



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ,
ANKARA SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ KLİNİĞİ**

**N-ASETİL-SİSTEİN (NAC) VE ASTAKSANTİN' İN SIÇAN
DEGLOVİNG TARZI YARALANMA MODELİNDE FLEP
YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MAKROSKOPİK,
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Fethiye Berna GÖKTAŞ DEMİRCAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA / 2017



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ,
ANKARA SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ KLİNİĞİ**

**N-ASETİL-SİSTEİN (NAC) VE ASTAKSANTİN 'İN SIÇAN
DEGLOVİNG TARZI YARALANMA MODELİNDE FLEP
YAŞAYABİLİRLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİNİN MAKROSKOPİK,
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Fethiye Berna GÖKTAŞ DEMİRCAN

Tez Danışmanı: Op. Dr. Koray GÜR SOY

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA / 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ ve YÖNTEM.....	17
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA	41
SONUÇLAR.....	47
KAYNAKLAR	48
EKLER.....	55

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, asistanı olmaktan onur duyduğum, mesleki birikimleriyle bizlere ışık tutan, her türlü konuda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Uğur KOÇER'e,

Tezimin oluşturulmasında her türlü desteği gösteren, bilgi ve deneyimlerini hoşgörü ve sabırla aktaran Op. Dr. Koray GÜRSOY'a, eğitimimde emeği geçen, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim değerli hocalarım Doç. Dr. Nezih SUNGUR, Op. Dr. Yüksel KANKAYA, Op. Dr. Melike ORUÇ ÖZPOSTACI ve Op. Dr. Hakan TEYMUR'a,

Asistanlığımın ilk yıllarında beraber çalışma fırsatı bulduğum Doç. Dr. Mustafa Gürhan ULUSOY, Doç. Dr. Gürcan ASLAN ve Doç. Dr. Ahmet TERZİOĞLU'na, eğitim sürem boyunca bana destek olan, yol gösteren Op. Dr. Kadri ÖZER ve Op. Dr. Adile DİKMEN'e, klinik içi ve dışı her konuda yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Dr. Hande AKDENİZ'e, beraber çalışmaktan zevk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, tüm klinik ve ameliyathane personel ve hemşirelerine,

Tezimin biyokimya ve istatistik analiz aşamalarında yardımcı olan Uzm. Dr. Murat ALIŞIK'a,

Hayattaki en büyük şansım olan canım anne- babam, kardeşlerim, her zaman desteğini hissettiğim canım kocam ve biricik oğluma, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. F. Berna GÖKTAŞ DEMİRCAN

ANKARA-2017

KISALTMALAR

Ark.	: Arkadaşları
ASTA	: Astaksantin
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
DMSO	: Dimetilsülfoksid
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
GSH	: Glutatyon
H. pluvialis	: Haematococcus Pluvialis
IR	: İskemi-Reperfüzyon
MLL	: Morel- Lavallee Lezyonları
MRG	: Magnetik Rezonans Görüntüleme
NAC	: N-Asetil-Sistein
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat'ın İndirgenmiş Hali
NSAİİ	: Nonsteroid Antiinflatuar İlaç
NPUAP	: National Pressure Ulcer Advisory Panel
SOD	: Süperoksid Dismutaz
VEGF	: Vasküler Endotelyal Growth Faktör

TABLO LİSTESİ

Tablo.1 Veriler	26
Tablo.2 Histopatolojik Değerlendirmede Nekroz Skorları	28
Tablo.3 Nativ Tiyol Değerlerinin Gruplar Arası İkili Karşılaştırılması.....	36
Tablo.4 Toplam Tiyol Değerlerinin Gruplar Arası İkili Karşılaştırılması	37
Tablo.5 Disülfid Değerlerinin Gruplar Arası İkili Karşılaştırılması	38
Tablo.6 NPUAP Evre Değerlerinin Gruplar Arası İkili Karşılaştırılması.....	38
Tablo.7 Nekroz Alanı Değerlerinin Gruplar Arası İkili Karşılaştırılması.....	39
Tablo.8 Nekroz Yüzdesi Değerlerinin Gruplar Arası İkili Karşılaştırılması	40
Tablo.9 Korelasyon	40

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İskemi- Reperfüzyon Mekanizması.....	3
Şekil 2. Seçilmiş Bazı Karotenoidlerin Yapısı	8
Şekil 3. Tiyol- Disülfid Dönüşümü	12
Şekil 4. Flebin Planlanması	18
Şekil 5a. Sağ İnguinal Alanda Oluşturulan Degloving Tarzı Yaralanma Modeli	19
Şekil 5b. Flebin Yerine Adapte Edildikten Sonraki Görünümü	19
Şekil 6. Ratlara Kullanılan Preparatlar	20
Şekil 7. Deneklerden Postoperatif Kan Alınması	21
Şekil 8. Makroskobik Olarak Nekroz Alanı Ölçümü.....	22
Şekil 9. Grupların Toplam Flep Alanı Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi	26
Şekil 10. Grupların Nekroz Alanı Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi	27
Şekil 11. Grupların Nekroz Yüzdesi Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi.....	27
Şekil.12 Grupların NPUAP Evre Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi	28
Şekil 13. Grup 2 (kontrol grubu) Kas Dokuya Kadar Uzanan Nekroz (x200)	29
Şekil 14. Grup 3 (NAC grubu) Cilt ve Subkutan Dokuda Nekroz Alanları (x100)...	30
Şekil 15. Grup 4 (ASTA grubu) Subepidermal Alanda İnflamasyon, Epidermis İntakt Görünümde (x200)	30
Şekil 16. Grup 5 (NAC+ ASTA grubu) Subkutan Dokuda Nekroz Alanları (x40)...	31
Şekil 17. Grupların Nativ Tiyol Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi	32
Şekil 18. Grupların Toplam Tiyol Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi.....	33
Şekil 19. Grupların Disülfid Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi	34
Şekil 20. Grupların Disülfid/ Nativ Tiyol Yüzde Oran Değerlerinin Grafikselsel Gösterimi	35

ÖZET

Flep yaşayabilirliğinin arttırılmasına yönelik çalışmalar plastik cerrahinin aktif araştırma alanlarından biridir. Etkinliği gösterilen ön ve ard koşullama modelleri klinik uygulamada yeterince yer bulamamasına rağmen, bu modellere paralel etkinliği olan farmakolojik ajanların flep yaşayabilirliğine etkisinin araştırılması güncelliğini hiç yitirmeyen bir konudur. Klinik uygulanabilirliği açısından bir aksiyel flep modeli yerine, plastik cerrahi ve el cerrahisi acil vakalarında karşılaşılan ve çoğu zaman flep nekrozu ile sonuçlanan degloving tarzı bir yaralanma modelinde iyi bilinen iki antioksidan ilacın etkinliğini araştırdık.

Çalışmamızda 40 adet dişi, erişkin, Sprague Dawley cinsi sıçan, randomize olarak 5 (n=8) gruba bölündü. Bu gruplar sham grubu, kontrol grubu, 300 mg/kg N-Asetil-Sistein (NAC), 8 mg / kg Astaksantin (ASTA) ve son olarak bu iki ilacın kombinasyonunun verildiği gruplardı. İlaç verilen gruplara ilaç verilmesi, işlemden 3 gün önce başladı ve postoperatif 7 gün boyunca devam etti. Cerrahi işlem sonrası 7. Günde sıçanlar sakrifiye edildi. Cilt flepleri makroskopik nekroz alanı, histolojik değerlendirme ve biyokimyasal olarak tiyol/ disülfid değişkenleri ile değerlendirildi.

Kontrol grubunun nekroz yüzdesi ASTA grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,009$). NAC uygulanan grubun nekroz alanı ASTA uygulanan gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,010$).

Olguların histopatolojik olarak mikroskop altında NPUAP skalasına göre evrelendirilmesinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,024$).

Alınan serum örneklerinde hesaplanan disülfid değerleri açısından kontrol grubu ve ASTA grubu arası istatistiksel olarak önemli fark saptandı ($p=0,063$).

İyi bir antioksidan olan ve geniş terapötik aralığı olan ASTA'nın flep yaşayabilirliğinin arttırılmasında ve yara iyileşmesinin hızlandırılmasında klinik uygulamada yer alabileceği öngörüsündeyiz.

ABSTRACT

Studies investigating flap viability are an active field of plastic surgery. The search for the effect of pharmacological agents on flap viability, which is an activity parallel to these models, maintain the updated, although pre and postconditioning models with activity show little place for clinical practice. Instead of an axial flap model in terms of clinical feasibility, it encountered in plastic surgery and hand surgery emergency cases, often resulting in flap necrosis, we investigated the effectiveness of two well-known antioxidant drugs in a degloving-type injury model.

