farmakolojik olarak aktif olan thymoquinone, dithymoquinone, thymohydroquinone ve thymol alt üniteleri mevcuttur (99). Thymoquinone *nigella sativa*'nın aktif olarak en fazla oranda bulunan içeriğidir (100). Flep dolaşımının artırılması amacı ile bu çalışmada kullandığımız TQ(thymoquinone) ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır (101-102). Ancak bu maddenin flep cerrahisi üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Yapmış olduğumuz çalışmada flepler üzerine Thymoquinone etken maddesinin olumlu etkilerinin olduğunu tespit ettik. Nekroz yüzdeleri olarak bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu gözlemledik. Makroskopik olarak en fazla nekrozun grup-2 (kontrol grubu) , en az nekrozun grup-5'de (en fazla TQ ile beslenen grup) olduğunu gördük.

Makroskopik olarak grup-2 ile grup-6 arasında nekroz oranları açısından benzerlik olduğunu gözlemledik. İstatistiksel anlamda iki grup arasında fark olmadığını gözlemledik. Bu sonuca göre DMSO (dimetil sulfoksit) maddesinin inert (etkisiz) bir madde olduğu görüşüne varılabilir. Bizim kanaatimize göre bu madde ile ilgili farklı parametrelerin karşılaştırmada kullanılacağı daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sankaranarayanan C ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada diyabetik ratlarda thymoquinone maddesinin oksidatif hasarı ve B-hücre hasarını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Thymoquinone verdikleri gruplarda serum katalaz düzeylerini diğer gruplara göre düşük bulmuşlardır. Bunun sonucunda thymoquinone maddesinin antioksidan olmadığı kanaatine varmışlardır (103).

Ancak Chern Chih Woo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada meme kanseri oluşturdukları farelerde thymoquinone maddesinin tümör büyümesini inhibe ettiğini ve apoptozisi uyardığını göstermişlerdir. Bu çalışmada serum katalaz düzeyi thymoquinone uygulanan gruplarda daha yüksek bulunmuş (104).

Biz çalışmamızda serum katalaz düzeylerini thymoquinone kullanılan gruplarda diğer gruplara oranla daha düşük bulduk. Ancak istatistiksel anlamda gruplar arasında fark saptamadık. Bu sonuç thymoquinone etken maddesinin antioksidan özelliğe sahip olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptamadık.

Transkripsiyonel aktivatör olarak tanımlanan hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) oksijen homeostazisinde regülatör olarak görev almaktadır. Bu aktivatör heterodimer yapıda olup esas olarak salınan HIF-1 β subuniti ve O₂ regülasyonundan sorumlu HIF-1 α subunitinden oluşmaktadır(105).

Vihanto MM ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada hipoksi altındaki flep ve normal deri arasında HIF-1 α düzeylerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmalarında HIF-1 α hipoksi durumundaki fleplerde 4 hafta sonra artmaya başlamış, maksimum düzeyine 6.hafta da ulaşmış ve 8.hafta sonunda normal düzeyine geri dönmüştür(106).

Başka bir çalışmada Cury V. ve arkadaşları yapmış oldukları araştırmada sıçanlarda iskemik deri flep modelinde düşük doz lazer tedavisinin anjiogenezi arttırdığını göstermişlerdir. Çalışmalarında anjiogenezis markeri olarak HIF-1 α , VEGF kullanmışlar ve bunların arttığını tespit etmişlerdir (107).

Çalışmamızda iskemik durumdaki flep modelinde damarlanma artışının biyokimyasal göstergesi olarak HIF-1a düzeylerine baktık ve TQ uyguladığımız grup-3 ve grup-5'te arttığını ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gördük. Bununla beraber TQ uygulanan diğer bir grup olan 4.grup'ta HIF-1a değerinin azaldığını gördük.İstatistiksel anlamda bakıldığında gruplar arasında HIF-1a düzeyleri olarak anlamlı fark izlemedik.

HIF-1a düzeylerinin TQ uygulanan gruplarda anlamlı düzeyde artmamasının nedeni Vihanto ve arkadaşlarının çalışmalarında belirttiği gibi HIF-1a düzeylerindeki maksimum artışın 6.haftada olması ve çalışmamızın takip süresinin kısa olması olabilir (3 hafta). Bu nedenle daha uzun süreli ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.

