


T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK

CERRAHİ ANABİLİM DALI

# Botulinum Toksin Tip A' nın Damar Çevresine Ve Deri Altına Uygulanmasının Flep Yaşayabilirliği Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması

UZMANLIK TEZİ

Dr. BAŞAR KAYA

TEZ DANIŞMANI

Yrd.Doç.Dr. SERHAN TUNCER

ANKARA 2011

# ÖNSÖZ

Araştırmamın her bölümünde bilgi, deneyim ve emek desteğini eksik etmeyen, aynı zamanda bana bir abi yakınlığı gösteren ve hissetiren tez danışmanın Sayın Yrd.Doç.Dr.Serhan TUNCER' e;

Tababet sanatının Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Sanatı eğitimimde önemli katkıları olan; destek, sabır ve ilgilerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Osman LATİFOĞLU' na, Sayın Prof. Dr. Cemalettin ÇELEBİ' ye, Sayın Prof. Dr. Kenan ATABAY' a, Sayın Prof. Dr. Seyhan ÇENETOĞLU' na, Sayın Prof. Dr. Reha YAVUZER' e, Sayın Prof. Dr. Sühan AYHAN' a, Sayın Doç. Dr. Selahattin ÖZMEN' e, tezimin hazırlık aşamasında fikirsel katkıları ile yardımcı olan Uzm. Dr. M.Onur ÇUKURLUOĞLU' na, Dr. Ali Mübin ARAL' a, Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi veteriner hekimleri Vet. Hek. Dr. Şeyda DİKER' e, Vet. Hekim Dr. Elif ERGÜVEN KAYA' ya, Vet. Hek. Dr. Elvan ANADOL' a ve tüm çalışanlarına, araştırmamın biyokimyasal incelemelerini yapan G.Ü. Tıbbi Biyokimya A.D. Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN' a ve Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya A.D. Araş. Gör. Sayın Filiz Bircan' a, genetik incelemelerini yapan G.Ü. Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D. Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Sevda MENEVŞE' ye ve Uz. Biyolog Sayın Atiye Seda Yar' a, histolojik ve elektron mikroskobik değerlendirmeleri yapan Histoloji ve Embriyoloji A.D. öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Çiğdem ELMAS' a ve Araş Gör. Sayın Gülce Naz Yazıcı' ya, istatiksel analizleri yapan İstatik Uzman Sayın Salih Ergöçen' e, araştırmanın finansmanında sağladığı destekler için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne ve yardımdan kaçınmayan çalışanlarına;

Araştırma süresince manevi desteğini üzerimden hiç eksik etmeyen canım eşim Elif ERGÜVEN KAYA' ya ve sevgisini yüreğime sığdıramadığım canım kızım Zeynep Ada KAYA' ya ve beni bugünlere getiren canım ailem babam, annem ve kız kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

**Dr.Başar KAYA**

## İÇİNDEKİLER


| | | Sayfa No |
|---|---|---|
| I. | GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| II. | GENEL BİLGİLER | 3 |
| III. | GEREÇ VE YÖNTEM | 44 |
| IV. | BULGULAR | 68 |
| V. | TARTIŞMA VE SONUÇ | 112 |
| VI. | ÖZET | 122 |
| VII. | İNGİLİZCE ÖZET | 124 |
| VIII. | KAYNAKLAR | 126 |

# I GİRİŞ ve AMAÇ

Travma, yanık, tümör rezeksiyonları vb. sonucunda oluşan geniş doku defektlerinin onarımında greft uygulamalarından, flep cerrahilerine uzanan farklı yöntemler mevcuttur. Flep, kendi dolaşımına sahip olan, verici bir alandan alıcı bir başka alana aktarılabilen doku ünitesidir.[1] Flep, alıcı ve verici alanın özelliklerine göre cilt-ciltaltı, kas, fasya, kemik doku veya kompozit doku bütünü içerebilir. Flep cerrahisinin başarısı, flep yaşayabilirliğine bağlıdır.[2,3] Flep dokusunun çeşitli nedenlerden ötürü kısmi veya tam kayıpları, cerrahi başarıyı düşürmekte, pansuman ihtiyacını, hastanede kalış süresini, tedavi masraflarını ve hasta morbiditesini (fizyolojik ve psikolojik) arttırmaktadır.

Pediküllü fleplerin tanımlanmasından sonra araştırmalar gelişigüzel kanlanan paternli fleplerde en/boy oranın arttırmak, aksiyel paternli fleplerde daha büyük dokuların güvenli aktarımı üzerine yoğunlaşmıştır.[4-6] Flep kayıplarını en aza indirebilmek ve flep kanlanmasını arttırmak amacıyla cerrahi geciktirme işlemi uygulanmıştır. 15.yy'da Viano ailesi [6], 16.yy'da Gaspare Tagliacozzi [7] cerrahi geciktirmenin temellerini atmışlardır. Ancak geciktirme fenomeninin etki mekanizmasının tam olarak anlaşılamaması üzerine farklı mekanizmalar üzerinden flep yaşayabilirliğini arttırmaya ve cerrahi geciktirme fenomenini taklit etmeye yönelik birçok araştırma yapılmaktadır.[8]

**Anjiozom Konsepti:** Taylor ve Palmer 1987'de yaptıkları bir kadavra çalışması sonrasında anjiozom tanımını; bireyler arasında fazla değişiklik göstermeyen, isimlendirilmiş bir arter tarafından beslenen kompozit doku ünitesi olarak yapmışlardır.[8] Her anjiozom arteriyozom ve venozom olarak bölgelere ayrılır ve her anjiozom komşu anjiozoma gerçek veya boğulmuş (choke) anastomozlarla bağlıdır. Daha sonra yapılan çalışmalar göstermiştir ki cerrahi geciktirme işlemi ile boğulmuş anastomozlar, gerçek anastomozlar haline gelmiştir.[8]

Bu mekanizma farmakolojik ve mekanik ajanlar kullanarak taklit edilmeye çalışılmış ve vazodilatör ajanlarla kimyasal geciktirme, diyot lazer ile kontrollü hipoksi, anjiojenik büyüme faktörleri, oksijen radikal temizleyicileri, şok dalga terapileri flep yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla kullanılmıştır.[8]

Botulinum Toksin Tip A ( BTx-A ): Presinaptik sinir-kas kavşağında, asetilkolin salınımını bloke ederek hem düz kas hem de çizgili kaslarda geçici paraliziye [9] ayrıca presinaptik terminalden noradrenalin salınımını engelleyerek kimyasal sempatektomiye sebep olur.[10]

Bu çalışmanın amacı damar çevresine ve flebe ayrı ayrı ve aynı anda uygulanan BTx-A'nın meydana getirdiği sempatektomi etkisine sekonder oluşan vazodilatasyonu ve bu dilatasyona bağlı farmakolojik flep geciktirilmesi etkisini sağlayabilirliğini değerlendirmek ayrıca BTx-A'nın flep yaşayabilirliği üzerine olan etkisini araştırmak ve uygulama bölgeleri arasındaki farkların varlığını sorgulamaktır.

# II GENEL BİLGİLER

## A. FLEP TANIMI VE SINIFLANDIRMASI

Flepler, vasküler beslenmesi korunarak, bir bölgeden başka bir bölgeye aktarılabilen doku kısımlarıdır. Vücuttaki tüm defektlerde kullanılabildikleri için onarım cerrahisinde oldukça geniş bir yere sahiptir.

Fleplerin sınıflandırılması kanlanma şekilleri, içerdikleri doku niteliği, aktarım şekilleri ve yerlerine göre yapılabilir.[11,12]

### 1. Kanlanma şekillerine göre

a. Random (gelişigüzel kanlanan) flep

b. Aksiyel flep

### 2. İçerdiği doku niteliğine göre

a. Deri flepleri (kutanöz)

b. Kas flepleri (müsküler)

c. Fasya flepleri

d. Kompozit flepler (kas-deri, fasya-deri, kas-kemik vb.)

### 3. Aktarım şekilleri ve yerlerine göre

### A. Lokal flepler

1. İlerletme flepleri

2. Rotasyon flepleri

3. Transpozisyon flepleri

**B. Uzak flepler**

1. Direkt flepler
2. Tüp flepler
3. Serbest flepler

## B. TARİHÇE

"Flep" kelimesi, köken olarak Flemenkçe olan "flappe" kelimesinden türemiş olup, 'gevşek ve geniş bir şekilde asılmış, sadece bir tarafından tutan'anlamına gelmektedir. Flep cerrahisinin tarihi M.Ö. 1000'lerde Hindistanlı Kanghiara ailesinin pediküllü alın flebini kullanarak yaptığı burun onarımına kadar uzanmaktadır.[1] Daha sonra M.Ö. 600'lerde Susruta Samitanın yanak flebi ile burun onarımı yaptığı bilinmektedir.[1] 1597'de Tagliacozzi yazdığı "De Curtorum Chirurgia" da koldan kaldırılan pediküllü tüp flebi ile burun rekonstrüksiyonunun klasik tanımını yapmıştır.[1] Flep cerrahisinin gelişiminin hız kazandığı dönem fleple onarım ihtiyacının en çok olduğu 1. ve 2. dünya savaşlarının yapıldığı yıllardır. 20. yy'da gelişigüzel kanlanan flepler popüler hale gelmiş, bu tarz fleplerde yaşayabilirliği arttırmak amacıyla geciktirme işlemleri uygulanmıştır.

1889'da Carl Manchot belirli damarlar tarafından beslenen deri bölgeleri kavramını yayınladı[1], daha sonra 1919'da Davis aksiyel, pediküllü kas ve fasya fleplerini ve kompozit flepleri tanımladı.[1] 1950 ve 1960'larda aksiyel flepler üzerine çok sayıda araştırmalar yapıldı.[1] 1963'te Goldwyn köpekte ilk serbest flebi gerçekleştirdi.[1] 1970'lerde Orticochea'nın bir damarın hem kas dokusunu, hem de üzerindeki deriyi beslediğini rapor etmesinden sonra kas ve kas-deri flepleri popülarize oldu.[1] 1981'de Ponten'in septokütan perforatör damarların varlığını bildirmesi üzerine fasyokütan flep kavramı gelişti. [1,13]

1987'de Taylor ve Palmer "anjiozom" kavramını tanımladılar. Anjiozom, tek bir kaynak arter tarafından beslenen kompozit (deri,deri altı, derin doku) doku ünitesidir. Bu doku üniteleri arasında çapları değişkenlik gösteren "boğulmuş" anastomotik damarlar da yine bu araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır.[14,15] Dhar ve Taylor'ın yaptığı deneysel çalışmada geciktirme işlemi sırasında "boğulmuş" damar dilatasyonunun kalıcı ve geri dönüşümsüz bir şekilde gerçekleşip, damar çapında artışla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bunun üzerine geciktirme işlemini taklit edecek farmakolojik ajanlar üzerine araştırmalar yapılmaya başlanmış ve bu çalışmalar sonucunda farmakolojik geciktirme ile flep yaşayabilirliğinin arttırılabildiği ve faydalı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ancak cerrahi geciktirme flep yaşayabilirliğini arttırmada günümüzde halen en kabul edilebilir sonuçları sağlamaktadır.[3]

Son otuz yılda mikrocerrahi alanında, yeterli teknik ve ekipmanların gelişmesi sayesinde serbest doku aktarımlarındaki komplikasyon oranları azalmış ve giderek popülaritesi artmıştır.

## C. FLEP KANLANMASI

Flep cerrahisi milattan önceki zamanlarda başlamış olup, 20.yy'a gelene kadar bu fleplerin neden ve nasıl yaşadığı tam olarak anlaşılamamış ve genellikle deneyime, belirli en-boy oranlarına dayalı gelişigüzel kanlanan flepler kullanılmıştır. Bu konudaki ilk detaylı incelemeler Manchot tarafından 1889'da yapılmış ve ilk defa deriyi besleyen damarsal bölgeler tariflenmiştir. Daha sonra dermal ve subdermal dolaşım tariflenmiştir. Salmon bu konu ile ilgili çalışmasında vücutta 80 adet damarsal kanlanma alanını ve bu bölgeler arası perforan damar bağlantılarını göstermiştir.[1]

Daniel ve Williams deri fleplerinin makrodolaşımının segmental, anastomotik ve aksiyel damarlar olmak üzere üç kaynaktan geldiğini, perforanların ise segmental arterlerden dallanarak kasları beslediğini söylemişler, flepleri kutanöz, arteriyel ve ada flepleri olarak sınıflandırmışlardır.[1] Yine aynı dönemde McGregor ve Morgan flepleri gelişigüzel kanlanan ve aksiyel olarak sınıflamışlardır.[11] Bazı yazarlar ise gelişigüzel kanlanan ve kutanöz flepleri yanlış şekilde anlamsal olarak aynı şekilde kullanmış ve tariflemişlerdir.[11]

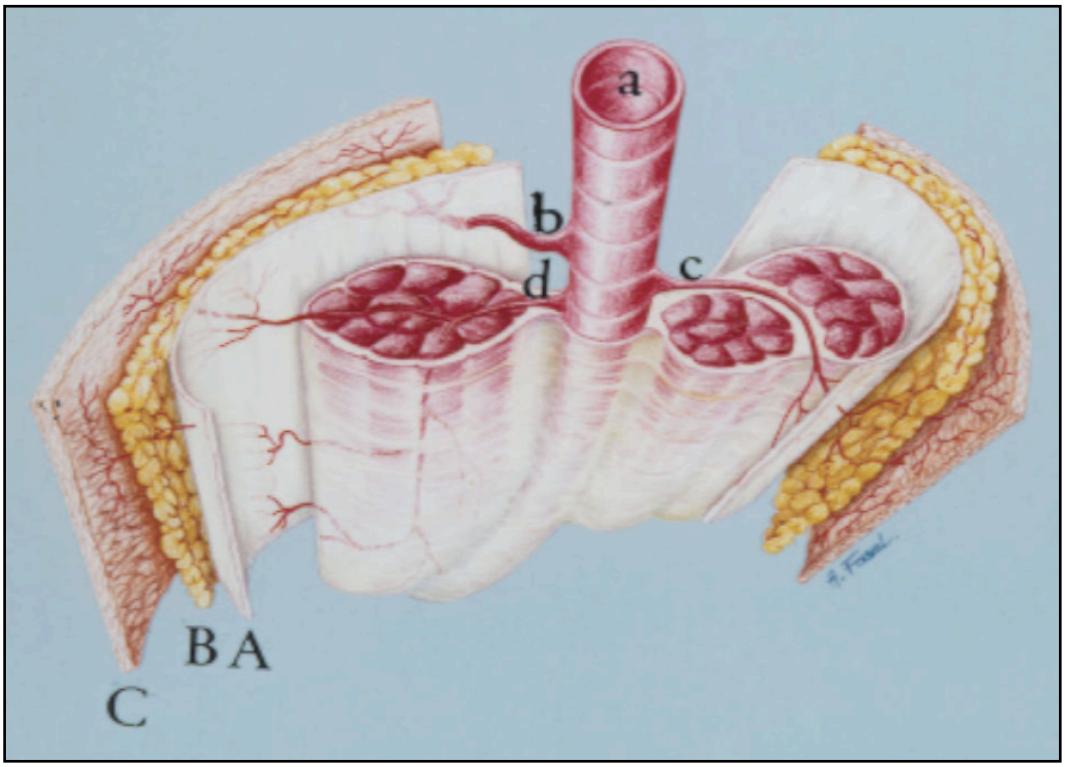
Daniel ve Kerrigan ada fleplerinin, arteriyel flep olduğunu bildirmişler ve bunları direkt kutanöz ve muskulokütanöz şekilde tekrar sınıflamışlardır. 1980'lerde fleplerde kanlanmanın fasyaları kateden damarlar tarafından gerçekleştiği anlaşılınca fasyokutan flep tanımı yapılmış ve deri dolaşımı konusunda yeni terimler (aksiyel, gelişigüzel kanlanan, direkt kutanöz, muskulokutanöz, fasyokutanöz, septokutanöz ve perforatör v.b.) ortaya çıkmıştır. [1,11,13]

Cormack ve Lamberty, anatomik, dinamik ve potansiyel alan olarak adlandırılan üç tip kutanöz damar alanı tanımlamışlardır.[1,13,16] Anatomik alan, tek bir damar tarafından çevre damarlar ile anastomoz yapmadan beslenip yaşayabilen alan, dinamik alan, arteriyoler anastomozlarda intravasküler basınç değişiklikleri sayesinde beslenen bölümü, potansiyel alan ise komşu bir arter alanını da içeren deri adası ile birlikte yaşayabilen flep alanını anlatır ve bu alanın yaşayabilirliğini arttırmak geciktirme işlemi ile mümkün olabilir. Bu çalışmaların ışığında bir flebin perfüzyonunu sağlayan arterlerin hedeflerine üç yoldan ulaşabildiği bildirilmiştir**(Şekil 1).**[13,16-18]

1. **Direkt kutanöz arter:** Subkutan yağ doku içinde kas ve fasyanın üstünde cilde paralel bulunan ve doğrudan cilde uzanan damar

2. **Septukutanöz arter:** Segmental veya muskulokutanöz damarlardan köken alıp intermüsküler fasyadan direkt olarak cilde ulaşan damar.

3. **Muskulokutanöz arter:**Kas dokusu içerisinden geçerekderi ve subkutan doku bloğunu besleyen damar.



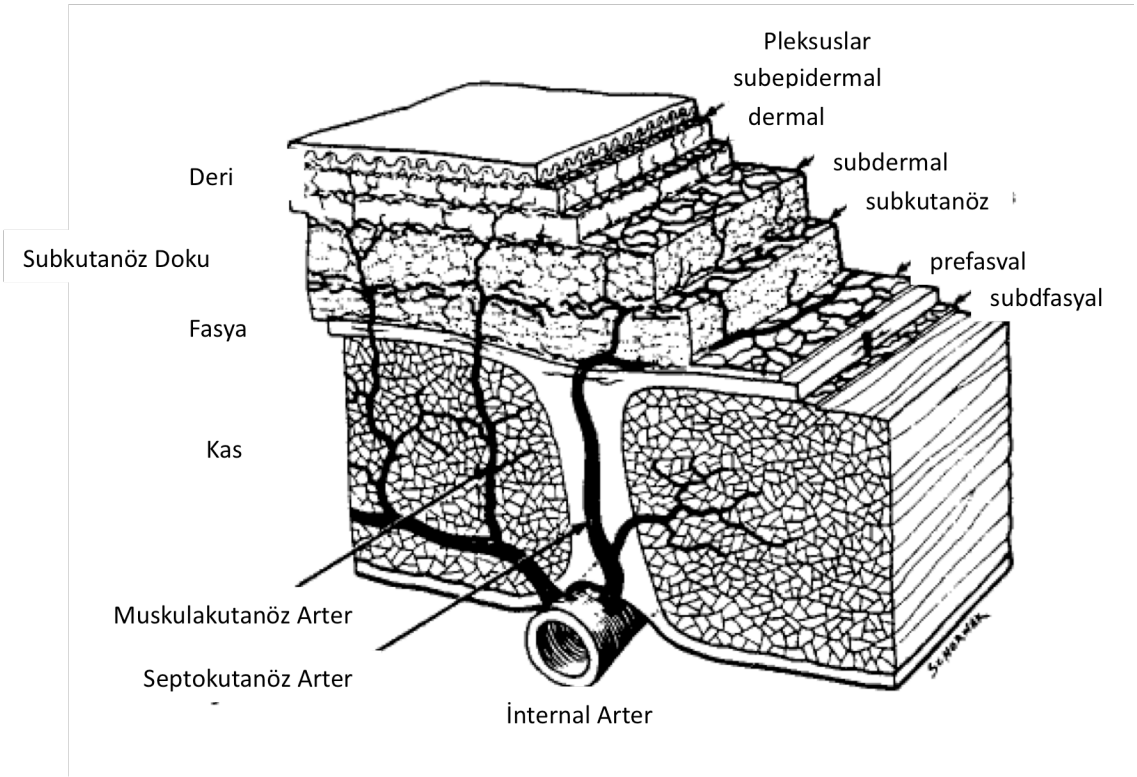

**Şekil 1:**

Subkutan damar ağı. A. Derin fasya B. Süperfisiyal fasya C. Deri;

a. Kaynak arter b. Direk kutanöz arter c. Septokutanöz arter d. Muskulokütanöz arter.

(Gumener R, Montandon D: Distally based forearm fasciosubcutaneous flap: Discussion. Plast Reconstr Surg 114(2): 397-399, 2004)

Bu damarlar fasya, subkutan doku ve deride beş adet pleksus (fasyal, subkutan, subdermal, dermal ve subepidermal) oluşturarak kanlanmayı sağlarlar **(Şekil 2).**



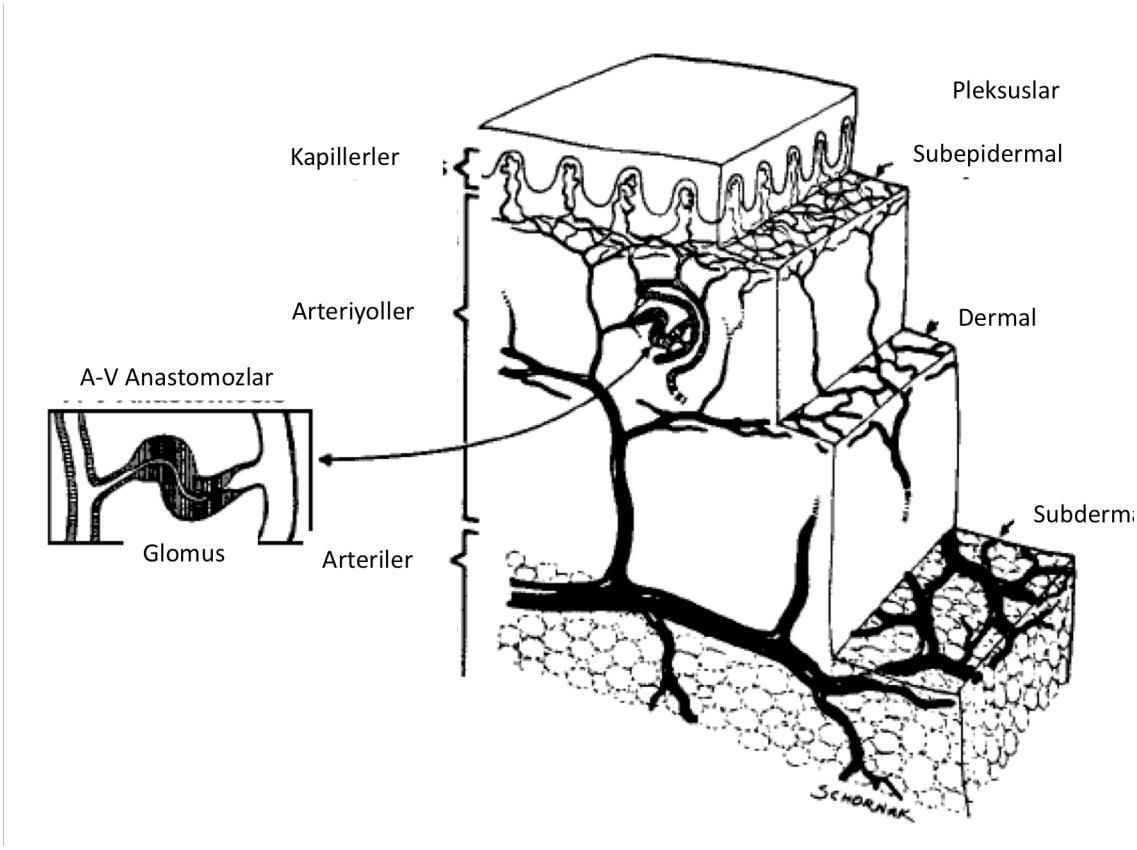

**Şekil 2:**

Deri dolaşımında pleksuslar(Reprinted with permissionfrom Daniel RK, Kerrigan CL: Principles and Physiology of Skin Flap Surgery. In: McCarthy JG (ed), Plastic Surgery. Philadelphia,WB Saunders, 1990. Vol 1, Ch 9.)

Taylor ve Palmer yaptıkları kadavra ve hayvan çalışmaları sonucunda tek bir kaynak arter tarafından kanlanması sağlanan deri, deri altı ve derin dokuları kapsayan kompozit doku blokları bulunduğunu göstermiş ve bunları anjiozom olarak adlandırmışlardır. Bu arteriyel sistemler arasında daha küçük çaplı arter ve arteriyoller aracılığı ile oluşan anastomozlar mevcuttur ve bağlantılara "boğulmuş" damarlar denir. Bir pedikülün kendi

beslediği anjiozoma ilave olarak komşu anjiozomların bir kısmını da "boğulmuş" damarlar vasıtası ile besleyebileceği iddia edilmişse de, McGregor'un çalışmalarında "fluorescein" dağılımı Taylor ve Palmer'ın gösterdikleri alandan daha küçük alanlarda olmuş ve komşu iki bölge arasında "watershed" denilen bölge, anjiozom kenarında tarif edilmiş olan "boğulmuş" arter bölgesiyle uyuşmamıştır.[14,15]

Makrodolaşımın anatomisi flepleri tarif etmek ve tasarımını yapmak için kullanılmıştır. Mikrodolaşım ise hücresel metabolizmanın(oksijenizasyon, besin döngüsü, atık geri alımı) gerçekleştiği yerdir. Mikrodolaşımı arteriyoller, kapillerler, venüller ve arteriyovenöz (A-V) anastomozlar meydana getirir ve perfüzyonun büyük kısmı bu yapılarda gerçekleşir[16]**(Şekil 3).**




**Şekil 3:**

A-V anastomozlar (Reprinted with permission from Daniel RK, Kerrigan CL:Principles and Physiology of Skin Flap Surgery. In:McCarthy JG (ed), Plastic Surgery**.** Philadelphia,WB Saunders, 1990. Vol 1, Ch 9.).

Flep yaşayabilirliğinde ve hemostazda endotel hücreleri asıl görevi üstlenir, örneğin **Nitrik Oksit (NO)** damar duvarını etkileyen birçok maddenin son mediyatörüdür ve endotel hücreleri tarafından üretilir. Deri kan akımının kontrolü **lokal** ve **sistemik** olarak yönetilir.

Sistemik kontrol **nöral** ve **hümoral** yolakları kullanır. Nöral regülasyon, primer olarak vazokonstrüksiyona sebep olan sempatik lifler ve deride en fazla bulunan α-adrenerjik reseptörler yoluyla gerçekleşir. β-adrenerjik reseptörlerin uyarılması vazodilatasyonla, seratonerjik uyarı A-V anastomozlarda vazokonstrüksiyonla sonuçlanır. Böylece arteriyoller ve A-V anastomozlar seviyesinde damar düz kas tonüsü kontrol edilir. Hümoral regülasyon sistemik vazoaktif maddelerin reseptörleri üzerinden etkileşimi tanımlar. Örneğin; epinefrin, norepinefrin, seratonin, tromboksan $A_2$, prostoglandin $F_{2\alpha}$,endotelin vazokonstrüksiyon mediyatörleri iken, prostoglandin $E_1$, prostoglandin $I_2$, histamin, bradikinin, lökotrien $C_4$ ve $D_4$, adenozin difosfat, trombin ve NO vazodilatasyon mediyatörleridir.Lokal kontrol metabolik ve fiziksel olarak ikiye ayrılır. Metabolik faktörler; hipoksi, asidoz ve hiperkarbidir ve vazodilatasyona neden olurlar. Fiziksel faktörler viskozite, hipotermi, hipertermi, miyojenik refleks doku perfüzyon basınç değişiklikleri olarak sıralanabilir.[1,16,19]

## NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit (NO) son yirmi yılda tanımlanan, birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, bir serbest radikaldir.[20] 1980'lerde Furchgott ve Zawadski, organ banyosuna aldıkları izole arter preparatlarında, asetilkolinle oluşturdukları relaksasyonun, endotele bağımlı olduğunu ve bu etkinin "labil bir hormonal faktör" ile sağlandığını göstermişlerdir. Çünkü

asetilkolinle oluşan bu gevşeme, arteriyel endotel uzaklaştırıldığında veya harap edildiğinde görülmemiştir.[20] Bundan dolayı bu faktör EDRF olarak adlandırılmış, ardından EDRF ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır. Başlangıçta EDRF, araşidonik asidin lipooksijenaz kolundaki bir ara ürün olarak değerlendirilmiştir. 1987'ye gelindiğinde ise, Ignarro ve ark[21] ile Palmer ve ark[22] ayrı ayrı yaptıkları çalışmalarda, EDRF'yi damar endotelinden izole etmişler ve bu yapının dominant kısmının NO olduğunu tesbit etmişlerdir.

1988'de Palmer ve ark. EDRF ile ilgili yaptıkları araştırmada, bu molekülün yarı ömrünün çok kısa olduğunu, aktivitesinin saniyeler içinde oluşup, bir başka forma dönüşerek sona erdiğini görmüş ve mevcut yapının NO olduğuna dair veriler iyice pekişmiştir. Yine aynı araştırmalar sırasında, NO'nun L-argininden sentezlendiği saptanmış ve NO sentezi reaksiyonunu gerçekleştiren enzime ise NO sentaz (NOS) adı verilmiştir.[23,24] NO ve diğer bir son ürün olan sitrüllin, argininden NOS enzimi aracılığıyla sentezlenir. Sentez için; nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), kalmodulin, oksijen ve dört kofaktöre (hem, flavin mononükleotid, flavin adenin dinükleotid ve tetrahidrobiyopterin) ihtiyaç duymaktadır. NOS'in genetik olarak farklı üç izo-formu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan bir yapısal endoteliyal izoform (e-NOS), yine düşük miktar üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen bir yapısal nöronal izoform (n-NOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir yapı olan uyarılabilir form (i-NOS)'dur. n-NOS ve e-NOS izoenzimleri NO üretimi için $Ca^{+2}$ kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın i-NOS bundan bağımsızdır.[25,26]NOS sayesinde oluşan NO, oksi formundaki hemoglobulin tarafından NO,stabil son ürünleri olan**$NO^2$(nitrit)**'e daha sonra**$NO^3$(nitrat)**'a oksitler. Doku örneklerinden HPLC (High-

performance liquid chromatography) yöntemi ile ölçülen nitrit ve nitrat miktarları dokuda sentezlenen NO miktarı hakkında bilgi sunar.

**Nitrik Oksit Sentaz İzoenzimleri**

Bunlar temel olarak iki ana gurupta incelenir.

**A) Yapısal (Constitutive) NOS : c-NOS.**

Bu izoformun ayırıcı özelliği aktivitesinin $Ca^{+2}$'a (ikincil haberci olarak) bağımlı olmasıdır. Bu izoform normal biyolojik sistemlerde düşük miktardaki NO sentezinden sorumludur. Sonuç olarak c-NOS ilgili hücrelerde daima mevcuttur fakat $Ca^{+2}$ düzeyi yükselinceye kadar inaktif durumdadır. Yapısal NOS'un n-NOS ve e-NOS olarak adlandırılan iki izoformu mevcuttur.

**I. n-NOS kaynaklı NO:** Esas olarak sinir sisteminde bulunmakla beraber başka dokularda da tespit edilmiştir.

a) Merkezi sinir sistemi;

• Santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar. Bilinen en düşük molekül ağırlıklı organik nörotransmitterdir.[27]

• Sinapsların şekillenmesine yardımcı olur.[28] Koku alma [28], görme [29], ağrıyı algılama [30], ve hafıza oluşması [28] gibi işlevlerde rol oynar.

b) Periferik sinir sistemi;

• Nonadrenerjik, nonkolinerjik sistemde nörotransmitter olarak rol oynar.[28-30] Solunum fonksiyonlarında[31], penil ereksiyonda[32], GİS (gastrointestinal sistem) motilitesinde[33],

mesane sfinkter işlevinde[34], ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır.

**II. e-NOS kaynaklı NO:**

• Düz kasların gevşemesini sağlayarak kan basıncını, kan akış hızını ve dolayısıyla kalp kasılmasını regüle eder.[137,138]

• Trombositlerin, adezyon ve agregasyonlarını inhibe eder.[139-141]

• Endotel hücresi ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkiye sahiptir.[142]

**B) Uyarılabilir (inducible) NOS : i-NOS.**

İlk olarak endotoksin ve sitokinler (IL-1, TNF, IFN) tarafından uyarılan makrofaj ve karaciğer hücrelerinde tanımlanmıştır. i-NOS'un da c-NOS gibi dimerik yapıda ve sitozolik bir protein olduğu, molekül ağırlığının ise 130000 dalton civarında olduğu bildirilmiştir.[25,26] Bu izoform aktivite için $Ca^{+2}$'a bağımlı değildir

Enzim indüklendiği zaman NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmez, saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Özellikle non spesifik immünitede önemli rol oynar.[35,36]i-NOS, makrofajlarda, epitel hücrelerinde ve damar düz kas hücrelerinde bulunur.[37]

NO, lipofilik bir madde olduğu için vasküler endotelden düz kas hücrelerine kolaylıkla difüze olarak, damar düz kasında "Guanilat Siklazı" aktive eder. cGMP düzeyini arttırarak vazodilatasyon sağlar. Ayrıca hücre içi $Ca^{+2}$ düzeyini ve miyozin hafif zincirin defosforilasyonunu azaltarak dilatasyona katkıda bulunur. Endotel yüzeyindeki adezyon (yapışma) moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek endoteli korur.

NO, cGMP aracılığıyla trombositlerin hem aggregasyonunu hem de adezyonunu inhibe ederek trombüs oluşumunu engeller. Trombüs oluşmuş ise, vazodilatasyonla lokal homeostaza katkıda bulunur. Plazminojene etki edip fibrinolizi arttırır. Bu etkilerinde prostasiklin ile sinerjistik etki yapar.

Nonadrenerjik nonkolinerjik (NANK) yolaklarda NO salındığı ve mediyatör olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Penil ereksiyonun NANK'tan salınan NO aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. NO, korpus kavernosum'daki düz kasları gevşetir.

## VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

Vücutta yer alan damar ağı ve anatomik yerleşimi beslediği dokular için hayati önem taşımaktadır. Yeni damar oluşum mekanizması ise bu yapıda oluşan problemler sonucu doku hasarının önlenmesinde kilit bir rol oynamaktadır. Yeni kan damarları iki yolla oluşur.

**Vaskülogenez:** Embriyonik hayatta görülen ve endotel hücrelerinin, mezodermal progenitor hücrelerin olgunlaşması ile meydana getirdiği yeni damar oluşturma yoludur ve embriyonik hayat dışında görülmez.

**Anjiogenez:** Bu yolda yeni damar yapıları, mevcut damar ağından tomurcuklanarak meydana gelirler[38] ve embriyonik hayat dışında görülen yeni damar oluşum yoludur.

Anjiogenez konusunda son iki dekatta yapılan detaylı araştırmalar birçok bilinmeyen soruya yanıt bulunmasını sağlamıştır. Çok sayıda büyüme faktörünün bu yolda etkili olduğu tespit edilmiştir. Büyüme faktörleri arasında yeni damar oluşumuna yüksek seviyede etkisi olduğu tespit edilen faktörün, VEGF olduğu tespit edilmiş. VEGF 45 kDa

ağırlığında, homodimer yapılı, heparin bağlama özelliğine sahip bir glikoprotein yapıdır. VEGF anjiogenezin ve damarların geçirgenlik özelliğinin güçlü bir endojen uyaranıdır.[39]

Damar geçirgenliğini değiştirmesi üzerine olan kuvvetli etkisinden dolayı 'vasküler permeabilite faktörü'olarak da adlandırılan VEGF, arter, ven ve lenfatiklerden köken almış mikro ve makrovasküler endotel hücreleri için doğrudan mitojeniktir.[40] Bunun yanında, yara iyileşmesinde çoğalma evresindeki anjiyogenik etkiden sorumludur.[40] Zhang ve ark. iskemik yaralarda egzojen olarak uygulanan VEGF'in anjiogenezi uyardığı ve gerim gücünü arttırdığını göstermiştir.[40] VEGF'in gösterdiği bu fizyolojik etkilerin yanında patolojik durumlarda da rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle bazı inflamatuar hastalıkların fizyopatolojisinde, kanser kitlesinin büyümesinde, malign karakterli tümörlerin metastazlarında anjiogenezi arttırıcı etkisi ile sorumlu tutulmaktadır.[41-43]

İskemi, VEGF sentezinin en güçlü uyaranıdır.[44] VEGF salınımının en önemli belirleyicisi hem in-vivo hem de in-vitro ortamda oksijen ($PO_2$) basıncıdır. Düşük $PO_2$ ile karşılaşıldığında VEGF-mRNA seviyesinde hızlı ve geri dönüşümlü bir artış ortaya çıkar. Normal doku şartlarında VEGF'ün yarı ömrü 30-45 dk iken, iskemik doku şartlarında bu süre 6-8 saate kadar uzayabilmektedir. İskemi haricinde TGF-β, IL-1α, $PGE_2$, ve IL-6 gibi birçok sitokin, onkogen ve büyüme faktörü de VEGF-mRNA replikasyonunda artışa sebep olmaktadır.[45]

VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E olmak üzere 5 alt grup proteine sahiptir. Bunların arasından VEGF-A grubu, anjiogenik etkisi tüm dokular üzerinde etkili ve en güçlü olan gruptur. VEGF-A grubu proteinin aminoasit dizilişine göre 121, 165, 189 ve 206 izoformlarına ayrılır. 165 izoformu tüm hücre ve dokularda bulunan en yaygın izoformdur. VEGF'lerin seçici bağlanma yeteneği olan üç grup reseptörü vardır. Bunlar VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3'tür.[41] Bu reseptörler en yoğun olarak endotel

hücrelerinde bulunur. VEGF endotel hücrelerinde bulunan bu reseptörler üzerinden etki gösterir. Alıcı-reseptör bağlantısı gerçekleştikten sonra doğrudan mitoz buna bağlı olarak da hücresel çoğalma uyarılır. Kollojenazlar ve proteazlar ile varolan mikrovasküler yapının bazal zarı yıkılır, daha sonra salgılanan kemotaktik faktörler endotel hücrelerinin göç etmesine kılavuzluk yapar. Endotel hücreleri kordon şeklinde yapılar oluşturmak üzere bir araya gelir, tüp ve bazal zarın oluşması ile yeni damar ağı oluşur.[38,46]

VEGF'in doğrudan mitotik aktivitelerinin yanında kısmi olarak uyardığı nitrik oksit sentezi ile vazodilatasyon etkisine, diğer taraftan hücre göçünü ve apopitozisi inhibe edici etkiye sahiptir.[47] Topikal olarak uygulanan VEGF'in venül ve kapiller endotelinde pencereler açılmasını sağlayarak damar geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir.[45]

Endojen salınan VEGF'in etkilerinin daha net anlaşılması sonucu, bu faktörün anjiogenik özelliklerinden faydalanmak üzere dışarıdan uygulanması hipotezi ortaya atılmıştır. Bu hipotezle başlayan çalışmaların çoğu koroner arter tıkanıklıklarında miyokard perfüzyonunu arttırmak için kollateral damar oluşumunu arttırmak veya iskemik alt ekstremitelerde dolaşımın yeniden düzeltilmesini sağlamak amacıyla yapılmıştır.[38,48] Son yıllarda ise dışardan VEGF uygulaması deneysel rekonstrüktif cerrahinin önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Ekzojen uygulanan VEGF'in bölgesel anjiogenezi uyararak aksiyel paternli deri fleplerinin gelişigüzel kanlanan uzantılarının sağkalımını arttırdığı tespit edilmiştir.[42]

Padubidri ve Browne arter içine tek doz VEGF-A $_{165}$ uygulamasının aksiyel paternli flebin, gelişigüzel kanlanan uzantısında doku kaybı alanını azalttığını, sağ kalan flep alanının % 20 oranında arttığını bildirmişlerdir.[49]

Dışardan uygulanan VEGF'in flep prefabrikasyonunda matürasyonu hızlandırdığı ve tüp fleplerin damarlanmasını arttırdığı da gösterilmiştir.[50]

Dışardan uygulanan VEGF'in anjiogenezi uyarmasının yanında, TNF-α, IL-1 gibi nötrofil ve adezyon moleküllerini aktive eden, kemotaksisi uyaran bu inflamasyon başlatıcı maddelerin azalmasını sağlar. Bu özellikleri de göz önünde tutularak VEGF'in, iskemi-reperfüzyon(İ/R) hasarını azaltmak amacıyla sıçan grasilis kasında akut iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiş ve kullanılmıştır.[42] Shen ve ark. VEGF'in, serbest radikal oluşumunu engelleyen ve güçlü vazodilatasyon sağlayan nitrik oksit (NO) üretimini uyardığını gösterilmişlerdir.[51]

Plastik cerrahide kullanılan ekzojen VEGF, uygulama yolu ve dozuna bağlı olarak farklı oranlarda flep sağkalımını arttırmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda en güçlü etkinin intravenöz yolla, tekrarlı şekilde ve yüksek dozda uygulama ile sağlandığı bilinmektedir.[52] Günümüzde bu uygulamanın etkilerinin kısa süreli ve geçici olması öne sürülerek daha kalıcı ve uzun süreli bir etki elde edilebilmesi amacıyla plazmid veya viral vektörler aracılığı ile VEGF-A $_{165\ ve}$ VEGF-B $_{165}$ kodları ile gerçekleştirilen gen tedavileri denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır.[53]

## D. FLEP FİZYOLOJİSİ

Flep verici yataktan kaldırılmaya başlandığında, dokuyu besleyen dolaşımın dengesi bozulur. Flep kaldırıldığı anda sempatik innervasyonun etkinliği ortadan kalkınca kesilen sempatik sinir uçlarından vazokonstrüktif nörotransmitterler salınır. Buna ek olarak flebi besleyen damar bağlantılarının kesilmesi perfüzyon basıncını düşürür ve flebin periferik bölgelerinde iskemi meydana gelir. İskemik kalan bölgenin yaşayabilirliği ilk 24 saat sürecinde mikrodolaşım düzeyinde olan kapiller kan akımı değişikliklerine bağlıdır. Flebin

distal bölümündeki göreceli iskemik bölgede gerçekleşen metabolik deşiklikler (oksijen, glikoz ve ATP düzeylerinde azalma, karbondioksit ve laktik asit düzeylerinde artış) meydana gelir. Anaerobik metabolizmanın devreye girmesi ile serbest oksijen radikallerinin üretimi artar ve doku hasarlanmasının devam etmesine neden olan ilave mekanizmalar ortaya çıkar.

