T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ

ANABİLİM DALI

GELİŞİGÜZEL KANLANAN DERİ FLEBİNİN SAĞKALIMINA DERİ ALTI TROMBOLİTİK, ANTİKOAGÜLAN VE VAZODİLATATÖR İLAÇ UYGULAMASININ ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. ALİ MÜBİN ARAL

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. SERHAN TUNCER

ANKARA 2011

ÖNSÖZ

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

Tababet sanatının Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Sanatı eğitimimde önemli katkıları olan; destek, sabır ve ilgilerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Osman LATİFOĞLU' na, Sayın Prof. Dr. Cemalettin ÇELEBİ' ye, Sayın Prof. Dr. Kenan ATABAY' a, Sayın Prof. Dr. Seyhan ÇENETOĞLU' na, Sayın Prof. Dr. Reha YAVUZER' e, Sayın Prof. Dr. Sühan AYHAN' a, Sayın Doç. Dr. Selahattin ÖZMEN' e, tezimin hazırlık aşamasında fikirsel katkıları ile yardımcı olan Dr. Başar KAYA' ya, birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi veteriner hekimleri Vet. Hek. Dr. Şeyda DİKER' e, Vet. Hekim Dr. Elif ERGÜVEN KAYA' ya, Vet. Hek. Dr. Elvan ANADOL' a ve tüm çalışanlarına, histolojik değerlendirmeleri yapan Histoloji ve Embriyoloji A.D. öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Çiğdem ELMAS' a ve Araş Gör. Eser Çağlar' a, istatiksel analizleri yapan İstatistik Uzmanı Sayın Salih Ergöçen' e, araştırmanın finansmanında sağladığı destekler için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi' ne ve yardımdan kaçınmayan çalışanlarına;

Araştırma süresince manevi desteğini üzerimden hiç eksik etmeyen Araş. Gör. Ayşe ŞENCAN' a, ve babam, annem ve ablama teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Ali Mübin ARAL

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No
I.	GİRİŞ	1
II.	GENEL BİLGİLER	3
III.	GEREÇ VE YÖNTEM	30
IV.	BULGULAR	44
V.	TARTIŞMA VE SONUÇ	70
VI.	ÖZET	80
VII.	İNGİLİZCE ÖZET	81
VIII.	KAYNAKLAR	82

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Deri flebi uygulamaları rekonstrüktif cerrahide halen en sık tercih edilen ameliyatlardır. Flep, kendi dolaşımına sahip olan, verici bir alandan alıcı başka bir alana aktarılabilen doku parçasıdır **[1]**. Çeşitli nedenlerden dolayı gelişen kısmi veya tam flep kaybı hastanede kalış süresini, ek cerrahi girişimleri ve tedavi masraflarını arttırmaktadır.

Gelişigüzel kanlanan deri flebi uygulamaları sonrası en sık karşılaşılan komplikasyon deri flebi distalinde nekrozdur. Flep nekrozunun önlenilmesinde sıkça kullanılan yöntemlerin başında cerrahi geciktirme işlemi gelmektedir. Cerrahi geciktirme iki seanslı cerrahi girişimi zorunlu kılar. Buna bağlı artmış komplikasyonlar nedeniyle giderek daha az tercih edilmektedir.

Flep nekrozu, dokuların iskemisi sonrasında gelişmektedir. Bunu önlemeye yönelik çalışmalar daha çok kan akımını arttırmaya ve neovaskülarizasyona odaklanmıştır. Flep kaybının önlenmesinde çeşitli ilaçlar kullanılmıştır. Bunlar sempatolitikler, kalsiyum kanal blokörleri, antikoagülanlar, vazodilatör ilaçlar, glukokortikoidler ve serbest oksijen radikal temizleyicileridir.

Nitrogliserin organik nitratların prototipidir. Esas olarak venodilatatör ve antiagregan özelliktedir. Düşük molekül ağırlıklı heparin antikoagülan bir ilaçtır. Yüksek riskli tromboz oluşabilecek durumlarda kullanılmaktadır. Doku plazminojen aktivatörü serin proteaz grubunda bulunan bir enzimdir. Trombüsün çözülmesinde etkili bir ilaçtır.

Bu çalışmanın amacı gelişigüzel kanlanan kaudal bazlı sıçan sırt flebinde deri altına uygulanan trombolitik, antikoagülan ve vazodilatatör ilaçların flep sağkalımına olan etkisini, aynı zamanda flepteki kan akımının uygulanan ilaçla ilişkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Flep Fizyolojisi

2.1.1 Flep Tanımı

Flepler, beslenmesi korunarak, bir bölgeden başka bir bölgeye aktarılabilen doku parçalarıdır **[1]**. Vücuttaki tüm defektlerde kullanılabildikleri için rekonstrüksiyon cerrahisinde oldukça geniş bir uygulama alanına sahiptirler.

Flepler plastik cerrahinin özünü oluşturur. Bir plastik cerrahı plastik cerrah yapan, flepleri başarılı bir şekilde kavrayabilme, tasarlayabilme, uygulama ve takip etme becerisidir. Bir flebi greftten ayıran özellik, flebin canlılığını sağlayan kendisine ait bir kan kaynağı olmasıdır; greft ise kendi damarlanması yeniden oluşana kadar diffüzyon ile beslenir. Bu şekildeki kanlanma özelliği geniş kullanım alanı ve potansiyel anlamına gelir; bu da fleplere, karmaşık defektlere kanlanan örtü sağlanmasında, form ve fonksiyonun yeniden sağlanmasında, neredeyse sınırsız olanak tanır. Bir flebin canlılığı kendi dolaşımına bağlı olduğundan, flebin vasküler fizyolojisinin tamamıyla anlaşılıp düzenlenebilmesi, başarı ile başarısızlık arasındaki farkı yaratır.

Bütün dokularda olduğu gibi fleplerde de kanlanma makrodolaşım ve mikrodolaşım öğelerinden oluşur. Her ikisi de iç ve dış faktörlerden etkilenebilir ve bu etkilenimler perfüzyonu ve dolayısıyla canlılığı dramatik olarak etkileyebilirler. Makrodolaşımın anatomisi bir flebin tanımlanıp tasarlanmasında kullanılır. Flebe ana arteryel giriş ve venöz çıkış, flebin bütünündeki hücresel

metabolizmanın temelini oluşturan besinlerin ve oksijenin taşınması ve karbon-dioksit ve atıkların uzaklaştırılmasına yarayan mikrodolaşım yatağını meydana getirir. Bu değişimin çoğu ve perfüzyon kontrolünün büyük kısmı arteriol, kapiller, venül ve arteriyovenöz anastomozlardan oluşan mikrodolaşım düzeyinde olmaktadır.

2.1.2 Flep Kan Akımının Düzenlenmesi

Derinin kan akımı 100 gram doku için yaklaşık 20 ml'dir, bu oran kas için çok daha fazladır **[2]**. Bu, derinin ve kasın farklı metabolik ihtiyaçlarıyla uyumludur. Kas dokusunun daha fazla oksijen ve enerjiye ihtiyacı vardır. Flep sağkalımı, kan akımı ve metabolik ihtiyaçlar arasındaki kritik dengeye bağlıdır. Flep tasarımı ve oluşturulmasında dokuya özel ihtiyaçları düşünmek flep sağkalımını olumlu etkiler.

Derinin kan akımının düzenlenmesi lokal ve sistemik olmak üzere iki seviyede olmaktadır **[3]**. Sistemik kontrol hem sinirsel hem de hümöral yollarla olmaktadır; bunlardan sinirsel olanı baskındır. Sinirsel düzenleme daha çok vazokonstrüksiyona yol açan sempatik lifler ve α-adrenerjik reseptörler yoluyla olmaktadır, diğer yandan β-adrenerjik reseptörler vazodilatasyona yol açmaktadırlar. Bunlara ek olarak arteriyovenöz anastomozlarda yer alan serotonerjik reseptörler de vazokonstrüksiyona yol açarlar **[3]**. Tüm bunlar birlikte

arteriol ve arteriyovenöz anastomozlar seviyesindeki vasküler düz kas tonusunu ayarlamaya çalışırlar **[3]**.

Hümöral düzenleme, epinefrin ve norepinefrinin α-adrenerjik reseptörler üzerine etkisinde olduğu gibi, sistemik vazoaktif maddelerin özgün reseptörleri üzerine etki etmesiyle gerçekleşir **[3]**. Diğer sistemik vazokonstrüktörler arasında serotonin, tromboksan A2 ve prostaglandin $F_{2\alpha}$ bulunmaktadır. Vazodilatatörler arasında prostaglandin E_1, prostaglandin I_2 (prostasiklin), histamin, bradikinin, lökotrien C_4 ve D_4 yer almaktadır. Kan akımının lokal kontrolü, başka bir deyişle otoregülasyon, vücutta pek çok doku yatağında özellikle de iskelet kası gibi yüksek metabolik ihtiyacı olan dokularda önemlidir. Lokal seviyede deri kan akımını etkileyen metabolik faktörler arasında hiperkapni, hipoksi ve asidoz bulunmaktadır ve bunların tümü vazodilatasyona yol açmaktadır. Bunlara ek olarak bazı fiziksel faktörler de bölgesel kan akımının ayarlanmasında rol oynamaktadır. Artan doku perfüzyon basıncı, arteriyel perfüzyon basıncından bağımsız sabit bir kapiller kan akımı elde edebilmek için vazokonstrüksiyona yol açan bir miyojenik refleksi tetikler. Bölgesel ısı düşüklüğü de doğrudan vasküler düz kas üzerine etkiyerek vazokonstrüksiyona yol açmaktadır, lokal ısı artışının ise tam ters bir etkisi vardır **[3]**.

Reolojik faktörler akım üzerinde etki sahibidirler; ancak bu etkileri belirgin olarak normal olmayan durumlarda ortaya çıkmaktadır. Derin anemi, reolojik özellikleri düzelterek flep kan akımını artırmaktadır; bazı çalışmalar bu artışın distal flep canlılığına katkıda bulunduğunu göstermekteyken **[4]**, diğerleri de

olasılıkla reolojik düzelmenin azalmış oksijen taşınmasıyla baskılanması nedeniyle herhangi bir etkisi olmadığını göstermektedir **[5]**. Polisitemi ve orak hücreli anemi gibi durumlarda reolojik faktörlerin anormal artışı, özellikle flep distalindeki perfüzyon ve canlılığı ciddi bir şekilde etkilemektedir. Marjinal perfüzyon durumlarında ve bölgelerinde reolojik faktörler önemli bir rol oynayabilirler ve düzenlenmeleri gerekebilir.

Bazı farklılıklara rağmen kas flepleri için de aynı prensipler geçerlidir. Kas dokusunda, deriye göre daha fazla kapiller yoğunluk olmasına rağmen arteriyovenöz şantlar yoktur **[3]**. Kas dokusu, metabolik gereksinimi fazla olan diğer dokular gibi, mevcut metabolik gereksinimini karşılamakta gerekli kan akımını sağlamak için otoregülasyon mekanizmalarına oldukça bağımlıdır. Epinefrin derideki etkilerinden farklı olarak "kaç veya dövüş" mekanizmasına uygun olarak kas dokusunda vazodilatasyona neden olur. Kas, deri gibi ısı regülasyonu sağlayan bir organ olmadığından ısının kas dolaşımı üzerine etkileri oldukça kısıtlıdır **[3]**.

Endotel, gerek saldığı vazoaktif maddeler **[6]**, gerekse dolaşmakta olan beyaz küreler ve trombositler üzerine etkileri ile kan akımının ayarlanmasında kritik bir rol oynar. Endotel yaralanmasına cevap olarak oluşan, beyaz küre ve trombositlerdeki değişiklikler, flep dolaşımının etkilenmesinde önemli patofizyolojik rol oynamaktadırlar **[3]**.

Flebin kaldırılması, dokuya kan akımının düzenlenmesindeki hassas dengenin bozulmasına ve bazı ciddi değişikliklere yol açar. Sempatik

innervasyonda ani bir kayıp gelişir, bu da vazokonstrüktör nörotransmitterlerin kendiliğinden salınımına yol açar **[2]**. Flebe giren damarlar fiziksel olarak kesildiğinden, düşen perfüzyon basıncı da olaya katıldığında, flebin uzak kısımları akut iskemiye girer. Gelecek 24 saat içinde bu çevresel dokudaki mikrodolaşımda meydana gelecek değişiklikler, flebin ne kadarının yaşayacağını belirler. Banbury ve arkadaşları kremaster kas flebinin çevresel mikrodolaşımında trifazik, dinamik bir cevap tanımlamışlardır **[7]**. Başlangıçtaki akut adrenerjik safhayı nonadrenerjik safha takip eder ve sonunda artmış kapiller perfüzyonun ve vazoaktif maddelere artmış yanıtın olduğu hassaslaşmış faza geçilir.

Flep kaldırılmasını takip eden hemodinamik, anatomik ve metabolik değişiklikler sonucu belirlerler. Hemodinamik değişiklikler en ayrıntısıyla çalışılmış olan gruptur. Palmer, Nathanson, Kerrigan ve diğerlerinin yaptığı işaretli mikroküreleri kullanan mükemmel çalışmalar mevcuttur **[2, 4-6]**. Bu çalışmalar göstermiştir ki flebin tabanındaki dolaşım, kaldırıldıktan sonra da korunmasına karşın flebin ucundaki dolaşım ilk 6-12 saat içinde çoğunlukla normalin %20'sine kadar düşmektedir. Akım 1-2 hafta içerisinde normalin %75'ine, 3-4 haftada ise normalin %100'üne kadar yükselmektedir.

Flebin iskemik kısmına pedikülden longitudinal olarak dolaşım dönmekte ve aynı zamanda inoskülasyon ve neovaskülarizasyon yoluyla flep yatağından ek bir akım da sağlanmaktadır **[7]** .

Flep kaldırıldıktan sonra meydana gelen olaylar aşağıdaki gibi özetlenebilir. İlk olarak besleyici damarlar ve sempatik sinirler kesilir. İlk 12-18 saat içerisinde,

özellikle flebin distalinde, giren damarların akut kesilmesi, sempatik vazokonstrüktörlerin salınımı ve lökositler tarafından oluşturulan ilerleyici endotel hasarı nedeniyle perfüzyon basıncı düşerek flebe giden akım dramatik olarak azalır. Distal kısım eğer yaşayacaksa, etkilenen dokuya da bağlı olmak üzere ilk 6-12 saatlik zaman diliminde yeterli besin akımı gerçekleşmelidir, aksi takdirde bu doku eninde sonunda ölecektir. 12-24 saat içerisinde sempatik nörotransmitterler tükeneceğinden ve 2-3 gün içerisinde flep yara yatağından inoskülasyon ve yeni damar oluşumuyla besleneceğinden flep dolaşımı aşamalı olarak yeniden düzenlenir. Ancak ilk 6-12 saat içerisinde iskemik kalmış dokularda dolaşımın geri dönmesi reperfüzyon hasarına katkıda bulunmakta, bu da sonunda mikrovasküler kapanmaya ve doku nekrozuna yol açmaktadır **[3]**.

2.1.3 Flep Kaybı

Bazen fleplerin tamamı yaşarken bazı fleplerin distal veya periferindeki doku kaybına yol açan nedir? Cevap çok faktörlü ve anlaşılması zordur. Flebin kompozisyonu, flebe gelen kan akımını ve iskemiye direncini belirlediğinden, kritik bir faktördür. Deri flepleri, kas fleplerine kıyasla çok daha az kan akımına sahip olmalarına rağmen kas fleplerine göre daha az metabolik ihtiyaçları vardır ve iskemiye dirençleri kas fleplerinden çok daha iyidir. Distal deri flebi canlılığını artırmada, sonucu kestirilebilir ve klinik uygulanabilir birkaç yöntemden biri olduğu için, flep canlılığını ilgilendiren pekçok çalışma cerrahi geciktirme üzerine odaklanmıştır. Reinisch **[8]** tarafından yapılan ilk çalışmalar distal flep canlılığını

belirleyen önemli faktörlerden birinin arteriyovenöz şantlar olduğunu ve flep kaldırıldıktan sonra distaldeki arteriyovenöz şantların kapiller yatağa yeterli kan akımını engellediğini göstermekteydi. Geciktirilmiş fleplerde ise bu şantların kapandığı ve bu sayede flep distaline yeterli kan akımının korunduğu düşünülmekteydi. Kerrigan, Sasani ve Pang'ın çalışmalarının da içinde olduğu, takip eden birkaç çalışma ise distal flep canlılığının belirlenmesinde arteriyovenöz şantların ufak bir rolü olduğunu kanıtlamışlardır **[9-11]**. Distal flep nekrozu küçük arterioller seviyesinde vazokonstrüksiyon veya pedikülden uzaklaştıkça düşen perfüzyon basıncı flep kaldırıldıktan sonra sempatektomi, katekolamin salınımı ve bölgesel yanıta bağlı olarak pedikülün proksimalinde kan akımı azalır. Distalde ise bölgesel iskemi vazodilatasyona yol açar yine de proksimaldeki azalmış kan akımı distalde yeterli perfüzyon sağlayamayabilir. Bu yönüyle yetersiz arteriyel kan akımı distal flep nekrozunun sebebidir **[2, 4, 11]**.

Gelişigüzel kanlanan fleplerde; hatalı flep tasarımı, iskemi-reperfüzyon hasarı, mikrodolaşımı etkileyen sistemik faktörler (hipotansiyon, sepsis, sigara içiciliği, vazokonstrüktörler), flebin fiziksel olarak sıkışması (uygunsuz yerleştirme, katlanma, hematom oluşumu) gibi durumlar sonucu oluşan mikrodolaşımdaki düşük akım hızları nedeniyle sekonder olarak tromboz gelişmektedir **[3]**.

Flep kaldırıldıktan sonra özellikle distal iskemik bölgelerde sayısız metabolik değişiklik oluşmaktadır. İskemik doku anaerobik solunuma geçer ve oksijen, glukoz ve ATP seviyelerinde hızlı bir düşüş gelişirken karbondioksit ve

laktoz seviyelerinde artış gerçekleşir. Prostasiklin ve tromboksan seviyeleri anlamlı olarak artar. İskemik alanlarda glukoz ve glikojen yıkımı iskemi oranında artar. Glukoz tüketimi 3. günde artar ve 7. günde normale döner **[12, 13]**.

Anaerobik metabolizmanın artışıyla birlikte toksik süperoksit radikallerinin üretiminde de artış gerçekleşir **[13-16]**. Bu toksik oksijen radikalleri direkt sitotoksik etkiler göstermelerinin yanında lokal akut enflamatuar yanıtı tetiklerler ve lökositlerin bölgeye toplanıp endotele yapışmalarına ve takiben endotel hasarı yapmalarına neden olurlar ve olaylar mikrovasküler dolaşımın kapanmasıyla sonuçlanır.

Reperfüzyon hasarının başka bir mekanizması araşidonik asit ve türevlerini kullanmaktadır. Lipooksijenaz'ın aktivasyonu potent bir kemoatraktan olan lökotrien B_4'ün (LTB_4) oluşumuna yol açar. LTB_4 süperoksit anyonu oluşumunu ve nötrofil degranülasyonunu uyarır. Aktive olan nötrofiller ise kısır döngüye yol açacak şekilde lökotrienlerin oluşumunu artırırlar. Benzer olarak iskemik dokularda siklooksijenaz etkisiyle tromboksan A_2 (TxA_2) sentezi gerçekleşir. TxA_2 potent bir vazokonstrüktördür ve trombosit agregasyonuna yol açar; diğer yandan prostasiklin potent bir vazodilatördür ve trombosit agregasyonunu inhibe eder. Birçok deneysel flep çalışması araşidonik asit metabolizmasının değiştirilmesi üzerine kurulmuştur **[3]**.

2.1.4 Reperfüzyon Hasarı

İskemi sonrasında bir çok organda gelişen bozuklukların iskemi sonrasında gelişen reperfüzyon sonrasında geliştiğine dair kanıtlar vardır. İskemi reperfüzyon hasarı özellikle plastik cerrahi ile alakalıdır. Değişen kan akımı sonrasına geri dönüş olmayan doku hasarı büyük komplikasyonlara neden olmaktadır. Çalışmalar doku hasarının olduğu bölgelerde nötrofillerin yığılmış olduğunu, dolaşımdaki nötrofil sayıları azaltıldığında reperfüzyon hasarının da azaldığını göstermektedir; bu kanıtlar nötrofillerin reperfüzyon hasarındaki önemini göstermektedir. Nötrofillerin hızlı ve ilerleyici olarak damar içinde birikimi reperfüzyon sonrasında gelişen akım yavaşlamasını açıklamaktadır **[17]**.

Nötrofiller başka şekillerde de reperfüzyon hasarına katkıda bulunmaktadırlar. İlk olarak aktive nötrofiller doğrudan endotel hasarına yol açarak damarsal bütünlüğün kaybına, ödem, kanama ve tromboza neden olabilir. Diğer muhtemel mekanizma ise nötrofillerin damar lümeninde birikip damar lümenine yapışmaları sonucu mikrovasküler tıkanıklık oluşturup iskeminin derinleşmesine neden olmalarıdır **[3]** .

Nötrofil endotel tutunmasında integrinler, selektinler, CD18, PAF ve başka birçok molekülün aracılık yaptığı düşünülmektedir. Bu moleküler mekanizmalar ve bunların anlaşılarak reperfüzyon hasarının engellenebilmesine yönelik çalışmalar yürütülmektedir **[18-22]**. Nitrik oksit (NO) endotel ve nötrofiller tarafından sentez edilen ve reperfüzyon hasarını nötrofillerin endotele tutunmasını bozarak engelleyen bir moleküldür **[23-27]**.

