T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENERVASYON İLE YAPILAN ÖNKOŞULLANDIRMANIN İSKELET KASINDA İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İsmail KÜÇÜKER

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Serhan TUNCER

ANKARA-2009

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENERVASYON İLE YAPILAN ÖNKOŞULLANDIRMANIN İSKELET KASINDA İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İsmail KÜÇÜKER

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Serhan TUNCER

ANKARA-2009

ÖNSÖZ

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel ve teknik olarak çalışma boyunca bana hoşgörüyle yol gösteren tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Serhan Tuncer'e;

Tez çalışmam sırasında fikirsel katkı ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Osman Latifoğlu'na, Sayın Prof. Dr. M. Cemalettin Çelebi'ye, Sayın Prof. Dr. Kenan Atabay'a, Sayın Prof. Dr. Seyhan Çenetoğlu'na, Sayın Doç. Dr. Reha Yavuzer'e, Sayın Doç. Dr. Sühan Ayhan'a, Sayın Doç. Dr. Selahattin Özmen'e, tezimin cerrahi aşamasındaki katkılarından dolayı Sayın Araş. Gör. Dr. Ayşe Şencan'a ve tüm Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D. araştırma görevlilerine, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi doktor ve çalışanlarına, çalışmamın biyokimyasal incelemelerini yapan Tıbbi Biyokimya Öğretim Üyesi Sayın. Prof. Dr. Nurten Türközkan ve Fen Edebiyat Fakültesi Biyokimya A.D Araştırma Görevlisi Sayın. Dr. Filiz Bircan'a, çalışmamın histolojik değerlendirmelerini yapan Histoloji ve Embriyoloji A.D. öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Çiğdem Elmas ve Sayın Araş. Gör. Eser Çağlar'a, çalışmamın istatistiksel analizini yapan istatistik uzmanı Sayın Salih Ergöçen'e, tezimin gerçekleşmesini sağlayan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi çalışanlarına;

Uzun tez çalışmalarım süresince bana sonsuz destek olan eşim Eda Küçüker, oğlum Efe Demir Küçüker ve aileme teşekkür ederim.

Dr İsmail KÜÇÜKER

İÇİNDEKİLER;

1. GİRİŞ ve AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1 İskelet Kasında İskemi – Reperfüzyon 3

2.2 Cerrahi Denervasyonun İskelet Kası Üzerindeki Etkileri 31

2.3 Botulinum Toksin 38

2.4 Sıçanda Biseps Femoris Kasının Anatomis 55

3. GEREÇ VE YÖNTEM 60

3.1 Cerrahi Teknik 60

3.2 Çalışma Grupları 63

3.3 İskemi-Reperfüzyon (İ-R) Döngüsü ve Doku örneklemesi 66

3.3 İstatistiksel Değerlendirme.....75

4. BULGULAR 76

4.1 Histolojik Değerlendirme.....78

4.2 Dokuda Apopitoz oranları.....93

4.3 Dokuların Biyokimyasal Analizleri 99

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 102

6. ÖZET.....112

7. ABSTRACT.....114

8. KAYNAKLAR 116

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İskemi; bir dokunun kan akımının durması sonucunda, o dokunun yaşayabilmesi için gerekli besinler ve oksijenden uzak kaldığı dönemdir. Kan akımının tekrar sağlanması sonrasındaki dönem ise "**reperfüzyon"** olarak adlandırılır. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve zehirli son ürünlerin uzaklaştırılması gibi olumlu etkilerinin yanında, uzamış iskemilerde doku hasarını arttıran metabolik yan ürünlerin üretiminin tetiklenmesi gibi zararlı etkileri de bulunmaktadır. Bu süreçte oluşan doku hasarları **"İskemi-Reperfüzyon Sendromu"** olarak bilinmektedir. İskemi reperfüzyon sendromunun önlenmesi amacıyla pek çok ajan deneysel olarak kullanılıp başarılı sonuçlar alınmasına karşın, bunların pek azı klinik kullanıma girmiştir.

Denervasyon; İskelet kasına gelen motor uyarıların kasa ulaşmasının engellenmesidir. Denervasyon iki şekilde yapılabilmektedir;

- **Cerrahi Denervasyon;** kasa dal veren motor sinirlerin kesilmesidir. Cerrahi denervasyonu takiben, erken ve geç dönemde, kas içi dolaşımda,[1,2] kasın genel yapısı[3-6] ve metabolizmasında[7-11] pek çok değişiklik meydana gelmektedir. Bu değişikliklerin kasın iskemi direncini nasıl etkilediği ve reperfüzyon hasarından koruyucu etkileri olup olmadığı ise henüz çalışılmamıştır.
- **Kimyasal Denervasyon;** motor sinirden gelen iletinin, kimyasal ajanlarla yapılan engellemelerle, kasa ulaşmasının önlenmesidir. **Botulinum Toksin Tip-A (BTx-A)** presinaptik sinir kas kavşağında, asetilkolin salınımını bloke ederek kasları üç - altı ay süreyle geçici olarak paralize etmektedir.[12] Bu denervasyonun

sonucunda da kasın dolaşımı,[13] genel yapısı[14,15] ve metabolizmasında[13,16,17] değişiklikler oluşmaktadır. Son yıllarda damar çevresi veya deri flebine bölgesel olarak uygulanan BTx-A'nın, anastomoz hattında tromboz oluşumunu azalttığı,[18] damar çaplarında genişleme yaptığı[19-21] ve deri fleplerinin sağ kalımını arttırdığı[22,23] gösterilmiştir. Buna karşın BTx-A ile yapılacak kimyasal denervasyonun kasın iskemi direncini nasıl etkilediği ve reperfüzyon hasarının olumsuz etkilerini azaltıp azaltmadığı henüz çalışılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı cerrahi veya BTx-A'yla kimyasal olarak gerçekleştirilen denervasyonun iskelet kasında **"İskemi-Reperfüzyon Hasarına" (İRH)** olan etkilerinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskelet Kasında İskemi – Reperfüzyon

Tüm dokular iskemik süreçte bir süre kendi enerji depoları ile idare edebilirler. Ancak uzayan iskemilerde bir noktadan sonra dokuların enerji depoları tükenir ve iskemi kalıcı hücre hasarları oluşturmaya başlar. Bu süre **kritik iskemi süresi** olarak adlandırılır. Her dokunun kendine özgü bir kritik iskemi süresi vardır. Bu sürenin normotermik koşullarda iskelet kasında 4 saat, sinir dokusunda 8 saat, yağ dokusunda 13 saat, deride 24 saat ve kemik dokusunda 4 gün olduğu bilinmektedir.[24] Bu veriler; iskelet kasının bir ekstremitede iskemiye en duyarlı doku olduğunu göstermektedir.

Kaslar içerdikleri miyoglobülin miktarına göre kırmızı (tip-1) ve beyaz (tip-2) kaslar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Pek çok kas, her iki tip kas lifini de benzer oranlarda içerirken, bacağın ön kompartmanındaki kaslarda kırmızı-yavaş seyiren tip-1 lifler, gastrokinemius kasında ise beyaz-hızlı seyiren tip-2 lifler baskındır. Kırmızı-yavaş seyiren liflerde ana enerji kaynağı trigliseritlerin oksidatif metabolizmasıyken, beyaz-hızlı seyiren liflerde ise ana enerji kaynağı, glikojenin anaerobik yoldan metabolize edilmesidir. Bu durum kırmızı-yavaş seyiren liflerin iskemiye olan duyarlılığını arttırmaktadır.[26]

Belkin ve arkadaşları 1988 yılında sıçan arka bacağında turnikeyle oluşturulan iskemi sonrasında kaslarda ciddi hasarın, iskeminin 3. saatinde başladığını ve 6. saatte kontrol grubuna oranla kasta sadece %3 fonksiyon varlığı kaldığını bildirmişlerdir.[25] Labbe ve arkadaşları, 1987 yılında köpek grasilis kas

modelinde yaptıkları çalışmada, iskeminin 3. saatinde % 2 olan nekroz oranının, 4. saatte % 30'a, 5. saatte ise % 90'a kadar yükseldiğini ve nekrozun kasın merkezinde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.[27]

Hayes ve arkadaşları, 1988 yılında yaptıkları çalışmada, iskemi sonrasında oluşan kas nekrozunun dokudaki Adenozin-tri-fosfat (ATP) miktarlarıyla yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir. ATP'nin tükenmeye başladığı durumlarda önce glikojen ve kreatinin fosfat enerji kaynağı olarak devreye girmektedir.[28] Anaerobik metabolizmanın kullanılması sonucu ortaya çıkan laktat hücre içi pH'sını düşürmektedir. Ayrıca ATP yetersizliğine bağlı olarak, hücre zarından geçiş işlevleri bozulmakta ve birbirine bağlı olayların tetiğini çeken Ca^{+2} ile proinflamatuar aracı maddeler hücre içerisinde birikmeye başlamaktadır.[29-31] Anaerobik metabolizmanın kullanılması ayrıca oksijen radikallerinin oluşumunu hızlandırmaktadır.[32] 1985 yılında Im ve arkadaşları,[32] 1983 yılında Manson[33] ve arkadaşlar yaptıkları çalışmalarda; anaerobik metabolizma esnasında toksik süperoksit radikallerinin biriktiğini ve bu maddelerin, deri fleplerinde iskemik geçiş bölgesindeki nekrozdan sorumlu olduklarını göstermişlerdir.

2.1.1. İskemik Süreçte Mikrodolaşım

Hammersen 1989 yılında yayınlanan araştırmalarında iskelet kasında, İRH sürecindeki mikro-dolaşımı incelemiştir. İnsanlarda, dolaşımın durması sonrasında, vastus lateralis kasında yaptığı çalışmalarda, iskeminin 3. saatinden itibaren mikro-dolaşımda önemli değişimler oluştuğunu bildirmiştir. Bu çalışmaya göre hücresel ilk değişiklikler kapiller lümen hücrelerinde görülmektedir. Hücre zarlarında lümene doğru çıkıntılar oluşurken, sitoplazmaya doğru invajinasyonlar görülmektedir.

İskeminin uzamasıyla birlikte endoteliyal veziküller oluşmakta ve endoteliyal hücrelerin arası açılmaktadır. Bu evrede lökosit ve trombositler oldukça nadir bulunmakta ve lümen birbirine sıkıca tutunmuş kırmızı kan hücreleriyle dolu görünmektedir.[34] Hammersen'in hayvanlar üzerinde yaptığı çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur. İskeminin 4. saatinde venül ve kılcal damarların lümenlerinin, neredeyse füzyona uğramış gibi görünen kırmızı kan hücreleriyle dolu oldukları bildirilmiştir. Reperfüzyonun ilk aşamalarında bu kırmızı kan hücreleri tomarlar halinde sıkışmakta ve endotel yüzeyini deforme etmektedir. Endotel hasarını takiben endotel hücrelerinin arası daha da açılmakta ve kılcal damarlar sonrasındaki venüllerin lümenlerinde trombosit yığınları baskın hale gelmektedir. Bu trombosit yığınları özellikle endotelin hasar gördüğü alanlarda yoğunlaşmaktadır. Bu süreçte daha büyük venüller ve küçük venlerde lökosit tutunmaları başlamakta ve hücreler arası mesafeye lökosit geçişleri görülmektedir. Küçük damarlarda ise lökositler, monositler ve lenfositler degranüle olmaksızın lümeni tıkamaktadır.[34]

Literatürdeki pek çok çalışma uzamış iskemi süresinin mikro-dolaşımdaki protein geçirgenliğini ve ödemi arttırdığını göstermektedir. Harman 1948 yılında tavşan arka bacaklarına turnikeyle 4 saat iskemi uyguladıktan sonra doku ödemini incelemiştir. Bu çalışmada, enfarktların daha çok olduğu kas gruplarında ödemin daha yüksek olduğu ve ödemin reperfüzyondan sonraki 3. saatte maksimum seviyeye çıktığını bildirilmiştir.[35] Petrasek ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları çalışmada bu verileri destekleyecek şekilde iskemi sonrası en az hasar görmüş olan kaslarda doku ağırlığının % 4, en çok hasar görülen grupta ise % 32 arttığını bildirmişlerdir.[36]

2.1.2. No-reflow Fenomeni

"No-reflow" fenomeni, uzamış iskemi sonunda dokunun reperfüze edilmesine rağmen mikro-dolaşımın geri dönüşümsüz olarak kapanmasıdır. İlk kez 1968 yılında Ames tarafından, iskemik beyin dokusunun reperfüze edilmesine rağmen, besleyici kapiller perfüzyonun geri gelmemesi olarak tanımlanmıştır.[37]

No-reflow fenomeninin patolojik olarak ilk tanımlanması ise 1922 yılında Brooks tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada köpeklerde uzun süren arteriyel tıkanıklıklar oluşturulduktan sonra kan akımı tekrar sağlanmıştır. Buna karşın kaslarda bazı alanlarda, bölgesel arterlerde pulsatil akım görülmesine karşın, perfüze olmayan alanlar olduğu ve bu alanların histolojik kesitlerde nekroza gittiği saptanmıştır.[38]

Harman 1948 yılında yaptığı çalışmada; tavşanların arka bacaklarına turnikeyle 8 saat boyunca iskemi uyguladıktan sonra reperfüzyona izin vermiştir. Bu süreç sonunda kan akımının büyük arter ve venlerde devam etmesine karşın, kılcal damar sisteminde kümelenmiş kırmızı kan hücrelerine bağlı olarak akım olmadığını belirlemiştir.[35]

Menger 1997 yılında "no-reflow" fenomeninin oluşum mekanizmalarını ayrıntılı olarak incelemiş ve 4 oluşum mekanizmasından bahsetmiştir.[39] Bunlar;

i. Damar içi hemo-konsantrasyon ve trombüs oluşması
ii. Kılcal damar endotel hücrelerinin şişmesi
iii. Lökositlerin lümeni tıkaması
iv. Damar dışı alandaki ödemin lümeni daraltması olarak tanımlanmıştır.

Aynı çalışmada endotel hücrelerindeki şişmenin enerji yoksunluğuna bağlı iyon pompalarının düzgün çalışamaması nedeniyle olduğu öne sürülmüştür. Hücrelerin şişmesi kılcal damarlardaki direnci arttırmakta ve reperfüzyonun erken aşamalarında iyice belirginleşmektedir.

Lökosit birikimin, tıkanmada bir sebep olmaktan çok, dolaşımdaki yavaşlamanın bir sonucu olduğu düşünülmektedir.[39,40] Fizyolojik şartlarda lökositler, akım hızının yüksek olduğu geniş çaplı damarlarda, örneğin kısa fakat geniş arterio-venöz geçişlerde seyahat etmeyi tercih ederler. Bu durum beslenme için gerekli olan kılcal damar ağındaki direncin düşük kalmasına yardımcı olur. No-reflow fenomeninde ise lökositler, kılcal damarlarda endotel yüzeyine yapışmamakta fakat bu alanlarda daha yüksek oranlarda birikerek akışkanlığı azaltmaktadır.[39,40]

Hagberg, 1985 yılında yaptığı çalışmada önce kaslarda elektriksel uyarılarla glikojen depolarını tüketmiş, sonrasında iskemi yaratarak doku hasarını incelemiştir. Bulgularında kas dokusunda beklenenden çok nekroz alanları görmesine karşın, mikro-dolaşımdaki hasar, kas hasarıyla uyumlu bulunmamıştır.[41] Bu durum kas nekrozunun mikro-dolaşımdaki hasar ile birebir uyumlu olmadığını göstermektedir. Bunun yanında kas iskelet sisteminde no-reflow fenomeni oluşması için dolaşımın durması gereken süre 6 saatin üzerindedir ve bu sürede kas hasarı zaten oluşmaktadır.[42,43]

2.1.3. Bölgesel ve Sistemik İnflamatuar Yanıt

Stotland ve Kerrigan primer iskemi nedeniyle oluşan hasarı yoksunluk, reperfüzyon sonrası oluşan hasarı ise bombardıman olarak tanımlamıştır.[44] İskemi reperfüzyon hasarı çok sayıda karmaşık moleküler olayın rol aldığı inflamatuar bir süreçtir. Oluşan bölgesel yanıtın birincil kaynağı ölen kas hücrelerinin son ürünleridir. Bu ürünler; asit fosfatazlar, aminoasitler, enzimler (SGOT, DH, CPK), histamin benzeri mediyatörler, inorganik fosfatlar, laktat, lizozomlar, miyoglobülin, nükleotidler, potasyum, proteolitik enzimler ve pürin bazlarıdır.

Toksik olan bu ürünler pıhtılaşma öncüsü olarak görev yapmakta, venüler trombozların artmasına ve arteriyel kollaterallerde spazm görülmesine neden olmaktadır. Bu maddeler mikro damarlarda doğrudan hasara yol açmalarının yanında damar dışı ödemi de arttırarak, mikro-dolaşımı daha da bozmaktadırlar.[24] Oluşan doku hasarlarına bağlı nötrofil-endotel yapışması gerçekleşmekte ve bunun sonucunda serbest oksijen radikallerinin oluşmasıyla doku hasarı gelişmektedir.[45,46]

İskemik kas miktarı arttıkça inflamatuar yanıt büyümekte ve bölgesel olan yanıt sistemik bir reaksiyona dönüşmektedir.[24] 1960 yılında Haimovici alt ekstremitedeki iskemilerin myoglobülinüriyle sonuçlanan böbrek yetmezliği oluşturduğunu göstermiştir.[51] 1966, 1969, 1978 yıllarında Blaisdell ve arkadaşları iskemik ekstremitelerin, kardiyo-pulmoner yetmezliklere ve bunlara bağlı ölümlere yol açabildiklerini göstermişlerdir.[52-54] Büyük iskemik alanlar, büyük sistemik reaksiyonlar oluşturmakta ve artan damar geçirgenliğine bağlı üçüncü alanlara sıvı kaçışı yaşanmaktadır. Azalan damar içi hacim böbreklerde dolaşım bozukluğuna yol

açmakta, kalp-damar sistemini olumsuz etkilemektedir. Sıvı kayıpları kontrol edilse bile akciğerlerle ilgili morbiditeler yaşanabilmektedir.

2.1.4. İskemik Dokulardan Salınan İnflamatuar Aracı Maddeler

İskemi sırasında hücre zarından geçiş sisteminin bozulmasıyla hücre içinde biriken kalsiyum, inflamatuar aracı maddelerin salınımında ikincil haberci görevini görür. Trombositler, endotel hücreleri ve diğer lökositler bu aracı maddelerin en önemli kaynaklarıdır. İskemik dokulardan salınan inflamatuar aracı maddeler şunlardır;

- Kompleman sistemi[55]
- Histamin[56]
- Interlökin[57]
- Lökotrienler[58]
- Serbest oksijen radikalleri[57,58]
- Trombosit aktive edici faktör[60,61]
- Serotonin
- Tromboksan[58]
- Tümör nekroz edici faktörü (TNF)[58,61]

2.1.5. İ-R Hasarında Ca^{+2} İyonları

Normal şartlarda hücre içinde 0,1µmol/L Ca^{+2} bulunur ki; çoğunluğu endoplazmik retikülüm içindedir.[65] Çeşitli faktörler ile hücre içine Ca^{+2} geçişi veya proteinlere bağlı kalsiyumun sitoplazma içinde serbestleşmesiyle hücre hasarı başlar.

Artan Ca^{+2} ile hücre içi enzimler ve transkripsiyon faktörleri aktive olur. Fosfolipaz, endonükleaz, ATPaz ve diğer proteazların aktivasyonu ile hücre iskeleti ve hücre zarını oluşturan yapı taşları bozulur. Hücre zarındaki değişiklikler sistemik etkilere neden olacak diğer sistemleri de aktive eder. Hücre ölümüne yol açan c-fos, c-jun, c-myc genleri aktive olur. Mitokondri içine Ca^{+2} akışı ile mitokondri enerji sistemi bozulur. Artan Ca^{+2} serbest oksijen radikal oluşumu dışında nitrikoksit (NO) artışı ile serbest nitrojen radikallerinin oluşumunu da artırır ve mitokondrideki elektron taşıma sisteminde kompleks 4'ü bloke eder.[65] Bu radikaller kaspas-3 sistemini aktive ederek hücre ölümüne neden olurlar.

2.1.6. İ-R Hasarında Mitokondri

Mitokondri; oluşan oksijen radikallerini, elektron taşıma sistemi ile indirgemektedir. Normal şartlarda oksidatif fosforilasyonda elektron taşıma zincirindeki ubikinon - sitokrom b bölgesinde oluşan radikaller farklı redoks mekanizmaları ile indirgenmektedir. Oysa iskemide, mitokondri iş yükü, dolayısıyla da radikal oluşumu artmaktadır.[64] Karşılanamayan indirgenme, mitokondri zar yükünü bozarak ve mitokondri zarındaki potasyum kanalları ve geçirgen porları açmaktadır. Bu durum mitokondri içine kontrolsüz iyon geçişine ve enerji metabolizmasının bozulmasına neden olmaktadır. Bu mekanizma takibinde sitokrom-c aktivasyonu ve apopitoza giden gen aktivasyonları ile sonuçlanmaktadır.[64] Diğer bir süperoksit kaynağı ise bakteriosidal rolü olan nötrofil zarında bulunan Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz sistem aktivasyonu ile süperoksit üretimidir. İskemi sırasında hücre içinde artan Ca^{+2}; gerek ikincil mesaj yolları, gerekse hücre içi potansiyeli etkileyerek NADPH sistemini

PKCα, PKCβII, S100 veya cPLA2 yolları ile aktive eder. Artan NADPH ile hücre içinde karşılanamayan oksijen radikali oluşumuna yol açar.

2.1.7. İ-R Hasarında Araşidonik Asit Salınımı

İskemide hücre içi Ca^{+2} artışı fosfolipaz A_2'yi aktive eder. Böylece zar fosfolipitleri yıkılır ve araşidonik asit oluşur. Araşidonik asit yıkımı ile lökotrien, prostoglandinler, prostasiklin ve tromboksan A_2 oluşur. Tromboksan oluşumu sırasında yan ürün olarak malonildialdehit (MDA) oluşur. Bu ürünlerin hepsine eikasonoid denir. Eikosonoidlerin etkileri şunlardır;

- Kemoatraktan rol oynayacak nötrofil birikimi ve nötrofil endotele yapışması.
- Nötrofil aktivasyonu ile H_2O_2 ve elastaz salınımı
- Vazokonstriktör etki ile dolaşımın bozulması.

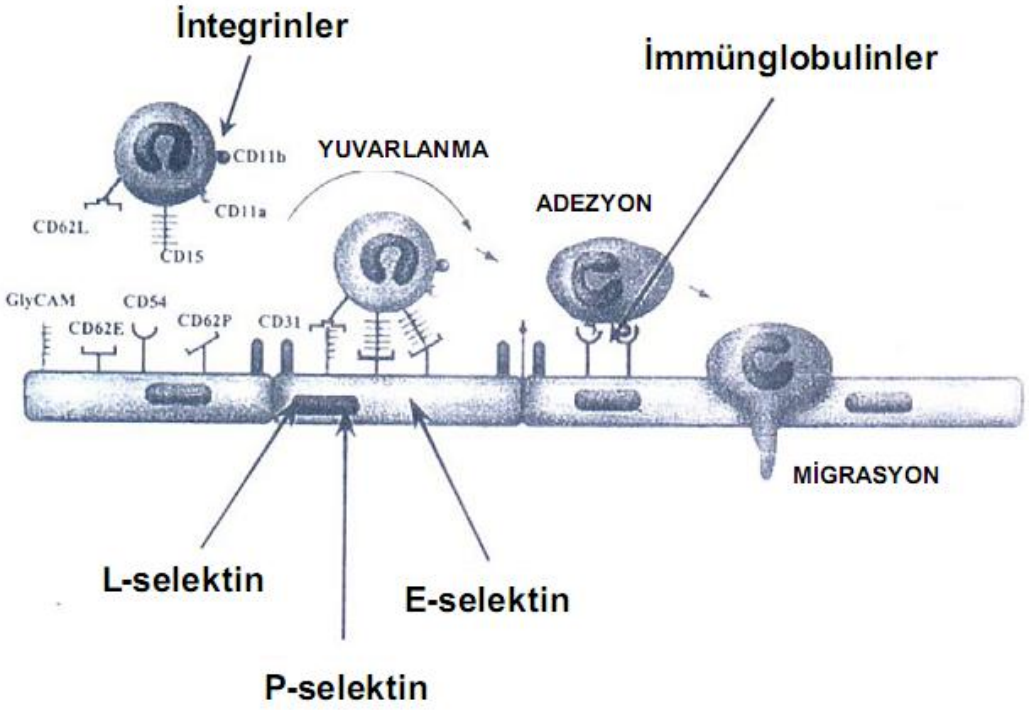
Lökotrien B_4 güçlü kemoatraktan rol oynayıp nötrofillerden hidrojen peroksit (H_2O_2) ve elastaz salınımına neden olur. Mikrodolaşımda vazokonstrüksiyonu tetikleyerek iskemiyi derinleştirir. Prostasiklin güçlü bir vazodilatatör ve antiagregan iken, tromboksan A_2 güçlü bir vazokonstriktör ve agregandır. İskemide prostasiklin artışının tersine tromboksan A_2 de azalma olur. Artan vazokonstrüksiyon ve trombosit birikimini, bölgesel iskemiyi ve inflamasyonu artırır. Bu mekanizmada tetikleyici rol oynayan serbest radikaller, ilerleyen iskemi ile beraber artar ve lipit peroksidasyon zincirinin aktivasyonuna neden olurlar.[66]

2.1.8. İ-R Hasarında Nötrofiller

Primer iskemi ve takibindeki reperfüzyon evrelerinde trombositler, endotel hücreleri ve diğer lökositler tarafından salınan kemotaktik faktörler, lökositleri uyararak otojen dokulara karşı harekete geçirirler. Nötrofiller bölgesel yanıtın oluşmasında oldukça önemlidirler. Hasarlı dokular ve kemotaktik ajanlar lökositleri kılcal damar ağına doğru yönlendirir. Yapışma moleküllerinin de yardımıyla önce kan akımındaki lökositler endotel boyunca yuvarlanma hareketini gerçekleştirirler.[49] Daha sonra oluşturdukları kuvvetli bağlarla endotel hücrelerine sıkıca yapışırlar. Endotele yapışma, hücrelerin harekete geçmesi ve serbest oksijen radikallerini salması için gereklidir.[50] Lökositler daha sonra endotel hücreleri arasındaki zayıf bölgelerden hücrelerarası mesafeye göç ederler (Şekil 1). Bu göçlerde etkili olan tutunma molekülleri şunlardır:[47,48]

- **Selektinler:** Yapışmanın erken döneminde etki gösteren hücre zarı proteinleridir. Selektinler; lökositler ve endotel hücreleri arasında zayıf bağlar oluştururlar ve bu bağlar aracılığıyla lökositlerin endotel hücreleri boyunca akışını yavaşlatırlar. Molekül yapısına ve üzerinde bulunduğu hücre tipine göre E, P ve L alt gruplarına ayrılırlar.
- **İntegrinler:** Lökosit ve endotel hücreleri arasında kuvvetli bağlar oluştururlar. Normal kan akımının varlığında dahi lökositleri damar duvarında hareketsiz hale getirebilirler. Çok sayıda alt gruba ayrılır (β1, β2, VLA-4, β7, α 4β7 ve diğerleri).
- **İmmünglobulin benzeri süper aile:** Bu grubun üyeleri, immünglobulinlere benzeyen çok sayıda hücrelerarası yapışma molekülünden oluşurlar (ICAM-1,

ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, PECAM-1, CD-31). Oluşturdukları güçlü bağlar sayesinde lökositlerin damar lümeninden hücreler arası alana geçişini sağlarlar.



Şekil 1. Nötrofiller ve endotel hücreleri arasında yapışma moleküllerinin aracı olduğu ilişki (Mier GM, Pereyra LHT, Ward PA. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion injury. J. Surg. Res. 94: 185-194, 2000.)

Nötrofil yapışmasının önemini araştırmak için yapılan bir çalışmada ICAM-1, TLR4 geni çıkarılmış, E-selektin antikor, integrin blokajı yapılmış farelerde I/R hasarının daha az olduğu görülmüştür.[62] ICAM reseptör blokajı ile nötrofil bağlanmasının önlenmesinin de özellikle organ transplantasyonunda koruyucu olduğu gösterilmiştir.[63]

Nötrofil inaktivasyonu sonucunda serbest oksijen radikallerinin, eikazonoidlerin ve proteazların aktivasyonu ile doku hasarı azalmaktadır.

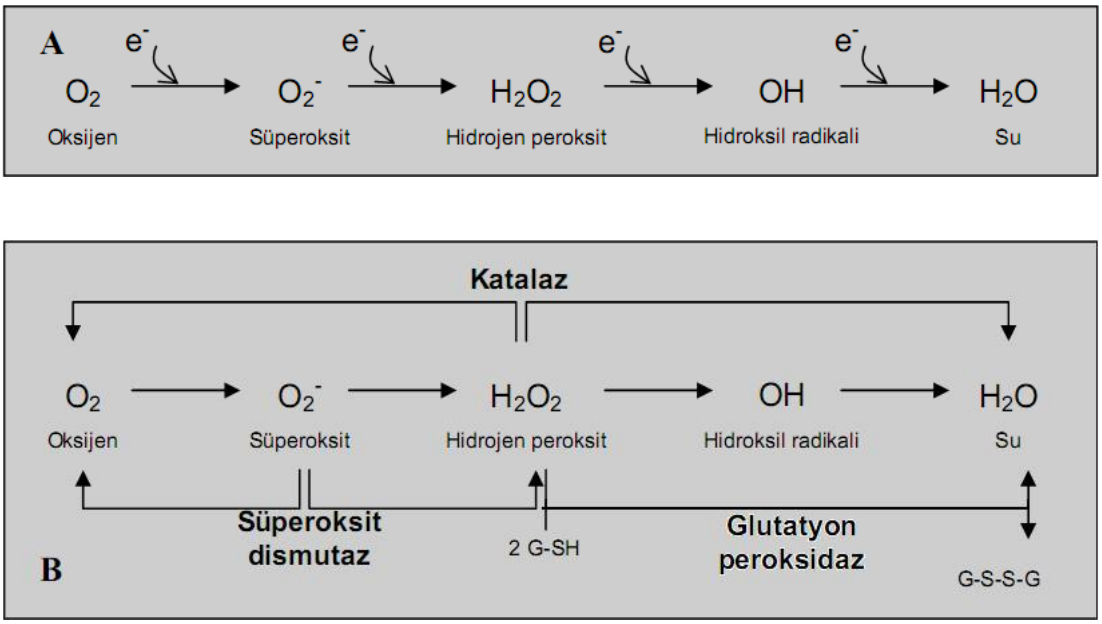
2.1.9. İ-R Hasarında Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, dış döngüsünde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran moleküllerdir. Yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktiftirler ve yaşam süreleri kısadır. İki tane eşleşmemiş elektronu olan oksijen önemli bir serbest radikaldir ve süperoksit adını alır. Süperoksitle reaksiyona giren moleküller serbest radikal oluşturur.

Üç temel tip serbest oksijen radikali vardır.

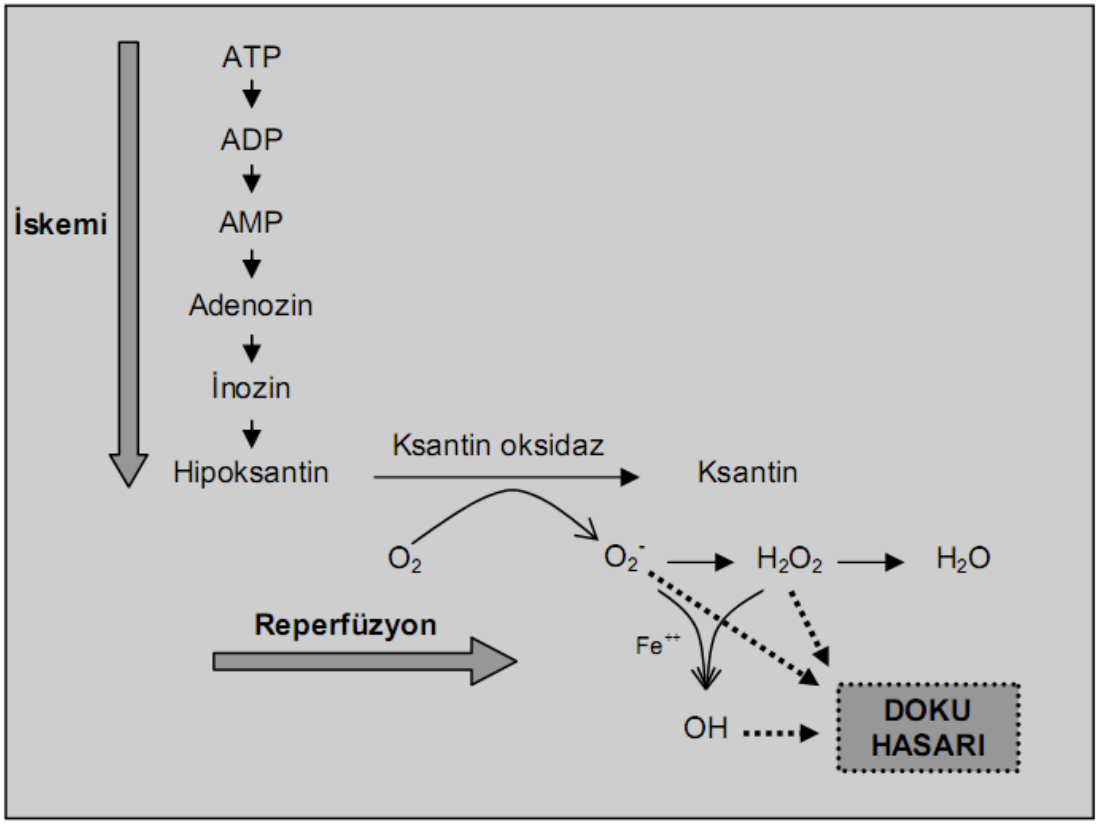
- **Süperoksit (O_2^-)** ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sistemi ile,
- **Hidrojen peroksit (H_2O_2),** süperoksit dismutaz enzimi ile,
- **Hidroksil radikali (OH^-),** ise demir moleküllerinin katalize ettiği reaksiyonlardan oluşmaktadır.

