

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

Tez Yöneticisi
Doç.Dr. Dağhan DAĞDELEN

DEFEROKSAMİNİN GECİKTİRME FENOMENİNE
ETKİSİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Ufuk ERDEM

EDİRNE-2021

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamız süresince bana her konuda desteğini sunan danışman hocam sayın Doç. Dr. Dağhan DAĞDELEN'e; yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatma Elif USTURALIKESİN'e, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı üyesi Doç.Dr. Selçuk KORKMAZ'a, Fizyoloji Anabilim Dalı üyesi Dr. Öğr. Üyesi Oktay KAYA'ya; uzmanlık eğitimim boyunca mesleki bilgi ve tecrübemi arttırmamda büyük desteği olan, bana rehberlik eden çok değerli hocalarım Prof. Dr. Erol BENLİER ve Prof. Dr. Hüsamettin TOP'a; özveri ile çalışan Deney Hayvanları Laboratuvar çalışanlarına; tüm çalışma arkadaşlarıma; her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
FLEP TANIMI	3
FLEP TARİHÇESİ	3
DERİNİN KANLANMASI.....	5
FLEP FİZYOLOJİSİ.....	6
KOŞULLANDIRMAYA DAYALI FLEPLER.....	8
SIÇAN DORSAL FLEBİ.....	10
SIÇAN CİLDİ	11
DEFEROKSAMİN	12
GEREÇ VE YÖNTEMLER	14
BULGULAR.....	24
TARTIŞMA	36
SONUÇLAR	43
ÖZET	44
SUMMARY.....	46
KAYNAKLAR.....	48
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

ark.	: arkadaşları
Def.	: Deferoksamin
Def.+Gec.	: Deferoksamin+Geciktirme
FGF	: Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)
Gec.	: Geciktirme
HIF-1α	: Hypoxia induced factor-1 α (Hipoksi ile arttırılabilir faktör-1 α)
i.m.	: intramüsküler
kg	: kilogram
mg	: miligram
mm	: milimetre
MÖ	: Milattan Önce
SIRS	: Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SDF-1α	: Stromal cell derived factor (Stromal hücre kaynaklı faktör 1 α)
VEGF	: Vascular endothelial growth factor (Vasküler endotelyal büyüme faktörü)
PHD	: Prolyl hydroxylase domain-containing enzyme (Prolil hidroksilaz alanı içeren enzim)

GİRİŞ VE AMAÇ

Plastik cerrahi pratiğinin büyük bir kısmını doku onarımları oluşturmaktadır. Doku onarımında kullanılan öz doku seçenekleri, kaba olarak iki alt başlıkta incelenebilir. Bunlar doku greftleri ve doku flepleridir. Doku greftlerinin kendilerine ait bir kan akımları bulunmazken, doku flepleri kendi kan akımlarını içerirler. Fleplerin yaşayabilirliğinin artırılmasına yönelik çalışmalar Plastik Cerrahi'de önemli bir deneysel çalışma kulvarıdır.

Flep yaşayabilirliğinin artırılmasında birçok sentetik ve/veya doğal ajan kullanılmaktadır bunun yanında cerrahi geciktirme olarak adlandırılan bir işlem ile de flep yaşayabilirliği artırılabilir (1). Cerrahi geciktirme işlemi; cilt flebine çeşitli zaman aralıklarında kontrollü kesiler yapılması ile flebin oksidatif strese sokulması, buna cevap olarak yeni damar oluşumunun indüklenmesi ve vasküler mimarisinin yeniden şekillendirilmesidir (1,2). Cilt flebinin cerrahi geciktirme ile iskemiye hazırlanması, beraberinde ilave bir cerrahi işlem gerektireceğinden daha uzun süreli bir prosedürdür. Literatürde yaygın olarak kullanılan geciktirme süresi 14 gündür. Bu süreyi belirleyen ana unsur, flepteki yeni damar oluşumudur (3).

Deferoksamin *Streptomyces pilosus* bakterisinden izole edilen bir bileşiktir. Güçlü bir demir bağlayıcıdır/şelatördür (4). Deferoksamin tarafından bağlanan demir, serbest radikal oluşum mekanizmalarına katılamaz (5). Demir intoksikasyonu tedavisinde kullanılan bu ilacın yakın dönemde gerçekleştirilen çalışmalarda yeni damar oluşumunu arttırdığı saptanmıştır (6,7). Bu etkisini hipoksi ile artırılabilir faktör-1 α 'nın (HIF-1 α) gen ekspresyonu baskılayıcısı olan Prolyl hydroxylase domain-containing enzyme (PHD)'in ekspresyonunu baskılayarak yaptığı gösterilmiştir (8,9). Bu bilgidен hareketle biz de cerrahi geciktirme uygulanmış fleplere

7 gün boyunca intraperitoneal 20 mg/ kg deferoxamine uygulayarak (10,11), cerrahi geciktirme için beklenmesi gereken sürenin kısıtılabilceği yönünde bir hipotez kurduk ve bu hipotezi sıçanlar üzerinde oluşturduğumuz deney modelinde görmek istedik.



GENEL BİLGİLER

FLEP TANIMI

Flep, doku defektlerini onarmak amacıyla vücudun çeşitli bölgelerinden hazırlanan; cilt, cilt altı, fasya, kas, kemik, kıkırdak gibi çeşitli bileşenleri tek başına veya kompozit olarak içerebilen, kendine ait kanlanması olan dokudur. Flebin alındığı alana verici alan, flebin nakledildiği alana alıcı alan denir. Flebin kendine ait kanlanması korunur veya serbest fleplerde olduğu gibi flebin kanlanması yeniden oluşturulabilir. Her türlü flep transfer sonrası sağ kalmak için yeterli kan desteğine ihtiyaç duyar.

FLEP TARİHÇESİ

Rekonstrüktif plastik cerrahi için fleplerin kullanımı MÖ 600 yılına dayanmaktadır. Kayıtlı en eski flep uygulaması burun rekonstrüksiyonunda kullanılmıştır ve Sushruta Samhita'ya atfedilir (12). Tagliacozzi, burun rekonstrüksiyonu için iki aşamalı bir prosedürle distal tabanlı bir kol flebini kullanmıştır. Çalışması 1597'de Venedik'te yayınlanmıştır (13).

Deri ve deri altı doku ilk kez ya yaraya komşu bölgeden ya da uzak bölgeden random paternli olarak kaldırılmıştır. “Random” terimi, cerrahın flebi canlı tutacak uzunlamasına yerleşmiş yeterli damarın varlığını kesin olarak bilmiyor anlamına gelir. “Random” kutanöz flepler adı olmayan küçük damarlara dayanır. Öngörülemeyen dolaşıma bağlı olarak, bu fleplerde sıklıkla kısmi veya tam nekroz görülmüştür. Tarihsel olarak flep uzunluk/genişlik oranının, flep sağ kalımında kritik bir değişken olduğu gözlenmiştir. Geciktirme teknikleri de vasküler desteği arttırmak için kullanılmıştır. Bu kısıtlamalar random fleplerin geniş defektlerde kullanım güvenilirliklerini azaltmıştır. Bununla birlikte uygun kullanımda random flepler tüm vücutta küçük defektlerin kapatılmasında güvenilir birinci seçenek olabilirler (14).

Tutarlı ve güvenilir bölgelerde (dorsalis pedis, kasık flebi) spesifik vasküler pediküllerin tanımlanması büyük bir ilerleme getirmiştir. Bu vasküler pediküllere bağlı flepler tanımlanmış ve vasküler pedikül ile kaldırılabilirdiğinden, daha büyük fleplerin transferi mümkün olmuştur (15). Ancak pedikülleri nedeniyle spesifik topografik bölgelerle sınırlıdır (14).

Orticochea, flep yapısına kasın dahil edilmesiyle daha geniş cilt sahasının sağ kalacağını bildirmiştir (16). Fasyal pleksusun flep beslenmesine etkisinin fark edilmesi ve septokutanöz damarlar keşfedildikten sonra bu damarların derinin dolaşımına katılması fikrinden yola çıkılarak fasyokutanöz flepler uygulanmaya başlanmıştır. Ponten, derin fasyayı cilt flebine dahil etmiştir ve sonuçta benzer genişlikteki random fleplere göre daha fazla cilt sağ kalımı bildirmiştir (17). 1981'de Mathes ve Nahai kas fleplerini vasküler anatomiye göre sınıflamışlardır (18). 1987'de Taylor anjiozomları tarif etmiştir (19). Koshima ve Soeda yaptıkları çalışmayla perforatör flep uygulamasını başlatmışlardır (20).

FLEPLERİN SINIFLANDIRILMASI

Rekonstrüktif cerrahi pratiğinde farklı flep çeşitlerinin tanımlanması nedeniyle çeşitli flep sınıflamaları gündeme gelmiştir.

McGregor ve Morgan cilt fleplerini random veya aksiyel paternli olarak sınıflandırmışlardır (15).

Nakajima ise cilt fleplerini vaskülarizasyonlarına göre; kutanöz, fasyokutanöz, adipofasyal, septokutan ve muskulokutan olmak üzere 5 tipe ayırmıştır (21).

Daniel ve Kerrigan flepleri kan dolaşımlarına, flebe cerrahi olarak yaptırılan harekete ve flebin içerdiği dokulara göre 3 ana sınıfa ayırmışlardır (22).

Random Patern Flepler

Random patern cilt flepleri; muskulokutan veya perforatör arterlerin dallarının oluşturduğu subkutan pleksuslar tarafından beslenirler. Pediküllerinde spesifik bir arter veya ven bulunmaz. Vücudun herhangi bir bölgesinden hazırlanabilirler. Belirli bir uzunluk/genişlik oranıyla kısıtlıdır. Bu fleplerin boyutları boy/en oranına göre baş-boyun bölgesinde 4/1, ekstremitelerde ise 2/1 ile sınırlıdır. Flep geciktirme prosedürü yapılmaksızın tavsiye edilen boy/en oranı aşıldığı takdirde iskemiye bağlı flep nekrozu olması beklenir (23).

Aksiyel Patern Flepler

Aksiyel paternli flepler anatomik olarak tanımlanmış flep içerisinde uzunlamasına doğrultuda uzanım gösteren vasküler bölgeye dayanır. Random fleplere göre anlamlı derecede

daha yüksek güvenilirlikleri nedeniyle aksiyel flepler orta-büyük defektlerin kapatılmasında tercih edilirler. Tek sınırlama, pediküllü olduğu zaman sınırlı topografik ark rotasyonudur (15).

DERİNİN KANLANMASI

Deri kan dolaşımı açısından zengindir. Bununla beraber deri hücrelerinin yaşamını devam ettirmesi için gereken bazal metabolizmanın yüksek olmaması nedeniyle derinin yaşaması için deri dolaşımının küçük bir parçası yeterlidir (24). Kutanöz arterler doğrudan kaynak arterden veya özellikle kas dokusunu kanlandıran kaynak arter dallarından köken alıp, kasların içerisinden ya da kasların arasından geçerek kasın derin fasyasının dış kısmının altında uzanırlar. Belirli sabit alanlarda kutanöz perforatörler fasyayı delerek yüzeye çıkarlar (25). Derin fasyayı geçen kutanöz perforatör daha sonra yağ dokusuna dallar verir, derin fasyanın üzerinde devam eder. Yağ dokusuna verilen dallar deri altında bulunan yağ bezeleri arasında ilerleyerek subdermal pleksusa ulaşır (26). Deri kanlanmasının yoğunluğu; vücudun genleşme, farklılaşma ve metabolik ihtiyaçlarına göre gelişir. Genellikle vücudun proksimalinde yer alan yapıların damarları vücudun distalinde yer alan yapıların damarlarından daha geniş ve daha aralıklıdır (27). Kutanöz perforatörlerin eni ve boyu değişkenlik gösterir. Kutanöz perforatörler birbirleriyle anastomoz yaparak epidermis, dermis, cilt altı yağ dokusu ve derin fasyanın eksternal katmanında horizontal plan halinde 3 boyutlu vücut örtüsünü yaparlar. Komşu kutanöz damarlar arasındaki anastomoz, çapı değişebilen “choke” (boğulmuş) damarlarla ya da çapı sabit anastomotik damarlarla olur (28). Choke anastomozlar deride sayıca daha çoktur ve hasarsız derideki rolleri kan akımının düzenlenmesidir. Flep distali ve flep proksimali arasında choke anastomozlar direnç oluşturarak flebinin canlı kalmasında önemli rol oynarlar. Cerrahi geciktirmede flep kenarından yapılan insizyonla flebin kanlanması kesintiye uğratılır. Cerrahi geciktirme işlemi ile choke anastomozlar genişleyip flep distaline olan kan akımını artırır. Sempatik tonusun azalması ile choke damarlarında genişleme görülebilmekle beraber geciktirmeden sonraki 48-72 saatte esas etki görülür. Choke anastomozların genişlemesi; damar duvarı elemanlarının kalınlaşması, hiperplazisi ve damar çapının genişlemesi ile sağlanır (29).

Tüm fleplerin, başlıca da fasyokutanöz fleplerin planlanmasında damarların yöneliminin gözetildiği esastır. Yüzeyel fasya gevşek bağ dokusu biçimindedir ve derin fasyanın dış tabakasını dermise bağlar. Derin fasya da bağ doku biçiminde olmakla beraber sıklıkla yüzeyel fasyaya göre daha az esnek yapıdadır. Derin fasya uzuvlarda adeleleri çepeçevre sarar, gövdede ise bir kılıf gibi sarar. Derin fasya yoğun ve gevşek intermusküler

septaları ile periosta tutunduğu alanlarda cildi iskelete asar. Kutanöz perforatörler genellikle kaynak arter veya kaynak arterin adeleye verdiği dallardan adeleye ulaşmadan önce veya adele içinde seyrederken çıkarlar. İntermusküler bağ dokularını takip edip derin fasyanın dış tabakasını delenler direkt veya intramusküler bağ dokusunu takip edip derin fasyanın dış tabakasını delenler indirekt kutanöz damarlar olarak adlandırılırlar (30).

Kutanöz damarların bir kısmı kaynağını sinir, periost gibi derin yapılara giden dallardan alır. Derin fasyadan çıkan kutanöz damarlar dermise ulaşmak için yüzeysel fasyanın bağ dokusu iskeletini izlerler. Bağ dokusu bazı noktalarda içerisinde bulunan arterlerin atımı ve venlerin çapının artabilmesine olanak verecek şekilde gevşektir. Derin fasyanın dış katmanı, tendon, apönoroz ve periost gibi yoğun fibröz dokular gevşek olmayan bağ dokusundan oluşur. Damarlar yoğun fibröz dokularda dens fasyanın içinde değil yanında veya üzerinde seyrederekler. Damarların derin fasyada sabit noktalardan çıktığı görülebilir. Boy/en oranı yüksek ve güvenli flepler derinin hareketsiz olduğu yerlerde, flep yönü derinin en mobilize olduğu hatta paralel olarak planlanmalıdır. Güvenli flep boyutları hareketsiz alanlar arasındaki mesafe arttıkça artar (31).

Anjiozom Kavramı

Manchot ve Salmon çalışmalarının ışığında deri ve derin dokulara ait kan dolaşımının incelenmesi ile; beden anatomik şekilde "anjiozom" olarak adlandırılan üç boyutlu vasküler bölgelere ayrılmıştır (31,32). Anjiozomlar cilt ve kemik arasında uzanan bir arter ve buna eşlik eden ven tarafından beslenirler. Her anjiozom arteriyel bölgeler ve venöz bölgeler olarak alt gruplarına ayrılabilir. Bu cilt, kemik, kas ve diğer dokulardan oluşan kompozit bloklar birbirleriyle uyumludurlar. Anjiozomlar çapında değişiklik olmayan gerçek anastomotik damarlar veya genişleyebilen anastomotik damarlarla yanlarında bulunan anjiozomala bağlantılıdır. Venöz bağlantılarda kapaksız venler sıklıkla anastomotik arterlerle beraber izlenir ve genellikle derin dokuların anjiozoma ait hududunu belirlerler. Kaynak arter ve venin beslediği anjiozom alanı, kompozit olarak bir arada veya ayrı ayrı taşınabilecek doku katmanlarının anatomik olarak emniyetli sınırını belirler. Böylelikle anjiozom kavramı birçok kas deri flebinin tasarımında baz alınır (33).

FLEP FİZYOLOJİSİ

Kuşkusuz bir cilt flebinin kaldırılmasıyla ortaya çıkabilecek en açık ve derin fizyolojik değişiklik, vasküler kaynağın kısmi olarak kesilmesi nedeniyle, deriye olan kan akışındaki

önemli azalmazdır. Uygun şekilde tasarlanmış bir flebin hayatta kalması sadece cildin düşük besin gereksinimine değil, aynı zamanda deri içindeki karmaşık vasküler ağlar tarafından sağlanan yan akışın önemine işaret eder. Sempatik denervasyonun etkileri, lokal inflamatuvar değişiklikler ve flebin alıcı yatağı içindeki neovaskülarizasyonu, cilt flebindeki kan akışında dikkate alınacak değişiklikler oluşturur (34).