2.1.5 Flep Geciktirme ve Flep Canlılığını Artırmak İçin Alınan Önlemler

Flep canlılığını arttırmada en güvenilir ve sıkça uygulanan yöntem cerrahi geciktirmedir. Bu işlem flebin distalde nekroza yol açmayacak kadar iskemiye girmesini sağlamak amacıyla flebin kısmen kaldırılması işlemidir. Bu kısmi iskemi flebin gelecekte bütünüyle kaldırıldığında gerçekleşecek iskemiye hazırlanmasını sağlamaktadır. Geçtiğimiz yarım yüzyılda flep fizyolojisiyle ilgili çoğu çalışma geciktirme işleminin etkilerini ve mekanizmasını ortaya çıkarmaya çalışmıştır. Bu çalışmalar geciktirme işlemi sonrasında flep içerisindeki damarların longitudinal bir yeniden düzenlemeye gittiğini, damar çaplarının arttığını ve subdermal pleksustaki küçük damar sayılarının arttığını göstermekteydi. Yeni damar oluşumunun da cerrahi geciktirme işlemine katkıda bulunduğu düşünülmektedir **[3]**.

Geçtiğimiz yıllarda bazı büyüme faktörlerinin tanımlanması ve özelliklerininin ortaya çıkarılması, flep damarlanmasının ve canlılığının arttırılması konusunda yeni bir potansiyel yöntem sağlamıştır. Bulgular yeni damar oluşumunun pek çok anjiyojenik büyüme faktörünün etkimesiyle olduğunu göstermektedir. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) bu faktörlerin en önemlilerindendir. Yapılan çalışmalar bFGF'nin, iskemik fleplerde yara yatağından yeni damar oluşumunu arttırdığını, pediküllü fleplerde distal dolaşımı arttırdığını ve beslenmesi sınırda olan dokuları nekrozdan koruduğunu göstermişti. Benzer sonuçlar VEGF için de geçerlidir **[28-30]**.

Flep canlılığını arttıracak faktörler arasında en önemlileri; uygun flep seçimi ve tasarımı, flebin uygulanacağı yatağın yeterli debridmanı ve hemostaz uygulanması, flebin dikkatlice kaldırılıp defekte yerleştirilmesi ve ameliyat sonrası yakın klinik takiptir. Hiçbir ilaç, alet, monitör veya manevra flebin kötü planlanması veya kötü bir şekilde kaldırılması nedeniyle oluşabilecek problemleri ortadan kaldırmaz.

Flep canlılığını arttırmak amacıyla cerrahi geciktirme işlemleri, hipotermi, steroidler, dekstran, heparin, sülükler ve aspirin sık kullanılan seçeneklerdir .

2.2 Nitrogliserin

Organik nitratlar nitrik asit vericisi olarak kabul edilirler **[31]**. Nitrogliserin ise nitratların tipik ilacıdır. Nitratlar dokuda nitrik okside (NO) dönüşerek kas hücrelerinde ve trombositlerde guanil siklazı aktive eder. Bu da siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşturarak vasküler gevşeme ve trombositler üzerinde antiagregan etkilerin görülmesini sağlar. Normalde bir çok fizyolojik uyarılara cevap olarak sağlam vasküler epitel nitrik oksit salgılar. Damarların hasarlanmış olduğu durumlarda bile dışarıdan nitrat alımıyla vazodilatasyonun sağlandığına dair hipotezler vardır.

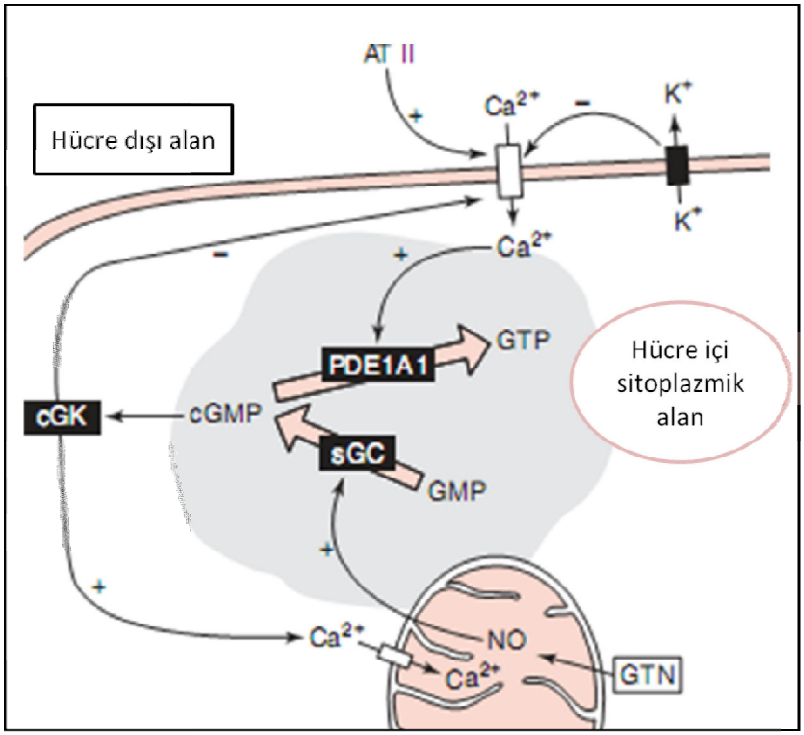
2.2.1 Etki Mekanizması

Nitratların asıl etkisi venöz damarlarda olmak üzere, periferik arteriyollerde, büyük koroner damarlarda ve mikrovasküler yatakta vazodilatasyondur **[32, 33]**.

NO üretilmesi ve endojen salınımının kardiyovasküler sistemin ötesinde önemli fizyolojik rolü vardır **[34]**. Nitratların NO'ya dönüşümü vasküler düz kas hücrelerinin plazma membranında olduğuna yönelik çalışmalar vardır, aynı zamanda bir kısım dönüşüm de hücre dışında olmaktadır **[35, 36] (Şekil 1)**.

Nitratların venöz damarlar üzerindeki etkisi arterler üzerindeki etkisinden daha fazladır ve venlerde hücre içine alınım arterlere göre daha isteklidir **[37]**. Buna rağmen arterlerdeki cGMP oluşum hızı daha fazladır **[38]**.

Nitrogliserin ağızdan alındığı zaman hızlı bir şekilde plazmada geçici yükseklik oluşturur, transdermal nitrogliserin bantları ise devamlı şekilde kan seviyesinde yükseklik sağlamaktadır **[39]**.



Şekil 1: Nitratların etki mekanizması. Gliseril trinitrat NO'ya metabolize edilir. Bu da cGMP sentezini arttırır. cGMP ise kalsiyumun hücre içine girişini engeller ve mitokondriler tarafından alımını kolaylaştırır. Kalsiyum aktive potasyum kanallarının rolü de araştırılmaktadır. Kalsiyum aktive potasyum kanalları hiperpolarizasyonuyla düz kas hücrelerine ve endotele kalsiyum girişini kısıtlanmasına katkıda bulunabilir. Aynı zamanda endotelde süperoksit oluşumu engellenebilir. Anjiotensin 2 (ATII) ise kalsiyumun hücre içine geçişini sağlar ve kalsiyum bağımlı PDE1A1'i indükleyebilir. Bu da azalmış cGMP ve cGK aktivitesine yol açar. Bu da nitratlara bağlı gelişen toleransa ve AT2'ye karşı gelişen artmış duyarlılığı güzel bir şekilde açıklar. PDE1A1 fosfodiesteraz 1A1'i; cGMP siklik guanozin monofosfat'ı; ATII anjiyotensin 2'yi; GTN gliseril trinitratı; NO nitrik oksit'i gösterir (Gori T, Parker JD: Nitrat toleransı: Birleştirici Hipotez. Circulation 2002; 106:2510).

Nitratlar daha çok kardiyolojide kullanılmaktadır. Kalbin önündeki yükü azaltması, kalbin artyükünü anlamlı bir şekilde azaltması ve epikardiyal yerleşimli koroner arterleri genişletmesi en önemli etkilerindendir. Anjina ve akut miyokard enfaktüsünde trombosit kümeleşmesindeki inhibitör etkileri de gösterilmiştir **[39]**.

Nitratların kullanılma endikasyonları arasında akut efor anjinası, anjina profilaksisi, kararsız anjina, akut miyokard enfaktüsü ve konjestif kalp yetmezliği yer almaktadır.

Nitratlara karşı tolerans gelişmesi bir çok doktor tarafından çok tartışılmasına rağmen kabul edilmiştir. Tolerans gelişimi konusundaki mekanizmalar tam olarak çözülememiştir.

Tolerans gelişimine yönelik bir takım hipotezler vardır. Bu hipotezlerin hiçbiri tam anlamıyla kabul görmemesine rağmen çoğunun katkı mekanizmaları bulunmaktadır. İn vitro olarak damarlardaki tolerans gelişimi nitratların farmakolojik olarak aktif nitrik okside dönüşümün azalmasıyla beraber olur **[40]**.

Toleransın önlenmesinde kısa süreli nitratların günde iki sefer uygulanmasının en etkin ve güvenilir metod olduğu düşünülmektedir **[40-44]**. Nitrogliserin yama uygulamasına günde 12 – 14 saat kullanım sonrasında 10 – 24 saat ara verilmesi önerilmektedir.

Nitratların en sık görülen yan etkisi baş ağrısıdır. Zamanla baş ağrıları azalabilir, bu da adaptasyon veya toleransı gösterir. Hipotansiyon hastaların

yaklaşık %10'unda görülür, infüzyonu azaltarak veya keserek geri döndürülebilir **[39]**.

Nitroderm TTS 5® deriye uygulandıktan sonra salınma zarından sürekli olarak nitrogliserin salınacak şekilde hazırlanmış çok katlı düz bir sistemdir. Deri geçirgenliğinin yüksek olduğu durumlarda salınımı sınırlandırır. Deriye nüfuz ettikten sona nisbeten sabit konsantrasyonlarda sistemik dolaşıma geçer. Ürünün adında kullanılan rakam ise sistemden 24 saat içerisinde salıverilen nitrogliserinin miktarını gösterir (5 mg/gün).

Nitrogliserin ile flep sağkalımına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Aksiyel bazlı fleplerde uygulanılan nitrogliserin pomadın postoperatif uygulanması sonrasında nekroz alanlarının azaldığı gösterilmiştir **[45]**. Klinik vakalarda da venöz konjesyonu olan fleplerin yaşayabilirliğinin arttığı gösterilmiştir **[46]**. Ancak tek doz uygulanan nitrogliserinin uygulamasının nekrozun önlenmesinde faydalı olmadığı belirtilmiştir **[47]**. İskemik venöz akımlı tavşan kulağında da nitroderm yama kullanımının flep sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir **[48]**.

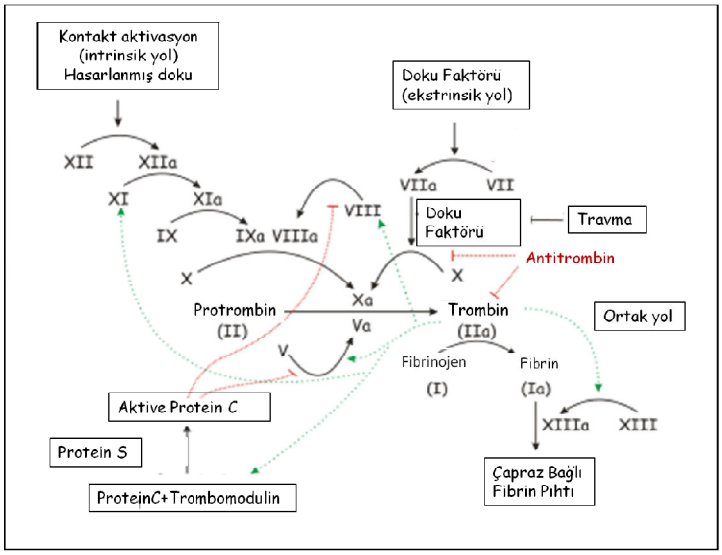
2.3 Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin

Düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) tromboz oluşturma riski yüksek olan durumlarda kullanılabilen antikoagülan bir ilaçtır **[49]**.

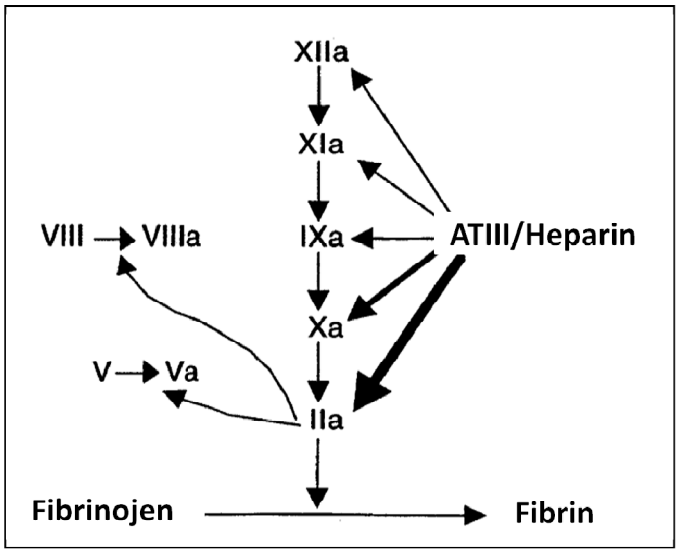
Heparin pıhtı oluştuğu zaman pıhtılaşmayı engelleyen doğal bir polisakkarittir. Heparin yapısında değişik boyutlarda moleküler ağırlıktaki zincirlerden oluşur. Bunlar 5000 ve 40000 Dalton arasında değişmektedir. Neredeyse tüm heparin preparatları domuz bağırsak ve akciğer mukozasından elde edilir. Yüksek ve düşük molekül ağırlıktaki kısımların antitrombin (AT) için farklı afiniteleri vardır.

DMAH sadece kısa zincirli polisakkaritlerden oluşur. Bunların molekül ağırlıkları ortalama olarak 8000 Daltondan daha azdır. DMAH çeşitli depolimerizasyon ve bölünme işlemlerinden sonra elde edilir.

Heparin ve DMAH antikoagülan aktivitelerini antitrombin aktivasyonuyla gösterirler. Antitrombin-Heparin birleşmesiyle bir takım pıhtılaşma faktörleri inaktif hale geçer **(Şekil 2-3).**



Şekil 2: Koagülasyon şeması (URL: http//www.thefullwiki.org/coagulation).



Şekil 3: Heparin-Antitrombin birleşkesinin inhibe ettiği pıhtılaşma faktörleri. En çok Faktör 2a (trombin) ve Faktör 10a etkilenir **(**Hirsh J, et al., Chest, 2001; 119;64S-94S).

DMAH'nın klinikte daha çok tercih edilmesinin 3 temel sebebi vardır:

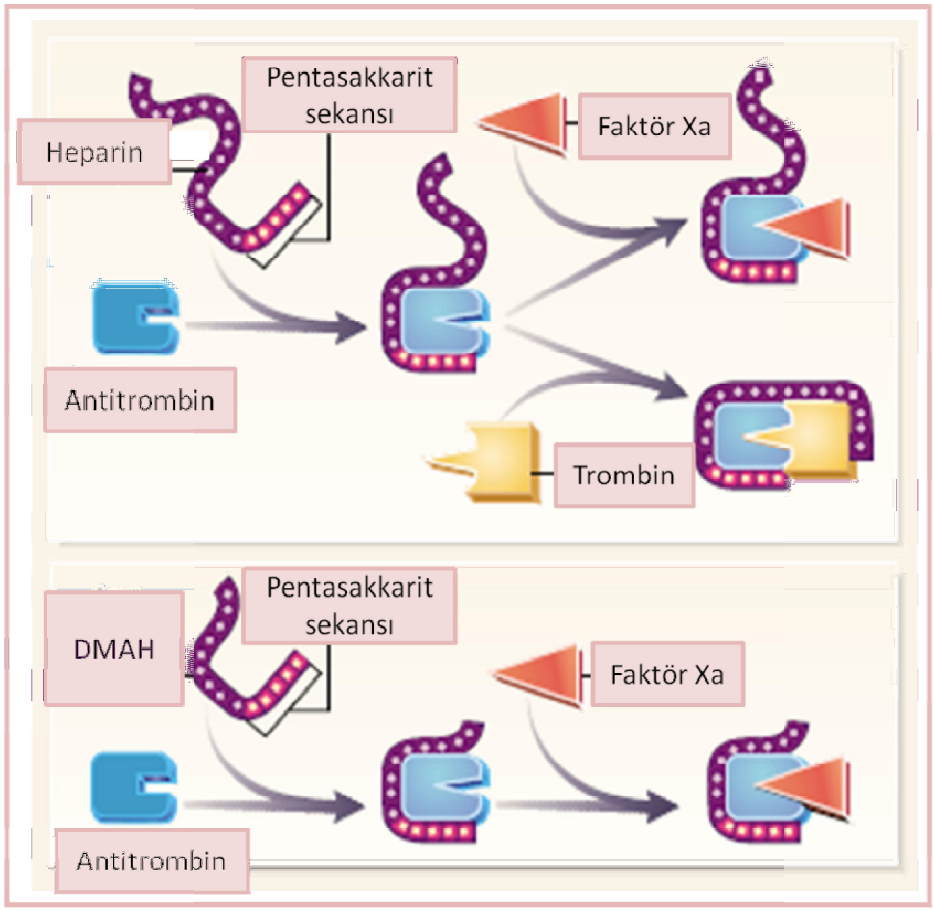
1. Antifaktör 10a aktivitesine göre kısmen azalmış anti-faktör 2a aktivitesi **[50, 51]**.
2. Deneysel hayvanlarda gösterilmiş daha uygun yarar-zarar oranı **[52-57]**.
3. Daha üstün farmakokinetik özellik **[58, 59]**.

DMAH'nın moleküler ağırlığından dolayı AT3'e bağlama etkisi düşük olmakla beraber faktör 10a'yı bağlama özelliği iyidir ve antikoagülan etkisinin çoğu bundan kaynaklanır. AT3'e bağlanması az olduğu için de APTT'de değişiklik gözlenmez. DMAH'in yarılanma süresi 3-4 saat arasındadır. Subkutan yolla, laboratuar parametreleriyle değerlendirilmeden, günde bir veya iki kez kullanılabilir **[49] (Şekil 5)**.

Klinik uygulamalara bakıldığında tromboembolizme karşı profilakside kullanıma yönelik yayınlar bulunmaktadır. Genel cerrahide genel anestezi öncesi venöz tromboemboliyi azalttığı ve pulmoner emboliyi %70 azalttığı gösterilmiştir **[60]**. Alt ekstremitenin ortopedik cerrahisinde derin ven trombozu (DVT) %50-70 olarak görülmektedir. Akut spinal kord yaralanmasında DVT yaklaşık %40 hastada gelişmektedir. Çoklu travmada DVT %50 olarak izlendiği gösterilmiştir **[61]**. Femoropopliteal bypass greftlerinde de açıklığın sağlanmasında etkili olduğu görülmüştür **[62]**.

Tromboz tedavisinde uygulamalar görülmektedir. Venöz trombozda yapılan meta-analiz çalışmalarında düşük molekül ağırlıklı heparinin trombüs büyümesini heparine kıyasla daha fazla önlediği gösterilmiştir **[63-65]**. Kararsız anjina tedavisinde de DMAH'nın heparin kadar etkili olduğu gösterilmiştir **[66, 67]**. İskemik inme tedavisinde de DMAH plasebo ile kıyaslanmış. Çalışmanın sonunda DMAH verilen grupta daha iyi sonuçlar alındığı görülmüştür **[68]**.

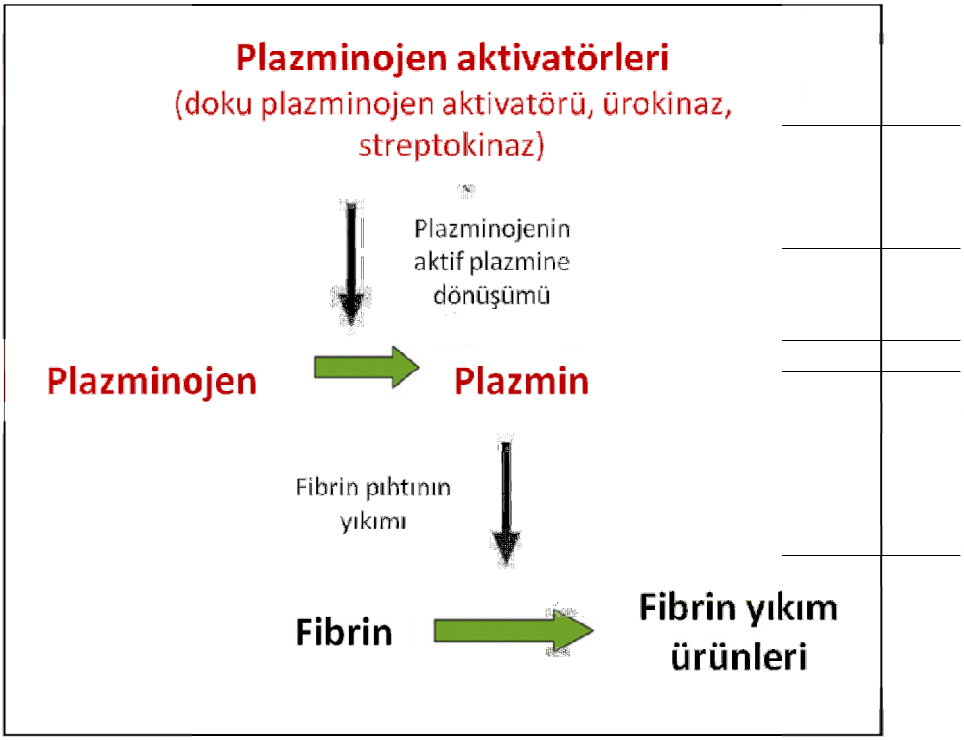
Plastik cerrahi literatüründe daha çok mikrocerrahi sonrası akım devamlılığının sağlanmasında kullanımına yöneliktir. Konjeste tavşan kulak modelinde DMAH'nın flep sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir **[69]**. Deneysel tromboz modelinde DMAH'nın heparin kadar trombozu önlediği gösterilmiştir **[70]**.



