



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF
VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**SIÇAN MCFARLANE CİLT FLEBİ MODELİNDE
CARBON MONOXİDE RELEASİNG MOLECULE-3
(CORM-3) NÜN DOKU BESLENMESİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE BU ETKİLERİN
PENTOKSİFİLİNİN ETKİLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. İhtişam Zafer CENGİZ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Erol KESİKTAŞ

ADANA-2022



**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF
VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI**

**SIÇAN MCFARLANE CİLT FLEBİ MODELİNDE
CARBON MONOXİDE RELEASİNG MOLECULE-3
(CORM-3) NÜN DOKU BESLENMESİNE OLAN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI VE BU ETKİLERİN
PENTOKSİFİLİNİN ETKİLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. İhtişam Zafer CENGİZ

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Erol KESİKTAŞ**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından
TF2011LTP16 no'lu proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2022

TEŞEKKÜR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda göreve başladığım günden itibaren güçlü bilgi ve iyi bir cerrahi donanımıyla bana doktorluk mesleğini sevdiren, plastik cerrahinin iyi bir planlama ve sabır işi olduğunu benimsettiren ve sonradan dahil olduğum bu klinikte ilk günden itibaren kendi evimde gibi hissettiren kıymetli hocam Prof. Dr. O. Metin YAVUZ'a,

Zorlu tez ve eğitim sürecimde hep yanımda olan, sorduğu sorularla sürekli araştırmaya iten, meslek etiğini bana öğreten, geldiğim ilk günden itibaren hoşgörüsüyle tüm problemlerime yanıt veren, hayatın her alanında örnek alacağım tez danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Erol KESİKTAŞ'a,

Cerrahiye farklı bakış açılarıyla ufkumu genişleten, bu bilgi ve birikimlerini bizlerle paylaşmayı düstur edinen sevgilerini hep üzerinde hissettiğim mümtaz hocalarım Doç. Dr. Eyüphan GENCEL'e ve Doç. Dr. Cengiz ESER'e,

Cerrahi eğitimimde bir hocadan ziyade abi-kardeş ilişkisiyle bana yaklaşan, yardıma ihtiyacım olan her anımda yanımda olan hocam, abim Dr. Öğretim Üyesi İbrahim TABAKAN'a ve Dr. Öğretim Üyesi Ömer KOKAÇYA'ya,

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda başlayıp sonradan dahil olduğum Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda beraber çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum, ilk geldiğim günden itibaren sevgilerini üzerimde hissettiğim kıymetli asistan çalışma arkadaşlarıma,

Plastik cerrahi serüvenine başladığım ilk günlerden itibaren geniş bilgi hakimiyeti ve cerrahi donanımıyla bana örnek olan, bana cerrahinin temellerini attıran, her ameliyatta varlığıyla bize güç veren, asistanlık sürecimin sonlarına kadar yaptığım her ameliyatta ondan esintileri hissettiğim, iyi niyeti ve hoşgörüsüyle yaklaşan kıymetli hocam Prof. Dr. Önder TAN'a,

Asistanlık sürecimde yüzümüzü güldürerek, huzurlu, disiplinli çalışma ortamı sağlayan, cerrahi anlamda farklı nosyonlar kazandıran, asistanlarını ailelerinden biri olarak gören Erzurum'u ve plastik cerrahiye bize sevdiren hocalarım, abilerim Doç. Dr.

Ensar Zafer BARIN'a, Doç. Dr. Hakan ÇİNAL'a, Dr. Öğretim Üyesi Abdülkerim OLGUN'a, Dr. Öğretim Üyesi Murat KARA'ya,

Atatürk Üniversitesinde beraber çalışmaktan onur duyduğum, gecesinde gündüzünde ya hastanede ya da sivil hayatta beraber olduğum, bildikleri her şeyi bana keyifle öğreten, her işimde her zor anımda benimle o taşın altına ellerini sokan, kıdemlimden ziyade bana kardeş olan sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Kerem YILMAZ'a ve Dr. Harun KARADUMAN'a,

İleri hayatlarında mutlaka başarılı olacaklarına inandığım, kliniğimizi güzelleştiren, saygı ve sevgilerini hep üzerimde hissettiren Atatürk Üniversitesi Plastik Cerrahisinin sevgili asistan arkadaşlarıma,

Tüm eğitim öğretim hayatım boyunca bana desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, hiçbir başarının tesadüf olmadığı düsturuyla beni büyüten tüm övgülerin yetersiz kaldığı kıymetli babam C. Celalettin CENGİZ'e ve kıymetli annem Birsal CENGİZ'e

Benim plastik cerrahi seçmemde büyük etkisi olan iyi bir doktor, iyi bir cerrah olarak yetişmemde katkısı olan, hayatın birçok alanında örnek aldığım abim Dr. A.Fatih CENGİZ'e, aynı mesleği paylaşmaktan gurur duyduğum, her daim yüzümüzü güldüren değerli kardeşim Dr. C. Cihangir CENGİZ'e

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecinde yaşadığımız her zorluğu beraber göğüslediğimiz, varlığıyla bana güç veren, sevgisini ve desteğini bana her anımda gösteren sevgili eşim, yoldaşım Dr. Dilşah Gizem CENGİZ'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	III
TABLolar DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
KISALTMALAR.....	IX
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XII
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Tanım	3
2.2.Tarihçe.....	3
2.3.Derinin Kan Dolaşımı	6
2.4.Fleplerin Sınıflandırılması	7
2.4.1.Kutanöz Flepler	8
2.4.1.1. Cormack & Lamberty Sınıflaması.....	10
2.4.1.2. Mathes & Nahai Sınıflaması.....	11
2.4.1.3. Nakajima Sınıflaması.....	12
2.4.2.Kas Flepleri	12
2.4.2.1. Mathes & Nahai Sınıflaması.....	12
2.4.2.2. Taylor Sınıflaması.....	13
2.4.3.Kemik Flepleri.....	13
2.4.3.1. Serafin Sınıflaması.....	14
2.4.4.Kombine Flepler	14
2.5. Flep Fizyolojisi ve Patofizyolojisi	14
2.5.1-Sistemik Regülasyon.....	15
2.5.1.1. Nöral Regülasyon	15
2.5.1.2. Hormonal Regülasyon	15
2.5.2. Lokal Regülasyon.....	15
2.5.3. Anjiyogenezis	17

2.5.3.1. VEGF Ailesi	19
2.5.3.2. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1 (HIF-1).....	20
2.5.3.3. Anjiyopoietinler	20
2.6. Flep Elevasyonu Sonrasında Ortaya Çıkan Anatomik, Hemodinamik ve Metabolik Değişimler.....	21
2.6.1.Hemodinamik Değişiklikler	21
2.6.2.Anatomik Değişiklikler	22
2.6.3.Metabolik Değişiklikler.....	22
2.7. Flep Nekrozu.....	24
2.8. Flep Sağ Kalımını Arttırıcı Yöntemler	25
2.8.1.Cerrahi Teknikler.....	25
2.8.2. Fiziksel Uygulamalar.....	26
2.8.3. Hiperbarik Oksijen Tedavisi.....	26
2.9. Flep Sağ Kalımını Arttırıcı Ajanlar.....	26
2.9.1. Antikoagülanlar ve Antitrombositer İlaçlar.....	27
2.9.2. Steroidler ve Serbest Radikal Temizleyicileri	27
2.9.3 Antiadrenerjik İlaçlar ve Sempatik Reseptör Blokörleri	28
2.9.4. Doğrudan Düz Kaslara Etki Ederek Damar Genişleten İlaçlar	28
2.9.5. Kanın Reolojik Özelliğini Değiştiren Ajanlar	28
2.10. Çalışmamızda Kullanılan Medikal Ajanlar.....	29
2.10.1.Karbon Monoksit Releasing Molekül-3 (CORM-3)	29
2.10.2. Pentoksifilin.....	31
2.11. Sıçan Sırt Derisinin Kanlanması ve Çalışmada Kullanılan Flep Modeli.....	33
2.12. İndosiyanin Yeşili Anjiyografisi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Çalışma Grupları	36
3.2.Deneyde Kullanılan Malzemeler ve İlaçlar.....	37
3.3. Deneyde Uygulanacak Medikal Ajanların Hazırlanması.....	38
3.4. Cerrahi Teknik ve CORM-3 ve Pentoksifilin'in Enjeksiyonu	40
3.5. Deneyin Sonlandırılması ve Bulguların Toplanması	41
3.5.1. ImageJ Programı Yardımı ile Nekroz Yüzdesinin Hesaplanması	42
3.5.2. İndosiyanin Yeşili Anjiyografisi	42

3.5.3. Histopatolojik Örneklerin Toplanması ve Değerlendirilmesi	44
3.5.3.1. Işık Mikroskopik Yöntemler	44
3.5.3.2. İmmünohistokimyasal Yöntemler	45
3.5.3.2.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi	46
3.5.3.3. Elektron Mikroskopik Yöntemler	46
3.6. İstatistiksel Metod	48
4. BULGULAR	49
4.1. Nekroz Oranları	49
4.2. Işık Mikroskopisi Bulguları	52
4.2.1. Kontrol Grubu	52
4.2.2. Deney Kontrol Grubu	53
4.2.3. CORM-3 Grubu	54
4.2.4. Pentoksifilin Grubu	55
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	56
4.3.1. Kontrol Grubu	57
4.3.2. Deney Kontrol Grubu	58
4.3.3. CORM-3 Grubu	59
4.3.4. Pentoksifilin Grubu	60
4.4. Elektron Mikroskopisi Bulguları	61
4.4.1. Kontrol Grubu	61
4.4.2. Deney Kontrol Grubu	62
4.4.3. CORM-3 Grubu	63
4.4.4. Pentoksifilin Grubu	64
4.5. İndosiyanın Yeşili Uygulaması ile Floresan Anjiyografi Bulguları	65
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR	86

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Fleplerin Sınıflaması	8
Tablo 2. Hipoksi ile indüklenen Pro- ve Anti-Anjiogenik Faktörler	18
Tablo 3. Işık mikroskopik doku takip işlemi	44
Tablo 4. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon işlemi	46
Tablo 5. Elektron mikroskopik doku takibinde şeffaflandırma işlemi	47
Tablo 6. Gömme materyalinin hazırlanışı	47
Tablo 7. Deney Kontrol Grubunun Nekroz Bulguları	50
Tablo 8. CORM-3 Grubunun Nekroz Bulguları	50
Tablo 9. Pentoksifilin Grubunun Nekroz Bulguları	50
Tablo 10. Gruplara göre nekroz alanı ve nekroz oranı	51
Tablo 11. Gruplara göre nekroz alanı ve nekroz oranı karşılaştırılması	52
Tablo 12. Dermiste VEGF immunreaktivitesinin semikantitatif değerlendirmesi	61
Tablo 13. Kontrol Grubunun Flep Perfüzyon Haritalamasının Yüzdelik Cinsinden Verileri	67
Tablo 14. Deney Kontrol Grubunun Flep Perfüzyon Haritalamasının Yüzdelik Cinsinden Verileri	67
Tablo 15. CORM-3 Grubunun Flep Perfüzyon Haritalamasının Yüzdelik Cinsinden Verileri	68
Tablo 16. Pentoksifilin Grubunun Flep Perfüzyon Haritalamasının Yüzdelik Cinsinden Verileri	68
Tablo 17. Gruplara göre flep anjiyografik perfüzyon değerleri	69
Tablo 18. Gruplara göre flep anjiyografik perfüzyon değerlerinin karşılaştırılması	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Çağlara Göre Plastik Cerrahini Evrimi	5
Şekil 2. Derinin beslenmesinde arteryel yapılar	7
Şekil 3. Tek pediküllü ilerletme flebi.....	8
Şekil 4. V-Y ilerletme flebi	9
Şekil 5. Limberg flep.....	9
Şekil 6. Dufourmental flep	9
Şekil 7. Z plasti	9
Şekil 8. Bilobe flep.....	10
Şekil 9. Rotasyon flebi	10
Şekil 10. Fasyokutanöz fleplerde Cormack & Lamberty Sınıflaması	11
Şekil 11. Mathes & Nahai Sınıflaması.....	11
Şekil 12. Nakajima Sınıflaması	12
Şekil 13. Mathes & Nahai Sınıflaması.....	13
Şekil 14. Hücre hasarında başlıca biyokimyasal mekanizmalar ve hasar bölgeleri.....	24
Şekil 15. HO yolağı veya CORM tarafından üretilen CO' nun metabolizması.....	30
Şekil 16. CORM-3' ün kimyasal yapısı	31
Şekil 17. Pentoksifilin molekülünün kimyasal formülasyonu	32
Şekil 18. Sıçan dorsal cildinin kanlanması.....	34
Şekil 19. Carbon Monoxide Releasing Molecule-3 (TOCRIS CORM-3)	39
Şekil 20. Pentoksifilin (Trentilin® Ampul 100 mg/5 ml)	39
Şekil 21. Ksilazin hidroklorür (Xylazinbio®, Bioveta), Ketamin hidroklorür (Ketasol®, Richter Pharma ag)	40
Şekil 22. Anestezi altında hazırlanmış rat (A), traş edilmiş rat (B), 3x9 cm tasarlanmış flep çizimi (C), flep cilt insizyonu (D), eleve edilmiş Mcfarlane flebi (E), aynı bölgesine suture edilmiş flep (F).....	41
Şekil 23. ImageJ Programı Yardımı ile Nekroz Alanının Hesaplanması.....	42
Şekil 24. İndosiyanın yeşili (DID Indocyanine Green [Dongindang, Inc., Gyeonggi-do, Republic of Korea])	43
Şekil 25. SPY (Novadaq Technologies Inc, Richmond, British Columbia, Kanada) ile postoperatif ölçümlerin yapılması.....	43
Şekil 26. ImageJ programı yardımıyla nekroz sahasının işaretlenmesi ve nekroz alanının hesaplanması	49
Şekil 27. Gruplara göre nekroz alanı ve nekroz oranı.....	51
Şekil 28. Kontrol grubu ışık mikroskopik görünümü.....	53
Şekil 29. Deney kontrol grubu ışık mikroskopik görünümü	54
Şekil 30. Corm3 uygulanan grubun ışık mikroskopik görünümü	55
Şekil 31. Pentoksifilin uygulanan grubun ışık mikroskopik görünümü.....	56
Şekil 32. VEGF immunoreaktivitesi.....	57
Şekil 33. Kontrol grubunda VEGF immunoreaktivitesi.....	58
Şekil 34. Deney kontrol grubunda VEGF immunoreaktivitesi.....	59
Şekil 35. Corm3 uygulanan grupta VEGF immunoreaktivitesi.....	60
Şekil 36. Pentoksifilin uygulanan grupta VEGF immunoreaktivitesi	61
Şekil 37. Kontrol grubuna ait deneklerden alınan deri örneklerinin elektron mikroskopik görünümü.	62
Şekil 38. Deney kontrol grubuna ait deneklerden alınan deri örneklerinin elektron mikroskopik görünümü.	63
Şekil 39. CORM-3 grubuna ait deri kesitlerinin elektron mikroskopik görünümü.	64
Şekil 40. Pentoksifilin grubuna ait deri kesitlerinin elektron mikroskopik görünümü	65

Şekil 41. Kontrol grubundaki bir sıçanın perfüzyon haritalanması.....	66
Şekil 42. Deney kontrol grubundaki bir sıçanın perfüzyon haritalanması.....	66
Şekil 43. CORM-3 grubundaki bir sıçanın perfüzyon haritalanması	66
Şekil 44. Pentoksifilin grubundaki bir sıçanın perfüzyon haritalanması.....	67
Şekil 45. Gruplara göre flep proksimal, flep orta ve flep distal bölgelerinin anjiyografik perfüzyon değerleri	69



KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
Ang	: Angiopoetin
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT	: Katalaz
cGMP	: Siklik Guanosin monofosfat
CO	: Karbon Monoksit
CORM-3	: Carbon Monoxide Releasing Molecule-3
EC	: Endotelyal Hücre
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
Gr	: Gram
GSH-PX	: Glutasyon Peroksidaz
GTP	: Guanosin Trifosfat
HIF-1α	: Hypoksi ile İndüklenebilir Faktör-1 α
HO-1	: Hemoksijenaz-1
I/R	: İskemi-Reperfüzyon
ICG	: İndosiyanin Yeşili
IL	: Interlokin
i.p.	: İntraperitoneal
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
Iv	: İntravenöz
K⁺	: Potasyum
Kg	: Kilogram
L	: Litre
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Na⁺	: Sodyum
NO	: Nitrik Oksit
°C	: Santigrad
PDGF-β	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü- β
PGF-2α	: Prostaglandin -2 α
PGI₂	: Prostasiklin
ph	: Power of hydrogen
PTX	: Pentoksifilin
SOD	: SüperOksit Dismutaz
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör - α
TxA₂	: Tromboksan A ₂
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
μM	: Mikromolar

ÖZET

Sıçan Mcfarlane Cilt Flebi Modelinde Carbon Monoxide Releasing Molecule-3 (Corm-3)'ün Doku Beslenmesine Olan Etkilerinin Araştırılması ve Bu Etkilerin Pentoksifilin Etkileri İle Karşılaştırılması

Giriş ve Amaç: İskemi, bir dokudaki kan akışının zayıflaması veya tamamen kesilmesi sonucu dokunun başta oksijen olmak üzere hayati önem taşıyan moleküllere erişiminin engellenmesine bağlı olarak gelişen doku hasarına verilen isimdir. Flep elevasyonu sonrası azalan kan akışı, flep distal bölümlerinde iskemiye sebebiyet vermektedir. Bu iskeminin devam etmesi de flep nekrozuna neden olarak ameliyat başarı oranlarını azaltmaktadır. Mevcut doku defektinin onarımı için bazı hastalarda kısıtlı olan flep seçeneklerinin istenmeyen bu nedenlerden ötürü nekrozla sonuçlanması araştırmacıları bu konu üzerine daha fazla çalışmaya sevk etmiştir. Deneysel ve klinik olarak birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen pek az ajan klinik kullanıma girmiştir. Pentoksifilin, bu çalışmalarda başarılı bulunmuş ve rutin klinik kullanıma girmiştir. Carbon monoxide releasing molecule-3 (CORM-3) kalp, karaciğer beyin ve böbrek hücreleri üzerinde iskemi reperfüzyon üzerine çalışmaların yapıldığı bilinmekle beraber deri perfüzyonu üzerine çalışma bulunmamaktadır. CORM-3 ün antiinflamatuvar, antiapoptotik, antiproliferatif, antioksidan ve vazodilatör özellikleri nedeni ile deri fleplerinde iskeminin azaltılabileceği düşünülmüştür. Çalışmadaki amacımız CORM-3 ün deri flep viabilitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması ve bu etkilerin daha önce flep beslenmesi üzerine olumlu etkilerinin bulunduğu pentoksifilin ile kıyaslanmasıdır.

Gereç ve yöntem: Yaşları 4-6 ay arasında olan, başlangıç ağırlıkları 250-350 g arasında değişen 32 adet Wistar-Albino türü erkek sıçan, 4 farklı gruba ayrıldı. Grup 1, kontrol grubu olup hiçbir uygulama yapılmamıştır (n=8). Grup 2, 3 ve 4'teki sıçanların sırt bölgesinde 3x9 cm'lik random patern Mcfarlane cilt flebi eleve edilerek tekrar mevcut yerine sütüre edilmiştir. Grup 2, deney kontrol grubu olduğu için flep elevasyonu sonrası herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmamıştır (n=8). Grup 3, postoperatif 0.1.2.3.4.5. günlerde 8 mg/kg dozlarda intraperitoneal CORM-3 uygulanmıştır. Grup 4 için de aynı gün ve şartlarda 40 mg/kg pentoksifilin (PTX) uygulaması yapılmıştır. 6. günde ratlar anestezi altında kuyruk veninden indosiyenin yeşili (ICG) uygulaması sonrası SPY cihazı ile Mcfarlane flebi perfüzyonu görüntülenmiş ve haritalanmıştır. Değerlendirme sonrası sıçanlardan doku örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler ışık mikroskobu ve elektron mikroskobunda incelenmiş ve Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ekspresyonu değerlendirilmiştir.

Bulgular: Flep nekroz yüzdeleri deney kontrol grubunda ortalama 35.02±4,13, CORM-3 grubunda 18,51±2,83 ve PTX grubunda 19.90±2,50 olarak bulunmuştur. Deney kontrol grubuna göre anjiyografik ve nekroz oranları CORM-3 ve PTX grubuyla kıyaslandığında anlamlı fark olduğu görülmüştür (p<0.05). Ancak CORM-3 ve PTX grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Histopatolojik incelemede CORM-3'ün diğer gruplara kıyasla epidermis ve derminin rejenerasyonunu daha olumlu yönde etkilediği görülmektedir. CORM-3 grubunda VEGF artışı 5+ boyanırken, PTX grubunda 3+, deney kontrol grubunda 2+, kontrol grubunda ise 1+ boyanmıştır. Elektron mikroskopisi ile incelemede organel harabiyeti açısından CORM-3 grubunun

kontrol grubuna benzerlik gösterdiği görüldü. Hücre çekirdekleri değerlendirildiğinde diğer gruplarda inaktif olarak değerlendirilen heterokromatin nükleuslar görülürken, CORM-3 grubunda aktif ökromatin nükleuslar görülmüştür.

Sonuç: PTX ve CORM-3'ün flep beslenmesine üzerine olumlu etkileri gözlemlenmişken, bu iki ajan arasında anlamlı fark görülmemiştir. VEGF miktarının CORM-3 grubunda aşırı ekspresyonu olmasına karşın bu durum nekroz oranlarına yansımamıştır. Antiinflamatuvar, antioksidan ve vazodilatör özelliği olan CORM-3, flep sağkalımını artırmak üzere tercih edilebilir.

Anahtar sözcükler: CORM-3, flep beslenmesi, Mcfarlane flebi, pentoksifilin, VEGF



ABSTRACT

Investigation of the Effects of Carbon Monoxide Releasing Molecule-3 (Corm-3) on Tissue Nutrition in the Rat Mcfarlane Skin Flap Model and Comparison of These Effects with the Effects of Pentoxifylline

Introduction and Objective: Ischemia is defined as the reduction or cessation of blood flow to a tissue. Decreased blood flow after flap elevation causes ischemia in the distal parts of the flap. The continuation of this ischemia causes flap necrosis and reduces the success rates of the surgery. The fact that the limited flap options in some patients for the repair of the existing tissue defect resulted in necrosis due to these undesirable reasons prompted the researchers to study more on this subject. Although many experimental and clinical studies have been conducted, few agents have entered clinical use. Pentoxifylline was found to be successful in these studies and entered into routine clinical use. Although it is known that there are studies on ischemia and reperfusion on CORM-3 heart, liver, brain and kidney cells, there are not enough studies on skin perfusion. It is thought that CORM-3 may reduce ischemia in skin flaps due to its anti-inflammatory, anti-apoptotic, antiproliferative, antioxidant and vasodilator properties. Our aim in the study is to investigate the effects of CORM-3 on skin flap viability and to compare these effects with pentoxifylline, which has proven effectiveness.

Material and Methods: Thirty-two male Wistar-Albino rats, aged between 4-6 months and weighing 250-350 g, were divided into 4 different groups. Group 1 was the control group and no application was made (n=8). 3x9 cm random pattern Mcfarlane skin flap on the dorsal region of the rats in Groups 2, 3 and 4 was elevated and sutured back to its current location. Since group 2 was the experimental control group, no drug injection was performed after flap elevation (n=8). Rats in Group 3, postoperative 0.1.2.3.4.5. On days, 8 mg/kg doses of CORM-3 were administered intraperitoneally. For Group 4, 40 mg/kg pentoxifylline was administered on the same day and under the same conditions. On the 6th day, after the application of indocyanine green (ICG) from the tail vein of the rats under anesthesia, Mcfarlane flap perfusion was visualized and mapped with the SPY device. Tissue samples were taken from rats after evaluation. Samples taken were examined under light microscope and electron microscope, and expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) was evaluated.

Results: The percentage of flap necrosis was found to be 35.02 ± 4.13 in the experimental control group, 18.51 ± 2.83 in the CORM-3 group and 19.90 ± 2.50 in the PTX group. When the angiographic and necrosis rates of the experimental control group were compared with the CORM-3 and PTX groups, there was a significant difference ($p < 0.05$). However, no significant difference was found between the CORM-3 and PTX groups. In the histopathological examination, it is seen that CORM-3 has a more positive effect on the regeneration of the epidermis and dermis compared to other groups. While VEGF increase was stained 5+ in the CORM-3 group, it was 3+ in the PTX group, 2+ in the experimental control group, and 1+ in the control group. In the examination by electron microscopy, it was observed that the CORM-3 group was similar to the control group in terms of organelle destruction. When cell nuclei were

evaluated, heterochromatin nuclei, which were considered inactive in other groups, were observed, while active euchromatin nuclei were observed in the CORM-3 group.

Conclusion: While positive effects of PTX and CORM-3 on flap nutrition were observed, no significant difference was observed between these two agents. Although the amount of VEGF was overexpressed in the CORM-3 group, this was not reflected in the necrosis rates. CORM-3, which has anti-inflammatory, antioxidant and vasodilator properties, can be preferred to increase flap survival.

Key words: CORM-3, flap nutrition, Mcfarlane flap, pentoxifylline, VEGF



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Doku defektleri travma sonrası, doğumsal ya da tümör eksizyonları sonrası oluşan mortalite ve ciddi morbiditeye sebebiyet verebilecek tıbbi bir sorundur. Rekonstrüktif cerrahinin temel prensibi doku defektinin onarımı ve normal fonksiyonel durumu geri kazanmaktır. Bu amaçla birçok yöntem olmakla birlikte en etkili ve kabul gören yöntem flep cerrahisidir. Flep, doku eksikliklerinin onarımı için vücudun belirli bölgelerinden hazırlanan, sahip olduğu damar anatomisi temelinde hareket eden içerik olarak; deri, derialtı, fasya, kas, kemik ya da bu dokuların bir kısmını veya hepsini bir arada içerebilen doku parçasıdır. Bir doku eksikliğinin onarımında onarılan dokunun onu etkileyen uzuvların fonksiyonunun geri kazanılması, donör alanda morbidite yaratılmaması ve estetik görünümün korunması temel amaçlar olmalıdır.

Flep cerrahisi sonrası başka alanlara aktarılan dokuların kan akımının azalması sonrası beslenme yetersizliğine girmekte ve flebin sağ kalımına olumsuz etkiler oluşturabilmektedir. Bu beslenme yetersizliği iskemi olarak isimlendirilmektedir.

Flep fizyolojisinin yapılan çalışmalar ile daha net ortaya konulması, anatomik ve klinik çalışmalar ile flep damarsal yapılarının daha iyi analiz edilmesi, mikrocerrahi alet ve cihazlardaki teknolojik gelişmeler karmaşık doku defektlerinde flep cerrahisinin kullanımındaki beceri ve başarı oranlarını önemli seviyede arttırmıştır.

Flep cerrahisini sık gerçekleştiren kliniklerde cerrahinin başarısı yüksek olsa da parsiyel ya da total flep kaybı halen önemli morbidite olarak karşımıza çıkmaktadır. Cerrahların saatlerini verdiği ve ciddi emek harcadığı operasyonlarda meydana gelebilecek flep kaybı hem hasta hem de cerrahi ekip açısından istenmeyen durumlardır. Mevcut flep kayıplarının önlenmek maksadıyla klinik ve deneysel birçok çalışma mevcuttur. Her geçen gün bu kazanımlara yeni çalışmalarla yeni bilgiler literatüre eklenmektedir. Bu amaçla birçok farklı ajan, metod denenmiştir ve elbette ki denenmeye devam edecektir.

Deneysel çalışmaların sonucunda önemli sayıda ajanın flep cerrahisini pozitif etkilediği görülmüştür fakat bu ajanlardan çok azı deneysel süreçten ileri gitmiştir. Klinik denemesi mevcut olan maddelerin de sadece az bir kısmı rutin klinik kullanıma girmiştir.

Vazodilatör ajanlar operasyon esnasındaki vazospazmın tedavisi amacıyla uzun yıllardır klinikte kullanılmaktadır.¹ Pek çok makalenin incelendiği bir çalışmada, en yaygın kullanılan moleküller sırasıyla kalsiyum kanal blokörleri (verapamil ve nifedipin), lidokain ve papaverin olarak raporlanmıştır.² yine aynı zamanda en sık kullanılan vazodilatör ajanlardan biri olan pentoksifilin'in etkinliği cilt fleplerinin sağ kalımında %50 ye varan artış sağlamış ve rutin klinik kullanıma girmiştir.³

Özellikle kalp kasında iskemik dokuların hasarının azaltılması üzerine çalışmalara konu olan carbon-monoxide releasing molecule-3 (CORM-3)'ün son dönemlerde önemi artmaktadır ve başarılı sonuçlar alınmıştır.⁴ CORM'lerin kullanımı, CO' nun vazodilatör, anti-inflamatuar ve anti-iskemik etkilerini daha da destekleyerek, bu gazın terapötik potansiyelleri için umut verici perspektifler açmıştır.⁵

Bu çalışmadaki amacımız random paternli dorsal McFarlane cilt flebi modelinde literatürde kendine yeni yer kazanan carbon monoxide releasing molecule-3'ün flep viablitesine olan etkilerini araştırmaktır. Bunun yanında etkinliği klinik kullanıma girmiş, uzun yıllardır kullanılan, sistemik ekileri ve yan etkileri de iyi bilinen ve maddi olarak da uygun olan pentoksifilin'in paranteral uygulama ile flep sağ kalımı üzerine bilinen olumlu etkilerini karşılaştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tanım

Flep, doku defektlerinin onarımı veya fonksiyon kaybının düzeltilmesi amaçlı vücudun belli bölgelerinden alınan, kendi vasküler beslenmesi olan doku parçasıdır. Flepler basitçe deri ve deri altı dokular ile deri, kas, kemik, yağ ya da fasyanın herhangi bir kombinasyonunu içeren kompozit dokulara kadar değişkenlik gösterir.⁶

2.2.Tarihçe

Plastik cerrahinin evrimi ve temeli antik çağda başlayıp günümüze kadar geniş bir yelpazede devam etmektedir (Şekil 1). Erken Hint ve Yunan kültürleri, plastik cerrahiye iletirmek için muazzam bir potansiyel gösterdi. Hindistan’da cerrahinin babası olarak bilinen Susruta (~ 1000-800 MÖ) ‘de burun için rejonel pediküllü flep tarif etti. Roma döneminde Celsus (25 MS) ve Oribasius (325-403 MS) dudaklar, burun, kulaklar ve alın için random pediküllü flepleri ve lokal cilt fleplerini kullandı.⁷

Mondino de Liuzzi (1270-1326 MS) renkli sıvıları kan damarlarına enjekte eden ilk anatomistti. Bu yöntem özellikle cilt fleplerinin dolaşımını incelemeyi mümkün kıldı. Araştırmacılar 19. ve 20. yüzyıllarda rekonstrüktif cerrahi için eleve edilmiş fleplerin vasküler beslemesini tanımlamak için bu tekniğin varyantlarını kullandılar. 1400’lerde Avrupalı cerrahlar eski Hindistan’ın flep tekniklerini yeniden keşfettiler. İtalya’dan Gustavo Branca, burun için Susruta’nın bölgesel alın flebi tekniğini kullanmaya başladı.⁷

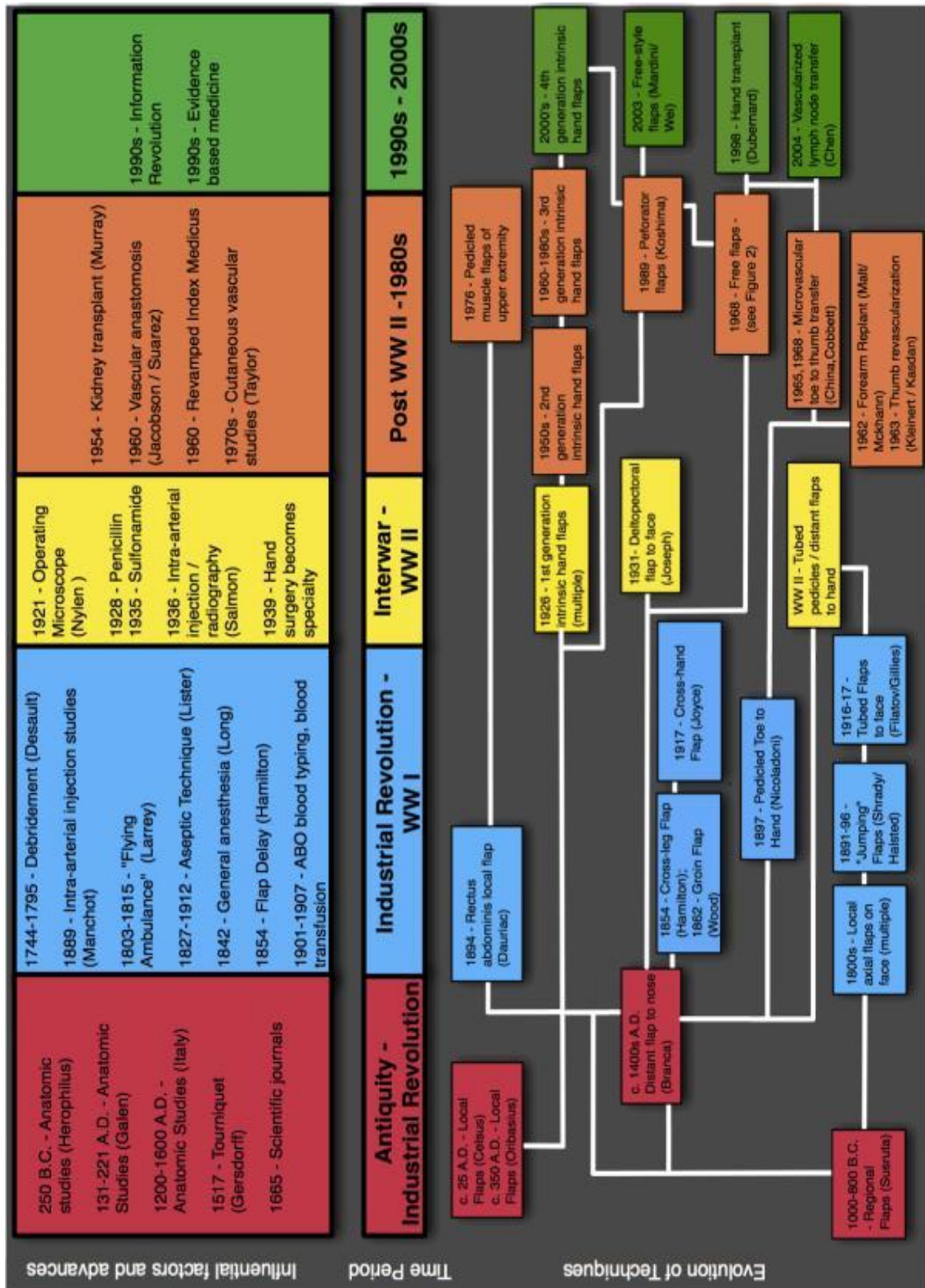
Orta çağ döneminde plastik cerrahi evrimi sekteye uğrasa da 20. Yüzyılda Dünya Savaşları sırasında geliştirilen en kullanışlı plastik prosedür 1916’da Filatov tarafından bağımsız olarak rapor edilen tüplü fleplerdir.⁸

McGregor ve Morgan 1950-1975 yılları arasında random ve aksiyel fleplerden söz etmiş, tam olarak açıklayamamaları da aralarında bazı farklılıklar olduğunu ifade etmişlerdir. İlerleyen yıllarda McGregor 1963’de temporal flebi, Bakanjiman ise

1965’de deltopektoral flebi tanımlamıştır. Ger 1977’de kas fleplerini, Ponten 1981’de fasyokutan flepleri tanımlamıştır.⁹

Mikrocerrahinin gelişimi ise klinikte ilk uygulaması 1964’te ampute olmuş bir kolun replantasyonu ile başlamıştır.¹⁰ Oshio Nakayama ve arkadaşları daha sonra 1964’te bağırsak bölümlerinin baş ve boyun bölgesine ilk serbest flep transferini tamamladılar. Çin’deki cerrahlar 1965’te mikrocerrahi yöntemle ayak parmağının başparmağa transferi ile ekstremiteye ilk serbest flebini gerçekleştirdiler ancak çalışmaları o zamanın ülkenin dışı kapalı olması nedeniyle bilinmiyordu. Büyük ölçülerdeki dokunun serbest mikrovasküler transferi, 1971’de Mclean ve Buncke ile gerçekleştirildi. Kısa bir süre sonra Daniel ve Taylor bir kasık flebinin ayağa serbest transferi ile ilk resmi mikrovasküler ekstremita rekonstrüksiyonunu gerçekleştirdi. Harii ve arkadaşları daha sonra 1973’te ele kasık flebi ile üst ekstremitede ilk mikrovasküler fasiokutanöz transferi gerçekleştirdiler.⁷

Yakın tarihlerde ise Mathes ve Nahai 1981’de kas fleplerini damarsal beslenme yapılarına göre sınıflandırmıştır.⁹ Yine aynı dönemde Cormack ve Lamberty fasyokutan fleplerin anatomik olarak sınıflandırmasını yapmıştır.¹¹ Daha sonra Taylor 1987’de anjiozomları tanımlayarak flep evrimine büyük katkı sağlamıştır.¹²



Şekil 1. Çağlara Göre Plastik Cerrahini Evrimi⁷

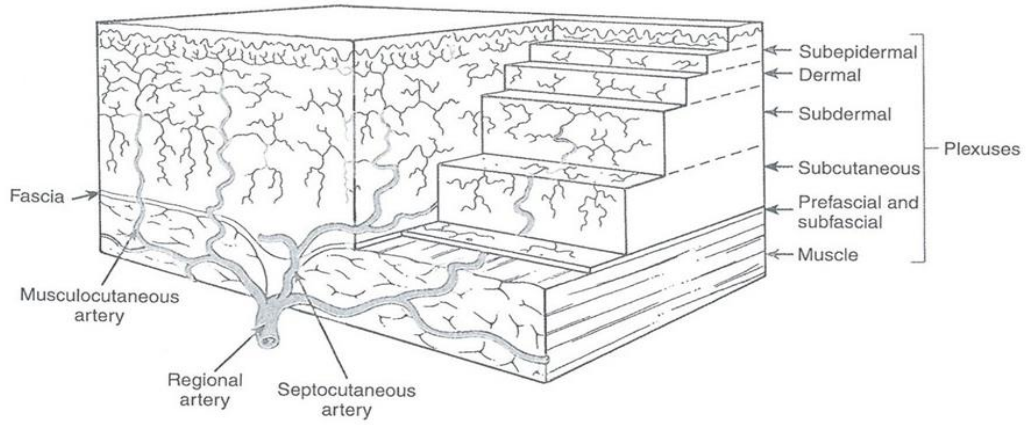
Yakın tarihlerde ise Mathes ve Nahai 1981’de kas fleplerini damarsal beslenme yapılarına göre sınıflandırmıştır.⁹ Yine aynı dönemde Cormack ve Lamberty fasyokutan fleplerin anatomik olarak sınıflandırmasını yapmıştır.¹¹ Daha sonra Taylor 1987’de anjiyozomları tanımlayarak flep evrimine büyük katkı sağlamıştır.¹²

2.3.Derinin Kan Dolaşımı

Doku eksikliğinin rekonstrüksiyonun fleplerle başarılı olabilmesi için anatomik bilgiler ışığında planlama yapılması gereklidir. Flep planlaması ve dizaynının doğru yapılabilmesi için de deri anatomisinin ve fizyolojisinin çok iyi bilinmesi gerekir. Flepler makro ve mikro olmak üzere iki ana sistem üzerinden beslenmektedir. Bu her iki sistemi de etkileyen durumlar flep cerrahisinin başarısını etkileyecek husustur.