Palmer ve Kerrigan işaretli mikroküreler yardımı ile flep distalinde ortalama 6-12 saat içinde akımın normalin % 20'sinin altına düştüğünü göstermişlerdir.[54,55] Bu flep distalinin yaşayabilirliğini koruyabilmemiz için yeterli dolaşımın 6-12 saat içerisinde sağlanması gerektiğini gösterir. Reinisch'e göre flep kaldırılırken oluşan sempatik denervasyon, bu denervasyon sonucu A-V anastomozlarda dilatasyon gelişir ve distal kapiller yatağa ulaşabilen akım azalır ve nekroz ortaya çıkar.[56] Kerrigan ve Pang antitez olarak distalde nekroza sebep olan mekanizmanın küçük arteriyollerde ortaya çıkan vazokonstrüksiyon olduğunu ileri sürmüşlerdir.[57] Cutting ise postoperatif ikinci günden sonra fleplerde kan akımının arttığını bunun sebebinin ise yeni damar kollaterallerinin oluşması veya mevcut olanların dilatasyonu ile açıklanabileceğini söylemiştir.[58] Kerrigan, bir flebin nekroza gitmesinde en önemli etkenin arteriyel yetmezlik olduğunu göstermiş ve distalinde nekroz olan akut ve geciktirilmiş deney modelinde "boğulmuş" damarlarda kan akımında anlamlı bir değişiklik olmadığını bulmuştur.[54,55]

Taylor 1990'lı yıllarda yaptığı kapsamlı çalışmalar neticesinde flep kaldırıldığında meydana gelen değişiklikleri tespit etmiştir;

1. Flebin içerdiği arterlerin tümünde çap artışı olur.

2. "Boğulmuş" damarlarda diğer arterlerden fazla olarak yaklaşık 2-4 kat çap artışı olur.

3. İlk 48-72 saatte "boğulmuş" damarların çapında artışla, bu damarların kas doku hücrelerinde sayı ve boyutları artar.

4. Oluşan dilatasyon 7. günden sonra geri dönüşümsüz hale gelir.

## E. GECİKTİRME FENOMENİ

Flep yaşayabilirliğinin arttırılması ve nekrozların önüne geçebilecek ideal yöntem arayışı temel hedefi oluşturmuştur ve bu arayış devam etmektedir. Geciktirme fenomeni üzerine ilk çalışmalar 15.yy'da Viano ailesi tarafından pediküllü ön kol flebi ile burun rekonstrüksiyonunda kullanılmıştır.[6] Daha sonra 16.yy'da Gaspare Tagliacozzi biseps kasının üstündeki deri ve cilt altı dokuya paralel kesiler yaparak kol fleplerinde geciktirme işlemi uygulamıştır.[63] 1921'de Blair "geciktirilmiş flep" tanımını literatüre yerleştirmiştir.[13,16,19] Buna ek olarak geciktirme işleminin biyokimyasal ve patofizyolojik özelliklerini ortaya koymaya yönelik araştırmalar yürütmüş ve teoriler ileri sürmüştür.[59]

**Erken Teoriler:** Braithwaite 1950'de geciktirilmiş fleplerde damar sayısının artmadığını, subdermal pleksustaki damarların genişleyip reaktif hiperemi ile dolaşımı arttırarak flep yaşayabilirliğini arttırdığını belirtmiştir. Stark ve DeHaan iontoforez yöntemini kullanarak histaminin damarlanmayı arttırdığını, fakat flep sağkalımına etkisi olmadığını deneysel olarak göstermiştir.[13,19,60] Velander 1964'te, geciktirmenin non-spesifik bir inflamatuar reaksiyonun sonucu olduğunu söylemesine rağmen 1969'da Myers ve Cherry bu tezi çürütmüş ve bipediküllü fleplerde merkezdeki damarları koruduklarında daha az geciktirme etkisi olduğunu göstermiş[60] ve hipoksinin asıl etkiyi yaratan faktör olduğunu belirtmişlerdir. Daha sonra McFarlane geciktirme işleminin aslında dokuları iskemiye alıştırdığını, fakat bunun ikincil önemde olduğunu savunmuştur.[16,61] Boyd ve ark

geçici hipoksinin vazodilatasyon için önemli bir uyaran olması nedeniyle arteriyollerin açılmasını ve kan akımının artmasını sağladığını söylemişler ve böylece 1990 yılında erken teorileri destekleyen sonuçlar yayınlamışlardır.[13]

**SempatektomiVazodilatasyonHipotezi:** Hynes tüp fleplerde yaptığı ter testine dayandırdığı çalışmasında geciktirme mekanizmasında sempatektominin etkili olduğunu ve buna bağlı oluşan damarlanmanın etkisini vurgulamıştır.[1,62]. Hynes'in bu iddiasından yaklaşık 20 yıl sonra 1970'li yıllarda sempatik sinir sisteminin damar tonusu üzerindeki etkisi dikkat çektiği için geciktirme işlemini sağlayanın denervasyon sonrası oluşan vazodilatasyon olduğu iddiası popülarize olmuştur.[1,58] Finseth ve Cutting bilateral pediküllü sıçan epigastrik flebinin bir pedikülünü önceden bağlayarak geciktirme yapabilmiş, etki mekanizması olarak da denervasyon ve/veya hipoksiye bağlı kalıcı vazodilatasyon gelişmesini göstermişlerdir.[58]Yine aynı araştırmacılar flep kaldırıldığı anda sempatik sinir uçlarından salınan vazokonstrüktif transmitterler salınarak flep beslenmesinin azaldığını daha sonra bu nörotransmitterlerin ortamda azalması ile vazodilatasyonun ortaya çıktığını öngörmüşlerdir.[58] Sıçan nörovasküler ada flebinde arter, ven ve siniri ayrı ayrı keserek yaptıkları geciktirme çalışmasında en iyi flep yaşayabilirliğinin her üç yapının da kesilmesi ile maksimuma ulaştığını, en az faydanın ise sadece ven bağlandığında ortaya çıktığını göstermişlerdir.[63]

Jurell 1996 yılında yayınlamış olduğu çalışmasında geciktirme yapılmış ve yapılmamış fleplerde sempatik denervasyonun etkisini araştırmak için norepinefrin, ATP ve c-AMP düzeylerini incelemiş,[64] geciktirme uygulanan fleplerde nörotransmitterlerin kendiliğinden boşaldığını, özellikle norepinefrin düzeylerinin azaldığını ve buna bağlı olarak vazokonstrüksiyonun azaldığını saptamıştır.[64] Antiadrenerjik ilaçlarla yaptığı çalışmalarla da bu sonucunu desteklemiştir.[65,66]

Vazodilatatif ajanlar (isoxuprine, guanethidine, hydralazin, phenoxybenzamine, vb) ameliyat öncesi ve sonrasında tedavi edilen fleplerde yaşayabilirliğin artması, sempatektomiye bağlı vazodilatasyon hipotezini desteklemiştir. Fakat geciktirme fenomeninin sempatektomiden minimum 48 saat sonra başlaması, bu fenomenin tek başına sempatektomi ile açıklanamayacağını ek başka mekanizmaların da varlığını düşündürmüştür.[67-72]

**Flep İçinde AV Şant Hipotezi:** Reinisch 1974'te geciktirilmiş arteriyel fleplerde işaretli kan hücreleri ve mikroküreler kullanarak yaptığı çalışmada kan akımını gözlemlemiş, sempatik denervasyonun "A-V Şant" ları, prekapiller sfinkterlerden daha çok dilate ettiği, bu nedenle flep içindeki kanın besleyici yatağa ulaşmadan "A-V Şant" lardan geçerek dolaşımı tamamladığı hipotezini ileri sürmüştür. Geciktirme işlemi sırasında flep kan akımının, flep tam kaldırıldığındaki kadar azalmadığını, "A-V Şant" lardaki vazodilatasyonun da iki haftada belirgin bir tonusa ulaştığını ve bu işlem sonrası flep tam olarak kaldırıldığında distalde "şant" mekaniğinin olmadığını göstermiştir.[3 56]

Reinisch'in bu teorisinin aksine diğer bazı araştırmacıların yaptığı çalışmalarda adrenerjik sinirlerin kesilmesinin ardından sinir uçlarından, depolanmış olan katekolaminlerin salındığını ve bunların aktivasyonunu engelleyecek "re-uptake" mekanizması da ortadan kalktığı için hiperadrenerjik bir ortam oluştuğunu göstermişler ve bunun prekapiller sfinkterleri etkileyerek besleyici yataktaki akımı azalttığını göstermişlerdir.[16,133,134]

Kerrigan da radyoaktif mikroküreler kullanarak, fleplerde proksimalden distale gidildiğinde kan akımında azalma olduğunu göstermiştir.[54]Aynı zamanda distalde A-V anastomozların olmadığını gözlemleyip distaldeki nekrozun "A-V Şant" lara bağlı olmadığını, nekrozun yetersiz kan akımına bağlı olduğunu göstermiştir.[54] Dorion domuz

TRAM flep modelinde mikroküre tekniğini kullanarak "denervasyon süpersensitivitesi" ve "A-V Şant" akımının geciktirmeyi açıklayacak yeterli mekanizma olamayacağını göstermişlerdir.[73]Akut olarak kaldırılan flepte oluşan hiperadrenerjik duruma bağlı vazokonstrüksiyonun engellenmesi amacıyla bazı araştırmacılar rezerpin, 6-OH dopamin, propanolol, guanetidine ve fentolamini peroperatifolarak kullanmışlar ve flep yaşayabilirliğinin arttığını iddia etmişlerdir. Benzer maddeleri kullanarak aynı mekanizmanın uygulanabilirliğini araştıran bazı çalışmalarda aynı başarılı sonuçlar elde edilememiştir.[16,55,74,75]

**Neovaskülarizasyon Hipotezi:** German, Seitchik ve Kahn geciktirme işlemi sonrasında tüp pedikülün uzun ekseni boyunca, küçük damarların uzunlamasına yeniden yerleştiğini boyut artışı olduğunu, buna ek olarak subdermal pleksustaki arter sayısında artış tespit etmişlerdir.[1] McFarlane ve ark.aynı uzunlamasına yerleşmeyi gözlemlemesine rağmen damar çap ve sayılarında artış saptamamışlardır.[1] Muhtemel mekanizmanın hipoksiye alıştırma, flebin iskemik ortamda yaşamaya hazır hale gelmesi olarak yorumlamışlardır.

Johnson, kan damarlarının flebin uzun aksına paralel olacak şekilde yeniden düzenlendiğini, kan akımındaki artışın ise önce vazodilatasyona, sonra neovaskülarizasyona bağlı olduğunu söylemiştir.[76] Young, yaptığı bir araştırmada normal deri ile kıyaslandığında, fleplerin distal kısmında besleyici kan akımında azalma saptaması, flebin proksimalindeki A-V anastomozların dilatasyonuna bağlı olduğu görüşünü desteklemiş ve sonuçta hipoksinin neovaskülarizasyonun en kuvvetli uyarıcısı olduğunu savunmuştur.[77]

Pang ve ark geciktirilmiş fleplerde ilk 6 saatte besleyici kan akımının normalde aynı bölgeye olan toplam kan akımının % 10'unda daha düşük olduğunu, daha sonra kapiller kan akımında 2. günün sonuna kadar hızlı bir artış olduğunu gözlemlemiş, fakat bu artışın

sadece neovaskülarizasyon ile açıklanamayacağını, muhtemelen nörohümoral maddelerin arteriyollerde oluşturduğu vazodilatasyon sonucunda gerçekleştiğini düşünmüşlerdir.[3]

Bu sonuçlarla geciktirmenin erken safhasında vazokonstrüksiyona sebep olan nörohümoral maddelerin azalmasının, ilerleyen safhalarında ise lokal olarak salınan vazodilatatör maddelerin artmasının rol oynadığını düşünmüşlerdir.[3,78,79]

Cerrahi geciktirme yerine anjiojenik ajanları kullanarak flep yaşayabilirliğini arttırmaya çalışan araştırıcılar umut verici sonuçlar almışlar ve geciktirme fenomeninin farmakolojik olarak da sağlanabileceğine yönelik umutları arttırmışlardır.[80-84]

**Birleştirici Teori:** Geciktirme fenomeninde yukarıda bahsedilen mekanizmaların birden fazlasının rol oynadığını savunan çalışmalar mevcuttur.[1,16,58,67,74,75,79,85] Cutting ve ark geciktirilmiş arteriyel fleplerde sempatektomi, doku iskemisi ve inflamasyon sonucunda prekapiller arteriyollerde damar düz kasında gevşeme olduğunu, denerve olan A-V anastomozların yavaş kapanması sonucunda periferik damar direncinin arttığı ve flep distalindeki kan akımında azalma olduğunu fakat geciktirme işleminin ikinci gününden itibaren deri damar yapısının düzenlendiğini savunmuşlardır. Geciktirme mekanizmasında sempatektomi, yeni kollateral damar oluşumu ve mevcut damarların vazodilatasyonunun birlikte iç içe geçmiş rollere sahip olduğunu düşünmüşlerdir.[75]

Hoopes'in özetlediği geciktirme fenomeninin mekanizmaları (sempatektomi, damarların flebin uzunlamasına eksenine paralel olarak yeniden düzenlenmesi, reaktif hiperemi, hipoksik koşullara alışma, nonspesifik inflamasyon) "boğulmuş" damarların tariflenmesinden sonra yeniden gözden geçirilmiş ve geciktirme fenomeninin mekanizmaları son olarak beş başlıkta toplanmıştır.

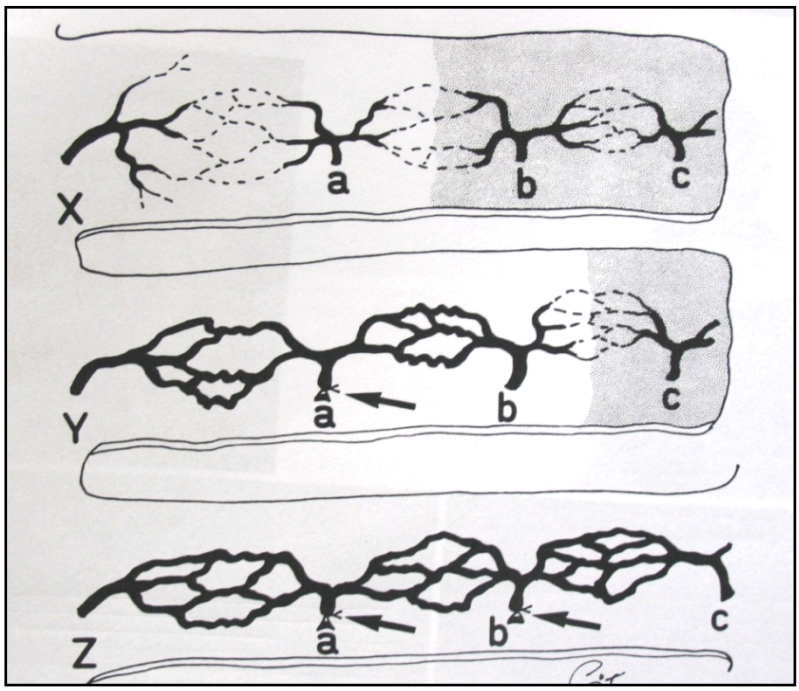
1. Sempatektomi sonrası damarlanmada artış,

2. Damarların flebin uzun aksına paralel yeniden yerleşimi,

3. Damarların büyüme ve genişlemesi,

4. Hipoksiye metabolik uyum,

**5.** Anjiozomlar arasındaki "boğulmuş" damarlarda dilatasyon **(Şekil 4).**




**Şekil 4:**

Cerrahi geciktirme yapılmış ve yapılmamış fleplerdenekroz çizgisi ve **"**choke" damarlardaki değişiklikler (Oklar geciktirme için bağlanmış olan damarları, a,b,c ise bir anjiozomu besleyen kaynak damarlarını göstermekte) (Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG: An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical Applications. Plast Reconstr Surg 89(3): 408-418, 1992)

Günümüzde halen en etkin geciktirme fenomeni, cerrahi olarak sağlanmaktadır, ancak yukarıda anlatılan mekanizmaların bir ve/veya birkaçını farmakolojik olarak sağlayıp flep yaşayabilirliğini arttıracak şekilde kullanabilmek, ikinci cerrahi gerekliliği, risklerini ve

maliyetini azaltmak günümüzde plastik cerrahların hedeflerinden birini oluşturmaktadır.[60,80, 86-89]

## F. BOTULİNUM TOKSİN TİP-A (BTx-A)

Dr. Justinus Kerner botulinum toksin zehirlenmesini 1817 yılında klinik olarak ilk tanımlayan kişidir. Daha sonra Prof vanErmengen botulinum toksininin kaslarda paralizi yaparak ölüme sebep olduğunu bildirmiştir ve bu toksinin kaynağı olan anaerobik sporlu basili Bacillus botulinus olarak adlandırmış, ilerleyen zaman içinde isim değişerek Clostridium botulinum haline gelmiştir. Botulizm için ilk antiserum 1897'de W. Kemper tarafından geliştirilmiştir. Botulinum toksinin ikinci serotipi (tip B) 1910'da Leuchs tarafından bulunmuştur. 1949'da Burgen botulinum toksinin etki mekanizmasını tanımlamıştır. 1973'de Scott tarafından hayvanlarda test edilen nörotoksin 1978'de yapılan pilot çalışmaların ardından, 1989'da strabismus, hemifasyal spazm ve blefarospazm tedavisi için ABD'de FDA (Food and Drug Administration) onayıyla kullanılmaya başlanmıştır. Botulinum toksin tip A'nın kozmetik kullanımı ise ilk olarak Jean Carruthers ve Alastair Carruthers tarafından rapor edilmiştir.[90]

Clostridium ailesinin iki ana öğesi, temel yapı ve fonksiyonel özellikleri benzerlik gösteren Clostridium Tetani ve Clostridium botulinum'dur. Cl. Tetani merkezi sinir sistemi üzerine, Cl. Botulinum ise periferik sinir sistemi üzerine etkilidir. Botulinum toksin (BTx), sporlu, gram (+), anaerob Cl botulinum'un ekzotoksinidir. BTx'in A, B, C1, D, E, F ve G olmak üzere yedi farklı serotipi bulunur.[90]

Botulinum sporları kaynadıktan sonra bile yaşamını sürdürebilmekle beraber, serbest toksin 80°C (176°F) 'nin üzerinde, 10 dakikadan fazla tutulduğunda veya 7'nin üzerindeki pH değerlerinde kolayca ortadan kaldırılabilir.[91]

Botulizmin 5 farklı klinik formu vardır.

1. İnfantil (intestinal) botulizm: Basil sporlarının yutulması sonucunda bu sporların kalın barsaklarda açılması ile olur.

2. Besin (klasik) botulizmi: Basille kontamine yiyeceklerin tüketilmesi ile olur.

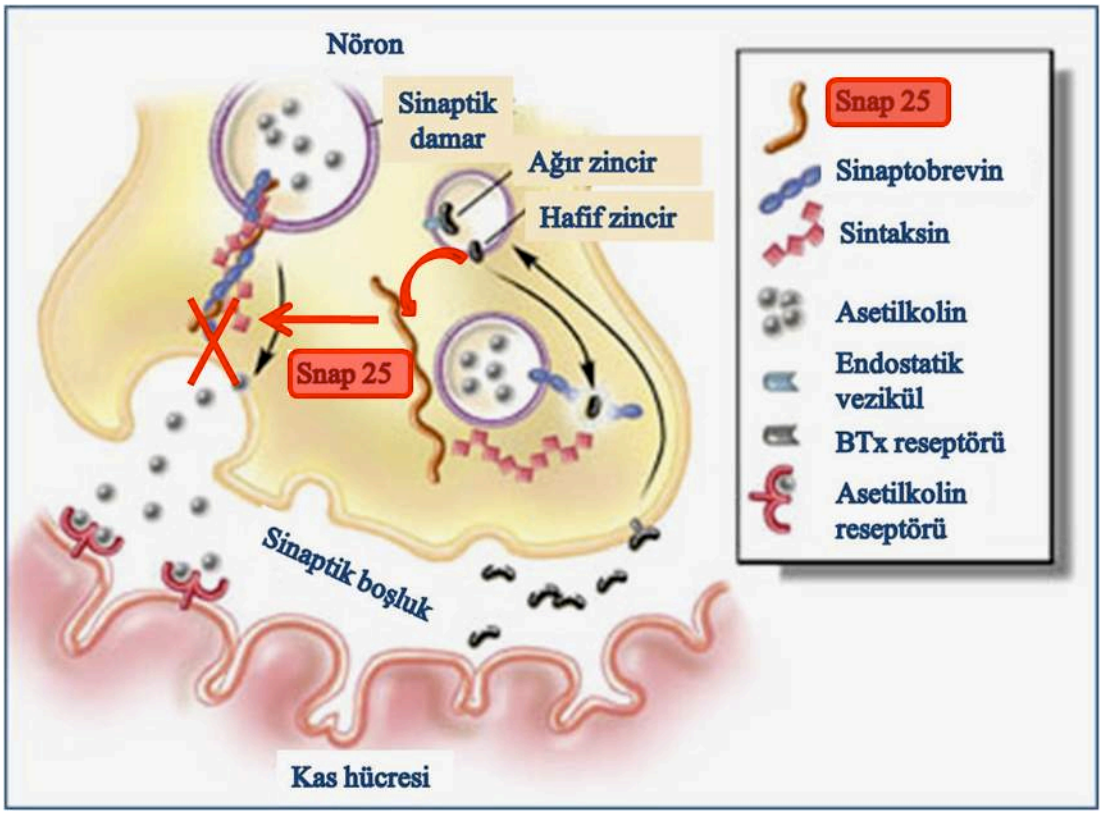
3. Yara botulizmi: Basille enfekte yarada meydana gelir.

4. İnhalasyonel botulizm: Biyolojik silah olarak kullanım sonrası literatürde 3 olguda bildirilmiştir.[91]

5. İyatrojenik botulizm: Tedavi amaçlı BTx uygulaması sonrasında bölgesel veya sistemik botulizm bulguları görülmesidir. Literatürde iki olguda bildirilmiştir.[92]

## BTx'İN YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMASI

Botulinum nörotoksinleri 150 kd inaktif polipeptidler şeklinde bulunup, tripsin benzeri bakteriyel proteaz tarafından aktif forma dönüştürülür. 100 kd ağır zincir ve 50 kd hafif zincir, ısıya duyarlı disülfit bağlarıyla birarada tutulurlar. Isı ile ağır ve hafif zincirler ayrışır ve nörotoksin inaktive olur. Bütün serotipler, periferik sinir sisteminde, nöromüsküler bileşkenin presinaptik terminallerinden, asetilkolin serbestleştirilmesini inhibe ederek, gevşek bir paraliziye sebep olurlar[93] **(Şekil 5).**



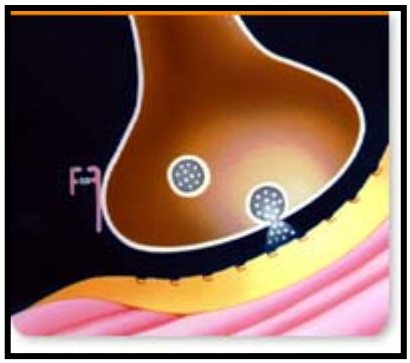

**Şekil 5:**

Botulinum toksin periferik sinir sisteminde reseptörlere bağlandıktan sonra hücre içine alınarak aktive olur. Daha sonra presinaptik kavşakta asetilkolin salınımını geri dönüşümsüz olarak engeller.

(http://www.derm.net/images/my_mode_of_action.jpg)

Botulinum Toksininin yol açtığı paralizi üç adımda gerçekleşir.

• **Bağlanma:** Presinaptik kolinerjik reseptörlere geri dönüşsüz olarak bağlanır**(Şekil 6).**

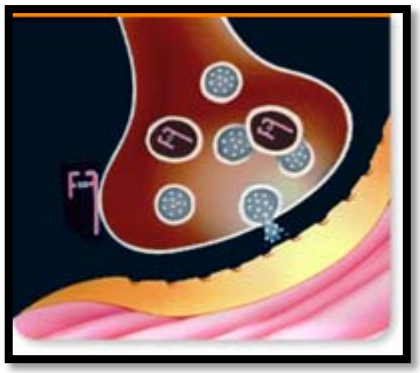


**Şekil 6:**

BTx-A presinaptik nörona bağlanmış durumda

(http://www.derm.net/images/my_mode_of_action.jpg)

• **Hücre içine giriş:** Nörotoksin reseptör bağlımlı endositozla hücre içine girdikten sonra ağır ve hafif zinciri bağlayan disülfit bağları bilinmeyen bir mekanizma ile kırılır. Daha sonra ağır zincirin N- terminali hafif zincirin hücre zarından geçişine yardımcı olur **(Şekil 7).**



**Şekil 7:**

BTx-A presinaptik nörona endositoz ile girmiş durumda

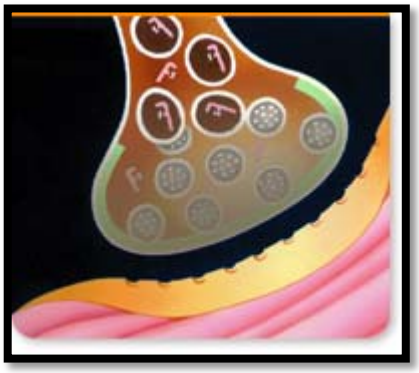
(http://www.derm.net/images/my_mode_of_action.jpg)

• **Nörotransmitter salınımının inhibisyonu:**

Asetilkolin taşıyan veziküllerin hücre zarı ile birleşerek, içerdiği asetilkolini nöromüsküler kavşağa bırakması için, hücre içinde aktif SNARE kompleksinin bulunması gereklidir. SNARE kompleksi 3 temel yapıdan oluşmaktadır. **"Synaptobrevin"** (VAMP=Vesicle-associated membrane protein), **"SNAP-25"** (25 kd synaptosome-

associated protein) ve **"Sintaksin"** dir. Aktif SNARE kompleksinin varlığında, asetilkolin taşıyan veziküllerin hücre membranı ile birleşerek, içerdiği asetilkolini nöromüsküler kavşağa veya ekrin bezlerin otonomik boşluklarına bırakması gereklidir.

BTx'in hafif zinciri, çinko bağımlı endopeptidaz aktivitesi ile proteolitik etkinlik kazanarak, asetilkolin veziküllerinin ekzositozundan sorumlu zar proteinlerini parçalar ve asetilkolin salınımını engeller **(Şekil 8).**



**Şekil 8:**

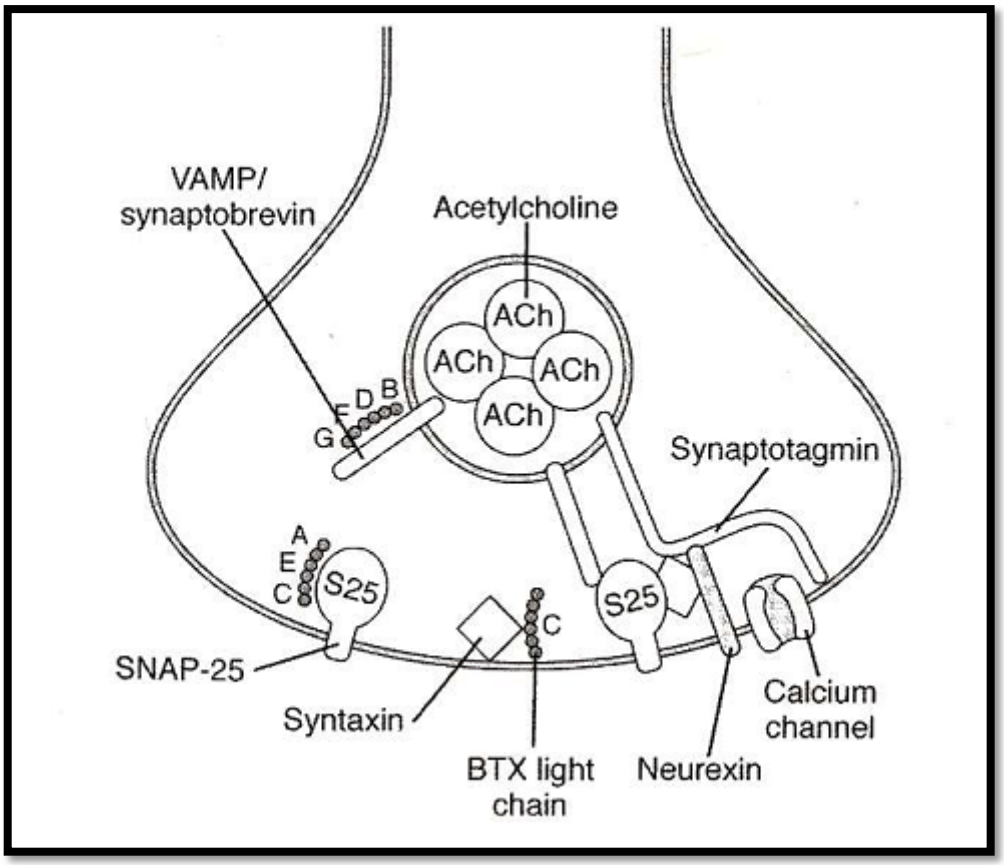
BTx-A presinaptik nöronda asetilkolin salınımını bloke etmiş durumda(http://www.derm.net/images/my_mode_of_action.jpg)

Her bir serotip farklı bir proteini ayırır; **(Şekil 9)**

**Serotip A, C,ve E**: SNAP-25'i

**Serotip B, D, F ve G**: Synaptobrevin (VAMP)'i

**Serotip C**: SNAP 25'i ayırmanın yanında primer olarak sintaksin üzerinden etkili olur.




**Şekil 9:**

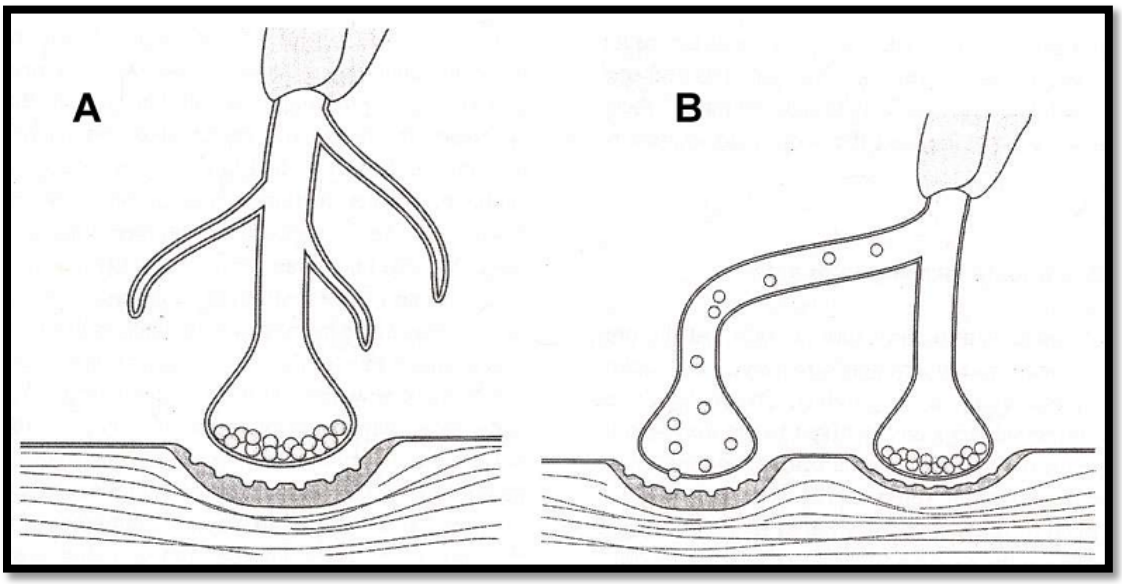
] Botulinum toksin serotipleri, asetilkolin salınımını SNARE reseptör kompleksinin farklı elemanlarını bloke ederek engeller. (Facial Plastic Surgery Clinics of North America 11, 2003).

]

Tx sinir-kas kavşağında, birbirini takip eden iki aşamada geri dönüşümlü denervasyon atrofisine yol açar. Bu süreç 2 basamakta incelenebilir.

**1. Basamak:** Başlangıçta, nonkollateral aksonal filizlenme meydana gelir. Bu sinir terminalleri, motor son plak bölgesinin ekspansiyonuna yol açar ve yeni bir nöromüsküler bileşkenin inşa edilmesini sağlarlar. Bu yeni kollateral aksonlar, 28 günde iyileşir ve bütün nöral iletim yeni filizlenen aksonlar aracılığıyla olur**(Şekil 10A).**

**2. Basamak:** Orijinal ana terminaller nöral geçişi yeniden kazanır ve yeni oluşan aksonal filizlenmelerin sinaptik fonksiyonlarının kaybı ve eliminasyonları gözlenir. İkinci aşama yaklaşık 91 gün sonra tamamlanır ki BTx aktivitesinin klinik kaybı ile ilişkilidir [92,94]**(Şekil 10B).**




**Şekil 10:**

BTx aktivitesinin sonlanma aşamaları

**A.**Aksonal filizlenme

**B.**Sinir terminallerinin yeni fonksiyonel nöromüsküler bileşkeyi oluşturması ve sonrasında yeni terminalin gerileyip, ana terminalin tekrar işlev görmeye başlaması (Facial Plastic Surgery Clinics of North America 11, 2003).

## BTx'İN İMMÜNOLOJİK ÖZELLİKLERİ

BTx'e karşı gelişen antikorlar belirgin olarak 150 kd toksine, nontoksin proteine veya her iki segmente olmak üzere, nörotoksin molekülünün herhangi bir bölgesine bağlanabilirler. Nontoksin bölümüne karşı oluşan antikorlar, klinik olarak nörotoksin aktivitesini bozmadıklarından ***"non-nötralizan antikorlar"*** olarak tanımlanırlar.

Nörotoksine karşı oluşan ve onun etkinliğini bloke eden antikorlar ise ***"nötralizan antikorlar"*** olarak isimlendirilir. BTx'in herhangi bir serotipini nötralize edebilen antikorlar, diğer tiplere karşı etkisizdir ve böyle bir immün yanıt oluşması halinde başka bir serotipe geçilmesi uygun olacaktır.[94]

Servikal distoni sebebiyle fazla sayıda BTx-A enjeksiyonu yapılan hastaların %3-5'inde tedaviye yanıtsızlık gelişmiştir. Nötralizan antikorların gelişiminde en önemli risk faktörleri; enjeksiyonun sık aralıklarla veya yüksek dozlarda uygulanmasıdır. BTx-A'nın etkili en düşük dozunun kullanımı, enjeksiyonlar arası zamanın en az 8 hafta ya da ideal olarak 12 haftadan fazla olması, kısa sürede bolus enjeksiyonlardan kaçınılması ile immün direnç gelişimi engellenebilir.[94] BTx-A preparatlarında stabilizan ajan olarak kullanılan insan albumini, antikor oluşumunda suçlanan etkenlerden en önemlisidir. Düşük protein içeriğinden dolayı Botox® kullanımında antijenik yanıt insidansı, Dysport® kullanımından daha düşüktür.[95]

**DOZ ÖNERİLERİ VE SAKLAMA KOŞULLARI**

Serotipler arasında BTx-A en sık kullanılan serotip olup, Avrupa'da Dysport® (Ipsen; Maidenhead, UK), Neuroblock® (Elan Pharmaceuticals) ve Botox® (Allergan; Irvine, Calif.) ticari isimleri ile bulunmaktadır. Sonradan FDA onayı alan BTx-B ise Myobloc® ticari adıyla satışa sunulmuştur.