Şekil 4: Antitrombinin (AT)'in DMAH ve heparin ilişkisi. Bu moleküllerin AT ile ilişkisi sonrasında Faktör 10a ile etkileşim artmaktadır. Trombinin AT aracılığıyla inaktivasyonu üçlü heparin-antitrombin-trombin birleşimiyle olmaktadır. Bu da ancak 18 sakkarit ünite uzunluğundaki zincirlerle olur. Bu da DMAH'nın neden trombine karşı inhibitör etkilerinin az olduğunu açıklamaktadır (Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. N Engl J Med. 1997 Sep 4;337 (10) :688-98).

2.4 Doku Plazminojen Aktivatörü (tPA)

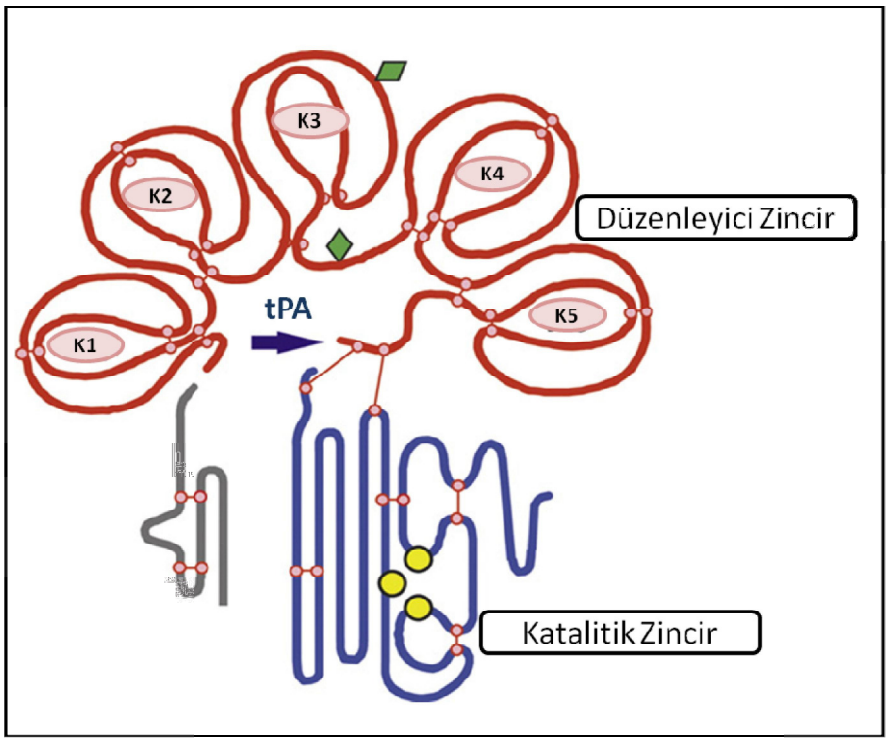
Doku plazminojen aktivatörü (tPA) kan pıhtısının yıkımında görevli bir proteindir. Kan damarlarındaki endotel hücrelerinde bulunan serin proteazdır. Bunu dolaşımdaki fibrine bağlı plazminojeni aktif plazmin haline dönüştürerek yapar **[71, 72]**. Bunu plazminojendeki tek zinciri iki zincir haline ayırarak gerçekleştirir. Bu iki zincir disülfit bağıyla bağlıdır **(Şekil 5)**.



Şekil 5: Fibrinolitik sistemin şematik görünümü (Novokhatny V, Structure and activity of plasmin and other direct thrombolytic agents. Thromb Res 2008; 122,S3-S8).

Bir çok basamaktan oluşan koagülasyon sistemine benzemeyen fibrinolitik sistem düzenleme konusunda daha basittir. Trombolizi kontrol eden iki tane protein vardır: plazminojen aktivatör inhibitörü tip 1 (PAI-1) ve α_2-antiplazmin. PAI-1 tPA'yı inhibe ederken α_2-antiplazmin plazmini inhibe eder. Trombolitik tedavide tPA PAI-1'i yenmek üzere fazla miktarda verilir. Plazmin zaten kanda fazla miktarda olan α_2-antiplazmin tarafından inhibe edilir. Bu nedenle sistemik olarak verilen plazmin α_2-antiplazmin tarafından nötralize edildiği için etkisizdir **[73]**.

Plazminojen/plazmin molekülü oldukça karmaşık bir yapıdadır. Plazminojen 791 amino asit içeren bir proteindir. Plazminojenin plazmine dönşümü Arg^{561}-Val^{562} peptit bağının yıkımıyla olur. Kalan yapı iki zincirli disülfit bağlı serin proteazdır. Beş tane yuvarlaktan oluşan alanın her birimde yaklaşık 80 amino asit bulunur. Bu alanın bir çok özelliği bulunur. Aktivasyon inhibitörleri, aktivasyon uyaranları gibi. Fizyolojik substratı fibrindir ve birincil inhibitörü α_2- antiplazmin'dir. Hafif zincir halkada ise tripsine benzeyen serin proteaz bulunur, klasik katalitik triadı içerir **[74] (Şekil 6)**.



Şekil 6: Plazmin/Plazminojen yapısı. Mavi ile gösterilen kısım hafif zincir, sarı renk katalitik zinciri oluşturur. Ağır halka ise kırmızı renktedir. Gri ile gösterilen kısım plazmini oluşturmak üzere ayrılır (Novokhatny V, Structure and activity of plasmin and other direct thrombolytic agents. Thromb Res 2008; 122,S3-S8).

Sıkça kullanılan 3 çeşit trombolitik ajan bulunmaktadır: alteplaz (rekombinant tPA), reteplaz (r-PA) ve teneteplaz (TNK). Streptokoklar tarafından üretilen streptokinaz ve ürokinaz daha önce bir çok çalışmada kullanılmıştır **[71, 75]**. Etkili bir ajan olmasına rağmen antijenik özelliklerinden dolayı streptokinaz kullanımı tavsiye edilmemektedir **[72]**.

Bu ilaçların metabolizmalarına bakıldığında yarılanma ömürleri yaklaşık olarak 4,5-50 dakika arasında değişmektedir. Karaciğerde ve böbrekte metabolize edilmektedirler **[76]**.

Trombolitik tedavi ST yükselmesi olan miyokardiyal enfaktüste, venöz tromboembolik hastalıkta, iskemik inmede ve periferik arter hastalığında kullanılmaktadır. Trombolitik tedavinin derin ven trombozunda ve pulmoner embolisinde de küçük ama kritik rol vardır **[39]**.

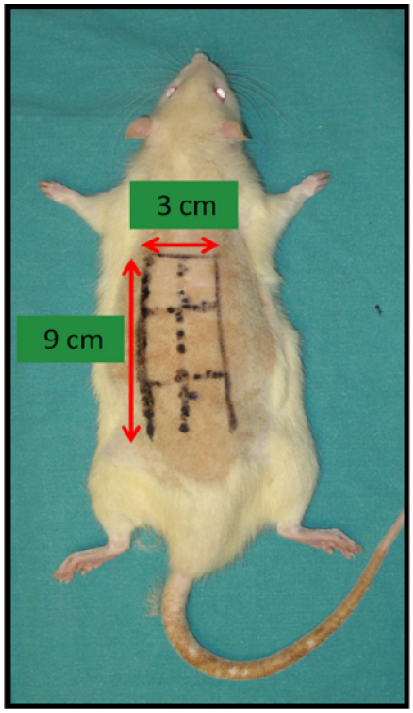
Doku plazminojen aktivatörü ile ilgili klinik çalışmalar mikrocerrahi sonrasında trombolitik özelliği göstermeye yönelik yapılmıştır. İntraarteriyel kateterizasyonla verilen tPA'nın venöz trombüsü önleyebileceği gösterilmiştir **[77]**. Femorodistal bypass sonrasında gelişen trombüsün de sistemik trombolitik tedavi ile giderildiği gösterilmiştir **[78]**. Subkutan yapılan tPA uygulamasının venöz konjesyonu giderebildiğine yönelik çalışmalar mevcuttur **[79]**. Kremaster kasında yapılan bir deneysel çalışmada kasa yönelik trombolitik modelde kas perfüzyonu sağlanmasındaki rolü gösterilmiştir **[80]**.

2.5 Sıçan Sırt Bölgesi Yarımada Flebinin Anatomisi

Sıçan sırtında hazırlanan flep modeli ilk olarak 1965 yılında Robert McFarlane ve arkadaşları tarafından hazırlanmıştır. Bu model geciktirme fenomenini araştırmak üzere geliştirilmiş ve gelişigüzel dolaşım özelliğine sahip olduğu kabul edilmiştir. Bu modelin çok tercih edilmesinin nedenlerinden biri de kolay hazırlanmasıdır. Bu flep modelinde yaşayan ve yaşamayan flep bölgelerinin yanında dolaşımın sınırda olduğu bölgeler de olduğu için dolaşım değişikliklerinin sonuca etkisini gözlemek mümkün olabilmektedir. Zaman içindeki değişikliklere karşın bu model "McFarlane" adıyla anılmaktadır **[81]**.

McFarlane ve arkadaşlarının tanımında flebin tasarlanmasında sabit anatomik noktalar mevcuttu. Her iki skapula ve posterior iliyak çıkıntılar işaretlenerek flep bu noktalar arasında planlanmıştı. Bu durumda flebin büyüklüğü hayvan büyüklüğüne göre değişiklik gösterebilmekte ve nekroz alanları değişebilmekteydi. Adamson ve arkadaşları bu flebi kaudal pediküllü olarak 1:3 en boy oranıyla tasarladılar. Daha sonrasında 2x7cm ve 5x10cm arasında değişen boyutlarda flepler kullanıldı **[81]**.

Sırt flebi kaldırıldıktan sonra yine aynı yere dikilir ve araştırma protokolü çerçevesinde izlenir. Sırt flebini korumak karın flebine göre daha kolaydır **[81]**.



Şekil 6: Kaudal bazlı tasarlanmış McFarlane flebi. Bu çalışmada en-boy oranı 1:3 olacak şekilde tasarlanmıştır.

Clexane ve tPA flep sağkalımını arttırmak için sistemik kullanılan ilaçlardır. Sistemik uygulanan bu ilaçların hematom, hemoraji gibi birtakım komplikasyonları bulunmaktadır. Sistemik olarak verilen ilaçların metabolize edilmeleri sonucunda flebe ulaşan miktarı sınırlı olabilir.

Topikal nitrogliserin uygulamasının flep sağkalımının arttırdığı gösterilmiştir **[45]**. Nitroderm TTS devamlı ilaç salınımı yapmaktadır. Devamlı uygulama flepte artmış kanlanma ile flep sağkalımını arttırabilir.

Bu çalışmanın amacı gelişigüzel kanlanan kaudal bazlı sıçan sırt flebinde deri altına uygulanan trombolitik, antikoagülan ve vazodilatör ilaçların flep sağkalımına olan etkisininin karşılaştırılması, aynı zamanda flepteki kan akımının uygulanan ilaçla ilişkisini saptamaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının etik kurallara uygunluğu, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı tarafından, G.Ü.ET-09.054 sayılı karar ile onaylanmıştır.

Çalışma Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 300-350 gr arasında değişen, 4 çalışma grubuna ayrılan 24 adet Wistar Albino tipi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar çalışma süresince uygun kafeslerde, 22 ± 2^0 C ısıda ve 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngüsünün sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve suyu verilerek düzenli olarak karşılandı.

Tüm cerrahi işlemler % 10'luk ketamin HCL (50mg/kg-Alfamine® - IM) ve ksilazin HCL (2,5mg/kg- Rompun® - IM) anestezisi altında, kornea refleksi ve ekstremite çekme yanıtı kaybolduktan sonra sırt bölgesindeki tüyleri elektrikli traş makinesi ile traş edilerek temizlendi. İşlemler aynı cerrah tarafından steril şartlarda gerçekleştirildi. Cerrahi işlem sonrası hayvanlar tek tek kafeslere konuldu. Deneklerin ağrılarını azaltmak amacıyla lüzum halinde fluniksin (1 mg/kg - Fluvil®-IM) enjeksiyonu uygulandı. Deneklerde cerrahi denek kaybı durumunda yeni denekler eklenerek grupların sayısal eşitliği sağlandı.

3.1 Çalışma Grupları

Her Grup İçin Standart Uygulamalar

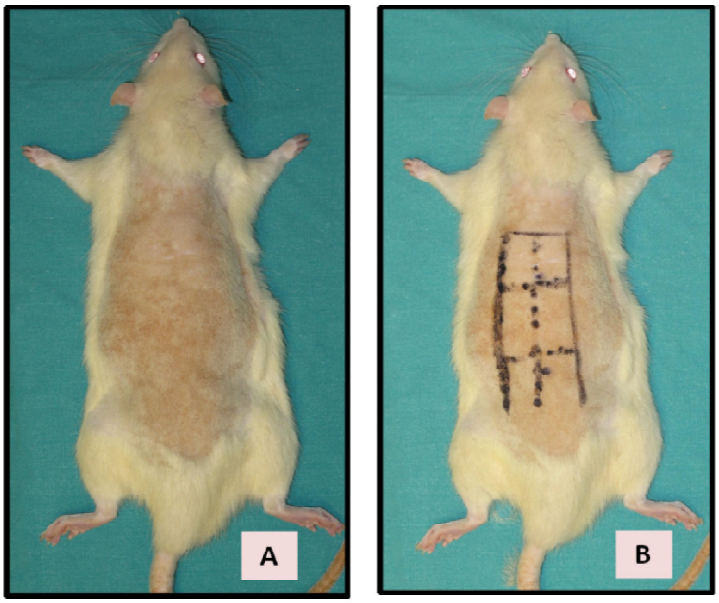
Deneklere; %10'luk ketamin HCL (50mg/kg- Alfamine® - IM) ve ksilazin HCL (2,5mg/kg- Rompun® - IM) ile anestezi uygulandı. Sırt bölgesi traş edildikten sonra yüzüstü pozisyonlarda tespit yapıldı **(Şekil 7-A)**. Cerrahi alan %10'luk povidon iyot solüsyonu ile dezenfekte edildi ve steril olarak örtüldü. Flep 3x9 cm kaudal bazlı olacak şekilde sırtta tasarlandı, orta hattından 2 eşit parçaya ve uzun eksende eşit 3 noktadan işaretlendikten sonra toplam 6 parçaya ayrıldı **(Şekil 7-B)**.

Grup 1 (Sham)

Grup 2 (Düşük molekül ağırlıklı heparin - Clexane ® enjeksiyonu)

Grup 3 (Transdermal nitrogliserin yama - Nitroderm ®)

Grup 4 (Doku plazminojen aktivatörü - Actilyse ® enjeksiyonu)



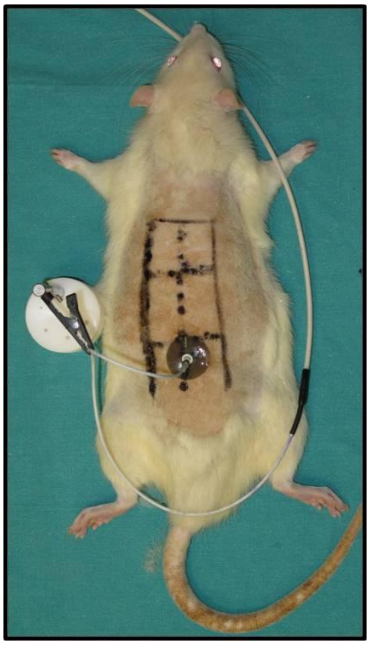
Şekil 7: A. Denek anestezi aldıktan sonra, **B.** Flep çizildikten sonra 6 parçaya ayrılmış hali.

Grup 1 (Sham)

0. Gün: Sırt bölgesinde tarif edildiği şekilde, 3x9 cm boyutlarında çizimini takiben flep iki parça olacak şekilde distal yarısı ve proksimal yarısı orta hatları işaretlendi, lazer doppler akımölçer ile kan akım miktarı ölçüldü **(Şekil 8)**. Flep, kranialden kaudale doğru, sırt kasları fasyası üzerinden pannikulus karnozus da dahil edilecek şekilde kaldırıldı **(Şekil 9)**. Daha sonra flep 3/0 Polypropilen dikiş ile yerine tespit edildi. Aynı noktalardan kan akım miktarı tekrar ölçüldü.

3. Gün: Lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısından kan akımı ölçümleri tekrarlandı. Daha sonra bu noktalardan histolojik değerlendirme için 2 adet biyopsi alındı **(Şekil 10)**. Biyopsi alanları 3/0 Polypropilen dikiş ile dikildi.

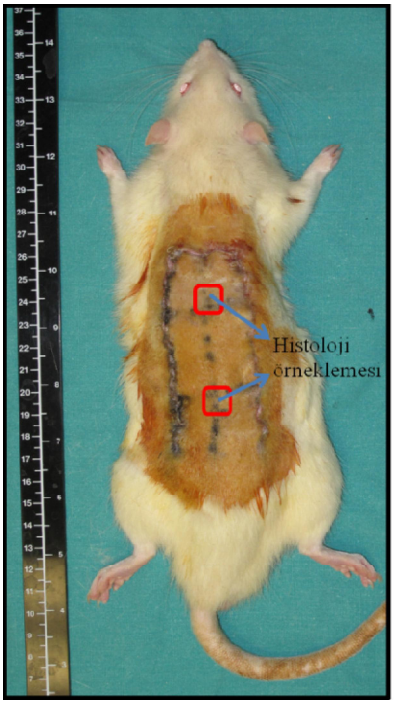
7. Gün: Lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısından kan akımı tekrar ölçüldü. Deneklerin yanına bir adet metrik cetvel konulduktan sonra dijital fotoğraf makinesi ile sırt flebinin fotoğrafı çekildi. Flepten 3. günde alınan proksimal ve distal biyopsi noktalarının yan taraflarından, orta hattan, 2 adet daha biyopsi alındı **(Şekil 10)**. Denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.



Şekil 8: Flebin proksimal yarısından lazer doppler akımölçer ile kan akımının ölçümü



Şekil 9 : Flebin kaudal bazlı olarak kaldırıldıktan sonraki görüntüsü



Şekil 10: Flebin proksimal ve distal yarımlarının orta hattından histolojik örnekleme

Grup 2 (Clexane®)

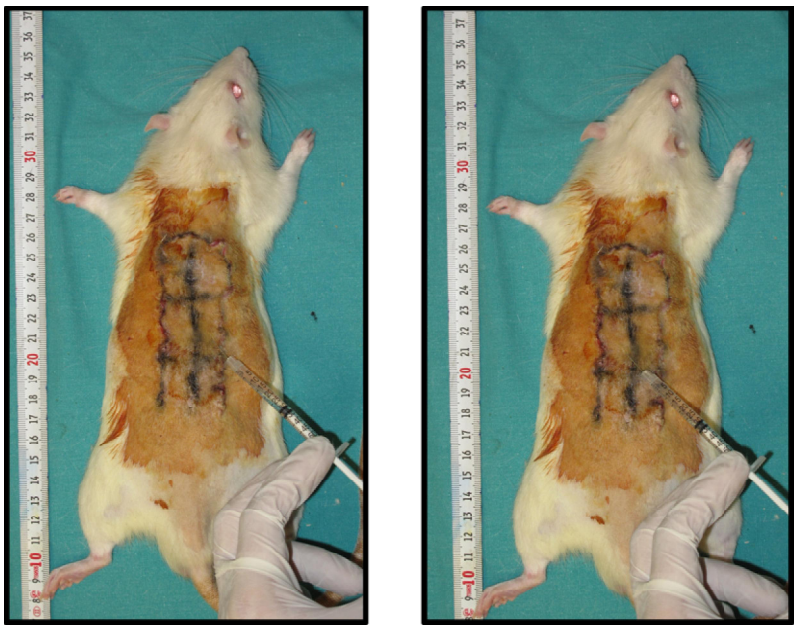
0. Gün:. Sırt bölgesinde tarif edildiği şekilde, 3x9 cm boyutlarında çizimini takiben flep iki parça olacak şekilde distal yarısı ve proksimal yarısı orta hatları işaretlendi, lazer doppler akımölçer ile kan akım miktarı ölçüldü. Flep, kranialden kaudale doğru, sırt kasları fasyası üzerinden pannikulus karnozus da dahil edilecek şekilde kaldırıldı. Daha sonra flep yerine 3/0 Polypropilen dikiş ile tesbit edildi. Proksimal ve distal yarısından kan akım miktarı tekrar ölçüldü. Flebe 6 noktadan toplam 320 IU/kg derialtı Clexane® enjeksiyonu yapıldı **(Şekil 11)**.

1. Gün: Sıçan anestezi aldıktan sonra flebe 6 noktadan 320IU/kg derialtı Clexane® enjeksiyonu tekrarlandı.

2. Gün: Sıçan anestezi aldıktan sonra flebe 6 noktadan 320IU/kg derialtı Clexane® enjeksiyonu tekrarlandı.

3. Gün: Lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısından kan akımı ölçüldü. Daha sonra proksimal ve distalde orta hatlardan histolojik değerlendirme için 2 adet biyopsi alındı. Biyopsi alanları 3/0 Polypropilen ile dikildi.