Derinin arteriyel dolaşımı esas olarak aorttan çıkan segmental damarlar aracılığıyla olmaktadır.

Taylor ve Palmer derinin kan dolaşımı ile ilgili anjiyozom ve fasyokutanöz pleksustan söz etmişlerdir. Taylor, kan dolaşımı bir tek deride değil, aynı anda bütün doku tabakalarında da sürekli üç boyutlu bir damar pleksusu içerdiğini göstermiştir (Şekil 2). Deri ve alt tabaka dokulardaki bir kaynak arterin anatomik bölgesi çoğu durumda anjiyozom denilen yapıyı doğurur. Arterler, bağ dokularını takip eder. Derinin kanlanmasını sağlayan yapılar kalibre, uzunluk ve yoğunluğa göre farklılıklar gösteren direkt kutanöz arterlerdir. Bu ana arteriyel yapılar aynı zamanda birçok indirekt damarlarla desteklenir. Daha kapsamlı anatomik çalışmalar insanda 374 adet perforatör olduğunu göstermiştir.¹²



Şekil 2. Derinin beslenmesinde arteriyel yapılar¹³

Deri kanlanması; deri, deri altı yağ doku ve fasya olmak üzere üç anatomik seviyede; subepidermal, dermal, subdermal, subkutan ve fasyal olarak 5 damar pleksusundan meydana gelir.

Derinin mikro dolaşımı, çapı 300 mikrondan küçük olan arteriol seviyesinde başlar. Doğrudan kutanöz, fasyokutanöz ve muskulokutanöz damar pleksusunun son dallarından köken alan arterioller, damar çapının 30 mikrondan daha küçük olmasıyla terminal arterioller meydana getirir. Bu arterioller 10 ile 30 mikron arasında çapa sahip, subdermal pleksusu oluşturan damarsal yapılardır. Terminal arterioller seviyesinde, innervasyona açık düz kaslardan oluşan prekapiller sfinkterler mevcuttur. Bu yapılar kan dolaşımında son kontrol noktasıdır. En uç noktada 3 ile 7 mikron arası çaplara sahip kapillerler bulunur. Kapillerlerin devamında, 8 ile 30 mikron arası çapa sahip postkapiller venüller başlar. Böylece kan, arteriyel sistemden venöz sisteme geçmiş olur. Postkapiller venüller çapı 50 mikrona kadar olan toplayıcı venüllerle devam eder. Toplayıcı venüller seviyesinde damar duvarında perisitler ve düz kas hücreleri bulunur.¹⁴

2.4.Fleplerin Sınıflandırılması

Flep sınıflandırılmasında birçok farklı kriter (vasküler kaynak, lokasyon, transfer yöntemi, içerik vs.) göz önüne alınarak, birçok farklı şekilde sınıflandırılma yapılmıştır (Tablo 1).

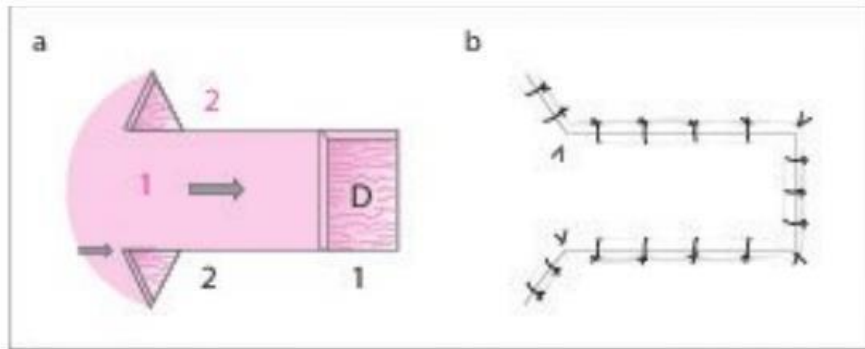
Tablo 1. Fleplerin Sınıflaması

<u>Transfer tekniğine göre flepler</u>	<u>Doku içeriğine göre flepler</u>	<u>Beslenme tipine göre flepler</u>
• Lokal flepler • İlerletme flepleri • Rotasyon ve transpozisyon flepleri • İnterpolasyon flepleri • Pediküllü flepler • Subkutanöz flepler • Uzak flepler • Tüp flepler • Mikrovasküler flepler	• Kutanöz flepler • Fasyokutanöz flepler • Myokutanöz flepler • Kas flebi + deri greftlemesi • Osteokutanöz flepler • Sensorial flepler	• Muskulokutanöz arterden beslenen flepler • Random kutanöz flepler • Myokutanöz flepler • Septokutanöz flepler • Fasyokutanöz flepler • Aksiyel arteryel flepler

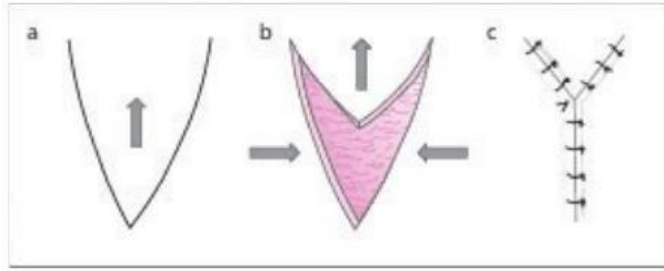
2.4.1.Kutanöz Flepler

Kutanöz fleplerinin sınıflandırılması adına birçok çalışma yapılmıştır. Bunlara örnek olarak bazı flepler tanımlanmıştır:

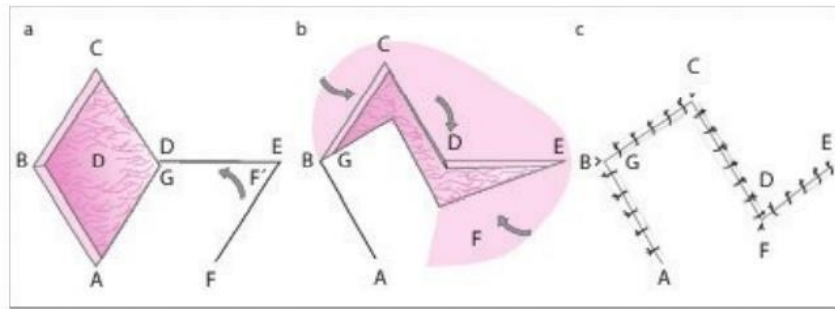
- Tek pediküllü ilerletme flepleri (Şekil 3)
- V-Y ilerletme flepleri (Şekil 4)
- Limberg flebi (Şekil 5)
- Dufourmental flep (Şekil 6)
- Z plasti (Şekil 7)
- Bilobe flep (Şekil 8)
- Rotasyon flepleri (Şekil 9)



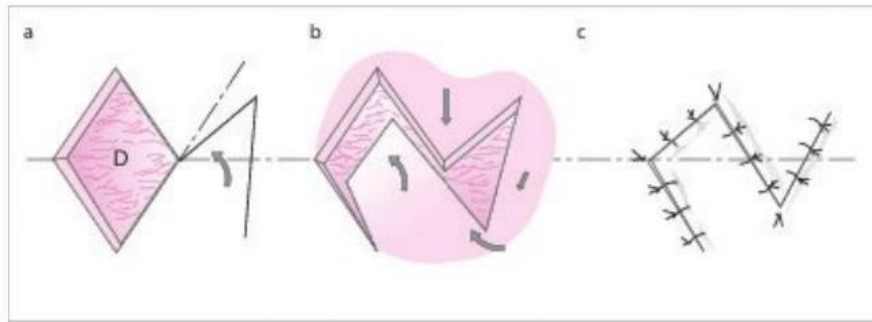
Şekil 3. Tek pediküllü ilerletme flebi ¹⁵



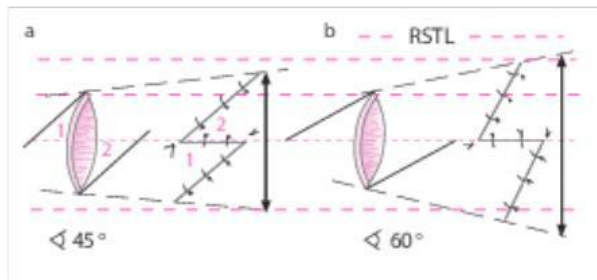
Şekil 4. V-Y ilerletme flebi¹⁵



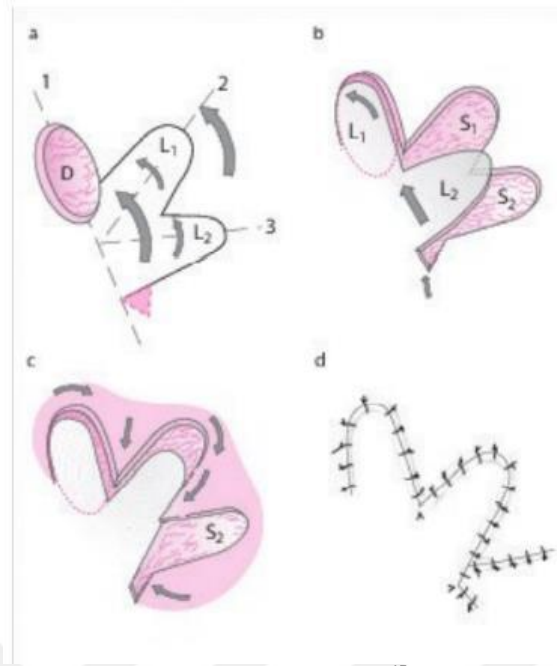
Şekil 5. Limberg flep¹⁵



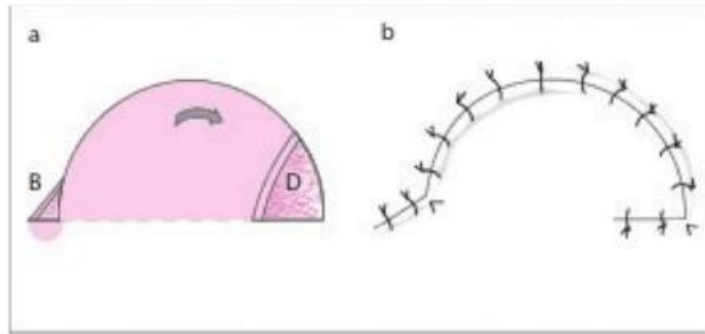
Şekil 6. Dufourmental flep¹⁵



Şekil 7. Z plasti¹⁵



Şekil 8. Bilobe flep¹⁵



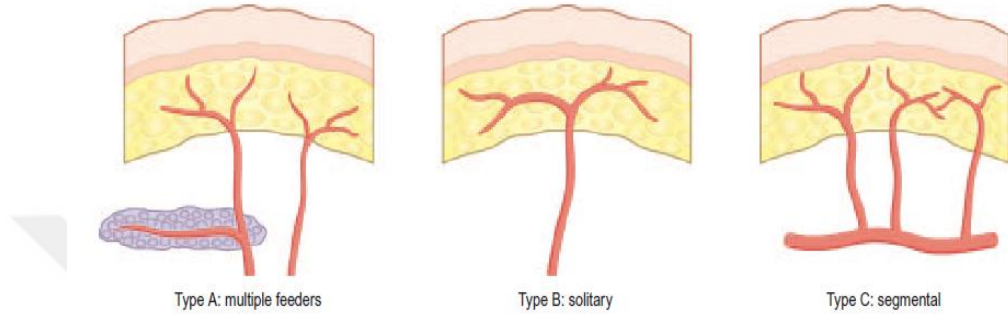
Şekil 9. Rotasyon flebi¹⁵

Bu çalışmalar sonucunda temel olarak kabul görenlerini sıralamak gerekirse:

2.4.1.1. Cormack & Lamberty Sınıflaması

Fasyokutanöz flepleri damarsal yapılarının kaynağına göre üç ana grupta sınıflandırmıştır (Şekil 10). Tip A birden çok isimlendirilmemiş damarlarla ya da perforatörlerle beslenir. Bu yönüyle random cilt fleplerine benzemektedir. Tip B flepler

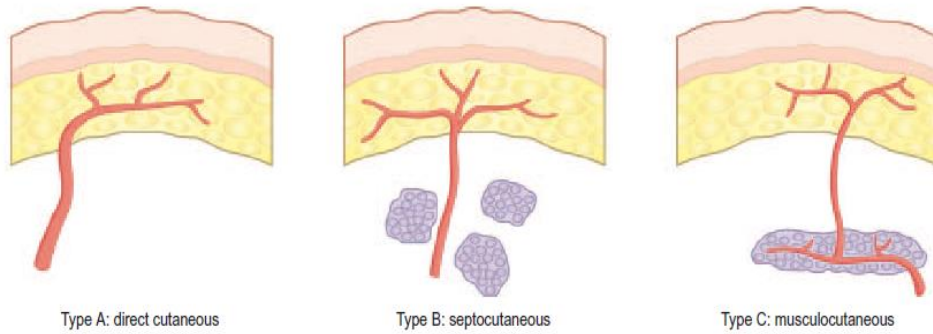
ise bir adet ana septokutanöz arterle beslenir. Tip C flepler ana bir arterden çıkan minik segmental septokutanöz dallardan oluşan bir damar ile beslenir ve bu yüzden bu tarz fleplerin segmental arterler üzerinden değil de ana arterleriyle beraber eleve edilmesi gerekir.¹⁶



Şekil 10. Fasyokutanöz fleplerde Cormack & Lamberty Sınıflaması¹⁷

2.4.1.2. Mathes & Nahai Sınıflaması

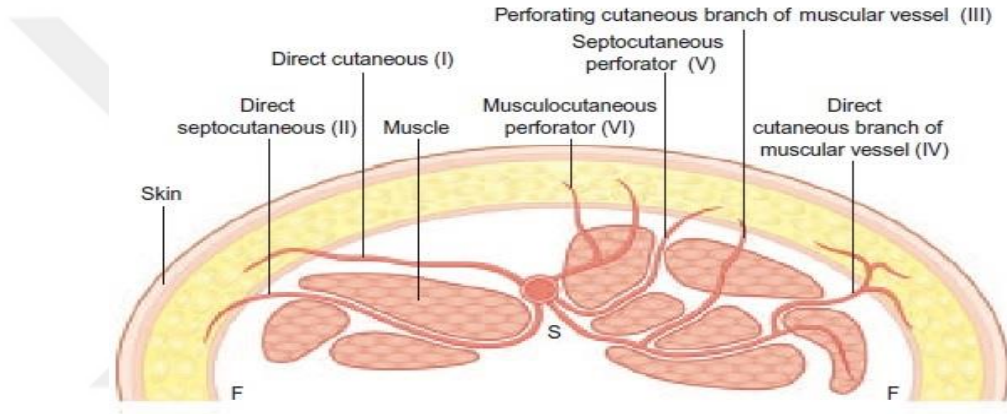
Mathes & Nahai ilerleyen dönemlerde fasyokutan flepleri Cormack & Lamberty ile benzer şekilde derin fasyal perforatörlerinin kaynağına göre alt kategorilere ayırmıştır.¹⁸ (Şekil 11)



Şekil 11. Mathes & Nahai Sınıflaması¹⁷

2.4.1.3. Nakajima Sınıflaması

Nakajima fasyokutan fleplerin sınıflandırmasını her biri farklı ana perforatörlerine göre 6 alt gruba ayıracak biçimde şekillendirmiştir (Şekil 12). Tip 1 direk kutanöz flepler. Tip 2 direk septokutanöz flepler. Tip 3 kasın arterinden köken alan cilt perforatöründen beslenen flepler. Tip 4 muskulokutanöz perforatör flepler. Tip 5 septokutanöz perforatör flepler. Tip 6 kas arterlerinden direk kutanöz dallarından beslenen flepler olarak gruplara ayrılmıştır. (Şekil 12)



Şekil 12. Nakajima Sınıflaması¹⁷

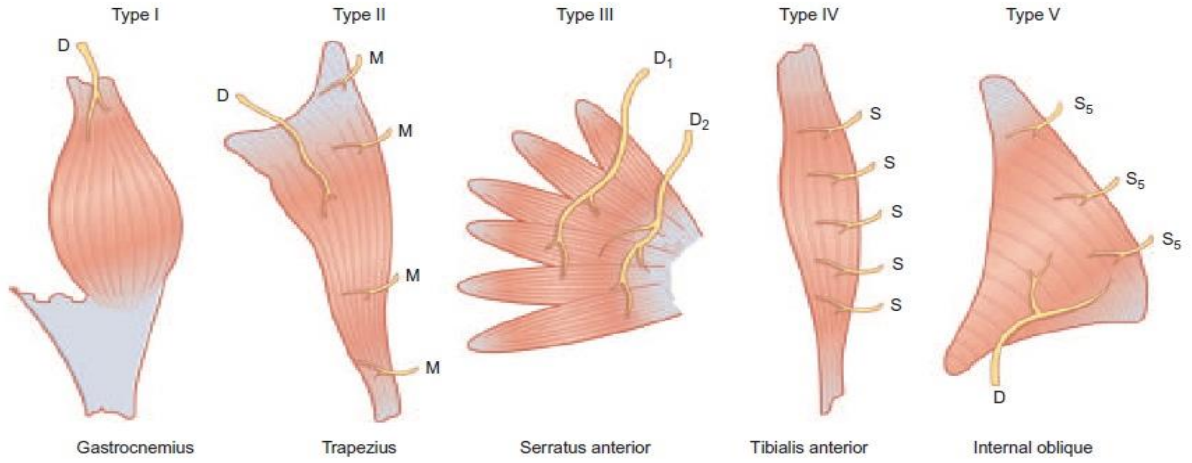
2.4.2.Kas Flepleri

Bazı durumlarda kas flepleri daha fazla yumuşak doku içermeleri ve daha çok kanlanması sayesinde kutanöz fleplerin önüne geçmektedir. Bu da flep viabilitesi için karmaşık damarlanma yapısının anlaşılmasını mecbur bırakmaktadır.

2.4.2.1. Mathes & Nahai Sınıflaması

Tüm flep sınıflamaları ele alındığında meydana getirilmiş en öğretici ve en çok kabul gören sınıflandırmadır. Tüm kaslar besleyici damarsal yapılarının benzerliklerine göre sınıflandırılmıştır (Şekil 13). Diğer taraftan muskulokutanöz perforatörlerin

çoğunluğu ana arterin kasa girdiği yerin yakınında belirmesi tesadüf değildir. İyi bir plastik cerrahının kası koruyarak bunu yapabilmesi için; en güvenilir kas tipleri, hangi pedikülün baskın ve genellikle hangi bölgede lokalize olduğunu doğru analiz etmesi gerekmektedir.¹³



Şekil 13. Mathes & Nahai Sınıflaması¹⁷

2.4.2.2. Taylor Sınıflaması

Taylor fonksiyonel kas transferleri için mevcut kasların inervasyonlarına göre alt gruplara ayırmıştır.¹⁹

2.4.3. Kemik Flepleri

Kemik flepleri doku defektleri arasında daha az ihtiyaç olan fleplerdir. Ancak kullanıldığında fonksiyonel geri kazanımı en iyi flepler olarak karşımıza çıkmaktadır. Yine diğer fleplerde olduğu gibi iyi bir arteriyel anatomi bilgisi gerektirmektedir.

2.4.3.1. Serafin Sınıflaması

Serafin kemik fleplerinin sınıflandırmasında direkt (endosteal) ve indirekt(periosteal) dolaşım parametresini kullanmıştır.

2.4.4.Kombine Flepler

Sadece bir donör alanın kullanılarak kompleks farklı doku eksiklerinin onarılması için kullanılan fleplerdir. Konjoid (yapışık) ve kimerik flepler bu sınıfa dahildir.

2.5. Flep Fizyolojisi ve Patofizyolojisi

Flep, doku eksikliklerinin onarımı için vücudun belirli bölgelerinden hazırlanan, sahip olduğu damar anatomisi temelinde hareket eden içerik olarak; deri, derialtı, fasya, kas, kemik ya da bu dokuların bir kısmını veya hepsini bir arada içerebilen doku parçasıdır. Bir flebin yaşayabilirliği önemli ölçüde kan akımına bağlıdır ve iyi bir planlama yapabilmek için deri kan akımının anatomi ve fizyolojisine hâkim olunması gerekmektedir. Flep cerrahisinde başarı sağlayabilmek için güncel anatomik ve fizyolojik bilgi ve prensipler göz önünde bulundurularak iyi bir planlama yapılmasının önemi son derece önemlidir.

Bütün dokular için geçerli olduğu gibi flepler için de doku kan dolaşımında iki komponentten bahsedilir. Bunlar makrosirkülasyon ve mikrosirkülasyondur. İki komponent de intrinsik ve ekstrinsek etmenlere bağlıdır ve bu etmenler flep dolaşımını yani viabilitesini etkilerler. Flepleri dolaşımına göre sınıflarken esasında makrosirkülasyonlarına göre sınıflandırmış oluruz. Flebin oksijenizasyonunu sağlayan, nütrisyonel desteğin flebe ulaşmasını sağlayan, karbondioksit ve metabolik atıkların atılmasını sağlayan arterioller, venüller, kapiller damarlar ile arteriovenöz anastomozlardan oluşan kısım mikrosirkülasyon olarak adlandırılır. Bu mikrosirkülasyon düzeyi perfüzyon kontrolünün maksimum olduğu, esas ve hayati metabolik değişimin gerçekleştiği yerdir.²⁰

Derinin kan akımı yaklaşık olarak herbir 100 gr doku için 20 ml'dir. Kaslarda bu miktar artan metabolik aktivite nedeniyle çok daha yüksektir.²¹

Derinin kan akımı iki mekanizma ile lokal ve sistemik olmak üzere kontrol edilmektedir.

2.5.1-Sistemik Regülasyon

Nöronal ve hormonal olarak iki kısımda incelenir.

2.5.1.1. Nöral Regülasyon

İki mekanizma arasında dominant olan kontrol mekanizmasıdır. Nöral mekanizma merkezi hipotalamus olan sinir sistemi etkisini damar çeperindeki reseptörlere etki ederek gösterir. Arterioller ve arterio-venöz anastomozlar seviyesinde nöral kontrol damar düz kasına etki ederek vazodilatasyon veya vazokonstrüksiyon ile kan akışını düzenler. Alfa adrenerjik, serotonerjik reseptörler ve sempatik liflerin etkisi ile vazokonstrüksiyon, beta-adrenerjik reseptörler ile vazodilatasyon meydana gelir.

2.5.1.2. Hormonal Regülasyon

Epinefrin, norepinefrin, serotonin, tromboksan A₂ ve prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) gibi vasoaktif maddelerin etkisi ile vazokonstrüksiyon, Prostaglandin E₁, prostoglandin I₂ (prostasiklin), histamine, bradikinin ve lökotrien C₄ ve D₄ gibi mediyatörlerle vazodilatatör etki oluşur.

2.5.2. Lokal Regülasyon

Fizyolojik ve metabolik faktörler ile sağlanmaktadır. Lokal etki ile bir dokuda oluşan metabolitlerin direkt vasküler yapılar üzerine olan etkiler sebebiyle vazodilatasyon ve vazokonstrüksiyon oluşur. Doku dolaşımı bozulduğu zaman ortaya çıkan hiperkapni, hipoksi, asidoz ve hiperkalemi gibi metabolik etkiler ile vazodilatasyon oluşurken lokal hipotermi ya da artmış doku perfüzyonu gibi etkiler ile vazokonstrüksiyon meydana gelir. Hipertermi ise vazodilatasyon oluşturarak buna ters

etki gösterir. Ayrıca kan basıncının yükselmesi gibi bir takım fiziksel faktörler arteriyal perfüzyon basıncından bağımsız olarak ‘miyojenik refleksi’ tetikleyerek vazokonstriksiyon oluşturur ve sabit kapiller kan akımını devam ettirmeye çalışırlar.

Lokal kan akımının kontrol edilmesinde endotelden salgılanan vazodilatasyon etkili (PGI₂ ve nitrik oksit(NO)) ve vazokonstriksiyon etkili (endotelin, tromboksan A₂) vazoaaktif maddelerin ve kendi aralarındaki dengenin rolü önemlidir.¹³

Bazı hematolojik süreçlerin deri ya da flep dolaşımına olan etkileri ortaya konmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda da hafif anemi sonucu kan akışkanlığında artış ile flep kan akımının arttığı ve distal beslenmenin daha iyi olduğu gösterilmiştir ancak başka çalışmalarda ise anemiye bağlı doku oksijenizasyonundaki azalma sebebiyle beslenme adına önemli ya da daha iyi bir etkinin görülmediği ortaya konmuştur.^{22,23,24}

Kas fleplerinde kan akımının düzenlenmesi hemen hemen aynı konseptlere bağlı olsa da bazı anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. Kapiller yoğunluğunun fazla olması ve arteriyovenöz şantların olmayışı kas dokusunu deri dokusundan ayırır. Tehlike durumlarında salınan adrenalın deride vazokonstriksiyon oluştururken, kas dokusunda vazodilatasyon oluşturur. Kas dokusu deri gibi termoregülasyondan sorumlu bir organ değildir ve kas dokusunda ısı değişikliklerinin kan akımı üzerine etkisi neredeyse hiç yoktur.

Muskulokutanöz fleplerin kutanöz bölümleri, üzerinde yer aldığı kas fleplerinin perforatörlerinden beslenmektedir ve beraber olduğu kasın aksiyel vasküler yapısı nedeniyle daha iyi kanlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda kan akışının muskulokutanöz fleplerin eleve edildikten sonra erken fazda artış gösterirken random paternli deri fleplerinde kan akımında azalma olduğu gösterilmiştir²⁵. Eleve edildikten yaklaşık 1 hafta sonra muskulokutan flepler de random deri fleplerine göre doku O₂ basıncının daha yüksek olduğu ve bu durumun her iki flebin proksimal kısımlarında da olduğu gösterilmiştir. Random fleplerde proksimal ve distal arasındaki farklılığın daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu da enfeksiyon varlığında kullanıldıklarında kas-deri fleplerinin daha güvenilir olduklarını ve enfeksiyona karşı daha etkili bakteriyel savunma sağladıklarını açıklayabilir.¹³

Bir flebin elevasyonu sonrasında doku kan akımında meydana gelen ani değişimler ve mevcut dengenin bozulmasıyla doku perfüzyonunda olumsuz değişiklikler olur. İlk aşamada flep kenarlarının kesilmesiyle sempatik innervasyon

kaybı ve buna bağılı nörotransmitter salınımı ile vazokonstriksiyon meydana gelir. Ek olarak flebi besleyen damar dışında kalan damarlardan gelen kan akımının da kesilmesi ile özellikle flep distal kısımlarında akut bir iskemi meydana gelir. Yapılan cerrahi travmalar sonucu endotelde meydana gelen hasar ile lökosit ve trombositlerin damarlarda birikmesi ile de iskemi miktarı artar. İlk 12-18 saatlik sürede oluşan bu değişiklikler nedeniyle özellikle flep uç kısmında kan akımı önemli miktarda azalır. İlk 24 saatlik sürede distal kısımların mikrosirkülasyonunda oluşan bu değişimler flebin ne kadarının yaşayıp yaşamayacağını belirleyen en önemli zaman aralığıdır. Flebin içeriğindeki dokuya göre bu süre değişmekle beraber doku kanlanmasında 6-12 saati geçen devamlı bozulma, doku ölümüne neden olacaktır.²⁰

2.5.3. Anjiyogenezis

Anjiyogenezis, genetik programlar tarafından düzenlenir ve hücreler ilişkili yolların aktivasyonuna izin veren birkaç kimyasal faktör tarafından güçlü bir şekilde modüle edilir. Anjiyogenezin ana düzenleyicileri vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A), vasküler endotelial büyüme faktörü-B (VEGF-B), vasküler endotelial büyüme faktörü-C (VEGF-C), vasküler endotelial büyüme faktörü-D (VEGF-D) ve plasental büyüme faktörünü (PlGF) içeren vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ailesidir. Bu çözünür faktörler, hücre yüzeyindeki tirozin kinaz reseptörüne (VEGFR1 ve VEGFR2) ve VEGFR'ler için ortak reseptör olarak işlev gören nöropilin (NRP-1 ve NRP-2) non-tirozin kinaz reseptörlerine spesifik olarak bağlanır. Her bir çözünür faktör, spesifik olarak reseptörüne bağlanır ve bu olaylar zinciri hücreler yolların aktivasyonuna izin verecektir. Bu protein ailesi içinde, VEGF-A veya basitçe VEGF, en önemli proanjiyogenik faktördür ve endotel hücrelerini çoğalmaya, göç etmeye, farklılaşmaya ve hayatta kalmaya teşvik ederek yeni kan damarı oluşumuna izin verir. Gerçekten de VEGF'nin VEGFR2'ye bağlanması, endotel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü ve vasküler geçirgenliğin artmasını uyarmak için en iyi bilinen yoldur.²⁶ Bu yolların etkileri, MEK-MAPK yolu (proliferasyon ve migrasyon), PI3K-Akt yolu (survival) ve Src-eNOS yolu (geçirgenlik) dahil olmak üzere aşağı sinyalleme yoluyla düzenlenir.^{26,27} VEGF'nin etkisinin yanı sıra anjiyogenik süreç, fibroblast growth factor (bFGF), interlökin-8, platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor

β (TGF- β), hypoxia-inducible factor (HIF) ve PIGF gibi diğ er büyüme faktörleri de etkilidir.^{27,28} (Tablo 2)

Kutanöz yaralar sonucunda keratinositler, makrofajlar ve fibroblastlar dahil olmak üzere birden fazla hücre tipi tarafından yaralanmaya yanıt olarak yüksek düzeyde VEGF  retilir.^{29,30} Hipoksi, transkripsiyon faktörü HIF' in aktivasyonuna neden olarak VEGF geninin transkripsiyonuna neden olur. Bu olay, yara iyileşmesi sırasında VEGF artı ını açıklayan nedenlerden biridir.³¹

Tablo 2. Hipoksi ile indüklenen Pro- ve Anti-Anjiyogenik Faktörler

Pro-Anjiyogenik	Anti-Anjiyogenik
VEGF, Flt-1 (VEGF-R1), Kdr (VEGF-R2)	DLL1-4
Angiopoietin-1/2 (Ang-1/2), Tie-2	Karbonik Anhidraz-9 (CA-9)
ADM	Thrombospondin-1
PDGF-B	Regulator of G-protein signaling 5
FGF	Angiostatin
SCF	Canstatin
PLGF	Endostatin
Osteopontin	�nterferons (IFN- α , IFN- β , IFN- γ)
PAI-1	Vasohibin-1
MMP, TIMP	
NOS	
COX-2	
Endoglin	
α 1B-adrenerjik resept�r	
Endothelin-1	
Semaphorin 4D	
�ntegrins, leptin	
Endosialin	
Adenozin A2A resept�r	
Oxygen-regulated protein-150	
SDF-1	
�nterl�kinler (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10)	

ADM = adrenomedulin; Ang-1/2 = angiopoietin-1/2; COX-2 = siklooksijenaz-2; DLL = delta-like ligand; FGF = fibroblast growth factor; Flt-1 = fms-related tyrosine kinase 1; Kdr = kinase insert domain containing receptor; MMP = matriks metalloproteinaz; NOS = nitrik oksit sentaz; PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1; PLGF = placenta growth factor; PDGF-B = platelet derived growth factor beta; SCF = stem cell factor; SDF-1 = stromal-derived growth factor; Tie-2 = TEK tyrosine kinase endothelial; TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases; VEGF = vasküler endotelial growth factor; VEGF-R = VEGF reseptör

2.5.3.1. VEGF Ailesi

Vasküler endotelial büyüme faktörü-A (VEGF-A; VEGF olarak da anılır), VEGF ailesi üyeleri arasında en iyi karakterize edilen ve en çok çalışılmıştır. Hem normal hem de tümörle ilişkili anjiyogeneizde büyük önemi olan, tümör tarafından salgılanan bir sitokindir.³² Kromozom 6'nın kısa kolunda yer alan VEGF geni sekiz ekzondan oluşur ve dört olgun izoform (VEGF121, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206) verecek şekilde diferansiyel olarak eklenir.³³ VEGF165, baskın izoformdur ve çeşitli katı tümörlerde aşırı eksprese edilir. VEGF189'un çeşitli kanserlerde vaskülarizasyon için en güçlü olduğu düşünülmektedir.³⁴ VEGF-A biyolojik etkisini hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşim yoluyla gösterir. Bu reseptörler transmembran tirozin kinaz reseptörleridir ve vasküler endotelial hücreler (ECs), seçici olarak eksprese edilen VEGF reseptörü-1 (VEGFR-1) ve VEGFR-2'yi nöronlar ve vasküler endotelde eksprese edilen nöropilin reseptörlerini (NP-1 ve NP-2) içerirler.³⁵ VEGF-A'nın reseptörün hücre dışı alanına bağlanması üzerine, hücre içi reseptör tirozin kinazların dimerizasyonu ve otofosforilasyonundan sonra bir dizi aşağı akış proteini aktive edilir. VEGFR-2, VEGF-A'nın pro-anjiyojenik etkilerine aracılık etmekten sorumlu ana reseptör gibi görünmektedir. VEGF-A, bugüne kadar tanımlanan en güçlü pro-anjiyogenik proteindir. Endotel hücrelerinin (ECs) proliferasyonunu, filizlenmesini ve tüp oluşumunu indükler. Ayrıca endotelial nitrik oksit sentazını indükleyerek ve dolayısıyla nitrik oksit üretimini artırarak vazodilatasyona neden olur. VEGF-A, hematopoietik kök hücreler (HSC'ler), monositler, osteoblastlar ve nöronlar üzerindeki birçok reseptörü bağlar. Kemik iliğinden HSC mobilizasyonunu, monosit kemoatraksiyonunu ve osteoblast aracılı kemik oluşumunu indükler.^{35,36,37}

VEGF-B, VEGFR-1'e bağlanır ancak VEGFR-2 veya VEGFR-3'e bağlanmaz³⁸. VEGF-B'nin in vivo kesin rolü bilinmemektedir. VEGF-B'nin inflamatuvar anjiyogeneizde de bir rolü olabilir ve bu kollajen kaynaklı artrit azalmış anjiyojenik tepkiler sergileyen farelerde gösterilmiştir.³⁹ Silvestre ve arkadaşları, VEGF-B'nin Akt ve eNOS ile ilgili yolların aktivasyonu ile bağlantılı olarak anjiyogenezi desteklediğini ilk kez açıkça göstermiştir.⁴⁰

VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-2 ve VEGFR-3'ü bağlar ve aktive eder⁴¹. Her iki büyüme faktörü de in vitro ve in vivo olarak anjiyogenezi uyarır. Bununla birlikte,

VEGF-C, transgenik farelerde yapılan erken deneylerde gösterildiği gibi, anjiyogeneze eşlik etmeden seçici lenfanjiyogenezi indükler.^{42,43}

Son olarak VEGF-E, VEGF ailesinin bir başka üyesidir. VEGF-E, güçlü bir anjiyojenik faktördür ve veriler, tek başına VEGFR-2 aktivasyonunun anjiyogenezi verimli bir şekilde uyurabildiğini güçlü bir şekilde göstermektedir.⁴⁴

2.5.3.2. Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1 (HIF-1)

Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1), ilk olarak eritropoietinin hipoksi ile indüklenebilir aktivitesine aracılık eden bir DNA-bağlayıcı faktör olarak tanınan bir $\alpha\beta$ -heterodimerdir.⁴⁵ HIF sisteminin, aralarında anjiyogenez de dahil olmak üzere diğer birçok sürecin kilit düzenleyicisi olduğu ortaya çıktı.