Bir ünite yada mouse unit (MU), periton içerisine enjeksiyon sonrası, 18-22 gr dişi Swiss-Webster farelerinin % 50'sini öldürebilecek doz olarak belirlenmiştir.1 Botox® ünitesi, yaklaşık 4 Dysport® ünitesine ve 60-75 Myobloc® ünitesine eşdeğerdir [94]

70 kg ağırlığındaki bir kişi için $LD_{50}$ (median lethal dose) 2500-3000 ünite BTx olup, spastisite tedavisi amacıyla kullanınlan en yüksek doz ise 400 ünitedir.[96,97] Yüzde mimik

kırışıklıklar için kullanılan en yüksek Botox® dozu, her bir seans için 60 ünitedir.[98] Botulinum toksinin tedavi edici doz aralığı oldukça geniştir ve sistemik toksisite olasılığı çok düşüktür.[94] Ancak kaza ile zehirlenme yada yüksek doza maruz kalınması durumunda, 24 saat içinde antitoksin verilmesi gerekmektedir.[99] Yüz bölgesinde BTx-A uygulamalarında, hayatı tehdit eden allerjik ya da ürtikeryal reaksiyonlar bildirilmemiştir. Yapılan insan ve hayvan çalışmalarında, uzun dönemde, immunojenik, karsinojenik ve diğer potansiyel zararlı yan etkiler tespit edilmemiştir.[99]

En sık kullanılan BTx preperatlarından Botox® -5 °C, Dysport® + 2-8 °C'de saklanmaktadır. Sulandırıldıktan sonra her ikisi de + 2-8 °C'de aseptik şartlarda korunmalıdır. Sulandırılan Dysport® preparatlarının 8 saat içinde tüketilmesi önerilir. +4°C'de saklanan sulandırılmış Botox® preparatlarının aktivitesi 1.günün sonunda %90-100, 3. gün % 70-80, 7. gün % 40-50, 14. günde minimal olarak bulunmuştur.[98] Sulandırılmış Botox® flakonlarının tekrar dondurulmasının, toksin aktivitesini korumada bir avantajının olmadığı görülmüş ve +4°C'de 24 saatten az saklanmasının en uygun olduğu kabul edilmiştir. 2007 yılında Elmas ve ark. yaptığı çalışmada, iki hafta süre ile +4$^{o}$C'de saklanan Botox®'un etkileri, yeni sulandırılmış Botox®'un etkileri ile elektron mikroskobik olarak kıyaslanmış ve beklemiş Botox®'un, yeni sulandırılmış Botox® ile aynı etkileri oluşturabildiği,ancak etki süresinin kısaldığı gösterilmiştir.[100]

## SIÇANLARDA UYGULANABİLECEK BTx-A DOZLARI VE ETKİ SÜRESİ

Aoki 2002 yılında farelerde yaptığı çalışmada BTx-A'nın maksimum kas paralizisi oluşturan dozu 29 ünite/kg etki süresini 36 gün olarak, hayvanların % 50'sini öldüren dozun 81,4 ünite/kg olduğunu bildirmiştir.[101]

Clemens ve ark. 2009 yılında yaptığı bir çalışmada sıçanlarda femoral bölgede perivasküler etki için 10 ünite BTx-A'nın uygulanabileceğini bildirmişlerdir.[102]

Kim ve ark. 2008 yılında gelişigüzel kanlanan patern flep yaşayabilirliğini arttırmayı hedefledikleri çalışmada flep içine uygulanacak doz aralığının 0,5-2,5 ünite (en optimal uygun 1,5 ünite) arasında olduğunu bildirmişlerdir.[103]

Kemirgenlerde BTx-A enjeksiyonu sonrası, etkinin 24. saat içinde başladığı ve 4-6 hafta etkinin devam ettiği belirtilmiştir.[104]

## TEDAVİ ENDİKASYONLARI VE YENİ UYGULAMALAR

BTx-A; blefarospazm, spazmodik tortikollis, ekstremite distonisi, disfoni, hemifasyal spazm, serebral palsi, spastik dipleji, esansiyel baş tremoru, distonik tikler, gerilim tipi baş ağrısı, tenisçi dirseği, palatal myoklonus, kekeleme, pelvi-rektal spazmlar ve nistagmus gibi nörolojik ve oftalmik endikasyonlarla kullanılmakla beraber, yüzdeki mimik kırışıklıkların giderilmesi amacıyla kozmetik alanında da 1990'dan beri kullanılmaktadır.[105]

Son zamanlarda, hiperhidrozis, hipersiyalore, Frey's sendromu, fasyal asimetriler, platismal bantların tedavisinde de kullanılmaktadır.[106-108]

Subpektoral implant yerleştirilmesini takiben pektoral kas spazmını önlemek için BTx-A uygulanmış ve hastaların ameliyat sonrası dönemi ağrısız geçirmesi, elde edilen kozmetik sonucun daha iyi olması, geri dönüşümlü bir denervasyona sebep olmasından dolayı bu yöntemin, nörektomiye tercih edilebileceği ifade edilmiştir.[109,110] Ayrıca BTx-A pektoral adaledeki kasılmaların protez üzerine yaptığı çekintilerin önlenmesi amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.[111]

Yüzdeki skarların genişlemesinin önlenmesi amacıyla yara dudaklarına BTx-A enjeksiyonunun yara iyileşmesinde [112,113] ve hipertrofik skar oluşumunun önlenmesinde faydalı olduğu bildirilmiştir.[114]

BTx-A fleksör tendon onarımı yapılmış hastaların kas origolarına uygulanmış ve tendon rüptürü oranlarının azaldığı bildirilmiştir.[115]

BTx-A vazospastik hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.[116-118] Neumastier ve ark. Raynaud Fenomeni tanısı ile takip edilen 19 hastanın avuç içlerinde damar-sinir pediküllerin geçeceği alanlara etki edecek şekilde BTx-A uygulanmışlar ve sonucunda tek doz uygulamayla hastaların 15'inde ağrılarının azaldığı ve parmak dolaşımının arttığını bildirmişler.[116]

O'Reilly ve ark. 2005 yılında aksiller hidradenit tedavisinde BTx-A kullanımı sonrasında bölgesel lezyonların kaybolduğunu ve 10 aylık süreçte rekürrens görmediklerini bildirmişler.[119]

Çelik ve ark. 2006 yılında sıçan pektoral kas flebinde yaptıkları çalışmada cerrahi denervasyon ve BTx-A ile yapılan kimyasal denervasyonun kas stabilizasyonu üzerine olan etkilerini araştırmışlar. Sonuçta iki yöntemin de kas stabilizasyonu sağladığını,

denervasyon yapılan grupta daha fazla olmak üzere kaslarda atrofi görüldüğünü belirtmişler.[120]

Arnold ve ark. 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında BTx-A uygulamsının sıçan deri fleplerinde, sağkalımı arttırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca perivasküler uygulanan 5 ünite BTx-A sonrası 1., 14. ve 28. günlerde damar çaplarını ölçmüşler ve tüm ölçümlerde arter ve ven çaplarının anlamlı şekilde arttığını tespit etmişler. Bu artışın 14. günde maksimum seviyede olduğunu bildirmişlerdir.[121,122]

Clemens ve ark. 2009 yılında BTx-A'nın sıçan femoral damar çapları ve yapılan anastomozların başarısına etkilerini incelemişler. Bu amaçla cerrahiden 5 gün önce perivasküler 10 ünite BTx-A uygulamışlar. Cerrahi sırasında yaptıkları ölçümlerde BTx-A yapılan grupta damarların, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde büyük olduğunu görmüşler. Damarlar kesilip anastomoz yapıldığında BTx-A yapılan tarafta anastomozların daha hızlı ve kolay yapıldığı ayrıca cerrahi sonrası trombozların daha az görüldüğü bildirilmiştir.[123]

BTx-A ile gelişigüzel kanlanan fleplerin sağ kalımının arttırılması ile ilgili iki yayın bulunmaktadır. Yıldırım ve ark. sıçanların sırtında hazırlanan gelişigüzel kanlanan fleplere 8 noktadan toplam 2,5 ünite BTx-A uygulamışlar ve flep sağkalımını arttırdıklarını bildirmişlerdir.[124] Kim ve ark. ise 2009 yılında yayınlanan makalelerinde sıçanların sırtında hazırlanan gelişigüzel kanlanan flebe 1,5 ünite BTx-A yaptıklarını ve flep sağkalımını arttırdıklarını bildirmiştir.[103]

## İLAÇ ETKİLEŞİMLERİ

Sinir-kas kavşağında nörotransmitter geçişini engelleyen ilaçlar BTx-A ile etkileşebilirler. Aminoglikozidler (Gentamisin), siklosporin, D-penisilamin, kas

gevşeticiler (kürar tipi non-depolarizan blokörler, süksinilkolin), aminokinolonlar, kinidin, magnezyum sülfat, linkozamid BTx-A'nın etkisini değiştirebilen ilaçlardır. Bunların çoğu nöromüsküler geçiş üzerine intrinsik inhibitör etkiye sahip olduklarından, BTx-A'nın etkinliğini arttırırlar. Aminoglikozidler yüksek dozda sinir-kas kavşağında asetilkolinin salınımını önleyebilirler ve botulizm benzeri klinik bir duruma neden olabilirler. Siklosporin, nöromüsküler blokaja ikincil kas güçsüzlüğünü uyarabilir, literatürde bir olguda solunum yetmezliği görülmüştür.[90] D-penisilamin kullanımına bağlı romatoid artritli hastaların bir kısmında, asetilkoline karşı antikor oluştuğu tespit edilmiştir. Bu hasta grubunda myasteniya gravisli olgulardakine benzer kas güçsüzlüğü tespit edilmiştir. Bu etkilerin tersine klorokin ve hidroklorokin gibi aminokinolonlar, hücre içinde BTx-A ile etkileşime girerek, aktivitesini inhibe edebilir.[125]

## BÖLGESEL YAN ETKİLER

Enjeksiyon sahasında ağrı, ödem, ekimoz sıklıkla uygulama tekniği ile ilgili olup yan etki olarak değerlendirilemezler. BTx-A enjeksiyonlarından sonra, baş ağrıları, kuru ağız, grip benzeri (flu-like) tablo görülebilir. Hastanın uygulama öncesi bu konularda bilgilendirilmesi önemlidir. Aspirin, antikoagülan, NSAİİ, E vitamini, ginseng, ginkgo ve yüksek doz sarımsak gibi bitkisel ilaçlar peteşiyal kanamaların oranını arttırmaktadır. Peteşilerin oluşumu, 30 gauge iğne kullanımı, iğnenin sık aralıklarla yenilenmesi, öncesinde ve sonrasında soğuk uygulanması ve enjeksiyonun intradermal yapılması ile azaltılabilir. Uygulama öncesi topikal anesteziklerin uygulanmasıenjeksiyonun daha az ağrılıolması sağlar. Enjeksiyon sırasında meydana gelen damar yaralanmaları, kompresyon ile durdurulmalıdır.

Uygulama bölgesinde görülebilen geciçi hiperestezi, enjeksiyon travması ve/veya BTx-A'nın lokalize antinosiseptif etkisi ile açıklanabilir. Enjeksiyon sonrası enfeksiyon hemen

hiç olmamakla beraber literatürde BTx-A enjeksiyonu sonrası bir olguda vücudunda psöriyazis benzeri döküntüler meydana gelen ve beş ay sonra kendiliğinden düzelen bir olgu bildirilmiştir.

Enjeksiyon sonrası ter bezi aktivitesinin de bloke olmasına bağlı deride kuruma ve pullanma da BTx-A tedavisi sonrası gelişebilir. Nemlendiricilerin kullanımı ile bu belirtiler tedavi edilebilir. Sıklıkla gerilim tipi baş ağrılarında ve migren tedavisinde kullanılmakla birlikte, enjeksiyon sonrası nadiren geçici baş ağrısına görülebilir. Bu baş ağrısının nedeni enjeksiyon sırasında iğnenin periosta ulaşması, kas enjeksiyonuna bağlı lokalize hematom, enjeksiyon stresi olarak açıklanmaktadır. Sıklıkla birkaç saat sürer ancak nadiren 2 güne uzayabilir.[125]

## SİSTEMİK YAN ETKİLERİ

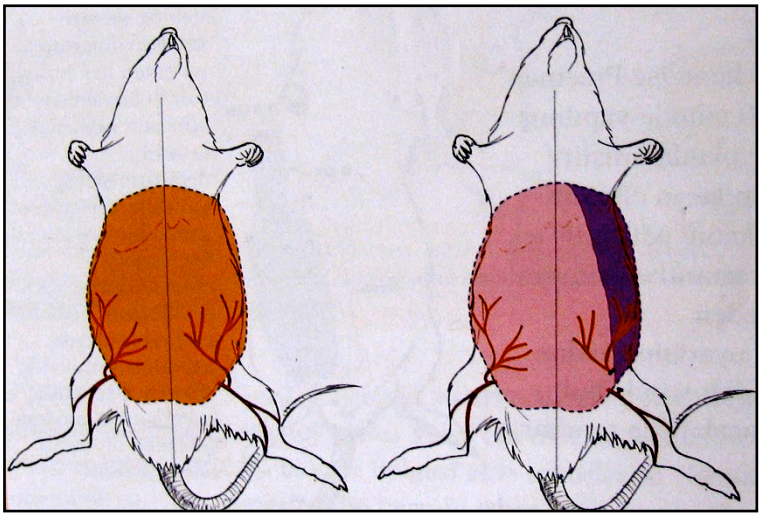
BTx-A'nın etkisinin en yoğun olduğu yer enjeksiyon alanıdır. Bunun yanında bu nörotoksinin küçük miktarları çevre dokulara veya sistemik dolaşıma geçebilir. Bu bölgesel ya da sistemik etkiler sıklıkla, tekrarlayan yüksek doz BTx-A uygulamaları sonucu ortaya çıkmasına karşın, blefarospazm tedavisi için düşük doz BTx-A uygulanan hastalarda da gözlenmiştir.[126] Enjeksiyon sahasından uzaktaki adale dokusundaki etkiler, tek-lif EMG çalışmaları ile gösterilebilir.[127] BTx-A'ya karşı antikor gelişmesi durumunda etki azalır ki bu immün cevap ilk birkaç yıl içinde görülür. Uygulamadan sonraki dört yıl içinde immün yanıt gelişmemesi halinde daha sonradan böyle bir cevap oluşma olasılığı çok düşüktür. Herhangi bir şekilde BTx-A'ya karşı direnç görülürse BTx-B ile tedaviye devam edilebilir.[127]

## G. SIÇAN KARIN FLEBİNİN ANATOMİSİ

Süperfisiyal epigastrik damarlar sıçanda karın derisinin kanlanmasını sağlayan ana damarlardır. Süperfisiyal epigastrik damarlar iki taraflı korunduğu zaman tüm karın derisi beslenebilir, tek taraflı bağlandığında ise bağlanan taraftaki karın derisinin dolaşımı, sağlam taraftaki damara bağımlı hale gelir. Tüm karın derisi tek damar üzerinde flep şeklinde hazırlandığında, damarı bağlanmış olan tarafta flep lateralinde doku ölümü görülür. Bu özelliklerinden dolayı süperfisiyal epigastrik damarların beslediği hazırlanan flepler, flep dolaşımının, geciktirme fenomeninin ya da flep sağkalım arttırılması çalışmalarında kullanılabilir bir model seçeneğidir. [128,129]

1978 yılında "geciktirme fenomeni" çalışmaları için Finseth ve Cutting [130] tarafından 9 x 9 cm boyutunda tariflenmiş; fakat deneklerin boyut ve ağırlıklarına göre her zaman bu boyuta ulaşılamamaktadır. Bu yüzden standart anatomik referans noktaları flep dizaynı için tariflenmiştir.[129] Bu noktalar yan tarafta koltukaltı çizgileri, yukarıda kaburga kavsi, aşağıda inguinal ligaman tarafından oluşturulan dikdörtgen şekilli deri alanıdır**(Şekil 11).**

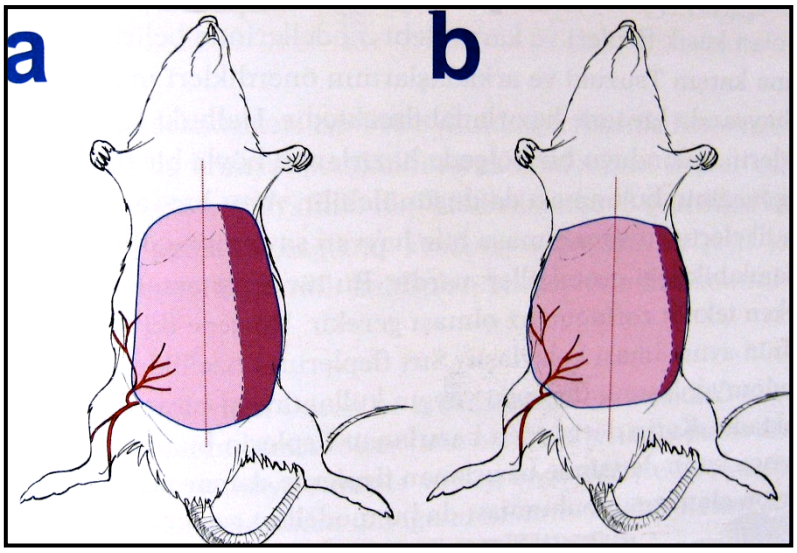
Flebin her iki dikey ve yukarı kenarları karın duvarı kaslarına kadar, pannikulus karnozus dokusunu da flebe dahil edecek şekilde kesildikten sonra aşağıdaki sınıra kadar diseksiyon makas yardımı ile devam edilir. Kesilecek veya bağlanacak süperfisiyal epigastrik damarın olduğu tarafta inguinal yağ yastığından çıkarak flebe giden damar rahatlıkla tespit edilir ve kesilir. Aşağıdaki deri adasının kalan kısmı makas yardımı damarlara zarar vermeyecek şekilde kesilebilir.



**Şekil 11:**

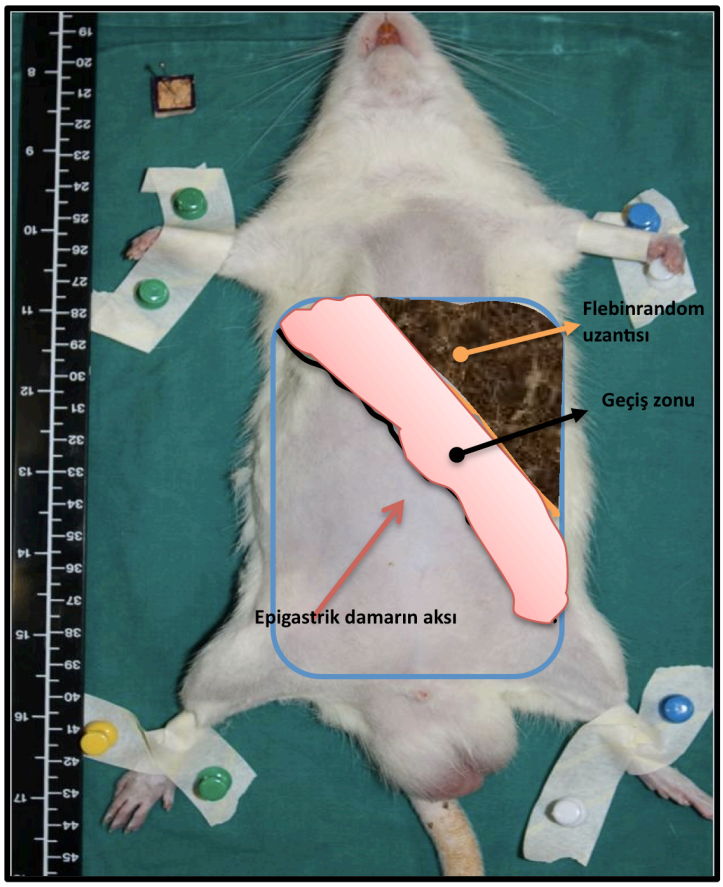
Karın flebi ve sağ inguinal bölgeden flebe giren süperfisiyal epigastrik damarların şematik görünümü (Bayramiçli M: Deneysel flep modelleri: Deri flepleri. In: Deneysel Mikrocerrahi, Editor: Bayramiçli M, Argos, Istanbul 2005, 443-489).

Çeşitli çalışmalarda nekroz alanları farklı bulunduğu için 1997'de Padubidri ve Brown damar anatomisini yakından inceleyip süperfisiyal epigastrik damarın lateral dalının bağlanması halinde ortalama % 30, lateral dalın korunması halinde ortalama % 13,5 oranında flepte doku ölümü ortaya çıktığını göstermişlerdir[131]**(Şekil 12)**. Bu damar anatomisinin iyi anlaşılması ile flep damarlarının uygun diseksiyonu sayesinde standart flepler oluşturmak mümkün hale gelmiştir[132] **(Şekil 13).**




**Şekil 12:**

Flep tek pedikül üzerinde kaldırıldığında kontralateral kraniyal kısmı gelişigüzel kanlanan bir uzantı halini alır. Bu nedenle bu bölgenin lateralinde, süperfisiyal epigastrik arterin lateral dalı flebe dahil edilmediğinde %30 (a) ve dahil edildiğinde %13,5 (b) oranında nekroz beklenir (Bayramiçli M: Deneysel flep modelleri: Deri flepleri. In: In: Deneysel Mikrocerrahi, Editor: Bayramiçli M, Argos, Istanbul 2005, 443-489).




**Şekil 13:**

Sağ süperfisiyal epigastrik damar üzerinde kaldırılan epigastrik flebin geçiş zonu ve flebin random uzantısı görülmekte.

Tek damar üzerinde kaldırılan fleplerde doku ölümü sınırları ortalama 5-7 gün içinde belirgin hale gelmektedir bu nedenle flep çalışmalarında cerrahi sonrası takip süresi genellikle yedi gün olup, doku ölümü yüzdesi bu süre sonunda hesaplanmalıdır.[131]

Bu araştırmanın amacı tek pedikül üzerinde kaldırılan sıçan karın flebinde, pedikül çevresine, flep içine ve hem damar çevresi hem de flep içine BTx-A uygulamasının, flep sağkalımına etkisi ve eğer etkisi varsa bu etkinin mekanizmasını araştırmak ve tartışmaktır. BTx-A'nın sempatektomi etkisi ile damar duvarında yer alan düz kaslarda paralizi meydana gelir ve paralizi sonucu vazodilatasyon ortaya çıkar. Çalışmanın cerrahi kısmı yapılmadan 3 gün önce damar çevresine uygulanan BTx-A'nın arteriyol yapısındaki bu

damarda yeralan düz kası bloke ederek farmakolojik olarak flep geciktirmesi yapabileceği ve flep kaldırıldığı anda kesilen sinir uçlarından salının nörotransmittterler ile meydana gelen akut vazokonstrüksiyondan, damarı ve dolayısı ile flebi koruyabileceği hipotezi kuruldu.

Yine diğer bir çalışma grubunda cerrahi öncesi 3. günde, BTx-A flep içinde çok noktalı uygulanarak kapiller düzeyde ve boğulmuş anastomozlarda aynı şekilde vazodilatasyon yaparak farmakoloji flep geciktirmesi yapabileceği ve yine flep kaldırıldığı anda kesilen sinir uçlarından salınan nörotransmittterler ile meydana gelen akut vazokonstrüksiyondan flebi koruyabileceği hipotezi kuruldu. Ancak flep içinde düz kas yapısı içeren damar içeriğinin az olması BTx-A'nın etkisinin damar çevresindeki uygulama kadar etkili olamayacağı düşünüldü. Ayrıca literatürdeki yayınlarda damar çevresine ve flep içine BTx-A uygulaması ile flep yaşayabilirliğinin arttırıldığı gösterilmiş ancak karşılaştırmalı bir çalışma yapılmamıştır.

Çalışmanın diğer bir çalışma grubunda ise BTx-A'nın hem damar çevresine hem de flep içine uygulanmasının, flep yaşayabilirliğine ayrı ayrı uygulamalara göre daha fazla müsbet etkisinin olabileceği düşünüldü.

# III GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı alınarak, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada, ağrılıkları 300-350 gr arasında değişen, 7 çalışma grubunda 42 adet Wistar Albino tipi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar çalışma süresince uygun kafeslerde, 22 ± $2^0$ C ısıda ve 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngüsünün sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları standart laboratuar yemi ve suyu verilerek düzenli olarak karşılandı.

Tüm cerrahi işlemler % 10'luk ketamin HCL (50mg/kg- Alfamine® - IM) ve ksilazin HCL (2,5mg/kg- Rompun® - IM) anestezisi altında, kornea refleksi ve ekstremite çekme yanıtı kaybolduktan sonra abdomen bölgesindeki tüyleri elektrikli traş makinesi ile traş edilerek temizlendi. İşlemler aynı cerrah tarafından steril koşullarda gerçekleştirildi. Cerrahi işlem sonrası otokannibalizasyonu (kendi kendilerini yeme) engellemek amacıyla setanet file pansuman yöntemi kullanıldı ve hayvanlar tek tek kafeslere konuldu. Deneklerin ağrılarını azaltmak amacıyla lüzum halinde fluniksin (1 mg/kg - Fluvil®-IM) enjeksiyonu uygulandı. Deneklerde cerrahiye sekonder yara yeri enfeksiyonu görülmez iken denek kaybı ve otokannibalizasyon sebebi ile çalışma dışı bırakılan deneklerin yerine aynı standartlara uygun yeni denekler eklenerek grupların sayısal eşitliği sağlandı. Beslenme problemi olduğu tespit edilen denekler gavaj ile beslenerek idameleri sağlandı.

## BOTULİNUM TOKSİN TİP A'NIN HAZIRLANIŞI

Soğuk zincir korunarak laboratuara ulaştırılan 100 ünite BTx-A içeren Botox® (Allergan,INC) flakonu steril şartlarda oda ısısında 2.0 cc serum fizyolojik ile sulandırıldı. 0.01 ml'sinde 0,5 ünite BTx-A olacak şekilde 0.5 ml lik 30 gauge enjektörlere, enjeksiyon bölgesine uygulanacak doz hesabına göre çekildi. BTx-A çekili enjektörler enjeksiyon yapılacak zamana kadar + 4 $^{o}$C'de bekletildi.

## ÇALIŞMA GRUPLARI

### Her Grup İçin Standart Uygulamalar

Deneklere; % 10'luk ketamin HCL (50mg/kg- Alfamine® - IM) ve ksilazin HCL (2,5mg/kg- Rompun® - IM) ile anestezi uygulandı. Karın ve kasık bölgeleri traş edildikten sonra sırtüstü pozisyonda tespit yapıldı **(Şekil 14-A).**Cerrahi alan %10'luk povidon iyot solüsyonu ile dezenfekte edildi ve steril olarak örtüldü.Flep her denekte yukarıda tariflendiği şekilde anatomik referans noktalarına göre sınırları çizildi ve flep 12 eşit parçaya ayrılarak cam kalemi ile işaretlendi **(Şekil 14-B).**

Grup 1(Sham)

Grup 2(Damar çevresine SF enjeksiyonu)

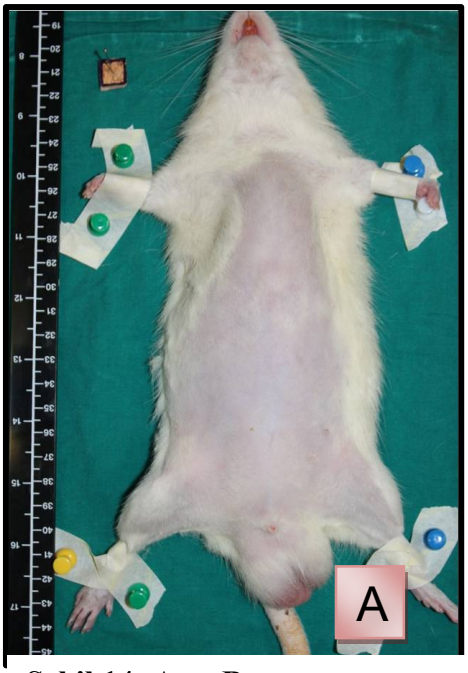
Grup 3(Damar çevresine BTx-A enjeksiyonu)

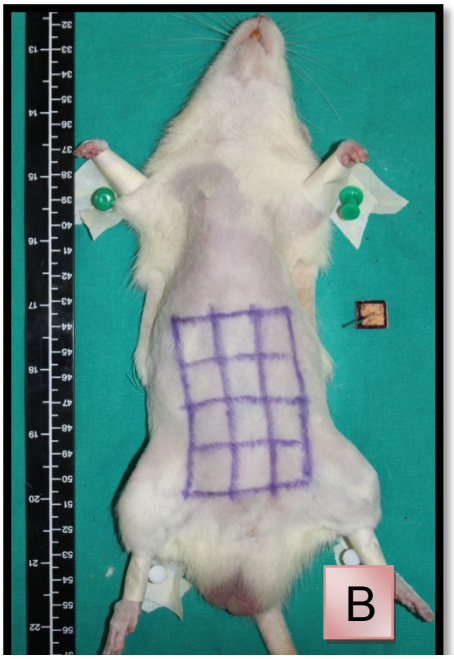
Grup 4(Flebe SF enjeksiyonu)

Grup 5(Flebe BTx-A enjeksiyonu)

Grup 6(Damar çevresine ve flebe SF enjeksiyonu)

Grup 7(Damar çevresine ve flebe BTx-A enjeksiyonu)




**Şekil 14- A ve B:**

**A**. Denek anestezi sonrası sırtüstü tespit edildi.

**B**. Anatomik referans noktalarına göre flep sınırları belirlendi daha sonraflep 12 eşit parçaya bölünerek işaretlendi.

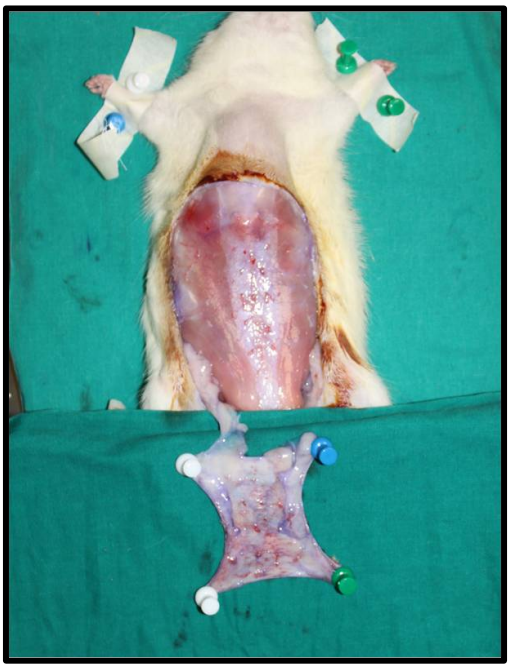
**Grup 1 (Sham) n=6**

**0. Gün:** Herhangi bir işlem uygulanmadı

**3. Gün:** Karın flebi sağ pedikül üzerinde, kraniyalden kaudale doğru, karın kaslarının fasyası üzerinden pannikulus karnozusu da dahil edecek şekilde kaldırıldı. Ters çevrilerek tespit edildi **(Şekil 15)** ve lazer doppler flowmetri ile pedikülden, flebin proksimal ve distalinden kan akım miktarı ölçüldü.**(Şekil 16)** Flep yerine 3/0 prolen dikiş ile tespit edildi. Flebin dört noktasından biyopsiler alındı **(Şekil 17-A).**Biyopsi alanları da 3/0 prolen ile

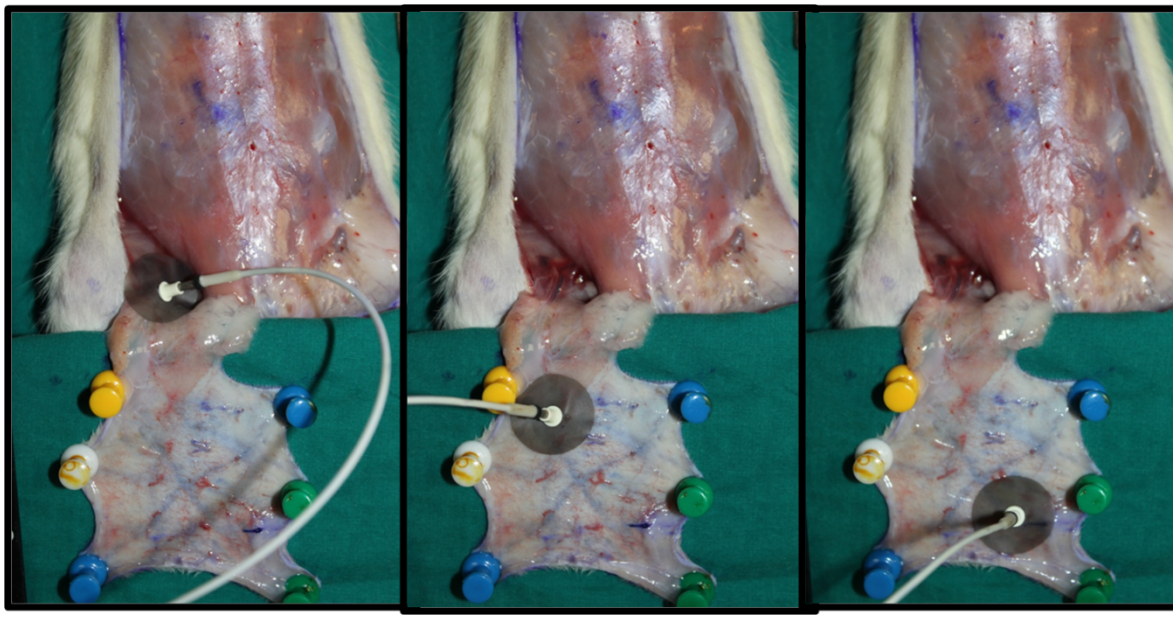
dikildi **(Şekil 17-B).**Deneklerin flebe zarar vermemeleri için setanet file pansumanı yapıldı **(Şekil 18).**

**10. Gün:** Karın flebinin fotoğrafı metrik ölçümle dijital makine ile çekildi**(Şekil 15).** Flepten 3.günde alınan biyopsi noktalarının yan taraflarından 4 adet biyopsi alındı. Flebin proksimal ve distal kısmından elektron mikroskobik inceleme ve genetik analiz amaçlı toplam 4 biyopsi alındı ve denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.



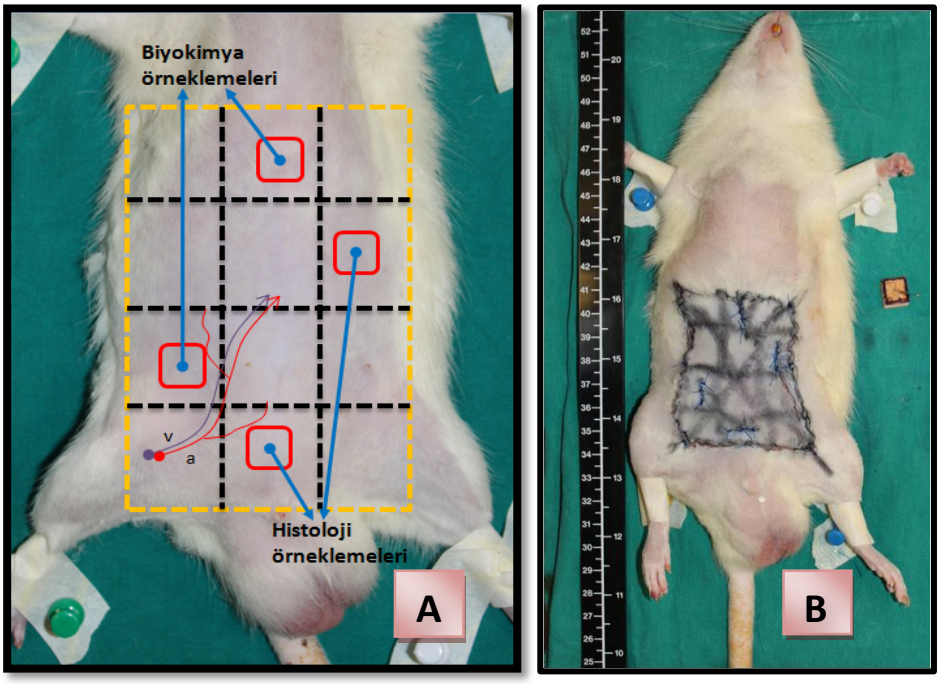
**Şekil 15 :**

Flep tek damar üzerinde kaldırıldıktan sonra kraniyalinden çevrilerek pannikulus karnozus tabakası yukarı bakacak şekilde tespit edildi.



**Şekil 16** :

Karın flebi tek damar üzerinde kaldırıldıktan ve damarda gerilim yaratmayacak şekilde ters çevrilip tespit edildikten sonra lazer doppler flowmetre ile sırasıyla süperfisiyal epigastrik damar, flep proksimali ve distalindeki kan akımı probe yardımı ile ölçüldü.

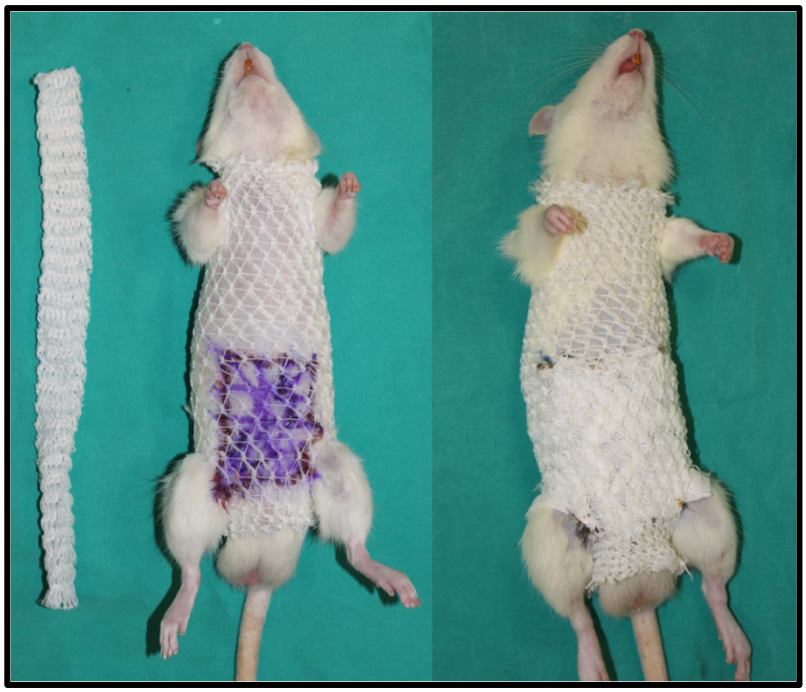



**Şekil 17- A ve B**

Ölçümleri yapıldıktan sonra flep yerine dikildi.

**A**: Önceden belirlenmiş olan biyopsi noktalarından örnekler alındı.

**B**: Biyosi alanları da primer dikildi.



**Şekil 18**

Cerrahi işlemlerden sonra deneklerin kendilerine veya fleplerine zarar vermemeleri için setanet file pansuman yöntemi kullanıldı.

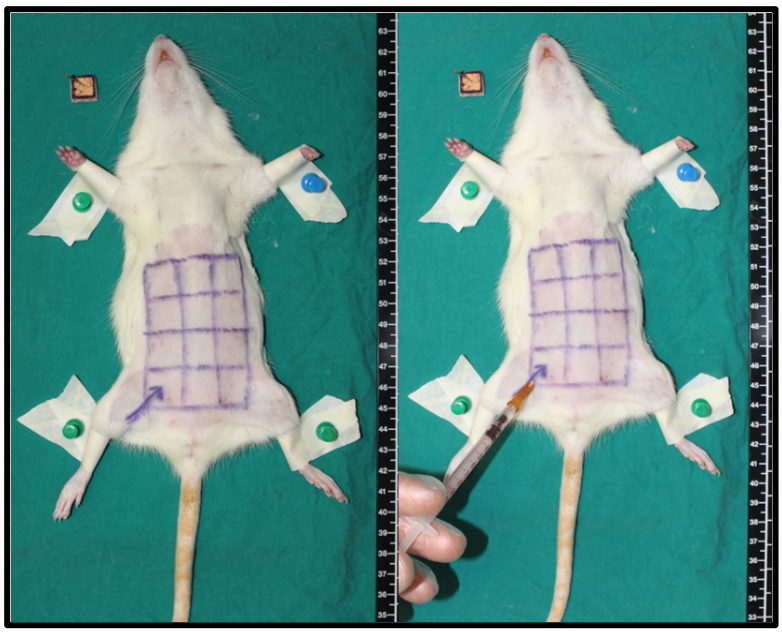
**Grup 2 (Damar çevresine SF enjeksiyonu) n=6**

**0. Gün:** Sağ süperfisiyal epigastrik damar çevresine 0.2 ml SF enjeksiyonu yapıldı**(Şekil 19).**

**3. Gün:** Karın flebi sağ pedikül üzerinde, kraniyalden kaudale doğru, karın kaslarının fasyası üzerinden pannikulus karnozusu da dahil edecek şekilde kaldırıldı. Ters çevrilerek tespit edildi ve lazer doppler flowmetri ile pedikülden, flebin proksimal ve distalinden kan akım miktarı ölçüldü. Flep yerine 3/0 prolen dikiş ile tespit edildi. Flebin dört noktasından biyopsiler alındı. Biyopsi alanları da 3/0 prolen ile dikildi. Deneklerin flebe zarar vermemeleri için setanet file pansumanı yapıldı.

**10. Gün:** Karın flebinin fotoğrafı metrik ölçümle dijital makine ile çekildi. Flepten 3.günde alınan biyopsi noktalarının yan taraflarından 4 adet biyopsi alındı. Flebin proksimal

ve distal kısmından elektron mikroskobik inceleme ve genetik analiz amaçlı toplam 4 biyopsi alındı ve denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi **(Şekil 20).**



**Şekil 19:**

Denek anestezi altında sırtüstü yatar pozisyonda tespit edildikten sonra palpasyonla femoral damar pulsasyonu tespit edildi ve damar çevresi enjeksiyonlar yapıldı.



**Şekil 20:**

Çalışmanın tamamlandığı 10. günde denek anestezi altında iken sabit yükseklikten, aynı fotoğraf makinası ile fotoğrafları yanlarında ölçüm amaçlı metre kullanılarak gerçekleştirildi.

**Grup 3 (Damar çevresine BTx-A enjeksiyonu) n=6**

**0. Gün:** Sağ süperfisiyal epigastrik damar çevresine 0.2 ml(10 ünite) BTx-Aenjeksiyonu yapıldı.

**3. Gün:** Karın flebi sağ pedikül üzerinde, kraniyalden kaudale doğru, karın kaslarının fasyası üzerinden pannikulus karnozusu da dahil edecek şekilde kaldırıldı. Ters çevrilerek tespit edildi ve lazer doppler flowmetri ile pedikülden, flebin proksimal ve distalinden kan akım miktarı ölçüldü. Flep yerine 3/0 prolen dikiş ile tespit edildi. Flebin dört noktasından biyopsiler alındı. Biyopsi alanları da 3/0 prolen ile dikildi. Deneklerin flebe zarar vermemeleri için setanet file pansumanı yapıldı.

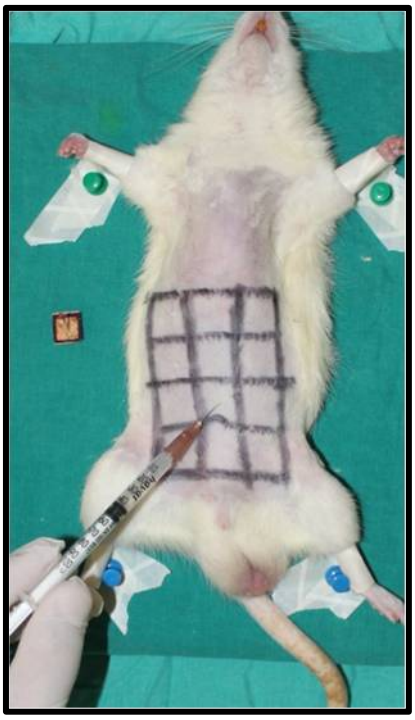
**10. Gün:** Karın flebinin fotoğrafı metrik ölçümle dijital makine ile çekildi. Flepten 3.günde alınan biyopsi noktalarının yan taraflarından 4 adet biyopsi alındı. Flebin proksimal ve distal kısmından elektron mikroskobik inceleme ve genetik analiz amaçlı toplam 4 biyopsi alındı ve denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.

**Grup 4 (Flebe SF enjeksiyonu) n=6**

**0. Gün:** 12 eşit parçaya ayrılmış olan flebin her bir parçasına 0.02 ml SF enjeksiyonu yapıldı**(Şekil 21)**.

**3. Gün:** Karın flebi sağ pedikül üzerinde, kraniyalden kaudale doğru, karın kaslarının fasyası üzerinden pannikulus karnozusu da dahil edecek şekilde kaldırıldı. Ters çevrilerek tespit edildi ve lazer doppler flowmetri ile pedikülden, flebin proksimal ve distalinden kan akım miktarı ölçüldü. Flep yerine 3/0 prolen dikiş ile tespit edildi. Flebin dört noktasından biyopsiler alındı. Biyopsi alanları da 3/0 prolen ile dikildi. Deneklerin flebe zarar vermemeleri için setanet file pansumanı yapıldı.

**10. Gün:** Karın flebinin fotoğrafı metrik ölçümle dijital makine ile çekildi. Flepten 3.günde alınan biyopsi noktalarının yan taraflarından 4 adet biyopsi alındı. Flebin proksimal ve distal kısmından elektron mikroskobik inceleme ve genetik analiz amaçlı toplam 4 biyopsi alındı ve denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.



**Şekil 21:**

Denek anestezi altında sırtüstü yatar pozisyonda tespit edildikten sonra 12 eşit parçaya ayrılmış flebin her bir parçasına intradermal enjeksiyonlar yapıldı.

**Grup 5 (Flebe BTx-A enjeksiyonu) n=6**

**0. Gün:** 12 eşit parçaya ayrılmış olan flebin her bir parçasına 0.02 ml(1 ünite) BTx-A enjeksiyonu yapıldı.

**3. Gün:** Karın flebi sağ pedikül üzerinde, kraniyalden kaudale doğru, karın kaslarının fasyası üzerinden pannikulus karnozusu da dahil edecek şekilde kaldırıldı. Ters çevrilerek tespit edildi ve lazer doppler flowmetri ile pedikülden, flebin proksimal ve distalinden kan akım miktarı ölçüldü. Flep yerine 3/0 prolen dikiş ile tespit edildi. Flebin dört noktasından biyopsiler alındı. Biyopsi alanları da 3/0 prolen ile dikildi. Deneklerin flebe zarar vermemeleri için setanet file pansumanı yapıldı.