Deneyisel fleplerin iskemik distal alanlarında ksantin oksidaz ve serbest radikal formasyonunun göstergesi olarak kabul edilen diğer bir indiktor olan malondialdehit düzeylerinin yüksek olduğu saptanmıştır (66,67). Bu nedenle fleplerde nekroz gelişimini engellemek için kullanılacak olan ajanların oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan oksijen radikallerini ortamdan temizleyen ve buna bağlı flep nekrozunu azaltmayı amaçlayan antioksidan özellikte olmaları istenir. MDA (malondialdehit) lipit peroksidasyonunun bir indikatörü olup dokuda nmol/g olarak ölçülür ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilir.

Nili-Ahmadabadi ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada farelerde aflatoxin ile karaciğer hasarı oluşturmuşlar ve thymoquinone maddesinin hepatoprotektif etkisi olduğunu göstermişlerdir.Bu çalışmalarında oksidatif stres göstergesi olarak MDA düzeylerinin TQ uygulanan gruplarda azaldığını ortaya koymuşlardır (108).

Başka bir çalışmada Kayıran O. ve arkadaşları Tadalafil'in iskemik cilt fleplerinde iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığını göstermişler ve iskemik koşullarda lipit peroksidasyon ürünü olarak kabul ettikleri MDA düzeylerinin iskemi durumunda arttığını göstermişlerdir (109).

Bir diğer çalışmada Bağdaş D. ve arkadaşları diyabetik ratlarda sistemik klorojenik asit uygulaması ile deri fleplerinde viabiliteyi arttığını göstermişler ve klorojenik asitin diyabetik ve non-diyabetik sıçanlarda oksidatif hasar göstergesi olan MDA ve NO (nitrik oksit) düzeylerini azalttığını ortaya koymuşlardır (110).

İnci M. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada akut bakteriel prostatit oluşturdukları sıçan modelinde TQ maddesinin antioksidan ve antiinflamatuvar etkisini göstermişler ve bu çalışmada TQ uygulanan gruplarda serum katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitesinin azaldığı, glutatyon peroksidaz aktivitesinin arttığı, artmış olan MDA düzeylerinin TQ uygulanması ile düşmeye başladığını ortaya koymuşlardır (111).

Ayrıca Badary OA ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada TQ maddesinin lipit peroksidasyonunu inhibe ettiğini ve ortamda süperoksit anyonlarının oluşumunu engellediğini ; Mansour MA ve arkadaşlarıda yaptıkları çalışmada TQ maddesinin süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan enzimleri aktive ettiğini ve bu nedenle antioksidan olduğunu savunmuşlardır (84,112).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda MDA düzeyinin TQ uygulanan gruplarda diğer gruplara oranla istatistiksel anlamda olmasada yüksek olduğunu gördük. Aksine katalaz düzeyinin bu gruplarda düşük olduğunu gözlemledik. Bu nedenle TQ maddesinin antioksidan özelliğinin olmadığı düşünülebilir. Ancak istatistiksel anlamda gruplar arasında fark olmadığı için sonuç tartışmaya açık kabul edildi.

Gautam Sethi ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada TQ maddesinin antiapoptotik geni inhibe ettiğini ve apoptozisi hızlandırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada TQ maddesinin antikanserojen ve antiinflamatuvar olduğunu savunmuşlardır (113).

Çalışmamızda antiinflamatuvar etkinin araştırılması için histopatolojik incelemede ödem yoğunluğu ve PMNL infiltrasyonu kullanılmıştır. Ödem yoğunluğu thymoquinone verilen gruplarda diğer gruplara oranla istatistiksel anlamda farklı bulunmamıştır. Ancak PMNL infiltrasyonu thymoquinone uygulanan gruplarda proksimalden alınan biyopsilerin sonucuna göre diğer gruplara oranla istatistiksel anlamda fark olmadığı, nekroz hattından alınan biyopsilerde anlamlı fark olduğu gözlemlendi. En düşük PMNL infiltrasyonunun (kontrol grubu hariç) grup-4'te olduğu en fazla PMNL infiltrasyonunun grup-6'da olduğu gözlenmiştir.

Bu bulgular TQ uygulanan gruplarda antiinflamatuvar etkinin görüldüğünü ancak antioksidan etkinin olmadığını düşündürmektedir.