Anjiyogenez sürecinde hipoksiye cevap olarak farklı birçok faktör rol alır. Örnekler arasında vasküler tonusun yönetilmesinde yer alan nitrik oksit sentazlar, VEGF, anjiyopoietinler, fibroblast büyüme faktörleri ve bunların çeşitli reseptörleri gibi büyüme faktörleri ve matriks metalloproteinazlar, plazminojen aktivatör reseptörleri ve inhibitörleri ve kollajen prolihidroksilaz dahil olmak üzere matriks metabolizmasında yer alan genler yer alır.^{46,47}

HIF yolunda inaktive edici mutasyonlar taşıyan hücreler üzerinde yapılan deneyler, HIF'nin (özellikle HIF-1 α) anjiyogenez ile ilgili genlerin düzenlenmesi üzerindeki önemini vurgulamıştır.⁴⁸ Hipokside, proteinlerin 3' UTR'deki spesifik dizilere bağlanmasıyla HIF mRNA stabilitesi artırılır ve VEGF transkripsiyonu HIF tarafından yukarı regüle edilir.⁴⁹ Özellikle EC'ler içinde HIF-1 α ekspresyonunun kazanılması veya kaybedilmesi, proliferasyon, kemotaksis ve EC penetrasyonu dahil olmak üzere anjiyogenez sırasında EC davranışının bir dizi önemli parametresini modüle eder.⁵⁰

2.5.3.3. Anjiyopoietinler

Damar gelişimi, büyümesi ve stabilizasyonu ile ilgili diğer bir sinyal sistemi, anjiyopoietinleri (Ang1 ve Ang2) bağlayan Tie2 reseptörüdür.⁵¹ Anjiyopoietinler ve Tie reseptörleri, anjiyogeneze anahtar rol oynar. İki Tie reseptörünün, Tie1 ve Tie2'nin

ekspresyon paternleri VEGFR'lerinkine benzerdir.⁵² Tie1 mRNA, embriyonik vasküler endotel, anjiyoblastlar ve endokardiyumda yüksek oranda eksprese edilirken, akciğer kılcal damarlarında kuvvetli, ancak erişkin dokularda endokardiyumda zayıf olarak eksprese edilir. Tie2 mRNA, benzer bir embriyonik lokalizasyon gösterir.⁵³ Bu reseptörlerin ekspresyon paternine dayanarak, anjiyogenezde önemli bir rol olduğu öne sürülmektedir.

Anjiyopoietinler Tie2'yi bağlar. Tie1 için henüz bir ligand tanımlanmadı. Anjiyopoietin-1 (Ang1) en çok çalışılan anjiyopoietindir; mRNA'sı embriyonik 9-11. günlerde miyokardda ve daha sonra kan damarlarını çevreleyen mezenşimde saptanır.⁵⁴ Ang1, *in vitro* EC'lerin proliferasyonunu indüklemeyi, ancak kültürlenmiş EC'lerden filizlenmeyi uyarır.⁵⁵ Son kanıtlar, endotelial NADPH oksidazdan türetilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) Ang1 ile indüklenen anjiyogenezde önemli bir rol oynadığını kuvvetle göstermektedir.⁵⁶

Ang2 mRNA noktasal bölgelerde ve damar sisteminin dorsal aortunda eksprese edilir ve yetişkinlerde sadece vasküler yeniden şekillenme bölgelerinde eksprese edilir. Ang2, Ang1'i *in vivo* antagonize eder ve kan damarlarının apoptozisini artırarak kan damarlarının aşırı filizlenmesini ve dallanmasını önleyebilir.⁵⁷

2.6. Flep Elevasyonu Sonrasında Ortaya Çıkan Anatomik, Hemodinamik ve Metabolik Değişimler

2.6.1. Hemodinamik Değişiklikler

Cilt flebinin kan akımındaki değişiklikler mikrosferler ve radyoaktif izotoplar sayesinde değerlendirilmiştir. Random ve bipediküllü geciktirilmiş fleplerin arteriyel dolaşımındaki değişimler değerlendirilmiştir. Flep pedikülündeki kan akımı % 100 baz alınmış, postop 1.günde cilt flebinin uç kısmında kan akımının % 18 azaldığı görülmüştür. Flep uç kısımlarındaki perfüzyon 1. haftanın sonunda % 65'e yükselirken 2. haftanın sonunda % 75-90 olarak ölçülmüştür. Bipediküllü fleplerde arteriyel uçta kan akımı kontrolün % 135'ine artış göstermiş, orta kısımda akım % 70'e azalmış ve karşı kutanöz uçtaki akım % 100 bulunmuştur. Kan akışı takribi 3-4 hafta içinde fleplerde normal seviyeye dönmüştür. Kan akışındaki benzer değişiklikler mikrosfer

tekniki kullanılarak yapılan tek pediküllü flep(köpekler üzerinde) ve bipediküllü geciktirilmiş flep(domuzlar üzerinde) çalışmalarında da elde edilmiştir.²¹

Kerrigan, yaptığı deneysel çalışmalarda akut olarak kaldırılan fleplerde görülen flep distalindeki yetmezliğin asıl nedeninin arteriyel yetmezlik olduğunu göstermiştir ve flep uç kısımlarında arteriovenöz şant kan akışının arttığını gösterecek kanıt bulamamıştır. Pang ve ark. delay uygulanan fleplerin olduğu çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile bu çalışmayı desteklemişler, akut ya da geciktirilmiş fleplerde flebin distal iskemik parçasında şant akımına ait bir bulguya rastlamamışlardır.⁵⁸

2.6.2.Anatomik Değişiklikler

Cerrahi travma sonrası hipoksi sonucu inflamatuvar cevap nedeniyle flepte neoanjiogenezis ile damar sayısı artar, transvers yerleşimli damarlar arasında var olan “choke anastomozlar” aktive olur. Bu oluşumlar yaklaşık 2-3 hafta boyunca devam eder. Erken dönemde salınan katekolaminler 30 saat içerisinde ortadan kaybolurlar ve tekrar ortaya çıkmaları yaklaşık 4-8 saat sonra reinnervasyonun gelişmesi ile olur. 4-5 gün sonra flep damarları ile çevre dokulardan ilerleyen yeni damarlar arasında bağlantılar oluşur.^{59,13,21}

2.6.3.Metabolik Değişiklikler

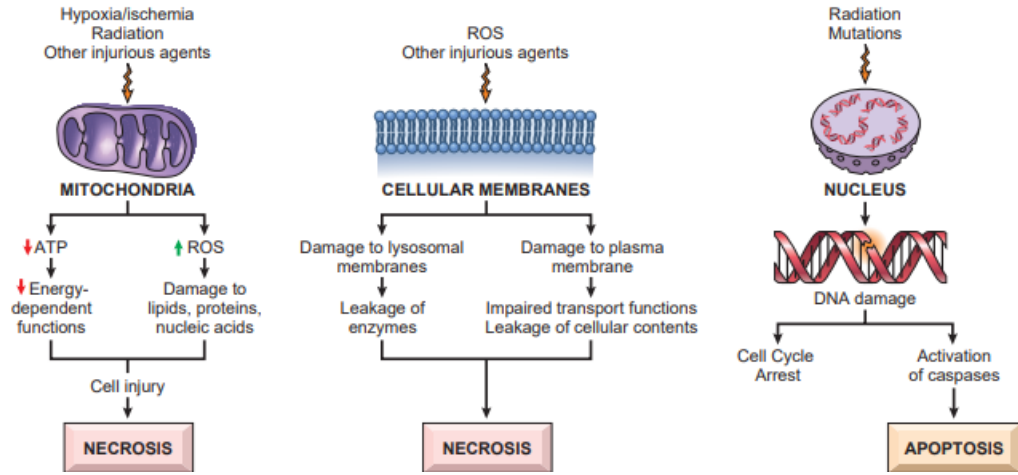
Flebin kaldırılmasına sekonder gelişen iskemik durum ve yetersiz oksijen anaerobik mekanizmaları tetikler. Özellikle fleplerin distal zonunda şiddetli iskemi görülür ve flep boyunca distale doğru gidildikçe adenosin trifosfat (ATP), oksijen ve glikoz miktarı anlanlı ölçüde düşer. Bunun sonucunda laktat ve karbondioksit artışıyla pH azalır. Glikoz tüketimi yaşayabilen fleplerde 3. günde maksimuma ulaşır ve 7. günde normale döner. Laktat üretimi artış gösterir, doku glikojeni ve glikoz miktarı önemli olarak azalır. Erken evrede siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyesinin düştüğü, ancak flebin perfüze olabilen parçasında 12 saat sonra anlamlı derecede artış olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.⁶⁰

İlk 24 saatte fibrinolitik aktivite belirgin olarak düşüş gösterir bu da trombosit agregasyonunda ve araşidonik asit metabolizmalarında bozukluklar meydana getirerek mikrotrombüsler oluşmasına zemin sağlar.²¹

Serbest ya da delay fenomenli fleplerin beslenmeyen bölgesinde anaerobik metabolizma artış gösterir ve devamında zararlı süperoksit radikallerinin üretiminde artış görülür. Süperoksit radikalleri ksantin metabolizmasında yan ürünlerinden biridir ve flep viabilitesini negatif yönde etkiler. Yapılan çalışmalarda akut ve geciktirilmiş (delay) sıçan fleplerinde serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı savunmada en önemli rolü oynayan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin seviyesi ölçülmüştür. Geciktirilmiş(delay) fleplerde SOD seviyesi normal iken, flep elevasyonun erken evresinde distalde SOD seviyesi azalmış olarak bulunmuştur. Allopürinol kullanılarak süperoksit radikallerinin üretimi engellenirse ve/veya eksojen SOD ile nötralize edilirse iskemik dokuların yaşayabilirliğinin artabileceği gösterilmiştir.^{61,62}

Özet olarak cilt flepleri eleve edildikten sonra oluşan olaylar:

- Flebi besleyen damar ağı ve sempatik sinirler kesilir.
- İlk 12-18 saat süresince flebe gelen kan akışı önemli ölçüde azalır, bu azalma en çok flebin uç kısımlarında daha çok görülür. Çünkü buna neden olarak hem alternatif kan akışı kesilir hem vazokonstrüktif maddelerin salınımı hem de lökosit aracılı endotel hasarı meydana gelir.
- İlk 6-12 saat boyunca kan akımı sağlanırsa distal kısım canlı kalabilir.
- Sempatik nörotransmitterler ilk 12-24 saatde tüketilirler ve flep yatağında akım, 2-3 gün içinde yeniden damarlanma ile beslenmenin başlamasıyla flep perfüzyonu giderek artar.
- Bununla beraber flep uç bölgelerinde 6-12 saat içinde iskemi oluşmakta ve sonradan gelen kan akışı ile reperfüzyon hasarı oluşur.
- Reperfüzyon hasarı ile mikrovasküler dolaşım bozulması ve doku ölümü meydana gelecektir.¹³ (Şekil 14)



Şekil 14. Hücre hasarında başlıca biyokimyasal mekanizmalar ve hasar bölgeleri ⁶³

2.7. Flep Nekrozu

Kerrigan flep kaybının başlıca nedenlerini yaptığı çalışmasında şu şekilde tanımlamıştır:⁶⁴

- Preoperatif flep tasarımının yanlış yapılması
- Hastanın sistemik diğer hastalıkları
- Peroperatif teknik hatalar
- Flep pedikülünün dokular arasında sıkışması, basıya uğraması
- Postoperatif pedikülde bükülme
- Yetersiz kalibrasyonda uygun olmayan alıcı damar seçilmesi
- Enfeksiyon
- Arteriyel ve/veya venöz tromboz

Flep cerrahisindeki gelişmelere rağmen iskemi reperfüzyon hasarına bağlı flep nekrozu önemli sorun karşımıza çıkmaktadır.⁶⁵ Flep viabilitesini belirlemede arteriyovenöz şantların önemli bir yere sahip olduğu, cerrahi sonrası dönemde kan akışının uç kısımlara ulaşmasını engellediği gösterilmiştir.⁶⁶ Bu çalışma sonrasında Kerrigan yaptığı çalışmalarda arteriyovenöz şantların flep distal kısımlarının yaşayabilirliği üzerine parsiyel bir etkisi olduğunu göstermiştir.⁶⁴ Bütün bu çalışmalar ele alındığında distal flep nekrozu farklı sebeplerden de olsa neticede yetersiz son akım sonucu olmaktadır.

Khibani ve Kerrigan deneysel çalışmalarında cilt flepleri ve kas flepleri arasında iskemi reperfüzyon hasarı cevabında farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur.⁶⁷ Fleplerin kas içeren bölümünde, reperfüzyon esnasındaki erken hiperemik fazda flebin nekroza uğrayacak bölgesi dahil olmak üzere flebe yeterli kan akımı sağlanır. Fleplerin cilt kısmında ise kan akışında azalma vardır. Bu farklılıklar, flep viabilitesini artırmak için verilen terapötik ilaçların önemini vurgulamaktadır. Flebe ait pedikülden doğan flep kayıpları incelendiğinde ise arteriyel ve/veya venöz yetersizlikler üzerine birçok çalışma görülmektedir. Yeterli arteriyel akımın olması tek başına kâfi değildir. Meydana gelebilecek venöz yetmezliğin de doku ölümü oluşturabileceği açıkça gösterilmiştir.⁶⁸

Serbest flepleri incelendiğinde, venöz oklüzyon arteriyel oklüzyona göre daha sık karşımıza çıkmaktadır. Akut dönemde mevcut problem giderilmez ise flep nekrozu ile sonuçlanmaktadır. Çoğu pediküllü flepte arteriyel ve venöz yetmezlik birbirine bağımlı olarak gerçekleşir. Primer venöz ve primer arteriyel yetmezlik sonrası oluşturulan iskemi ile yapılan deneysel çalışmalarda venöz iskeminin daha ön görülemez, istenmeyen sonuçlar doğurduğu gösterilmiştir.⁶⁹

2.8. Flep Sağ Kalımını Arttırıcı Yöntemler

2.8.1.Cerrahi Teknikler

Bir çok çalışma sonucunda anlaşılmıştır ki cerrahi geciktirme yöntemi (delay yöntemi) flep viabilitesine pozitif etkisi gösterilen tek gerçekçi yöntemdir.⁷⁰ Delay işlemi sonucu flep aksında yeni anjiyogenetik yapılanmalar, damar çaplarında ve subdermal pleksuslarda damarlanma miktarında artış tespit edilmiştir.^{66,71} Farklı bir çalışmada delay prosedürü sonrasında cilt flebinde oluşan ilk olayın yeni anjiyogenezis değil, mevcut damarlarda dilatasyon olduğu gösterilmiştir.⁷² Başka bir çalışmada ise delay prosedürünün iskemi-reperfüzyonun daha kontrollü olarak yapılmasını ve böylece bundan ötürü metabolitlerin oluşumunda azalma sağladığını, nihayetinde ise flep kaybını engellediğini göstermişlerdir.⁷³ Delay prosedürünün perforatör flep viabilitesini de arttırdığı gösterilmiştir.⁷⁴

Farmakolojik flep geciktirme kavramı da yapılan çalışmalar sonucunda ortaya atılmıştır. Burada protein kinaz aktivasyonunun iskemik koşullandırma ile

gerçekleştirilmesi esas olandır.⁷⁵ Diğer bir farmakolojik geciktirme yöntemi ise aynı işlemin geç fazını taklit eden sentetik bir molekül olan Monofosforil Lipid-A kullanılmasıdır.⁷⁶

Venöz süper şarjın epigastrik perforatör flep modelinde sağ kalımını arttırdığı⁷⁷, yine farklı bir çalışmada ters akımlı sural flep cerrahisinde venöz süper şarjın da flep viabilitesini arttırdığı ortaya konmuştur.⁷⁸

2.8.2. Fiziksel Uygulamalar

Fleplerin nemli tutulması⁷⁹, hipotermiye vazokonstriksiyon yoluyla ve kan akımında azalmaya sebep olarak deri fleplerinin perfüzyonunu etkilediği, flep sıcaklığının artırılması ile de kan akımını arttırdığı⁸⁰, deney hayvanlarında ısı şokunun flep viabilitesine olumlu katkı yaptığı⁸¹, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

2.8.3. Hiperbarik Oksijen Tedavisi

Ratlarda eleve edilen abdominal fleplerde olumlu etkileri görülmüştür.⁸² Mekanizma olarak süperoksit dismutazın etkinliğini artırarak etki ettiği gösterilmiştir.⁸³

2.9. Flep Sağ Kalımını Arttırıcı Ajanlar

Flep viabilitesini artırmak flep cerrahisinin her basamağında temel hedeftir. Doğru hasta ve doğru flep seçimi, alıcı sahanın hazırlanması, flebin hatasız diseksiyonu, alıcı bölgeye uygun şekilde konumlandırılması ve postoperatif yakın takip cerrahi başarı için temel unsurlardır. Sayılan herhangi basamakta yaşanabilecek bir problem flep kaybı ile sonuçlanacağından viabiliteyi artırmaya yönelik tedaviler her bir basamağa uygulanabilir ve denenebilir.^{64,13}

2.9.1. Antikoagülanlar ve Antitrombositer İlaçlar

Bu amaçla kulanabilecek ajanlar şunlardır:

- Dekstran (kan vizkositesinde azalma, trombosit agregasyonunda azalma, kanama zamanında uzama⁸⁴)
- Hiruda medicinalis (sülükler venöz yetmezlikte olan fleplere hirudin sayesinde faydalı olmaktadır. Hirudin, heparinden farklı olarak fonksiyonu için Antitrombin -3'e gereksinim duymaz⁸⁵)
- Salisilik asit (aspirin) (trombosit agregasyonunu bozarak arteriyel ya da venöz trombozu engeller, ideal dozu 50-100 mg arasındır⁶⁸)
- Heparin (antikoagülan etki) (Heparin ve türevi moleküllerin flep sağ kalımına olumlu etkileri olduğu ortaya konmuştur⁸⁶)

2.9.2. Steroidler ve Serbest Radikal Temizleyicileri

Bu grup ajanlar birçok hastalıkta deneysel ve klinik olarak kullanılmaktadır. Antiinflamatuvar ve membran stabilizasyonunda etkileri vardır. Aynı zamanda immunsupresif etkileri de olduğu bilinen steroidlerin enfeksiyona yatkınlık oluşturduğu da bilinmektedir. Bunun yanında antiinflamatuvar ve antiödematöz özelliği nedeniyle klinikte kullanımı önemli bir yer teşkil etmektedir.^{13,87}

Sığır kaynaklı süperoksit dismutaz'ın kadavra kaynaklı böbrek nakillerinde akut rejeksiyonu önlediği görülmüştür.⁸⁸ Klinik kullanımı için süperoksit dismutaz'ın flep viabilitesi üzerine bir çalışma olmamakla beraber hayvan deneylerinde olumlu yönde etki yaptığı tesbit edilmiştir.⁸⁹ Farklı yapılan çalışmalarla vitamin E ile prostasiklinin beraber kullanımının reperfüzyon hasarını azalttığı anlaşılmıştır.⁹⁰ Bunların dışında ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol, bu özelliği sayesinde reaktif oksijen metabolitlerinin üretimini azaltır. İskemi sırasında insan derisinde ksantin oksidaz aktivitesi etkilenmez.⁹¹ Buna rağmen klinik bir çalışmada replantasyon yapılan hastalarda olumlu sonuç bulunmuştur⁹². Deferoksamin'in (bakteriyel siderofor), serbest radikalleri bağlaması sebebiyle flep kaybını azalttığı görülmüştür.⁹³ Mannitol (osmoterapik)⁹⁴, Anisodamin (alfa-1 reseptör antagonisti)⁹⁴, Coenzim Q (vitamin

türevi)⁹⁵, Fosfokreatin (yüksek enerjili fosfor)⁹⁶; bu dört ajan da deneysel çalışmalarda iskemi-reperfüzyon hasarının azaltılmasında etkili bulunmuştur.

2.9.3 Antiadrenerjik İlaçlar ve Sempatik Reseptör Blokörleri

Bu amaçla kullanılan; Guanetidin (Antihipertansif)⁹⁷, Dobutamin (Sempatomimetik)⁹⁸, L-Arginin (NO prekürsörü vazodilatör)⁹⁸, Terbutalin (β_2 adrenerjik reseptör agonisti)⁹⁹, Naftidrofuril (arteriyal vazodilatör)⁹⁹, Trimetazidin (antianjinal)⁹⁹, Fenoksibenzamin'in (sempatolitik ajan)⁹⁹, Fentolamin (alfa adrenerjik antagonist)¹⁰⁰, ve Klorpromazinin(direkt vazodilatör ve antipsikotik)⁹³; deneysel çalışmalarda flep viabilitesi üzerine olumlu etkileri olduğu görülmüştür.

Rezerpin (antiadrenerjik etkili, antipsikotik, antihipertansif)¹⁰¹, Fenilepinefrin ve Dopamin (nörotransmitter)⁹⁸, Propranolol (β -adrenerjik bloker)²¹; bu ajanların ise yapılan deneysel çalışmalarda flep viabilitesi üzerinde olumlu etkisi görülememiştir.

2.9.4. Doğrudan Düz Kaslara Etki Ederek Damar Genişleten İlaçlar

Bu amaçla kullanılan; Hidralazin (intraseküller c-AMP konsantrasyonlarını artırarak arteriyel düz kaslarda relaksasyon)⁹⁹, Nitrogliserin (arteriyel sistemden ziyade venöz sistem üzerine etkili vazodilatör)¹⁰², Nifedipin (kalsiyum kanal blokörü, damar düz kaslarında vazodilatasyon)^{103,104}, Verapamil (kalsiyum kanal blokörü, damar düz kaslarında vazodilatasyon)¹⁰⁵, Kalsitonin gen ilişkili peptit (arteriyel dilatasyon)¹⁰⁶, ve Buflomedilin (periferik vasküler hastalık tedavisi)¹⁰⁷; yapılan deneysel çalışmalarda flep viabilitesi üzerinde olumlu etkiler ortaya konmuştur.

2.9.5. Kanın Reolojik Özelliğini Değiştiren Ajanlar

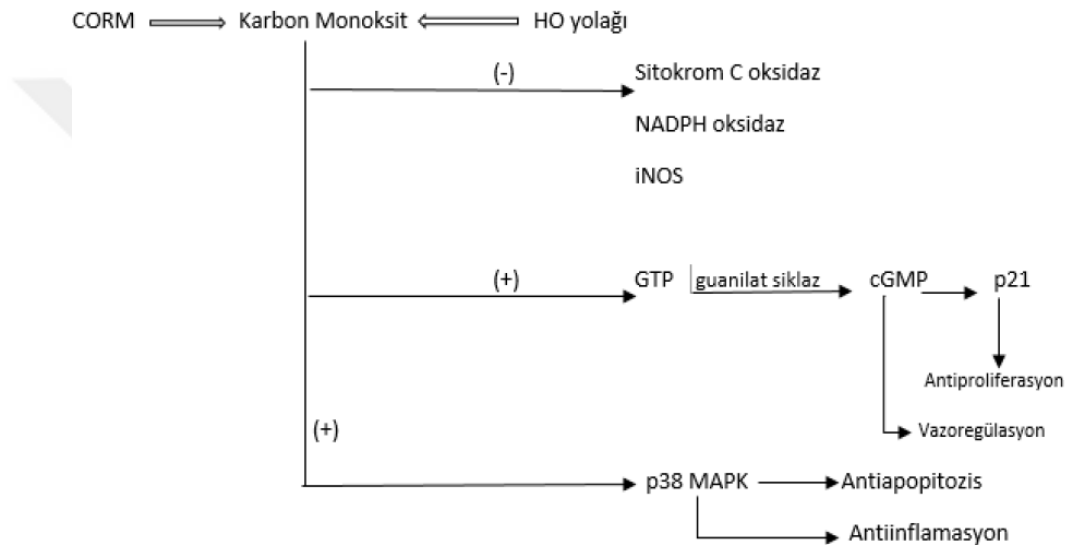
Fluosol (kanın oksijen taşıma kapasitesini artırır) flep sağkalımına etkili bulunmazken¹⁰⁸, pentoksifilin (eritrositlerin deforme olma özelliğini artırarak kan akımı özelliğini düzelteren bir reolojik ajandır) ise etkili bulunmuştur¹⁰⁹. Başka bir çalışmada ise Piracetam (Eritrositlerin damar endoteline yapışmasını azaltma)¹¹⁰ etkili bulunmuştur.

2.10. Çalışmamızda Kullanılan Medikal Ajanlar

2.10.1.Karbon Monoksit Releasing Molekül-3 (CORM-3)

Nitrik oksit'in (NO) bulunması ve nitrik oksitle karbon monoksit (CO) ile yapısal benzerliklerinin öğrenilmesi sonrasında, karbon monoksitin de damar vazodilatasyonunda etkili olabileceği düşünülmüştür. Ama canlı organizmalarda karbon monoksitin toksik etkilerinin olması kafalarda soru olarak yer etmiştir.¹¹¹ Son dönemlerde karbon monoksit üzerine yapılan çalışmalarda CO'nun farklı konsantrasyonlarda vasküler, antiapoptotik, antiproliferatif ve nöroprotektif etkilerinin olduğu anlaşılmıştır. Endotelial hücre içi metabolizma ürünü olarak ortaya çıkan CO düz kasta ve dolaşımdaki kan hücreleri üzerinde parakrin etkiler göstermektedir.¹¹² Nitrik oksit gibi CO, büyük ve küçük damar çeperlerindeki kas tonusunu idamede etkili olduğu gibi, vasküler düz kas hücrelerinde dilatasyona sebep olabilmektedir.¹¹³ Karbon monoksit'in kan basıncını azaltma etkisini direkt vazodilatasyonla veya indirekt olarak glutamaterjik transmisyon yoluyla beyindeki nükleus traktus solitarius'a etki ederek olabilmektedir.¹¹⁴ Vasküler travma sonucu damar düz kas hücrelerinde, yıkıma uğrayan damar endotelial hücrelerin Hemoksijenaz-1 (HO-1) enzimini indüklemesi sonucunda ortaya çıkan CO; vazodilatasyon, antiproliferasyon ve antitrombotik özellikleri ile meydana çıkar.¹¹⁵ Vasküler lokal hasarlanma esnasında dolaşımda bulunan ve IL (İnterlökin) -1 β , TNF- α gibi inflamatuvar sitokinleri salan monosit ve makrofajlar, hasar bölgesine yönelirler.¹¹⁶ Bu inflamatuvar mediyatörlerin bölgeye intikalinden sonra bölgesel olarak sitokin seviyelerinde artışa neden olurlar. Bunun sonucunda da Hemoksijenaz-1 enzimi aktive olur. Açığa çıkan CO ise cGMP miktarını artırarak trombositlerin ve nötrofillerin travmatik bölgeye göçünü önler.¹¹⁷ HO-1 enzimi, Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK) enzimini indükleyerek endotelial hücre apoptozisini de önlemektedir.¹¹⁸ Vasküler endotelial hasar sonucu HO-1 enziminin aktivasyonu sonrasında açığa çıkan CO, hasar bölgesindeki vasküler düz kas hücrelerinde vazokonstrüksiyonu ve düz kas hücre proliferasyonunu engelleyerek damar içi homeostazisi sağlar.¹¹⁹ (Şekil 15). Yapılan bu çalışmalarla CO'nun organizmalardaki fizyolojik ve patolojik birçok mekanizmayla ilintili olduğu anlaşılmıştır. Bu düzlemde CO'nun kontrollü kullanımı için karbon monoksit releasing moleküllerin (CORM) üretilmeye başlanmıştır. Son dönemlerde laboratuvar ortamında CORM potansiyeline

sahip taşıyıcı metil karbonillerle ilişkili biyolojik aktiviteler üzerine çalışmalar yapılmaktadır.¹²⁰ Bu kompleksler demir, manganez gibi transizyon metalleri içerebilir ve bunlar koordine bağlarla CO gruplarını bağlarlar. CO, mevzu bahis transizyon metallerinden ayrıldıktan sonra geriye kalan metal karbonil gruplarının toksisitesi üzerine herhangi bir çalışma yoktur. Hem $[Mn_2(CO)_{10}]$ (CORM-1)'in hem de $[Ru(CO)_3Cl_2]_2$ (CORM-2)'nin 400 mikromol/L konsantrasyonlarına ulaşana kadar hücrelerde yaşamsal faaliyetleri olumsuz etkilediğine dair bir etki görülmemiştir.¹²¹

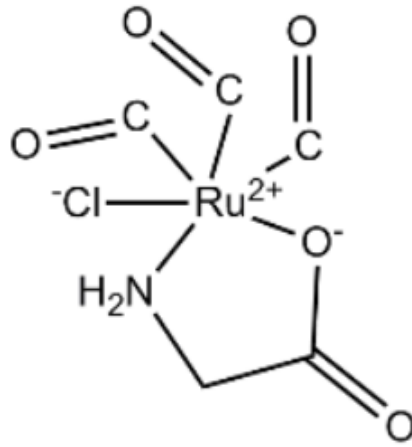


Şekil 15. HO yoluğı veya CORM tarafından üretilen CO' nun metabolizması¹¹¹

CORM-3, vazodilatasyonu cGMP salınımını indükleyip damarsal genişlemeyi sağlayan K^+ kanallarını aktifleyerek gerçekleştirmektedir.¹²² Gerçek CORM'lar sadece organik çözücülerde çözünebilen ve CO'yu salıverebilmesi için ışıık, sterik ligandlar gibi fiziksel ve kimyasal müdahalelere gereksinim duyan moleküllerdir. CO'yu kolaylıkla salıverebilen ve suda çözünebilen ilk molekül, trikarbonilkloro (glisinat) rutenyum(II) olan CORM-3'tür.¹²⁰ (Şekil 16)

CORM-3, terapötik amaçlar doğrultusunda kullanılabilen ve CO' nun salınması açısından farmakolojik olarak aktif bir moleküldür. CORM-3'ün canlı organizmalarda CO'yu salıverme süresi 1-5 dakika arasında değişmektedir. CORM-3 insan plazmasında, hücre kültürlerinde, fizyolojik solüsyonlarda ve biyolojik sıvılarda CO'yu

kısa sürede salıvermesine rağmen, oda sıcaklığında, suda veya asidik pH'da 24 saatten fazla stabil halde kalabilmektedir.¹²¹ CORM-3 de diğer CORM bileşikleri gibi canlı organizmalarda CO'yu hızla salıvermektedir. Bu özelliği sayesinde CORM-3 nörotransmisyon, akut hipertansiyon, anjina ve I/R hasarı gibi patolojilerle ilgili yapılacak deneysel çalışmalarda terapötik dozlara kolayca ulaşabilir.¹²³ CORM-3'ün toksik olmadığı ve terapötik konsantrasyonlarda canlı hücrelere olumsuz yönde bir reaksiyona yol açmadığı gösterilmiştir¹²⁴.