**10. Gün:** Karın flebinin fotoğrafı metrik ölçümle dijital makine ile çekildi. Flepten 3.günde alınan biyopsi noktalarının yan taraflarından 4 adet biyopsi alındı. Flebin proksimal ve distal kısmından elektron mikroskobik inceleme ve genetik analiz amaçlı toplam 4 biyopsi alındı ve denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.

**Grup 6 (Damar çevresine ve flebe SF enjeksiyonu) n=6**

**0. Gün:** Sağ süperfisiyal epigastrik damar çevresine 0.2 ml SF ve 12 eşit parçaya ayrılmış olan flebin her bir parçasına 0.02 ml SF enjeksiyonu yapıldı.

**3. Gün:** Karın flebi sağ pedikül üzerinde, kraniyalden kaudale doğru, karın kaslarının fasyası üzerinden pannikulus karnozusu da dahil edecek şekilde kaldırıldı. Ters çevrilerek tespit edildi ve lazer doppler flowmetri ile pedikülden, flebin proksimal ve distalinden kan akım miktarı ölçüldü. Flep yerine 3/0 prolen dikiş ile tespit edildi. Flebin dört noktasından biyopsiler alındı. Biyopsi alanları da 3/0 prolen ile dikildi. Deneklerin flebe zarar vermemeleri için setanet file pansumanı yapıldı.

**10. Gün:** Karın flebinin fotoğrafı metrik ölçümle dijital makine ile çekildi. Flepten 3.günde alınan biyopsi noktalarının yan taraflarından 4 adet biyopsi alındı. Flebin proksimal ve distal kısmından elektron mikroskobik inceleme ve genetik analiz amaçlı toplam 4 biyopsi alındı ve denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.

**Grup 7 (Damar çevresine ve flebe BTx-A enjeksiyonu) n=6**

**0. Gün:** Sağ süperfisiyal epigastrik damar çevresine 0.2 ml(10 ünite) BTx-A ve 12 eşit parçaya ayrılmış olan flebin her bir parçasına 0.02 ml(1 ünite) BTx-A enjeksiyonu yapıldı.

**3. Gün:** Karın flebi sağ pedikül üzerinde, kraniyalden kaudale doğru, karın kaslarının fasyası üzerinden pannikulus karnozusu da dahil edecek şekilde kaldırıldı. Ters çevrilerek

tespit edildi ve lazer doppler flowmetri ile pedikülden, flebin proksimal ve distalinden kan akım miktarı ölçüldü. Flep yerine 3/0 prolen dikiş ile tespit edildi. Flebin dört noktasından biyopsiler alındı. Biyopsi alanları da 3/0 prolen ile dikildi. Deneklerin flebe zarar vermemeleri için setanet file pansumanı yapıldı.

**10. Gün:** Karın flebinin fotoğrafı metrik ölçümle dijital makine ile çekildi. Flepten 3.günde alınan biyopsi noktalarının yan taraflarından 4 adet biyopsi alındı. Flebin proksimal ve distal kısmından elektron mikroskobik inceleme ve genetik analiz amaçlı toplam 4 biyopsi alındı ve denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.

## DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

### A. GENEL DEĞERLENDİRME

Deneysel araştırmaya dahil edilen hayvanlarda araştırma süresince oluşan genel değişiklikler günlük olarak gözlendi. Deneklerin ağrılarını azaltmak amacıyla lüzum halinde fluniksin (1mg/kg-Fluvil®-IM) enjeksiyonu uygulandı. Cerrahi işlem sonrası otokannibalizasyonu (kendi kendilerini yemeleri) engellemek amacıyla setanet file pansumanı bozulan fileler düzeltildi veya yenilendi.

### B. FLEP NEKROZ ALAN ÖLÇÜMÜ

Tüm gruplarda cerrahiden sonraki 7. günde nekroz alanları değerlendirildi. Değerlendirme için denekler sakrifiye edilmeden önce sırtüstü pozisyonda tespit edildi. Daha sonra standart yükseklikten ve standart yöntem kullanılarak dijital fotoğraf makinesi (DSLR D500, Canon Inc, Japonya) aracılığıyla, deneklerin yanlarına bir cetvel konularak fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflar bilgisayara aktarıldı ve Image Tool 3.0 programı kullanılarak, tüm flep alanı, nekrotik alan ve sağkalan flep alanı ölçüldü. Yara iyileşmesi ve nekroza bağlı oluşan flep kontraksiyonu nedeniyle nekroz alanının, tüm flep alanına olan yüzdesi ölçüldü.

### C. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Tüm gruplarda cerrahinin yapıldığı 3. gün ve çalışmanın sonlandırıldığı 10. günde flep distalinden ve proksimalinden birer adet 1 cm büyüklüğünde biyopsiler alındı, toplu iğne ile mantar plakaya tespit edildi ve % 4'lük formaldehit solüsyonuna konularak stabilize edildi. Daha sonra, dokular rutin mikroskobik inceleme için Hematoksilen Eozin (HE) ile boyandı. Boyama sonrası dokular Olympus BH2 ışık mikroskobu altında, örneklerin hangi gruplara ait olduğunu bilmeyen, tek histolog tarafından incelendi ve her grup için genel subjektif

değerlendirme yapılarak epidermis, dermis, dermal vasküler yapılar ve dermoepidermal bileşkede görülen değişiklikler kaydedildi.

**İmmünohistokimyasal Yöntem**

Alınan doku örnekleri, oda ısısında, %10'luk formalin solusyonu içerisinde 72 saat tesbit edildi. Tespit edilen dokular alışılmış ışık mikroskop takip yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan bloklardan mikrotomla (Leica SM 2000, Germany) polizinli lamlara 4-5 μm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinize edilmesi amacıyla, kesitler bir gece 37 ºC ve ertesi gün 1 saat 60 ºC olacak şekilde etüvde bekletilerek 15'X 2 ksilol'e etkin bırakıldılar. Dehidrate edilmesi amacıyla dokular 10'ar dakika olacak şekilde sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinden geçirildiler.

Dehidrate edilen dokular alkolden arındırılmak için 5'X2 kez distile sudan geçirildikten sonra, pap pen (Super PAP Pen, PN IM3580, Becman Coulter Company, France) ile kesit üzerindeki dokuların etrafı çizildi.

Daha sonra, e-NOS primer antikoru için 15 dakika % 3'lük hidrojen peroksite etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (Phosphate buffer saline, pH=7,4) (Invitrogen Immunodetection, Ref/Cat No: 00-3000, Lot: 1373125, Zymed, USA) ile camlar yıkandı.

Yıkanan camlara 5 dakika Ultra V block (Ref/Cat No: 85-9043, Lot: 724944A Zymed, USA) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçilerek ve e-NOS primer antikoruna (C-20 sc: 654, Lot: G3108, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) etkin bırakıldılar. Daha sonra PBS ile yıkanan camlara 20 dakika biyotinli sekonder antikor (Ref/Cat No: 85-9043, Lot: 724944A, Zymed, USA) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 20

dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Ref/ Cat No: 85-9043, Lot: 724944A, Zymed, USA) etkin bırakıldı, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak ortama kromojen AEC (3–amino–9–ethylcarbazde) (Cat: 00–2007, Lot: 319293A, Zymed, USA ) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı.

Zemin boyası olarak Mayer'in Hemotoksileni (0B52Y092, Merck) kullanıldı. Negatif boyama primer antikor aşamasında yapıldı. Bu şekilde boyanan camlar ultra–mount (VM 13518, Lab Vision Corporation, San Francisco, CA, USA) ile kapatılıp, bilgisayar donanımlı, kamera ataçmanlı foto-ışık mikroskopta (DM 4000 B, Leica, Weetlar, Germany, DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) fotoğraflanarak değerlendirildi.

Yine bloklardan polizinli camlara 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı ve 37ºC'deki etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak amacıyla etüv ısısı 60ºC'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi. Camlar ksilol ve alkol ile deparafinize ve dehidrate edildi.

Dehidrate edilen dokular alkolden arındırılmak için 5'x2 kez distile sudan geçirildikten sonra, pap pen (Super PAP Pen, PN IM3580, Becman Coulter Company, France) ile kesit üzerindeki dokuların etrafı çizildi.

Daha sonra, PECAM-1 primer antikoru için 5 dakika peroksidaz bloğa (Ref/ Cat No: sc-2053, Lot: F2909, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (Phosphate buffer saline, pH=7,4) ile camlar yıkandı. Yıkanan camlara 20 dakika serum blok (Ref/Cat No: sc-2053, Lot: D0810 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi ve kesitler PECAM-1 primer antikoruna (M-20 sc: 1506, Lot: D0610, Santa Cruz Biotechnology) etkin bırakıldılar. Daha sonra PBS ile yıkanan camlara 20 dakika biyotinli

sekonder antikor (Ref/Cat No: sc-2053, Lot: D0810 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 30 dakika HRP streptavidin enzim kompleksine (Ref/ Cat No: sc-2053, Lot: F2909, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) etkin bırakıldı, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak ortama kromojen DAB (Ref/ Cat No: sc-2053, Lot: F2909, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Harris'in Hemotoksileni kullanıldı. Daha sonra, camlar distile su ile yıkandı ve alkol serilerinden her birinde birkaç dip yapılıp geçirilerek dehidrate edildi. Ardından camlar 15'x 2 ksilole etkin bırakılarak şeffaflaştırıldı ve boyanan camlar entellan ile kapatılıp, bilgisayar donanımlı, kamerasıolan foto-ışık mikroskopta (DM 4000 B, Leica, Weetlar, Germany, DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) fotoğraflanarak şu şekilde değerlendirildi.

İmmüno-işaretlenme yoğunluğu bir semi-objektif skorlama sistemi ile şu şekilde değerlendirilmiştir.

0. İşaretlenme yok
1. Zayıf işaretlenme
2. Orta dereceli işaretlenme
3. Güçlü işaretlenme

Bu değerlendirme skorları uygulanan protokolü bilmeyen iki bağımsız araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. HSCORE şu şekilde hesaplandı.

$$\mathbf{HSCORE = \Sigma\ Pi\ (i + 1)}$$

i değeri işaretlenme yoğunluğu değeri,

Pi değeri epitelyal ve stromal hücrelerin işaretlenme yüzdesi (%0-%100)

Sonuçlar ortalama ± standart deviasyon olarak belirlendi.

## D. LAZER DOPPLER FLOWMETRE ÖLÇÜMÜ

Tüm gruplarda her denekte cerrahinin yapıldığı 3. gün flep tek pedikül üzerinde kaldırıldıktan sonra pannikulus karnozus tabakası yukarı bakacak şekilde ters çevrilerek tespit edildi. Lazer doppler flowmetre probu ile üç noktadan (süperfisiyal epigastrik damar üzerinden, flebin proksimalinden ve distalinden) üçer ölçüm yapıldı ve ortalamaları alındı.

## E. DAMAR SAYIMI

Tüm gruplarda her denekte cerrahinin yapıldığı 3. gün flep tek pedikül üzerinde kaldırıldıktan sonra histolojik değerlendirmeler için alınan örnekler hemotoksilen eozin ile boyandıktan sonra tüm kontrol ve deney gruplarına ait 4 μm kalınlığındaki deri kesitlerinde damar sayımı yapıldı. Damar sayısı, 4 μm kalınlığındaki seri kesitlerde X40 büyültmede 6 farklı bölgede Lecia Q Vin 3 programında tüm alanda olacak şekilde yapılarak istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı.

## F. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Tüm gruplarda cerrahinin yapıldığı 3. gün ve çalışmanın sonlandırıldığı 10. günde flep distalinden ve proksimalinden birer adet 1 cm büyüklüğünde biyopsiler alındı alüminyum folyoya sarıldıktan sonra sıvı azota atılarak donduruldu daha sonra inceleme süresine kadar -$80^0$ C'de saklandı. HPLC tekniği ile dokuda nitrik oksit metabolitleri olan nitrit ve nitrat miktarları ölçüldü.

### Dokuda NOx Tayini

Dokulardaki NOx (nitrik oksitin stabil son ürünleri/ nitrit+nitrat) konsantrasyonu, Griess yöntemi ile çalışıldı.

**Reaktifler**

- 0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH:7)
- Griess I: % 0,2'lik Naftiletilendiamin Dihidroklorür (NEDD)
- Griess II: % 10'luk Fosforik asit ($H_3PO_4$) içinde % 2'lik Sülfanilamid
- 1 M Hidroklorik asit (HCl) içinde 400 mg Vanadyum (III) Klorür ($VCl_3$)
- 0,3 M NaOH
- %5'lik $ZnSO_4$

**Dokuların Hazırlanması**

Dokular, sodyum fosfat tamponu ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 500 µL homojenata, deproteinizasyon amacıyla 250'şer µL NaOH ve $ZnSO_4$ eklenip 3000 g'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Buradan elde edilen 200 µL süpernatana ortamdaki nitratı nitrite indirgemek için eşit miktarda $VCl_3$ eklendi ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifi eklendi. 37 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, 540 nm'de köre karşı okundu.

**Standartın Hazırlanması**

6,4 mM'lik stok sodyum nitrit ($NaNO_2$) standartı günlük olarak dilüe edilerek, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µM konsantrasyonlarda standartlar elde edildi. Dokulardaki NOx miktarı, hazırlanan standart eğriye göre hesaplandı ve µmol/gr doku olarak verildi.

## G. GENETİK DEĞERLENDİRME

Çalışma gruplarındaki tüm deneklerden 10. günde flep proksimal ve distalinden 2 cm'lik doku örnekleri alındı, örnekler üzerinde bulunan kıl ve krutlardan arındırıldı. Daha sonra

örnekler serumda yıkanarak temizlendi ve 1,5 ml'lik ependorf tüplere konuldu. Tüpler sıvı azota atılarak dondurulduu daha sonra inceleme süresine kadar - $80^0$ C'de saklandı

**Sıçan dokusundan total RNA saflaştırılması**

Deney sonunda steril bir şekilde çıkartılan deri dokuları steril petri kabında steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun (50mg- 100mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı. DNAz ve RNAz free 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde dondurulduu. Deri dokuları, analiz gününe kadar - 80ºC'de saklandı. Doku örneklerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak aşağıda yazılı olan protokol ile total RNA saflaştırıldı. Kontaminasyonu engellemek amacı ile saflaştırma işlemi güvenlik kabininin içinde gerçekleştirildi.

**Dokudan RNA İzolasyon Protokolü**

**1-** 1.5 ml'lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle veya mortar ile homojenize edildi. Örnekler çözünmeye başladığı anda tekrar sıvı azotta donduruldu ve homojenizasyon işlemine devam edildi.

**2-** Homojenizasyon işlemine 1000 ul TriFast ile devam edildi. (Doku büyüklüğü arttığı oranda kullanılan Trifast miktarıda arttırıldı). Örnek hacminin, homojenizasyon sırasında kullanılan TriFast hacminin %10'nu geçmemesine dikkat edildi.

**3-** Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.

**4-** 200 ul kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca (tamamen karışıncaya kadar) vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu.

**5-** Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 $^{o}$C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.

**6-** Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.

**7-** Başlangıçta kullanılan TriFast miktarının yarısı kadar izopropanol eklenip vortekslendi.

**8-** Örnekler 1 yada 1.5 saat -20 $^{0}$C'de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dakika 4 $^{o}$C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatan atıldı.

**9-** DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 ul Dnaz (ug başına 5U DNAz), 300 ul Dnaz Buffer I (200mM Tris-HCL (pH:8.4), 20mM MgCl2, 500mM KCl) ve 400 ul DEPC'li su eklenerek 30 dakika 37 $^{0}$C sıcaklığında bekletildi.

**10-** Örneklerin üzerine 300 ul 25mM EDTA eklendi ve 65 $^{o}$C'de 10 dak bekletildi.

**11-** 12.000 rpm'de 10 dakika 4 $^{o}$C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.

**12-** 1000 ul %75'lik alkol ( taze hazırlanır) eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4 $^{o}$C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.

**13-** Peletin üzerine tekrar 1000 ul %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4 $^{o}$C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atıldı.

**14-** Pelet kurumaya bırakıldı. 30-50 ul DEPC'li su ile sulandırıldı.

**cDNA sentezi**

Elde edilen RNA'lar Spektrofotometre'de 260 nanometre (nm)'de ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendi. Primer olarak Random Hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve miktarları **tablo 1'**de verilmiştir.

**Tablo 1: cDNA RT-PCR tepkime karışımı**

| | Son konsantrasyon | Hacim |
|---|---|---|
| Steril $H_2O$-PCR grade | - | RNA miktarına göre değişken |
| Reaksiyon Tamponu | 1x (8mM $MgCl_2$) | 4 µl |
| dNTP | 1mM | 2 µl |
| Random hekzamer primeri | 60 µM | 2 µl |
| RNaz inhibitörü | 20 ünite | 0.5 µl |
| Transcriptor Ters Transkriptaz | 10 ünite | 0,5 µl |
| Total RNA | 1 µg | 1 µg olacak şekilde |

cDNA için PCR karışımı ince çeperli 0.2'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA eklendi.

**cDNA RT-PCR Programı**

Otomatik ısı döngüsü cihazı aşağıda belirtilen programa ayarlanarak cDNA ters transkripsiyon polimeraz zincir tepkimesi uygulandı.**(Tablo 2)**

**Tablo 2: cDNA RT-PCR**

| | Sıcaklık | Zaman | Döngü sayısı |
|---|---|---|---|
| Primer Bağlanması | 25 °C | 10 dk | 1 döngü |
| Ters transkripsiyon | 50 °C | 60 dk | 1 döngü |
| İnaktivasyon | 85 °C | 5 dk | 1 döngü |
| Soğutma | 4 °C | - | 1 döngü |

Reaksiyon sonucu cDNA örnekleri Real-time PCR'da kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

**i-NOS, e-NOS ve VEGF genlerinin ifadelenmesinin Real-Time PCR ile ölçümü**

i-NOS, e-NOS ve VEGF genlerinin mRNA miktarları Real-time PCR yöntemi ile ölçümü için Light Cycler$^{TM}$ cihazı kullanıldı. Amplifikasyonlar 20 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, bölgeye özgü primerler, UPL TaqMan probu ve LightCycler TaqMan Master miks kullanılarak gerçekleştirildi. i-NOS, e-NOS ve VEGF gen ifadelenmesini normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, β-aktin genine özgü primer ve UPL TaqMan probu kullanılarak çalışıldı. Relatif gen ifadelenmesi sonuçları "Pfaffl" matematiksel yöntemi ile hesaplandı.

**β-aktin Gerçek Zamanlı PCR Tepkime Karışımı**

Real-time PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler**tablo 3**'de verilmiştir.

**Tablo 3: β-aktin gerçek zamanlı PCR tepkime karışımı**

| | Son konsantrasyon | Hacim |
|---|---|---|
| $dH_2O$ | - | 6.7 µl |
| $MgCI_2$ (25 mM) | 4 mM | 0.8 µl |
| Aktin Primer F (10 pmol/µl) | 10 pmol | 0.5 µl |
| Aktin Primer R (10 pmol/µl) | 10 pmol | 0.5 µl |
| Beta aktin TaqMan prob 17 (100 pmol/µl) | 10 pmol | 0.1 µl |
| LC TaqMan karışımı (10x) | 1x | 1.4 µl |
| cDNA | - | 2 µl |

**i-NOS, e-NOS ve VEGF Real-Time PCR Tepkime Karışımı**

Gerçek zamanlı PCR tepkimesi karışımını hazırlamak için kullanılan kimyasal maddeler **tablo 4**'de verilmiştir.

**Tablo 4: i-NOS, e-NOS ve VEGF Real-time PCR tepkime karışımı**

| | Son konsantrasyon | Hacim |
|---|---|---|
| $dH_2O$ | - | 4.7 µl |
| $MgCI_2$ (25 mM) | 4 mM | 1.2 µl |
| i-NOS, e-NOS ve VEGF Primer F (10 pmol/µl) | 5 pmol | 0.5 µl |
| i-NOS, e-NOS ve VEGF Primer R (10 pmol/µl) | 5 pmol | 0.5 µl |
| i-NOS, e-NOS ve VEGF TaqMan UPL prob 77 (100 pmol/µl) | 10 pmol | 0.1 µl |
| LC TaqMan karışımı (10x) | 1x | 1 µl |
| cDNA | - | 2 µl |

Gerçek zamanlı PCR karışımı hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve en son üzerine cDNA eklendi. Kapiller tüpler 3000-5000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler yerleştirildikten sonra LightCycler cihazında aşağıda belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. i-NOS, e-NOS, VEGF ve β-aktin için aynı PCR programı kullanılmıştır.

**i-NOS, e-NOS, VEGF ve β-aktin Light-Cycler Deney Programı**

| **Program 1 Ayrılma (Denatürasyon)** | |
|---|---|
| **Program Verisi** | **Değer** |
| Döngüler | 1 |
| Analiz Modu | - |
| **Sıcaklık Hedefleri** | **Kısım 1** |
| Hedef Sıcaklık (°C) | 95 |
| İnkübasyon zamanı (s:dk:sn) | 10:00 |
| Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn) | 20.0 |

| **Program 2 Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)** | | |
|---|---|---|
| **Program Verisi** | **Değer** | |
| Döngüler | 50 | |
| Analiz Modu | Çoğalma | |
| **Sıcaklık Hedefleri** | **Kısım 1** | **Kısım 2** |
| Hedef Sıcaklık (°C) | 95 | 60 |
| İnkübasyon zamanı (s:dk:sn) | 10 | 20 |
| Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn) | 20.0 | 10.0 |

Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait i-NOS, e-NOS ve VEGF ve β-aktin genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren crossing point (Cp) değerleri belirlendi. β-aktin mRNA seviyeleri i-NOS, e-NOS ve VEGF düzeylerini normalize etmek amacı ile kullanıldı.

**İstatistiksel Analiz Yöntemleri**

Botoks enjeksiyonu yapılan gruplar ile kontrol gruplarındaki sıçanlardan elde edilen deri dokularında izlenen i-NOS, e-NOS ve VEGF mRNA ifadelenmesine ait veriler REST (2008

Beta V2.0.7) istatistik programı ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

## H. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro Wilk testiyle araştırıldı. Varyansların homojenliği ise Levene testiyle değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler flep nekroz alanı, distal ve perivasküler doppler flowmetre kan akımı için ortanca (çeyrekler arası genişlik) olarak distal doppler flowmetre kan akımı içinse ortalama ± standart sapma biçiminde gösterildi. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile ortanca değerler yönünden farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testi ile incelendi. One-Way ANOVA veya Kruskal Wallis test istatistiği sonucunun önemli bulunması halinde farka neden olan durumları tespit etmek amacıyla post hoc Tukey veya Conover'in parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

# IV BULGULAR

## A. GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

Çalışma gruplarından grup 1,3,4 ve 7'de birer denek, grup 5 ve 6'da ikişer, grup 2'de 3 denek cerrahiden sonraki takip sürecinde kaybedildi. Çalışma gruplarından eksilen deneklerin yerine yeni deneklerde aynı işlemler uygulanarak grup sayısı korundu.

## B. FLEP NEKROZ ALANI DEĞERLENDİRME BULGULARI

Cerrahiden sonra 7. günde fleplerin nekroz alanlarının, tüm flep yüzdesine oranları değerlendirildiğinde: **(Şekil 22)-(Tablo 5)**

Ortalama Nekroz Alanı Yüzdeleri

Grup 1(Sham) % 38,5 ± 2,1

Grup 2(Damar çevresine SF enjeksiyonu) % 37,4 ± 1,8

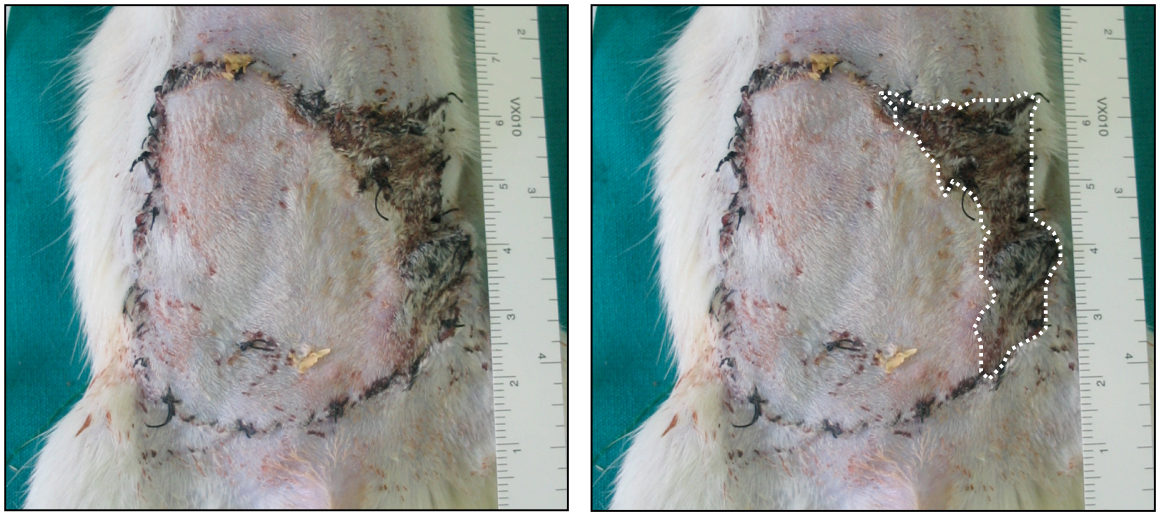
Grup 3(Damar çevresine BTx-A enjeksiyonu) % 26,2 ± 2,2

Grup 4(Flebe SF enjeksiyonu) % 41,2 ± 2,0

Grup 5(Flebe BTx-A enjeksiyonu) % 30,6 ± 1,7

Grup 6(Damar çevresine ve flebe SF enjeksiyonu) % 43,3 ± 1,9

Grup 7(Damar çevresine ve flebe BTx-A enjeksiyonu) % 24,9 ± 2,1 olduğu ölçüldü.

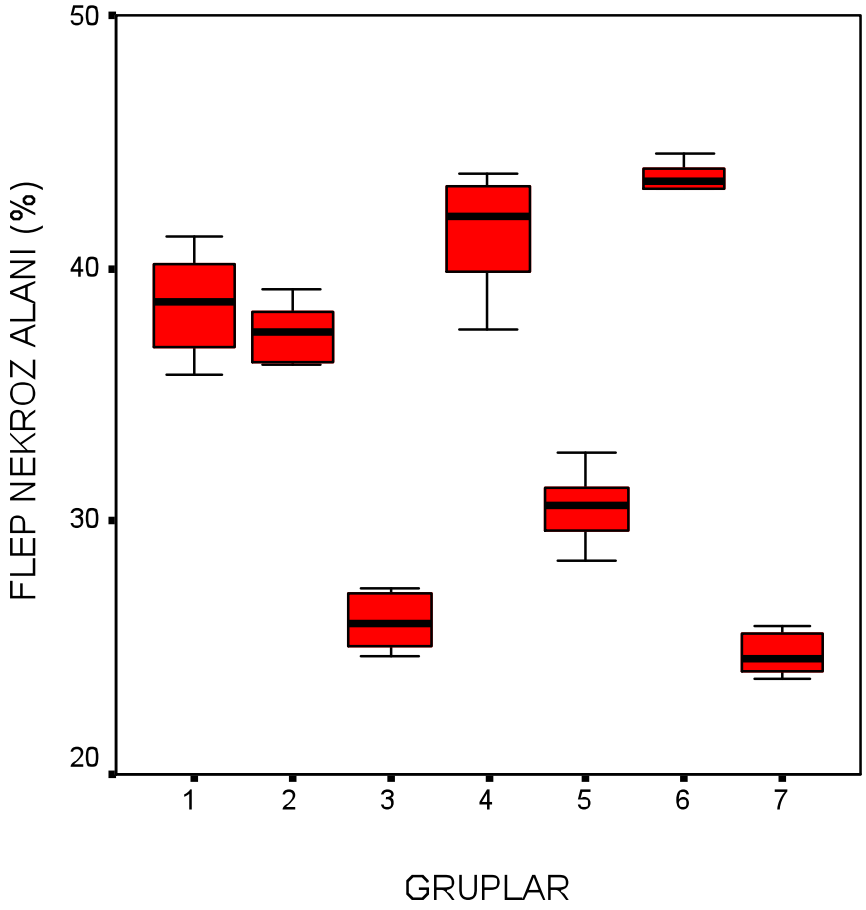


**Şekil 22:**

Nekroz ve yara iyileşmesinin yol açtığı flep kontraksiyonu nedeniyle nekroz alanının yüzdesi değerlendirildi.

**Tablo 5:** Tüm gruplardaki deneklerin flep nekroz alan yüzdeleri, ortalama ve standart deviasyonları

| Denek No | GRUPLAR | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | 40,2 | 39,2 | 27,4 | 43,7 | 29,6 | 44,5 | 24,7 |
| 2 | 39,7 | 38,3 | 25,5 | 43,2 | 31,2 | 43,4 | 25,9 |
| 3 | 36,9 | 36,8 | 24,7 | 39,9 | 30,1 | 41,2 | 25,6 |
| 4 | 35,8 | 36,3 | 26,5 | 42,3 | 28,4 | 43,4 | 24,1 |
| 5 | 41,3 | 38,1 | 27,2 | 41,8 | 31,3 | 43,9 | 24,5 |
| 6 | 37,7 | 36,2 | 25,1 | 37,6 | 32,7 | 43,1 | 23,8 |
| **Ort** | **38,5** | **37,4** | **26,2** | **41,2** | **30,6** | **43,3** | **24,9** |
| **SD** | **± 2,1** | **± 1,8** | **± 2,2** | **± 2,0** | **± 1,7** | **± 1,9** | **± 2,1** |




**Şekil 23:.**

Gruplara Göre Flep Nekroz Alanları

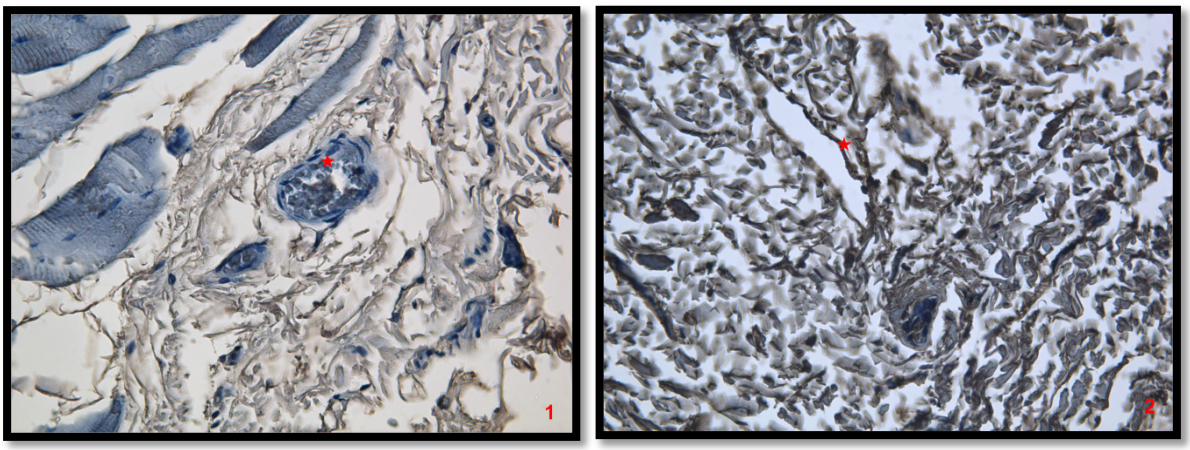
Her bir kutunun ortasındaki yatay çizgi ortanca değeri (50.yüzdelik) gösterirken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; 25. ve 75.yüzdelik değerleri ifade etmektedir. Kutuların alt ve üst kısımlarında uzayarak giden çubuklarla sırasıyla; minimum ve maksimum değerler gösterilmiştir.

## C. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

### PECAM BOYAMALARI

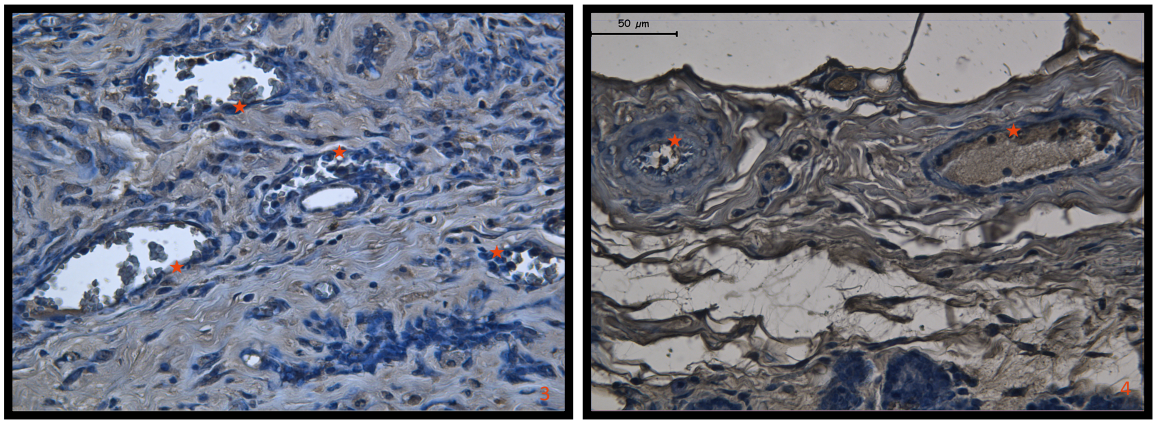
#### PECAM İmmünreaktivite Değerlendirme Sonucu

Damar yoğunluğu açısından en az damar ve kapiller yapıları ile karşılaşılan ve PECAM immünreaktivitesinin en zayıf olduğu grupların, flep proksimalinden yapılan incelemelerde sırasıyla, grup 1, 2 ve 6, flep distalinden yapılan incelemelerde sırasıyla ise grup 1, 2 ve 6 olduğu belirlendi. BTx-A'nın hem damar hem de flebe uygulandığı grup 7'de damar oluşumunun en yoğun düzeyde olduğu saptandı. Bunu distal ve proksimallerde aynı olmak üzere grup 3 ve 5 izledi. Yapılan değerlendirmede, BTx-A'nın damar çevresi ya da flebe herhangi bir şekilde uygulanmasının damar oluşumunu kesin olarak arttırdığı düşünüldü. Hem damar sayım değerleri, hem de PECAM immünreaktivite yoğunluğu bu bulguların göstergesi olarak kabul edildi. Tüm grupların distallerinde ise genel olarak; nekrozun göstergesi olan lenfosit infiltrasyonu belirgin olarak izlendi. Lenfosit infiltrasyonu proksimal kesitlerde sadece bazı gruplarda ve yer yer görüldü. Distallerde belirgin bir nekroz olduğu kabul edildi ancak bu durumun az da olsa süregelmekte olan damar oluşumunu engellemediği kanısına varıldı. BTx-A uygulamasının proksimallerde daha çok olmak üzere, distallerde de damar oluşumunu tetiklediği sonucuna varıldı.



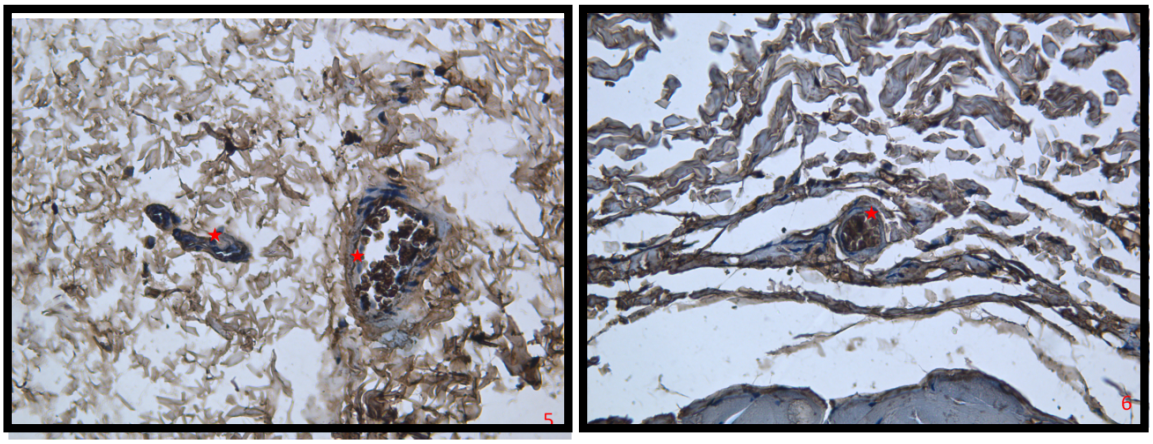
**Fotoğraf 1-2:**

Grup 1 (sham) 3.gün proksimal (1) ve distal (2) deri dokusu örneğinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilenx400).



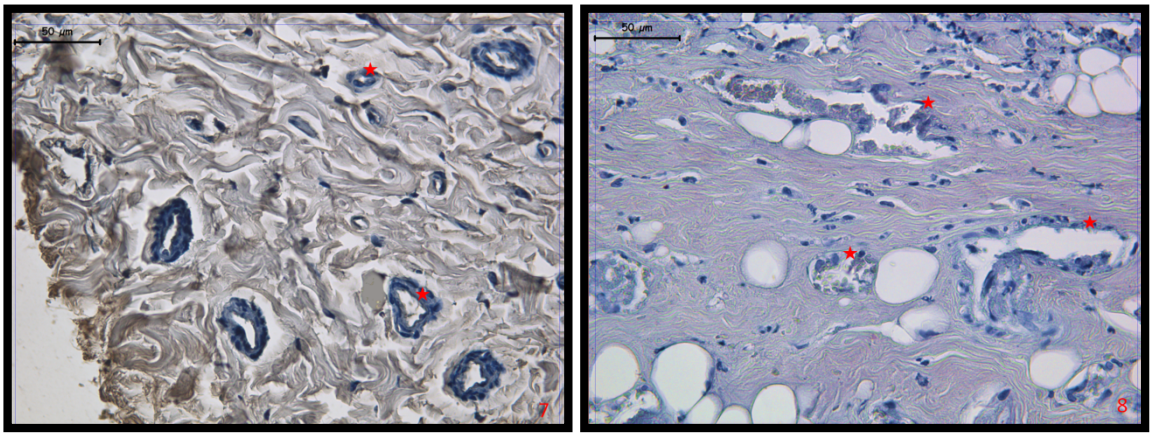

**Fotoğraf 3-4:**

Grup 1 (sham) 10.gün proksimal (3) ve distal (4) deri dokusu örneğinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilenx400).