In our study, 40 female, adult, Sprague Dawley rats were randomly divided into 5 (n = 8) groups. These groups were sham group, control group, given 300 mg / kg N-Acetyl- Cistein (NAC) group, given 8 mg / kg Astaxanthin (ASTA) group and finally combination of these two drugs. Drug administration to the drug groups started 3 days before the procedure and continued for 7 days postoperatively. On the 7th day after surgery, the rats were sacrificed. Flaps were assessed macroscopic necrosis area, histologically and biochemically by thiol / disulfide variables.

The percentage of necrosis of control group was significantly higher than ASTA group ($p = 0.009$). Necrosis area of NAC applied group was found to be significantly higher than ASTA treated group ($p = 0,010$).

When the cases were staged according to the NPUAP scale under histopathologic microscope, statistically significant difference was detected between the groups ($p = 0,024$).

There was a statistically important difference between the control group and the ASTA group in terms of the disulfide values calculated in the serum samples ($p = 0,020$).

We anticipate that ASTA is a good antioxidant and broad therapeutic range, may be involved in clinical practice in increasing flap viability and accelerating wound healing.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ekstremitelerin degloving şeklinde yaralanmaları oldukça ciddi problemlerdir ve çoğunlukla da cerrahın uygun tedaviye karar vermesi zordur. Bu yaralanmalar dokulara güç kullanılması sonrası oluşan avülziyon tarzı yaralanmalardır. Avülze flebi orijinal yerine adapte etmek bilinen en hızlı ve en kolay tedavi methodudur; ancak bu yöntemle avülze flebin tamamına yakınında cilt nekrozu ile sonuçlanan dolaşım problemi gözlenir ve çoğunlukla ek cerrahi müdahalelere ihtiyaç duyulur. Bilinen güçlü antioksidan etkileri olan N-Asetil-Sistein (NAC) ve Astaksantin (ASTA)'in avülze olmuş flep yaşayabilirliği üzerine etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışmanın yürütülmesi planlanmıştır.

Degloving tipi yaralanmalar avülze olduğu bölgeye uygun şekilde adapte edilseler bile sonrasında yüksek oranda nekrozla sonuçlanan ve hastaya ciddi işgücü ve maddi kayıp getiren yaralanmalardır. Bu yaralanmalar hakkında literatürde bilinen çok az sayıda deneysel çalışma ve tedavi yöntemi mevcuttur. Var olan çalışmalar daha çok flep yaşayabilirliğini değerlendiren çalışmalardır. Literatürde iyi bilinen antioksidanlar olan NAC ve ASTA kullanımı ile deglove olmuş sıçan ekstremitelerde cildindeki iskemi-reperfüzyon hasarının azaltılması ve dolayısıyla da flep viabilitesinin artırılması amaçlandı. Değerlendirme makroskobik olarak flep nekroz alanının ölçümü, nekroza giden bölgenin histopatolojik olarak değerlendirilmesi ve biyokimyasal olarak dokularda iskemi reperfüzyon hasarının yeni tanımlanmış bir belirteci olan tiyol/ disülfid oranının analizi ile yapıldı.

Sonrasında ek cerrahi girişime gerek kalmadan tedavinin tamamlanması açısından degloving tarzı yaralanma modelinde ileri sürülen çalışmanın hem tedavi maliyetini azaltmak hem de hastaların hastanede kalış süresini azaltmak açısından faydalı olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. FLEP TANIMI

Flep cerrahisi plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin en önemli ve temel uygulama alanlarından biridir. Flep cerrahisindeki başarının anahtarı ise derinin kanlanma paterni, kan akımını etkileyen mekanizmalar, iskemi reperfüzyon sürecinin ve bu süreci etkileyen faktörlerin bilinmesi, doğru flep planlaması ve iyi postoperatif takip yapılmasından geçmektedir.

Flep, klasik tanımla kendine ait besleyici damarı bulunan ve damarıyla beraber taşınarak, vücudun başka bölgesine aktarılabilen doku parçasıdır. Flemenkçe bir kelime olan 'flappe'den köken alır ve kanat şeklinde bir kenarından bağlı serbest parça anlamına gelir (1).

Flepler, kendilerine ait besleyici damarları bulunması nedeniyle genel olarak kanlanması yetersiz olan defekt alanlarına (deperioste kemik, perikondriyumsuz kırık, paratenonsuz tendon gibi) nakledilmekle beraber kas, kemik, sinir gibi yapıların transferine imkan sağladığı için fonksiyonel rekonstrüksiyon amaçlanan durumlarda da oldukça sık tercih edilmektedirler (2).

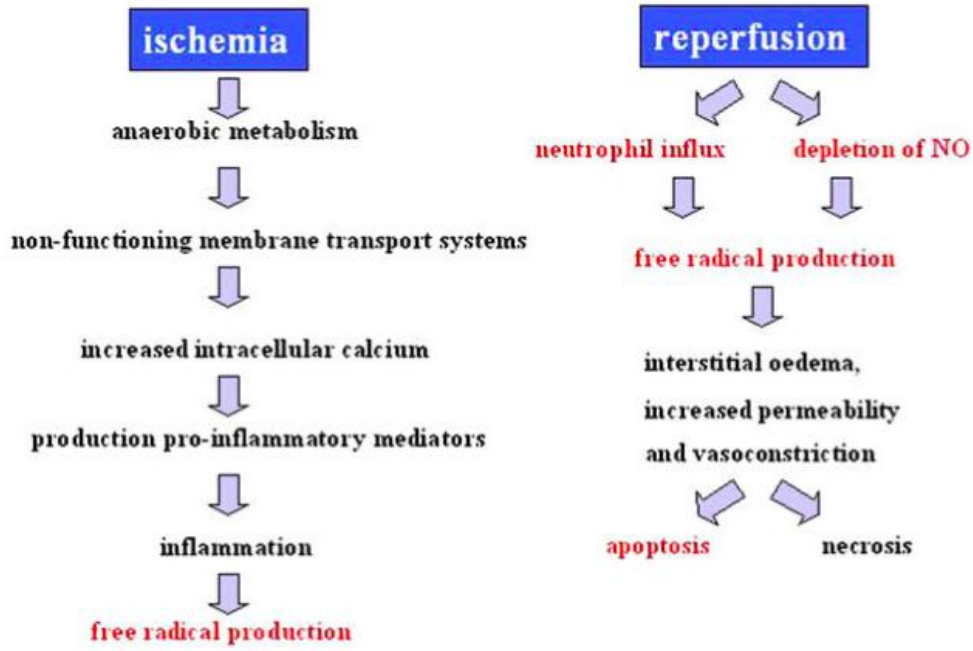
2.2. FLEP FİZYYOLOJİSİ

İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi, spesifik bir doku sahasına yetersiz kan akımı durumudur (3). Reperfüzyon sonrasında da doku hasarının artmasına neden olan patofizyolojik olaylar kaskadı başlar (4).

Flep cerrahisinde, iskemi- reperfüzyon (IR) hasarı, bir bölgeden diğerine serbest flep transferi yapıldığında ya da herhangi bir nedenle flep dolaşımının bozulduğu herhangi bir durumda daima oluşur. Bu cerrahi prosedürün bir parçasıdır ve engellenemez. Bu mekanizmaya primer iskemi denir. Sekonder iskemi ise iki şekilde oluşabilir; birisi geniş bir flebin distalinde gözlenen iskemi, bir diğeri ise anastomoz hatasından kaynaklanan iskemidir (5).

İskemi ve bilhassa takip eden reperfüzyon sürecinde oksijen iyonlarını, serbest radikalleri ve peroksitleri içeren reaktif oksijen ürünleri üretilir (6) (Şekil 1) . Bu ürünler iki farklı kaynaktan elde edilir; endotel hücrelerindeki ksantin oksidaz sistemi ve nötrofillerdeki nikotinamid adenine dinükleotid fosfat oksidaz sistemi (7, 8). Cilt fleplerindeki iskemi sırasında ksantin oksidaz sisteminin ciddi aktivasyonu olduğu hayvan çalışmalarında da gösterilmiştir (9).



Şekil. 1 İskemi- Reperfüzyon Mekanizması (Marieke G.W. van den Heuvel, Wim A. Buurman, Aalt Bast, Rene R.W.J. van der Hulst. Review: Ischaemia- reperfusion injury in flap surgery. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery (2009) 62, 721e726.)