Bu yapılar, özel enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarla birbirlerine dönüşerek organizmada dengede bulunurlar. (Şekil 2)



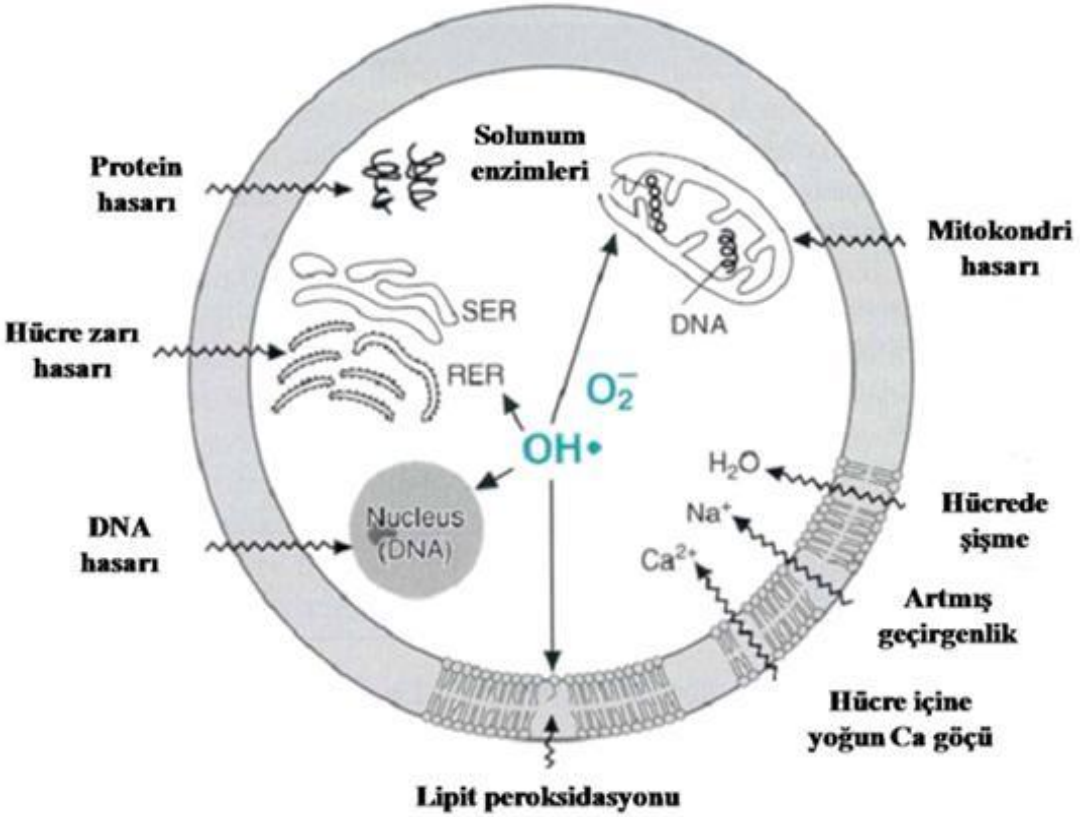
Şekil 2. A. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu. **B.** Enzimlerin serbest oksijen radikalleri üzerine etkisi (Champe PC, Harvey RA, Biochemistry. Lippincott's Illustrated Reviews. Lippincott Company, S: 114, 1994).

İskemi sırasında ATP kaynakları kullanılmakta ve hipoksantin oluşmaktadır. Reperfüzyon evresinde oksijenin yardımıyla hipoksantin ksantine dönüşmekte ve bu sırada süperoksit (O_2^-) radikali oluşmaktadır. İskemi uzayıp ATP tüketimi arttıkça hipoksantin üretimi dolayısıyla da reperfüzyon sırasında üretilen süperoksit radikallerinin miktarı artmaktadır. İ-R hasarı sırasında oksijen radikallerinin üretimi şekil 3'te özetlenmiştir.



Şekil 3. İskemi reperfüzyon hasarında rol alan serbest oksijen radikalleri ve ksantin oksidaz sistemi (Suzuki S, Yoshioka N, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y. Involvement of reactive oxygen species in post-ischemic flap necrosis and its prevention by antioxidants. Br J Plast Surg. 44: 130-134, 1991).

Serbest radikaller İ-R'de kritik role sahip olup normal hücre metabolizmasında da ortaya çıkarlar. Ancak normal hücre metabolizmasında düşük miktarlarda oluşan radikaller fizyolojik mekanizmalarla kolaylıkla etkisiz hale getirilebilmektedir. İ-R hasarında serbest radikallerin rolleri Şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. İ-R hasarında serbest radikallerin rolleri (www.medscape.com).

Vücutta süperoksit radikallerine karşı çeşitli doğal antioksidanlar mevcuttur. Bu antioksidan enzim ve moleküller, hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır. Bunlar;

- **Hücre içi:** Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, vitamin A,C,E,K, ürat, tiyoller, indirgenmiş glutatyon, ubilinar.
- **Hücre dışı:** Süperoksit dismutaz, ürat, serüloplazmin, metal şelatörler, transferin, albümin, laktoferrindir.

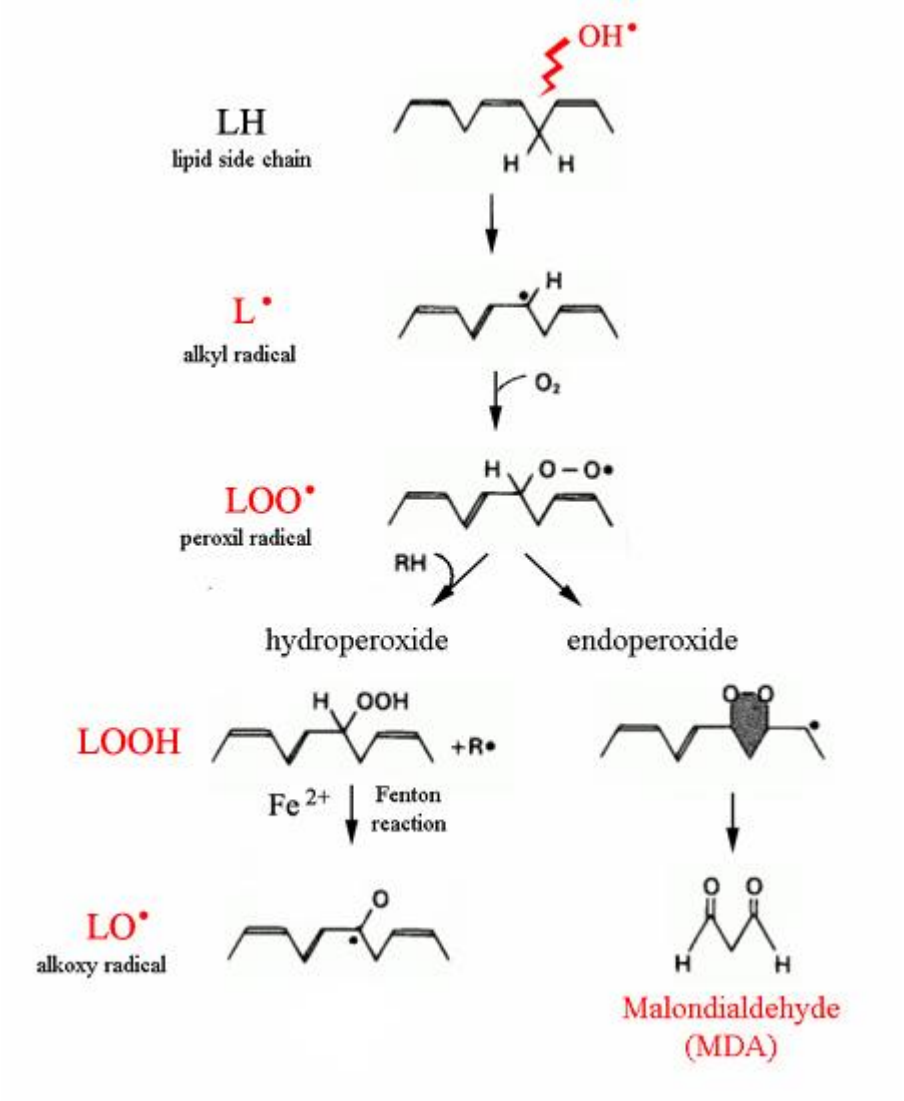
Antioksidanların etki mekanizmaları şunlardır:

- Serbest radikallerin tutulması veya daha zayıf bir moleküle çevrilmesi,
- Serbest radikallere hidrojen aktararak reaktivitenin azaltılması,
- Onarıcı etki veya zincir kırıcı etki şeklindedir.

2.1.10.İ-R Hasarında Lipit Peroksidasyonu ve Malonildialdehit

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre zarlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipit peroksidasyonu olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre zarlarında lipit serbest radikalleri ($L^{\cdot}$) ve lipit peroksit radikallerinin ($LOO^{\cdot}$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir.[67] Hücre zarlarında lipit peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleridir. Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki bileşik çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipit radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipit radikali ($L^{\cdot}$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipit radikallerinin ($L^{\cdot}$) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri ($LOO^{\cdot}$) oluşur. Lipit peroksit radikalleri ($LOO^{\cdot}$), zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit peroksitlerine ($LOOH^{\cdot}$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini

katalizleyerek devam eder. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit peroksitlerinin ($LOOH^-$) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma zarı ve subsellüler organel, lipit peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali (OH^-) oluşması, zincir reaksiyonunu başlatabilir. Lipit peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malonildialdehit (MDA) meydana gelir (Şekil 5).



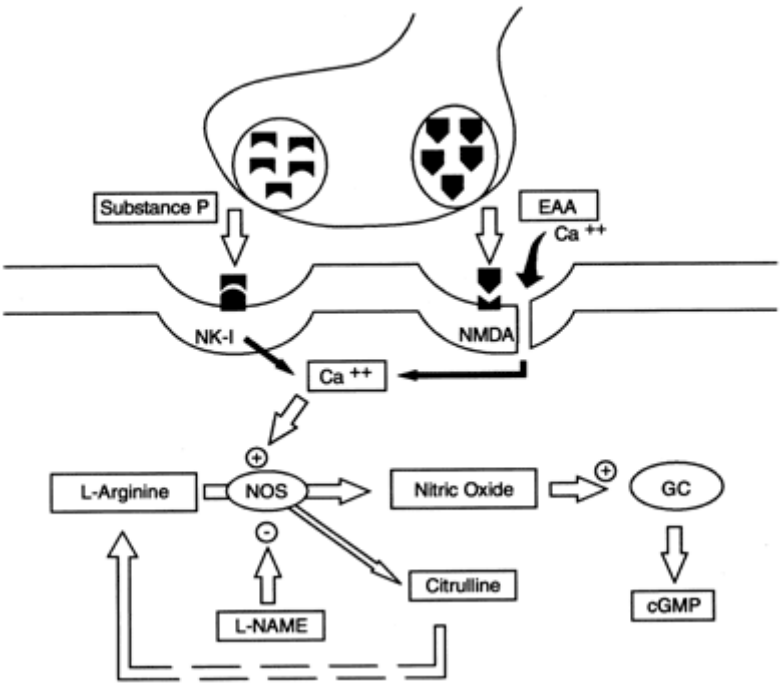
Şekil 5. Lipit peroksidasyonu sonrası MDA sentezi

Malonildialdehit (MDA) kanda ve idrarda ortaya çıkarak, yağ asidi oksidasyonunun özgün ya da nicel bir göstergesi olmamakla beraber, lipit peroksidasyon derecesiyle ilgilidir. Bu nedenle biyolojik materyalde malonildialdehit (MDA) ölçülmesi lipit peroksit seviyelerinin göstergesi olarak kullanılır. Non-enzimatik lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak zar yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle dolaylı olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur.[67,68]

2.1.11. İ-R hasarında Reaktif Azot Ürünleri

Nitrik oksit (NO^-) hem fizyolojik, hem de patofizyolojik süreçlerde önemli bir serbest radikaldir. NO^- sentezi bazı hücrelerde bir reseptöre uyaranın bağlanmasına veya nöronlarda sinir uyarısına yanıt olarak meydana gelir.

Nitrik oksit (NO^-) muskarinik veya histamin reseptörleri gibi çeşitli reseptörlerin aktivasyonu sonucu L-arjinin'den, nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39) etkisiyle sentezlenir. (Şekil 5)



Şekil 5. NO oluşum mekanizmaları ve sentezi *(*www.medscape.com)

Nitrik oksit sentazın farklı lokalizasyon ve düzenlenmeye sahip üç izo-enzimi vardır.

- **Nöronal NOS** (tip I, nNOS), nöral iletide fonksiyon görür.

- **İndüklenebilir NOS** (tip II, iNOS) normal şartlar altında bulunmaz. Enflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenir ve uzun dönemde bol miktarda üretilir.
- **Endoteliyal NOS** (tip III, eNOS) böbreklerde bulunur. Endoteliyal NOS (tip III, eNOS) vasıtasıyla oluşturulan nitrik oksit (NO^-), vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesi için en önemli sinyaldir.

iNOS hepatositler, makrofajlar, nötrofiller, düz kas hücreleri, kondrositler gibi birçok hücre tipinde indüklenebilir. iNOS vasıtasıyla oluşturulan NO^-, antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve bu nedenle özgün olmayan konak savunma sisteminin önemli bir parçasıdır. Sepsis, astım, romatoid artrit, aterosklerotik lezyonlar, tüberküloz, enflamatuar bağırsak hastalığı, helicobacter pylori'nin yol açtığı gastrit, allogreft reddi, Alzheimer hastalığı ve multipl skleroz gibi geniş bir hastalık grubunda iNOS'un arttığı saptanmıştır.[68]

Nitrik oksit (NO^-) Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece Fenton reaksiyonunu uyararak karsinogenezde rol oynar. Nitrik oksitin, süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit (O_2^-) radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Damar tonüsünün düzenlenmesi için süperoksit (O_2^-) ve nitrik oksit (NO^-) arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ileri sürülmektedir. Peroksinitrit, nitrik oksit zehirlenmesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO_2^-), hidroksil radikali (OH^-), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşür. Peroksinitrit, nitrik oksit son ürünleri (NOx)

olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir.[68] İ-R hasarının oluşmasında oksijen kaynaklı serbest radikaller gibi, azot kaynaklı serbest radikaller de önemlidir.[69] Dokudaki NOx (nitrit + nitrat) düzeylerinin tayin edilmesi azot kaynaklı serbest radikal hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır.[69]

2.1.12. İ-R Hasarında Apopitoz

Hücre ölümlerinde iki temel mekanizma vardır. Bunlar apopitoz ve nekrozdur.[70,71] Apopitoz fizyolojik, programlı hücre ölümlerindeki temel mekanizmadır.

a) **Apopitoz** yoluyla ölümlerde görülen olaylar şunlardır;
   - Hücrede büzülme,
   - DNA hasarı,
   - Düzenli kromatin kümelenmesi,
   - Plazmada baloncuklar oluşması,
   - Plazma zarından fosfoatidilserinin dışarı atılması.

b) **Nekroz** yoluyla ölümlerde görülen olaylar ise şunlardır;
   - Hücrede ve mitokondride şişme,
   - Dağınık kromatin kümelenmesi,
   - Plazma zar bütünlüğünün bozulması.

Geçmiş yıllarda İ-R hasarında hücre ölümlerinde sadece nekrozun etkili olduğu düşünülürken güncel çalışmalar apopitozun da beyin, kalp, karaciğer ve böbrek gibi pek çok dokuda İ-R hasarında önemli bir hücre ölüm yolu olduğunu göstermiştir.[70] Wang ve arkadaşlarının sıçan iskelet kası İ-R modelinde yaptıkları

çalışma;[70] apopitozun iskelet kası iskemi-reperfüzyon modelinde de hücre ölümlerinde etkili olduğunu göstermektedir. Kaspaslar tüm hücrelerde bulunan ve hücrenin apopitoza gitmesinin tetiğini çeken öncü proteinlerdir. Bunlar hedef proteinlerini belirli aspartat artıklarından parçalayan ve aktif bölgelerinde sistein içeren proteazlardır. Kaspaslar hücrede sitoplazmada büyük, inaktif öncüler olarak bulunurlar (pro-kaspaslar) ve genellikle bir kaspas diğeri tarafından parçalanarak aktifleşir. Böylece proteolitik bir döngü oluştururlar. Yapılan in-vitro çalışmalar apopitozun ani gerçekleşen hızlı bir olay olduğunu gösterir. Protoplazmanın zardan uzaklaşmasından, apopitotik cismin oluşumuna kadar bütün olaylar zinciri birkaç dakika sürer. Kaspaslar inaktif olarak sentezlenirler ancak hücrenin stres ya da ölüm reseptörleri ile uyarılmasından sonra aktif enzimlere dönüşürler. Öncelikle başlangıç kaspasları (örn. kaspas-8 ve -10) aktive olurlar, bunlar ise etkin kaspasları (Ör; kaspas-3, -6, ve -7) aktive ederler. Etkin kaspaslar bir kez aktive olduktan sonra artık geri dönüş yoktur ve hücre apopitoza gider.

2.1.13. İ-R Hasarının Önlenmesi

İ-R hasarının azaltılmasına yönelik ilk çalışmalar Kerrigan, Daniel ve daha sonra Pang tarafından yapılmıştır. Bu çalışmalarda topikal, bölgesel veya sistemik yolla verilecek maddeler sayesinde flep mikro-dolaşımında gelişebilecek "no-reflow" fenomeninin önlenebileceğini, geri döndürülebileceğini veya geciktirilebileceği bildirilmiştir.[72,73] Bundan sonra günümüze kadar İ-R hasarının önlenebilmesi için, bu zincirin değişik basamaklarına etki edecek çok sayıda farmakolojik madde deneysel çalışmalarda kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu maddeler İ-R hasarının

oluşumu sırasında etki ettikleri bölgeye ve etki mekanizmasına göre gruplandırılabilirler.

2.1.13.1. Antikoagülanlar

Antikoagülan ajanların temel etki mekanizması serbest doku aktarımları veya replantasyon cerrahilerinde anastomoz sahasında trombüs oluşmasını engellemektir. Bu ajanlar içerisinde klinikte en çok kullanılanı heparindir. Heparin, karaciğerde K-vitaminine bağımlı olarak sentez edilen antitrombin-III'ü aktif duruma getirerek antikoagülan etki yapar. Trombüs oluşma riskini azaltmasına karşın, iskemik süreçte aktive olan trombositlerden proinflamatuar uyarıcıların salınımını engelleyemez ve sistemik heparin kullanımının flep sağ kalımını arttırıcı etkisi olmadığı gösterilmiştir.[74] Bunun yanında sistemik heparin kullanımı cerrahi sonrası dönemde kanama riskini ve morbiditeyi arttırmaktadır. Sistemik uygulama yerine topikal olarak anastomoz sahalarında uygulanan heparin anastomoz sahasında sistemik heparine oranla daha yüksek anti-trombüs etkisi göstermekte ve morbiditeyi azaltmaktadır.[75] Son yıllarda kullanımları artan düşük moleküler ağırlıklı heparinler, sistemik heparinle benzer koruyucu etkiler göstermelerine karşın, daha az morbidite yaratmaktadırlar.

Bir diğer antikoagülan ajan, sülüklerin salgısında bulunan ve anti-trombin özellikleri olan hirüdindir. Sun ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada bölgesel uygulanan hirüdinin, sıçanlarda random patternli fleplerde konjesyonu azalttığını göstermişlerdir.[76] Schlaudraff ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada hirüdinin venöz konjesyonu azaltmakta başarılı olduğunu ancak arterio-venöz karışık yetmezliklerde herhangi bir faydasının olmadığını belirtmişlerdir.[77]

Yapılan bu çalışalar hirüdinin venöz göllenmelerde flep sağ kalımını arttırdığını bildirmektedir.[76,77]

Diğer bir antikoagülan madde ise trombositlerin hem yapışmasını, hem de birikmesini azaltan, ayrıca viskoziteyi düşürerek kan akımını arttıran dekstrandır.[78] Bugüne kadar dekstranla ilgili yapılan çalışmalar farklı sonuçlar ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada, dekstranla tedavi edilen tavşanlarda, salinle tedavi edilen tavşanlara göre flep sağ kalımının arttığı gözlemlenmiştir.[79] Buna karşın başka bir çalışmada, dekstranın flep sağ kalımı üzerine ek bir fayda sağlamadığı gösterilmiştir.[74]

2.1.13.2.Anti-İnflamatuar Ajanlar

Mikrovasküler trombozu ve İ-R hasarını önlemek için çeşitli non-steroid anti-inflamatuar ajanlar kullanılmıştır. Bu amaçla aspirin, ibuprofen ve ketorolak gibi farmakolojik ajanlar klinik ve deneysel alanda kullanıma sunulmuştur. Bunlar çeşitli yollarla araşidonik asit metabolitlerinin oluşmasını engelleyerek İ-R hasarında gelişen vazokonstrüksiyon, trombosit yapışma ve birikimiyle, nötrofiller için kemotaktik olan maddelerin salınmasını azaltırlar.[80-82] Ayrıca yine bu amaçla kullanılan steroidler, fosfolipaz A_2'yi inhibe ederek ve prostaglandinin, tromboksanların, lökotrienlerin ve platellet aktive edici faktörün sentezini de engelleyerek etki gösterirler.[83]

2.1.13.3.Serbest Radikal Hasarının Önlenmesi

Serbest radikallerin toksik etkilerini engellemek amacıyla kullanılan maddelerin tümü antioksidanlar olarak bilinir. Antioksidanlar, etki etme mekanizmalarına göre iki gruba ayrılırlar. Bunlar;

i. Reaktif oksijen ürünlerinin üretimini inhibe edenler,

ii. Üretimi tamamlanmış olan serbest radikalleri ortadan kaldıran ajanlar

Bu ajanlar, serbest radikal avcıları olarak da bilinirler. Serbest radikal avcıları, yüklü oksijen radikallerini daha az zararlı ürünlere indirgeyerek etki gösterirler.

Bu grup maddeler arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, trimetazidin, desferoksamin ve N-asetil sistein bulunur.[84,85] Ksantin oksidaz sistemine etki ederek serbest oksijen radikali üretimini engelleyen allopurinol ve epoksisüksinil türevinin de deneysel olarak flep sağ kalımını arttırdığı gösterilmiştir.[86,87] Deneysel olarak faydalı etkileri gösterilen bu maddelerin henüz klinik uygulamalarına ait deneyimler yetersizdir.

2.1.13.4.Vazodilatatörler

İ-R hasarında endotel hücre işlev bozukluğu nedeniyle endojen vazodilatatör yapımı azaldığından, dışarıdan verilen vazodilatatörlerin flep sağ kalımına olumlu etki edebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla kullanılan nitrik oksit ve nitrik oksit sağlayıcıları, kalsiyum kanal blokörleri, dipridamol, iloprost, "calcitonin gen-related peptide" (CGRP) ve adenozinin deneysel olarak olumlu etkileri gösterilmiştir.[88-92]

Nootropik, vazodilatör, antispazmodik ve antitrombotik özellikleri olan pirasetamın da pediküllü fleplerde sağ kalımını arttırdığı, İ-R hasarı sonucu oluşan nekroz miktarını azalttığı da gösterilmiştir.[111]

2.1.13.5.İmmün Sistem Düzenleyicileri

İmmün sistem baskılayıcıları, lökositlerin endotele yapışmasını ve lökositlerin etkinleşmesini önlerler. Bu sayede nötrofile bağlı hücre hasarını azaltırlar. Aşkar ve Bozkurt'un yaptığı çalışmada, siklosporin A'nın doğrudan yuvarlanan, yapışan ve damar duvarından göç eden lökosit sayısını azalttığı gösterilmiş, bu sayede kapiller perfüzyonun arttırılabileceği öne sürülmüştür. [83] İmmün sistem baskılayıcıları, dolaylı yoldan nötrofil infiltrasyonunu ve etkinleşmesini de engellerler. Kronik organ retlerinin önlenmesinde kullanılan siklosporin A'nın bu etkisinin yanında hücre mitokondrisini doğrudan İ-R hasarından koruyucu etkisi olduğu ve bu yol üzerinden de hasarı önlediği gösterilmiştir.[93]

2.1.13.6.Araşidonik Asit Anti-metabolitleri

Araşidonik asit anti-metabolitleri, İ-R hasarında ortaya çıkan lökotrien B_4 ve tromboksan A_2 gibi proinflamatuar aracı maddeleri inhibe ederler. Bir lipooksijenaz enzim inhibitörü olan dietilkarbamazin, özgün lökotrien B_4 ve tromboksan A_2 inhibitörleri ve balık yağı bu amaçla kullanılan ve faydalı oldukları deneysel olarak kanıtlanan ajanlardır.[94-96]

2.1.13.7.Nötrofil yapışmasının önlenmesi

Nötrofil yapışma molekülleri son zamanlarda araştırmacıların ilgisini çeken yapılardır. Selektin ve integrin adı verilen bu tutunma moleküllerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar dışarıdan verildiğinde, İ-R hasarını azaltarak flep sağ kalımını arttırdıkları gösterilmiştir.[97-99]

Ayrıca, bir steroid hormonu olan dehidroepiandrosteronun mikro dolaşımdaki yapışma moleküllerinin yanıtını azaltarak istenmeyen lökosit-endotel hücresi ilişkisini engellediği ve İ-R hasarını azalttığı gösterilmiştir.[100]

Aynı amaçla antihistaminik ajanlar ve fusoidin denenmiş ve bu ajanların nötrofil yuvarlanmasını ve yapışmasını engelleyerek İ-R hasarını azalttıkları saptanmıştır.[101,102]

2.1.13.8.İskemik ön koşullandırma

Dokuları uzun iskemi ve takip eden reperfüzyon hasarından korumanın bir diğer yolu ise iskemik ön koşullandırmadır. Önceden uygulanan kısa süreli iskemi süreçleri, dokuyu uzun sürecek iskemiye daha dirençli hale getirir. İlk kez 1986 da Murry tarafından kalp kası üzerinde gösterilen bu etki daha sonra diğer organlarda ve fleplerde gösterilmiştir.[103-107] Mounsey ve arkadaşları, iskemik ön koşullandırmanın kas flebini uzun süren iskemiye karşı dirençli hale getirdiğini göstermiştir.[108]

İskemik ön koşullandırmanın koruyucu etkisi hem görülme zamanı olarak, hem de etki mekanizması açısından iki tiptir. Erken ön koşullandırmanın etkisi reperfüzyon başladıktan dakikalar sonra görülür ve 2-3 saat kadar sürer. Buna karşın

gecikmiş ön koşullandırma 12-24 saat sonra ortaya çıkar ve etkisi 2-3 gün kadar sürer. Erken ön koşullandırma, protein sentezinden bağımsızdır ve iskemi sırasında açığa çıkan adenozin, NO, bradikinin, katekolaminler, reaktif oksijen ürünleri, opioidler ve anjiyotensin II koruyucu etki gösterirler. Gecikmiş ön koşullandırmada ise yeniden düzenlenen gen ifadesi sonrası yeni protein sentezi koruyucu etkiyi gösterir. Deneysel ve klinik alanda kullanılan tüm bu farmakolojik ajanların ve iskemik ön koşullandırmanın yanı sıra yapılan bazı basit cerrahi uygulamalarla da İ-R hasarı önlenmeye çalışılmıştır. Özellikle, koroner damarlar üzerinde yapılan çalışmalarda iskemiden sonra uygulanan kontrollü reperfüzyonun İ-R hasarını azalttığı gösterilmiştir.[109] Ünal ve arkadaşları sıçan arka bacak modelinde iskemiyi takiben gerçekleştirdikleri kademeli reperfüzyonun nötrofil ve süperoksit radikallerinin birikimini azalttığını ve doku nekrozunu sınırlandırdığını ortaya koymuşlardır.[110]

2.2. CERRAHİ DENERVASYONUN İSKELET KASINDAKİ ETKİLERİ

Cerrahi denervasyon, periferik sinirin bir kasa vermiş olduğu motor liflerinin kas ile olan tüm bağlantılarının cerrahi olarak kesilmesidir. 19. yüzyılın başlarından itibaren pek çok makalede cerrahi denervasyonun kasta yarattığı; morfolojik, yapısal, ultra-yapısal, metabolik ve dolaşımsal değişiklikler incelenmiştir.

2.2.1. Morfolojik, Yapısal ve Fonksiyonel Değişiklikler

Denervasyonla ilgili ilk uzun dönem çalışma Tower tarafından 1935 yılında kedilerde yapılmıştır. Bu çalışmada denervasyon sonrası bir yıllık takiplerdeki değişiklikler 3 fazda incelenmiştir. Bunlar atrofi, akut dejenerasyon ve fibrotik değişimlerdir.[113] Gutman 1948 yılında tavşanlarda 8 ay süreyle denervasyon sonuçlarını takip etmiş ve denervasyon sonrası değişiklikleri incelemiştir.[114] Bu çalışmada kas ağırlığında ve kas lifi uzunluklarında ilerleyici azalma olduğu ve atrofinin soleus kası benzeri yavaş seyiren kaslarda ekstensor digitorum longus (EDL) kası benzeri hızlı seyiren kaslara oranla daha fazla görüldüğünü belirtilmiştir.

Gutman ve Zelena 1962 yılında yaptıkları çalışmada 12-15 ay süren denervasyonun sıçanlardaki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada liflerin kısalmasının yanında sayılarının da azaldığı, ayrıca dizilimlerinin paralelliğini kaybettiğini ve bu kayıpların soleus kasında, EDL kasına oranla daha belirgin olduğunu bildirmişlerdir.[115] Pellegrino ve Franzini 1963 yılında denervasyonun etkilerini elektron mikroskobu ile incelemişler ve kastaki ilk yapısal değişikliklerin 7. günde bile görülebildiğini bildirmişlerdir.[116]

Denerve kaslarda zamanla ultra-yapıda da pek çok değişiklik olmaktadır.[112,117,118,123] Hu ve arkadaşları bu değişiklikleri erken ve geç olmak üzere iki evrede özetlemişlerdir.

Denervasyonun erken evrelerinde;

- Miyofilament ve sarkomerler büyük oranda normaldir
- Bazı kas hücrelerinin çekirdekleri genişlemiş ve soluk görünümdedir.
- Bazı mitokondrilerde vaküoller görülür,
- Miyofibrillerin çevresinde kollajen lifi proliferasyonu gözlenmez.

Altı ay sonrasında;

- Miyoflamentlerin bütünlüğü bozulur,
- Çekirdeklerin bazıları küçük ve koyu renkli, bazıları ise yoğunlaşır.
- Fibroblastların, yağ hücreleri ve miyofibriller etrafındaki kollajen liflerinin proliferasyonu görülür.
- Bir yıl sonra motor son plağı tanınamaz duruma gelir

Da-Xing Lu ve arkadaşları denerve iskelet kasını elektron mikroskobu ile 18 ay boyunca takip etmişler ve şu sonuçlara ulaşmışlardır;[123]

- Kas liflerindeki atrofi iki ayda belirginleşir fakat lifler arasında atrofi homojen değildir.
- Hücreler arası alanda ve damar çevrelerinde kollajen ve yağ birikimi giderek artar.
- Damarlar dejenere olur, ayrıca biriken kollajene bağlı olarak kaslardan izole olurlar ve beslenme bozulur.

- Denervasyonun sonrası hücre çekirdeğinde 2. ayda başlayan değişiklikler sonrası 9. ayda hücre çekirdeklerinin büyük bir kısmı merkezde yerleşmiş görünümdedir.
- Denervasyonun 2. ve 7. ayları arasında bazı çekirdeklerde kromatin kümelenmeleri ve parçalanmaları gözükmektedir.
- Denervasyonun 18. ayında kas lifi çapları, 30-80 μm'den 2-15 μm'ye düşmektedir.
- Sarkomerlerin yapısında değişimler görülür. Bu değişimler erken dönemlerde az olmakla beraber zamanla artar. Bununla beraber 18. ayda dahi yapısı bozulmamış, düzgün sıralı sarkomerler görülebilir
- Mitokondri zamanla küçülür, yuvarlaklaşır krista yapıları seyrekleşir.
- Sarkoplazmik retikulum düzensizleşir ve A-I bileşkeleriyle olan ilişkileri azalır.
- Sitoplazma içerisinde yağ vezikülleri ve fagositik veziküller artar.

Kas ağırlığıyla ilgili çalışmalarda; Hagerty ve arkadaşları denerve latissimus dorsi flebinde, kitle ve hacim değişikliklerini değerlendirmişlerdir. Kas ağırlığında, altı hafta sonrasında % 20, altı ayda % 45, dokuz ayda % 55 kayıp olduğunu ve bu kaybın direkt olarak kas hacmi ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.[119] Serbest mikrovasküler kas transferlerinden sonra ise 2. haftada kas hacminde 1,5 katlık bir artış olup, bu değer 9. ayda normal değerlerine ulaşmaktadır.[118,120] Serbest kas transferinden dokuz ay sonra, ortalama kas lifi çapında azalma, tip-1 liflerde atrofi, tip-2 lif oranında artış olup; ameliyattan 2 hafta sonra başlayan yağlı değişiklikler ve fibrozisin zamanla artarak devam ettiği tespit edilmiştir. Kas lifi çapındaki azalma;

alıcı saha, postoperatif enfeksiyon, hareketsizlik ve yaralanmadan cerrahiye kadar geçen süre ile ilişkilidir.[118,120]

Denervasyon sonrasında iskelet kasında fonksiyonel değişiklikler incelendiğinde denervasyonu takiben ilk iki-üç gün içinde kasılma hızında yavaşlama, kasılma gücünde azalma görülür.[112] Sonraki birkaç haftalık dönemde kasılmalarda bir miktar düzelme olur. Bunların en önemli sebebi denerve olan kasta hücre zarının yüksek frekanslarda aksiyon potansiyeli oluşumuna izin vermemesidir.[112,121] 1994 yılında yapılan bir çalışmada postnatal dönemde denervasyon yapılan sıçan ve kedilerin kaslarında yavaş seyiren lif sayısının azaldığı, hızlı seyiren kas lifi sayısının ise arttığı saptanmıştır.[122]

2.2.2. Denervasyonun İskelet Kası Metabolizması Üzerine Etkileri

Kauffman ve Albuquerque 1970 yılında yaptıkları çalışmada denervasyonu takiben beş gün içinde EDL kasının enerji ihtiyacının % 36 azaldığını göstermişlerdir.[125]

DuBois ve arkadaşları, 1983 yılında, denervasyonun; iskelet kasında glikoz oksidasyonuna etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada denervasyonu takiben kasın yaş ağırlığındaki düşüşe bağlı olarak, total glikoz oksidasyonu azalmaktadır. Ancak kas birim ağırlığına göre olarak belirlenen özgün glikoz oksidasyonu hesaplandığında; denervasyonu takiben ilk on gün, glikoz oksidasyonunun daha yüksek olduğu bulunmuştur.[124] Bu oran 20. günden sonra iyice azalmakta ve toplam glikoz tüketimiyle paralellik göstermektedir. Bu bulgular çalışmada ilk 10 gün içerisinde kasta total enerji ihtiyacında bir azalma olmasına karşın, birim oksidatif kapasitede artış olduğu şeklinde yorumlanmıştır.[124] Ayrıca oksidatif kapasitede 20

günden sonra belirginleşen düşüşlerin, mitokondride oluşmaya başlayan ultra-yapısal değişikliklerle ilişkili olabileceği belirtilmiştir.[124]

Davis ve Karl 1988 yılında hücrelerin denervasyon sonrası glikoz ve protein döngülerini incelemiştir. Çalışmada denerve olan kaslarda bazal glikojen miktarlarının azaldığı belirtilmiştir. Normal kas hücresinde glikojen miktarı azalınca glikojen sentezi artmasına karşın, denerve edilmiş kasta glikojen sentez hızı artmamaktadır. Bu durum insülin direnciyle açıklanmaktadır. İlk on gün içinde glikozun hücre içine göç hızı artmaktadır. Buna karşın glikojen sentez hızı artmamakta, aksine hücreye ulaşan birim kas miktarına oranla artan oksidatif fosforilasyonda kullanılmaktadır. Proteinlerin hem sentezi hem de yıkımı artmaktadır ancak yıkım yapımdan daha yüksek olmaktadır.[126] İlk on gündeki glikolitik ve oksidatif fosforilasyon yönündeki tablo 20. günden sonra değişmekte ve oksidatif yolların aktiviteleri azalmaktadır.[124, 127]

2.2.3. Denervasyonun İskelet Kası Dolaşımına etkileri

Banbury ve arkadaşları 1999 yılında yayınladıkları çalışmalarında sıçan kremaster kasının denervasyon sonrası erken dönemde mikro-dolaşımını incelemişlerdir. Karşı kremaster kası kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bulgular şu şekildedir;[128]

- Damar çapları: İlk 24 saat içinde vazokonstrüksiyon görülmektedir. Bunun sebebi denervasyona tepki olarak endotel hücrelerinde rezerv edilen vazo-aktif maddelerin salınmasıdır. Bu faza hiperadrenerjik faz denmiştir. 48. saatte damarlar denervasyon öncesindeki kalınlıklarına geri dönmektedir. Bu süreçte

sistemik vazo-aktif maddelere yanıt azalmıştır ve bu faza non-adrenerjik faz denir. Birinci haftada denerve taraftaki damardaki genişleme en üst seviyeye ulaşmakta ve ikinci haftada kontrol grubu seviyelerine dönmektedir. Vazodilatasyondaki bu azalmanın sebebi ise adrenerjik ajanlara olan cevabın bu evrede geri dönmesidir. Bu faza ise aşırı duyarlılık fazı denir. Böylece denervasyona üç fazlı bir yanıt oluşur.[128]

- Eritrosit akım hızları: Denervasyondan hemen sonra birinci, ikinci ve üçüncü sıra arteriollerde eritrosit akım hızları artmaktadır.
- Kılcal damar perfüzyonu: Denervasyonu takiben 48 saat içinde kılcal damar perfüzyonu artar ve bu artış 2. haftada iyice belirginleşerek kontrol grubunun % 133'üne ulaşır.
- Lökosit-Entotel yapışması: İlk 24 saat içinde yüksek bulunmasına karşın, 48. saatte normale döner
- Vazo-aktif maddelere yanıt; İlk bir hafta yanıt oldukça düşüktür. Birinci haftada asetilkolin ve norepinefrine tepki oluşmaya başlarken, ikinci haftada tüm vazo-aktif maddelere hiperadrenerjik bir yanıt oluşur.