Flep kaldırıldığında kan akışının bozulmasıyla derinin perfüzyon basıncında bir düşüş görülür. Random paternli fleplerin beslenmesi flep tabanından gelen vasküler desteğe bağlıdır. Flebin tabanına olan mesafe arttıkça perfüzyon basıncı daha da azalır (35). Perfüzyon basıncı, dermal-subdermal pleksus içindeki arteriyollerin kritik kapanma basıncının altına düştüğünde, uzak dokulara besin akışı durur. Bu durum, kritik iskemik alanlara akış yeniden sağlanamazsa flebin distal kısmında nekroz ile sonuçlanır. Aksiyel ve random paternli fleplerin, doku canlılığı geri döndürülemez bir şekilde tehlikeye atılmadan önce, ortalama 13 saatlik tam avaskülariteyi tolere ettiği domuz modelinde gösterilmiştir (36). Neyse ki, kutanöz yapılar içinde bulunan birbirine bağlı vasküler ağ boyunca seyreden geniş kollateral akış, bitişik dokulardan daha zayıf perfüze olan alanlara yeterli destek sağlar. Bu durum fleplerin çoğunluğuna tam vasküler akış sağlanana kadar hayatta kalma yeteneğini sağlar (34).

Flep oluşturulduğunda, kutanöz duysal innervasyonun bozulmasıyla beraber ilgili dokuların sempatik innervasyonunda bozulma görülür. Sempatik sinir bölünmesi, sinir terminalinden katekolaminlerin salınmasına ve nörotransmitter geri alımını bozarak göreceli bir hiperadrenerjik duruma ve lokal vazokonstrüksiyona neden olur (35). Bu vazokonstrüksiyon vücuttaki homeostatik mekanizmaların bir parçasıdır ve penetran bir yaralanmadan sonra kan kaybını en aza indirir. Ne yazık ki, akışı zaten bozulmuş olan cilt flebi içindeki besleyici kan akışının azalmasına yol açar (37). Adrenerjik nörotransmitter seviyeleri 24 saat ile 48 saat sonra azaldığında, sempatik tonus kaybı olur ve bu durum flebi besleyen vasküler ağların vazodilatasyonu ile sonuçlanır. Sempatektomi sonrası oluşan bu rebound vazodilatasyon, gecikme fenomeni yoluyla flep canlılığını artırmak için kullanılan mekanizmalardan biridir (38).

Cilt flebinin kaldırılmasında olduğu gibi yumuşak doku yaralandığında da inflamatuvar bir yanıt oluşur. Bu yanıtta akut olarak histamin, serotonin gibi maddelerin hücre dışına salınımı aracılık eder. Bu maddeler mikrovasküler geçirgenlikte, hücre dışı ortamda inflamatuvar hücrelerin ve proteinlerin konsantrasyonunda artışa neden olur. Ortaya çıkan doku ödemi, akut fazda riskli flebin perfüzyonunu daha da azaltabilir (35).

Flep alıcı alana transpoze edildikten sonra flebin neovaskülarizasyonu ile ilk birkaç günde kan akışı kademeli olarak iyileşir. Bu süreç yaklaşık 3 ile 4. günlerde başlar ve genellikle 7. günden sonra kan akımı flebin pedikülünün kesilebileceği kadar sağlamdır (39). Neovaskülarizasyonun meydana geldiği mekanizmalar karmaşıktır, ancak muhtemelen hem anjiyojenik (önceden var olan bir kılcal ağdan filizlenen yeni mikro damarlar) hem de vaskülojenik (kemik iliğinden türetilmiş endotelial progenitor hücrelerden yeni damar oluşumu) süreçleri içerir (40). Doku iskemisi varlığında, fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin salınması, endotel hücrelerini ve endotel progenitor hücrelerini yeni kılcal kanallar oluşturmak üzere uyarır. Bu kılcal neovaskülarizasyon, çevre dokulardan flebe doğru damar büyümesi ile karakterize edilir. Bir anjiyojenik uyarana doğru yeni kılcal büyüme, günde yaklaşık 0,2 mm'lik olarak gerçekleşir ve sonuçta 2 mm ile 5 mm'lik mesafeleri kapsar (35).

KOŞULLANDIRMAYA DAYALI FLEPLER

Cerrahi Geciktirme (Vasküler Delay)

Cilt flebinin iki veya daha fazla aşamada kaldırıldığı durumda, tek aşamada kaldırılan flebe göre kan temininin daha fazla olduğu iyi bilinen cerrahi bir gerçektir (41). Cerrahi flep geciktirmesi, geciktirme planlanan flebin iki kenarına tam kat insizyon yapılarak veya flebin iki kenarına tam kat insizyon yapıp flebi zeminden kaldırıp bipediküllü flep haline getirilerek yapılabilmektedir. Geciktirme işlemi ile pedikül dokusunun damarlanmasının iyileştirilmesi ilk olarak Tagliocozzi tarafından tanımlanmıştır ve uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır (42). Cerrahi geciktirme yönteminde amaç flebin defekt olan bölgeye taşınmasından önce geçici bir süreliğine iskemik durumda kalmasını sağlamaktır. Bunun sonucunda aksiyel fleplerde daha fazla hacimde flep taşınabilirken random fleplerde ise boy/en oranı artmaktadır (41).

Taylor ve ark. tarafından yapılan cerrahi geciktirme çalışmaları neticesinde flep kaldırılmasından 48–72 saat sonra flep damarlarının kontrollere kıyasla enine kesit çapının tutarlı bir şekilde daha büyük olduğu ve bunun damar duvar kalınlığındaki azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Cerrahi geciktirme işleminin neovaskülarizasyondan çok mevcut damarların genişlemesiyle flep sağkalımına katkı sağladığını göstermişlerdir (19).

Pearl, flep elevasyonu sonrasında iskemiyin en önemli nedeni olarak hiperadrenerjik durumu işaret etmiştir. Ameliyat sonrası 30 saat kadar devam edebilen bu durumun prekapillerik sfinkterlerde vazokonstriksiyon oluşturduğunu, kan akımının arteriovenöz anastomozlar aracılığıyla kapiller yatağı bypass ettiğini ve bunun sonucunda dokularda iske mi oluştuğunu belirtmiştir (3).

Cerrahi gecikmenin, boğulmuş (choke) anastomozların bitişik perforatörler arasında genişlemesine izin vererek flebin hayatta kalmasına katkı sağladığı da belirtilmiştir (18). Cerrahi geciktirme işleminin vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) ekspresyonunu artırarak flepte anjiyogenezi ve vazodilatasyonu arttırdığı da gösterilmiştir (43). Carroll ve arkadaşları köpek modelinde yaptıkları çalışmada β -FGF verilerek geciktirme benzeri etki oluşturarak latissimus dorsi kas flebinde perfüzyonun ve canlılığın arttığını göstermişlerdir (44). İske mi durumunda özellikle VEGF gibi büyüme faktörleri salınır ve kemik iliği kökenli endotelyal progenitör hücreler üretilir. Bu hücreler iskemik dokuya göç ederek neovaskülarizasyonu başlatır. 14. günde bu hücreler vasküler kordlar oluşturur ve 21. günde tam anlamıyla fonksiyonel damarlar oluşur. Geciktirme operasyonu sonrasında kemik iliği kökenli progenitör hücrelerin 3 ile 7. günler arasında iskemik dokuda saptanabileceği bildirilmiştir. Bu hücreler aracılığıyla oluşan damarlar dolaşıma en erken 14. günden sonra destek olabilmektedir. Bu nedenle geciktirme sonrasında doku transferi için en uygun zaman 14. gün olarak kabul görmüştür (45).

Prelamine Flep

Flep laminasyonu iki aşamalı bir prosedürdür. Transfer edilecek dokunun transferi öncesi vasküler yapısına müdahale etmeden transfer edilecek doku içerisine kırıkta k kemik vb. dokuların implante edilmesidir. Bu tekniğin amacı, kompozit rekonstrüksiyon için ihtiyaç duyulan uygun destek ve kaplama yapılarını ekleyerek doğal bir aksiyel flebi çok katmanlı bir flebe dönüştürmektir (46). Genellikle baş boyun rekonstrüksiyonunda kullanılan fleplerde uygulanmıştır. Pribaz, burun ve merkezi yüz rekonstrüksiyonu için önkolda laminasyon tekniklerini kullanmıştır (47).

Prefabrike Flep

Sheen tarafından sunulan bir terim olan flep prefabrikasyonu, iki aşamalı bir prosedürü ifade eder. Vasküler pedikül yeni kan kaynağı olarak doku hacmine implante edilir. Dokuda neovaskülarizasyonun meydana geldiği bir olgunlaşma döneminden sonra, bu doku sadece

implante edilmiş vasküler pedikülü ile transfer edilebilir (48). Bu, donör sahanın niteliklerini koruyan büyük ve ince cilt fleplerinin oluşturulmasına izin verir. Farklı klinik ihtiyaçlar için vasküler pediküllerin, donör dokuların ve donör saha konumlarının çeşitli kombinasyonları ile modifiye edilebilir (49).

Doku Genişletmesi Uygulanmış Flep

Defektin kapatılmasında cilt rengi, dokusu ve kontur benzerliğinden dolayı defektin yanındaki deri ve yumuşak doku tercih edilir. Defektin boyutu veya defekt çevresindeki yaralanma bölgesi (zone of injury) genellikle bitişik dokunun kullanılmasını yara kapatma açısından veya kompozit rekonstrüksiyon açısından engeller. Bu durumlarda doku genişlemesi, rekonstrüksiyon için istenen bitişik dokunun kullanımına izin verebilir. Doku genişletme, fasiyal fleplerin ve yüzeysel kas deri fleplerinin kutanöz bölgesini genişletmek için etkili bir yöntemdir. Yaygın olarak kutanöz flep bölgesini artırmak için kullanılmasına rağmen, doku genişletme ilkesi fasya ve periferik sinir dahil tüm yumuşak dokulara uygulanabilir. Genişletici, genişletme işlemi sırasında pedikülün yaralanmasını önlemek için doğrudan baskın vasküler pedikülün altına yerleştirilmemelidir (50).

Radovan ayrıca 1976'da bu tekniğin meme rekonstrüksiyonu için kullanımını açıkladı (51). Hemen genişletme mümkün olsa da, genellikle flep kaldırılmadan önce aşamalı genişletme gerçekleştirilir. Genellikle 6 hafta ile 3 ay arasında değişen belirli bir zaman aralığında genişleticiye haftalık aralıklarla salin enjekte edilir. İstenilen genişleme miktarı elde edildiğinde, genişletici çıkarılır ve modifiye deri sahası rekonstrüksiyon için kullanılır (50).

SIÇAN DORSAL FLEBİ

Sıçan, düşük maliyetle birçok araştırma yapılabilmesinden dolayı deri anatomisi insana göre farklı olmasına rağmen, araştırmalarda en çok tercih edilen deney hayvanıdır. Ancak ciddi dezavantajı ise 'otokanibalizasyon' olayıdır. 'Otokanibalizasyon' sıçanın kendisi tarafından yenilerek zarar görmesine verilen isimdir. Bu nedenle 'otokanibalizasyonu' ortadan kaldırmak üzere sırt bölgesinden kaldırılan flep tipleri yeğlenmektedir (52). Sıçan sırtında hazırlanan flep modeli ilk olarak 1965 yılında Robert McFarlane ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (53). Planlanan modelde yaşayan ve yaşamayan flep bölgelerinin yanı sıra dolaşımın sınırda olduğu bir ara bölge de bulunduğu için dolaşım değişikliklerinin sonuca etkisini gözlemek mümkün olabilmektedir. Sonraki yıllarda değişikliklere uğramasına karşın McFarlane'in adıyla anılan

bu modelin yaygın kabul görmesindeki en önemli neden flebin en uç kısmında bir nekroz alanının bulunması ve kolay hazırlanmasıdır (52).

McFarlane ve arkadaşlarının orijinal tanımında, flep planlaması değişmeyen özel işaretlere dayanmaktadır. Her iki skapula ve her iki posterior iliyak çıkıntılar belirlenip, flep bu çıkıntılar arasında planlanmıştır. Bu nedenle sıçanın büyüklüğüne bağlı olarak flep boyutları da değişiklik göstermektedir. Sabit anatomik işaretlerin kaynak alınması hayvan ebadından bağımsız olarak flebin hep bilinen, değişmeyen damarlardan kanlanmasını sağladığı için avantaj olarak görülür fakat nekroz boyutları hep benzer büyüklükte tespit edilmemiştir. Myers ve Cherry'de yaptıkları çalışmalarda McFarlane ve arkadaşları gibi nekroz oranları arasında ciddi farklar göstermiştir (2). Bu nedenle daha standart nekroz oranları açısından deney modeli çalışmaları yapılmıştır.

Roger Khouri ve arkadaşları sıçan sırtındaki fleplerde çelişkili olmayan, uyumlu nekroz oranı elde etmek ve temel alınabilecek bir modeli elde etmek için eni 3 ve 4 cm olan iki farklı flebi pedikülü kaudalde ve kraniyalde olacak şekilde kaldırmıştır. Çalışmada en tutarlı nekroz oranı kraniyal veya kaudal pediküllü olması farketmeksizin, genişliği 3 cm olan fleplerde görülmüştür (54,55). Nekroz oranında küçük değişiklikler göstermesi daha az sayıda canlı kullanarak istatistiksel sonuçların tutarlı olmasını sağlayacağı için pedikülün kaudal veya kraniyalde olması farketmeksizin eni geniş olmayan flepler avantajlı görülmüştür. Eni 3 cm'lik kaudal ve kraniyal tabanlı fleplerin daha tutarlı netice verdiği ve çalışma gruplarında daha az canlı ile istatistiksel olarak anlamlı sonuçların alınabildiği düşünülmektedir (52).

Flep elevasyonu sırasında flep kenarlarında yapılan insizyon ile deri geçildikten sonra derinin hemen altında görülen pannikulus karnosus kası insize edilerek derin kas fasyası üzerine kadar ilerlenir, böylece flep pannikulus karnosus kasını da içerisine alır. Deri ve pannikulus karnosus kasını içeren flep dokusu, kas üstündeki sıkı olmayan ve görece avasküler seyirde kolaylıkla ilerlenerek kaldırılır. Kraniyal ve kaudalden flebe gelen dallar flebin planlamasına göre korunur ya da feda edilir. Sırt flebi kaldırıldıktan sonra yine aynı yere dikilir ve araştırma protokolü çerçevesinde izlenir (2).

SIÇAN CİLDİ

Sıçanlar, cerrahi branşlar tarafından sıklıkla kullanılan deneklerdir. Diğer deneklere oranla az mali yük oluşturur. İzogenetiktir ve güçlü immünite ve dirence sahiptir. Temininin kolay olması artı yönüdür. Cilt yapısı itibariyle diğer bir avantajı özellikle flep çalışmalarında ortaya çıkar. (56) Deneklerde gözlenen iki ana cilt yapısı mevcuttur; gevşek ve sıkı cilt. Gevşek

ciltli denekler kanlanmayı perforan arterlerle, sıkı ciltli denekler ise muskulokütan arterlerle sağlar. İnsanda ise bu iki cilt tipi de operasyon bölgesine göre değişkenlik gösterir (52).

Sıçan cildi ve insan cildi arasındaki majör farklılık sıçan cildinde mevcut olan pannikulus karnosus tabakasıdır. Bu kas tabakası cilde kuvvetli, alttaki diğer kaslara ise gevşek bağlanır. İnsanda ise bunun analoğu sayılabilecek yüzeysel fasya bulunur. Her iki canlıda da bu iki katmanın tasarlanacak flebin içinde bulunması vaskülaritede artışa neden olur (52). Önceden yapılan çalışmalarda sıçan dorsal cildinin 3 damar vasıtasıyla beslendiği gösterilmiştir, bunlar;

- 1- Kranial tarafta aksiller damardan köken alan lateral torasik arter
- 2- 4 – 12. kosta arasından çıkan posterior interkostal arterler
- 3- Kuyruk tarafında derin sirkumfleks iliak arterdir (57).

DEFEROXAMİNE

N-[5-[3-[(5-aminopentil) hidroksikarbamol] propionamido] pentil]-3-[[5 (N hidroksiasetamid) pentil] karbamol] propionohidroksamik asit deferoksaminin kimyasal ismidir. $C_{25}H_{48}N_6O_8$ kapalı kimyasal formülüdür (58). Deferoksamin *Streptomyces pilosus* bakterisinden izole edilen bir bileşiktir. Güçlü bir demir bağlayıcıdır/şelatörüdür (59). Deferoksamin tarafından demir bağlanır ve şelat oluşur, bağlanan demir serbest radikal oluşumu mekanizmalarına katılamaz (60). Oluşan şelat suda kolaylıkla çözünür ve böbrekten kolayca geçerek idrara karakteristik kırmızımsı bir renk verir (59).