Antioksidanlar, reaktif oksijen radikallerini nötralize ederek doku hasarını önlerler. Bilhassa reperfüzyon aşamasında ciddi anlamda reaktif oksijen radikali üretimi mevcuttur ve bunları nötralize edebilmek için antioksidanlara ihtiyaç vardır. Hayvan çalışmaları çeşitli antioksidanların uygulanmasının cilt fleplerinin yaşayabilirliğini ve fonksiyonunu artırdığını göstermiştir. Vücudu oksidatif strese koruyan en önemli antioksidanlardan biri olan glutatyon (GSH) düzeyleri bir sıçan flebi çalışmasında, I-R hasarı sonrası kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuş (10). Dahası GSH' ın I-R öncesi kalbe uygulanmasının miyokard hasarını azalttığı gösterilmiş (11). Süperoksid dismutaz (SOD), dimetilsülfoksid (DMSO), Vitamin C, E gibi diğer antioksidanlar doku hasarını sınırlandırmak amacıyla kullanılmış (4). Son zamanlarda yapılan sıçan çalışmalarında preiskemik antioksidan tedavinin flep viabilitesini anlamlı derecede artırdığı göze çarpmıştır (12). DMSO ile yapılan fasyokutan flep çalışmasında, yine bir sıçan epigastrik flep modelinde vitamin C ile preiskemik tedavinin flep yaşayabilirliğini ciddi anlamda artırdığı gösterilmiştir (13).

Flep Yaşayabilirliğini Artırmaya Yönelik İşlemler

2.2.1.Geciktirme (Delay) yöntemleri:

Flep yaşayabilirliğini artırmada etkinliği kanıtlanmış iki yöntem, cerrahi ve vasküler geciktirmedir (14). Flep yaşayabilirliğini artırmada en güvenilir yöntem cerrahi geciktirme olup, bu işlem flebin distalde nekroza yol açmayacak kadar iskemiye girmesini sağlamak amacıyla flebin kısmen kaldırılması işlemini içermektedir. Bu kısmi iskemi flebin tamamen kaldırıldığında gelişecek iskemiye hazırlanmasını sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar geciktirme işlemi sonrasında flep içerisindeki damarların yeniden düzenlemeye gittiğini, damar çaplarının ve subdermal pleksustaki küçük damar sayılarının arttığını göstermektedir (15).

Flep cerrahisinde geciktirme işlemi daha çok obez, radyoterapi görmüş, sigara alışkanlığı olan, uzun flep gereksinimi olan flep yaşayabilirliğinde sıkıntı olabilecek riskli hastalarda tercih edilmektedir. Cerrahi geciktirme genellikle çok aşamalı operasyonları içerir. İlk aşamada flep kısmi olarak kaldırılarak iskemiye duyarsızlaştırma ve kapiller kan akımında artış sağlanır (1). Vasküler geciktirme iki

veya daha fazla dominant arteri olan fleplerde arterlerden birinin cerrahi bağlama ya da anjiyografik embolizasyon ile flep dolaşımı üzerine olan etkisinin iptal edilip, diğer arter üzerinden flep kaldırılmasını daha güvenli hale getirme prensibine dayanır (16). Random fleplerde özellikle distal kısımlarda kapiller kan akımında artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Geciktirme işlemi uygulanan fleplerde önceden bulunan “choke” damarların açıldığı gösterilmiştir. Cerrahi geciktirmenin VEGF ve FGF gen ekspresyonunu artırarak flepte anjiogenezi ve vazodilatasyonu artırdığı da gösterilmiştir (1).

Cerrahi ve vasküler geciktirmenin klinik etkinliği ispatlanmış olmasına karşın birkaç aşamalı cerrahi işlem geciktirmesi, pahalı ve zaman alıcı olması nedeni ile günümüzde kullanımı sınırlıdır. Son zamanlarda flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik farmakolojik ajanların kullanımına yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur (1).

2.2.2. Farmakolojik ajanlar:

Flep cerrahisinde norepinefrin, tromboksan A2, serotonin ve endotelin 1 gibi vazokonstrüktör ve protrombojenik maddelerin artışı olduğu ve bu maddelerin akut dönemdeki vazokonstrüksiyon ve trombozdan sorumlu olduğu bilinmektedir (17). Flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik ilaç çalışmaları vazodilatasyon yapma, antitromboz sağlama, nötrofil kümelenmesi ve agregasyonu önleme üzerine yoğunlaşmıştır (1).

Flep canlılığını artırmak amacıyla cerrahi geciktirme işlemleri, çok sayıda farmakolojik ajan ve sülükler cerrahi pratikte sıklıkla kullanılmaktadır.

2.3. ANTIOKSİDANLARIN ETKİ MEKANİZMALARI

Antioksidanlar 4 ayrı mekanizma ile etki gösterir. Bunlar temizleyici (scavenging), söndürme (quenching), onarıcı (repair), zincir kırıcı (chain breaking) etkidir. Temizleyici etki oksidanlarla etkileşip onları daha zayıf moleküllere çevirme etkisidir ve doğal antioksidan enzimler bu etki prensibiyle çalışır. Söndürme etkisi oksidanlara hidrojen iyonu vererek inaktif hale getirme etkisidir. Glutasyon ve vitaminler (A, E) bu şekilde etki gösterir. Onarıcılar serbest radikallerce zedelenen proteinleri parçalar ve DNA hasarlarını onarır. Zincir kırıcılar oksidanlara bağlanarak

elektron çalma zincirlerini kırarlar. Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin gibi taşıyıcı proteinler bu şekilde etki gösterir (18, 19).

Antioksidanlar eksojen ve doğal antioksidanlar olarak iki grupta toplanabilir. Ekzojen antioksidanlara ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol, oksipurinol, tungsten, folik asit), NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, kalsiyum kalan blokerleri, NSAİİ, lokal anestetikler), desferoksamin, seruloplazmin, barbitüratlar, non enzimatik radikal toplayıcılar (mannitol, albümin, dimetil dulfoksit), glutasyon peroksidaz aktivitesini arttıran (asetil sistein) gibi ajanlar örnek verilebilir.

Doğal antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılır. Nonenzimatik olanlara vitamin E, vitamin C, beta karoten, koenzim Q, melatonin, ürik asit, ferritin, bilirubin, albümin, glutasyon örnek verilebilir. Enzimatik olanlara mitokondrial sitokrom oksidaz, katalaz, glutasyon peroksidaz, hidroksiperoksidaz, süperoksit dismutaz örnektir.