7. Gün: Lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısından kan akımı ölçüldü. Deneklerin yanına bir adet metrik cetvel konulduktan sonra dijital fotoğraf makinesi ile sırt flebinin fotoğrafı çekildi. Flepten 3. günde alınan proksimal ve distal biyopsi noktalarının yan taraflarından, orta hattan, 2 adet daha biyopsi alındı. Denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.



Şekil 11 : Flebe derialtı Clexane enjeksiyonu

Grup 3 (Nitroderm®)

0. Gün: Sırt bölgesinde tarif edildiği şekilde, 3x9 cm boyutlarında çizimini takiben flep iki parça olacak şekilde distal yarısı ve proksimal yarısı orta hatları işaretlendi, lazer doppler akımölçer ile kan akım miktarı ölçüldü. Flep, kranialden kaudale doğru, sırt kasları fasyası üzerinden pannikulus karnozus da dahil edilecek şekilde kaldırıldı. Daha sonra flep yerine 3/0 Polypropilen dikiş ile tesbit edildi. Proksimal ve distal yarısından kan akım miktarı tekrar ölçüldü. Flebin distal kısmına gelecek şekilde bir adet Nitroderm TTS 5® yapıştırıldı **(Şekil 12)**. 4/0 Polypropilen ile dört noktadan dikiş konularak sabitlendi.

1. Gün: Sıçana anestezi uygulandıktan sonra bir gün önce yerleştirilen Nitroderm alınarak yerine, aynı bölgeye yeni bir Nitroderm TTS 5® yapıştırıldı.

2. Gün: Sıçana anestezi uygulandıktan sonra bir gün önce yerleştirilen Nitroderm alınarak yerine, aynı bölgeye yeni bir Nitroderm TTS 5® yapıştırıldı.

3. Gün: Lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısından kan akımı ölçüldü. Daha sonra proksimal ve distalde orta hatlardan histolojik değerlendirme için 2 adet biyopsi alındı. Biyopsi alanları 3/0 Polypropilen ile dikildi.

7. Gün: Lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısından kan akımı ölçüldü. Deneklerin yanına bir adet metrik cetvel konulduktan sonra dijital fotoğraf makinesi ile sırt flebinin fotoğrafı çekildi. Flepten 3. günde alınan proksimal ve distal biyopsi noktalarının yan taraflarından, orta hattan, 2 adet daha biyopsi alındı. Denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.



Şekil 12: Flebe Nitroderm uygulaması

Grup 4 (Actilyse®)

0.Gün: Sırt bölgesinde tarif edildiği şekilde, 3x9 cm boyutlarında çizimini takiben flep iki parça olacak şekilde distal yarısı ve proksimal yarısı orta hatları işaretlendi, lazer doppler akımölçer ile kan akım miktarı ölçüldü. Flep, kranialden kaudale doğru, sırt kasları fasyası üzerinden pannikulus karnozus da dahil edilecek şekilde kaldırıldı. Daha sonra flep yerine 3/0 Polypropilen dikiş ile tesbit edildi. Proksimal ve distal yarısından kan akım miktarı tekrar ölçüldü. Flebe 6 noktadan toplam 1 mg/kg derialtı Actilyse® enjeksiyonu yapıldı.

1. Gün: Sıçan anestezi aldıktan sonra flebe 6 noktadan 1 mg/kg derialtı Actilyse® enjeksiyonu tekrarlandı.

2. Gün: Sıçan anestezi aldıktan sonra flebe 6 noktadan 1 mg/kg derialtı Actilyse® enjeksiyonu tekrarlandı.

3. Gün: Lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısından kan akımı ölçüldü. Daha sonra proksimal ve distalde orta hatlardan histolojik değerlendirme için 2 adet biyopsi alındı. Biyopsi alanları 3/0 Polypropilen ile dikildi.

7. Gün: Lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısından kan akımı ölçüldü. Deneklerin yanına bir adet metrik cetvel konulduktan sonra dijital fotoğraf makinesi ile sırt flebinin fotoğrafı çekildi. Flepten 3. günde alınan proksimal ve distal biyopsi noktalarının yan taraflarından, orta hattan, 2 adet daha biyopsi alındı. Denek intrakardiyak enjeksiyonla kanı alınarak sakrifiye edildi.

3.2 Değerlendirme Yöntemleri

3.2.1 Genel Değerlendirme

Deneysel araştırmaya dahil edilen hayvanlarda araştırma süresince oluşan genel değişiklikler günlük olarak gözlendi. Deneklerin ağrılarını azaltmak amacıyla lüzum halinde fluniksin (1mg/kg-Fluvil®-IM) enjeksiyonu uygulandı.

3.2.2 Flep Nekroz Alan Ölçümü

Tüm gruplarda cerrahiden sonraki 7. günde nekroz alanları değerlendirildi. Değerlendirme için denekler sakrifiye edilmeden önce yüzüstü pozisyoda sabitlendi. Daha sonra standart yükseklikten ve standart yöntem kullanılarak dijital fotoğraf makinesi (G10, Canon Inc, Japonya) aracılığıyla, deneklerin yanlarına bir cetvel konularak fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflar bilgisayara aktarıldı ve Image Tool 3.0 ® programı kullanılarak, tüm flep alanı, nekrotik alan ve sağ kalan flep alanı ölçüldü. Yara iyileşmesi ve nekroza bağlı oluşan flep kontraksiyonu nedeniyle nekroz alanının, tüm flep alanına olan yüzdesi ölçüldü.

3.2.3 Histolojik Yöntem

Alınan doku örnekleri, oda ısısında, %10'luk nötral formalin solüsyonu içerisinde 72 saat tespit edildiler. Tespit edilen dokular alışılmış ışık mikroskop

takip yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan bloklardan mikrotomla (Leica SM 2000, Germany) polizinli lamlara 4-5 μm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinize edilmesi amacıyla, kesitler bir gece 37 ºC ve ertesi gün 1 saat 60 ºC olacak şekilde etüvde bekletilerek 15'X2 ksilol'e etkin bırakıldılar. Dehidrate edilmesi amacıyla dokular 10'ar dakika olacak şekilde sırasıyla %100, %96 ve %80' lik alkol serilerinden geçirildiler.

Dehidrate edilen dokular alkolden arındırılmak için 5'X2 kez distile sudan geçirildikten sonra, pap pen (Super PAP Pen, PN IM3580, Becman Coulter Company, France) ile kesit üzerindeki dokuların etrafı çizildi. 15 dakika % 3'lük hidrojen peroksite etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (Phosphate buffer saline, pH=7,4) (Invitrogen Immunodetection, Ref/Cat No: 00-3000, Lot: 1373125, Zymed, USA) ile camlar yıkandı.

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

PBS ile yıkanan camlara 20 dakika biyotinli sekonder antikor (Ref/Cat No: sc-2053, Lot: D0810 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 30 dakika HRP streptavidin enzim kompleksine (Ref/ Cat No: sc-2053, Lot: F2909, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) etkin bırakıldı ve böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak ortama kromojen DAB (Ref/ Cat No: sc-2053, Lot: F2909, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Harris'in Hemotoksileni kullanıldı. Bu şekilde boyanan camlar entellan ile kapatılıp, bilgisayar donanımlı, kamera ataçmanlı foto-ışık mikroskopta (DM 4000 B, Leica, Weetlar, Germany, DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) fotoğraflandırılarak değerlendirildi.

Tüm kontrol ve deney gruplarına ait 4 μm kalınlığındaki seri kesitlerde, X40 büyütmede tüm alanda olacak şekilde Lecia Q Vin 3 programı kullanılarak lenfosit yoğunluğu ve PECAM immunohistokimyasal boyanma yoğunluğu değerlendirildi. Tutulum yoğunluğu semi kantitatif yöntemle tespit edildi. Bu değerlendirmeye göre 0 (0, tutulum yok), 1 (+, zayıf immünreaktivite), 2 (++, orta düzeyde immünreaktivite), 3 (+++, kuvvetli düzeyde immünreaktivite) olarak skorlandı. Lenfosit infiltrasyonu da, normal (0), orta (1) ve yoğun (2) olacak şekilde semikantitatif olarak değerlendirmeye alındı.

3.2.4 Damar Sayımı

Tüm gruplarda her denekte cerrahi sorası 3. gün ve 7. gün flepten histolojik değerlendirmeler için alınan örnekler hematoksilen eozin ile boyandıktan sonra tüm kontrol ve deney gruplarına ait 4µm kalınlığındaki deri kesitlerinde damar sayımı yapıldı. Damar sayısı, 4µm kalınlığındaki seri kesitlerde X40 büyültmede 6 farklı bölgede Lecia Q Vin 3 programında tüm alanda olacak şekilde yapılarak istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı.

3.2.5 Lazer Doppler Akımölçer Ölçümü

Tüm gruplarda flep çizimi yapıldıktan sonra, cerrahinin hemen sonrasında, 3. günde ve çalışmanın sonlandırıldığı 7. günde flebin proksimal ve distal orta noktalardan deri üzerinden lazer doppler akımölçer ile üç kez ölçüm yapıldı ve ortalamaları alındı. Ölçümler cilt probu kullanılarak yapıldı.

3.2.6 İstatiksel Değerlendirme

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama ± standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) olarak gösterildi.

Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile ortanca değerler yönünden farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testiyle araştırıldı. One-Way ANOVA ya da Kruskal Wallis test istatistiğinin anlamlı bulunması halinde post hoc Tukey ya da parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durumlar belirlendi.

Gruplar içerisinde tekrarlayan ölçümlerin ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı Tekrarlayan Ölçümlerde Varyans Analizi ile değerlendirildi. Varyans analizinin önemli bulunması halinde Bonferroni Düzeltmeli çoklu karşılaştırma testi yapılarak farka neden olan izlem zamanları belirlendi. Gruplar içerisinde tekrarlayan ölçümlerin ortanca değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı ise Wilcoxon İşaret test ile değerlendirildi.

$p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ancak, olası tüm çoklu karşılaştırmalarda Tip I hatayı kontrol edebilmek için Bonferroni Düzeltmesi yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 Genel Değerlendirme Bulguları

Çalışma gruplarından Grup 2'de üç denek, Grup 4'de iki denek cerrahiden sonraki takip sürecinde kaybedildi. Çalışma gruplarından eksilen deneklerin yerine yeni deneklerde aynı işlemler uygulanarak grup sayısı korundu.

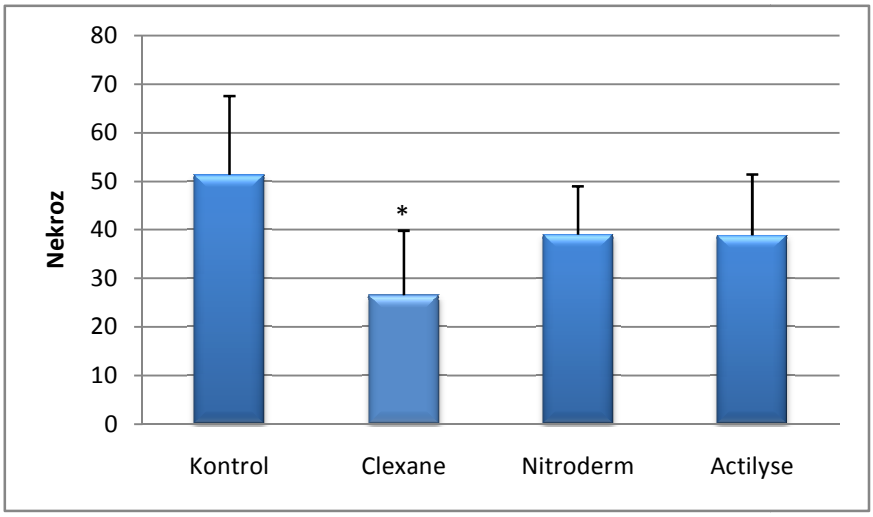
4.2 Flep Nekroz Alanı Değerlendirme Bulguları

Cerrahiden sonra 7. günde fleplerin nekroz alanlarının, tüm flep yüzdesine oranları değerlendirildiğinde **(Tablo 1, Grafik 1, Şekil 13)** kontrol grubuna göre tüm gruplarda nekroz yüzdeleri azalmıştı. Ancak sadece düşük molekül ağırlıklı heparin (Clexane) uygulanan Grup 2'de istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

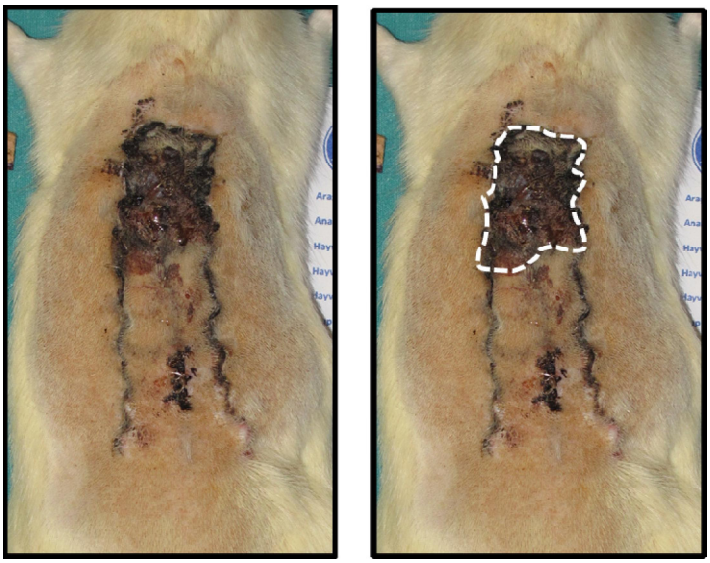
Tablo 1: Gruplara Göre Deneklerin Nekroz Düzeyleri

Gruplar	**Nekroz**
Kontrol	51,3±16,2[a]
Clexane	26,5±13,3[a]
Nitroderm	39,0±10,0
Actilyse	38,8±12,6
p-değeri	0,033

a Kontrol grubu ile Clexane grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p=0,019).



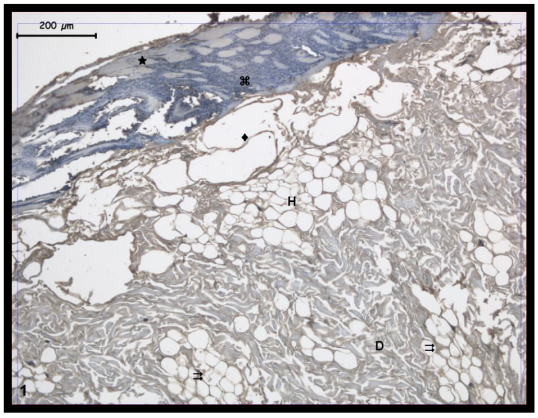
Grafik 1: Postoperatif 7. günde nekroz alanları incelendi. Nitroderm ve Actilyse grubunda kontrole göre nekrotik alan düşük olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Clexane grubunda ise nekrotik alan yüzdesi en düşük olup kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,019).



Şekil 13: Nekroz ve yara iyileşmesinin yol açtığı flep kontraksiyonu nedeniyle nekroz alanının tüm flebe yüzdesi değerlendirildi.

4.3 Histolojik Değerlendirme Bulguları

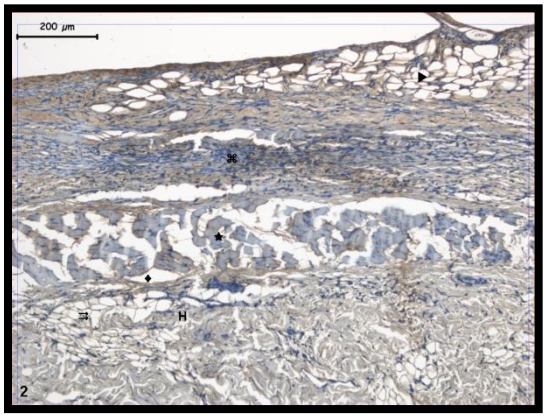
Kontrol grubu olarak belirlenen grupta 3. günde distalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, dermiste kollajen liflerin düzenlenimin normal görünümde olduğu belirlenmekle birlikte dermisin devamı şeklinde görülen hipodermisin, yağ hücre içeriğinin arttığı ve bu hücrelerin dermisin derin bölgelerine doğru yerleşim gösterdiği belirlendi. Kas tabakasında liflerin düzenleniminde yer yer bozulmalar izlenirken, belirgin lenfosit infiltrasyonu dikkati çekti. Hipodermise komşu damarlarda ödem izlendi. PECAM immünreaktivitesi ise son derece azdı **(Fotoğraf 1)**.



Fotoğraf 1: Kontrol grubu 3. gün distalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ⌘: Lenfosit infiltrasyonu, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

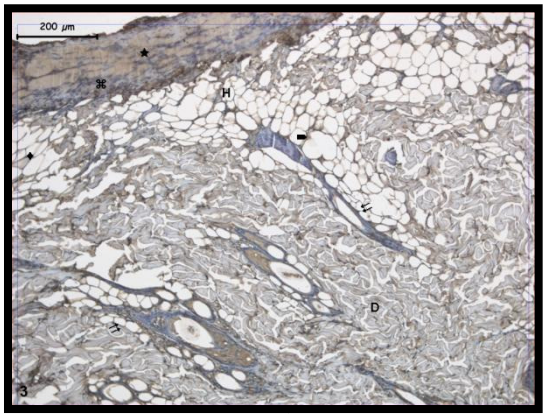
Kontrol grubu olarak belirlenen grupta 7. günde distalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, 3. günde distal bölümden alınan örneklere karşın özellikle hipodermis bölgesindeki yağ hücrelerinin azaldığı belirlendi. Bazı bölgelerde lenfatik ödem saptandı. Kas tabakasında yapının organizasyonunun bozulduğu görülmekle birlikte lenfosit infiltrasyonu artmıştı. Lenfatik infiltrasyonun yoğun olduğu bölgelerde yer yer doku görünümü almış yağ hücre

infiltrasyonu belirlendi. PECAM immünreaktivitesi ise zayıftı ve bir önceki gruba karşın azalmıştı **(Fotoğraf 2)**.



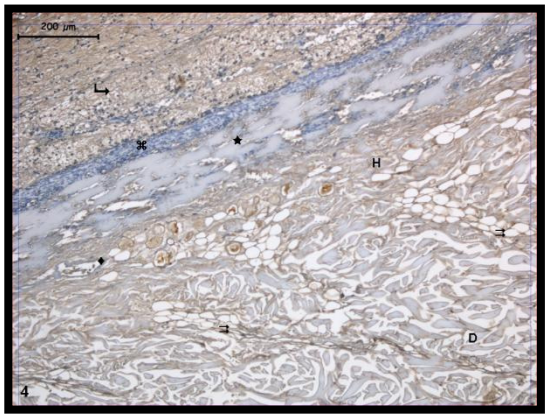
Fotoğraf 2: Kontrol grubu 7. gün distalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ⌘: Lenfosit infiltrasyonu, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, ▶: Yağ doku infiltrasyonu, H: Hipodermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

Kontrol grubu olarak belirlenen grupta 3. günde proksimalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, dermis tabakasında kollajen liflerin normale benzer yapıda olduğu görüldü. Bu tabakada yağ bezleri, ter bezleri ve kıl folikülleri ayırt edildi. Hipodermisteki yağ dokusunun arttığı, yağ damlacıklarının birleşerek iri düzensiz damlacıklar oluşturduğu görüldü. Oluşan yağ hücrelerinin yer yer kıl foliküllerine invaze olduğu dikkati çekti. Kan damarları normal görünümleriyle ayırt edildi. PECAM immünreaktivitesi 3. günde distal bölümden alınan örneklere karşın daha yoğun ve orta dereceliydi **(Fotoğraf 3)**.



Fotoğraf 3: Kontrol grubu 3. gün proksimalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ⌘: Lenfosit infiltrasyonu, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, ➨: Birleşen yağ damlacıkları, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

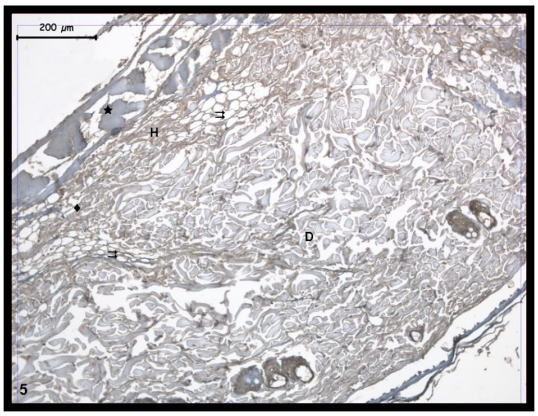
Kontrol grubu olarak belirlenen grupta 7. günde proksimalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, dermis ve hipodermis tabakasının normal görünümde olduğu belirlendi. Kas tabakası normal organizayonunu korumakla birlikte dokuda lenfatik ödemin varlığı dikkati çekti. Lenfosit infiiltrasyonunun diğer gruplara karşın göreceli olarak daha az ve sınırlı bir bölgede olduğu görüldü. Bu grupta kas tabakasına komşu alanlarda granülasyon dokusunda ince organize olmamış kollajen liflerin varlığı dikkati çekti. Hipodermise yakın yerleşimli damarlarda PECAM immünreaktivitesinin arttığı belirlendi. Tutulum yer yer orta yer yer kuvvetliydi **(Fotoğraf 4)**.