Çalışmanın sonunda yazarlar iki hafta önceden kasa yapılacak denervasyonun kastaki perfüzyonu arttırabileceğini ve klinik kullanımının olabileceğini belirtmişlerdir. İki haftadan kısa ya da uzun süreli denervasyonların fayda veya zararları hakkında ise yorum yapmamışlardır.[128]

2.2.4. Denervasyonun Apopitoza Etkisi

Borisov ve Carlson 2000 yılında sıçan iskelet kasında yaptıkları çalışmada denervasyon sonrasında atrofiye giden kaslarda yoğun miktarda apopitoz belirlediklerini bildirmişlerdir.[4]

2.3. Botulinum Toksin

2.3.1. Genel Bilgiler

Botulinum toksin zehirlenmesinin klinik olarak ilk tanımı Dr. Justinus Kerner tarafından 1817 ve 1822 yıllarında yapılmıştır. Daha sonra Prof. van Ermengen toksinin kaslarda yaptığı paralizinin ölümle sonuçlandığını bildirmiştir. Prof. van Ermengen izole ettiği anaerobik sporlu basili Bacillus botulinus olarak adlandırmış, daha sonraları ise basilin adı Clostridium botulinum olarak değiştirilmiştir. Botulinum toksinin ikinci serotipi olan tip-B 1910'da Leuchs tarafından bulunmuştur. Toksinin etki mekanizması ise 1949 yılında Burken tarafından tanımlanmıştır. 1973'de Scott tarafından hayvanlarda test edilen nörotoksin, klinik olarak ilk kez 1989'da strabismus, hemifasyal spazm ve blefarospazm tedavisi için FDA (Food and Drug Administration) onayıyla kullanılmaya başlanmıştır. Botulinum toksin tip-A'nın kozmetik kullanımı ise ilk olarak Jean ve Alastair Carruthers tarafından rapor edilmiştir.[129]

Clostridium tetani ve Clostridium botulinum temel yapıları ve etkileri bakımından benzerlik göstermektedir. Clostridium tetani merkezi sinir sistemi üzerine, Clostridium botulinum ise periferik sinir sistemi üzerine etkilidir. Botulinum toksin (BTx), sporlu ve gram (+) bir anaerob olan Clostridium botulinum'un ekzotoksinidir. BTx'in A, B, C1, D, E, F ve G olmak üzere yedi farklı serotipi bulunur.

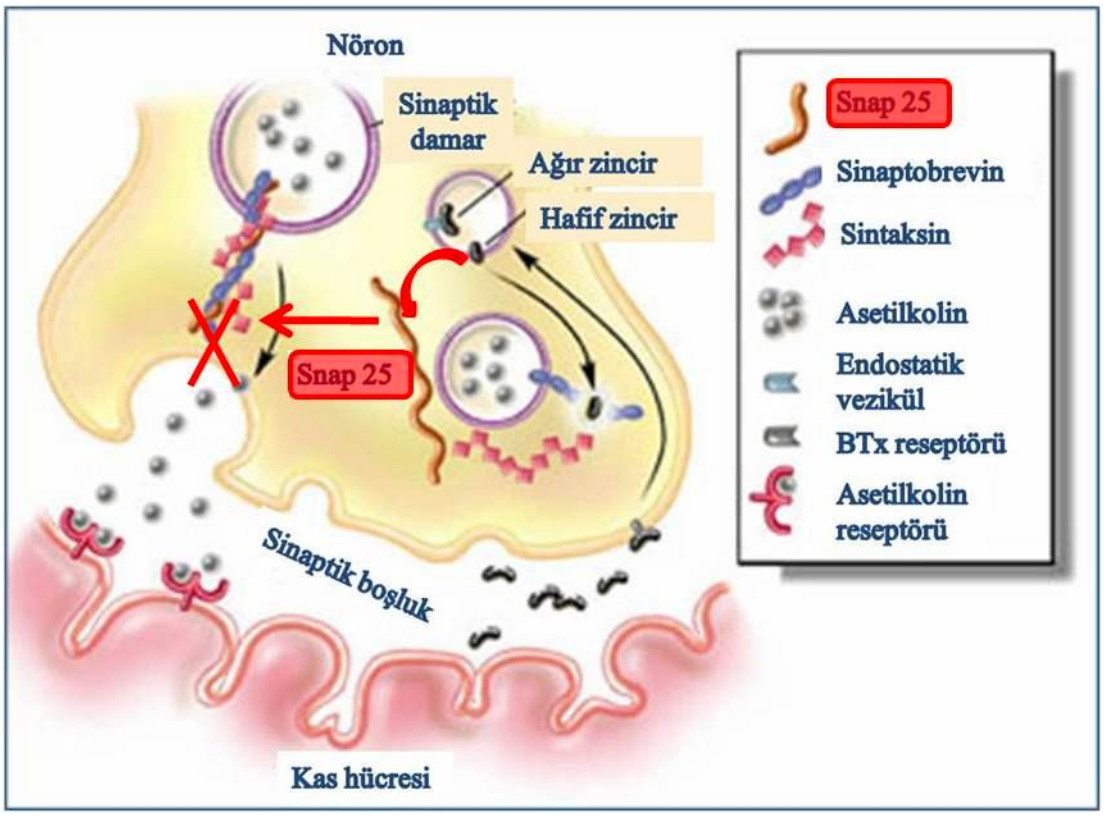
Doğada oldukça dirençli olan botulinum sporları kaynadıktan sonra bile yaşamını sürdürebilmektedir. Toksinin yok edilmesi için, 80 °C'nin üzerinde, 10 dakikadan fazla veya pH>7 olan ortamda bir süre tutulması gerekmektedir.[118]

İnsanda beş farklı botulizm görülmektedir. Bunlar:

- İnfantil (intestinal) botulizm: Yutulan sporların kalın bağırsaklarda açılmasıyla oluşur
- Besin (klasik) botulizmi: kontamine yiteceklerin yenmesiyle oluşur
- Yara botulizmi: enfekte yarada görülür
- İnhalasyona bağlı botulizm: Biyolojik silah yaralanmalarından ötürü literatürde 3 olguda bildirilmiştir.[118]
- İyatrojenik botulizm: Tedavi amaçlı yapılan BTx uygulaması sonrasında bölgesel veya sistematik botulizm bulguları görülmesidir. Literatürde iki olguda bildirilmiştir.[130]

2.3.2. Yapısal Özellikleri ve Etki Mekanizması

Botulinum nörotoksinleri birbirine disulfit bağlarıyla bağlanmış 100 kd'lik ağır zincir ve 50 kd'lik hafif zincirden oluşan 150 kd'lik inaktif bir polipeptitdir. BTx; tripsin benzeri bakteriyel proteazlarca aktif forma dönüştürülürken, ısı ile ağır-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.[131] (Şekil 6)



Şekil 6; Botulinum toksin periferik sinir sisteminde reseptörlere bağlandıktan sonra hücre içine alınarak aktive olur. Daha sonra presinaptik kavşakta asetilkolin salınımını geri dönüşümsüz olarak engeller.

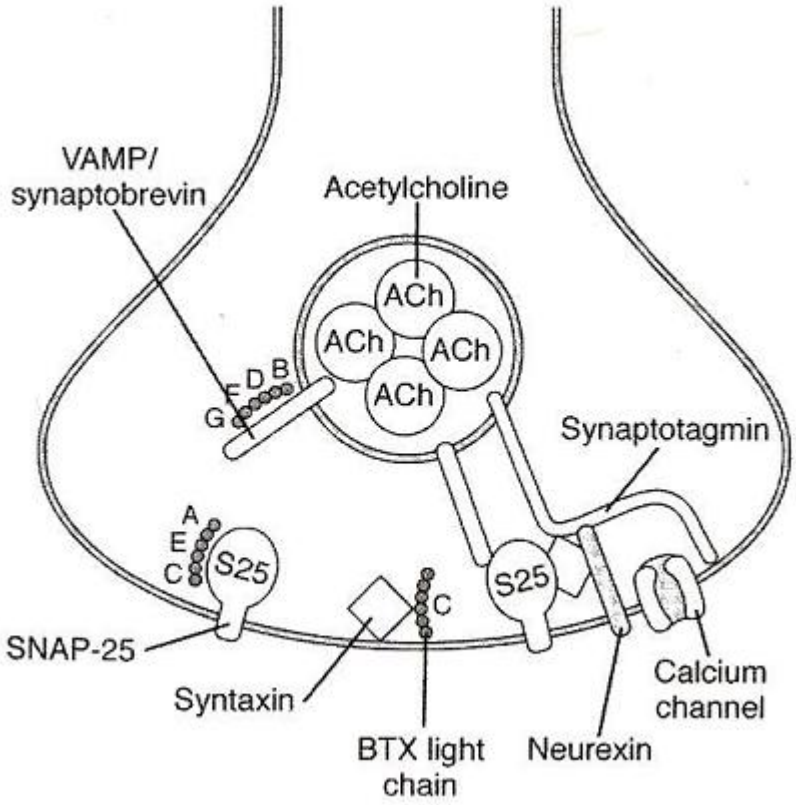
(http://www.derm.net/images/my_mode_of_action.jpg)

Botulinum toksinin yol açtığı paralizi üç adımda gerçekleşir:

- **Bağlanma:** BTx; ağır zinciri aracılığı ile presinaptik kolinerjik reseptörlere geri dönüşümsüz olarak bağlanır.
- **Hücre içine giriş:** Nörotoksin reseptör bağımlı 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.
- **Nörotransmitter salınımının engellenmesi:** Asetilkolin taşıyan veziküllerin hücre zarı ile birleşerek, içerdiği asetilkolini nöromuskuler kavşağa bırakması için, hücre içinde aktif SNARE kompleksinin bulunması gereklidir. SNARE kompleksi 3 temel yapıdan oluşmaktadır. Bunlar **"Sinaptobrevin"** (VAMP=Vesicle-associated membrane protein), **"SNAP-25"** (25 kd synaptosome-associated protein) ve **"Sintaksin"** dir. BTx'in hafif zinciri, çinko bağımlı endopeptidaz aktivitesi ile proteolitik etkinlik kazanarak, asetilkolin veziküllerinin ekzositozundan sorumlu zar proteinlerini parçalar ve asetilkolin salınımını engeller.

Her bir BTx serotipi SNARE kompleksinin farklı bir parçasını bloke ederek etki gösterir.

- **Serotip A, C,ve E;** SNAP-25'i
- **Serotip B, D, F ve G;** Sinaptobrevini (VAMP)'i
- **Serotip C;** SNAP-25'i parçalamanın yanında primer etkisini sintaksini parçalayarak gösterir.



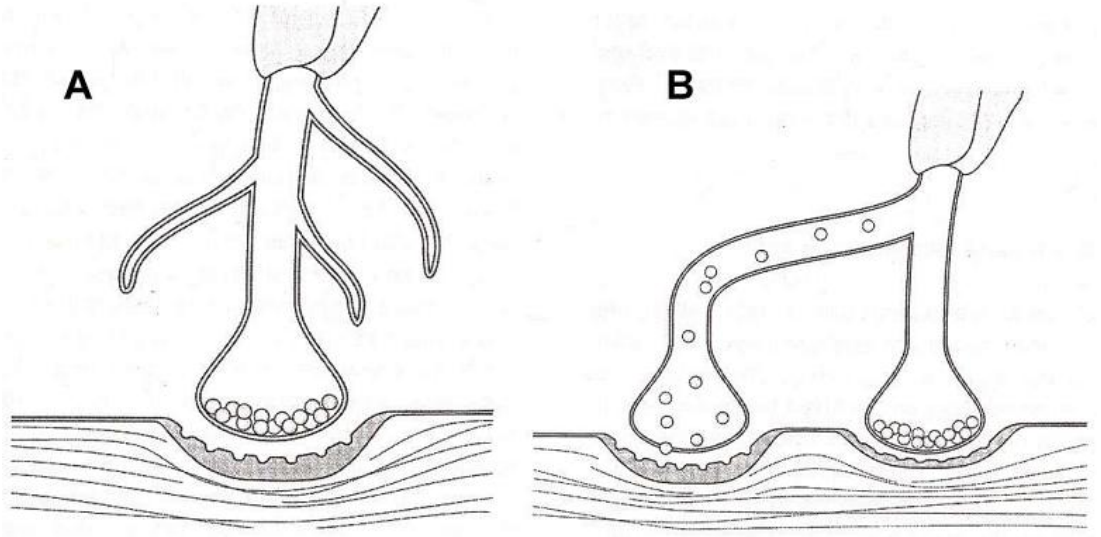
Şekil 7. Farklı Botulinum toksin serotipleri, hücreden asetilkolin salınımını farklı yollardan engeller. (Facial Plastic Surgery Clinics of North America 11 2003)

BTx'in etkisinin geri dönüşümü için, sinir yeni aksonal uçlar üretmek zorundadır. Bu işlem iki aşamada gerçekleşir:

- 1. Aşama; sinir uçlarında aksonal filizlenme meydana gelir. Bu sinir terminalleri, motor son plak bölgesinde uzanımlar oluşmasına yol açar ve böylece yeni bir nöromüsküler bileşke inşası başlar. Bu işlem yaklaşık 28 günde tamamlanır ve bütün nöral iletim yeni filizlenen aksonlar aracılığıyla olur.

- 2. Aşama, orijinal ana terminaller nöral geçişi yeniden kazanır ve yeni oluşan aksonal filizlenmelerin sinaptik fonksiyonlarının kaybı ve elenmesi gözlenir.

İkinci aşama yaklaşık 91 gün sonra tamamlanır. Bu iki aşamanın gerçekleşmesiyle BTx'in klinik aktivitesi sonlanmış olur.[130-132]



Şekil 8. BTx aktivitesinin sonlanma aşamaları A) Aksonal filizlenmenin meydana gelişi, 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)

2.3.3. İmmünolojik Özellikleri

Botulinum toksin preparatlarına karşı immünolojik yanıt toksine veya taşıyıcı olan non-toksin proteine karşı gelişebilir. Non-toksin bölümüne karşı oluşan antikorlar, klinik olarak nörotoksin aktivitesini bozmadıklarından "non-nötralizan antikorlar" olarak tanımlanırlar. Nörotoksine karşı oluşan antikorlar ise "nötralizan antikorlar" olarak isimlendirilir. BTx'in herhangi bir serotipini etkisiz hale getirebilen antikorlar, diğer tiplere karşı etkisizdir ve immünolojik yanıt durumunda preparatın değiştirilmesi uygun olacaktır.[132] Servikal distoni sebebiyle bir ya da daha

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 azaltılabilmektedir.[132] BTx-A preparatlarında stabilize edici olarak kullanılan insan albümini, antikor oluşumunda suçlanan etkenlerden en önemlisidir. Piyasadaki iki BTx-A preparatı arasında daha düşük protein içermesinden dolayı Botox®'a immünolojik yanıt Dysport®'a oranla daha azdır.[133]

2.3.4. Doz Önerileri ve Saklama Koşulları

Botulinum toksin serotipleri içerisinde en çık kullanılanı BTx tip-A'dır. Avrupa'da Dysport® (Ipsen; Maidenhead, UK), Neuroblock® (Elan Pharmaceuticals) ve Botox® (Allergan; Irvine, Calif.) ticari isimleri ile bulunmaktadır. Sonradan FDA onayı alan BTx tip-B ise Myobloc® ticari adıyla satışa sunulmuştur.

Bir ünite (U) ya da mouse unit (MU), periton içerisine enjeksiyon sonrası, 18-22 gr dişi Swiss-Webster farelerinin % 50'sini öldürebilecek doz olarak belirlenmiştir. Bir Botox® ünitesi, yaklaşık 2,5 - 4 Dysport® ünitesine ve 60-75 Myobloc® ünitesine eşdeğerdir.[132]

İnsanlarda ortanca öldürücü doz (LD50), 70 kg ağırlığındaki bir kişi için 2500-3000 U Botox®'tur. Spastisite tedavisi amacıyla kullanılan en yüksek doz ise

400 ünitedir.[134,135] Yüzde mimik kırışıklıklar için kullanılan Botox® dozu, her bir seans için ortalama 50-60 ünitedir.[136] Botulinum toksinin tedavi edici doz aralığı oldukça geniştir ve sistemik zehirlenme olasılığı çok düşüktür.[132] Ancak kaza ile zehirlenme ya da yüksek doza maruz kalınması durumunda, 24 saat içinde antitoksin verilmesi gerekmektedir.[137] Yüz bölgesinde BTx-A uygulamalarında, hayatı tehdit eden alerjik ya da ürtiker benzeri reaksiyonlar bildirilmemiştir. Yapılan insan ve hayvan çalışmalarında, uzun dönemde, immünojenik, karsinojenik ve diğer potansiyel zararlı yan etkiler tespit edilmemiştir.[137]

Sık kullanılan preparatlardan 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. Botulinum toksinin saklandıktan sonra kullanılması ile ilgili çelişkili yayınlar vardır. Bir çalışmada +4°C'de saklanan sulandırılmış Botox® preparatlarının aktivitesi 1.günün sonunda % 90-100, 3. Gün % 70-80, 7. gün % 40-50, 14. gün minimal olarak bulunmuştur.[136] Bunun yanında Elmas ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları çalışmada iki hafta süre ile +4°C'de saklanılan Botox®'un etkileri, taze Botox®'un etkileriyle elektron mikroskobisinde kıyaslanmıştır. Çalışma sonuçları iki hafta beklemiş Botox®'un taze Botox® ile aynı etkileri oluşturabildiğini ancak etki süresinin daha kısa olduğunu göstermektedir.[15]

2.3.5. Sıçanlarda Uygulanacak BTx-A Dozları ve Etki Süresi

Aoki 2002 yılında farelerde yaptığı çalışmada BTx-A için maksimum kas paralizisi oluşturan dozu 29 ünite/kg, hayvanların %50 sine öldürücü olan dozu 81,4 ünite/kg, etki süresini 36 gün olarak tanımlamıştır.[155]

Billante ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BTx-A dozları 350-400 gr ağırlığındaki sıçanlarda gastrokinemius kasına uygulanmış ve şu şekilde sınıflandırılmıştır;[156]

- Minimal doz; 0,625 ünite
- Düşük doz; 1,25 ünite
- Orta doz; 2,5 ünite
- Yüksek doz; 5 ünite
- Çok yüksek doz; 10 ünite

Sketelji ve arkadaşlarının 1983 yılında sıçan arka bacağında botulinum toksin ile yaptıkları çalışmada 5 unite Botox ile sıçanın tüm ekstensör ve fleksör kaslarında paralizi oluştuğu bildirilmiştir.[160]

Kemirgenlerde BTx-A enjeksiyon sonrası etkisinin 24. saatte başladığı ve 4-6 hafta sürdüğü belirtilmektedir.[13]

2.3.6. Tedavi Endikasyonları ve Yeni Uygulama Alanları

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, pelvirektal

spazmlar ve nistagmus gibi nörolojik ve oftalmik endikasyonlarda kullanılmakla beraber, yüzdeki mimik kırışıklıkların giderilmesi amacıyla kozmetik alanında da kullanılmaktadır.[138]

Son zamanlarda BTx kullanımı oldukça yaygınlaşmış olup yukarıdaki endikasyonlar dışında pek çok yeni kullanım alanı bulunmuştur. Bu alanlardan bazıları şunlardır:

- Hiperhidrozis ve hipersialore tedavisi, Frey sendromu tedavisi, fasiyal asimetriler, platismal bantların tedavisinde BTx-A kullanılmaktadır. [139-141]
- Subpektoral implant yerleştirilmesini takiben pektoral kas spazmını önlemek için BTx-A uygulanmıştır. Ameliyat sonrası dönemde hastaların ağrılarının azaldığı, elde edilen kozmetik sonucun daha iyi olduğu bildirilmiştir. Oluşan paralizinin geri dönüşümlü bir denervasyona sebep olmasından dolayı bu yöntemin, nörektomiye tercih edilebileceği ifade edilmiştir. [142, 143] Ayrıca BTx-A pektoral adaledeki kasılmaların protez üzerinde yaptığı çekintilerin önlenmesi amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.[147]
- Yüzdeki skarların genişlemesinin önlenmesi amacıyla yara dudaklarına Btx-A enjeksiyonunun yara iyileşmesinde[144,145] ve hipertrofik skar oluşumunun önlenmesinde faydalı olduğu bildirilmiştir.[146]
- BTx-A fleksör tendon onarımı yapılmış hastaların kas origolarına uygulanmış ve tendon rüptürü oranlarının azaldığı bildirilmiştir.[148]
- BTx-A vazospastik hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır.[20,149,150] Neumastier ve arkadaşları Raynoud hastalığı tanısı ile takip edilen 19 hastanın avuç içlerine nörovasküler pediküllerin geçeceği alanlara etki edecek şekilde 50

ile 100 ünite arasında Botox enjekte etmişlerdir. Çalışma sonucunda tek doz uygulamanın dahi 4 hasta hariç tüm hastaların ağrılarını kestiği, parmakların dolaşım yüzdesinin % -48'den % 425'e çıktığı bildirilmiştir.[20]

- O'Reilly ve arkadaşları 2005 yılında aksiller hidradeniti olan bir hastaya BTx-A uygulamışlar ve bölgesel lezyonların kaybolmasının yanında 10 ay süreyle tekrar oluşmadığını bildirmişlerdir.[151]
- Çelik ve arkadaşları 2006 yılında sıçan pektoral kas flebinde yaptıkları çalışmada cerrahi denervasyon ve BTx-A ile yapılan kimyasal denervasyonun kas stabilizasyonuna etkilerini araştırmışladır. Sonuçlarda hem cerrahi, hem de kimyasal denervasyonun flep stabilizasyonunu arttırdığı, kas liflerini iki grupta da benzer oranlarda azalttığını, denervasyon yapılan grupta daha fazla olmak üzere kaslarda atrofi görüldüğü belirtilmiştir.[152]
- Arnold ve arkadaşları 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarda botulinum toksin uygulamasının sıçan deri fleplerinde flep sağ kalımını arttırdıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca perivasküler olarak 5 ünite BTx-A uygulaması sonrası 1., 14. ve 28. günlerde damar çaplarını ölçmüşlerdir. BTx-A'nın uygulama sonrası 1. günde bile hem arter, hem de ven çaplarında anlamlı artışa yol açtığı, bu artışın 14.gün ölçümünde en yüksek seviyeye çıktığını ve 28. günde halen yüksek olduğunu belirtmişlerdir.[19,21]
- Clemens ve arkadaşları 2009 yılında BTx-A'nın sıçan femoral damar çapları ve yapılan anastomozların başarısına etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla cerrahiden 5 gün önce femoral damarların çevresine 10 ünite Botox® enjekte edilmiştir. Cerrahi günü damar çaplarının Botox® yapılan grupta anlamlı olarak

daha fazla olduğu bildirilmiştir. Damarlar kesilip, re-anastomoz edildiğinde ise Botox® yapılan tarafta anastomozların daha hızlı ve kolay yapıldığı ayrıca cerrahi sonrası trombozların daha az görüldüğü bildirilmiştir.[153]

- BTx-A ile random fleplerin sağ kalımının arttırılması ile ilgili iki yayın bulunmaktadır. Yıldırım ve arkadaşları sıçanların sırtında hazırlanan random fleplere 8 noktadan toplam 2,5 ünite Botox® uygulamışlar ve flep sağ kalımını arttırdıklarını bildirmişlerdir.[22] Kim ve arkadaşları ise 2009 yılında yayınlanan makalelerinde sıçanların sırtında hazırlanan random flebe dağınık olarak toplam 1,5 ünite Botox® yaptıklarını ve flep sağ kalımını arttırdıklarını bildirmişlerdir. [23]
- Botulinum toksinin havadan veya yiyecek yoluyla biyolojik silah olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.[154]

2.3.7. İlaç Etkileşimleri

Sinir-kas kavşağında geçişi engelleyen ilaçlar BTx-A ile etkileşebilirler. Aminoglikozidler (Gentamisin), siklosporin, D-penisilamin, kas gevşeticiler (kürar tipi nondepolarizan blokörler, süksinilkolin), aminokinolonlar, kinidin, magnezyum sülfat ve linkozamid BTx-A'nın etkisini değiştirebilen ilaçlardır. Bunların çoğu nöromüsküler geçiş üzerine intrinsik inhibitör etkiye sahip olduklarından BTx-A'nın etkisini arttırırlar. Aminoglikozidler yüksek dozlarda, sinir-kas kavşağında asetilkolinin salınmasını önleyebilirler ve botulizm benzeri bir klinik duruma yol açabilirler. Siklosporin, nöromüsküler blokaja ikincil kas güçsüzlüğünü uyarabilir ve bir olguda solunum yetersizliğine neden olmuştur. D-penisilamin romatoid artritli hastaların küçük bir kısmında, asetilkolin antikorları oluşturmuştur. Bu hastalarda myastenia gravisli hastalardakine benzer kas güçsüzlüğü tespit edilmiştir. Tüm

bunların tersine, klorokin ve hidroklorokin gibi aminokinolonlar, hücre içinde BTx ile etkileşime girerek, BTx-A aktivitesini inhibe edebilir.[157]

2.3.8. Bölgesel Yan etkiler

Enjeksiyon sahasında ağrı, ödem, ekimoz sıklıkla uygulama tekniğiyle ilgili olup yan etki olarak değerlendirilmemelidir. BTx enjeksiyonlarından sonra, baş ağrıları, kuru ağız hissi, grip benzeri tablo görülebilir. Hastanın uygulama öncesi bu konularda bilgilendirilmesi ile gereksiz anksiyeteye girmesi önlenmelidir. Aspirin, antikoagülanlar, nonsteroid anti-enflamatuar ilaçlar, E vitamini, ginseng, ginkgo ve yüksek doz sarımsak gibi bitkisel ilaçlar peteşial kanamaların oranını arttırmaktadır. Peteşilerin oluşumu, 30 gauge iğne kullanımı, her üç-dört enjeksiyonda bir iğnenin değiştirilmesi, enjeksiyondan önce buz uygulanması ve enjeksiyonun intradermal yapılmasıyla azaltılabilir. Uygulama sırasına meydana gelen damar yaralanmalarında, hemen sahaya parmak ile basınç yapılması da cilt altı kanamaların oluşmaması için kolay bir önlemdir. Enjeksiyon sahasında ağrı, topikal anestetik kullanımıyla azaltılabilir.

Uygulama bölgesinde görülebilen geçici hiperestezinin, bölgesel travma veya BTx'in lokalize antinosiseptif özelliği sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Deri enfeksiyonları, oldukça nadir görülmekle beraber, literatürde vücudunda BTx-A ile ilişkili psoriasis benzeri döküntüler meydana gelen ve beş ay sonra kendiliğinden düzelen bir olgu bildirilmiştir.

Deride kuruma ve pullanma da BTx-A tedavisi sonrası gelişebilir ve ter bezi aktivitesinin azalmasına bağlanmıştır. Nemlendiricilerin kullanımı ile bu belirtiler

kaybolur. Baş ağrısının birçok tipinde tedavi için kullanılmasına rağmen, BTx-A enjeksiyonu yapılan hastaların küçük bir kısmında geçici baş ağrıları görülebilmektedir. Etiyoloji, enjeksiyon sırasında iğnenin periosta ulaşması, oluşan derin kas hematomları, enjeksiyonun yarattığı stres ile açıklanmaya çalışılmıştır. Genellikle birkaç saat ile iki gün arasında devam eden hafif bir ağrıdır. Çok nadir olarak, bazı hastalarda hayatın günlük akışını değiştiren, ciddi, şiddetli baş ağrıları meydana gelmektedir. Bu ağrılar 2-4 hafta içinde kendiliğinden yatışmaktadır.[157]

2.3.9. Sistemik Yan Etkileri

BTx-A'nın en etkili olduğu yer enjeksiyon sahasıdır. Bununla birlikte nörotoksinin küçük miktarları yakınındaki yapılara veya sistemik dolaşıma geçebilir. Bu bölgesel ya da uzak etkiler en sık, tekrarlayan yüksek doz uygulamalar sonucu ortaya çıkmasına karşın blefarospazm tedavisi için düşük doz BTx-A alan hastalarda da gözlenmiştir. [158] Enjeksiyon sahasından uzak kaslardaki subklinik etkiler, tek-lif EMG ile gösterilebilir. [159] Antikor gelişimine bağlı olarak, BTx-A etkinliği azalabilir ya da kaybolabilir ki bu durum genellikle tedavinin ilk birkaç yılında ortaya çıkar. Eğer, ilk dört yıl içerisinde immün direnç gözlenmediyse, daha sonra ortaya çıkma olasılığı son derece düşüktür. Direnç gelişimi halinde BTx-B ile tedaviye devam edilebilir.[159]

2.3.10. BTx-A uygulamasının kas metabolizmasına etkileri

Matic ve arkadaşları 2007 yılında tavşan masseter kasına 25 ünite botulinum toksin uygulaması sonrası BTx yapılan tarafta şu sonuçlara ulaşmışlardır;[13]

- 8. haftanın sonunda kas ağırlığı daha az bulunmuştur.

- Hem 4. hem de 8. haftalarda masseter kası içindeki kan akımı ve kan hacmi daha yüksek bulunmuştur. Bu durum BTx-A enjeksiyonu sonrasında motor son plaklarda yüksek oranda tespit edilen kalsitonin geni ilişkili peptid ile açıklanmıştır. Bu peptidin vazodilatator özellikleri vardır ve damar tonüsünün düzenlenmesinde önemlidir.
- 4. ve 8. haftalarda masseter içi damarlarda geçirgenlik artmış olarak bulunmuştur. 0-12 haftalarda değişiklik yoktur.
- 4. haftada masseter içi geçiş hızı artmış, 12. haftada azalmış olarak bulunmuştur.
- 4, 8, 12. haftalarda glikozun kas içine alım hızı artmış olarak bulunmuştur. Bu durumun ilginç olduğu ve paraliziye giden kasta normalde enerji ihtiyaçlarının azalması gerektiği belirtilmiştir. Bu artışta tıpkı kan akımı artışı gibi kalsitonin geni ilişkili peptidin glikoliz hızını arttırması sonucu olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Welham ve arkadaşları 2008 yılında sıçan tiroaritenoid kasına BTx-A verdikten sonra protein mekanizmasındaki değişikliklere bakmışlar ve şu sonuçlara ulaşmışlardır;[17]

- BTx-A'nın etkisinin; ilk ve ikinci inceleme zamanları olan 3. ve 7. günlerde tam olduğu, üçüncü inceleme olan 14. günde azalmaya başladığı, dördüncü ve son inceleme olan 56. günde ise tamamen geçmiş olduğu belirlenmiştir.
- BTx-A uygulaması sonrasında kasta enerji metabolizması, kasılma fonksiyonu, transkripsiyon, translasyon ve hücre çoğalmasıyla ilgili olan proteinlerin sayısında çok farklı değişiklikler olmaktadır.

- Enerji metabolizmasındaki proteinler;
    - ATP-sentaz enziminin 3 zincirinden ikisinin miktarı azalırken, alfa zincirinin miktarı artmaktadır,
    - Beta-enolaz, G6PDH ve aldolaz glikolitik enzimlerdir, miktarları artar
    - Kreatinin kinaz miktarları artar
- Stres cevabı;
    - BTx-A enjeksiyonu sonrasında 7. günde süperoksit dismutaz miktarları artmış olarak bulunmuştur.
- Transkripsiyon, translasyon ve hücre çoğalması;
    - Hücrelerde DNA sentezini ve hücre çoğalmasını engelleyen prohibitin artmış olarak bulunmuştur.

2.3.11. BTx-A Sonrasında İskelet Kasındaki Ultra-Yapısal Değişiklikler

Elmas ve arkadaşları 2007 yılında yayınlanan çalışmalarında taze ve iki hafta bekletilmiş 25 ünite botulinum toksin tip-A'yı tavşan anterior aüriküler kasına enjekte etmişlerdir. Uygulama sonrası 5. gün ve 12. haftalarda hayvanlar sakrifiye edilerek elektron mikroskobunda kasın ultra-yapısı incelenmiştir. Çalışmada 5. günde BTx-A'nın kasta yoğun ultra-yapısal değişiklikler yaptığı ve bu değişikliklerin 12. haftada A-I ve Z bantlarında orta düzeyde devam eden ayrışma haricinde sonlandığı belirtilmiştir. Sonuçlar tablo 1 ile özetlendirilebilir;[15]

Tablo 1. Elmas ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmanın sonuçları; BTx-A'nın iskelet kasında erken-geç dönemde yol açtığı ultra-yapısal değişiklikler. (Ann Plast Surg.2007 Sep; 59(3): 316-22.)