2.3.1. Astaksantin:

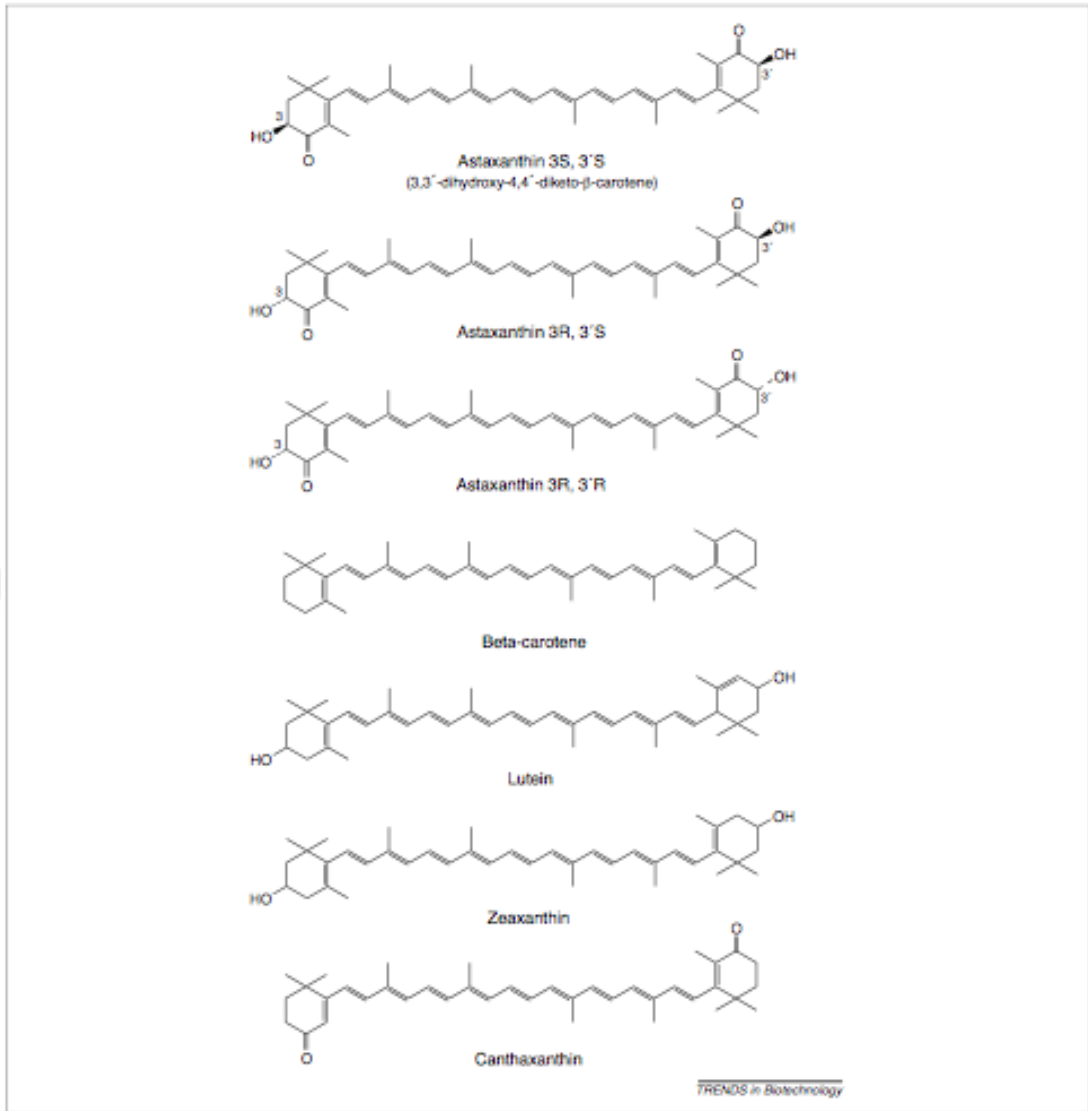
Astaksantin; somon, alabalık gibi suda yaşayan hayvanlarda ve ıstakoz, karides ve havyar gibi çok sayıda deniz ürünlerinde bulunan karotenoid pigmentidir. Suda yaşayan çok sayıda hayvanda olduğu gibi, astaksantin esansiyel poliansatüre yağların oksidasyonuna karşı koruma, UV ışığın etkilerine karşı koruma, immün cevabın modülasyonu, üreme fonksiyonuna karşı olumlu etkileri gibi çok sayıda esansiyel biyolojik fonksiyonu vardır (20). Bir su yosunu olan *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) gibi bazı mikroorganizmalar da astaksantin açısından zengindir. *H. pluvialis* doğada astaksantini en yüksek düzeyde bulunduran canlıdır. Ticari olarak geliştirilmiş *H. pluvialis*, kilogramda 30 g astaksantin bulundurur (21).

Astaksantin, hayvanlar tarafından sentezlenemez ve diyetten edinilmesi gerekir. Memeliler ve çoğu balık türleri diğer diyet karotenoidlerini astaksantine çevirememelerine rağmen, yengeç gibi bazı kabuklular ve bazı balık türleri diyetteki karotenoidleri kısıtlı da olsa astaksantine çevirebilme yeteneğine sahiptirler. Memeliler astaksantin sentezleme yeteneğinden ya da diyetteki astaksantini vitamin A'ya dönüştürme yeteneğinden yoksundurlar (22).

a) Kimyasal Yapısı

Astaksantin (3,3'-dihidroksi-4, 4'-diketo- β -karoten), beta karoten, zeaksantin ve lutein gibi diğler iyi bilinen karotenoidlerle yapı olarak benzerdir, bu nedenle karotenoidlere atfedilen metabolik ve fizyolojik özelliklerin çoğunu paylaşırlar (Şekil.2). Her bir iyonon halkası üzerindeki hidroksil ve keto uçlarının varlığı, esterleşebilme kabiliyeti, daha yüksek bir antioksidan aktivite ve diğler karotenoidlerden daha polar konfigürasyon gibi bazı benzersiz özelliklerini açıklar. Serbest astaksantin, oksidasyona karşı özellikle hassastır. Doğada, ya somon kası ya da ıstakoz dış iskeletinde olduğu gibi proteinlerle konjuge edilmiş ya da moleküle stabilize olan bir ya da iki yağ asidi ile esterleşmiş olarak bulunur (20).

Doğada, molekül üzerindeki iki hidroksil grubunun konfigürasyonu farklı olan çeşitli astaksantin stereoizomerleri bulunur. $3S$ $3^I S$ stereoizomeri, H. pluvialis ve somon balığı içinde bulunan ana formdur (20).



Şekil. 2 Seçilmiş Bazı Karotenoidlerin Yapısı (Martin Guerin, Mark E. Huntley, Miguel Olaizola: Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. TRENDS in Biotechnology Vol. 21 No. 5 May 2003)

b) Astaksantinin Antioksidan Aktivitesi

Serbest radikaller (hidroksi ve peroksi radikaller gibi) ve yüksek oranda reaktif oksijen formları vücutta normal metabolik reaksiyonlar esnasında rutin olarak üretilir. Psikolojik stres, hava kirliliği, sigara kullanımı, kimyasal maruziyeti, UV ışını maruziyeti, bu ajanların üretimini artırır. Serbest radikaller DNA yapısını, proteinleri ve lipid membranları hasarlarlar. Oksidatif hasar yaş, ateroskleroz, iskemi-reperfüzyon hasarı, infant retinopatisi, yaş ile ilişkili maküler dejenerasyon ve karsinogenez gibi pek çok patolojik süreçle ilişkidir (23).

Diyetteki karotenoidler gibi antioksidanlar, çok sayıda hastalıkla mücadele etmekte ve engellemekte yardımcı olur. Karotenoidler potansiyel biyolojik antioksidanlardır, serbest oksijen radikallerinin enerjilerini absorbe ederek, diğer molekülleri ve dokuları hasarlanmadan korurlar. Astaksantin membranöz fosfolipidleri ve diğer lipidleri peroksidasyona karşı korumakta oldukça başarılı bir moleküldür (24, 25).

ASTA'nın antioksidan aktivitesi çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda ASTA'nın vitamin E ve beta-karotenden serbest radikallere karşı bir kaç kat daha güçlü antioksidan kapasitesi olduğu bilinmektedir (26, 27).

ASTA'nın antioksidan özelliklerinin UV-ışık kaynaklı fotooksidasyon, inflamasyon, kanser, yaş ile ilişkili maküler dejenerasyon ve katarakt, immün cevabın zayıflığı, koroner arter hastalığı ve ateroskleroz riski, eklem ve prostat hastalıklarında anahtar rol oynadığı kanıtlanmıştır.

c) Hücresel Düzeyde Astaksantin:

Mitokondriyel düzeyde enerji üreten multipl oksidatif zincir reaksiyonu sonucunda serbest radikaller ortaya çıkar. Mitokondriyel düzeydeki kümülatif oksidatif hasarın yaşlanmadan sorumlu olduğu bilinmektedir (27). Yapılan bir çalışmada sıçan karaciğer mitokondrisinde in vitro peroksidasyonu engellemede ASTA'nın vitamin E'den 100 kat daha fazla etkili olduğu bulunmuştur (26).

d) Astaksantin Antikanser Etkisi:

Çok sayıda çalışma ASTA'nın memelilerdeki antikanser etkisine işaret etmektedir. Diyetteki ASTA'nın işaretli meme tümör hücrelerini beta-karoten ve kantaksantine göre %50'den fazla azalttığı gösterilmiş (28). Deneysel bir çalışmada ASTA'nın sıçanları mesane kanserinden koruduğu gösterilmiş (29). Yine başka bir çalışmada ASTA'nın prostat büyümesinden sorumlu 5-alfa-redüktaz enzimini inhibe ettiği ve ASTA desteğinin benign prostat hiperplazisi ve prostat kanseri ile mücadelede bir method olabileceği gösterilmiş (30).

2.3.2. NAC (N-Asetil-Sistein)

NAC doğal bir aminoasit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevine verilen isimdir. NAC mukolitik bir ajandır. Asetilsistein sahip olduğu sülfidril grubu ile mukus glikoproteini içerisindeki disülfid bağlarını koparma yeteneği sayesinde, mukoid ve mukopürülan sekresyonlar üzerine mukolitik etki gösterir. Solunum yollarında toplanan balgam yoğunluğunu ve yapışkanlığını azaltır, akışkan hale getirir. Bronşial sekresyonların atılımını ve solunumu kolaylaştırarak akciğer fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olur.