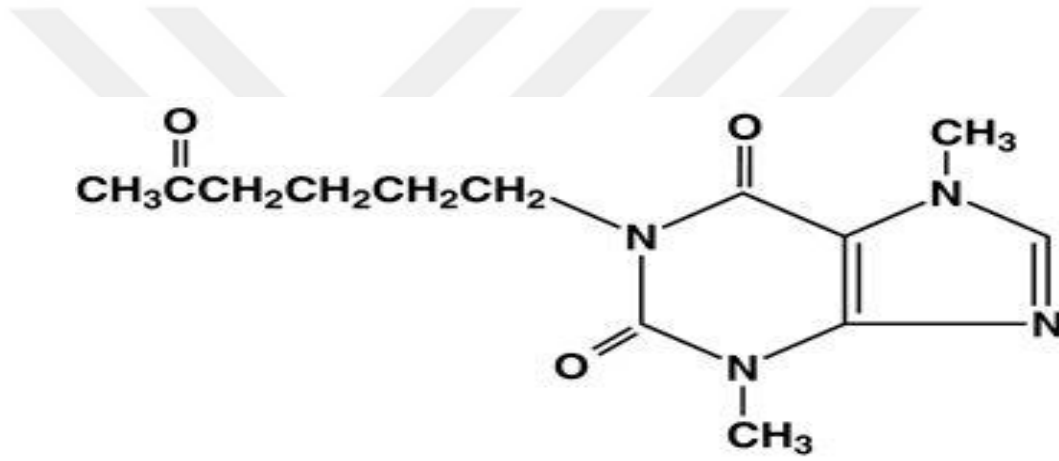
Şekil 16. CORM-3'ün kimyasal yapısı

CORM-3 iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarı, hemorajik şok, kompartman sendromu, iskemik inme, akut miyokard enfarktüsü, postiskemik miyokard enfarktüsü iyileşmesi, renal transplantasyona bağlı hücre ölümü, renal iskemiye bağlı akut böbrek yetmezliği, kardiyoprotektif ve renoprotektif etki gibi iskemi-reperfüzyon hasarının birçok alanında çalışılmıştır.¹²⁵

2.10.2. Pentoksifilin

Pentoksifilin(okspentifilin), C₁₃H₁₈N₄O₃ yapısında (Şekil 17), bir ksantin türevidir (teofilin benzeri) olup, fosfodiesteraz-5 enzim inhibisyonu yaparak eritrositlerin esnekliğini (fleksibilitesini veya deformabilitesini) artıran ve hücre içi cAMP seviyesini artıran bir medikal ajandır. Periferik vazodilatör ilaçların çoğundan farklı olarak kanda

reolojik etkiler de gösterirler ve kan vizkositesini azaltarak kanın akışkanlığını artırır. Bu etkiler nedeniyle aynı anda trombosit agregasyonunu da azalttığı gözlenmiştir. Proinflamatuvar sitokin üretimini azaltarak endotel fonksiyonunu ve doku oksijenizasyonunu artırır.^{126,127} Pentoksifilin 5'-Nükleotidaz enzimini inhibe ederek etki eder. 5'-Nükleotidaz enziminin down regülasyonu sonucunda dokularda ATP kaybını azaltmakta, iskemi dönemi ve sonrasında doku enerji tüketimini minimumda tutarak hücre hasarını engellemektedir. Pentoksifilin etkisini özellikle iskemik bölgelerde kan dolaşımını artırarak da göstermektedir.⁶⁰ Mide bağırsak yolunda iyi emilebilen ve karaciğerde metabolize edilen Pentoksifilin molekülünün yarılanma ömrü 2 saattir. Plazma proteinlerine bağlanmayan bu molekülün % 93-95'i böbreklerden atılır.¹²⁸



Şekil 17. Pentoksifilin molekülünün kimyasal formülasyonu

Pentoksifilin damar içi aşırı pıhtılaşmayı önler, yara iyileşmesinde rol oynar ve aynı zamanda immun modülatör olarak da etki gösterir. Klinik kullanımda serebrovasküler hastalıklar, intermittant klaudikasyo ve sepsis durumlarında rutin olarak kullanılmaktadır.⁶⁰ Pentoksifilin klaudikasyo olan kaslarda mitokondri fonksiyonlarını düzenler ve en fazla düzelme, başlangıçta en kötü durumdaki mitokondrilerde olur.¹²⁹ Alt ekstremitte arterlerinin patolojilerinde periferik vazodilatörlerin çoğu, intermittan klaudikasyo yani ağrı meydana gelinceye kadar hastanın yürüyebildiği mesafeyi (ağrısız yürüyebilme mesafesi), (pain-free walking distance) belirgin miktarda değiştirmez. Ancak pentoksifilinin hemoreolojik etkisiyle ağrısız yürüyebilme mesafesini artırabildiği yürüyen zeminli ergometrede yapılan incelemelerle kanıtlanmıştır.¹³⁰ Literatürdeki güncel çalışmalar, pentoksifilinin nötrofillerin kemotaktik yanıtını

artırabildiğini, nötrofil ve monositlerde fagositoz ve süperoksit üretimini azalttığı gösterilmiştir.¹³¹ I/R-indüklenmiş spinal kord hasarı olan hastalarda 50 mg/kg/gün pentoksifilin alımının inflamatuvar indeks ve oksidatif stresin azalmasında faydalı etkileri olduğu görülmüştür.¹³² Yine yapılan çalışmalarda pentoksifilin kontrol gruplarına göre cilt fleplerinin yaşayabilirliğini artırdığı görülmüştür.³ Doku canlılığındaki bu bariz artış pentoksifilin reolojik özelliklerinin deri fleplerinin patofizyolojisini değiştirmede önemli olduğunu düşündürmektedir.³

2.11. Sıçan Sırt Derisinin Kanlanması ve Çalışmada Kullanılan Flep Modeli

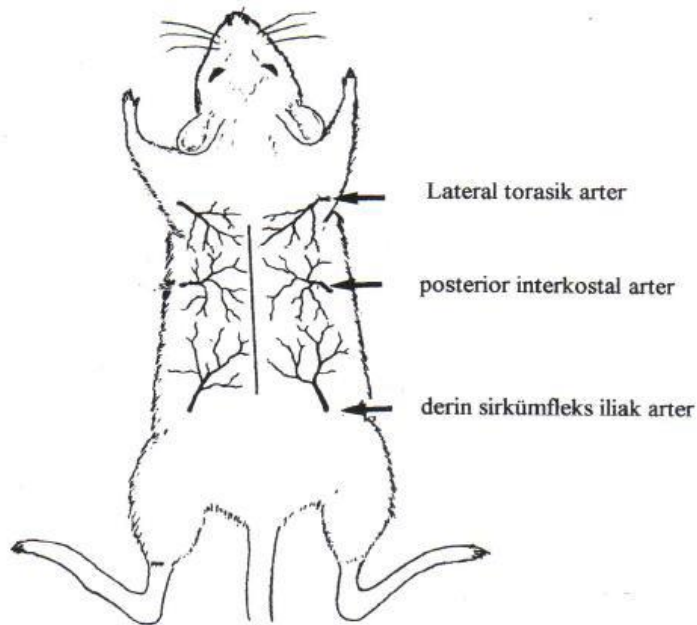
Sıçanlar (Ratlar) uzun süredir plastik cerrahi araştırmacılarına flep anatomisinin ve fizyolojisinin birçok yönünü incelemek için çok yönlü bir model sağlamıştır. Bu, vücudun çeşitli bölgelerinde tasarlanan basit cilt flepleriyle başladı ve serbest doku transfer modellerinin gözden geçirilmesiyle devam etti. Henüz cevaplanmamış çok sayıda soru olduğu için, sıçanlar her zaman bu alanda bir araştırma kaynağı olarak yaygın olarak kullanılmaya devam edecektir.¹³³

DeneySEL sağ kalım çalışmalarında en sık kullanılan flepler rat dorsumundan kaldırılan cilt flepleridir. Bu flepleri 1965 yılında McFarlane kendi adını verdiği flebi standardize etmiştir. McFarlane spesifik uzunlukta olmayıp anatomik kemik işaretler arasında yer alan kranial bazlı dorsal rat flebini tanımlamıştır.¹³⁴

Ratlarda epidermis göreceli olarak daha ince olup, kalınlığı yaklaşık 22-23 mikrometredir. Stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum korneum tabakaları belirgin olup, stratum lucidum tabakası yoktur. Dermis; yüzeysel, papiller ve derin retiküler katmanlarından oluşur. Kollajen, elastik ve retiküler lif içeriği yoğundur. Kıl folikülleri, kan damarları ve yağ bezleri retiküler tabaka içinde, retiküler tabakanın altındaki bazal membranın hemen üzerinde bulunurlar. Sıçan dorsum cildinin hemen altında panniculus carnosus adı verilen kas tabakası ve zengin damar ağı ile beslenen fasyası vardır. Normal ağırlıktaki bir ratın cilt altında az miktarda adipöz doku bulunur. İnterskapular alanda, boyun ön kısmında, aksiler bölgede ve inguinal bölgede cilt altı kahverengi yağ dokusu, diğer bölgelerde beyaz yağ dokusu bulunmaktadır. Yağ dokusu ve kapillerler özellikle kıl folikülleri çevresinde yoğunlaşır. Ratların gevşek cilt yapıları, pannikulus karnozus tabakası sebebiyle insan derisinden farklı gibi görünse de

insan derisinde subkutan dokunun yapısının pannikulus karnozusa benzer olduğu gösterilmiştir.¹³⁵

Ratlarda sırt derisinin anatomisini inceleyecek olursak temel olarak muskulokutan perforatör arterler ve aksiyel arterler ile beslenir. Muskulokutan perforatör arterlerin anatomik olarak belli lokalizasyonları bulunmamaktadır. Sıçan sırt derisini besleyen aksiyel arterler, kranialde sağ ve sol torakodorsal arterler (a.thoracodorsalis), kaudalde orta sakral arter (a.sacralis mediana) ve bu arterlerin terminal dallarıdır (rr.sacrales). İnsanlarda olduğu gibi torakodorsal arter, subskapular (a.subscapularis) arterin dalıdır. Subskapular arter, aksiller (a.axillaris) arterin dalı olan trunkus sirkumfleks subskapularis''den (tr.circumflexo-subscapular) dallanır. Subskapular arter daha sonra skapulanın lateral kenarına doğru yönelerek, omuz bölgesi kaslarına dallar verir. Torakodorsal arter, teres majör kasını geçerek sırta doğru uzanım gösterir. Sırt derisini, deri alt dokularını ve en son latissimus dorsi kasını besler. Orta sakral arter, abdominal aortun (aorta abdominalis) sağ ve sol iliyak arterlere ayrıldığı seviyede, abdominal aortdan çıkar. Yanlara, yukarıya ve aşağıya doğru, dorsal (r.dorsalis), spinal (r.spinalis) ve lateral (a.sacralis lateralis - a.caudalis lateralis) dallar verir. Sıçan sırt derisinin kaudal kısmının kanlanması sağlar.¹³⁶ (şekil 18)



şekil 18. Sıçan dorsal cildinin kanlanması¹³⁶

2.12. İndosiyanin Yeşili Anjiyografisi

İndosiyanin yeşili (ICG) 1950 yıllarından itibaren tıp dünyasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Diğer ilaçlara göre kısmen toksik olmayan, karaciğerde hızlı bir şekilde elimine olabilen floresans ışına yapan bir ajandır. ICG, tıp dünyasında daha çok kalp ve karaciğer fonksiyonlarının ölçülmesinde kullanılmıştır.¹³⁷ 1970’li yıllarda ICG kan düzeyi ile ilgili çalışmalar sürerken oftalmolojik vakalarda da kullanımı artmaya başlamıştır.¹³⁷ 1990’lı yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmeler ICG anjiyografisi kullanımını kolaylaştırmıştır. Milenyum sonrasında dijital görüntülemelerdeki gelişmeler sayesinde doku düzeyinde dolaşımın fotoğrafçılığı tatmin edici seviyelere ulaşmıştır.¹³⁸ ICG venöz dolaşıma katıldıktan sonra %98 oranında plazma proteinlerine bağlanır ve bunun sayesinde ekstrasvazasyon oluşmaz. Plazma proteinlerinin yapısını bozmaz. Serbest dolaşan ICG karaciğerde glutatyon S-transferaz ile safra taşınma yoluyla atılır.^{139,140,141} 2mg/kg’dan ve bu dozdan daha düşük enjeksiyonlarda -hastanın iyota karşı hipersensitivitesi olmaması kaydı ile- hemen hemen toksik değildir.^{138,142} İlacın letal dozu 50-80 mg/kg’dır.

Karaciğer ICG dakikada enjekte edilen miktarın % 18-24 ünü temizleme oranına sahiptir. ICG’nin uygulanması sonrasında ilk 10 ile 20 dakika içerisinde karaciğerin vaskülaritesine bağlı olarak genellikle 3-4 dk’lık bir yarı ömrü mevcuttur. ICG yarılandıktan sonra eliminasyonu yavaşlar ve eser miktarda ICG’nin plazma içerisinde kalmasına izin verilir.^{143,144}

2000’li yıllarından beri ICG gelişen teknoloji ile beraber dokuların kanlanması ve sağ kalımın ön görülmesi açısından plastik cerrahisinde aktif kullanılmaktadır. SPY Elite Sistem cerrahi sırasında doku kanlanmasını göstermek için geliştirilmiştir. Lazer yardımıyla dermis ve subkutan yağ dokusundaki damarların gösterilmesi ilkesine dayanır. Bu sayede subdermal pleksusun ne derece dokuyu kanlandığı belirlenebilir.^{145,146} Hastaya ICG enjeksiyonu sonrası eksternal bir lazer yardımıyla yakın kızıl ötesi dalga boyunda ışına yapılır ve mevcut kamera bu ışınmayı birçok filtreden geçirdikten sonra okuyarak görüntüyü meydana getirir.¹³⁸ Bu işlem cerrahi sırasında eş zamanlı gerçekleştiği için cerrahi planı etkileyerek sağlıklı kararlar verilmesine yardımcı olur. Böylece oluşabilecek yara komplikasyonları en aza indirilebilir.¹⁴⁷

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığının 08.07.2021 tarihli onayı ve TTU-2021-14127 proje numarası ile Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Fonu desteğiyle yürütülmüştür.

Çalışmamız, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde, Çukurova Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Bu çalışmada toplamda 32 adet, ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen “Wistar Albino” sıçanlar kullanıldı. Uygun kafeslere alınan ratlar oda sıcaklığı 24-25°C olan, nem oranı %40-50, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyacı, standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı.

Bu çalışma ile carbon-monoxide releasing molecule-3 (CORM-3) ün cilt fleplerinin beslenmesine olan etkisinin araştırılması ve bu etkinin etkinliği kanıtlanmış olan pentoksifilin ajanı ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Flep beslenmelerinin karşılaştırılması amacıyla; nekroz ve yaşayan alanların oranı (ImageJ programı), ışık mikroskopisi ile epidermis ve dermiş tabakaları, kollajen dağılımı gibi morfolojik bulgular incelenmiştir. Flep dokusu özel boya ile boyanarak VEGF ekspresyonu parametre olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca elektron mikroskopisi ile hücre içi organellerin değişimi incelenmiştir. Yine deneyin son gününde ICG enjekte edilerek SPY Flourescence ile flep kanlanma oranları karşılaştırılmıştır.

Bu amaç doğrultusunda çalışmada toplam 32 rat her bir grupta 8'er rat olmak üzere toplam 4 gruba ayrılmıştır.

3.1. Çalışma Grupları

Bu amaçla 40 adet sıçan 4 gruba ayrılarak incelendi. Buna göre:

Grup 1 (n=8): (Kontrol grubu) Bu grup mevcut parametrelerin karşılaştırılması amacı ile diğer gruplarla aynı beslenme ve ortam sağlanarak herhangi bir cerrahi işlem ya da ilaç enjeksiyonu yapılmadan takip edilen grup.

Grup 2 (n=8): (Deney Kontrol grubu) İntraperitoneal anesteziyi takiben sıçan sırtı derisinden distal bazlı ortalama 3×9 cm’lik standart “McFarlane” flebi pannikulus karnosus’u içerecek şekilde eleve edildi. Flep 3/0 prolene suture ile primer olarak yatağına suture edildi. Herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmayan grup.

Grup 3 (n=8): (CORM-3 grubu) İntraperitoneal anesteziyi takiben sıçan sırtı derisinden distal bazlı ortalama 3×9 cm’lik standart “McFarlane” flebi pannikulus karnosus’u içerecek şekilde eleve edildi. Flep 3/0 prolene suture ile primer olarak yatağına suture edildi. Cerrahi işlem sonrası postop 0. Günden itibaren 6 gün süre ile 8 mg/kg/gün carbon-monoxide releasing molecule-3 (CORM-3) intraperitoneal verilerek takip edilen grup.

Grup 4 (n=10): (Pentoksifilin grubu) İntraperitoneal anesteziyi takiben sıçan sırtı derisinden distal bazlı ortalama 3×9 cm’lik standart “McFarlane” flebi pannikulus karnosus’u içerecek şekilde eleve edildi. Flep 3/0 prolene suture ile primer olarak yatağına suture edildi. Cerrahi işlem sonrası postop 0. Günden itibaren 6 gün süre ile 40 mg/kg/gün Pentoksifilin intraperitoneal verilerek takip edilen grup.

3.2. Deneyde Kullanılan Malzemeler ve İlaçlar

- Ksilazin hidroklorür (Xylazinbio®, Bioveta)
- Ketamin hidroklorür (Ketasol®, Richter Pharma ag)
- Pentoksifilin (Trentilin® Ampul 100 mg/5 ml)
- Carbon-monoxide releasing molecule-3 (CORM-3) (Tocris 50 mg ampul) (CAS No:475473-26-8)
- İndosiyenin yeşili (DID Indocyanine Green [Dongindang, Inc., Gyeonggi-do, Republic of Korea])
- SPY (Novadaq Technologies Inc, Richmond, British Columbia, Kanada)
- Canon 1300D fotoğraf makinesi
- Cetvel ve çizim kalemi
- Patoloji kabı-formol
- Hypafix
- Povidon iyot
- Tıraş makinesi

- Bistüri (15 numara) (11 numara) (10 numara)
- 1 adet mikro makas
- 1adet mikro penset
- Adson penset
- Doku makası
- Sütür makası
- Portegue
- Spanç
- Klemp
- Enjektör 2,5 ml-5 ml
- İnsülin enjektörü 1 ml
- Sarı-mor intraket
- Şeffaf flaster
- 3/0 prolén
- Steril gazlı bez
- Tartı aleti
- Steril eldiven/non-steril eldiven

3.3. Deneyde Uygulanacak Medikal Ajanların Hazırlanması

- 1- Carbon Monoxide Releasing Molecule-3 (TOCRIS CORM-3) (Cat no: 5320) (CAS Number: 475473-26-8): 50 mg ampul toz halinde hazır temin edilen preparatlar -20 °C'de saklandı. Her ampul 5 cc distile su ile sulandırılarak -20 °C'de saklandı. Her bir rata 8 mg/kg/gün olacak şekilde intraperitoneal (i.p.) CORM-3 uygulandı. (Şekil 19)



Şekil 19. Carbon Monoxide Releasing Molecule-3 (TOCRIS CORM-3)

2- Pentoksifilin: Trentilin® Ampul 100 mg/5 ml şeklinde temin edilen pentoksifilin oda sıcaklığında saklanarak her bir rata 40 mg/kg/gün dozunda verildi. (Şekil 20)



Şekil 20. Pentoksifilin (Trentilin® Ampul 100 mg/5 ml)

3.4. Cerrahi Teknik ve CORM-3 ve Pentoksifilin'in Enjeksiyonu

Ratlar üzerindeki tüm cerrahi girişimler % 10'luk ketamin HCl (Ketasol %10) (40 mg/kg) ve ksilazin HCl (Xylazinbo % 2) (10 mg/kg) intramuskuler enjeksiyonu ile anestezi işlemi altında başlatıldı ve ratlar prone pozisyonunda yatırılıp tüm sırt bölgesi tüyleri traş edildi. Operasyon steril koşullarda ve aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi (Şekil 21). Cerrahi işlem öncesinde povidon-iyodin ile sıçanların asepsisi sağlandı. Cilt kalemi ile ortalama 3x9 cm boyutlarında kaudal pediküllü dorsal, Mc Farlane sıçan cilt flebi tasarlandı. Çizimi takiben posterior iliak krest anatomik işaret noktası alınarak pannikulus karnosus dahil olacak şekilde kaudal pediküllü flep kaldırıldı ve tekrar yerine 3/0 prolene ile sütüre edildi. (Şekil 22)

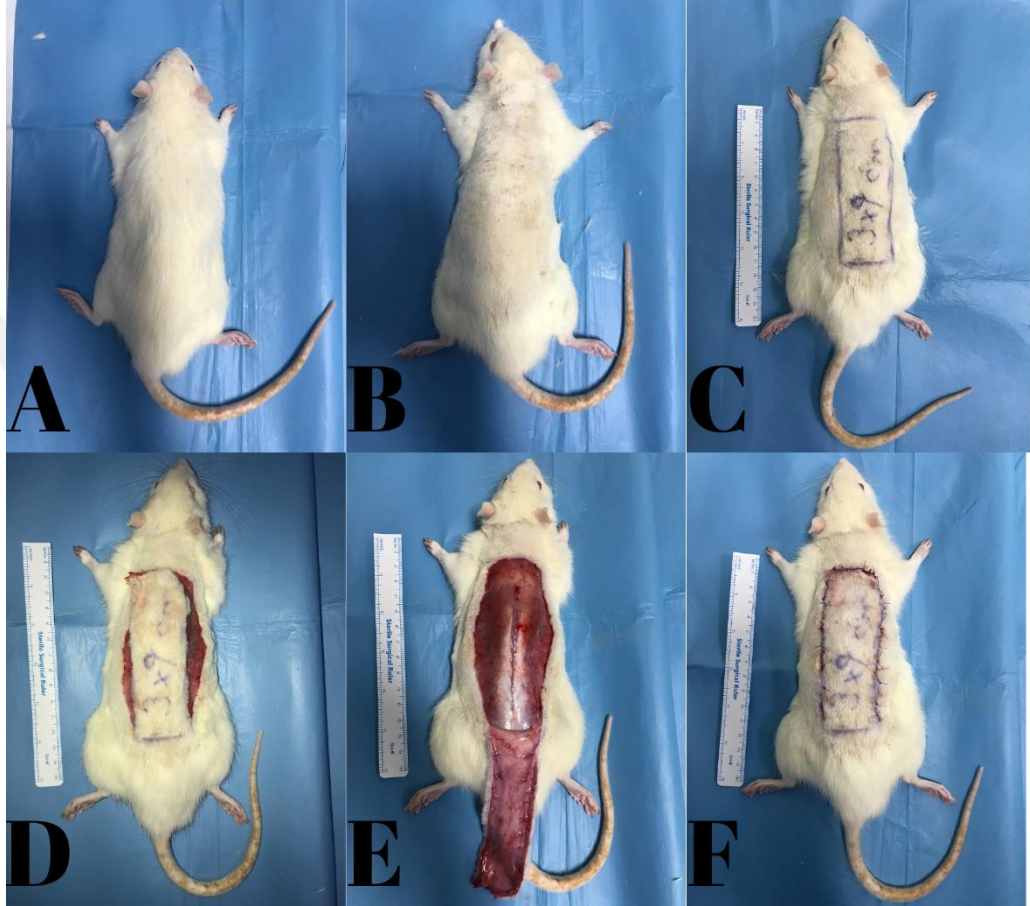
Deneklerin birbirlerine zarar vermemesi için farklı kafeslere alındı.



Şekil 21. Ksilazin hidroklorür (Xylazinbio®, Bioveta), Ketamin hidroklorür (Ketasol®, Richter Pharma ag)

Carbon-monoxide releasing molecule-3 (CORM-3) (Tocris 50 mg ampul) (CAS No:475473-26-8) 50 mg toz halinde bulunan içerik 5 ml distile su ile sulandırıldı. Her bir rata postop 0. 1. 2. 3. 4. 5. günlerde karın bölgesi alkol ile silinerek 8 mg/kg olacak şekilde 26 Gauge insülin iğneleri ile intraperitoneal enjeksiyon yapıldı.

Pentoksifilin (Trentilin® Ampul 100 mg/5 ml) hazır preperat olarak temin edildi. Her bir rata postop 0. 1. 2. 3. 4. 5. günlerde karın bölgesi alkol ile silinerek 40 mg/kg olacak şekilde 26 gauge insülin iğneleri ile intraperitoneal enjeksiyon yapıldı.



Şekil 22. Anestezi altında hazırlanmış rat (A), traş edilmiş rat (B), 3x9 cm tasarlanmış flep çizimi (C), flep cilt insizyonu (D), eleve edilmiş Mcfarlane flebi (E), aynı bölgesine suture edilmiş flep (F)

3.5. Deneyin Sonlandırılması ve Bulguların Toplanması

Postoperatif 6. günde denekler % 10'luk ketamin HCl (40 mg/kg) ve ksilazin HCl (10 mg/kg) anestezisi altında Canon 1300D fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı. Tüm fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarıldı. Tüm flep ve flep nekroz alanları bilgisayar ortamında ImageJ modelleme programı yardımıyla cm² cinsinden not edildi. Bulunan rakamlar yardımıyla flep nekroz oranları hesaplandı.

3.5.1. ImageJ Programı Yardımı ile Nekroz Yüzdesinin Hesaplanması

Deney sonunda sıçanlar fotoğraflanarak bilgisayar ortamına aktarılan görüntüler ImageJ programında değerlendirildi. Flebin uzun aksı olan 9 cm'lik kenarı referans uzunluk olarak alındı. Nekroz kenarları işaretlenerek programdan nekroz alanı cm^2 cinsinden hesaplandı. (Şekil 23)



Şekil 23. ImageJ Programı Yardımı ile Nekroz Alanının Hesaplanması

3.5.2. İndosiyanin Yeşili Anjiyografisi

Operasyon sonrası 6. günde sedoaneljezi altında kuyruk bölgelerinden 24 ve 26 gauge intraketlerle damar yolu açıldı. Ardından 0,3 mg/kg'dan indosiyanin yeşili (DID Indocyanine Green [Dongindang, Inc., Gyeonggi-do, Republic of Korea]) (Şekil 24) hazırlanarak SPY (Novadaq Technologies Inc, Richmond, British Columbia, Kanada) cihazına yerleşildi. SPY cihazının lazer işaretleme yardımı ile flep bölgesine

odaklanarak hazırlandı. Kuyruk veninden açılan damar yolundan bolus şeklinde ilaç uygulandı ve aynı esnada SPY cihazında görüntülemeler yapıldı. Her bir denekten 90 saniye boyunca saniye de 25 görüntü olacak şekilde kayıt alındı. (Şekil 25)



Şekil 24. İndosiyanin yeşili (DID Indocyanine Green [Dongindang, Inc., Gyeonggi-do, Republic of Korea])



Şekil 25. SPY (Novadaq Technologies Inc, Richmond, British Columbia, Kanada) ile postoperatif ölçümlerin yapılması

3.5.3. Histopatolojik Örneklerin Toplanması ve Değerlendirilmesi

ICG enjeksiyonu ve SPY cihazı ile ölçümler tamamlandıktan sonra histopatolojik örneklemeler için tüm gruplarda 3x9 cm'lik flep çizimlerinin 5. cm'sinden histopatolojik inceleme için örnekler alındı. Ardından Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim dalına inceleme amacı ile teslim edildi.

3.5.3.1. Işık Mikroskopik Yöntemler

Işık mikroskopik incelemeler için bütün gruplardan elde edilen deri dokusu örnekleri, %10'luk nötral formalin içerisine alındı ve oda ısısında 72 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra nötral formalinin uzaklaştırılması için dokular su ile yıkandı ve Leica TP 1020 Ototeknikon Cihazı ile Tablo 3' te belirtilen doku takip yöntemi uygulandı.

Tablo 3. Işık mikroskopik doku takip işlemi

Oda sıcaklığında	Paraformaldehit	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Bloklama işlemini takiben mikrotom ile 5 µm kalınlığında alınan histolojik kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Olympus BX53 ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları alındı. Bloklardan ayrıca immünohistokimyasal incelemeler için de doku kesitleri alındı ve uygun yöntemlerle hazırlandı.

3.5.3.2. İmmünohistokimyasal Yöntemler

Vasküler endotelial growth faktör (VEGF) aktivitesinin belirlenmesi amacı ile elde edilen histolojik kesitler, polilizin kaplı lamalar üzerine alındı. Buzdolabında bekletilen kesitler işaretleme işlemine geçilmeden önce kurutularak, tekrar buzdolabına alındı ve 15 dakika kadar bekletildi. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra tekrar kurutulan kesitler, 60 °C’de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra doku kesitleri, oda ısısında ksilol serilerinden geçirildi ve derecesi giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edildi ve distile su içerisine alındı. Kesitler daha sonra, sitrat solüsyonu (pH:6) içerisine alınıp 95°C’lik su banyosunda, 45 dakika süreyle tutularak antijenlerin açığa çıkarılması işlemi gerçekleştirildi. Oda ısısında 60 dk soğutulan kesitler, distile su ile yıkandı ve %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içerisine alındı. H₂O₂’te yaklaşık 10 dk kadar bekletildikten sonra, kesitler, saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice silinip, kurulandıktan sonra, üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek amacıyla blocking (TL-015-HD, Thermo-Scientific, USA) damlatıldı ve oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra kesitler, saf su ve fosfat tamponundan geçirildi ve dokuların etrafı kurulandı. Daha sonra 1/100 oranında dilüe edilen anti-VEGF (VEGF; anti-rat rabbit poyclonal antibody, RB-9031-P0, Thermo-Scientific, USA) primer antikoru damlatıldı. Primer antikoru damlatılan tüm kesitler +4°C’de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikoru yerine, tampon solüsyonu damlatıldı. Primer antikoruyla muamele edilip 1 gece +4°C’de ve ardından 1 saat oda bekletilen kesitler, daha sonra distile su ve PBS’den geçirildi ve üzerlerine HRP polimer (TL-015-HD, Thermo-Scientific, USA) damlatılarak 15 dk süreyle oda ısısında tutuldu. 15 dk sonra distile su ve PBS’de yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp DAB plus substrat (TL-015-HD, Thermo-Scientific, USA) damlatılarak, 10 dakika süreyle oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS’den geçirilen kesitler üzerine, DAB (Deaminobenzidine) solüsyonu damlatıldı ve 5 dakika bekletildi, çeşme suyu içerisinde yıkandı ve doku kesitleri, zıt boyama için hematoksilin ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı, Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japonya) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.5.3.2.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi

VEGF ekspresyonunun araştırılması amacıyla immunohistokimyasal skorlama yöntemi uygulandı. İmmünohistokimyasal skorlama için 40'lık objektifte rastgele seçilen 5 alanda H Skorlama sistemi kullanıldı.

Boyanma derecesi = 0 (Hiç boyanma yok)

= ++ (Zayıf derecede boyanma)

= +++ (Orta derecede boyanma)

= +++++ (Güçlü derecede boyanma) şeklinde değerlendirildi.

3.5.3.3. Elektron Mikroskopik Yöntemler

Elektron mikroskopik değerlendirme için alınan deri dokusu parçaları, Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %5 lik glutaraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra üzerinde birkaç damla glutaraldehit olan dişçi mumuyla kaplı petri üzerinde jilet yardımıyla 1 mm³ lük parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar glutaraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat kadar tespit edildi. Böylece dokular glutaraldehit ile toplam 4 saat tespit edilmiş oldu. Daha sonra dokular Millonig fosfat tamponunda iki defa 10'ar dk çalkalandı ve ardından Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1 lik osmium tetraoksit (OsO₄) solüsyonu ile ikinci defa tespit edildi. İki saatlik osmium tetraoksit tespitinden sonra dokular fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dakika yıkandı. Daha sonra dokular, Tablo 4'te belirtilen sıraya göre derecesi giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.

Tablo 4. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon işlemi

%50'lik etil alkol	+4°C	15 dakika
%70'lik etil alkol	+4°C	15 dakika
%86'lik etil alkol	+4°C	15 dakika
%96'lik etil alkol	+4°C	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C	15 dakika

Buraya kadar olan işlemler +4°C’de gerçekleştirildi. Daha sonra Tablo 5’te belirtilen işlemler oda ısısında gerçekleştirildi.

Tablo 5. Elektron mikroskopik doku takibinde şeffaflandırma işlemi

%100 Etil alkolde	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen oksitte	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen oksitte	Oda sıcaklığında	15 dakika

Dehidratasyon ve şeffaflandırma işlemleri tamamlandıktan sonra, doku parçaları 1 hacim propilen oksit ve 1 hacim rezin’den (gömme materyali) oluşturulan karışım içerisinde 2’şer defa 30’ar dakika süreyle bekletildi. Bu işlemlerden sonra doku parçaları taze hazırlanmış rezin içerisine alınarak 1 gece boyunca rotatorda döndürülerek karıştırıldı ve rezinin doku parçaları içerisine daha iyi nüfuz etmesi sağlandı. Taze rezin (gömme materyali) Tablo 6’da belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 6. Gömme materyalinin hazırlanışı

Araldehit (CY 212)	20 ml
Sertleştirici (HY 964)	20 ml
Hızlandırıcı (DY 064)	0,6 ml
Plastikleştirici-Dibütil Fitalat	1ml

Ertesi gün rotatordan alınan doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak Beem kapsüllere gömüldü ve 60 °C etüvde 48 saat polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Ultracut S ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve doku bloklarında uygun alanların seçimi yapıldı. Belirlenen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere alınarak %70’lik etil alkolde hazırlanan doymuş uranil asetat ile Reynolds’un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japan) ile incelendi ve mikrograflar elde edildi.

3.6. İstatistiksel Metod

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin analizinde SPSS 21.0 paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama ve standart sapma değerleri verildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar Mann Whitney U test ile yapıldı. Elde edilen sonuçlar %95 ($p < 0.05$) anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

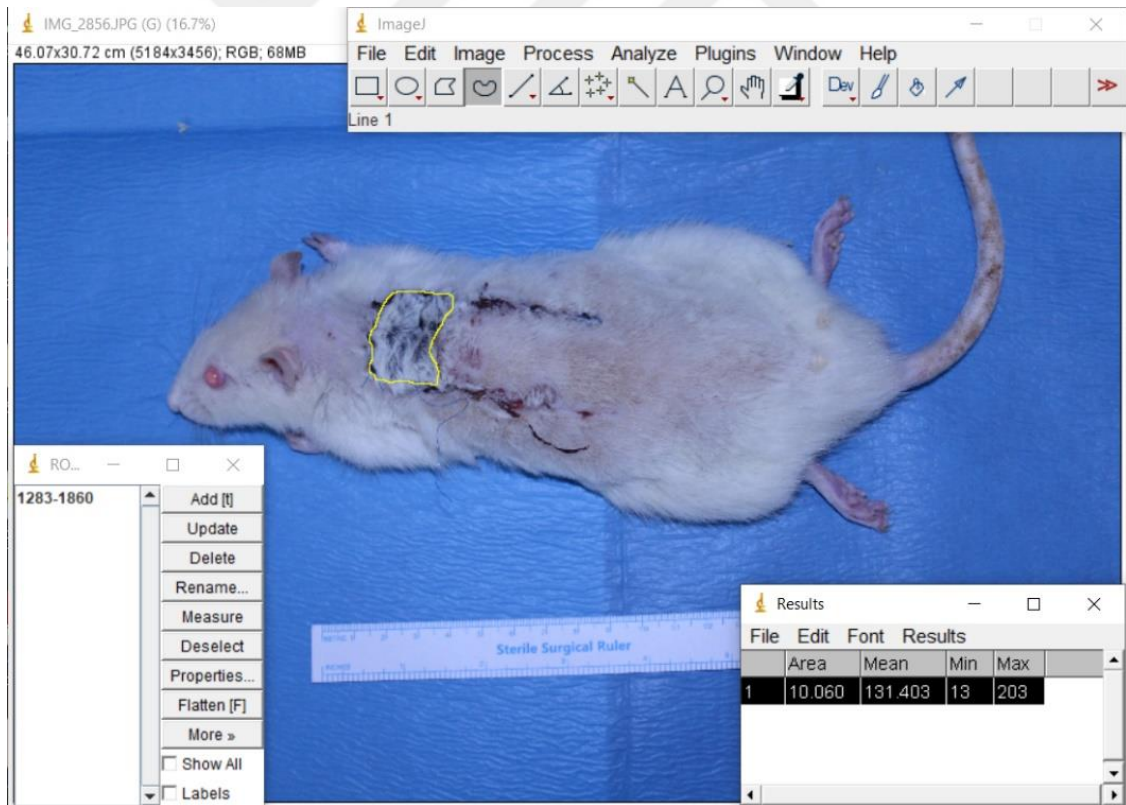


4. BULGULAR

Yapılan çalışmamız sonucunda elde edilen sonuçlar flep nekroz oranları, ışık ve elektron mikroskopisi bulguları, immünohistokimyasal bulgular ile değerlendirildi.

4.1. Nekroz Oranları

Deney sonunda sıçanlar gruplar halinde Canon 1300D ile fotoğraflandı. Bilgisayar ortamına aktarılan görüntüler ImageJ programında değerlendirildi. Flebin uzun aksı olan 9 cm'lik kenarı referans uzunluk olarak alındı. Nekroz kenarları işaretlenerek programdan nekroz alanı cm^2 cinsinden hesaplandı. (Şekil 26)



Şekil 26. ImageJ programı yardımıyla nekroz sahasının işaretlenmesi ve nekroz alanının hesaplanması

Tablo 7. Deney Kontrol Grubunun Nekroz Bulguları

Deney Kontrol Grubu	Nekroz (cm ²)	Nekroz (%)
1	9,31	34,48
2	8,43	31,22
3	11,21	41,52
4	9,87	36,56
5	10,06	37,26
6	10,16	37,63
7	7,64	28,30
8	8,98	33,26

Tablo 8. CORM-3 Grubunun Nekroz Bulguları

CORM-3 Grubu	Nekroz (cm ²)	Nekroz (%)
1	6,12	22,67
2	5,67	21,00
3	5,54	20,52
4	4,68	17,33
5	3,78	14,00
6	4,8	17,78
7	4,32	16,00
8	5,08	18,81

Deney kontrol grubuna göre CORM-3 grubunun nekroz oranları karşılaştırıldığında, ortalama % 35,03'e karşı % 18,29 nekroz oranı ile CORM-3'ün nekroz oranlarını azalttığı görülmektedir. (Tablo 7) (Tablo 8)

Tablo 9. Pentoksifilin Grubunun Nekroz Bulguları

Pentoksifilin Grubu	Nekroz (cm ²)	Nekroz (%)
1	5,11	18,93
2	4,98	18,44
3	4,46	16,52
4	4,73	17,52
5	5,86	21,70
6	5,41	20,04
7	6,41	23,74
8	6,03	22,33

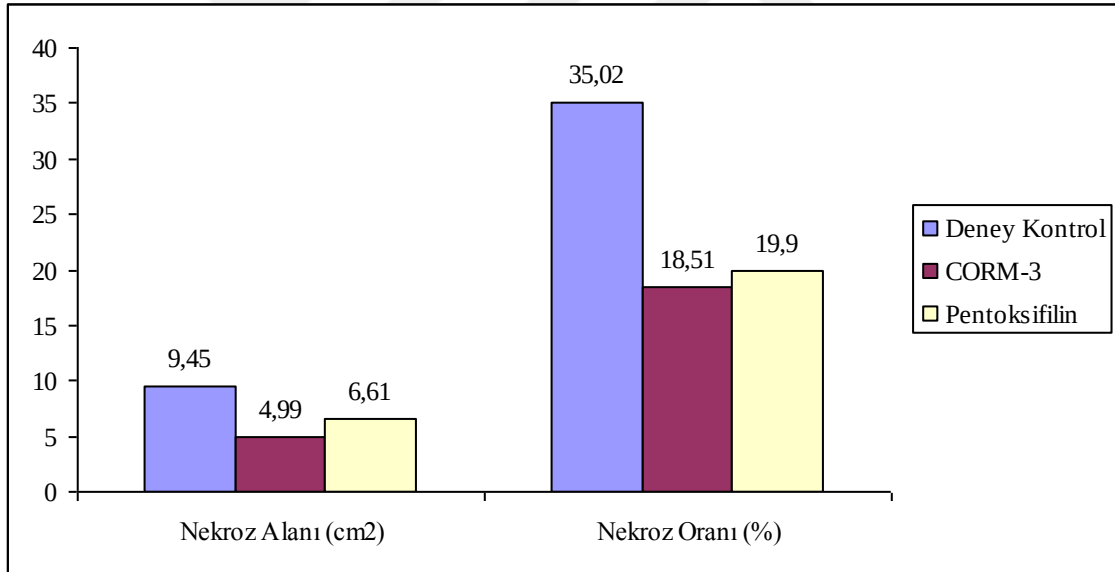
Deney kontrol grubuna nazaran Pentoksifilin grubunun nekroz oranları karşılaştırıldığında ortalama % 35,03'e karşı % 19,90 nekroz oranı ile pentoksifilin nekroz oranlarını azalttığı görülmektedir. (Tablo 7) (Tablo 9)

CORM-3 grubu pentoksifilin grubuna kıyasla nekroz oranları yakın değerlerde olsa da daha başarılı bulunmuştur. (Tablo 8) (Tablo 9)

Gruplara göre nekroz alanı ve nekroz oranı değerleri Tablo 10'da ve Şekil 27'de görülmektedir. Buna göre nekroz alanı ve oranının en yüksek olduğu grup deney kontrol grubu iken en düşük olduğu grup ise CORM-3 grubudur.