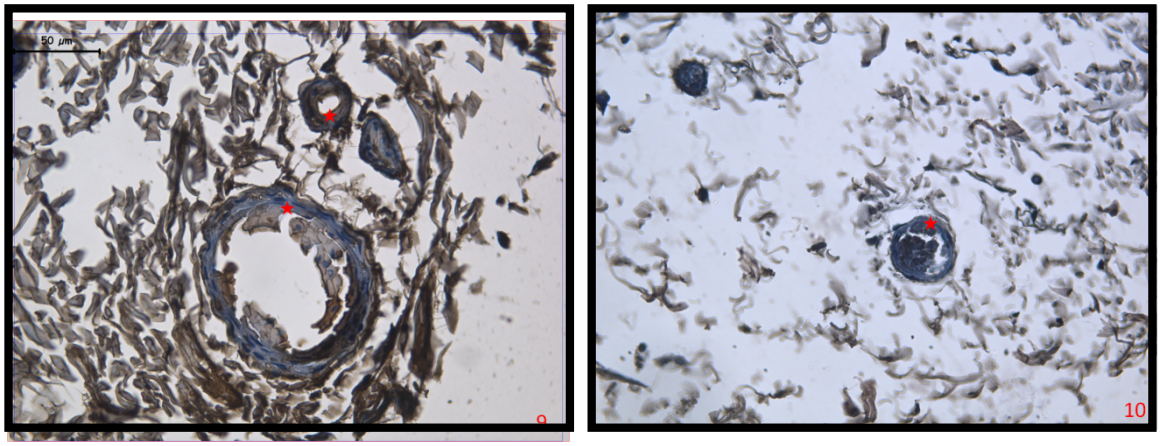
**Fotoğraf 5-6:**

Grup 2 (perivaskülerSF enjeksiyonu) 3.gün proksimal (5) ve distal (6) deri dokusu örneğinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



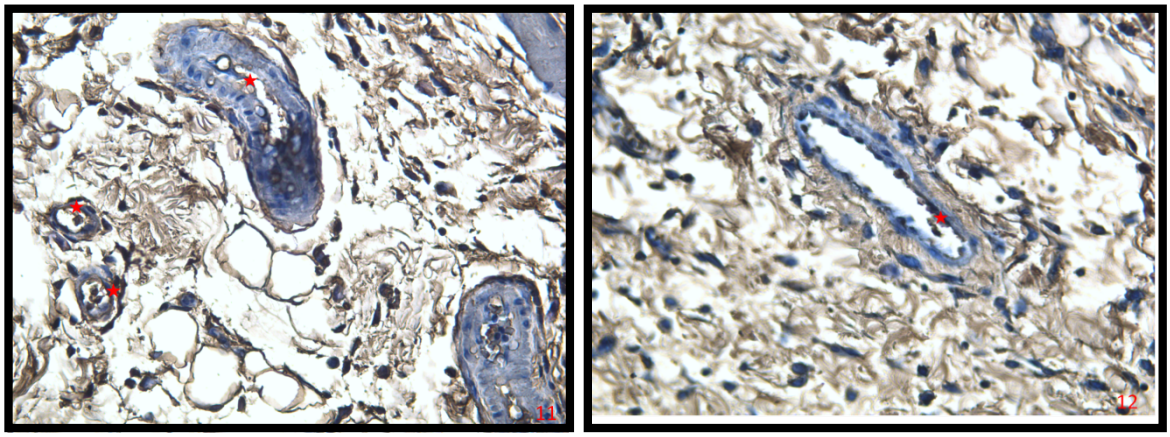
**Fotoğraf 7-8:**

Grup 2 (perivaskülerSF enjeksiyonu) 10.gün proksimal (7) ve distal (8) deri dokusu örneğinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



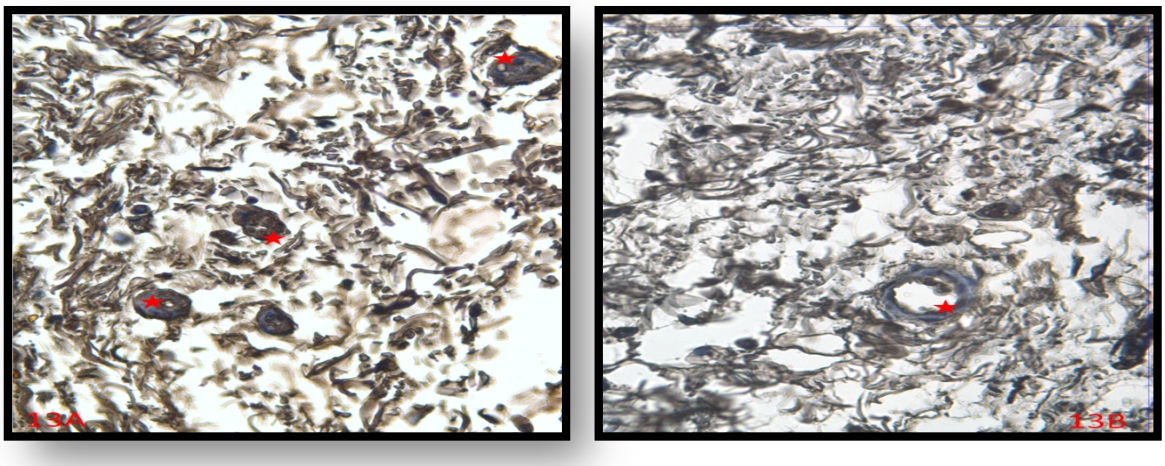

**Fotoğraf 9-10:**

Grup 3 (perivaskülerBTx-A enjeksiyonu) 3.gün proksimal (9) ve distal (10) deri dokusu örneğinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



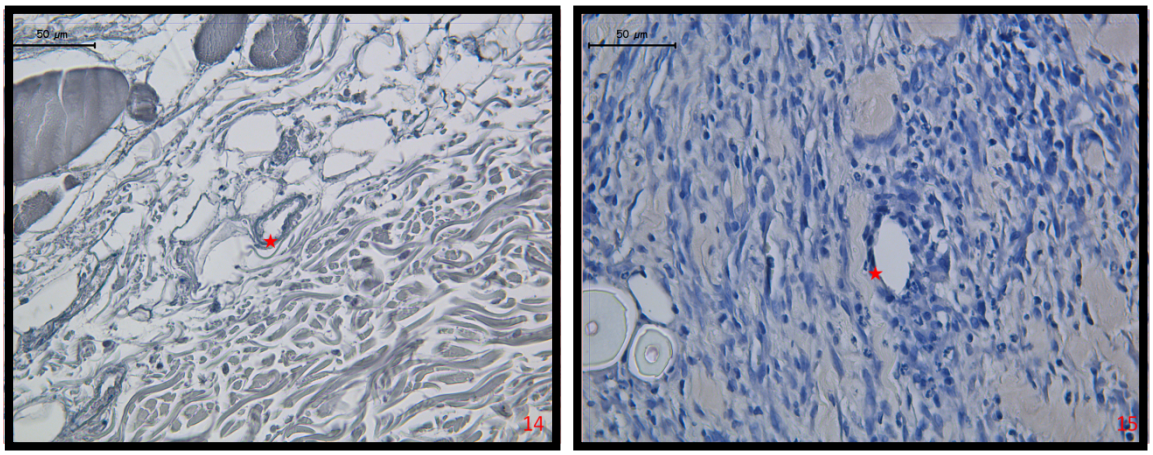

**Fotoğraf 11-12:**

Grup 3 (perivaskülerBTx-A enjeksiyonu) 10.gün proksimal (11) ve distal (12) deri dokusu örneğinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



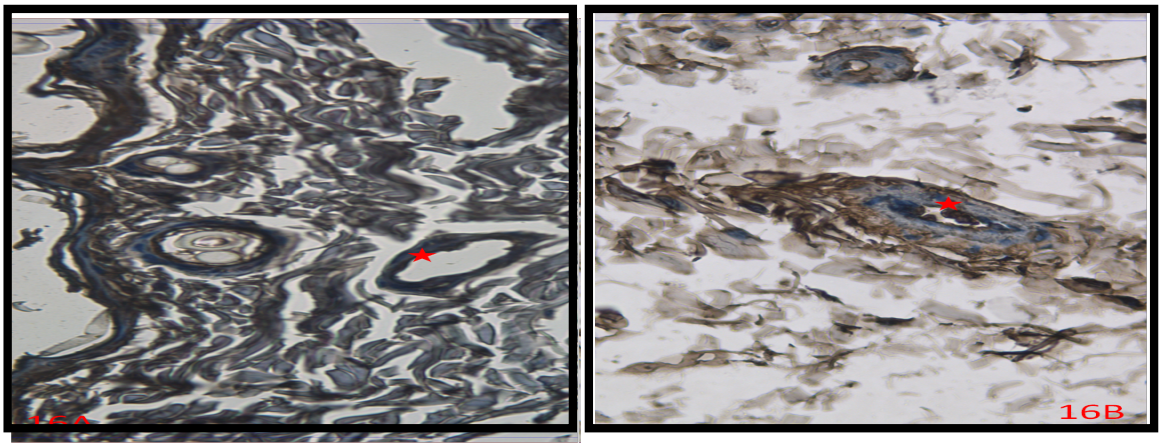

**Fotoğraf 13:**

Grup 4 (flebe SF enjeksiyonu) 3.gün proksimal (13A) ve distal (13B) deri dokusu örneklerinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



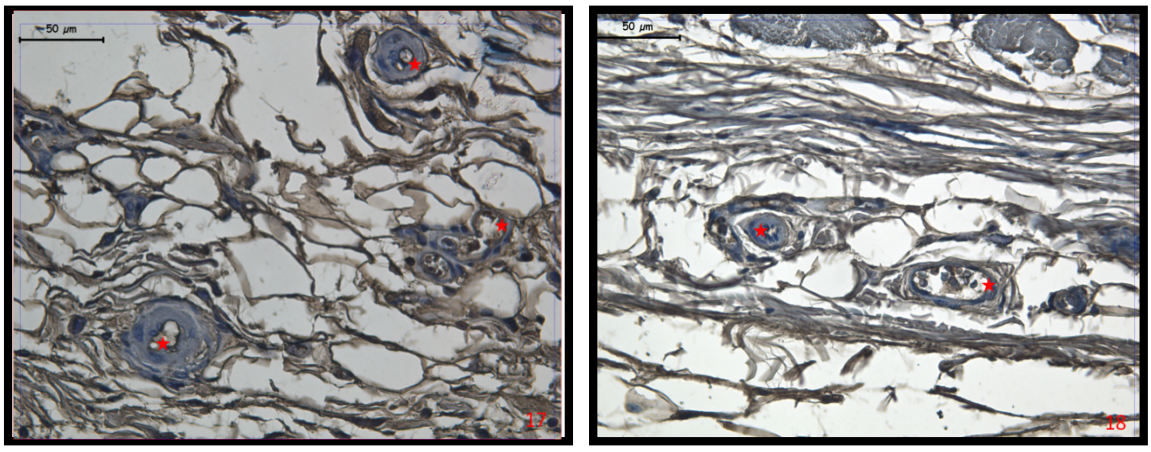

**Fotoğraf 14-15:**

Grup 4 (flebe SF enjeksiyonu) 10.gün proksimal (14) ve distal (15) deri dokusu örneğinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



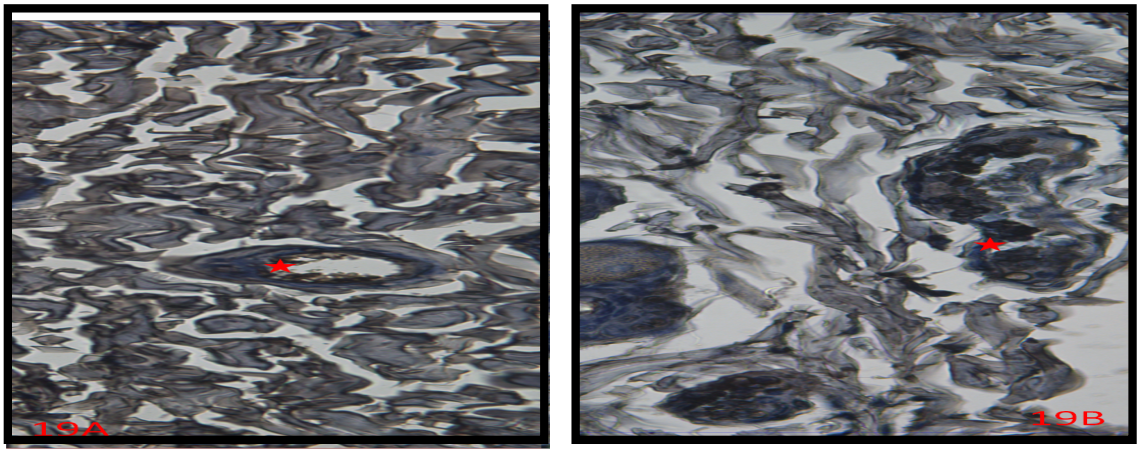

**Fotoğraf 16:**

Grup 5 (flebe BTx-A enjeksiyonu) 3.gün proksimal (16A) ve distal (16B) deri dokusu örneklerinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



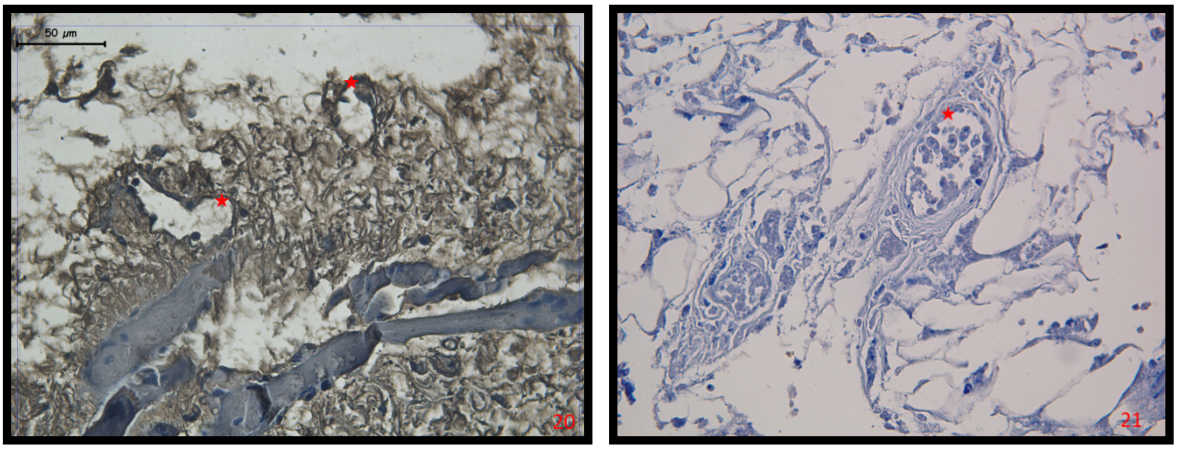

**Fotoğraf 17-18:**

Grup 5 (flebe BTx-A enjeksiyonu)10.gün proksimal (17) ve distal (18) deri dokusu örneğinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



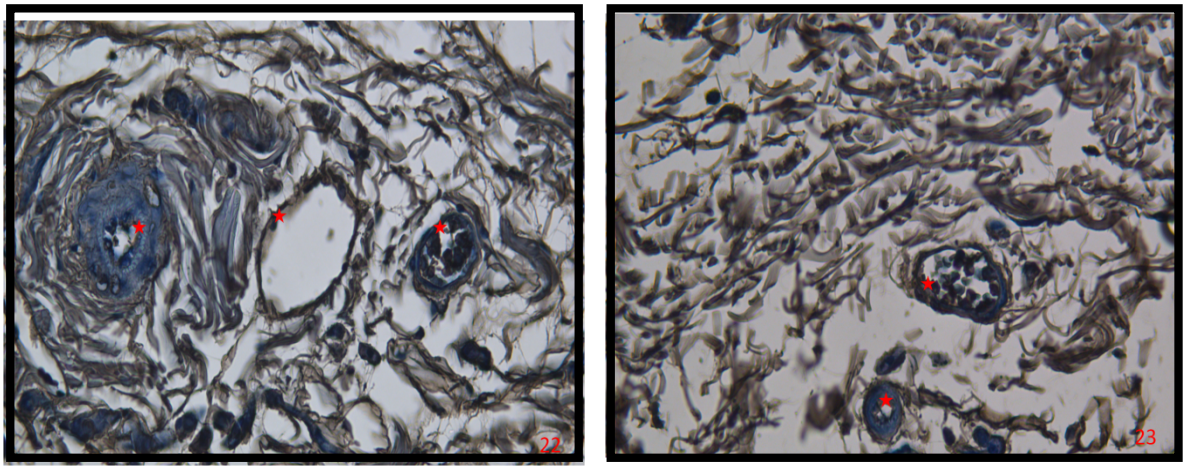

**Fotoğraf 19:**

Grup 6 (perivaskülerve flebe SF enjeksiyonu) 3.gün proksimal (19A) ve 3.gün distal (19B) deri dokusu örneklerinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



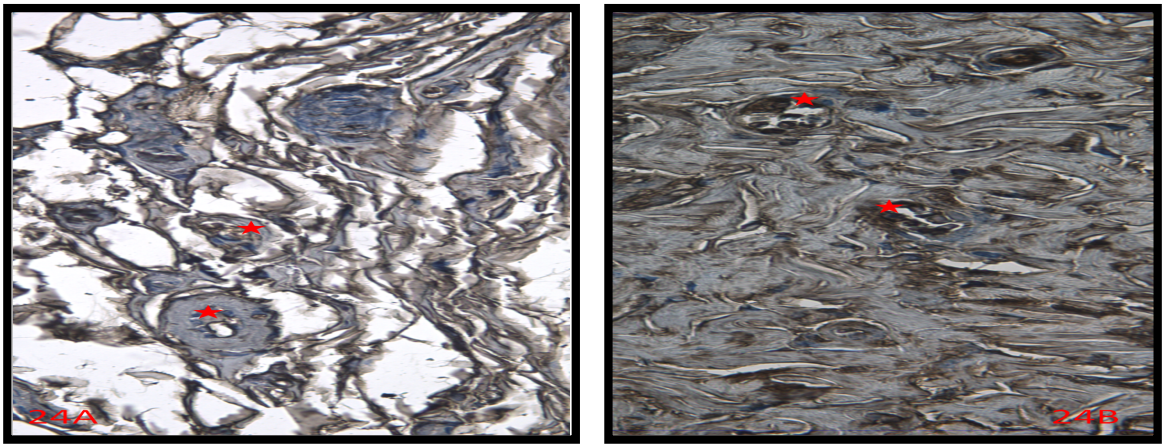

**Fotoğraf 20-21:**

Grup 6 (perivaskülerve flebe SF enjeksiyonu) 10.gün proksimal (20) ve distal (21) deri dokusu örneklerinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).




**Fotoğraf 22-23:**

Grup 7 (perivaskülerve flebe BTx-A enjeksiyonu) 3.gün proksimal (22) ve distal (23) deri dokusu örneklerinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



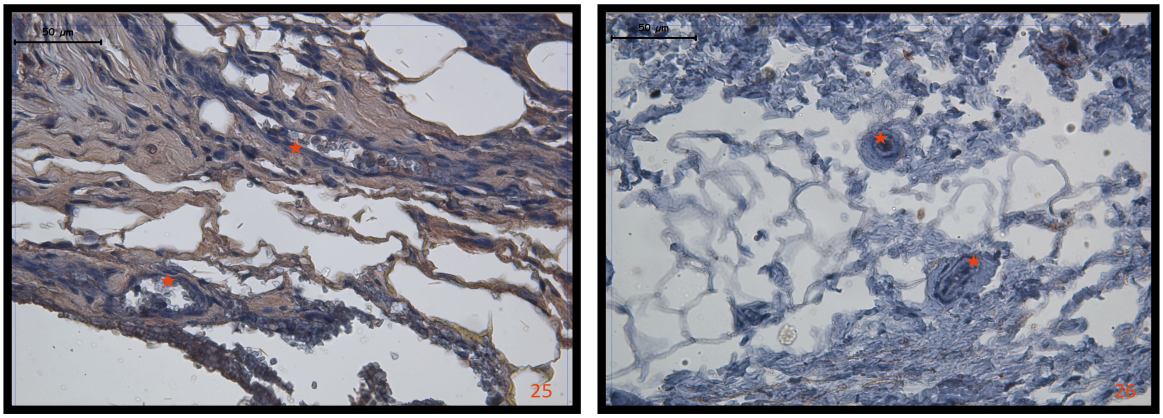

**Fotoğraf 24:**

Grup 7 (perivaskülerve flebe BTx-A enjeksiyonu) 10.gün proksimal (24A) ve distal (24B) deri dokusu örneklerinde PECAM immünreaktivitesi, damar endoteli (★)(İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).

## e-NOS BOYAMALARI

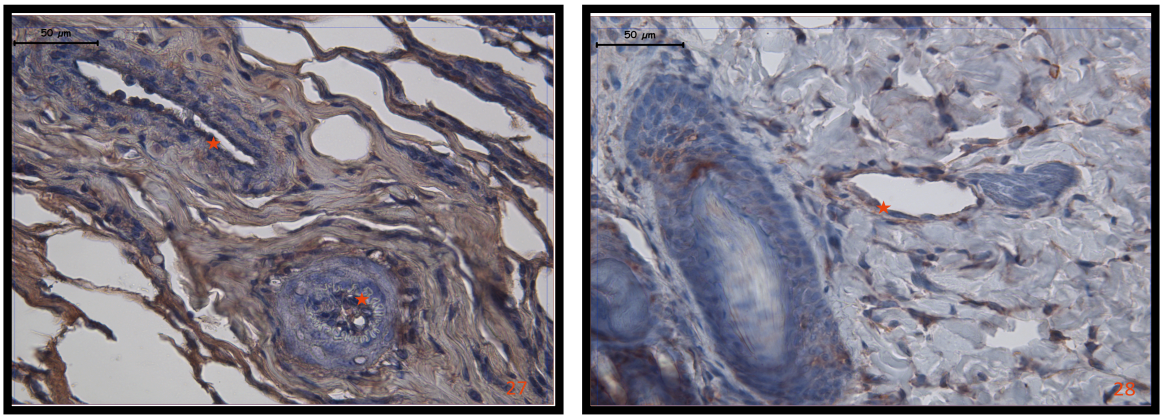
### e-NOS İmmünreaktivite Değerlendirme Sonucu

Çalışmamızda anjiyogenez düzenlenmesinde çok önemli bir molekül olarak karşımıza çıkan nitrik oksit sentezinde önemli rolü olane-NOS immünreaktivitesi değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda endoteliyal nitrik oksit sentazın hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu artırdığı ancak nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin yara iyileşmesini bozduğu bildirilmiştir. Anjiyogenezin temelini oluşturan, vasküler endoteliyal hücrelerin mitozunda önemli role sahip olan VEGF'nin NO ürünü endotelyal nitrik oksit sentaz (e-NOS) proteini tarafından arttırıldığı da bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da, deney grupları arasında e-NOS immünreaktivitesi değerlendirildiğinde; BTx-A uygulaması yapılan gruplar, serum fizyolojik uygulanan ve sadece flebin kaldırıldığı gruplarla karşılaştırıldıklarında, e-NOS immünreaktivitesinin BTx-A uygulaması ile arttığı saptanmıştır. Damar oluşumu sırasında dokuda artış gösteren VEGF tarafından tetiklendiği bilinen ve endotel hücrelerince salınan e-NOS immünreaktivitesinin yüksek olduğu BTx-A deney gruplarında damar oluşumunun artmış olduğu kanısına varılmıştır.



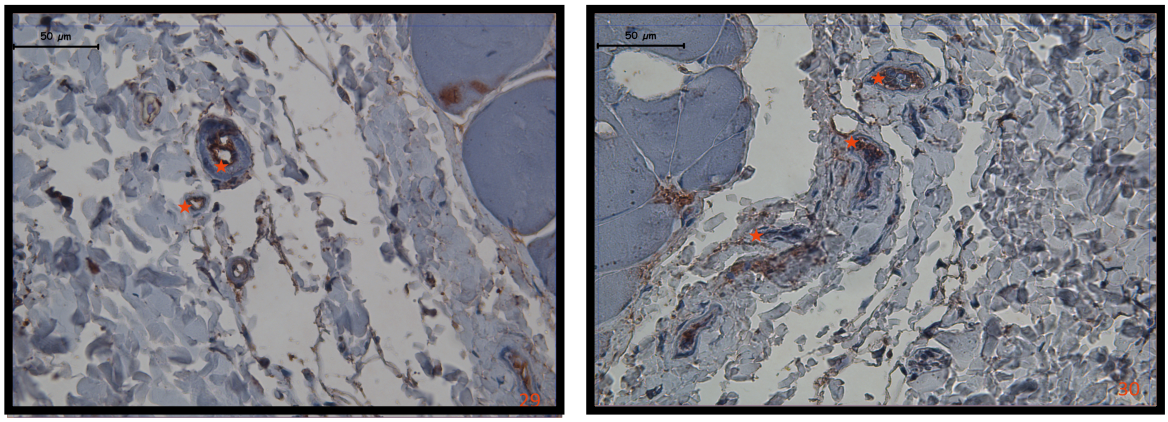

**Fotoğraf 25-26:**

Grup 1 (sham) 3.gün proksimal (25) ve distal (26) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilenx400).



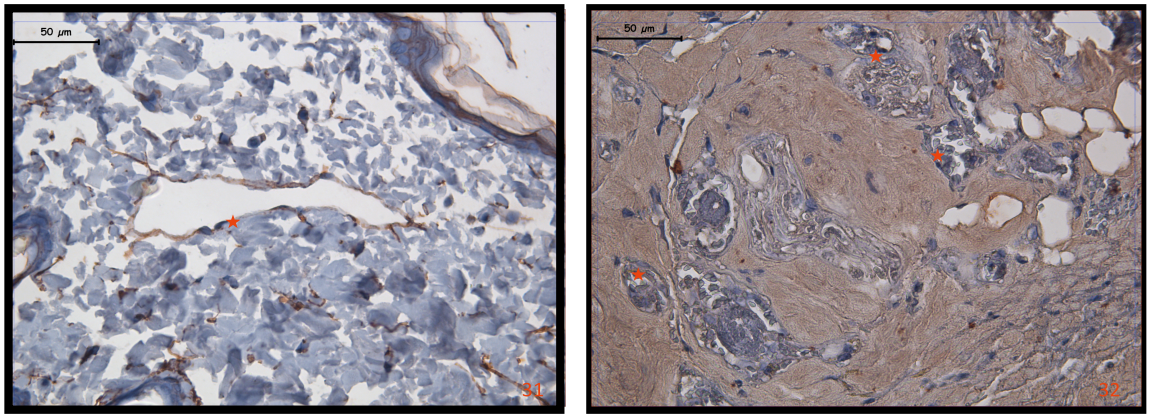

**Fotoğraf 27-28:**

Grup 1 (sham) 10.gün proksimal (27) ve distal (28) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilenx400).



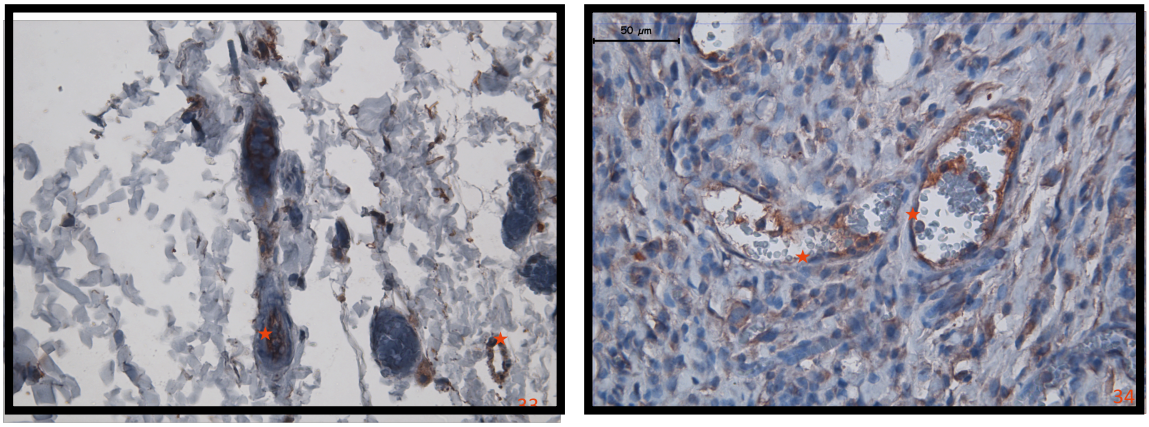

**Fotoğraf 29-30:**

Grup 2 (perivaskülerSF enjeksiyonu) 3.gün proksimal (29) ve distal (30) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilenx400).



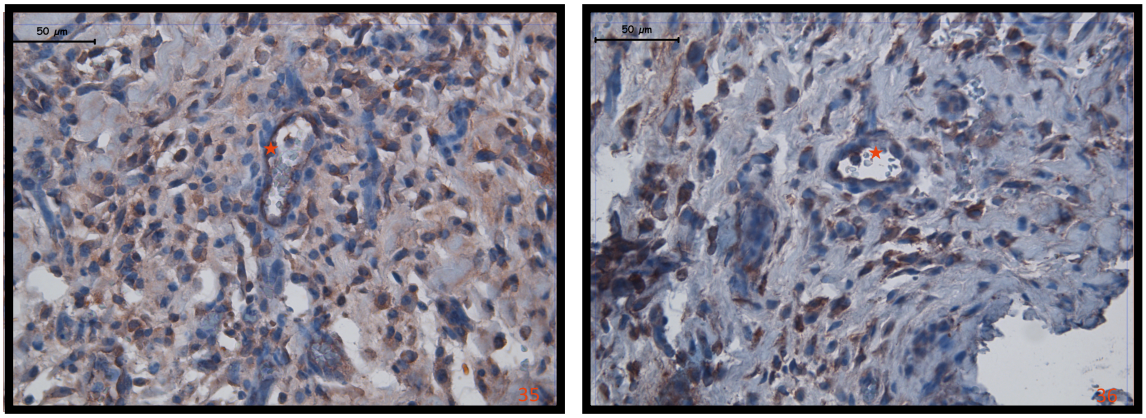

**Fotoğraf 31-32:**

Grup 2 (perivaskülerSF enjeksiyonu) 10.gün proksimal (31) ve distal (32) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilenx400).



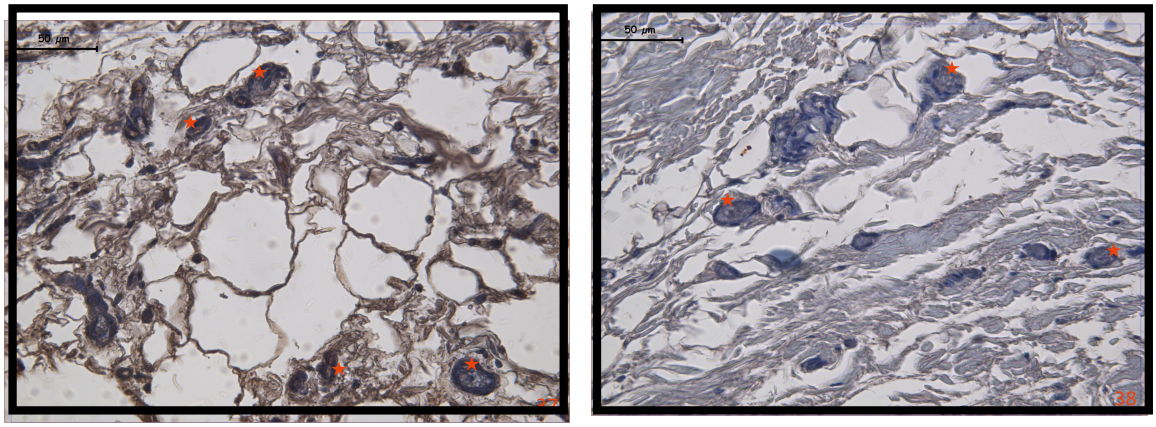

**Fotoğraf 33-34:**

Grup 3 (perivaskülerBTx-A enjeksiyonu) 3.gün proksimal (33) ve distal (34) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



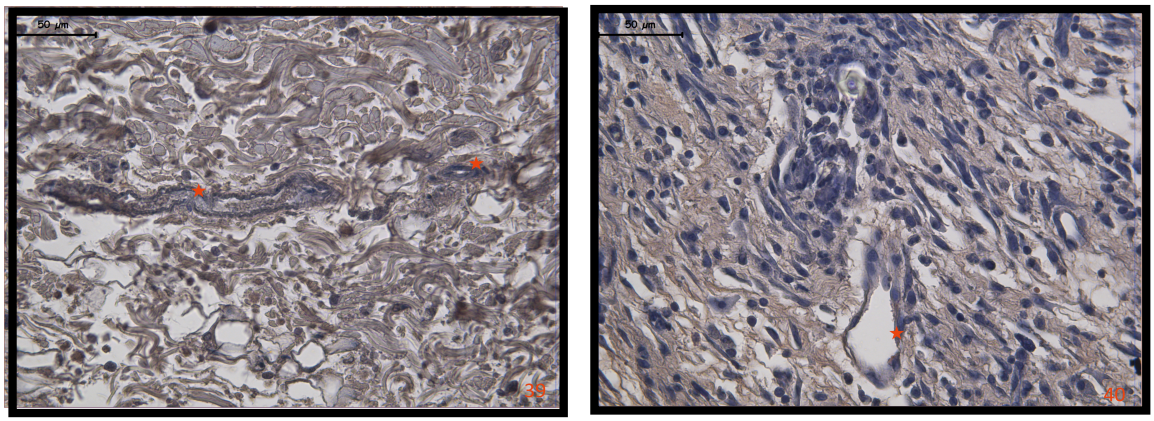

**Fotoğraf 35-36:**

Grup 3 (perivaskülerBTx-A enjeksiyonu) 10.gün proksimal (35) ve distal (36) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



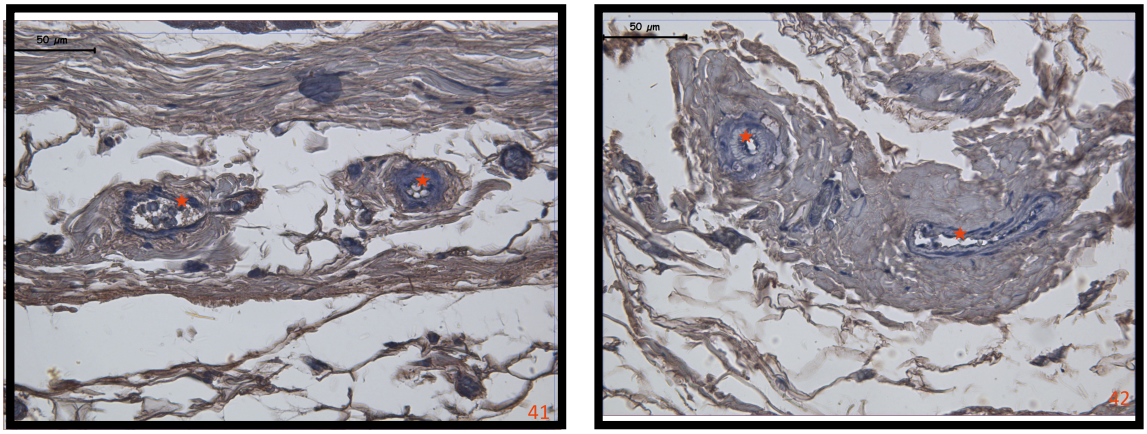
**Fotoğraf 37-38:**

Grup 4 (flebe SF enjeksiyonu) 3.gün proksimal (37) ve distal (38) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



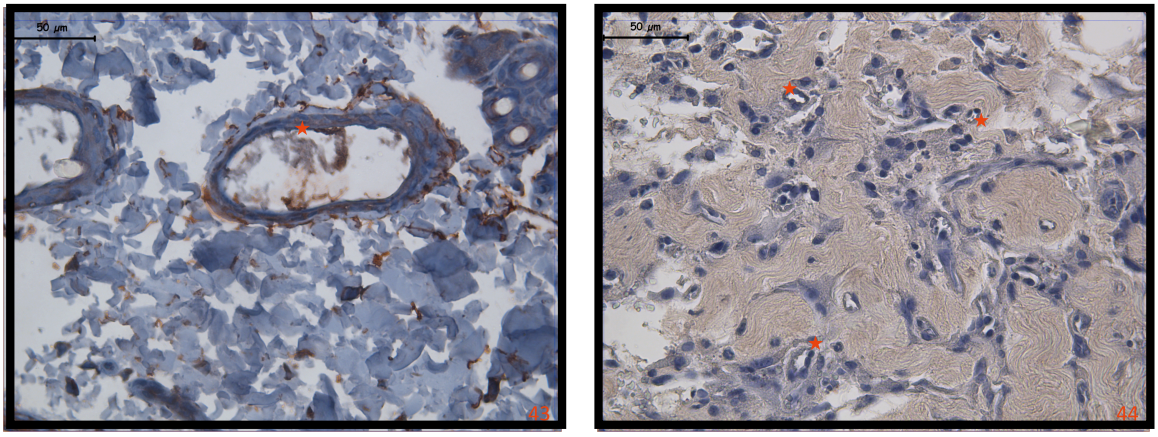
**Fotoğraf 39-40:**

Grup 4 (flebe SF enjeksiyonu) 10.gün proksimal (39) ve distal (40) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



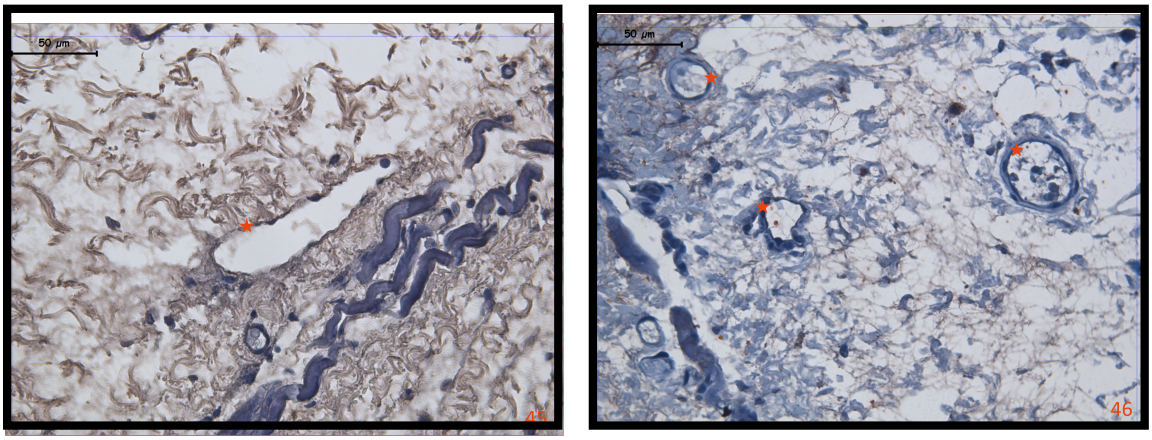

**Fotoğraf 41-42:**

Grup 5(flebe BTx-A enjeksiyonu) 3.gün proksimal (41) ve distal (42) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



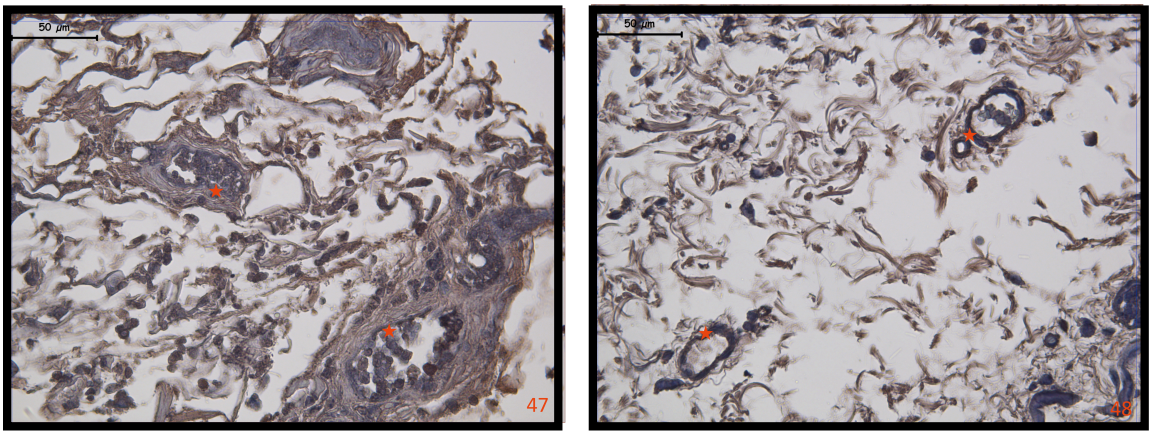

**Fotoğraf 43-44:**

Grup 5 (flebe BTx-A enjeksiyonu) 10.gün proksimal (43) ve distal (44) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



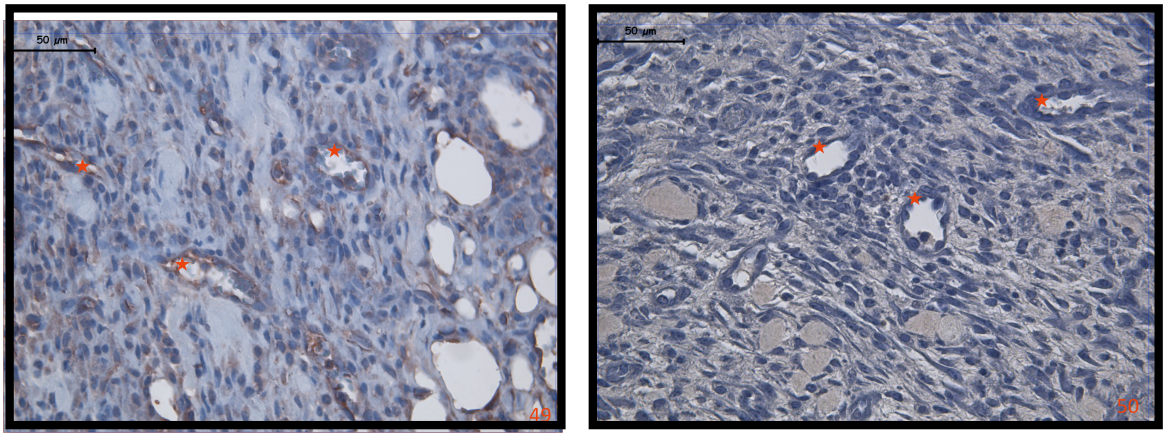
**Fotoğraf 45-46:**

Grup 6 (perivaskülerve flebe SF enjeksiyonu) 3.gün proksimal (45) ve distal (46) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).



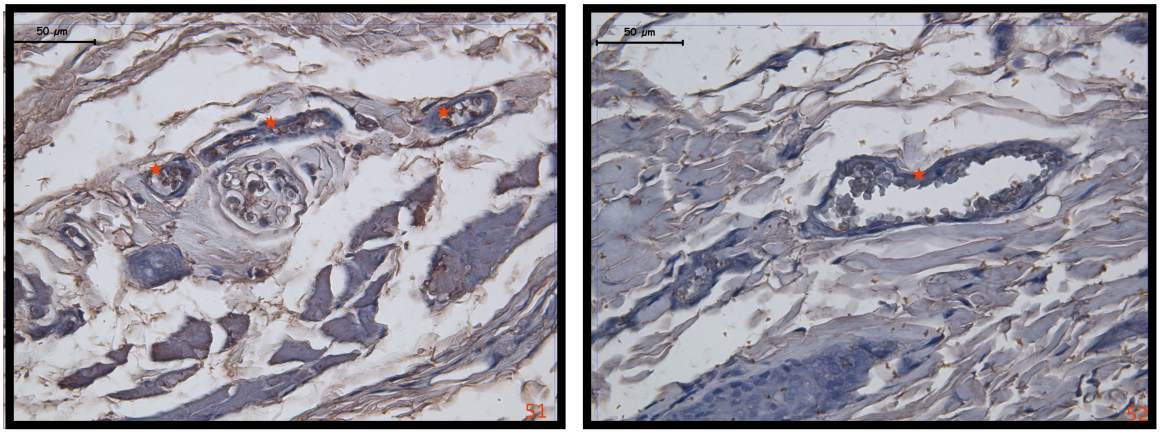
**Fotoğraf 47-48:**

Grup 6 (perivaskülerve flebe SF enjeksiyonu) 10.gün proksimal (47) ve distal (48) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).