NAC ayrıca, sahip olduğu nükleofilik serbest tiyol (-SH) grubu aracılığıyla, oksidan radikallerin elektrofilik grubuyla etkileşime girerek, direkt antioksidan özellik gösterir. Moleküler yapısı nedeniyle hücre içine kolayca giren NAC, burada deasetillenerek, L-sistein'e dönüşür. L-sistein bir glutasyon prekürsörüdür ve glutasyon sentezini artırır. Glutasyon ise, ekzojen veya endojen sitotoksik maddelerin ve oksidan radikallerin hücreye zarar vermesini önleyen, hücre bütünlüğünün ve işlevlerinin devamı için çok önemli bir endosellüler mekanizmada temel rolü olan, yüksek reaktivlikte bir tripeptittir. Bu yönüyle NAC hücreleri hasardan koruyacak düzeyde glutasyon yapımı için birincil derecede önem taşımaktadır.

Memeliler, kendilerini stres faktörlerinden korumak için kompleks antioksidan sistemlerine sahiptir. İntrasellüler antioksidan sistemlerin en önemli komponentlerinden birisi glutasyondur, güçlü bir aktif radikal süpürücüdür. NAC, glutasyon depoları için sistein sağlayan bir ön ilaçtır. Karşı konulmaz şekilde aktif

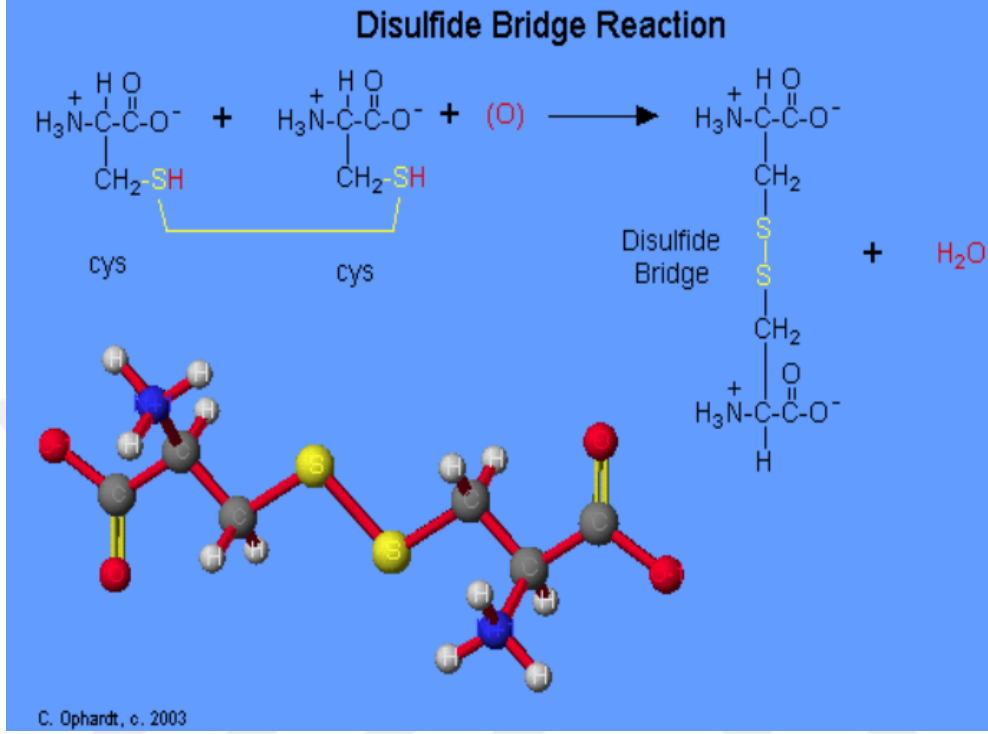
oksijen ürünlerinin varlığında, hücre içi glutatyon seviyesi azalır. Güçlü bir antioksidan olan NAC bu zararlı etkilerden hücreyi korur (31).

Bir glutatyon prekürsörü olan NAC, antioksidan özellikleri olan, intrasellüler kompartmanlara kolaylıkla geçebilen, yapısında tiyol grubu bulunduran küçük bir moleküldür (32). NAC'ın farmakolojik uygulamasının çeşitliliği, esas olarak molekül yapısındaki sistenin tiyol grubunun kimyasal özellikleri nedeniyle, indirgenmiş tiyol gruplarının da serbest oksijen radikallerini temizleme yeteneği iyi anlaşılmıştır (33). Daha önceki sıçan çalışmalarında NAC'ın yaklaşık 400 mg/kg dozunda uygulanmasının organları oksidatif hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (34).

2.3.3. Dinamik Tiyol/ Disülfid Dengesi

Tiyoller merkaptanlar olarak bilinmektedirler. Tiyoller bir karbon atomuna bağlı hidrojen atomu ve sülfür atomundan oluşan sülfidril grubu (-SH) içeren organik bileşikler sınıfındadır ve disülfid bağları ve oksidanlar üzerinden oksidasyon reaksiyonuna uğrayabilirler (35). Disülfid bağı (RSSR) SS-bağı ya da disülfid köprüsü olarak adlandırılan kovalent bir bağıdır. Oksidatif stres altında sistein kalıntılarının oksidasyonu; düşük molekül ağırlıklı tiyoller ve protein tiyol grupları ile miks disülfidlerin tersinir oluşumuna yol açabilir. Oluşan disülfid bağları tekrar tiyol gruplarına redükte olabilir. Böylece dinamik tiyol/disülfid homeostazisi sağlanır (36) (Şekil 3). Tiyol grupları antioksidan kaskadın önemli bir üyesidir çünkü enzimatik ve non-enzimatik yol ile ortaya çıkan reaktif oksijen molekülleri ve diğer serbest radikalleri yok eder. Plazma tiyol havuzu; biraz sistein (Cys), sisteinglisin, glutatyon, homosistein and γ -glutamilsistein gibi düşük molekül ağırlıklı tiyollerden, başlıca protein tiyolleri ve albumin tiyollerinden oluşur (37). Tiyoller oksidan molekülleri ile oksidasyon reaksiyonuna uğrayabilirler. Böylece disülfid bağlarını oluşturur. Dinamik tiyol/disülfid homeostazisinin; detoksifikasyonda, antioksidan korumada, enzimatik reaksiyonların düzenlenmesinde, apoptoziste ve hücrel sinyal mekanizmalarında kritik rol oynadığı gösterilmiştir (36, 38). Oksidatif stres koşullarında redükte tiyol konsantrasyonunun arttığı, nativ (redükte olmayan) tiyol (SH) konsantrasyonunun azaldığı ve disülfid (SS) değerlerinin korole bir şekilde arttığı Erel ve Neşelioğlu tarafından rapor edilmiştir (39). Tiyol/disülfid homeostazisinin de diyabet, myokard enfarktüsü ve hiperemezis gravidarum gibi

hastalıklarda da değişiklikler saptanmıştır (40) .



Şekil. 3 Tiyol-Disülfit Dönüşümü (Ophardt, C., Virtual chembook, available online at www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/, 2003. 8.)

2.5 DEGLOVİNG TARZI YARALANMA

Degloving tarzı yumuşak doku yaralanmaları, cilt ve subkutan dokunun, altındaki fasya ve kastan avülziyonuyla oluşan yaralanmalardır. Bu tarz yaralanmalar vücudun her bölgesini etkileyebilmekle beraber, bilhassa ekstremiteler, gövde, skalp, yüz ve genital bölge etkilenmektedir (41, 42).

Degloving tarzı yumuşak doku yaralanmalarında tedavi zaman aldığı ve çoğunlukla da geciktiği için hızlı karar vermek gereklidir. Ciddi degloving yaralanmaları hızlı karar verilmediği takdirde yumuşak doku enfeksiyonu kaynağı olur ya da nekrotizan fasiite kadar ilerleyebilir. Komplikasyonların ciddiyeti yaralanma mekanizmasına, eşlik eden yaralanmalara, etkilenen anatomik bölgeye

bağlıdır. Degloving tarzı yaralanmalara yaklaşımla ilgili bugüne kadar bilinen herhangi bir rehber ve konsensus yoktur. Sonucu pek çok faktörün etkilediği bilinmekle beraber, iyi bilinen bir gerçek de erken müdahalenin önemidir (43).