Bağlantısız demir, çok sayıda biyolojik dokuya zarar verebilecek reaktif oksijen radikalleri oluşturmak üzere peroksitler ile reaksiyona girme potansiyeline sahiptir (61). Davies ve ark. deferoksaminin, demir bulunmasa bile reaktif oksijen radikalleri ile reaksiyona girebileceğini göstermiştir. Bu da deferoksaminin demir şelasyon özellikleriyle ilgisi olmayan bir antioksidan rolüne sahip olabileceğini göstermektedir (62). Deferoksaminin alkoksil, peroksil, hidroksil ve süperoksit radikallerini söndürmede etkili olduğu ve bu etkilerin, demirin reaksiyon sistemlerinde rol oynadığında arttığı belirlenmiştir (63,64).

Reaktif oksijen radikalleri, iltihaplı dokuda nispeten yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve bağışıklık yanıtında sinyal molekülleri olarak makrofajlar ve polimorfonükleer nötrofiller gibi hücreler tarafından üretilir. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlarda, reaktif oksijen radikalleri, yerel vaskülatörü kaplayan endotel hücreleri dahil olmak üzere çevredeki sağlıklı dokuya zarar verebilir. Lokal bağışıklık tepkisini bastırarak damarları ve çevreleyen dokuyu korumak, doku yenilenmesini desteklemek için oldukça faydalı olacaktır (65).

Hou ve ark., tam kalınlıkta deri yarası olan diyabetik farelerde intraperitoneal deferoksamin enjeksiyonunun etkilerini kontrol grubu ve bir VEGF tedavi grubu ile

karşılaştırdı. Western blot analizi, deferoksaminin HIF-1 α ve vaskülogenez için önemli faktörler olan VEGF ve stromal hücre kaynaklı faktör 1 α 'yı (SDF-1 α) içeren hedef genleri önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Ek olarak, deferoksamin grubunun, diğer gruplardan daha fazla kırmızı kan hücresi içeren daha yüksek sayıda kan damarı ve daha fazla kılcal damar yoğunluğuna sahip olduğunu göstermiştir (66).

Pek çok faktör neovaskülarizasyonu teşvik edebilir, ancak doku hipoksisi neovaskülarizasyon için birincil uyarıcıdır. Düşük oksijen koşulları altındaki hücreler oksijen homeostazını sürdürmek için bir dizi uyarlanabilir tepkiyi aktive eder ve bu tepkiler anjiyogenezi de içerir.



GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışma için öncelikle 29.12.2020 tarihli ve TÜHADYEK-2020/15 protokol nolu Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı (Ek-1) alındı. Bu çalışma için, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilen, ağırlıkları 280-320 g arasında değişen 40 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar %50 nem, 21 +/- 2°C ısı koşullarında ışıkların saat 08:00'de yakılıp, saat 20:00 de söndürülmesiyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritminin sağlandığı koşullarda barındırıldı. Sıçanlar standart sıçan yemi ile beslendi, herhangi bir beslenme ya da su kısıtlaması yapılmadı. Tüm hayvanlar ayrı kafeslerde barındırıldı. Çalışmamızda Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın deneysel ve diğer bilimsel amaçlar için kullanılan hayvanların refah ve korunmasına dair 13.12.2011 tarih ve 28141 sayılı yönetmeliğine ve uluslararası Helsinki deklarasyonunda bildirilen hayvan bakım ve kullanımı ile ilgili kurallara uyuldu.

GEREÇLER

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri;

- 1- Temel cerrahi aletler (penset, portegü, bistüri sapı, bistüri, vb.)
- 2- Steril enjektörler (1, 2.5 cc)
- 3- Steril cerrahi eldiven
- 4- Steril cerrahi gazlı bez
- 5- Çizim kalemi

- 6- Traş makinası
- 7- Povidone iodine
- 8- Cetvel
- 9- Ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, Türkiye)
- 10- Ksilazin (Rompun®, Bayer, Türkiye)
- 11- Serum fizyolojik
- 12- 2/0 ipek sütür
- 13- Dijital fotoğraf makinası (Samsung NX2000)
- 14- Kullanılan kimyasal malzemeler:

Tiyobarbitürik asit	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinhelm, Almanya)
Sodyum dodesil sülfat:		(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinhelm, Almanya)
DTNB	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinhelm, Almanya)
Sodyumsitrat	:	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH Seinhelm, Almanya)
NaOH	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Na-K tartarat	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Folin fenol reaktifi	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
Na ₂ HPO ₄	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
EDTA	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
KCl	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)
MPA	:	(Merck&Co., Inc., Darmstadt, Almanya)

15-Kullanılan cihazlar:

Spektrofotometre	:	(Spectronic Unicam Helios α, İngiltere)
Hassas terazi	:	(Mettler Toledo, AB204-S, İsviçre)
Soğutmalı santrifüj	:	(MPW 350R, Polonya)
Soğutmalı santrifüj	:	(Hettich Micro 220R, Almanya)
Su banyosu	:	(Nickel Clifton Elektro LTD, İngiltere)
Otomatik pipetler	:	(Eppendorf Research Plus, Almanya)
Vorteks	:	(Heidolph, Almanya)
Derin dondurucu	:	(Thermo Elektron Corporation, USA)

pH metre : (InoLab, Level 1, Almanya)
Manyetik karıştırıcı : (Remi equipments, Hindistan)
Homojenizatör : (Polytron Kinematica AG, İsviçre)

16-Çözeltiler:

A Çözeltisi: % 2'lik Na_2CO_3 'ın 0,1 N NaOH'teki çözeltisi
B Çözeltisi: % 1'lik CuSO_4 çözeltisi
C Çözeltisi: % 2'lik Sodyum Potasyum tartarat çözeltisi
D Çözeltisi: 98 hacim A çözeltisi + 1 hacim B çözeltisi + 1 hacim C çözeltisi karışımı
E Çözeltisi: 1 hacim Folin Fenol belirteci + 1 hacim distile su karışımı

Bovın Serum Albumin (BSA) Çözeltisi: Standart protein çözeltisi olarak kullanılan BSA 10 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden 1, 2, 3, 5, 7,5, 10 mg/ml'lik çözeltileri

ANESTEZİ VE ÖTENAZİ TEKNİĞİ

Tüm sıçanlarda anestezi, Ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, Türkiye) 50 mg/kg intramusküler (i.m.) ve Xylazine hidroklorid (Rompun®, Bayer, Türkiye) 10 mg/kg i.m. ile sağlandı. Bu dozun 1/3'ü gerektiğinde i.m. olarak tekrarlandı.

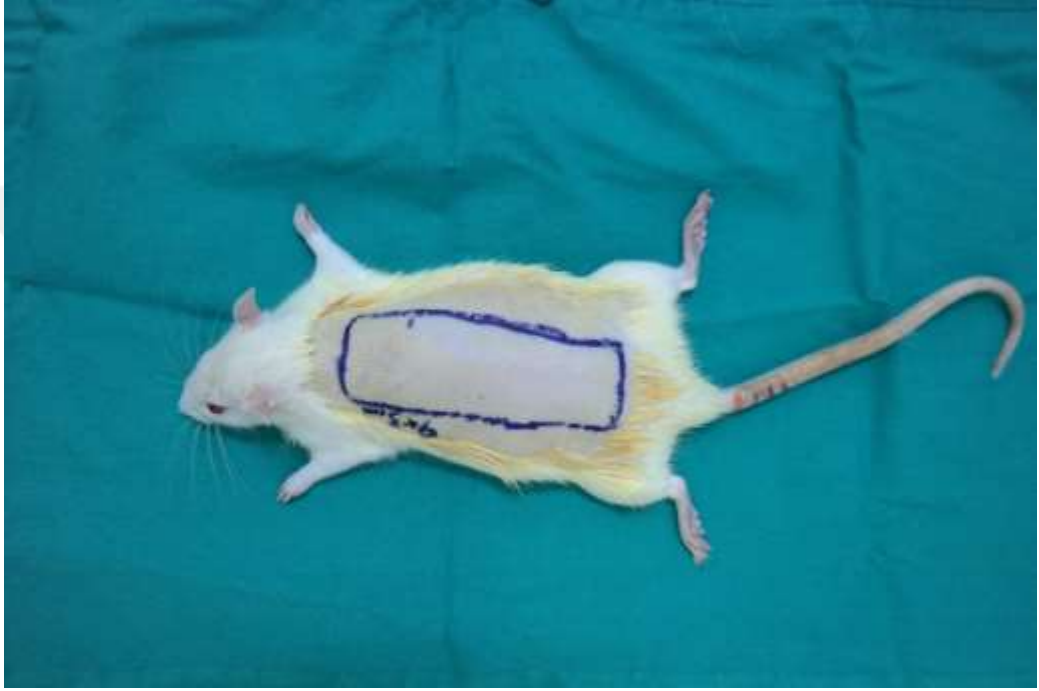
Çalışmanın sonunda sıçanlara tekrar aynı yöntemle anestezi uygulandı. Sıçan sırtındaki flepler fotoğraflandıktan ve histopatolojik doku örnekleri alındıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi yapıldı. Ölüm, kalp vurusu yokluğu kontrol edilerek doğrulandı.

CERRAHİ TEKNİK

Deney hayvanına Ketamin hidroklorür (Ketalar®, Eczacıbaşı, Türkiye) 50 mg/kg intramusküler (i.m.) ve Xylazine hidroklorid (Rompun®, Bayer, Türkiye) 10 mg/kg i.m. ile anestezi sağlandı. Anestezi derinliği çene ve iskelet kas tonusuyla izlendikten sonra cerrahi masasına yüzüstü yatırılarak sırtlarındaki tüyler traşlandı. Povidone iodine ile lokal saha temizliği yapıldı ve steril örtülerle örtüldü. Daha sonra sıçan sırtında iliak kanat seviyesinden başlayan pedikülü kaudal tarafta olan 3x9 cm'lik flep çizim kalem ile işaretlendi (Şekil 1). Cerrahi geciktirme grubunda çizilen flep kenarlarından 15 nolu bistüri ile deri ve pannikulus karnosus kası insize edildikten sonra flep tabanı pannikulus karnosus kasını içerecek şekilde kaldırıldı. Kranial ve kaudalden beslenen bipediküllü flep oluşturuldu. İnsizyon hattı 2/0 ipek sütür ile devamlı sütürasyon ile kapatılarak cerrahi geciktirme operasyonu tamamlandı. Cerrahi geciktirme prosedüründen 1 hafta sonra planlanan flep kenarlarındaki sütürler alındıktan sonra kranial taraftaki 3 cm'lik cilt insize edildi ve deri ve pannikulus karnosusu içeren 3x9 cm'lik

flep kaldırıldı. Flep 2/0 ipek sütür ile devamlı sütürasyonla kaldırıldığı sahaya iade edildi (Şekil 3).

Cerrahi geciktirme yapılmayan grupta sıçan sırtında 3x9 cm boyutlarında flep planlandı ve çizim kalemi ile insizyon hattı çizildi. Çizim sonrası 15 nolu bistüri ile insizyon yapıldıktan sonra deri ve pannikulus karnosus kasını içeren flep kaldırıldı. 2/0 ipek sütür ile devamlı sütürasyonla flep kaldırıldığı sahaya iade edildi. (Şekil 2).



Şekil 1. Flep dizaynı



Şekil 2. Elevasyonu tamamlanmış McFarlane flep



Şekil 3. Flebin kaldırıldığı sahaya iadesi

İşlemler, nem oranı %50 ve sıcaklığı 16-21 °C arasında değişen şartlarda yapılarak sıçanların sıvı kaybı en aza indirilmeye çalışıldı. Çalışmanın tamamlandığı bütün sıçanlar patolojik ve fizyolojik inceleme amacıyla preperat alımı tamamlandıktan sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

DENEY PROTOKOLÜ

Denekler her grupta 10 sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu: Kaudal bazlı 9x3 cm'lik McFarlane flebi kaldırıldı ve devamlı sütürasyonla kaldırıldığı sahaya iadesi yapıldı. Bu gruba bir hafta boyunca povidione iyot ile günlük yara bakımı, tartı kontrolü yapıldı. 1 hafta sonra nekroz değerlendirilmesi, fotoğraflama ve doku örneklerinin alınması sonrası sıçanlar sakrifiye edildi. Ek herhangi bir stres veya ilaç uygulanmadı. Kontrol grubundaki sıçanlar deney başlangıcından 1 hafta sonra sakrifiye edilmiş oldu.

Deferoksamine Tedavisi Yapılan(Def.) Grup: 20 mg/kg deferoksamin (Desferal;Novartis) salin içinde çözülerek operasyondan bir hafta önce günlük 1x1 intraperitoneal olarak uygulandı (ön koşullama), daha sonra kaudal bazlı 9x3 cm'lik McFarlane flebi kaldırıldı ve devamlı sütürasyonla kaldırıldığı sahaya iadesi yapıldı. Bu gruba bir hafta boyunca povidione iyot ile günlük yara bakımı, tartı kontrolü yapıldı ve 1 bir hafta sonra nekroz değerlendirilmesi, fotoğraflama ve doku örneklerinin alınması sonrası sıçanlar sakrifiye edildi. Def. grubundaki sıçanlar deney başlangıcından 2 hafta sonra sakrifiye edilmiş oldu.

Cerrahi Geciktirme(Gec.) Grubu: sıçan sırtında 9x3 cm'lik kaudal bazlı McFarlane flep işaretlendi, lateral insizyonlar yapıldı, pannikulus karnosus kası insize edildikten sonra flep tabanı pannikulus karnosus kasını içerecek şekilde kaldırılarak cerrahi geciktirme işlemi yapıldı. İnsizyonlar devamlı sütürasyonla kapatıldı. Bir hafta boyunca povidione iyot ile günlük yara bakımı, tartı kontrolü yapıldı. Bir hafta sonra McFarlane flebi tümüyle kaldırıldı ve devamlı sütürasyonla kaldırıldığı sahaya iade edildi. Povidione iyot ile günlük yara bakımı, tartı kontrolüne devam edildi ve operasyondan bir hafta sonra nekroz değerlendirilmesi, fotoğraflama ve doku örneklerinin alınması sonrası sıçanlar sakrifiye edildi. Gec. grubundaki sıçanlar deney başlangıcından 2 hafta sonra sakrifiye edilmiş oldu.

Deferoksamine tedavisi ve Cerrahi Geciktirme(Def+Gec.) Yapılan Grup: 20 mg/kg deferoksamin (Desferal;Novartis) salin içinde çözülerek operasyondan bir hafta önce günlük 1x1 intraperitoneal olarak uygulandı. 1 hafta sonra sıçan sırtında 9x3 cm'lik kaudal bazlı McFarlane flep işaretlendi ve lateral insizyonları yapıldı, pannikulus karnosus kası insize edildikten sonra flep tabanı pannikulus karnosus kasını içerecek şekilde kaldırılarak cerrahi geciktirme işlemi yapıldı. İnsizyonlar devamlı sütürasyonla kapatıldı. Bir hafta sonra

McFarlane flebi kaldırıldı ve devamlı sütürasyonla kaldırıldığı sahaya iadesi yapıldı, Povidione iyot ile günlük yara bakımı, tartı kontrolüne devam edildi. Operasyondan 1 hafta sonra nekroz değerlendirilmesi, fotoğraflama yapıldı, doku örnekleri alındı ve sıçanlar sakrifiye edildi. Def+Gec. grubundaki sıçanlar deney başlangıcından 3 hafta sonra sakrifiye edilmiş oldu.

DEğERLENDİRME YÖNTEMİ

Makroskopik Flep Canlılığı

Hayvanlar sakrifiye edilmeden önce 40 cm uzaktan Samsung NX2000 (Samsung Electronics. China) digital fotoğraf makinası ile çekilen standart fotoğraflar bilgisayar ortamında ImageJ (National Institutes of Health. United States) programı kullanılarak tüm flep alanı, nekrotik doku alanı ve nekrotik alanların tüm flep alanına yüzde cinsinden oranları ayrı ayrı dört grup için hesaplandı. Standardize  l  mler yapılırken her fotoğrafta bulunan sabit cisim referans alınarak ölçü kalibrasyonu yapıldı.

Histopatolojik İnceleme

Deneyin tamamlandığı operasyon sonrası yedinci günde sıçanlar sakrifiye edildi. Flepler her iki skapuladan hat boyunca pedikül düzeyinden kesilerek sıçandan ayrıldı, yeşil arka plan üzerinde sabit mesafeden fotoğraflandı. Daha sonra tüm flep dokusu % 10'luk formalin solüsyonu ile fiks edildi. Histopatolojik  alışma için flep nekroz- normal doku geçiş zonundan doku örnekleri patolog tarafından alındı. Rutin doku takip işlemlerinin ardından paraf ne g  mlere mikrotom cihazı ile 4 mikronluk kesitler alındı. Alınan kesitler hematoxilen eozin ile boyandı. Hematoxilen eozin boyaması sonrası, ışık mikroskopunda tüm flepler, (x10) büyütme alanında nekroz varlığı (-/+), inflamasyon ve damar yoğunluğu açısından, aynı patolog tarafından, hangi doku örneğinin hangi gruba dahil olduğunu bilmeden (k r olarak) incelendi ve en yoğun alan seçilerek x400 lık büyütmede kantitatif olarak değerlendirildi. Örneklenen preperatlara Tablo-1'deki kriterlere göre skorelama yapıldı.