Elektron mikroskobi bulguları	Kontrol	Saline enjek.	Taze 5.gün	Beklemiş 5. gün	Taze 12. hafta	Beklemiş 12. hafta
A-I bantlarının ayrıklığı	0	0	5	5	3	1
Z batlarının ayrıklığı	0	0	5	5	3	0
Hücre çekirdeğinin göçü	0	0	4	3	0	1
Miyofibril kaybı	0	0	5	4	1	0
Miyofibril organizasyon kaybı	0	0	5	4	0	0
Mitokondri dejenerasyonu	0	0	4	3	0	0
Puanlama: 0 dejenerasyon yok, 5 maksimum dejenerasyonu gösterir						

2.3.12. BTx-A- Apopitoz ilişkisi

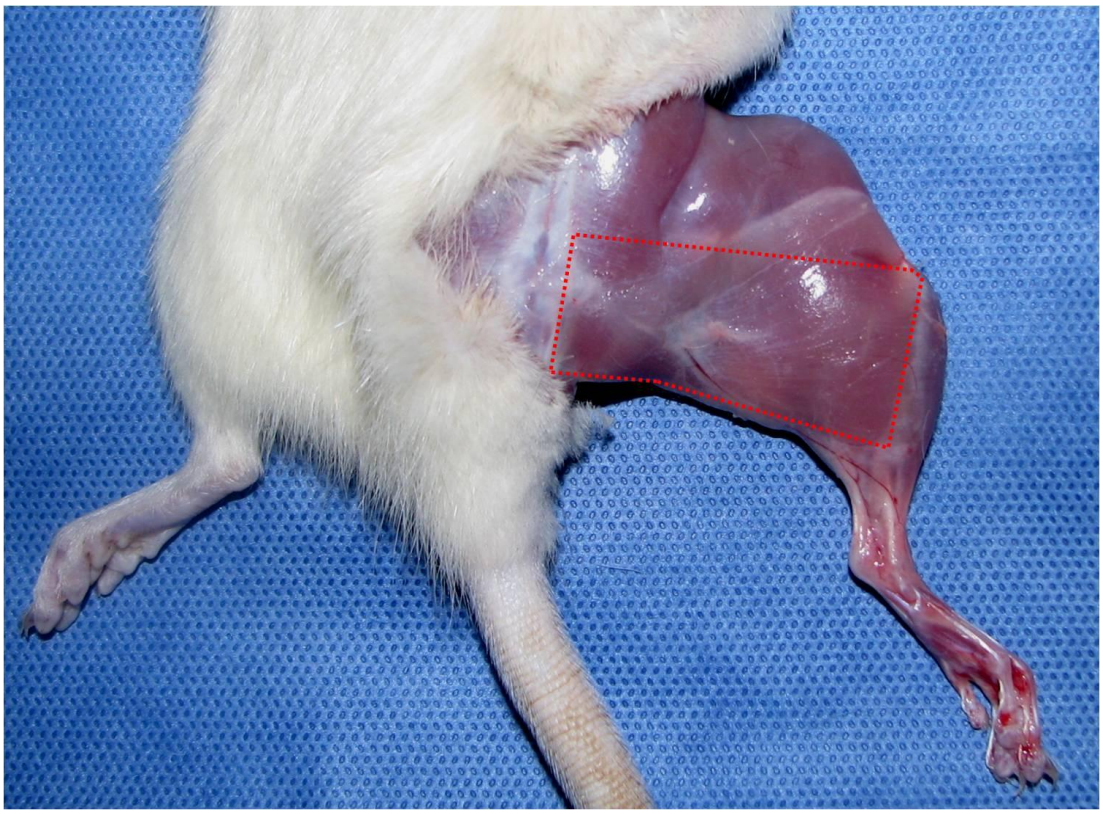
BTx-A uygulamalarının dokulardaki apopitozu nasıl etkilediğine dair çelişkili yayınlar bulunmaktadır. Manno ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmalarda BTx-E'ninintrahipokampal uygulanması sonrası hücrede apopitozun oluşması için gerekli kaspas sisteminin aktivasyonunun engellendiğini ve apopitoz miktarının azaldığını belirtmişlerdir.[174] Bunun yanında Chuang ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmalarda prostat içine enjekte edilen BTx-A'nın histolojik kesitlerde 1. ve 3. aylarda yaygın apopitoza yol açtığını bildirmişlerdir. Berliocchi ve arkadaşları 2005 yılında BTx-C uygulanan nöronlarda önce yaygın sinaptik hasar oluştuğunu, ve bunun apopitozla sonuçlandığını belirtmişlerdir.

2.4. Sıçan Biseps Femoris Kasının Anatomisi

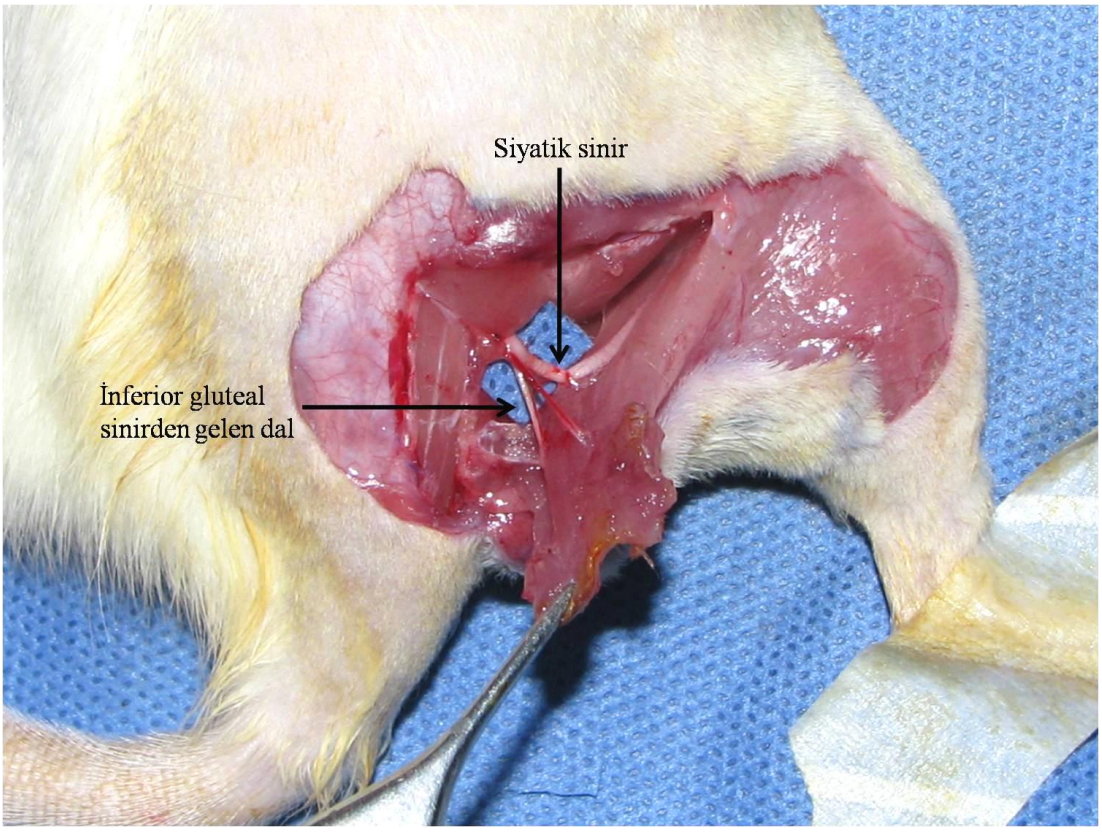
Biseps femoris kas flebi ilk kez 1992 yılında Lee ve arkadaşları tarafından yapılmış bir çalışmada model olarak kullanılmıştır.[161] 1998 yılında Yenidünya ve arkadaşları kasın üzerindeki deri adasını içerecek şekilde bölgeyi aksiyel patternli bir flep olarak tanımlamışlardır.[163] Ancak bu flebin anatomik özelliklerinin ayrıntılı olarak tanımlanması 2000 yılında Akyürek ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.[162] 2002 yılında ise Coşkunfırat ve arkadaşları kasın üzerindeki deri bölgesini besleyen damarın kasın perforatörü olduğunu göstererek yeni bir perforator flep modeli tanımlamışlardır.[164]

Biseps femoris vertebral ve pelvik olmak üzere iki başlı bir kastır. Vertebral başı 4. sakral vertebranın kemiksi çıkıntısından kaynaklanıp, femurun lateral kondiline uzanırken, pelvik baş siyatik çıkıntıdan kaynaklanıp lateral epikondile, oradan da apenevrotik bir yapı halinde tibiyal çıkıntıya kadar uzanarak yapışır. Vertebral başın hemen altından ayrılan medial bölüm de yine lateral epikondile yapışarak sonlanır[165] (Şekil 9).

Kasın motor innervasyonu ise birden fazla sinirden gelir. Vertebral başın innervasyonu lumbo-sakral pleksustan çıkan inferior gluteal sinirden, medial kısmın innervasyonu ise siyatik sinirden gelir[165] (Şekil 10).

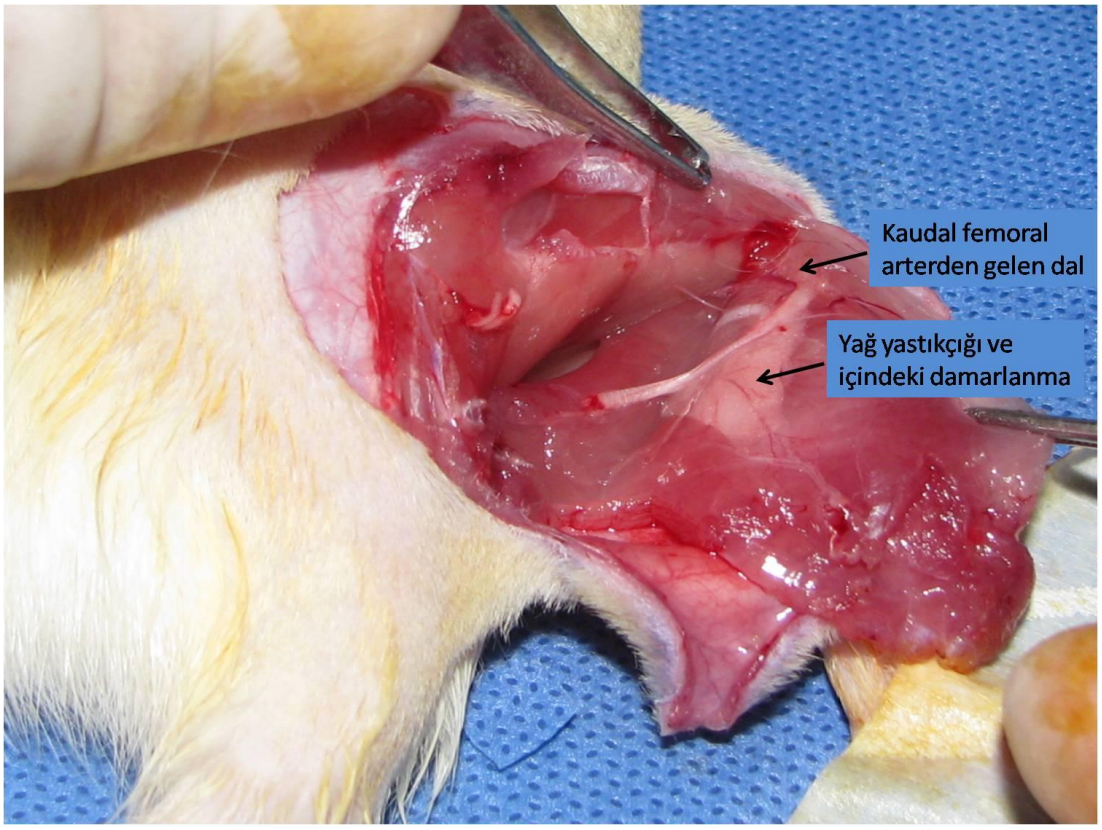


Şekil 9. Biseps femoris kasının anatomisi, Vertebral başı 4. sakral vertebranın kemiksi çıkıntısından kaynaklanıp, femurun lateral kondiline uzanırken, pelvik baş siyatik çıkıntıdan kaynaklanıp lateral epikondile, oradan da apenevrotik bir yapı halinde tibiyal çıkıntıya kadar uzanarak yapışır. Vertebral başın hemen altından ayrılan mediyal bölüm de yine lateral epikondile yapışarak sonlanır.



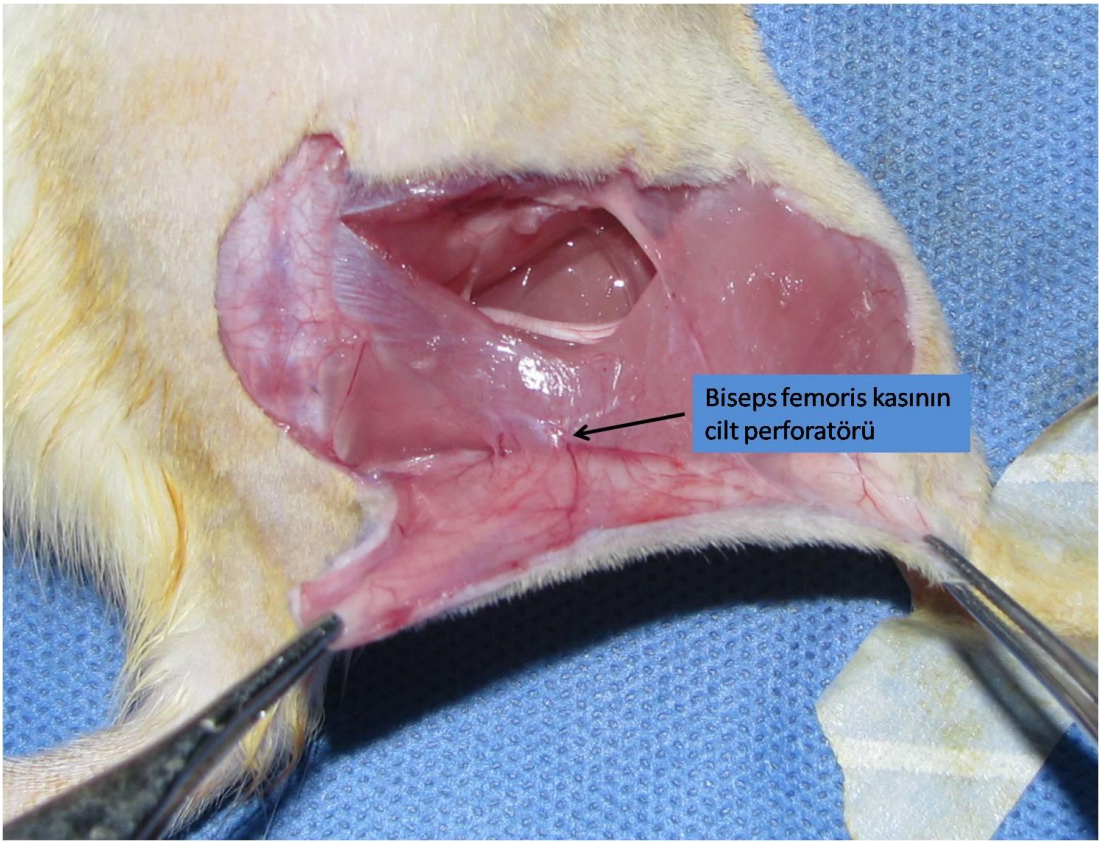
Şekil 10. Vertebral başın innervasyonu lumbo-sakral pleksustan çıkan inferior gluteal sinirden, medial kısmın innervasyonu ise siyatik sinirden gelir.

Kaudal femoral arter, popliteal arterin verdiği en kalın daldır. Bu damar biseps femorise ve altındaki yağ yastıkçığına gönderdiği iki dal ile biseps femoris kasını besler (Şekil 11).



Şekil 11. Kaudal femoral arterin biseps femoris kasını beslemek için direkt kasa ve kas altındaki yağ yatıkçığının içine verdiği dallar.

Biseps femoris kasının deri tarafında kalan arka yüzünde 0,1-0,2 mm çapında bir adet deri perforatörü bulunur. (Şekil 12) Bu damar çevresinde 5 cm çaplı bir deri adasını besleyebilir.[162,165] Kaudal femoral - popliteal sistem üzerinde kaldırılan flebin pedikül uzunluğu 2,5 cm'ye, damar çapları 0,7-0,8 mm'ye, femoral damarlar da dahil edilirse uzunluğu 5 cm'ye, damar çapları 1-1,2 mm'ye ulaşır.[165]



Şekil 12; Biseps femoris kasının deri perforatörü; 0,1- 0,2 mm kalınlığında olup 5 cm^2 çaplı bir alanı besleyebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

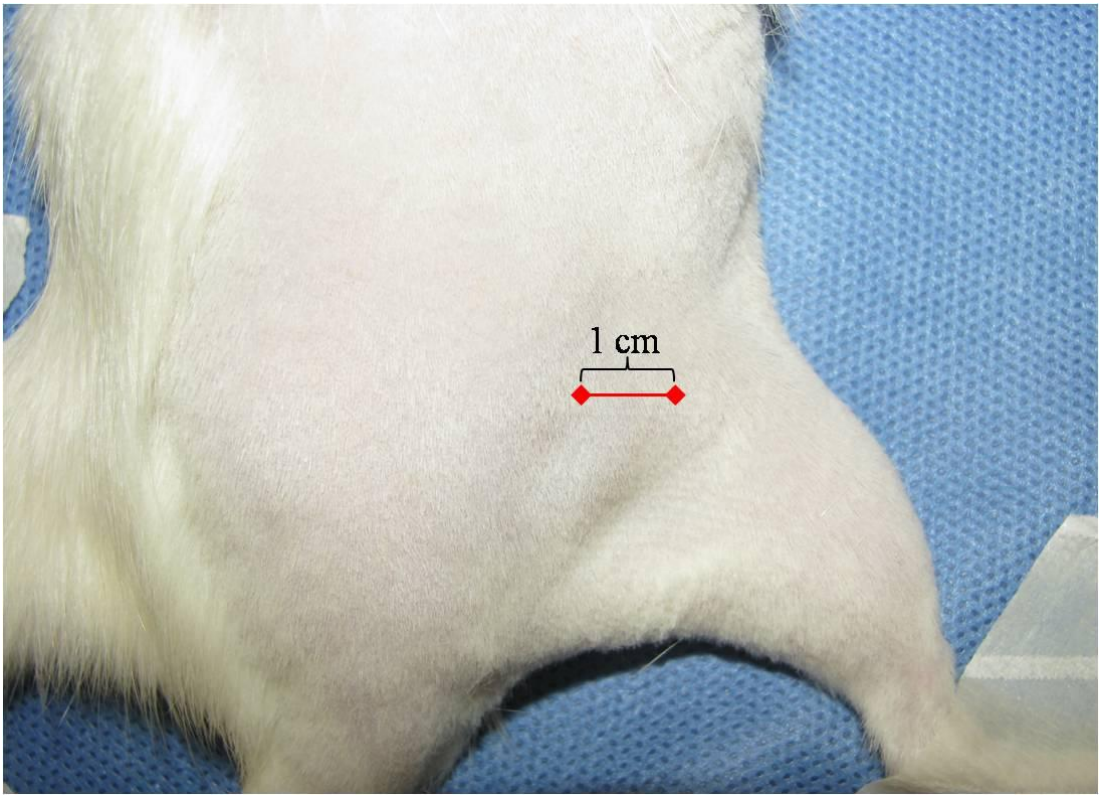
Bu tez çalışması, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı alınarak, Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen, 42 adet Wistar Albino tipi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar uygun kafeslerde, 21±2 ^{o}C sıcaklıkta ve 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları, standart laboratuar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı. Tüm cerrahi işlemler % 10'luk ketamin HCl (50 mg/kg) ve ksilazin HCl (2,5 mg/kg) anestezisi altında, aynı cerrah tarafından steril koşullarda ve lup büyütmesi altında standart mikrocerrahi teknikler kullanılarak gerçekleştirildi. Denekler üç hayvan bir kafeste kalacak şekilde ayrı kafeslerde tutuldu. Deney boyunca ölüm ya da otomütilasyon sebebiyle kaybedilen hayvan olmadı. Hiçbir denekte enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı.

3.1. Cerrahi Teknik

3.1.1. Cerrahi Denervasyon

Sıçanlar yüz üstü yatırıldıktan sonra sağ uyluk bölgeleri tıraş edildi. Palpasyon ile femur belirlendikten sonra sakrum femur bileşkesinde 1 cm'lik deri kesisi yapıldı. (Şekil 13) Kasın femur ile yapmış olduğu gevşek bağlantılar mosquito klemp ile ayrıldı. Daha sonra kasın hemen altında kasa paralel uzanan siyatik sinir ve kasın sakrumla birleştiği yere doğru kasa dik olarak giren inferior gluteal sinir dalı görüldü. (şekil 10) Diseksiyon inflamasyonun sınırlı kalması için lup büyütme altında mikrocerrahi teknikler kullanılarak yapıldı. Siyatik sinirin ve inferior gluteal

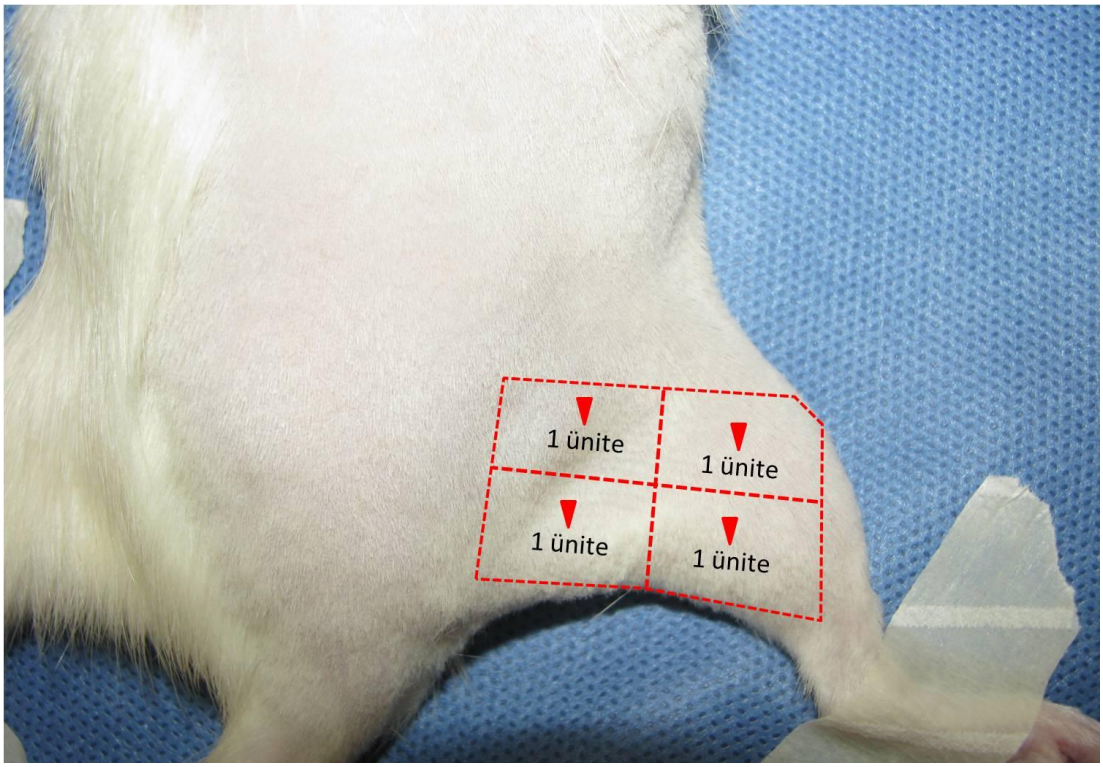
sinirlerin proksimal kısımlarından birer cm'lik sinir eksizyonu yapılarak re-innervasyon önlendi ve cerrahi denervasyon tamamlandı. Diseksiyon esnasında sakral yüzden ve popliteal kısımlardan kasa giren damarlarda herhangi bir yaralanma olmamasına özellikle dikkat edildi. Deri tüm olgularda Caprosyn® 5,0 ile sürekli dikiş tekniğiyle kapatıldı.



Şekil 13. Cerrahi denervasyon amacıyla femurun palpe edilmesi sonrası femur-sakrum bileşkesi üzerinde yapılan 1 cm'lik kesi.

3.1.2. Botulinum Toksin-A (BTx-A) uygulaması

Sıçanlar yüzüstü yatırıldıktan sonra sağ uyluk bölgeleri tıraş edildi ve deri üzerinden biseps femoris kasının sınırları çizildi. Kas dört eşit alana bölündükten sonra her alanın orta noktası işaretlendi. Botox® 2 ml serum fizyolojik ile sulandırıldı ve 30 gauge'luk enjektörlere çekildi. Daha önce yapılmış çalışmalardaki dozlar göz önünde bulundurularak[156,160] işaretlenen 4 noktanın her birine birer ünite olmak üzere toplam 4 ünite BTx-A (Botox®; Allergan, Abdi İbrahim, Türkiye) enjeksiyonu yapıldı (Şekil 14).



Şekil 14. Biseps femoris kası dört eşit alana bölündükten sonra her bir alana 1 ünite, toplam 4 ünite Botox® enjeksiyonu yapıldı.

3.2. Çalışma Grupları

Çalışma iki aşamalı olarak gerçekleştirildi:

- Birinci aşamada İ-R döngüsünden 1 gün, 7 gün ve 30 gün önce gerçekleştirilen cerrahi denervasyonun sıçan iskelet kasında İ-R hasarına etkileri araştırıldı.
- İkinci aşamada cerrahi bir işlem yapılmaksızın, İ-R döngüsünden 1 gün, 7 gün ve 30 gün önce BTx-A enjeksiyonlarıyla gerçekleştirilen kimyasal denervasyonun sıçan iskelet kasında İ-R hasarına etkileri araştırıldı.

3.2.1. Birinci aşama: Cerrahi denervasyonun (CD) İ-R hasarına etkileri

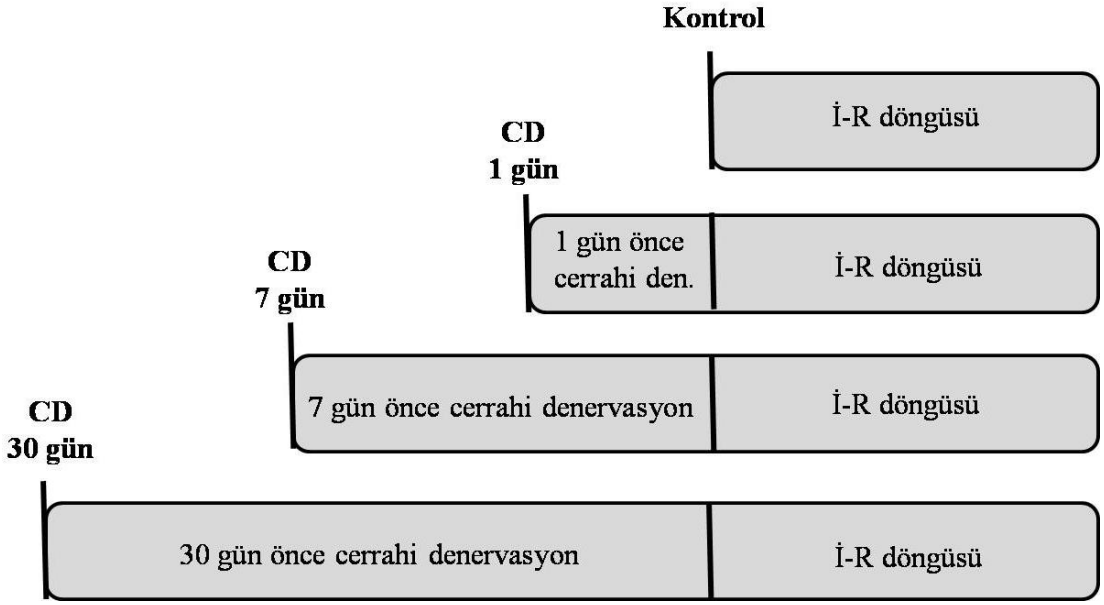
Birinci aşama, birisi kontrol grubu olmak üzere 4 grupta gerçekleştirildi. Her grupta 6 adet Wistar albino sıçan yer aldı ve sıçanların normal yaşantılarını sürdürebilmeleri için sadece tek ekstremiteleri (sağ arka bacakları) kullanıldı. Gruplar şu şekilde tasarlandı;

- **Kontrol grubu;** Cerrahi denervasyon uygulanmaksızın 4 saat iskemi - 4 saat reperfüzyon uygulanan grup (n=6 sıçan)
- **Cerrahi denervasyon 1 gün grubu;** İ-R hasarından bir gün önce gerçekleştirilen cerrahi denervasyon sonrası 4 saat iskemi - 4 saat reperfüzyon uygulanan grup (n=6 sıçan)
- **Cerrahi denervasyon 7 gün grubu;** İ-R hasarından 7 gün önce gerçekleştirilen cerrahi denervasyon sonrası 4 saat iskemi - 4 saat reperfüzyon uygulanan grup (n=6 sıçan)

- **Cerrahi denervasyon 30 gün grubu;** İ-R hasarından 30 gün önce gerçekleştirilen cerrahi denervasyon sonrası 4 saat iskemi - 4 saat reperfüzyon uygulanan grup (n=6 sıçan)

Çalışmanın birinci aşamasının tasarımı ve zaman çizelgesi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Cerrahi denervasyonun İ-R hasarına etkisi, grupların şematik görünümü



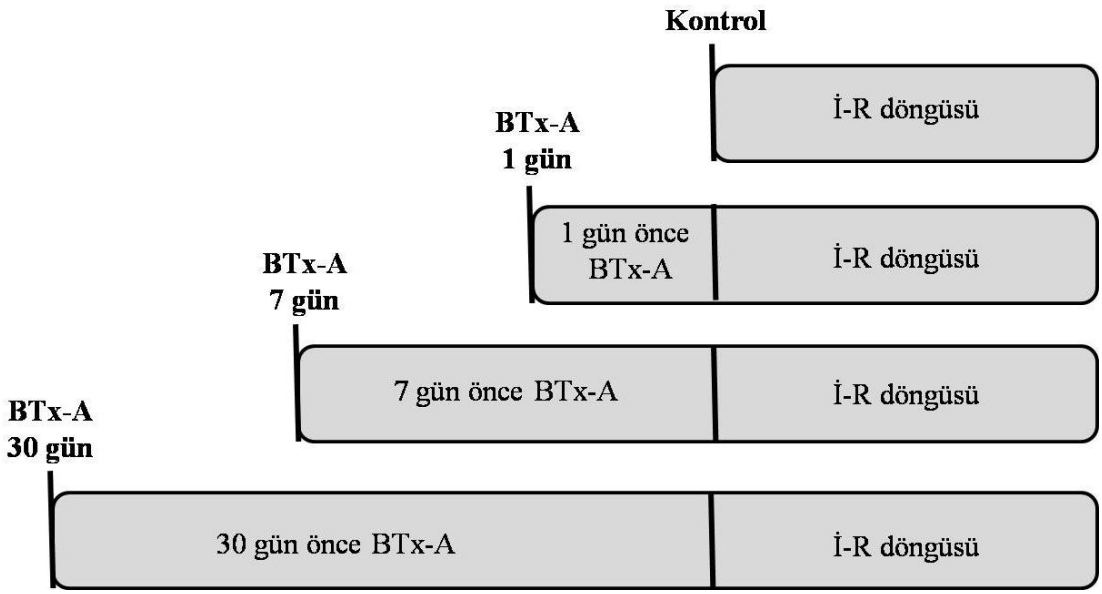
3.2.2. İkinci aşama: BTx-A ile kimyasal denervasyonun İ-R hasarına etkileri

İkinci aşama birisi kontrol grubu olmak üzere 4 grupta gerçekleştirildi. Her grupta 6 adet Wistar albino sıçan yer aldı ve sıçanların normal yaşantılarını sürdürebilmeleri için sadece tek ekstremiteleri (sağ arka bacakları) kullanıldı.

- **Kontrol grubu; (ortak grup)** BTx-A uygulanmaksızın 4 saat iskemi - 4 saat reperfüzyon uygulanan grup (n=6 sıçan)

- **BTx-A 1 gün grubu;** İ-R hasarından bir gün önce gerçekleştirilen BTx-A uygulaması sonrası 4 saat iskemi - 4 saat reperfüzyon uygulanan grup (n=6 sıçan)
- **BTx-A 7 gün grubu;** İ-R hasarından 7 gün önce gerçekleştirilen BTx-A uygulaması sonrası 4 saat iskemi - 4 saat reperfüzyon uygulanan grup (n=6 sıçan)
- **BTx-A 30 gün grubu;** İ-R hasarından 30 gün önce gerçekleştirilen BTx-A uygulaması sonrası 4 saat iskemi - 4 saat reperfüzyon uygulanan grup (n=6 sıçan)

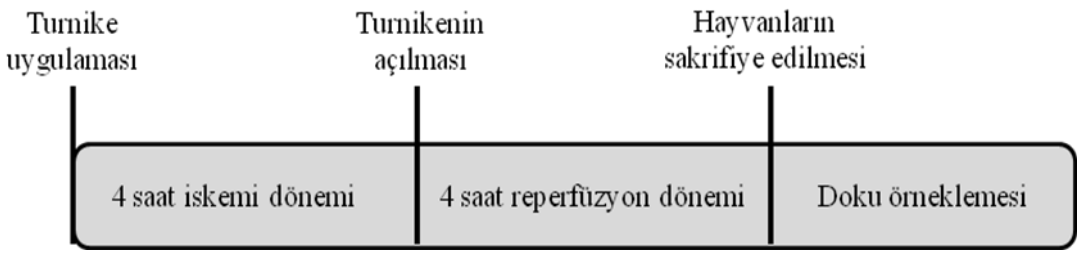
Tablo 3. BTx-A ile kimyasal denervasyonun İ-R hasarına etkisi, grupların şematik görünümü



3.3. İskemi-Reperfüzyon (İ-R) Döngüsü ve Doku Örneklemesi

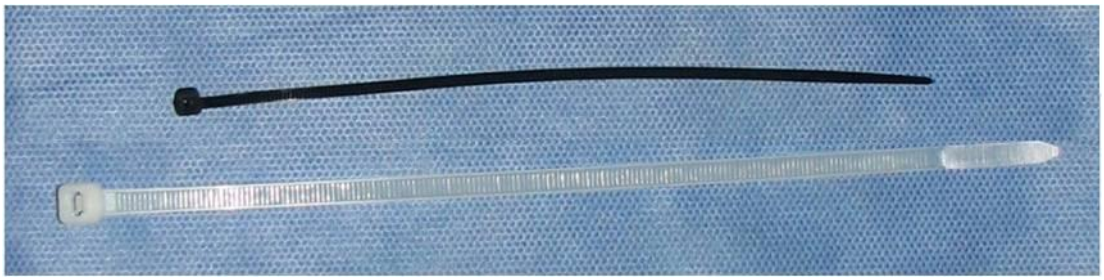
Literatürde yapılmış çalışmalar referans alınarak iskemi ve reperfüzyon süreleri belirlendi.[25,166,167] Deneklere 4 saat iskemiyi takiben, 4 saat reperfüzyon uygulandı. (Tablo 4) İ-R döngüsünün sonunda denekler sakrifiye edilerek, sağ biseps femoris kasları incelenmek üzere eksize edildi.