TQ maddesinin deri üzerinde anjiogenezisi arttırdığına dair literatürde yayın bulunmamakla beraber mevcut yayınların bir çoğu kanserli hücrelerde anjiogenezisi azalttığı yönündedir.

Yi T. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada TQ sıçanlardaki prostat kanserlerinde VEGF (vasküler endotelial growth faktör)-2 üzerinden etki göstererek anjiogenezisi azalttığını savunmuşlardır. Ancak tam olarak hangi mekanizmalar ile vaskülaritenin azaldığını bilmediklerini öne sürmüşlerdir (114).

Bir diğer çalışmada Peng L. ve arkadaşları osteosarkomda TQ maddesinin anti-tümör ve anti-anjiogenezis etkisini savunmuşlardır (115).

Çalışmamızda damarlanma artışı olarak bakıldığında en yüksek damarlanma artışı yüzdesinin grup-3 te olduğunu gözlemledik. Ayrıca TQ uygulanan grup-4 ve grup-5'de de aynı şekilde kontrol grubu, shame grubu ve grup-6 ya göre anlamlı artış izledik. İstatistiksel olarak TQ uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptandı. Bu bulgulara bakılarak TQ maddesinin deride anjiogenezisi arttırdığını düşünmekteyiz. Ancak damarlanma artışının bir diğer göstergesi olan HIF-1a düzeylerinin gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık göstermemesi nedeni ile damarlanma artışı konusunda çelişkili bilgiler olduğu kanaatindeyiz.

HIF-1a düzeyinin deriden alınan biyopsilerden çalışılmaması, serumdan çalışılması nedeni ile derideki kan akımı artışı kriteri olarak kullanılmasının doğru olmayacağı, daha kapsamlı çalışmalarda deri biyopsilerinde HIF-1a'nın çalışılmasının damarlanma artışı konusunda daha sağlıklı bilgiler vereceğini düşünmekteyiz.

Elektron mikroskopi incelemelerinde mitokondrilerin ince yapısı tarayıcı elektron mikroskobun da incelendiğinde grup-1, grup-4 , grup-5'in birbirine benzer özellikte olduğu gözlemlendi. Grup-2'de nekrotik hücrelerin yanında mitokondriler oldukça hasarlı olarak izlendi.

Grup-3 ve grup-6'daki mitokondrilerin ise grup-2 kadar olmasa da hasarlı olduğu gözlemlendi. Mitokondri hasarı düzeylerine bakılarak TQ(thymoquinone) uygulanan gruplarda normal gruplara göre hasarın daha az olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca dayanarak thymoquinone etken maddesinin antioksidan özelliğinin olduğu düşünülmektedir. Grup-3'de thymoquinone'nun cerrahi müdahale öncesi verilmesi ve sonraki 10 günlük takip sürecinde verilmemesine bağlı olarak mitokondrideki değişimlerin iyileşme sürecindeki mekanizmalara ve cerrahi stres faktörüne bağlı olarak daha arttığı ve bu hasarın oluştuğu düşünüldü.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Flep distalinde gelişen nekrozun ortadan kaldırılması yada engellenebilmesi için yapılan çalışmalar günümüzde hala popülerliğini korumaktadır ve gelecekte devam edecektir. Nigella sativa bitkisi (çörek otu) insanların normal yaşantılarında çok sık olarak kullandıkları bir bitkidir. Nigella sativa yada etken maddesi TQ'nun çok değişik organ sistemlerine olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiş ancak bir çoğu hala tartışma konusudur.

Deri flepleri üzerine etkisi gösterilmemiş olan Nigella sativa bitkisinin en aktif ve içeriğinde en fazla bulunan formu TQ(thymoquinone) maddesinin flep viabilitesi üzerine etkilerinin araştırılması ile ilgili çalışmaların sadece bu çalışma ile sınırlı kalmayacağı ve daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

Bu çalışmaya göre elde ettiğimiz sonuçlar şu şekilde sıralanabilir;

1-TQ maddesinin flep nekroz oranlarını anlamlı düzeyde azalttığı görülmüştür.

2-TQ maddesinin katalaz düzeylerini azalttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

3-TQ maddesinin MDA düzeylerini arttırdığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

4-Katalaz düzeylerinin azalması, MDA düzeylerinin artması TQ maddesinin antioksidan olmadığını düşündürebilir. Ancak bu veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir.