Tablo 1. Histopatolojik Skorlama Kriterleri

Kriter	Kapiller dansite¹	Nekroz²	Inflamasyon³ (PNL infiltrasyonu)
0	Kapiller yok	Patolojik değişiklik yok	0-1
1	0-5	Fasya ile sınırlı nekroz	2-5
2	5-10	Fasya ve panniculus carnosusa uzanan nekroz	6-11
3	10-20	Tam kat nekroz	12-20
4	>20		>20 pmnl

Biyokimyasal İnceleme

Test ve standart tüplerine 490 µl, kör tüpüne 500 µl distile su kondu. Tüm tüplere 2,5 ml D çözeltisi ilave edildikten sonra, test tüplerine 10 kat dilüe edilmiş numuneden 10 µl; standart tüplerine de 10 µl her bir standarttan ilave edildi ve tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı. Karanlıkta oda ısısında 10 dk bekletildikten sonra, tüm tüplere 250 µl E çözeltisi eklendi. 25 °C’de 30 dk bekletildikten sonra, spektrofotometrede 650 nm’de köre karşı sıfırlanarak okuma yapıldı.

Protein Miktarı Tayini:

Protein miktar tayini Lowry metoduna göre yapıldı (67).

Malondialdehit Tayini

Lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehitin (MDA) tiyobarbitürik asit (TBA) ile sıcak ve asit ortamda reaksiyona girmesi sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçüldü (68).

Çözeltiler:

1. % 8,1’lik Sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. % 20’lik Asetik asit (NaOH ile pH 3,5’e ayarlandı)
3. % 0,8’lik Tiyobarbitürik asit (TBA)

Deneyin Yapılışı:

0,2 ml 10 kat dilüe edilmiş doku homojenatı; 0,2 ml % 8,1'lik SDS, 1,5 ml % 20'lik asetik asit, 1,5 ml % 0,8'lik TBA ve 0,6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 95 °C'deki sıcak su banyosunda 1 saat tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 650 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.

Sonuçların Hesaplanması:

$$C \text{ (nmol/ml)} = \frac{A \times V_t \times 10^9}{E \times V_s \times L \times 10^3}$$

A : Absorbans

E : Tüketim katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V_t : Total reaksiyon hacmi

V_s : Total reaksiyon içindeki numune hacmi

L : Küvet çapı

10⁹ : Molün nanomole çevrilmesi

10³ : Litrenin mililitreye çevrilmesi

Sonuçlar MDA nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Glutasyon Düzeyinin Ölçümü:

Doku homojenatlarındaki serbest SH gruplarının Ellman ayırıcı ile oluşturduğu rengin spektrofotometrik olarak saptanması, glutasyon (GSH) içeriğinin belirtilmesi için kullanıldı (69).

Çözeltiler:

1. Proteinsizleştirme çözeltisi: 120 g NaCl, 6,68 g metafosforik asit ve 0,8 g sodyum-EDTA tartıldı ve 400 ml distile suda çözüldü.
2. 0,3 M Disodyum fosfat (Na₂HPO₄)
3. 1 mM Elman ayırıcı: 4 mg 5.5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DNTB), 10 ml % 1'lik sodyum sitrat çözeltisinde çözüldü.
4. Glutasyon standardı: 10 mg/dl GSH

Deneyin Yapılışı:

Doku homojenatının 0,5 ml'si üzerine 1,5 ml 0,15 M KCl ve 3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi. Bu karışım 3000xg'de 20 dk santrifüj edildikten sonra 0,5 ml süpernatant alınarak üzerine 0,3 M Na₂HPO₄ ve 0,5 ml Ellman ayırıcı eklendi. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 412 nm'de okundu. GSH düzeyleri ekstinksiyon katsayısı ($\Sigma=1.36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{mol GSH/mg protein}$ olarak ifade edildi.

İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerde normal dağılım Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Çalışma grupları Tek Yönlü Varyans Analizi (Post-Hoc: Tukey testi) uygulanarak karşılaştırıldı. Kategorik türde değişkenler arasındaki ilişki Fisher'ın Kesin testi ile incelendi. Tanımlayıcı istatistik olarak normal dağılıma uyanlar ortalama ve standart sapma ile birlikte minimum ve maksimum değer verildi. Normal dağılıma uymayanlar ise median ve interquartil range olarak verildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS (Version 23, Armonk, NY: IBM Corp) paket programı ile gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlendi.

BULGULAR

Çalışmamız süresince geciktirme (gec.) grubunda 1 sıçan cerrahi sonrası 1. gün, deferoksamin+geciktirme (def.+gec.) grubunda 1 sıçan cerrahi sonrası 3. gün, kontrol grubunda 1 sıçan cerrahi sonrası 1. gün öldü. Sonuçlar buna göre gec. grubunda 9, def+gec. grubunda 9, kontrol grubunda 9, deferoksamin (def.) grubunda 10 sıçan üzerinden hesaplandı. Deney sırasında herhangi bir ilaç yan etkisi görülmedi. Kontrol grubundaki sıçanlar 1 hafta, gec. ve def. grubundaki sıçanlar 2 hafta, def+gec. grubundaki sıçanlar 3 hafta süren deney protokolünden sonra kurban edildi.

Deney öncesi ve sonrası tüm sıçanların ağırlık ölçümleri yapıldı. Deney gruplarının ve kontrol grubunun bazal ağırlık ölçümlerinde anlamlı fark yoktu (kontrol grubu $258,3 \pm 34,05$ gr, def. grubu $273,7 \pm 28,6$ gr, gec. grubu $275,8 \pm 17,9$ gr, def+gec. grubu $256,8 \pm 14,3$ gr, $p:0,248$). Tüm gruplarda cerrahi sonrası ağırlık kaybı görüldü ve gec. grubunda, def. grubuna göre ağırlık kaybı fazlaydı (kontrol grubu $-10 \pm 6,5$ gr, def. grubu $-7,7 \pm 7,5$ gr, gec. grubu $-16,6 \pm 9$ gr, def+gec. grubu $-9 \pm 4,7$ gr, $p:0,049$).

Flep Değerlendirme Sonuçları

Fleplerde bir miktar kontraksiyon olacağı öngörüldüğü için toplam flep alanını 2700 mm² kabul etmek yerine her bir sıçana ait toplam alan ölçüldü (Şekil 5, Tablo 3). Öncelikle deney gruplarındaki ve kontrol grubundaki toplam flep alanları karşılaştırıldı (Şekil 6). Toplam flep alanlarının normal ve homojen dağılım gösterdikleri izlendi. Flep alanı açısından gruplar arası fark incelendiğinde kontrol grubu ile deney grupları arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (gec. grubu $p=0,960$, def. grubu $p=0,090$, def.+gec. grubu $p=0,379$). Bununla

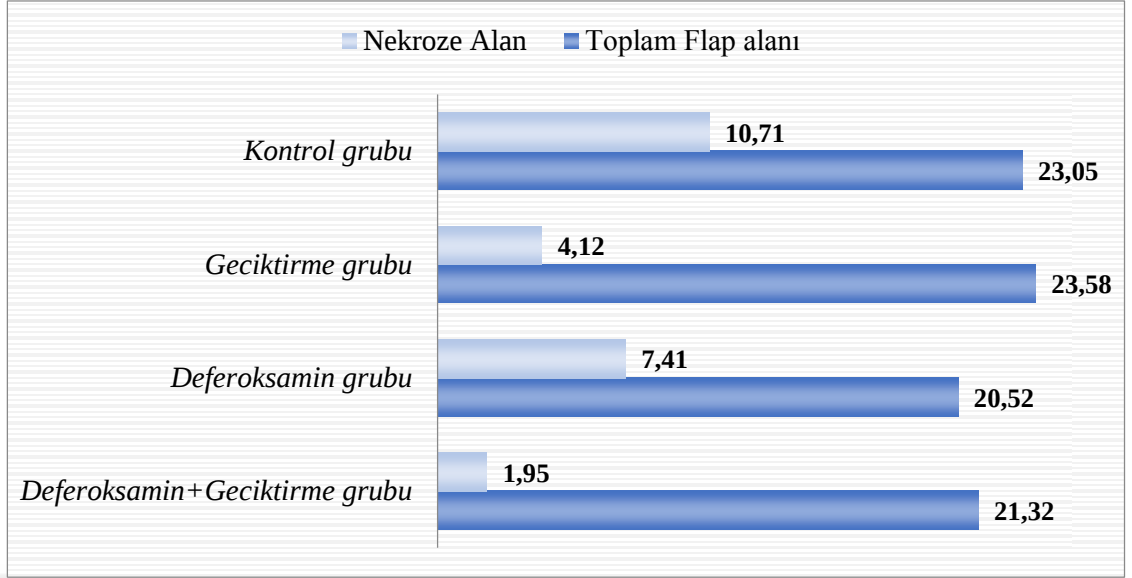
beraber gec. ve def. grupları arasında (Ortalama flep alanları sırasıyla; $23,58 \pm 1,6 \text{ cm}^2$, $20,52 \pm 2,2 \text{ cm}^2$) anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p=0,029$) (Tablo 2).



Şekil 5. Def. grubundan 9. sıçana ait toplam flep alanı bilgisayar programı (Imagej®) yardımıyla hesaplanması



Şekil 6. Def. grubundan 9. sıçana ait nekroze alanının bilgisayar programı (Imagej®) yardımıyla hesaplanması



Şekil 7. Imagej programı ile ölçülen toplam flep ve nekroz alanlarının ortalama değerlendirilmesi

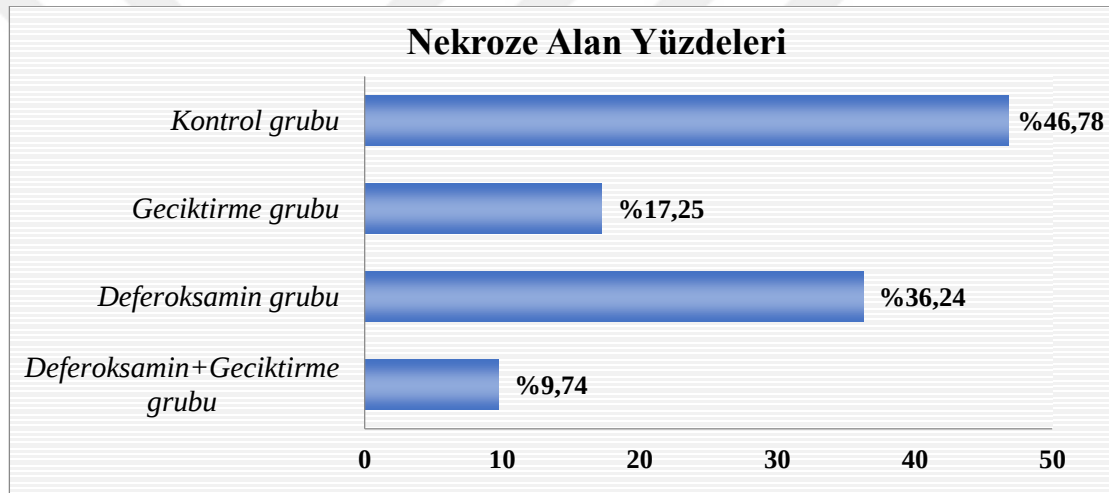
Her bir sıçana ait nekroze flep alanları ImageJ programı ile ölçüldü. (Şekil 6) Daha sonra gruplar arası nekroze flep alanları farkı incelendi (Şekil 7, Tablo 3). Yapılan incelemede nekroze flep alanlarının, def., gec. ve def+gec. gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görüldü (Sırasıyla; $p=0,027$, $p<0,001$, $p<0,001$). Gec. ve def+gec. gruplarının nekroze flep alanlarında, def. grubuna göre anlamlı derecede azalma tespit edildi (Sırasıyla; $p=0,026$, $p<0,001$). Gec. ve def+gec. grupları arasında nekroze flep alanları açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,246$). Ortalama nekroze flep alanı, kontrol grubunda $10,71\pm2,7$ (min-maks: 6,02-15,22), gec. grubunda $4,12\pm3,2$ (min-maks: 0,64-9,07), def. grubunda $7,41\pm1,9$ (min-maks: 4,16-10,95), def+gec. grubunda ise $1,95\pm1,5$ (min-maks: 0,42-5,28) olarak görüldü (Tablo 2, Şekil 7).

Tablo 3. Sıçanların gruplarına, toplam flep alanlarına, nekroze alanlarına ve nekroze alan yüzdelere ilişkin verileri

No	Çalışma grupları	Toplam Flep alanı	Nekroze Alan	Nekroze alan yüzdesi
1	Kontrol grubu	25,301	15,220	%60,16
2	Kontrol grubu	22,301	12,528	%56,18
3	Kontrol grubu	23,823	12,625	%53
4	Kontrol grubu	21,600	10,984	%50,85
5	Kontrol grubu	20,653	8,069	%39,07
6	Kontrol grubu	25,871	6,017	%23,26
7	Kontrol grubu	21,021	10,013	%47,63
8	Kontrol grubu	26,028	9,670	%37,15
9	Kontrol grubu	20,875	11,229	%53,79
10*	-	-	-	-
11	Geciktirme grubu	23,154	641	%2,77
12	Geciktirme grubu	23,076	6,274	%27,19
13	Geciktirme grubu	25,028	1,799	%7,19
14*	-	-	-	-
15	Geciktirme grubu	26,082	9,067	%34,76
16	Geciktirme grubu	24,165	1,237	%5,12
17	Geciktirme grubu	23,064	2,626	%11,39
18	Geciktirme grubu	21,566	1,655	%7,67
19	Geciktirme grubu	24,723	8,123	%32,86
20	Geciktirme grubu	21,347	5,618	%26,32
21	Deferoksamin grubu	19,350	9,008	%46,55
22	Deferoksamin grubu	17,857	7,669	%42,95
23	Deferoksamin grubu	17,754	7,250	%40,84
24	Deferoksamin grubu	20,667	7,142	%34,56
25	Deferoksamin grubu	19,031	4,161	%21,86
26	Deferoksamin grubu	23,712	10,947	%46,17
27	Deferoksamin grubu	23,666	5,680	%24
28	Deferoksamin grubu	20,303	6,698	%32,99
29	Deferoksamin grubu	22,319	8,954	%40,12
30	Deferoksamin grubu	20,580	6,661	%32,37
31	Deferoksamin+Geciktirme grubu	18,901	5,283	%27,95
32	Deferoksamin+Geciktirme grubu	21,419	2,953	%13,79
33	Deferoksamin+Geciktirme grubu	18,692	1,521	%8,14
34*	-	-	-	-
35	Deferoksamin+Geciktirme grubu	26,033	1,545	%5,93
36	Deferoksamin+Geciktirme grubu	24,266	501	%2,06
37	Deferoksamin+Geciktirme grubu	17,589	2,465	%14,01
38	Deferoksamin+Geciktirme grubu	20,010	579	%2,89
39	Deferoksamin+Geciktirme grubu	20,894	2,324	%11,12
40	Deferoksamin+Geciktirme grubu	24,092	423	%1,76

* Çalışma sırasında ölüm nedeniyle çalışmadan çıkartılan denekler.