Fotoğraf 4: Kontrol grubu 7. gün proksimalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ⌘: Lenfosit infiltrasyonu, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, ↳ : Granülasyon dokusu, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

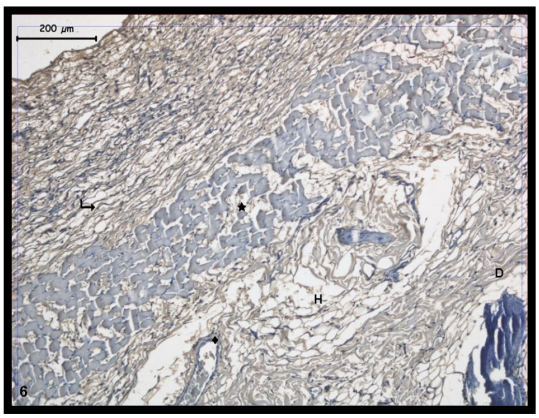
Clexane uygulaması yapılan grupta 3. günde distalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, hipodermiste önceki gruplara karşın yağ dokunun azaldığı belirlendi. Ancak bazı bölgelerde dermise yer yer yağ hücre infiltrasyonu olduğu görüldü. Lenfosit infiltrasyonu önceki gruplara karşın azdı ancak lenfatik kapiller dilatasyon ve perikapiller ödemin varlığı belirgindi. Bu gruba ait örneklerde

damar sayısı az ve PECAM immünreaktivitesi zayıf orta dereceli olarak değerlendirildi **(Fotoğraf 5)**.



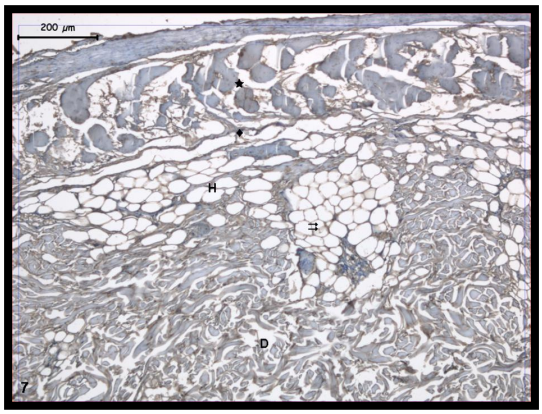
Fotoğraf 5: Clexane grubu 3. gün distalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

Clexane uygulaması yapılan grupta 7. günde distalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, hipodermis yağ dokusunun bir önceki grupla benzer görünümde olduğu belirlendi. Perikapiller ödem görülmemekle birlikte bazı lenfatik damarlarda az miktarda ödem vardı. Venöz kapillerlerde dilatasyon görüldü ancak arteriyol kapillerde bu bulgu son derece azdı. Granülasyon dokusunda tam olarak organize olmamakla birlikte kollajen liflerinin sayısının arttığı saptandı. Bu grupta hipodermis tabakasında ayırt edilen damarlarda PECAM immünreaktivitesi azdı **(Fotoğraf 6)**.



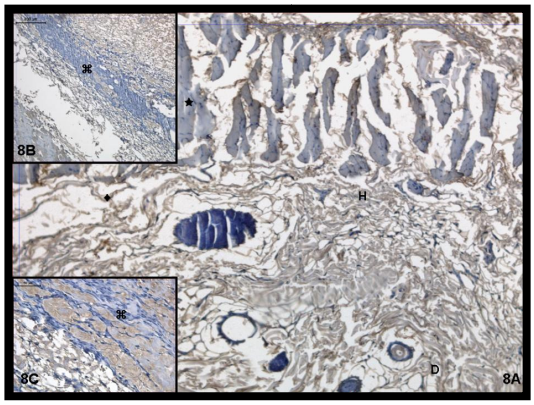
Fotoğraf 6: : Clexane grubu 7. gün distalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, ↳ : Granülasyon dokusu, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

Clexane uygulaması yapılan grupta 3. günde proksimalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, özellikle dermiste kollajen lif düzenleniminin normal olduğu belirlendi. Hipodermiste yağ dokuda yer yer artış dikkati çekti. Lenfosit infiltrasyonu önceki gruplara karşın son derece azalmıştı. Kas tabakasında bazı alanlarda ayrılmalar görüldü ve kas liflerinde dejenerasyon ayırt edildi. Kas altında izlenen damarlar belirgindi ve PECAM immünreaktivitesi 3. gün distal grubuna karşın artmıştı **(Fotoğraf 7)**.



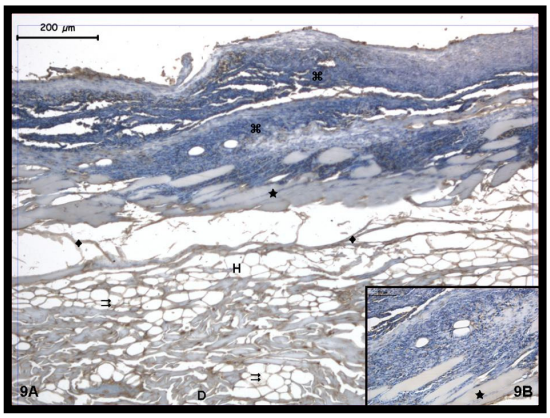
Fotoğraf 7: Clexane grubu 3. gün proksimalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

Clexane uygulaması yapılan grupta 7. günde proksimalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, doku genelindeki dejenerasyon dikkati çekti. Kas tabakasında organizasyon bozukluğu saptandı ve lenfatik kapiller dilatasyon yaygındı. Granülasyon dokusu belirgin olmakla birlikte, bu grupta diğer gruplara karşın damarlanmanın arttığı görüldü. PECAM immünreaktivitesi diğer gruplara karşın oldukça yoğun ve tutulum kuvvetliydi **(Fotoğraf 8)**.



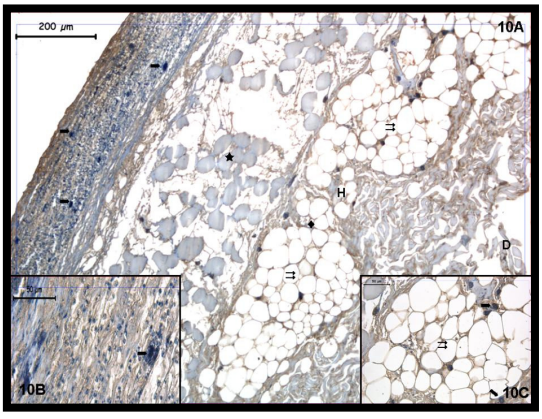
Fotoğraf 8A, B, C: Clexane grubu 7. gün proksimalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ⌘: Lenfosit infiltrasyonu, ♦: Damar, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A, BX100, CX400).

Nitroderm uygulaması yapılan grupta 3. günde distalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, doku genelinde lenfosit infiltrasyonu son derece yaygındı. Bu bulguya perikapiller ödemin varlığı eşlik ediyordu. Hipodermisteki yağ dokusu artmıştı ve dermise doğru düzensiz bir invaginasyon gösteriyordu. Arteriyel kapillerler normal görünümde ayırt edildi. Bu gruba ait immünohistokimyasal değerlendirmede normal görünümleriyle ayırt edilen kapillerlerde PECAM tutulumu orta dereceli olarak belirlendi **(Fotoğraf 9)**.



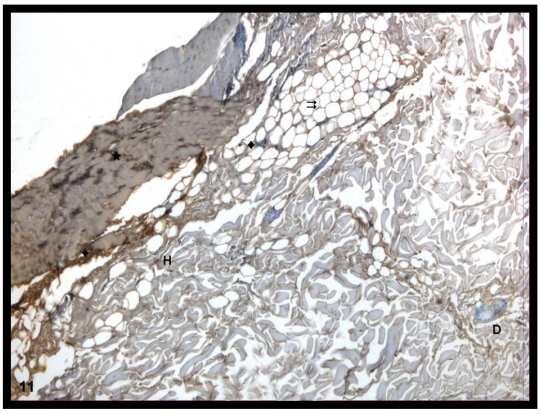
Fotoğraf 9A, B: Nitroderm grubu 3. gün distalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ⌘: Lenfosit infiltrasyonu, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-Hematoksilen AX100, BX400).

Nitroderm uygulaması yapılan grupta 7. günde distalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, dermiste kollajen lif düzenleniminin bozulduğu görüldü. Hipodermiste artan yağ doku hücrelerinin birleşerek vakuoler görünüm kazandığı dikkati çekti. Birleşen yağ hücrelerinin dermise doğru yayılım gösterdiği belirlendi. Doku genelinde arteriyol ve perikapiller ödem belirgindi ve diğer gruplara karşın artmıştı. Bu grupta yine lenfatik ve perikapiller ödem saptandı. Kas dokusunun organizasyonunun son derece bozulduğu ve lenfosit infiltrasyonunun bu grupta belirgin olduğu dikkati çekti. Granülasyon dokusu son derece gelişkindi ancak kollajen lif sentezi son derece azdı. Diğer tüm gruplardan ayrıcalıklı olarak bu grupta belirgin mast hücre infiltrasyonu olduğu ayırt edildi. Büyük büyültmeli incelemelerde mast hücrelerininin granülasyon dokusunda ve yağ hücreleri arasında damarlara yakın yerleşim gösterdikleri saptandı. Bu grupta yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede ise PECAM immünreaktivitesinin ortadan kuvvetliye değiştiği ve özellikle hipodermiste yaygın olduğu belirlendi **(Fotoğraf 10)**.



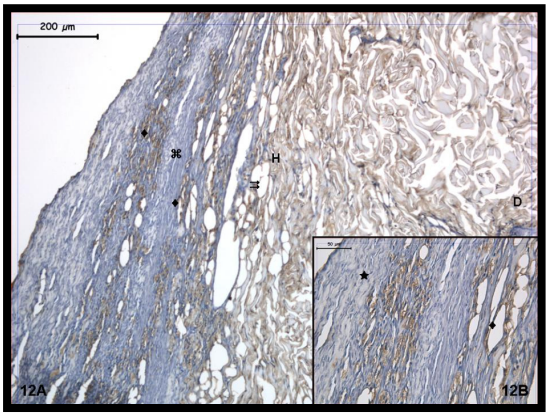
Fotoğraf 10A, B, C: Nitroderm grubu 7. gün distalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, ➡: Mast hücresi, Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-Hematoksilen AX100, B,CX400).

Nitroderm uygulaması yapılan grupta 3. günde proksimalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde hipodermis normal yapısında izlenirken, yağ doku ve kollajen düzenlenimi de normaldi. Doku genelinde lenfosit infiltrasyonunun son derece azaldığı belirlendi. Görülen az sayıdaki lenfatik damarlarda ödem saptanmadı. Tüm bölgelerde artmış damar sayısına koşut ortadan kuvvetliye değişen PECAM immünreaktivitesi görüldü **(Fotoğraf 11)**.



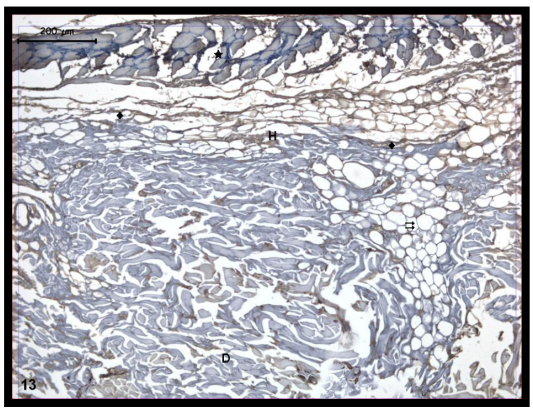
Fotoğraf 11: Nitroderm grubu 3. gün prosimalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

Nitroderm uygulaması yapılan grupta 7. günde proksimalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, dermiste kollajen lifler normal düzenlenimlerindeydi. Kıl folikülleri ve yağ bezleri normal yapılarında ayırt edildi. Bu grupta lenfatik ödemin azaldığı saptandı. Granülasyon dokusunda belirgin kollajen sentezi ilgiyi çekti. Damarlanmadaki artış dikkati çekerken arteriyal kapillerlerdeki diğer gruplara karşın kuvvetli PECAM immünreaktivitesi saptandı **(Fotoğraf 12)**.



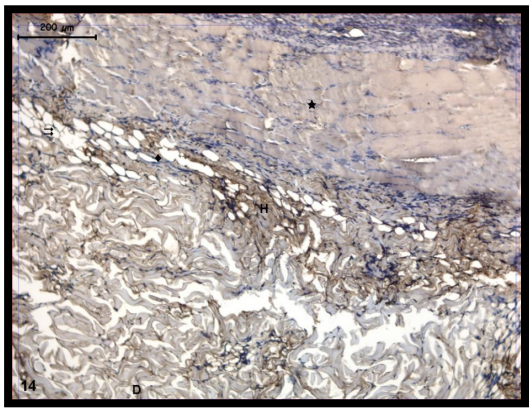
Fotoğraf 12A, B: Nitroderm grubu 7. gün prosimalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ⌘: Lenfosit infiltrasyonu, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-Hematoksilen AX100, BX400).

Actilyse uygulaması yapılan grupta 3. günde distalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, dermiste kollajen lifler normal düzenlenimlerinde ayırt edildi. Bazı alanlarda yağ doku hücrelerinin gruplar halinde dermise doğru girmiş oldukları saptandı. Perikapiller ödem yaygındı. Kas tabakasında yer yer ayrılmalar vardı. Bu tabakada lokal alanlar halinde az miktarda lenfosit infiltrasyonu olduğu belirlendi. PECAM immünreaktivitesi diğer gruplara karşın azalmıştı **(Fotoğraf 13)**.



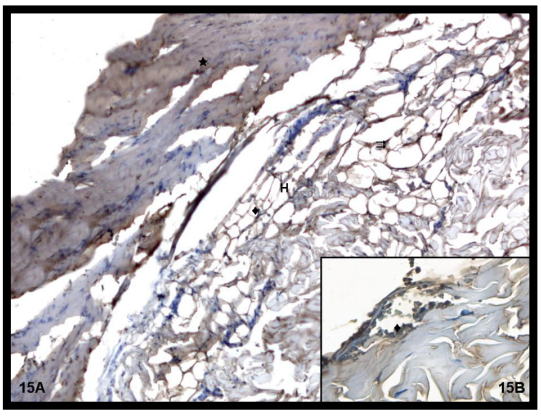
Fotoğraf 13: Actilyse grubu 3. gün distalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

Actilyse uygulaması yapılan grupta 7. günde distalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, dermis tabakasında kollajen liflerin arasında yer yer açılmalar olduğu görüldü. Hipodermis normal görünümdeydi. Lenfosit infiltrasyonu son derece azdı. PECAM immünreaktivitesi bazı bölgelerde orta bazı bölgelerde ortadan kuvvetliye değişiyordu **(Fotoğraf 14)**.



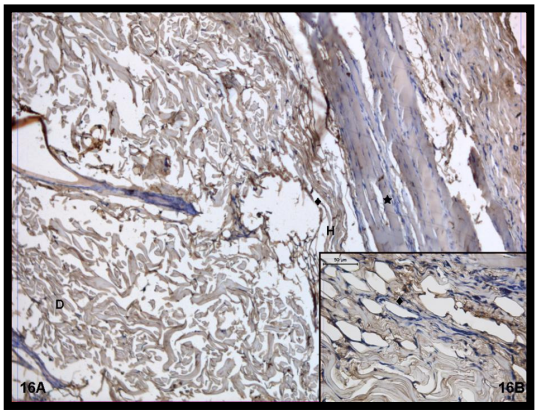
Fotoğraf 14: Actilyse grubu 7. gün distalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-HematoksilenX100).

Actilyse uygulaması yapılan grupta 3. günde proksimalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, doku genelinde diğer gruplara karşın yapıda daha çok dejenerasyon olduğu görüldü. Hem perikapiller hem de lenfatik ödem yaygındı. Kas ve kollajen lifler arasında ayrılmalar vardı. Bu grupta da dermise doğru yağ doku invaginasyonu saptandı. Bu grupta PECAM tutulumu orta dereceliydi **(Fotoğraf 15)**.



Fotoğraf 15A, B: Actilyse grubu 3. gün proksimalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-Hematoksilen AX100, BX400).

Actilyse uygulaması yapılan grupta 7. günde proksimalden alınan örneklerde yapılan incelemelerde, düzenli seyir göstermesine karşın kas tabakasında yer yer ayrılmalar belirlendi. Bu grupta da bazı alanlarda perikapiller ödem saptandı. PECAM immünreaktivitesi ortadan kuvvetliye değişiyordu **(Fotoğraf 16)**.



Fotoğraf 16A, B: Actilyse grubu 7. gün proksimalden alınan örneklerde yapılan PECAM boyaması; ★: Kas tabakası, ♦: Damar, ⇉: Yağ dokuya ait hücreler, H: Hipodermis, D: Dermis (İmmünperoksidaz-Hematoksilen AX100, BX400).

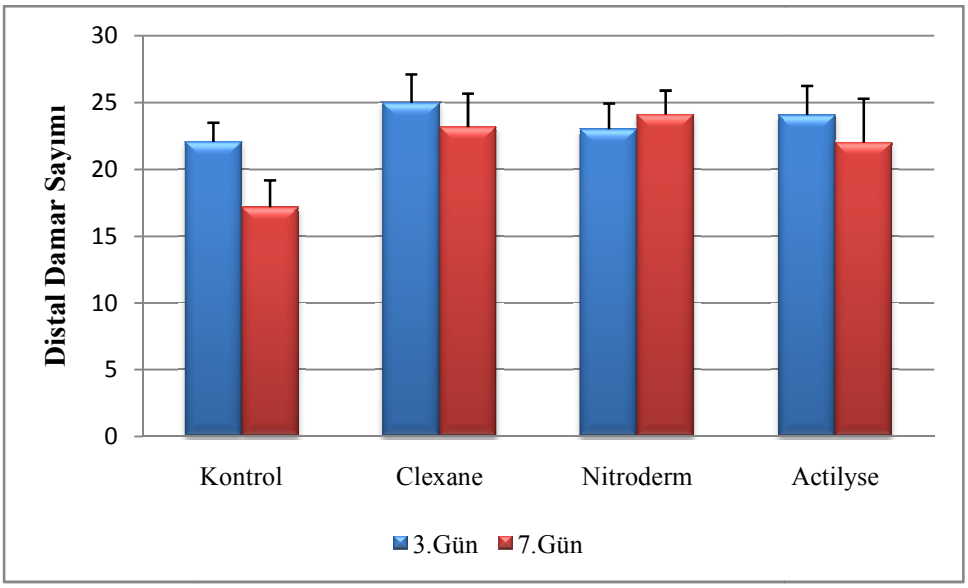
Sonuç olarak; kontrol grubunda distal bölgelerde belirgin olarak izlenen lenfosit infiltrasyonunun diğer tüm gruplarda göreceli olarak azaldığı saptandı. Lenfosit infiltrasyonunun azalmasıyla birlikte granülasyon dokusunda kollajen yapımının arttığı belirlendi. Proksimal kesitlerde lenfosit infiltrasyonu belirgin olarak azalmıştı. Nitroderm grubunda görülen mast hücreleri bu uygulamanın alerjik reaksiyona neden olabileceğini düşündürdü. Ancak bu durumun doku genelinde artmış damar sayısı nedeniyle vaskülogenezi engellemediği kanısına varıldı. Nitroderm grubu öncelikli olmak üzere, Clexane ve Actilyse gruplarında proksimal ve distal bölgelerde kontrol grubuna karşın vaskülogenezin indüklendiği sonucuna varıldı.

4.4 Damar Sayımı, Lenfosit infiltrasyonu ve PECAM boyama bulguları

Tablo 6: Damar Sayımı

DAMAR SAYISI		DİSTAL												PROKSİMAL											
		3.gün						7.gün						3.gün						7.gün					
GRUPLAR	DENEK NO	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
KONTROL GRUBU	1	23	24	20	18	17	19	16	15	17	19	20	16	24	26	27	23	25	21	29	27	30	25	27	28
	2	24	25	23	21	24	26	14	18	12	14	16	19	23	24	21	27	25	24	27	30	32	31	28	26
	3	18	19	22	24	22	23	12	15	17	18	14	16	26	28	25	26	24	22	25	28	30	32	33	31
	4	22	24	21	23	25	19	19	21	23	21	22	18	19	20	26	22	23	24	30	25	24	23	28	24
	5	25	26	25	24	20	21	14	12	18	20	17	16	25	26	27	24	21	29	21	22	20	22	24	25
	6	24	19	20	23	19	22	15	16	19	17	20	22	23	25	24	22	25	21	19	24	25	21	22	20
CLEXANE GRUBU	1	27	26	25	22	24	23	21	22	20	18	23	19	27	25	24	24	25	27	30	28	29	24	25	31
	2	29	27	25	27	23	28	24	25	23	21	24	26	31	34	32	31	30	29	25	27	24	25	26	29
	3	20	24	25	20	23	21	26	19	22	24	25	23	30	28	25	27	23	24	34	25	27	32	31	28
	4	28	29	28	24	27	25	22	26	21	27	24	25	21	19	23	25	24	27	25	34	26	35	28	27
	5	22	24	25	22	21	23	27	28	27	29	25	26	28	29	21	28	27	22	30	25	24	29	28	31
	6	24	25	28	27	28	30	20	19	18	24	19	22	29	27	30	31	30	33	34	33	35	36	34	32
NİTRODERM GRUBU	1	19	20	21	19	18	22	23	24	25	21	22	24	24	21	24	28	29	27	34	36	30	33	29	31
	2	25	24	18	25	20	24	26	27	24	29	28	27	32	33	30	31	29	28	27	29	25	28	26	30
	3	20	24	27	21	26	20	27	26	22	28	24	25	27	30	32	28	27	30	35	39	33	34	37	38
	4	18	25	24	23	24	21	25	26	24	27	22	20	26	30	29	34	30	27	33	30	29	37	35	34
	5	26	22	25	27	25	23	20	21	19	25	24	21	29	32	31	35	34	32	30	35	28	32	34	33
	6	22	25	27	28	26	24	23	22	25	27	23	22	28	29	25	29	27	31	32	34	35	30	27	31
ACTİLYSE GRUBU	1	25	27	29	21	25	24	18	19	20	22	21	18	28	27	28	26	25	27	27	28	29	24	31	25
	2	22	20	24	28	24	21	22	24	23	26	23	25	26	23	25	22	23	25	25	30	27	31	29	30
	3	25	22	26	24	28	29	17	15	16	18	15	17	27	25	26	25	27	28	30	27	29	24	28	25
	4	23	17	19	22	20	19	24	23	21	27	24	26	26	22	20	24	23	25	21	23	25	26	25	24
	5	24	26	28	25	27	23	24	20	27	23	28	24	24	28	25	22	23	26	30	28	31	32	30	27
	6	25	27	26	25	22	24	22	21	23	24	27	25	26	24	27	28	27	25	31	30	24	29	25	27

Damar incelemesinde 3. gün ve 7. günde yapılan damar sayımında gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı **(Grafik 4, Tablo 6-7)**.