Tablo 3. İ-R döngüsü ve deneklerin sakrifiye edilmesinin şematik görünümü

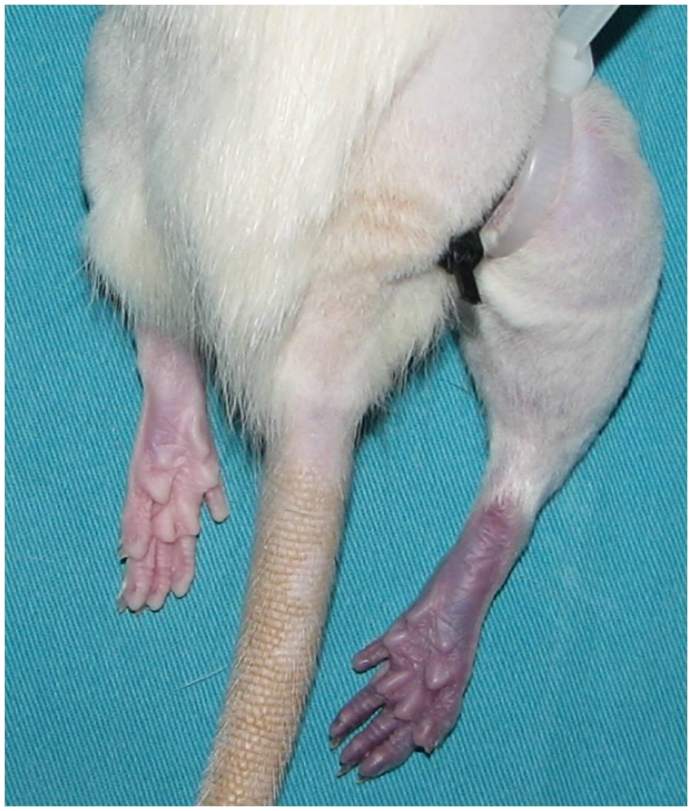


3.3.1. İskemi

Sıçanların sağ arka bacaklarına iskemi uygulamak amacıyla kalça eklemi hizasında 1,5 ve 4 mm kalınlıklarındaki iki adet kablo kıskacı ile (şekil 15) turnike uygulaması gerçekleştirildi. İki turnike kullanılmasının sebebi turnikenin etkinliğini arttırmaktı. Kablo kıskaçlarının bir kere sıkıldıktan sonra bir daha gevşememesi turnikenin başarısını arttırdı. Daha önceki çalışmalar referans alınarak kasta geri dönüşsüz hasarın başladığı süre olan 4 saatlik iskemi süresi uygulandı.[25,166] Turnike uygulaması sonrasında sıçan arka bacaklarında ısı kaybı ve morarma geliştiğinin görülmesi ile iskeminin başladığı anlaşıldı. (Şekil 16)



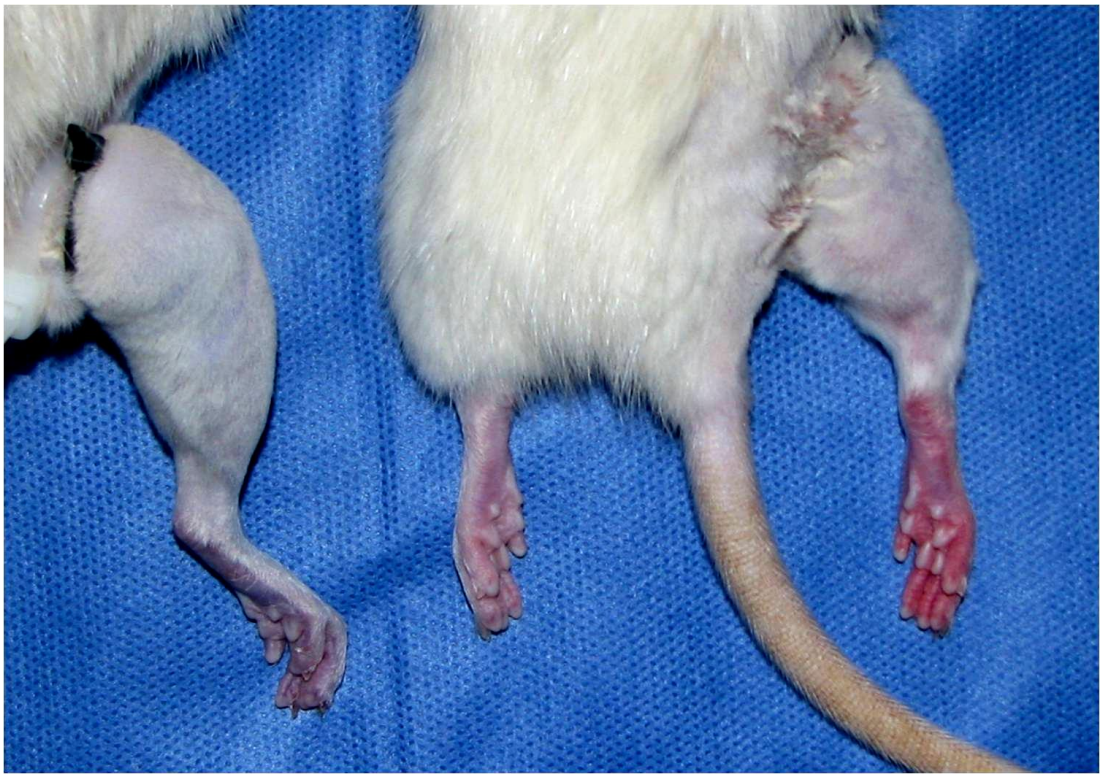
Şekil 15. Çalışmada turnike amaçlı kullanılan kablo kıskaçları



Şekil 16. İskeminin başlamasıyla beraber sağ bacakta gelişen morarma, sol tarafta (turnike uygulanmayan ekstremitede) normal pembe renk

3.3.2. Reperfüzyon

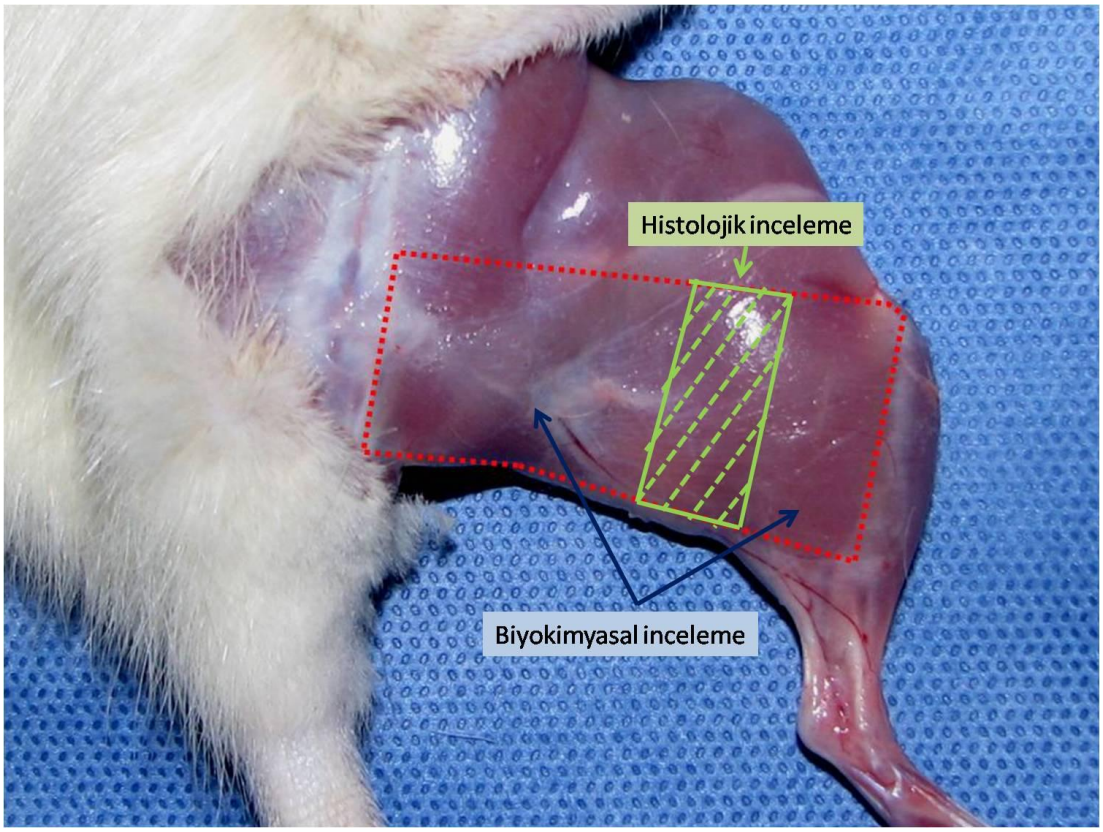
Dört saatlik iskemi süresinin sonunda turnike makas yardımıyla kesilerek reperfüzyon evresi başlatıldı. Turnikenin açılmasıyla beraber ekstremitede yaklaşık 20 - 30 dakika süreyle devam eden bir aşırı kızarıklık (flushing) görüldü. (Şekil 17) Reperfüzyonun takip eden döneminde ekstremitenin rengi normale döndü. Çalışmada dokuda İ-R hasarının hem biyokimyasal, hem de histolojik olarak yol açacağı değişiklikler inceleneceği için reperfüzyon süresi önceki çalışmalar da referans alınarak 4 saat olarak belirlendi.[25,166,167]



Şekil 17. En solda başka bir sıçanın iskemik dönemdeki sağ bacağı morarmış olarak görülürken, ortada normal dolaşımı olan bir ekstremite pembe renkli, en sağda ise reperfüzyon dönemine yeni girmiş bir ekstremitede "flushing" görüntüsü.

3.3.3. Doku örneklemesi

Dörder saatlik iskemi reperfüzyon döngülerinin sonunda denekler kalpten kan alınması yöntemiyle sakrifiye edildi. Daha sonra deneklerin İ-R uygulanan sağ biseps femoris kasları tamamen eksize edildi. Alınan doku örnekleri histoloji ve biyokimyasal incelemeler için parçalara bölündü. (Şekil 18) Kasın tibiyal bileşkesine 1 cm mesafeden, 1 cm genişliğinde alınan doku biyopsileri histolojik inceleme için kullanılırken, kalan kas dokularında biyokimya analizleri yapıldı.



Şekil 18. Doku örneklemesi sonrası histolojik ve biyokimyasal incelemeler için dokunun parçalara ayrılması

3.3.4. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Alınan doku örnekleri, oda ısısında, %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 72 saat tespit edildiler. Tespit edilen dokular standart ışık mikroskobu takip yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan bloklardan mikrotomla (Leica SM 2000, Germany) polizinli lamlara 5 μm kalınlığında kesitler alındı. Her denekten alınan 10 adet seri kesit histolojik değerlendirmenin yapılabilmesi amacıyla hematoksilen-eozin ile boyandı. Kesitler bilgisayar donanımlı, kamera ataçmanlı foto-ışık mikroskopta (DM 4000 B, Leica, Weetlar, Germany, DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) fotoğraflanarak değerlendirildi. Dejeneratif bulguların değerlendirilmesi ardarda alınan seri kesitlerde, her kesitten gelişigüzel seçilen 5 ayrı alanda Leica QWin (V3 plus image) görüntü analiz sistemi kullanılarak bilgisayar ortamında yapıldı. Her bulgu için verilen puanlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal değerlendirmenin yapılabilmesi için kesitler deparafinizasyon amacıyla bir gece 37 ºC ve ertesi gün 1 saat 60 ºC olacak şekilde etüvde bekletilerek 15'X2 ksilole 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 5X2 kez distile sudan geçirildikten sonra, doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak için 1μ sitrat tamponu (Lot 9003CT13610, Labvision Corporation, San Francisco, CA, USA) ile mikrodalga fırında, 650 watta 5 dakika, 550 watta 5'X3 kez retriver işlemi gerçekleştirildi. 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılan kesitler, 5 dakika distile suda yıkandıktan

sonra pap pen (Super PAP Pen, PN IM3580, Becman Coulter Company, France) ile kesit üzerindeki dokuların etrafı çizildi. Daha sonra, 15 dakika % 3' lük hidrojen peroksite etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (Phosphate buffer saline, pH=7,4) ile camlar yıkandı. Yıkanan camlara 5 dakika Ultra V blok (Lot: 060HL70515, Lab Vision) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi. Bu amaçla kesitlere caspas 3 (CPP32) Ab4 primer antikoru (Lot: 1197P708A, Neomarkers, Fremont CA) primer antikoru damlatılarak 30 dakika oda ısısında bekletildiler. Daha sonra PBS ile yıkanan camlara 20 dakika biyotinli sekonder antikor (Lot: 060HL70515, Lab Vision) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 20 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Lot: 060HL70515, Lab Vision) etkin bırakıldı, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak AEC (3 – amino – 9 – ethylcarbazde) (Lot: 060HA1333, Lab Vision) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in Hemotoksilen'i (0B52Y092, Merck) kullanıldı. 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.

- Hemotoksilen-Eosin kesitlerinde şu dejeneratif bulgulara bakıldı;
    - Segmental nekroz,
    - Enine çizgilenme kayıpları,
    - Çekirdeğin merkeze göçü,

- Kas liflerinde ayrılma,
- Bağ doku artışı,
- İntersellüler - interfasiküler ödem
- Enflamatuar hücrelerin sayısı incelendi.

Her denekten hazırlanan 10'ar adet preparat yukarıdaki dejeneratif bulgular açısından ayrı ayrı değerlendirilerek skorlandı. Skorlamalarda 0 = dejeneratif bulgu yok, 1 = minimal dejeneratif bulgular, 2 = orta düzeyde dejeneratif bulgular, 3 = orta - çok dejeneratif bulgular, 4; çok dejeneratif bulgular şeklinde puanlandı. Lenfosit infiltrasyonu içinse 0 = 10'dan az lenfosit infiltrasyonu, 1 = 10-20 arası lenfosit infiltrasyonu, 2 = 20-30 arası lenfosit infiltrasyonu, 3= 30'dan fazla lenfosit infiltrasyonu olarak puanlandı. Her dejeneratif bulgu için verilen skorlar ayrı ayrı toplanıp 10'a bölünerek her hayvandaki dejeneratif bulgu için bir skor belirlendi. Daha sonra bu bulgular toplanıp dejeneratif bulgu sayısına bölünerek her hayvan için ayrı bir skor oluşturuldu. Daha sonra bu skorlar istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal kesitlerdeki apopitozun değerlendirilmesi amacıyla Caspas 3 ile boyanan dokular ise, 0=boyanma yok, 1 = minimal boyanma, 2 = orta düzeyde boyanma, 3 = yüksek düzeyde boyanma şeklinde puanlandı. Hesaplamalar her denekten alınan 5 preperata ayrı ayrı puanlama yapıldıktan sonra önce her deneğin skorları hesaplandı. Daha sonra bu skorlar toplanıp denek sayısına bölünerek grupların apopitoz skorları bulundu.

3.3.5. Biyokimyasal değerlendirme

3.3.5.1. Malonildialdehit (MDA) düzeylerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile ölçülmesi

250 mg kas dokusu %1,15'lik KCl ile homojenize edildi. Protein bağlı MDA'nın alkaline hidrolizi için, 200 µL 6 M NaOH, Eppendorf kupasındaki 1 ml homojenata döküldü ve örnek 60ºC'de 45 dakikalık su banyosuna yerleştirildi. 1 ml çözelti eşit miktarda asetonitril ile proteinlerin çökmesi için homojenize edildi. Oluşan çözelti 30 saniye boyunca döndürülerek karıştırıldıktan sonra, 15000g'de 10 dakika sentrifüj edildi. Üstte kalan 0,25 ml'lik süpernatant 2 ml'lik Eppendorf kabına alındı ve 25 µL DNPH solüsyonu (5mM in 2M HCl) ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildi. Derivatizasyon sonrası örnekler 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek, 20 µL'lik parçalar halinde HPLC sistemine enjekte edildi.

Standart eğrinin hazırlanması için MDA standartı 25 µL 1,1,3,3 tetraetoksipropanın (TEP) 1 mM stok solüsyonu verebilmek için 100 ml suda çözülmesiyle hazırlandı. Çalışma standartları 1 ml TEP stok solüsyonunun 50 ml %'lik sülfürik asitle hidrolize edilmesi ve oda sıcaklığında iki saat inkübe edilmesiyle oluşturuldu. Oluşan 20nmol/ml lik MDA standardı % 1'lik sülfürik asit ile tekrar seyreltildi. Bu 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 ve 0,15625 nmol/ml'lik son konsantrasyonlara ve toplam MDA'nın standart eğrisine ulaşmak için kullanıldı. 0,25 ml'lik standartlar 25 µL DNPH solüsyonu ile karıştırılarak 10 dakika süreyle inkübe edildi. 20 µL'lik reaksiyon karışımı 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek doğrudan HPLC sisteminin içine enjekte edildi.

HPLC analizi için örnekler Thermo Finningan HPLC aparatı ile analiz edildi. Analitik kolon ODS 2 C18 (5 µm parçacık boyutu, 125x4 mm) olarak belirlendi. Mobil faz asetonitril-distile su (38: 62, v/v) içeren % 0,2 (v/v) asetik asitti. HPLC aparatı 1 ml/dakika dönüş hızına, UV detektörü ise 310 nm'ye ayarlandı. MDA pikleri kalış sürelerine belirlendi ve dışsal standartların eklenmesiyle tepki vermeleri sonrası onaylandı. Daha sonra MDA konsantrasyonları 1,1,3,3 tetraetoksipropandan hazırlanan standart eğriyle hesaplanarak nmol/gr doku olarak belirtildi. [168, 169]

3.3.5.2. Reaktif azot ürünlerinin hesaplanması

Nitrik oksit (NO)'in kararlı son ürünü olan reaktif azot oksit ürünleri (NOx) 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
- **Dokuların Hazırlanması**

Dokular (0,15 gr), sodyum fosfat tamponu ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 3500 RPM'de 15 dakika santrifüj edildi. 200 µL süpernatanta, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda VCl_3 eklendi ve 37 °C'de 30 dakika enkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklendi. 37°C'de 10 dakika enkübasyondan sonra numunelerin optik yoğunluğu spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm'de okundu.

- **Standartın Hazırlanması**

6,4 mM'lık 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 nmol/gr doku olarak verildi. [170, 171]

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler "SPSS 16 for Windows" programının yardımıyla Kruskal Wallis testi kullanılarak yapıldı. "$p<0,05$" değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Değerlendirme

Deneklerin dejeneratif histoloji skorlarında ayrı-ayrı aldıkları puanlar tablo 5 ve tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 5. Cerrahi denervasyon yapılan deneklerin aldıkları histoloji skorları (CD: cerrahi denervasyon, D: denek)

Dejeneratif Histoloji Bulguları	Kontrol grubu						CD 30 gün grubu						CD 7 gün grubu						CD 1 gün grubu					
Segmental nekroz	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	3	3	2	2	3	1	1	1	2	1	1	2	1	2	3	1	2	1	2	2	1	1	1
Enine çizgilenmelerde kayıp	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Çekirdeklerin merkeze göçü	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	3	2	2	3	2	3	2	2	2	3	3	2	1	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1
Kas liflerinde ayrılma	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1	2	1
Bağ dokuda artış	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	3	2	2	2	3	3	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2
İnterselüler ve interfasiküler ödem	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	3	3	3	2	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1
Lenfosit infiltrasyonu	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	2	2	2	1	2	3	2	3	3	3	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1
Ortalama	2,35						1,95						1,59						1,51					

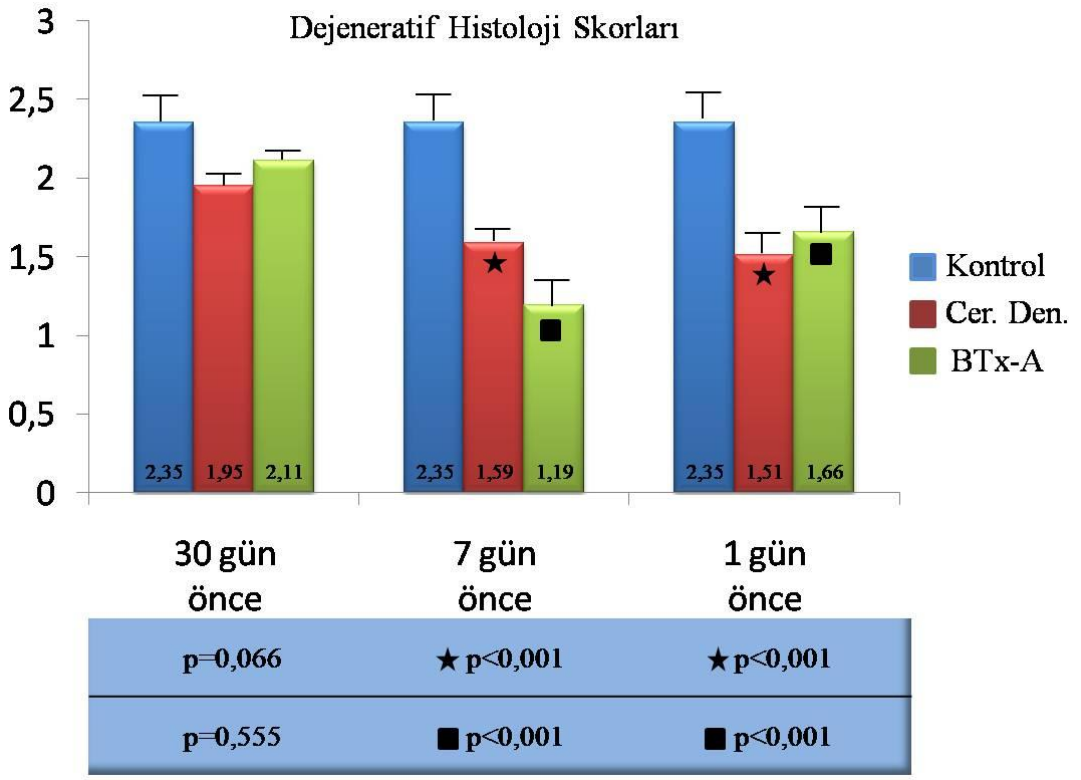
Tablo 6. BTx-A yapılan deneklerin aldıkları histoloji skorları (D: denek)

Dejeneratif Histoloji Bulguları	Kontrol grubu						BTx-A 30 gün grubu						BTx-A 7 gün grubu						BTx-A 1 gün grubu					
Segmental nekroz	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	3	3	2	2	3	2	2	1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	3	2	2	1	3	3
Enine çizgilenmelerde kayıp	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	2	3	2	2	3	2	3	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2
Çekirdeklerin merkeze göçü	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	3	2	2	3	2	2	2	3	3	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1
Kas liflerinde ayrılma	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bağ dokuda artış	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	3	2	2	2	3	3	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1
İnterselüler ve interfasiküler ödem	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	2	3	1	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2
Lenfosit infilitrasyonu	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
	2	2	2	2	1	2	3	3	3	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	2	2
Ortalama	2,35						2,11						1,19						1,66					

Dejeneratif histoloji skorlarının en yüksek çıktığı grup kontrol grubu olmuştur. Cerrahi denervasyon ve BTx-A 30 gün gruplarında histoloji skorlarında azalma olmasına karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Cerrahi denervasyon ve BTx-A 7 gün ile 1 gün gruplarında ise İ-R hasarı sonrasında histolojik dejenerasyon bulgularının anlamlı ölçüde azaldığı görülmektedir. Her gruptaki 6 deneğin histoloji skorlarının ortalaması alınarak hesaplanan dejeneratif histoloji skorları ve grupların kontrol grubuyla karşılaştırılması ile hesaplanan "p" değerleri tablo 7 ve şekil 19'de özetlenmiştir.

Tablo 7. Deneklerin histoloji skorları ve ortalamaları

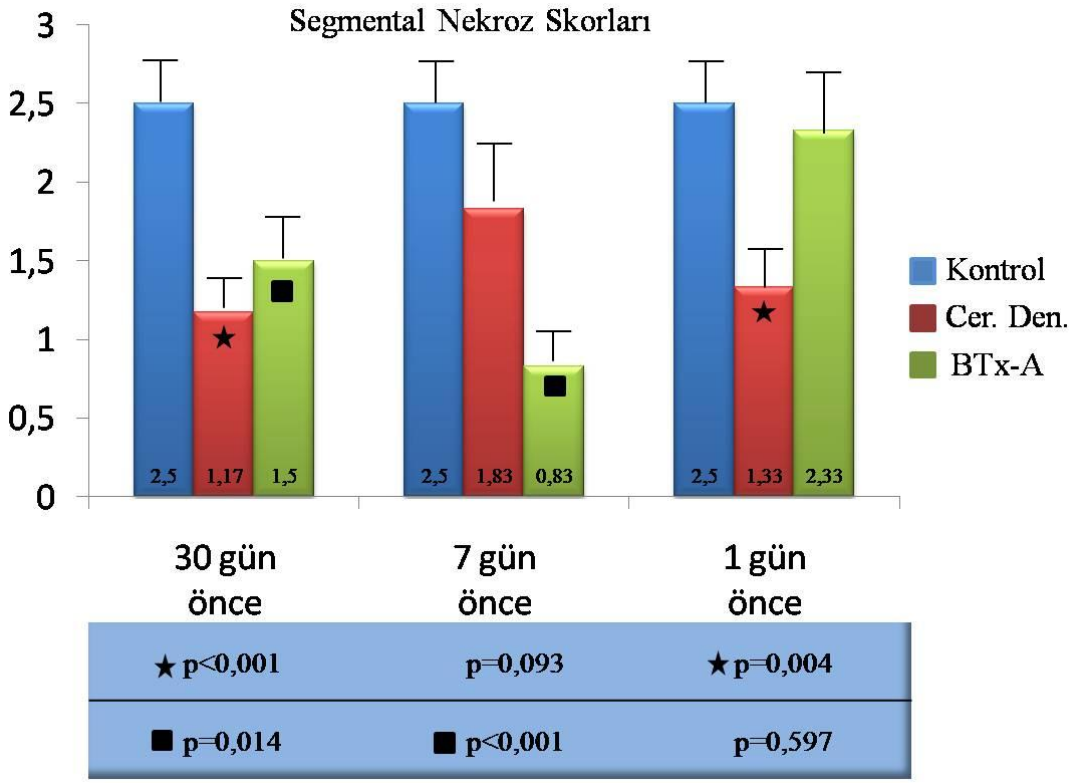
	Kontrol grubu	CD 30 gün grubu	CD 7 gün grubu	CD 1 gün grubu	BTx-A 30 gün grubu	BTx-A 7 gün grubu	BTx-A 1 gün grubu
Denek 1	2,28	2,00	1,71	1,42	2,28	1,14	1,85
Denek 2	2,42	1,85	1,42	1,85	2,14	1,42	1,57
Denek 3	2,57	2,00	1,28	1,57	2,28	1,00	1,57
Denek 4	2,00	2,00	1,85	1,42	2,00	1,28	1,42
Denek 5	2,28	1,85	1,57	1,57	2,00	1,14	1,85
Denek 6	2,57	2,00	1,71	1,28	2,00	1,14	1,71
Ortalama	2,35	1.95	1.59	1.51	2.11	1,19	1.66



Şekil 19. Grupların ortalama dejeneratif histoloji skorları, standart sapmaları (SD) ve "p" değerleri. 30 gün önce cerrahi denervasyon veya BTx-A ile kimyasal denervasyon yapılan gruplar hariç diğer gruplarda kontrol grubuna oranla histolojik dejenerasyon skorlarında anlamlı azalmalar saptanmıştır.

4.1.1. Segmental nekroz skorları;

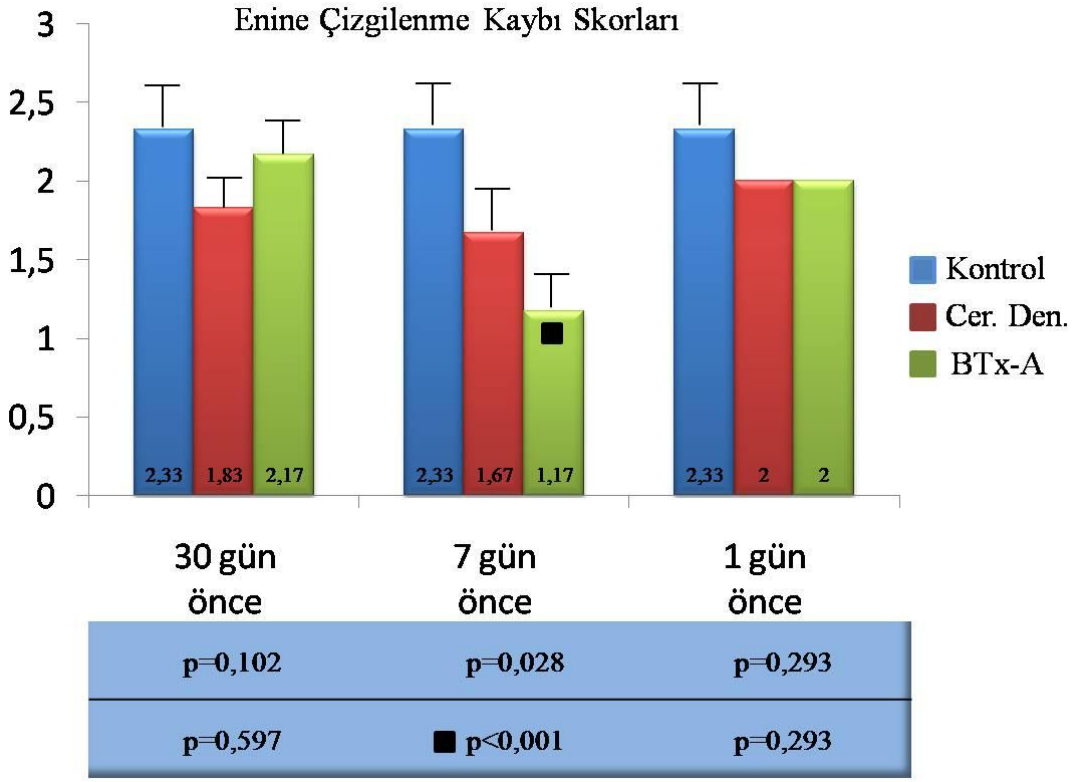
Kontrol grubuyla kıyaslandığında BTx-A 1 gün ve cerrahi denervasyon 7 gün grupları hariç diğer gruplarda İ-R hasarı sonrasında daha az segmental nekroz alanları görülmüştür. BTx-A 1 gün grubundaki segmental nekroz skoru kontrol grubu skorundan daha yüksek bulunmasına karşın aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Gruplara göre segmental nekroz skorları, standart sapmaları ve "p" değerleri şekil 20'de özetlenmiştir.



Şekil 20. Segmental nekroz skorları, standart sapmalar ve "p" değerleri. Kontrol grubuna kıyaslandığında 30 gün veya bir gün önce cerrahi denervasyon yapılan ve 7 gün veya 30 gün önce BTx-A ile kimyasal denervasyon yapılan gruplarda kaslarda segmental nekroz oranları anlamlı ölçüde azalmıştır.

4.1.2. Enine Çizgilenmelerde Kayıp;

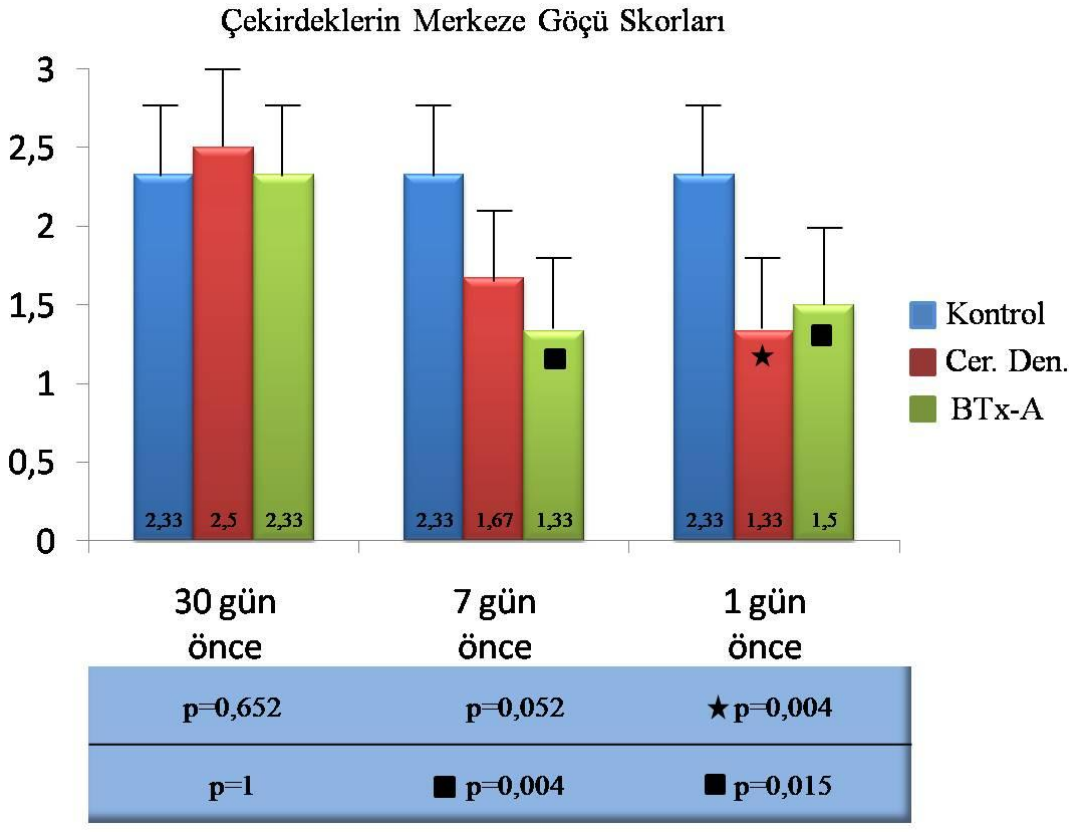
İ-R hasarı sonrasında kas liflerindeki enine çizgilenme kaybı en çok kontrol grubunda görülse de, bu parametrede anlamlı azalmanın görüldüğü tek grup BTx-A 7 gün grubudur. Enine çizgilenmelerde kayıp oranına göre belirlenen histoloji skorları, standart sapmaları ve "p" değerleri şekil 21'de özetlenmiştir.



Şekil 21. Enine çizgilenmelerde kayıp skorları, standart sapmaları ve "p" değerleri. Enine çizgilenmelerin kontrol grubuna oranla daha düzenli kaldığı iki grup 7 gün önce yapılan cerrahi denervasyon veya BTx-A yapılan gruplardır.

4.1.3. Çekirdeklerin merkeze göçü;

Dejenenerasyon derecesiyle iyi uyumluluk gösteren merkeze göç eden çekirdeklerin varlığı özellikle bir ay önce cerrahi denervasyon veya BTx-A yapılan gruplarda oldukça dikkat çekiciydi. 7 gün önce BTx-A ve 1 gün önce cerrahi denervasyon veya Btx-A uygulanan gruplarda ise çekirdeklerin merkeze göçü skoru kontrol grubuna oranlı anlamlı derecede azalmış olarak bulundu. Çekirdeklerin merkeze göç oranına göre oluşturulan histoloji skorları, standart sapmaları ve "p" değerleri şekil 22'de özetlenmiştir.

