



**T.C**

**BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ**

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ**

**ANABİLİM DALI**

**SIÇAN KASIK FLEP MODELİNDE MAGNEZYUM SÜLFAT  
UYGULAMASININ FLEP FİZYOLOJİSİ VE SAĞKALIMINA ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Azer ZEYNALOV**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kemalettin YILDIZ**

**İSTANBUL2018**

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında yapıcı ve bilimsel eleştirilerini esirgemeyen, plastik cerrah olma yolunda benimle değer biçilemez bilgi ve deneyimlerini paylaşan, bana plastik cerrah olmanın ayrıcalığını hissettiren, gösterdikleri emek, gayret ve desteklerinden dolayı tez danışmanı hocam Sayın Doç. Dr. Kemalettin YILDIZ'a, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ethem GÜNEREN'e, Sayın Prof. Dr. Selma SÖNMEZ ERGÜN'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Osman KELAMETOĞLU'na, sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Birlikte çalıştığım ve hiçbir zaman yardım ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Turan MEHDİZADE, Arş. Gör. Dr. Mustafa ÜNAL, Arş. Gör. Dr. Mustafa EKREM GÜLEŞ, Arş. Gör. Dr. Tuğba DÜLGEROĞLU, Arş. Gör. Dr. Ufuk DURGUN, Arş. Gör. Dr. Ali Yeniocak ve BVÜTF Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği hemşire ve personeline teşekkürü borç bilirim. Deney laboratuvarının veterineri Mert ÇELİK, Önder beye teşekkür ederim. Biokimya Anabilim Dalı Öğretim görevlisi Eray METİN GÜLER'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Hayatım boyunca yetişmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan değerli anne ve babama, çok sevdiğim kardeşim Tural'a ve eşime, hayatımdaki bütün iyi öğretmenlere sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY.....                                              | i    |
| TEŞEKKÜR.....                                                   | ii   |
| İÇİNDEKİLER.....                                                | iii  |
| KISALTMALAR DİZİNİ.....                                         | v    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                            | vi   |
| TABLolar DİZİNİ.....                                            | vii  |
| GRAFİKLER DİZİNİ .....                                          | viii |
| ÖZET.....                                                       | 1    |
| SUMMARY.....                                                    | 2    |
| GİRİŞ .....                                                     | 3    |
| GENEL BİLGİLER .....                                            | 5    |
| -Mikrocerrahinin Tarihçesi .....                                | 5    |
| -Flep Tarihçesi .....                                           | 6    |
| -Deri Kanlanması .....                                          | 7    |
| -Derinin Kanlanmasının Sınıflandırılması .....                  | 10   |
| -Direkt Kutanöz Damarlar .....                                  | 10   |
| -İndirekt Kutanöz Damarlar .....                                | 10   |
| -Anjiozom Kavramı .....                                         | 11   |
| -Flep Fizyolojisi .....                                         | 11   |
| -Damar Duvarının Yapısı.....                                    | 12   |
| -Anastomoz Hattının İyileşmesi .....                            | 13   |
| -Anastomoz Tektikleri .....                                     | 15   |
| -Uç-Uca Anastomoz.....                                          | 15   |
| -Uç-Yan Anastomoz .....                                         | 16   |
| -Yeni Damar Oluşumu.....                                        | 16   |
| -İskemi Reperfüzyon Hasarı.....                                 | 19   |
| -Hücresinin Programlı Ölümü ( Apoptoz).....                     | 22   |
| Çalışmada Kullanılacak Belirteçlere İlişkin Genel Bilgiler..... | 26   |

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>                            | <b>32</b> |
| -Gereç .....                                               | 33        |
| -Denekler, Barınma, Beslenme .....                         | 33        |
| -Operasyona Hazırlık ve Anestezi .....                     | 33        |
| -Cerrahi Teknik .....                                      | 33        |
| -Grupların Planlanması ve Çalışmanın Dizaynı .....         | 34        |
| -Doku Perfüzyonunun Değerlendirilmesi .....                | 36        |
| -Doku Analizleri .....                                     | 36        |
| -Biokimyasal Değerlendirme .....                           | 36        |
| -Anastomoz Patensi Değerlendirilmesi .....                 | 38        |
| -İstatistiksel Değerlendirme .....                         | 38        |
| <b>BULGULAR .....</b>                                      | <b>40</b> |
| -Doku Perfüzyon Sonuçlarının Analizi .....                 | 40        |
| -Biokimyasal Sonuçların Analizi .....                      | 47        |
| Oksidatif Stres Belirteçlerinin Sonuçlarının Analizi ..... | 52        |
| <b>TARTIŞMA .....</b>                                      | <b>58</b> |
| <b>SONUÇ .....</b>                                         | <b>62</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                     | <b>63</b> |

## KISALTMALAR DİZİNİ

|                                 |                                        |
|---------------------------------|----------------------------------------|
| <b>EGF</b>                      | Epidermal büyüme faktörü               |
| <b>ESM</b>                      | Ekstraselüler matriks                  |
| <b>DNA</b>                      | Deoksiribonükleik asit                 |
| <b>FGF</b>                      | Fibroblast büyüme faktörü              |
| <b>HIF-1<math>\alpha</math></b> | Hipoksi ile indüklenen faktör          |
| <b>LDF</b>                      | Lazer doppler flowmetre                |
| <b>NMDA</b>                     | N-Metil-D-Aspartik asit                |
| <b>MMP-2</b>                    | Matriks metalloproteinaz-2             |
| <b>MMP-9</b>                    | Matriks metalloproteinaz-9             |
| <b>NO</b>                       | Nitrik oksit                           |
| <b>OSİ</b>                      | Oksidatif stres indeksi                |
| <b>PDGF</b>                     | Trombosit kaynaklı büyüme faktörü      |
| <b>PLC</b>                      | Fosfolipaz C                           |
| <b>PLD</b>                      | Fosfolipaz D                           |
| <b>PKC</b>                      | Protein kinaz C                        |
| <b>PMNL</b>                     | Polimorf nüveli lökosit                |
| <b>CyPA</b>                     | Siklofilin A                           |
| <b>SOR</b>                      | Serbest oksijen radikali               |
| <b>SOD</b>                      | Süperoksit dismutaz                    |
| <b>TNF</b>                      | Tümör nekroz faktör                    |
| <b>TAS</b>                      | Toplam antioksidan kapasite            |
| <b>TOS</b>                      | Toplam oksidan kapasite                |
| <b>VEGF</b>                     | Damar endoteli kaynaklı büyüme faktörü |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil-1. İskemi varlığında choke anastomotik damarların açılması..... | 8  |
| Şekil-2. İskemi reperfüzyon sürecindeki metabolik değişiklikler.....  | 9  |
| Şekil-3. İskemi reperfüzyon hasarı ve apoptoz.....                    | 10 |
| Şekil-4. İskemi reperfüzyon hasarı ve sonuçları.....                  | 11 |
| Şekil-5. Grupların şematik görünümü.....                              | 12 |



## TABLÖLAR DİZİNİ

|           |                                                                                                                               |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo-1.  | Grup 1'in LDF perfüzyon sonuçları.....                                                                                        | 40 |
| Tablo-2.  | Grup 2'nin LDF perfüzyon sonuçları.....                                                                                       | 41 |
| Tablo-3.  | Grup 3'ün LDF perfüzyon sonuçları.....                                                                                        | 41 |
| Tablo-4.  | Grup 4'ün LDF perfüzyon sonuçları.....                                                                                        | 42 |
| Tablo-5.  | Gruplar arası perfüzyon değerlerinin karşılaştırılmasındaki<br>istatistiksel anlamlılık (Kruskal-Wallis varyans analizi)..... | 46 |
| Tablo-6.  | Gruplar arasında perfüzyon değerlerinin anlamlılığının<br>değerlendirilmesi (Mann-Whitney U testi).....                       | 46 |
| Tablo-7.  | Grup içi perfüzyon değerlerinin zaman içinde değişiminin<br>karşılaştırılması (Wilcoxon Signed Ranks Test).....               | 47 |
| Tablo-8.  | Grup 1'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları.....                                                               | 47 |
| Tablo-9.  | Grup 2'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları.....                                                               | 48 |
| Tablo-10. | Grup 3'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları.....                                                               | 48 |
| Tablo-11. | Grup 4'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları.....                                                               | 49 |
| Tablo-12. | Biokimyasal değerlerinin karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılık<br>(Kruskal-Wallis varyans analizi).....               | 51 |
| Tablo-13. | Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında biokimyasal<br>değerlerinin istatistiksel anlamlılığı (Mann Whitney U testi)..... | 51 |
| Tablo-14. | Grup 1'in oksidatif stres belirteç değerleri.....                                                                             | 52 |

|           |                                                                                                                 |    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo-15. | Grup 2'nin oksidatif stres belirteç değerleri.....                                                              | 52 |
| Tablo-16. | Grup 3'ün oksidatif stres belirteç değerleri.....                                                               | 53 |
| Tablo-17. | Grup 4'ün oksidatif stres belirteç değerleri.....                                                               | 53 |
| Tablo-18. | Oksidatif stres belirteçlerinin istatistiksel analizi (Kruskal-Wallis varyans analizi).....                     | 56 |
| Tablo-19. | Gruplar arasında oksidatif stres belirteç değerlerinin karşılaştırılması (Mann Whitney U testi ile analiz)..... | 57 |



## GRAFİKLER DİZİNİ

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Grafik-1. Vazospazm öncesinin perfüzyon değerlerinin grafik olarak sunumu.....         | 43 |
| Grafik-2. Vazospazm esnasında perfüzyon değerlerinin grafik olarak sunumu.....         | 43 |
| Grafik-3. Vazospazm sonrasının perfüzyon değerlerinin grafik olarak sunumu.....        | 44 |
| Grafik-4. Amekiyat sonrası 7. gün perfüzyon değerlerinin grafik olarak sunumu.....     | 44 |
| Grafik-5. Gruplar arasında biokimyasal değerlerinin değişiminin karşılaştırılması..... | 49 |
| Grafik-6. Toplam oksidan kapasite değerlerinin grafik olarak sunumu.....               | 54 |
| Grafik-7. Toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafik olarak sunumu.....           | 55 |
| Grafik-8. Oksidatif stres indeksi değerlerinin grafik olarak sunumu.....               | 55 |

## ÖZET

Serbest doku nakillerinde vazospazm flep perfüzyonunu bozan, nekroza neden olabilecek önemli bir sorundur. Vazospazmı çözmek için pek çok cerrahi teknik ve ilaç kullanılmıştır. Bu çalışmadaki amacımız magnezyum sülfatı hem damar içi hem de damar üzerine uygulayarak flep perfüzyonunu değerlendirmektir.

40 adet Sprague Dawley sıçan 4 gruba ayrıldı. Tüm deneklere kasık flebi planlandı. Pediküle traksiyon uygulaması yapılarak vazospazm gerçekleştirildi. Femoral arter transeksiyonu ve anastomozu yapıldı. 1. grup için damar üzerine serum fizyolojik, 2. grupta damar üzerine %10 magnezyum sülfat, 3. grupta intraarteriyel olarak %10 magnezyum sülfat, 4. grupta hem intraarteriyel hem de damar üzerine %10 magnezyum sülfat uygulandı. Lazer doppler flowmetre ile vazospazm öncesi, esnasında, sonrasında ve 7. gün sakrifikasyon öncesinde doku perfüzyonu ölçüldü. Alınan doku biyopsisi örneklerinde EGF, VEGF, MMP-2, MMP-9, HIF-1 alfa, Cyclophilin-A, TAS, TOS, OSI değerlerine bakıldı.

Anastomoz sonrası ve 7. gün patensi değerlendirildi. 4. grupta flep perfüzyonu, angiogenez belirteçleri değerlerinin anlamlı derecede yüksek olduğu, iskemi-reperfüzyon hasarı ile apoptoz değerlerinin ise anlamlı derecede düşük olduğu ( $p<0,005$ ) saptandı. Gruplar arasında anastomoz patensi açısından fark gözlenmedi.

Bu çalışmada magnezyum sülfatın hem flep damar içine hem de anastomoz hattı üzerine uygulanmasıyla ve diğer uygulamalara oranla vazospazmın daha etkin şekilde düzeldiği ve flep perfüzyonu olumlu yönde değiştirdiği gözlemlendi. Bu sonuçlara göre bu tedavi modelinin klinik ve deneysel serbest doku nakilleri çalışmalarında kullanılabileceği kanatine varıldı.

## SUMMARY

Vasospasm in free tissue transfers is a serious problem that can cause necrosis, which impairs flap perfusion. A lot of surgical techniques and medications were used to resolve vasospasm. In this study, our aim is to evaluate the flap perfusion by applying magnesium sulfate both into intravenous and intravenous

40 sprague dawley rats were divided into 4 groups. Groin flap was planned for all experimental rats. Vasospasm has been carried out by pedicle traction. Femoral artery transection and anastomosis are performed. Normal saline was applied on the vessel of group 1, 10% magnesium sulphate in the 2nd group, Intraarterial 10% magnesium sulphate in the 3rd group, 10% magnesium sulphate on vessel and intraarterial in the 4<sup>th</sup> group respectively. Tissue perfusion was measured by laser doppler flowmeter (LDF) before, during, and following vasospasm before sacrifice on 7<sup>day</sup>. The degrees of EGF, VEGF, MMP-2, MMP-9, HIF-1 alpha, cyclophilin-A, TAS and TOS were monitored in samples of tissue.

Following anastomosis, patency was evaluated on 7<sup>th</sup>.day In group 4, flap perfusion and angiogenesis markers were found to be significantly higher, while ischemia-reperfusion injury and apoptosis were found to be significantly lower ( $p < 0.005$ ). There was no difference in terms of anastomotic patency among the groups.

In this study, with the application of Magnesium sulfate both into intra-arterial and onto the anastomosis, it was observed that vasospasm improved more effectively compared to others. According to these results, it was concluded that this treatment model can be used for clinical and experimental free tissue transfer studies.

## GİRİŞ

Mikrocerrahi, rekonstrüktif cerrahinin vazgeçilmez parçasıdır. Damar anastomozlarının yapılması ile hem ampute uzuv parçalarına replantasyon yapılabilmekte, hem de tedavisi zor ve komplike doku defektlerinin onarımı mümkün olmaktadır. Ameliyat başarılarını arttırmak için daha iyi mikroskoplar, daha hassas cerrahi aletler ve dikişler geliştirilmiştir. Mikrocerrahi eğitimi için birçok yerde hayvan laboratuvarları kurulmuştur ve mikrocerrahi kursları düzenlenmiştir. Aynı zamanda damar anastomoz tekniklerinde ve damar anastomozu bölgelerinde histomorfolojik olarak çalışmalar yapılmıştır.<sup>1,2,3</sup> Bu gelişmelere rağmen hala istenilen sonuca tam olarak ulaşamamıştır.

Anastomoz yapılan damarlarda oluşan tıkanıklık, replante edilmiş uzvun ya da defekt onarımı için yapılan serbest dokunun tamamen kaybedilmesine yol açmaktadır.<sup>4</sup> Farklı anastomoz teknikleri ile akımlar karşılaştırılmış ancak cerrahi teknikler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.<sup>5,6</sup> Yine de literatürde dikiş teknikleri arasında en iyi sonucun aralıklı basit dikiş tekniği ile alındığı bildirilen yayınlar bulunmaktadır.<sup>7</sup> Farklı dikiş materyallerinin anastomoz sonrası tıkanıklık oranına etkileri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.<sup>8</sup> Anastomoz sırasında ve sonrası takip ile ilgili farklı farmakolojik ajanlar denenmiş olup; daha çok lokal sempatik etkiyi ortadan kaldıran ve tromboz oluşmasını engelleyen ajanlar ile anlamlı başarı sağlanmıştır.<sup>9,10,11</sup>

Günümüzde rekonstrüktif cerrahide serbest doku nakli önemli bir yer tutmaktadır. Serbest doku nakillerinin başarı oranı %90'ın üzerindedir.<sup>12</sup> Mikrocerrahide damar komplikasyonlarının patogeneğinde 3 önemli olay mevcuttur: tromboz, iskemi-reperfüzyon hasarı ve vazospazmdır.<sup>13,14,15</sup> Tromboz oluşumu için staz, endotel hasarı, hiperkoagülebilite gereklidir. Damar duvarında oluşan spazm ve buna bağlı gelişen staz ve kan akımındaki azalma trombüs oluşumuna neden olur.<sup>16</sup>

Vazospazm flebin kanlanması azaltarak flep sağkalımını etkiler. Epinefrin, norepinefrin, serotonin, tromboxan A<sub>2</sub>, prostaglandin F<sub>2</sub> vazospazm oluşturan mediatörlerdir. Hipotermi ve alfa adrenerejik reseptörlerin uyarımı da vazospazm oluşturan nedenler arasındadır.<sup>17</sup> İntraoperatif mikrovasküler anastomoz esnasında damara yapılan müdahaleler de vazospazm oluşturabilmektedir. Uzayan vazospazm oksijen radikalleri oluşturarak doku hasarını artırmaktadır.<sup>18</sup> Vazospazm genelde kendiliğinden çözülebilirken bazı nedenlerle uzayan

vazospazm flebin kanlanması ciddi anlamda tehlikeye sokabilir ve flep sağkalımını etkiler.<sup>19</sup> Vazospazma sekonder olarak oluşan iskemi-reperfüzyon hasarını önlemek için vazospazm gelişimini önlemek veya süresini kısaltmak gereklidir.<sup>20</sup> Vazospazm hem anastomoz sırasında hem de anastomoz sonrası dönemde engellenmeye çalışılmalıdır.<sup>21,22</sup>

Vazospazmı çözmek için farklı teknikler ve ilaçlar kullanılır. Bunlar (lidokain, nikardipin, verapamil, nifedipin, sodyum nitroprusid, ve hidralazin papaverin, pentoksifillin, magnezyum sülfat, fentolamin ve klorpromazin gibi farmakolojik ajanlar denenmesine, rejyonel bloklar uygulanmasına, sempatektomi, hastanın ısıtılmasına kadar birçok tedavi yöntemi geliştirilmiş olsa da etkinlikleri literatürde tartışmalıdır.<sup>23,24,25</sup> Nörotoksin uygulaması ile damar çaplarının daha geniş olduğu gösterilmiş ve daha yüksek patens oranına ulaşıldığı saptanmıştır.<sup>26</sup> Sempatektominin vasküler tonusu azaltarak, mikrodolaşımı arttırdığı gözlenmiştir.<sup>27</sup> Ayrıca epidural anestezide sempatik sistem bloke edilmekte ve kan dolaşımı artmaktadır.<sup>28</sup>

Magnezyum sülfatın, astım tedavisi, nöprotektif olarak, migren, preklampsi, eklampsi epilepsi tedavisi gibi farklı klinik uygulama alanları mevcuttur.<sup>29,30</sup> Magnezyum sülfat bronkodilatator, bronkoprotektif etki göstererek astım tedavisinde kullanılır.<sup>31</sup> Aynı zamanda kalsiyum kanal blokörü olarak işlev görerek kalsiyumun düz kaslara girmesini engellemek suretiyle bronkodilatasyon yapar. Magnezyum sülfat nöprotektif etkisini glutamat bağımlı N-Metil-D-Aspartik asit (NMDA) bloke ederek gösterir. Nöprotektif olarak serebral palsiyi önemli ölçüde azaltır.<sup>32,33</sup> Magnezyum sülfatın diğer etkileri arasında antioksidant etki, membran stabilizasyonu, glutamat bağımlı kalsiyum kanal blokörü, serebral kan akımını artırma, proinflamatuvar sitokinlerin azaltılması gibi fonksiyonları vardır. Preklampsi, eklampsiye bağlı felçlerin tedavisinde kullanılır.<sup>34</sup> Amacımız sıçanların kasık fleplerindeki femoral arterde yapacağımız anastomoza magnezyum sülfat uygulayarak damar anastomozu ve flep sağkalımına etkisini gözlemlemektir.

Ameliyat esnasında vazospazm önceden bilinemez, ve serbest doku nakillerinin başarısı için kritik öneme sahiptir.<sup>35</sup> Adventisyanın soyulması, dilatatör ile vasküler lümenin dilate edilmesi, uygulanan topikal vazodilatatörler veya spazmolitik ajanlar ile vasküler spazm giderilebilir. Bu çalışma modelinde %10'luk magnezyum sülfat uygulamasının vazospazm, flep doku perfüzyonu ve flep fizyolojisi üzerine etkisi araştırılmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### Mikrocerrahinin Tarihçesi

Carrel ve Guthrie XX yılların başında deney hayvanlarında uzuv replantasyonu ve böbrek transplantasyonu yapmıştır.<sup>36,37</sup> Alexis Carrel 1902 yılında uç-uca damar anastomozunda trianguler metodu tarif etmiş ve 1912 yılında Nobel ödülü almıştır.

İlerleyen yıllarda Höpfner köpeklerde ilk ekstremité replantasyonunu gerçekleştirmiştir.<sup>38</sup>

Nylen 1921'de ilk kez mono oküler mikroskobu iç kulak ve kulak zarı operasyonları için kullanmıştır.<sup>39,40,41</sup> Holmgren 1923'de binoküler mikroskop kullanmıştır.<sup>42</sup>

İlerleyen yıllarda antikoagulanlar intraoperatif olarak kullanılmaya başlandı.<sup>43,44</sup> Mikrovasküler anastomoz terimi ilk defa Jacobson tarafından ortaya atılmıştır. Mikrovasküler cerrahinin gelişiminde dönüm noktalarından biri de 1961 yılında operasyon mikroskobunun Jacobson ve Suarez tarafından vasküler anastomozda kullanımıdır.<sup>45</sup> Çalışmacılar 1,4 mm çapındaki tavşan damarlarını 7/0 ipek dikişle % 100 başarı ile anastomoz yapmışlardır.<sup>46</sup>

1962 yılında Malt ve McKhan, 1963 yılında Chen ve Chien ilk başarılı ön kol replantasyonu vakalarını sunmuşlardır.<sup>47,48</sup> 1963 yılında Kleinert ve Kasdan başarısız da olsa loop ile subtotal ampute bir başparmakta revaskülarizasyon deneyimlerini yayınlamışlardır.<sup>49</sup> 1964 yılında Nakayama, 1965 yılında Jurkiewicz ve Saldenberg serbest jejunum flebi ile özofagus rekonstrüksiyonu olgularını bildirmişlerdir.<sup>50</sup> Bunlar plastik cerrahi tarihindeki ilk başarılı serbest flep uygulamaları olarak kabul edilmektedir.

1964 yılında Buncke tavşan kulağındaki 1 mm çaplı damarda anastomoz yaparak replantasyonlar gerçekleştirmiştir.<sup>51</sup>

Komatsu ve Tamai 1965 yılında ilk başarılı başparmak replantasyonu olgularını yayınlamışlardır.<sup>52</sup>

Chen ve ark. 1966-1967 yıllarında 5 vakada el 1. Parmak rekonstrüksiyonu için ayak 2. Parmağı John Cobbett ayak 1. parmağı kullanmıştır.<sup>53</sup>

1972 yılında Fujino ve ark. köpeklerde fonksiyonel meme glandı transferini gerçekleştirmiştir.<sup>54</sup> McLean ve Buncke skalp rekonstrüksiyonuna büyük omentum transferi yapmışlar.<sup>55</sup> 1973 yılında Danial ve Taylor serbest kasık flebini kullanmıştır.<sup>56</sup>

1975 yılında Miller ve ark. ilk kez avülze skalpin replantasyonunu yapmıştır.<sup>57</sup> İlerleyen yıllarda gelişen teknoloji mikrovasküler alanındada gelişme göstermiştir. Daha hassas aletler daha iyi mikroskoplar damar anastomozu alanında gelişmeler trombozu engelleyen yöntemlerin kullanılması serbest flep cerrahisinde başarıyı artırmıştır.