Tablo 10. Gruplara göre nekroz alanı ve nekroz oranı

Grup		Nekroz Alanı (cm ²)	Nekroz Oranı (%)
Deney Kontrol	Med (Min-Maks)	9.59 (7.64-11.21)	35.52 (28.30-41.52)
	Ort.±ss	9.45±1.11	35.02±4.13
CORM-3	Med (Min-Maks)	4.94 (3.78-6.12)	18.29 (14-22.67)
	Ort.±ss	4.99±0.76	18.51±2.83
Pentoksifilin	Med (Min-Maks)	5.26 (4.46-6.41)	19.48 (16.52-23.74)
	Ort.±ss	6.61±2.22	19.90±2.50



Şekil 27. Gruplara göre nekroz alanı ve nekroz oranı

Gruplar arasında nekroz alanı ve oranı açısından farklılık olup olmadığını tespit etmek için yapılan Mann Whitney U test neticesinde deney kontrol grubu ile CORM-3 grubu arasında nekroz alanı ve nekroz oranı açısından farkın anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). Yapılan analiz sonucunda deney kontrol grubu ile pentoksifilin grubu arasında nekroz alanı ve nekroz oranı açısından farkın anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). CORM-

3 grubu ile pentoksifilin grubu arasında ise nekroz alanı ve oranı açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 11).

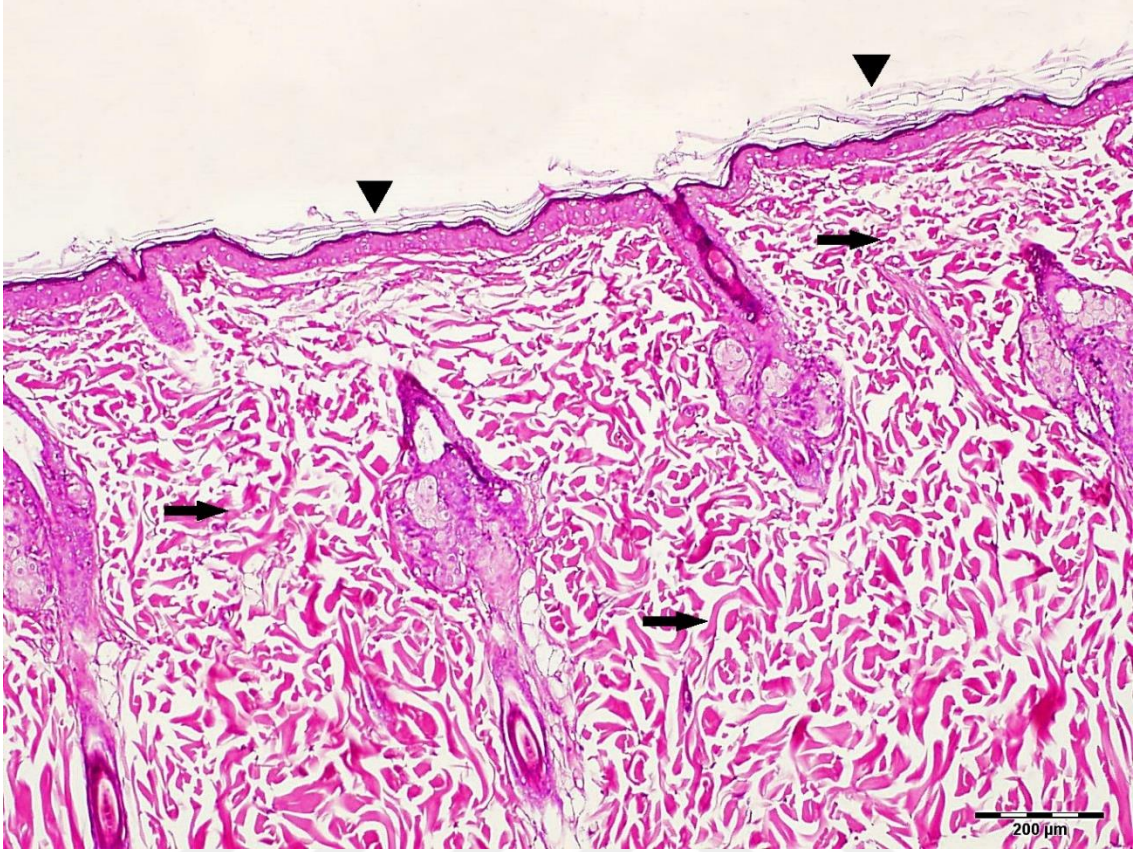
Tablo 11. Gruplara göre nekroz alanı ve nekroz oranı karşılaştırılması

	Nekroz Alanı (cm²)	Nekroz Oranı (%)
Deney Kontrol-CORM-3	0.001	0.001
Deney Kontrol-Pentoksifilin	0.001	0.001
CORM-3-Pentoksifilin	0.345	0.345

4.2. Işık Mikroskopisi Bulguları

4.2.1. Kontrol Grubu

Herhangi bir işlem yapılmayan tamamen sağlam kontrol grubuna ait deri örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde; derinin epidermis ve dermis tabakalarının normal histolojik yapıda olduğu görüldü. Epidermisin keratinize çok katlı yassı epitel yapısında olduğu, dermisin ise düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında olduğu izlendi. Epidermisin en üst tabakası olan stratum korneum tabakasının normal kalınlıkta olduğu görüldü. Dermis tabakasında deri ekleri olan kıl folikülleri ve sebace bezler ayırt edildi. Düzensiz sıkı bağ dokusunu oluşturan kollajen liflerin dağılımının ve yoğunluğunun normal olduğu tespit edildi. Ayrıca dermiste kan damarları ve düz kas lifleri de izlendi. Epidermis ve dermiste nekroz, ödem, kollajen dansitesi, vasküler dansite, lenfosit infiltrasyonu ve herhangi bir fibroblast proliferasyonu belirlenmedi (Şekil 28).

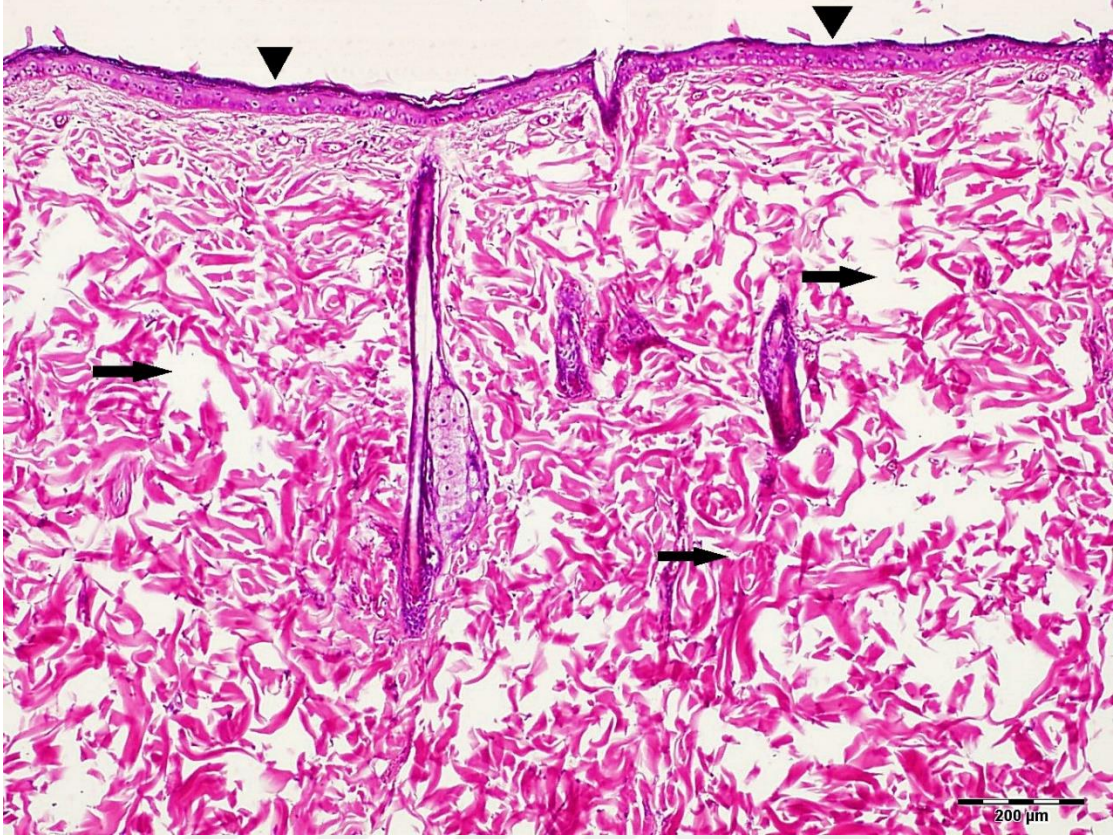


Şekil 28. Kontrol grubu ışık mikroskopik görünümü

Epidermis ve dermis tabakalarının normal yapıda olduğu görülmektedir (oklar). Stratum korneumun normal kalınlıkta olduğu izlenmektedir (ok başları). Bar=200 μ m

4.2.2. Deney Kontrol Grubu

Sadece flep uygulanıp herhangi bir tedavi yöntemi uygulanmayan deney grubuna ait deri örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, epidermisin korneum tabakasında incelme ve deskuamasyon görüldü. Dermiste bulunan düzensiz sıkı bağ dokusunu oluşturan kollajen liflerin yapısında ve dağılımında değişiklikler izlendi. Bazı alanlarda yoğun kollajen lif birikimi görülürken, bazı alanlarda kollajen liflerin daha seyrek şekilde dağılım gösterdiği dikkati çekti. Kollajen liflerde kalınlaşma izlendi. Kollajen liflerin seyrek olduğu bölgelerde koyu boyanmış çekirdekleriyle karakterize lenfosit infiltrasyonu tespit edildi (Şekil 29).

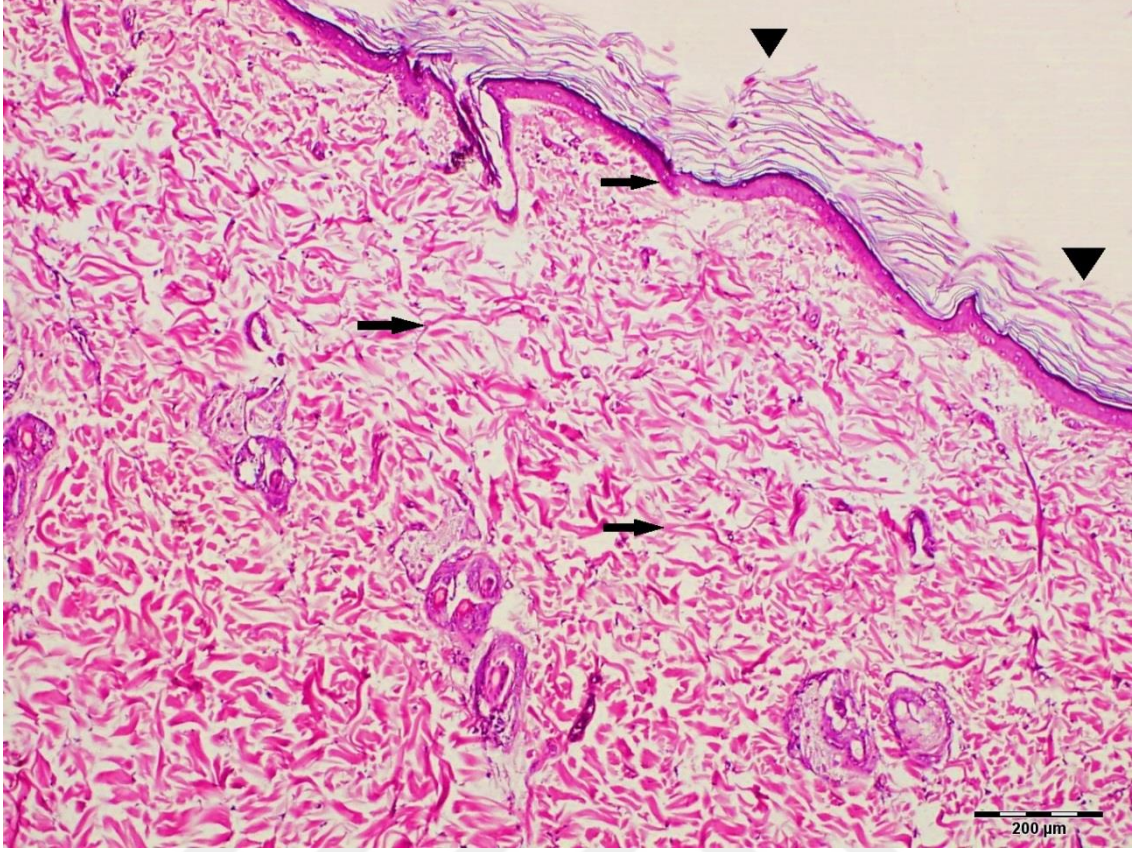


Şekil 29. Deney kontrol grubu ışık mikroskopik görünümü

Dermiste bulunan kollajen liflerin kalınlaştığı ve lif dağılımında düzensizlikler olduğu görülmektedir (oklar). Epidermisin korneum tabakasının incelendiği ve bazı alanlarda döküldüğü izlenmektedir (Ok başları) Bar=200 µm

4.2.3. CORM-3 Grubu

Flep modeli uygulanmasından sonra 6 gün süreyle intraperitoneal yolla 8 mg/kg/gün CORM-3 verilen sıçanların sırt bölgesinden alınan ince deri doku örnekleri ışık mikroskopunda incelendi. Epidermisi oluşturan tabakaların nispeten normal histolojik yapıda olduğu görüldü. Deney grubunda incelendiği tespit edilen korneum tabakasının, CORM-3 uygulamasının ardından kalınlığında artış olduğu gözlemlendi. Dermiste düzensiz sıkı bağ dokusunu oluşturan kollajen liflerin dağılımının ve yoğunluğunun, kontrol grubuna benzerlik gösterdiği tespit edildi. Vasküler yoğunluğun deney kontrol grubuna göre arttığı izlendi. Kollajen lifleri sentezleyen fibroblastların dağılımı ve yoğunluğunun normal histolojik yapıya benzer olduğu görüldü. Fibroblast proliferasyonu tespit edilmedi (Şekil 30).

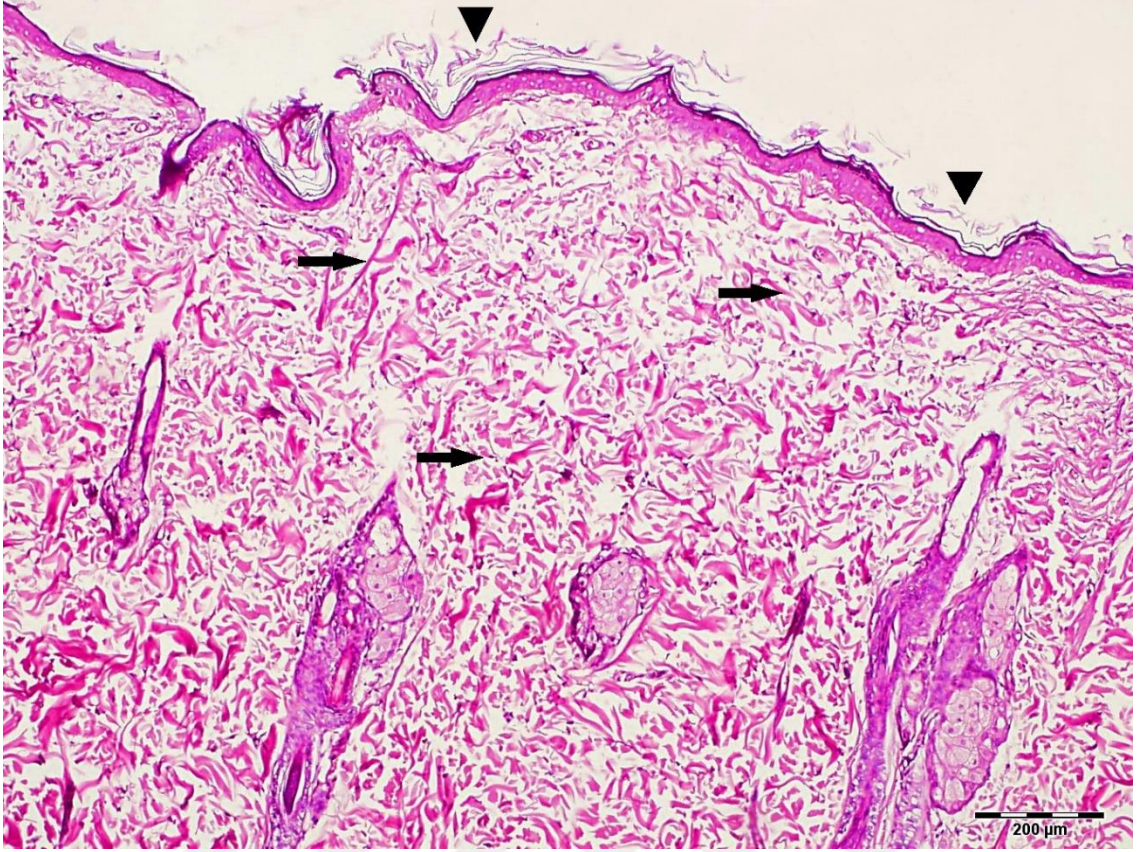


Şekil 30. Corm3 uygulanan grubun ışık mikroskopik görünümü

Epidermis ve dermiş tabakalarının normal histolojik yapıda olduğu görülmektedir (oklar). Epiderminin en üst tabakası olan korneum tabakasının normal kalınlıkta olduğu izlenmektedir (ok başları) Bar=200 µm

4.2.4. Pentoksifilin Grubu

Flep uygulamasını takiben 6 gün boyunca intraperitoneal yolla 40 mg/kg/gün pentoksifilin uygulanan bu gruba ait sıçanların deri örneklerinden alınan kesitler HE ile boyanarak ışık mikroskopuyla incelendi. Korneum tabakasının, CORM-3 uygulanan grubuna göre bir miktar daha ince olduğu belirlendi. Dermiste bulunan kollajen liflerin kalınlaştığı ve homojen olarak dağılmadığı tespit edildi. Dermiste bazı alanlarda fibroblast proliferasyonu, lenfosit infiltrasyonu ve ödematöz alanlar izlendi. Deri eklerinin kontrol grubuna benzer olarak normal histolojik yapıda olduğu görüldü (Şekil 31).



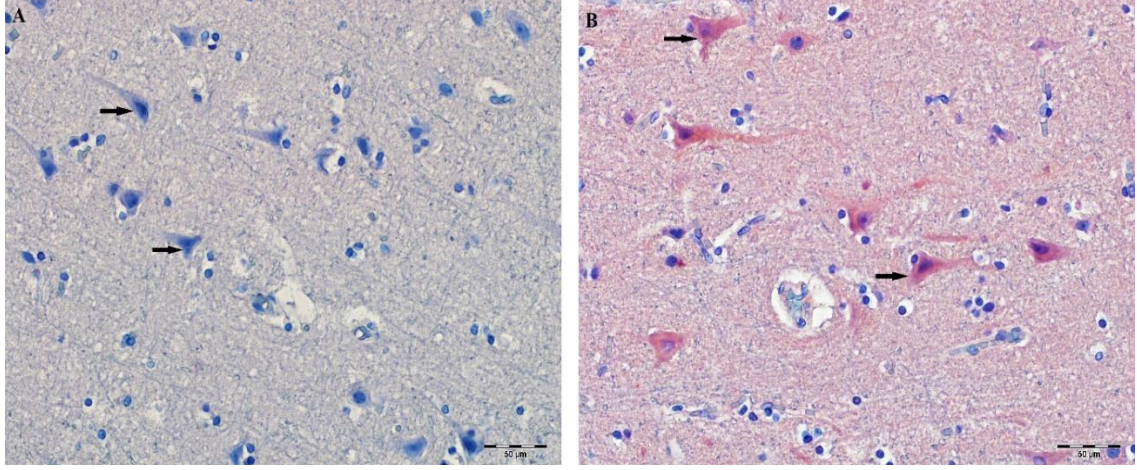
Şekil 31. Pentoksifilin uygulanan grubun ışık mikroskopik görünümü

Epidermis ve dermis tabakalarının kontrol grubuna yakın olduğu görülmektedir (oklar). Epidermisin korneum tabakasının kalınlığı Corm3 ve kontrol grubuna göre daha ince olduğu izlenmektedir (Ok başları) Bar=200 μm

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Mcfarlane flep modeli uygulanan sıçanlarda Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ekspresyon düzeyinin belirlenmesi amacıyla alınan deri dokuları, immünohistokimyasal yöntemle incelendi.

Beypinden elde edilen biyopsi örnekleri VEGF immünoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak (Şekil 32B), primer antikor damlatılmayan doku kesitleri ise negatif kontrol amacıyla boyandı (Şekil-32A).

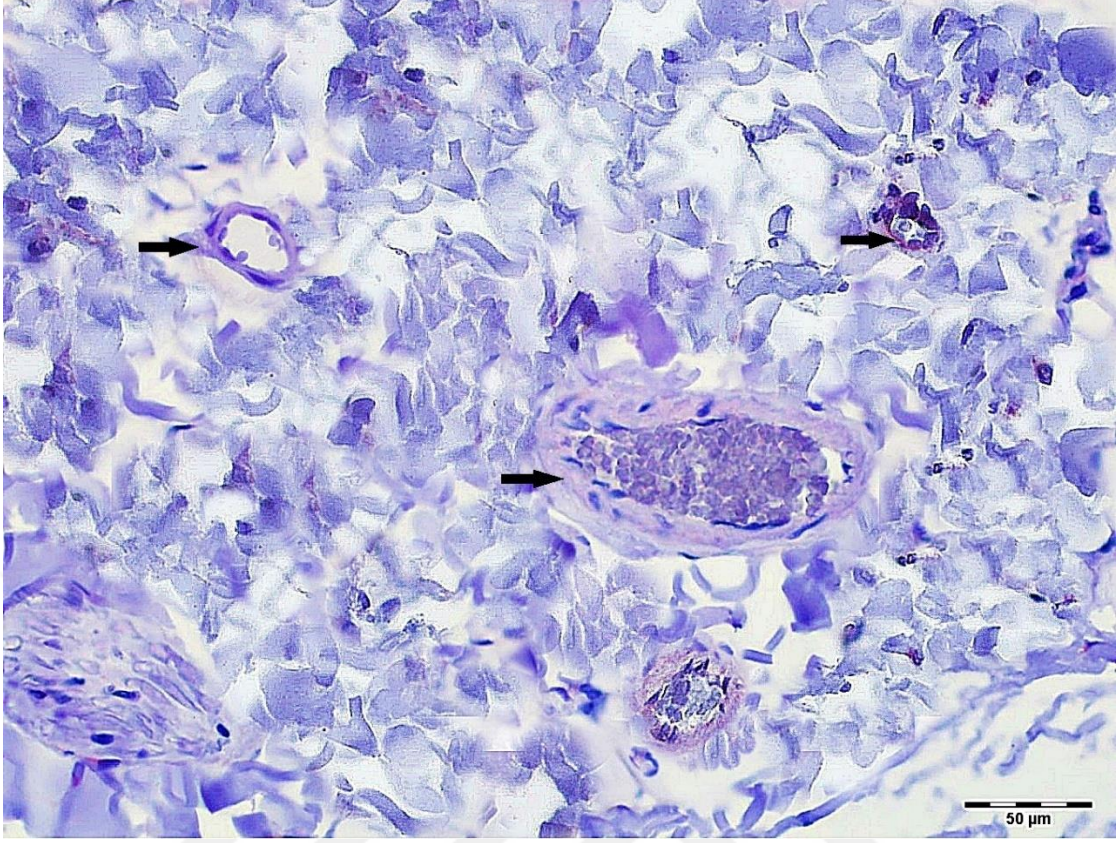


Şekil 32. VEGF immunoreaktivitesi

A) Negatif kontrol. VEGF için, primer antikor damlatılmamış beyin dokusuna ait kesitte herhangi bir işaretlemenin olmadığı görülmektedir (oklar). Bar= 50 µm. B) Pozitif Kontrol. Beyin korteksinde yer alan nöron ve kapiller damarlarda VEGF immunoreaktivitesi izlenmektedir (oklar). Bar=50 µm.

4.3.1. Kontrol Grubu

Herhangi bir işlem uygulanmayan tamamen sağlam deneklerden elde edilen deri doku örneklerinde, VEGF ekspresyonunu araştırmak amacıyla immunohistokimyasal yöntemler uygulandı. Deri kesitlerinde dermiste kollajen lifleri arasında bulunan bağ dokusuna ait hücrelerde VEGF ekspresyonu tespit edilmedi. Küçük çaplı kapiller damar endotel hücrelerinde ve daha büyük çaplı damar endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonunun minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 33).

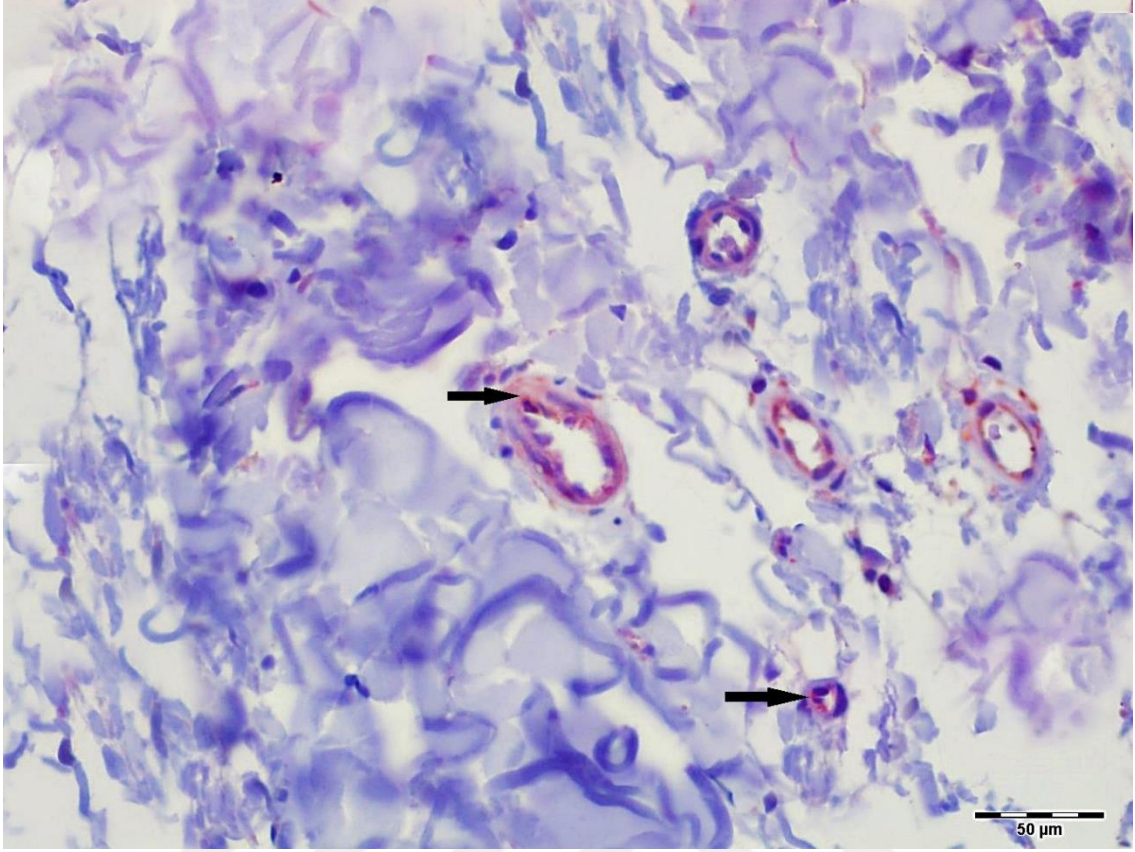


Şekil 33. Kontrol grubunda VEGF immunoreaktivitesi

Deri dokusunda VEGF immunoreaktivitesinin, damar endotel hücrelerinde (ok) zayıf ekspresyonu görülmektedir. Bar= 50 µm.

4.3.2. Deney Kontrol Grubu

Flep modeli uygulanıp herhangi bir tedavi yöntemi uygulanmayan bu gruptaki sıçanlardan 5. gün sonunda alınan deri dokusuna ait örneklerde, VEGF ekspresyonu immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Kollajen lifleri arasında yer alan hücrelerde herhangi bir VEGF ekspresyonu tespit edilmedi. Ancak kapiller damar endotel hücrelerinde yoğun VEGF ekspresyonu görüldü (Şekil 34).

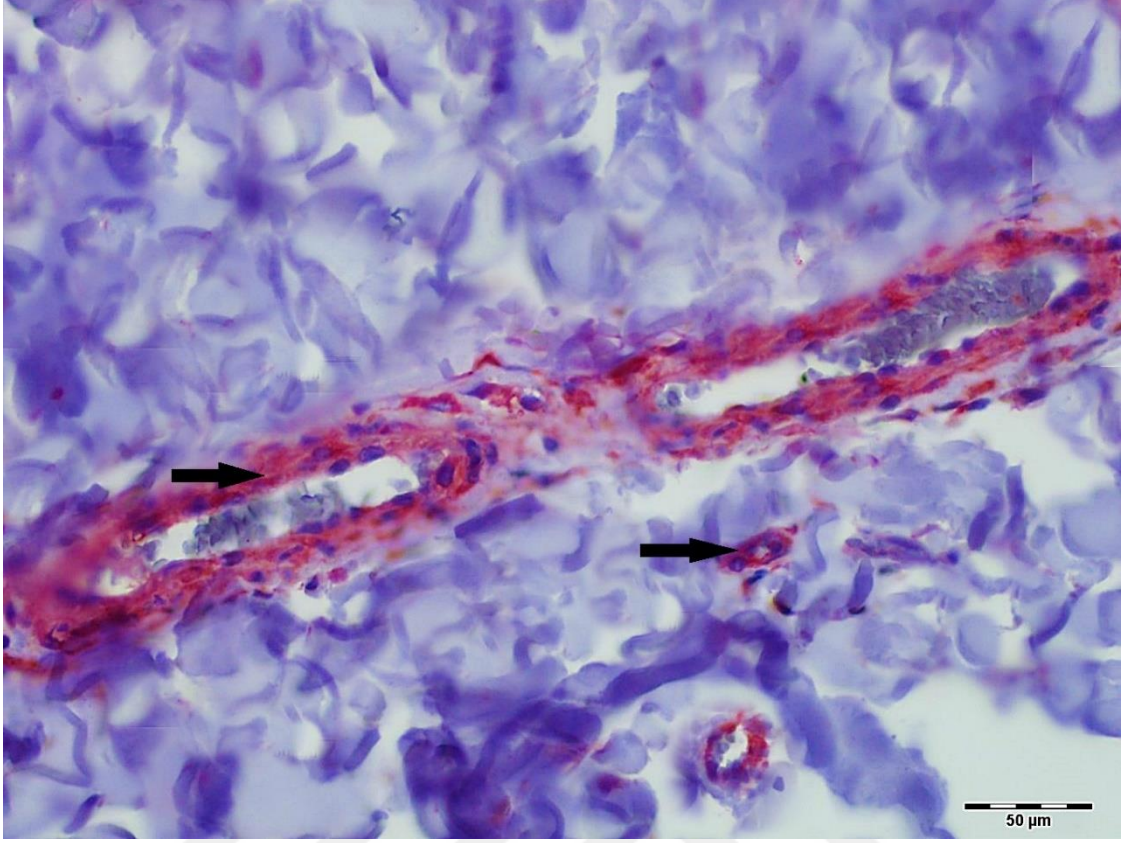


Şekil 34. Deney kontrol grubunda VEGF immunoreaktivitesi

İncelenen deri dokusuna ait kesitte küçük ve büyük çaplı damar duvarlarında VEGF ekspresyonunun varlığı (ok) izlenmektedir. Bar= 50 µm.

4.3.3. CORM-3 Grubu

Flep modeli uygulanmasının ardından 6 gün süreyle i.p. yolla 8 mg/kg/gün CORM-3 uygulanan sıçanların sırt bölgesinden alınan ince deri doku örneklerinde VEGF immunoreaktivitesi değerlendirildi. Dermiste kollajen liflerin arasında yer alan hücrelerde VEGF ekspresyonu tespit edilmedi. Ancak kapiller damar endotel hücrelerinde çok güçlü VEGF ekspresyonu görüldü. Hem küçük çaplı hem de daha büyük çaplı damar duvarlarında belirgin VEGF ekspresyonu izlendi (Şekil 35).