**Fotoğraf 49-50:**

Grup 7 (perivaskülerve flebe BTx-A enjeksiyonu) 3.gün proksimal (49) ve distal (50) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).




**Fotoğraf 51-52:**

Grup 7 (perivasküler ve flebe BTx-A enjeksiyonu) 10.gün proksimal (51) ve distal (52) deri dokusu örneğinde e-NOS immünreaktivitesi, damar endoteli (★) (İmmünperoksidaz& Hematoksilen x400).

**Boyanma Tutulum Yoğunluğuna Göre Değerlendirildiğinde**

Çalışmanın 3. gününde proksimal bölgeden alınan doku örneklerinde immünohistokimyasal değerlendirme bulgu tablosu**(Tablo 6)**

| **3. gün Proksimal** | **Tutulum Yoğunluğu/Denek No** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Grup-1 (Sham)** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** | **1** |
| **Grup-2 (Perivasküler SF enj.)** | **2** | **3** | **3** | **2** | **2** | **3** |
| **Grup-3 (Perivasküler BTx-A enj.)** | **3** | **2** | **3** | **2** | **3** | **3** |
| **Grup-4 (Flebe SF enj.)** | **2** | **1** | **2** | **2** | **1** | **2** |
| **Grup-5 (Perivasküler BTx-A enj.)** | **3** | **2** | **3** | **3** | **3** | **2** |
| **Grup-6 (Perivasküler +Flebe SF enj.)** | **3** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** |
| **Grup-7 (Perivasküler +Flebe Btx enj.)** | **3** | **2** | **3** | **3** | **3** | **3** |

Çalışmanın 3. gününde distal bölgeden alınan doku örneklerinde immünohistokimyasal değerlendirme bulgu tablosu**(Tablo 7)**

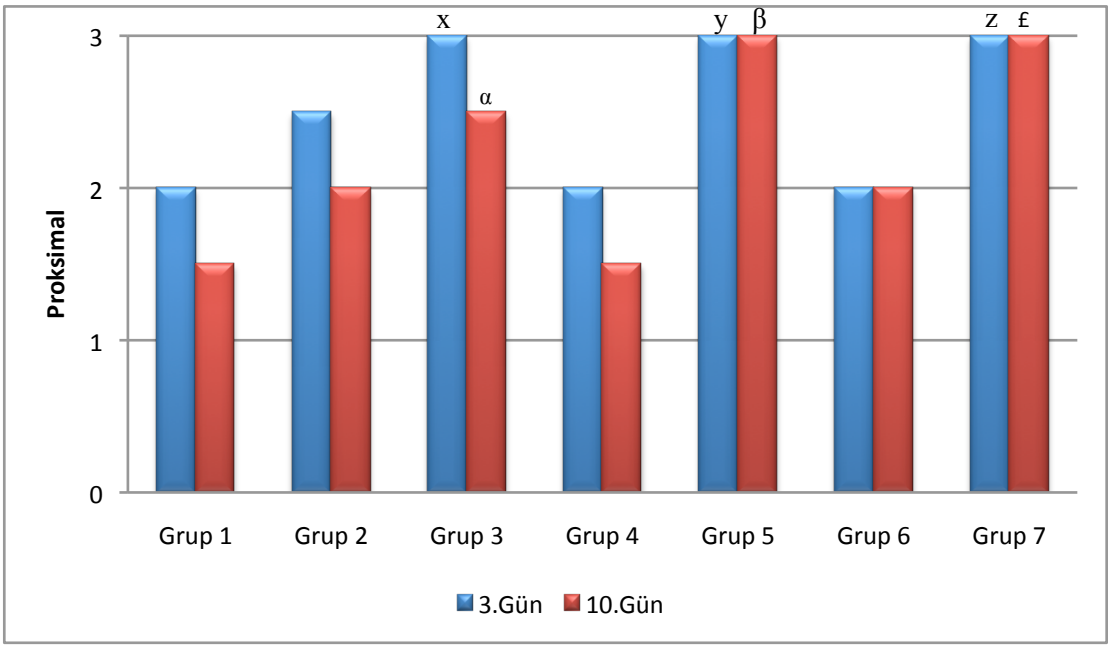
| **3. gün Distal** | **Tutulum Yoğunluğu/Denek No** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Grup-1 (Sham)** | **1** | **2** | **2** | **2** | **1** | **2** |
| **Grup-2 (Perivasküler SF enj.)** | **2** | **1** | **1** | **2** | **2** | **1** |
| **Grup-3 (Perivasküler BTx-A enj.)** | **3** | **3** | **2** | **3** | **2** | **2** |
| **Grup-4 (Flebe SF enj.)** | **1** | **2** | **2** | **1** | **1** | **2** |
| **Grup-5 (Perivasküler BTx-A enj.)** | **2** | **3** | **2** | **3** | **3** | **2** |
| **Grup-6 (Perivasküler +Flebe SF enj.)** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** |
| **Grup-7 (Perivasküler +Flebe Btx enj.)** | **3** | **3** | **2** | **3** | **3** | **3** |

Çalışmanın 10. gününde proksimal bölgeden alınan doku örneklerinde immünohistokimyasal değerlendirme bulgu tablosu **(Tablo 8)**

| **10. gün Proksimal** | **Tutulum Yoğunluğu/Denek No** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Grup-1 (Sham)** | **1** | **2** | **2** | **2** | **1** | **2** |
| **Grup-2 (Perivasküler SF enj.)** | **2** | **1** | **1** | **2** | **2** | **1** |
| **Grup-3 (Perivasküler BTx-A enj.)** | **3** | **3** | **2** | **3** | **2** | **2** |
| **Grup-4 (Flebe SF enj.)** | **1** | **2** | **2** | **1** | **1** | **2** |
| **Grup-5 (Perivasküler BTx-A enj.)** | **2** | **3** | **2** | **3** | **3** | **2** |
| **Grup-6 (Perivasküler +Flebe SF enj.)** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** | **2** |
| **Grup-7 (Perivasküler +Flebe Btx enj.)** | **3** | **3** | **2** | **3** | **3** | **3** |

Çalışmanın 10. gününde distal bölgeden alınan doku örneklerinde immünohistokimyasal değerlendirme bulgu tablosu **(Tablo 9)**

| **10. gün Distal** | **Tutulum Yoğunluğu/Denek No** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Gruplar** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** |
| **Grup-1 (Sham)** | **1** | **1** | **2** | **1** | **1** | **1** |
| **Grup-2 (Perivasküler SF enj.)** | **2** | **1** | **1** | **2** | **1** | **1** |
| **Grup-3 (Perivasküler BTx-A enj.)** | **2** | **3** | **2** | **3** | **3** | **2** |
| **Grup-4 (Flebe SF enj.)** | **1** | **1** | **2** | **1** | **2** | **2** |
| **Grup-5 (Perivasküler BTx-A enj.)** | **3** | **2** | **2** | **3** | **3** | **2** |
| **Grup-6 (Perivasküler +Flebe SF enj.)** | **1** | **1** | **1** | **1** | **2** | **1** |
| **Grup-7 (Perivasküler +Flebe Btx enj.)** | **3** | **2** | **3** | **2** | **3** | **3** |



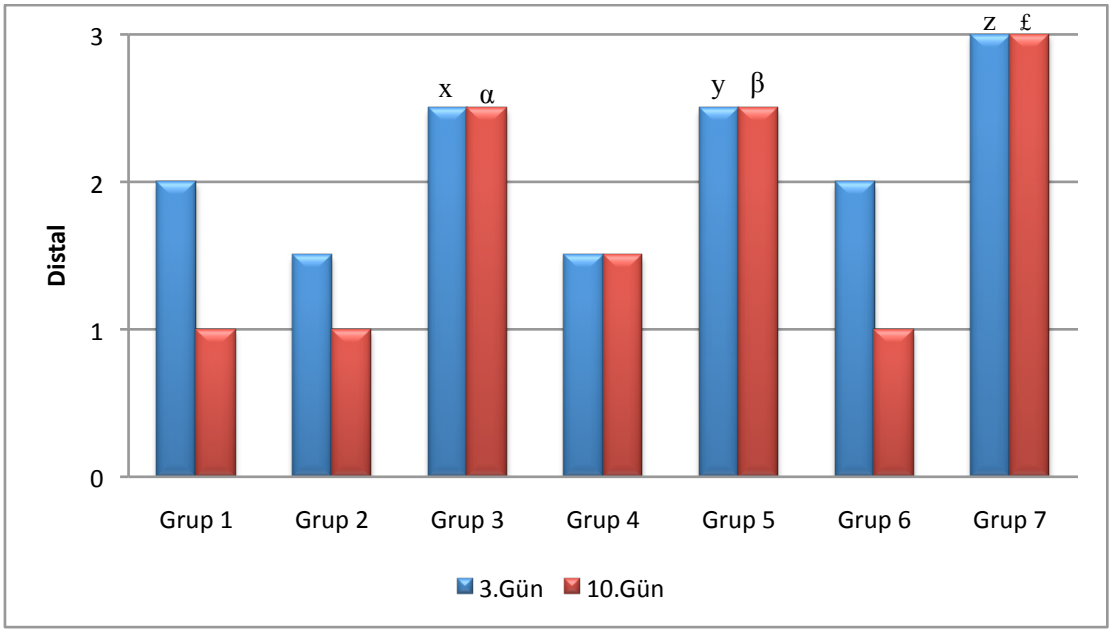

**Grafik 1:** 3. ve 10. günde proksimal doku örneklerinden yapılan immünohistokimyasal tutulum yoğunluğunun gruplar arasında karşılaştırılması

x, y ve z gruplarında, diğer grupların 3. gün değerlerine göre göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu

x, y ve z grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı

α, β ve £ gruplarında, diğer grupların 10. gün değerlerine göre göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu

α, β ve £ grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı




**Grafik 2:** 3. ve 10. günde distal doku örneklerinden yapılan immünohistokimyasal tutulum yoğunluğunun gruplar arasında karşılaştırılması

x, y ve z gruplarında, diğer grupların 3. gün değerlerine göre göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu

x, y ve z grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı

α, β ve £ gruplarında, diğer grupların 10. gün değerlerine göre göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu

α, β ve £ grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı

## D. LAZER DOPPLER FLOWMETRE AKIM ÖLÇÜM BULGULARI

**Tablo 10:** Grup 1 (sham) için flep proksimal, distal ve perivasküler alandan yapılan kan akım ölçümleri, ortalama ve standart deviasyonları

| Denek | Proksimal | Distal | Perivasküler |
|---|---|---|---|
| 1 | 5,4 | 3,2 | 22,6 |
| 2 | 5,4 | 3,1 | 23,5 |
| 3 | 4,5 | 3,5 | 23,4 |
| 4 | 3,3 | 2,4 | 22,5 |
| 5 | 4,4 | 1,5 | 25,9 |
| 6 | 4,7 | 1,1 | 28,4 |
| **Ort** | **4,6** | **2,4** | **23,3** |
| **SD** | **± 0,8** | **± 0,5** | **± 3,2** |

**Tablo 11:** Grup 2 (perivasküler SF enjeksiyonu) için flep proksimal, distal ve perivasküler alandan yapılan kan akım ölçümleri, ortalama ve standart deviasyonları

| Denek | Proksimal | Distal | Perivasküler |
|---|---|---|---|
| 1 | 6,1 | 3,1 | 27,5 |
| 2 | 5,9 | 2,9 | 26,8 |
| 3 | 5,1 | 2,8 | 25,4 |
| 4 | 5,8 | 3,3 | 25,2 |
| 5 | 3,6 | 1,3 | 24,1 |
| 6 | 5,0 | 3,7 | 26,3 |
| **Ort** | **5,6** | **2,8** | **25,9** |
| **SD** | **± 0,6** | **± 0,3** | **± 4,1** |

**Tablo 12:** Grup 3 (perivasküler BTx-A enjeksiyonu) için flep proksimal, distal ve perivasküler alandan yapılan kan akım ölçümleri, ortalama ve standart deviasyonları

| Denek | Proksimal | Distal | Perivasküler |
|---|---|---|---|
| 1 | 6,8 | 3,6 | 47,5 |
| 2 | 6,5 | 3,7 | 57,6 |
| 3 | 6,9 | 3,9 | 56,4 |
| 4 | 7,1 | 4,1 | 46,7 |
| 5 | 7,2 | 4,5 | 54,5 |
| 6 | 7,6 | 4,7 | 57,3 |
| **Ort** | **6,5** | **3,6** | **53,3** |
| **SD** | **± 0,9** | **± 0,5** | **± 6,4** |

**Tablo 13:** Grup 4 (flebe SF enjeksiyonu) için flep proksimal, distal ve perivasküler alandan yapılan kan akım ölçümleri, ortalama ve standart deviasyonları

| Denek | Proksimal | Distal | Perivasküler |
|---|---|---|---|
| 1 | 5,1 | 2,7 | 28,6 |
| 2 | 4,9 | 2,5 | 29,1 |
| 3 | 5,6 | 2,9 | 34,0 |
| 4 | 4,4 | 3,1 | 33,2 |
| 5 | 5,1 | 2,6 | 28,5 |
| 6 | 4,5 | 3,2 | 24,6 |
| **Ort** | **5,4** | **2,5** | **31,8** |
| **SD** | **± 0,6** | **± 0,3** | **± 4,4** |

**Tablo 14:** Grup 5 (flebe BTx-A enjeksiyonu) için flep proksimal, distal ve perivasküler alandan yapılan kan akım ölçümleri, ortalama ve standart deviasyonları

| Denek | Proksimal | Distal | Perivasküler |
|---|---|---|---|
| 1 | 5,2 | 3,2 | 34,1 |
| 2 | 5,3 | 3,1 | 30,7 |
| 3 | 5,5 | 3,0 | 23,2 |
| 4 | 5,5 | 3,1 | 32,4 |
| 5 | 5,1 | 3,3 | 25,5 |
| 6 | 5,2 | 3,2 | 34,3 |
| **Ort** | **5,3** | **3,1** | **30,1** |
| **SD** | **± 0,4** | **± 0,2** | **± 3,4** |

**Tablo 15:** Grup 6 (perivasküler ve flebe SF enjeksiyonu) için flep proksimal, distal ve perivasküler alandan yapılan kan akım ölçümleri, ortalama ve standart deviasyonları

| Denek | Proksimal | Distal | Perivasküler |
|---|---|---|---|
| 1 | 4,0 | 1,4 | 22,7 |
| 2 | 4,2 | 2,4 | 28,2 |
| 3 | 4,3 | 2,1 | 27,5 |
| 4 | 5,1 | 3,1 | 33,1 |
| 5 | 4,1 | 2,7 | 32,1 |
| 6 | 5,2 | 2,5 | 33,4 |
| **Ort** | **4,4** | **2,3** | **29,5** |
| **SD** | **± 0,2** | **± 0,1** | **± 4,1** |

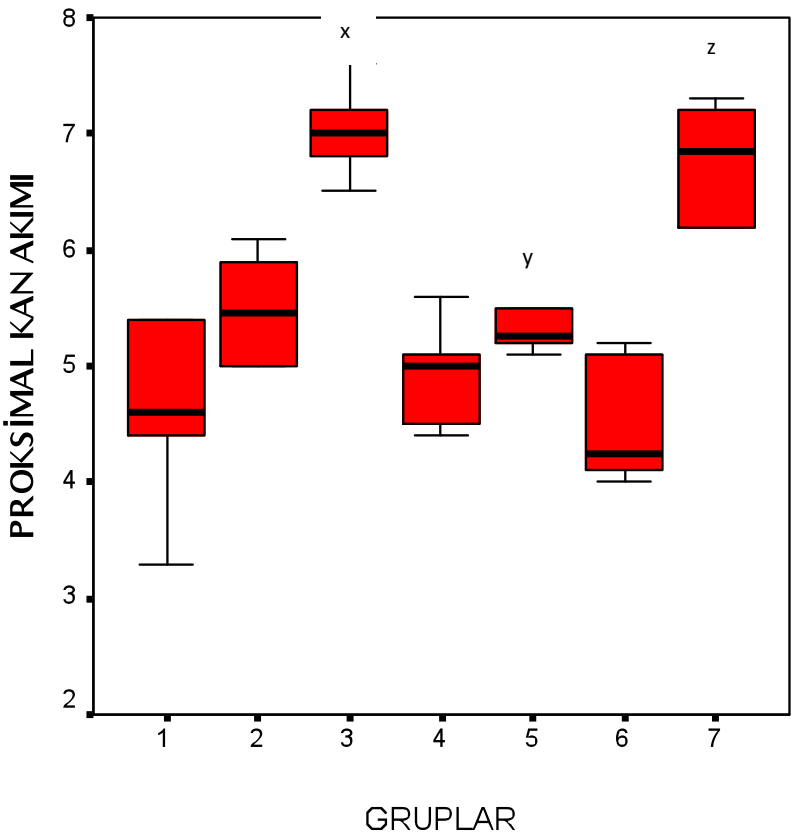
**Tablo 16:** Grup 7 (perivasküler ve flebe BTx-A enjeksiyonu) için flep proksimal, distal ve perivasküler alandan yapılan kan akım ölçümleri, ortalama ve standart deviasyonları

| Denek | Proksimal | Distal | Perivasküler |
|---|---|---|---|
| 1 | 6,6 | 4,3 | 55,2 |
| 2 | 6,2 | 3,5 | 54,5 |
| 3 | 7,1 | 3,3 | 51,3 |
| 4 | 6,2 | 3,0 | 54,5 |
| 5 | 7,3 | 3,8 | 54,7 |
| 6 | 7,2 | 3,2 | 53,6 |
| **Ort** | **6,7** | **3,5** | **53,9** |
| **SD** | **± 0,7** | **± 0,4** | **± 5,2** |

**Tablo 17.** Gruplara Göre Proksimaldeki Lazer Doppler Flowmetre Kan Akım Ölçümlerine Ait Demografik İstatistikler (**Şekil 24)**

| Gruplar | Ortalama | SD | Ortanca | ÇAG | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4,6 | 0,78 | 4,6 | 1,28 | 3,3 | 5,4 |
| 2 | 5,3 | 0,92 | 5,5 | 1,30 | 3,6 | 6,1 |
| 3 | 7,0 | 0,38 | 7,0 | 0,58 | 6,5 | 7,6 |
| 4 | 4,9 | 0,44 | 5,0 | 0,75 | 4,4 | 5,6 |
| 5 | 5,3 | 0,17 | 5,3 | 0,33 | 5,1 | 5,5 |
| 6 | 4,5 | 0,53 | 4,3 | 1,05 | 4,0 | 5,2 |
| 7 | 6,8 | 0,50 | 6,9 | 1,03 | 6,2 | 7,3 |

ÇAG: Çeyrekler Arası Genişlik, SD: Standart Deviasyon




**Şekil 24**

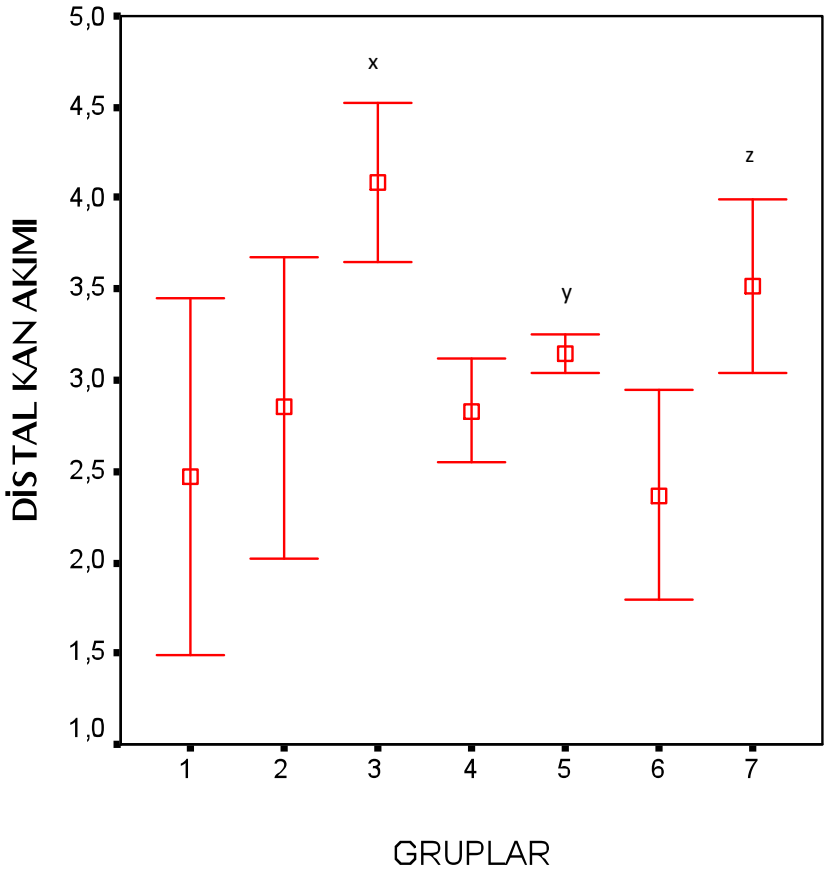
Gruplara Göre Proksimaldeki Lazer Doppler Flowmetre Kan Akım Ölçümleri

x(grup 3) ve z(grup 7) için sham grubuna göre p<0,001

**Tablo 18.** Gruplara Göre Distaldeki Lazer Doppler Flowmetre Kan Akım Ölçümlerine Ait Demografik İstatistikler (**Şekil 25**)

| Gruplar | Ortalama | SD | Ortanca | ÇAG | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2,5 | 0,98 | 2,8 | 1,88 | 1,1 | 3,5 |
| 2 | 2,9 | 0,82 | 3,0 | 0,98 | 1,3 | 3,7 |
| 3 | 4,1 | 0,44 | 4,0 | 0,88 | 3,6 | 4,7 |
| 4 | 2,8 | 0,28 | 2,8 | 0,55 | 2,5 | 3,2 |
| 5 | 3,2 | 0,10 | 3,2 | 0,15 | 3,0 | 3,3 |
| 6 | 2,4 | 0,58 | 2,5 | 0,88 | 1,4 | 3,1 |
| 7 | 3,5 | 0,47 | 3,4 | 0,77 | 3,0 | 4,3 |

ÇAG: Çeyrekler Arası Genişlik, SD: Standart Deviasyon




**Şekil 25**

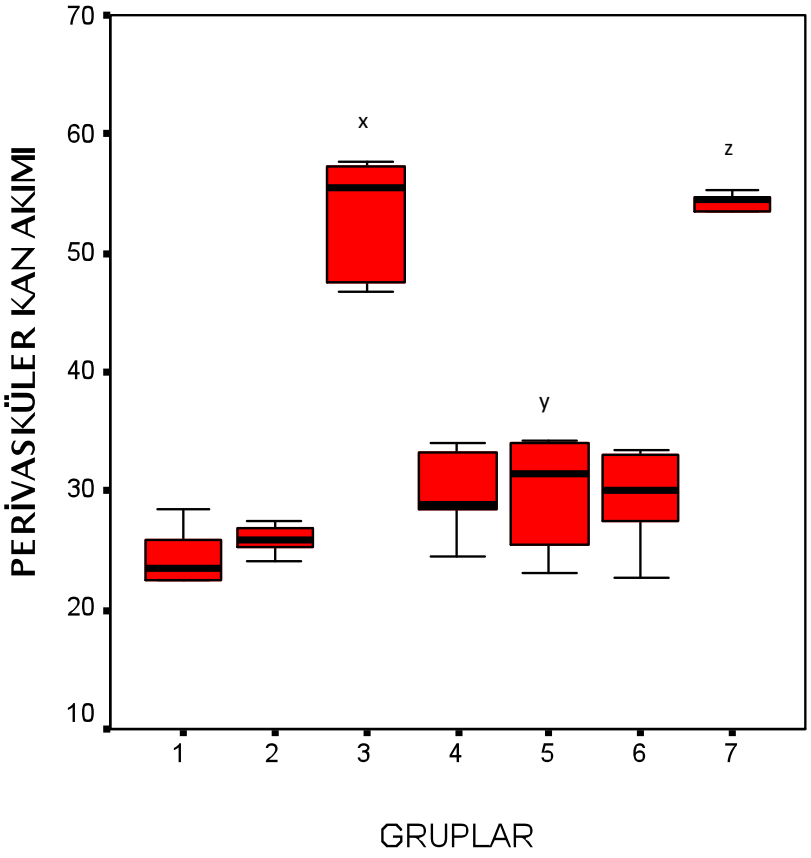
Gruplara Göre Distaldeki Lazer Doppler Flowmetre Kan Akım Ölçümleri

x(grup 3) için sham grubuna göre p<0,001iken, z(grup 7) için sham grubuna göre p=0.007

**Tablo 19.** Gruplara Göre Perivaskülerdeki Lazer Doppler Flowmetre Kan Akım Ölçümlerine Ait Demografik İstatistikler (**Şekil 26**)

| Gruplar | Ortalama | SD | Ortanca | ÇAG | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 24,4 | 2,32 | 23,5 | 3,95 | 22,5 | 28,4 |
| 2 | 25,9 | 1,23 | 25,9 | 2,05 | 24,1 | 27,5 |
| 3 | 53,3 | 4,95 | 55,5 | 10,08 | 46,7 | 57,6 |
| 4 | 29,7 | 3,46 | 28,9 | 5,88 | 24,6 | 34,0 |
| 5 | 30,0 | 4,65 | 31,6 | 9,23 | 23,2 | 34,3 |
| 6 | 29,5 | 4,17 | 30,2 | 6,88 | 22,7 | 33,4 |
| 7 | 54,0 | 1,41 | 54,5 | 1,80 | 51,3 | 55,2 |

ÇAG: Çeyrekler Arası Genişlik, SD: Standart Deviasyon




**Şekil 26:**

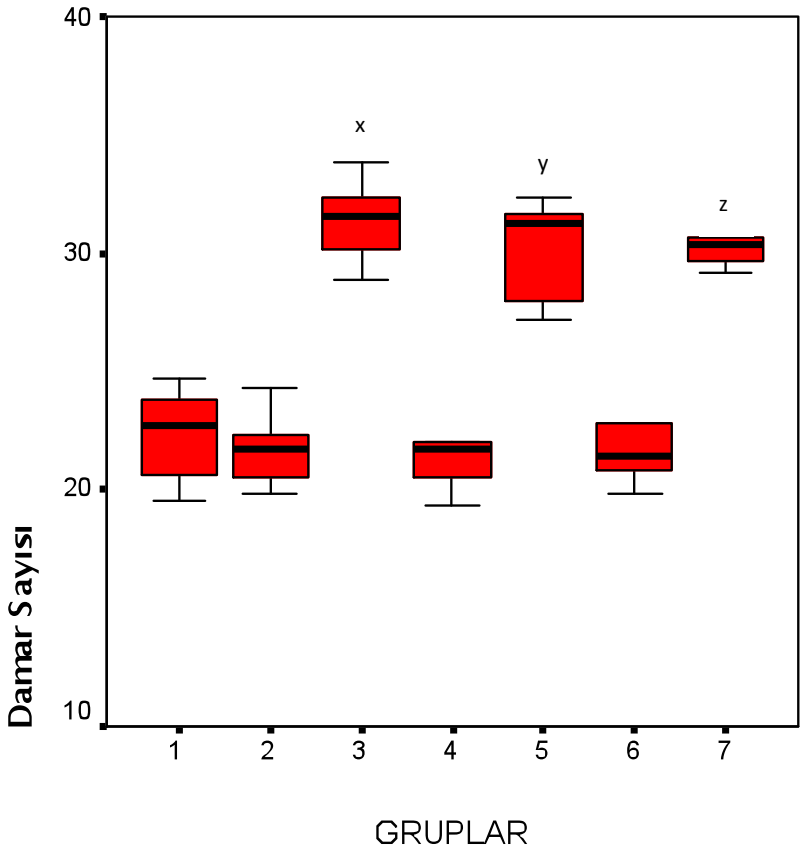
Gruplara Göre Perivaskülerdeki Lazer Doppler Flowmetre Kan Akım Ölçümleri x(grup 3) ve z(grup 7) için sham grubuna göre $p<0,001$

## E. DAMAR SAYIMI BULGULARI

**Tablo 20.** Gruplara Göre Damar Sayımına Ait Demografik İstatistikler (**Şekil 27)**

| Gruplar | Ortalama | SD | Ortanca | ÇAG | Minimum | Maksimum |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 22,4 | 1,95 | 22,8 | 3,67 | 19,5 | 24,7 |
| 2 | 21,7 | 1,57 | 21,8 | 2,50 | 19,8 | 24,3 |
| 3 | 31,4 | 1,75 | 31,6 | 2,87 | 28,8 | 33,8 |
| 4 | 21,6 | 1,74 | 21,8 | 2,42 | 19,3 | 24,5 |
| 5 | 30,3 | 2,14 | 31,3 | 4,04 | 27,2 | 32,3 |
| 6 | 22,1 | 2,23 | 21,4 | 3,08 | 19,8 | 26,2 |
| 7 | 30,6 | 1,39 | 30,3 | 1,75 | 29,2 | 33,2 |

ÇAG: Çeyrekler Arası Genişlik, SD: Standart Deviasyon (Şekil 27)




**Şekil 27:**

Gruplara Göre Damar Sayılarının Dağılımı

x(grup 3) ve y(grup 5) için sham grubuna göre p<0,001

z(grup 7) için sham grubuna göre p=0,002

**Tablo 21.** Gruplar Arasında Flep Nekroz Alanı, Proksimal, Distal ve Perivasküler den Ölçülen Doppler Flowmetre Kan Ölçümleri ve Damar Sayımı Yönünden Yapılan Çoklu Karşılaştırma Testilerine İlişkin p Değerleri

| Çoklu Karşılaştırma | Flep Nekroz Alanı | Lazer Dopler Flowmetre | | | Damar Sayımı |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Proksimal | Distal | Perivasküler | |
| **Grup I - Grup II** | p=0,609 | p=0,498 | p=0,438 | p=0,447 | p=0,586 |
| **Grup I - Grup III** | **p=0,002** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** |
| **Grup I -Grup IV** | p=0,218 | p=0,962 | p=0,988 | p=0,120 | p=0,524 |
| **Grup I - Grup V** | **p=0,043** | p=0,407 | p=0,133 | p=0,102 | **p<0,001** |
| **Grup I - Grup VI** | p=0,140 | p=1,000 | p=0,273 | p=0,144 | p=0,663 |
| **Grup I - Grup VII** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p=0,007** | **p<0,001** | **p=0,002** |
| **Grup II - Grup III** | **p=0,006** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** |
| **Grup II - Grup IV** | p=0,088 | p=0,962 | p=0,447 | p=0,102 | p=0,926 |
| **Grup II - Grup V** | p=0,118 | p=1,000 | p=0,456 | p=0,115 | **p<0,001** |
| **Grup II - Grup VI** | p=0,112 | p=0,276 | p=0,066 | p=0,196 | p=0,913 |
| **Grup II - Grup VII** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p=0,044** | **p<0,001** | **p<0,001** |
| **Grup III- Grup IV** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p=0,003** | **p<0,001** |
| **Grup III- Grup V** | p=0,191 | **p<0,001** | **p=0,008** | **p=0,003** | p=0,674 |
| **Grup III- Grup VI** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** |
| **Grup III- Grup VII** | p=0,475 | p=0,988 | p=0,145 | p=0,852 | p=0,576 |
| **Grup IV - Grup V** | **p=0,002** | p=0,925 | p=0,137 | p=0,950 | **p<0,001** |
| **Grup IV - Grup VI** | p=0,385 | p=0,826 | p=0,266 | p=0,720 | p=0,840 |
| **Grup IV - Grup VII** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p=0,007** | **p=0,006** | **p<0,001** |
| **Grup V- Grup VI** | **p<0,001** | p=0,212 | **p=0,012** | p=0,767 | **p<0,001** |
| **Grup V- Grup VII** | **p=0,047** | **p=0,002** | p=0,191 | **p=0,005** | p=0,888 |
| **Grup VI - Grup VII** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p<0,001** | **p=0,002** | **p<0,001** |

## F. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME BULGULARI

**Tablo 22:** Grup 1 (sham) için flep proksimal ve distalinden 3. ve 10. gün alınan doku örneklerinde nitrit–nitrat miktarları, ortalama ve standart deviasyonları (µmol/gr doku)

| Denek | 3. gün | | 10.gün | |
|---|---|---|---|---|
| | **Distal** | **Proksimal** | **Distal** | **Proksimal** |
| 1 | 0,251 | 0,316 | 0,276 | 0,269 |
| 2 | 0,304 | 0,292 | 0,263 | 0,316 |
| 3 | 0,278 | 0,322 | 0,292 | 0,292 |
| 4 | 0,304 | 0,332 | 0,287 | 0,257 |
| 5 | 0,285 | 0,315 | 0,263 | 0,28 |
| 6 | 0,267 | 0,305 | 0,298 | 0,296 |
| **Ort** | **0,281** | **0,316** | **0,265** | **0,269** |
| **SD** | **0,020** | **0,013** | **0,014** | **0,020** |

**Tablo 23:** Grup 2 (perivasküler SF enjeksiyonu) için flep proksimal ve distalinden 3. ve 10. gün alınan doku örneklerinde nitrit–nitrat miktarları, ortalama ve standart deviasyonları (µmol/gr doku)

| Denek | 3. gün | | 10.gün | |
|---|---|---|---|---|
| | **Distal** | **Proksimal** | **Distal** | **Proksimal** |
| 1 | 0,352 | 0,327 | 0,325 | 0,331 |
| 2 | 0,328 | 0,296 | 0,332 | 0,333 |
| 3 | 0,315 | 0,352 | 0,316 | 0,304 |
| 4 | 0,304 | 0,324 | 0,322 | 0,316 |
| 5 | 0,310 | 0,339 | 0,287 | 0,320 |
| 6 | 0,349 | 0,351 | 0,392 | 0,318 |
| **Ort** | **0,332** | **0,301** | **0,330** | **0,332** |
| **SD** | **0,020** | **0,020** | **0,034** | **0,010** |

**Tablo 24:** Grup 3 (perivasküler BTx-A enjeksiyonu) için flep proksimal ve distalinden 3. ve 10. gün alınan doku örneklerinde nitrit–nitrat miktarları, ortalama ve standart deviasyonları (μmol/gr doku)

| Denek | 3. gün | | 10.gün | |
|---|---|---|---|---|
| | **Distal** | **Proksimal** | **Distal** | **Proksimal** |
| 1 | 0,313 | 0,382 | 0,372 | 0,407 |
| 2 | 0,305 | 0,363 | 0,373 | 0,404 |
| 3 | 0,298 | 0,372 | 0,392 | 0,369 |
| 4 | 0,310 | 0,375 | 0,385 | 0,357 |
| 5 | 0,317 | 0,405 | 0,375 | 0,375 |
| 6 | 0,316 | 0,332 | 0,332 | 0,398 |
| **Ort** | **0,306** | **0,370** | **0,370** | **0,385** |
| **SD** | **0,007** | **0,022** | **0,022** | **0,020** |

**Tablo 25:** Grup 4 (flebe SF enjeksiyonu) için flep proksimal ve distalinden 3. ve 10. gün alınan doku örneklerinde nitrit–nitrat miktarları, ortalama ve standart deviasyonları (μmol/gr doku)

| Denek | 3. gün | | 10.gün | |
|---|---|---|---|---|
| | **Distal** | **Proksimal** | **Distal** | **Proksimal** |
| 1 | 0,351 | 0,347 | 0,300 | 0,298 |
| 2 | 0,343 | 0,335 | 0,293 | 0,302 |
| 3 | 0,361 | 0,343 | 0,298 | 0,316 |
| 4 | 0,299 | 0,310 | 0,284 | 0,305 |
| 5 | 0,301 | 0,326 | 0,322 | 0,298 |
| 6 | 0,337 | 0,331 | 0,339 | 0,293 |
| **Ort** | **0,332** | **0,332** | **0,306** | **0,302** |
| **SD** | **0,029** | **0,020** | **0,021** | **0,007** |

**Tablo 26:** Grup 5 (flebe BTx-A enjeksiyonu) için flep proksimal ve distalinden 3. ve 10. gün alınan doku örneklerinde nitrit–nitrat miktarları, ortalama ve standart deviasyonları (μmol/gr doku)

| Denek | 3. gün | | 10.gün | |
|---|---|---|---|---|
| | **Distal** | **Proksimal** | **Distal** | **Proksimal** |
| 1 | 0,346 | 0,385 | 0,344 | 0,300 |
| 2 | 0,345 | 0,363 | 0,335 | 0,339 |
| 3 | 0,327 | 0,310 | 0,297 | 0,301 |
| 4 | 0,354 | 0,357 | 0,325 | 0,343 |
| 5 | 0,316 | 0,323 | 0,338 | 0,323 |
| 6 | 0,340 | 0,320 | 0,337 | 0,312 |
| **Ort** | **0,338** | **0,343** | **0,331** | **0,313** |
| **SD** | **0,014** | **0,012** | **0,040** | **0,020** |

Ort: Ortalama, SD: Standart Deviasyon

**Tablo 27:** Grup 6 (perivasküler ve flebe SF enjeksiyonu) için flep proksimal ve distalinden 3. ve 10. gün alınan doku örneklerinde nitrit–nitrat miktarları, ortalama ve standart deviasyonları (μmol/gr doku)

| Denek | 3. gün | | 10.gün | |
|---|---|---|---|---|
| | **Distal** | **Proksimal** | **Distal** | **Proksimal** |
| 1 | 0,279 | 0,258 | 0,312 | 0,292 |
| 2 | 0,272 | 0,243 | 0,292 | 0,327 |
| 3 | 0,287 | 0,271 | 0,287 | 0,313 |
| 4 | 0,292 | 0,257 | 0,299 | 0,336 |
| 5 | 0,263 | 0,251 | 0,263 | 0,335 |
| 6 | 0,275 | 0,263 | 0,356 | 0,304 |
| **Ort** | **0,278** | **0,257** | **0,301** | **0,324** |
| **SD** | **0,010** | **0,009** | **0,031** | **0,016** |

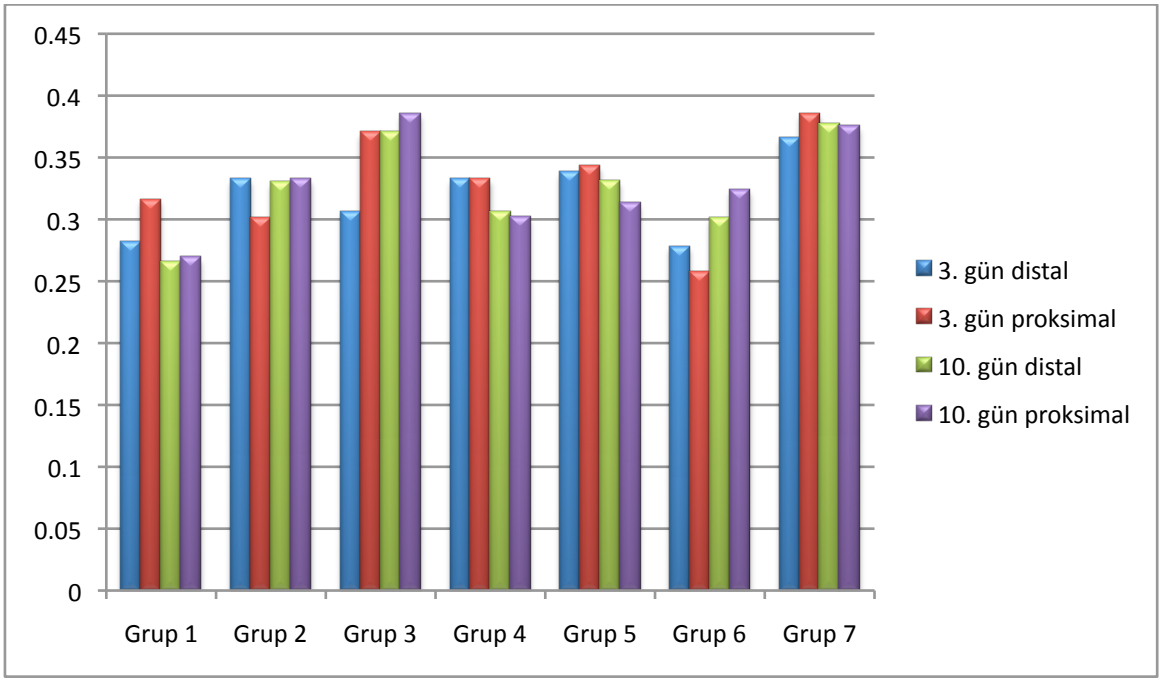
Ort: Ortalama, SD: Standart Deviasyon

**Tablo 28:** Grup 7 (perivasküler ve flebe BTx-A enjeksiyonu) için flep proksimal ve distalinden 3. ve 10. gün alınan doku örneklerinde nitrit–nitrat miktarları, ortalama ve standart deviasyonları (µmol/gr doku)

| Denek | 3. gün | | 10.gün | |
|---|---|---|---|---|
| | **Distal** | **Proksimal** | **Distal** | **Proksimal** |
| 1 | 0,376 | 0,378 | 0,372 | 0,367 |
| 2 | 0,351 | 0,360 | 0,382 | 0,373 |
| 3 | 0,361 | 0,366 | 0,371 | 0,336 |
| 4 | 0,355 | 0,372 | 0,387 | 0,386 |
| 5 | 0,365 | 0,371 | 0,388 | 0,359 |
| 6 | 0,386 | 0,382 | 0,372 | 0,372 |
| **Ort** | **0,366** | **0,365** | **0,377** | **0,375** |
| **SD** | **0,011** | **0,008** | **0,026** | **0,027** |

Bu sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri; veriler normal dağılıma sahip ve varyanslar eşit olduğu için One Way ANOVA yöntemi (Tukey testi) uygulandı. $p<0.05$ ise istatistiksel olarak farklı kabul edildi**.(Grafik 3)**

**Grafilk 3**



İstatistiksel değerlendirme sonucunda flep yaşayabilirliğinin arttırılması planlanan flebin distal bölümden çalışmanın 10. Gününde yapılan örneklemeden elde edilen veriler karşılaştırıldı. **Tablo 29**

| Karşılaştırılan Gruplar | p değeri |
|---|---|
| **Grup I - Grup II** | 1.0000 |
| **Grup I - Grup III** | **<0.05** |
| **Grup I - Grup IV** | 0.906 |
| **Grup I - Grup V** | **<0.05** |
| **Grup I - Grup VI** | 0.991 |
| **Grup I - Grup VII** | **<0.05** |
| **Grup II - Grup III** | **<0.05** |
| **Grup II - Grup IV** | 0.986 |
| **Grup II - Grup V** | **<0.05** |
| **Grup II - Grup VI** | 0.876 |
| **Grup II - Grup VII** | **<0.05** |
| **Grup III - Grup IV** | **<0.05** |
| **Grup III - Grup V** | **<0.05** |
| **Grup III - Grup VI** | **<0.05** |
| **Grup III - Grup VII** | 0.746 |
| **Grup IV - Grup V** | **<0.05** |
| **Grup IV - Grup VI** | 1.000 |
| **Grup IV - Grup VII** | **<0.05** |
| **Grup V - Grup VI** | **<0.05** |
| **Grup V - Grup VII** | **<0.05** |
| **Grup VI - Grup VII** | **<0.05** |

Değerlendirme sonucunda çalışmanın 10. gününde flep distalinden alınan örneklerden ölçümleri yapılan nitrit ve nitrat miktarları gruplar arasında karşılaştırıldığında, çalışma grupları olan grup 3, grup 5 ve grup 7'de nitrit ve nitrat miktarlarının kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düzeyde farklı olduğu tespit edildi. Çalışma grupları kendi

aralarında karşılaştırıldığında grup 3 ile grup 7 arasında nitrit-nitrat miktarları arasında anlamlı fark yokken grup 3 ile 5 arasında ve grup 5 ile grup 7 arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu.