2.5.1 Sınıflandırma

Degloving tarzı yaralanmanın 4 ayrı paternine uygun sınıflandırmalar tanımlanmıştır (abrazyon/ avülzüyonla sınırlı, sirkümferansiyel olmayan, tek planda sirkümferansiyel ve çok planda sirkümferansiyel degloving yaralanmalar) (44). Bu yaralanmalar tek başına olabileceği gibi, nadiren kombine halde görülebilir. Ek olarak tüm degloving yumuşak doku yaralanmaları açık ya da kapalı olarak da sınıflandırılır. Morel- Lavallee lezyonları (MLL), bu tip yaralanmaların en ciddi tiplerinden biridir ve diğer anatomik lokalizasyonlarda da görülse bile, bilhassa pelvik bölge (%30) ya da uyluk bölgesinde (%20) ciddi yumuşak doku yaralanmalarıyla ilişkilidir (45). Bu lezyonlar daha çok spor yaralanmaları ya da motorlu taşıt yaralanmaları sonrası görülür (46).

Degloving yumuşak doku yaralanmaları vücudun herhangi bir bölgesinde görülebilse de bilhassa alt ekstremitte degloving yaralanmaları en sık görülen tiptir ve uygun müdahale edilmediği takdirde yüksek oranda morbidite ve potansiyel mortalite ile ilişkilidir (47). Skalp, üst ekstremitte, gluteal bölge degloving yaralanmaları ciddi kan kaybı ve hemodinamik instabiliteye neden olabilir. Çocuklarda akıllarda bulundurulması gereken bir diğer degloving tarzı yaralanma bölgesi ise ayaklardır, ciddi olabilmekte ve fonksiyonel olarak yeniden yapılandırabilmek için ileri kompleks cerrahi teknikler gerekebilmektedir (48, 49).

2.5.2 Tanı

Degloving tarzı yumuşak doku yaralanmasının tanısında, deglove olmuş cildin klinik değerlendirmesi, yaralanmanın ciddiyetinin zayıf bir belirteçidir. İntravenöz fluorescein, iyi bir değerlendirme methodu olarak önerilmektedir, ancak bu şekilde viabl ve nonviable cilt arasındaki demarkasyon hattı çoğunlukla net seçilememektedir (50). Eğer arteryel geri dönüş uygunsa, yumuşak doku debride edilebilir ve gerginlik olmadan kapatılabilir. İnkomplet avülzüyonlardan sonra doku

viabilitesine değerlendirebilmek için cilt rengi, cilt ısı, kapiller doluluk ve kanama dikkatlice değerlendirilmelidir (51).

MLL' nin kesin tanısı değişken klinik prezentasyon ve başlangıçta ciltteki morarmanın alttaki yumuşak doku yaralanmasının önemini maskeleyen hastaların yaklaşık üçte birinde gecikmektedir. Serum inflamasyon markerları çoğunlukla normal aralıktadır. Ultrasonografi, Bilgisayarlı Tomografi (BT), Magnetik Rezonans Görüntüleme (MRG) uygun tanı için kullanışlı tekniklerdir, fakat MLL değerlendirmesi için en anlamlı olan görüntüleme yöntemi MRG'dir (45).

2.5.3 Tedavi Prensipleri

Degloving tarzı yumuşak doku yaralanmasının tedavisi kompleks olabilmektedir ve devitalize dokunun genişliğinin ve etkilenen dokuların kan desteğinin değerlendirilmesi açısından dikkatli bir değerlendirme gereklidir. Genel tedavi prensibi mümkün olduğunca çok dokunun korunmasını, erken primer uygun cilt kapamasını, iyi kalitede cilt kapamasını, erken fonksiyonel dönüşü ve mümkün olduğunca az sekonder prosedür ihtiyacını içermektedir (43).

Parmak degloving yaralanmaları için öncelikli ve en iyi cerrahi seçenek her zaman replantasyon ve revaskularizasyon prosedürüdür. Sıklıkla deglove olan cilt vücuttan total olarak ayrılmışsa, yerine replantasyonla adapte edilebilir. Ancak bu prosedür ciddi uzmanlık ve iş gücü gerektirir. Ayrıca travma hastalarının sıklıkla uzun süreli replantasyon ve revaskularizasyon prosedürlerine izin vermeyen eşlik eden hayatı tehdit eden yaralanmaları da mevcuttur.

Abrazyon ve / veya avülzyonla birlikte daha limitli degloving yaralanması olan hastalarda, alttaki ekspoze tendonlar, kemikler ve eklemlerin üzerini kapatmak için serbest doku transfer prosedürleri uygulanabilir. Serbest doku transferi teknikleri tek basamaklı mikrovasküler prosedürleri içermektedir. Transfer edilen doku genellikle anterolateral uyluk flebi (52) ya da latissimus dorsi kas flebidir (53) . Ne yazık ki mikrovasküler cerrahinin teknik zorluğu ve uzmanlık gerektirmesi nedeniyle dünya genelinde az sayıda merkezde bu tarz serbest doku nakilleri yapılabilmektedir. Dahası deglove olmuş el ya da parmağın rekonstrüksiyonunu takiben sekonder

prosedürler gerekebilmektedir (skar revizyonu, flep inceltmesi ya da sindaktili serbestleştirilmesi gibi) (43).

Avülze olmuş cilt, kısmi ya da tam kalınlıkta cilt grefti kaynağı olarak kullanılabilir. Cerrahlar sıklıkla avulze cildin inceltmesini takiben delikler açılması ve üzerine negatif basınçlı yara kapama yapılmasını tercih etmektedirler. Deglove olan alan genişse bir diğer seçenek de hastaya rekonstrüksiyon öncesi seri eksizyonlar önermektir; bu durum teorik dezavantajı ise kemiğin üstünün açık kalıp kurumması ve nazokomiyal enfeksiyon riskidir.

Dar ya da distal pedikülle beraber geniş cilt avülziyonu olan hastalarda, süperfisyel subkutan dokuyu içerip içermediğine bakılmaksızın, derin dokular hasarlanmamışsa eğer, en iyi tedavi yöntemi pedikülü ayırmak, cildi inceltmek ve avulze cildi tam kalınlıkta deri grefti haline getirip yerine adapte etmektir. Eğer yara çok kontamine ya da çok ödemli ise avulze doku pulsatile lavajla yıkanmalı, yara açık bırakılmalı ve sekonder eksplorasyon planlanmalıdır. Sirkümferansiyel olmayan degloving yaralanması olan hastalarda, doku eksizyonu hemen her zaman gereklidir. Tek planda sirkümferansiyel degloving yaralanması olan hastalarda, sirkümferansiyel multiplanda degloving yaralanmalarda olduğu gibi flepler eksize edilir, ardından aşamalı rekonstrüksiyon önerilir. Açık kırıklarla ilişkili degloving yaralanmalarında devitalize yumuşak dokunun debridmanı, ardından uygun kemik fiksasyonu ve üzerinin vaskülerize yumuşak doku ile kaplanması önerilir (44).

2.6 SIÇAN DEGLOVİNG TARZI YARALANMA MODELİ

Degloving yaralanmalarında tedaviye rağmen alttaki dokuyu besleyen subkutan vasküler pleksus hasarlandığı için sonuç genellikle avulze dokunun parsiyel ya da total nekrozudur (54). Degloving tarzı yaralanmalar için ilk hayvan modeli 1978 tarihinde Kurata ve ark. tarafından tanımlanmış olmakla beraber bu çalışma tavşanlar üzerinde planlanmış bir çalışma idi (55). Deneysel çalışmalarda degloving yaralanmalarının tedavisinde iki farklı sıçan modeline odaklanılmıştır; kuyruk degloving yaralanma modeli 2006 yılında Öztuna ve ark. tarafından (56), arka bacak degloving yaralanma modeli ise 2012 yılında Milcheski ve ark. tarafından (57) tanımlanmıştır. Sıçan kuyruğunda 3 cmlik avülziyon oluşturulmuş ve pentoksifilin

avulze flep viabilitesindeki etkisi araştırılmıştır (56). Milcheski ve ark. tarafından tanımlanan arka bacak degloving yaralanması modelinde ise dört farklı tip avülziyon modeli değerlendirilmiş: proksimal akışlı pediküllü flep, distal akışlı pediküllü flep, lateral akışlı pediküllü flep ve medial akışlı pediküllü flep (57). Bu hayvan modelini sonraki bir çalışmada pentoksifilin ve allopurinolün deglove olmuş sıçan arka bacak modelinde flep viabilitesine etkisini araştırmak için kullanmışlardır (58). Sonrasında başka çalışmalarda rat kuyruk ya da arka bacak modelinde farklı ilaçların flep viabilitesindeki etkisi araştırılmıştır (59, 60). Milcheski ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada en yüksek nekroz oranının arka bacak degloving tarzı distal pediküllü flep modelinde görülmesi üzerine sonraki arka bacak modelleri hep distal pediküllü flep üzerine kurgulanmıştır (57).