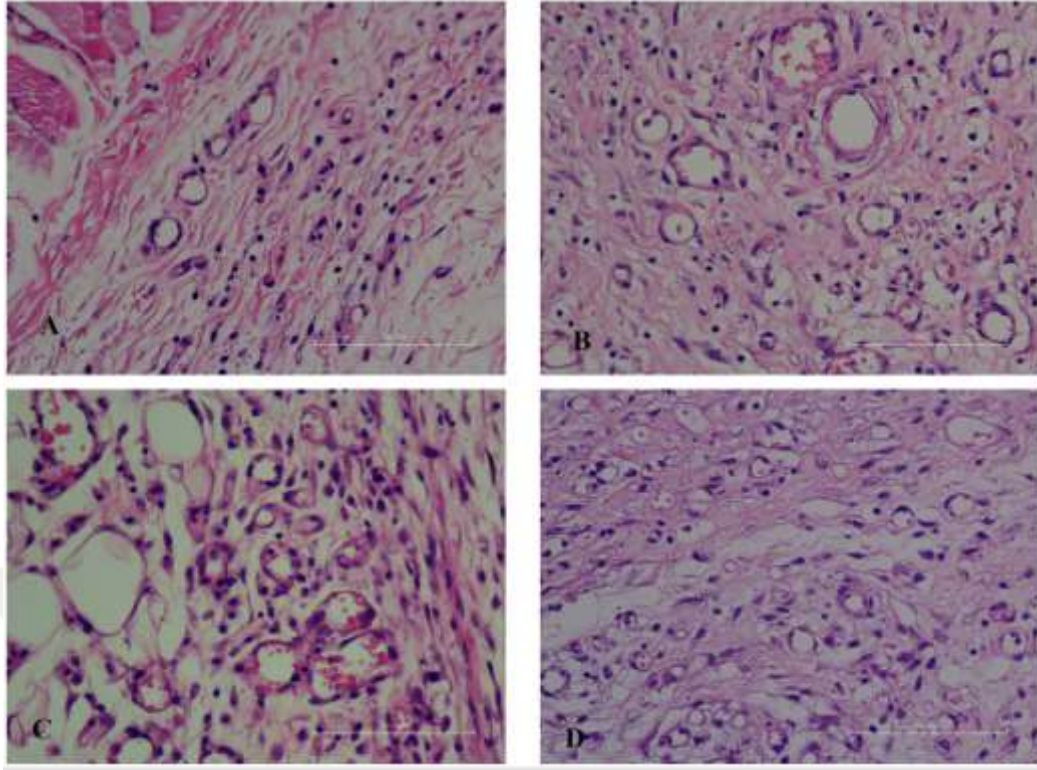
Nekroz alanının toplam flep alanına bölümü ile elde edilen nekroze alan yüzdeleri hesaplandı. Yapılan incelemede nekroze alan yüzdelерinin, def., gec. ve def+gec. gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı görüldü (Sırasıyla; $p=0,037$, $p<0,001$, $p<0,001$). Gec. ve def+gec. gruplarında nekroze alan yüzdesinin, def. grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (Sırasıyla; $p<0,001$, $p<0,001$). Gec. ve def+gec. grupları arasında nekroze alan yüzdeleri açısından anlamlı fark saptanmadı ($p=0,142$). Hesaplanan nekroze alan yüzdelерinin ortalama değерleri; kontrol grubunda $\%46,78 \pm 11,6$ (min-maks: $\%23,26-60,16$) olduğu görüldü. Gec. grubunda $\%17,25 \pm 12,8$ (min-maks: $\%2,77-34,76$)'a düştüğü, def. grubunda $\%36,24 \pm 8,6$ (min-maks: $\%21,86-46,55$)'a ve Def+Gec. grubunda $\%9,74 \pm 8,3$ (min-maks: $\%1,76-27,95$)'a düştüğü görüldü (Şekil 8).



Şekil 8. Çalışma gruplarına göre Nekroze alan yüzdelерinin karşılaştırılması

Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Deferoksaminin sıçanlarda cerrahi geciktirme fenomenine etkisini incelediğimiz çalışmamızda tüm flep örnekleri histopatolojik inceleme amacı ile alındı. Patolog tarafından örneğinin hangi gruba dahil olduğunu bilmeden incelendi. Nekroz-normal doku geçişinden alınan doku örnekleri x400 lık büyütmede kantitatif olarak değerlendirildi. (Şekil 9)



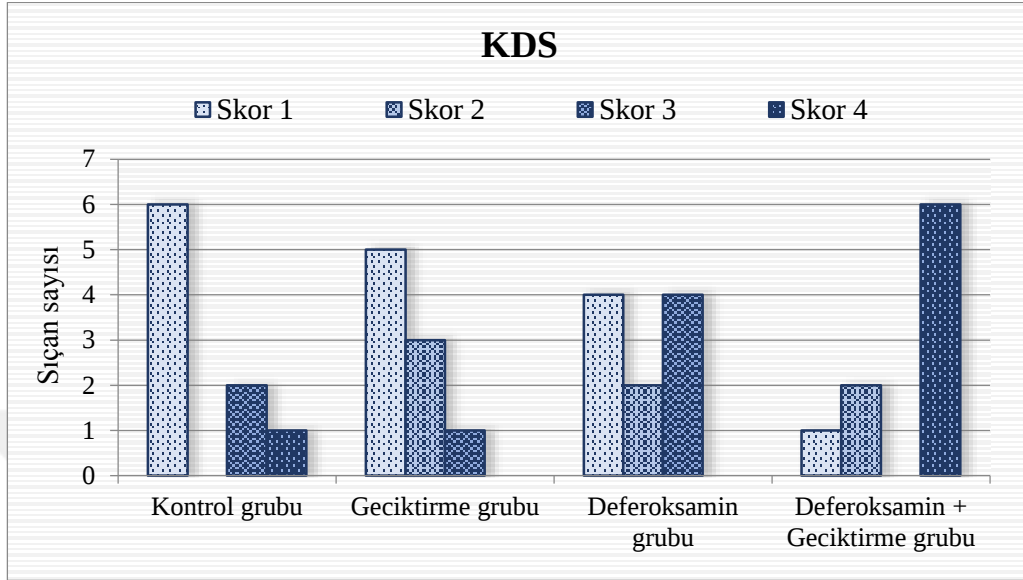
Şekil 9. Nekroz-normal doku geçiş hattında damar sayımı yapılarak kapiller dansite skorunun belirlendiği histolojik kesitler. A; kapiller dansite skoru 1, B; kapiller dansite skoru 2, C; kapiller dansite skoru 3, D; kapiller dansite skoru 4 (HE X400 NIKON ECLIPSE Ci-L)

Tablo 4. Çalışma gruplarına göre KDS - n(%)

Çalışma grupları	KDS			
	Skor 1	Skor 2	Skor 3	Skor 4
Kontrol grubu	6 (%66,7)	0 (%0)	2 (%22,2)	1 (%11,1)
Geciktirme grubu	5 (%55,6)	3 (%33,3)	1 (%11,1)	0 (%0)
Deferoksamin grubu	4 (%40)	2 (%20)	4 (%40)	0 (%0)
Deferoksamin+Geciktirme grubu	1 (%11,1)	2 (%22,2)	0 (%0)	6 (%66,7)
p	0,002			

Yapılan istatistiksel analizde, def.+gec grubunda kontrol, gec. ve def. gruplarına göre kapiller dansite skorları anlamlı derecede daha yüksek elde edildi (Sırasıyla; $p=0,011$, $p=0,020$, $p=0,008$). Def+GeC. grubunda %66,7'sinin KDS skoru "4" olarak elde edilirken kontrol grubunda %11,1 oranında elde edildi. Gec. ve def. gruplarında ise "4" KDS skoru gözlenmedi (Tablo 4). Kontrol grubu ile gec. ve def. grupları arasında ve gec. ile def. grupları arasında

yapılan karşılaştırmalarda ise kapiller dansite skoru açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 10).



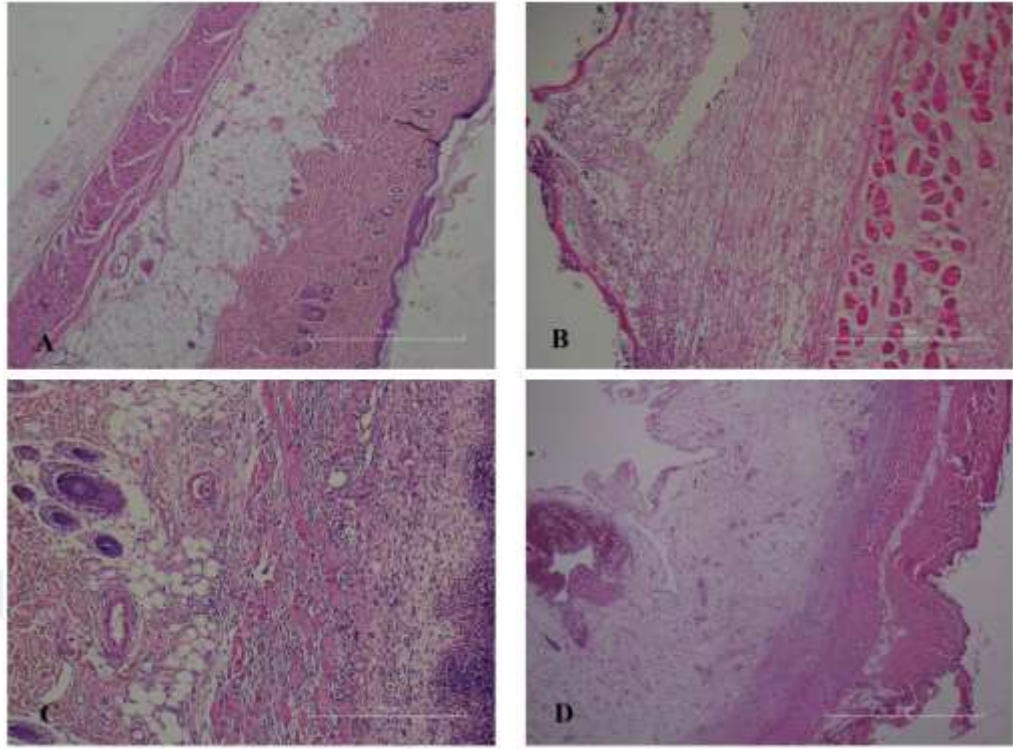
Şekil 10: Gruplar arası kapiller dansite skoru karşılaştırılması

Nekroz Skoru

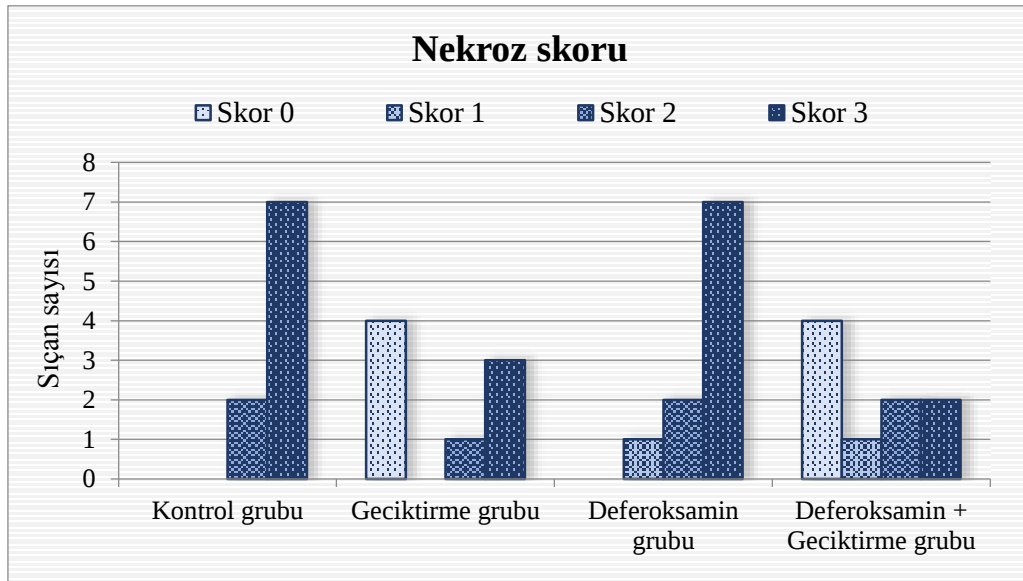
Mikroskopik nekroz skorlaması açısından yapılan analizde, kontrol grubuna göre gec., def. gruplarının arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 12). Kontrol grubuna göre def+gec. grubunda daha düşük nekroz skorlaması elde edildi. ($p<0,05$) Bununla birlikte gec. ve def. grupları arasında yapılan karşılaştırmada, def. grubunda daha yüksek nekroz skorları elde edildiği görüldü ($p<0,05$). Gec. grubunun %50'sinin nekroz skoru 0 iken def. grubunda nekroz skoru 0 olarak belirlenen sıçan yoktu. Nekroz skoru 3 olarak belirlenen sıçanların oranları ise gec. grubunda %37,5, def. grubunda %70 idi (Tablo 5).

Tablo 5. Çalışma gruplarına göre Nekroz skoru - n(%)

Çalışma grupları	Nekroz skoru			
	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3
Kontrol grubu	0 (%0)	0 (%0)	2 (%22,2)	7 (%77,8)
Geciktirme grubu	4 (%50)	0 (%0)	1 (%12,5)	3 (%37,5)
Deferoksamin grubu	0 (%0)	1 (%10)	2 (%20)	7 (%70)
Deferoksamin+Geciktirme grubu	4 (%44,4)	1 (%11,1)	2 (%22,2)	2 (%22,2)
p	0,020			

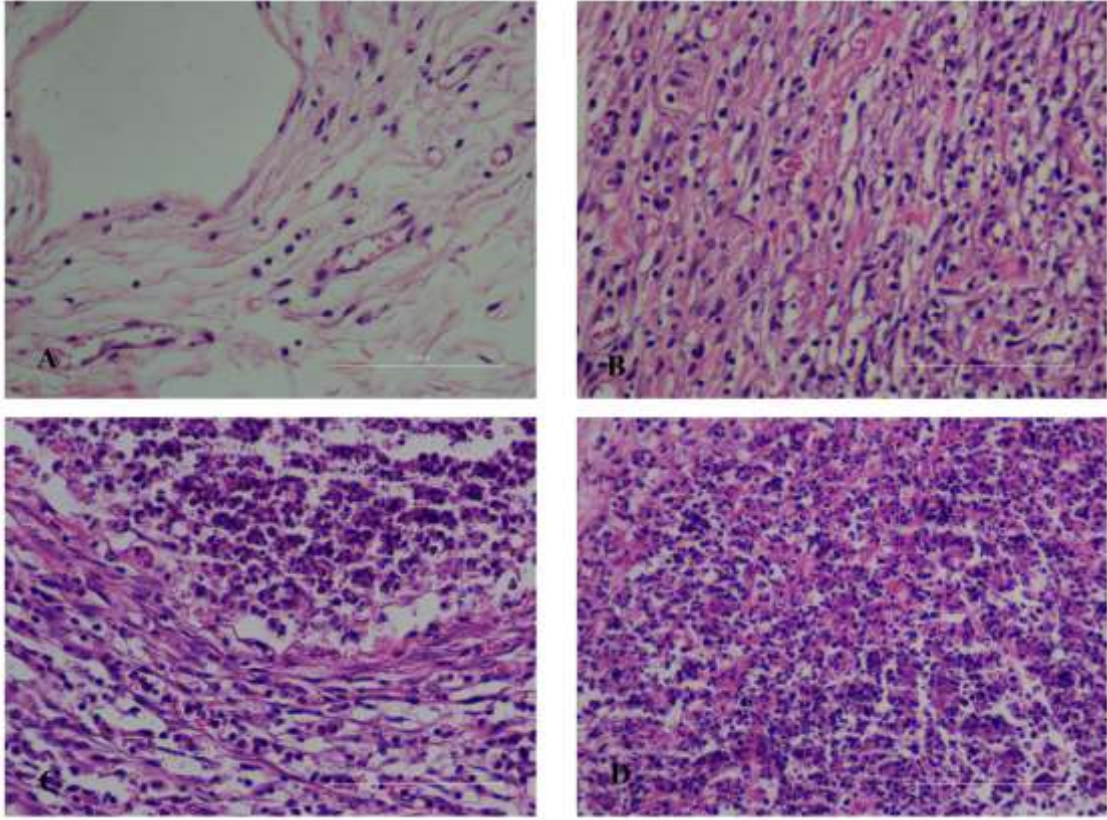


Şekil 11. Nekroz-normal doku geçiş hattında nekroz skorunun belirlendiği histolojik kesitler. A; nekroz yok 1, B; sadece fasyada nekroz mevcut 2, C; epitelizasyon düzenli kas ve fasyada nekroz mevcut, D; tam kat nekroz (HE X400 NIKON ECLIPSE Ci-L)



Şekil 12: Gruplar arası nekroz skoru karşılaştırılması

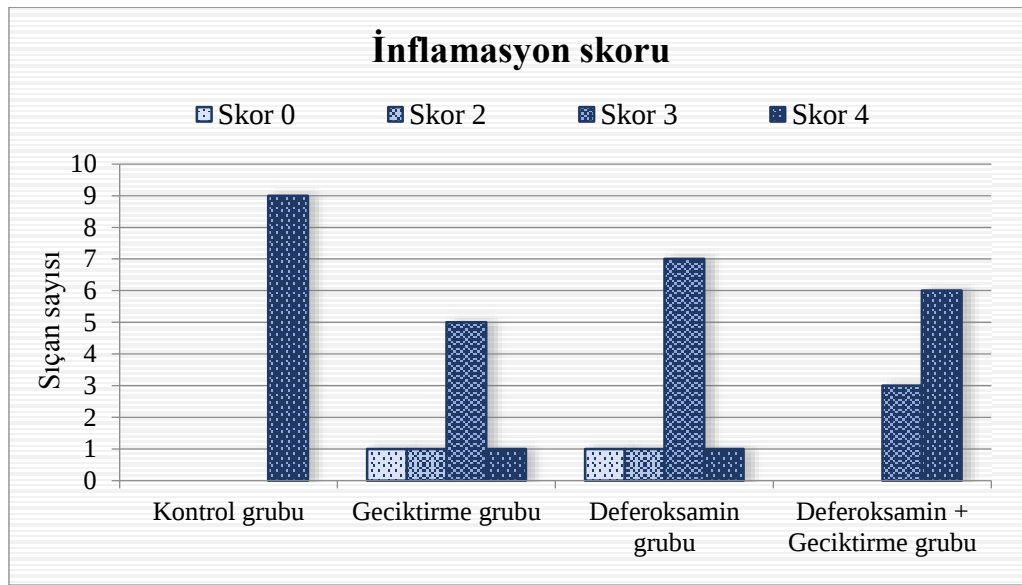
İnflamasyon skorlaması sonucu elde edilen veriler üzerinde yapılan istatistiksel analizde, def+gec. grubu ile kontrol grubu, gec. ve def. grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 14). Kontrol grubunun tamamında inflamasyon skoru 4 olarak elde edilirken gec. ve def. gruplarında bu oranlar sırasıyla; %12,5 ve %10 idi (Tablo 6). Gec. ve def. gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük inflamasyon skorları elde edildi. Kontrol grubu ile gec. ve def. grupları arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,002$).