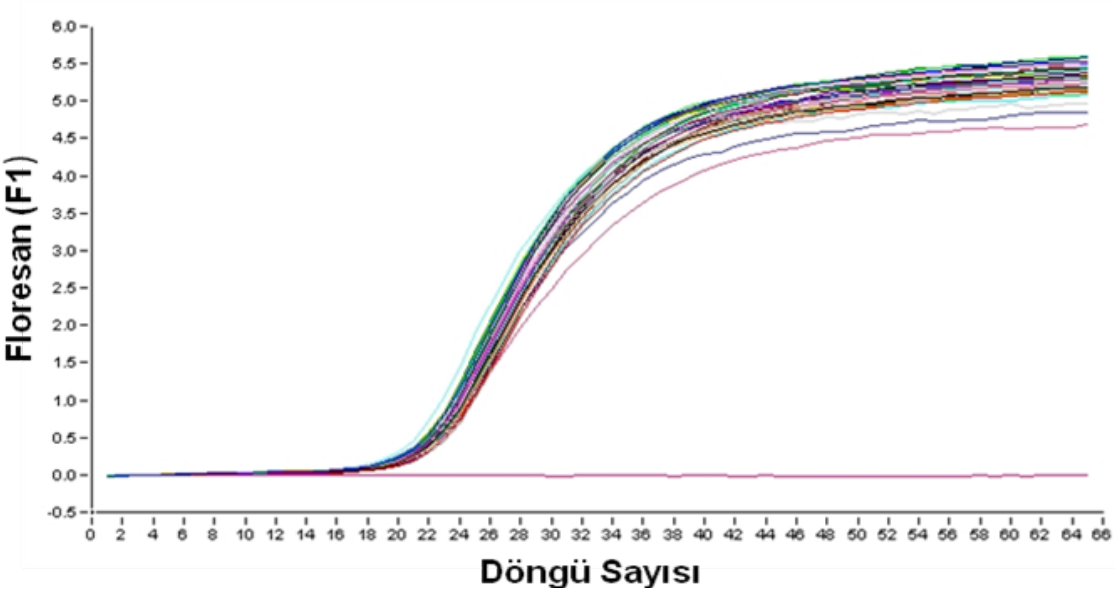
## G. GENETİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

i-NOS, e-NOS ve VEGF genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler TM cihazı kullanıldı. i-NOS, e-NOS ve VEGF gen ifadelenmesini normalize etmek için tüm gruplar ve kontrol gruplarına ait her bir cDNA örneği, β-aktin genine özgü primer ve TaqMan probu kullanılarak çalışıldı. Relatif gen ifadelenmesi sonuçları REST programı kullanılarak "Pfaffl" matematiksel yöntemi ile hesaplandı. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir.[135]

$$R = \frac{E\ (hedef)\ \Delta Ct(kontrol\text{-}hasta)}{E\ (referans)\ \Delta Ct(kontrol\text{-}hasta)}$$

Eşitlikte belirtilen E, PCR(polimerize zincir reaksiyonu) etkinliğini ifade etmektedir. ΔCt değeri ise kontrol ile hasta örneklerinin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte elde edilen R ise ekspresyon oranını göstermektedir. CT, tepkime sırasında oluşan floresans sinyalin eşik değeri geçtiği andaki siklus sayısını ifade eder. CT değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır.[136]

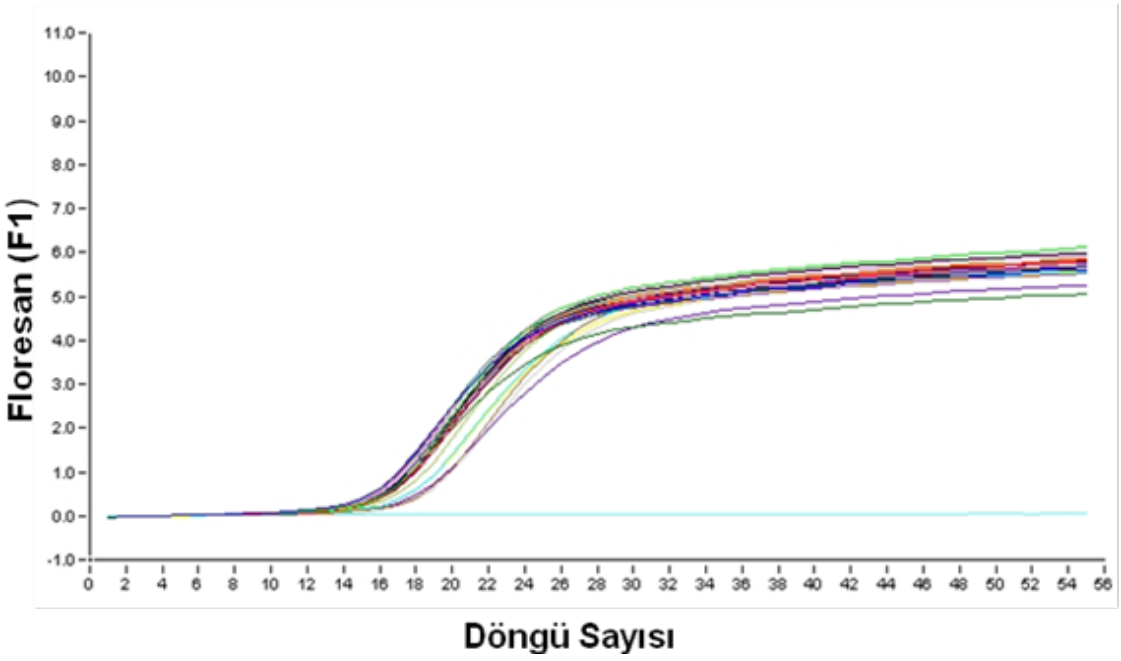
Gen ifadelenmesinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan β-aktin geninin mRNA düzeyinde ifadelenmesini kantitaif olarak gösteren gerçek zamanlı PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi **(Şekil 28)**




**Şekil:28**

β-aktin geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. β-aktin geninin gerçek zamanlı PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresans sinyal izlenmektedir.

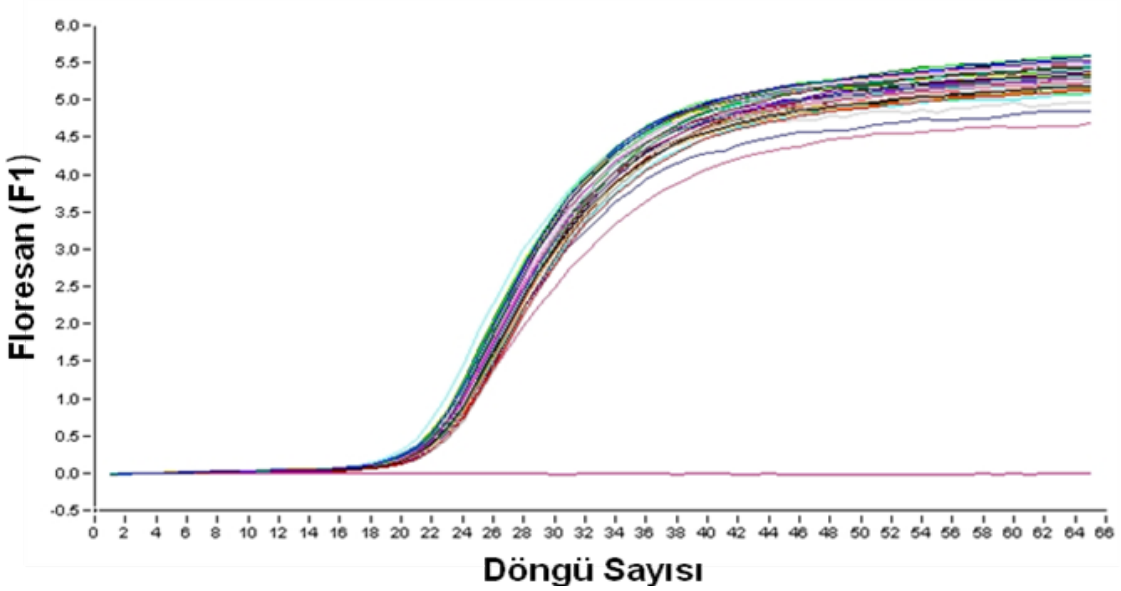
i-NOS geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren gerçek zamanlı PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi **(Şekil 29**)




**Şekil:29**

i-NOS geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. i-NOS geninin gerçek zamanlı PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresans sinyal izlenmektedir.

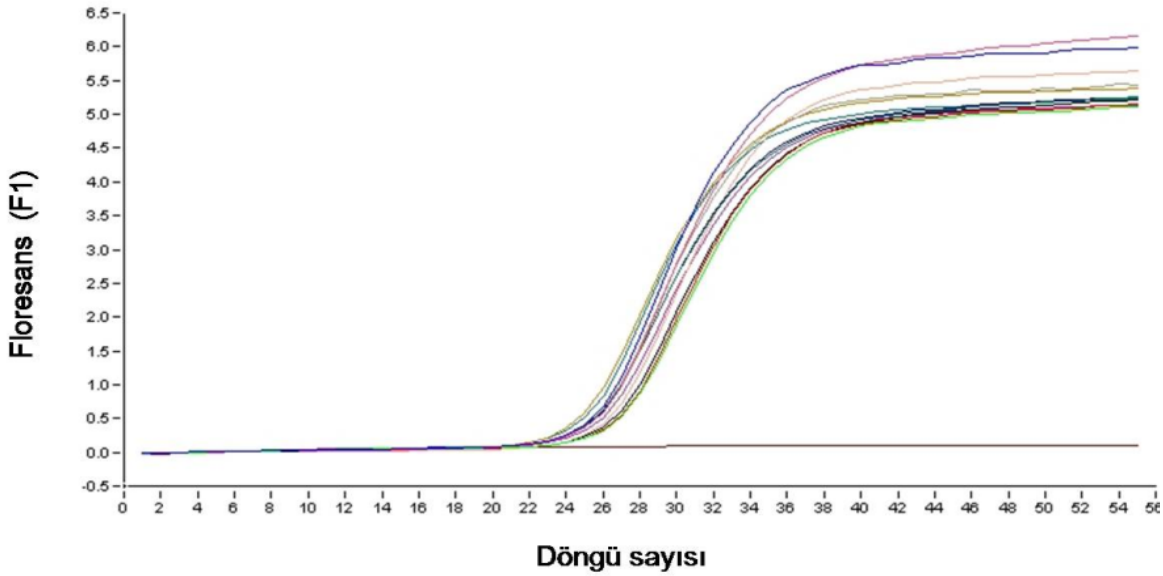
e-NOS geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren gerçek zamanlı PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi **(Şekil 30)**




**Şekil 30:**

e-NOS geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. e-NOS geninin gerçek zamanlı PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresans sinyal izlenmektedir.

VEGF geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren gerçek zamanlı PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi **(Şekil 31)**




**Şekil 32:**

VEGF geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. VEGF geninin gerçek zamanlı PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay eksende yer almaktadır. Dikey eksende floresans sinyal izlenmektedir.

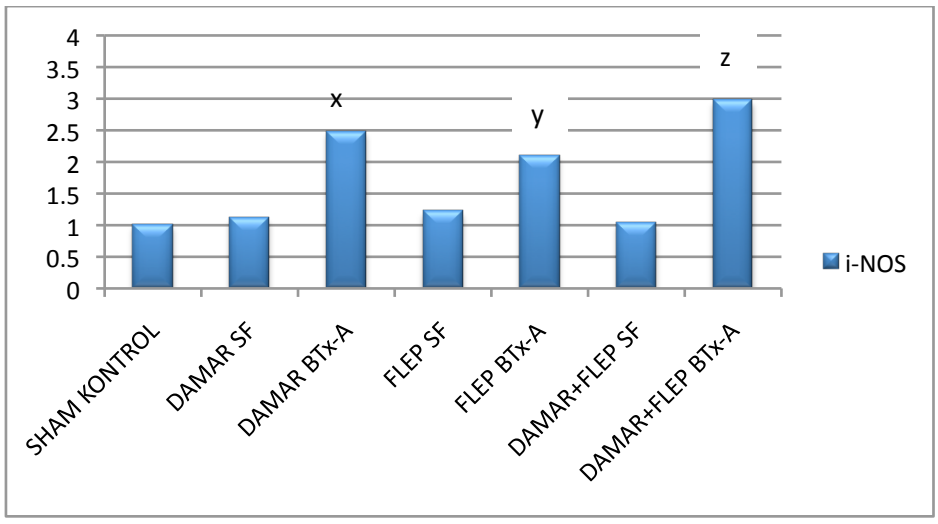
**PROKSİMAL DOKU ÖRNEKLEMELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Flep proksimalinden alınan doku örneklerinde, i-NOS gen ekspresyon miktarlarının gruplar arasında karşılaştırılması **(Tablo 30- Grafik 4)**

**Tablo 30**

| | **i-NOS** |
|---|---|
| SHAM KONTROL | 1 |
| PERİVASKÜLER SF | 1,106 |
| PERİVASKÜLER BTx-A | 2,482 |
| FLEP SF | 1,216 |
| FLEP BTx-A | 2,095 |
| PERİVASKÜLER+FLEP SF | 1,029 |
| PERİVASKÜLER+FLEP BTx-A | 2,966 |

**Grafik 4**




x,y ve z: Proksimal doku örneklemesi için i-NOSgen ekspresyon miktarları açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

x için sham grubuna göre P(H1)=0,002

y için sham grubuna göre P(H1)=0,043

z için sham grubuna göre P(H1)=0,003

x, y ve z kendi aralarında karşılaştırıldığında

x ile y karşılaştırıldığında P(H1)=0,087

y ile z karşılaştırıldığında P(H1)=0,017

x ile z karşılaştırıldığında P(H1)=0,093

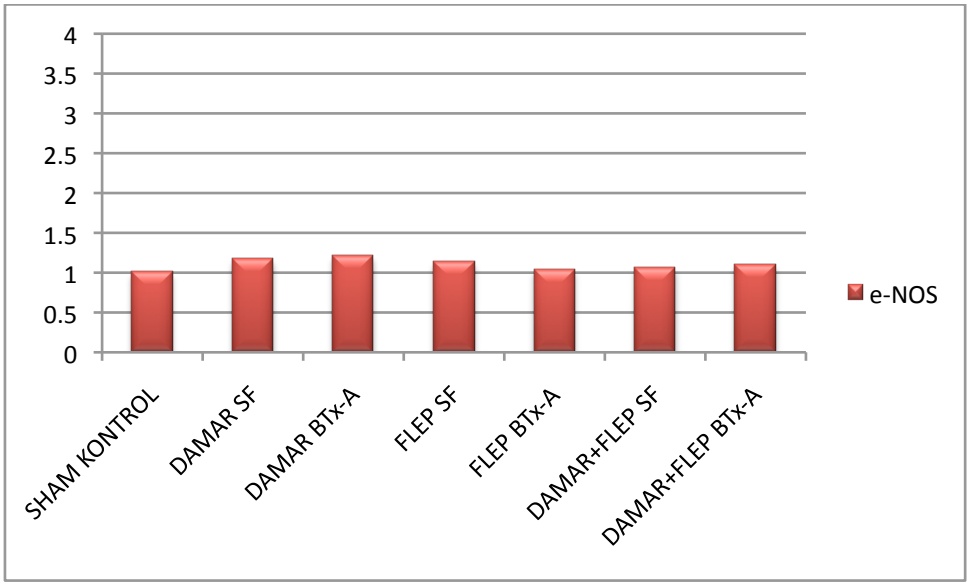
y ile z arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu

Flep proksimalinden alınan doku örneklerinde, e-NOS gen ekspresyon miktarlarının gruplar arasında karşılaştırılması **(Tablo 31- Grafik 5)**

**Tablo 31**

| | **e-NOS** |
|---|---|
| SHAM KONTROL | 1 |
| PERİVASKÜLER SF | 1,165 |
| PERİVASKÜLER BTx-A | 1,206 |
| FLEP SF | 1,139 |
| FLEP BTx-A | 1,032 |
| PERİVASKÜLER+FLEP SF | 1,052 |
| PERİVASKÜLER+FLEP BTx-A | 1,096 |

**Grafik 5**



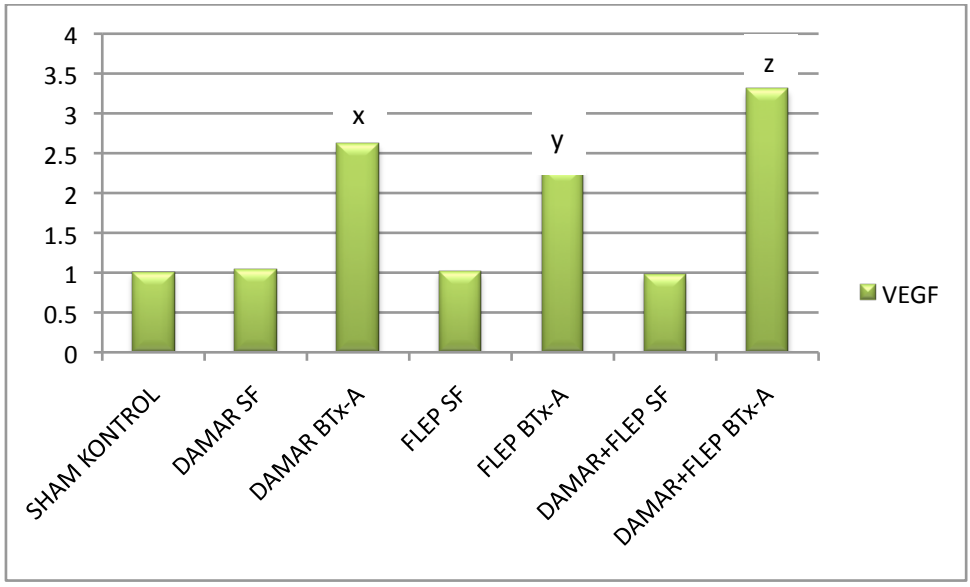

Hiçbir grupta proksimal doku örneklemesi için e-NOSgen ekspresyon miktarları açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi.

Flep proksimalinden alınan doku örneklerinde, VEGF gen ekspresyon miktarlarının gruplar arasında karşılaştırılması **(Tablo 32 – Grafik 6)**

**Tablo 32**

| | **VEGF** |
|---|---|
| SHAM KONTROL | 1 |
| PERİVASKÜLER SF | 1,035 |
| PERİVASKÜLER BTx-A | 2,612 |
| FLEP SF | 1,009 |
| FLEP BTx-A | 2,297 |
| PERİVASKÜLER+FLEP SF | 0,966 |
| PERİVASKÜLER+FLEP BTx-A | 3,302 |

**Grafik 6**




x,y ve z: Proksimal doku örneklemesi için VEGFgen ekspresyon miktarları açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

x için sham grubuna göre P(H1)=0,005

y için sham grubuna göre P(H1)=0,007

z için sham grubuna göre P(H1)=0,003

x, y ve z kendi aralarında karşılaştırıldığında

x ile y karşılaştırıldığında P(H1)=0,344

y ile z karşılaştırıldığında P(H1)=0,054

x ile z karşılaştırıldığında P(H1)=0,153

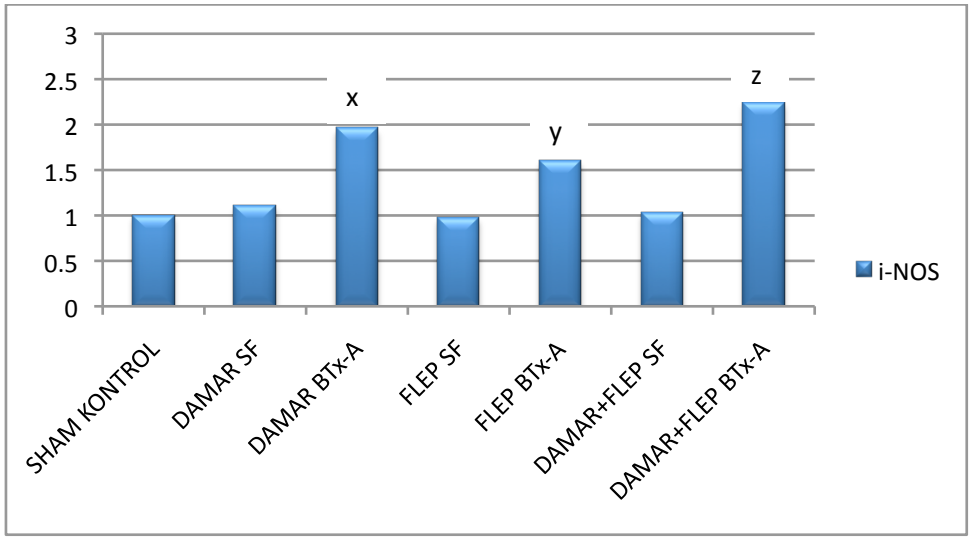
**DİSTAL DOKU ÖRNEKLEMELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Flep distalinden alınan doku örneklerinde, i-NOS gen ekspresyon miktarlarının gruplar arasında karşılaştırılması **(Tablo 33 – Grafik 7)**

**Tablo 33**

| | **i-NOS** |
|---|---|
| SHAM KONTROL | 1 |
| PERİVASKÜLER SF | 1,102 |
| DAMAR BTx-A | 1,954 |
| FLEP SF | 0,968 |
| FLEP BTx-A | 1,598 |
| PERİVASKÜLER+FLEP SF | 1,029 |
| PERİVASKÜLER+FLEP BTx-A | 2,240 |

**Grafik 7**




x ve z: Distal doku örneklemesi için i-NOSgen ekspresyon miktarları açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

x için sham grubuna göre P(H1)=0,037

y için sham grubuna göre P(H1)=0,225

z için sham grubuna göre P(H1)=0,029

x, y ve z kendi aralarında karşılaştırıldığında

x ile y karşılaştırıldığında P(H1)=0,183

y ile z karşılaştırıldığında P(H1)=0,170

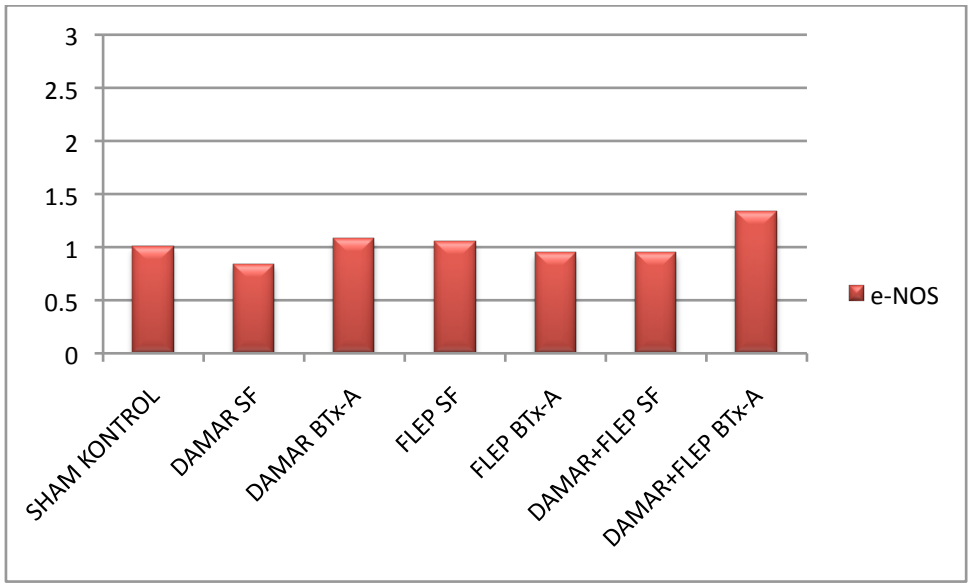
x ile z karşılaştırıldığında P(H1)=0,763

Flep distalinden alınan doku örneklerinde, e-NOS gen ekspresyon miktarlarının gruplar arasında karşılaştırılması **(Tablo 34 – Grafik 8)**

**Tablo 34**

| | **e-NOS** |
|---|---|
| SHAM KONTROL | 1 |
| PERİVASKÜLER SF | 0,834 |
| PERİVASKÜLER BTx-A | 1,072 |
| FLEP SF | 1,044 |
| FLEP BTx-A | 0,941 |
| PERİVASKÜLER+FLEP SF | 0,941 |
| PERİVASKÜLER+FLEP BTx-A | 1,33 |

**Grafik 8**



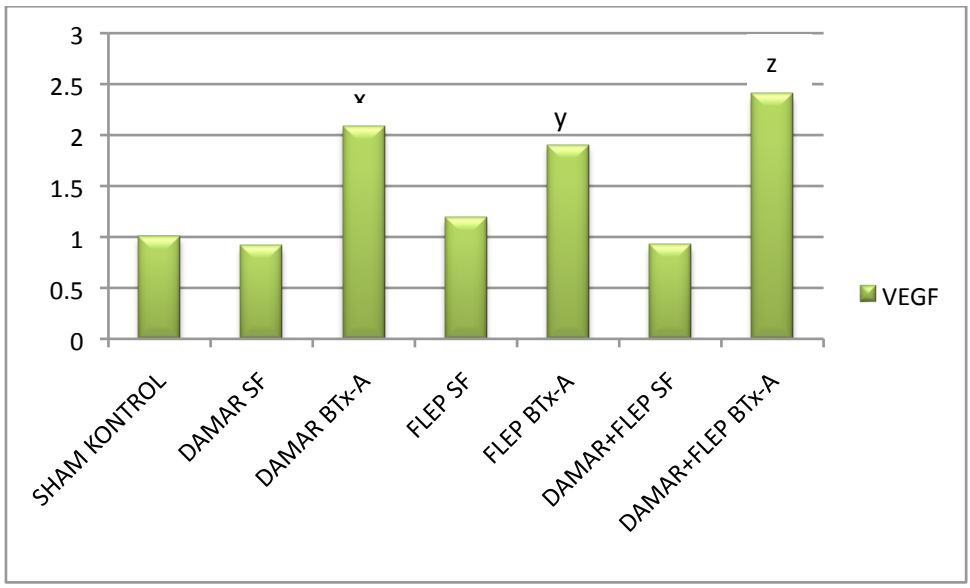

Hiçbir grupta distal doku örneklemesi için e-NOSgen ekspresyon miktarları açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi

Flep distalinden alınan doku örneklerinde, VEGF gen ekspresyon miktarlarının gruplar arasında karşılaştırılması **(Tablo 35 – Grafik 9)**

**Tablo 35**

| | **VEGF** |
|---|---|
| SHAM KONTROL | 1 |
| DAMAR SF | 0,909 |
| DAMAR BTx-A | 2,083 |
| FLEP SF | 1,184 |
| FLEP BTx-A | 1,894 |
| DAMAR+FLEP SF | 0,921 |
| DAMAR+FLEP BTx-A | 2,395 |

**Grafik 9**




x ve z: Distal doku örneklemesi için, VEGFgen ekspresyon miktarları açısından diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

x için sham grubuna göre P(H1)=0,009

y için sham grubuna göre P(H1)=0,124

z için sham grubuna göre P(H1)=0,020

x, y ve z kendi aralarında karşılaştırıldığında

x ile y karşılaştırıldığında P(H1)=0,111

y ile z karşılaştırıldığında P(H1)=0,030

x ile z karşılaştırıldığında P(H1)=0,949

y ile z arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu

# VTARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, flep mikrodolaşımı hakkındaki bilgilerin ve mikrocerrahi tekniklerin gelişmesi sayesinde, serbest doku aktarımında başarı oranı % 91-99 arasında değişmektedir. Bununla beraber, dolaşım sorunlarına bağlı parsiyel ve/veya total flep kayıplarının önüne tam olarak geçilememektedir. Tagliacozzi'nin 16.yy'da mekanizmasını tam olarak anlamadan gerçekleştirdiği ilk geciktirme işlemlerinin üzerinden 400 yıl gibi uzun bir süre geçmesine rağmen fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamıştır. Geciktirme fenomeni hem pediküllü fleplerin yaşayabilirliğini arttırabilmek hem de serbest flepler de dahil tüm fleplerde komşu anjizom bölgelerini flebe dahil ederek, flep boyutlarını arttırmak için halen ilk tercih edilen işlem olma özelliğini korumaktadır.[62]

Angel ve ark. geciktirme fenomeninin klinikteki kullanım amacını; bilinmeyen bir flebi yaşayabilir hale getirmek, bilinen bir flebin dolaşımını arttırarak yaşayabilir sınırlarını arttırmak olarak tarif etmiştir.[143]

Geciktirme fenomeninin başlatıcısının "subletal iskemi" olduğu düşünülmekte ve buna ek olarak etkin olan diğer mekanizmalar "A-V şant" ların kapanması, dokuların hipoksik değişikliklere alışması, "boğulmuş" damarların vazodilatasyon ile açılması, sempatektomi etkileri sonucu flebe giden kan akımının artması şeklinde özetlenebilir. Bu hipotezler dolaşıma salınan katekolaminlere ve perfüzyon basıncındaki azalmaya bağlı " 'A-V şant" ların kapanması, flebin ilerleyici iskemi ve inflamasyonuna neden olan araşidonik asit metabolitlerine, vazodilatasyonla sempatektomi ve denervasyon hipersensitivitesine dayandırılmış, fakat metabolik değişiklikleri yöneten faktörler tam olarak aydınlatılamamıştır.[1,133,144]

Geciktirme sırasında, flepteki arteriyel akımda değişiklikler olduğu hem histolojik hem de mikroküre perfüzyon tekniği ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.[54,56,62,76,78,79,133,145,146] Geciktirilmiş fleplerde, vazokonstrüksiyonla başlayıp sonra vazodilatasyon ve damar duvar hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi ile devam eden yapı değişiklikleri görülmektedir. Flep boyunca gelişen damarların organizasyona, "boğulmuş" damarların akıma açık hale gelmesi ve buna bağlı komşu anjiozomlarla bağlantının artması eşlik etmektedir.[14,15,59,75,148]

Geciktirme işleminde vazodilatasyona sebep olan faktör ve/veya faktörler nelerdir? Kan basıncının "fiziksel germe" etkisi ve hipoksinin vazodilatasyona katkısı olduğu düşünülmektedir.[143] Buna ek olarak sempatik sinir sistemi aktivitesinin ortadan kaldırılmasının da vazodilatasyona katkısı bilinmektedir.

Geciktirme fizyopatolojisini hipoksinin tetiklediği yeni damar oluşumuna bağlayan araştırmacılar bu konuda çalışmalar yayınlamışlardır.[76,85,148,149] Ancak günümüzde halen, hipoksinin yeni damar oluşumunu başlatma mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Geciktirme işleminin iki basamaklı olması, ameliyat risk ve tedavi maliyetlerini arttırmaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla geciktirme fenomeninin olası mekanizmalarını taklit edecek farmakolojik ajanlar araştırılmış ve literatürde yayınlanmıştır.[60,86-89,144,150]

Anjiogenez; yeni kapiller oluşumu için endotel hücrelerinin harekete geçmesi, göç etmesi ve çoğalmasını gerektiren, normal koşullarda erişkin bireylerde nadiren gerçekleşmesine rağmen, tümör oluşumu, romatoid artrit ve diyabetik retinopati gibi patolojilerde kontrolsüz şekilde gerçekleşen fizyolojik bir mekanizmadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda bazı büyüme faktörlerinin direkt veya indirekt şekilde anjiogenezi uyardığı saptanmıştır.[151-156]

Büyüme faktörleri, kendilerine duyarlı hücrelerin biyolojik aktiviteleri üzerinde reseptör yoluyla etkilerini gösteren, küçük proteinler veya glikoproteinlerin oluşturduğu sitokinlerdir.

Tek başlarına etki gösterebildikleri gibi, bir kısmı sinerjistik etkileşim yolaklarını kullanır. Bu büyüme faktörleri arasında, VEGF "vascular endothelial growth factor", PDGF "platelet-derived growth factor", bFGF "basic fibroblast growth factor" ve TGF-β "transforming growth factor" en iyi bilinen ve üzerinde en çok araştırma yapılan ajanlardır. Bu faktörler arasında anjiogenezi en potent şekilde uyaran ve hipoksi ile salınımı tetiklenen faktör VEGF'dir.[2,38]

Anjiogenez, yara ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin gösterilmesinden sonra büyüme faktörleri çok sayıda çalışmada daha detaylı şekilde araştırılmış ve iskemik deri fleplerinde, flep yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir.[81-84,144,157] Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmlara dayanarak neovaskülarizasyonun flep yaşayabilirliğine etkisi olmadığını iddia etmişler ancak Brown yaptığı bir çalışmada anjiogenezi uyaran bir protein olan PDGF'ü kullanarak flep kanlanmasını arttırıp pedikül ayırma zamanının kısaltılabileceğini öne sürmüş ve yine başka araştırmacılar tarafından anjiogenik moleküller olan PDFG, VEGF, bFGF, TGF-β vb. kullanarak flep yaşayabilirliğinin arttırılabildiğini kanıtlamışlardır.[81-84,144,158-161] Büyüme faktörlerinin adenovirüsler yolu ile iskemik dokulara transfeksiyonu hayvan deneylerinde olumlu sonuçlar vermekte ve klinikte iskemik fleplerin tedavisinde gelecek için ümit vaat etmektedir. [2,152,159] Farmakolojik ajanlar yolu ile iskemik dokulara doğru olan yeni damar oluşumunun arttırılmasının mümkün olduğu gösterildikten sonra bu konuya olan ilgi artmış ve "terapötik anjiogenez" kavramını ortaya atmıştır.[92,152-154,159,162-166]

## VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ

Damar geçirgenliğini değiştirmesi üzerine olan kuvvetli etkisinden dolayı 'vasküler permeabilite faktörü'olarak da adlandırılan VEGF, arter, ven ve lenfatiklerden köken almış mikro ve makrovasküler endotel hücreleri için doğrudan mitojeniktir. Bunun yanında, yara iyileşmesinde çoğalma evresindeki anjiyogenik etkiden sorumludur. Zhang ve ark. iskemik

yaralarda egzojen olarak uygulanan VEGF'in anjiogenezi uyardığı ve gerim gücünü arttırdığını göstermiştir.[40] VEGF'in gösterdiği bu fizyolojik etkilerin yanında patolojik hadiselerde de rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle bazı inflamatuar hastalıkların fizyopatolojisinde, kanser kitlesinin büyümesinde, malign karakterli tümörlerin metastazlarında anjiogenezi arttırıcı etkisi ile suçlanmaktadır.[41-43]

Ekzojen uygulanan VEGF'in bölgesel anjiogenezi uyararak aksiyel paternli deri fleplerinin gelişigüzel kanlanan uzantılarının sağkalımını, kontrol grubuna göre arttırdığı birçok çalışmada tespit edilmiştir.[42]

Padubidri ve Browne arter içine tek doz VEGF-A $_{165}$ uygulamasının aksiyel paternli flebin, gelişigüzel kanlanan uzantısında doku kaybı alanını azalttığını, sağ kalan flep alanının % 20 oranında arttığını bildirmişlerdir.[49]

Zhang, Banbury, Kryger ve Padubidri gibi araştırmacıların kas ve/veya deri fleplerinde uygulandığında flep sağkalımında artış saptamışlardır. İskemik ekstremitelere uygulandığında damarlanmayı arttırdığı gösterilmiştir.[47,50,81,82,144,165-167]

Shen ve ark. VEGF'in, serbest radikal oluşumunu engelleyen ve güçlü vazodilatasyon sağlayan nitrik oksit (NO) üretimini uyardığı gösterilmiştir.[51]

Flep proksimalinden alınan doku örneklerinde BTx-A uygulanan 3.,5. ve 7. deney grubunda VEGF gen ekspresyonunun, sham kontrol ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi.

Flep distalinden alınan doku örneklerinde BTx-A uygulanan 3. ve 7.deney grubunda VEGF gen ekspresyonunun, sham kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi.

Bu bulgular göstermiştir ki BTx-A'nın perivasküler(grup 3) ve perivasküler + flep(grup 7) içine uygulandığı gruplarda VEGF sentezi artmakta, buna bağlı anjiogenez ve vazodilatasyon ortaya çıkmakta bu sayede flep yaşayabilirliğinin artmasına katkıda bulunmaktadır.

## NİTRİK OKSİT

Nitrik oksit (NO) son yirmi yılda bilimsel varlığı tanınan ve günümüze kadar popülaritesi giderek artan, üzerinde çok sayıda araştırma yapılan, birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, bir serbest radikaldir. NO'nun L-argininden sentezlendiği keşfedilmiş ve NO sentezi reaksiyonunu gerçekleştiren enzime ise NOS adı verilmiştir.[23,24]

NOS'in genetik olarak farklı üç izo-formu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan bir konstitutif endoteliyal izoform (e-NOS), yine düşük miktar üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen bir konstitutif nöronal izoform (n-NOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form (i-NOS)'dur. n-NOS ve e-NOS izoenzimleri NO üretimi için $Ca^{+2}$ kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın i-NOS bundan bağımsızdır.[25,26]

NO, lipofilik bir madde olduğu için vasküler endotelden düz kas hücrelerine kolaylıkla difüze olarak, damar düz kasında "Guanilat Siklazı" aktive eder. cGMP düzeyini arttırarak vazodilatasyon sağlar. Ayrıca hücre içi $Ca^{+2}$ düzeyini ve miyozin hafif zincirin defosforilasyonunu azaltarak dilatasyona katkıda bulunur. Endotel yüzeyindeki adezyon (yapışma) moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek endoteli korur.

NO, cGMP aracılığıyla trombositlerin hem aggregasyonunu hem de adezyonunu inhibe ederek trombus oluşumunu engeller. Trombüs oluşmuş ise, vazodilatasyonla lokal homeostaza katkıda bulunur. Plazminojene etki yapıp fibrinolizi arttırır. Bu etkilerinde

prostasiklin ile sinerjistik etki yapar.Flep proksimalinden alınan doku örneklerinde BTx-A uygulanan 3.,5. ve 7. deney grubunda i-NOS gen ekspresyonunun, sham kontrol ve kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi.

Flep distalinden alınan doku örneklerinde BTx-A uygulanan 3. ve 7.deney grubunda i-NOS gen ekspresyonunun, sham kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi.

Bu bulgular göstermiştir ki BTx-A'nın perivasküler(grup 3) ve perivasküler + flep(grup 7) içine uygulandığı gruplarda i-NOS kaynaklı NO sentezi artmakta, ve dolaylı olarak flep yaşayabilirliğini, yarattığı vazodilatasyon ile artmasına katkıda bulunmaktadır.

**NİTRİT-NİTRAT**

Ortamda ortaya çıkan NO'in metabolitleri olan nitrit ve nitrat düzeyinin ölçümü araştırmada ortaya konulan genetik, histolojik sonuçların sağlamasının yapılabilmesi amacı ile HPLC yöntemi ile ölçülmüştür.