1998 yılında Dubernard ve ekibi, insanda ilk el transplantasyonunu yaparak allotransplantasyonda yeni bir sayfa açmıştır.<sup>58</sup>

2005 yılında Dubernard ve onun ekibi köpek ısırması sonucu burun, üst ve alt dudak ile çenede deformitesi oluşan bir hastaya ilk yüz allotransplantasyonunu gerçekleştirdiler.<sup>59</sup>

2009-2010 yılında Siemionow ve ark. yüzün tümüne yakınının transplantasyonu gerçekleştirmiştir.<sup>60,61</sup>

## **Flep Tarihçesi**

Sushruta Samhita MÖ VI. yüzyılda Hindistan'da yaşamış ve birçok hastalığın tedavisi ve ameliyatlarını anlatan kitabı yazmıştır. Kitabında burun rekonstrüksiyonu, kulak lobu rekonstrüksiyonu konularına değinmiştir.<sup>62</sup>

XVI yüzyılda Tagliacozzi burun onarımında random distal pediküllü önkol fleplerini kullanmıştır.<sup>63,64</sup> XIX yüzyıldaki çalışmalar von Graefe (1818), Mutter (1843), Dieffenbach (1845), Gersuny (1887) ve diğerleri üzerinde ağırlık kazanır.<sup>65</sup> Flep transferinin modern plastik cerrahi teknikleri 1917-1920 yıllarında Gillies ve Filatov pediküllü tüp flep'in anlatıldığı makalelerini yayınlamıştır. Random paternli bu flepler 1:1 ve 2:1 oranında kullanılmıştır.<sup>66</sup>

1950 – 1960 yıllarında özellikle baş boyun bölgesi rekonstrüksiyonu ile ilgili birçok flep yapılmıştır. Mc Gregor ve Jackson aksiyel paternli deri fleplerini tanımlamıştır. Kas flebi ilk defa Ger tarafından 1968 yılında tarif edilmiştir.<sup>67</sup>

1970'li ve 1980'li yıllarda derinin kan akımı daha iyi anlaşılmış ve kas–deri flepleri kullanılmaya başlanmıştır. 1980 yıllarında fasiyokutan flepler kullanılmıştır. Deri kanlanmasının daha iyi bilinmesiyle lokal fleplerle daha başarılı doku defekti onarımı yapılmış ve doku defekti onarımında aksiyel flepler, perföratör flepler, serbest doku nakilleri daha da sık kullanılmaya

başlanmıştır. Buncke, Harii, Taylor, Daniel ve diğerlerinin öncülüğünde mikrovasküler serbest doku aktarımları gerçekleştirilmiştir.<sup>68</sup>

1971 yılında Strauch ve ark. ilk kez deneysel olarak köpek mandibulasına pediküllü vaskularize kemik flebini transfer etmiştir.<sup>69</sup> Aynı yılda Tamai ve ark. deneysel olarak köpeklerde bütün diz transplantasyonu gerçekleştirmiştir.<sup>70</sup>

1973 yılında serbest pektoralis majör kas flebi transferi yapıldı.<sup>71</sup> İlerleyen yıllarda serbest grasilis flebi fasiyal paralizi tedavisinde kullanıldı.<sup>72</sup> Aynı yılda Harii ve ark. Ueba ve Fujikawa serbest fibula transferi yapıldı.<sup>73</sup>

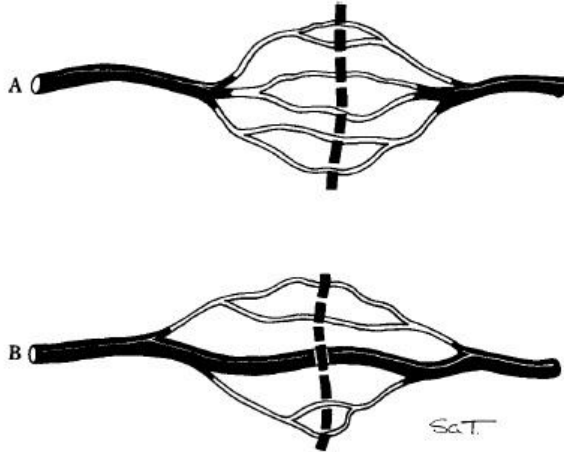
1989 yılında Koshima ve Soeda insanda derin inferior epigastrik arter perforatoru flebini kullandı. Bu yıldan sonra perforator flep kullanımı popülerize olmuştur.<sup>74</sup>

### **Derinin Kanlanması**

Derinin dolaşımının zengin ve geniş olmasına rağmen, deri bileşenlerinin metabolik ihtiyaçlarının az olması nedeniyle derinin yaşayabilirliği için mevcut deri dolaşımının yalnız küçük bir parçası yeterlidir.<sup>75</sup> Kutanöz arterler doğrudan (direkt) alttaki kaynak arterden veya derin dokuları özellikle kasları besleyen kaynak arter dallarından dolayı (indirekt) olarak köken alırlar. Buradan kutanöz arterler kasların arasından veya içerisinden derin dokuların bağ dokusu çatısını takip eder ve deri fasyayı sararak dış yaprağın altında değişken uzunlukta ilerler. Genellikle belirli sabit noktalarda kutanöz perforatörler olarak bu yapıları delerler.<sup>76</sup> Derin fasyayı geçtikten sonra fasya ve alt yüzdeki yağ dokusunu besleyen dallar vererek, arterler değişken mesafede derin fasyanın yüzeyinde ilerlerler. Daha sonra subkutan yağ dokusunun lobulleri arasında kıvrılarak ilerler sonunda deriyi beslemek için tekrar değişken mesafelerde ilerleyecekleri subdermal pleksusa ulaşırlar. Kutanöz arterler (venler) ile uzun kanallar veya damar sisteminin oluşturduğu zincir sistemi ile beraber ilerlerler.<sup>77</sup> Kutanöz perforatörlerin yoğunluğu, hacmi ve yönü vücudun büyüme, farklılaşma ve fonksiyonel gereksinimlerine göre oluşur. Genelde baş, boyun, gövde ve proksimal ekstremitte damarları önkol, bacaklar, eller ve ayaklardaki karıştılarından geniş ve birbirlerinden daha geniş aralıklıdır.<sup>78</sup> Kutanöz perforatörlerin çapı ve uzunluğu değişken olmakla beraber hepsi birbirleriyle bağlanarak dermis, subdermis, subkutanöz yağ dokusunun altında ve derin fasyanın dış yüzeyinde özellikle iyi gelişmiş horizontal tabaka halinde üç boyutlu "vücut örtüsü"nü oluştururlar.



Birbirine komşu kutanöz damarlar arasındaki bağlantı ya çapı değişmeyen gerçek anastomozlarla veya çapı daralmış "choke" anastomotik damarlarla olur (şekil-1).<sup>79</sup> Bu "choke" anastomozlar deride (deri ve deri altı dokuda) daha fazladır ve sağlam deriye kan akımını regülasyonunda rolleri önemli olabilir. Bu "choke" damarlar flep ucu ve flep tabanı arasındaki flebe kan akımına başlangıçta direnç sağlayarak deri flebi sağ kalımında önemli bir rol oynarlar. Deri flebi boyunca kutanöz perforatörler kesilerek geciktirme işlemi yapıldığında bu choke damarlar genişleyip gerçek anastomoz çapına ulaşarak flep distaline olan kan akımını artırır. Sempatik tonusun gevşemesinden dolayı choke damarlarında biraz genişleme olsa da esas etki ameliyattan sonraki 48-72 saatte görülür. Bu durum damar duvarı elemanlarının hipertrofisi, hiperplazisi ve lümen çapının artmasıyla sonuçlanan aktif bir sürecin sonucudur.<sup>80</sup>



Şekil-1. İskemi varlığında choke anastomotik damarların açılması.

Kutanöz venler de subdermiste belirgin tabakalanma gösteren birbirleriyle bağlantılı kanallardan oluşan üç boyutlu bir ağ oluştururlar. Bu venlerin çoğunda kanı belirli bir yöne yönlendiren kapakçıklar olmasına rağmen sıklıkla avalvüler (kapakçiksız) venler ile bağlıdırlar. Bu avalvüler venler valfleri ters yöne açılabilen komşu venöz adalar arasında akımın iki yönlü olmasına imkan tanıyarak akım ve basınç dengesini sağlarlar. Genelde kutanöz venler arterlere eşlik ederler. Dermal ve subdermal pleksustan gelen venler ya sıklıkla kutanöz sinirlerle ve zincir gibi bağlanmış longitudinal arter sistemi ilişkili geniş çaplı venlerin oluşturduğu "çevre yolu" ile

horizontal sistemindeki venöz drenajı ya da alternatif olarak derin fasyayı delen kutanöz arterlerle beraber aşağı dik olarak inen ortak bir kanaldan çevresel tarzda venöz drenajı toplarlar. Bu perforan venler direkt ve indirekt kutanöz arterlerle beraber kalarak en sonunda derin dokudaki kaynak arterlerin vena komitantesine drene olurlar. Böylece deri vücutta bölgeden bölgeye çapı, şekli, yoğunluğu ve yönü değişen damarlardan oluşmuş devamlılık gösteren arter ve ven ağı ile beslenir ve drene olur. Tüm fleplerin özellikle de fasyokutanöz ve septokutanöz fleplerin planlanmasında damarların bağ dokusu çatısını izledikleri gerçekliği esastır. Sıklıkla karışan yüzeysel ve derin fasyanın arasındaki ayırım da önemlidir. Yüzeysel fasya dermisi derin fasyanın dış tabakasına bağlayan bal peteği şeklinde gevşek bağ dokusudur. Derin fasya da genellikle yüzeysel fasyaya göre daha az esnek olan bal peteği şeklinde bağ dokusudur. Derin fasya gövdede bir kılıf, ekstremitelerde ise bir çorap gibi kasları sarar. Bazı yerlerde yoğun bazı yerlerde gevşek intermusküler septaları ile periostla devam ettiği yerlerde dış tabakayı iskelete asar. Derin fasya bu septalardan ve periosttan kasların içine intramusküler septa olarak devam eder. Kutanöz peforatorler genellikle kaynak arter veya onun kasa verdiği dallardan birinden kasa girmeden önce veya sonra çıkarlar ve derin fasyanın dış tabakasını delmek için sırasıyla direkt veya indirekt kutanöz damarlar olarak derin fasyanın intermusküler veya intramusküler konnektif dokularını takip ederler.<sup>81</sup>

Kutanöz damarların bir kısmı sinir, periost ve bazı bezler gibi diğer derin yapılara giden dallardan köken alırlar.<sup>82</sup> Kutanöz damarlar derin fasyadan çıktıktan hemen sonra dermise ulaşmak için yüzeysel fasyanın bağ dokusu çatısını takip ederler. Bazı bölgelerde bağ dokusu içerisinde ilerleyen arterlerin pulsasyonuna ve venlerin genişlemesine imkan tanıyacak şekilde gevşektir. Diğer bölgelerde bağ dokusu derin fasyanın dış tabakası, intermusküler septa ve periost gibi yoğun fibröz kılıflar oluştururlar. Böyle yerlerde damarlar yoğun fasyanın içinde değil yanında veya üzerinde ilerlerler. Damarlar doku planlarına sabit kenarlardan geçerek, hareketli planlarda da ilerleyerek dağılırlar. Bu düşünce ile damarların derin fasyadan sabit yerlerde çıktığı görülebilir. Uzun ve güvenli flepler derinin sabit olduğu yerlerde aksı derinin en hareketli olduğu hata paralel olarak planlanmalıdır. Sabit noktalar arasındaki mesafe arttıkça güvenli flep boyutları da artar.<sup>82</sup>

Damarlarda denge kuralı Debreuil-Chambardel tarafından tarif edilmiştir. Temel olarak bu kavrama göre "aynı bölgedeki anatomik adaları besleyen komşu arterler birbirleriyle ters bir

ilişki içindedirler". Eğer bir damar küçükse diğeri bunu dengelemek için büyüktür ya da bu durumun tersi geçerlidir.

### **Derinin Kanlanması ve Sınıflandırılması**

Flep diseksiyon ve planlamasına göre tarif edilmiş olan aksiyel, random, kutanöz, fasyokutanöz, septokutanöz ve muskülokutanöz gibi flebin planlamasına odaklanan eski terimlerden çok deri dolaşımının anatomi ve fizyolojisini temel alan sınıflandırmaların birbirinden ayırt edilmesi esastır. En eski ve basit, fakat en iyi sınıflandırmalardan biri 1983 yılında Spalteholz tarafından önerilmiştir.<sup>83</sup> Spalteholz kutanöz damarları besledikleri alanlardaki rollerine göre ana (dominant) ve minör (bütünleyici) olarak iki gruba ayırmıştır.

### **Direkt Kutanöz Damarlar**

Bu damarların besledikleri alanın beslenmesine primer (dominant) katkıları vardır ve özellikle ekstremitelerde iyi gelişmişlerdir. Bu damarlar alttaki kaynak arterden veya kasa girmeden önceki kasın dallarından birinden köken alırlar. Bu damarlar kasların ve intermusküler septumun içindeki diğer derin yapıların arasından geçip fasyanın dış tabakasını ulaştıkları en kısa yoldan delerek esas ulaşacakları yer olan deriye ulaşırlar. Özellikle derinin hareketli olduğu gövde, baş, boyun, kollar ve uylukta genellikle geniş ve birbirlerinden iyi bir şekilde ayrılmışlardır. Kutanöz sinirlere eşlik ettikleri yerler dışında önkol ve bacakta daha küçük ve çok sayıdadırlar. Avuç içi ve ayak tabanında küçük damarların oluşturduğu sıkı bir ağ vardır.

Her olguda bu kutanöz damarlar derin dokunun bağ iskeletini deriye doğru takip ederler. Kas ve tendonların arasından bazen "septokutanöz damarlar" olarak gerçek intermusküler septuma çok yakın bir şekilde geçerler. Eğer kaynak arter radial, ulnar veya femoral arter gibi yüzeye yakınsa derin fasyanın dış tabakasındaki seyirleri kısa olabilir. Ters olarak eğer kaynak arter profunda brachii'nin kutanöz perforatörleri, lateral femoral sirkumfleks ve peroneal arterlerde olduğu gibi derin yerleşimli ise boyları uzundur.

### **İndirekt Kutanöz Damarlar**

Bu damarlar kaynak arterlerden köken alır ve derin fasyanın dış tabakasını delmeden önce vertikal veya oblik olarak genellikle kası ve derin dokuları delerler. Bunlar oldukça geniş

olabilirler, derinin kan dolaşımının esas (dominant) kısmını sağlarlar ve özellikle gövdede (örneğin internal torasik, interkostal ve derin inferior epigastrik muskülerokutanöz perforatörler) iyi gelişmiştir. Alternatif olarak deriye ikincil kan dolaşımı sağlayan terminal dallar şeklinde küçük damarlar olarak çıkabilirler. Bunlar başlıca çeşitli derin dokuları özellikle kasları besleyen damarların terminal dalları olarak sıklıkla sayıları çok olan küçük damarlardır.

### **Anjiozom Kavramı**

Manchot ve Salmon çalışmalarının gözden geçirilmesi ve tüm vücudun deri ve alttaki derin dokuların kan dolaşımına ait çalışmaların birleştirilmesi; vücudu anatomik olarak "anjiozom" olarak adlandırılan üç boyutlu vasküler alanlara ayrılmasını sağlamıştır.<sup>84,85</sup> Bu üç boyutlu anatomik alanlar deri ve kemik arasında uzanan bir kaynak arter (segmental veya dağıtıcı) ve buna eşlik eden ven(ler) tarafından beslenirler. Her anjiozom eşleşen arterizom (arteriyel alanlar) ve venozom (venöz alanlar) alt gruplarına ayrılabilir. Bu deri, kemik, kas ve diğer dokulardan oluşan kompozit bloklar birbirleriyle uyumludurlar.<sup>86</sup> Her anjiozom her dokuda çapında değişiklik olmayan gerçek (basit) anastomotik arterler veya çapı küçülen "choke" (retiform) anastomotik damarlarla komşu anjiozoma bağlantılıdır. Venöz tarafta kapaksız venler (çift yönlü veya titreşen) sıklıkla anastomotik arterlere uyarlar ve özellikle derin dokularda anjiozomun sınırlarını belirlerler. Her anjiozom alttaki kaynak arter ve ven üzerinden kompozit flep olarak birlikte veya ayrı olarak aktarılabilecek her doku tabakasının anatomik güvenli sınırını belirler. Bu anatomik bilgi birçok kas-deri flebinin tasarımı için temel oluşturur.<sup>87</sup>

### **Flep Fizyolojisi**

Flep mikrodolaşımı arteriolden başlayıp, prekapiller sfinkterler, kapillerler, postkapiller venüller olarak devam eder. Bu mikrodolaşım aşamasında cilt kan akımı lokal ve sistemik faktörlerle kontrol edilmektedir. Vücudun farklı alanlarında cilt kanlanması farklılık göstermektedir. Diyabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği, radyasyon, yaşlanma ve sigara cilt perfüzyonunu etkilemektedir. Lenfatik sistem lenfatik kapillerler, toplayıcı lenfatikler ve lenf nodlarından oluşur. Bunlar da venöz sistemle birleşirler. Flep cerrahisinde lenfatiklerin kesilmesine bağlı ödem sıklıkla ada fleplerinde belirgin olarak gözlenebilir.<sup>88</sup>

Deri dolaşımının sistemik kontrolünde sinir sistemi önemlidir. Hipotalamus tarafından kontrol edilir. Alfa-adrenerjik reseptörler vazokonstriksiyon oluştururken; beta-adrenerjik reseptörler ve kolinerjik reseptörler ise vazodilatasyon oluşturur.<sup>89</sup> Damarın esas tonusu arteriovenöz anastomozlar, arterioller ve arterlerdeki sempatik adrenerjik sistemle ayarlanır. Humoral sistemi epinefrin, nörepinefrin, serotonin, tromboksan A<sub>2</sub> ve prostaglandin F<sub>2</sub> vazokonstriksiyon oluştururken bradikinin, histamin, prostoglandin E<sub>1</sub> vazodilatasyon oluşturur.

Deri dolaşımının lokal kontrolünde metabolik faktörler hiperkapni, hipoksi, asidoz ve hiperkalemi vazodilatatör gibi davranır.<sup>90</sup> Lokal hipotermi kan akımını azaltır, bu da vazodilatasyonu uyarır. Kan viskozite artışı kan akımını azaltmaktadır. Deri ve kasların kan akım regülasyonu farklıdır. Sempatik sistem etkisi ile vazokonstriksiyon deri için çok önemli iken kas için az önemlidir. Epinefrin deride vazokonstriksiyon yaparken kaslarda vazodilatasyon yapabilir. Metabolik faktörler ise kas doku perfüzyonu için çok önemlidir. Sıcaklık ise deri perfüzyonu için önemli iken miyojenik tonus kas doku dolaşımı için önem arz etmektedir.

### **Damar Duvarının Yapısı**

Damar duvarları üç konsantrik tabaka şeklinde organize olmuştur: intima, medya ve adventisya. Bu yapılar tüm damarlarda mevcuttur; ama büyük damarlarda, özellikle arterlerde, daha belirgindirler. İntima, altında minimal miktarda ekstrasellular matriks (ESM) bulunduran bir bazal membran ve bunun üzerine yerleşmiş tek katlı bir endotel tabakasından oluşur. Mediadan internal elastik lamina denilen yoğun bir elastik membran ile ayrılır. Medya, ağırlıklı olarak düz kas hücreleri ve ESM'ten oluşur, etrafı adventisya gevşek bağ dokusu, sinir lifleri ve küçük damarları ile çevrelenir. Eksternal elastik lamina bazı arterlerde mevcut olup medya ile adventisya arasındaki geçişi belirler. Oksijen ve besin ürünlerinin lümeninden difüzyonu, ince duvarlı damarlar için ve tüm damarların lümene en yakın düz kas hücrelerinin desteklenebilmesi için yeterlidir. Ancak, büyük ve orta boydaki damarlarda adventisyadaki küçük arterioller (vasa vasorum, "damarların damarları" anlamında) medyanın dış yarısı ila üçte ikisinin gereksinimini karşırlar.<sup>91,92</sup>

### **Anastomoz Hattının İyileşmesi**

Mikrovasküler anastomozda amaç, endotel devamlılığının sağlayak trombositlerin derin yapılarla temasını önlemektir. Endotel bütünlüğünün bozulması, trombositlerin derin tabakalarla temasına neden olarak trombosit agregasyonunu tetikler.<sup>93</sup>

Damar anastomozundan hemen sonra dikiş hattı ve dikişler fibrin ve hücresel elementlerden oluşan ince koagulumla örtülür. İğne delikleride trombosit fibrin tıkaçıyla kapanır. Operasyondan sonraki 24 saatte trombositin fibrin reaksiyonu artar, dikişler üzerinde daha kalın koagulumla örtülür. 2. gün sonunda ise kar yığıntısı görünümü azalır. Pıhtı stabilize olur. 3. günde dikişlerin girdiği noktalardan reendotelizasyon başlar. 4. gün sonunda dikiş hattı tamamen endotelize olur. Endotelizasyon kabaca 3. gün başlar ve 7-10 gün arasında tamamlanır. 10. günde subintimal hiperplazi normal mediyanın 2/3 kalınlığına ulaşır. Bu kalınlaşmaya miyofibroblastlar ve makrofajlar sebep olur. İntimanın kalınlığı artar. Üç haftada tüm dikiş hatları ve dikiş deliklerinde endotelizasyon tamamlanmış olur. Mediyada nekrozis ve fibrozis gözlenir. Adventisyada fibrozis görülür. Endotel iyileşmesi tamamlanana kadar kullanılan antikoagülan ilaçlarla trombüs oluşumu baskılanabilir.<sup>94</sup>

İntimada hiperplazi ve yeni oluşan elastik lifler gözlenir. Mediyada nekrozis, incelmeye ve fibrozis oluşurken adventisiyada fibrozis gelişir. Arter duvarının sutureasyonu sırasında oluşan gerginliğe bağlı olarak onarım alanında arter duvarının normal yapısı nekroza gider ve yerini fibröz doku alır. Greftlerde tüm tabakalar korunur fakat her tabakada kısmi fibrozis oluşur. Arter greftinde de ven greftine benzer oranda sağkalım oranı mevcuttur. Fakat arter greftinde sağkalım biraz daha fazladır. İlk üç haftada intimada fibrin membran mevcutken mediyada aselüler ve nekrotiktir. Geç periotta venin mediya tabakasında fibroz doku oluşur. Yalnız küçük bir kısmında kas sağlam kalır. Aynı değişiklik arterlerde de biraz az şekilde gerçekleşir. Cerrahi teknik, büyük suturelerin kullanımı, uygun olmayan aletler ile damar duvarı travmatize olur ve bunlar da fibrozis oranını artırır. Damar duvarının incelendiğini, anastomoz hattının genişlediğini fark edilir.<sup>95</sup>

8-12 günde onarım alanında ince trombüs örtüsü oluşurken 2. haftada trombüs kasılır. Elastik lifler ve kollajen oluşur. Bu aşamada endotel hücreler tüm yüzeyi kaplamaya başlar. Sıkı atılan sutureler mediya tabakasında, tüm tabakada hasarlar oluştururlar ve subintimal hiperplaziye yol açarlar. İlk elastik lifler gözlenir daha sonra 2-4 hafta arasında düz kas hücreleri gözlenir. 4-6 haftada fibriller yeterli sıklığa ulaşırlar ve internal elastik lamina oluşur. Sutureler ve arter

klempleri adventisiya hasarlamasına fibrozisine neden olurlar.<sup>96</sup> Aproximatörün ayakları arasındaki endotelin tamamen döküldüğü ve klempin bastığı noktalarda da aşırı mediya nekrozu olduğu gösterilmiştir. Damar hasarlanması için klemp basıncının 30gr/m<sup>2</sup>'den fazla olmaması gerektiği gösterilmiştir.<sup>97</sup> Hasarlanma sonucu trombojenik yüzeylerin ortaya çıkmasıyla pıhtı oluşumu tetiklenir.<sup>98</sup> Bir damar zedelendiği veya yırtıldığında çeşitli mekanizmalarla hemostaz sağlanır. Bu mekanizmalar: (1) damar spazmı, (2) trombosit tıkaçının oluşumu, (3) kanın pıhtılaşması sonucu kan pıhtısının oluşumu, (4) fibröz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damardaki deliğin kalıcı olarak kapatılmasıdır.<sup>93</sup>

## **Anastomoz Teknikleri**

### **Uç-Uca Anastomoz**

Mikrovasküler anastomozda iki temel yöntem vardır; uç-uca anastomoz ve uç-yan anastomoz. Anastomoza başlamadan önce damarların kendi etraflarında dönmüş olmadığından emin olunmalıdır. Uç-uca anastomoz günümüzde daha pratik, daha kolay olarak görmekte ve daha fazla uygulanmaktadır. Mikrovasküler anastomozda damar diseksiyonu rahat pozisyonda, çevre dokulara ve organlara hasar verilmeden yapılmalıdır. Diseksiyon zamanı, damarların fazla manipülasyonu damarın hasarlanmasına ve trombüs oluşumuna neden olabilir. Radyasyona uğramış ve aterosklerotik damarlar daha frajildirler. Aterosklerotik plaklar parçalanabilir ve tromboz oluştururlar. Bu tür durumlarda daha dikkatli olunmalıdır.<sup>99</sup>

Anastomozda damar duvarı anatomik şekilde onarılmalıdır. Endotel devamlılığı sağlanmalıdır. Tromboza neden olan adventisiya damar lümenine sarkmamasına dikkat edilmelidir. Damar içinde en az trombojenik ortam sağlanmalıdır. Anastomoz için farklı dikiş teknikleri vardır, fakat daha çok tercih edileni tek-tek sütür yöntemidir. Dikiş atılırken, damar duvarına dik açıyla girilmeli ve damar duvarının her üç tabakası da geçilmelidir. Anastomoz hattına sütür atılırken gerginliğe dikkat edilmelidir. Eğer fazla gerginlik oluşursa damar duvarı yırtılabilir ki, bu da trombüs nedenidir. Anastomozda ilk iki dikişi en zor olan dikişlerdir. İlk dikiş 0° dikiş tir. ikinci dikiş 180° arasında atılır. Daha sonra 90° ve 270° dikişler atılır. Bundan sonra dikişlerin aralarına birer dikiş atılır.<sup>100</sup> Klempler açılır ve anastomoz patensi kontrol edilir. Kaçak varlığında fazladan dikiş atılabilir. Anastomoz esnasında sütürün damar arka duvarından geçmemesine dikkat edilmelidir. Sütürler hem birbirine hem de damar uçlarına eşit uzaklıkta

olmalıdır.<sup>101</sup> Çok seyrek sütür atılması kanama ve trombus oluşumuna, çok fazla sütür ise endotel hasarına neden olur. Venlerin ince duvar yapısı nedeniyle ven anastomozu daha zordur. Venlerde kan akım hızı daha yavaş olduğu için, dikiş aralıklarında daha kolay trombus oluşabilir. Bu nedenle venlerde daha dikkatli olunmalıdır. Fazla sütür atılması da trombus kaynağıdır. Damarın altına eğri uçlu penset yerleştirilip damar içindeki akımın kesileceği kadar yataktan kaldırdıktan sonra penseti aşağı yukarı kaydırarak akımın varlığı kontrol edilebilir. Eğer lümendeki kan pensetin arkasından rahat hareket ediyorsa, bu akımın var olduğunu gösterir.<sup>102</sup>

### **Uç-yan Anastomoz**

Mikrovasküler uç-yan anastomozda alıcı damara ve donör damara disseksiyon yapılır. Venler üzerinde yan pencere açıldıktan sonra sadece lümene sarkan liflerin temizlenmesi yeterlidir.<sup>104</sup> Uç-yan anastomozun birkaç önemli avantajları vardır.  ap uyumsuzluğunu ortadan kaldırır. Büyük venler baş-boyunda çoğu zaman ameliyat sahasında olur ve ven disseksiyon süresini kısaltır. Bas ve ark vende uç-uca ve uç-yan anastomoz patensi açısından önemli fark olmadığını deneysel çalışmasında göstermiştir.<sup>105</sup> Uç-yan anastomoz extremitelerin ve distal kısımların dolaşımının korunması, vazospazmın önlenmesi amacıyla ve damarlar arasında önemli çap uyumsuzluğu durumlarında tercih edilmektedir.<sup>103</sup>

Mikrocerrahinin  nc lerinden Godina, arterotomiyi düz bir makas yardımıyla damar duvarından bir eliptik eksizyonu ile yapmıştır.<sup>106</sup> Arteriotomi farklı şekillerde de yapılabilir; uzunlamasına yarık şeklinde, transvers yarık şeklinde, eliptik veya armut şeklinde. Anastomoz patensilerinde arterotomiler açısından fark gözlenmemiştir.<sup>107,108</sup> İlk iki dikiş donör damarın uzun ekseninde 0  ve 180  kabul edilen noktalara atılır. Dikişler tam kat geçilmelidir. Öncelikle arka duvarı onarmak manipulasyon açısından daha iyidir. İyi planlama yapılmalıdır.    nc  dikiş 270  noktasına uygulanır. dikiş aralarının eşit olmalıdır. Arka duvardaki ara dikişler atılır. Arka duvar devamlı dikişlerle de onarılabilir. Sonrasında 90  noktasına dikiş atılır. Daha sonra ara dikişler atılarak anastomoz tamamlanır. Tüm dikişler tamamlandıktan sonra dikiş aralıkları kontrol edilir.<sup>109,110</sup> Anastomoz patensine Acland testi - sağma testi ile değerlendirilir.<sup>111</sup> Bu test venler için de yapılabilir fakat ven duvarları ince olduğu için intima ve media tabakasının hasaslanmaması yönünde dikkatli olunmalıdır. Bu yüzden ven anastomozlarında açıklığın sadece görerek değerlendirilebileceği savunulmuştur.