5-HIF-1a düzeyleri TQ uygulanan gruplarda diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı değildir. HIF-1a'nın kan örneklerinden çalışılması, deri biyopsilerinden çalışılmaması nedeni ile deride anjiyogenezis artışının savunulması için yapılacak olan sonraki çalışmalarda HIF-1a'nın doku biyopsilerinden çalışılması önerilmektedir.

6-Histopatolojik olarak damarlanma artışı TQ uygulanan gruplarda artmıştır ve istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu bulguya dayanarak TQ maddesinin anjiyogenezisi arttırdığı düşünüldü.

7-Histopatolojik olarak bakılan PMNL infiltrasyonu, dermal ödem bulgularının anlamlı olmadığı görüldü.

8-Kollajen yoğunluğunun TQ uygulanan gruplarda arttığı gözlemlendi. Yara iyileşmesi olarak değerlendirildiğinde en yüksek yara iyileşmesinin (kollajen yoğunluğunun en fazla olduğu) grup-4'te olduğu, en düşük yara iyileşmesinin grup-1 ve grup-6'da olduğu gözlemlendi.

Bu durumda TQ maddesinin yara iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğu savunulabilir. Ancak TQ uygulanan grup-3 ve grup-5'te kollajen yoğunluğunun artması ancak grup-4 kadar anlamlı artışın olmaması nedeni ile bu konuda ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

9-Elektron mikroskopi bulgularına bakıldığında en az mitokondri ve hücre membran hasarının TQ uygulanan grup-4 ve grup-5'te olduğu gözlemlendi. Bu bulgu TQ maddesinin antioksidan olduğunu düşündürmektedir. Ancak TQ verilen diğer bir grup olan grup-3'teki mitokondrilere hasar gözlenmesi çalışmada süre faktörünü tartışmaya açmaktadır.

Sonuç olarak bu bulgular ışığında flep viabilitesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu düşündüğümüz TQ maddesinin klinikte kullanılabileceğini savunmaktayız.

REFERANSLAR

1. Chang H, Nobuaki I, Minabe T, Nakajima H. Comparison of three different supercharging procedures in a rat skin flap model. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Jan;113(1):277-83.
2. Barral SM, Araujo ID, Vidigal PV, Mayrink CA, Araujo AD, Costa PR. Effects of sildenafil on the viability of random skin flaps. *Acta Cir Bras.* 2011 Aug;26(4):314-9.
3. Vourtsis SA, Spyriounis PK, Agrogiannis GD, Ionac M, Papalois AE. VEGF application on rat skin flap survival. *J Invest Surg.* 2012 Feb;25(1):14-9.
4. Arnold PB, Merritt W, Rodeheaver GT, Campbell CA, Morgan RF, Drake DB. Effects of perivascular Botulinum Toxin-A application on vascular smooth muscle and flap viability in the rat. *Ann Plast Surg.* 2009 May;62(5):463-7.
5. Bai T, Yang Y, Wu YL, Jiang S, Lee JJ, Lian LH, Nan JX. Thymoquinone alleviates thioacetamide-induced hepatic fibrosis and inflammation by activating LKB1-AMPK signaling pathway in mice. *Int Immunopharmacol.* 2014 Feb 20.
6. Aycan IO, Tüfek A, Tokgöz O, Evliyaoğlu O, Fırat U, Kavak GO, Turgut H, Yüksel MU. Thymoquinone treatment against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *IntJ Surg.* 2014 Jan 2.
7. Paletta C, Pokorny J, Rumbolo P. Skin Graft. Ed: Mc Carthy J, May J, Litter J, Mathes Plastic Surgery. pp. 293-316, Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, 2006.
8. Taylor GI, Ives A, Dhar S. Vascular Territories. In: Mathes SJ, Second Edition. Plastic Surgery. Philadelphia: Elsevier, 2006: 317-363
9. Taylor GI. The Blood Supply Of The Skin. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CH, Sixth Edition. Grabb and Smith's Plastic Surgery. Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins, 2007: 33-51
10. Gnudi, M.T and Webster, J.P. The Life and Times of Gaspare Tagliacozzi, Surgeon of Bologna, 1545-1599. With a Documented Study of the Scientific and Cultural Life of Bologna in the Sixteenth Century. Preface by Arturo Castiglioni. New York, Herbert Reichner, 1950. xxii + 538 pages, illus.
11. Menick FJ. Nasal reconstruction: forehead flap. *Plast Reconstr Surg.* 2004 May;113(6):100E-11E
12. Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. (1975). "The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques". *Plast Reconstr Surg.* 55 (5): 533-44.
13. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: Experimental and clinical correlation. *Plast Reconstr Surg* 67:1177-1187.
14. Cormack GC, Lamberty BG. A classification of fasciocutaneous flaps according to their patterns of vascularisation. *Br J Plast Surg* 37:80-87, 1984
15. Cormack G, Lamberty B. The Anatomical Basis for Fasciocutaneous Flaps, Cambridge, Mass: Blackwell Scientific Publications, 1992.
16. Taylor GI, Palmer JH: The vascular territories (Angiosomes) of the body: Experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg* 40: 113-141, 1987