Çeşitli tedavi yöntemlerinin objektif değerlendirmesi için deneysel degloving yaralanma modelleri gerçekçi ve kolayca oluşturulabilir olmalıdır. Daha spesifik olarak da cilt nekrozunun genişliği aynı yaralanma modeline maruz bırakılan hayvanlarda benzer olmalıdır.

2.6.1 Kuyruk Degloving Yaralanma Modeli

Kuyruk başlangıcından 5 cm distalden cilt ve subkutan dokuyu içerecek tarzda sirküler insizyon yapılır, başparmak ve işaret parmağını kullanarak insizyondan 3 cm distaline kadar alttaki tendon ve vasküler yapılar intakt kalacak şekilde cilt ve subkutan doku avulze edilir. Yaklaşık 15 dakika beklendikten sonra cilt tekrar yerine adapte edilir (56).

2.6.2 Arka Bacak Degloving Yaralanma Modeli

Arka bacak inguinal krizden yapılan sirküler insizyonla cilt ve subkutan doku geçilir, kaba cerrahi aletler yardımıyla ayak bileği eklemine kadar tek cerrah tarafından avulze edilir. Avülze olmuş distal tabanlı flep 5 dakika sonra yerine adapte edilir (58).

Literatürde kuyruk degloving yaralanma modelleri, arka bacak degloving yaralanma modelinden daha fazla kullanılmıştır; fakat klinikte alt ekstremitte degloving yaralanmaları daha sık gözlemlendiği için arka bacak modeli klinik olarak daha amaca uygun bir modeldir (61).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 0042/ 485 sayılı protokol izni ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Dış tetkikler Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı ve 29 Mayıs Devlet Hastanesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarında çalışıldı.

Çalışmada Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı tarafından temin edilen 40 adet, ağırlıkları ortalama 240- 260 gr arasında değişen, dişi, erişkin, Sprague Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarında sabit sıcaklıkta, sabit nem oranında, her kafeste bir hayvan olacak şekilde, 12 saatlik gece gündüz ritmine uyacak şekilde barındırıldı. Tüm hayvanlar musluk suyu ve sıçan yemi ile beslendi. Cerrahi girişimler Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yapıldı. Hayvanlar 3 ayrı deney grubu, kontrol grubu ve sham grubu olmak üzere 8'er sıçanlık beş gruba ayrıldı.

Grup 1: sham grubu (n:8)

Grup 2: kontrol grubu (n:8), degloving tarzı yaralanma oluşturulacak; ancak bu gruptaki sıçanlara herhangi bir medikasyon verilmeyecektir.

Grup 3: deney grubu (n:8), bu gruptaki sıçanlara degloving işlemi uygulandıktan sonra ve uygulamadan 3 gün önce başlanıp, sakrifikasyon işlemine kadar toplamda 10 gün boyunca peroral nazogastrik sonda yardımıyla 300 mg/kg NAC uygulanacaktır.

Grup 4: deney grubu (n:8), bu gruptaki sıçanlara degloving işlemi uygulandıktan sonra ve uygulamadan 3 gün önce başlanıp, sakrifikasyon işlemine kadar toplamda 10 gün boyunca peroral nazogastrik sonda yardımıyla 8 mg/kg ASTA uygulanacaktır.

Grup 5: deney grubu (n:8), bu gruptaki sıçanlara degloving işlemi uygulandıktan sonra ve uygulamadan 3 gün önce başlanıp, sakrifikasyon işlemine kadar toplamda 10 gün boyunca peroral nazogastrik sonda yardımıyla 8 mg/kg ASTA ve 300 mg/kg NAC uygulanacaktır.

3.1 Anestezi Tekniği

Tüm sıçanlara anestezi, 35 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar®, Eczacıbaşı-Türkiye) i.m. ve 10 mg/kg ksilozin hidroklorid (Rompun®, Bayer-Türkiye) i.m. ile sağlandı. Anestezi derinliği çene ve iskelet kas tonusuyla izlendi. Gerektiğinde bu dozun 1/3' ü kadar idame dozu uygulandı.

3.2 Cerrahi Yöntem

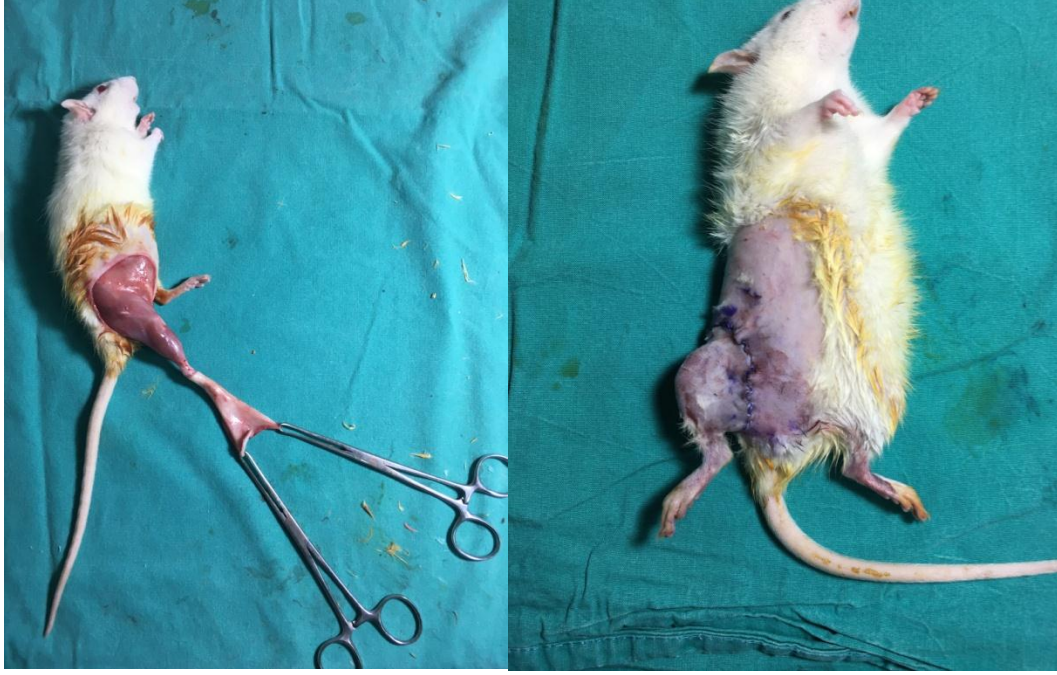
Tüm sıçanlar, rastgele seçilmiş 8'er sıçandan oluşan beş gruba ayrıldıktan sonra anestezi işlemi uygulandı. Anesteziyi takiben cerrahi alan tıraş makinesi ile tıraş edildi, povidon iyot ile cerrahi temizlik sağlandı. Sağ arka bacakta inguinal ve gluteal krizden geçecek şekilde cerrahi çizim kalemi ile insizyon hattı belirlendi (Şekil 4).



Şekil 4. Flebin Planlanması

Hayvan sırtüstü pozisyondayken 15 numara bisturi yardımıyla insizyona başlandı, yüzüstü pozisyona alınarak insizyon tamamlandı. Cilt ve cilt altı doku geçildi, ardından 2 adet cerrahi allis yardımıyla kas fasyası üzerinden sıçan ayak

bileği eklemine kadar progresif bir traksiyon ile avülze edildi. Bu şekilde distal bazlı Milcheski'nin tanımladığı degloving tarzı bir flep elde edildi (Şekil 5a). Cilt iskemisi için 5 dakika bekleddikten sonra, avülze flep 5/0 absorbe olmayan sütün ile yerine adapte edildi (Şekil 5b) .



Şekil 5a. Sağ İnguinal Alanda Oluşturulan Degloving Tarzı Yaralanma Modeli

Şekil 5b. Flebin Yerine Adapte Edildikten Sonraki Görünümü

Sıçanlar postoperatif dönemde her biri ayrı kafeste olacak şekilde yerleştirildi. Her sıçanın insizyon hattının postoperatif dönemde antibiyotik içeren pomad (nitrofurazon) ile günlük pansumanı yapıldı.

Deney gruplarına preoperatif 3 gün ve sakrifiye edene kadar toplamda 10 gün boyunca nazogastrik sonda boyunca peroral ilaçlar verildi. 3.gruba 300 mg/ kg NAC (Mucinac®, Vem İlaç) 4.gruba 8 mg/ kg ASTA (Ocean Astaksantin®, Orzax), 5.gruba ise bu ilaçların kombinasyonu verildi (Şekil 6).