## Yeni Damar Oluşumu

Anjiyogenez, öncelikle venüllerden olmak üzere mevcut damarlardan yeni kan damarlarının oluşma sürecidir. Hasar yerlerindeki iyileşme sürecinde, iskemi yerlerinde kollateral dolaşım gelişmesinde gözlenir. Mevcut damarlardan yeni damarların filizlendiği bir süreç olan anjiyogenez sırasında, aşağıdaki aşamalar gerçekleşir<sup>112</sup>

- Nitrik oksite yanıt olarak vazodilatasyon ve Damar Endoteli Kaynaklı Büyüme Faktörü (VEGF) etkisiyle damar geçirgenliğinin artması,
  - Perisitlerin damarın lümenine uzak (abluminal) yüzeyinden ayrılması,
  - Endotel hücrelerinin, doku hasarı bölgesine göç etmesi,  
Göç eden endotel hücrelerinin ön sırasının hemen arkasındaki endotel hücrelerinin proliferasyonu,
  - Kılcal tüplerin oluşumu yönünde yeniden biçimlenmesi,
  - Periendothelial hücrelerin (küçük kapiller damarlar için perisitlerin, daha büyük damarlar için düz kas hücrelerinin) matür damar oluşturmak üzere toplanması,
  - Endotel hücrelerinin proliferasyon ve göçünün baskılanması ve bazal membran depolanması
- Anjiyogenez sürecinde çeşitli büyüme faktörleri, hücre-hücre etkileşimleri, ESM proteinleriyle etkileşim ve doku enzimleri rol alır.<sup>113,114</sup>

Anjiyogenezde rol oynayan başlıca büyüme faktörleri; Damar Endoteli Kaynaklı Büyüme Faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF-2) dir.<sup>115</sup>

- Büyüme faktörlerinin VEGF ailesinde VEGF-A, -B, -C, -D ve -E; ve plasental büyüme faktörü (PIGF) vardır. Genellikle VEGF adıyla anılan VEGF-A, hasar sonrası anjiyogenezi başlatan başlıca etkindir; VEGF-B ve PIGF, embriyodaki damar gelişmesinde rol oynar; VEGF-C ve -D, hem lenfanjiyogenezi, hem de anjiyogenezi uyarır. Erişkin dokularının çok büyük bir bölümünde, VEGF üyelerinin ekspresyonu vardır: bu ekspresyonlar en fazla, "pencereli" epitele komşu epitel hücrelerinde (örneğin böbrekteki podositlerde, retinadaki pigment epitelinde) karşılaşılır. Bu büyüme faktörleri, bir tirozin kinaz reseptör ailesine bağlanır (VEGFR-1, -2 ve -3). Anjiyogenez için bu reseptörlerin en önemlisi, özellikle endotel hücreleri olmak üzere hedef hücrelerde yer alan VEGFR-2'dir. VEGF endüksiyonuna yol açan birçok faktörden en önemlisi hipoksi; diğerleri trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) TGF-a ve TGF-3'dir<sup>116,117,118</sup>.

VEGF endotel hücrelerinin hem göç etmesini, hem de proliferasyonunu uyararak anjiyogenezdeki kapiller filizlenmeyi başlatır.<sup>119,120</sup> Nitrit oksit (NO) üretimini uyarıp vazodilatasyonu destekler ve damar lümeni oluşumuna katkıda bulunur. Bu etkenler ayrıca, 50 yaş üzeri erişkinlerde karşılaşılan görme bozukluğunun önde gelen bir nedeni olan "ıslak" (neovasküler) maküla dejenerasyonunun tedavisinde; ayrıca prematürite retinopatisine eşlik eden anjiyogenez üzerinde yapılan klinik çalışmalarla, diyabetteki maküla ödeme yol açan sızıntılı damarlar (leaky vessels) ile ilgili çalışmalarda kullanılmaktadır.<sup>121</sup>

Büyüme faktörlerinin FGF ailesinin, en iyi karakterize edilenleri FGF-1 (asidik FGF) ve FGF-2 (bazik FGF) olmakla birlikte, 20'den fazla üyesi vardır.<sup>122</sup> Birçok hücre tipinde üretilen bu büyüme faktörleri, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir plazma membran reseptörleri ailesine bağlanır. Serbest kalan FGF, heparan sülfata da bağlanabilir ve ESM'de depo edilebilir. FGF-2 anjiyogeneze en çok, endotel hücrelerinde proliferasyonu uyararak katkı yapar. Ayrıca makrofajların ve fibroblastların hasar alanına göç etmelerini teşvik eder; epitel hücrelerinin, epidermal yaraları örtmek üzere göç etmesini uyarır.<sup>123,124</sup>

Anjiyopoetin Ang1 ve Ang2 anjiyogenezde ve yeni damarların yapısal olgunlaşmasında rol oynayan büyüme faktörleridir. Yeni oluşan damarların, perisitlerin ve düz kas hücrelerinin toplanması ve bağ dokusu depolanması yoluyla stabilizasyona ihtiyaçları vardır. Ang1, endotel hücrelerinin üzerindeki, Tie2 adlı bir tirozin kinaz reseptörüyle etkileşime girer. Stabilizasyon sürecine, diğer bazı büyüme faktörleri de (PDGF ve TGF- $\beta$ 3) katılır. PDGF düz kas hücrelerini toplar; TGF- $\beta$ 3 ise endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü baskılar, ESM proteinlerinin üretimini artırır.<sup>125</sup>

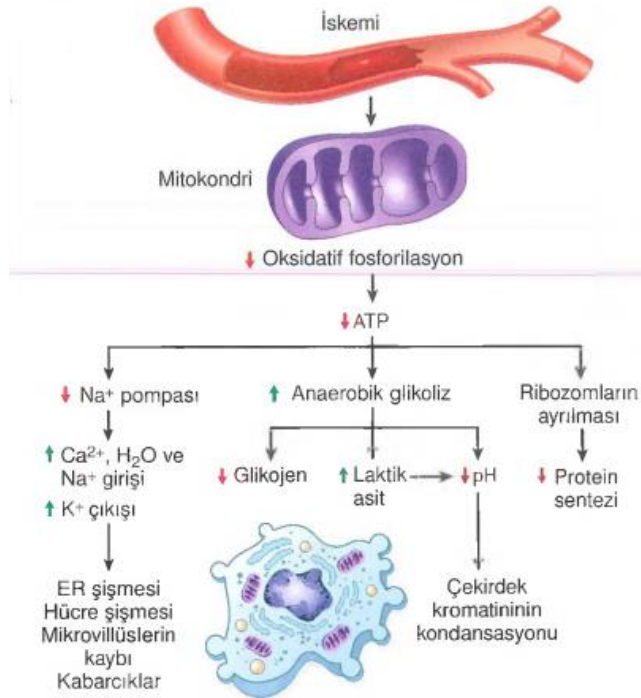
Kan damarlarının embriyo gelişmesi sırasında çoğalmasına vaskülogenez adı verilmektedir. Bu süreçte damarlar, angioblast adı verilen endotel prekürsör (öncül) hücrelerinin birleşmesiyle yeni baştan (de novo) yapılır. Angioblastların kökeni, kendileri de hematopoetik sisteme prekürsör hücre üreten hemangioblastlardır. Ayrıca erişkinlerde kemik iliğindeki kök hücrelerden üretilerek dolaşıma bırakılan endotel prekürsör hücreleri de vardır. Ancak bunların erişkinlerdeki anjiyogeneze katkıda bulundukları kesin olarak saptanmış değildir.<sup>126</sup>

ESM proteinleri anjiyogenezdeki damarların filizlenmesine katkıda bulunur ve bunu daha çok endotel hücrelerindeki integrinlerle etkileşime girerek ve oluşan damara iskelet oluşturarak yapar. Öncelikle metalloproteinazlar (MMP) olmak üzere ESM enzimleri ESM'i, damar tüpünün

yeniden biçimlenerek uzamasını sağlamak amacıyla parçalar. Yeni oluşan damarlar, endotel hücreleri arasındaki bağlantıların tamamlanmaması ve VEGF'nin damar geçirgenliğini artırması nedeniyle, henüz sıvı sızdıran oluşumlardır. Granülasyon dokusunun çoğu zaman niçin ödemli olduğunu kısmen açıklayan bu özellik, iyileşen damarlarda inflamatuvar yanıtın yatışmasından sonra uzun süre devam eder.<sup>127,128</sup>

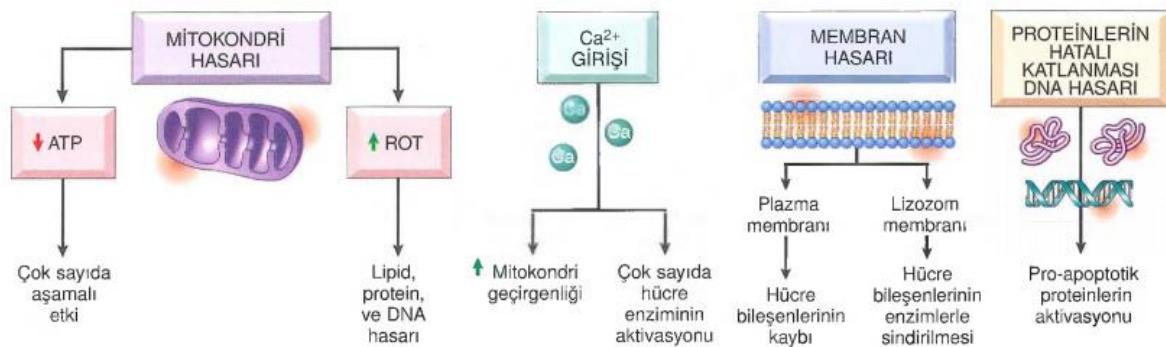
### İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Mikrovasküler serbest doku nakillerinin başarı oranı %90'dan yüksektir.<sup>129</sup> Serbest doku nakillerinde sınırlı da olsa her zaman iskemik reperfüzyon hasarı meydana gelir. Flep elevasyonu sonrasında flep pedikülünün kesilmesiyle primer iskemik başlamaktadır. Fakat çoğu zaman anastomoz süresinin kısa olmasından dolayı bu aşamada flep kaybı gerçekleşmemektedir. Sistemik faktörler (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstriktörler, hiperkoagulabilite) veya flep üzerine fiziksel baskı (hatalı yerleştirme, pedikülde katlanmalar, hematoma) nedeniyle mikrodolaşım düzeyinde kan akımının azalmasına ikincil olarak tromboz oluşur ve bu durum sekonder iskemiyi başlatır. Sekonder iskemide flep kaybı oranı yükselmektedir.<sup>130</sup>



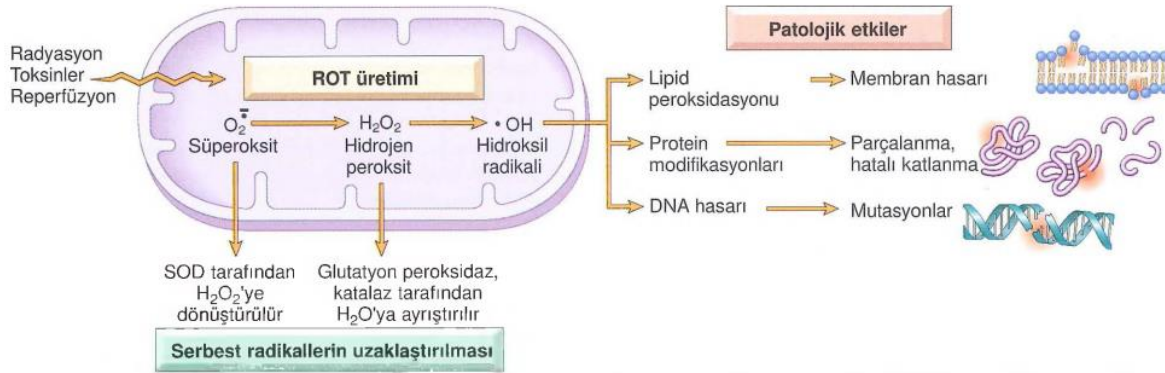
Şekil-2. İskemi reperfüzyon sürecindeki metabolik değişiklikler

İskemi zamanı uzadıkça iskemik doku anaerob metabolizmaya yönelir ve oksijen, glikoz, adenozin trifosfat seviyeleri düşerken, CO<sub>2</sub> laktik asit seviyelerinde artış meydana gelir.<sup>131</sup> Deri ve kemik doku için kritik iskemi zamanı uzun iken, kas ve bağırsak endoteli gibi dokular için kısadır.<sup>132,133</sup> Doku hasarının ciddiyetini iskemi süresi belirler.<sup>134</sup> İskemide kapillerlerin çapında daralma, lökositlerin birikimi, endotel hücrelerinde metabolik disfonksiyon, hücre membran disfonksiyonu, inflamatuvar mediyatörlerin salgılanması gibi yapısal ve metabolik değişiklik olur.<sup>135</sup> Dokularda oksijen oranı azalırken, laktat birikir ve pH düşer.<sup>136</sup> Membran nakil fonksiyonunun bozulmasıyla hücre içerisinde kalsiyumun konsantrasyonu artar.<sup>137</sup> Kalsiyum sekonder mesajcı olarak enzimleri aktive eder ve proinflamatuvar mediyatörler birikir.<sup>138</sup> Reperfüzyonun sağlanmasıyla süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi serbest oksijen radikalleri oluşur. Reperfüzyon esnasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri, endotelyal şişme ve kapiller geçirgenliğinde artışa neden olurlar.<sup>139</sup> İskemi sonrası endotel dokusu süperoksit radikalının esas kaynağıdır.<sup>140</sup> Normal şartlarda süperoksit radikali, süperoksit dismutaz enzim etkisiyle hidrojen peroksite dönüştürülür.<sup>141</sup> Hidrojen peroksit glutatyonla birleşerek suya dönüşür. İskemik reperfüzyon zamanı oluşan süperoksit, hidrojen peroksit o da hidroksil radikaline dönüşür.<sup>142</sup> (Şekil-3) Oluşan serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu ile membran hasarına protein hasarlanması ile proteinlerin parçalanmasına, proteinlerin hatalı katlanmalarına, DNA hasarı ile mutasyonlara neden olur. İlk aktiflenen hücre nötrofildir. Nötrofiller kemotaktik uyarılarla inflamasyonu başlatır ve trombositler ile lökositler hasarlı alana gelirler. Lökositler hasarlanmış endotele tutunarak migrasyon yapar ve intersitisyel alana geçer. Lökositler sitoplazmik granüllerden elastaz gibi proteazları salgırlar. Bu aşamada mikrodolaşım bozulur, iskemi genişler.<sup>143</sup>



Şekil-3. İskemi reperfüzyon hasarı ve apoptoz.

Prostasiklin ve tromboksan düzeyleri yükselir. İskemi zamanla iyon kanal geçirgenlik bozukluğu, ATP/ADP oranının azalması ve mitokondriyal permeabilite bozulmasına neden olarak reaktif moleküllere karşı hücre savunmasını zayıflatmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarında toksik süperoksit radikallerin üretiminde artış olur. Serbest radikaller sitotoksik etki, inflamasyon, endotelial hasar, lökosit yapışması ve birikimi gibi mikrodolaşımın bozulmasına neden olur. Reperfüzyon sırasında ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin oksidaza dönüşür. Ksantin oksidaz, oksijen ve iskemide oluşan hipoksantin ile reaksiyona girer ve ürün olarak süperoksit anyon oluşur. Bu anyon diğer oksijen radikal türlerine dönüşerek doğrudan hücre hasarı yapar. Süperoksit radikal, endotel ile doğrudan etkileşir ve lipid peroksidasyonu, membran proteinlerinde ayrışma, hücre geçirgenliğinde artış, sitoplazmada şişme ve işlev bozukluğuna yol açar.<sup>144</sup> Süperoksit dismutaz düzeylerinde düşme olur.<sup>145</sup> Endotel nitrik oksitin esas kaynağıdır. Nitrik oksit iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucudur.<sup>146</sup> Nitrik oksit vasküler tonusun regülasyonunda, trombosit agregasyon inhibisyonunda, lökositin endotele yapışmasının zayıflamasına, serbest oksijen radikallerinin temizlenmesinde, normal vasküler geçirgenliğin saklanması, immün savunmada ve endotel hücre rejenerasyonunda rol alır.<sup>147</sup> İskemi reperfüzyon hasarında bilinmeyen nedenlerden nitrik oksit inhibe olur.(Şekil-4)



Şekil-4. İskemi reperfüzyon hasarı ve onun sonuçları.

Oksijen miktarı arttığında, reaktif oksijen türevleri üretimi de buna bağlı olarak artar. Bunun nedeni, mitokondriyal hasar ile oksijenin tam olarak indirgenememesi ve lökositler, endotel hücreleri ile parankimdeki hücrelerdeki oksidazların etkisidir. Hücredeki antioksidan

savunma mekanizmalarının da iskemiden zarar görmüş olması, serbest radikallerin birikimini kolaylaştırır. Süperoksit dismutaz ve glutatyon uygulaması ile flep sağkalımının arttığı gözlenmiştir.<sup>148,149</sup> Vitamin C iskemi reperfüzyon hasarında flep sağkalımını artırır.<sup>150</sup>

İskemi devam ederse geri dönüşsüz hasar ve nekroz gelişir. Geri dönüşsüz hasarda; aşırı şişmesi, hücre zarında yaygın hasar ve lizozomların şişmesi söz konusudur. Kalsiyum yoğun biçimde hücre içine girebilir. Ölüm genellikle nekroz ile olur ama buna, apoptoz da eşlik edebilir. Apoptoz yolağı mitokondrilerden proapoptotik moleküllerin salıverilmesiyle aktive olur.<sup>120</sup> Hücrenin bileşenleri progresif bir şekilde yıkıma uğrar ve hücre enzimleri yaygın bir şekilde hücre-dışı boşluğa sızar. Son olarak ölü hücrelerin yerini fosfolipidlerden oluşan büyük kitleler olan miyelin tipi şekiller alır.<sup>151</sup> Bunlar da lökositler tarafından fagosite edilir ya da daha sonra kalsifiye olabilecek yağ asitleri yönünde daha fazla yıkıma uğrarlar.<sup>152</sup>

### **Hücrenin Programlı Ölümü ( Apoptoz)**

Apoptoz, hücrenin kendi nükleer DNA'sının, nükleer ve sitoplazmik proteinlerinin yıkımına neden olacak enzimleri aktive etmesiyle gerçekleşen bir hücre ölümü çeşididir.<sup>153,154</sup> Apoptotik hücre parçaları koparak, bu olaya verilen isimden (apoptoz, dağılma) sorumlu olan görüntüyü oluştururlar. Apoptotik hücrelerin plazma membranı sağlam kalır ama hücrenin ve parçalarının fagositler için çekici bir hedef haline gelmesine yol açacak değişikliklere uğrar.<sup>155,156</sup> Ölen hücre ve parçaları, hücre içeriğinin dışarıya sızmasına zaman kalmadan hızla ortadan kaldırıldığından apoptotik hücre ölümü konakta inflamatuvar yanıtı neden olmaz. Apoptoz; bu bakımlardan membran bütünlüğünün bozulduğu, hücrelerin sindirildiği, hücre içeriğinin dışarı sızdığı ve çoğu zaman bir konak reaksiyonunun olduğu nekrozdan farklıdır. Ancak apoptoz ve nekroz bazen birlikte de bulunabilir ve bazı patolojik uyarılar nedeniyle başlayan apoptoz, nekroz yönünde ilerleyebilir.<sup>157</sup>

### **Apoptozun Mitokondri (İntrensek) Yolağı**

Mitokondrilerde apoptozu başlatabilen çeşitli proteinler vardır. Bunlar sitokrom c ve endojen apoptoz inhibitörlerini nötralize eden proteinlerdir. Hücrenin ölmesi veya yaşamaya devam etmesi arasındaki tercih, prototipi Bcl-2 olan 20'den fazla sayıda protein tarafından denetlenen mitokondri geçirgenliği ile belirlenir.<sup>158</sup> Hücreler büyüme faktörlerinden ve diğer

yaşam sinyallerinden yoksun kaldıklarında veya DNA'ya zarar verecek etkenlerle karşılaştıklarında ya da hatalı katlanmış proteinleri çok miktarda biriktirdiklerinde çok sayıda sensör aktif duruma geçer. Bu sensörler Bcl-2 ailesinin, "BH3 proteinleri" olarak adlandırılan üyeleridir. (Çünkü bunlar Bcl-2 ailesinin korunmuş domainlerinden üçüncüsünü içerirler.) BH3 proteinleri, ailenin Bax ve Bak adı verilen proapoptotik iki üyesini aktive eder. Bunlar da dimerize olup mitokondri içine girer ve sitokrom c ile diğer mitokondri proteinlerinin sitozole geçebileceği kanallar oluştururlar. Yine aynı sensörler Bcl-2 ve Bcl-xL adlı antiapoptotik molekülleri inhibe ederek mitokondri proteinlerinin sitozole geçmesini kolaylaştırır. Sitokrom c, diğer bazı kofaktörlerle birlikte kaspaz-9'u aktive eder. Mitokondriden sitozole geçmiş olan diğer proteinler apoptozun fizyolojik inhibitörleri olarak iş gören kaspaz antagonistlerini bloke eder. Tüm bu etkileşimlerin net sonucu hücre çekirdeğinin parçalanmasıyla sonuçlanan kaspaz olaylar dizisinin aktivasyonudur. Oysa hücreler büyüme faktörlerini ve diğer yaşam sinyallerini almaya devam ettiklerinde Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyelerini sentez ederler.<sup>159</sup> Bunların iki ana tipinden biri Bcl-2'nin bizzat kendisi diğeri ile Bcl-xL'dir. Bu proteinler Bax ve Bak proteinlerini antagonize ettiklerinden, proapoptotik proteinlerin mitokondriden çıkışını sınırlar. Büyüme faktörlerinden yoksun kalan hücreler yalnızca Bax ve Bak proteinlerini aktive etmekle kalmaz. Ayrıca Bcl-2 ve BclxL düzeylerini de azaltarak dengenin, hücre ölümü yönünde daha fazla değişmesine yol açarlar. Mitokondri yolağı, daha sonra da anlatılacağı gibi çoğu durumdaki apoptozdan sorumlu gibi görünmektedir.<sup>159</sup>

### **Apoptozun Ölüm Reseptörü (Ekstresek) Yolağı**

Birçok hücrenin yüzeyinde, ölüm reseptörleri adı verilen ve apoptozu tetikleyen moleküller vardır. Bunların çok büyük bölümü tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin üyesidir.<sup>160</sup> Bunların sitoplazma bölgelerinde hücre ölümünde rolü olan diğer proteinlerle etkileşime girmeleri nedeniyle bu şekilde adlandırılan bir "ölüm bölgesi" vardır. Tip 1 TNF reseptörü ve Fas (CD95) ölüm reseptörlerinin prototipidir. Fas ligandı (FasL) öncelikle aktive T lenfositlerinin yüzeyinde eksprese edilen bir membran proteindir. Söz konusu T hücreleri Fas taşıyan hedefleri tanıyınca Fas molekülleri FasL ile çapraz bağlar yapar ve ölüm bölgesi aracılığı ile adaptör proteinlere bağlanır. Bu bağlanma kaspaz-8 enzimini bölgede toplayarak aktive eder. Kaspaz-8 birçok hücre tipinde Bcl-2 ailesinin proapoptotik Bid adlı üyesini bölüp aktive ederek

mitokondriyal apoptoz yolağını besler. Her iki apoptoz yolağının beraberce aktif duruma geçmesi hücrelere ölümcül bir darbe vurur. Hücre proteinleri, özellikle de FLIP adıyla bilinen bir kaspaz antagonisti ölüm reseptörünün kaspaz tarafından aktivasyonunu önler. İlginç olarak, bazı virüsler FLIP(“viral fllice-inhibitory proteins) homologlarını üretir. Virüslerin bu mekanizmayı, enfekte hücreleri canlı tutmak amacıyla kullandığı öne sürülmektedir. Ölüm reseptörü yolağı kendi kendilerine karşı reaktif lenfositlerin ortadan kaldırılmasında ve hedef hücrelerin, sitotoksik T lenfositleri tarafından öldürülmesinde rol oynamaktadır.<sup>161</sup>

### **Kaspazların Aktivasyonu ve Fonksiyonu**

İntrensek ve ekstrinsek apoptoz yolları, sırasıyla kas-paz-9 ve -8 adlı, öncü kaspazları aktive eder. Bu enzimlerin aktif şekilleri, infazcı kaspazlar adı verilen, başka bir seri kaspazı bölerek aktive eder. Bu aktive kaspazların çok sayıda hedefi etkilemesi DNA'yı ve nükleer proteinleri parçalayan nükleaz enzimlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Kaspazlar ayrıca çekirdek matriksinin ve hücre iskeletinin diğer bileşenlerinin yıkımına da neden olarak hücrenin parçalanmasına yol açarlar.<sup>162</sup>

### **Apoptotik Hücrelerin Temizlenmesi**

Apoptotik hücreler sinyalleri oluşturarak fagositleri kendilerine çekerler. Fosfatidilserin normal hücrelerde, plazma membranının iç yaprağında bulunur ama apoptoz gerçekleştiğinde dış yaprağa geçer ve burada doku makrofajları tarafından tanınarak ölen hücrenin fagosit edilmeye yol açar. Apoptozla ölmekte olan hücreler ayrıca, fagositleri çeken çözünür faktörler de salgılar. Bu olay, ölü hücrelerin ikincil membran hasarına uğramadan ve inflamasyon başlatabilecek içeriklerini salıvermeden hızla temizlenmesini kolaylaştırır. Bazı apoptotik cisimcikler fagositler tarafından tanınan yapışkan glikoproteinler taşır. Makrofajlar da apoptotik hücrelere (canlı hücrelere değil) bağlanarak bunların fagositoz hedefi olmalarını sağlayan proteinler üretebilir. Çok sayıda makrofaj reseptörünün, apoptotik hücrelerin bağlanma ve fagositozunda rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptoz sonucu ölen hücrelerin geçirdiği bu fagositoz süreci öylesine etkindir ki ölü hücreler iz bırakmaksızın yok olur ve hemen hemen hiç inflamatuvar yanıt meydana gelmez.<sup>163</sup>