Şekil 13. Nekroz geçiş hattında polimorfonükleer hücrelerin sayılarak inflamasyon skorunun belirlendiği histolojik kesitler. A; inflamasyon skoru: 1, B; inflamasyon skoru: 2, C; inflamasyon skoru: 3, D; inflamasyon skoru: 4 (HE X400 NIKON ECLIPSE Ci-L)

Tablo 6. Çalışma gruplarına göre İnflamasyon skoru - n (%)

Çalışma grupları	İnflamasyon skoru			
	Skor 0	Skor 2	Skor 3	Skor 4
Kontrol grubu	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	9 (%100)
Geciktirme grubu	1 (%12,5)	1 (%12,5)	5 (%62,5)	1 (%12,5)
Deferoksamin grubu	1 (%10)	1 (%10)	7 (%70)	1 (%10)
Deferoksamin+Geciktirme grubu	0 (%0)	0 (%0)	3 (%33,3)	6 (%66,7)
p	<0,001			



Şekil 14. Gruplar arası inflamasyon skoru karşılaştırılması

Biyokimyasal İnceleme Sonuçları

Malondialdehid (MDA) değerleri çalışma grupları arasında karşılaştırıldığında, def.+gec. grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek MDA değerleri elde edildiği görüldü ($p=0,032$) (Tablo 3). Def.+gec. grubu ile def. ve gec. grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,467$, $0,995$). Ortanca MDA değerleri, def.+gec. grubunda 0,43 (%25-%75: 0,19-0,79, min-maks: 0,09-1,57), kontrol grubunda 0,17 (%25-%75: 0,08-0,23, min-maks: 0,04-0,34) idi. Def. ve gec. gruplarında ise sırasıyla; 0,36 (%25-%75: 0,25-0,47, min-maks: 0,09-0,67), 0,23 (%25-%75: 0,14-0,4, min-maks: 0,10-0,58) olarak ölçüldü (Şekil 15).

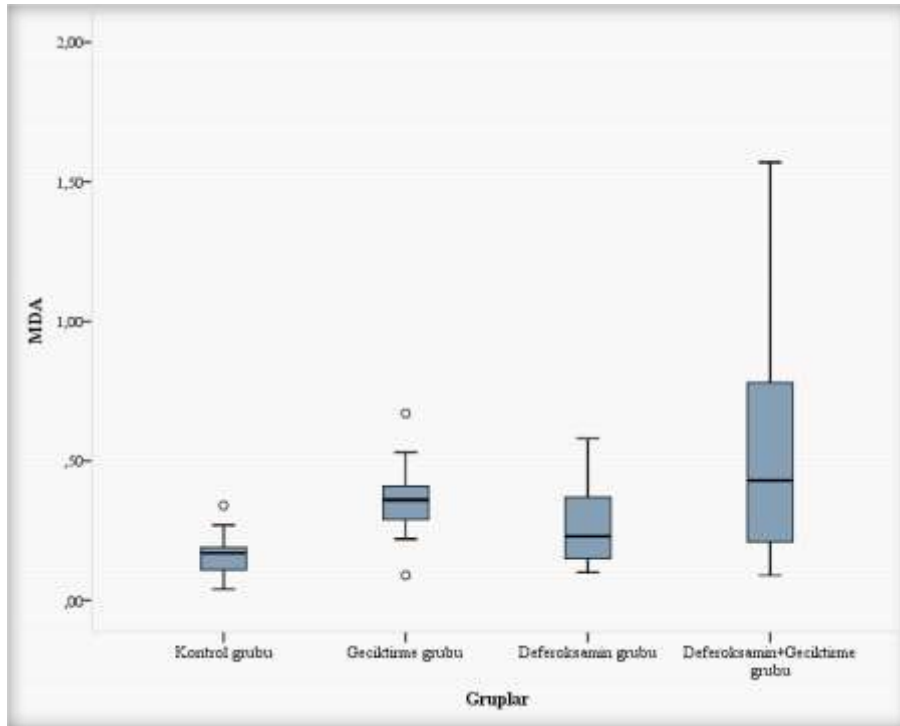
GSH değerleri için yapılan incelemede, çalışma grupları arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,001$). GSH değerleri, def.+gec. grubunda kontrol, def. ve gec. gruplarına göre daha

yüksekti (Sırasıyla; $p<0,001$, $p=0,027$, $p=0,002$). Kontrol grubu ile def. ve gec. grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,010$, $0,072$). Ortanca GSH değerleri def.+gec. grubunda 306 (%25-%75: 225,2-1084,5, min-maks: 112,15-1552,90) olarak elde edilirken kontrol grubunda 85,07 (%25-%75: 65,6-106,3, 46,59-120,03), gec. grubunda 128,5 (%25-%75: 116,9-150,1, min-maks: 98,64-168,28), def. grubunda 113,8 (%25-%75: 87,1-182,8, min-maks: 76,83-424,04) olarak ölçüldü (Şekil 16).

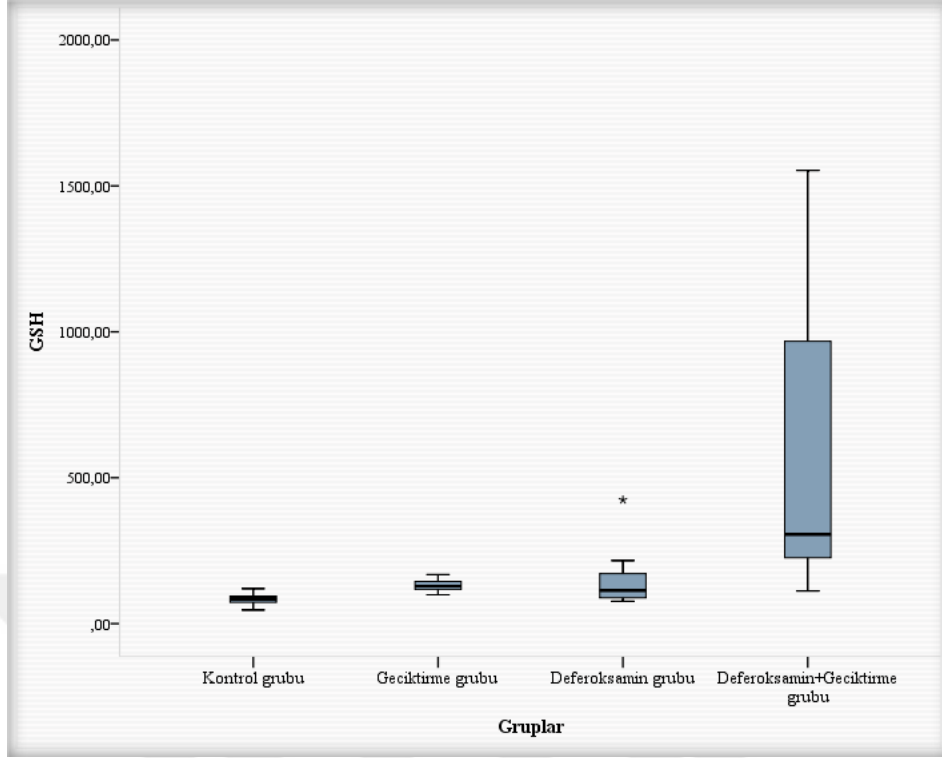
Tablo 3. Gruplarda MDA ve GSH incelemesi

Çalışma grupları	n	MDA	GSH
Kontrol grubu	9	0,17 (0,08-0,23), 0,04-0,34	85,07 (65,6-106,3), 46,59-120,03
Geciktirme grubu	9	0,36 (0,25-0,47), 0,09-0,67	128,5 (116,9-150,1), 98,64-168,28
Deferoksamin grubu	10	0,23 (0,14-0,4), 0,10-0,58	113,8 (87,1-182,8), 76,83-424,04
Deferoksamin+ Geciktirme grubu	9	0,43 (0,19-0,79), 0,09-1,57	306 (225,2-1084,5), 112,15-1552,90
p		$p=0,033$	$p<0,001$

Veriler Ortanca (%25-%75), minimum-maksimum değer olarak özetlendi.



Şekil 15. Gruplar arası MDA değerleri karşılaştırılması



Şekil 16. Gruplar arası GSH değerleri karşılaştırılması

Bulgular ve istatistiksel sonuçlar CD halinde Ek 2’de verilmiştir.

TARTIŞMA

Plastik cerrahlardan genellikle travma, yanık, tümör rezeksiyonları gibi edinsel defektler sonucunda oluşan kompleks doku defektlerinin kapatılması için konsültasyon istenir. Yara değerlendirilirken, kapatmak için en basitten başlayıp “rekonstrüktif merdiven” üzerinden daha kompleks onarımlara gidilir. Defektin onarımında primer cilt onarımından başlayıp, sekonder onarım, deri greft uygulamaları, yakın veya uzak flep cerrahilerine uzanan farklı yöntemler mevcuttur. Primer cilt onarımı yapılamadığında bu defektlerin kapatılmasında en fonksiyonel ve estetik yaklaşım ise flep cerrahisidir. Kolay ve morbiditesi düşük olduğundan öncelikli tercih lokal fleplerdir. Lokal flepler içerisinde en sık kullanılanları random paternli fleplerdir.

Kısmi ya da total flep kaybında, mevcut tabloya ameliyat tekrarı, yatış süresinin uzaması, ekonomik kayıp ve iş gücü kaybı, psikolojik stres gibi sorunlar eklenmektedir. Flep cerrahisindeki teknik ilerlemeler ile kompleks çözümler denense bile her flep dokusunun random paternli fleplerde olduğu gibi kapiller düzeyde yetersiz dolaşıma sahip alanları mevcuttur. Bu nedenle flep kanlanması ve flep sağ kalımının artırılmasına yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Cerrahi geciktirme ile flep sağkalımının artacağına dair ilk kanıt McFarlane tarafından gösterilmiştir (52). Myers cerrahi geciktirme ile flebin yaşayabilirliğinin, boy-en oranının ve aktarılabilecek doku miktarının artırılabilirdiğini belirtmiştir (2). Cerrahi geciktirme ile doku iskemiye hazırlanır ve iskemiye olan toleransı artırılır (27). Cerrahi geciktirme işlemi aynı zamanda vaskülariteyi artırır (19). Milton domuz yavruları üzerinde yaptığı çalışmada cerrahi geciktirme işlemini incelemiş ve en uygun zaman olarak iki hafta sonra doku aktarımının yapılmasını önermiştir (70).

Cerrahi geciktirme işleminin flep sağ kalımını arttırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Fakat Cerrahi geciktirmenin ek bir ameliyat olması, hastanede kalış süresini uzatması, bu süre zarfında sosyal hayattan mahrumiyet, ek pansuman ve yara bakımı, bu ameliyatta olabilecek ek morbidite ve sağlık harcaması gibi olumsuz yanları vardır (16). Bu nedenle flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik sistemik yada lokal olarak birçok farmakolojik ajan denenmiştir.

Fasyokutan fleplerin distalinde oluşan nekrozun tam nedeni açığa çıkarılamamış olsa da flep yaşayabilirliğinde en önemli faktör cilt tabakasındaki kan dolaşımıdır. Flep kayıplarındaki faktörlerin arteriyel yetmezliğin sebep olduğu iskemi, vasospazm, tromboz, iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan serbest radikallerin hasarı olduğu ileri sürülmüştür.

Deferoksamin, şu anda hemokromatoz tedavisi için klinik kullanımda olan FDA onaylı bir demir şelatlama ajanıdır (71). Deferoksaminin serbest radikal oluşumunu azaltılması ile hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir (72). Dahası deferoksamin demiri bağlayarak prolin hidroksilazların aktivitesini inhibe eder ve HIF-1 α 'yı stabilize eder. HIF-1 α , hipoksiye karşı normal hücresel tepkinin kritik bir transkripsiyonel düzenleyicisidir. Progenitör hücre katılımını, proliferasyonu, hayatta kalmayı ve neovaskülarizasyonu teşvik eder (73).

Çalışmamızda literatürden farklı olarak antioksidan ve anjiogenik etkili deferoksaminin, cerrahi geciktirme ve flep yaşayabilirliğine etkisini karşılaştırdık.

Deney gruplarımız ağırlık kaybı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubuyla deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Okauchi ve ark. (74) Deferoksaminin intraserebral kanama sonrası beyin hasarına etkisini inceledikleri çalışmada sıçanların vücut ağırlığının ameliyattan sonra azaldığını, vücut ağırlığındaki azalmanın 7. günde zirvede olduğunu ve bu noktadan sonra, sıçan vücut ağırlığının kademeli olarak arttığını belirtmişlerdir. Ağırlık kaybı açısından gruplar arasında hiçbir fark olmadığını ve deferoksamin tedavisinin vücut ağırlığı değişimini etkilemediğini belirtmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda gec. grubunda def. grubuna göre istatistiksel olarak daha fazla kilo kaybı olduğu görülmüştür. Bu durumun Gec. grubunda uygulanan cerrahi geciktirmenin ve sonrasında flep cerrahisinin katastrofik etkisine bağlı olduğu düşünülmüştür. Def.+Gec. grubunda ise bu gruptaki sıçanların daha uzun süre yaşamasından ötürü cerrahiye bağlı kilo kaybı etkisinin hafiflediği düşünülmüştür.

Çalışmamızda toplam flep alanları kontrol grubunda 23,05 $\pm$ 2,2 cm², def. grubunda 20,52 $\pm$ 2,2 cm², Gec. grubunda 23,58 $\pm$ 1,6 cm², def.+gec. grubunda 21,32 $\pm$ 2,29 cm² olarak ölçüldü ve gec. ve def. grupları arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi (p=0,029). Literatürde,

tam kalınlıkta bir cilt greftinin orijinal alanının yaklaşık %40'ını kaybettiği ve kısmi kalınlıkta cilt greftinin, ani elastik kasılma sonucu dikiş atılmadan önce yaklaşık %10 oranında büzüldüğü gösterilmiştir (75). Cilt greftlerinin yanında cildin elastik içeriği nedeniyle cilt fleplerinin de kaldırıldıktan sonra büzüldüğü ve bunun kaçınılmaz olduğu plastik cerrahlar tarafından iyi bilinen bir durumdur. Flep büzülmesi dermisteki gevşemiş cilt gerilim hatları boyunca paralel sıralar halinde düzenlenen kollajenin organizasyonuna atfedilir (76). Aneesha ve ark. (77) diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesini inceledikleri çalışmalarında Deferoksamin tedavisi alan gruplarda kontrol grubuna kıyasla yara kontraksiyonunda artış görüldüğünü, olgun kollajen liflerinin fibroblastlarla birlikte çok iyi organize edilmiş bir şekilde düzenlendiğini göstermiştir. Cilt fleplerinin geri çekilme özelliklerini değerlendiren çok az deneysel çalışma vardır (78,79,80). Çalışmamızda def. grubunda belirgin olmak üzere (def+gec. grubunda 1 haftalık cerrahi geciktirme sonrası flep kaldırılması uygulandığı için dokuda bulunan deferoksamin miktarının azaldığı ve deferoksaminin kollajen organizasyonu üzerine etkisinin azaldığı düşünülmüştür) toplam flep alanı azalmış olarak tespit edilmiştir. Bu durumun deferoksaminin olgun kollajen miktarını ve kollajen organizasyonunu yeniden düzenlemesine bağlı flep büzülmesini arttırması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür. İngilizce literatür taramamızda cilt flebi büzülmesini arttıran veya azaltan farmakolojik ajan çalışmasına rastlanmamakla beraber deferoksaminin cilt flebi büzülmesi ile ilişkisine dair bir çalışma da görülmemiştir. Deferoksamin ile cilt flebi kontraksiyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen yeni bir çalışma modeline gereksinim olduğu düşünülmüştür.

Angel ve ark. sıçan McFarlene flebi modelinde 150 mg/kg deferoksamin kullanarak yaptıkları çalışmada serbest radikal oluşumunu önleyerek flep yaşayabilirliğini arttırdıklarını göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca deney grubunda lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyelerinin kontrol grubuna oranla azaldığını tespit edip, serbest radikal oluşumda azalmaya bağlı flep yaşayabilirliğinin arttığını belirtmişlerdir (81). Çalışmamızda MDA seviyesi en yüksek olarak def+gec. grubunda görülmüştür. Bu grupta görülen artmış flep yaşayabilirliğine serbest radikal oluşumunun önlenmesine bağlı bir katkının olmadığı düşünülmüştür. Bununla beraber Angel ve ark. yaptığı çalışmadan farklı bir şekilde 20 mg/kg deferoksamin kullandığımız def. grubundaki ile kontrol grubundaki MDA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir. Bu nedenle serbest radikal oluşumunun engellenmesinin doz bağımlı olabileceğini düşünülmüştür.