Grafik 4: Histolojik olarak damar sayımı.

Tablo 7 : Distal ve Proksimaldeki 3 ve 7. Gün Damar Sayımlarının Gruplara Göre Dağılımı

Gruplar	**3.Gün**	**7.Gün**	**p-değeri[a]**	**Değişim**	**p-değeri[b]**
Distal					0,070
Kontrol	22,1±1,4	17,2±2,0	0,007	-4,9±2,7	
Clexane	25,0±2,1	23,2±2,5	0,301	-1,8±3,8	
Nitroderm	23,0±1,9	24,1±1,8	0,383	1,1±2,8	
Actilyse	24,1±2,2	22,0±3,3	0,337	-2,1±4,7	
Proksimal					0,963
Kontrol	24,1±1,1	26,1±3,4	0,212	2,0±3,4	
Clexane	26,9±3,0	29,1±2,7	0,235	2,2±3,8	
Nitroderm	29,1±2,2	32,0±2,7	0,126	2,9±3,9	
Actilyse	25,2±1,4	27,4±1,9	0,049	2,2±2,1	

a Gruplar içerisinde 3.gün ile 7.gün arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,006$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b Gruplar arasında 3.güne göre 7.gün lenfosit skorundaki değişim yönünden yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,025$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 8: Lenfosit Yoğunluğu. Normal (0), orta (1) ve yoğun (2)

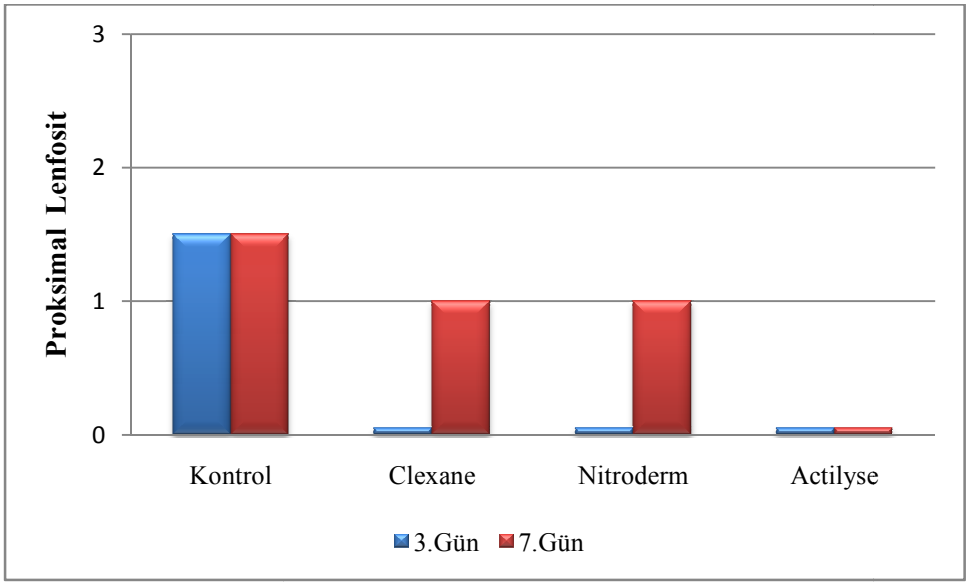
LENFOSİT YOĞUNLUĞU		DİSTAL		PROKSİMAL	
GRUPLAR	DENEK NO	3.gün	7.gün	3.gün	7.gün
KONTROL GRUBU	1	2	2	2	1
	2	2	2	2	2
	3	2	2	1	1
	4	2	1	1	0
	5	2	2	2	2
	6	2	1	1	2
CLEXANE GRUBU	1	1	1	0	1
	2	1	1	0	1
	3	1	1	1	1
	4	1	0	0	1
	5	0	1	0	1
	6	0	1	0	1
NİTRODERM GRUBU	1	2	2	0	2
	2	2	2	0	1
	3	2	2	0	1
	4	1	1	0	1
	5	2	2	1	1
	6	2	1	0	1
ACTİLYSE GRUBU	1	0	1	0	1
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	1	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	0	0	1	1

3.gün ve 7.gündeki incelemelerde lenfosit yoğunluğu distalde istatistiksel olarak anlamlı değildi. Proksimalde ise kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olarak lenfosit yoğunluğu vardı **(Tablo 8-9, Grafik 5-6)**.

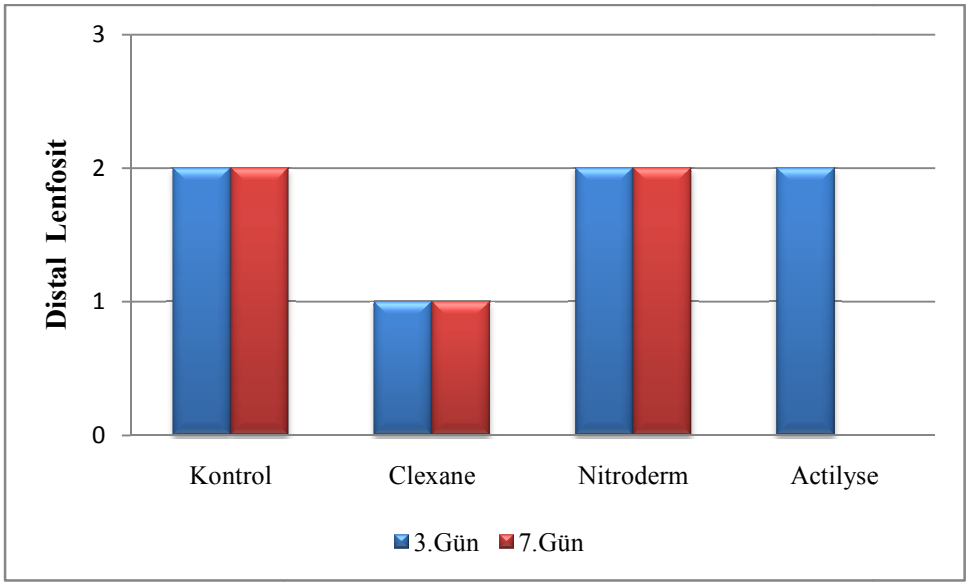
Tablo 9: Distal ve Proksimaldeki 3 ve 7. Gün Lenfosit Skorlarının Gruplara Göre Dağılımı

Gruplar	**3.Gün**	**7.Gün**	**p-değeri[a]**	**Değişim**	**p-değeri[b]**
Distal					0,537
Kontrol	2 (2-2)	2 (1-2)	0,157	0 (-1 – 0)	
Clexane	1 (0-1)	1 (0-1)	0,564	0 (-1 – 1)	
Nitroderm	2 (1-2)	2 (1-2)	0,317	0 (-1 – 0)	
Actilyse	0 (0-1)	0 (0-1)	1,000	0 (-1 – 1)	
Proksimal					0,018
Kontrol	1,5 (1-2)	1,5 (0-2)	0,564	0 (-1 – 1)[c,d,e]	
Clexane	0 (0-1)	1 (1-1)	0,025	1 (0 – 1)[c,f]	
Nitroderm	0 (0-1)	1 (1-2)	0,034	1 (0 – 2)[d,g]	
Actilyse	0 (0-0)	0 (0-1)	0,317	0 (0 – 1)[e,f,g]	

a Gruplar içerisinde 3. gün ile 7. gün arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre p<0,006 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b Gruplar arasında 3. güne göre 7. gün lenfosit skorundaki değişim yönünden yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre p<0,025 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, c Kontrol grubu ile Clexane grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), d Kontrol grubu ile Nitroderm grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), e Kontrol grubu ile Actilyse grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p=0,011), f Clexane grubu ile Actilyse grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001), g Nitroderm grubu ile Actilyse grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001).



Grafik 5 : Proksimal lenfosit tutulumu. Kontrol grubunda 7. gündeki lenfosit tutulumu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,025$).



Grafik 6: Distal lenfosit tutulumu. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Tablo 10: PECAM tutulum yoğunluğu. 0 (0, tutulum yok), 1 (+, zayıf immünreaktivite), 2 (++, orta düzeyde immünreaktivite), 3 (+++, kuvvetli düzeyde immünreaktivite)

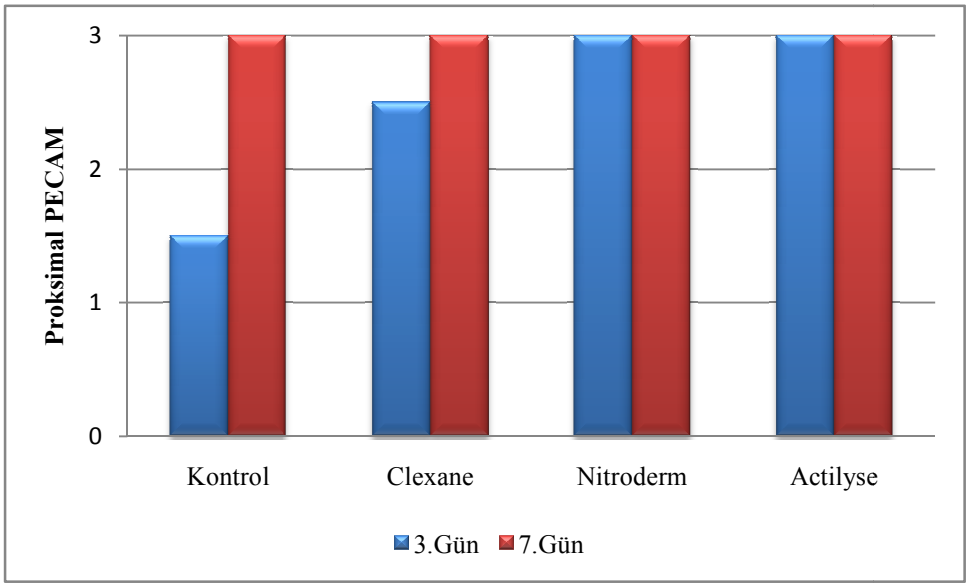
PECAM TUTULUM YOĞUNLUĞU		DİSTAL												PROKSİMAL											
		3.gün						7.gün						3.gün						7.gün					
GRUPLAR	DENEK NO	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
KONTROL GRUBU	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	3	3	3	3	2	2
	2	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	2	2	1	1	2	2	3	3	3	3
	3	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	3	2
	4	1	1	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	2	2	2	1	3	3	3	3	2	2
	5	2	2	2	1	1	1	0	0	0	1	1	0	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2
	6	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	2	3	2	3	2	3
CLEXANE GRUBU	1	3	2	2	2	1	1	3	2	3	2	1	3	1	3	2	3	2	2	3	3	3	3	3	3
	2	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3
	3	2	2	3	3	3	2	2	1	2	2	1	1	3	2	2	3	2	3	3	3	3	3	2	3
	4	1	2	1	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	3	3	3
	5	3	3	3	3	2	3	3	2	3	1	1	2	1	2	2	1	2	2	3	2	3	2	2	2
	6	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	1	1	2	2	2	3	3	3
NİTRODERM GRUBU	1	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	2	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3
	3	2	2	2	2	2	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2	3
	4	3	3	3	2	3	1	3	3	3	2	3	1	3	3	3	2	2	3	3	3	2	3	3	3
	5	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3
	6	3	2	2	3	3	2	3	2	3	3	3	2	3	2	3	2	2	3	2	3	3	3	2	3
ACTİLYSE GRUBU	1	2	2	2	2	1	2	0	1	0	1	2	0	3	2	2	2	3	2	3	3	3	3	3	3
	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	2	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2
	3	2	2	1	1	1	1	3	2	3	3	3	2	3	2	3	3	1	2	2	2	2	2	2	2
	4	0	0	1	0	1	0	2	3	2	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	2	3	2	3	3
	5	1	1	1	1	0	0	1	0	1	2	0	3	2	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3
	6	0	1	0	1	0	0	2	3	1	1	1	3	2	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	2

Tablo 11: Distal ve Proksimaldeki 3 ve 7. Gün PECAM Skorlarının Gruplara Göre Dağılımı

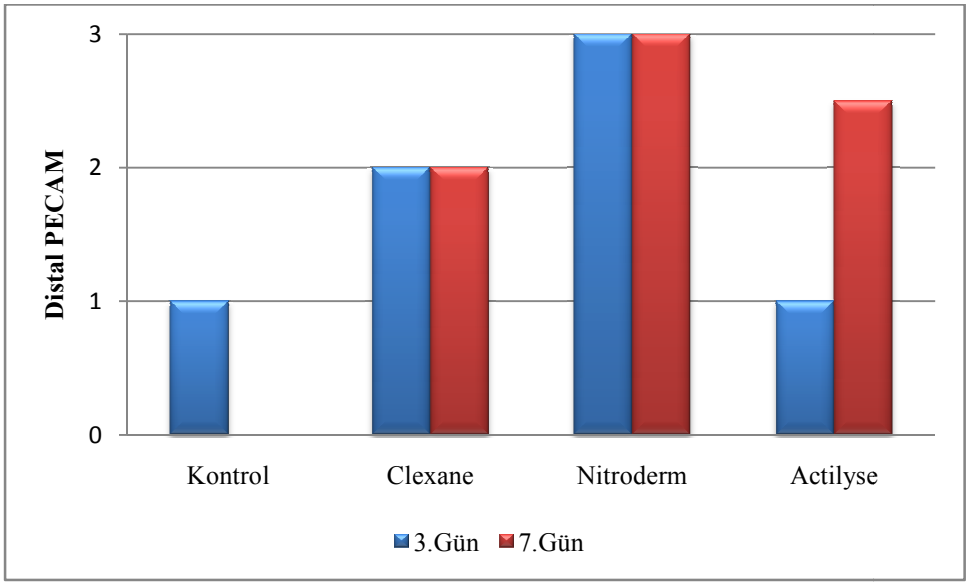
Gruplar	3.Gün	7.Gün	p-değeri[a]	Değişim	p-değeri[b]
Distal					0,084
Kontrol	1 (0-2)	0 (0-1)	0,257	-0,5 (-2 – 1)	
Clexane	2 (2-3)	2 (1-3)	0,317	-0,5 (-1 – 1)	
Nitroderm	3 (2-3)	3 (2-3)	0,317	0 (0 – 1)	
Actilyse	1 (0-2)	2,5 (1-3)	0,074	2 (-1 – 3)	
Proksimal					0,003
Kontrol	1,5 (0-2)	3 (2-3)	0,024	1 (1 – 3)[c,d,e]	
Clexane	2,5 (2-3)	3 (2-3)	0,157	0 (0 – 1)[c,f,g]	
Nitroderm	3 (3-3)	3 (3-3)	1,000	0 (0 – 0)[d,f]	
Actilyse	3 (2-3)	3 (2-3)	1,000	0 (-1 – 1)[e,g]	

a Gruplar içerisinde 3. gün ile 7. gün arasında yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,006$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b Gruplar arasında 3. güne göre 7. gün lenfosit skorundaki değişim yönünden yapılan karşılaştırmalar, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,025$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, c Kontrol grubu ile Clexane grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), d Kontrol grubu ile Nitroderm grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), e Kontrol grubu ile Actilyse grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), f Clexane grubu ile Nitroderm grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,008$), g Clexane grubu ile Actilyse grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,019$).

3. günde ve 7. günde PECAM skorları incelendiğinde distalde gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi. Proksimalde PECAM tutulumu tüm gruplarda artmıştı ancak kontrol grubunda bu artış istatistiksel olarak anlamlıydı. Buna rağmen ilaç gruplarındaki PECAM tutulum yoğunluğu kontrollere göre daha artmıştı **(Tablo 10-11, Grafik 7-8)**.



Grafik 7: Proksimal PECAM değerleri. Kontrol grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı($p<0,05$).



Grafik 8: Distal PECAM değerleri. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi($p>0,05$)

4.5 Lazer Doppler Akım Ölçüm Bulguları

Kontrol grubu ve diğer gruplar arasında proksimaldeki kan akımındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı **(Tablo 12)**.

Tablo 12: Gruplar İçerisinde İzlem Zamanlarına Göre Deneklerin Proksimaldeki Lazer Doppler Akımölçer (LDA) ölçümleri.

Gruplar	**T_0**	**T_1**	**T_2**	**T_3**	**p-değeri[a]**
Kontrol	7,4±2,0	5,1±3,4	5,6±2,1	2,0±2,5	0,134
Clexane	4,7±1,8	5,4±0,9	6,2±2,7	3,4±1,8	0,323
Nitroderm	10,2±2,6	5,9±2,6	5,7±2,8	7,2±2,2	0,283
Actilyse	7,8±1,4	7,0±2,1	6,1±2,2	5,0±2,6	0,036

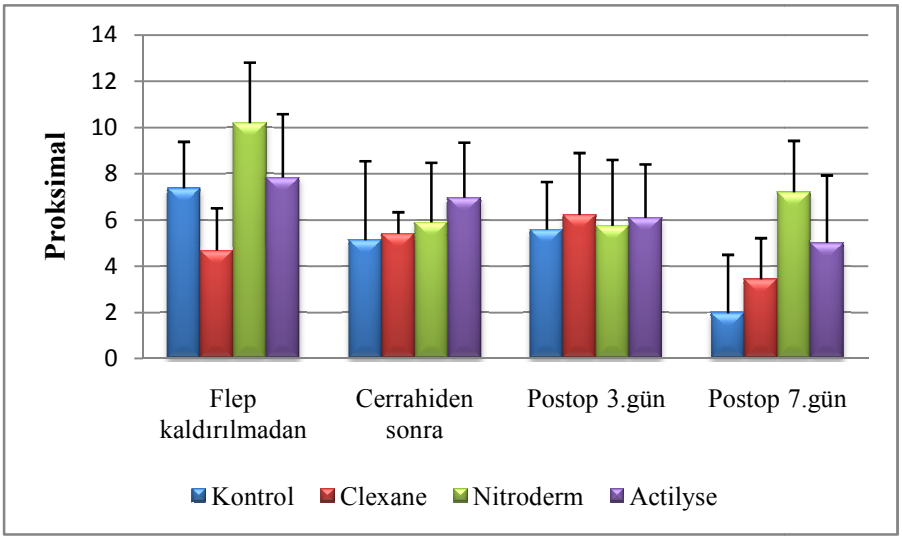
a Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (T_0: Flep kaldırılmadan, T_1: Cerrahiden sonra, T_2: Postop 3. gün, T_3: Postop 7. gün).

İzlem zamanlarına göre proksimalde kan akımı ölçümlerindeki değişimin gruplara göre dağılımı incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı **(Tablo 13, Grafik 2)**.

Tablo 13: İzlem Zamanlarına Göre Proksimal Ölçümlerindeki Değişimin Gruplara Göre Dağılımı (T_0: Flep kaldırılmadan, T_1: Cerrahiden sonra, T_2: Postop 3. gün, T_3: Postop 7. gün).

Gruplar	Kontrol	Clexane	Nitroderm	Actilyse	p-değeri[a]
T_0-T_1	-2,3±3,91	0,7±1,87	-4,3±4,32	-0,8±1,00	0,066
T_0- T_2	-1,9±1,99	1,5±4,30	-4,7±4,11	-1,7±1,67	0,032
T_0-T_3	-5,4±2,95	-1,3±3,22	-3,0±2,38	-2,8±1,96	0,092
T_1-T_2	0,4±3,87	0,8±2,82	-0,4±4,04	-0,8±1,10	0,824
T_1-T_3	-3,2±4,66	-2,0±2,34	1,3±2,86	-2,0±2,45	0,127
T_2-T_3	-3,5±2,60	-2,7±2,43	1,7±3,29	-1,2±3,23	0,027

a Bonferroni Düzeltmesine göre p<0,0083 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi(T_0: Flep kaldırılmadan, T_1: Cerrahiden sonra, T_2: Postop 3.gün, T_3: Postop 7.gün).



Grafik 2: Flebin proksimalindeki akım değişimi.

Kontrol grubu ve diğer gruplar arasında distalde kan akımındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı **(Tablo 14)**.

Tablo 14. Gruplar İçerisinde İzlem Zamanlarına Göre Deneklerin Distaldeki Ölçümleri (T_0: Flep kaldırılmadan, T_1: Cerrahiden sonra, T_2: Postop 3.gün, T_3: Postop 7.gün).