Nekrozla apoptoz arasında önemli farklar mevcuttur, ama bu iki çeşit hücre ölümü birlikte de gerçekleşebilir ve aralarında mekanik ilişki bulunabilir.<sup>164,165</sup> Örneğin apoptozda görülen DNA



hasarı, poli-ADP(riboz) polimeraz adlı bir enzimin aktive olmasına yol açar. Bu enzim hücrenin nilcotinamid adenin dinükleotid depolarını boşaltarak ATP düzeylerinin düşmesine ve sonunda nekroza neden olur. Aslında, iskemi gibi sık karşılaşılan durumlarda bile erken hücre ölümünün kısmen apoptozla ve daha sonra iskemi ağırlaştıkça bunun üzerine eklenen nekrozla gerçekleştiği öne sürülmüştür.<sup>166</sup>

Sonuç olarak; apoptoz programlı hücre ölümüdür. İskemi reperfüzyon hasarı zamanı oluşan serbest oksijen radikalleri ve sitokinler apoptozu tetiklerler.<sup>167</sup>



## ÇALIŞMADA KULANILMIŞ BELİRTEÇLERE İLİŞKİN GENEL BİLGİLER

### Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF proliferasyon, migrasyon ve farklılaşmayı sağlayan sinyal yolunu uyaran bir büyüme faktörüdür. Etkisini yüksek ve düşük afiniteli bağlanma bölgeleri olan spesifik reseptörü EGF-R aracılığı ile yapar.<sup>168,169</sup> EGF'nin reseptörüne bağlanması reseptörün tirozin kinaz aktivitesini uyarır, fosforilasyon reaksiyonlarını başlar ve bunun sonucu olarak DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi, farklılaşması, hücre göçü uyarılır. EGF-R tümör hücrelerinde yüksek oranda bulunur. EGF hücre proliferasyonunu stimule eder, farklılaşmayı regüle eder ve morfogenezde hücre kararlılığının akıbetini belirler. EGF'nin, fibroblast çoğalmasını uyarak, granülasyon dokusunun oluşumunu hızlandırarak, epitelizasyonu artırarak ve yeni damar oluşumunu uyarak yara iyileşmesini hızlandırdığı yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur.<sup>170,171,172</sup> Epidermal büyüme faktörü PI3K/AKT, RAS/ERK and JAK/STAT yollarını uyarak apoptoz yollarını bloke ediyor. RAS/ERK sinyal yolağını uyarak antiapoptotic Bcl-2 miktarını artırarak apoptozu önler.<sup>173,174</sup> Hidrojen peroksit ve oksijen anyonu gibi reaktif oksijen türevleri, solunumda oksidatif fosforilasyon sırasında oluşan yan ürünlerde ve birçok toksik reaksiyonla oluşur. Bu reaktif türlerin makromoleküller üzerine zararlı etkisi olduğu bilinse de hücre sinyal sisteminde önemli bir rol oynarlar. Bu süreçte inflamasyona; hücre proliferasyonuna, anjiogeneze, apoptozise ve yaşlanmaya da neden olurlar. Birçok polipeptid büyüme faktörünün in vivo ve in vitro olarak iskemik hasarda belli derecelerde koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bazı fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve EGF'nin beraber uygulandığı kültürlerde, eksitotoksisteye karşı çok yüksek ve çok önemli bir koruma sağlanmıştır. EGF hücrelerde oksijen sebebiyle apoptozisi önlerler. EGF ve bFGF çeşitli hücrelerin yaşama oranını ve farklılaşmasını artırır. EGF nörotrofik faktördür ve nöronları oksidatif hasardan koruyucu rolleri vardır.<sup>175</sup>

### Damar Endoteli Kaynaklı Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF ailesine ait 6 adet izoformu VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-F, VEGF-E tespit edilmiştir. Klinik ve preklinal terapötik anjiyogeneze de en sık çalışılmış olan faktör ise VEGF-A'dır. VEGF-A'nın şu ana kadar bilinen VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF183, VEGF189 ve VEGF206 olarak isimlendirilmiş 7 adet izoformu vardır. Bu izoformlardaki sayılar içerdikleri amino asit sayılarını göstermektedir. VEGF reseptörleri

vasküler endotel hücrelerinin hücre yüzeyinde tanımlanmıştır. Daha sonra VEGFR'ler monosit gibi kemik iliği kaynaklı hücrelerde de bulunmuştur. VEGF'nin VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 olmak üzere 3 tane tirozin kinaz reseptörü (TKR) vardır. VEGF ekspresyonu HIF-1 aracılı mekanizma ile hipoksida upregüle olur. VEGF mitojenik, anjiyogenik ve geçirgenlik artışı etkilerinden sorumludur. Lenfanjiyogenezde ve lenfatik endotel hücresinin apoptozisten korunmasında görev aldığı gösterilmiştir.<sup>176,177</sup> VEGF'nin Fonksiyonları arasında mitogenez, anjiyogenez ve endotelial sağkalım, arter, ven ve lenfatiklerden vasküler endotel hücrelerinin büyümesini sağladığı gösterilmiştir. VEGF endotelial apoptozu engeller. Bu aktivitesine PI3 kinaz/Akt yolu aracılık eder. Ayrıca VEGF endotel hücresinde antiapoptotik Bcl-2 gibi proteinlerin ekspresyonunu da indükler. Kemik iliği hücreleri ve hematopoieze etkileri ilk olarak monosit kemotaksisini desteklediği gösterilmiştir. Granülosit- makrofaj progenitör hücrelerin olgun alt kümeleri ile koloni formasyonunu uyarır. B lenfosit hücre üretimini ve immatür myeloid hücrelerin üretimini artırır.<sup>178,179,180</sup> Damar duvarı geçirgenliği artışı ve hemodinamik etkileri VEGF vasküler sızıntıyı arttırdığından vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak da bilinir. İnflamasyon gibi patolojik olayların altında yatan rolünün de temel sebebi bu molekülün permeabiliteyi artırma aktivitesidir. VEGF Gen Ekspresyon Regülasyonu Mikroçevrede VEGF salınımını düzenleyen lokal hipoksinin desteği ile parakrin ve otokrin salınımla epidermal büyüme faktörü, TGF- $\beta$ , keratinosit büyüme faktörü, IGF-1, FGF ve PDGF; VEGF mRNA ekspresyonunu upregüle eder. Ayrıca; IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler birçok hücrede VEGF ekspresyonunu uyarır. Hormonlar; VEGF'yi uyaran diğer bir faktördür. TSH'nin(tiroid stimüle edici hormon) tiroit karsinomunda VEGF'yi uyardığı gösterilmiştir. ACTH'nin insan kültür fetal adrenal kortikal hücrelerde VEGF'yi uyardığı gösterilmiştir. VEGF; adrenal kortikal anjiyogenezde lokal düzenleyici olabilir ve ACTH'nin tropik etkilerinden sorumlu mediatör olabilir. VEGF'nin çeşitli yollar üzerinden gerçekleştirdiği uyarılar ile, anjiyogenez için gerekli olan endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile birlikte yaşam oranında artış meydana gelir.<sup>181,182</sup> (PI3K: Fosfoinozotid 3-kinaz; Akt/PKB: Protein kinaz B; p38MAPK: p38 mitojen ile aktive olan protein kinaz; (MEK): mitojen ve ekstraselüler kinaz; Erk: Ekstraselüler düzenlenen kinaz). Düşük fizyolojik VEGF-A miktarları vasodilatasyon, antitromboz ve düz kas hücre proliferasyonunun baskılanması esnasında üretilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda angiogenik ve vaskülogenik etkiler için ise daha fazla gereklidir. Atherogenez esnasında VEGF-A miktarının

sürekli artmasının büyüyen lezyonlarda hipoksi ve inflamasyona sekonder bir cevap olarak oluştuğu ileri sürülmüştür. VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1'e (VEGFR-1) bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol oynar. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynar. Aynı zamanda VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endoteliyal hücrelerde mitojenik etki de yapar.<sup>183</sup>

### **Matriks Metalloproteinazlar (MMP-2, MMP-9)**

Matriks Metalloproteinazlar, ekstrasellüler matriks komponentlerini yıkıma uğratan çinko ve kalsiyum bağımlı nötral endopeptidazlardır. MMP-2, MMP-9, Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri, myelin temel protein, fibronektin, fibrillin-1 gibi proteinleri yıkma özelliğine sahiptirler.<sup>184,185</sup>  $\alpha 2$  makroglobulin ve TIMP'lar tarafından inhibe edilirler. MMP-2, MMP-9, ESM yıkımı, anjiogenez, doku remodeling ve hücre migrasyonu süreçlerinde önemli rol oynarlar.<sup>186</sup> Ayrıca birçok sitokin ve kemokin üzerinde etkileri vardır. MMP-9, IL-8'i parçalayarak daha potent IL-8 ortaya çıkmasını sağlar. Yine TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  ve IL-1 $\beta$ 'yi inaktif formdan aktif forma dönüştürür. MMP-9, VEGF'ün salınımını arttırarak anjiogenezde rol alır. VEGF de MMP-2'nin Endotel hücrelerinden salınımını arttırarak bazal membran yıkımına yol açar ve yeni damar oluşumuna neden olur. Diğer fonksiyonlar arasında kemiğin yeniden yapılanması, yara iyileşmesi, embriyogenezis, anjiogenez, inflamasyon, apoptozis, immun cevap gelişimi sayılabilir. MMP-2 aynı zamanda tip 1 kollajeni yıkarak ESM'in "remodeling" olayında önemli rol üstlenir.<sup>187,188</sup> MMP-2, TIMP-2, -3, -4 ve  $\alpha 2$  makroglobulin tarafından inhibe edilir. MMP-9, jelatin ve tip IV bazal membran kollajeni için substrat spesifiktir. Ayrıca MMP-9 Tip III, Tip V kollajen, elastin ve fibronektini parçalar. MMP-9, TIMP-1,-3,-4 ve  $\alpha 2$  makroglobulin tarafından inhibe edilir. MMP-2, MMP-9 ekstraselular matriksi parçalayarak ve anjiogeneze sebep olan markları artırarak anjiogeneze katkıda bulunur. Matriks metalloproteinazlar ESM parçalayarak endotel hücrenin etraf dokuya göçüne neden olarak, FGF-2, VEGF gibi diğer anjiogeneze neden olan belirteçleri artırarak anjiogeneze neden olur.<sup>188,189,190</sup>

### **Hipoksi ile Indüklenen faktör – HIF-1 $\alpha$**

HIF-1, hücrel oksijen düşüşüne yanıt veren major bir transkripsiyon faktörüdür. Hipoksi durumunda ilk olarak hipoksi ile indüklenen factor 1(HIF-1) oluşur. HIF-1 hipoksiya-indüklenen genlerin transkripsiyonlarını aktifleyerek eritropoietin, vascular endothelial büyüme factor, heme oksigenaz-1, inducible nitrik oksit sentetaz, ve glikolitik enzim aldolaz A, enolaz 1, lactat dehidrogenaz A, fosfofructokinaz L, and fosfoglisarat kinaz 1 sentezlenmelerini sağlarlar.<sup>191,192</sup> HIF bir nukleer proteindir ve hücrenin oksijenlenmesinde önemli rol alır. HIF-1 proteini oksijen tarafından kontrol edilen HIF-1 alfa alt ünitesi ile hücrede sürekli olarak ekspres edilen HIF-1 beta alt ünitesinin biraraya gelmesiyle oluşan bir heterodimerdir. HIF-1 tarafından aktive edilen 40 tan fazla gen olduğu bilinmektedir. Oksijen konsantrasyonundaki değişmeye bağlı olarak HIF-1 ile regule edilen genlerin transkripsiyonunda düzenlenmeler gerçekleşir. Hipoksiye hızlı bir şekilde cevap verebilmek için hücreler HIF-1 alfa proteini düzenli ve devamlı olarak hipoksik olmayan koşullarda da sentez ve elimine ederler . Hipoksik ortamda ise HIF-1 alfa yıkımı inhibe olur ve miktar olarak artar. Hipoksik koşullar altında HIF-1 alfa alt ünitesi sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirerek HIF-1beta ile birleşerek dimer oluşturmaktadır. Çekirdekteki diğer kofaktörlerin de bağlanması ile aktive olan HIF- DNA üzerinde hipoksi cevap elmanı olarak tanımlanan özgül diziye bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu tetiklemektedir. Anjiogenez birbirinden bağımsız pek çok mekanizmaya bağlıdır. Bu mekanizmaların etkileşimiyle damar duvarında bütünlüğün kaybolmasına, endotel hücrelerin dinlenme döneminden çıkmasına ve proliferatif fenotip dönemine neden olmaktadır.<sup>193,194,195</sup> Hipoksik ortamda düzeyi hızla artan HIF-1 sayesinde endotel hücrelerin üzerinde güçlü bir mitojenik etkisi olan vasküler endoteilal büyüme faktörü (VEGF) hücrelerden salınarak anjiogenezi uyarmaktadır. VEGF aracılı artmış damar geçirgenliği ile matriks elemanları ve proteazlar lokal bir alanda damar dışına çıkarlar. Endotel hücreleri proliferer olur ve yeniden yapılanan matrikse doğru yönelerek içinden kanın rahatca geçebileceği yapılar oluştururlar. Bunlara ek olarak mezenkimal hücrelerde proliferer olurlar ve yeni damarlar etrafına göç ederek perisitlere dönüşürler. Hücreler arası ilişkilerin güçlenmesi ve yeni matriks elemanlarının varlığı ile yeni damarlar stabilize edilmektedir. HIF-1 alfa ekspresyonu arttığı zaman flep sağ kalımı artmaktadır.<sup>196,197,198</sup>

## Siklofilin A

Siklofilin A (CyPA) ilk kez immunsupressif ilaç olan siklosporinin hücre içi reseptörü olarak bulunmuştur. CyPA; hücre içinde, hücre dışında, hücre membranı ve organellerde bulunur. Hücreler arası iletişimde immunmodülatör olarak, gen transkripsiyonunda, protein katlanması, hücre büyümesi ve farklılaşması ile normal hücre fizyolojisinde etkin rol oynamaktadır. CyPA'nın protein katlanmasında görev alan peptidil-prolil izomeraz aktivitesi sayesinde cis-trans izomerizasyonunu gerçekleştirerek protein katlanmasını hızlandırdığı bildirilmiştir.<sup>199,200</sup> İlk başta Siklofilinlerle ilişkili çalışmaların çoğunda hücre içi fonksiyonlarını araştırılmıştır.<sup>201</sup> Son yıllarda yapılan çalışmalar, CyPA'nın reaktif oksijen türlerine (ROS) cevaben damar düz kas hücrelerinden salgılandığını ve hücre dışına salınan CyPA'nın monosit, nötrofil, eozinofil ve T lenfositler için güçlü bir kemoatraktan olduğunu ortaya koymuştur. CyPA sentez ve sekresyonunun başlıca uyarının ROS olduğu ve uyarımın Rhokinaz bağımlı bir mekanizma ile gerçekleştiği gösterilmiştir. ROS uyarısına cevap olarak CyPA ile etkileşiminin MMP'lerin sentez ve salınımını uyardığı bildirilmiştir.<sup>202</sup> Ekstrasellüler CyPA'nın (a) enflamatuvar hücrelerden IL-6 sekresyonunu ve monositlerin makrofajlara dönüşümünü uyardığı, (b) enflamatuvar hücrelerde nükleer faktör- $\kappa$ B yolağını uyararak TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8, IL-1 $\beta$  ve MMP-9 ekspresyonlarını arttırdığı, (c) endotel hücrelerinden VCAM-1, E-selektin gibi proenflamatuvar sinyal moleküllerinin salınımını uyardığı, (d) damar düz kas hücrelerinde ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2), Akt ve JAK yolaklarını stimüle ederek daha fazla ROS üretilmesine neden olduğu, (e) damar düz kas hücrelerinde MMPaz'ların aktivasyonuna yol açtığı ve proenflamatuvar hücreler için kemoatraktan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Siklofilin-A damar düz kas hücrelerinde DNA sentezini arttırdığı ve apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>203</sup> CyPA'nın damar düz kas hücrelerindeki etkilerini mitojenle aktiflenen protein kinaz (MAPK) yolağı aracılığı gösterdiği ve hücre proliferasyonunu kontrol eden Ras-bağımlı ERK1/2'nin aktiflenmesini stimüle ederek sağladığı bildirilmiştir. 10 Siklofilin A oksidatif stres durumunda, hipoksida ve enfeksiyon gibi durumlarda sentezlenir. Siklofin-A arttığı zaman apoptoz azalır. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar siklofilin-A'yı azaltarak apoptozisi artırır. Vasküler endotel hücrelerde Siklofilin-A antiapoptotik etki göstermektedir. Hücre dışı siklofilin-A Akt ve NF- $\kappa$ B yolağını aktivleyerek antiapoptotik Bcl-2 sekresyonunu

arttırır ve hücre içi siklofinin-A proapoptotoik etki gösteren kaspaz 3'ü inhibe ederek apoptozu önler.<sup>204,205,206</sup>

### **Oksidatif Stres**

Son yıllarda oksidan ve antioksidan kapasite arasındaki ilişki oldukça fazla irdelenmiştir ve bunlar arasındaki dengesizliğin hücre yıkımındaki rolü daha fazla anlaşılmıştır. Özellikle hücre içinde ekzojen ve endojen kaynaklı oluşan serbest oksijen radikallerin toksik açıdan önemli olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir<sup>207</sup>. Serbest oksijen radikallerinin kimyasal veya metabolik oluşumuna yol açan hücre içi ve/veya hücre dışı koşullar, oksidatif stres olarak adlandırılır<sup>208</sup>. Hücreler, SOR'nin zararlı etkilerine karşı antioksidan savunma sistemleri ile korunurlar. Oksidatif stres basit bir şekilde vücudun antioksidan savunması ile serbest oksijen radikal üretimi arasındaki dengesizlik olarak da tanımlanabilir<sup>209</sup>.

### **Toplam Antioksidan Kapasite (TAS)**

Plazma TAS düzeyi güvenilir bir oksidatif stres indeksidir. Serbest oksijen radikallerine karşı toplam plazma direncinin ölçülmesini sağlar. Yapılan çalışmalarda plazma TAS düzeyi ile lenfosit DNA hasarı arasında ters ilişki olduğu gözlenmiştir<sup>210</sup>

### **Toplam Oksidan Kapasite (TOS)**

TAS ile aynı yöntemle ölçülür. Bu şekilde organizmadaki oksidan kapasite tayin edilir. Aktif oksijen ürünlerinin, tampon mekanizması olan antioksidanları ve antioksidan enzimleri aşması oksidatif strese neden olmaktadır.<sup>211</sup> Bu fenomen; aşırı reaktif oksijen ürünlerinin üretimi veya antioksidan mekanizmanın eksikliği sonucu oluşur. Bu reaktif oksijen ürünleri toksiktir ve hücrenin protein, lipid yapıları ve DNA'sına zarar verir. Damar endoteli de kısmen bu durumdan etkilenmektedir.<sup>212</sup>

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin desteği ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun onayı alındıktan sonra Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bölümü laboratuvarında gerçekleştirildi.

### **Gereç**

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri:

- 1- Temel cerrahi aletler (pens, penset, portegü, bistüri sapı, bistüri, vb.)
- 2- Steril enjektörler (0,5, 1, 2.5)
- 3- Steril cerrahi eldiven
- 4- Steril cerrahi gazlı bez
- 5- Çizim kalemi
- 6- Mikro cerrahi aletler (mikroklem, mikromakas, mikroportegü, vb.)
- 7- Traş bıçağı
- 8- Povidone iodine
- 9- Cetvel
- 10- Ketamin baz (Ketalar®, Pfizer, New York, Amerika Birleşik Devletleri)
- 11- Ksilazin (Alfazyne® %2, Alfasan International BV, Voerden, Hollanda)
- 12- Serum fizyolojik
- 13- Lazer dopler flowmetre (Perimed 5010; Perimed AB, Jarfalla, Sweden) ve doppler probu (küçük düz prob 407-1; PeriMed AB, Järfälla, Sweden) cihazı
- 14- Nikon Eclipse E600 ışık mikroskop.

### **Denekler, Barınma, Beslenme**

Deney toplam 40 sıçanda yapıldı. Denek olarak ağırlıkları 250 -300 gr. arasında değişen 40 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan ve Araştırma Merkezindeki hayvan üretim



merkezinden temin edildi. Deney hayvanları deney öncesi ve sonrası Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bölümü laboratuvarında, ortam ısı 20-24 °C olan ve 12 saat gün ışığı alan alanda barındırıldı. Sıçanlar standart sıçan yemi ile beslendi. İçme suyu olarak standart çeşme suyu verildi.

### **Operasyona Hazırlık ve Anestezi**

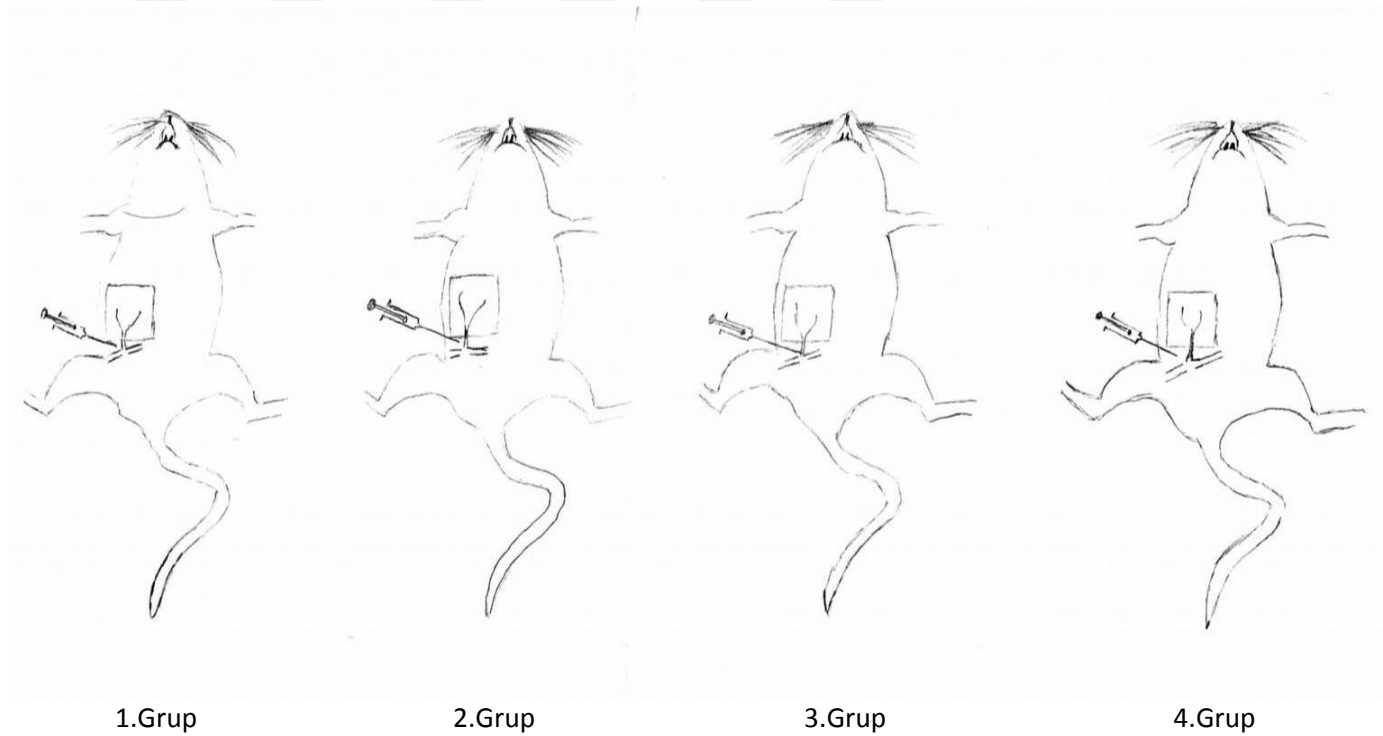
Deney hayvanlarının anestezi batın sol taraftan i.p.(intraperitoneal). Ketamin 100 mg/kg ve Xylazine 60 mg/kg yapılarak sağlandı. Operasyonlara ağırlı uyarana yanıt kesildiğinde başlandı. Sıçanların sağ taraf karın derileri uygun büyüklükte traş edildi, supin pozisyonda operasyon masasına yatırıldı, ön ve arka ekstremiteleri operasyon masasına sabitlendi. Operasyon yapılacak bölge %10'luk iyot çözeltisi antiseptik ile silinerek antisepsi sağlandı.

### **Cerrahi Teknik**

Uygun temizlik ve operasyon pozisyonunu takiben flep çizimi yapıldı. Tüm deneklerde flep 1/3 superolaterali sabit alan lazer doppler akımmetre (LDF cihazı) (Perimed 5010; Perimed AB, Jarfalla, Sweden) ve doppler probu (küçük düz prob 407-1; PeriMed AB, Järfälla, Sweden) ile perfüzyonun değerlendirilmesi ve biyopsi alanı amacıyla işaretlendi. İşaretli alanda LDF kullanılarak cilt perfüzyonu değerlendirildi. Çizime uygun olarak yapılan insizyonu takiben fasyaaltı planda inguinal yağlı doku, panniculus carnosus ve cilt dahil edilerek 3x3 cm boyutunda adipokutanöz flep disseke edildi.<sup>213,214,215</sup> Ardından, mikroskop altında süperfisyal inferior epigastrik arter ve ven, femoral arter ve venden dallandıkları yerden itibaren flebe kadar diseke edilerek inferior epigastrik arter pediküllü ada flep olarak kaldırıldı . Mikroskop altında uygun diseksiyonlar ile femoral arter ve ven ortaya konuldu. 15gr ağırlık 5 dakika uygulayarak vazospazm oluşturuldu.<sup>216</sup>. Ardından cilt perfüzyonunu değerlendirmek için LDF yapıldı. Daha sonra mikroskop altında femoral arter transekte edildi. 10/0 naylon sütür ile femoral arterin uç uca anastomozu yapıldı. Anastomoz sonrasında flep perfüzyonu işaretli alandan LDF ile tekrar değerlendirildi. Sonrasında flep eski yerine suture edildi. Pansuman yapıldı. Sıçanların herbiri ayrı kafeslere yerleştirildi.

### Grupların Planlanması ve Çalışmanın Dizaynı

- Grup 1: Damar anastomoz hattına 0,5 cc serum fizyolojik uygulanarak uç-uca anastomoz yapıldı.
- Grup 2: Damar anastomoz hattına 0,5 cc %10 magnezyum sülfat uygulanarak uç-uca anastomoz yapıldı.
- Grup 3: Femoral arter içerisinden flep içine 0,2 cc %10 magnezyum sülfat damar içi olarak verildikten sonra uç-uca damar anastomozu yapıldı.
- Grup 4: Femoral arter içerisinden flep içine 0,2cc %10 magnezyum sülfat damar içi olarak verildi ve damar anastomozu hattına 0,5 cc %10 magnezyum sülfat uygulanarak uç-uca anastomoz yapıldı.