17. Koshima I, Soeda S. Inferior epigastric artery skin flap without rectus abdominus muscle. *Br J Plast Surg*. 42:645, 1989.
18. Koshima I, Soeda S. Free posterior tibial perforator-based flaps. *Ann Plast Surg*. 1991 Mar;26(3):284-8.
19. Koshima I, Moriguchi T, Fukuda H, Yoshikawa Y, Soeda S. Free, thinned, paraumbilical perforator-based flaps. *J Reconstr Microsurg*. 1991 Oct;7(4):313-6.
20. Koshima I, Moriguchi T, Soeda S, Kawata S, Ohta S, Ikeda A. The gluteal perforator-based flap for repair of sacral pressure sores. *Plast Reconstr Surg*. 1993 Apr;91(4):678-83.
21. Lamberty B.G.H., Healy C. : Flaps : Physiology , principles of design and pitfalls. *Mastery of Plastic Reconstructive Surgery*. Ed.: Cohen M. Little ,Brown and Company, Boston, New York, Toronto, London, 1994;1th Ed.
22. Özkaya Ö. Amniotik membranın flep yaşayabilirliğine etkisi. Uzmanlık tezi, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği, İstanbul-Türkiye, 2007.
23. Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104:2079-91.
24. Solmaz Korkmaz G. Sıçanlarda genişletilmiş sırt ada flebi modelinde yeni bir cerrahi geciktirme tekniği. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği, Adana, 2011.
25. Taylor GI. The blood supply of the skin. Thorne CH, Beasley RW, Aston SJ, Bartlett SP, Gurtner GC, Spear SL. *Grabb & Smith's Plastic Surgery*. 6th Ed, Philadelphia: Lippincott, 2007:33-41.
26. Mathes SJ, Nahai F: Classification of the vascular anatomy of the muscles: experimental and clinical correlation. *Plast. Reconstr. Surg*. 1981;67:177.
27. Stephen J. Mathes, Jamie Levine: Muscle Flaps and Their Blood Supply. *Grabb & Smith's Plastic Surgery*. 6th Ed, Philadelphia: Lippincott, 2007:42-51.
28. Stephen J. Mathes, Scott L. Hansen. Flap Classification and Applications. *Mathes Plastic Surgery Volume-1. Chapter 16*. 374-377.
29. Cormack GC, Lamberty BG: A classification of fasciocutaneous flaps according to their patterns of vascularization. *Br J Plast Surg* 1984;37:80.
30. Stephen J. Mathes, Scott L. Hansen. Flap Classification and Applications. *Mathes Plastic Surgery Volume-1. Chapter 16*. 377
31. Wei FC. *Clinics in Plastic Surgery: Perforator Flaps*. 2003, 9-58.
32. Blondeel PN, Van Landuyt KH, Monstrey SJ, Hamdi M, Matton GE, Allen RJ, Dupin C, Feller AM, Koshima I, Kostakoglu N, Wei FC. The "Gent" consensus on perforator flap terminology: preliminary definitions. *Plast Reconstr Surg* 2003; 112:1378-83.
33. Ali Rıza Öreroğlu, İlker Üşçetin, Seda Barutça, Çağdaş Orman, Mehmet Karahangil, Mithat Akan. Güncel Perforatör Flep Çeşitleri ve Uygulamaları. *S.B.Okmeydanı Tıp Dergisi* 28(1):1-7, 2012