Gruplar	**T_0**	**T_1**	**T_2**	**T_3**	**p-değeri[a]**
Kontrol	7,1±2,1	3,6±2,0	2,7±1,1	1,4±1,5	0,024
Clexane	6,7±2,5	4,0±2,8	2,6±1,7	1,5±0,9	0,118
Nitroderm	8,0±3,2[b]	3,1±1,3	4,0±2,4	1,5±1,1[b]	0,003
Actilyse	5,7±1,8	4,5±1,9	2,5±0,8	1,6±1,1	0,055

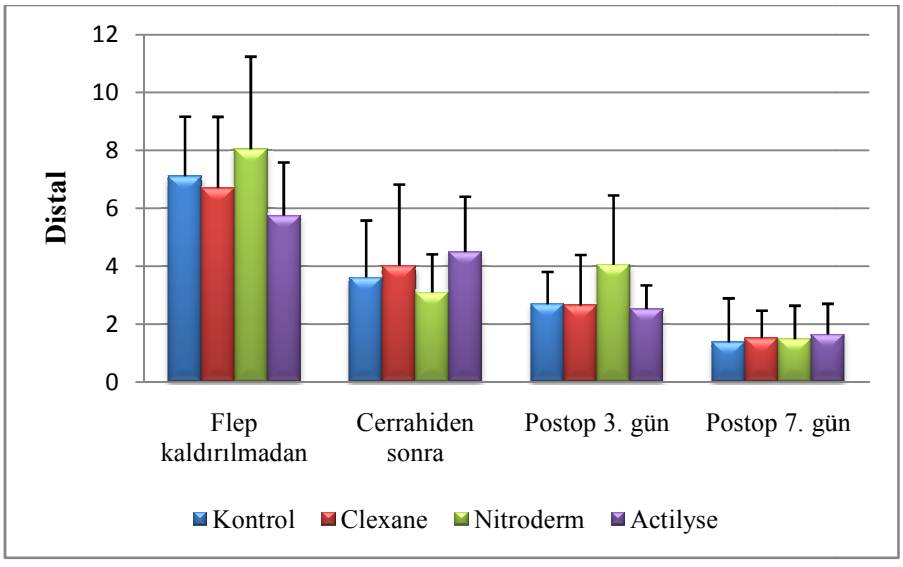
a Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,0125$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi, b Nitroderm grubu içerisinde T_0 ile T_3 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,007$).

İzlem zamanlarına göre distaldeki kan akımı ölçümlerindeki değişimin gruplara göre dağılımı incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı **(Tablo 15, Grafik 3)**.

Tablo 15: İzlem Zamanlarına Göre Distal Ölçümlerindeki Değişimin Gruplara Göre Dağılımı (T_0: Flep kaldırılmadan, T_1: Cerrahiden sonra, T_2: Postop 3. gün, T_3: Postop 7. gün).

Gruplar	Kontrol	Clexane	Nitroderm	Actilyse	p-değeri[a]
T_0 - T_1	-3,5±3,16	-2,7±2,40	-4,9±2,96	-1,3±1,97	0,145
T_0- T_2	-4,4±2,47	-4,0±2,71	-4,0±4,67	-3,2±1,99	0,927
T_0- T_3	-5,7±2,51	-5,2±2,91	-6,6±2,45	-4,1±2,43	0,435
T_1- T_2	-0,9±1,67	-1,4±3,62	1,0±2,79	-2,0±2,21	0,290
T_1- T_3	-2,2±1,22	-2,5±3,50	-1,6±1,44	-2,8±1,99	0,802
T_2- T_3	-1,3±1,28	-1,1±1,08	-2,6±2,40	-0,9±0,75	0,251

a Bonferroni Düzeltmesine göre p<0,0083 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 3: Flebin distalindeki akım değişimi.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Deri flepleri yaraların onarımında plastik ve rekonstrüktif cerrahlar tarafından işlevsel ve kozmetik ihtiyaçları karşılamak üzere sıkça kullanılmaktadır. Gelişigüzel kanlanan deri fleplerinde karşılaşılan en önemli problemlerden birisi flep distalinde nekroz gelişmesidir. Deri flebi distalindeki nekrozun oluşma mekanizması ile ilgili farklı hipotezler mevcuttur. Bunu gidermek için çeşitli cerrahi teknikler ve ilaç uygulamaları geliştirilmesine rağmen halen karşımıza sorun olarak çıkabilmektedir. Flep sağkalımını arttırmanın en güvenilir metodu cerrahi geciktirmedir. Cerrahi geciktirme ile komşu dokuları besleyen damarlar ve flep arasındaki "boğulmuş" damarlarda vazodilatasyon gelişerek daha iyi dolaşım elde edilebilmektedir **[82]**. Ancak bu yöntemin asıl cerrahi öncesinde ek girişim gerektirmesi dezavantajıdır.

Flep uç kısmında nekroz gelişmesi hakkındaki genel görüş doku iskemisi sonrasında geliştiği yönündedir **[83]**. Çalışmalar daha çok kan akımını arttırmaya veya neovaskülarizasyona odaklanmıştır. Reinish arteriovenöz şantlar sonrasında kapiller kan akımındaki azalmanın flep nekrozuna yol açabileceğini göstermiştir **[8]**. Ancak Kerrigan'a göre asıl neden arteriyel yetersizliktir **[11]**. Vazospazmın flep nekrozu oluşturabileceğine dair çeşitli mekanizmalar açıklanmıştır **[83-85]**.

Vazodilatatör ilaçların flep sağkalımına etkisi üzerinde bir çok araştırma yapılmıştır. Bu ilaçların deri fleplerindeki sağkalımı üzerindeki etkileri ilk kez Donavan tarafından gösterilmiştir **[86]**. Finseth ve arkadaşları vazodilatör ilaç olan isoksuprin ve guanethidinin sıçan deri fleplerinin sağkalımını arttırdığını

göstermişlerdir **[87]**. Çalışmamızda flep sağkalımını arttırmak, flep distalindeki nekrozu önlemek için kullanılan ajanlardan birisi nitroderm yamadır.

Vasküler endotelyal hasarı ve mikrovasküler düzeydeki tromboz konusunda da çeşitli araştırmalar yapılmıştır **[88].** Mikrocerrahideki gelişmelere rağmen vazospazma ve tromboza bağlı meydana gelen flep kaybı en deneyimli merkezlerde bile halen %5-10 civarındadır **[89].** Trombüs patogenezinde vazospazm önemli bir rol oynar. Bu da serbest fleplerde hemen anastomoz sonrasında görülebileceği gibi anastomozdan sonraki 72 saate kadar gelişebilir **[90, 91]**.

Flep kaybını azaltmaya yönelik geliştirilecek yeni tedavi seçenekleri flep dolaşımı, iskemi-reperfüzyon hasarı ve trombozun mekanizmasının iyi bilinmesine bağlıdır. Tedavide kullanılan ilaç seçenekleri başta vazodilatatörler olmak üzere sempatolitikler, kalsiyum kanal blokörleri, antikoagülanlar, glukokortikoidler ve serbest oksijen radikal temizleyicileridir **[92-96]**.

NİTROGLİSERİN

Nitrogliserin organik nitratların tipik ajanıdır. Nitratlar dokuda nitrik okside (NO) dönüşerek kas hücrelerinde ve trombositlerde guanil siklazı aktive eder. Bu da siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşturarak devamında vasküler gevşeme sağlar. Nitratların özellikle venodilatör etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle plastik cerrahi literatüründe nitratların çeşitli formlarıyla yapılmış

çalışmalar mevcuttur. Rohrich'in sıçanlar ve domuzlar üzerinde yaptığı çalışmada nitrogliserin pomad flepler kaldırılmadan 1 saat önce ve flep kaldırıldıktan sonra altışar saat arayla toplam 3 gün uygulanmıştır. Nitrogliserin uygulanan grupta nekroz yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunmuştur **[45].** Blomain ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada domuzlar üzerinde kaldırılan flepte 4 gün boyunca %2'lik nitrogliserin uygulamasının iskemik kısmın yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir **[97]**. Segura ve ark. distal konjesyonu olan bir alt göz kapağı flebinde nitrogliserin spreyi 7 gün boyunca, günde 3 kez olacak şekilde uygulamışlardır, sonrasında flebin tamamının yaşadığını gözlemlemişlerdir **[46]**. Dunn ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre postoperatif dönem sonrası hemen kullanılan tek doz nitrogliserin pomad uygulamasının yeterince faydalı olmadığı belirtilmiştir **[47]**. Çoruh ve arkadaşları iskemik venöz akımlı tavşan kulağında yaptıkları çalışmada nitroderm kullandıklarında flep sağkalımını arttırdığını göstermişlerdir **[48]**. Davis ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise sıçanlarda yaptıkları gelişigüzel kanlanan sırt flebinde topikal iskemi karşıtı ilaçları karşılaştırmışlardır. Nifedipin, trolamin salisilat ve nitrogliserinin çeşitli birleşimleri uygulamışlardır. Topikal nitrogliserin ve trolamin salisilat uygulamasının flep yaşayabilirliğinde en iyi olduğu sonucunu bulmuşlardır **[98]**.

Bu çalışmada gelişigüzel kanlanan deri flebinde postoperatif 0.,1. ve 2. günlerde uygulanan topikal nitrogliserin yama uygulamasının kontrol grubuna göre flepteki nekroz oranını azalttığı saptandı. Ancak bu oran istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİN

Düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) tromboz gelişme riskinin yüksek olduğu durumlarda kullanılan bir ilaçtır **[49]**. Plastik cerrahi literatüründe DMAH ile ilgili deneysel yayınlar daha çok flep konjesyonu ve mikrocerrahide kan akımı devamlılığı ile ilgilidir. Miyavaki ve arkadaşları konjesyon gelişen kulak flep modelinde uyguladıkları DMAH'nın flep sağkalımını arttırdığını göstermişlerdir **[69]**. Chung ve arkadaşları iki farklı DMAH grubunun etkilerini konjesyon gelişen tavşan kulak modelinde çalışmışlardır. Her iki grubun da kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde flep sağkalımını arttırdığını saptamışlardır **[99]**.

DMAH'nin mikrocerrahide akımın korunmasına yönelik yapılan bir çalışmada ezilmiş sıçan arter modelinde verilen DMAH'nın arter akımında devamlılık sağladığı gösterilmiştir **[100]**. Başka bir sıçan tromboz modelinde DMAH, heparin ile kıyaslandığında trombozu heparin kadar etkili bir şekilde önlediği, kanama gibi komplikasyonların da DMAH ile daha az görüldüğü gösterilmiştir **[70]**.

DMAH'nin antikoagülan özellikleri yanında antiinflamatuvar etkileri de bulunmuştur **[101, 102]**. Bu anti inflamatuar etkiye özellikle düşük dozda ulaşıldığı görülmüştür. Düşük doz enoksaparinin inflamatuar bağırsak hastalıklarında da yararlı etkisi gösterilmiştir **[103]**

Postoperatif 0., 1. ve 2. günlerde deri altına DMAH uygulanan Grup 2'de flepteki nekroz oranının diğer ilaç grupları ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (p=0,019).

DOKU PLAZMİNOJEN AKTİVATÖRÜ

Doku plazminojen aktivatörü (tPA) trombüs yıkımında görevli bir proteindir. Bunu dolaşımdaki fibrine bağlı plazminojeni aktif plazmin haline dönüştürerek yapar **[71, 72]**. Doku plazminojen aktivatörüyle ilgili yapılan çalışmaların birçoğu mikrocerrahi yapılmış trombojenik modellerde trombolitik özelliği göstermeye yöneliktir. Hashimoto ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bir trombojenik model üzerinde heparin, ürokinaz ve prostaglandin E1'in antitrombotik özelliklerine bakılmıştır. Burda heparinin hem arter hem vendeki stazı önleyebileceği, ürokinazın venüllerde, prostaglandinin ise arteriollerdeki staza karşı antitrombotik olduğu gösterilmiştir **[104]**. Casey ve arkadaşları intra-arteriyel verdikleri tPA ile serbest fleplerdeki venöz trombüsün önlenebileceğini bildirmişlerdir **[77]**. Başka bir çalışmada geç dönemde gelişen atreriyel ve venöz tromboz tablosu gösteren fleplerde kateter yoluyla tPA verilerek fleplerin sağkalımı değerlendirilmiştir **[105]**. Byrne ve arkadaşları ise femorodistal bypass cerrahisi ve sonrasında serbest flep yapılan bir hastada trombolitik tedavi ile trombozun giderildiğini bildirmişlerdir **[78]**. Deneysel bir çalışmada ise tPA'nın sıçan kremaster kasına yönelik trombotik bir model üzerinde kas perfüzyonunu sağlanmasındaki rolü gösterilmiştir **[80]**.

Doku plazminojen aktivatörünün deri altı kullanımı ve venöz konjesyona bağlı flep kaybının önlenebildiğini gösteren yayınlar da vardır. Tran ve arkadaşları meme rekonstrüksiyonu amacıyla serbest TRAM ameliyatı sonrasında venöz tromboz gelişen ve birkaç kez ameliyathanede revizyona alınan olgunun flebinin ameliyat sonrası dönemde deri altı tPA enjeksiyonu ile kurtarıldığını bildirmişlerdir **[106]**. Atiyeh ve arkadaşları da parmak replantasyonu sonrasında pulpadan ve intra-arteriel yoldan verilen tPA ile parmaklardaki oksijen saturasyonunun arttığını göstermişlerdir **[107]**. Ayhan ve arkadaşları ise DIEAP ile meme rekonstrüksiyonu yapılan bir hastada tekrarlayan venöz konjesyonun postoperatif dönemde tPA uygulaması ile üstesinden gelinebildiği göstermişlerdir **[79]**.

Bizim çalışmamızda postoperatif 0., 1. ve 2. günlerde deri altına uygulanan tPA'nın kontrol grubuna göre 7. gündeki nekroz alanını azalttığı saptanmıştır. Ancak bu oran Nitrogliserin yama grubuyla benzer ve DMAH grubundan daha fazla olmasına rağmen arada istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Fleplerin ameliyat sonrası dönemde takibi flep kaybını en aza indirgeyebilmek amacıyla yapılmaktadır. Geleneksel metodlarda cilt rengi, deri turgoru, derinin ısısı ve kapiller geri dolum takipte sıkça kullanılmaktadır. El doppleriyle takip de geleneksel metodlar arasında sayılabilir **[108]**. Serbest flep nakillerinde iskemi oluşmasıyla bu durumun klinik olarak saptanması arasında geçen zamanla flebin kurtarılabilme ihtimali ters orantılıdır **[109]**. Bunun tespitinde de flep monitorizasyonu oldukça önemlidir. Son yıllarda flep

monitorizasyonuyla ilgili çeşitli yeni yöntemler literatürde yer almaktadır. Vücuda yerleştirilebilen doppler sistemi, renkli dupleks sonografi, kızılötesine yakın spektroskopi, mikrodializ ve lazer doppler akımölçer gibi cihazlar tanımlanmıştır **[110]**. Devamlı ölçü yapabilen, en az girişimsel özellikleri olan, kullanımı kolay ve sonuçları doğru olacak bir monitörizasyon cihazı en ideal olandır. Lazer doppler akımölçer (LDA) flep takiplerinde ve deneysel cerrahide kan akım hızı ölçümlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Lazer dopler akımölçer, belirli bir alana gönderilen lazer ışınlarının, o bölgedeki hareket eden eritrositler tarafından dağılması sonucu ortaya çıkan dopler etkisinin ölçülmesi ilkesi ile çalışır. Probun geometrik özelliğine bağlı olarak 8mm derinliğe kadar ölçüm yapılabilmektedir **[111]**. İlk kullanıldığı zamanlarda kan akım hızını ölçmede oldukça iyi bit yöntem olarak gösterilmesine rağmen bazı dezavantajlarının olduğu bilinmektedir. LDA'nın teknik olarak kalibrasyonu güçtür. Sistem probun hareketi, dokunun hareketi veya titreşime oldukça hassastır. Eğer anormal bir akım izleniyorsa probun tekrar yerleştirilmesi akım ölçümlerini düzeltebilir **[112]**. Sıçan gibi küçük hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda hayvanın solunumu gibi düzenli hareketler LDA verisi içinden net olarak ayıklanabilmektedir. Ancak yüzeyel anestezi nedeniyle deneklerin hareket etmesi ölçüm sonuçlarını olumsuz yönde etkiler. Bu nedenle çalışmamızda akım ölçümleri esnasında hayvanların derin anestezide olması için özen gösterilmiştir. Toplam 326 olgu içeren iki büyük çalışmada LDA'nın %100 duyarlılığa ve %94-100 arasında özgünlüğe sahip olduğu gösterilmiş. Ancak bu çalışmaya probun tekrar konumlandırıldığı olgular dahil edilmemiştir **[112, 113]**.

Deney esnasında flebin cerrahi öncesinde proksimal ve distal bölgelerinden alınan ölçümlerin tüm gruplarda benzer şekilde cerrahi sonrasında düştüğü görüldü. Üçüncü ve 7. gün ölçümleride de benzer şekilde tüm gruplarda akımda bir azalma gözlendi. Ancak kan akımı değişimleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi. 7. günde nekrotik alanların üzerinde yapılan ölçümler sıfıra yakındı.

Flep yaşayabilirliğin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden biri de yüzeyel nekroz alanlarının değerlendirilmesidir. Flep cerrahisi sonrasında yara iyileşmesi ve kontraksiyona bağlı preoperatif değerler değişime uğrayabilir. Bunun değerlendirmeyi bozmaması için çalışmada 7. günde flep nekroz alanı kontrakte olan tüm flep alanına göre değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda kontrol grubunda %51 olarak belirlenen flep nekroz oranı Nitroderm grubuna %38, actilyse grubunda ise %37 olarak saptanmıştır. Bu oranlar kontrol grubuna göre düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak Clexane grubunda %27 olarak saptanan nekroz oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Bu bulgu değerlendirildiğinde DMAH'ın antiinflamatuar etkilerinin flep yaşayabilirliğinin artmasında katkıda bulunduğu düşünüldü.

Histolojik değerlendirmeler sonucunda anjiogenez için yapılan immünhistokimyasal değerlendirme sonuçlarında nitroderm grubunda 3. günde belirgin olmak üzere anjiogenezin 7. günde de en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Kontrol grubundaki tutulumun 3. günden 7. güne istatistiksel olarak

anlamlı olarak artmış olmasına rağmen, Nitroderm başta olmak üzere diğer gruplardaki tutulum değerini yakalayamamıştır. Nitroderm grubunun anjiojenik özellikleri özellikle yaptığı venodilatasyon etkisiyle erken dönemde gelişen vazokonstrüksiyonu önleyerek dolaşımı arttırmasından dolayı olduğu düşünüldü.

Damar sayımında gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Lenfosit sayımında ise flebin distalinde 7. günde istatistiksel fark saptanmamış olup proksimalde ilaç gruplarında lenfosit miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı. DMAH ve Nitroderm grubunda ise tPA'ya göre lenfosit sayımı istatistiksel olarak anlamlıydı. İlaç gruplarında damar sayımı artmamasına rağmen immünhistokimyasal boyamada ilaç gruplarında kanlanmanın arttığı görüldü. Özellikle proksimal kısımlardaki kanlanma artışıyla birlikte inflamasyonun göstergesi olan lenfosit infiltrasyonu da korelasyon göstermişti.

Histolojik değerlendirmede nitroderm grubunda görülen mast hücreleri alerjik bir durumun olabileceğini düşündürdü. Literatürde nitrogliserine karşı ve Nitroderme yönelik gelişen alerjik durumlara yönelik çeşitli veriler bulunmaktadır. Nitroderme bağlı alerjinin nadir görüldüğü bildirilmekle beraber alerjik reaksiyonların uygulanma yeriyle sınırlı olabileceği veya tüm vücutta görülebileceği de bildirilmiştir **[114, 115]**.

Derialtı yolla uygulanan trombolitik, antikoagülan ve vazodilatatör ilaçların, gelişigüzel kanlanan deri fleplerinin distalindeki nekroz alanının yüzdesini belirgin olarak azalttığı görüldü. Bu ilaçlar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında DMAH uygulanan grupta bu fark istatistiksel olarak anlamlı

bulundu. Histolojik değerlendirmede anjiyogenezin Nitroderm uygulanan grupta daha belirgin olmak üzere tüm ilaç gruplarında arttığı saptandı. Tüm fleplerdeki kan akımının flebin proksimalinde ve distalinde cerrahi sonrası takiplerde azaldığı saptandı.

Genel olarak sistemik uygulaması olan trombolitik, antikoagülan ve vazodilatatör ilaçların sistemik yan etkileri ve flep distaline olan kan akımı azalmasına bağlı hedef dokuya ulaşmasında güçlükler mevcuttur. Bu nedenle bu ilaçların sistemik uygulama yerine doğrudan hedef doku üzerinde uygulaması ile etkilerinin artacağı görülmüştür.

ÖZET

Rekonstrüktif cerrahide deri flebi uygulamaları halen en sık uygulanan cerrahi girişimlerdir. Flepteki nekrozun önlenmesinde çeşitli medikal ajanlar kullanılmıştır.

Kaudal bazlı sıçan sırt flebi modeli oluşturulan 24 adet sıçan 4 gruba ayrıldı. Grup 1'de (n=6) flep kaldırıldı ve yerine iade edildi. Grup 2'de (n=6) cerrahiden hemen sonra, 1. ve 2. günde Clexane enjeksiyonu yapıldı. Grup 3'de (n=6) cerrahiden hemen sonra, 1. ve 2. günde Nitroderm yama yapıştırıldı. Grup 4'te (n=6) cerrahiden hemen sonra, 1. ve 2. günde Actilyse enjeksiyonu yapıldı.

Cerrahi öncesinde, flep kaldırıldıktan hemen sonra, 3. ve 7. günde lazer doppler akımölçer ile flebin proksimal ve distal yarısında kan akım hızları ölçüldü. Cerrahi sonrası 3. günde ve 7. günde histolojik değerlendirme için proksimal ve distal kısımlardan biyopsi alındı. Postoperatif 7. günde flep nekroz alanları belirlenmek üzere fotoğraflandı.