Lipid peroksidasyonu ile MDA değerinin yükseldiği, akut dönemde GSH değerinin azaldığı gösterilmiştir.(82,83) Benlier ve ark. sıçan kaudal tabanlı sırt cildi flebi modelinde 50

mg/kg allopurinol, 30 mg/kg siklosporin ve 150 mg/kg deferoksaminin tek ve kombine kullanımının iskemik hasara etkisini incelediği çalışmada, deferoksamin grubunda ortalama MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük, deferoksamin grubunda GSH düzeylerinin ise kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (84). Çalışmamızda def.+gec. grubunda GSH düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$), def. grubu ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Özbek ve ark. kronik yaralanmalarda GSH düzeyinin arttığını bildirmiştir (85). Çalışmamızda GSH düzeylerinin deferoksamin enjeksiyonları, geciktirme ve sonrasında yapılan flep cerrahisine bağlı olarak yara ile en uzun süre yaşayan (21 gün) sıçanların bulunduğu def.+gec. grubunda yüksek görülmesine olası bir açıklama olarak düşünülmüştür. Kontrol grubu 7 gün, def. grubu 14 gün, gec. grubu 14 gün yaşamıştır.

Polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar tarafından üretilen radikallerin akut inflamasyonda ilk doku hasarını oluşturduğu bilinmektedir. Hidroksil radikalleri güçlü toksik ajanlardır ve bunların oluşumu büyük ölçüde serbest demirin varlığına bağlıdır. Geçmişte sıçanlarda deneysel üveit modelinde deferoksamin tedavisi ile koroid inflamasyonunda belirgin azalma olduğu ve retina hasarının baskılandığı gösterilmiştir (86). Bunun yanında deferoksamin, merkezi sinir sistemindeki ve eklemlerdeki inflamasyonun zararlı etkilerini engellemek için başarıyla kullanılmıştır (87,88) Güncel olarak Zhang ve ark. fareler üzerinde yaptıkları lipopolisakkarid enjeksiyonu ile indüklenen ateroskleroz modelinde 100 mg/kg intraperitoneal deferoksamin tedavisinin lipopolisakkarid ile indüklenen akut inflamatuvar tepkileri bastırdığını, kısmen vasküler inflamasyonu ve monosit-makrofaj birikimini baskılayarak aterosklerotik lezyon gelişimini inhibe ettiğini belirtmiştir (89). Kono ve ark. fareler üzerinde yaptığı benzer çalışma modelinde 20 mg/kg intraperitoneal deferoksamin tedavisinin akciğer dokusundaki nötrofil birikimini inhibe ettiğini ve akciğer hasarını önlediğini göstermiştir (90). Vlahakos ve ark. domuzlar üzerinde SIRS(sistemik inflamatuvar yanıt sendromu) modelinde 150 mg/kg deferoksamin tedavisinin reaktif oksijen radikallerini ve lökositözu azalttığını, SIRS gelişimine direnç oluşturduğunu belirtmiştir (91). Çalışmamızda def. ve gec. grubunda inflamasyon skoru, kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış izlenmekle birlikte def.+gec. grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmemiştir. Blake ve ark. (88) sıçanlar üzerinde farklı dozlarda intraperitoneal deferoksamin tedavisi uyguladığı çalışmasında demir ile doygunluğa ulaşmamış desferrioksamin kompleksinin parçası olarak demirin tutulduğunu, bu koşulda demir katalizli hasarı ve lipid peroksidasyonunu inhibe edeceğini ve böylece inflamatuvar yanıtı bastıracağını belirtmiştir.

İnflamatuvar bölgede nispeten yüksek dozlarda desferrioksamin mevcutsa görece demir eksikliği yaratarak bu inhibitör etkinin ortaya çıktığını, buna karşılık, düşük dozlarda desferrioksaminin hızla demirle doymuş hale geleceğini ve etkisini kaybedeceğini belirtmiştir. Def.+gec. grubunda 1 haftalık cerrahi geciktirme sonrası flep kaldırılması uygulandığı için dokuda bulunan deferoksamin miktarının azaldığı ve deferoksaminin antiinflamatuvar etkisini yitirdiği düşünülmüştür.

Li ve ark. (10) sıçan abdominal prefabrike flep modelinde 20 mg/kg deferoksamin kullanarak yaptıkları çalışmada deferoksamin uygulamasının sadece normal veya hafif hipoksik dokuda anjiyogenezi destekleyebileceğini, hücreleri yalnızca hücre canlılığı nispeten yüksek kaldığında homeostazı sürdürmek için gereken sıralı tepkileri üretmeye teşvik edebileceğini belirtmiştir. Tersine hipoksi derecesi ciddi olduğunda dokular ve hücrelerin zaten hasar gördüğünü ve iyileşme kabiliyetine deferoksamin uygulamasının ek fayda getirmediğini belirtmiştir. Cerrahi geciktirmenin kontrollü hipoksi oluşturarak flep yaşayabilirliğini arttırdığı düşünüldüğünde çalışmamızda deferoksamine bağlı sıralı tepkilerin yeni damar oluşumunu def.+gec. grubunda hafif hipoksi sayesinde yeni damar oluşumunu belirgin olarak arttırdığı görülmüştür. Dolayısıyla bu durum çalışmamızın başında kurduğumuz, geciktirme için beklenmesi gereken sürenin kısaltılabileceği yönündeki hipotezi desteklemekte ve deferoksamin tedavisinin cerrahi geciktirme sonrası beklenen sürenin kısaltılmasında kullanılabilirliğini göstermek açısından önemlidir.

Temiz ve ark. (92) sıçan transvers rektus abdominis kas deri (TRAM) flebi modelinde cerrahi geciktirme ile botulinum toksin tip A intramusküler uygulamasının karşılaştırıldığı bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonunda herhangi bir geciktirme işlemi yapılmayan gruptaki fleplerde nekroz oranının anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Ancak geciktirme grupları arasında (Cerrahi geciktirme grubu, Botulinum tip A grubu, Cerrahi geciktirme+Botulinum tip A grubu) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Literatürde bir çok ajanın flep sağkalımını arttırdığı ve flep dokusunda damarlanma artışı sağladığını gösteren çalışma mevcuttur. Çalışmamızda def.+gec. grubunda belirgin damarlanma artışı, nekroze flep alanında azalma ve histopatolojik incelemede düşük nekroz skoru gösterilmiştir. Nekroz skoru kontrol grubu ile deney grupları arasında karşılaştırıldığında sadece def.+gec. grubunda nekroz skoru anlamlı olarak düşük bulunmakla birlikte gec. grubu ve def. grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Gec. grubu ile def. grubu karşılaştırıldığında gec. grubunda nekroz skorunda azalma görülmüştür. Bu değerlendirme çalışmamızda hedeflediğimiz deferoksaminin cerrahi geciktirmenin etkisi

potansiyelize ederek geciktirme sonrası beklenecek sürenin kısaltılabileceğini desteklemektedir.

Cerrahi geciktirme yöntemi, flebin sınırlarının kısmi subkutan elevasyonunu veya eleve edilmeden kısmi kesilmesini ve genellikle gecikmenin maksimum etkisinin olduğu düşünülen 14 gün boyunca yerinde bırakılmasını içerir. Gecikme süresinden sonra flep tamamen kaldırılır ve defekte transpoze edilir (70). Myers ve ark. (43) VEGF ve FGF ekspresyonundaki artışla cerrahi geciktirme işleminin flepte anjiyogenezi ve vazodilatasyonu arttırdığını göstermiştir. Cerrahi geciktirme ile flep içerisindeki damarların uzunlamasına yeniden yönlendiği gösterilmiştir (93). German ve ark. (94) en az birkaç haftadan birkaç aya kadar sürmesi gerektiği savunulan uzun gecikme süresini sorgulamıştır. Köpeklerde tüp fleplerinde enjeksiyon çalışmaları yaparak, flep tabanına yakın kan damarlarında önemli bir artış ve ana damarların uzun eksenini boyunca yeniden yönlendirildiğini göstermişlerdir. Bu değişikliklerin tüp oluşumundan sonraki dördüncü günde belirgin hale geldiğini ve yedinci güne kadar artarak devam ettiğini belirtmişlerdir. German ve ark. çalışmalarında onuncu günden başlayarak tüpün 2-3 aşamada bölünmesini önerir. Restifo ve ark. (95) sıçanlar üzerinde yaptıkları TRAM flep modelinde gecikme prosedürünü çalışmış ve flep sağkalımını 3, 7, 10, 14, 21 ve 30 günlük gecikme sürelerinden sonra değerlendirmiştir. 7 gün veya daha uzun bir gecikme uygulanan gruplarda flep sağkalımında istatistiksel olarak anlamlı iyileşme ile sonuçlandığını, gecikme etkisinin 14. günde maksimum olduğunu gördüğünü ve 14 günlük gecikmenin 7 günlük gecikmeden istatistiksel olarak daha fazla flep sağkalımı ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda cerrahi geciktirme sonrası beklenecek en kısa ancak optimal süreyi belirleme amacıyla cerrahi geciktirmenin etkisinin maksimuma çıktığı 14. gün değil deferoksaminin geciktirme etkisini potansiyelize edeceğini ve geciktirme sonrası beklenecek sürenin kısaltılabileceğini göstermek amacıyla 7 gün beklenmiştir. Def+gec.grubunda nekroz sahası ve nekroz yüzdesindeki azalma ile birlikte normal-nekroze doku geçiş zonundaki anlamlı kapiller dansite artışı çalışmamızın başında kurduğumuz geciktirme için beklenmesi gereken sürenin kısaltılabileceği yönündeki hipotezi desteklemektedir. Cerrahi geciktirme sonrası beklenecek sürenin ne kadar kısaltılabileceğinin değerlendirilmesi için geciktirme süresinin daha da kısa tutularak karşılatırmaların yapılabileceği yeni bir çalışma modeline gereksinim vardır.

Deferoksaminin ticari olarak enjeksiyon formunun piyasada mevcut olduğu ve enjeksiyonun hasta konforunu düşürdüğü bilinmektedir. Ducher ve ark. (96) diyabetik fare sırtında bası yarası modelinde transdermal deferoksamin uygulamasının yeni damar oluşumunu

arttırdığını, yara iyileşmesini olumlu etkilediğini ve bası yarası oluşumunu engellediğini göstermiştir. Kronik demir yüklenmesi olan çocuklarda deferoksaminin 40 mg/kg, erişkinde 60 mg/kg dozunda güvenle kullanıldığı bilinmektedir. Çalışmamızda 20 mg/kg gibi düşük bir dozla elde ettiğimiz belirgin damarlanma artışı ve transdermal formun hastalar tarafından daha iyi tolere edileceği düşünüldüğünde flep cerrahisinde transdermal formun etkinliğinin gösterildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.



SONUÇLAR

Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında 29.12.2020 tarihli ve TÜHADYEK-2020/15 protokol nolu alınan etik kurul yazısı ile çalışmamız gerçekleştirilmiştir. Histopatolojik sonuçlar T.Ü Patoloji Laboratuvarında, biyokimyasal veriler T.Ü. Fizyoloji Laboratuvarında çalışılmıştır. Deney modelimizde;

- 1- Deferoksaminin iskemi ve prefabrike flep modellerinde gösterilen flep yaşayabilirliğini arttırıcı etkisi çalışmamızda konu alınan cerrahi geciktirme modelinde de görülmüştür.
- 2- Deferoksaminin yeni damar oluşumunu arttırıcı etkisi çalışmamızda konu alınan cerrahi geciktirme modelinde de görülmüştür.
- 3- Deferoksaminin serbest radikal oluşumunu azaltmadan da flep yaşayabilirliğine olan olumlu etkisi görülmüştür.
- 4- Deferoksaminin cerrahi geciktirme fenomeni için beklenmesi gereken süreyi kısalttığı görülmüştür.

ÖZET

Rekonstrüksiyon başarısını ve flep yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla bir çok cerrahi teknik ve ilaç denenmiştir. Deferoksaminin yeni damar oluşumunu arttırdığı ve yara iyileşmesine olumlu katkısının olduğu bilinmekle beraber cerrahi geciktirme üzerine etkisi bilinmemektedir. Deferoksaminin cerrahi geciktirme üzerine etkisini araştırdığımız çalışmamıza 40 adet erişkin sıçan çalışmaya dahil edilmiştir. Sıçanlar randomize olarak 4 gruba ayrılmıştır.

Kontrol grubundaki 10 sıçanın sırtında McFarlene flep modeli oluşturulmuş, kaldırıldığı sahaya 2/0 ipek ile devamlı olarak sütüre edilerek iade edilmiştir. Geciktirme grubundaki 10 sıçanın sırtında işaretlenen McFarlene flebinin uzun kenarlarından yapılan insizyonla bipediküllü flep oluşturuldu ve devamlı sütürasyonla geciktirme işlemi tamamlandı. 1 hafta sonra McFarlene flebi kaldırıldı ve 2/0 ipek ile devamlı sütüre edilerek kaldırıldığı sahaya iade edildi. Deferoksamin grubundaki 10 sıçana 1 hafta günlük 20 mg/kg deferoksamin enjeksiyonu sonrası sıçanların sırtlarında McFarlene flep modeli oluşturulmuş, kaldırıldığı sahaya 2/0 ipek ile devamlı olarak sütüre edilerek iade edilmiştir. Deferoksamin+Geciktirme grubundaki 10 sıçana haftalık iyileşme süresi sonrası 1 hafta günlük 20 mg/kg deferoksamin enjeksiyonu sonrası geciktirme işlemi yapılmış, geciktirme işleminden 1 hafta sonra McFarlene flebi kaldırılmış ve 2/0 ipek ile devamlı sütüre edilerek kaldırıldığı sahaya iade edilmiştir. Tüm gruplarda son operasyondan 1 hafta sonra nekroz değerlendirilmesi, fotoğraflama ve doku örnekleri alındıktan sonra servikal dislokasyon işlemi yapılmıştır.

Kontrol, geciktirme, deferoksamin+geciktirme gruplarında 1 er sıçanın deney protokolü tamamlanmadan ölmesi sonucu deney 37 sıçanla tamamlanmıştır. Flep yaşayabilirliğinin

arttırılması açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark izlendi. Yeni damar oluşumu açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark izlendi.

Bu çalışmanın sonucunda deferoksaminin cerrahi geciktirme işleminde yeni damar oluşumu belirgin olarak arttırdığı saptandı.

Anahtar kelimeler: Deferoksamin, cerrahi geciktirme , McFarlane flep , sıçan



DEFEROXAMINE EFFECT ON THE DELAY PHENOMENON

SUMMARY

Many surgical techniques and drugs have been tried to increase the success of reconstruction and flap viability. Although it is known that deferoxamine increases new vessel formation and has a positive contribution to wound healing, its effect on surgical delay is not known. In our study in which we investigated the effect of deferoxamine on surgical delay, 40 adult rats were included in the study. Rats were randomly divided into 4 groups.

McFarlane flap model was created on the backs of 10 rats in the control group, and it was returned to the area where it was lifted by suturing continuously with 2/0 silk. A bipedicated flap was created with an incision made from the long sides of the McFarlane flap marked on the back of 10 rats in the delay group, and the delaying process was completed with continuous suturing. After 1 week, the McFarlane flap was lifted, and it was returned to the area where it was removed by continuous suturing with 2/0 silk. After a 1 week daily injection of 20 mg/kg deferoxamine to 10 rats in the deferoxamine group, a McFarlane flap model was created on the backs of the rats, and it was returned to the area where it was lifted by suturing continuously with 2/0 silk. 10 rats in the deferoxamine + Retard group were delayed after a 1 week daily injection of 20 mg/kg deferoxamine, 1 week after the delay, the McFarlane flap was lifted and returned to the area where it was removed by continuous suturing with 2/0 silk. Cervical dislocation procedure was performed in all groups after evaluation of necrosis, photographing and tissue samples were taken 1 week after the last operation.

Experiment was completed with 37 rats as 1 rat in control, delay, deferoxamine+retard groups died before the experimental protocol was completed. A significant difference was observed when compared in terms of increasing flap viability. A significant difference was observed when compared in terms of new vessel formation. As a result of this study, it was determined that deferoxamine significantly increased the formation of new vessels in the surgical delay procedure. Deferoxamine has been shown to shorten the time to wait for the surgical delay phenomenon.