34. Savaş Serel, Burak Kaya, Hakan Gence, Zeki Can, Serdar Gültan. Perforatör fleplerle klinik deneyimlerimiz. Clinical experience with perforator flaps. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2006; 59:26-31
35. Stephen J. Mathes, Scott L. Hansen. Flap Classification and Applications. Mathes Plastic Surgery Volume-1. Chapter 16. 379.
36. Nicholas B. Vedder MD. Flap Physiology. Mathes Plastic Surgery Volume-1. Chapter 17. 483 p.
37. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body; experimental study and clinical applications. Br J Plast Surg 1987; 40:113-141.
38. Daniel RK, Kerrigan CL: Principles and physiology of skin flap surgery. In McCarthy JG, ed: Plastic Surgery. Philadelphia, WB Saunders, 1990:275-328.
39. Vedder, N. B., Flap Physiology. Mathes Plastic Surgery, 2nd ed., volume 1, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2006; 484 p.
40. Tunç S. Melatonin ve N-asetil sisteinin sıçanlardaki McFarlane flep beslenmesi üzerine etkileri. 2012. Adana.
41. Gatti JE, La Rossa D, Neff SR, Silverman DG: Altered skin flap survival and fluorescein kinetics with hemodilution. Surgery 1982; 92:200-205.
42. Kim KZ, Thompson DH, George TF. 2nd, et al. Effect of anemia on survival of myocutaneous flaps in the pig. Otolaryngol Head Neck Surg. 1994. 111:509-512.
43. Burnstock G., Ralevic V.: New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. Br J Plast Surg, 47:527-543, 1994.
44. Daniel R.K., Kerrigan C.L.: Principle and physiology of skin flap surgery. In McCarthy J.G., second ed: Plastic Surgery. Philadelphia: W.B. Saunders, 275-328, 1990.
45. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Zins JE. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. Plast Reconstr Surg, 104(3):730-7, 1999.
46. Palmer B, Jurell G, Norberg KA; The blood flow in experimental skin flaps in rats studied by means of the 133 xenon clearance method. Scand J Plast Reconstr Surg. 1972; 6:6-12.
47. Hoopes JE: Pedicle flaps-an overview. In Krizec TJ, ed: Symposium on basic science in plastic surgery. vol 15. St. Louis, Mosby. 1976. 241-259.
48. Daniel R.K., Kerrigan C.L.: Principle and physiology of skin flap surgery. In McCarthy J.G., second ed: Plastic Surgery. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. 486p.
49. Reinisch, J.F., The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon. Plast Reconstr Surg, 1974. 54(5): p. 585-98.
50. Pang, C.Y., et al., Hemodynamics and vascular sensitivity to circulating norepinephrine in normal skin and delayed and acute random skin flaps in the pig. Plast Reconstr Surg, 1986. 78(1): p. 75-84.
51. Kerrigan, C.L., Skin flap failure: pathophysiology. Plast Reconstr Surg, 1983. 72(6): p. 766-777.

52. Kerrigan CL, Daniel RK: Monitoring acute skin-flap failure. *Plast. Reconstr. Surg.*,1983,71:519-524.
53. Kerrigan CL, Daniel RK:Skin flap research:a candid view.*Ann Plast Surg.*1984;13:383-387.
54. Kerrigan, C.L., Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg*, 1983. **72**: p. 766-777.
- 55.Khiabani KT,Kerrigan CL:Differing flow patterns between ischemically challenged flap skin and flap skeletal muscle:implications for salvage regiments.*Plast Reconstr Surg* 2002;109:220-227.
56. Fujino T: Contribution of the axial and perforator vasculature to circulation in flaps.*Plast.Reconstr. Surg.* 1967;39:125-137.
57. Hjortdal VE, Hauge E, Hansen ES:Differential effects of venous stasis and arterial insufficiency on tissue oxygenation in myocutaneous island flaps: an experimental study in pigs. *Plast. Reconstr. Surg.* 1992;89:521-529
58. Hjortdal VE, Sinclair T,Kerrigan CL,Solymoss S:Venous ischemia in skin flaps:microcirculatory intravascular thrombosis.*Plast. Reconstr. Surg.*1994;93:366-374
59. Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J: Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast. Reconstr. Surg.* 1994;93:1485-1495
60. Cohen BE, Harmon CS, Phizackerley PJ: Glucose metabolism in experimental skin flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 1983;71:79-86.
- 61.Im MJ, Su CT, Hoopes JE, Anthenelli RM: Skin flap metabolism in rats: oxygen consumption and lactate production. *Plast. Reconstr. Surg.* 1983;71:685-688.
62. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, et al: Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast.Reconstr. Surg.*, 1987;79:990-997.
- 63.Im MJ,Manson PN,Bulkley GB,Hoopes JE.Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps.*Ann Surg* 1985;201:357-359.
- 64.McCord JM.Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury.*N Engl J Med* 1985;312:159-163.
65. Vedder, N. B.,. *Flap Physiology. Mathes Plastic Surgery*, 2nd ed., volume 1, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2006; 487 p.
66. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, et al: The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: evidence for tissue intolerance of marginal perfusion.*Plast. Reconstr. Surg.* 1988;81:233-239.
67. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, et al: Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischemic flap surgery. *Br.J. Plast. Surg.* 1986;39:469-472.
68. Manson PN, Narayan KK, Im MJ, et al: Improved survival in free skin flap transfers in rats. *Surgery* 1986;99:211-215.
69. Vedder, N. B.,. *Flap Physiology. Mathes Plastic Surgery*, 2nd ed., volume 1, Saunders Elsevier, Philadelphia, 2006; 501 p.

70. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg* 198(1): 87-90, 1983.
71. Goossens DP, Rao VK, Harms BA, Starling JR. Superoxide dismutase and catalase in skin flaps during venous occlusion and reperfusion. *Ann Plast Surg* 25(1): 21-25, 1990.
72. Wilkins EG, Rees RS, Smith D, Cashmer B, Punch J, Till GO, et al. Identification of xanthine oxidase activity following reperfusion in human tissue. *Ann Plast Surg* 31(1): 60-65, 1993.
73. Suzuki S, Matsushita Y, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y. Salvage of distal flap necrosis by topical superoxide dismutase. *Ann Plast Surg* 27(3): 253-257, 1991.
74. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Narayanan K, Basford RE, Futrell JW. Augmentation of skin flap survival with allopurinol. *Ann Plast Surg* 18(6): 494-498, 1987.
75. Green CJ, Dhimi L, Prasad S, Healing G, Shurey C. The effect of desferrioxamine on lipid peroxidation and survival of ischaemic island skin flaps in rats. *Br J Plast Surg* 42(5):565-569, 1989.
76. Pari L, Sankaranarayanan C. 2009. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sciences*, 85: 830-834.
77. Al-Naqeeq G, Ismail M, Yazan LS. 2009. Effects of thymoquinone rich fraction and thymoquinone on plasma lipoprotein levels and hepatic low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes expression. *Journal of Functional Foods*, 1(3): 298-303.
78. Nofer J. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 2002;161(1), 1-16.
79. Hawsawi ZA, Ali BA, Bamosa AO. 2001. Effect of *Nigella sativa* (Black Seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Annals of Saudi Medicine*, 21: 242-244.
80. Kanter M. Protective effects of thymoquinone on streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *J Mol Histol*. 2009 Apr;40(2):107-15. doi: 10.1007/s10735-009-9220-7. Epub 2009 May 31.
81. Kanter M, Demir H, Karakaya C, Özbek H. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology* 11(42): 6662-6666. 2005.
82. Al-Gharably N, Badary O, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. Protective effect of thymoquinone against carbontetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Res Commun Pharmacol Toxicol*, 2: 41-50. 1997
83. Alsaif MA. Effect of thymoquinone on ethanol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *J of Med Sci*, 7(7): 1164-1170. 2007
84. Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 26(2): 87-98. 2003
85. El-Dakhkhny M, Madi NJ, Lembert N, Ammon HPT. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 161-164. 2002