Tüm bu bulgular incelendiğinde nekroz oranları kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda belirgin azalmıştı. Ancak bu azalma sadece Clexane grubunda istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Lazer doppler akımölçer ile incelendiğinde kan akımının tüm gruplarda cerrahi sonrasında giderek azaldığı görüldü. Histolojik değerlendirme sonrası özellikle Nitroderm grubunda belirgin olmak üzere PECAM boyaması ile anjiyogenezin indüklendiği görüldü. Sonuç olarak sistemik kullanımı olan bu ilaçların deri altı uygulamalarının flep sağkalımını arttırdığı düşünüldü.

SUMMARY

Skin flaps are the most common applications in reconstructive surgery. Various medications are used to improve flap survival.

Caudally based dorsal flap model was applied to 24 rats in 4 groups. In Group 1 (n=6) flap was elevated and sutured. In Group 2 (n=6) Clexane was injected subcutaneously right after surgery at day 1 and day 2 postoperative respectively. In Group 3 (n=6) Nitroderm patch was applied right after surgery, day 1 and day 2 postoperatively. In Group 4 (n=6) Actilyse was injected subcutaneously right after surgery, day 1 and day 2 postoperatively.

Blood flow was measured with laser doppler flowmetry from the proximal and distal halves of flap, four times, such as before surgery, right after surgery, day 3 and day 7 postoperatively. Histologic samples were taken from proximal and distal halves at day 3 and day 7 postoperatively. Photographs were taken to determine flap necrosis areas at day 7 postoperatively.

Skin necrosis area was found less than control group in the medication groups, but only in Clexane group skin necrosis was significant statistically ($p<0,05$). Laser doppler flowmetry results showed gradual decrease in all groups with time, but results was not significant statistically. Histologic findings revealed induction of angiogenesis in all medication groups but Nitroderm group was more prominent. In conclusion medications which have systemic usage could be beneficial in improving flap survival when used subcutaneously.

KAYNAKLAR

1. Kayser M. Surgical flaps. Select Read Plast Surg, 1995. 8(1): p. 1-58.
2. Kerrigan CL, Daniel RK. Monitoring acute skin-flap failure. Plast Reconstr Surg, 1983. 71(4): p. 519-24.
3. Mathes. Plastic Sugery. Vol. 1. 2006, Saunders: Philadelphia.
4. Kerrigan CL, Daniel RK. Skin flap research: a candid view. Ann Plast Surg, 1984. 13(5): p. 383-7.
5. Nathanson SE, Jackson RT. Blood flow measurements in skin flaps. Arch Otolaryngol, 1975. 101(6): p. 354-7.
6. Palmer B, Jurell G, Norberg KA. The blood flow in experimental skin flaps in rats studied by means of the 133 xenon clearance method. Scand J Plast Reconstr Surg 1972. 6(1): p. 6-12.
7. Vedder NB. Plastic Surgery 2. ed. 2006. 483-506.
8. Reinisch JF. The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon. Plast Reconstr Surg, 1974. 54(5).
9. Pang CY, Neligan PC, Forrest CR, Nakatsuka T, Sasaki GH. Hemodynamics and vascular sensitivity to circulating norepinephrine in normal skin and delayed and acute random skin flaps in the pig. Plast Reconstr Surg, 1986. 78(1): p. 75-84.
10. Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. Plast Reconstr Surg, 1980. 65(2): p. 152-8.

11. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. Plast Reconstr Surg, 1983. 72(6): p. 766-77.

12. Cohen BE, Harmon CS, Phizackerley PJ. Glucose metabolism in experimental skin flaps. Plast Reconstr Surg, 1983. 71: p. 79-86.

13. Im MJ, Su CT, Hoopes JE, Anthenelli RM. Skin flap metabolism in rats: oxygen consumption and lactate production. Plast Reconstr Surg, 1983. 71: p. 79-86.

14. 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, 1983. 198: p. 87-90.

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

16. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free Radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology and relevance to plastic surgery. Plast Reconstr Surg, 1987. 79: p. 990-997.

17. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent ischemic myocardial injury by neutrophil dpletion in the dog. Circulation, 1983. 67: p. 1016-1023.

18. Butcher EC. Leukocyte- endothelial cell recognition: three (or more) steps to specify and diversity. Cell, 1991. 67(6): p. 1033-6.

19. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN. Role of neutrophils in ischemia- reperfusion- induced microvascular injury. J Clin İnvest, 1987. 92(2): p. 253(3 pt 2) : p. H699-703.

20. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflamatory roles of P- Selectin. J Clin İnvest, 1993. 92(2): p. 559-570.

21. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin -8. Nature, 1993. 92(2): p. 559-570.

22. Stotland MA, Kerrigan CL. The role of platelet-activating factor in musculocutaneous flap reperfusion injury. Plast Reconstr Surg, 1997. 99(7): p. p. 1989-99; discussion 2000-1.

23. Linas S, Whittenburg D, Repine JE. Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. Am J Physiol, 1997. 272(1 pt 2): p. p. F48-54.

24. Morikawa E, Huang Z, Moskowitz MA. L-arginine decreases infarct size caused by middle cerebral arterial occlusion in SHR. Am J Physiol, 1992. 263(5 pt 2): p. H 1632-5.

25. Payne D, Kubes P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. Am J Physiol, 1993. 265 (1 pt 1): p. G 189-95.

26. Siegfried MR, Erhardt J, Rider T, Ma XL, Lefer AM. Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors

in myocardial ischemia-reperfusion. J Pharmacol Exp Ther, 1992. 260(2): p. 668-75.

27. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. Circulation, 1992. 86(1): p. 279-88.

28. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Browne E. Improved perfusion after subcritical ischemia in muscle flaps treated with vascular endothelial growth factor. Plast Reconstr Surg,, 2000. 106(7): p. 1541-6.

29. Padubidri A, Browne E Jr. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. Ann Plast Surg 1996. 37(6): p. 604-11.

30. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, Senderoff D, Nhat PD, Phelps R, Urken ML et al. Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. Plast Reconstr Surg, 1998. 102(6): p. 2033-9.

31. Harrison R. Organic Nitrates and Nitrites. 2005, Wiley- VCH. 33-54.

32. Anderson TJ, Meredith IT, Ganz P, Selwyn AP, Yeung AC. Nitric oxide and nitrovasodilatators: Similarities, diferences and potential interactions. J Am Coll Card, 1994. 24: p. 555-66.

33. Abrams J. Beneficial actions of Nitrates in cardiovascular disease. Am J Cardiol, 1996. 77.

34. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium - derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84.

35. Fung HL, Chung SJ, Bauer JA, Chong S, Kowaluk EA. Biochemical action of organic nitrate action. Am J Cardiol, 1992. 70: p. 4B-10B.

36. Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T et al. An essential role for mitochondrial aldehyte dehydrogenase in nitroglycerin bioactyvation. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102: p. 12159-64.

37. Bauer JA, Fung HL. Arterial versus venous metabolism of nitrogycerin to nitric oxide: A possible explanation of organic nitrate venoselectivity. J Card Pharmacol, 1996. 28: p. 371-4.

38. Tadjkarimi S, O'Neil GS, Luu TN, Allen SP, Schyns CJ, Chester AH et al. Comparison of cyclic GMP in human internal mammary artery and saphenous vein: Implications for coronary artery bypass graft patency. Cardiovasc Res, 1992. 26: p. 297-300.

39. Antman, Cardiovascular Therapeutics. Third Edition ed., ed. Antman2007, Saunders Elsevier: Philadelphia.

40. Fung HL, Bauer JA. Mechanisms of Nitrate Tolerance Cardiovasc Drugs Ther., 1994. 8: p. 489-99.

41. Abrams J. Tolerance: An historical overview. Am J Cardiol, 1998. 81: p. 3A-14A.

42. Abrams J. Nitrates. Cardiol Clinics: Annual of Drug Therapy, 1997. 1: p. 25-40.

43. Abrams J. Clinical Practice: Chronic Stable Angina. N Engl J Med, 2005. 352: p. 2524-33.

44. Thadani U, Lipicky RJ. Short and long- acting oral nitrates for stable angina pectoris. Cardiovasc Drugs Ther., 1994. 8(8).

45. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. Plast Reconstr Surg, 1984. 73(6): p. 943-8.

46. Coto-Segura P, Ingelmo J, Alonso T, Sánchez-Sambucety P, Rodríguez-Prieto MA. Effectiveness of Topical Application of Nitroglycerin Spray to Increase Survival of Cutaneous Flaps and Grafts. Actas Dermosifiliogr., 2007. 98: p. 291-5.

47. Dunn CL, Brodland DG, Griego RD, Huether MJ, Fazio MJ, Zitelli JA. A single postoperative application of nitroglycerin ointment does not increase survival of cutaneous flaps and grafts. Dermatol Surg, 2000. 26: p. 425-7.

48. Coruh A, Abaci K, Gunay GK. Effect of topical nitroglycerine on the survival of ischemic flow-through venous flaps in rabbits. J Reconstr Microsurg, 2004. 20: p. 261-6.

49. Weitz JI. Low molecular weight heparins. N Engl J Med, 1997. 337(10): p. 688-98.

50. Andersson LO, Barrowcliffe TW, Holmer E, Johnson EA, Sims GE. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity

chromatography on matrix-bound antithrombin III and by gel filtration. Thromb Res, 1976. 9: p. 575-83.

51. Johnson EA, Kirkwood TB, Stirling Y, Perez-Requejo JL, Ingram GI, Bangham DR at al. Four heparin preparations: anti-Xa potentiating effect of heparin after subcutaneous injection. Thromb Res, 1976. 35: p. 586-591.

52. Carter CJ, Kelton JG, Hirsh J, Cerskus A, Santos AV, Gent M. The relationship between the hemorrhagic and antithrombotic properties of low molecular weight heparins and heparin. Blood, 1982. 59: p. 1239-1245.

53. Briant L, Caranobe C, Saivin S, Sié P, Bayrou B, Houin G et al. Unfractionated heparin and CY216: pharmacokinetics and bioavailabilities of the anti-factor Xa and IIa; effects of intravenous and subcutaneous injection in rabbits. Thromb Haemost, 1989. 61: p. 348-353.

54. Bratt G, Törnebohm E, Widlund L, Lockner D. Thromb Res. Low molecular weight heparin (KABI 2165, Fragmin): pharmacokinetics after intravenous and subcutaneous administration in human volunteers, 1986. 42: p. 613-620.

55. Mätzsch T, Bergqvist D, Hedner U, Ostergaard P. Effect of an enzymatically depolymerized heparin as compared with conventional heparin in healthy volunteers. Thromb Haemost, 1987. 57: p. 97-101.

56. Bara L, Samama M. Pharmacokinetics of low molecular weight heparins. Acta Chir Scand, 1988. 543: p. 65-72.

57. Bradbrook ID, Magnani HN, Moelker HC, Morrison PJ, Robinson J, Rogers HJ et al. ORG 10172: a low molecular weight heparinoid anticoagulant with a long half life in man. Br J Clin Pharmacol, 1987. 23: p. 667-675.

58. Hirsh J, Levine MN. Low molecular weight heparin. Blood, 1992. 79.

59. Weitz JI. Low molecular weight heparins. N Engl J Med, 1997. 337: p. 688-698.

60. Collins R, Scrimgeour A, Yusuf S, Peto R. Reduction in fatal pulmonary embolism and venous thrombosis by perioperative administration of subcutaneous heparin: overview of results of randomized trials in general, orthopedic, and urologic surgery. N Engl J Med, 1988. 318: p. 1162-73.

61. Geerts WH, Code KI, Jay RM, Chen E, Szalai JP. A prospective study of venous thromboembolism after major trauma N Engl J Med, 1994. 331: p. 1601-6.

62. Edmondson RA, Cohen AT, Das SK, Wagner MB, Kakkar VV. Low molecular weight heparin versus aspirin and dipyridamole after femoropopliteal bypass grafting. Lancet, 1994. 344: p. 914-8.

63. Leizorovicz A, Simonneau G, Decousus H, Boissel JP. Comparison of efficacy and safety of low molecular weight heparins and unfractionated heparin in initial treatment of deep venous thrombosis: a meta-analysis. BMJ, 1994. 309: p. 299-304.

64. Siragusa S, Cosmi B, Piovella F, Hirsh J, Ginsberg JS. Low-molecularweight heparins and unfractionated heparin in the treatment of patients with acute venous thromboembolism: results of a meta-anlysis. Am J Med, 1996: p. 269-77.

65. Lensing, A.e.a., Treatment of deep venous thrombosis with low-molecular-weight heparins: a meta-analysis. Arch Intern Med, 1995. 155: p. 601-607.

66. Klein, W., Low molecular weight heparin in the initial and prolonged treatment of unstable coronary artery disease — the fragmin in unstable coronary heart disease study (FRIC). Eur Heart J, 1996. 17: p. Suppl:306.

67. Cohen M, Demers C, Gurfinkel EP, Turpie AG, Fromell GJ, Goodman S. A comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin for unstable coronary artery disese. N Engl J Med, 1997. 337: p. 447-52.

68. Kay R, Wong KS, Yu YL, Chan YW, Tsoi TH, Ahuja AT et al. Low-molecular-weight heparin for the treatment of acute ischemic stroke. N Engl J Med, 1995. 333: p. 1588-93.

69. Miyawaki T, Jackson IT, Elmazar H, Bier UC, Barakat K, Andrus L et al. The Effect of Low-Molecular-Weight Heparin in the Survival of a Rabbit Congested Skin Flap. Plast Reconstr Surg, 2002. 109(6).

70. Malm K, Dahlbäck B, Arnljots B. Low-molecular-weight heparin (dalteparin) effectively prevents thrombosis in a rat model of deep arterial injury. Plast Reconstr Surg, 2003. 111(5): p. 1659-66.

71. Collen D, Lijnen HR. Thrombolytic agents. Thromb Haemost, 2005. 93(4): p. 627-630.

72. Todd JL, Tapson VF. Thrombolytic therapy for pulmonary embolism: a critical appraisal. Chest, 2009. 135: p. 1321-1329.

73. Wiman B, Collen D. On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and plasmin. Eur J Biochem, 1978. 84: p. 573-82.

74. Novokhatny V. Structure and activity of plasmin and other directthrombolytic agents. Thromb Res, 2008. 122.

75. Collen D, Lijnen HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. Blood, 1991. 78(12).

76. Campbell J, Hilleman D. Recombinant Peptides in Thrombolysis. Semin Thromb and Hemostasis, 2010. 36(5): p. 529-36.

77. Casey WJ 3rd, Craft RO, Rebecca AM, Smith AA, Yoon S. Intra-arterial tissue plasminogen activator: an effective adjunct following microsurgical venous thrombosis. Ann Plast Surg, 2007. 59(5): p. 520-5.

78. Parry DJ, Byrne P, Kessel D, Robertson I, Patel J, Batchelor A. Pharmacological salvage of a combined distal bypass and free flap with catheter-directed thrombolysis. Br J Plast Surg, 2002. 55: p. 140-167.

79. Ayhan S, Uygur S, Kucukoduk I, Sencan A. Salvage of a congested DIEAP flap with subcutaneous recombinant tissue plasminogen activator treatment. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2009. 62(11): p. 453-4.

80. Krapohl BD, Siemionow M, Zins JE. Tissue-plasminogen activator restores muscle flap perfusion in the rat. J Hand Surg Am, 1999. 24(5): p. 1036-44.

81. Bayramicli M. Deneysel Mikrocerrahi. 2005, ARGOS İletişim Hizmetleri.

82. Grabb W. Basic techniques of Plastic surgery. 1979, Little Brown: Boston. 36.

83. Kerrigan CL, Daniel RK. Pharmacologic treatment of the failing skin flap. Plast Reconstr Surg, 1982. 70: p. 541-548.

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

85. Pang CY, Chiu C, Zhong A, Xu N. Pharmacologic intervention of skin vasospasm and ischaemic necrosis in pigs. Cardiovasc Pharmacol, 1993. 21: p. 163-171.

86. Donavan W. Experimental model in skin flap research. The Skin Flaps, ed. M.M. Grabb. WC1975, Little Brown: Boston. 11-20.

87. Finseth F, Cutting C. An experimental neurovascular island skin flap for the study of the delay phenomenon. Plast Reconstr Surg, 1978. 61: p. 412-20.

88. Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Arterial ischaemia in skin flaps: Microcirculatory intravascular thrombosis. Plast Reconstr Surg, 1994. 93: p. 375-385.

89. Afridi N. Free flap failure: What to do next? Can J Plast Surg, 2000. 8: p. 30-32.

90. May JW Jr, Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV. The noreflow phenomenon in experimental free flaps. Plast Reconstr Surg, 1978. 61: p. 256-267.

91. Weinzweig N, Gonzalez M. Free tissue failure is not an allor-none phenomenon. Plast Reconstr Surg, 1995. 96: p. 648-660.

92. Emery FM, Kodey TR, Bomberger RA, McGregor DB. The effect of nifedipine on skin-flap survival. Plast Reconstr Surg, 1990. 85: p. 61-63.

93. Shalom A. Effect of asprin on random pattern flap survival in rats. Eur J Plast Surg, 2000. 23: p. 21.

94. Miyawaki T. The effect of capsaicin ointment on skin for the survival of cutaneous flap. Eur J Plast Surg, 2001. 24: p. 28.

95. Nakanishi Y, Nakajima T, Yoshimura Y, Okamoto Y, Yamada T. The trasnsepidermal absorbtion of prostaglandin E1 as a topical ointment: An experimental study of application over a rat skin flap. Ann Plast Surg, 1998. 40: p. 44-47.

96. Karacaoğlan N, Akbaş H. Effect of parenteral pentoxifyline and topical nitro-glycerine on skin flap survival. Otolaryngol Head Neck Surg, 1999. 120: p. 272.

97. Blomain E. Topical nitroglycerin ointment enhances the survival of skin flaps. Surg Forum, 1982. 33: p. 594-595.

98. Davis RE, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. Arch Facial Plast Surg, 1999. 1(1): p. 27-32.

99. Chung TL, Holton LH 3rd, Silverman RP. The effect of fondaparinux versus enoxaparin in the survival of a congested skin flap in a rabbit model. Ann Plast Surg, 2006. 56(3): p. 312-15.

100. Eom JS, Koh KS, Al-Hilal TA, Park JW, Jeon OC, Moon HT, Byun Y. Antithrombotic efficacy of an oral low molecular weight heparin conjugated with deoxycholic asset on microsurgical anastomosis in rats. Thromb Res, 2010. 126(3): p. 220-4.

101. Bazzoni G, Beltrán Nuñez A, Mascellani G, Bianchini P, Dejana E, Del Maschio A. Effect of heparin, dermatan sulfate and related oligoderivatives on human polymorphonuclear leukocyte function. J Lab Clin Med, 1993. 121(268): p. 275.

102. Tyrell DJ, Kilfeather S, Page CP. Heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. TIPS, 1993. 16: p. 198-204.

103. Dotan I, Hallak A, Arber N, Santo M, Alexandrowitz A, Knaani Y et al. Low-dose lowmolecular weight heparin (enoxaparin) is effective as adjuvant treatment in active ulcerative colitis: an open trial. Dig Dis Sci, 2001. 46: p. 2239-2244.

104. Hashimoto I, Nakanishi H, Shono Y, Yamano M, Toda M. The Features of Thrombus in a Microvessel Injury Model and the Antithrombotic Efficacy of Heparin, Urokinase, and Prostaglandin E1. Plast Reconstr Surg, 2003. 111(7).

105. Trussler AP, Watson JP, Crisera CA. Late free-flap salvage with catheter-directed thrombolysis. Microsurgery, 2008. 28(4): p. 217-22.

106. Tran NV, Bishop AT, Convery PA, Yu AY. Venous congestive flap salvage with subcutaneous rtPA. Microsurgery, 2006. 26(5): p. 370-2.

107. Atiyeh BS, Hashim HA, Hamdan AM, Moucharafieh RS. Local recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) thrombolytic therapy in microvascular surgery. Microsurgery, 1999. 19: p. 265-71.

108. Jones BM. Monitors for the cutaneous microcirculation. Plast Reconstr Surg, 1984. 73: p. 843-850.

109. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. Microsurgery, 2004. 24: p. 468-475.

110. Smit JM, Zeebregts CJ, Acosta R, Werker PM. Advancements in free flap monitoring in the last decade: a critical review. Plast Reconstr Surg, 2010. 125(1): p. 177-85.

111. Hölzle F, Loeffelbein DJ, Nolte D, Wolff KD. Free flap monitoring using simultaneous non-invasive laser Doppler flowmetry and tissue spectrophotometry. J Craniomaxillofac Surg, 2006. 34: p. 25-33.

112. Heller L, Levin LS, Klitzman B. Laser Doppler flowmeter monitoring of free-tissue transfers: Blood flow in normal and complicated cases. Plast Reconstr Surg, 2001. 107: p. 1739-1745.

113. Yuen JC, Feng Z. Monitoring free flaps using the laser Doppler flowmeter: Five-year experience. Plast Reconstr Surg, 2000. 105: p. 55-61.

114. Roche Gamón E, De la Cuadra Oyanguren J, Pérez Ferriols A, Fortea Baixauli JM. Contact Dermatitis from Nitroglycerin in a Transdermal Therapeutic System. Acta Derm Venereol, 2006. 86: p. 544-545.

115. Pérez-Calderón R, Gonzalo-Garijo MA, Rodríguez-Nevado I. Generalized allergiccontact dermatitis from nitroglycerin in a transdermal therapeutic system. Contact Dermatitis, 2002. 46: p. 303.