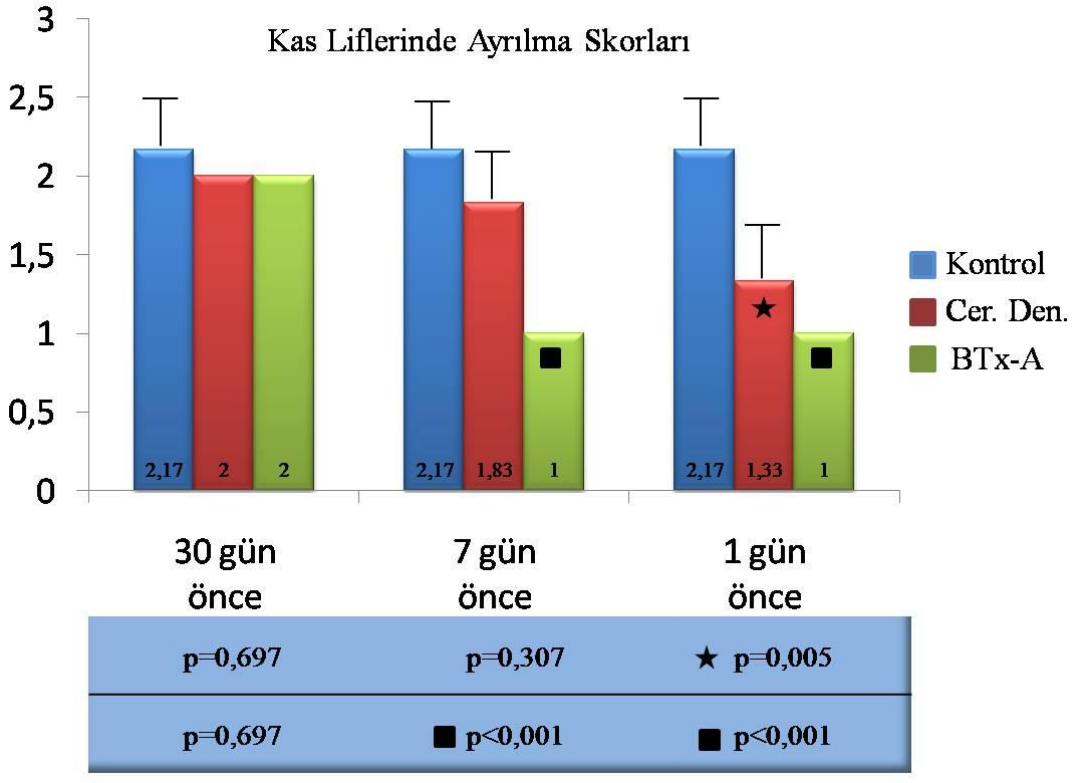


Şekil 22. Çekirdeklerin merkeze göçünün gruplar arası histolojik dağılımı ve "p" değerleri. 30 gün önce yapılan cerrahi denervasyon veya BTx-A uygulaması yapılan

gruplarda, bu uygulamaların çekirdeklerin merkeze göçünü önlemede yetersiz kaldıkları görülmektedir.

4.1.4. Kas liflerinde ayrılma;

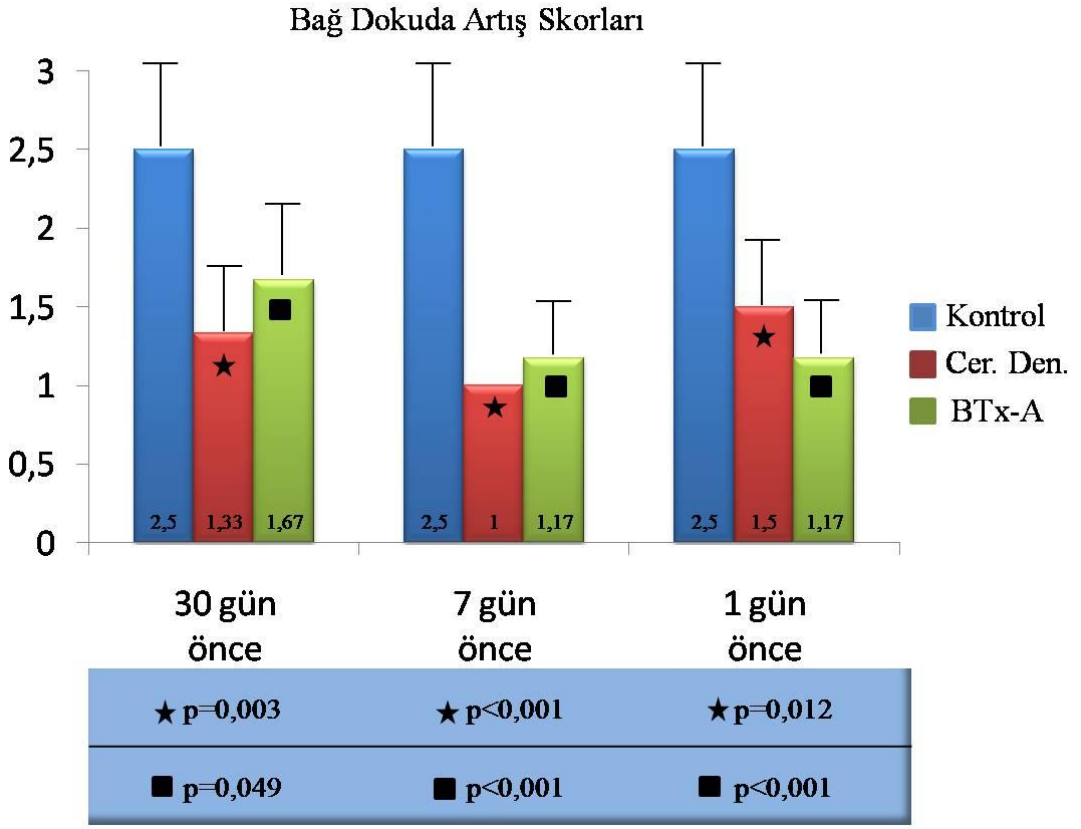
Kas liflerinin devamlılığının bozulasını gösteren bu skor incelendiğinde bir ay önce BTx-A veya cerahi denervasyon yapılan gruplarda bu skorda bir azalma olmadığı görüldü. Bununla beraber 7 gün önce BTx-A ve 1 gün önce BTx-A veya cerrahi denervasyon uygulanan gruplarda kas liflerindeki ayrılma anlamlı ölçüde azalmıştı. Kas liflerinde ayrılma oranına göre oluşturulan histoloji skorları, standart sapma ve "p" değerleri şekil 23'de özetlenmiştir.



Şekil 23. Kas liflerinde ayrılma histolojik skorunun gruplar arası dağılımı ve "p" değerleri. Bir gün veya 7 gün önce BTx-A ve bir gün önce CD yapılan gruplarda kontrol grubuna oranla kas liflerindeki ayrılma daha az görülmektedir.

4.1.5. Bağ dokuda artış;

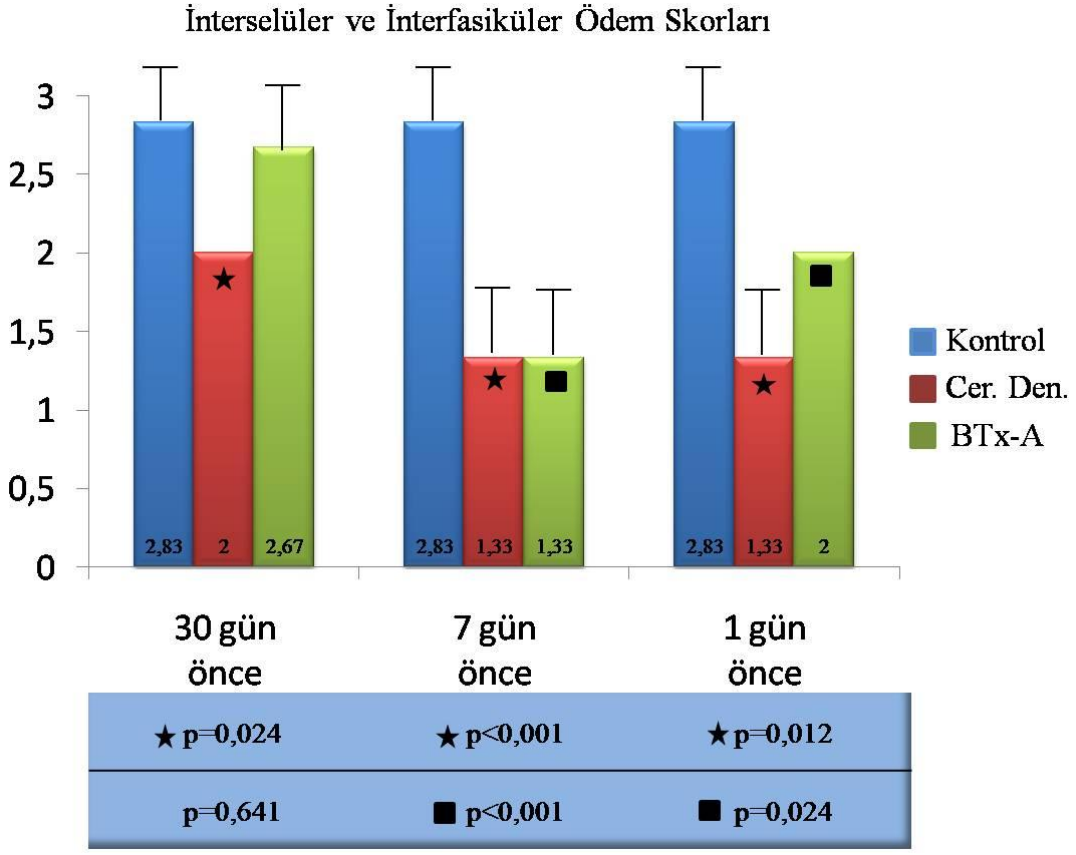
Bağ dokusunun kontrol grubuna oranla tüm dokularda gruplarda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı görülmektedir. Bağ dokudaki artışa göre oluşturulan histoloji skorları, standart sapma ve "p" değerleri şekil 24'de özetlenmiştir.



Şekil 24. "Bağ dokuda artış" histolojik skorunun gruplar arası dağılımı ve "p" değerleri. Kontrol grubuna oranla tüm gruplarda bağ doku miktarındaki artış daha sınırlı kalmıştır.

4.1.6. İntersellüler ve interfasiküler ödem

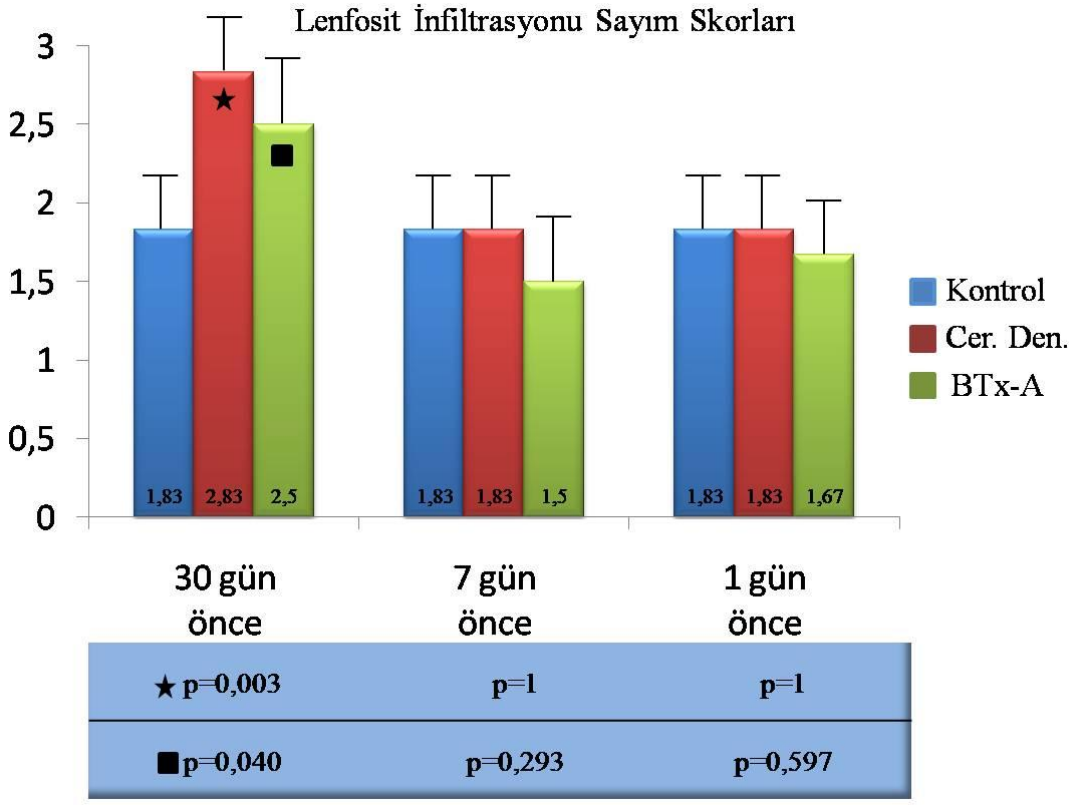
İ-R hasarı sonrasında dokular arasında oluşan ödem 30 gün önce BTx-A yapılan grup hariç tüm gruplarda anlamlı olarak azalmıştır. İntersellüler ve interfasiküler ödem oranlarına göre oluşturulan histoloji skorları, standart sapma ve "p" değerleri şekil 25'de özetlenmiştir.



Şekil 25. İntersellüler ve interfasiküler ödem skorlarının gruplar arası dağılımı ve "p" değerleri. Dokular arasındaki ödem kontrol grubuyla kıyaslanıldığında 30 gün önce BTx-A ile denervasyon yapılan grup dışındaki tüm gruplarda anlamlı oranda daha az bulunmuştur.

4.1.7. Lenfosit infiltrasyonu sayım skoru

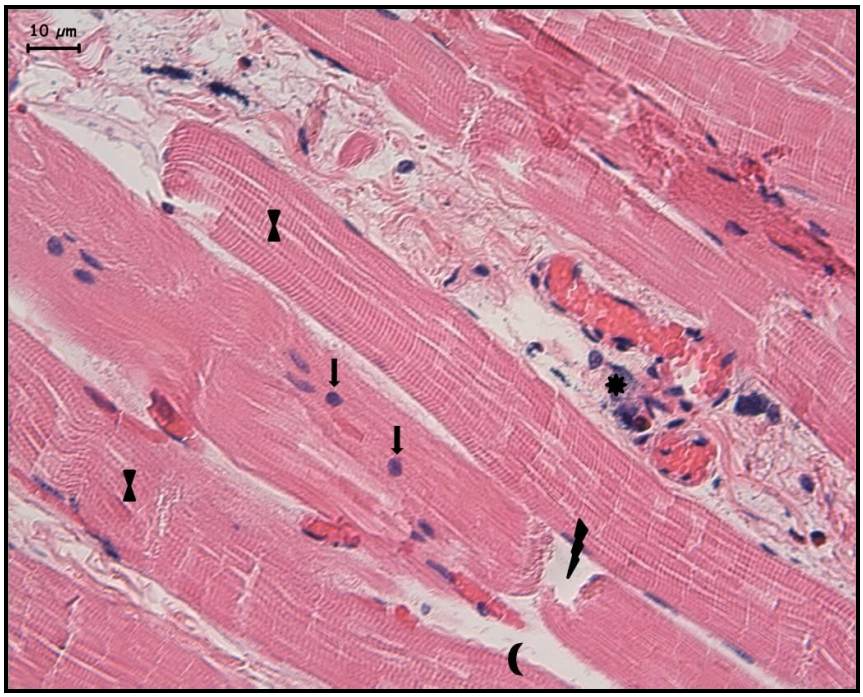
Lenfosit infiltrasyonlarının 30 gün önce cerrahi denervasyon veya BTx-A yapılan gruplarda kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür. Diğer gruplarla kontrol grubu arasında lenfosit infiltrasyonu skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Birim büyütmede saptanan lenfosit infiltrasyon sayısına göre oluşturulan histoloji skorları, standart sapmalar ve "p" değerleri şekil 26'de özetlenmiştir.



Şekil 26. Lenfosit infiltrasyon sayısının gruplar arası dağılımı ve "p" değerleri. Lenfosit infiltrasyonlarının 30 gün önce cerrahi ve BTx-A ile kimyasal denervasyon yapılan gruplarda kontrol grubuna oranla daha yüksek olması dikkat çekicidir.

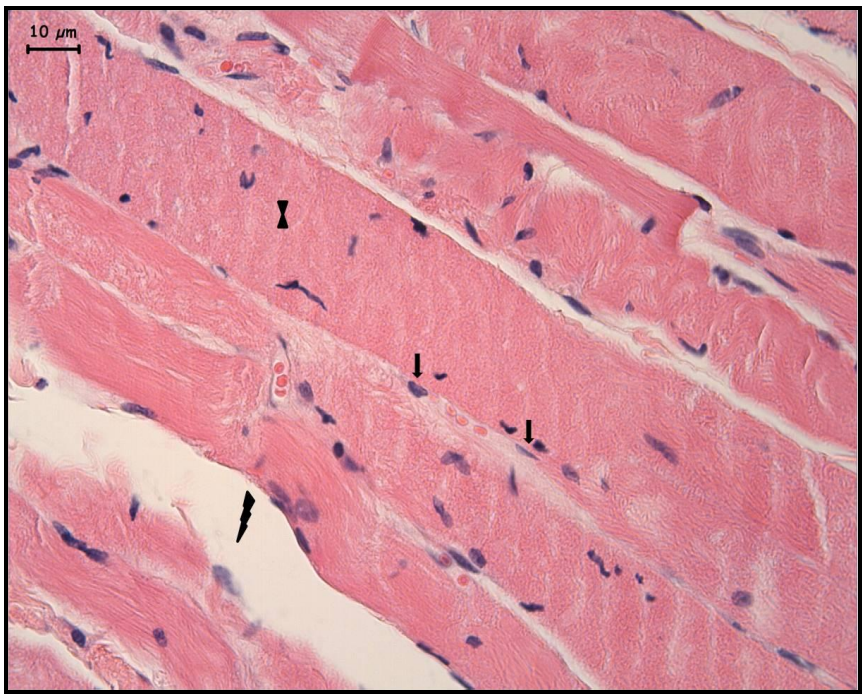
Hemotoksilen - Eozin Kesitleri

İ-R döngüsü sonrası kontrol grubunda geniş segmental nekroz alanları, enine çizgilenmelerde kayıplar, çekirdeklerin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ doku artışları ve intersellüler-interfasiküler ödem ile lenfosit infiltrasyonunda yoğun artışlar dikkat çekicidir. (şekil 27)



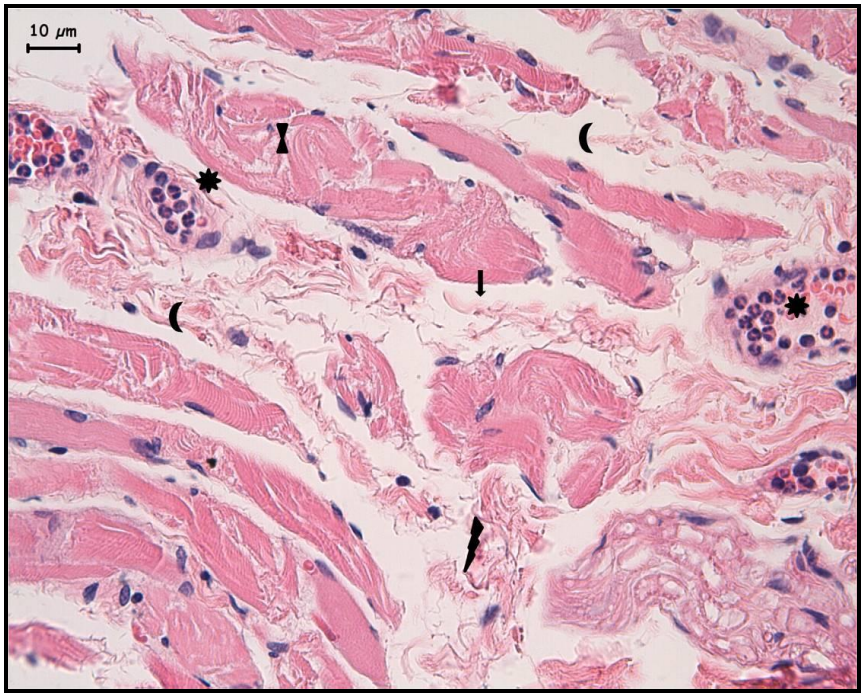
Şekil 27. Kontrol grubu; enine çizgilenmelerde kayıplar (⧗), çekirdeklerin merkeze göçü (⬇), enflamatuvar hücre artışları (✸), kas liflerinde ayrılma (↯), ödem (◐)

30 gün önce cerrahi denervasyon yapılan grupta segmental nekroz alanları kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmıştır. Bunun yanında çekirdeklerin merkeze göçü ve lenfosit infiltrasyonunda bu gruptaki dejenerasyon, kontrol grubundan da fazladır. Enine çizgilenme kayıpları, kas liflerinde ayrılma skorlarındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı değilken, bağ doku artışı ve ödem parametrelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır. (Şekil 28)



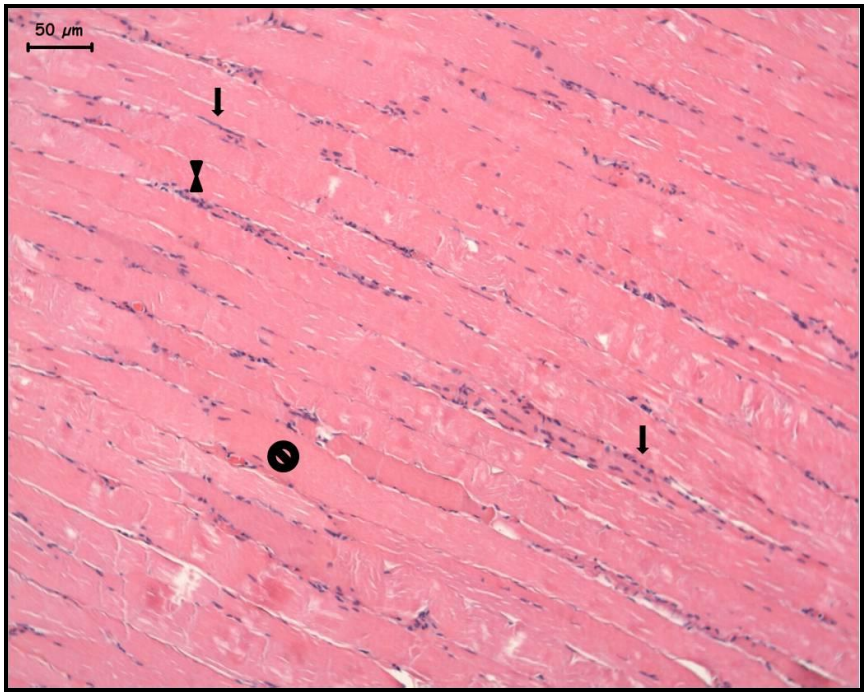
Şekil 28. Cerrahi denervasyon 30 gün grubu. Enine çizgilenme kayıpları (⧗), Çekirdeklerin merkeze göçü (⬇), kas liflerinde ayrılma (🗲)

BTx-A 30 gün grubunda da, cerrahi denervasyon 30 gün grubunda olduğu gibi segmental nekroz ve bağ dokusu artışı skorlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcuttur. Bu grupta diğer hiçbir parametredeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değilken, lenfosit infiltrasyonu kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. (şekil 29)



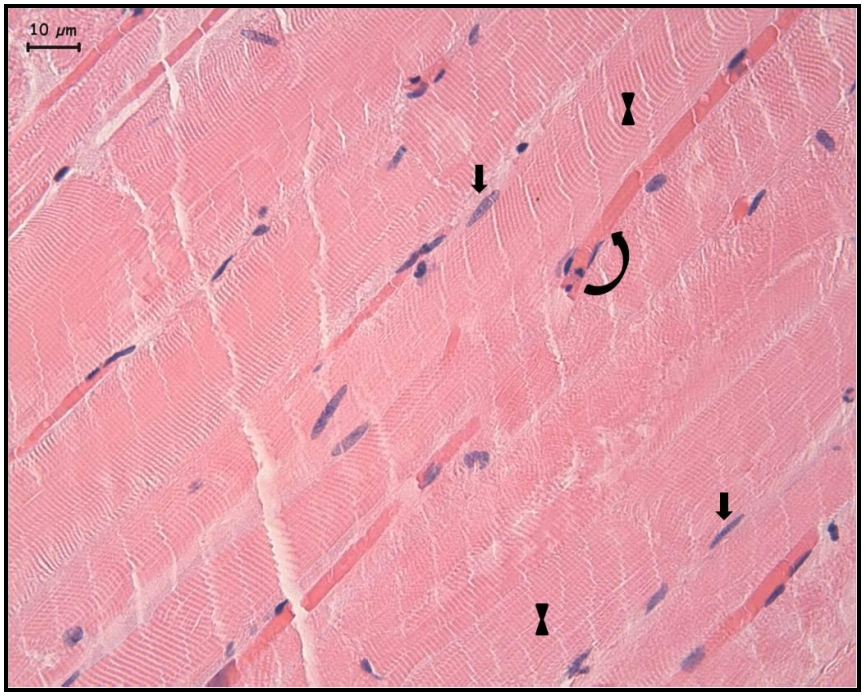
Şekil 29 BTx-A 30 gün grubu, yoğun dejeneratif değişiklikler mevcuttur. Kas liflerinde ayrılma ( ), enine çizgilenmelerde kayıp ( ), yoğun lenfosit infiltrasyonu ( ), yaygın ödem ( )

Cerrahi denervasyon 7 gün grubunda, bağ doku artışı, ödem ve enine çizgilenme kaybı skorlarında kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düşüşler saptanmasına karşın, segmental nekroz, çekirdeklerin merkeze göçü ve kas liflerinin ayrılması skorlarındaki düşüşler anlamlı bulunmamıştır. Lenfosit infiltrasyonu skoru ise kontrol grubu ile aynı değerdedir. (Şekil 30)



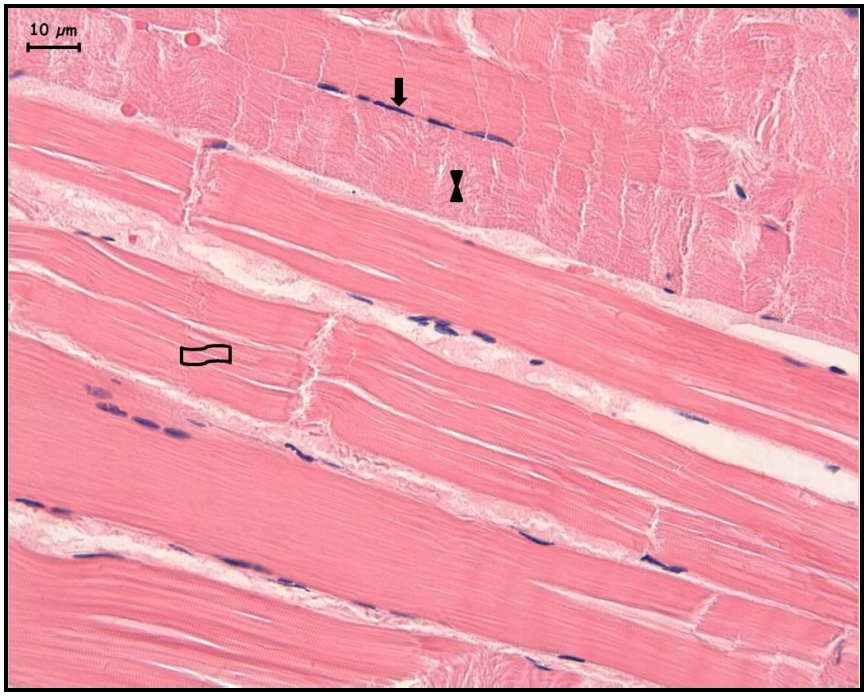
Şeki 30 Cerrahi denervasyon 7 gün grubu. Çekirdekler periferde yerleşmiş (⬇), ödem yok, nadir nekroz alanları (⊘), enine çizgilenmelerde kayıp (⧗)

BTx-A 7 gün grubunda lenfosit infiltrasyonu hariç tüm gruplarda kontrol grubuna oranla histoloji skorlarında anlamlı düşüşler saptanmıştır. (şekil 31)



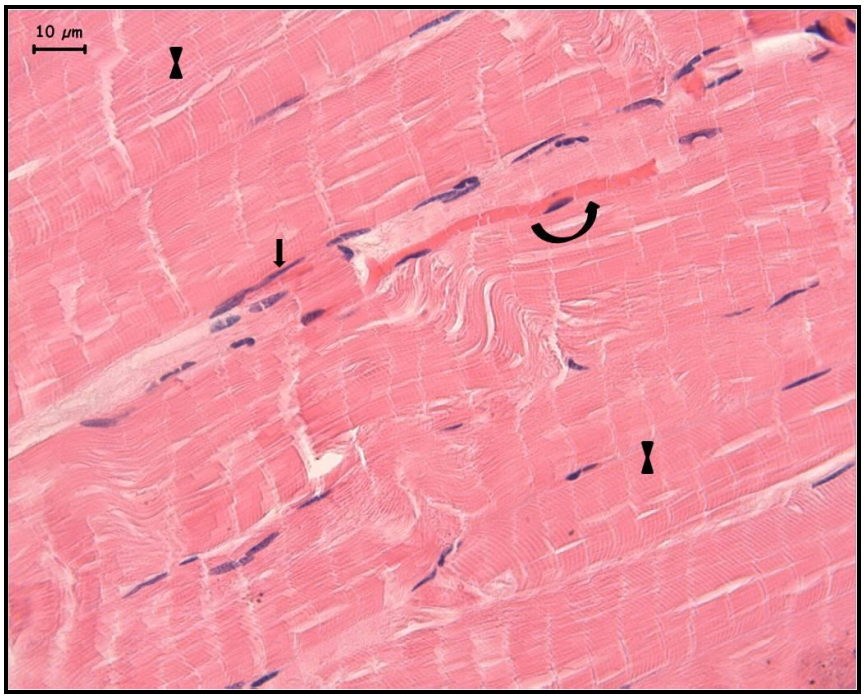
Şekil 31. BTx-A 7 gün grubu, Enine çizgilenmeler korunmuş ( ), çekirdekler periferde yerleşmiş ( ) damar endoteli yapısı sağlam görünümde ( ), ödem görünmemekte, kas lifleri arasında ayrılma yok

Cerrahi denervasyon 1 gün grubunda, segmental nekroz, çekirdeklerin merkeze göçü, kas liflerinin ayrılması, bağ doku artışı ve ödem parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmıştır. Enine çizgilenmelerde kayıp skorlarındaki düşüş ise anlamlı bulunmamıştır. Lenfosit infiltrasyon skoru ise kontrol grubu ile aynıdır. (Şekil 32)



Şekil 32. Cerrahi denervasyon 1 gün grubu. Enine çizgilenmeler bazı alanlarda korunmuşken (⧗), bazı alanlarda dejenere olmuştur. (▭) Çekirdekler periferde yerleşmiştir. (⬇) Dokular arası minimal ödem mevcuttur. (❨)

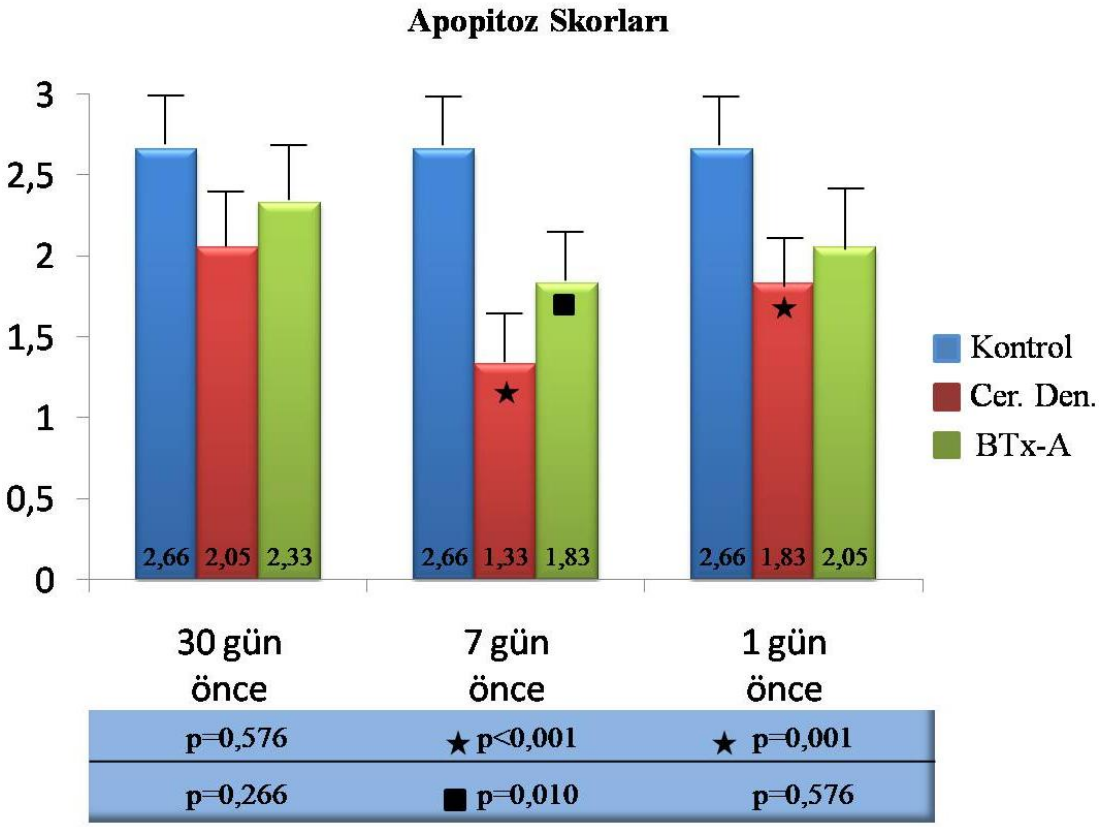
BTx-A 1 gün grubunda kas liflerinde ayrılma, çekirdeklerin merkeze göçü, bağ dokusunda artış ve ödem skorlarında kontrol grubuna oranla anlamlı azalmalar saptanmıştır. Bununla beraber enine çizgilenme, segmental nekroz ve lenfosit infiltrasyonu skorlarındaki azalmalar anlamlı bulunmamıştır. (Şekil 33)



Şekil 33. BTx-A 1 gün grubu. Enine çizgilenmelerin korunduğu ( ), damar yapısının sağlam olduğu ( ), çekirdeklerin periferde yer aldığı ( ) ve ödemin minimal olduğu dikkat çekicidir

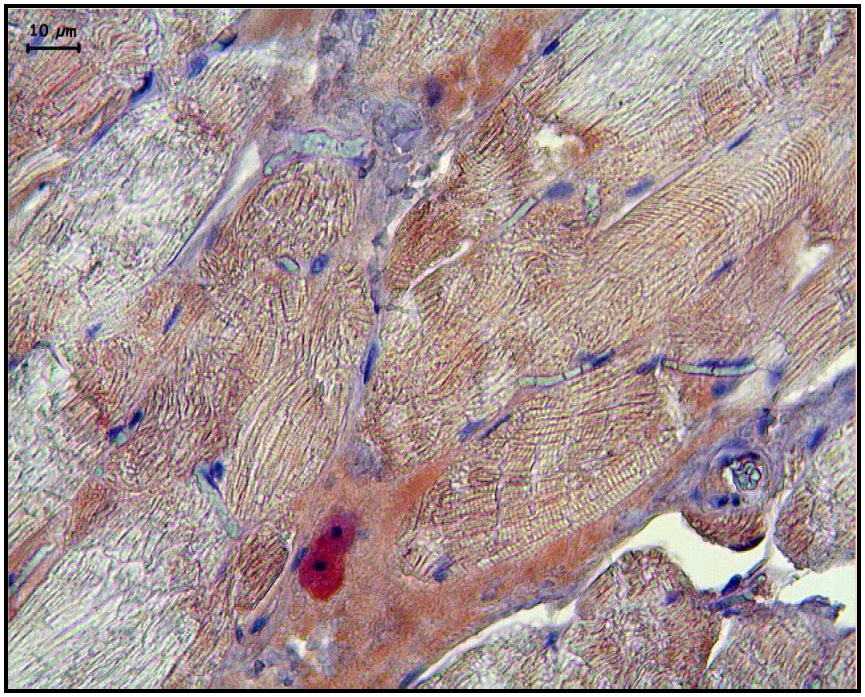
4.2. Dokuda Apopitoz Oranları

Caspas 3 pozitifliği sonucu apopitoza gittiği anlaşılan hücrelerin skorları incelendiğinde apopitozun kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm gruplarda daha az görüldüğü ve bu azalmanın 1 gün önce cerrahi denervasyon ve 7 gün önce BTx-A veya cerrahi denervasyon yapılan gruplarda anlamlı olduğu belirlenmiştir. Apopitoz skorları ve bu değerlerin kontrol grubuyla karşılaştırılmaları ile oluşan standart sapma ve "p" değerleri şekil 34'te özetlenmiştir.