86. 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*, 24(5): 1123-31.1999
87. Sholeb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol*, 22:107-13.2003.
88. Galı-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol*, 25(4): 857-66.2004
89. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Galı-Muhtasib H. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther*, 6 (2): 160-9.2007
90. Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, 67: 7782-8.2007
91. Kobak, Ö., Random Flep Modellerinde Farklı Geciktirme İşlemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması: Deneysel Çalışma, Uzmanlık tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Samsun, 2001
92. Tekin,H. Ginsengin Random Paternli Sıçan Deri Fleplerinin Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Plastik,Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Van, 2014
- 93.Goth L.A simple method for determination of serum catyalase activation and revision of reference range.*Clin. Chim. Acta*.1992.196;143-152.
94. Torun M, Yardım S, Gönenç A, Sargın H. Çeşitli kanser vakalarında serum MDA düzeyleri. *Biyokimya dergisi* 1995;20:1-7.
95. Fan Pan, Joseph Barbi, Drew M.Pardoll. A link between metabolism and T cell differentiation and a potential therapeutic target. *Oncoimmunology*. 2012 July 1;1(4): 510–515.
96. Emerick KS,Herr MA,Deschler DG.Supraclavicular flap reconstruction following total laryngectomy. *Laryngoscope*.2013 Nov 20. doi: 10.1002/lary.24530.
97. Kerem H, Akdemir O, Ates U, Uyanıkgıl Y, Demirel Sezer E, Bilkay U, Turgut M, Sozmen E, Songur E. The Effect of Melatonin on a Dorsal Skin Flap Model.*J Invest Surg*. 2013 Sep 24.
98. Hart K, Baur D, Hodam J, Lesoon-Wood L, Parham M, Keith K, Vazquez R, Ager E, Pizarro J. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats.*Laryngoscope*. 2006 Apr;116(4):522-8.
99. Sayed MD. Traditional medicine in health care. *Journal of Ethnopharmacology*. 1980; 2:19-22.
100. Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine*. 2004;11(1):56-64.

101. Selçuk CT¹, 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 Res.* 2013 Sep-Oct;34(5):e274-81.
102. Kanter M¹, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004 Jul;279(1):685-91.
103. Sankaranarayanan C, Pari L (2011) Thymoquinone ameliorates chemical induced oxidative stress and β -cell damage in experimental hyperglycemic rats. *Chem Biol Interact* 190: 148-154.
104. Woo CC, Hsu A, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone inhibits tumor growth and induces apoptosis in a breast cancer xenograft mouse model: the role of p38 MAPK and ROS. *PLoS One.* 2013 Oct 2;8(10)
105. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5510–5514
106. Vihanto MM, Plock J, Erni D, Frey BM, Frey FJ, Huynh-Do U. Hypoxia up-regulates expression of Eph receptors and ephrins in mouse skin. *FASEB J.* 2005 Oct;19(12):1689-91. *Epub* 2005 Aug 4.
107. Cury V, Moretti AI, Assis L, Bossini P, Crusca Jde S, Neto CB, Fangel R, de Souza HP, Hamblin MR, Parizotto NA. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2. *J Photochem Photobiol B.* 2013 Aug 5;125:164-70.
108. Nili-Ahmadabadi A, Tavakoli F, Hasanzadeh G, Rahimi H, Sabzevari O. Protective effect of pretreatment with thymoquinone against Aflatoxin B(1) induced liver toxicity in mice. *Daru.* 2011;19(4):282-7
109. Kayiran O, Cuzdan SS, Uysal A, Kocer U. Tadalafil significantly reduces ischemia reperfusion injury in skin island flaps. *Indian J Plast Surg.* 2013 Jan;46(1):75-81.
110. Deniz Bagdas, Betul Cam Etoz, Sevda Inan Ozturkoglu, Nilufer Cinkilic, Musa Ozgur Ozyigit, Zulfiye Gul, Naciye Isbil Buyukcoskun, Kasim Ozluk, and Mine Sibel Gurun. Effects of Systemic Chlorogenic Acid on Random-Pattern Dorsal Skin Flap Survival in Diabetic Rats *Biol. Pharm. Bull.* 37(3) 361–370 (2014)
111. Inci M, Davarci M, Inci M, Motor S, Yalcinkaya FR, Nacar E, Aydin M, Sefil NK, Zararsiz I. Anti-inflammatory and antioxidant activity of thymoquinone in a rat model of acute bacterial prostatitis. *Hum Exp Toxicol.* 2013 Apr;32(4):354-61.
112. Mansour MA, Nagi MN, El-Khatib AS, Al-Bekairi AM. Effects of thymoquinone on antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation and DT-diaphorase in different tissues of mice: a possible mechanism of action. *Cell Biochem Funct* 2002;20:143–51.
113. Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB. Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2008 Jun;6(6):1059-70.

114. Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Cancer Ther*. 2008 Jul;7(7).
115. 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).