Şekil-5 Grupların şematik görünümü

### Sonuçlandırma aşaması

7. gün tüm gruplardaki sıçanlar tarif edilen anestezi uygulanmasını ve hazırlığı takiben operasyon masasına alındı. Bütün fleplerde LDF perfüzyon değerlerine bakıldı. Acland testi ile

anastomoz patensi değeri ölçüldü. Tüm deneklerden LDF ile perfüzyon ölçümü amacıyla işaretlenen alandaki dokudan 0.5 cm çapında biyopsi alındı.

### **LDF ile Doku Perfüzyonunun Değerlendirilmesi Sonuçlandırma Aşaması**

Doku perfüzyonunun ölçümü için LDF<sup>5</sup> kullanıldı. Doku perfüzyon değerlendirmesi vazospazm öncesinde, esnasında, sonrasında ve 7.günde flep 1/3 süperiolateralinde işaretli alandan gerçekleştirildi.

### **Doku Analizleri**

7. günde sıçanlardan alınan doku örnekleri tartılıp, 1/5 oranında soğuk 0,15 M KCl solüsyonu ile MP FastPrep Homojenizatör ile homojenize edildi. Daha sonra +4 °C’de 10000 x g’de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Süpernatantlarda Damar endoteli kaynaklı büyüme faktörü (VEGF), Epidermal büyüme faktörü (EGF), Matriks metalloproteinaz-2 (MMP2), Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), Hipoksiyle induklene faktör 1 alfa (HIF1 $\alpha$ ) ve Siklofilin A (Cyclophilin A) ile toplam antioksidan kapasite (TAS) ve toplam oksidan (TOS) düzeyleri ölçüldü. Protein tayini Bradford yöntemi kullanılarak yapıldı veya total protein içeren elüsyon -20 °C’de saklandı.

### **Protein Konsantrasyonunun Hesaplanması**

Elde edilen örneklerdeki toplam protein konsantrasyonu Bradford protein tayini (BioRad Protein Assay) ile ölçüldü. Öncelikle Sığır serum albumini Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılarak 0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.2mg/ml konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Her bir eppendorf’a 4 $\mu$ l standart veya bilinmeyen örnek ve 200 $\mu$ l çalışma ayırıcı eklendi.Daha sonrasında karanlık ortamda 5 dk olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Oluşan mavi renk gözlemlenerek 595 nm’de multiplak okuyucuda (Varioskan Multireader, Thermo) ile ölçüldü. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki protein miktarları hesaplandı.<sup>217</sup>

## **SDS-PAGE ve Western Blotting ile MMP2, MMP9, VEGF, EGF, HIF1 $\alpha$ ve Cyclophilin A Proteinlerinin Tayin Edilmesi**

Çalışma dokuları için 60  $\mu$ g protein içeren homojenatlar 1 mM Tris-HCl, % 40 gliserol, % 8 SDS, % 20 2- $\beta$ -merkaptoetanol, % 0.03 bromfenol mavisi içeren jel yükleme tamponu ile 1:4 oranında sulandırıldı ve 95°C'de 4 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Sonrasında ise %5 yükleme (1 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0,05 (w/v) APS ve % 0,05 (w/v) TEMED eklenerek pH 6.8'de hazırlandı) ve % 12 ayırma (1.5 M Tris-HCl, % 30 (w/v) Akrilamid, % 10 (w/v) SDS, % 0.05 (w/v) APS, % 0.05 (w/v) TEMED eklenerek pH 8.8'de hazırlandı) jeline yüklendi. 2 L elektroforez yürütme tamponu içinde 100 volt sabit akımda 1 saat sürede proteinler ayrıştırıldı (Biorad, Mini-PROTEAN 3 Cell). Protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak "Precision Plus Protein Standards" (Biorad) kullanıldı. Ayrıştırılan proteinler, immunoblotting ile ortam sıcaklığında 100 volt sabit akımda, 25 mM Tris-baz, 192 mM glisin ve % 20 v/v metanol içeren, pH 8.3'lük transfer tamponunda 2 saat sürede 0.2  $\mu$ m kalınlıktaki PVDF membrana aktarıldı (mini transblot elektroforetik transfer cell (BioRad)). Daha sonra membran ponceau S boyası ile muamele edilip proteinlerin transfer edildiği konfirme edildi, membran antikor ile tayin edilene kadar PBS içerisinde +4 de bırakıldı. Antikor ile tayin için ilk aşama olarak membrandaki bağlanmamış yerler % 5 süt tozu-TBST ile 1 saat bloke edildikten sonra membran % 1 süt tozu-TBST ile spesifik primer antikor ile ortam sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların PBST ile yıkanmasından sonra membran, 1/5000 oranında sulandırılmış sıçanlara karşı geliştirilmiş amplifiye horseradish peroksidaz (HRP) işaretli sekonder antikor ile 1 saat inkübe edildi ve yıkandıktan sonra kemiluminesans kit ile (20X LumiGLO ve 20X Peroxide, Cell Signaling) kemiluminesans bir reaksiyon gerçekleştirildi ve oluşan ışıma ile bantların görünmesi sağlandı. Bant yoğunlukları Vilber Lourmat Görüntüleme cihazı kullanılarak TIFF formatında saklandı. Tüm görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğu "Image Programı" ile eşit büyüklükte alanlarda sayıldı.

## **Doku Toplam Anti-oksidan Kapasite (TAS) Analizleri**

Toplam antioksidan durum ölçümü Erel yöntemine göre yapıldı.<sup>220</sup> Yöntemin prensibi, örnekteki antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna

indirgemesine dayanır.<sup>1</sup> Standartlar, doku yerine 0 (standart 1) ve 1 (standart 2) milimolar Trolox ekivalan/ litre (mmol Trolox Eq/L) konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri kullanılarak çalışıldı. İkinci ve ilk ölçümler arasındaki farktan absorbans değişimi ( $\Delta$ Abs) hesaplandı. Dokulardaki TAS düzeyleri (mmol Trolox Eq/L) kitte belirtilen aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$TAS = (\Delta Abs \text{ standart 1}) - (\Delta Abs \text{ numune}) / (\Delta Abs \text{ standart 1}) - (\Delta Abs \text{ standart 2})$$

### **Toplam Oksidan Kapasite (TOS) Analizleri**

Toplam oksidan durum ölçümü ölçümü Erel yöntemine göre yapıldı. Yöntemin prensibi, örnekteki oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır<sup>8</sup>. Standart, doku yerine 20 mikromolar hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ekivalan/ litre (mmol  $H_2O_2$  Eq/L) içeren dilue standart çözeltisi kullanılarak çalışıldı. İkinci ve ilk ölçümler arasındaki farktan absorbans değişimi ( $\Delta$ Abs) hesaplandı. Dokulardaki TOS düzeyleri (mmol  $H_2O_2$  Eq/L) kitte belirtilen aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$TOS = (\Delta Abs \text{ doku}) / (\Delta Abs \text{ standart}) \times 20$$

### **Oksidatif Stres İndeksi Analizi (OSI)**

$OSI = [(TOS, \text{ mmol } H_2O_2 \text{ Eq. g1 protein}) / (TAS, \text{ mmol Trolox Eq. g1 protein})]$   
formülüne uygun olarak verilerin analizi gerçekleştirildi.

### **Anastomoz Patensi Değerlendirmesi**

Damar anastomozu sonrasında ve postoperatif 7. Günde Acland testi ile damar patensi ile anastomoz hattındaki kanama makroskopik olarak değerlendirildi. Damar patensi değerlendirilmesinde operasyon mikroskobu (Zeiss OpMi Vario) kullanıldı.

### **İstatistiksel Değerlendirme**

Bu çalışmada parametreler arası analiz için SPSS 17.0 sürümü programı kullanıldı. Vazospazm öncesi, sonrası ve 7. gün LDF sonuçları ile 7. gün alınan doku

örneklerinin biokimyasal inceleme sonuçları Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi.  $p < 0.05$  anlamlı kabul edildi. Anlamlı fark bulunan gruplar arasındaki karşılaştırmalar için ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı ve  $p < 0,0125$  değeri anlamlı kabul edildi. Ayrıca vazospazm öncesi ile 7. gün perfüzyon değerlerini ve vazospazm ve vazospazm sonrası perfüzyon değerlerini karşılaştırmak için Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanıldı ve  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi.



## BULGULAR

### Doku Perfüzyonunun Değerlendirme Sonuçları

Grup 1'in doku perfüzyonu değerlendirmek için yapılan lazer doppler flowmetre sonuçları tablo 1'de gösterilmiştir.

| Grup 1 | Vazospazm<br>Öncesinde | Esnasında | Sonrasında | 7. gün | DELTA |
|--------|------------------------|-----------|------------|--------|-------|
| D1     | 59,64                  | 19,06     | 12,04      | 52,35  | -7    |
| D2     | 60,88                  | 16,06     | 11,18      | 54,21  | -6    |
| D3     | 65,66                  | 19,65     | 12,43      | 58,03  | -7    |
| D3     | 56,34                  | 16,45     | 13,24      | 47,48  | -9    |
| D5     | 64,68                  | 23,36     | 12,01      | 53,23  | -9    |
| D6     | 68,35                  | 14,19     | 10,11      | 64,07  | -4    |
| D7     | 56,45                  | 19,41     | 12,98      | 51,58  | -5    |
| D8     | 62,32                  | 13,44     | 10,17      | 58,83  | -4    |
| D9     | 58,58                  | 14,17     | 11,61      | 55,22  | -3    |
| D10    | 64,31                  | 14,31     | 12,23      | 61,79  | -3    |

Tablo-1. Grup 1'in LDF perfüzyon sonuçları.

Grup 2'nin doku perfüzyonu değerlendirmek için yapılan lazer doppler flowmetre sonuçları tablo 2'de gösterilmiştir.

| <b>Grup 2</b> | <b>Vazospazm<br/>Öncesinde</b> | <b>Esnasında</b> | <b>Sonrasında</b> | <b>7. gün</b> | <b>DELTA</b> |
|---------------|--------------------------------|------------------|-------------------|---------------|--------------|
| <b>D1</b>     | 60,73                          | 11,98            | 12,47             | 63,22         | 3            |
| <b>D2</b>     | 56,15                          | 17,18            | 21,88             | 58,36         | 2            |
| <b>D3</b>     | 67,71                          | 12,02            | 14,28             | 69,25         | 2            |
| <b>D4</b>     | 62,99                          | 13,85            | 15,32             | 67,35         | 5            |
| <b>D5</b>     | 62,59                          | 17,24            | 21,34             | 69,55         | 7            |
| <b>D6</b>     | 57,63                          | 11,07            | 13,89             | 61,32         | 4            |
| <b>D7</b>     | 63,38                          | 12,81            | 14,26             | 67,29         | 4            |
| <b>D8</b>     | 62,67                          | 11,08            | 13,72             | 65,87         | 3            |
| <b>D9</b>     | 61,87                          | 16,04            | 18,12             | 65,29         | 4            |
| <b>D10</b>    | 63,36                          | 19,89            | 23,72             | 69,83         | 6            |

Tablo-2. Grup 2'nin LDF perfüzyon sonuçları.

Grup 3'ün doku perfüzyonu değerlendirmek için yapılan lazer doppler flowmetre sonuçları tablo 3'de gösterilmiştir.

| <b>Grup 3</b> | <b>Vazospazm<br/>Öncesinde</b> | <b>Esnasında</b> | <b>Sonrasında</b> | <b>7. gün</b> | <b>DELTA</b> |
|---------------|--------------------------------|------------------|-------------------|---------------|--------------|
| <b>D1</b>     | 54,98                          | 12,25            | 24,92             | 59,58         | 5            |
| <b>D2</b>     | 63,76                          | 19,43            | 24,07             | 67,94         | 4            |
| <b>D3</b>     | 60,44                          | 18,92            | 22,54             | 64,95         | 4            |
| <b>D4</b>     | 61,67                          | 9,15             | 13,39             | 64,47         | 3            |
| <b>D5</b>     | 61,11                          | 12,56            | 15,14             | 65,56         | 4            |
| <b>D6</b>     | 56,87                          | 11,24            | 16,43             | 61,49         | 5            |
| <b>D7</b>     | 61,58                          | 19,21            | 21,92             | 67,01         | 6            |
| <b>D8</b>     | 62,32                          | 15,57            | 18,27             | 66,48         | 4            |
| <b>D9</b>     | 63,26                          | 14,35            | 17,83             | 69,35         | 6            |
| <b>D10</b>    | 65,16                          | 26,79            | 29,53             | 68,59         | 3            |

Tablo-3. Grup 3'ün LDF perfüzyon sonuçları.

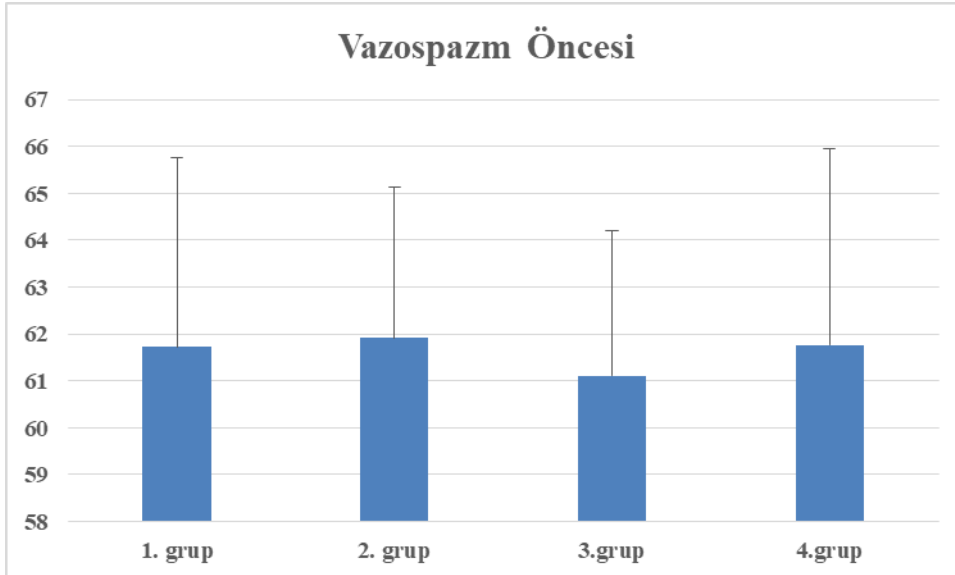


Grup 4'ün doku perfüzyonunu değerlendirmek için yapılan lazer doppler flowmetre sonuçları tablo 4'de gösterilmiştir.

| <b>Grup 4</b> | <b>Vazospazm<br/>öncesinde</b> | <b>Esnasında</b> | <b>Sonrasında</b> | <b>7. gün</b> | <b>DELTA</b> |
|---------------|--------------------------------|------------------|-------------------|---------------|--------------|
| <b>D1</b>     | 62,11                          | 19,33            | 25,17             | 75,77         | 13           |
| <b>D2</b>     | 60,03                          | 20,57            | 26,09             | 70,04         | 10           |
| <b>D3</b>     | 59,47                          | 17,79            | 22,38             | 64,69         | 5            |
| <b>D4</b>     | 58,06                          | 13,65            | 25,97             | 67,27         | 9            |
| <b>D5</b>     | 63,26                          | 19,21            | 26,31             | 71,14         | 8            |
| <b>D6</b>     | 64,76                          | 14,53            | 19,17             | 73,25         | 9            |
| <b>D7</b>     | 58,08                          | 10,74            | 17,56             | 65,71         | 7            |
| <b>D8</b>     | 68,44                          | 19,31            | 25,27             | 72,42         | 4            |
| <b>D9</b>     | 56,06                          | 12,34            | 22,73             | 62,91         | 6            |
| <b>D10</b>    | 67,48                          | 14,64            | 22,29             | 72,17         | 5            |

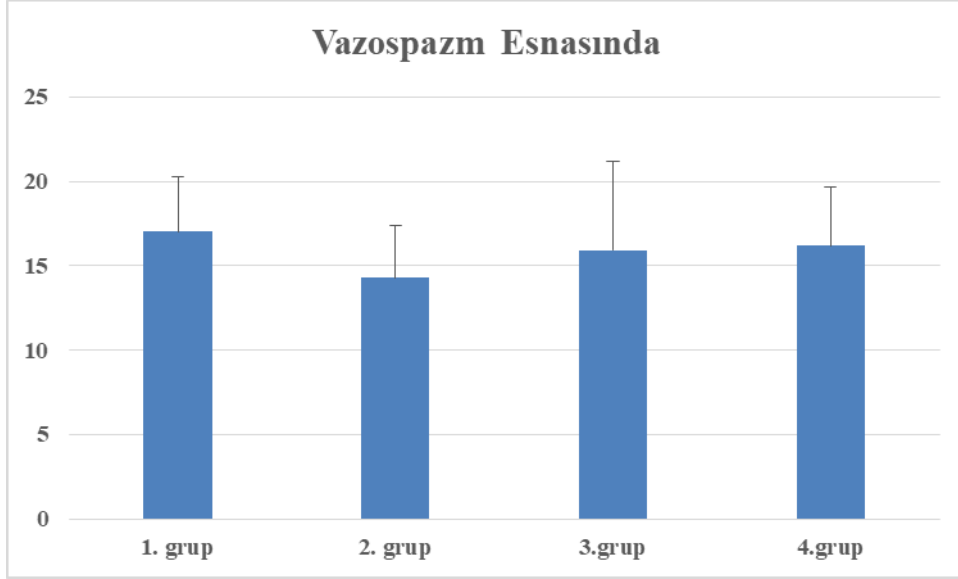
Tablo-4. Grup 4'ün LDF perfüzyon sonuçları.

Vazospazm öncesi doku perfüzyonu değerlendirme sonuçları grafik 1'de gösterilmiştir.



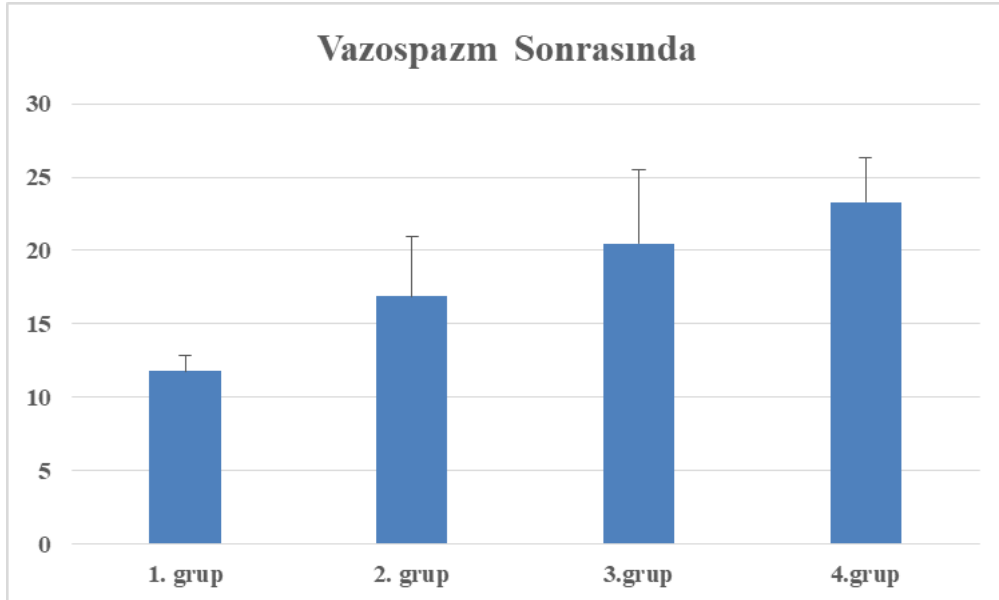
Grafik-1. Vazospazm öncesinin perfüzyon değerlerinin grafik olarak sunumu.

Vazospazm esnasında gruplar arasında doku perfüzyonu değerlendirme sonuçları grafik 2’de gösterilmiştir.



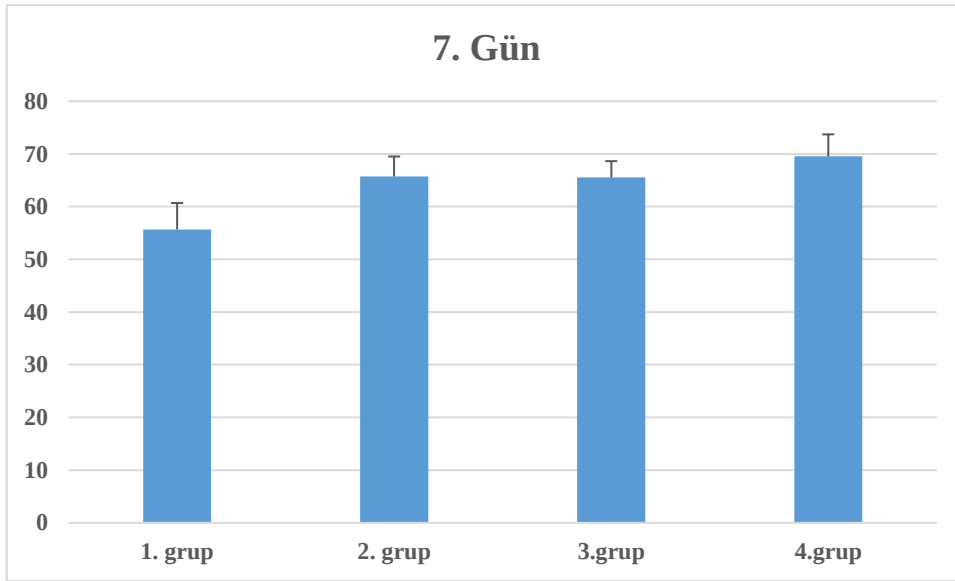
Grafik-2. Vazospazm esnasında perfüzyon değerlerinin grafik olarak sunumu.

Vazospazm sonrası doku perfüzyon değerlendirme sonuçları grafik 3’te Grafik-3.



Grafik-3. Vazospazm sonrasında perfüzyon değerlerinin grafik olarak sunumu.

7. günde doku perfüzyon değerlendirme sonuçları grafik 4'te gösterilmiştir



Grafik-4. 7. gün perfüzyon değerlerinin grafik olarak sunumu.

LDF ile elde edilen doku perfüzyon değerlerinin analizinde gruplar arasında vazospazm öncesi, esnasında, sonrasında ve 7. gün değerleri için karşılaştırma yapıldı. Buna göre vazospazm öncesi ve esnasındaki değerler için gruplarda istatistiksel fark oluşmadığı gözlenirken vazospazm sonrası ve 7. gün değerleri için anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p < 0,05$ ) (Tablo-5)

Vazospazm sonrası ve 7. gün değerlerindeki anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak ve gruplar arası karşılaştırma yapmak amacıyla Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi uygulandı ve  $p < 0,0125$  değeri anlamlı kabul edildi.

Vazospazm sonrası perfüzyon değerleri kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Çalışma grupları arasında da anlamlı farklılık saptandı. En yüksek perfüzyon değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

7. gün perfüzyon değerleri kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Çalışma grupları arasında da anlamlı farklılık saptandı. En yüksek perfüzyon değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

DELTA değeri aynı grup içerisinde 7. gün ile vazospazm öncesi perfüzyon değerleri arasındaki farkı göstermektedir.

DELTA değerleri kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı fark saptandı. Çalışma grupları arasında da anlamlı farklılık saptandı. En yüksek DELTA değeri 4. grupta gözlemlendi.

Gruplar arası perfüzyon değerlerinin karşılaştırılmasındaki istatistiksel anlamlılık Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapıldı. Sonuçlar tablo-5’de gösterilmiştir.

| Kruskal-Wallis | vazospazm öncesi | Esnasında | Sonrasında | 7. gün |
|----------------|------------------|-----------|------------|--------|
| p değeri       | 0,966            | 0,347     | 0,000      | 0,000  |

Tablo-5. Gruplar arası perfüzyon değerlerinin karşılaştırılmasındaki istatistiksel anlamlılık (Kruskal-Wallis varyans analizi).

Gruplar arasında perfüzyon değerlerinin anlamlılığının değerlendirilmesi Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Sonuçlar tablo-6’da gösterilmiştir.

|                     | Vazospazm sonrası                        | 7. gün                                   | Delta                                    |
|---------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Grup 1&amp;2</b> | (1.179±1.058/1.689±4.052)<br>(p = 0.000) | (5.567±5.018/6.573±3.787)<br>(p = 0.001) | (-4,30±2,263/4,000±1,633)<br>(p = 0.000) |
| <b>Grup 1&amp;3</b> | (1.179±1.058/2.040±5.031)<br>(p = 0.000) | (5.567±5.018/6.554±3.091)<br>(p = 0.001) | (-4,30±2,263/4,40±1.075)<br>(p = 0.000)  |
| <b>Grup 1&amp;4</b> | (1.179±1.058/2.329±3.045)<br>(p = 0.000) | (5.567±5.018/6.953±4.190)<br>(p = 0.000) | (-4,30±2,263/7.60±2.757)<br>(p = 0.000)  |
| <b>Grup 2&amp;3</b> | (1.689±4.052/2.040±5.031)<br>(p = 0.082) | (6.573±3.787/6.554±3.091)<br>(p = 0.705) | (4,000±1,633/4,40±1.075)<br>(p = 0.436)) |
| <b>Grup 2&amp;4</b> | (1.689±4.052/2.329±3.045)<br>(p = 0.002) | (6.573±3.787/6.953±4.190)<br>(p = 0,070) | (4,000±1,633/7.60±2.757)<br>(p = 0,003)  |
| <b>Grup 3&amp;4</b> | (2.040±5.031/2.329±3.045)<br>(p = 0.096) | (6.554±3.091/6.953±4.190)<br>(p = 0.041) | (4,40±1.075/7.60±2.757)<br>(p = 0.005)   |

Tablo-6. Perfüzyon değerlerinin anlamlılığının değerlendirilmesi (Mann-Whitney U testi).