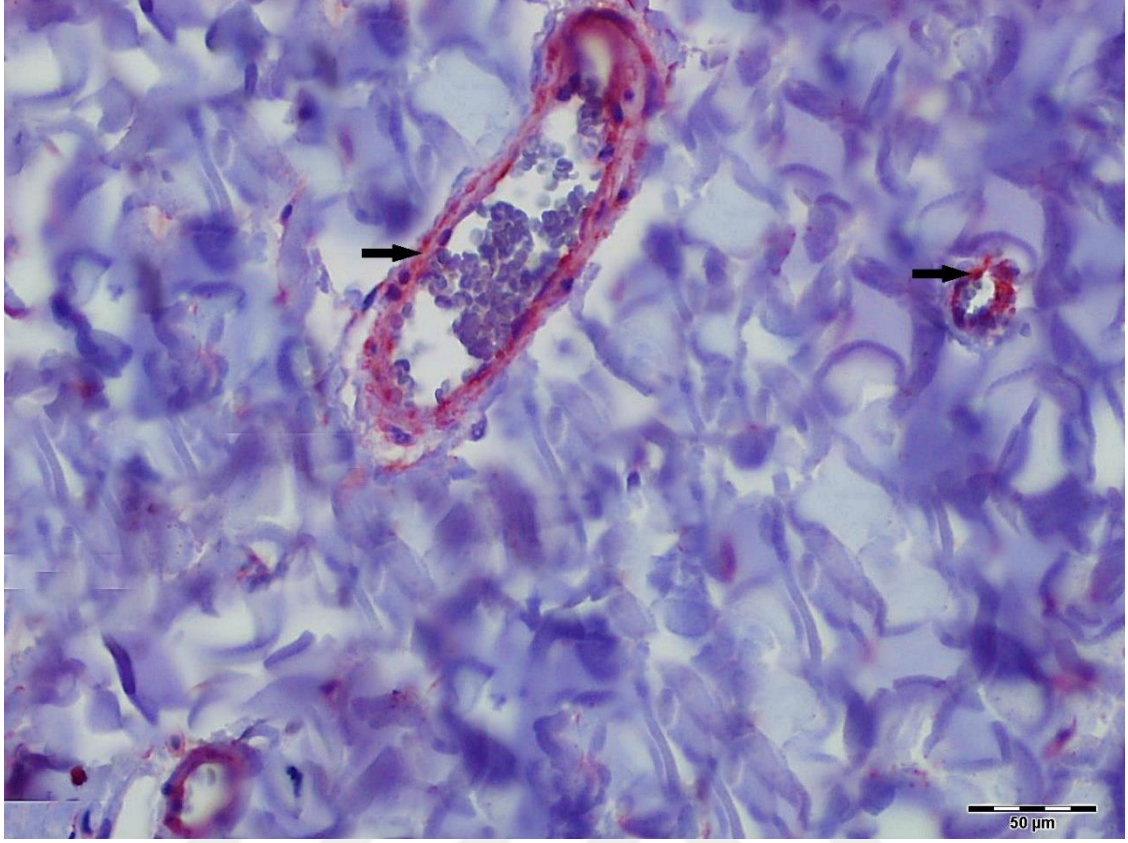


Şekil 35. Corm3 uygulanan grupta VEGF immunoreaktivitesi

Bu gruptaki sıçarlardan alınan deri dokusuna ait kesitte küçük ve büyük çaplı damar duvarlarında çok güçlü VEGF ekspresyonu (ok) izlenmektedir. Bar= 50 µm.

4.3.4. Pentoksifilin Grubu

Flep modeli uygulanmasının ardından 6 gün süreyle i.p. yolla 40 mg/kg/gün Pentoksifilin uygulanan sıçanların sırt bölgesinden alınan ince deri doku örneklerinde VEGF immunoreaktivitesi değerlendirildi. Dermis tabakasında bulunan hücrelerde VEGF ekspresyonu tespit edilmedi. Ancak dermiste bulunan kapiller damar endotel hücrelerinde güçlü VEGF ekspresyonu görüldü. CORM-3 uygulanan gruba kıyasla, pentoksifilin uygulanan grupta VEGF ekspresyonunun nispeten azalmış olduğu tespit edildi. Yoğun VEGF ekspresyonu küçük ve büyük çaplı damar duvarlarında da aynı düzeyde izlendi (Şekil 36).



Şekil 36. Pentoksifilin uygulanan grupta VEGF immunreaktivitesi

İncelenen deri dokusuna ait kesitte küçük ve büyük çaplı damar duvarlarında güçlü VEGF ekspresyonunun varlığı (oklar) izlenmektedir. Bar= 50 µm.

Tablo 12. Dermiste VEGF immunreaktivitesinin semikantitatif değerlendirmesi

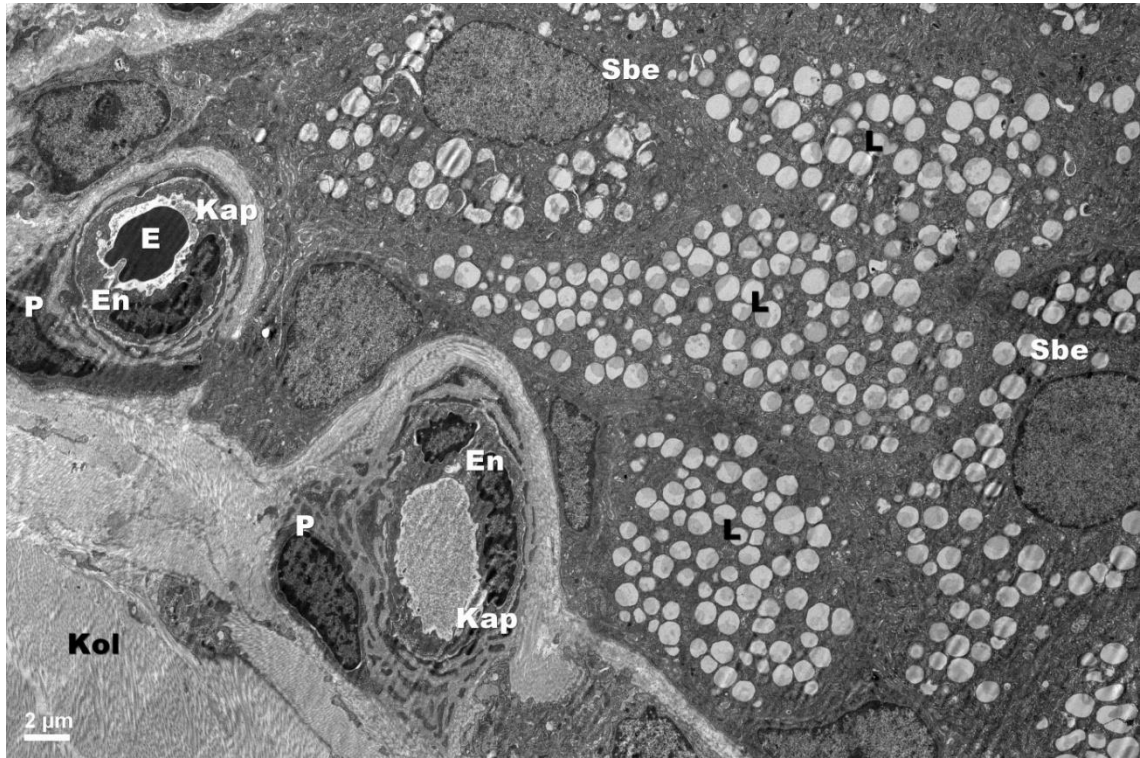
İmmunohistokimyasal Boyanma Yoğunluğu			
Kontrol Grubu	Deney Kontrol Grubu	CORM-3 Grubu	Pentoksifilin Grubu
+	++	+++++	+++

4.4. Elektron Mikroskopisi Bulguları

4.4.1. Kontrol Grubu

Kontrol grubuna ait deneklerden alınan deri örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde; epidermis ve dermis tabakalarının normal histolojik yapıda olduğu görüldü. Dermis düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında olup, bütünlüğünü koruduğu

izlendi. Dermiste bulunan kollajen, elastik ve retiküler lif demetleri arasında deri ekleri, kan damarları ve bağ dokusu hücreleri olan fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlar tespit edildi. Dermiste bulunan, kapiller damarların duvarı; lümeni bakan yüzeyi döşeyen endotel hücreleri ile endotel hücrelerinin altında normal görünüme sahip bazal lamina ve miyoepitelyal hücreler olan perisitlerden oluşmaktaydı (Şekil 37).



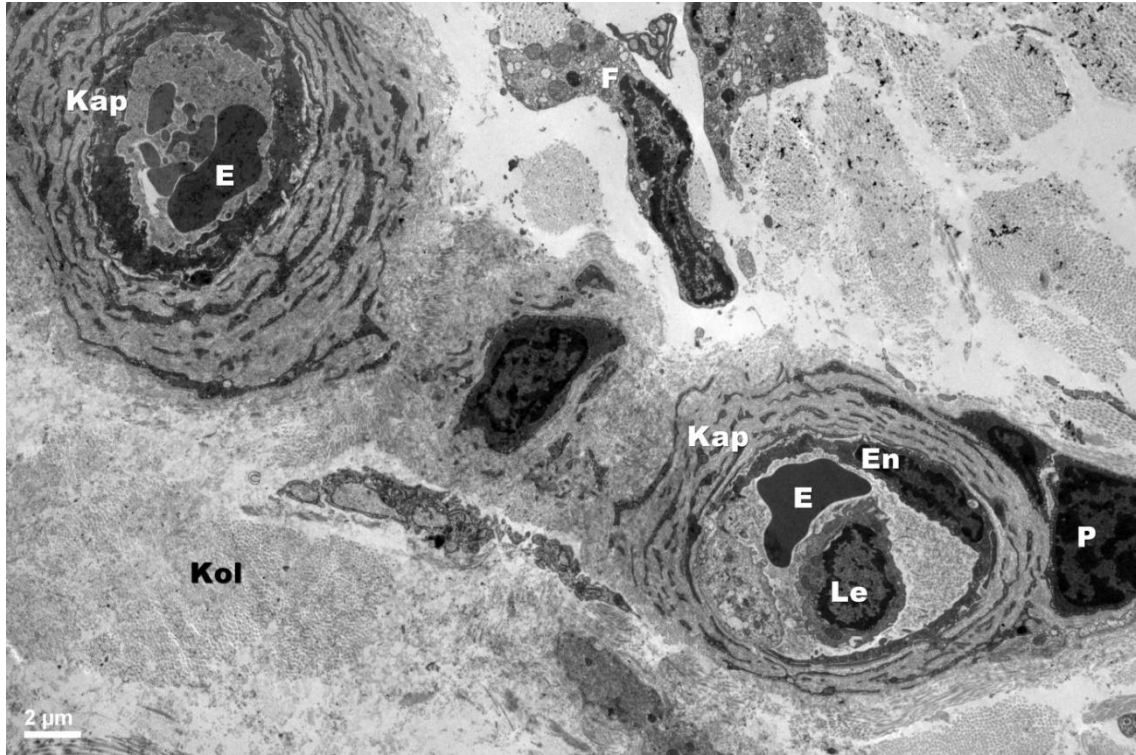
Şekil 37. Kontrol grubuna ait deneklerden alınan deri örneklerinin elektron mikroskopik görünümü.

Dermiste yer alan kapillerler damar duvarında (Kap), normal yapıya sahip endotel hücreleri (En) ve onları çevreleyen perisitler (P) görülmektedir. Sebace bez epiteli (Sbe) sitoplazmasında lipid damlacıkları izlenmektedir. Eritrosit (E) ve kollajen lifler (Kol) gösterilmiştir. Bar= 2 μ m.

4.4.2. Deney Kontrol Grubu

Deney grubuna ait deneklerden alınan deri örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde; epidermis ve dermisi oluşturan yapılarda dejeneratif değişikliklerin varlığı tespit edildi. Dermiste yer alan bağ dokusu hücrelerinde apoptotik değişiklikler izlendi. Dejeneratif alanlarda bulunan fibroblast hücre çekirdeklerinin piknotik hale

geldiği ve çekirdekte indentasyon oranının arttığı görüldü. Fibroblast sitoplazmalarında vakuolizasyon ve lipid damlacıklarında artış dikkati çekti. Dermiste bulunan kan damarlarının duvar bütünlüğünün bozulduğu, lümeni döşeyen endotel hücreleri ile bunları çevreleyen perisitlerin normal yapısının değiştiği, endotel hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinin açıldığı ve endotel hücrelerinin çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşmasının arttığı dikkati çekti (Şekil 38).



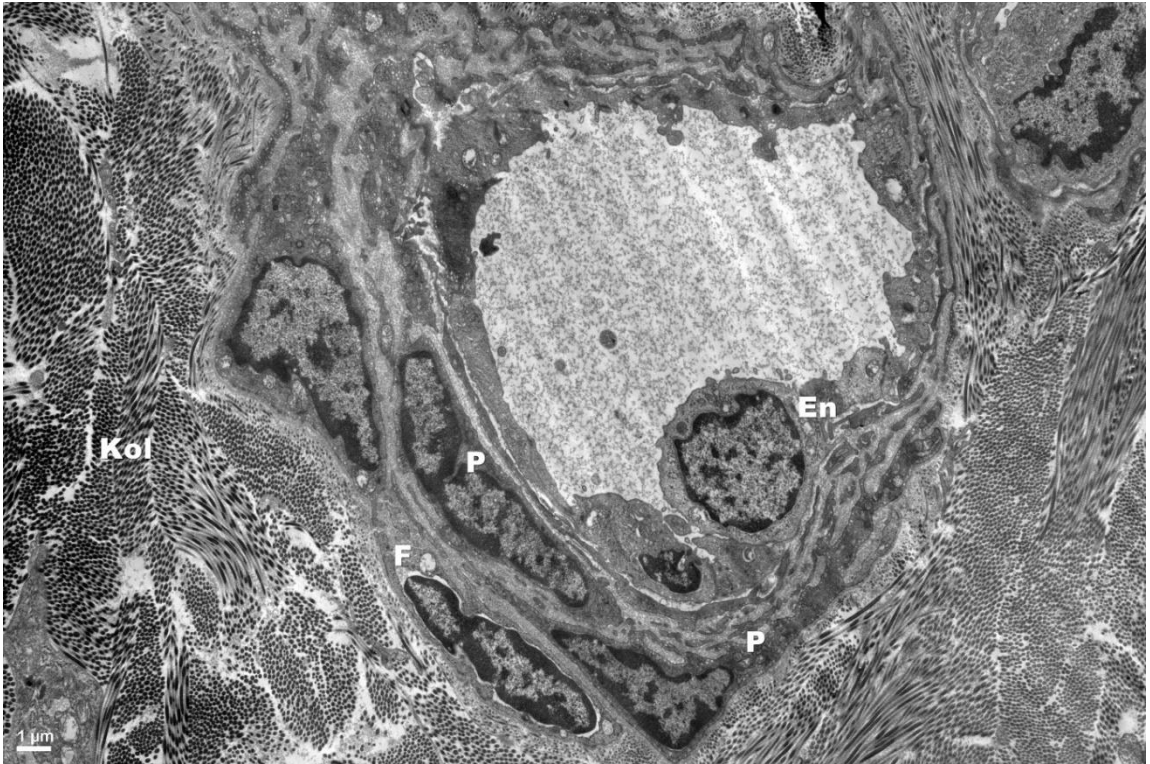
Şekil 38. Deney kontrol grubuna ait deneklerden alınan deri örneklerinin elektron mikroskopik görünümü.

Dermiste yer alan kapillerlerin (Kap) duvarını oluşturan endotel hücreleri (En) ve perisitlerin (P) çekirdeklerinde heterokromatin artışı ve sitoplazmalarında vakuolizasyon ve sitoplazmada yaygın litik alanlar izlenmektedir. Fibroblastların (F) litik hale geldiği görülmektedir. Eritrosit (E) ve kollajen lifler (Kol) gösterilmiştir. Bar= 2 µm.

4.4.3. CORM-3 Grubu

Corm3 uygulanan gruba ait deri kesitlerinin elektron mikroskopik incelemesinde bazı alanlarda kısmi dejeneratif değişiklikler gözlenmekle birlikte, genel olarak epidermis ve dermis tabakalarının bütünlüğünü korudukları dikkati çekti. Dermiste yer

alan fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlar gibi bağ doku hücreleri ile kollajen ve elastik liflerin normal yapıda oldukları gözlemlendi. Fibroblast çekirdeklerinde kromatin kondensasyonunun normal yapıda olduğu, sitoplazmik organel harabiyeti ve litik değişikliklerin deney ve Pentoksifilin gruplarıyla karşılaştırıldığında azaldığı dikkati çekti. Dermiste bulunan kapiller damarların normal histolojik yapıda olduğu ve endotel hücreleri, bazal lamina ve perisit yapılarının genellikle korunduğu görüldü (Şekil 39).



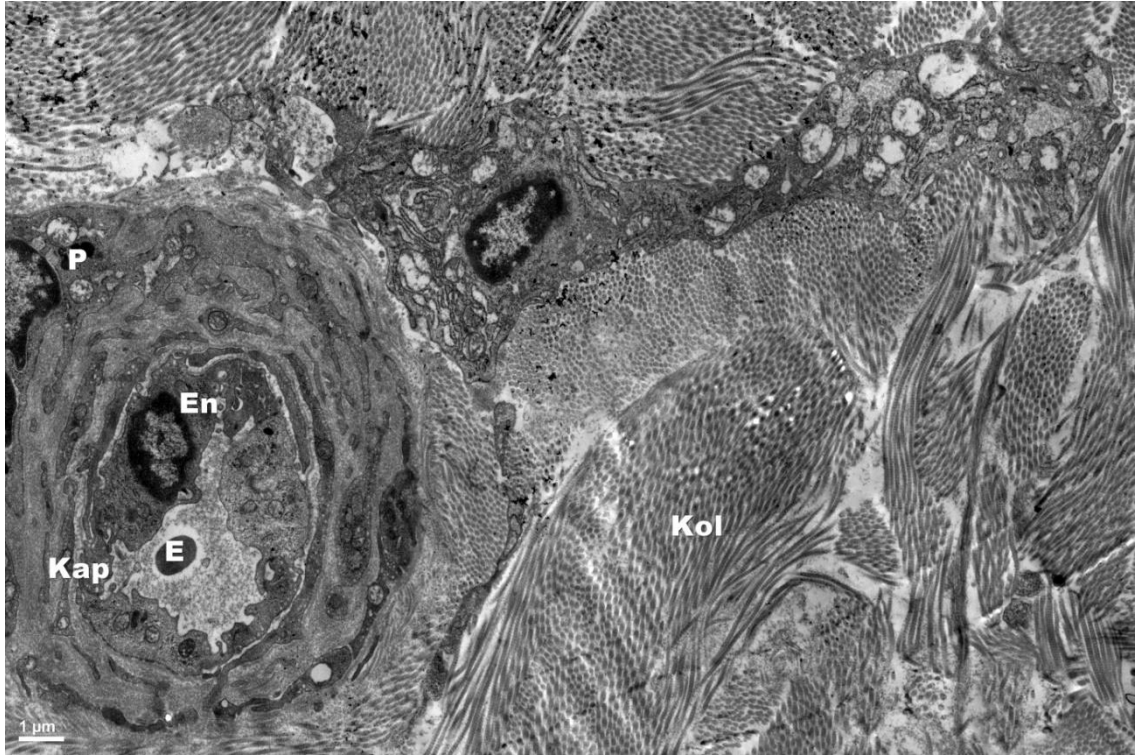
Şekil 39. CORM-3 grubuna ait deri kesitlerinin elektron mikroskopik görünümü.

Dermiste kapillerleri (Kap) döşeyen perisit (P) ve endotel hücrelerinin (En) çekirdek ve sitoplazmik organellerinin normal yapıda oldukları izlenmektedir. Kollajen lifler (Kol) gösterilmiştir. Bar= 1 µm

4.4.4. Pentoksifilin Grubu

Pentoksifilin uygulanan gruba ait deri kesitlerinin elektron mikroskopik incelemesinde epidermis ve dermis tabakalarında ultrastrüktürel değişikliklerin iskemi grubuyla benzerlik gösterdiği dikkati çekti. Bu grupta, dermiste fibroblast çekirdeklerinde kromatin kondensasyonu, sitoplazmada endoplazmik retikülüm

sisternalarında genişleme, mitokondriyal dejenerasyon, sitoplazmik vakuolizasyon ve lipid damlacıklarında artış gözlemlendi. Dermiste çok sayıda lökositin varlığı tespit edildi. Kapiller damarları döşeyen endotel hücrelerinde ve perisitlerde çekirdekte heterokromatin artışı, sitoplazmik vakuolizasyon ve hücreler arası bağlantı komplekslerinde bozulma izlendi (Şekil 40).



Şekil 40. Pentoksifilin grubuna ait deri kesitlerinin elektron mikroskopik görünümü

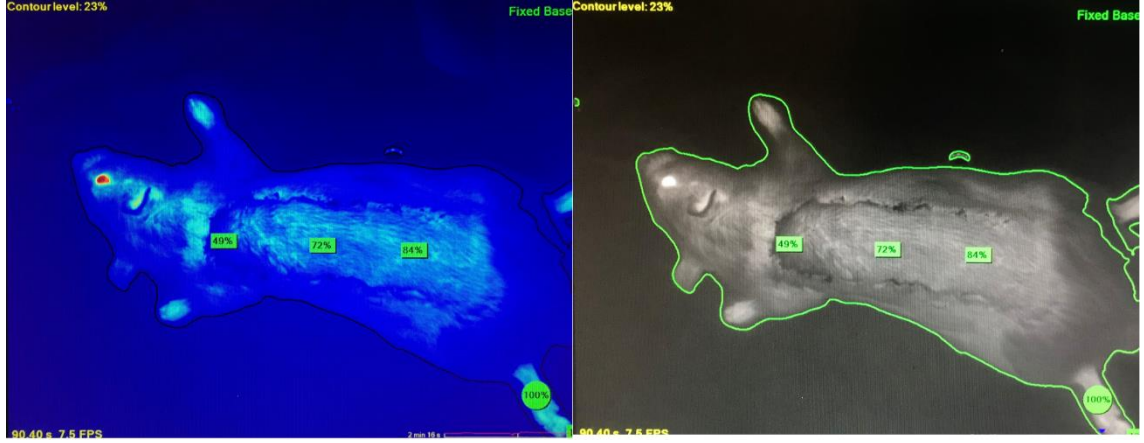
Dermiste dejeneratif değişikliklere sahip bağ dokusu hücreleri görülmektedir. Dermiste kapillerleri (Kap) döşeyen endotel hücre (En) çekirdeklerinde (Ç) heterokromatin artışı, sitoplazmik vakuolizasyon ve hücreler arası bağlantı komplekslerinde bozulma izlenmektedir. Kollajen lifler (Kol) ve eritrosit (E) gösterilmiştir. Bar= 1 µm.

4.5. İndosiyanin Yeşili Uygulaması ile Floresan Anjiyografi Bulguları

Ratların kuyruk veninden indosiyanin yeşili (DID Indocyanine Green [Dongindang, Inc., Gyeonggi-do, Republic of Korea]) uygulandıktan sonra anlık SPY (Novadaq Technologies Inc, Richmond, British Columbia, Kanada) cihazı ile perfüzyon haritalanması yapıldı. Ayak bölgesi referans % 100 olarak işaretlendi. Flep bölgesi

[illegible]

66



Şekil 44. Pentoksifilin grubundaki bir sıçanın perfüzyon haritalanması

Tablo 13. Kontrol Grubunun Flep Perfüzyon Haritalamasının Yüzdelik Cinsinden Verileri

KONTROL GRUBU	FLEP PROKSİMAL 1/3 (%)	FLEP ORTA 1/3 (%)	FLEP DİSTAL 1/3 (%)
1	91	86	89
2	88	84	76
3	90	95	82
4	87	91	96
5	89	90	87
6	76	80	73
7	86	90	81
8	80	84	85
ORTALAMA	85,875	87,5	83,625

Tablo 14. Deney Kontrol Grubunun Flep Perfüzyon Haritalamasının Yüzdelik Cinsinden Verileri

DENEY KONTROL GRUBU	FLEP PROKSİMAL 1/3 (%)	FLEP ORTA 1/3 (%)	FLEP DİSTAL 1/3 (%)
1	72	69	47
2	80	61	17
3	69	56	33
4	71	55	14
5	85	73	53
6	79	62	44
7	69	58	31
8	70	50	24
ORTALAMA	74,375	60,5	34,875

Tablo 15. CORM-3 Grubunun Flep Perfüzyon Haritalamasının Yüzdelik Cinsinden Verileri

CORM GRUBU	FLEP PROKSİMAL 1/3 (%)	FLEP ORTA 1/3 (%)	FLEP DİSTAL 1/3 (%)
1	82	77	44
2	90	83	53
3	79	67	49
4	78	59	38
5	90	81	51
6	81	69	37
7	82	72	56
8	88	71	47
ORTALAMA	83,75	72,375	46,875

Tablo 16. Pentoksifilin Grubunun Flep Perfüzyon Haritalamasının Yüzdelik Cinsinden Verileri

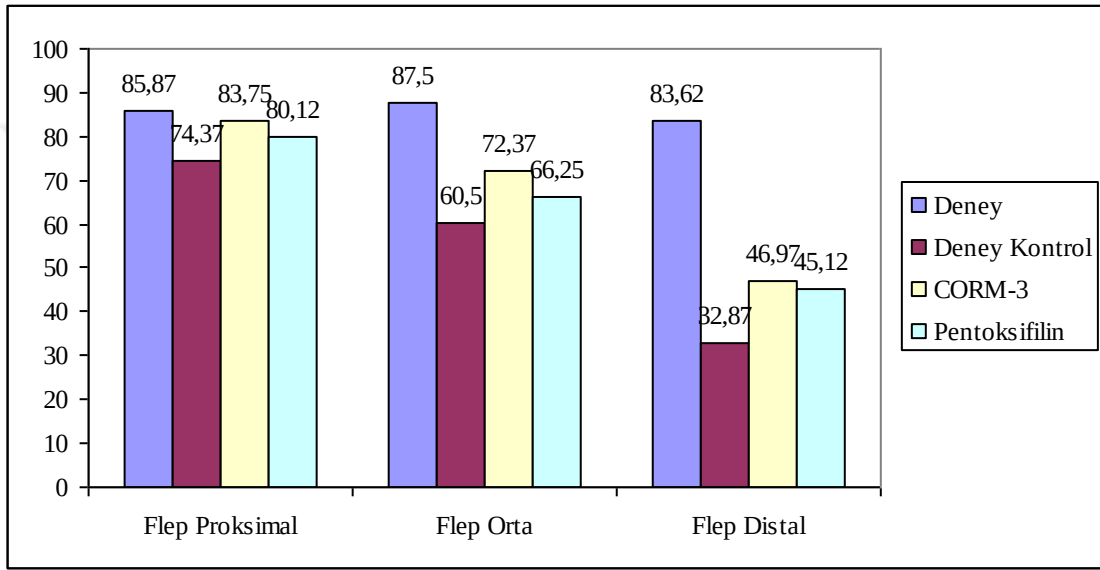
PENTOKSİFİLİN GRUBU	FLEP PROKSİMAL 1/3 (%)	FLEP ORTA 1/3 (%)	FLEP DİSTAL 1/3 (%)
1	80	72	45
2	93	84	51
3	84	72	49
4	86	80	61
5	78	58	39
6	83	69	50
7	67	44	32
8	70	51	34
ORTALAMA	80,125	66,25	45,125

Yapılan SPY floresan anjiyografi perfüzyon bulgularına göre CORM-3 ve Pentoksifilin grubunun ortalama perfüzyon değerleri deney kontrol grubuna göre daha iyi olduğu görülmüştür. CORM-3 ve Pentoksifilin grubunun ise yakın değerlerde olduğu göze çarpsa da CORM-3 grubunun bulguları daha iyi olduğu görülmüştür. (Tablo 14,15,16)

Gruplara göre flep proksimal 1/3, orta 1/3 ve distal 1/3 değerleri Tablo 17 ve şekil 45'te görülmektedir. Buna göre flep proksimal, orta ve distal değeri en yüksek kontrol grubunda iken en düşük ise deney kontrol grubundadır.

Tablo 17. Gruplara göre flep anjiyografik perfüzyon değerleri

Grup		Flep Proksimal	Flep Orta	Flep Distal
Kontrol	Med (Min-Maks)	87.50 (76-91)	88 (80-95)	83.50 (73-96)
	Ort.±ss	85.87±5.22	87.50±4.84	83.62±7.32
Deney Kontrol	Med (Min-Maks)	71.50 (69-85)	59.50 (50-73)	32 (14-53)
	Ort.±ss	74.37±6.09	60.50±7.54	32.87±14.23
Corm-3	Med (Min-Maks)	82 (78-90)	71.50 (59-83)	48 (37-56)
	Ort.±ss	83.75±4.86	72.37±7.83	46.97±6.83
Pentoksifilin	Med (Min-Maks)	81.50 (67-93)	70.50 (44-84)	47 (32-61)
	Ort.±ss	80.12±8.47	66.25±14.00	45.12±9.70



Şekil 45. Gruplara göre flep proksimal, flep orta ve flep distal bölgelerinin anjiyografik perfüzyon değerleri

Gruplar arasında flep perfüzyon değerleri açısından farklılık olup olmadığını belirlemek için yapılan Mann Whitney U test neticesinde kontrol grubu ile deney kontrol grubu arasında flep proksimal, orta ve distal değerleri açısından anlamlı fark olduğu görüldü. Yine yapılan analiz sonucunda kontrol grubu ile CORM-3 grubu arasında flep orta ve distal değerleri açısından; kontrol grubu ile pentoksifilin grubu arasında flep orta ve distal değerleri açısından; deney kontrol grubu ile de CORM-3 grubu arasında flep proksimal, orta ve distal değerleri açısından farkın anlamlı olduğu saptandı (Tablo 18).

Tablo 18. Gruplara göre flep anjiyografik perfüzyon değerlerinin karşılaştırılması

	Flep Proksimal 1/3	Flep Orta 1/3	Flep Distal 1/3
Kontrol-Deney Kontrol	0.002	0.001	0.001
Kontrol-CORM-3	0.493	0.002	0.001
Kontrol-Pentoksifilin	0.115	0.002	0.001
Deney Kontrol-CORM-3	0.013	0.018	0.040
Deney Kontrol-Pentoksifilin	0.207	0.343	0.074
CORM-3-Pentoksifilin	0.494	0.493	0.674

5. TARTIŞMA

Plastik cerrahi konjenital, posttravmatik ya da tümoral lezyonlar sonrası oluşan doku defektlerinin hem fonksiyonel hem de estetik onarımıyla ilgilenen bilim dalıdır. Bu defektlerin vücudun her alanında olabilmesi plastik cerrahinin kapsamını çok genişletmektedir. Bu yüzdendir ki, plastik cerrahi tüm tıp bölümleri arasında tepeden tırnağa, her vücut bölgesine, her yaş grubuna ait problemlere yönelebilen en kapsamlı uzmanlık dalıdır. McCarthy nin de dediği gibi “Plastik cerrahi, problem çözme uzmanlığıdır.”

Vücudun her alanında görev alan plastik cerrahi, her anatomik bölge için kendine özgü prensipler geliştirmiştir. Bu gelişim milattan önce 600 yıllarında Hint cerrah Sushruta Samhita'nın ilk flep kullanımından günümüze kadar uzanır. Anatomik, fizyolojik ve cerrahi teknik alanında yapılan çalışmalarla artan bilgi birikimine rağmen fleplerin total veya parsiyel nekrozu önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Bu durum hem hasta hem de cerrah için dramatik bir olay olan, ek ameliyatlara yol açan, hastaneye yatış süresini arttıran ayrıca artan maliyetlere ve duygusal strese neden olabilen sıkıntılı bir süreçtir. Bu nedenle flep kaybına neden olan problemlerin ortaya konması ve çözümü, flep cerrahisindeki başarısızlıkları azaltıp bizlere yön verebilir. Bu amaçla günümüze kadar riskleri azaltmak veya ortadan kaldırmak için binlerce çalışma yapılmıştır ve halen yapılmaya devam etmektedir.

Flepler, plastik cerrahi için en önemli silahlardan birisi olmasına rağmen, bu silahın birçok aksayan yönleri bulunmaktadır. Bu aksaklıkları çözmek üzere birçok araştırmacı flep viabilitesini dolayısıyla flep kaybını en aza indirmek için birçok çalışma yapmıştır. Flep fizyolojisi daha net anlaşıldıkça daha oturaklı çözümler üretilmiştir.

Flep cerrahisi sonrası gelişebilecek doku kayıplarının nedenlerini intrensek ve ekstrensek olarak ikiye ayırabiliriz. Temel olarak intreksek faktörün azalmış kan akışının olduğu gözükmemektedir ve flep kaybından sorumlu olan esas neden olarak görülmektedir.¹⁴⁸ Ekstrensek nedenler arasında ise sistemik hastalıklar, çevresel etmenler ve ameliyat teknikleri sayılabilir. Olumsuz yönde etkileyen sistemik nedenler arasında hipotansiyon, periferik arter hastalıkları ve enfektif olaylar, çevresel etmenleri ise sıcaklık ve kompresyon diyebiliriz. Teknik sebepler arasında ise flep tasarımı ve

uygulama hatalarını sayabiliriz.¹⁴⁸ Tüm bu etmenler flep nekrozuna sebep olabilmektedir.

Flebin, nekroza doğru evrilen sürece neden olan temel başlangıç, flep elevasyonu sonrasında flebi besleyen damarların ve sempatik inervasyonu sağlayan sinirlerin flepten ayrılarak kesilmesidir. Flep elevasyonu sonrası flebin en uç kısmında oluşan nekroz patogenezinin sorumlu iki temel faktör vardır. Birincisi; beslenmesi azalan ve sempatik aktivasyon sürecine giren flepte, flep uç kısmında kan akımının azalması ardından vazokonstriktör maddelerin adrenalin, noradrenalin, serotonin, TXA2, PGF-2 α , PGI-2 ekspresyonundaki artış nedeni ile kan akımı daha da azalır. Alfa adrenerejik sistem sayesinde gerçekleşen vazokonstriksiyon flebin en fazla uç kısmında iskekiye neden olur. Sempatik nörotransmitterler 12-24 saat içerisinde tükenirler. Flep distalinde bulunan iskeki 6-12 saat boyunca devam ederse ve sonrasında tekrar dolaşım sağlandığında ikinci patogenetik faktör olarak reperfüzyon hasarı meydana gelir. Bu nedenle mikrovasküler kapanma oluşur ve genellikle flepte nekroz gelişir¹⁴⁹. İskemik dokularda anaerobik metabolizma ile glikolizasyon gerçekleşmeye başlar. Anaerobik glikolizasyonla birlikte reaktif oksijen radikallerinde (ROS) artış meydana gelir. Artan radikaller doğrudan hücre zarında lipit peroksidasyonuna sebebiyet vererek toksik etki gösterir. Lokal olarak akut inflamasyona, lökositlerin birikimine ve adezyona, sonuçta mikrovasküler kapanmaya yol açacak endotel hasarına neden olurlar.¹³

Plastik cerrahlar doku defektlerinin onarımında deri greftinin uygun olmadığı bölgelerde sıklıkla deri fleplerini tercih etmektedir. Bu yüzden cilt fleplerinin tarihsel gelişimi öncelikle random flepler üzerine olmuştur. Random flepleri en-boy oranı gözeterek planlama yapılyordu. Ancak özellikle son 40 yılda deri kanlanması anatomik bilgi kazanımlarıyla flep cerrahisi zaman içerisinde perforatör fleplere doğru evrilmiştir. Yine teknoloji alanındaki gelişmeler mikrocerrahinin de önünü açmış, serbest fleplere ilgiyi artırmıştır. Perforatör flepler ve serbest fleplerin, ekstra donanım ve deneyimli cerrahi ekibi olması gerektirmesi nedeniyle günümüzde halen random flepler geçerliliğini korumaktadır. Random fleplerin arteriyel kaynağı birbirleriyle bağlantı içinde iyi gelişmiş bir yatay tabaka halinde dermiş, subdermis, derin subkutan yağ dokusu ve derin fasya içerisindeki isimlendirilmemiş arteriyel pleksuslardır. Random olarak tasarlanan cilt fleplerinin her anatomik bölgeden eleve edilebilmesi nedeniyle ilk tercihler arasındadır.

Random fleplerin cerrahide bu kadar sıklıkla tercih edilmesinin de haliyle en sık komplikasyonu olan flep nekrozu ile başa çıkma becerisi de gelişmiştir. Aksiyel flepler, perforatör flepler ve serbest fleplerde de benzer problemlere sıkça rastlanması sonucunda flep viabilitesinin artırılması üzerine tarihsel süreçte birçok çalışma yapılmış ve birçok ilaç denenmiştir. Fakat bu ilaçların çok azı başarılı bulunmuş, yine bu başarılı ilaçların bazıları rutin klinik kullanıma girmiştir.

Bu çalışmada, çoğu flep çalışmasında olduğu gibi deneysel hayvan modeli olarak sıçanlar kullanıldığından Wistar albino cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçan, tavşan, köpek gibi deneysel çalışmalarda sıkça kullanılan hayvanlarda subkutan panniculus carnosus kası mevcuttur. Gevşek bir deriye sahiplerdir. Bu hayvanların deri kanlanması panniculus carnosus içerisinde uzanan damarlar ile sağlanmaktadır. Flep türünün seçiminde flep nekrozu çalışmalarında altın standart olan McFarlane ve arkadaşlarının tanımladığı dorsal sıçan flep modeli uygulanmıştır.¹⁵⁰

Flep nekrozunu azaltmak ve tamamen önlemek için birçok deneysel çalışma yapılagelmiştir. Sıçanlar; insanlar gibi memeli sınıfından olması, biyolojik ve fizyolojik mekanizmalarına iyi hâkim olunması, elde edilen verilerin insanlara uygulanabilir olması sebebiyle yapılan deneylerde sıkça tercih edilmektedir. Sıçanlarda da hormonal değişiklikleri ve menstruel döngüleri mevcuttur. Sıçan yumuşak dokusu ve cildi de bu değişikliklerden etkilenebilmektedir. Bu sebeplerden ötürü çalışmamızda sıçanlar tercih edilmiştir. Hormonal değişikliklerin deney sonucunu etkilememesi için erkek cinsiyette sıçanlar tercih edilmiştir.