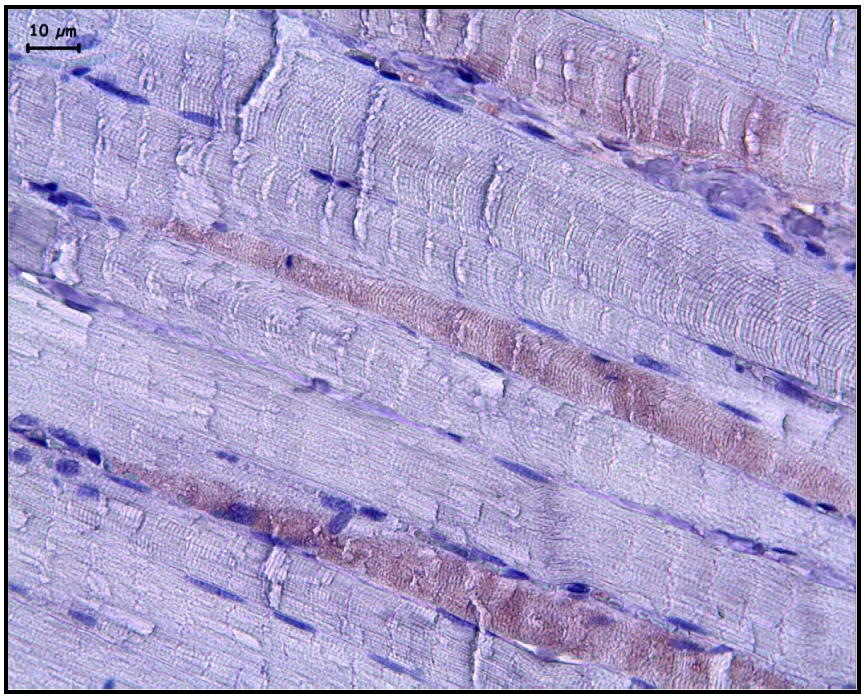


Şekil 34. Grupların ortalama apopitoz skorları ve standart sapma ve "p" değerleri. Kontrol grubuna göre 7 gün önce cerrahi denervasyon ($p < 0,001$), bir gün önce cerrahi denervasyon ($p = 0,01$) ve 7 gün önce BTx-A ($p = 0,01$) yapılan gruplarda İ-R hasarı sonrasında apopitoz yüzdeleri anlamlı oranda daha az saptanmıştır.

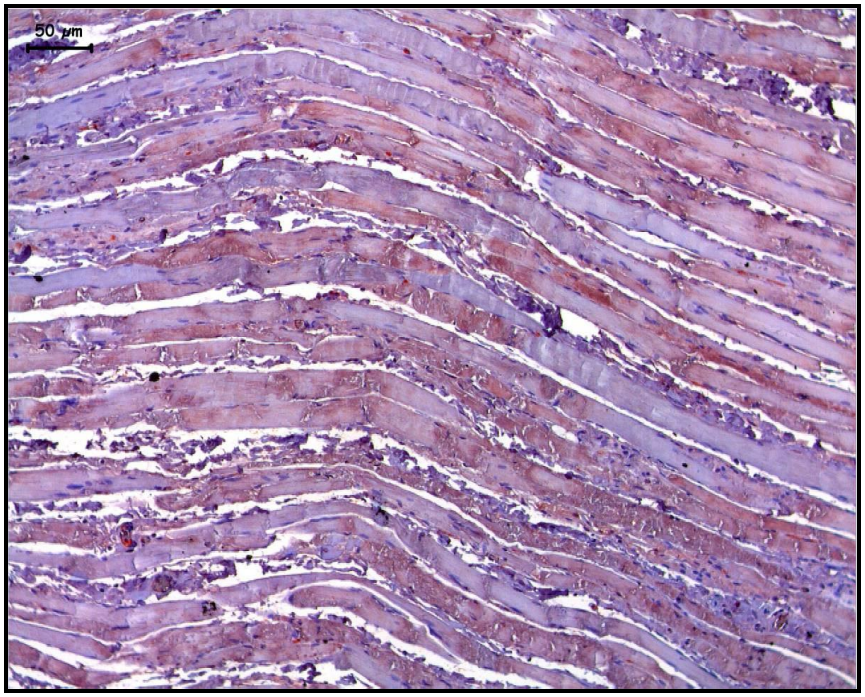
Bu veriler incelendiğinde Caspas 3 boyası ile en yüksek reaksiyon veren grup kontrol grubu (Şekil 35), en az reaksiyon veren grup ise cerrahi denervasyon 7 gün (şekil 36) grubudur. Bir gün önce BTx-A ve 30 gün önce BTx-A veya cerrahi denervasyon yapılan gruplarda apopitotik değişiklikler oldukça yüksek bulunmuştur. (şekil 37-39). 7 gün önce BTx-A ve bir gün önce cerrahi denervasyon yapılan gruplarda ise orta düzeyde apopitotik değişiklikler mevcuttur. (şekil 40, 41)



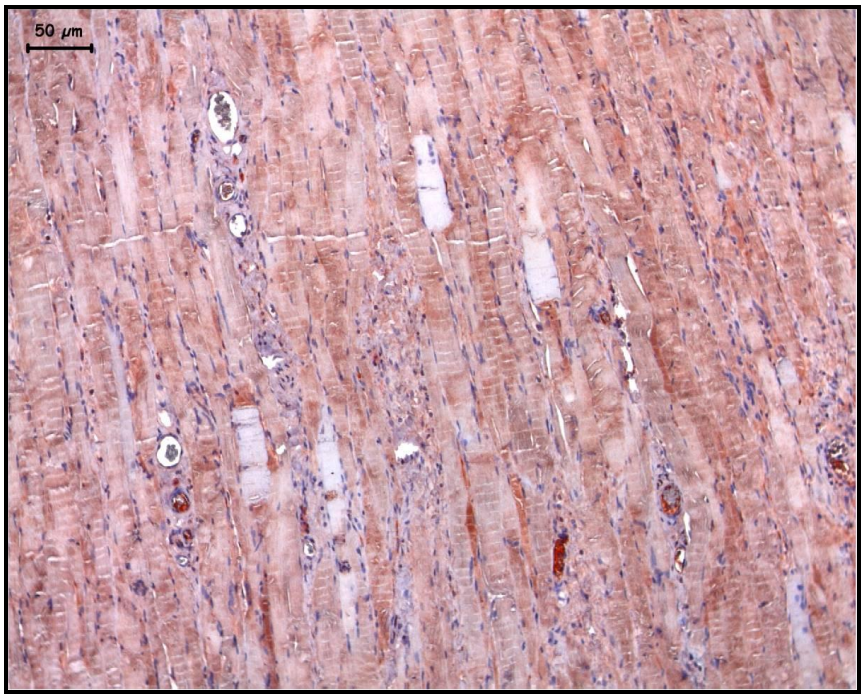
Şekil 3511. Kontrol grubu. Caspas 3 aktivitesi olan dokular kahverengi boyanmıştır. Yoğun apopitotik değişiklikler dikkat çekicidir.



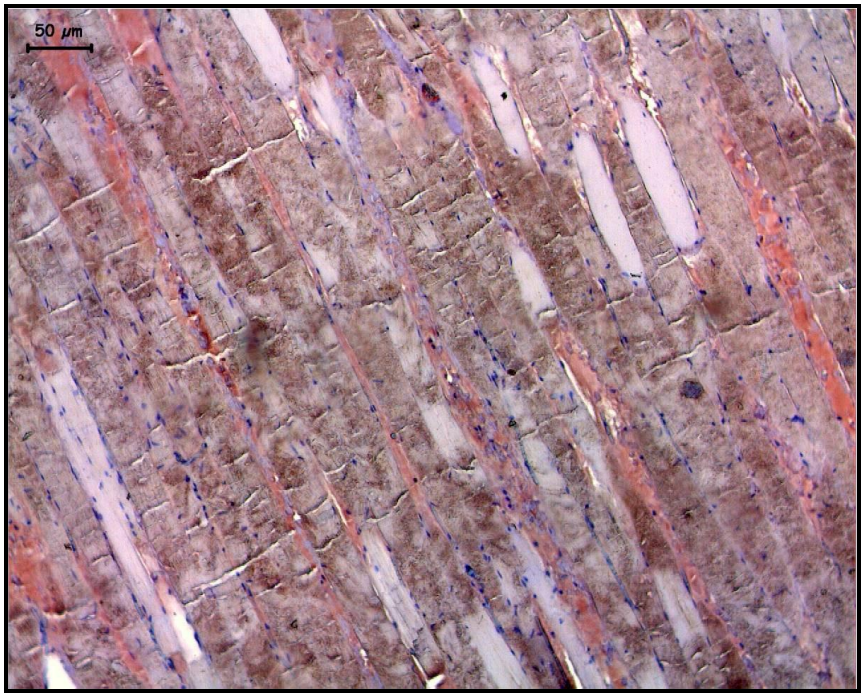
Şekil 36. Cerrahi denervasyon 7 gün grubu Caspas 3 reaksiyonu. Minimal apopitotik değişiklikler



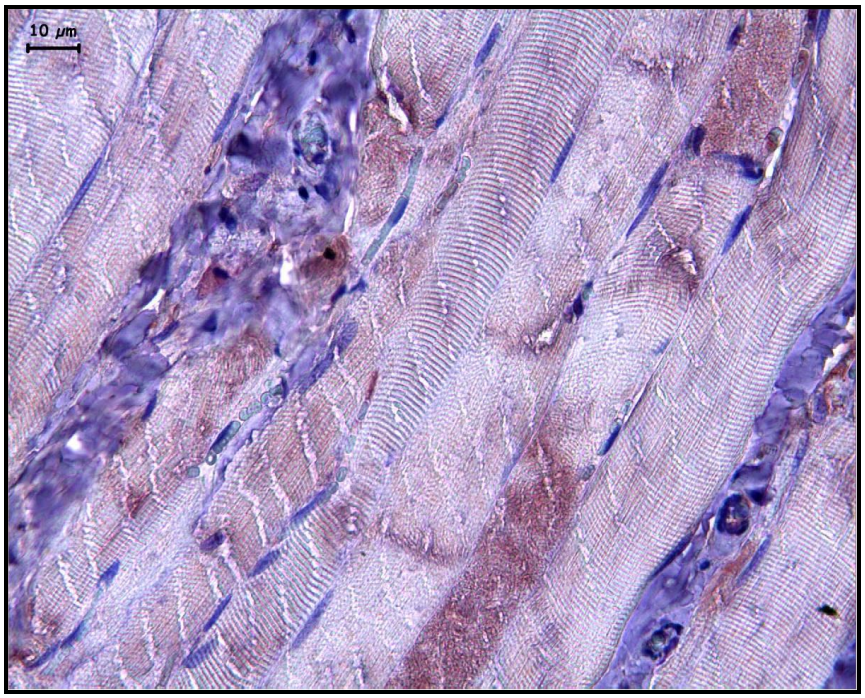
Şekil 3712. BTx-A 30 gün grubu. Caspas 3 aktivitesi olan dokular kahverengi boyanmıştır. Yoğun apopitotik değişiklikler dikkat çekicidir.



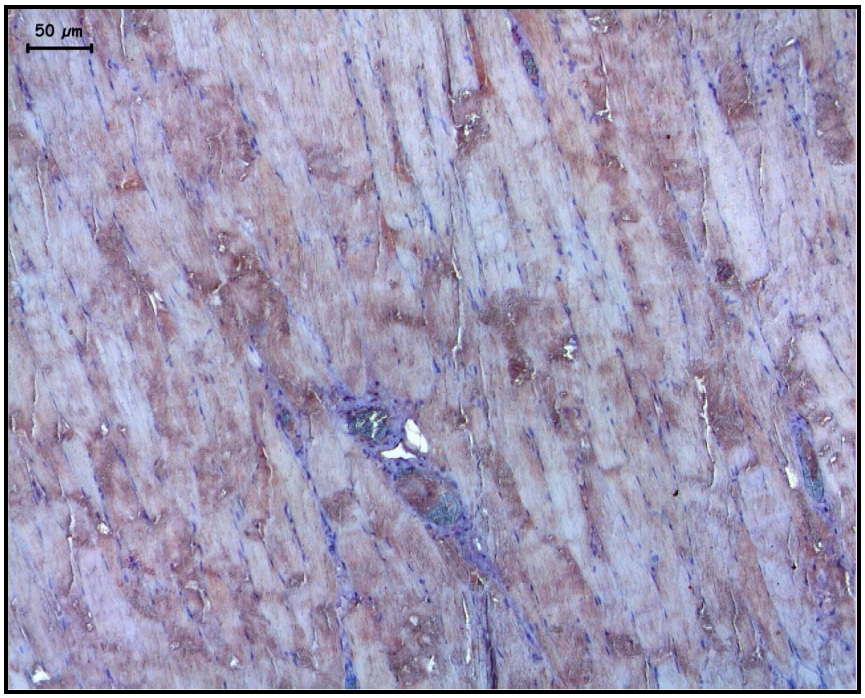
Şekil 38. Cerrahi denervasyon 30 gün grubu tıpkı 30 gün önce BTx-A yapılan grup gibi yoğun apopitotik değişiklikler mevcuttur.



Şekil 39. BTx-A 1 gün grubu, yoğun apopitotik alanlar görülmektedir



Şekil 40. BTx-A 7 gün grubu. Caspas 3 aktivitesi olan dokular kahverengi boyanmıştır. Dokularda kontrol grubuna oranla daha az apopitotik değişiklikler görülmektedir

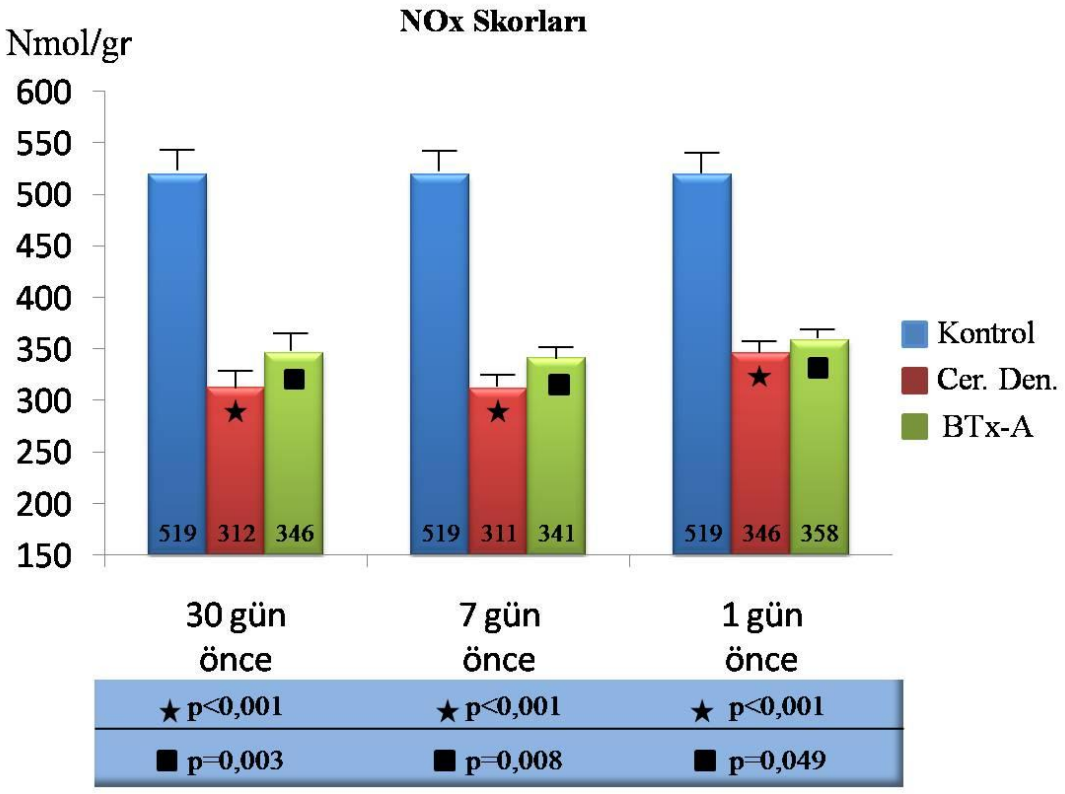


Şekil 41. Cerrahi denervasyon 1 gün grubunda da tıpkı BTx-A 7 gün grubunda olduğu gibi apopitotik değişiklikler azalmış olmakla beraber orta yoğunlukta devam etmektedir.

4.3. Dokuların Biyokimyasal Analizleri

4.3.1. Doku Reaktif Azot Ürünlerinin Düzeyleri;

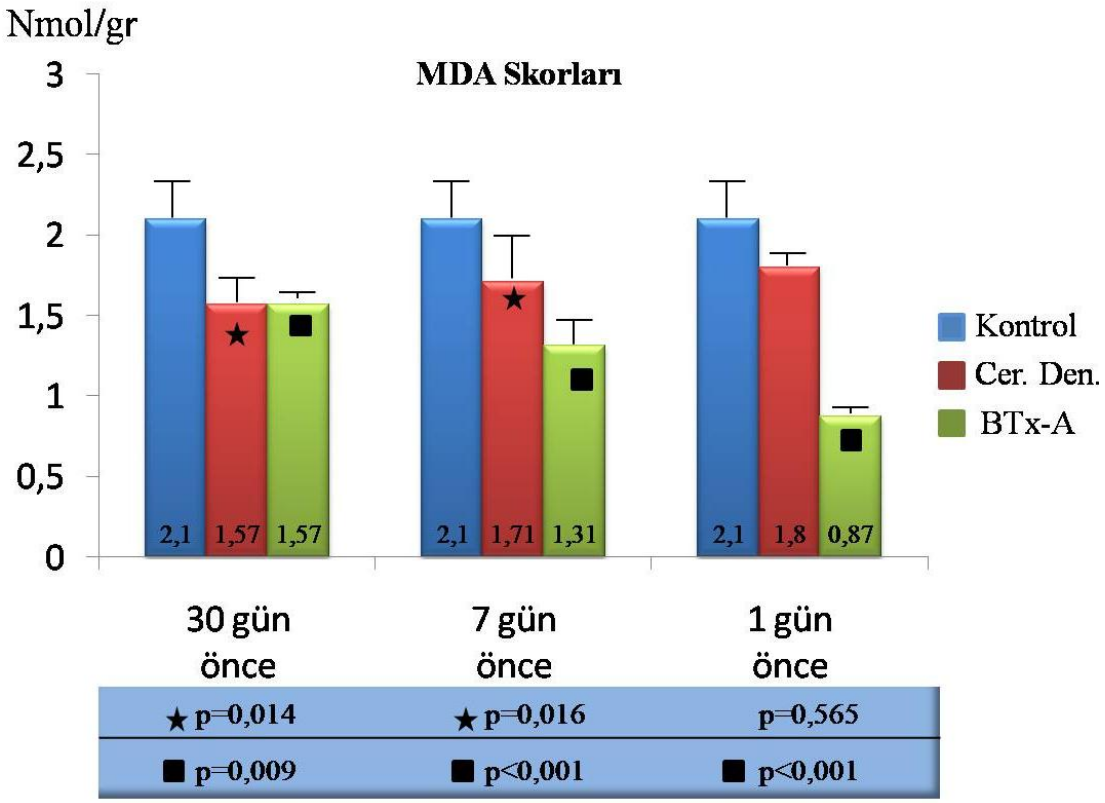
Kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman tüm gruplarda reaktif azot ürünlerinin konsantrasyonu anlamlı oranda daha düşük bulunmuştur. Nitrik oksit metabolizmasının sonucunda oluşan reaktif azot oksit ürünlerinin (NOx) (nitrit + nitrat) gruplara göre dağılımı, standart sapmaları ve "p" değerleri şekil 42'da özetlenmiştir.



Şekil 42. Doku NOx (nitrit+nitrat) düzeyleri, grup standart sapma ve "p" değerleri. Kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman diğer tüm gruplarda doku reaktif azot ürünlerinin konsantrasyonu anlamlı oranda daha düşük bulunmuştur.

4.3.2. Doku Malonildialdehit (MDA) Düzeyleri;

Oksijen radikallerinin yol açtığı lipit peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeylerinde kontrol grubuna oranla bir gün önce cerrahi denervasyon yapılan grup hariç tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmıştır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle hesaplanan doku MDA değerleri, standart sapmaları ve kontrol grubuyla karşılaştırma sonucu hesaplanan "p" değerleri şekil 43'da özetlenmiştir.



Şekil 43. İ-R hasarını takiben grupların doku MDA düzeyleri, standart sapma ve "p" değerleri. Bir gün önce cerrahi denervasyon yapılan grup hariç diğer tüm gruplarda kontrol grubuna oranla lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeylerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. Bir gün önceki cerrahi denervasyon da MDA düzeylerini düşürmesine karşın bu düşüş istatistiksel anlam oluşturmamaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İskemi reperfüzyon hasarı klinikte replantasyonlar ve serbest doku nakillerinde daha sık karşılaşılmakla beraber tüm doku aktarımlarda yaşanabilen bir durumdur. İskemi sonrasında, dokuda reperfüzyona karşın geri dönüşümsüz hasarların oluştuğu süre "Kritik İskemi Süresi" olarak bilinmektedir. Her dokunun kendine özgü bir kritik iskemi süresi vardır. Bu süreç normotermik koşullarda iskelet kaslarında 4 saat, sinir dokusunda 8 saat, yağ dokusunda 13 saat, deride 24 saat, kemik dokusunda ise 4 gün olarak bilinmektedir.[24] Bu veriler iskelet kasının bir uzuvda iskemiye en duyarlı doku olduğunu göstermektedir.

Günümüzde, flep mikro-dolaşımı hakkındaki bilgilerin ve mikrocerrahi tekniklerin gelişmesi sayesinde, serbest doku aktarımında başarı oranları % 91-99 arasında değişmektedir. Bununla beraber cerrahi sonrası dönemde oluşan dolaşım sorunlarına bağlı tekrar ameliyata alma oranları % 6 ile 25 arasındadır.[172] Serbest doku aktarımlarından sonra revizyona alınan olgularda flebi kurtarma oranları ise % 28 ile % 90 arasındadır.[173] Serbest kas fleplerinde iskemi duyarlılığı, sadece cilt ve cilt altı doku içeren fleplere oranla daha yüksektir. Bu sebeple anastomoz süresinin uzamasına veya anastomoz sonrası pedikülde tıkanma olmasına bağlı iskemik kalan kaslarda İ-R hasarının olumsuz etkileri daha sık görülmektedir. Ayrıca pediküllü rektus abdominus veya latissimus dorsi flepleri gibi miyokutanöz fleplerde hematom veya çevresel dokuların basısına bağlı iskemiler görülebilmekte ve bunun sonucunda kısmi ve hatta tam flep kayıpları görülebilmektir.

İ-R hasarının önlenebilmesi için alınabilecek önlemlerin başında iskemi sürelerinin mümkün olduğunca kısa tutulması gelmektedir. Alınan tüm önlemlere karşın serbest doku nakillerinde, replantasyonlarda ve pedikülünde bası ya da tromboza bağlı tıkanıklık oluşan fleplerde, iskemi süreleri uzayabilmektedir. Bu gibi durumlarda alınabilecek diğer bir önlem ise kas flebinin iskemiye dayanıklılığının arttırılmasıdır. Bu amaçla literatürde İ-R hasarının önlenmesi için pek çok ajan veya yöntem deneysel olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar bildirilmiştir. Bu ajan ve yöntemlerin bazıları antikoagülanlar,[74-78] anti-enflamatuarlar,[80-83] antioksidanlar,[84-87] vazodilatatörler,[88-92,111] immün sistem düzenleyiciler,[83,93] araşidonik asit antimetabolitleri,[94-96] nötrofil yapışma önleyicileri[97-102] ve iskemik önkoşullandırmadır.[103-110] Deneysel olarak etkinliği kanıtlanmış pek çok yöntem ile İ-R hasarının azaltılabileceği gösterilmişken bunlardan pek azı klinik olarak kullanılabilmektedir. Bunun en önemli sebebi deneysel olarak etkinliği gösterilen pek çok ajanın klinik olarak temin edilmesinin veya uygulanmasının güç olmasıdır.

Çalışmamızda ilk aşamada cerrahi denervasyonla, ikinci aşamada BTx-A ile yapılan ön koşullandıranın iskelet kasında İ-R hasarına etkileri incelenmiştir. Bu amaçla dejeneratif histoloji bulguları, apopitoz oranları ve doku MDA ve NOx düzeyleri değerlendirilmiştir.

30 gün önce gerçekleştirilen cerrahi denervasyonun dejeneratif histoloji skorlarında ve apopitoz oranlarında kontrol grubuna oranla yeterli fayda sağlayamadığı görülmektedir. Bunun yanında dokudaki serbest radikal hasarının bir göstergesi olan MDA ve azot oksit radikallerine bağlı hasarın göstergesi olan NOx miktarlarında kontrol grubuna oranla anlamlı düşüşler görülmüştür. Biyokimyasal

parametrelerle histolojik parametrelerin bu grupta örtüşmemeleri beklenmeyen bir durum değildir. Cerrahi denervasyon sonrası kaslarda morfolojik olarak; ağırlık kaybı, liflerde kısalma, ayrılma ve dizilim kusurları oluşmakta zaman içinde kas dokusu atrofiye giderek, fibro-adipoz dokularla yer değiştirmektedir.[113-116,119] Damarların çevresinde kollajen birikimi olmakta, damarlar giderek küçülmekte ve kas dokusundan izole olmaktadır.[123] Değişimler elektron mikroskobunda hücresel temelde incelendiğinde yapısal değişikliklerin birinci haftada dahi görülebildiği belirtilmiştir.[116] Zamanla mitokondri yapısı bozulmakta, çekirdekler merkeze doğru göç etmektedir. Kromatin dizilimleri ve yoğunlukları değişmekte, sitoplazma içinde yağ ve fagositik veziküller görülmektedir.[112,117,118,123] Bu bilgilerin ışığında histolojik parametreler tekrar tek tek incelenmiştir. Bu inceleme soncunda 30 gün önce cerrahi denervasyon yapılan kontrol grubuna oranla, enine çizgilenme kaybının ve kas liflerindeki ayrılmanın anlamlı ölçüde azalmadığı, hatta merkeze göç eden çekirdek sayısının ve lenfosit infiltrasyonunun kontrol grubunun üzerinde kaldığı belirlenmiştir. Tüm bu değişikliklerin, denervasyonun doğal sürecinin bir parçası olduğu düşünüldüğünde, histolojik parametrelerdeki olumsuzluğun denervasyonun doğal sürecine mi, İ-R hasarına mı bağlı oluştuğunu ayırt etmek güçtür. Aynı şekilde denerve olan kaslarda apopitozun da doğal bir süreç olduğu bilindiği için[4] apopitoz skorunun kontrol grubuna yakın çıkmasının da, İ-R hasarından korunma parametrelerini değerlendirmede yanıltıcı olabileceği düşünülmüştür. Histoloji ve apopitoz parametreleri göz ardı edildiğinde ise, doku biyokimyasal parametrelerinde 30 gün önce yapılan cerrahi denervasyon anlamlı koruma sağlamakta ve İ-R hasarını azaltmaktadır.

İ-R hasarından 7 gün önce gerçekleştirilen cerrahi denervasyonun hem dejeneratif histoloji ve apopitoz, hem de doku MDA ve NOx skorlarında kontrol grubuna oranla anlamlı düşüşler sağlamaktadır. 30 gün önce cerrahi denervasyon yapılan grubun aksine 7 gün önce yapılan denervasyonda histoloji ve apopitoz skorlarının daha iyi çıkması, denervasyon sonrasında geçen sürenin mikroskobik düzeyde değişiklikler oluşmasına ve apopitozun başlamasına yetmemesi şeklinde yorumlanmıştır. Yapılan çalışmalarda elektron mikroskobunda doku dejenerasyonunun 7. günde oluşmaya başlamasına karşın tam etkilerin görülmesinin 1-2 ay sürdüğü belirtilmiştir.[123] Denervasyonun erken dönemde sağladığı faydalar, denervasyonun kasa sağladığı metabolik ve dolaşım avantajları ile açıklanabilir. Kauffman ve Albuquerque 1970 yılında yaptıkları çalışmada denervasyonu takiben beş gün içinde EDL kasının enerji ihtiyacının % 36 azaldığını göstermişlerdir.[125] Du Bois ve arkadaşları denervasyon sonrası iskelet kasındaki glikoz metabolizmasını incelemişlerdir. Çalışmada cerrahi denervasyonu takiben kasta, birim kas hücresine düşen oksidatif kapasitenin, denerve olmamış kasla kıyaslandığında ilk on gün arttığı, sonra azalmaya başlayarak 20 günde oksidatif kapasitenin denerve olmayan kastaki miktarın altına düştüğü gösterilmiştir.[124] Bu düşüş çalışmada denervasyonun mitokondride yarattığı yapısal değişikliklere bağlanmıştır.

Davis ve Karl 1988 yılında yaptıkları çalışmada denervasyon sonrasında ilk 10 gün glikozun hücre içine göç hızının artmasına karşın glikojen sentez hızının azaldığını belirtmişlerdir. Bu durum hücre içine giren glikozun artmış oksidatif fosforilasyonda kullanıldığı şeklinde yorumlanmıştır.[126]

Denervasyonu takiben iskelet kasının dolaşımı Banbury ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. Çalışmada denervasyonun ilk 24 saat içinde vazokonstrüksiyon yaptığı ve buna bağlı kas içinde eritrosit akım hızlarının arttığı, 24. saatten sonra vazokonstrüksiyonun düzelmeye başladığı ve 48. saatte normale döndüğü belirtilmiştir. Bu erken vasküler yanıt endotel hücrelerinde depolanan vazoaktif maddelerin denervasyonu takiben kontrolsüz olarak salınmalarıyla açıklanmıştır. İkinci haftada vazodilatasyonun en üst seviyeye çıktığı ve perfüzyonun temel değerin %133'üne ulaştığı söylenmiştir. Çalışma iki haftadan uzun süredeki kas dolaşımını ise incelememiştir.[128] Ancak hücresel düzeydeki çalışmalar uzun dönemde damar çaplarında küçülmeler ve damar çevrelerinde fibrozis olduğunu, buna bağlı olarak da kas içi dolaşımın azaldığı yönünde fikir belirtmektedir.

Denervasyon sonrası değişimleri inceleyen bu makalelerden çıkarılan ortak sonuç; denervasyonun iskemi-reperfüzyon hasarından korunmada en etkili olduğu sürecin denervasyon sonrası ilk iki haftalık süreç olduğudur. Bu korumanın en muhtemel sebepleri; kasın denervasyon sonrası enerji ihtiyacının düşmesi, ilk 10 gün glikoz alım - kullanım hızının ve kas içi dolaşım kapasitesinin artması olarak yorumlanmıştır.

İ-R hasarından bir gün önce yapılan cerrahi denervasyon; dejeneratif histoloji-apopitoz skorlarında ve doku NOx miktarlarında anlamlı düşüşler yaratarak, İ-R hasarının azaltılmasında etkili olabileceğini göstermiştir. Doku MDA düzeylerinde de, kontrol grubuna oranla daha düşük miktarlar saptanmasına karşın, bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Denervasyon sonrası glikoz metabolizması ve oksidatif kapasiteyi inceleyen çalışmalar ilk on gün kas içine

glikoz göçünde ve oksidatif kapasitede artış bildirilmektedir. Ancak bu çalışmalarda en erken değerlendirmeler 5. günde yapılmış ve birinci gün hakkında bir yorumda bulunulmamıştır.[124,126] Denervasyon sonrası kas içinde dolaşımı inceleyen çalışmada ise denervasyonu takiben ilk 24 saat içinde vazokonstrüksiyon olduğu ve kan akım hızının arttığı belirtilmiştir. 24. saatten sonra bu vazokonstrüksiyonun etkisinin azalmaya başladığı ve 48. saatte düzeldiği bildirilmiştir. Bir gün önce yapılan cerrahi denervasyonun MDA düzeylerinde yeteri kadar düşüş yapamaması, artmış oksidatif kapasiteye rağmen vazokonstrüksiyonun tam olarak düzelmemiş olmasıyla ilişkilendirilebilir. Bunun yanında bir gün önce dahi yapılsa cerrahi denervasyonun dokuda apopitoz yoluyla ölen hücrelerin de sayısını azalttığı dikkat çekicidir. Tüm bu bilgilerin ışığında cerrahi denervasyonun İ-R hasarı oluşmadan bir gün dahi önce yapılmasının muhtemel hasarları azaltacağı, bununla beraber vazokonstrüksiyonun tam çözüleceği ikinci günü beklemenin muhtemel avantajları arttıracağı da düşünülmektedir.