Ayrıca grup içi perfüzyon değerlerinin zaman içinde değişiminin karşılaştırılmasına yönelik olarak; vazospazm öncesi ile 7. gün perfüzyon değerlerini ve vazospazm ve vazospazm sonrası perfüzyon değerleri için Wilcoxon Signed Ranks Testi kullanıldı ve p <0,05 anlamlı kabul edildi (tablo 4). Vazospazm öncesi ile 7. gün ve vazospazm ile vazospazm sonrası değerlerin karşılaştırılmasında tüm gruplarda anlamlı fark olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda

perfüzyonun azalmasına bağlı negatif yönde değişim anlamlı iken çalışma gruplarında perfüzyonun artışına bağlı pozitif yönde anlamlılık saptandı.

| Wilcoxon<br>SignedRanks Test            | Kontrol                                 | Damar üzerine                          | Flep damarı içine<br>intrarterial      | Flep damarı içine<br>intrarterial + damar<br>üzerine |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Vazospazm öncesi<br>ile – 7. Gün        | -0,005<br>(61,72±4,041/<br>5.567±5.018) | 0,005<br>(61,90±3,214/<br>6.573±3.787) | 0,005<br>(61,11±3,092/<br>6.554±3.091) | 0,005<br>(61,77±4,172/<br>6.953±4.190)               |
| Vazospazm<br>esnasında ile –<br>sonrası | -0,005<br>(1,701±3,240/<br>1.179±1.058) | 0,005<br>(1,431±3,073/<br>1.689±4.052) | 0,005<br>(1,594±5,221/<br>2.040±5.031) | 0,005<br>(1,621±3,440/<br>2.329±3.045)               |

Tablo-7. Grup içi perfüzyon değerlerinin zaman içinde değişiminin karşılaştırılması (Wilcoxon Signed Ranks Test).

### Biokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Grup 1’deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları Tablo-8’te gösterilmiştir.

| Grup 1 | EGF     | VEGF    | MMP-2   | MMP-9   | HIF-1 $\alpha$ | Siklofilin-A |
|--------|---------|---------|---------|---------|----------------|--------------|
| D1     | 0,50212 | 0,49821 | 0,30349 | 0,25366 | 0,62547        | 0,22321      |
| D2     | 0,50122 | 0,50632 | 0,30499 | 0,25587 | 0,63254        | 0,23523      |
| D3     | 0,50617 | 0,48712 | 0,30548 | 0,24568 | 0,63254        | 0,24895      |
| D4     | 0,49925 | 0,50332 | 0,30365 | 0,25687 | 0,63254        | 0,22987      |
| D5     | 0,49932 | 0,48915 | 0,30465 | 0,25478 | 0,63254        | 0,24954      |
| D6     | 0,49725 | 0,51171 | 0,30399 | 0,25698 | 0,63254        | 0,23523      |
| D7     | 0,50141 | 0,48616 | 0,30468 | 0,25478 | 0,63254        | 0,24854      |
| D8     | 0,48917 | 0,50626 | 0,30564 | 0,30564 | 0,63547        | 0,22621      |
| D9     | 0,50528 | 0,50316 | 0,30594 | 0,24365 | 0,63254        | 0,23932      |
| D10    | 0,50916 | 0,50331 | 0,30469 | 0,25478 | 0,62254        | 0,24083      |

Tablo-8. Grup 1’deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları.

Grup 2'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları Tablo-9'te gösterilmiştir.

| Grup 2 | EGF     | VEGF    | MMP-2   | MMP-9   | HIF-1 $\alpha$ | Siklofilin-A |
|--------|---------|---------|---------|---------|----------------|--------------|
| D1     | 0,76914 | 0,76816 | 0,74698 | 0,70147 | 0,67854        | 0,58694      |
| D2     | 0,77121 | 0,77321 | 0,73689 | 0,70254 | 0,66854        | 0,59654      |
| D3     | 0,75232 | 0,76823 | 0,73356 | 0,70258 | 0,65873        | 0,60568      |
| D4     | 0,76925 | 0,77416 | 0,72586 | 0,70221 | 0,67458        | 0,59874      |
| D5     | 0,76114 | 0,75918 | 0,73674 | 0,70145 | 0,67458        | 0,60845      |
| D6     | 0,75835 | 0,76418 | 0,72417 | 0,70238 | 0,66235        | 0,59654      |
| D7     | 0,77526 | 0,77331 | 0,73146 | 0,70356 | 0,66569        | 0,58745      |
| D8     | 0,77214 | 0,76424 | 0,72165 | 0,70245 | 0,65321        | 0,60874      |
| D9     | 0,76717 | 0,77326 | 0,72587 | 0,70141 | 0,64258        | 0,58745      |
| D10    | 0,76838 | 0,76831 | 0,73147 | 0,70224 | 0,65321        | 0,60876      |

Tablo-9. Grup 2'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları.

Grup 3'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları Tablo-10'da gösterilmiştir.

| Grup 3 | EGF     | VEGF    | MMP-2   | MMP-9   | HIF-1 $\alpha$ | Siklofilin-A |
|--------|---------|---------|---------|---------|----------------|--------------|
| D1     | 0,68112 | 0,70432 | 0,66874 | 0,56874 | 0,70145        | 0,43587      |
| D2     | 0,65221 | 0,70921 | 0,67852 | 0,57896 | 0,71874        | 0,44578      |
| D3     | 0,64616 | 0,69821 | 0,65987 | 0,57846 | 0,70124        | 0,42358      |
| D4     | 0,69837 | 0,69326 | 0,67845 | 0,58796 | 0,69587        | 0,44587      |
| D5     | 0,66616 | 0,70615 | 0,66987 | 0,57845 | 0,70124        | 0,45896      |
| D6     | 0,68427 | 0,68935 | 0,65325 | 0,58645 | 0,70856        | 0,43558      |
| D7     | 0,67319 | 0,71124 | 0,67584 | 0,57412 | 0,70369        | 0,44553      |
| D8     | 0,68431 | 0,70925 | 0,67845 | 0,57654 | 0,71123        | 0,43258      |
| D9     | 0,67214 | 0,71224 | 0,66587 | 0,57784 | 0,70985        | 0,43387      |
| D10    | 0,68424 | 0,71423 | 0,67541 | 0,56897 | 0,7125         | 0,44786      |

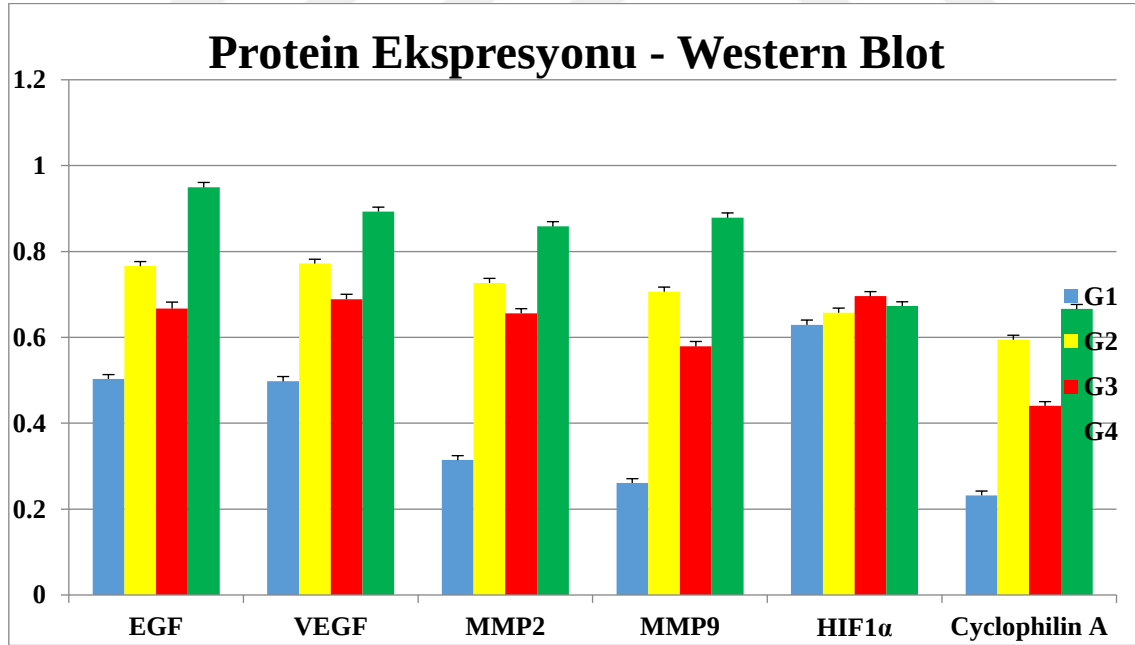
Tablo-10. Grup 3'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları.

Grup 4'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları Tablo-11'te gösterilmiştir.

| Grup 4 | EGF     | VEGF    | MMP-2   | MMP-9   | HIF-1 $\alpha$ | Siklofilin-A |
|--------|---------|---------|---------|---------|----------------|--------------|
| D1     | 0,93425 | 0,87624 | 0,83654 | 0,88745 | 0,66873        | 0,66358      |
| D2     | 0,95315 | 0,87426 | 0,84357 | 0,86547 | 0,66587        | 0,65987      |
| D3     | 0,94536 | 0,86924 | 0,84541 | 0,87456 | 0,67845        | 0,66587      |
| D4     | 0,94515 | 0,88615 | 0,85632 | 0,87412 | 0,65325        | 0,65358      |
| D5     | 0,92228 | 0,87516 | 0,83214 | 0,86456 | 0,67258        | 0,66558      |
| D6     | 0,94216 | 0,88432 | 0,84174 | 0,86521 | 0,66987        | 0,66547      |
| D7     | 0,92331 | 0,86714 | 0,84562 | 0,88456 | 0,67452        | 0,65987      |
| D8     | 0,94326 | 0,87926 | 0,83154 | 0,86325 | 0,66987        | 0,66985      |
| D9     | 0,93515 | 0,86928 | 0,83789 | 0,86347 | 0,65871        | 0,66456      |
| D10    | 0,94325 | 0,87631 | 0,84321 | 0,86447 | 0,66875        | 0,65698      |

Tablo-11. Grup 4'deki deneklerin biokimyasal değerlendirme sonuçları.

Gruplar arasında biokimyasal değerlerinin değişiminin karşılaştırılması grafik-5'de gösterilmiştir.



Grafik-5. Gruplar arasında biokimyasal değerlerinin değişiminin karşılaştırılması.

Tüm biyokimyasal parametrelerin Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapılan karşılaştırma sonucu anlamlılık tespit edildi. p değeri 0.05'den küçük olduğundan anlamlı kabul edildi. EGF,

VEGF, MMP-2, MMP-9, HIF-1 alfa, CYCLOPHILIN-A, TAS, TOS, OSI'ye ait veriler ve p değerleri gösterilmektedir. Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını göstermek üzere karşılaştırma için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak elde edilen analiz sonuçları aşağıda gösterilmiştir.

EGF değerlerinin analizinde hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En yüksek EGF değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

VEGF değerlerinin analizinde hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En yüksek VEGF değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

MMP-2 değerlerinin analizinde hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En yüksek MMP-2 değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

MMP-9 değerlerinin analizinde hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En yüksek MMP-9 değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

HIF-1 alfa değerlerinin analizinde de hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En yüksek HIF-1 alfa değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

Siklofilin-A değerlerinin analizinde hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En yüksek Siklofilin-A değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

Biokimyasal değerlerinin karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılık Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapıldı. Sonuçlar tablo 12'de gösterilmiştir.

| Kruskal-Wallis | EGF   | VEGF  | MMP-2 | MMP-9 | HIF-1 alfa | Siklofilin-A |
|----------------|-------|-------|-------|-------|------------|--------------|
| p değeri       | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000      | 0,000        |

Tablo-12. Biokimyasal değerlerinin karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlılık.



Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında biokimyasal değerlerinin istatistiksel anlamlılığı Mann Whitney U testi ile yapıldı. Sonuçlar tablo 13’de gösterilmiştir.

| Mann-Whitney U testi | EGF                                             | VEGF                                         | MMP-2                                        | MMP-9                                        | HIF-1 alfa                                   | Siklofilin-A                                 |
|----------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>1&amp;2</b>       | (0.501±0.005/0.766±0.007)<br><b>(p = 0.000)</b> | (0.499±0.008/0.768±0.004) <b>(p = 0.000)</b> | (0.304±0.000/0.731±0.007) <b>(p = 0.000)</b> | (0.253±0.004/0.702±0.000) <b>(p = 0.000)</b> | (0.631±0.003/0.663±0.011) <b>(p = 0.000)</b> | (0.237±0.009/0.598±0.009) <b>(p = 0.000)</b> |
| <b>1&amp;3</b>       | (0.501±0.005/0.674±0.015)<br><b>(p = 0.000)</b> | (0.499±0.008/0.704±0.008) <b>(p = 0.000)</b> | (0.304±0.000/0.670±0.008) <b>(p = 0.000)</b> | (0.253±0.004/0.577±0.006) <b>(p = 0.000)</b> | (0.631±0.003/0.706±0.006) <b>(p = 0.000)</b> | (0.237±0.009/0.440±0.010) <b>(p = 0.000)</b> |
| <b>1&amp;4</b>       | (0.501±0.005/0.938±0.009)<br><b>(p = 0.000)</b> | (0.499±0.008/0.875±0.006) <b>(p = 0.000)</b> | (0.304±0.000/0.841±0.007) <b>(p = 0.000)</b> | (0.253±0.004/0.870±0.009) <b>(p = 0.000)</b> | (0.631±0.003/0.668±0.007) <b>(p = 0.000)</b> | (0.237±0.009/0.662±0.004) <b>(p = 0.000)</b> |
| <b>2&amp;3</b>       | (0.766±0.007/0.674±0.015)<br><b>(p = 0.000)</b> | (0.768±0.004/0.704±0.008) <b>(p = 0.000)</b> | (0.731±0.007/0.670±0.008) <b>(p = 0.000)</b> | (0.702±0.000/0.577±0.006) <b>(p = 0.000)</b> | (0.663±0.011/0.706±0.006) <b>(p = 0.000)</b> | (0.598±0.009/0.440±0.010) <b>(p = 0.000)</b> |
| <b>2&amp;4</b>       | (0.766±0.007/0.938±0.009)<br><b>(p = 0.000)</b> | (0.768±0.004/0.875±0.006) <b>(p = 0.000)</b> | (0.731±0.007/0.841±0.007) <b>(p = 0.000)</b> | (0.702±0.000/0.870±0.009) <b>(p = 0.000)</b> | (0.663±0.011/0.668±0.007) (p = 0,325)        | (0.598±0.009/0.662±0.004) <b>(p = 0.000)</b> |
| <b>3&amp;4</b>       | (0.674±0.015/0.938±0.009) <b>(p = 0.000)</b>    | (0.704±0.008/0.875±0.006) <b>(p = 0.000)</b> | (0.670±0.008/0.841±0.007) <b>(p = 0.000)</b> | (0.577±0.006/0.870±0.009) <b>(p = 0.000)</b> | (0.706±0.006/0.668±0.007) <b>(p = 0.000)</b> | (0.440±0.010/0.662±0.004) <b>(p = 0.000)</b> |

Tablo-13. Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında biokimyasal değerlerinin istatistiksel anlamlılığı (Mann Whitney U testi)

### Oksidatif Stres Belirteçlerinin Değerlendirilme Sonuçları

Grup 1'in oksidatif stres belirteç değerleri tablo 14'de gösterilmiştir.

| Grup1 | TOS      | TAS      | OSİ      |
|-------|----------|----------|----------|
| D1    | 3,793221 | 0,576638 | 6,578169 |
| D2    | 4,178592 | 0,557604 | 7,493829 |
| D3    | 4,306756 | 0,613317 | 7,277541 |
| D4    | 3,920282 | 0,559736 | 5,84381  |
| D5    | 3,697377 | 0,724214 | 7,105365 |
| D6    | 4,220269 | 0,684511 | 4,319073 |
| D7    | 3,056458 | 0,513037 | 5,759311 |
| D8    | 4,223548 | 0,632548 | 4,564843 |
| D9    | 4,012357 | 0,785642 | 5,325547 |
| D10   | 4,135864 | 0,523659 | 6,354766 |

Tablo-14. Grup 1'in oksidatif stres belirteç değerleri.

Grup 2'nin oksidatif stres belirteç değerleri tablo 15'de gösterilmiştir.

| Grup 2 | TOS      | TAS      | OSİ      |
|--------|----------|----------|----------|
| D1     | 3,596743 | 0,86223  | 4,781278 |
| D2     | 3,810669 | 0,961192 | 3,964523 |
| D3     | 2,553412 | 0,936496 | 4,011667 |
| D4     | 3,833337 | 0,947828 | 3,658363 |
| D5     | 3,969765 | 1,071354 | 3,705371 |
| D6     | 3,304134 | 0,970014 | 3,087933 |
| D7     | 2,979524 | 0,834452 | 3,570642 |
| D8     | 3,687513 | 0,935876 | 4,235479 |
| D9     | 3,265898 | 0,835479 | 3,254793 |
| D10    | 3,968754 | 0,987546 | 4,325795 |

Tablo-15. Grup 2'nin oksidatif stres belirteç değerleri.

Grup 3'ün oksidatif stres belirteç değerlerinin sonuçları tablo 16'da gösterilmiştir

| Grup 3 | TOS      | TAS      | OSİ      |
|--------|----------|----------|----------|
| D1     | 3,56653  | 1,311229 | 3,913977 |
| D2     | 3,281657 | 0,639306 | 6,697354 |
| D3     | 3,307789 | 1,163843 | 3,431875 |
| D4     | 2,910587 | 1,291678 | 4,919206 |
| D5     | 3,152383 | 1,164244 | 4,306361 |
| D6     | 3,993253 | 1,01353  | 3,939946 |
| D7     | 3,423326 | 0,918758 | 3,726036 |
| D8     | 3,061528 | 0,956046 | 4,666635 |
| D9     | 3,988167 | 0,611664 | 4,885304 |
| D10    | 3,169854 | 0,842399 | 4,986457 |

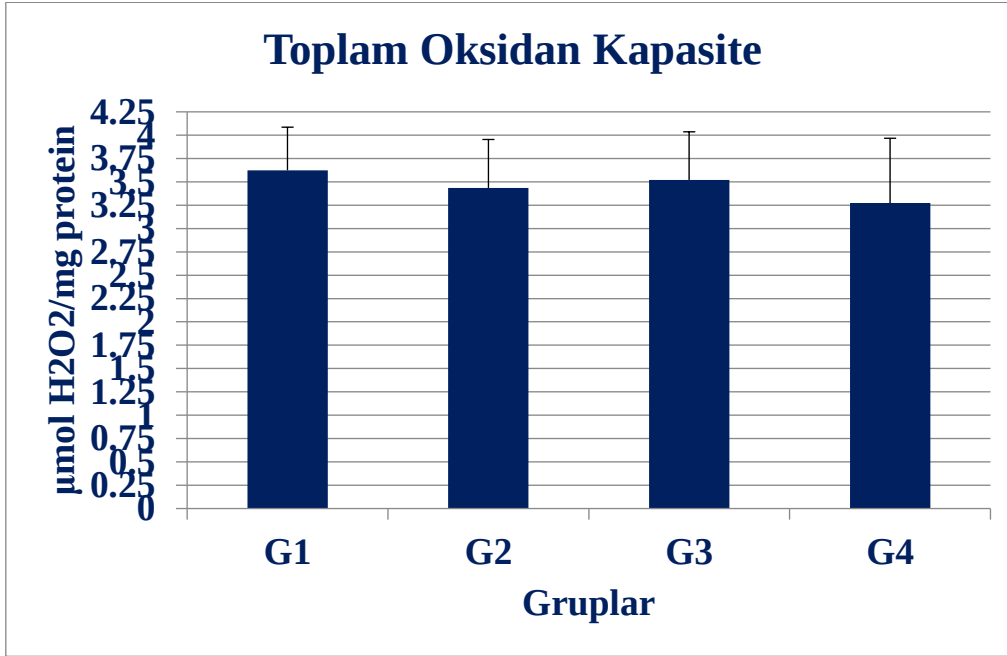
Tablo-16. Grup 3'ün oksidatif stres belirteç değerleri.

Grup 4'ün oksidatif stres belirteç değerleri tablo 17'de gösterilmiştir.

| Grup 4 | TOS      | TAS      | OSİ      |
|--------|----------|----------|----------|
| D1     | 3,562461 | 1,001028 | 3,558803 |
| D2     | 2,952653 | 0,968382 | 3,84269  |
| D3     | 3,510175 | 1,304514 | 2,690792 |
| D4     | 2,452849 | 1,078369 | 2,274591 |
| D5     | 2,676851 | 1,074769 | 3,421062 |
| D6     | 1,371148 | 1,350029 | 2,497093 |
| D7     | 2,816611 | 0,980556 | 3,745866 |
| D8     | 2,853817 | 1,156266 | 2,872338 |
| D9     | 1,964827 | 0,991869 | 3,994615 |
| D10    | 2,654236 | 1,235479 | 2,854626 |

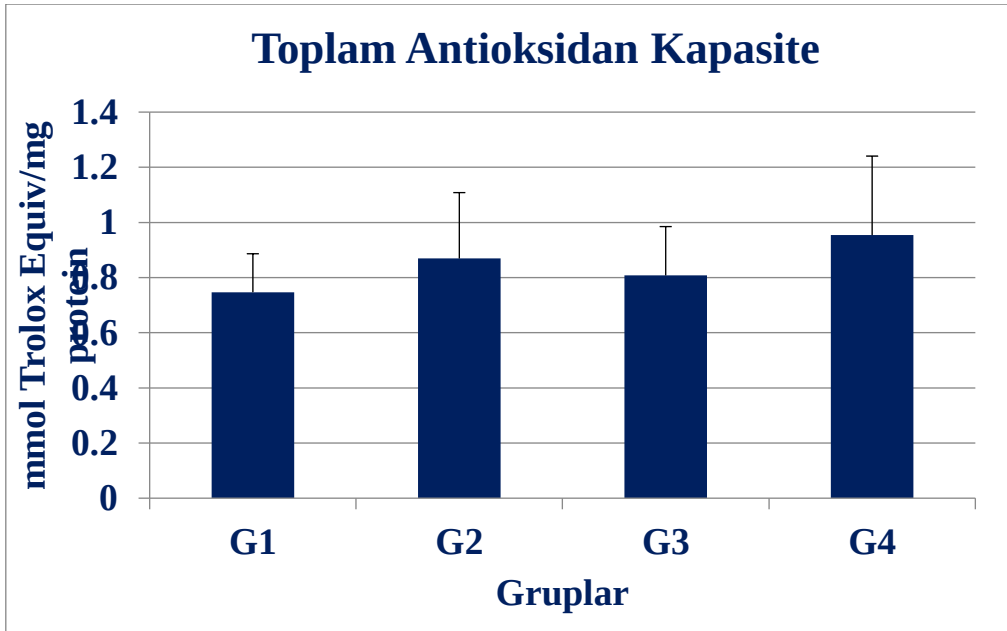
Tablo-17. Grup 4'ün oksidatif stres belirteç değerleri.

Toplam oksidan kapasite değerlerinin sonuları grafik-6’da gsterilmişdir.



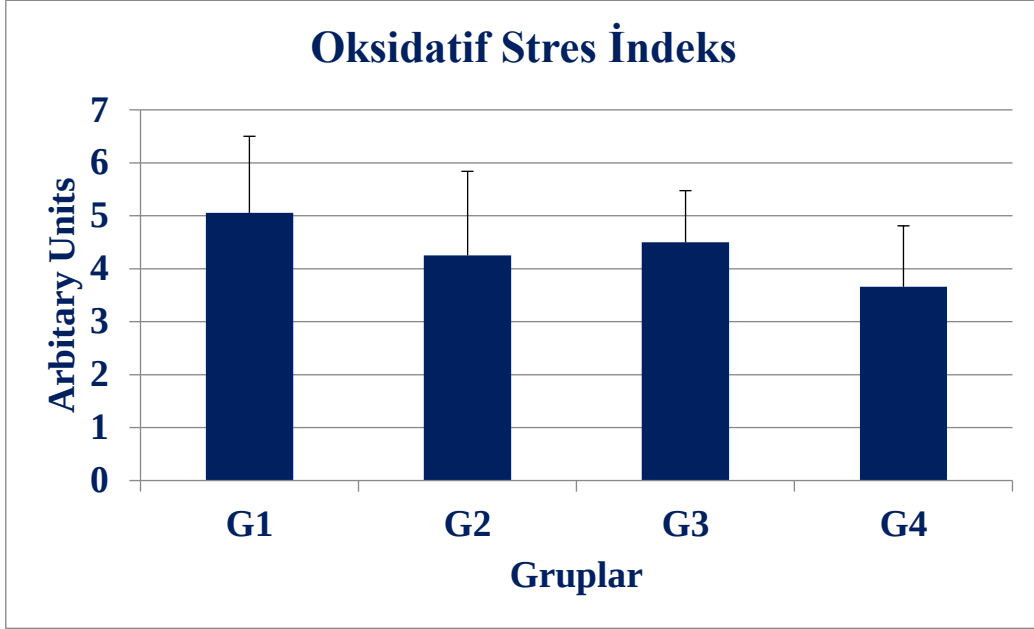
Grafik-6. Toplam oksidan kapasite değerlerinin grafik olarak sunumu.

Toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafik-7’de gsterilmişdir.



Grafi-7. Toplam antioksidan kapasite değerlerinin grafik olarak sunumu.

Oksidatif Stres İndeksi değerlerinin sonuçları grafik-8’de gösterilmiştir.



Grafi-8. Oksidatif Stres İndeksi değerlerinin grafik olarak sunumu.

TOS değerlerinin analizinde hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En düşük TOS değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.

TAS değerlerinin analizinde hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En yüksek TAS değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi.(Tablo-19)

OSI toplam oksidatif kapasitenin toplam antioksidan kapasiteye oranıdır.OSI değerlerinin analizinde hem kontrol grubu ile diğer gruplar arasında hem de çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı. En düşük OSI değerinin 4. grupta olduğu gözlemlendi:.

Oksidatif stres belirteçlerinin istatistiksel anlamlılığı Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Sonuçlar tablo-18’de gösterilmiştir.

| Kruskal-Wallis | TOS   | TAS   | OSI   |
|----------------|-------|-------|-------|
| p değeri       | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Tablo-18. Oksidatif stres belirteçlerinin istatistiksel anlamlılığı (Kruskal-Wallis varyans analizi).