Rohrich ve ark. flep viabilitesini artırmak için kullanılacak ilaç veya uygulama için; kolay uygulanabilir olmalı, güvenilir olmalı, postoperatif kullanılabilmeli, ucuz olmalı, etki mekanizması tam olarak bilinmeli, elde edilebilir olmalı ve flep nekrozunda koruyucu olmalı şeklinde özetlemiştir.¹⁵¹

Karbon monoksitin (CO) artık çok farklı yönleri olduğu kabul edilmektedir. CO, çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde önemli bir düzenleyici role sahip sinyal molekülüdür.¹⁵²

Karbon monoksitin fiziksel özellikleri ve toksisitesinin fazla olması aynı zamanda dokular tarafından kullanım miktarının ölçümündeki zorluklar nedeniyle akademik çalışmalarda kullanım kolaylığı oluşması açısından gereklilik arz etmiştir. Sonrasında üretilen CORM, bugüne kadar rapor edilen yayınlarda CO'nun ne denli yararlı

olduğunu bize ispatlamıştır. CORM moleküllerinin bir türevi olan CORM-3 ise suda ve yağda hızlı çözünürlüğe sahip olmasından dolayı dokularda daha kolay kullanılmaktadır. Bu sebeplerden dolayı CORM-3 molekülü ile ilgili yayınların sayısının her geçen gün arttığını görmekteyiz.

CORM-3'ün vazodilatör etkisi iki farklı mekanizma aracılığıyla oluşur. Bunlardan ilki CORM-3'ün ATP bağımlı K^+ kanallarını aktive ederek damar düz kaslarında vazodilatasyona neden olmasıyla başlar. İkincisi yol ise CORM-3 molekülünden kolayca ayrılarak serbest forma dönüşen CO'nun, cGMP miktarını artırmasıdır. cGMP artışı sonucunda ise NO salınır. CORM-3'ün antiinflamatuvar, antiapoptotik, antiproliferatif, nöroprotektif, antioksidan ve vazodilatör özellikleri farklı çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Yaptığımız tez çalışmasında da sonuçlarını elde ettiğimiz anjiyografik ve histopatolojik bulguların CORM-3 tedavisinin diğer ajanlar kadar etkili olması, CORM-3 molekülü ile ilgili farklı akademik çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Alshehri ve arkadaşları normotansif Wistar-Kyoto sıçanlarından izole edilmiş aort halkalarını elektron spin rezonansı ile değerlendirmiş. CORM-3, endotel bağımlı ve endotelden bağımsız gevşemeler oluşturmuş, düz kas potasyum kanallarının çözünür guanilil siklazdan bağımsız aktivasyonu görülmüş. Ek olarak, CO eşzamanlı olarak NO sentazın aktivasyonunu sağlamış. Diğer iki etkisi arasından ilki CORM-3'ün endotel ve cGMP'ye bağlı etkisi, ikincisi nöro-hümorale aracılara yanıt olarak endotel bağımlı gevşemelerin olduğunu gösterilmiştir.¹²²

Luiso Lo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada suda çözünür bir CO salan molekül (CORM-3) kullanılarak izole edilmiş kalp hücresi mitokondrisine CO'nun hassas bir şekilde verilmesinin solunumu ayırdığını göstermiş, CORM-3'ün, düşük seviyelerde CO'nun mitokondriyal solunumun önemli bir düzenleyicisi olarak işlev gördüğünü ortaya koymuşlardır.⁵

Pizarro ve arkadaşlarının biyolojik sistemlerde hem oksijenaz-1 (HO-1) tarafından hem'in bozunması sırasında üretilen bir sinyal molekülü olan karbon monoksitin (CO) düşük sıcaklıklarda anti-hipoksik etkiler de dahil olmak üzere çeşitli sitoprotektif etkilere sahip olduğuna dair artan kanıtlar ışığında yaptığı çalışmada CORM-3 ilavesinin soğukta korunan karaciğerlerle karşılaştırıldığında, reperfüzyon sırasında perfüzyon akışını önemli ölçüde iyileştirerek (neredeyse % 90 oranında) ve intrahepatik

direnci (% 88 oranında) azaltarak soğuk depolamanın neden olduğu hasarı önlediğini keşfetmişlerdir.¹²⁵

Musameh ve arkadaşları CORM-3'ten salınan karbon monoksitin (CO) kalpteki soğuk iskemi aracılı hasara karşı kardiyoprotektif rolünü araştırmış ve kalp transplantasyonunun klinik ortamında potansiyel uygulamasını değerlendirmişlerdir. CORM-3'ün transplante edilecek kalbin koruma solüsyonuna eklenmesi, sistolik ve diyastolik fonksiyonun yanı sıra koroner akışta önemli bir gelişme ile sonuçlandığı gösterilmiş. Ek olarak, CORM-3 ile depolanan kalplerin perfüzyonunda kardiyak enzimler kreatin kinaz ve laktat dehidrojenaz seviyeleri daha düşük ölçülmüştür.⁴

Hitesh Soni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ratlarda yapılan ex vivo çalışmada 10 dakika süreyle 3 mg/kg iv CORM-3 infüzyonu uygulandığında da antiplatelet etki gözlenmiş ve yine ratlarda yıkanmış trombositlere in vitro çalışmada eklendiğinde, CORM-3 (100 ve 200 µM), trombin kaynaklı trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.¹⁵³

Yabluchanskiy ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı hemorajik inme modelinde beyin hasarını değerlendirmişler. CORM-3 verilen grubun nöroprotektif olduğu olduğu ve hemorajik inmeye bağlı beyin hasarının azalttığını göstermişlerdir.¹²¹

Literatürde yapılan deneysel çalışmaların analizi sonucunda CORM-3'ün fizyolojik ve metabolik mekanizmaları hususunda edinilen bilgiler ve ortaya koyduğumuz bu deneysel çalışma neticesinde elde edilen anjiyografik ve histopatolojik verilerden çıkarılan sonuç, CORM-3 ile ilgili klinik çalışmaların derhal başlaması gerektiğidir. Doku defektlerinin cilt flepleri ile başarılı bir şekilde onarılması hakkında pozitif verilerin alınması için CORM-3 gibi medikal ajanların daha çok çalışması yapılması lazım gelmektedir.

Pentoksifilin, özellikle intermittan kladikasyonun semptomatik tedavisinde onlarca yıldır kullanılan bir metilksantin türevidir. Etki mekanizması tam olarak anlaşılamayan bu ilaç kan reolojisine bazı tamamlayıcı yoldan yarar sağlar. Bunlar; kan ve plazma viskozitesini azaltmak, fibrinolizi teşvik ederken plazma fibrinojenini düşürmek ve eritrosit genişleyebilirliğini artırarak ve nötrofil aktivasyonunu azaltmaktır. Bazı bulgular pentoksifilinin nötrofiller ve makrofaj/monositler üzerindeki anti-inflamatuar etkileri olduğu yönündedir.¹⁵⁴

Pentoksifilin hakkında 1980’li yıllardan itibaren flepler üzerinde çok hızlı birçok çalışma yapılmış ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu kazanımlar da pentoksifilin rutin klinik kullanıma adaptasyonu hızla gerçekleşmiştir.

Pentoksifilin plastik cerrahide birçok alanında rutin olarak kullanılmaktadır. Soğuk yanıklarında özellikle ekstremit distallerindeki doku kaybını azaltmada kullanılmaktadır.¹⁵⁵ Ekstremit ya da end organ replantasyonlarında postoperatif intravenöz pentoksifilin uygulaması yapılabilmektedir.¹⁵⁶

Pentoksifilin sıcak yanıkları üzerinde staz zonunda inflamasyonu azaltarak genişlemesini ve doku kaybını azalttığı bilinmektedir.¹⁵⁷

Randall S. ve arkadaşlarının domuzlarda yaptığı random paternli cilt flepleri üzerinde pentoksifilin etkilerini incelemiştir. Kontrol grubu random patern cilt flebinde nekroz oranı ortalama % 32.6 bulunmuş ve pentoksifilin uygulanan grupta ise nekroz oranı ortalama % 2.57 olarak tespit edilmiştir.¹⁵⁸

İsken ve arkadaşlarının diyabetik sıçanlarda yaptığı random paternli cilt flepleri üzerinde yaptığı çalışmada diyabetik PTX tedavisi grubu, diyabetik kontrol grubu, diyabetik olmayan PTX tedavisi grubu, diyabetik olmayan kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrılmış. Çalışmada preoperatif 4 hafta PTX uygulanmış. Çalışma sonucunda hem PTX uygulanan diyabetik grubun diyabetik kontrol grubuna, hem de PTX uygulanan sağlıklı grubun sağlıklı kontrol grubuna göre flep sağ kalımının daha iyi olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁹

Brasilio ve arkadaşlarının 60 sıçanın sol ana iliak arteri klemplayerek 6 saat boyunca pelvik ekstremit iskemisine tabi tutmuş. Sonrasında soleus kasından örnekler alınarak hitopatolojik örnekleme alınmış. Sonuç olarak pentoksifilin, iskemi ve reperfüzyon başlangıcında uygulandığında, kas lifleri arasındaki ödem ve nötrofilik infiltratı azaltarak, kas dokusundaki morfolojik değişiklikleri hafifletmede olumlu olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca, perivasküler ve perinükleer alanlardaki lökosit infiltratında, iskemi ve reperfüzyon başlangıcında uygulandığında daha önemli olan kaspaz-3 ekspresyonunu azaltmada olumlu olduğu kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada pentoksifilini tercih etmemizdeki temel amaç bu ilacın çok yönlü kan dolaşımı artırmasıdır. Pentoksifilin bu özelliğinden ötürü birçok patolojik durum üzerinde kanıtlanmış olması ve rutin kullanımda olması bize CORM-3 ajanının etkinliğinin kıyaslanabilmesi için güçlü bir parametre sağlamasıdır.

SPY cihazının kullanımının mikrocerrahi prosedürlerde flep perfüzyonu ve anastomoz patensi oranını ölçecek şekilde kullanımı, rekonstrüktif cerrahide kendisine büyük bir yer kazandırmıştır.¹⁶⁰ Son yirmi yılda Feindel ve arkadaşlarının mikrocerrahi prosedürlere floresan anjiyografi uygulamasını takiben ICG, rekonstrüktif cerrahide rol almaya başlamıştır.¹⁶¹ ICG anjiyografiyi takiben kan akımının kalitatif olarak değerlendirilmesi, flep nekrozu veya amputasyonu takiben güdük nekrozu tahminini optimize etmek için denenmiştir.¹⁶² Zimmermann ve arkadaşları ICG anjiyografi ile kan akımını kalitatif olarak değerlendirerek, amputasyon güdüğü nekrozu veya flep nekrozu riskinin yönetilebileceğini savunmuşlardır.¹⁶³

İdeal olarak, ICG anjiyografi görüntüleme flep tasarımı sırasında yapılabilir ve alttaki perforatör damarların lokalizasyonuna izin verir. Daha sonra flep perfüzyonunu değerlendirmek için diseksiyon sırasında görüntüleme tekrarlanabileceğinden, flep damar konumu ve boyutuna göre tasarlanır. Örneğin, istenen perforatörlerin korunduğu ve kalan perforatörlerin geçici olarak klemlenebildiği perforatör seçimi sırasında flep perfüzyonunu değerlendirmek için görüntüleme yapılabilir. Yetersiz bulunursa, klemler çıkarılır ve ek veya alternatif perforatörler seçilir. Mikrocerrahi sırasında görüntüleme, transferden sonra flebin perfüzyonunu tespit edebilir ve anastomoz içindeki kan akışını değerlendirebilir.

2004'te Yamaguchi ve arkadaşları, bir flep perfüzyon haritası oluşturmak için 10 transvers rektus abdominis muskulokutanöz (TRAM) flep meme rekonstrüksiyonu vakasında ICG anjiyografi kullandılar.¹⁶⁴

Holm ve arkadaşları, otolog meme rekonstrüksiyonunda serbest yüzeysel alt epigastrik arter (SIEA) fleplerinin haritalanmasını ve diseksiyonunu hızlandırmak için intraoperatif ICG floresan anjiyografi kullandılar. 25 hastanın % 64'ünde SIEA vasküler bölgesinin orta hattı geçmediğini belirlediler. Bu, 6 hastada SIEA pedikülünün terk edilmesi dahil olmak üzere 11 hastada (% 44) cerrahi planda bir değişikliğe yol açtı.¹⁶⁵ Holm ve arkadaşları tarafından yapılan ayrı bir çalışmada, serbest derin inferior epigastrik perforatör (DIEP) fleplerinin perfüzyon bölgelerini değerlendirmek için intraoperatif olarak perfüzyon ölçümleri yapıldı.¹⁶⁶

Komorowska-Timek ve Gurtner, doku perfüzyonunu haritalamak için 24 ardışık meme rekonstrüksiyonuna (16 doku genişletici ve 8 otolog flep) ICG anjiyografi uyguladılar. ICG görüntüleme ile tespit edilen tüm yetersiz perfüze cildi çıkardılar ve bu

da % 4 komplikasyon oranıyla sonuçlandı. Bu, benzer demografik özelliklere sahip önceki ardışık hastalarda gözlemlenen % 15 komplikasyon oranıyla olumlu şekilde karşılaştırıldı. Bu çalışma, ICG anjiyografinin maksimum doku genişletici dolum hacmini belirlemede ve otolog meme rekonstrüksiyonunda şüpheli perfüze olmuş dokunun canlılığını doğrulamada klinik faydası olduğunu göstermiştir.¹⁶⁷

Plastik cerrahi prosedürlere kanıta dayalı bir yaklaşım, perfüzyonun intraoperatif değerlendirmesine dayanan önemli bir hedef olmaya devam etmektedir. Nihai hedef, flep cerrahisi ile ilişkili morbiditeyi azaltmaktır. ICG anjiyografi, flep seçiminin preoperatif planlamasında ve rekonstrüktif cerrahide kullanılan fleplerin intraoperatif/postoperatif değerlendirilmesinde faydalı olabilir. Replantasyon cerrahisinde, travma veya kanser cerrahisinde cerrahi debridmanda ve hatta amputasyon seviyelerinin belirlenmesinde kararlara varmada yardımcı olma potansiyeline sahiptir. ICG anjiyografi, donör morbiditesini en aza indiren ve klinik sonuçları iyileştiren rekonstrüksiyonlar sağlayan, plastik cerrahlar için önem teşkil eden perforatörleri, anjiyozomları ve flep perfüzyonu değerlendirmelerini sağlayan yeni bir teknolojidir. Bu teknolojinin kullanımı, yalnızca zayıf kan temini ile ilgili herhangi bir uzmanlığı kapsadığı için büyümeye devam edecektir. ICG anjiyografi plastik cerrahi haricinde diğer branşlarda da kullanılmaktadır. Mastektomi fleplerini değerlendiren genel cerrahlar ve bağırsak anastomozlarında perfüzyonu değerlendiren kolorektal cerrahlar bu teknolojiyi kullanmaktadır. ICG anjiyografinin en büyük zayıflıklarından biri, yalnızca zaman içinde enstantane olarak doğru olmasıdır. Bu nedenle bölgesel vazospazm, postoperatif ödem, pansuman ve hasta uyumsuzluğu gibi diğer etkilere bağlı flep iskemisini tahmin etmede % 100 doğru olmayabilir. Buna rağmen, sağlanan bilgiler potansiyel olarak ameliyatı yapan cerraha gerçek zamanlı olarak sonuçları iyileştirebilecek inanılmaz bir içgörü sağlayabilir.

Çalışmamızda, ICG anestezi altındaki sıçanlara kuyruk venlerinden uygulanmış olup, sol alt ekstremitte % 100 olacak şekilde flep perfüzyonu yüzdelik olarak değerlendirilmiştir.

Anjiyogenezis düzensiz olduğunda, sağlığımız üzerinde büyük bir etkisi vardır ve bazı durumlarda beklenmedik birçok bozukluğun patogenezeine rol oynar. Sistemin az çalışması yara iyileşmesini bozduğu gibi çok çalışması da tümör oluşması ve sonucunda metastaz için gereklidir. Bu sistem tümörlerde aşırı şekilde çalışır. Ancak kanıtlar bunun

hematolojik neoplazilerde de önemli bir olay olduğunu göstermektedir. Bu nedenle anjiyogenez, tedavi için varsayılan bir hedeftir. Farklı anjiyogenez inhibitörlerinin potansiyel uygulaması şu anda yoğun klinik araştırma altındadır. Anjiyogenez biyolojisinin daha iyi anlaşılması, bu karmaşık süreçle ilişkili birçok hastalığın tedavisi için yeni hedefler ortaya çıkarabilir.¹⁶⁸

Yeni kılcal kan damarlarının oluşumu, anjiyogenez promotörleri ve inhibitörlerinin organize üretimine bağlıdır. Anjiyogenez, miyokardda embriyonik gelişim, ovulasyon, yara onarımı ve kollateral damar oluşumu dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde karmaşık ve önemli bir süreçtir. Anjiyogenezin, tümör büyümesi de dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarda kritik bir rol oynadığının anlaşılması, çeşitli proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerin ve stratejilerin keşfedilmesine yol açmıştır. Anjiyogenezin desteklenmesi ya proanjiyogenik sitokinlerin, matriks proteinlerinin, büyüme faktörlerinin, diğer önemli araçların üretimi ya da endojen anjiyostatik araçların üretimindeki eksiklik ile belirlenir. Anjiyogenezin anahtar aracı, tümörlerin birçoğu tarafından indüklenen VEGF'dir. VEGF ailesinin de en önemlisi olan VEGF-A, EC'lerin çoğalmasını, filizlenmesini ve tüp oluşumunu indükler.¹⁶⁸

Canlı organizmalardaki damar sistemi, endojen anjiyogenez inhibitörlerinin anjiyogenik uyarılar üzerindeki baskın etkisinden dolayı normalde şartlarda stabil kalır. Yapılan son çalışmalar ana cilt anjiyogenez faktörü olarak vasküler endotelial büyüme faktörünü işaret etmektedir. Deri anjiyogenezi sırasında, vasküler endotelial büyüme faktörünün ekspresyonu, epidermal keratinositlerde transforming growth factor- α (TGF- α) ve hipoksi dahil olmak üzere çeşitli uyarılar tarafından indüklenir. Bu da dermin vaskülarizasyonunda artışa yol açar.¹⁶⁹ Pentoksifilin deri hipoksisi sonrası VEGF ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir.¹⁷⁰ Yine karbon monoksitin bazı dokularda VEGF ve HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor-1) ekspresyonunun artırdığına dair çalışmalar mevcuttur.¹⁷¹

Cilt nekrozunu değerlendirmek üzere birçok anjiyogenik parametreler histopatolojik olarak incelenebilir. Öncelikle VEGF ailesi ve bunlara ait reseptör antikoru olmak üzere HIF-1a, anjiyopoetinler (Ang1 ve Ang2) ve bunları bağlayan Tie reseptörleri, FGF (fibroblast growth factor), CSF (colony-stimulating factor), PDGF (platelet derived growth factor), TGF- β (tumor growth factor beta), TGF- α (tumor

growth factor-alfa), TNF-a (tumor necrosis factor), EGF (epidermal growth factor), incelenebilir.¹⁶⁸

Ancak literatürde CORM-3'ün ciltte VEGF ekspresyonunu artırdığına dair kanıt yok denecek azdır. Anjiyogenezi değerlendirmede kullanılan diğer parametrelerin proje bütçe kapsamını çok aşabileceği sebebiyle ve anjiyogenezin ana kavşağının VEGF olması sebebiyle bu çalışmada VEGF'i histopatolojik inceleme için uygun bulduk.

Yara iyileşmesi için gerekli olan mediatörlerin salınması ve hücre göçlerinin tamamlanması ile yara yerinde anjiyogenez 5. günde maksimuma ulaşır. Yapılan çalışmalarda VEGF ekspresyonunun 5.-6. günlerde maksimum seviyeye ulaştığı görülmüştür.¹⁷² Yine başka bir çalışmada ise HIF-1 α seviyesinin ise 6.-7. Günlerde maksimuma ulaştığı görülmüştür.¹⁷³ Bu nedenle çalışmamızda, anjiyogenezin maksimum seviyelerde olduğu ve anjiyogeneze bağlı mediatörlerin pik yaptığı 6. günde VEGF seviyeleri değerlendirilmiştir.

Literatürdeki bilgiler ışığında bu çalışmamızda CORM-3 ve pentoksifilinin random fleplerin viabilitesi üzerindeki etkilerini ölçmeye ve bu iki ajanın birbirine üstünlüklerini inceledik. Elde ettiğimiz verileri literatürdeki diğer çalışmalarla kıyasladık.

Biz de Yabluchanskiy ve arkadaşlarının hemorajik inme üzerindeki yaptığı çalışmada 4 mg/kg ve 8 mg/kg CORM-3 uygulaması arasında anlamlı fark olmaması¹²¹ ve Karaduman'ın yaptığı rat alt ekstremitesinde CORM-3'ün iskemi reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisini 10 mg/kg CORM-3 uygulayarak değerlendirmesini¹²⁴ baz alarak, çalışmamızda 8 mg/kg CORM-3 uyguladık. Yüksek doz uygulamayarak CORM-3'ün toksik olabilecek etkilerinden kaçındık. Ayrıca anjiyogenezin 5. günde gerçekleştiği varsayılarak, nekroz demarkasyon hattının tam olarak oturması ve VEGF ekspresyonunu daha net anlamak amacıyla deneyi 6 gün planladık. CORM-3 yarılanma ömrünü göz önüne aldığımızda günlük enjeksiyon yaptık.

Literatürde bulunan birçok çalışma göz önüne alınarak PTX uygulamasını 40 mg/kg olarak belirledik.^{124,60} Ayrıca CORM-3 uygulaması ile eşit şartlarda olması açısından PTX uygulamasını da 6 günle sınırlı tutuldu.

Deney sonunda sonuçların değerlendirilmesi amacıyla topografik flep alanı hesaplaması birçok çalışmada altın standart değer olarak karşımıza çıkmaktadır.^{174,175,176,87} Fleplerin nekroz miktarı cm² cinsinden ölçülüp grupların nekroz

oranları hesaplandığında gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli ölçüde anlamlı bulundu. Deney kontrol grubunda nekroz oranı ortalama % 35.02±4.13 bulunurken, CORM-3 grubunda % 18.51±2.83, PTX grubunda % 19.90±2.50 bulunmuştur. Gruplar karşılaştırıldığında deney kontrol grubu ile CORM-3 grubu arasında nekroz alanı ve nekroz oranı açısından farkın anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). Yine yapılan analiz sonucunda deney kontrol grubu ile pentoksifilin grubu arasında nekroz alanı ve nekroz oranı açısından farkın anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). CORM-3 grubu ile pentoksifilin grubu arasında ise nekroz alanı ve oranı açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 11). Bu durum bize CORM-3 ve PTX'in cilt fleplerinde nekrozun azaltılmasında oldukça etkili olduğunu göstermiştir. PTX'in flep beslenmesine olumlu etkisi eski çalışmalar baz alındığında beklenen bir sonuçu. Ancak CORM-3'ün flep viabilitesine etkisi yapılan farklı türdeki çalışmalar göz önüne alındığında öngörülen bir sonuç olsa da bu kadar etkili olduğu bu çalışma ile anlaşılmıştır.

Aker ve arkadaşlarının pentoksifilin ve nikotin Mcfarlane flep perfüzyonuna olan etkisinin kıyaslayarak yaptığı çalışmada pentoksifilin grubundaki flep yaşayabilirliği % 80,1 olarak ölçülmüştür. Nikotin grubunda ise yaşayan flep yüzdesi ise % 59 olarak ölçülmüştür.¹⁷⁷ Bizim çalışmamız ile birebir paralel sonuçlar elde etmişlerdir.

Sarifakioğlu ve arkadaşlarının 10 mg/kg/gün sildenafil ile Mcfarlane flep viabilitesi üzerinde yaptığı çalışmada flep yaşayabilirliğini sildenafil grubunda % 77,4 bulunurken, kontrol grubunda % 71,6 olarak ölçülmüştür.¹⁷⁸

Antonio ve arkadaşlarının Mcfarlane cilt flebi yaşayabilirliği üzerinde PTX ve hyaluronidaz ile yaptığı çalışmada kontrol grubunun nekroz yüzdesi % 48,17 iken PTX grubunda nekroz oranı % 33,16 ve hyaluronidaz grubunda % 21,4 olarak tespit edilmiştir.¹⁷⁹

Zhou ve arkadaşlarının kalsitriolün flep beslenmesine olan etkileri üzerinde yaptığı çalışmada kalsitriol grubunun viabl flep yüzdesi % 70,42 bulunurken, kontrol grubunun ise % 49,20 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca çalışmada kalsitriolün VEGF mRNA düzeyini de artırdığı tespit edilmiştir.¹⁸⁰

Yapılan histopatolojik incelemede kontrol grubunda epidermis ve tabakaları normal olarak değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra deney kontrol grubunda stratum korneum tabakasında incelleme görülmüş bazı yerlerde dökülmeler görülmüştür (Şekil

29). Şekil 28 ve Şekil 30 incelendiğinde CORM-3 grubunda bu tabakanın kontrol grubuna çok benzer olduğu hatta daha kalınlaşmış bir stratum korneum tabakası görülmüştür. PTX grubunda ise CORM-3 grubu kadar olmasa da kalınlaşmış stratum korneum tabakası tespit edilmiştir. Bu durum CORM-3 ün epidermisin rejenerasyonunda ciddi katkılarının olduğunu göstermiştir.

Dermiste düzensiz sıkı bağ dokusunu oluşturan kollajen liflerin dağılımının ve yoğunluğunun kontrol grubuna göre deney kontrol grubunda seyrelme görülmüştür. CORM-3 grubunda ise kollajen liflerin yoğunluğunun kontrol grubuna benzer olduğu görülmüştür (Şekil 30). Buna karşın PTX grubunda ise kollajen lif yoğunluğunun CORM-3 grubu gibi artmış oluğu görölse de homojen dağılım göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 31). Ayrıca CORM-3 grubunda vasküler yoğunluğun deney kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlemlenmiştir.

Alınan örneklerin değerlendirilmesi sonucunda kapiller damarların endotel hücrelerinin çevresinde VEGF üretimi VEGF antikoru ile boyanarak değerlendirildi. (Tablo 12) Kontrol grubunda endotel hücre çevresinde minimal de olsa VEGF üretimi görüldü (Şekil 33). Bu durum normal zamanlarda bazal seviyede VEGF üretildiğini gösterdi. Deney kontrol grubunda hücresel rejenerasyon ve anjiyogenez oluşturma çabası nedeni ile kontrol grubuna kıyasla daha yoğun boyanma gözlemlendi (Şekil 34). PTX grubunda ise deney kontrol grubuna göre kıyasla daha fazla boyanma görüldü (Şekil 36). Literatürdeki çalışmalar ışığında PTX uygulanması VEGF üretimini artırdığını gözlemllemek beklediğimiz bir sonuçtu. Bunlara karşın CORM-3 grubunda çok yoğun boyanma görüldü (Şekil 35). VEGF üretiminin CORM-3 tedavisi ile semikantitatif değerlendirilerek diğer tüm gruplardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Elektron mikroskopisi ile yapılan incelemelerde epidermis ve dermis katmanlarında deney kontrol grubunda ve pentoksifilin grubunda bağ doku hücrelerinde dejenerasyon ve apoptotik olduğu gözlenirken, CORM-3 grubunda kontrol grubu gibi normal yapıda değerlendirildi (Şekil 39). Grupların endotel perisit çekirdeklerinde deney kontrol grubu ve pentoksifilin grubunda heterokromatin artışı gözlenirken, CORM-3 grubunda ökromatin yapıda olduğu görüldü. CORM-3 grubunda fibroblast çekirdeklerinde kromatin kondensasyonunun normal yapıda olduğu, sitoplazmik organel harabiyeti ve litik değişikliklerin deney ve Pentoksifilin gruplarıyla karşılaştırıldığında azaldığı dikkati çekti. CORM-3 grubundaki perisit çekirdeklerinde

ökromatin artışı hücrelerin rejenerasyon ve çoğalma eğiliminde olduğunu göstermektedir.

İndosiyanin yeşili kullanılarak anjiyografi ile flep perfüzyon değerlendirilmesi son yıllarda plastik cerrahide önemli yer edinmiştir. Bir çok çalışmada ICG kullanılarak random fleplerin perfüzyonu değerlendirilmiştir.^{181,182} Biz de çalışmamızda ICG ile SPY floresans cihazı ile perfüzyon değerlendirmesi yaptık ve grupları karşılaştırdık. Deney kontrol grubunda proksimal, orta ve distal bölümlerinde perfüzyon ortalama olarak 74.37 ± 6.09 , 60.50 ± 7.54 , 32.87 ± 14.23 olarak değerlendirildi (Tablo 14). CORM-3 grubu ise sırasıyla 83.75 ± 4.86 , 72.37 ± 7.83 , 46.97 ± 6.83 olarak değerlendirildi (Tablo 15). PTX grubu da sırasıyla 80.12 ± 8.47 , 66.25 ± 14.00 , 45.12 ± 9.70 olarak değerlendirildi (Tablo 16).

Yapılan analiz sonucunda deney kontrol grubu ile de CORM-3 grubu arasında flep proksimal, orta ve distal perfüzyon değerleri açısından farkın anlamlı olduğu saptandı. Ancak PTX ve CORM-3 grubu arasında anlamlı fark görülmedi.

Çalışmamızda kullandığımız tüm bu parametreler birçok farklı çalışmalarda kullanılmıştır. Biz de bu parametreleri tek çalışmada birleştirerek elde ettiğimiz veriler ışığında güvenilir sonuçlar elde ettiğimizi düşünüyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Doku defektlerinin onarımı plastik cerrahinin en temel uğraşı alanlarından biridir. Defekt onarımı için en sık flepler kullanılmakta, flep çeşitleri arasında ise random flepler kullanımı teknik kolaylığı sebebiyle sıkça tercih edilmektedir. Bu fleplerde flep nekrozu sık karşılaştığımız istenmeyen sonuçlardan biri olması sebebiyle, bu sorunun çözümü için birçok çalışma yapılmış ve hala bu konudaki araştırmalar sürmektedir.

2. CORM-3'ün doku iyileşmesi ve rejenerasyonu hakkında çalışmalar oldukça kısıtlı olup, random cilt flepleri üzerine olan etkilerini inceleyen çalışma literatürde yoktur.

3. Biz de çalışmamızda antiinflamatuvar, antiapoptotik, antioksidan ve vazodilatör etkileri olan CORM-3'ü ve bir ksantin türevi olan PTX'i sıçan Mcfarlane random cilt flebine olan etkilerini inceledik. Elde ettiğimiz verilere göre her iki ajanın da flep nekroz alanlarının azalmasında başarılı olduğu deney kontrol grubuna göre anlamlı fark olduğu görülürken, iki ajan arasında sonuçlarda anlamlı fark olmadığı görüldü.

4. CORM-3 grubunda diğer gruplara nazaran VEGF düzeylerini fazla artırması anjiyogenezisin önemli bir indükleyicisi olduğunu göstermektedir. PTX'e göre VEGF miktarını anlamlı derecede fazla artırmasına karşın bunun sonucunu flep nekroz oranlarında göremememizin sebebi anjiyogenezisin geç dönemde başlaması sebebiyle deney süresinin kısa sürmesi olabilir. Bu sebepten ötürü CORM-3 enjeksiyonu ameliyat öncesi profilaktik önerilebilir. Bu sonuçlarla CORM-3, sadece random fleplerde değil, aksiyel ve serbest fleplerde de tercih edilebilir hatta kronik yaralarda da kullanımı söz konusu olabilir.

5. Daha ileri çalışma olarak CORM-3 'ün etkilerini daha iyi anlamak maksadıyla diğer anjiyogenetik faktörlerin (HIF-1 α , FGF, PDGF- β , Ang), proinflamatuvar ve antiinflamatuvar süreçte etkili olan sitokinlerin (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL10), apoptotik ve antiapoptotik özelliğini değerlendirmek adına önemli olan genlerin (Bcl-2, kaspaz, Heat shock protein-90) ve antioksidan enzimlerin (CAT, GSH-PX, SOD gibi) ölçümleri yapılabilir.

6. Karaciğer ve kalp transplantasyonları üzerinde yapılan çalışmalarda transplante edilecek organın saklama solüsyonuna CORM-3 eklenmesi sonucunda reperfüzyon hasarını azalttığı ve doku perfüzyonunu artırdığı bilgisi ışığında, serbest flep transferi ve ekstremitte replantasyonları sırasında doku CORM-3 ile yıkanabilir. Bu konuda yeni çalışmalar yapılabilir.

7. CORM-3, etkilerinin daha spesifik boyutta irdelenmesi ve tedavi doz ve günlerinin daha net anlaşılması için birçok çalışmaya gebedir. İlerleyen yıllarda CORM-3'ün klinik kullanıma girmesiyle plastik cerrahinin tedavi algoritmalarına dahil olacağını düşünüyoruz.



KAYNAKLAR

1. **Davies BW, Lewis RD, Pennington G.** The impact of vasodilators on random-pattern skin flap survival in the rat following mainstream smoke exposure. *Ann Plast Surg.* **1998**;40(6):630-636. doi:10.1097/0000637-199806000-00010
2. **Rinkinen J, Halvorson EG.** Topical Vasodilators in Microsurgery: What Is the Evidence? *J Reconstr Microsurg.* **2017**;33(1):001-007. doi:10.1055/s-0036-1592191
3. **Dennis T. Monteiro.** The influence of pentoxifylline on skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg.* Published online **1986**.
4. Musameh MD, Green CJ, Mann BE, Fuller BJ, Motterlini R. Improved Myocardial Function After Cold Storage With Preservation Solution Supplemented With a Carbon Monoxide-Releasing Molecule (CORM-3). *J Hear Lung Transplant.* **2007**;26(11):1192-1198. doi:10.1016/j.healun.2007.08.005
5. **Lo Iacono L, Boczkowski J, Zini R, et al.** A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) uncouples mitochondrial respiration and modulates the production of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* **2011**;50(11):1556-1564. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.033
6. **Thorne CH, Chung KC, Gosain AK, et al.** Grabb and Smith's plastic surgery: Seventh edition. *Grabb Smith's Plast Surg Seventh Ed.* Published online September 26, **2013**:1-1017. doi:10.1097/PRS.0000000000000337
7. **Fang F, Chung KC.** An evolutionary perspective on the history of flap reconstruction in the upper extremity. *Hand Clin.* **2014**;30(2):109-122. doi:10.1016/j.hcl.2013.12.001
8. **Ixoux Bal.** Plastic Surgery in World War I and in World War II. *Fifty-seventh Annu Sess South Surg Assoc.* Published online **1945**:610-621.
9. **Thorne CH, Chung KC, Gosain AK, et al.** Grabb and Smith's plastic surgery: Seventh edition. *Grabb Smith's Plast Surg Seventh Ed.* Published online **2013**:1-1017. doi:10.1097/prs.0000000000000337
10. **Ronald A. Malt, MD, and Charles F. McKhann, MD BW.** Replantation of severed arms. *jama.* Published online **1964**.
11. **George Cormack L.** *The Arterial Anatomy of Skin Flaps 2nd Edition.*; **1994**.