Key words: Deferoxamine, surgical delay, McFarlane flap, rat



KAYNAKLAR

1. Grabb WWM; Basic techniques of plastic surgery. Grabb WCSmith JWPlastic Surgery. 1979. Little BrownBoston
2. Myers MB, Cherry G. Mechanism of the delay phenomenon. *Plast Reconst Surg* 1969;44:52.
3. Pearl, R. M. A unifying theory of the delay phenomenon: Recovery from the hyperadrenergic state. *Ann. Plast. Surg* 1981;7:102-12.
4. Keberle, H. (1964). The biochemistry of deferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Annals of the New York Academy of Science*. 119,753.
5. Gutteridge JM, Richmond R, Halliwell B. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem J*. 1979;184(2):469-472. doi:10.1042/bj1840469
6. Farberg AS, Jing XL, Monson LA. Deferoxamine reverses radiation induced hypovascularity during bone regeneration and repair in the murine mandible. *Bone* 2012;50(5):1184-7.
7. Park K, Chung KY, Sung SH, Kim BR, Kim YS. Protective effect of desferrioxamine during canine liver transplantation: significance of peritransplant liver biopsy. *Transplant Proc* 2003;35(1):117-9.
8. Thangarajah H, Yao D, Chang EI, Shi Y, Jazayeri L, Vial IN, et al. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(32):13505-10.
9. Duscher D, Januszyk M, Maan ZN. Comparison of the Hydroxylase Inhibitor Dimethyloxalylglycine and the Iron Chelator Deferoxamine in Diabetic and Aged Wound Healing. *Plast Reconstr Surg* 2017;139(3):695-706.

10. Li B, Li H, Jin R, Cheng C, Wang J, Zhu H, Zan T, Li Q, Hao L. Desferrioxamine: a practical method for improving neovascularization of prefabricated flaps. *Ann Plast Surg* 2015;74(2):252-5.
11. Çeliköz B, Aydın A, Kubar A. The effects of ginkgo biloba extract and deferoxamine on flap viability. *Eur J Plast Surg* 1997;20:197–201.
12. Bhishagratna KK. An English translation of the Sushruta Samhita based on original Sanskrit text. Calcutta: Bose; 1916.
13. Tagliacozzi G. De curtorum chirurgia per institione. Venice: Gaspare Bindoni; 1597.
14. Thorne, Charles H, eds. Grabb and Smith's Plastic Surgery. 7th Edition. 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106 USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
15. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *Br J Plast Surg* 1973;26(3):202-213.
16. Orticochea M. The musculo-cutaneous flap method: an immediate and heroic substitute for the method of delay. *Br J Plast Surg* 1972;25:106–10.
17. Pontén B . The fasciocutaneous flap: its use in soft tissue defects of the lower leg . *Br J Plast Surg* 1981;34:215–220.
18. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. *Plastic Reconst Surg* 1981;67(2):177-87.
19. Taylor GI, Palmer J. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *British J Plastic Surg* 1987;40(2):113-41.
20. Koshima I, Soeda S. Inferior epigastric artery skin flap. without rectus abdominis muscle. *Br J Plast Surg* 1989;42:645-8.
21. Nakajima H, Fujino T, Adachi S. A new concept of vascular supply to the skin and classification of skin flaps according to their vascularization. *Ann Plast Surg* 1986; 16:1–19.
22. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and Physiology of Skin Flap Surgery. In: McCarthy J, ed. *Plastic Surgery*. Philadelphia: WB Saunders; 1990:275-32.
23. Brown DL, Borschel GH. Flaps. In: Brown GH, editor. *Michigan Manual of Plastic Surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 22-33.
24. Dhar SC, Taylor, GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plast Reconstr Surg* 1999;104(7):2079–91.
25. Morris SF, Taylor GI. The time sequence of the delay phenomenon: when is a surgical delay effective? An experimental study. *Plast Reconstr Surg* 1995; 95(1):526.
26. Taylor GI, McCarten G, Doyle M. The use of the Doppler probe for planning flaps: anatomical study and clinical applications. *Br J Plast Surg* 1990;43:1.

27. Callegari PR, Taylor GI, Caddy CM. An anatomical review of the delay phenomenon: 1. Experimental studies. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:397.
28. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM. An anatomical review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:408.
29. Taylor GI, Gianoutsos MP, Morris SF. The neurovascular territories of the skin and muscles: anatomic study and clinical implications. *Plast Reconstr Surg* 1994;94:1.
30. Taylor GI, Daniel RK. The anatomy of several free flap donor sites. *Plast Reconstr Surg* 1975;56:243.
31. Manchot C. *The Cutaneous Arteries of the Human Body*. New York: Springer-Verlag, 1983.
32. Salmon M. Arteries of the skin. In: Taylor GI, Tempest M, eds. London: ChurchillLivingstone; 1988.
33. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br Plast Surg*. 1987;40:113.
34. Lucas JB. The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2017;25(3):303-311.
35. Hom D.B., Goding G.S.: Skin flap physiology. Baker S.R. Local flaps in facial reconstruction. 2007. Mosby Elsevier Philadelphia: pp. 15-30.
36. Kerrigan CL, Daniel RK. Critical ischemia time and the failing skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1982; 69(6):986–9.
37. Pang CY, Neligan PC, Forrest CR, et al. Hemodynamics and vascular sensitivity to circulating norepinephrine in normal skin and delayed and acute random skin flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 1986;78(1):75–84.
38. Lucas JB. The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2017;25(3):303-311.
39. Tsur H, Daniller A, Strauch B. Neovascularization of skin flaps: route and timing. *Plast Reconstr Surg* 1980;66(1):85–93.
40. Ghali S, Butler PEM, Tepper OM. Vascular delay revisited. *Plast Reconstr Surg* 2007;119(6): 1735–44.
41. Myers MB, Cherry G. Differences in the delay phenomenon in the rabbit, rat, and pig. *Plast Reconstr Surg* 1971;47(1):73–78.
42. Zimble M S. Gaspare Tagliacozzi (1545-1599): renaissance surgeon. *Arch Facial Plast Surg* 2001;3(4):283–284.
43. Myers MB ve Cherry G. Augmentation of survival in pedicle skin flaps by the chemical production of ischemia. *Surg Forum* 1971;22:485.

44. Carroll SM, Carroll CM, Stremel RW. Vascular delay and administration of basic fibroblast growth factor augment latissimus dorsi muscle flap perfusion and function. *Plast. Reconstr Surg.* 2000;105:964-71.
45. Park, S., Tepper, O. M., Galiano, R. D., et al. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast. Reconstr Surg* 2004;113:284-93.
46. Pribaz JJ, Weiss DD, Mulliken JB, Eriksson E. Prelaminated free flap reconstruction of complex central facial defects. *Plast Reconstr Surg* 1999;104 :357–365, discussion 66–67.
47. Pribaz JJ, Fine NA. Prefabricated and prelaminated flaps for head and neck reconstruction. *Clin Plast Surg* 2001;28(2):261-72.
48. Shen TY Microvascular Transplantation of Prefabricated Free Thigh Flap. *Plast Reconstr Surg* 1982;69(3):568.
49. Morrison WA, Penington AJ, Kumta SK, + Clinical applications and technical limitations of prefabricated flaps. *Plast Reconstr Surg* 1997; 99:378–85.
50. Gurtner, Geoffrey C, *Plastic Surgery* (4nd ed), Volume I. Elsevier Inc, September 2017; pp: 393-394.
51. Radovan C. Adjacent flap development using expandable silastic implant. Annual ASPRS meeting. Boston, 1976.
52. Bayramiçli M. Deneysel Mikrocerrahi. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ. 2005;1(5):85.
53. McFarlane R, DeYoung G, Henry R, McFarlane R. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plastic Reconst surg* 1965;5(2):177-82.
54. Khouri RK, Angel MF, Edström LE. Standardizing the dorsal rat flap. *Surg Forum.* 1986;37:590.
55. Khouri RK, Edström LE, Angel MF. The dorsal rat flap: an appraisal of the model. *Surg Forum.* 37:598, 1986.
56. Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plastic Reconst Surg* 1992;90(2):319-328.
57. Ohara H, Kishi K, Nakajima T. Rat dorsal paired island skin flaps: a precise model for flap survival evaluation. *Keio J Med* 2008; 57(4):211-6.
58. Deferoxamine mesylate (Desferal mesylate). A specific iron-chelating agent for treating acute iron intoxication. *Clin Pharmacol Ther* 1969;10(4):595-6.
59. Keberle, H. The biochemistry of deferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann New York Acad Sci* 1964;119:753.

60. Inhibition of iron catalyzed formation of hydroxyl radicals from superoxide and at lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochemistry Journal*, 184,469. Halliwell, B. (1984). Oxygen toxicity.
61. Hatcher H.C., Singh R.N., Torti F.M., and Torti S.V. Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Future Med Chem* 2009;1:1643.
62. Davies M.J, Donkor R, Dunster C.A, Gee C.A, Jonas S, Willson R.L. Desferrioxamine (Desferal) and superoxide free radicals. Formation of an enzyme-damaging nitroxide. *Biochem J* 1987;246:725.
63. Parvar M, Mehrzad J, Chaichi MJ, Hosseinkhani S., and Golchoubian H. Quenching effect of deferoxamine on free radical-mediated photon production in luminol and ortho-phenanthroline-dependent chemiluminescence. *Chin Chem Lett* 2014;4(25):630-4.
64. Hartley A, Davies M, Rice-Evans C. Desferrioxamine as a lipid chain-breaking antioxidant in sickle erythrocyte membranes. *FEBS Lett* 1990;264(1):145-8.
65. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 2014;20(7):1126-67.
66. Hou Z, Nie C, Si Z, Ma Y. Deferoxamine enhances neovascularization and accelerates wound healing in diabetic rats via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Diabetes Res Clin Pract* 2013;101(1):62-71.
67. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RI. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
68. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
69. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
70. Milton SH. The effects of "delay" on the survival of experimental pedicled skin flaps. *Br J Plast Surg*. 1969 Jul;22(3):244-52.
71. Andrews NC (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341(26):1986–95.
72. Bergeron RJ, Wiegand J, McManis JS, Bussenius J, Smith RE, Weimar WR. Methoxylation of desazadesferrithiocin analogues: enhanced iron clearing efficiency. *J Med Chem*. 2003 Apr 10;46(8):1470-7.
73. Sarkar K, Fox-Talbot K, Steenbergen C, Bosch-Marcé M, Semenza GL. Adenoviral transfer of HIF-1 α enhances vascular responses to critical limb ischemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3;106(44):18769-74.
74. Okauchi M, Hua Y, Keep RF, Morgenstern LB, Xi G. Effects of deferoxamine on intracerebral hemorrhage-induced brain injury in aged rats. *Stroke* 2009;40(5):1858-63.
75. Ragnell A. The secondary contracting tendency of free skin grafts; an experimental investigation on animals. *Br J Plast Surg* 1952;5:6–24.

76. On the anatomy and physiology of the skin. I. The cleavability of the cutis. (Translated from Langer, K. (1861). *Zur Anatomie und Physiologie der Haut. I. Über die Spaltbarkeit der Cutis. Sitzungsbericht der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Classe der Kaiserlichen Academie der Wissenschaften*, 44, 19.). *Br J Plast Surg* 1978;31(1):3-8.
77. V.A. Aneesha, S. Anagha, Madhuri R. Patel, Asif Qayoom, V.K. Naresh, Shah Ayub Almas, Sanjay Kumawat, W. Ramdas Singh, Monalisa Sahu, Abdul Sadam, Madhu C. Lingaraju, T.U. Singh, Dinesh Kumar. Amelioration of wound healing by deferoxamine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J. Vet. Surg.* June 2019;40(1):12-5.
78. Stell PM, Green JR. (1976) Contraction of the delto-pectoral flap. Clinical observations and the design of an experimental model. *Acta Otolaryngol* 81:181–6
79. Rose EH, Ksander GA, Vistnes LM Skin tension lines in the domestic pig. *Plast Reconstr Surg* 1976;57:729–32.
80. Stell PM Contraction of skin flaps. *Clin Otolaryngol* 1982;7:45–49
81. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, Ramasastry SS, Kuhns DB, Basford RE, Futrell JW. Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischaemic flap surgery. *Br J Plast Surg* 1986;39(4):469-72.
82. Hsu C, Han B, Liu M, Yeh C, Casida JE: Phosphine- induced oxidative damage in rats: attenuation by melatonin. *Free Radic Biol Med* 2000;28: 636-642.
83. Chugh SN, Arora V, Sharma A, Chugh K: Free radical scavengers and lipid peroxidation in acute aluminium phosphide poisoning. *Indian J Med Res* 1996;104:190-3.
84. Benlier E. , Çetinkale O. , Şengül R. , Civelek S. , Çınar C. , Yazar Ş. Değişik Antioksidanların Kombine Kullanımı iskemik Hasarı Azaltmada daha Fazla Etkili mi?. *turkplastsurg.* 2002; 10(3): -.
85. Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Turkoz Y, Soylu A, Ilbey YO, Balbay MD. Comparison of antioxidant enzyme activity in the internal spermatic vein and brachial veins of patients with infertile varicocele. *Int Urol Nephrol* 2008;40(3):679-83.
86. Rao NA, Romero JL, Fernandez MAS, Sevanian A, Marak GE. Effect of Iron Chelation on Severity of Ocular Inflammation in an Animal Model. *Arch Ophthalmol* 1986;104(9):1369–71.
87. Bowern N, Ramshaw IA, Clark IA, Doherty PC. Inhibition of autoimmune neuropathological process by treatment with an iron-chelating agent. *J Exp Med* 1984;160(5):1532-43.
88. Blake DR, Hall ND, Bacon PA, Dieppe PA, Halliwell B, Gutteridge JM. Effect of a specific iron chelating agent on animal models of inflammation. *Ann Rheum Dis* 1983;42(1):89-93.
89. Zhang WJ, Wei H, Frei B. The iron chelator, desferrioxamine, reduces inflammation and atherosclerotic lesion development in experimental mice. *Exp Biol Med* 2010;235(5):633-41.

90. Kono M, Matsuihiroya S, Obuchi A, Takahashi T, Imoto S, Kawano S, Saigo K. Deferasirox, an iron-chelating agent, alleviates acute lung inflammation by inhibiting neutrophil activation and extracellular trap formation. *J Int Med Res.* 2020;48(9):300060520951015.
91. Vlahakos D, Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Siasiakou S, Kaklamanis L, Degiannis D, Demonakou M, Smyrniotis V. Deferoxamine attenuates lipid peroxidation, blocks interleukin-6 production, ameliorates sepsis inflammatory response syndrome, and confers renoprotection after acute hepatic ischemia in pigs. *Artif Organs* 2012;36(4):400-8.
92. Temiz G, Yeşiloğlu N, Şirinoğlu H, Akpınar AC, Sarıcı M, Filinte D, Filinte GT, Bozkurt M. Increasing the survival of transverse rectus abdominis musculocutaneous flaps with a Botulinum toxin-A injection: A comparison of surgical and chemical flap delay methods. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016;69(7):944-51.
93. McCraw JH, Dibbell DG, Carraway JH. Clinical definition of independent myocutaneous vascular territories. *Plast Reconstr Surg* 1977;60(3):341-352.
94. German W, Finesilver EM, Davis JS. Establishment of circulation in tubed skin grafts. *Arch Surg* 1933;26:27.
95. Restifo, Richard; Ahmed, Syed; Isenberg, Jeffrey; Thomson, J. Timing, magnitude, and utility of surgical delay in the TRAM Flap: I. Animal Studies, *Plastic & Reconstructive Surgery* 1997;99(4):1211-6.
96. Duscher D, Neofytou E, Wong VW, Maan ZN, Rennert RC, Inayathullah M, Januszyk M, Rodrigues M, Malkovskiy AV, Whitmore AJ, Walmsley GG, Galvez MG, Whittam AJ, Brownlee M, Rajadas J, Gurtner GC. Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(1):94-9.

EKLER



Ek 1



T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2020/12

Karar Tarihi: 29.12.2020

Karar No: 2020.12.01

Hayvan Sayısı ve Cinsi: Sıçan 40 adet

Yürütüldüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr. Öğr. Üyesi Dağhan DAĞDELEN'nin yaptığı, Araş. Gör. Dr.Ufuk ERDEM'in Uzmanlık Tezi olarak planlanan, TÜHADYEK-2020/15 protokol nolu "Deferoksamlın geciktirme fenomenine etkisi" başlıklı çalışma önerisi görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☒ var ☐ yok
Toplantı Katılımı: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Hakan ERBAŞ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☒ var ☐ yok
Toplantı Katılımı: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Suat ERİĞÖZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☒ var ☐ yok
Toplantı Katılımı: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. N. Arkan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Mustafa SÖT
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☒ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Filiz SANAL
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☐ evet ☐ hayır

Dr. Öğr. Üyesi F. Gülfeşan ÇANAKÇI
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☐ evet ☐ hayır

Vet. Hek. Kerem SELVİ
Vet. Hek. Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☐ evet ☐ hayır

Ecz. F. Özgür GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☐ evet ☐ hayır

Ayhan YILMAZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılımı: ☐ evet ☐ hayır

Ek 2

Bulgular ve istatistiksel sonuçlar CD halinde Ek 2’de verilmiştir.