Gruplar arasında oksidatif stres belirteç değerlerinin karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. Sonuçlar tablo 19’da gösterilmiştir.

| Mann-Whitney U testi | TOS                                             | TAS                                             | OSI                                             |
|----------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>Grup 1&amp;2</b>  | (3.954±0.373/3,496±0.465)<br>(p = 0.016)        | (0.617±0.089/0.934±0.073)<br><b>(p = 0.000)</b> | (6,062±1,101/3,859±0.511)<br><b>(p = 0.000)</b> |
| <b>Grup 1&amp;3</b>  | (3.954±0.373/3,385±0.367)<br><b>(p = 0.008)</b> | (0.617±0.089/0.991±0.247)<br><b>(p = 0.001)</b> | (6,062±1,101/4,547±0.932)<br><b>(p = 0.008)</b> |
| <b>Grup 1&amp;4</b>  | (3.954±0.373/2,681±0.655)<br><b>(p = 0,000)</b> | (0.617±0.089/1,114±0.140)<br><b>(p = 0,000)</b> | (6,062±1,101/3,175±0.610)<br><b>(p = 0,000)</b> |
| <b>Grup 2&amp;3</b>  | (3,496±0.465/3,385±0.367)<br>(p = 0.545)        | (0.934±0.073/0.991±0.247)<br>(p = 0.450)        | (3,859±0.511/4,547±0.932)<br>(p = 0.070)        |
| <b>Grup 2&amp;4</b>  | (3,496±0.465/2,681±0.655)<br><b>(p = 0,005)</b> | (0.934±0.073/1,114±0.140)<br><b>(p = 0,001)</b> | (3,859±0.511/3,175±0.610)<br>(p = 0,023)        |
| <b>Grup 3&amp;4</b>  | (3,385±0.367/2,681±0.655)<br><b>(p = 0.008)</b> | (0.991±0.247/1,114±0.140)<br>(p = 0.257)        | (4,547±0.932/3,175±0.610)<br><b>(p = 0.002)</b> |

Tablo-19. Gruplar arasında oksidatif stres belirteç değerlerinin karşılaştırılması (Mann Whitney U testi).

### Patensi ve Nekroz Değerlendirilmesi

Acland testi ile anastomoz sonrası ve 7. gün yapılan patensi değerlendirmesinde tüm gruplarda anastomozların patent olduğu ve patensi farkı olmadığı gözlemlendi. Damar patensi, arter anastomoz hattının 0.5 cm distalinden damar kesilip kan akımı görülerek tespit edildi. Tüm gruplarda tüm anastomozlarda distale geçiş saptandı ve anastomoz hattında trombus saptanmadı. Topografik değerlendirmede deneklerin hiçbirinde makroskopik olarak flep nekroz alanı saptanmadı.

## TARTIŞMA

Doğru mikrocerrahi tekniklerin uygulanması trombozis riskini ve serbest flep kayıplarını azaltır. Ameliyat esnasında vazospazm önceden bilinemez ve vazospazm serbest doku nakillerinin başarısı için kritik öneme sahiptir. Adventisyanın soyulması, vasküler lümenin dilate edilmesi, topikal vazodilatatörler veya spazmolitik ajanlar uygulaması ile vazospazm giderilebilir.<sup>218,219</sup>

Vazospazma sekonder olarak oluşan iskemi-reperfüzyon hasarını önlemek için vazospazm gelişimini önlemek veya süresini kısaltmak gerekir.<sup>220</sup> Vazospazmı çözmek için farklı yöntemler ve ilaçlar kullanılır.<sup>221</sup> Spazm hem anastomoz sırasında hem de anastomoz sonrası engellenmeye çalışılmalıdır.<sup>222</sup> Bu nedenle farmakolojik ajanların (lidokain, nikardipin, verapamil, nifedipin, sodyum nitroprusid, and hidralazin, papaverin, pentoksifilin, magnezyum sülfat, fentolamin ve klorpromazin) kullanımı, rejyonel blok, sempatektomi, hastanın ısıtılması gibi birçok yöntem geliştirilmiş olsa da etkinlikleri literatürde tartışmalıdır.<sup>223</sup>

Sempatektominin vasküler tonusu azaltarak mikrodolaşımı arttırdığı gözlenmiştir.<sup>224</sup> Ayrıca epidural anestezide sempatik sistem bloke edilmekte ve kan dolaşımı artmaktadır. Brakiyal pleksus bloğu yapıldıktan sonra radial arter üzerindeki sempatik etkinin ortadan kalkması sonucu damarda dilatasyon gözlenmiştir. Tüm bu işlemlerde damar ve etrafına yönelik invaziv girişimler yapıldığından dolayı morbidite riski içermektedir.<sup>225</sup> Diğer taraftan deneysel çalışmalar ve klinik gözlemler göstermiştir ki sempatektomi sonrası aşırı vazokonstriksiyonla karakterize denervasyon süpersensitivitesi gelişebilmektedir.<sup>226,227</sup> Bu rebound etki; bu yöntemin vazospazmda kullanımını tartışılır kılmaktadır.

Çalışmamızda 7. gün perfüzyon ve biyopsi sonuçlarımızda ise herhangi bir rebound etkiyi işaret eden bulgu saptanmamıştır. Magnezyum sülfatın erken dönem etkisi vazospazm sonrası doku perfüzyon değerinde artış olması ile gösterilirken; uzun dönem etkisi 7. günde yapılan değerlendirmelerde çalışma gruplarında kontrol grubuna oranla flep perfüzyon ile anjiogenez değerlerinin artması ve apoptoz ile oksidatif stres değerlerinin azalması ile gösterilmiş oldu.

Nörotoksin uygulaması ile damar çapında artış olduğu gösterilmiş ve daha yüksek patens oranına ulaşıldığı saptanmıştır.<sup>228</sup> Fakat bildiğimiz üzere nörotoksin uygulaması asetil kolin salımını inhibe ederek etki gösterdiği için daha geç dönemde etki göstermektedir. Bu nedenle nörotoksin uygulaması acil durumda uygulanamaz ve ameliyat esnasında kullanımı durumunda

fayda vermesi beklenmez. Bu yüzden de teorik olarak sadece seçilmiş vakalarda elektif ameliyat öncesinde uygulanabilir. botulinium toksin çevre dokulara yayılabilir, bu nedenle anastomoz bölgesinde çevre kaslara difüze olmak suretiyle istenmeyen kas paralizilerine yol açabilir.

Beekman ve ark. lidokainin vazodilatasyon etkisinin doz bağımlı olduğunu belirtmişlerdir.<sup>229</sup> Yüksek dozda lidokainin vazospazma yönelik etkisi gösterilmiş olup doza bağlı toksisite oluşumu kullanımını sınırlamaktadır. Düşük doz lidokain kullanımında ise vazospazma etkisi sınırlı olabileceği gibi vazospazmı düzeltemediği veya vazospazm süresinin uzamasına yönelik etki gösterdiği de bildirilmiştir.

Nifedipin ve verapamil, kalsiyum kanal blokajı oluşturarak vazodilatasyon yapar.<sup>230</sup> Verapamil nifedipine oranla vazodilatasyonda daha etkindir fakat kardiyak yan etkileri mevcuttur.<sup>231</sup> Kalsiyum kanal blokörlerinin terapötik doz aralığı düşüktür. Magnezyum sülfatın doz aralığı ise geniştir. Dolayısıyla bu özellik ona geniş bir doz aralığında klinik uygulama olanağı sağlar.

Hyza ve ark.nın yaptığı çalışmalarda magnezyum sülfatın vazospazm süresini azalttığı ve flep deri adası perfüzyonunu arttırdığını gösterilmiştir.<sup>232,233</sup> Aynı çalışmada sadece pedikül üzerine magnezyum sülfat uygulama yapılmıştı. Bu yöntem çalışmamızın 2. grubuna denk gelmektedir. Çalışmamızda Hyza ve ark çalışmasından farklı olarak, magnezyum sülfat, hem flep damarı içine intraarteriyal olarak, hem de damar üzerine uygulandı. Bu şekilde magnezyum sülfat uygulamasının flep perfüzyonuna, anastomoz üzerine ve dolayısıyla flep fizyolojisine etkisi değerlendirilmiştir. Sonuçlarımıza göre her iki bölgeye ilaç uygulandığında flep perfüzyonunda anlamlı derecede arttığı ve biyokimyasal olarak değerlendirilen anjiogenezis, apoptoz ve oksidatif stres belirteçleri ile de anlamlı fark olduğu saptandı. Bu sonuç magnezyum sülfatın hem damar içi hem damar üzerine uygulanmasının sinerjestik etki gösterebildiğini veya vazospazmın sadece anastomoz hattında değil; aynı zamanda flep içinde arterioller sistemde de olabileceğini düşündürmektedir.

Hyza ve ark. flep perfüzyonu için sadece vazospazm sonrası magnezyum sülfat uygulaması ile oluşan etkisini araştırmıştı. Çalışmamızda ise farklı olarak deri perfüzyonu değerlendirmesi vazospazm öncesi, esnasında, sonrasında ve 7. Gün (sakrifikasyon öncesi) yapıldı. Bu şekilde anastomoza etkisi ve flep dolaşımına etkisi birlikte değerlendirilebilmesi için



yeni bir model oluşturuldu. Aynı zamanda bu model klinik serbest doku aktarımlarındaki vazospazmı simule etmeyi de amaçlamıştır. Öyle ki; vazospazm esnası ile sonrası perfüzyon değerlerinin karşılaştırılması ile magnezyum sülfat uygulamasının akut etkisi ve dolayısıyla anastomoza etkisini değerlendirilmiştir. Vazospazm öncesi ile 7. Gün perfüzyon değerleri karşılaştırılması ile de magnezyum sülfat uygulamasının uzun süreli etkisi ve dolayısıyla flep fizyolojisine etkisi değerlendirilmiştir.

Literatürden farklı olarak çalışmamızda EGF, VEGF, HIF-1 alfa, MMP-2, MMP-9, siklofilin-A, TAS, TOS, OSİ belirteçleri değerlendirildi. 4. grupta yüksek perfüzyon değerlerine paralel olarak hücre apoptozunu, proliferasyonu, migrasyonu, angiogenezi gösteren (EGF) değerleri, hiposiye yanıt olarak yükselerek angiogenezi gösteren HIF-1 alfa ve VEGF değerleri ile hücre farklılaşması, hücre migrasyonu, angiogenezi gösteren MMP-2 MMP-9, apoptozu gösteren Siklofilin A değerleri yüksektir.<sup>234,235</sup> Literatürde siklofilin a düzeyi ile apoptoz arasında ters orantılı ilişki gösterildiği üzere çalışmamızda da en yüksek siklofilin a düzeyi 4. Grupta, yani perfüzyonun ve angiogenezin en yüksek olduğu grupta, saptanmıştır.<sup>236,237</sup> TAS değerleri de 4. grupta aynı doğrultuda yüksek saptanmıştır. Bu sonuçların birbiri ile uyumlu olması çalışmanın tutarlılığını desteklemektedir. Bununla birlikte, oksidatif stresi gösteren toplam oksidatif kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (TOS/TAS=OSİ) 4. Grupta en düşük seviyede tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre hem damar üzerine hem de intraarteryel yolla flep içine magnezyum sülfat uygulamasının angiogenezi arttırarak, oksidatif stresi ve apoptozu azaltarak flep fizyolojisine ve sağkalımına olumlu yönde etki ettiği söylenebilir.<sup>238,239</sup>

Perfüzyon değerlendirmesindeki DELTA değeri en yüksek 4. grupta saptanması en etkin tedavi grubunun 4. grup olduğunu desteklemektedir. TOS ve TAS değerlerinin analizinde en düşük TOS değeri 4. grupta en yüksek TAS değeri 4. grupta olması da magnezyum sülfat uygulamasının en etkin tedavi yöntemi olduğunu ve oksidatif stresi azalttığı, flep perfüzyonunu artırdığı söylenebilir.

Yukarıda da belirtildiği üzere çalışmamızda angienez, oksidatif stres, apoptoz ve perfüzyona ilişkin çok sayıda parametre değerlendirilmiştir. Parametrelere ilişkin sonuçların birbiri ile uyumlu olması çalışmanın tutarlılığını desteklediği gibi aynı zamanda bu

parametrelerin diğ er flep sağkalımı, iskemi-reperfüzyon hasarı veya vazospazma yönelik çalışmalarda da kullanılabileceğini işaret etmektedir.

Acland testi ile anastomoz sonrası ve 7. gün yapılan patensi değerlendirmesinde tüm gruplarda anastomozların patent olduğu ve patensi farkı olmadığı gözlendi. Bu durum aynı cerrah tarafından anastomozların yapılmasından kaynaklanabilir. Veya patensi değerlendirmesinin anastomozdaki vazospazmı göstermekte yetersiz kalabileceğini düşündürmektedir. Literatürde de vazospazma ilgili çalışmalarda patensi testi yerine damar çapının değerlendirildiği bildirilmiştir. Anastomoza ilişkin bir histopatolojik değerlendirme çalışmamızın konusuna dahil edilmemiştir.

Bu çalışmada vazospazm tedavisinde kullanımı araştırılmış olan magnezyum sülfatın flep fizyolojisi ve perfüzyonundaki etkileri araştırılmıştır. Bu nedenle nispeten küçük boyutlu bir flep tercih edilmiştir ve flep nekrozuna dair topografik değerlendirme yapılmamıştır. Yine de aşırı genişletilmiş boyutlu fleplerin kullanımı ile flep sağkalımı ve nekroz boyutuna etkisi ayrı bir çalışmanın konusu olarak değerlendirilebilir.

Çalışmada ilaç etkileşimlerini önlemek için magnezyum sülfat dışında antikoagülasyon ve antiagregan ilaç kullanılmamıştır. Damar anastomozunda ve flep aktarımı sonrasında sıklıkla kullanılan antiagregan ve antikoagülasyon ilaçları ile vazospazmı önleyen magzyum sülfat gibi ajanların birlikte kullanımının etkileri ayrı bir çalışma konusudur.

## SONUÇ

Bu çalışmada magnezyum sülfatın hem damar üzerine hem de intraarteryel yolla damar/flep içine uygulandığında tek başına damar üzeri veya içi uygulamasına göre flep perfüzyonu ve anjiogenezi daha fazla arttırdığı, apoptoz ve iskemi-reperfüzyon hasarını daha fazla azalttığı gösterilmektedir. Bu nedenle vazospazma yönelik tedavinin sadece anastomoz hattında değil flep içinde de etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Magnezyum sülfatın hem erken hem de geç dönem etkin olması onun serbest doku nakillerinde kullanımının önünü açmaktadır.

Damar anastomozunda ve serbest doku nakillerinde antikoagülan ve antiagregan ilaçlar sıklıkla kullanılmakta iken vazospazmı engelleyen ilaçlar klinikte nadiren kullanılmaktadır. Magnezyum sülfatın hem erken hem de geç dönem etkin olması onun kullanımı ile serbest doku nakillerinde doku sağkalımının arttırılabileceğini düşündürmektedir. Bu uygulamanın güvenle klinikte kullanımı için magnezyum sülfatın büyük boyutlu fleplerde ve farklı doz titrelerinde uygulanan çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Lee S, Frank DH, Choi SY. Historical review of small and microvascular vessel surgery. *Ann Plast Surg.* 1983;11(1):53-6
2. Baxter TJ, O'Brien BM, Henderson PN, Bennet RC. The Histopatholoji of small vessels following microvascular repair. *Br J Surg.* 1972;59(8):617-22.
3. McCabe M, Cunningham GJ, Wyatt AP, Rothnie NG, Taylor GW. A histological and histochemical examination of autogenous vein grafts. *Br J Surg.* 1967;54(2):147-55
4. Khaja SF, Rubin N, Bayon R. Venous Complications in one versus two anastomoses in head and neck free flap. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2017;126(10):722-26.
5. Ueda K, Harii K, Nakatsuka T, Asato H, Yamada A. Comparison of end-to-end and end-to-side venous anastomosis in free tissue transfer following resection of head and neck tumors. *Microsurgery.* 1996;17(3):146-9
6. Miyamoto S, Takushima A, Okazaki M, Ohura N, Minabe T, Harii K. Relationship between microvascular arterial anastomotic type and area of free flap survival: comparison of end-to-end, end-to-side, and retrograde arterial anastomosis. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121(6):1901-8.
7. Radad K, El-Shazly M. Clinical and pathological assessment of different suture techniques for microvascular anastomosis in rat femoral artery. *J Vet Sci.* 2007;8(3):269-73.
8. Thiede A, Lütjohann K, Beck C, Blunck F. Absorbable and nonabsorbable sutures in microsurgery: standardized comparable studies in rats. *J Microsurg.* 1979;1(3):216-22.
9. Wang WZ, Anderson G, Fleming JT, et al. Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia/reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99:1099
10. Chang EI, Mehrara BJ, Festekjian JH, Da Lio AL, Crisera CA. Vascular complications and microvascular free flap salvage: the role of thrombolytic agents. *Microsurgery.* 2011 Oct;31(7):505-9. doi: 10.1002/micr.20905. Epub 2011.

11. Pollock DC, Li Z, Rosencrance E, Krome J, Koman LA, Smith TL. Acute effects of periarterial sympathectomy on the cutaneous microcirculation. *J OrthopRes* 1997;15:408–13.
12. A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome. Khouri RK, Cooley BC, Kunselman AR, Landis JR, Yeramian P, Ingram D, Natarajan N, Benes CO, Wallemark C. 1998;102(3):711-21.
13. Yousef MA, Dionigi P. Experimental thromboprophylaxis with low molecular weight heparin after microsurgical revascularization. *J Hand Microsurg.* 2015;7(2):256-60.
14. Seiminow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery.* 2004;24(6):468-75.
15. Weinzwieg N, Lukash F, Weinzwieg J. Topical and systemic calcium channel blockers in prevention and treatment of microsurgical spasm in a rat epigastric island flap model. *Ann Plast Surg.* 1999;42:320–26.
16. Kumar, Abbas, Aster. Robbins Basic Pathology. Hemodinamik bozukluklar, tromboembolizm, şok. Elsevier Saunders. Philadelphia. 9th Ed. 75-99. 2016
17. Deniz Basci, Amanda A. Gosman. Basics of Flaps. Essentials of Plastic Surgery. Edi: Jeffrey E. Janis. Quality Medical Publishing inc. CRC Press Taylor & Francis Group. Columbus, Ohio, America. 2th Ed. 24-45. 2014
18. 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: 87-90.
19. Monteiro DT, Santamore WP, Nemir P Jr. The influence of pentoxifylline on skin-flap survival. *Plast Reconstr Surg.* 1986;77:277–81.
20. Kim DC, Chen D, Perrotta VJ, et al. Porcine gastroepiploic artery as an in vitro experimental model to study vasodilators in microsurgery. *Ann Plast Surg.* 1996;36:502–7
21. Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Vasodilator action of prostaglandin E1 on microcirculation of rat cremaster muscle. *Microsurgery* 1990;11:204–8.
22. Beekman WH, Dammeijer PF, Sluimers JE, Kort WJ, van der Meulen JH. Improvement in blood flow and diameter of the postanastomotic rat tail artery by

- topical application of lidocaine in varying concentrations. *Ann Plast Surg.* 1990 ;24(3):248-51
23. Vargas CR, Lorio ML, Lee BT. A Systematic review of topical vasodilators for the treatment of intraoperative vasospasm in reconstructive microsurgery. *Plast Reconstr Surg.* 2015;136(2):411-22.
  24. Lecoq JP, Joris JL, Nelissen XP, Lamy ML, Heymans OY. Effect of adrenergic stimulation on cutaneous microcirculation immediately after surgical adventitiectomy in a rat skin flap model. *Microsurgery.* 2008;28 (6):480-6.
  25. Godden DR, Little R, Weston A, Greenstein A, Woodward RT. Catecholamine sensitivity in the rat femoral artery after microvascular anastomosis. *Microsurgery.* 2000;20(5):217-20.
  26. Arnold PB, Campbell CA, Rodeheaver G, Merritt W, Morgan RF, Drake DB. Modification of blood vessel diameter following perivascular application of botulinum toxin-A. *Hand (N Y).* 2009;4(3):302-7
  27. Crandall CG, Meyer DM, Davis SL, Dellaria SM. Palmar skin blood flow and temperature responses throughout endoscopic sympathectomy. *Anesth Analg* 2005;100:277–83.
  28. Lazar G, Kaszaki J, Abraham S, Horvath G, Wolfard A, Szentpali K, Paszt A, Balogh A, Boros M. Thoracic epidural anesthesia improves the gastric microcirculation during experimental gastric tube formation. *Surgery* 2003;134:799–805
  29. Choi H, Parmar N. The use of intravenous magnesium sulphate for acute migraine: meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Emerg Med.* 2014;21(1):2-9
  30. Lecuyer M, Rubio M, Chollat C, Lecointre M<sup>1</sup>, Jegou S, Leroux P, Cleren C, Lerroux-Nicollet I, Marpeau L, Viven D, Marret S, Gonzalez. Experimental and clinical evidence of differential effects of magnesium sulfate on neuroprotection and angiogenesis in the fetal brain. *Pharmacol Res Perspect* 2017;5(4).
  31. Irazuzta JE, Chiriboga N. Magnesium sulfate infusion for acute asthma in the emergency department. *J Pediatr (Rio J).* 2017 26. pii: S0021-7557(17)30539-9

32. Keepanasseril A, Maurya DK, Manikandan K, Suriya J Y, Habeebullah S, Raghavan SS. Prophylactic magnesium sulphate in prevention of eclampsia in women with severe preeclampsia: randomised controlled trial (PIPES trial). *J Obstet Gynaecol.* 2017 3;1-5.
33. Binette A, Blouin S, Ardilouze A, Pasquier JC. Neuroprotective effects of antenatal magnesium sulfate under inflammatory conditions in a sprague- Dawley pregnant rat model. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017;30 (14):1715-20.
34. Chollat C, Le Doussal L, de la Villeon G, Provost D, Marret S. Antenatal magnesium sulphate administration for fetal neuroprotection: a French national survey. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017 13;17(1):304.
35. Ohta I, Kawai H, Kawabata H, Masada K, Ono K. Topical use of Xylocaine for relieving vasospasm: Effect of concentration. *J Reconstr Microsurg.* 1991;7:205–8.
36. Tamai S. History of microsurgery. *Plast Reconstr surg.* 2009 Dec;124(6 Suppl):e282-94
37. Carrel A. La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères. *Lyon Med.* 1902;98:859–63.
38. Höpfner E. Über Gefassnaht, Gefasstransplantationen und Replantation von amputierten Extremitäten. *Arch Klin Chir.* 1903;70:417–71.
39. Nylen CO. The microscope in aural surgery: Its first use and later development. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1954;116:226–40.
40. Nylen CO. The otomicroscope and microsurgery 1921-1971. *Acta Otolaryngol.* 1972;73(6):453-4.
41. Dohlman GF. Carl Olof Nylen and birth of the otomicroscope and microsurgery. *Arch Otolaryngol.* 1969;90(6):813-7
42. Holmgren G. Some Experiences in surgery of otosclerosis. *Acta Otolaryngol.* 1923;5:460-6.
43. McLean J. The thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol.* 1916;41:250–7.
44. Charles AF, Scott DA. Studies on heparin I. The preparation of heparin. *J Biol Chem.* 1933;102:425–9.

45. Jacobson JH, Suarez EL. Microsurgery in anastomosis of small vessels. Surg Forum.1960;11: 243-5
46. Jacobson JH. The development of microsurgical technique.In: Donaghy RMP, Yasargil MG, eds. Micro-vascular Surgery: Report of First Conference, October 6–7, 1966, Mary Fletcher Hospital, Burlington, Vermont. Stuttgart: Thieme;1967:4–14.
47. Malt RA, McKhann CF. Replantation of severed arms. JAMA. 1964;189:716–22.
48. Chen ZW, Chien YC, Bao YS. Salvage of the forearm following complete traumatic amputation: Report of a case. Chin Med J. 1963;82:632.
49. Kleinert HE, Kasdan ML. Anastomosis of digital vessels. J Ky Med Assoc. 1965;63:106–8
50. Seidenberg B, Rosenak SS, Hurwitt ES, Som ML. Immediate reconstruction of the cervical esophagus by a revascularized isolated jejunal segment. Ann Surg.1959 Feb;149(2):162-71
51. Buncke HJ Jr, Schulz WP. Total ear reimplantation in the rabbit utilising microminiature vascular anastomose. Br J plast Surg. 1966;19(1):15-22
52. Komatsu S, Tamai S. Successful replantation of a completely cut-off thumb. Plast Reconstr Surg. 1968;42:374–7.
53. Chen ZW, Yang DY, Chang DS. Microsurgery. New York: Springer; 1982:143.
54. Fujino T, Harashina T, Mikata A. Autogenous en bloc transplantation of the mammary gland in dogs, using microsurgical technique. Plast Reconstr Surg. 1972;50:376–81
55. McLean DH, Buncke HJ Jr. Autotransplant of omentum to large scalp defect with microsurgical revascularization. Plast Reconstr Surg. 1972;49:268–74.
56. Daniel RK, Taylor GI. Distant transfer of an island flap by microvascular anastomoses: A clinical technique. Plast Reconstr Surg. 1973;52:111–7.
57. Miller GD, Anstee EJ, Snell JA. Successful replantation of an avulsed scalp by microvascular anastomoses. Plast Reconstr Surg. 1976;58:133–6



58. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, et al. Human hand allograft: Report on first 6 months. *Lancet* 1999;353:1315–20.
59. Devauchelle B, Badet L, Lengele B, Morelon E, Testelin S, Michalet M, D'Hauthuille C, Dubernard JM. First human face allograft: early report. *Lancet*. 2006 15;368(9531):203-9
60. Siemionow Mz, Papay F, Djohan R, Bernard S, Gordon CR, Alam D Hendrickson M, Lohman R, Eghtesad B, Fung J. First U.S. near-total face transplantation: a paradigm shift for massive complex injuries. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(1):111-22
61. Siemionow Mz, Papay F, Alam D, Bernard S, Djohan R, Gordon CR, Hendrickson M, Lohman R, Eghtesad B, Coffman K, Kodish E, Paradis C, Fung J. Near-total face transplantation for a severely disfigured patient in the USA. *Lancet*. 2009 ;374(9685):203
62. Loukas M, Lanteri A, Ferraiola J, Tubbs RS, Maharaja G, Shoja MM, Yadav A, Rao VC. Anatomy in ancient india: a focus on the Susruta Samhita. *J Anat*. 2010 ;217(6):646-50.
63. Webster JP. Gaspare Tagliacozzi--plastic surgeon. *JAMA*. 1969;208(7):1191.
64. Mendelson BC, Masson JK, Arnold PG, Erich JB. Flaps used for nasal reconstruction a perspective based on 180 cases. *Mayo Clin Proc*. 1979;54(2):91-6.
65. Morani AD. The evolution of plastic surgery. *Trans Stud Coll Physicians Phila*. 1958;26(2):84-8.
66. Lamberty B G H , Healy C. Flaps : Physiology , principles of design and pitfalls. *Mastery of Plastic Reconstructive Surgery*. Edi: Cohen M. Little, Brown and Company, Boston/NewYork/Toronto/London, 1th Ed. 56-70.1994.
67. Pedicle muscle flaps and their applications in the surgery of repair By Michael Peru and Sandor Medgyesi, Departments of Plastic and Maxillo-Facial Surgery, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark. *British Journal of Plastic Surgery* (1973), 26, 313-3~1
68. Taylor GI, Miller GD, Ham FJ. The free vascularized bone graft: A clinical extension of microvascular technique. *Plast Reconstr Surg*. 1975;55:533–44.