İ-R hasarından 30 gün önce uygulanan BTx-A tıpkı 30 gün önce cerrahi denervasyon uygulanan grupta olduğu gibi dejeneratif histoloji ve apopitoz skorlarında İ-R hasarını anlamlı derecede azaltamamakta fakat doku MDA ve NOx düzeylerinde anlamlı düşüşler yaratmaktadır. Bu durum aynı 30 gün önce cerrahi denervasyon grupta olduğu gibi botulinum toksinin kasta yarattığı histolojik ve apopitotik değişikliklerin bir sonucu olabilir. Elmas ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada BTx-A'nın erken ve geç dönemde yol açtığı yapısal değişiklikler incelenmiştir. BTx-A uygulandıktan 5 gün sonra bile elektron mikroskobunda kas liflerinin ayrılamaya başladığı, bazı hücre çekirdeğinin merkeze

göç ettiği, miyofibrillerin organizasyonun bozulduğu ve bazı mitokondrilerin dejenere olduğu belirtilmiştir. Bu değişiklikler dejeneratif histoloji skorlarındaki yüksekliğin İ-R hasarına mı bağlı oluştuğu yoksa BTx-A uygulamasının doğal bir süreci mi olduğu konusunda soru işaretleri yaratmaktadır. BTx-A uygulamasından sonra apopitozun arttığına yönelik iki yayın olmasına karşın, apopitozun azaldığına dair de bir yayın bulunmaktadır. Bu çalışmalar arasında BTx-A ile yapılan tek çalışmada, Chuang ve arkadaşları prostat içine enjekte edilen BTx-A'nın histolojik kesitlerde 1. ve 3. aylarda yaygın apopitoza yol açtığını bildirmişlerdir. Bu veri de yüksek olan apopitoz oranlarının BTx-A'nın doğal sürecinin bir parçası mı, İ-R hasarının bir sonucu mu olduğuna dair net bir kanıya varmamızı güçleştirmektedir. Arnold ve arkadaşları 2009 yılında perivasküler olarak 5 ünite BTx-A uygulaması sonrası 1., 14. ve 28. günlerde damar çaplarını ölçmüşlerdir. BTx-A uygulaması sonrası 1. günde bile hem arter, hem de ven çaplarında anlamlı artışlar yarattığını, bu değişimin 14.gün ölçümünde en yüksek seviyeye çıktığını ve 28. günde halen yüksek olduğunu belirtmişlerdir.[19,21] Clemens ve arkadaşları 2009 yılında cerrahiden 5 gün önce femoral damarların çevresine 10 ünite Botox® enjekte etmişler. Cerrahi günü damar çaplarının Botox® yapılan grupta anlamlı olarak daha fazla olduğu bildirilmiştir. Damarlar kesilip, tekrar anastomoz edildiğinde ise Botox® yapılan tarafta anastomozların daha hızlı ve kolay yapıldığı ayrıca cerrahi sonrası trombozların daha az görüldüğü bildirilmiştir.[153] Matic ve arkadaşları 2007 yılında tavşan masseter kasına 25 ünite botulinum toksin uygulaması sonrası 4. ve 8. haftalarda masseter kası içindeki kan akımını, kan hacmini, damar geçirgenliğini ve glikoz alım hızını değerlendirmişler ve tüm bu parametrelerde artış olduğunu belirtmişlerdir.[13] Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda cerrahiden 30 gün

önce yapılan BTx-A, sağladığı metabolik ve dolaşıma ait avantajlarla İ-R hasarından koruyucu etkilere sahiptir. Histoloji ve apopitoz parametreleri yukarıdaki literatür bilgisinin ışığında göz ardı edildiğinde ise, 30 gün önce uygulanan BTx-A doku MDA ve NOx düzeylerinde İ-R hasarı sonrası anlamlı düşüşler oluşturmaktadır.

7 gün öce BTx-A ile kimyasal denervasyon yapılan grupta tıpkı 7 gün önce cerrahi denervasyon yapılan grupta olduğu gibi İ-R hasarı sonrasında hem dejeneratif histoloji ve apopitoz skorlarında, hem de doku MDA – NOx düzeylerinde anlamlı düşüşler saptanmıştır. Bu değişimler BTx-A uygulamasından sonra oluşan paraliziye bağlı düşen enerji metabolizmasının yanında, glikoz alım hızının[13] ve enerji metabolizma enzimlerinin[17], kas perfüzyon hızının[13], damar çaplarının[19,21,153] süperoksit dismutaz miktarının[17] artması gibi pek çok faktörle ilişkilendirilmiştir. Tüm bu parametreler ve çalışmamızın sonuçları incelendiğinde cerrahiden 7 gün önce yapılacak BTx-A uygulamasının, oluşacak İ-R hasarının düzeyini azaltacağı düşünülmektedir.

Bir gün önce BTx-A ile önkoşullandırma yapmanın İ-R hasarı sonrası görülen dejeneratif histoloji skorlarında, doku MDA ve NOx düzeylerinde anlamlı azalmalar sağladığı ancak İ-R hasarı sonrası kas dokusunda görülebilen apopitoz miktarlarını yeteri oranda azaltmadığı görülmektedir. Literatürde BTx-A'nın etkilerinin 6-36 saat arasında başladığı bildirilmektedir.[12] Çalışmamızda uygulandıktan 24 saat sonra BTx-A'nın vazodilatasyon, artmış perfüzyon hızı ve glikoz alımı gibi İ-R hasarından koruyucu etkilerinin başladığı görülmektedir. Bu bilgiler ışığında kasa yönelik olarak yapılan cerrahi girişimlerden bir gün önce kas içine BTx-A uygulaması kasta oluşacak İ-R hasarının olumsuz etkilerini azaltabilmektedir. Kas fleplerine BTx-A

uygulamanın İ-R hasarının etkilerini azaltmasının yanında flebin stabilizasyonunu da arttıracağı bilinmektedir.[152]

Sonuç olarak muhtemel İ-R hasarından gerek cerrahi, gerekse kimyasal olarak gerçekleştirilen denervasyon işlemi bir gün önce yapılsa bile iskelet kasının iskemiye olan direncini artırmaktadır. Bununla beraber koruyucu etkinin en yüksek olduğu zaman dilimi denervasyondan sonraki birinci hafta gibi görünmektedir. BTx-A ile kimyasal denervasyon, cerrahi denervasyon ile benzer oranlarda İ-R hasarını azaltabilmektedir. BTx-A ile önkoşullandırmanın en önemli avantajları; BTx-A'nın klinikte kolay ulaşılabilir olması ve cerrahi gerektirmeksizin uygulanabilmesidir. Önemli bir dezavantajı ek maliyet getirmesidir. Ancak cerrahi denervasyonun ikinci bir cerrahi gerektirmesi ve tabiî ki bu işlemin de bir maliyeti olacağı unutulmamalıdır.

Denervasyon serbest kas nakillerinin ayrılmaz bir sürecidir. Ayrıca pediküllü kas fleplerinde de transfer öncesi denervasyon yapılabilmektedir. Denervasyonun ilk 24 saat içerisinde vazokonstrüksiyon yaptığı ve vasküler tonusun ancak 48. saatte normale döndüğü Banbury ve arkadaşları tarafından gösterilmiş ve bu hiperadrenerjik durum, denervasyonu takiben damarlarda depolanan vazoaktif aminlerin reaktif olarak salınması ile ilişkilendirilmiştir.[128] Bu hiperadrenerjik cevap serbest kas nakillerinde anastomoz sonrası görülebilen vazospazmların bir sebebi olabilir. Arnold ve arkadaşları 2009 yılında perivasküler BTx-A enjeksiyonunun uygulamanın birinci gününde dahi arter ve ven çaplarını arttırdığını, adrenerjik cevabı azalttığını bildirmiştir.[19,21] Bu iki çalışma bizim sonuçlarımızla birleştirildiğinde, serbest kas nakillerinden bir gün önce kas içine ve - veya pedikülü

çevresine yapılacak BTx-A'nın, kas transferi sonrasında görülebilecek vazospastik komplikasyonları azaltabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak cerrahiden en az bir gün önce yapılacak denervasyon iskelet kasında İ-R hasarının olumsuz etkilerini azaltabilmektedir. Bu gruplar içerisinde kas içine bir gün önce uygulanan BTx-A, yeterli korumayı sağlamanın yanında, kolay elde edilmesi, serbest kas nakillerinde denervasyona bağlı erken dönemde oluşabilecek vazospastik komplikasyonları azaltabilmesi ve ek bir cerrahi girişim gerektirmemesi sebebiyle klinikte uygulanabilir bir yöntemdir.

6. ÖZET

İskemi-Reperfüzyon (İR) hasarının önlenmesi amacıyla birçok ajan deneysel çalışmalarda başarılı sonuçlar alsa da bunların pek azı klinik olarak ulanılmaktadır. Denervasyonun iskelet kasının enerji ihtiyacını azalttığı bilinmektedir. Bu çalışmada cerrahi denervasyon (CD) veya Botulinum Toksin Tip A (BTx-A) ile kimyasal denervasyonla gerçekleştirilen önkoşullandırmanın iskelet kasında İR hasarına etkileri incelenmiştir

Çalışma 42 adet Wistar Albino Sıçanın sağ biseps femoris adalesinde gerçekleştirildi. Kontrol grubunda sadece İR hasarı gerçekleştirilirken, 2-4. gruplarda 30 gün (n=6) , 7 gün (n=6) ve bir gün önce (n=6) cerrahi denervasyon, 5-7. gruplarda ise 30 gün (n=6) , 7 gün (n=6) ve bir gün önce (n=6) BTx-A ile kimyasal denervasyon gerçekleştirildi. Dört saat iskemiyi takiben 4 saat reperfüzyona izin verildi. Reperfüzyonun sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek biseps femoris kasları eksize edilerek dokuda histolojik inceleme, apopitoz yoğunluğu, malonildialdehit (MDA) ve reaktif azot ürünleri (NOx) çalışıldı.

Otuz gün önce cerrahi veya BTx-A ile denervasyon yapılan gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında histoloji ve apopitoz skorlarındaki düşüş anlamlı değilken, doku MDA ve NOx düzeylerindeki düşüş anlamlıydı. Yedi gün önce cerrahi veya BTx-A ile kimyasal denervasyon yapılan gruplarda ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tüm parametrelerde İR hasarının etkilerinin azaldığı görüldü. Bir gün önce cerrahi veya BTx-A ile kimyasal denervasyon yapılan gruplarda kontrol grubuyla kıyaslandığında dejeneratif histoloji ve doku NOx miktarlarında anlamlı

azalma saptanırken, bir gün önce cerrahi denervasyon yapılan grupta doku MDA, bir gün önce BTx-A ile kimyasal denervasyon yapılan grupta ise apopitoz skorlarındaki düşüş anlamlı bulunmadı

Sonuç olarak kas naklinden en az bir gün önce yapmak koşuluyla denervasyon iskelet kasında iskemi direncini arttırır ve reperfüzyon hasarını azaltır. BTx-A ile kimyasal denervasyon, ek bir cerrahi girişim gerektirmemesi ve cerrahi denervasyon ile benzer etkiler oluşturması sebebiyle cerrahi denervasyona tercih edilebilecek bir yöntemdir.

7. ABSTRACT

Many agents were studied for the prevention of Ischemia-Reperfusion (IR) injury but few of them are used in clinical cases. Denervation can reduce the energy consumption of a skeletal muscle and theoretically can increase its ischemia tolerance. In this study the effects of precontioning by surgical or chemical denervation with Botulinum Toxin A (BTx-A) on IR injury of a skeletal muscle was examined.

Biceps femoris muscle of 42 Wistar Albino rats were used in this study. Only IR injury was done in control group. In groups 2-4, surgical denervation was done 30 days (n=6), 7 days (n=6) and 1 day prior to IR injury. In groups 5-7 chemical denervation with BTx-A was applied 30 days (n=6), 7 days (n=6) and 1 day prior to IR injury. For IR injury tourniquet was applied to right extremity of all rats for four hours. Then tourniquet was cut and reperfusion was allowed for 4 hours. Then all the animal were sacrificed and tissue samples were gathered. In these tissues histological examination, apoptosis presence with Caspas 3 stains, tissue malonyldialdehyde (MDA) and nitrit + nitrate levels were studied.

The degenerative histology and apoptosis scores were not significantly decreased in groups that the surgical or chemical denervation was done 30 days prior to surgery. But the decrease was significant in tissue biochemical analysis in both groups. All the histological, apoptotic and biochemical parameters were significantly decreased in groups that surgical or chemical denervation was done 7 days prior to IR injury. Although the degenerative histology and tissue NOx scores were

significantly decreased in groups that surgical or chemical denervation was done 1 day prior to IR injury, decrease in tissue MDA level in one day prior surgical denervation group and apoptosis score level in one day prior chemical denervation groups were not statistically significant.

In conclusion, in a skeletal muscle; surgical or chemical denervation that applied at least one day prior to IR injury can increases the muscle tolerance for ischemia and reduces the effects of reperfusion injury. Chemical denervation with BTx-A can be a better choice for providing similar results without a secondary operation.

8. KAYNAKLAR;

1. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Zins JE. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. Plast Reconstr Surg. 1999 Sep;104(3):730-7.
2. Borisov AB, Huang SK, Carlson BM. Remodeling of the vascular bed and progressive loss of capillaries in denervated skeletal muscle. Anat Rec. 2000 Mar 1;258(3):292-304.
3. Hu SN, Xu JG, Gu YD, Li JF, Ultrastructural changes after denervation of different muscles, Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2002 Jan;16(1):44-7
4. Borisov AB, Carlson BM. Cell death in denervated skeletal muscle is distinct from classical apoptosis. Anat Rec. 2000 Mar 1;258(3):305-18.
5. Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. Anat Rec. 1997 Jul;248(3):355-65
6. Midrio M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review.Eur J Appl Physiol. 2006 Sep;98(1):1-21. Epub 2006 Aug 3. Review.
7. Davis TA, Karl IE. Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in denervated rat muscle. Biochem J. 1988 Sep 15;254(3):667-75.
8. DuBois DC, Max SR. Effect of denervation and reinnervation on oxidation of[6-14C]glucose by rat skeletal muscle homogenates. J Neurochem. 1983 Mar;40(3):727-33.
9. David F. Goldspink The effects of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. Biochem. J. (1976) 156,71-80
10. Shoji S. Effect of denervation on glucose uptake in rat soleus and extensor digitorum longus muscles. Muscle Nerve. 1986 Jan;9(1):69-72.
11. Kirsch GE, Anderson MF. Sodium channel kinetics in normal and denervated rabbit muscle membrane. Muscle Nerve. 1986 Oct;9(8):738-47
12. Matarasso A, Deva AK; American Society of Plastic Surgeons DATA Committee. Botulinum toxin. Plast Reconstr Surg. 2002 Mar;109(3):1191-7. Review.

13. 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.
14. White CM, Greensmith L, Vrbová G. Repeated stimuli for axonal growth causes motoneuron death in adult rats: the effect of botulinum toxin followed by partial denervation. Neuroscience. 2000;95(4):1101-9.
15. 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.
16. Montecucco C, Schiavo G, Rossetto O. The mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. Arch Toxicol Suppl. 1996;18:342-54. Review.
17. Welham NV, Marriott G, Tateya I, Bless DM. Proteomic changes in rat thyroarytenoid muscle induced by botulinum neurotoxin injection. Proteomics. 2008 May;8(9):1933-44.
18. 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
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.

23. Kim TK, Oh EJ, Chung JY, Park JW, Cho BC, Chung HY. The effects of Botulinum toxin A on the survival of a random cutaneous flap. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2009 Jul;62(7):906-13. Epub 2008 Apr 24.
24. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. Cardiovasc Surg. 2002 Dec;10(6):620-30. Review.
25. Belkin, M., Brown, R. D., Wright, J. G. et al. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. Am J Surg, 1988, 156,83–86.
26. Lindsay, T. F.Liauw, S.Romaschin, A. D.Walker, P. M. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. J Vasc Surg, 1990, 12,8–15.
27. Labbe, R., Lindsay, T. and Walker, P. M. The extent and distribution of skeletal muscle necrosis after graded periods of complete ischemia. J Vasc Surg, 1987, 6, 152–157
28. Hayes, G.Liauw, S.Romaschin, A. D.Walker, P. M. Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. Surg Forum, 1988, 39, 306–308
29. Kerrigan CL, Stotland MA: Ischemia reperfusion injury: A review. Microsurgery 14: 165-175, 1993
30. Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, Chiao JJC, Davis JM, Fantini GA: Ischemia-reperfusion injury in myocutaneous flaps: Role of leukocytes and leukotriens. Plast Reconstr Surg 99: 1485-1493, 1997
31. Russel RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG: Reperfusion injury and oxygen free radicals: A review. J Reconstr Microsurg 5: 79-84, 1989
32. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE: Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. Ann Surg 201: 357-359, 1985
33. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE: The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. Ann Surg 198: 87-90, 1983

34. Hammersen, F. The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia on reperfusion. Prog Appl Microcirc, 1989, 13,1–26

35. Harman, J. W. The significance of local vascular phenomena in the production of ischemic necrosis in skeletal muscle. Am J Pathol, 1948, 24, 625–641

36. Petrasek, P. F., Homer-Vanniasinkam, S. and Walker, P. M. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. J Vasc Surg, 1994, 19, 623–631

37. Ames, A. Jr., Wright, R. L. and Kowada, M. Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. Am J Pathol, 1968, 52, 437–453

38. Brooks, B. Pathologic changes in muscle as the result of disturbances of circulation. Arch Surg, 1922, 5, 188–216

39. Menger, M. D., Ru ¨cker, M. and Vollmar, B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". Shock, 1997, 8,26–31

40. Harris, A. G., Steinbauer, M., Leiderer, R. et al. Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia reperfusion injury. Am J Physiol, 1997, 273, H992–6.

41. Hagberg, H. Intracellular pH during ischemia in skeletal muscle: relationship to membrane potential, extracellular pH, tissue lactic acid and ATP. Pflugers Arch, 1985, 404, 342–347.

42. Strock, P. E. and Manjo, G. Microvascular changes in acutely ischemic rat muscle. Surg Gynecol Obstet, 1969, 129, 1213–1224

43. Makitie, J. and Teravainen, H. Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat. Acta Neuropathol, 1977, 37, 101–109.

44. Stotland MA, Kerrigan CL: The role of platelet activating factors in musculocutaneous flap perfusion injury. Plast reconstr Surg 99: 1989-1999, 1997

45. Kirschner RE, Fantini GA: Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia reperfusion injury. J Am Coll Surg 179: 103-117, 1994

46. Pang CY: Ischemia induced reperfusion injury in muscle flaps and major source of free radicals. J Reconstr Microsurg 6: 77-83, 1990

47. Martinez-Mier G, Toledo-Pereyra LH, Ward PA: Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion. J Surg Res 94: 185-194, 2000

48. Serafini FM, Rosemurgy AS: Adhesion molecules: Clinical implications. Surgery 127: 481-483, 2000

49. Türegün M, Güdemez E, Newman P, Zins J, Siemionow M: Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia-reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. Plast Reconstr Surg 104: 1033-1040, 1999

50. De La Ossa JC, Malago M, Gewertz BL: Neutrophil-endothelial cell binding in neutrophil-mediated tissue injury. J Surg Res 53: 103-107, 1992

51. Haimovici, H. Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria: evaluation of a hitherto unreported syndrome with report of two cases. Surgery, 1960, 47,739–744.

52. Blaisdell, F. W., Lim, R. C. Jr. and Amberg, J. R. Pulmonary microembolism. A cause of morbidity and death after major vascular surgery. Arch Surg, 1966, 93, 776–786

53. Stallone, R. J., Blaisdell, F. W., Cafferata, H. T. et al. Analysis of morbidity and mortality from arterial embolectomy. Surgery, 1969, 65, 207–217.

54. Blaisdell, F. W., Steele, M. and Allen, R. E. Management of acute lower extremity arterial ischemia due to embolism and thrombosis. Surgery, 1978, 84, 822–834.

55. Weiser MR, Williams JP, Moore FD Jr, Kobzik L, Ma M, Hechtman HB, Carroll MC. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. J Exp Med. 1996 May 1;183(5):2343-8.

56. Fantini, G. A. Ischmia-Reperfusion Injury of Skeletal Muscle. Cornell Univ Publ, New York, 1994pp 33-156.

57. Eppihimer, M. J. and Granger, D. N. Ischemia/reperfusion induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. Shock, 1997, 8,16–25.

58. Lorensen, E. and Ascer, A. Ischemia and reperfusion injury of skeletal muscle. In Tissue Injury and Organ Function: Ischemia/Reperfusion Injury, ed. T. Kamada. Elsevier, New York 1996

59. Fantone, J. C. Pathogenesis of ischemia-reperfusion injury: an overview. In Clinical Ischemic Syndromes: Mechanism and Consequence of Tissue Injury, ed. G. B. Zelenock. CV Mosby, St. Louis 1990, pp. 137–145.

60. Silver, D., Dhar, A. and Slocum, M. Role of platelet activating factor in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. In Platelet activating Factor and Related Lipit Mediators. 2. Roles in Health and Disease, eds S. N. Nigam, G. Kunkel and S. M. Prescott. Plenum Press, New York 1996, pp. 217–223.

61. Duran, W. N., Silva, M. B. Jr. and Ferrante, R. J. Microcirculation dysfunction in ischemic reperfusion injury. In Reperfusion Injuries and Clinical Capillary Leak Syndrome, ed. B. A. Zikria. Futura Press, New York 1994 Chap 6.

62. Akçal KC, Dalgıc A, Uçar A, Haj KB, Güvenç D. Expression of bcl-2 gene family during resection induced liver regeneration: comparison between hepatectomized and sham group. World J Gastroenterol 2004;10(21):279-283

63. Calhoun RF, Oppat WF, Duffy B, Mohanakumar T. Intercellular adhesion molecule-1/leukocyte function associated antigen-1 blockade inhibits alloantigen specific human T cell effector functions without inducing anergy. Transplantation 1999;68(8):1144-52 Utku Tez referans 37

64. Franzoni F, Quinones-Galvan A, Regoli F, Ferrannini E, Galeta F. A comparative study of the in vitro antioxidant activity of statins. Int J Cardiol. 2003;90(2-3):317-321

65. Welbourne CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. Br J Surg 1991;78(6):651-655

66. Davenport A, Hopton M, Bolton C. Measurement of melondialdehyde as a marker of oxygen free radical production during renal allograft transplantation and the effect on early graft function. Clin Transplant. 1995;9(3):171-175

67. Marnett LJ. Lipit peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mutat Res. 1999 Mar 8;424(1-2):83-95. Review.

68. Filiz Sezen Bircan, Endotoksemi oluşturulan kobayların dalak dokusunda 3-Nitrotirozin oluşmu ve Taurinin antioksidan etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi Biyoloji Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Aralık 2007 Ankara

69. Chen HY, Hung YC, Lee EJ, Chen TY, Chuang IC, Wu TS. The protective efficacy of magnolol in hind limb ischemia-reperfusion injury. Phytomedicine. 2009 Jul 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19577912

70. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. J Orthop Res. 2008 Mar;26(3):351-6.

71. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. Anat Histol Embryol. 2002 Aug;31(4):214-23. Review.

72. Kerrigan CL, Daniel RK: Critical ischemia time and the failing skin flap. Plast Reconstr Surg 69: 986-989, 1982

73. Pang CY: Ischemia induced reperfusion injury in muscle flaps and major source of free radicals. J Reconstr Microsurg 6: 77-83, 1990

74. Lepore DA, Knight KR, Bhattacharya S, Ritz M, Robbins SP, Sieg P, Morrison WA, O'Brien BM: Drug mixture which improves survival of ischemic rabbit epigastric skin flaps. Microsurgery 15: 685-692, 1994

75. Fu K, Izkuibrdo R, Walenga JM, Fareed J: Comperative study on the use of anticoagulants: Heparin and recombinant hirudin in a rabbit traumatic anastomosis model. Thromb Res 78: 421-428, 1995

76. Sun Z, Wang G, Yang X, Yang J, Teng X, Yin G. [Experimental study on effect of natural hirudin on vein congestion of random skin flap in porcine models]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2008 Nov;22(11):1296-300.

77. Schlaudraff KU, Bezzola T, Montandon D, Pepper MS, Pittet B. Mixed arterio-venous insufficiency in random skin flaps in the rat: is the application of medicinal leeches beneficial? J Surg Res. 2008 Nov;150(1):85-91.

78. Rothkopf DM, Chu B, Bern S, May JW: The effect of dextran on microvascular thrombosis is an experimental rabbit model. Plast Reconstr Surg 92: 511-515, 1993

79. Wolfort SF, Angel MF, Kniht KR, Amiss LR, Morgan RF: The beneficial effect of dextran on anastomotic patency and flap survival in a strongly thrombogenic model. J Reconstr Microsurg 8: 375-378, 1992

80. Basile AP, Fiala TG, Yaremshuk MJ, May JW: The antithrombotic effects of ticlopidine and aspirin in a microvascular thrombogenic model. Plast reconstr Surg 92: 1258-1264, 1995

81. Lee C, Kerrigan CL: Ibuprofen treatment of ischemic musculocutaneous flaps. Ann Plast Surg 32: 300-304, 1994

82. Peter FW, Franken RJPM, Wang WZ, Anderson GL, Schuschke DA, O'Shaughnessy MM, Banis JC, Steinau HU, Barker JH: Effective low dose aspirin on thrombus formation at arterial and venous microanastomoses and on the tissue microcirculation. Plast Reconstr Surg 99: 1112-1121,1997

83. Aşkar İ, Bozkurt M: Protective effects of immunosuppressants and steroids against ischemia-reperfusion injury in cremaster muscle flap at microcirculatory level. Microsurgery 22: 361-366, 2002

84. Carroll WR, Esclamado RM: Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery. Head Neck 22: 700-713, 2000

85. Sagi A, Ferder M, Levens D, Strauch B: Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoxide dismutase. Plast Reconstr Surg 77: 639-644, 1986

86. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE: Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. Ann Surg 201: 357-359, 1985

87. Suzuki S, Yoshioka N, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y: Involvement of reactive oxygen species in post-ischaemic flap necrosis and its prevention by antioxidants. Br J Plast Surg 44: 130-134, 1991

88. Cordeiro PG, Mastorakos DP, Hu QY, Kirschner RE: The protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. Plast Reconstr Surg 100: 1227-1233, 1997

89. Khiabani KT, Kerrigan CL: The effects of the nitric oxide donor SIN-1 on ischemia-reperfused cutaneous and myocutaneous flaps. Plast Reconstr Surg 110: 169-176, 2002

90. Knight KR: Review of postoperative pharmacological infusions in ischemic skin flaps. Microsurgery 15: 675-684, 1994

91. Lee HT, Lineaweaver WC: Protection against ischemic-reperfusion injury of skeletal muscle: Role of ischemic preconditioning and adenosine pretreatment J Reconstr Microsurg 12: 383-388, 1992

92. Renaud F, Succo E, Alessi MC, Legre R, Juahan-Vague I: Iloprost and salvage of a free flap. Br J Plast Surg 49: 245-258, 1996

93. Mowlavi A, Ghavami A, Song YH, Neumeister M: Limited use of cyclosporin A in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. Ann Plast Surg 46: 426-430, 2001

94. Kerrigan CL, Stotland MA: Ischemia reperfusion injury: A review. Microsurgery 14: 165-175, 1993

95. Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, Chiao JJC, Davis JM, Fantini GA: Ischemia- reperfusion injury in myocutaneous flaps: Role of leukocytes and leukotriens. Plast Reconstr Surg 99: 1485-1493, 1997

96. O'Sgaughnessy M, Anderson GL, Acland RD, Barker JH: Platelet-derived thromboxane A2 decreases microvascular perfusion after arterial repair. Plast Reconstr Surg 99: 834-841, 1997

97. Cartwright JE, Whitley GS, Johnstone AP: The expression and release of adhesion molecules by human endothelial cell lines and their consequent binding of lymphocytes. Exp Cell Res 217: 329-335, 1995

98. Stotland MA, Kerrigan CL: The role of platelet activating factors in musculocutaneous flap perfusion injury. Plast reconstr Surg 99: 1989-1999, 1997

99. Türegün M, Güdemez E, Newman P, Zins J, Siemionow M: Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. Plast Reconstr Surg 104: 1033-1040, 1999

100. Ayhan S, Tugay C, Norton S, Araneo B, Siemionow M: Dehydroepiandrosterone protects the microcirculation of muscle flaps from ischemia-reperfusion injury by reducing the expression of adhesion molecules. Plast Reconstr Surg 111: 2286-2294, 2003

101. Cordeiro PG, Lee JJ, Mastorakos D, Hu QY, Pinto JT, Santamaria E: Prevention of ischemia-reperfusion injury in a rat skin flap model: The role of mast cells, cromolyn sodium, and histamine receptor blockade. Plast Reconstr Surg 105: 654-659, 2000

102. Çetin C, Köse AA, Aral E, Çolak Ö, Erçel C, Karabağli Y, Özyılmaz M, Alataş Ö, Eker A: Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia- reperfusion injury in epigastric island flaps. Ann Plast Surg 47: 540-546, 2001

103. Adanalı G, Özer K, Siemionow M: Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. Plast Reconstr Surg 109: 1344-1351, 2002

104. Cutrin JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Catafau JR, Poli G: Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. Free Radic Biol Med 33: 1200-1208, 2002

105. Küntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobiling R, Gebhard MM, Germann G: Acute

remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. Microsurgery 22: 221-226, 2002

106. Küntscher MV, Altmann J, Menke H, Gebhard MM, Germann G: Acute remote ischemic preconditioning II: The role of nitric oxide. Mıcrosurgery 22: 227-231, 2002

107. Küntscher MV, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G: Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. Plast Reconstr Surg 109: 2398-2404, 2002

108. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C: Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. Otolaryngol Head Neck Surg 107: 549-552, 1992

109. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J: Studies of controlled reperfusion after ischemia XIV. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. J Thorac Cardiovasc Surg 92: 613-620, 1986

110. Ünal Ş, Özmen S, Demir Y, Yavuzer R, Latifoglu O, Atabay K: The Effect of gradually increased blood flow on ischemia-reperfusion injury. Ann Plast Surg 47: 412-416, 2001

111. Serhan Tuncer, Doktora Tezi Sistemik pirasetam tedavisinin iskemi-reperfüzyon hasarına ve vasküler endothelial büyüme faktörü yanıtına etkilerinin araştırılması T.C Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A. D. Ankara 2005

112. Midrio M. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. Eur J Appl Physiol. 2006 Sep; 98(1):1-21. Epub 2006 Aug 3. Review.

113. Tower S (1935) Atrophy and degeneration in skeletal muscle. Am J Anat 56:1–43

114. Gutmann E (1948) EVect of delay of innervation on recovery of muscle after nerve lesions. J Neurophysiol 11:279–294

115. Gutmann E, Zelená J (1962) Morphological changes in the denervated muscles. In: Gutmann E (ed) The denervated muscle. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, pp 57–102

116. Pellegrino C, Franzini C (1963) An electron microscope study of denervation atrophy in red and white skeletal muscle Wbers.J Cell Biol 17:327–349

117. Hu SN, Xu JG, Gu YD, Li JF. [Ultrastructural changes after denervation of different muscles]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2002 Jan;16(1):44-7.

118. 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

119. Hagerty, R. Bostwick, J.III. Nahai, F. Denervated muscle flaps: mass and thickness changes following denervation. Ann. Plast. Surg. 12(2): 171-176, 1984

120. Salmi, A., Ahovuo, J., Tukiainen, E. Et al. Use of ultrasonography to evaluate muscle thickness and blood flow in free flaps. Microsurgery 16: 601-605, 1995

121. Kotsias BA, Muchnik S (1987) Mechanical and electrical properties of denervated skeletal muscles. Exp Neurol 97:516–528

122. d'Albis A, Goubel F, Couteaux R, Janmot C, Mira J-C (1994) The eVect of denervation on myosin isoform synthesis in rabbit slow-type and fast-type muscles during terminal diVerentiation. Denervation induces diVerentiation into slow-type muscles. Eur J Biochem 223:249–258

123. Lu DX, Huang SK, Carlson BM. Electron microscopic study of long-term denervated rat skeletal muscle. Anat Rec. 1997 Jul;248(3):355-65.

124. DuBois DC, Max SR. Effect of denervation and reinnervation on oxidation of [6-14C] glucose by rat skeletal muscle homogenates. J Neurochem. 1983Mar;40(3):727-33.

125. Kauffman F. C. and Albuquerque E. X. (1970) Effect of ischemia and denervation on metabolism of fast and slow mammalian skeletal muscle. Exp. Neurol. 28, 46-63.

126. Davis TA, Karl IE. Resistance of protein and glucose metabolism to insulin in denervated rat muscle. Biochem J. 1988 Sep 15;254(3):667-75.

127. Hogan, E. L., Dawson, D. M. & Romanul, F. C. A. (1965) Arch. Neurol. 13, 274-282

128. Banbury, J., Siemionow, M., Porvasnik, S. et al. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. Plast. Reconstr. Surg. 104(3): 730-737, 1999

129. 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.

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

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

132. 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.

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

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

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

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

137. 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

138. 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.

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

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

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

142. 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.

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

144. 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.

145. 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.

146. 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.

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

148. 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.

149. 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.

150. 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.

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

152. 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.

153. 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.

154. Stephen S. Arnon; Robert Schechter; Thomas V. Inglesby; et al. JAMA 2001;285(8):1059-1070

155. 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.

156. Billante CR, Zealear DL, Billante M, Reyes JH, Sant'Anna G, Rodriguez R, Stone RE Jr. Comparison of neuromuscular blockade and recovery with botulinum toxins A and F. Muscle Nerve. 2002 Sep;26(3):395-403.

157. 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.

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

159. 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.

160. Sketelj J, Crne-Finderle N, Sket D, Dettbarn WD, Brzin M. Comparison between the effects of botulinum toxin-induced paralysis and denervation on molecular forms of acetylcholinesterase in muscles. J Neurochem. 1993 Aug;61(2):501-8.

161. Lee RC, River LP, Pan FS, Ji L, Wollmann RL. Surfactant-induced sealing of electropermeabilized skeletal muscle membranes in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1992 May 15;89(10):4524-8.

162. Yenidunya MO, Tsukagoshi T, Morioka D, Hosaka Y. An axial-pattern skin flap in the rat. J Reconstr Microsurg. 1998 Aug;14(6):383-6.

163. Akyürek M, Safak T, Manavbaşi I, Keçik A. A rat musculocutaneous flap model: the biceps femoris musculocutaneous flap. Ann Plast Surg. 2000 Sep;45(3):305-12.

164. Coşkunfirat OK, Islamoğlu K, Ozgentaş HE. Posterior thigh perforator-based flap: a new experimental model in rats. Ann Plast Surg. 2002 Mar;48(3):286-91.

165. Mehmet Bayramiçli Biseps Femoris Kas ve Kas-Deri Flebleri sy 241-247 Deneysel Mikrocerrahi, Mayıs 2005

166. Elmali N, Esenkaya I, Karadağ N, Taş F, Elmali N. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2007 Oct;13(4):274-80.

167. Ozturk K, Ozyurt H, Somay A, Karaca C. The effects of nitric oxide donor molsidomine on skeletal muscle damage in a rat hind limb model of ischemia-reperfusion. Eur Surg Res. 2009;42(2):71-7.

168. Pilz J, Meineke I, Gleiter GH: Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography as the 2,4 dinitrophenylhydrazine derivative. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 9(742): 315–325 (2000)

169. Cordis GA, Das DK, Riedel W: High performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipit peroxidation aldehydes by photodiode array detection. J Chromatogr A. 798(1–2): 117–123 (1998).

170. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR: Analyses of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 126: 131–138 (1982).

171. Miranda KM, Espey MG, Wink DA: A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. Nitric Oxide. 5(1): 62-71 (2001).

172. Jones NF: Intraoperative and postoperative monitoring of microsurgical free tissue transfers. Clin Plast Surg 19: 783-797, 1992

173. Novakovic D, Patel RS, Goldstein DP, Gullane PJ. Salvage of failed free flaps used in head and neck reconstruction. Head Neck Oncol. 2009 Aug 21;1(1):33.

174. Manno I, Antonucci F, Caleo M, Bozzi Y. BoNT/E prevents seizure-induced activation of caspase 3 in the rat hippocampus. Neuroreport. 2007 Apr16;18(6):577-80.

175. Chuang YC, Tu CH, Huang CC, Lin HJ, Chiang PH, Yoshimura N, Chancellor MB. Intraprostatic injection of botulinum toxin type-A relieves bladder outlet obstruction in human and induces prostate apoptosis in dogs. BMC Urol. 2006 Apr 18;6:12.

176. Berliocchi L, Fava E, Leist M, Horvat V, Dinsdale D, Read D, Nicotera P. Botulinum neurotoxin C initiates two different programs for neurite degeneration and neuronal apoptosis. J Cell Biol. 2005 Feb 14;168(4):607-18.