12. **Taylor GI, Palmer JH.** The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg.* **1987**;40(2):113-141. doi:10.1016/0007-1226(87)90185-8
13. **S. J. Mathes.** *Mathes Plastic Surgery, N. B. Vedder, "Flap Physiology";* **2006.**
14. **Lamberty B HC.** *Mastery of Plastic and Reconstructive Surgery; Flaps: Physiology, Principles of Design, and Pitfalls;* **1994.**
15. **K. Shokrollahi, I. S. Whitaker and FN.** *Flaps Practical Reconstructive Surgery.;* **2017.**
16. **Niranjan NS, Price RD, Govilkar PS.** Fascial feeder and perforator-based V-Y advancement flaps in the reconstruction of lower limb defects. *Br J Plast Surg.* **2000**;53(8):679-689. doi:10.1054/bjps.2000.3428
17. **Geoffrey G. Hallock.** *Classification of Flaps, Flaps and Reconstructive Surgery.;* **2009.**
18. **Mathes S NF.** *Anatomy, Technique. Flap Selection, Analysis of Features, Modifications, and Applications.;* **1997.**
19. **Taylor, G Ian F.R.C.S., F.R.A.C.S.1; Gianoutsos, Mark P. M.B., B.S.; Morris, Steven F. M.D. FRCS (C.** The Neurovascular Territories of the Skin and Muscles: Anatomic Study and Clinical Implications. *Plast Reconstr Surg.* **1994**;94(1):1-36.
20. **Pang, Cho Y.; Neligan PC.** *Flap Pathophysiology and Pharmacology. Plastic Surgery Six Volumes. 3rd Ed.;* **2012.**
21. **McCarthy.** *Plastic Surgery.;* **1990.**
22. **Desyatnikova S, Winslow C, Cohen JI, Wax MK.** Effect of anemia on the fasciocutaneous flap survival in a rat model. *Laryngoscope.* **2001**;111(4 I):572-575. doi:10.1097/00005537-200104000-00004
23. **Kim KZ, Thompson DH, George TF, McQuillan PM, Kao TC.** Effect of anemia on survival of myocutaneous flaps in the pig. *Otolaryngol - Head Neck Surg.* **1994**;111(4):509-512. doi:10.1177/019459989411100420
24. **Gatti JE, LaRossa D, Neff SR, Silverman DG.** Altered skin flap survival and fluorescein kinetics with hemodilution. *Surgery.* **1982**;92(2):200—205. <http://europepmc.org/abstract/MED/7101122>
25. **Gottrup F, Oredsson S, Price DC, Mathes SJ, Hohn DC.** A comparative study of skin blood flow in musculocutaneous and random pattern flaps. *J Surg Res.* **1984**;37(6):443-447. doi:10.1016/0022-4804(84)90211-7

26. **Koch S, Claesson-welsh L.** Signal Transduction by VEGFRs.pdf. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2012**;July(2):7.
27. **Guerra A, Belinha J, Jorge RN.** Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. *J Theor Biol.* **2018**;459:1-17. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.09.020>
28. **Penn JW, Grobelaar AO, Rolfe KJ.** The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: A review. *Int J Burn Trauma.* **2012**;2(1):18-28. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84872233600&partnerID=40&md5=a2c32e07942bc2ef62b8f1ceea5255ec>
29. **Willenborg S, Lucas T, van Loo G, et al.** CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood.* **2012**;120(3):613-625. doi:10.1182/blood-2012-01-403386
30. **Brown LF, Yeo K-T, Berse B, et al.** Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound Healing. *J Exp Med.* **1992**;176(5):1375-1379. doi:10.1084/jem.176.5.1375
31. **Elson DA, Ryan HE, Snow JW, Johnson R, Arbeit JM.** Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing. *Cancer Res.* **2000**;60(21):6189-6195. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034326273&partnerID=40&md5=0a8372161225d17977085882dbffedfe>
32. **Rini BI, Small EJ.** Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* **2005**;23(5):1028-1043. doi:10.1200/JCO.2005.01.186
33. **Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al.** The human gene for vascular endothelial growth factor: Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* **1991**;266(18):11947-11954. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0025999033&partnerID=40&md5=a7502a681408a5558e4d299b43d864ef>
34. **Nishi M, Abe Y, Tomii Y, et al.** Cell binding isoforms of vascular endothelial growth factor-A (VEGF189) contribute to blood flow-distant metastasis of pulmonary adenocarcinoma. *Int J Oncol.* **2005**;26(6):1517-1524. doi:10.3892/ijo.26.6.1517
35. **Dvorak HF.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* **2002**;20(21):4368-4380. doi:10.1200/JCO.2002.10.088
36. **Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P.** VEGF: Once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays.* **2004**;26(9):943-954. doi:10.1002/bies.20092

37. **Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L.** VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci.* **2003**;28(9):488-494. doi:10.1016/S0968-0004(03)00193-2
38. **Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD.** The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther.* **2006**;19(1):61-69. doi:10.1016/j.pupt.2005.02.007
39. **Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, et al.** Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum.* **2003**;48(9):2660-2669. doi:10.1002/art.11232
40. **Silvestre J-S, Tamarat R, Ebrahimian TG, et al.** Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res.* **2003**;93(2):114-123. doi:10.1161/01.RES.0000081594.21764.44
41. **Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al.** Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**;95(2):548-553. doi:10.1073/pnas.95.2.548
42. **Cao Y, Linden P, Farnebo J, et al.** Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**;95(24):14389-14394. doi:10.1073/pnas.95.24.14389
43. **Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, et al.** Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science (80-).* **1997**;276(5317):1423-1425. doi:10.1126/science.276.5317.1423
44. **Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, et al.** A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **1999**;18(2):363-374. doi:10.1093/emboj/18.2.363
45. **Semenza GL, Wang GL.** A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* **1992**;12(12):5447-5454. doi:10.1128/mcb.12.12.5447-5454.1992
46. **Goldberg MA, Schneider TJ.** Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem.* **1994**;269(6):4355-4359. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41787-X
47. **Forsythe JA, Jiang BH, Iyer N V, et al.** Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* **1996**;16(9):4604-4613. doi:10.1128/MCB.16.9.4604
48. **Carmeliet P, Dor Y, Herbert J-M, et al.** Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature.* **1998**;394(6692):485-490. doi:10.1038/28867

49. **Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S.** Hypoxia Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Endothelial Cells . *Circ Res.* **1995**;77(3):638-643. doi:10.1161/01.RES.77.3.638
50. **Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al.** Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood.* **2005**;105(2):659-669. doi:10.1182/blood-2004-07-2958
51. **Carmeliet P.** Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* **2003**;9(6):653-660. doi:10.1038/nm0603-653
52. **Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J.** Vasculogenesis, Angiogenesis, and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border. *Cell.* **1998**;93(5):661-664. doi:10.1016/S0092-8674(00)81426-9
53. **Korhonen J, Polvi A, Partanen J, Alitalo K.** The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene.* **1994**;9(2):395-403. <http://europepmc.org/abstract/MED/7507228>
54. **Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al.** Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning. *Cell.* **1996**;87(7):1161-1169. doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81812-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81812-7)
55. **Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W.** Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol.* **1998**;8(9):529-532. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70205-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70205-2)
56. **Chen J-X, Zeng H, Lawrence ML, Blackwell TS, Meyrick B.** Angiopoietin-1-induced angiogenesis is modulated by endothelial NADPH oxidase. *Am J Physiol Circ Physiol.* **2006**;291(4):H1563-H1572. doi:10.1152/ajpheart.01081.2005
57. **C. MP, Chitra S, F. JP, et al.** Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science (80-).* **1997**;277(5322):55-60. doi:10.1126/science.277.5322.55
58. **Pang, Cho Y. Ph.D.; Forrest, Christopher R. M.D.; Neligan, Peter C. F.R.C.S.(I).; Lindsay, William K. M.D. FRCS** (C. Augmentation of Blood Flow in Delayed Random Skin Flaps in the Pig Effect of Length of Delay Period and Angiogenesis. *Plast Reconstr Surg.* **1986**;78(1):68-74.
59. **Taylor GI1, Corlett RJ, Caddy CM ZR.** An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surgery, 01 Mar 1992, 89(3)408-16; Discuss 417-8 PMID 1741464.* Published online **1992**.
60. **Taha S. Dr. Taha Sönmez** (Tıpta Uzmanlık Tezi) Danışman Prof. Dr. Ufuk Emekli. Published online **2018**.

61. **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(3):357-359. doi:10.1097/00000658-198503000-00018
62. **Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Narayanan K, Basford RE FJ.** Augmentation of skin flap survival with allopurinol. *Ann Plast Surgery, 01 Jun 1987, 18(6)*494-498. Published online 1987.
63. **Kumar V and Aka.** *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.* Tenth Edit. Elsevier Inc; **2021.**
64. **Kerrigan CL.** Skin flap failure: Pathophysiology. *Plast Reconstr Surg.* **1983**;72(6):766-774. doi:10.1097/00006534-198312000-00003
65. **Van den Heuvel MGW, Buurman WA, Bast A, van der Hulst RRWJ.** Review: ischaemia-reperfusion injury in flap surgery. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* **2009**;62(6):721-726. doi:10.1016/j.bjps.2009.01.060
66. **Reinisch JF.** The pathophysiology of skin flap circulation: The delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg.* **1974**;54(5):585-598. doi:10.1097/00006534-197411000-00010
67. **Khiabani KT, Kerrigan CL.** Differing flow patterns between ischemically challenged flap skin and flap skeletal muscle: Implications for salvage regimens. *Plast Reconstr Surg.* **2002**;109(1):220-227. doi:10.1097/00006534-200201000-00033
68. **Maeda M, Fukui A, Tamai S.** Combined therapy with antithrombotic agents and radical scavengers for reperfusion injury of flaps. *J Reconstr Microsurg.* **1991**;7(3):233-243. doi:10.1055/s-2007-1006784
69. **Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S.** Arterial ischemia in skin flaps: Microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg.* **1994**;93(2):375-385. doi:10.1097/00006534-199402000-00024
70. **Morris SF, Taylor GI.** Predicting the survival of experimental skin flaps with a knowledge of the vascular architecture. *Plast Reconstr Surg.* **1993**;92(7):1352—1361. <http://europepmc.org/abstract/MED/8248411>
71. **Guba AM.** Study of the delay phenomenon in axial pattern flaps in pigs. *Plast Reconstr Surg.* **1979**;63(4):550—554. doi:10.1097/00006534-197904000-00018
72. **Dhar, Shymal C. M.D.; Taylor, G. Ian F.R.C.S., F.R.A.C.S., F.A.C.S. M.** The Delay Phenomenon: The Story Unfolds. *Plast Reconstr Surg.* **1999**;104(7):2079-2091.
73. **Rees R, Punch J, Shaheen K, Cashmer B, Guice K, Smith DJ.** The stress response in skin: the role of neutrophil products in preconditioning. *Plast Reconstr Surg.* **1993**;92(1):110—7; discussion 118—9. <http://europepmc.org/abstract/MED/8390696>

74. **Coşkunfirat OK, Okşar HS, Ozgentaş HE.** Effect of the delay phenomenon in the rat single-perforator-based abdominal skin flap model. *Ann Plast Surg.* **2000**;45(1):42—47. doi:10.1097/0000637-200045010-00008
75. **Hopper RA, Forrest CR, Xu H, et al.** Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* **2000**;279(2):R666-R676. doi:10.1152/ajpregu.2000.279.2.R666
76. **Maldonado C, Stadelmann WK, Ramirez S, Quan EE, Barker JH.** Preconditioning of latissimus dorsi muscle flaps with monophosphoryl lipid a. *Plast Reconstr Surg.* **2003**;111(1):267—274. doi:10.1097/01.prs.0000033066.12439.c0
77. **Hallock GG, Rice DC.** Efficacy of venous supercharging of the deep inferior epigastric perforator flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* **2005**;116(2):551-555. doi:10.1097/01.prs.0000172889.62564.e1
78. **Tan O, Atik B, Bekerecioglu M.** Supercharged reverse-flow sural flap: A new modification increasing the reliability of the flap. *Microsurgery.* **2005**;25(1):36-43. doi:https://doi.org/10.1002/micr.20072
79. **Sasaki GH, Pang CY.** Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg.* **1980**;65(2):152—158. doi:10.1097/00006534-198002000-00005
80. **Awwad AM, White RJ, Webster MHC, Vance JP.** The effect of temperature on blood flow in island and free skin flaps: an experimental study. *Br J Plast Surg.* **1983**;36(3):373-382. doi:https://doi.org/10.1016/S0007-1226(83)90064-4
81. **Koenig WJ, Lohner RA, Perdrizet GA, Lohner ME, Schweitzer RT, Lewis VL.** Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery. *Plast Reconstr Surg.* **1992**;90(4):659—664. doi:10.1097/00006534-199210000-00016
82. **Ramon Y, Abramovich A, Shupak A, et al.** Effect of hyperbaric oxygen on a rat transverse rectus abdominis myocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg.* **1998**;102(2):416-422. doi:10.1097/00006534-199808000-00019
83. **Angel MF, Im MJ, Chung H-K, Kolk CA Vander, Manson PN.** Effects of combined cold and hyperbaric oxygen storage on free flap survival. *Microsurgery.* **1994**;15(9):648-651. doi:https://doi.org/10.1002/micr.1920150909
84. **Rothkopf DM, Chu B, Bern S, May JW.** The effect of dextran on microvascular thrombosis in an experimental rabbit model. *Plast Reconstr Surg.* **1993**;92(3):511—515. doi:10.1097/00006534-199309000-00021
85. **Lee C, Mehran RJ, Lessard M-L, Kerrigan CL.** Leeches: controlled trial in venous compromised rat epigastric flaps. *Br J Plast Surg.* **1992**;45(3):235-238. doi:https://doi.org/10.1016/0007-1226(92)90085-C

86. **Hataya Y, Matsuo K, Ishigaki M, Imai Y, Taki K.** Retrograde intra-arterial infusion of prostaglandin E1 and heparin for the no-reflow phenomenon after oromandibular reconstruction with a free fibular flap. *Ann Plast Surg.* **1999**;42(1):92—95. doi:10.1097/00000637-199901000-00016
87. **Hosnuter M, Babuçcu O, Kargi E, Altinyazar C.** Dual preconditioning: Effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival. *Ann Plast Surg.* **2003**;50(4):398-402. doi:10.1097/01.SAP.0000037261.84618.7F
88. **Land W, Schneeberger H, Schleibner S, et al.** The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation.* **1994**;57(2):211—217. doi:10.1097/00007890-199401001-00010
89. **Prada FS, Arrunategui G, Alves MC, Ferreira MC, Zumioti A V.** Effect of allopurinol, superoxide-dismutase, and hyperbaric oxygen on flap survival. *Microsurgery.* **2002**;22(8):352-360. doi:https://doi.org/10.1002/micr.10073
90. **Bilgin-Karabulut A, Ademoğlu E, Aydın I, Erer M, Gökkuşu C.** Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. *J Reconstr Microsurg.* **2001**;17(6):425-429. doi:10.1055/s-2001-16356
91. **Picard-Ami LA, MacKay A, Kerrigan CL.** Pathophysiology of ischemic skin flaps: differences in xanthine oxidase levels among rats, pigs, and humans. *Plast Reconstr Surg.* **1991**;87(4):750—755. <http://europepmc.org/abstract/MED/2008472>
92. **Waikakul S, Unnanantana A, Vanadurongwan V.** The Role of Allopurinol in Digital Replantation. *J Hand Surg Am.* **1999**;24(3):325-327. doi:10.1054/JHSB.1998.0215
93. **Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, et al.** Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischaemic flap surgery. *Br J Plast Surg.* **1986**;39(4):469-472. doi:https://doi.org/10.1016/0007-1226(86)90115-3
94. **Fu W, Jiao X.** The effect of mannitol and anisodamin on the prevention of free radical injury to post-ischaemia flaps: an experimental study. *Br J Plast Surg.* **1995**;48(4):218-221. doi:https://doi.org/10.1016/0007-1226(95)90005-5
95. **Yokoyama K, Itoman M, Takagishi K, Yamamoto M.** Protective effects of coenzyme Q10 on ischemia-induced reperfusion injury in ischemic limb models. *Plast Reconstr Surg.* **1992**;90(5):890-898. doi:10.1097/00006534-199211000-00026
96. **Cuono CB, Cortes A, Marquetand R, Weisberg V, Armitage IM.** Augmentation of experimental skin flap survival via postoperative phosphocreatine replacement. *Surgery.* **1987**;102(2):263-268. doi:10.5555/uri:pii:0039606087902431
97. **Finseth F, Adelberg MG.** Prevention of skin flap necrosis by a course of treatment with vasodilator drugs. *Plast Reconstr Surg.* **1978**;61(5):738—743. doi:10.1097/00006534-197805000-00013

98. **Cordeiro PG, Santamaria E, Hu QY, Heerdt P.** Effects of vasoactive medications on the blood flow of island musculocutaneous flaps in swine. *Ann Plast Surg.* **1997**;39(5):524—531. doi:10.1097/00000637-199711000-00013
99. **Nieto CS, García MJS, García PB.** A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg.* **1992**;45(2):113-116. doi:https://doi.org/10.1016/0007-1226(92)90169-X
100. **Goshen J, Wexler MR, Peled IJ.** The use of two alpha blocking agents, phenoxybenzamine and phentolamine, in ointment and injection form to improve skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg.* **1985**;15(5):431—435. doi:10.1097/00000637-198511000-00010
101. **Kennedy TJ, Pistone G, Miller SH.** The effects of reserpine on microcirculatory flow in rat flaps. *Plast Reconstr Surg.* **1979**;63(1):101—110. doi:10.1097/00006534-197901000-00016
102. **Nichter LS, Sobieski MW, Edgerton MT.** Efficacy of topical nitroglycerin for random-pattern skin-flap salvage. *Plast Reconstr Surg.* **1985**;75(6):847—852. doi:10.1097/00006534-198506000-00016
103. **Hira M, Tajima S, Sano S.** Increased survival length of experimental flap by calcium antagonist nifedipine. *Ann Plast Surg.* **1990**;24(1):45—48. doi:10.1097/00000637-199001000-00008
104. **Emery FM, Kodey TR, Bomberger RA, McGregor DB.** The effect of nifedipine on skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg.* **1990**;85(1):61—63. doi:10.1097/00006534-199001000-00011
105. **Nichter LS, Sobieski MW.** Efficacy of verapamil in the salvage of failing random skin flaps. *Ann Plast Surg.* **1988**;21(3):242—245. doi:10.1097/00000637-198809000-00009
106. **Hedén P, Jernbeck J, Kjartansson J, Samuelson UE.** Increased Skin Flap Survival and Arterial Dilation by Calcitonin Gene-Related Peptide: A Study in the Pig. *Scand J Plast Reconstr Surg.* **1989**;23(1):11-16. doi:10.3109/02844318909067502
107. **Saetzler RK, Lehr HA, Barker JH, Kamler M, Galla TJ, Messmer K.** Visualization of nutritive perfusion following tourniquet ischemia in arterial pattern skin flaps: effect of vasoactive medication. *Plast Reconstr Surg.* **1994**;94(5):652—660. doi:10.1097/00006534-199410000-00013
108. **Ramasasthy SS, Waterman P, Angel MF, Futrell JW.** Effect of Fluosol-DA (20%) on skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg.* **1985**;15(5):436—442. doi:10.1097/00000637-198511000-00011
109. **Mauad RJ, Shimizu MHM, Mauad T, de Tolosa EMC.** Buflomedil and pentoxifylline in the viability of dorsal cutaneous flaps of rats treated with nicotine. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* **2006**;59(4):387-392. doi:https://doi.org/10.1016/j.bjps.2005.07.005

110. **Rossillon D, Vanwyck R, Bayet B, Calteux N, De Coninck A.** The action of piracetam in ischaemic flaps. *Br J Plast Surg.* **1987**;40(5):459-466. doi:10.1016/s0007-1226(87)90073-7
111. **Karaavcı NÇ.** Deneyisel subaraknoid kanama modelinde karbonmonoksit releasing molekül-3'ün serebral vazospazm üzerine etkisinin değerlendirilmesi. *Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıpta Uzm Tezi.* **2017**;Erzurum(Danışman: Prof. Dr. Hakan Hadi Kadioğlu).
112. **Dulak J, Józkwicz A, Foresti R, et al.** Heme Oxygenase Activity Modulates Vascular Endothelial Growth Factor Synthesis in Vascular Smooth Muscle Cells. *Antioxidants \& Redox Signal.* **2002**;4(2):229-240. doi:10.1089/152308602753666280
113. **Kaide J-I, Zhang F, Wei Y, et al.** Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J Clin Invest.* **2001**;107(9):1163-1171. doi:10.1172/JCI11218
114. **Morse D, Sethi J.** Carbon Monoxide and Human Disease. *Antioxidants \& Redox Signal.* **2002**;4(2):331-338. doi:10.1089/152308602753666389
115. **Stanford SJ, Walters MJ, Hislop AA, et al.** Heme oxygenase is expressed in human pulmonary artery smooth muscle where carbon monoxide has an anti-proliferative role. *Eur J Pharmacol.* **2003**;473(2):135-141. doi:https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)02001-6
116. **Morisaki H, Katayama T, Kotake Y, et al.** Carbon Monoxide Modulates Endotoxin-induced Microvascular Leukocyte Adhesion through Platelet-dependent Mechanisms. *Anesthesiology.* **2002**;97(3):701-709. doi:10.1097/00000542-200209000-00025
117. **Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, et al.** Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts. *Surgery.* **2003**;134(2):285-292. doi:https://doi.org/10.1067/msy.2003.238
118. **Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al.** Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase 1 Suppresses Endothelial Cell Apoptosis. *J Exp Med.* **2000**;192(7):1015-1026. doi:10.1084/jem.192.7.1015
119. **Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, et al.** Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med.* **2003**;9(2):183-190. doi:10.1038/nm817
120. **Clark JE, Naughton P, Shurey S, et al.** Cardioprotective Actions by a Water-Soluble Carbon Monoxide\&\#x2013;Releasing Molecule. *Circ Res.* **2003**;93(2):e2-e8. doi:10.1161/01.RES.0000084381.86567.08

121. **Yabluchanskiy A, Sawle P, Homer-Vanniasinkam S, Green CJ, Foresti R, Motterlini R.** CORM-3, a carbon monoxide-releasing molecule, alters the inflammatory response and reduces brain damage in a rat model of hemorrhagic stroke*. *Crit Care Med.* **2012**;40(2). https://journals.lww.com/ccmjjournal/Fulltext/2012/02000/CORM_3_a_carbon_monoxide_releasing_molecule,.25.aspx
122. **Alshehri A, Bourguignon M-P, Clavreul N, et al.** Mechanisms of the vasorelaxing effects of CORM-3, a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule: interactions with eNOS. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **2013**;386(3):185-196. doi:10.1007/s00210-012-0829-9
123. **Chatterjee PK.** Water-soluble carbon monoxide-releasing molecules: helping to elucidate the vascular activity of the 'silent killer.' *Br J Pharmacol.* **2004**;142(3):391-393. doi:<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705826>
124. **Karaduman H.** Sıçan Alt Ekstremit Akut İskemi Reperfüzyon Modelinde Corm -3 Molekülünün Etkilerinin Gingko Biloba , Sıçan Alt Ekstremit Akut İskemi Reperfüzyon Modelinde Corm -3 Molekülünün Etkilerinin Gingko Biloba ,. Published online **2020**.
125. **Pizarro MD, Rodriguez J V, Mamprin ME, et al.** Protective effects of a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) during hepatic cold preservation. *Cryobiology.* **2009**;58(3):248-255. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.01.002>
126. **Kvist M, Jozsa L, Kannus P, et al.** Morphology and Histochemistry of the Myotendineal Junction of the Rat Calf Muscles. *Cells Tissues Organs.* **1991**;141(3):199-205. doi:10.1159/000147122
127. **Takhtfooladi HA, Hesaraki S, Razmara F, Takhtfooladi MA, Hajizadeh H.** Effects of N-acetylcysteine and pentoxifylline on remote lung injury in a rat model of hind-limb ischemia/reperfusion injury. *J Bras Pneumol.* **2016**;42(1):9-14. doi:10.1590/s1806-37562016000000183
128. **Samlaska CP, Winfield EA. Pentoxifylline.** *J Am Acad Dermatol.* **1994**;30(4):603-621. doi:[https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(94\)70069-9](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(94)70069-9)
129. **Pipinos II, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos P V, Katsamouris A.** Pentoxifylline Reverses Oxidative Mitochondrial Defect in Claudicating Skeletal Muscle. *J Surg Res.* **2002**;102(2):126-132. doi:<https://doi.org/10.1006/jsre.2001.6292>
130. **Kayaalp SO.** *Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.*; **2012**.
131. **Vadiei K, Brunner LJ, Luke DR.** Effects of pentoxifylline in experimental acute renal failure. *Kidney Int.* **1989**;36(3):466-470. doi:<https://doi.org/10.1038/ki.1989.218>
132. **Savas S, Delibas N, Savas Ç, Sütçü R, Cindas A.** Pentoxifylline reduces biochemical markers of ischemia-reperfusion induced spinal cord injury in rabbits. *Spinal Cord.* **2002**;40(5):224-229. doi:10.1038/sj.sc.3101281

133. **Dunn RM, Mancoll J.** Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg.* **1992**;90(2):319—328. <http://europepmc.org/abstract/MED/1631226>
134. **Kelly CP, Gupta A, Keskin M, Jackson IT.** A new design of a dorsal flap in the rat to study skin necrosis and its prevention. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* **2010**;63(9):1553-1556. doi:10.1016/j.bjps.2009.08.011
135. **Dr. Süphan Tunç.** Melatonin ve N-asetilsisteinin sıçanlardaki mcfarlane flep beslenmesi üzerine etkileri. Published online **2012**.
136. **Dr. M. Özer Kobak.** Random Flep Modellerinde Farklı Geciktirme İşlemlerinin Etkinliğinin Karşılaştırılması: Deneysel Çalışma. Published online **2001**.
137. **Yannuzzi LA.** Indocyanine Green Angiography: A Perspective on Use in the Clinical Setting. *Am J Ophthalmol.* **2011**;151(5):745-751.e1. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajo.2011.01.043>
138. **Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, et al.** A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery. *J Biomed Imaging.* **2012**;2012. doi:10.1155/2012/940585
139. **Engel E, Schraml R, Maisch T, et al.** Light-Induced Decomposition of Indocyanine Green. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2008**;49(5):1777-1783. doi:10.1167/iovs.07-0911
140. **Desmettre T, Devoisselle JM, Mordon S.** Fluorescence Properties and Metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography. *Surv Ophthalmol.* **2000**;45(1):15-27. doi:[https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(00\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(00)00123-5)
141. **Landsman ML, Kwant G, Mook GA, Zijlstra WG.** Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol.* **1976**;40(4):575-583. doi:10.1152/jappl.1976.40.4.575
142. **Reinhart MB, Huntington CR, Blair LJ, Heniford BT, Augenstein VA.** Indocyanine Green: Historical Context, Current Applications, and Future Considerations. *Surg Innov.* **2016**;23(2):166-175. doi:10.1177/1553350615604053
143. **Cherrick Gr, Stein Sw, Leevy Cm, Davidson Cs.** Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest.* **1960**;39:592-600. doi:10.1172/JCI104072
144. **Rosenthal Sm, White EC.** Clinical application of the bromsulphalein test for hepatic function. *J Am Med Assoc.* **1925**;84(15):1112-1114. doi:10.1001/jama.1925.02660410020008
145. **Holm C, Mayr M, Höfter E, Becker A, Pfeiffer UJ, Mühlbauer W.** Intraoperative evaluation of skin-flap viability using laser-induced fluorescence of indocyanine green. *Br J Plast Surg.* **2002**;55(8):635-644. doi:<https://doi.org/10.1054/bjps.2002.3969>

146. **Moyer HR, Losken A.** Predicting Mastectomy Skin Flap Necrosis with Indocyanine Green Angiography: The Gray Area Defined. *Plast Reconstr Surg.* **2012**;129(5). https://journals.lww.com/plasreconsurg/Fulltext/2012/05000/Predicting_Mastectomy_Skin_Flap_Necrosis_with.4.aspx
147. **Kanuri A, Liu AS, Guo L.** Whom Should We SPY? A Cost Analysis of Laser-Assisted Indocyanine Green Angiography in Prevention of Mastectomy Skin Flap Necrosis during Prosthesis-Based Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* **2014**;133(4). https://journals.lww.com/plasreconsurg/Fulltext/2014/04000/Whom_Should_We_SPY__A_Cost_Analysis_of.3.aspx
148. **De Lima Silva JJ, Guimarães SB, da Silveira ER, et al.** Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. *Aesthetic Plast Surg.* **2009**;33(1):104-109. doi:10.1007/s00266-008-9263-2
149. **Stein HJ, Fayman MS, Oosthuizen MM, Hinder RA.** Verapamil improves survival of rat hyperemic island skin flaps. *Surgery.* **1989**;106(4):613-617.
150. **Mcfarlane RM, Deyoung G, Henry RA, Mcfarlane RM.** The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg.* **1965**;35(2). https://journals.lww.com/plasreconsurg/Fulltext/1965/02000/the_design_of_a_pedicle_flap_in_the_rat_to_study.7.aspx
151. **Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M.** Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. *Plast Reconstr Surg.* **1984**;73(6):943—948. doi:10.1097/00006534-198406000-00016
152. **Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, McLaughlin BE.** Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol Sci.* **1991**;12:185-188. doi:[https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90544-3](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90544-3)
153. **Soni H, Jain M, Mehta AA.** Investigation into the mechanism(s) of antithrombotic effects of carbon monoxide releasing molecule-3 (CORM-3). *Thromb Res.* **2011**;127(6):551-559. doi:<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2011.02.009>
154. **McCarty MF, O'Keefe JH, DiNicolantonio JJ.** Pentoxifylline for vascular health: a brief review of the literature. *Open Hear.* **2016**;3(1):e000365. doi:10.1136/openhrt-2015-000365
155. **Hayes DW, Mandracchia VJ, Considine C, Webb GE.** Pentoxifylline. Adjunctive therapy in the treatment of pedal frostbite. *Clin Podiatr Med Surg.* **2000**;17(4):715—722. <http://europepmc.org/abstract/MED/11070801>
156. **Erken HY, Takka S, Akmaz I.** Artery-Only Fingertip Replantations Using a Controlled Nailbed Bleeding Protocol. *J Hand Surg Am.* **2013**;38(11):2173-2179. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2013.08.110>

157. **Yücel DB.** Yanıkta Staz Zonunun pentoksifilin kullanımı ile kurtarılması-ratlarda deneysel Çalışma. Published online **2014**.
158. **Yessenow RS, Maves MD.** The Effects of Pentoxifylline on Random Skin Flap Survival. *Arch Otolaryngol Neck Surg.* **1989**;115(2):179-181. doi:10.1001/archotol.1989.01860260053013
159. **Isken T, Serdaroglu I, Ozgentas E.** The Effects of the Pentoxifylline on Survival of the Skin Flaps in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Ann Plast Surg.* **2009**;62(4). https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/Fulltext/2009/04000/The_Effects_of_the_Pentoxifylline_on_Survival_of.25.aspx
160. **Carmo-Araújo EM, Dal-Pai-Silva M, Dal-Pai V, Cecchini R, Anjos Ferreira AL.** Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. *Int J Exp Pathol.* **2007**;88(3):147-154. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2007.00526.x>
161. **Feindel W, Yamamoto YL, Hodge CP.** Intracarotid fluorescein angiography: a new method for examination of the epicerebral circulation in man. *Can Med Assoc J.* **1967**;96(1):1-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4959610>
162. **Zimmermann A, Roenneberg C, Wendorff H, Holzbach T, Giunta RE, Eckstein H-H.** Early Postoperative Detection of Tissue Necrosis in Amputation Stumps With Indocyanine Green Fluorescence Angiography. *Vasc Endovascular Surg.* **2010**;44(4):269-273. doi:10.1177/1538574410362109
163. **Küntscher M V, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G.** Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* **2002**;109(7):2398—2404. doi:10.1097/00006534-200206000-00034
164. **Yamaguchi S, De Lorenzi F, Petit JY, et al.** The “Perfusion Map” of the Unipedicled TRAM Flap to Reduce Postoperative Partial Necrosis. *Ann Plast Surg.* **2004**;53(3). https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/Fulltext/2004/09000/The__Perfusion_Map__of_the_Unipedicled_TRAM_Flap.2.aspx
165. **Holm C, Mayr M, Höfter E, Raab N, Ninkovic M.** Interindividual Variability of the SIEA Angiosome: Effects on Operative Strategies in Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* **2008**;122(6). https://journals.lww.com/plasreconsurg/Fulltext/2008/12000/Interindividual_Variability_of_the_SIEA_Angiosome_.2.aspx
166. **Holm C, Mayr M, Höfter E, Ninkovic M.** Perfusion Zones of the DIEP Flap Revisited: A Clinical Study. *Plast Reconstr Surg.* **2006**;117(1). https://journals.lww.com/plasreconsurg/Fulltext/2006/01000/Perfusion_Zones_of_the_DIEP_Flap_Revisited__A.6.aspx

167. **Komorowska-Timek E, Gurtner GC.** Intraoperative Perfusion Mapping with Laser-Assisted Indocyanine Green Imaging Can Predict and Prevent Complications in Immediate Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* **2010**;125(4). https://journals.lww.com/plasreconsurg/Fulltext/2010/04000/Intraoperative_Perfusion_Mapping_with.3.aspx
168. **Otrock ZK, Mahfouz RAR, Makarem JA, Shamseddine AI.** Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells, Mol Dis.* **2007**;39(2):212-220. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.04.001>
169. **Detmar M.** The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *J Dermatol Sci.* **2000**;24:S78-S84. doi:[https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(00\)00145-6](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(00)00145-6)
170. **Pedretti SL da C, Rena C de L, Orellano LAA, de Lazari MG, Campos PP, Nunes TA.** Benefits of pentoxifylline for skin flap tissue repair in rats. *Acta Cir Bras.* **2020**;35(11):1-12. doi:10.1590/ACB351105
171. **Choi YK, Kim C-K, Lee H, et al.** Carbon Monoxide Promotes VEGF Expression by Increasing HIF-1 α ; Protein Level via Two Distinct Mechanisms, Translational Activation and Stabilization of HIF-1 α ; Protein *. *J Biol Chem.* **2010**;285(42):32116-32125. doi:10.1074/jbc.M110.131284
172. **An G, Ji C, Wei Z, Chen H, Zhang J.** The Therapeutic Role of VEGF-Expressing Muscle-Derived Stem Cells in Acute Penile Cavernosal Injury. *J Sex Med.* **2012**;9(8):1988-2000. doi:10.1111/j.1743-6109.2012.02827.x
173. **Mace KA, Yu DH, Paydar KZ, Boudreau N, Young DM.** Sustained expression of Hif-1 α in the diabetic environment promotes angiogenesis and cutaneous wound repair. *Wound Repair Regen.* **2007**;15(5):636-645. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00278.x>
174. **İnce B.** Ratlarda deri fleplerinin yaşayabilirliğini arttırmada Rosmarinus officinalis' in etkisi/The effects of Rosemary into improving survivability of skin flaps in rats. Published online **2010**.
175. **Abla LEF, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM.** Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras.* **2005**;20(2):121-123. doi:10.1590/S0102-86502005000200004
176. **Gurlek A, Celik M, Parlakpınar H, Aydoğan H, Bay-Karabulut A.** The protective effect of melatonin on ischemia–reperfusion injury in the groin (inferior epigastric) flap model in rats. *J Pineal Res.* **2006**;40(4):312-317. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00319.x>
177. **Aker JS, Mancoll J, Lewis B, Colen LB.** The effect of pentoxifylline on random-pattern skin-flap necrosis induced by nicotine treatment in the rat. *Plast Reconstr Surg.* **1997**;100(1):66-71. doi:10.1097/00006534-199707000-00011

178. **Sarifakioglu N, Gokrem S, Ates L, Akbuga UB, Aslan G.** The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study. *Br J Plast Surg.* **2004**;57(8):769-772. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bjps.2004.04.014>
179. **Antônio NN, Monte Alto Costa A, Marques RG.** Viability of randomized skin flaps; an experimental study in rats. *J Surg Res.* **2017**;207:92-101. doi:10.1016/j.jss.2016.08.065
180. **Zhou K, Zhang Y, Lin D, Tao X, Xu H.** Effects of calcitriol on random skin flap survival in rats. *Sci Rep.* **2016**;6(1):18945. doi:10.1038/srep18945
181. **Miland AO, de Weerd L, Mercer JB.** Intraoperative use of dynamic infrared thermography and indocyanine green fluorescence video angiography to predict partial skin flap loss. *Eur J Plast Surg.* **2008**;30(6):269-276. doi:10.1007/s00238-007-0201-3
182. **Fourman MS, Gersch RP, Phillips BT, et al.** Comparison of Laser Doppler and Laser-Assisted Indocyanine Green Angiography Prediction of Flap Survival in a Novel Modification of the McFarlane Flap. *Ann Plast Surg.* **2015**;75(1). https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/Fulltext/2015/07000/Comparison_of_Laser_Doppler_and_Laser_Assisted.19.aspx