69. Strauch B, Bloomberg AE, Lewin ML. An experimental approach to mandibular replacement: Island vascular composite rib grafts. *Br J Plast Surg.* 1971;24:334–41.
70. Tamai S, Sasauchi N, Horii Y, Tatsumi Y, Okuda H. Microvascular surgery in orthopedics and traumatology. *J Bone Joint Surg (Br.)* 1972;54:637–47.
71. Research Laboratory for Replantation of Severed Limb, Shanghai Sixth People's Hospital. Free muscle transplantation by microsurgical neurovascular anastomoses: Report of a case. *Chin Med J (Engl.)* 1976;2:47–50.
72. Harii K, Ohmori K, Torii S. Free gracilis muscle transplantation, with microvascular anastomoses for the treatment of facial paralysis. *Plast Reconstr Surg.* 1976;57:133–43.
73. Ueba Y, Fujikawa S. Vascularized fibula graft to neurofibromatosis of the ulna: A 9-year follow up. *Orthop Surg Traumatol.* 1983;26:595–600.
74. Koshima I, Soeda S. Inferior epigastric skin flaps without rectus abdominis muscle. *Br J Plast Surg.* 1989;42:645–8.
75. G Ian Taylor. The blood supply of the skin. *Grabb and Smith Plastic surgery.* Edi: Charles H Thorne, Kevin C. Chung, Arun K. Gosain, Geoffrey C. Gurtner, Babak J. Mehrara, J Peter Rubin, Scott L. Spear. Wolters Kluwer/ Lipincott & Wilkins, Philadelphia/ Baltimore/ New York/ London/ Buenos Aires/ Hong Kong/ Sydney/ Tokyo. 7th Ed. 33–42. 2016
76. Dhar SC, Taylor, GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(7):2079–91.
77. Morris SF, Taylor GI. The time sequence of the delay phenomenon: when is a surgical delay effective? An experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 1995; 95(1):526.
78. Taylor GI, McCarten G, Doyle M. The use of the Doppler probe for planning flaps: anatomical study and clinical applications. *Br J Plast Surg.* 1990;43:1.
79. Callegari PR, Taylor GI, Caddy CM, et al. An anatomical review of the delay phenomenon: 1. Experimental studies. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89:397.
80. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, et al. An anatomical review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89:408.

81. Taylor GI, Gianoutsos MP, Morris SF. The neurovascular territories of the skin and muscles: anatomic study and clinical implications. *Plast Reconstr Surg*. 1994;94:1.
82. Taylor GI, Daniel RK. The anatomy of several free flap donor sites. *Plast Reconstr Surg*. 1975;56:243.
83. Spalteholz W. Die vertheilung der blutgefasse in der haut. *Arch Anat*. 1893.
84. Manhot C. The Cutaneous Arteries of the Human Body. New York: Springer-Verlag, 1983.
85. Salmon M. Arteries of the skin. In: Taylor GI, Tempest M, eds. London: Churchill-Livingstone; 1988.
86. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br Plast Surg*. 1987;40:113.
87. Esser JFS. Artery Flaps. Antwerp: De Vos-van Kleef; 1929.
88. Deniz Basci, Amanda A. Gosman. Basics of Flaps. Essentials of Plastic Surgery. Edi:Jeffrey E. Janis. Quality Medical Publishing inc. CRC Press Taylor & Francis Group. Columbus, Ohio, America. 2th Ed. 24-45. 2014
89. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and physiology of skin flap surgery. In: Joseph G McCarthy, James W May, J William Littler. McCarthy Plastic Surgery. Philadelphia: Saunders, 1990; Vol.1:275-329.
90. Daniel RK, Kerrigan CL. Skin flaps: an anatomical and hemodynamic approach. *Clin Plast Surg* 6:181, 1979
91. Kumar, Abbas, Aster. Robbins Basic Pathology. Kan damarları. Elsevier Saunders. Philadelphia. 9th Ed.327-65.2016
92. Luiz Carlos Junqueira, Jose Carneirao. The circulatory system. Basic histology. Lange Copyrighted Material.10th Ed. 2016.215-33.
93. Guyton and Hall textbook of Medical Histology.Hemostasis and blood coagulation. Elsevier.Copyrighted Material.13th Ed. 2016.483-97.
94. Gelderman PW, Berendsen W. Re-endothelization of microvascular carotid end to side anastomosis in the rat. *J Neurosurg*. 1979;51(6):785-95

95. Khodadad G. Histological evaluation of long-term microvascular repair and replacement. Arch Surg. 1970;101(4):503-7
96. Baxter TJ, O'Brien BM, Henderson PN, Bennet RC. The Histopathology of small vessels following microvascular repair. Br J Surg. 1972;59(8):617-22.
97. Chow SP. The histopathology of microvascular anastomosis: a study of the incidence of various tissue changes. Microsurgery. 1983;4(1):5-9.
98. Thurston JB, Buncke HJ, Chater NL, Weinstein PR. A scanning electron microscopy study of microarterial damage and repair. Plast Reconstr Surg. 1976;57(2):197-203
99. Lok Huei Yap, Charles E. Butler. Principles of Microsurgery . Grabb and Smith Plastic surgery. Edi: Charles H Thorne, Kevin C.Chung, Arun K. Gosain, Geoffrey C. Gurtner, Babak J. Mehrara, J Peter Rubin, Scott L.Spear. Wolters Kluwer/ Lipincott & Wilkins, Philadelphia/ /Baltimore/ New York/ London/ Buenos Aires/ Hong Kong/ Sydney/ Tokyo. 7th Ed.66-73. 2016.
100. Yamamoto Y, Sugihara T, Sasaki S, Furukawa H, Okushiba S, Nohira K. Microsurgical reconstruction of the hepatic and superior mesenteric arteries using a back Wall technique. J Reconstr Microsurg. 1999;15(5):321-5
101. Harashina T. Use of a continuous suture for back Wall repair of end-to-end or end-to-side anastomoses. Plast Reconstr Surg. 1982;69(1):139-44
102. Harris GD, Finseth F, Buncke HJ. Posterior Wall first microvascular anastomotic technique. Br J Plast Surg. 1981;34(1):47-9
103. Yoleri L, Songür E. Different Venous end-to-side microanastomotic techniques: comparative study in a new rat model. Ann Plast Surg. 2002;48(4):410-4
104. Zhang L, Moskovitz M, Piscatelli S, Longaker MT, Siebert JW. Hemodynamic study of different angled end-to-side anastomoses. Microsurgery. 1995;16(2):114-7

105. Bas L, May JW Jr, Handren J, Fallon J. End-to-end versus end-to-side microvascular anastomosis patency in experimental venous repairs. *Plast Reconstr Surg.* 1986;77(3):442-50.
106. Godina M. Preferential use of end-to-side arterial anastomoses in free flap transfers. *Plast Reconstr Surg.* 1979;64(5):673-82
107. Okazaki M, Asato H, Sarukawa S, Takushima A, Nakatsuka T, Harii K. Availability of end-to-side arterial anastomosis to the external carotid artery using short thread double needle microsuture in free flap transfer for head and neck reconstruction. *Ann Plast Surg.* 2006;56(2):171-5
108. Orbay T, Imhof HG. A new technique for anastomosing vein to small caliber arteries. *Microsurgery.* 1985;6(3):147-50
109. Weinrib HP, Cook JQ, Penn RD. The ring technique for end-to-side microvascular anastomosis. *Microsurgery.* 1984;5(2):76-9
110. Ozkan O, Ozgentaş HE. Open Guide suture technique for safe microvascular anastomosis. *Ann Plast Surg.* 2005 Sep;55(3):289-91
111. Acland RD, Trachtenberg L. The histopathology of small arteries following experimental microvascular anastomosis. *Plast Reconstr Surg.* 1977 ;60(6):868-75.
112. Fischer C, Schneider M, Carmeliet P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(176 Pt 2):157-212.
113. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-9.
114. Clauss M. Molecular biology of the VEGF and the receptor family. *Semin Thromb Hemost* , 26:561-69, 2000.
115. Ferrara N (2000a) Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent ProgHormRes* 55:15–35; discussion35–16

116. Kumar, Abbas, Aster. Robbins Basic Pathology. Cell injury, cell death and adaptation. Elsevier Saunders. Philadelphia. 9th Ed. 1-29. 2016
117. Bren EC. VEGF in biological control. J Cell Biochem, 102:1358-1367, 2007.
118. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003;9:669-76.
119. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 1983;219:983-5.
120. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovascular Research, 65:550-63, 2005.
121. Philips GD, Stone AM. Vascular endothelial growth factor (VEGF<sub>165</sub>) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. In Vivo 8:961-5, 1994.
122. Bai Y, Bai L, Zhou J, Chen H, Zhang L. Sequential of VEGF, FGF-2 and PDGF from the polymeric system enhance HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis. Cell Immunol. 2017 pii: S0008-8749(17)30183-1.
123. Hori Y, Ito K, Hamamichi S, Ozawa Y, Matsui J, Umeda IO, Fujii H. Functional characterization of VEGF and fgf induced tumor blood vessel model in human cancer xenografts. Anticancer Res. ;37(12):6629-38.
124. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. J Anat 2002; 200: 587-97.
125. Shoeibi S, Mozdziak P, Mohammadi S. Important signals regulating coronary artery angiogenesis. Microvasc Res. 2017;117:1-9.
126. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as the therapeutic strategies for postnatal neovascularization. J Clin Invest 1999; 103:1231-6.
127. Testa U, Pannitteri G, Condorelli GL. Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. J Cardiovasc Med 2008;9:1190-221.

128. Ortega N, L'Faqihi FE, Plouet J. Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell*, 90:381-90, 1998.
129. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery*. 1993;14(3):165-75.
130. Kumar, Abbas, Aster. Robbins Basic Pathology. Cell injury, cell death and adaptation. Elsevier Saunders. Philadelphia. 9th Ed. 1-29. 2016.
131. Chatterjee, P.K., Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Ischemia-Reperfusion Injury. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media., 2006: p. 20.
132. Alizan A, K.C., Farah A, John C., Reperfusion injury. *Plast. Reconstr Surg*, 2006(117): p. 1024–33.
133. Lammers, K.M., et al., The effect of transient intestinal ischemia on inflammatory parameters. *Int J Colorectal Dis*, 2003. 18(1): p. 78-85.
134. Gute, D.C., Inflammatory responses to ischemia, and reperfusion in skeletal muscle. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 1998(179): p. 169-87.
135. Küntscher MV, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G. Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 2002; 109: 2398–404
136. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.
137. Perez HD, Weksler BB, Goldstein IM. Generation of a chemotactic lipid from a arachidonic acid by exposure to a superoxide-generating system. *Inflammation* 1980; 4(3): 313-28.
138. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987; 46(7): 2402-6.

139. Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2007; 47: 108–12.
140. Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, Sargin M, Aydin A, Eken A, Ozal E, Kuralay E, Demirkilic U, Tatar H. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2007; 139: 274–9.
141. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Inflammation and repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins basic pathology*. 9 th edn. Canada, Saunders Elsevier. 2013; 29-74.
142. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Melatonin reduces I/R-induced superoxide generation in arterial wall and cell death in skeletal muscle. *J Pineal Res* 2006; 41: 255–60
143. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. *Plast Reconstr Surg* 2011; 128 (6): 685e-92e.
144. Loerakker S, Oomens CW, Manders E, Schakel T, Bader DL, Baaijens FP, Nicolay K, Strijkers GJ. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle assessed with T (2)-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med* 2011; 66: 528–37.
145. Krueger AJ, Yang JJ, Roy TA, Robbins DJ, Mackerer CR. An automated myeloperoxidase assay. *Clin Chem*. 1990;36(1):158.
146. Mittermayr R, Valentini D, Fitzal F, Hallström S, Gasser H, Redl H. Protective Effect of a Novel NO – donor on Ischemia /Reperfusion Injury in a Rat Epigastric Flap Model. *Wound Repair and Regeneration* 2003;11:3–10
147. Van den Heuvel MG, Buurman WA, Bast A, Van der Hulst RR. Review: Ischemia-reperfusion injury in flap surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009;62(6):721-6.



148. Park JW, Qi WN, Cai Y, Zelko I, Liu JQ, Chen LE, Urbaniak JR, Folz RJ. Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H181–H187.
149. Ozyazgan I, Tuncer A, Yacici C, Günay GK. Reaktive oxygen species in experimental ischemic flow-through venous flaps and effects of antioxidants on reactive oxygen species and flap survival. *Ann Plast Surg.* 2007 ;58(6):661-6
150. Zaccaria A, Weinzwieg N, Yoshitake M, Matsuda T, Cohen M. Vitamin C Reduce ischemia reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. *Ann Plast Surg.* 1994;33(6):620-3
151. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994;94(4):1621-8
152. Mak T. Apoptosis: "Tis death that makes life live". *Bial Blaad Marraw Transp/ant* 2003;9:483-8.
153. Haldun Öniz. Apoptoz: Ölmeye Yatmak. *SSK Tepecik Hcwt Derg* 2004;14(1.):1-20
154. Kumar, Abbas, Aster. Robbins Basic Pathology. Cell injury, cell death and adaptation. Elsevier Saunders. Philadelphia. 9th Ed. 1-29. 2016.
155. Kane AB. Redefining cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:1-2.
156. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995;146:16-9.
157. Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997;21:88-101
158. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
159. Rosse T, Olivier R, Manney L, Rager M, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998;391:496-9.

160. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334:1717-25.
161. Nagata S. Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 1996;406:119-24.
162. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003;348: 1365-75.
163. Conroy LA, Alexander DR. The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis. *Leukemia* 1996;10;1422-35.
164. Hamburg CH, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Curr Opin Immunol* 1996;3:94-9.
165. Giles KM, Hart SP, Haslett C, Rossi A, Dransfield I. An appetite for apoptotic cells: controversies and challenges. *Br J Haematol* 2000; 109:1-12.
166. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: Integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86: 1286-96.
167. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: New implications for therapy. *Blood* 1993;82:15-21.
168. Henson ES, Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (egf) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cell signal* 18:2089– 2097, 2006.
169. Wells A. Egf receptor. *Int j biochem cell biol* 31:637–43, 1999.
170. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265: 7709-12.
171. Tachibana E, Saito K, Fukuta K, Yoshida J. Evaluation of the healing process after dural reconstruction achieved using a free fascial graft. *J Neurosurg.* 2002;96(2):280-6.
172. Feng GM, Chen HC, Chang TM, Tsai LM. Early enteral 5% glucose infusion maintains the epidermal growth factor levels in the jejunal flap used for pharyngo-oesophageal reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011;64(5):602-7.

173. Vogt PM<sup>1</sup>, Boorboor P, Vaske B, Topsakal E, Schneider M, Muehlberger T. Significant angiogenic potential is present in the microenvironment of muscle flaps in humans. *J Reconstr Microsurg.* 2005;21(8):517-23.
174. Tuyet HL<sup>1</sup>, Nguyen Quynh TT, Vo Hoang Minh H, Thi Bich DN, Do Dinh T, Le Tan D, Van HL, Le Huy T, Doan Huu H, Tran Trong TN. The efficacy and safety of epidermal growth factor in treatment of diabetic foot ulcers: the preliminary results. *Int Wound J.* 2009;6(2):159-66.
175. Wang XT<sup>1</sup>, Avanesian B, Ma Q, Durfee H, Tang YQ, Liu PY. Enhancement of flap survival and changes in angiogenic gene expression after AAV2-mediated VEGF gene transfer to rat ischemic flaps. *Wound Repair Regen.* 2011;19(4):498-504.
176. Kryger Z<sup>1</sup>, Dogan T, Zhang F, Komorowska-Timek E, Shi DY, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. Effects of VEGF administration following ischemia on survival of the gracilis muscle flap in the rat. *Ann Plast Surg.* 1999;43 (2):172-8.
177. Moens S<sup>1</sup>, Goveia J<sup>1</sup>, Stapor PC<sup>1</sup>, Cantelmo AR<sup>1</sup>, Carmeliet P<sup>2</sup>. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014 (4):473-82.
178. Schultze-Mosgau S<sup>1</sup>, Wehrhan F, Rödel F, Amann K, Radespiel-Tröger M, Grabenbauer GG. Improved free vascular graft survival in an irradiated surgical site following topical application of rVEGF. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;57(3):803-12.
179. Anderson TA<sup>1</sup>, Yu V, Hom DB, Odland RM. Interstitial delivery of vascular endothelial growth factor to skin flaps. *Arch Facial Plast Surg.* 2010 ;12(5):326-31.
180. Cheng L<sup>1</sup>, Chen T<sup>1</sup>, Tu Q<sup>1</sup>, Li H<sup>1</sup>, Feng Z<sup>1</sup>, Li Z<sup>1</sup>, Lin D<sup>1</sup>. Naringin improves random skin flap survival in rats. *Oncotarget.* 2017;8(55):94142-94150.
181. Angelos PC<sup>1</sup>, Winn SR, Kaurin DS, Holland J, Wax MK. Evaluating revascularization and flap survival using vascular endothelial growth factor in an irradiated rat model. *Arch Facial Plast Surg.* 2011 ;13 (3):185-9.

182. Keil H1, Mueller W, Herold-Mende C, Gebhard MM, Germann G, Engel H, Reichenberger MA. Preoperative shock wave treatment enhances ischemic tissue survival, blood flow and angiogenesis in a rat skin flap model. *nt J Surg*. 2011;9(4):292-6.
183. Mücke T1, Borgmann A, Fichter AM, Wagenpfeil S, Mitchell DA, Ritschl LM, Kesting MR, Wolff KD. The influence of different VEGF administration protocols on the perfusion of epigastric flaps in rats.*Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51 (6):555-62.
184. Stetler-Stevenson WG1. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention.*J Clin Invest*. 1999;103(9):1237-41.
185. Bellafiore M1, Battaglia G, Bianco A, Farina F, Palma A, Paoli A. The involvement of MMP-2 and MMP-9 in heart exercise-related angiogenesis.*J Transl Med*. 2013;11:283.
186. Kim BS1, Park JY2, Kang HJ3, Kim HJ4, Lee J5. Fucoidan/FGF-2 induces angiogenesis through JNK- and p38-mediated activation of AKT/MMP-2 signalling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 8;450(4):1333-8.
187. Zhuang Y1, Fang F2, Lan X1, Wang F1, Huang J1, Zhang Q1, Zhao L1, Guo W1, Zheng H3, Xu J4 The vascular evolution of an extended flap on the dorsum of rats and the potential involvement of MMP-2 and MMP-9. *Microvasc Res*. 2017;112:20-29.
188. Williams BA1, Currie RW, Morris SF. Impact of arteriogenesis in plastic surgery: choke vessel growth proceeds via arteriogenic mechanisms in the rat dorsal island skin flap. *Microcirculation*. 2009;16(3):235-50.
189. Wang X1, Khalil RA2. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease.*Adv Pharmacol*. 2018;81:241-330.
190. Singh MK1, Bhattacharya D, Chaudhuri S, Acharya S, Kumar P, Santra P, Basu AK, Chaudhuri S. T11TS inhibits glioma angiogenesis by modulation of MMPs, TIMPs, with related integrin  $\alpha v$  and TGF- $\beta 1$  expressions.*Tumour Biol*. 2014;35(3):2231-46.
192. Sun Y, Li QF, Zhang Y, Hu R, Jiang H. Isoflurane preconditioning increases survival of rat skin random-pattern by induction of HIF-1  $\alpha$  expression. *Cell Physion Biochem*. 2013;31(4):579-91
191. Ruas JL, Poellinger L, Pereira T. Role of CBP in regulating HIF-1-mediated activation of transcription. *J Cell Sci* 2005;118:301-11.

192. Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *EJSO* 2004;30:465-8.
193. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 alpha. *Cell Death Differ* 2008; 15 (4): 621-27.
194. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O<sub>2</sub> tension. *Am J Physiol* 1996;271:C1172-80.
195. Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE. Induction of hypoxia-inducible factor- 2002;277:48403-9.
196. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998; 394: 485–90.
197. Shafighi M1, Olariu R, Brun C, Fathi AR, Djafarzadeh S, Jakob SM, Hunger RE, Banic A, Constantinescu MA. The role of androgens on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ -induced angiogenesis and on the survival of ischemically challenged skin flaps in a rat model. *Microsurgery*. 2012;32(6):475-81.
198. Takaku M1, Tomita S, Kurobe H, Kihira Y, Morimoto A, Higashida M, Ikeda Y, Ushiyama A, Hashimoto I, Nakanishi H, Tamaki T. Systemic preconditioning by a prolyl hydroxylase inhibitor promotes prevention of skin flap necrosis via HIF-1-induced bone marrow-derived cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e42964.
199. Satoh K, Shimokawa H, Berk BC. Cyclophilin-A: Promising New Target in Cardiovascular Therapy. *Circ J*. 2010; 74: 2249-56.
200. Satoh K, Matoba T, Suzuki J, O'Dell MR, Nigro P, Cui Z ve ark. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 2008; 117: 3088-98.
201. Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA ve ark. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res*2000; 87:789-96.
202. Taguchi I, Abe S, Inoue T. Cyclophilin A is a promising predictor of coronary arterydisease. *Circ J*. 2013;77:321-2.

203. Nigro P, Pompilio G, Capogrossi MC. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis.* 2013 31;4: e888.
204. Jin ZG, Lungu AO, Xie L, Wang M, Wong C, Berk BC. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 1186-91
205. Xu, Q., Leiva, M. C., Fischkoff, S. A., Handschumacher, R. E., Lyttle, C. R.(1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* 267,11968–11971.
206. Guo H, Majmudar G, Jensen TC, Biswas C, Toole BP, Gordon MK. Characterization of the gene for human EMMPRIN, a tumor cell surface inducer of matrix metalloproteinases. *Gene* 1998; 220: 99 – 108.
207. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004; 37: 112-9.
208. Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, Mossman BT. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest.* 1993; 69: 261-74.
209. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med.* 1991; 91: 23-30.
210. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38: 1103-11.
211. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry* 2005; 47(5): 119– 29.
212. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Erel O. Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *J. Mutation Research* 2005; 23: 49–54.
213. Wallmichrath J<sup>1</sup>, Baumeister RG, Gottschalk O, Giunta RE, Frick A. The free groin flap in the rat: a model for improving microsurgical skills and for microvascular perfusion studies. *J Plast Surg Hand Surg.* 2014 ;48(3):191-6.
214. Petry JJ, Wortham KA, The anatomy of the epigastric flap in the experimental rat. *Plast Reconstr Surg.* 1984;74(3):410-3.
215. Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg.* 1992;90(2):319-28.

216. Hyza P, Streit L, Schwarz D, Kubek T, Vesely J. Vasospasm of the flap pedicle - the new experimental model on rat. *Acta Chir Plast.* 2014;56(1-2):3-11.
217. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54
218. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *J. Clinical Biochemistry* 2005; 47(5): 119– 29
219. Contaldo C, Harder Y, Plock J, Banic A, Jakob SM, Erni D. The influence of local and systemic preconditioning on oxygenation, metabolism and survival in critically ischaemic skin flaps in pigs. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2007;60:1182-92.
220. Lorenzetti F, Salmi A, Ahovuo J, Tukiainen E, Asko-Seljavaara S. Postoperative changes in blood flow in free muscle flaps: A prospective study. *Microsurgery* 1999;19:196–199.
221. Johnstone RE, Wax MK, Bishop DJ, Chafin JB. Large doses of topical lidocaine during microvascular surgery are not associated with toxic blood concentrations. *Anesthesiology* 1995;82:593–596.
222. Koman LA, Smith BP, Pollock FE Jr, Smith TL, Pollock D, Russell GB. The microcirculatory effects of peripheral sympathectomy. *J Hand Surg [Am]* 1995;20:709– 717.
223. Evans GR, Gherardini G, Gürlek A, Lanstein H, Joly GA, Cromeens DM, Sukumaran AV, Williams J, Kilbourn RG, Wang B, Lundeborg T. Drug induced vasodilation in an in vitro and vivo study: the effects of nicardipine, papaverine, and lidocaine on the rabbit carotid artery. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(6):1475-81.
224. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Zins JE. Muscle flaps triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. *Plast Reconstr Surg* 1999;104:730–7.

225. Bickel A, Axelrod FB, Schmelz M, Marthol H, Hilz MJ. Dermal microdialysis provides evidence for hypersensitivity to noradrenaline in patients with familial dysautonomia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:299–302.
226. Godden DR, Little R, Weston A, Greenstein A, Woodward RT. Catecholamine sensitivity in the rat femoral artery after microvascular anastomosis. *Microsurgery* 2000;20:217–20.
227. Fleming WW. Postjunctional supersensitivity; a cellular homeostatic mechanism. *TIPS* 1981; 2:152-4
228. Clemens MW, Higgins JP, Wilgis EF. Prevention of anastomotic thrombosis by botulinum toxin a in an animal model. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123(1):64-70.
229. Beekman WH, Sluimers JE, Kort WJ, van der Meulen JC. Resolution of experimental microvascular vasoconstriction in rats by topical application of lidocaine hydrochloride in varying concentrations. *Ann Plast Surg.* 1988;21:570–5.
230. Rinker B, Fink BF, Barry NG, File JA, Milan ME. The effect of calcium channel blockers on smoking induced skin flap necrosis. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(3):866-71.
231. Stark GB, Dorer A, Jaeger K, Narayanan K. The influence of the calcium channel blocker nimodipine on flap survival. *Ann Plast Surg.* 1989;23:306–9. 30.
232. Hyza P, Streit L, Schwarz D, Kubek T, Vesely J. Vasospasm of the flap pedicle: the effect of 11 of the most often used vasodilating drugs. Comparative study in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 2014;134(4):574e-84e.
233. Hyza P, Streit L, Gopfert ED, Dvorak Z, Stupka I, Schwarz D, Kubek T, Lombardo GA. Vasospasm of the flap Pedicle magnesium sulphate relieve vasospasm of axial flap pedicle in porcine model. *Acta Chir plast.* 2015;57(1-2):4-8
234. Feng GM1, Chen HC, Chang TM, Tsai LM. Early enteral 5% glucose infusion maintains the epidermal growth factor levels in the jejunal flap used for pharyngo-oesophageal reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2011;64(5):602-7.
235. The multifaceted activity of VEGF in angiogenesis - Implications for therapy responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(4):473-82.



236. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10(5):275-82.
237. Semenza GL1, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int.* 1997;51(2):553-5
238. Schmidt Y, Bannasch H, Eisenhardt SU. Ischemia-reperfusion injury leads to significant tissue damage in free flap surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(1):174e-175e
239. Tian-Tian Z1, Jun-Feng Z, Heng G. Functions of cyclophilin A in atherosclerosis. *Exp Clin Cardiol.* 2013; 18: 118-24. 59