Değerlendirme sonucunda çalışmanın 10. gününde flep distalinden alınan örneklerden ölçümleri yapılan nitrit ve nitrat miktarları gruplar arasında karşılaştırıldığında,çalışma grupları olan grup 3,5 ve 7'de nitrit ve nitrat miktarlarının kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olduğu tespit edildi.

Bu çalışmada, pediküllü bir flepte BTx-A'nın, pedikül çevresine, flep içine ve hem pedikül çevresine hem de flep içine uygulamasının flep yaşayabilirliğini arttırma ihtimali ve eğer böyle bir etkisi varsa, uygulama alanları arasındaki farkların, kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi planlandı. BTx-A'nın flep yaşayabilirliği üzerine

katkılarının varlığı ve etkinin mekanizmaları üzerinde duruldu, farmakolojik olarak geciktirme işlemi sağlama olasılığı araştırıldı.

Bu deneysel çalışmada flep modeli olarak sıçan karın flebi tercih edildi. Bu model, hem flep sağkalımının değerlendirilmesinde hem de geciktirme fenomeninin çalışmasında oldukça iyi bilinmektedir.[131] Flebin normalden büyük tasarımı ve bir taraftaki epigastrik damarın kesilmesi, flepte sağkalım ve geciktirme etkisinin değerlendirmemizi sağlayacak gelişigüzel kanlanan bir bölge oluşturmaktadır.[128]

Flep yaşayabilirliğini değerlendirme yöntemleri arasında en sık kullanılanlardan birisi, nekroz alanlarının, tüm flep boyutuna göre yüzde olarak hesaplanmasıdır. Gruplara göre hesaplamalar yapıldığında çalışma grupları olan grup 3, 5 ve 7'de flep nekroz alanlarının kopntrol gruplarına göre belirgin derecede daha az olduğu tespit edildi. Bu 3 grup kendi içinde karşılaştırıldığında grup 3 ve 7'de nekroz yüzdeleri birbirine yakın ve grup 5'ten daha az olarak bulundu.

**PECAM ve e-NOS**

PECAM İmmünreaktivite Değerlendirme Sonucu

Vasküler dansite açısından en az damar ve kapiller yapıları ile karşılaşılan ve PECAM immünreaktivitesinin en zayıf olduğu grupların, flep proksimalinden yapılan incelemelerde sırasıyla, grup 1, 2 ve 6, flep distalinden yapılan incelemelerde sırasıyla ise grup 1, 2 ve 6 olduğu belirlendi. BTx-A'nın hem perivasküler hem de flebe uygulandığı grup 7'de vaskülogenezin en yoğun düzeyde olduğu saptandı. Bunu distal ve proksimallerde aynı olmak üzere grup 3 ve 5 izledi. Yapılan değerlendirmede, BTx-A'nın damar çevresi ya da flebe herhangi bir şekilde uygulanmasının vaskülogenezi kesin olarak arttırdığı düşünüldü. Hem damar sayım değerleri, hem de PECAM immünreaktivite yoğunluğu bu bulguların göstergesi olarak kabul edildi. Tüm grupların distallerinde ise genel olarak; nekrozun göstergesi olan

lenfosit infiltrasyonu belirgin olarak izlendi. Lenfosit infiltrasyonu proksimal kesitlerde sadece bazı gruplarda ve yer yer görüldü. Distallerde belirgin bir nekroz olduğu kabul edildi ancak bu durumun az da olsa süre gelmekte olan vaskülogenezi engellemediği kanısına varıldı. BTx-A uygulamasının proksimallerde daha çok olmak üzere, distallerde de vaskülogenezi indüklediği sonucuna varıldı.

e-NOS İmmünreaktivite Değerlendirme Sonucu

Çalışmamızda anjiyogenez düzenlenmesinde çok önemli bir molekül olarak karşımıza çıkan nitrik oksit sentezinde önemli rolü olane-NOS immünreaktivitesi değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda endoteliyal nitrik oksit sentazın hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu artırdığı ancak nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin yara iyileşmesini bozduğu bildirilmiştir. Anjiyogenezin temelini oluşturan, vasküler endoteliyal hücrelerin mitozunda önemli role sahip olan VEGF'nin NO ürünü endotelyal nitrik oksit sentaz (e-NOS) proteini tarafından artırıldığı da bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da, deney grupları arasında e-NOS immünreaktivitesi değerlendirildiğinde; BTx-A uygulaması yapılan gruplar, serum fizyolojik uygulanan ve sadece flebin kaldırıldığı gruplarla karşılaştırıldıklarında, e-NOS immünreaktivitesinin BTx-A uygulaması ile arttığı saptanmıştır. Vaskülogenez sırasında dokuda artış gösteren VEGF tarafından indüklendiği bilinen ve endotel hücrelerince salınan e-NOS immünreaktivitesinin yüksek olduğu BTx-A deney gruplarında vaskülogenezin artmış olduğu kanısına varılmıştır. Bulgular incelendiğinde BTx-A uygulanan gruplarda flep nekroz alanlarının kontrol gruplarına oranla daha az olduğu tespit edildi. BTx-A uygulanan gruplarda yapılan genetik incelemede i-NOS ve VEGF gen ekspresyonlarının, histolojik incelemede damar sayısı, PECAM ve e-NOS boyama oranlarının, biyokimyasal incelemede nitrit-nitrat miktarlarının, lazer dopler flowmetri ölçümlerinde kan akım hızının diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edildi. BTx-A uygulanan gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında grup 3 ve 7'nin, grup 5'göre flep nekroz alanlarının daha

az, i-NOS ve VEGF gen ekspresyonlarının, damar sayısının, kan akım hızının daha yüksek olduğu tespit edildi.

Elde edilen veriler göstermiştir ki BTx-A'nın pediküllü bir flepte uygulama yerinden bağımsız olarak yaşayabilirliği arttırdığı tespit edildi. Ancak perivasküler uygulamanın, flep içine uygulamaya göre, flep yaşayabilirliğine katkısının daha fazla olduğu söylenebilir. Grup 7'de olduğu gibi kombine(perivasküler+flep) uygulamalarda ise flep yaşayabilirliğini arttırıcı etkinin en yüksek oldu tespit edildi.

BTx-A'nın sağladığı sempatektomi ile yarattığı vazodilatasyon ve anjiogenezi uyarıcı etkisi ile farmakolojik olarak geciktirme etkisi sağlayabileceği gösterilmiştir.

Bu sonuçlar ışığında BTx-A uygulaması ile gelişigüzel kanlanan ve pediküllü fleplerin yaşayabilirlik oranlarının arttırılması, büyük doku defektlerinin rekonstrüksiyonunda kullanılması planlanan flep boyutunun arttırılması, flep prefabrikasyonu ve geciktirilmesinde hem boyut arttırılması hem de bekleme süresinin kısaltılması amacı ile kullanılabilecek bir madde olduğu söylenebilir.

# VI ÖZET

Geciktirme etkisini farmakolojik olarak sağlayabilecek bir madde arayışı sürmektedir. Literatürde gelişigüzel kanlanan ve pediküllü fleplerde BTx-A ile flep yaşayabilirliğinin arttırıldığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmada, pediküllü bir flepte BTx-A'nın, pedikül çevresine, flep içine ve hem pedikül çevresine hem de flep içine uygulandı. BTx-A'nın flep yaşayabilirliğine etkisi, uygulama alanları arasındaki farkların varlığı kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. BTx-A'nın flep yaşayabilirliğine etkisi ve etkinin mekanizmaları üzerinde duruldu, farmakolojik olarak geciktirme işlemi sağlama olasılığı araştırıldı.

Epigastrik flep modeli oluşturulan 42 adet sıçan 7 gruba ayrıldı. Grup 1'de (n=6) çalışmanın 3. gününde flep tek pedikül üzerinde kaldırıldı ve yerine iade edildi. Grup 2'de (n=6) grup 1'e uygulanan işleme ek olarak 0. günde perivasküler serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Grup 3'de (n=6) grup 1'e ek olarak 0. günde perivasküler BTx-A uygulandı. Grup 4'te (n=6) grup 1'e ek olarak 0. günde flep içine serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Grup 5'te (n=6) grup 1'e olarak 0. günde flep içine BTx-A enjeksiyonu yapıldı. Grup 6'da (n=6) grup 1'e ek olarak 0. günde hem perivasküler hem de flep içine serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Grup 7'de (n=6) grup 1'e ek olarak 0. günde hem perivasküler hem de flep içine BTx-A enjeksiyonu yapıldı.

Çalışmanın 0. gününde yapılan enjeksiyonları takiben 3. günde cerrahi işlem uygulandı. Cerrahi sırasında epigastrik damar, flep proksimali ve distalinden lazer dopler flowmetre ile kan akım hızları ölçüldü. Flep proksimal ve distalinden histolojik ve biyokimyasal inceleme için örnekler alındı. Çalışmanın başlangıcından 10 gün sonra flep nekroz alanları fotoğrafik teknikle ölçüldü, flep proksimal ve distalinden histolojik ve biyokimyasal inceleme için örnekler alındı, yine aynı gün genetik değerlendirme için örnek alındı.

Bulgular incelendiğinde BTx-A uygulanan gruplarda flep nekroz alanlarının kontrol gruplarına oranla daha az olduğu tespit edildi. BTx-A uygulanan gruplarda yapılan genetik incelemede i-NOS ve VEGF gen ekspresyonlarının, histolojik incelemede damar sayısı, PECAM ve e-NOS boyama oranlarının, biyokimyasal incelemede nitrit-nitrat miktarlarının, lazer dopler flowmetri ölçümlerinde kan akım hızının diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edildi.

BTx-A uygulanan gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında grup 3 ve 7'nin, grup 5'göre flep nekroz alanlarının daha az, i-NOS ve VEGF gen ekspresyonlarının, damar sayısının, kan akım hızının daha yüksek olduğu tespit edildi.

Elde edilen veriler ışığında BTx-A'nın pediküllü bir flepte uygulama yerinden bağımsız olarak yaşayabilirliği arttırdığı tespit edildi. Ancak perivasküler uygulamanın, flep içine uygulamaya göre, flep yaşayabilirliğine katkısının daha fazla olduğu söylenebilir. Grup 7'de olduğu gibi kombine(perivasküler+flep) uygulamalarda ise flep yaşayabilirliğini arttırıcı etkinin en yüksek oldu tespit edildi.

BTx-A'nın sağladığı sempatektomi ile yarattığı vazodilatasyon ve anjiogenezi uyarıcı etkisi ile farmakolojik olarak geciktirme etkisi sağlayabileceği gösterilmiştir.

# VII SUMMARY

Searching the substance which provides delay effect pharmacologically is still in progress. Few studies presence successful results on flap viability by BTx-A in gelişigüzel kanlanan and pedicled flaps to take place in literature. In this study BTx-A applied perivascular area, into the flap and both respectively. We investigatethe effect of BTx-A on flap viability and presence of differencesat varied application areas and the influence of mechanism and the possibilty to provide delay effect pharmacologically.

Epigastric flap model was used in 42 rats and seperated into 7 groups. Group 1 (n=6) unipedicled flap was elevated and returned into same position in study day 3. Group 2 (n=6) in study day 0 perivascular saline injected and in study day 3 same surgical procedure was performed. Group 3 (n=6) same procedure was performed at group 2 but BTx-A injected as perivascular area instead of saline. Group 4 (n=6) saline injected into the flap only in study day 0 and in study day 3 same surgical procedure was performed. Group 5 (n=6) BTx-A injected into the flap only in study day 0 and same surgical procedure was performed in study day 3. Group 6 (n=6) saline injected into the flap and perivascular area both in study day 0 and same surgical procedure was performed in study day 3. Group 7 (n=6) BTx-A injected into the flap and perivascular area both in study day 0 and same surgical procedure was performed in study day 3.

Blood stream velocity measured during surgery by laser doppler flowmeter. Sample obtained proximal and distal part of the flap for histological and biochemical assessment in study day 3.

In the study day 10, flap necrosis rates measured photographically. Samples obtained proximal and distal part of the flap for histological and biochemical assessment. Also same time another sample obtained for genetical evaluation.

When examine the findings at BTx-A applied groups we observed less flap necrosis in accordance with control groups. Additionally, genetical evaluation revealed increased i-NOS and VEGF gene expression levels, histological evaluation revealed increased count of vessels, PECAM and e-NOS immunostaining, biochemical evaluation revealed increased nitrite and nitrate quantity and laser doppler flowmetric blood stream velocity measurements increased.This values are statistically significant in BTx-A applied groups than controls.

While BTx-A applied groups compared itself, group 3 and group 7 had less flap necrosis rates and more i-NOS and VEGF gene expression levels, count of vessels, blood stream velocity confirmed than group 5 .

In the light of these findings BTx-A increased pediculated flap viability independently from application area. But we may dictate perivascular application of BTx-A has more positive effect on flap viability according to flap application. In combined(perivascular and flap) application such as group 7 has most positive effect on flap viability.

This study demonstrates that BTx-A application provide delay effect pharmacologically by sympathectomy welded vasodilatation and stimulatory effect on angiogenesis.

## VIII KAYNAKLAR


1. Kayser MR, Hodges PL: Surgical flaps. Select Read Plast Surg 8:1-58, 1995
2. Gurunluoglu R, Ozer K, Skugor B, Lubiatowski P, Carnavale K, Siemionow M: Effect of transfection time on the survival of epigastric skin flaps pretreated with adenovirus encoding the VEGF gene. Ann Plast Surg 49(2):161-169, 2002
3. Pang CY, Forrest CR, Morris SF: Pharmacological augmentation of skin flap viability: A hypothesis to mimic the surgical delay phenomenon or a wishful thought. Ann Plast Surg 22: 293-306, 1989
4. Myers, M.B., and Cherry, G. Mechanism of the delay phenomenon. Plast. Reconstr. Surg. 44: 52, 1969.
5. Myers, M.B., and Cherry, G. Differences in the delay phenomen on in the rabbit, rat, and pig. Plast. Reconstr. Surg. 47: 73, 1971.
6. Myers, M.B. and Cherry, G. Augmentation of tissue survival by delay: An experimental study in rabbits. Plast. Reconstr. Surg. 39:397, 1967
7. Cormack, G.C.,and Lamberty, B.G.H. The Arterial Anatomy of Skin Flaps, 2nd Ed. NewYork: Churchill Livingstone, 1994.
8. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. Br J Plast Surg. 1987 Mar; 40(2):113-41.)
9. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends Biochem Sci.2002; 27: 552–558 )
10. Celik E, Tercan M, Uzunismail A, et al. Versatility of botulinum toxin: a use instabilization of pedicled muscle flaps. Plast Reconstr Surg. 2006;117: 462–467.)

11. Daniel RK, Kerrigan CL: Principles and physiology of skin flap surgery. In: Plastic Surgery, Editor: McCarthy JG, JB Saunders Co, Philadelphia. 1: 275-276, 1990

12. Grabb WC: Classification of skin flaps. In: Skin Flaps, Editors:Grabb WC, Myers MB, Little Brown Comp, Boston 1975, 145-153

13. Cormack GC, Lamberty BGH: Introduction and the microcirculation. In: The Arterial Anatomy of Skin Flaps, Editor: Cormack GC, Churchill Livingstone, London 1994, 1-32

14. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG: An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical Applications. Plast Reconstr Surg 89(3): 408-418, 1992

15. Taylor GI, Palmer JH: The vascular territories (Angiosomes) of the body: Experimental study and clinical applications. Br J Plast Surg 40: 113-141, 1987

16. Cormack GC, Lamberty BGH: The ischemic flap. In: The Arterial Anatomy of Skin Flaps, Editor: Cormack GC, Churchill Livingstone, London 1994, 47-69

17. Gumener R, Montandon D: Distally based forearm fasciosubcutaneous flap: Discussion. Plast Reconstr Surg 114(2): 397-399, 2004

18. Huang LH, Neiva EF, Soehren SE, Giannobile WV, Wang HL: The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: a pilot human trial. J Periodontol 76: 1768-1777, 2005

19. Mathes SJ, Hansen SL: Flap classification and applications. In: Plastic Surgery, Editors: Mathes SJ, Hentz VR, Saunders Elsevier, 2nd ed. Philadelphia, 2006: 365-379

20. Furchott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcoline. Nature (Lond). 1980; 288: 373-6.

21. İgnarro JJ, Byrns RE, Wood KS. Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its smilarity to nitric oxide radicals in

vasodilatation. Vasculer smooth muscle, peptides, autonoms nerves and endothelium. (Ed: Vanhoutte PM) Raven Press, New York. 1988: 427-36.

22. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factors. Nature 1988; 327: 524-6.

23. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginin: A pathway for the regulation of cell function and communication. Biochem pharmacol 1989; 38:1709-15.

24. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vasculer endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.1989; 158: 348-52.

25. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. The J. Biol. Chem. 1993; 268 (17): 12231-4.

26. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharm. Rev 1991; 43: 109-41

27. Hua Wan, Yu Amy. Nitric oxide synthase in motor neurons after axotomy. The J Histochem and Cytochem 1994; 42(4): 451-7

28. Katayama Y. Nitric oxide:Mysterious messenger. Dojindo News Letter 1995; 1:1-20.

29. Haeflinger IO, Flammer J, Luscher TF. Nitric oxide and endothelium are important regulators of human ophtalmic artery. Invest Ophtalmol Vis Sci 1992; 33(7):2340-8.

30. Olesen J, Thomsen LL, Iversen H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. Trend Pharmacol Sci Engl 1994; 15(5): 149-53.

31. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K. Inhaled nitric oxide for adult respiratory distress syndrome. N Engl J Med 1993; 328: 399-402

32. Burnett Al, Lowenstien CJ, Bredt DS. Nitric oxide a physiologic mediator of penil erection. Science 1992; 257: 401-3.

33. Stark ME, Szurszevski JH. Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic fuction disease. Gastroenterology 1992; 103: 1928-49.

34. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: Synthesis, localisation and function. Am. J Kidn Dis. 1994; 24 (1): 112-29.

35. Francis MC, Allen N, Mizel JB, Albina DE. Suppression of arthritis by an inhibitor of NOS. J Exp Med 1993; 178:749-54.

36. Corbett JA, Mc Daniel ML. Nitric oxide mediated autoimmune destruction of beta cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. Diabetes USA 1992; 41(8): 899-903.

37. Thiemmermann C. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in circulatory shock. Adv. Pharmacol 1994, 28: 45-79

38. O'Toole G, MacKenzie D, Buckley MF, Lindeman R, Poole M: A review of therapeutic angiogenesis and consideration of its potential applications to plastic and reconstructive surgery. Br J Plast Surg 54: 1-7, 2001

39. Pang CY, Lineaweaver WC, Lei MP, Oswald T, Shamburger S, Cai Z, Zhang F: Evaluation of the mechanism of vascularendothelial growth factor improvement ofischemic flap survival in rats. Plast Reconstr Surg 112: 556-564, 2003

40. Zhang F, Lei MP, Oswalda TM, Pangb Y, Blaina B, Caib ZW, Lineaweaver WC:

The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. Br J Plast Surg 56: 334-341, 2003

41. Jubb AM, Pham TQ, Hanby AM, Frantz GD, Peale FV, Wu TD, Koeppen HW, Hillan KJ: Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1α, and carbonic anhydrase IX in human tumors. J Clin Pathol 57: 504-512, 2003

42. Kryger Z, Dogan T, Zhang F, Timek EK, Shi DY, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ: Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat. Ann Plast Surg 43: 172-178, 1999

43. Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Camacci T, De Jeso K, Cervadoro G, Pingitore R, Barachini P, Leocata P, Fontanini G: CD 34 microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma. Pathol Res Pract 199: 705-712, 2003

44. Zachary I: Vascular endothelial growth factor. Int J Biochem Cell Biol 30: 1169-1174, 1998

45. Ferrara N, Smyth TD: The biology of vascular endothelial growth factor. Endocrine Rev 18: 4-25, 1997

46. Detmar M: The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. J Dermatol Sci 24:78-84, 2000

47. Zhang F, Oswalda T, Linb S, Caib Z, Leia M, Jonesa M, Angela MF, Lineaweaver WC: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. Br J Plast Surg 56: 653-659, 2003

48. Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, Baffour R, Kornowski R: Therapeutic interventions for enhancing collateral developement by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. Cardiovasc Res 49: 532-542, 2001

49. Padubidri A, Browne E Jr: Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. Ann Plast Surg 37: 604-611, 1996

50. Zhang F, Richards L, Angel MF, Zhang J, Liu H, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC: Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. Br J Plast Surg 55: 59-63, 2002

51. Shen BQ, Lee DY, Zioncheck TF: Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 and a protein kinase C signaling pathway. J Biol Chem 274: 33057-33063, 1999

52. Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ: The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. 53: 234-239, 2000

53. Lubiatowski P, Gürünlüoğlu R, Goldman CK, Skugor B, Carnevale K, Siemionow M: Gene therapy by adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 promotes perfusion of muscle flaps. Plast Reconstr Surg 110: 149-159, 2002

54. Kerrigan CL: Skin flap failure: Pathophysiology. Plast Reconstr Surg 72(6): 766-777, 1983

55. Kerrigan CL, Rollin DK: Pharmacologic treatment of the failing skin flap. Plast Reconstr Surg 70(5): 541-549, 1982

56. Reinisch JF: The pathophysiology of skin flap circulation: The delay phenomenon. Plast Reconstr Surg 54(5): 585-598, 1974

57. Vedder NB: Flap physiology. In: Plastic Surgery, Editors: Mathes SJ, Hentz VR, Saunders Elsevier, 2nd ed. Philadelphia, 2006: 483-506

58. Cutting C, Bardach J, Finseth F: Haemodynamics of the delayed skin flap: a total blood-flow study. Br J Plast Surg 34: 133-135, 1981

59. Dhar SC, Taylor IG: The delay phenomenon:The story unfolds. Plast Reconstr Surg 104(7): 2079-2091, 1999

60. Myers MB: Attempts to augment survival in skin flaps- Mechanism of the delay phenomenon. In: Skin Flap, Editors: Grabb WC, Myers MB, Little Brown Comp, Boston 1975, 63-79

61. McFarlane RM, Heagy FC, Rodin S, Aust SC, Wermuth RE: A study of the delay phenomenon in experimental pedicle flaps. Plast Reconstr Surg 35:245-262, 1965

62. Boyd JB, Markland B, Dorion D, Pang CY, Morris S: Surgical augmentation of skin blood flow and viability in a pig musculocutaneous flap model. Plast Reconstr Surg 86(4): 731-738, 1990

63. ShadiGhali,M.R.C.S. PeterE.M.Butler, F.R.C.S.I.,F.R.C.S.(Plast.) OrenM.Tepper,M.D. GeoffreyC.Gurtner,M.D. Vascular Delay Revisited Plast.Reconstr.Surg. 119:1735,2007

64. Jurell G: Adrenergic nerves and the delay phenomenon. Ann Plast Surg 17: 493-497, 1986

65. Jurell G, Hjemdahl P, Ferdholm BB: On the mechanism by which antiadrenergic drugs increase survival of critical skin flaps. Plast Reconstr Surg 72(4): 518-525, 1983

66. Jurell G, Jonsson CE: Increased survival of experimental skin flaps in rats following treatment with antiadrenergic drugs. Scand J Plast Reconstr Surg 10:169-172, 1976

67. Finseth F, Adelberg MG: Prevention of skin flap necrosis by a course of treatment with vasodilator drugs. Plast Reconstr Surg 61: 738-743, 1978

68. Goshen J, Wexler MR, Peled IJ: The use of two alpha blocking agents, Phenoxybenzamine and Phentolamine in ointment and injection form to improve skin flap survival in rats. Ann Plast Surg 15: 431-435, 1985

69. Neligan P, Pang CY, Nakatsuka T, Lindsay WK, Thomson HG: Pharmacologic action of Isoxsuprine in cutaneous and myocutaneous flaps. Plast Reconstr Surg 75(3): 363-374, 1985

70. Sasaki A, Harii K: Lack of effect of Isoxsuprine on experimental random flaps in the rat. Plast Reconstr Surg 66(1): 105-108, 1980

71. Toomey JM, Conoyer JM, Oguna JH: Vasodilating agents in augmentation of skin flap survival. Otolaryngol Head Neck Surg 87(6): 757-762, 1979

72. Whitman DH, Berry RL, Green DM: Platelet Gel:An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 55: 1294-1299, 1997

73. Dorion D, Boyd JB, Pang CY: Augmentation of transmidline skin perfusion and viability in transverse rectus abdominis myocutaneous (TRAM) flaps in the pig. Plast Reconstr Surg 88(4): 642-649, 1991

74. Aarts HF: Regional intravascular sympathetic blockade for beter results in flap surgery: An experimental study of free flaps, island flaps, and pedicle flaps in the rabbit ear. Plast Reconstr Surg 66(5): 690-698, 1980

75. Cutting C, Robson MC, Koss N: Denervation supersensitivity and the delay phenomenon. Plast Reconstr Surg 61(6): 881-887, 1978

76. Johnson K, Hunt TK, Brennan SS: Tissue oxygen measurements delayed skin flaps: A reconsideration of the mechanisms of the delay phenomenon. Plast Reconstr Surg 82: 328-336, 1988

77. Young CMA: The revascularization of pedicle skin flaps in pigs: A functional and morphologic study.Plast Reconstr Surg 70(4): 455-464, 1982

78. Pang CY, Forrest CR, Neligan PC, Lindsay WK: Augmentation of blood flow in delayed random skin flaps in the pig: Effect of length of delay period and angiogenesis. Plast Reconstr Surg 78(1): 68-74, 1986

79. Suzuki S, Isshiki N, Ohtsuka M, Maeda T: Experimental study on "delay" phenomenon in relation to flap width and ischaemia. Br j Plast Surg 41: 389-394, 1988

80. Marek CA, Amiss LR, Morgan RF, Spotnitz WD, Drake DB: Acute thrombogenic effects of fibrin sealant on microvascular anastomosis in a rat model. Ann Plast Surg 41(4): 415-419, 1998

81. Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC: Growth factors and flap survival. Microsurgery 24(3): 162-167, 2004

82. Zhang F, Fischer K, Timek EK, Guo M, Cui D, Martin WD, Buncke HJ, Lineaweaver WC: Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. Ann Plast Surg 46: 314-319, 2001

83. Zhang F, Richards L, Angel MF, Zhang J, Liu H, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC: Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. Br J Plast Surg 55: 59-63, 2002

84. Zhang F, Oswalda T, Linb S, Caib Z, Leia M, Jonesa M, Angela MF, Lineaweaver WC: Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. Br J Plast Surg 56: 653-659, 2003

85. Lopez JLA, Nieto CS, Garcia PB, Ortega JMR: Evaluation of angiogenesis in delayed skin flaps using a monoclonal antibody for the vascular endothelium. Br J Plast Surg 48: 479-486, 1995

86. Acıkel C, Kenkel JM, Nojima K, Hoopman JE, Saboorian MH, Brown SA: Nonsurgical delay of dorsal rat cutaneous flap using a long-pulsed 1064-nm Nd:YAG Laser with a contact cooling device. Plast Reconstr Surg 116(5): 1411-1420, 2005

87. Acıkel C, Kenkel JM, Ozturk S, Nojima K, Hoopman JE, Gokaslan ST, Brown SA: Evaluation of Flashlamp-pumped pulsed-dye laser (585nm) in nonsurgical delay of dorsal rat cutaneous flaps. Plast Reconstr Surg 115(7): 2032-2041, 2005

88. Cho BC, Lee MS, Lee JH, Bjun JS, Baik BS: The effects of surgical and chemical delay procedures on the survival of arterialized venous flaps in rabbits. Plast Reconstr Surg 102(4):1134-1143, 1998

89. Ksander GA, Sawamura SJ, Ogawa Y, Sundsmo J, McPherson JM: The effect of platelet releasate on wound healing in animal models. J Am Acad Dermatol 22(5): 781-791, 1990

90. Shelosky, L. History of the clinical use of Botulinum toxin type A. In Sommer, B., Sattler, G. (Eds.), Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine. 1st edition. Berlin-Vienna: Blackwell Science, 1-7, 2001.

91. Esra Çelik Soylu, Doktora tezi, Pediküllü kas fleplerinin stabilizasyonunda Botulium Toksin-A'nın kullanılması T.C.Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği İstanbul 2005

92. Lam, S.M. The basic science of botulinum toxin. Facial Plast. Surg. Clin. N. Am. 11: 431-438, 2003

93. Huang, W., Foster, J.A., Rogachefsky, A.S. Pharmacology of botulinum toxin. J. Am. Acad. Dermatol. 43: 249-259, 2000

94. Shelosky, L. Pharmacology and Toxicology. In Sommer, B., Sattler, G. (Eds.), Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine. 1st edition. Berlin-Vienna: Blackwell Science, 1-7, 2001.

95. Carruthers, J., Carruthers, A. About Botulinum Neurotoxins. In: Using Botulinum Toxins Cosmetically: A Practical Guide. 1st edition. Martin Dunitz: Taylor&Francis Group, London, 2003.

96. Scott, A.B., Suzuki, D. Systemic toxicity of botulinum toxin by intramuscular injection in the monkey. Mov. Disord. 3: 333-335, 1998.

97. Tsui, J.K. Botulinum toxin as a therapeutic agent. Pharmacol. Ther. 72:13-24, 1996.

98. Lowe, N.J. Botulinum toxin type A for facial rejuvenation. Dermatol. Surg. 24: 1216-1218, 1998

99. Vartanian, A.J., Dayan, S.H. Complications of botulinum toxin A use in facial rejuvenation. Facial Plast. Surg. Clin. N. Am. 11: 483-492, 2003

100. Elmas C, Ayhan S, Tuncer S, Erdogan D, Calguner E, Basterzï Y, Gozil R, Bahcelioglu M. Effect of fresh and stored botulinum toxin a on muscle and nevre ultrastructure: an electron microscopic study. Ann Plast Surg. 2007 Sep;59(3):316-22.

101. Roger Aoki K. Botulinum neurotoxin serotypes A and B preparations have different safety margins in preclinical models of muscle weakening efficacy and systemic safety. Toxicon. 2002 Jul;40(7):923-8.

102. MarkW.Clemens,M.D. JamesP.Higgins,M.D. E.F.ShawWilgis,M.D. Prevention of Anastomotic Thrombosis by Botulinum Toxin A in an Animal Model Plast.Reconstr.Surg. 123:64,2009

103. Taek Kyun Kim, Eun Jung Oh, Jae Young Chung, Jae Woo Park, Byung Chae Cho, Ho Yun Chung The effects of botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2009) 62,906-913

104. Matic DB, Lee TY, Wells RG, Gan BS. The effects of botulinum toxin type A on muscle blood perfusion and metabolism. Plast Reconstr Surg. 2007 Dec;120(7):1823-33.

105. Shelosky, L. Botulinum toxin type A use in neurology. In Sommer, B., Sattler, G. (Eds.), Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine. 1st edition. Berlin-Vienna: Blackwell Science, 1-7, 2001.

106. Cohen, JL., Solish, N. Treatment of hyperhidrosis with botulinum toxin. Facial Plast. Surg. Clin. N. Am. 11: 493-502, 2003.

107. Guntinas-Lichius, O. Management of Frey's syndrome and hypersialorrhea with botulinum toxin. Facial Plast. Surg. Clin. N. Am. 11: 503-513, 2003.

108. Stupak, H.D., Maas, C.S. New procedures in facial plastic surgery using botulinum toxin A. 11: 515-520, 2003.

109. Senior, M.A., Fourie, L.R. Botox and the management of pectoral spasm after subpectoral implant insertion. Plast. Reconstr. Surg. 106(1): 224-225, 2000.

110. Richards, A., Ritz, M., Donahoe, S. et al. Botox for contraction of pectoral muscles. Plast. Reconstr. Surg. 108(1): 270- 271, 2001.

111. Cattin T, Govender S. Botulinum toxin for tethering of breast implant. Plast Reconstr Surg. 2005 Aug;116(2):686-8.

112. Venus MR. Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars. Plast Reconstr Surg. 2007 Jan;119(1):423-4; author reply 424.

113. Wilson AM. Use of botulinum toxin type A to prevent widening of facial scars. Plast Reconstr Surg. 2006 May;117(6):1758-66; discussion 1767-8.

114. Zhibo X, Miaobo Z. Botulinum toxin type A affects cell cycle distribution of fibroblasts derived from hypertrophic scar. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008 Sep; 61(9):1128-9.

115. De Aguiar G, Chait LA, Schultz D, Bleloch S, Theron A, Snijman CN, Ching V.Chemoprotection of flexor tendon repairs using botulinum toxin. Plast Reconstr Surg. 2009 Jul;124(1):201-9.

116. Van Beek AL, Lim PK, Gear AJ, Pritzker MR. Management of vasospastic disorders with botulinum toxin A. Plast Reconstr Surg. 2007;119(1):217–26.

117. Neumeister MW, Chambers CB, Herron MS, Webb K, Wietfeldt J, Gillespie JN, Bueno RA Jr, Cooney CM. Botox therapy for ischemic digits. Plast Reconstr Surg. 2009 Jul;124(1):191-201.

118. Fregene A, Ditmars D, Siddiqui A. Botulinum toxin type A: a treatment option for digital ischemia in patients with Raynaud's phenomenon. J Hand Surg Am. 2009 Mar;34(3):446-52.

119. O'Reilly DJ, Pleat JM, Richards AM. Treatment of hidradenitis suppurativa with botulinum toxin A. Plast Reconstr Surg. 2005 Oct;116(5):1575-6.

120 Celik E, Tercan M, Uzunismail A, Sağlam A. Versatility of botulinum toxin: a use in stabilization of pedicled muscle flaps. Plast Reconstr Surg. 2006 Feb;117(2):462-7.

121. Arnold PB, Merritt W, Rodeheaver GT, Campbell CA, Morgan RF, Drake DB. Effects of perivascular Botulinum Toxin-A application on vascular smooth muscle and flap viability in the rat. Ann Plast Surg. 2009 May;62(5):463-7.

122. Arnold PB, Campbell CA, Rodeheaver G, Merritt W, Morgan RF, Drake DB. Modification of blood vessel diameter following perivascular application of botulinum toxin-a. Hand (N Y). 2009 Sep;4(3):302-7. Epub 2009 Feb 5.

123. Clemens MW, Higgins JP, Wilgis EF. Prevention of anastomotic thrombosis by botulinum toxin a in an animal model. Plast Reconstr Surg. 2009 Jan;123(1):64-70.

124. Yildirim AM, Okur I, Orter Z, Uysal A. Nonsurgical delay of dorsal rat cutaneous flap using botulinum toxin type A. Plast Reconstr Surg. 2008 Jul;122(1):53e-54e.

125. Vartanian, A.J., Dayan, S.H. Complications of botulinum toxin A use in facial rejuvenation. Facial Plast. Surg. Clin. N. Am. 11: 483-492, 2003.

126. Blitzer, A., Binder, W.J., Boyd, J.B. et al. Management of facial lines and wrinkles. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

127. Lange, D.J., Rubin, M., Greene, P.E. et al. Distant effects of locally injected botulinum toxin: a double-blind study of single fiber EMG changes. Muscle Nerve 14: 672-675, 1991.

128. Adanalı G, Seyhan T, Turegun M, Senen D, Sensoz O: Effects of different vascular patterns and the delay phenomenon on rat ventral island flap viability. Ann Plast Surg 48(6): 660-664, 2002

129. Dunn RM, Mancoll J: Flap models in the rat: A review and reappraisal. Plast Reconstr Surg 90(2): 319-328, 1992

130. Finseth F, Cutting C: An experimental neurovascular island skin flap for the study of the delay phenomenon. Plast Reconstr Surg 61(3): 412-420, 1978

131. Bayramiçli M: Deneysel flep modelleri: Deri flepleri. In: In: Deneysel Mikrocerrahi, Editor: Bayramiçli M, Argos, Istanbul 2005, 443-489

132. Padubidri AN, Browne E: Modification in flap design of the epigastric artery flap in rats: a new experimental flap model. Ann Plast Surg 39: 500-504,1997

133. Pang CY, Forrest CR, Morris SF: Pharmacological augmentation of skin flap viability: A hypothesis to mimic the surgical delay phenomenon or a wishful thought. Ann Plast Surg 22: 293-306, 1989

134. Pang CY, Neligan PC, Forrest CR, Nakatsuka T, Sasaki GH: Hemodynamics and vascular sensitivity to circulating norepinephrine in normal skin and delayed and acute random skin flaps in the pig. Plast Reconstr Surg 78(1): 75-84, 1986

135. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nuvleic Acids Res 2001: 29; 2002-2007.

136. Walker NJ. A technique whose time has come. Science 2002: 296; 557-559.

137. Bossenge E. Coronary vasomotor responses: role of endothelium and nitrovasodilators. Cardiovasc Drug Ther (USA) 1994; 8(4): 601-10.

138. Drexler H, Zeiher AM, Meinzerk H. Correction of endothelial disfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic human. J Clin Invest 1992; 90: 1248-53.

139. Muuruganandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. Biochem Biophys Res Commun 1989;165: 802-9.

140. Radomski MW. Endogenous nitric oxide inhibits platellet adhesion to vasculer endothelium. Lancet 1988; 11: 1057-8.

141. Salvemini D, Denucci G, Gryglewski RJ. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platellet agregasyon by releasing a nitric oxide-like factor. Pros Natl Acad Sci USA 1989; 86: 6328-32.

142. Usmar VD, Radomski M. Free radicals in the vasculature: The good, the bad and the ugly. The Biochemist 1994;16(5): 15-22.

143. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: Evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. Plast Reconstr Surg 81: 233-239, 1988

144. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F: Vascular Endothelium Growth Factor, surgical delay and skin flap survival. Ann Surg 239(6): 866-875, 2004

145. Guba AM, Callahan J: Nutrient blood flow in delayed axial pattern skin flaps in pigs. Plast Reconstr Surg 64(3): 372-376, 1979

146. Sasaki GH, Pang CY: Pathophysiology of skin flaps raised on expanded pig skin. Plast Reconstr Surg 74(1): 59-67, 1984

147. Hoopes JE, Su CT, Im MJ: Enzymatic responses to skin flap elevation following a delay procedure. Plast Reconstr Surg 66(3): 369-372, 1980

148. Garcia PB, Nieto CS, Ortega JMR: Morphological changes in the vascularization of delayed flaps in rabbits. Br J Plast Surg 44: 285-290, 1991

149. Serafin D, Shearin C, Georgiade NG: The vascularization of free flaps: Aclinical and experimental correlation. Plast Reconstr Surg 60(2): 233-241, 1977

150. Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, Zienowicz RJ: Chemical delay: An alternative to surgical delay experimental study. Ann Plast Surg 49(1): 73-81, 2002

151. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Browne E: Improved perfusion after subcritical ischemiain muscle flaps treated with vascularendothelial growth factor. Plast Reconstr Surg 106: 1541-1546, 2000

152. Colville-Nash PR, Willoughby DA: Growth factors in angiogenesis:current interest and therapeutic potential. Mol Med Today 3:14-23, 1997

153. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S: The molecular control of angiogenesis. Intern Rev Immunol 21:33-49,2002

154. Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. J Biol Chem 267(16):10931-10934, 1992

155. Klagsbrun M, D'amore PA: Regulators of angiogenesis. Annu Rev Physiol 53:217-239, 1991

156. Roesel JF, Nanney LB: Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. J Surg Res 58: 449-459, 1995

157. Nall AV, Brownlee RE, Colvin CP, Schultz G, Fein D, Cassisi NJ, Nguyen T, Karla A. Transforming Growth Factor-β1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122(2): 171-177, 1996

158. Brown DM, Hong SP, Farrell CL, Pierce GF, Khouri RK: Platelet-derived Growth Factor-BB induces functional vascular anastomoses in vivo. Proc Natl Acad Sci 92: 5920-5924, 1995

159 Huemer GM, Shafighi M, Meirer R, Debagge P, Piza-Katzer H, Gurunluoglu R: Adenovirus-Mediated Transforming Growth Factor-β ameliorates ischemic necrosis of epigastric skin flaps in a rat model. J Surg Res 121: 101-107, 2004

160. Khouri RK, Brown DM, Leal-Khouri SM, Tark KC, Shaw WW: The effect of basic Fibroblast Growth Factor on the neovascularization process: skin flap survival and staged flap transfers. Br J Plast Surg 44: 585-588, 1991

161. Rashid MA, Akita S, Razzaque MS, Yoshimoto H, Ishihara H, Fujii T, Tanaka K, Taguchi T: Coadministration of basic Fibroblast Growth Factor and Sucrose Octasulfate (Sucralfate) facilitates the rat dorsal flap survival and viability. Plast Reconstr Surg 103(3): 941-948, 1999

162. Folkman J: Clinical applications of research on angiogenesis. N Eng J Med 333: 1757-1763, 1995

163. Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. Science 235: 442-447, 1987

164. Machens HG, Salehi J, Weich H, Münch S, Siemers F, Krapohl BD, Herter KH, Krüger S, Reichert B, Berger A, Vogt P, Mailänder P: Angiogenic effects of

injected VEGF165 and sVEGF-1 (sFLT-1) in a rat flap model. J Surg Res 111:136-142, 2003

165. Ribatti D, Vacca A, Presta M: The discovery of angiogenic factors: A historical review. Gen Pharmacol 35:227-231, 2002

166. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM: Therapeutic Angiogenesis. J Clin Invest 93:662-670, 1994

167. Hsu C, Alto P, Chang J: Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. J Hand Surg 29A(4): 551-563, 2004