Şekil 6. Ratlara Kullanılan Preparatlar

Postoperatif 7.günde deneklere intramuskuler 35 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar-[®] Pfizer) ve 10 mg/ kg xylazine hidroklorür (Rompun[®] %2-Bayer) ile anestezi sağlandı, fleplerin alınmasını takiben, anestezi altındaki hayvandan kardiyak ponksiyonla 5 cc kan alındı (Şekil 7). Ardından flepler alınıp, histopatolojik inceleme için %10 oranında formaldehit içeren solüsyon içinde patoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Nekroz alanlarının değerlendirilmesi flebin hayvandan alınmasını takiben yayılarak makroskopik digimizer programı ile yapıldı.



Şekil 7. Deneklerden Postoperatif Kan Alınması

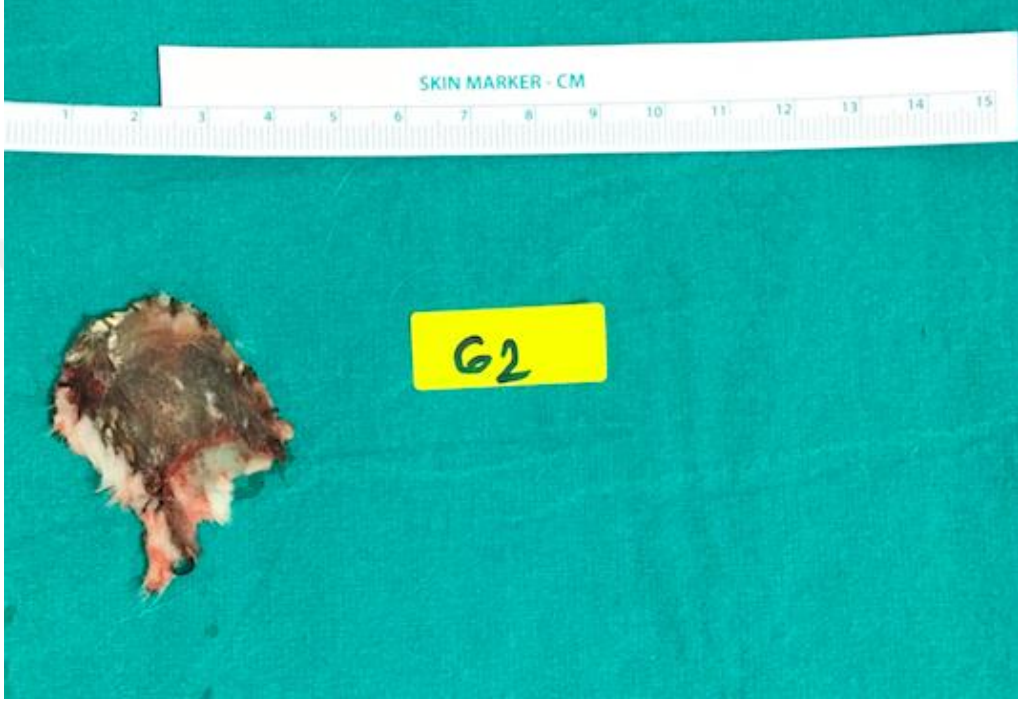
Deneklerden kan alınmasını takiben, deneklere anestezi altında servikal dislokasyon uygulanarak ötenazi yapıldı, ölüm kalp atımı kontrol edilerek doğrulandı. Kan örnekleri 3500 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serum ayrıştırıldı, serum örnekleri ependorf tüpler içine alınarak -80 derecede donduruldu, ardından kuru buz içinde biyokimya parametrelerinin çalışılması için biyokimya laboratuvarına verildi.

3.3 Değerlendirmeler

3.3.1 Fleplerde Yaşayan Alan Oranlarının Hesaplanması:

Postoperatif 7. günde sıçanlara ait flepler dijital fotoğraf makinesi (Sony DC-520) ile fotoğraflandı. Fleplerdeki epidermoliz alanları, sonrasında epitelizasyonla iyileştiği için sağlam deri alanları kapsamında değerlendirildi. Alınan dijital görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Aktarılan görüntülerin analizi Digimizer 4.3.0 programı ile yapıldı. Ardından değerlendirilen fotoğraf üzerinde flep nekroz

alanlarının ve flep total alanlarının ayrı ayrı ölçümleri yapıldı (Şekil 8). Nekroz yüzdesi = (nekroz alanı / flep alanı) X 100 formülüyle nekroze alan yüzdesi hesaplandı.



Şekil 8. Makroskobik Olarak Nekroz Alanı Ölçümü

3.3.2 Histopatolojik Değerlendirme

Operasyon sonrası 7. günde histopatolojik inceleme için doku örnekleri alındı. Histopatolojik inceleme Sağlık Bakanlığı Ankara 29 Mayıs Devlet Hastanesi Patoloji Kliniğinde yapıldı.

Cerrahi materyaller alınma işlemini takiben %10'luk formaldehit solüsyonunda taşındı. Kontrol ve deney gruplarında flebin tam orta noktası referans alınarak 6 mm boyutunda punch biyopsi aletiyle tam kalınlıkta doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri %10'luk nötral formaldehit içerisinde fikse edildi. Fiksasyonu takiben tüm dokular rutin histolojik takip yöntemleri kullanılarak dehidrate edildi ve parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alındı. Tüm kesitler rutin histopatolojik boyama yöntemlerine tabi tutuldu. Hematoksilen- Eozin (H-E) boyası ile epidermis ve dermisteki nekroz alanları, PNL (polimorf nüveli lökosit), lenfosit, fibroblast, kollajen oluşumu yönünden değerlendirildi. Elde edilen histolojik preparatlar, Olympus BX61 araştırma mikroskobu ile incelendi ve Olympus DP72 model mikroskop kamerası ile fotoğraflandı.

Kontrol grubundaki hayvanlardan, ASTA, NAC ve bu iki ilacın kombinasyonunun uygulandığı gruplardan alınan cilt örnekleri Hematoksilen Eozin boyası ile ışık mikroskobu altında nekroz açısından değerlendirildi. Nekroz derecesi Ulusal Bası Yarası Danışma Paneli Skalasına (National Pressure Ulcer Advisory Panel- NPUAP) göre skorlandı. Evre 0; normal cilt, Evre 1; ciltte lokalize kızarıklık, görünür inflamasyonla beraber intakt cilt, Evre 2; dermisin kısmi kalınlık kaybıyla beraber ülsere alan, Evre 3; kemik, tendon ya da kas ekspozisyonunu içermeyen tam kat cilt kaybı, Evre 4; ekspozite kemik, tendon, kasla beraber tam kat doku kaybı olarak değerlendirildi. Skorlama 0 ila 4 arasında yapıldı.

3.3.3 Biyokimyasal Değerlendirme

Deney grupları ve sham grubundaki ratlardan sakrifiye etmeden önce intrakardiyak olarak yaklaşık 5 cc kan örnekleri alındı. Kanlar EDTA içeren tüplere konuldu ve 10 dakikalık 3500 rpm hızla santrifüj yapıldı. Biyokimyasal analiz yapılana kadar -80 derece de saklandı.

Plazma tiyol/ disülfid homeostazisi analizinde Erel ve Neşelioğlu 'nun yeni geliştirdiği otomatik method kullanıldı. Bu teknikte disülfid bağları ilk olarak sodyum borohidrid içindeki reaktif tiyol grupları ile redükte edildi. Reaktif olmayan sodyum borohidrid formaldehit ile ortadan kaldırıldı. Tüm tiyol gruplarını kapsayan redüksiyon yapıldı. Nativ (unredükte) tiyol (SH) grup, 5,5-dithiobis- (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon sonrası tespit edildi. Nativ tiyol miktarı total tiyol miktarından çıkarıldı. Disülfid (SS) bağlarının sayısı total ve nativ tiyollerin farklarının yarısına eşdeğer olarak değerlendirildi. Tiyol grupların disülfide oranı, tiyol grupları ve disülfidin total havuz dışındaki gruplara oranı ve disülfidin total havuzun göreceli tiyol gruplarına oranı ve tiyol gruplarının reaksiyon sonuçları kullanılarak eş zamanlı olarak hesaplanabilir.

3.4 İstatistiksel Analiz

Deney ve kontrol grubundan toplanan veriler MS Office Excel programına girilerek veri kümesi oluşturuldu. Çalışmanın analizleri SPSS 19.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortanca (çeyrekler arası açıklık) şeklinde gösterildi. Bağımsız grup karşılaştırmaları için Kruskal-Wallis non-parametrik test yöntemi tercih edildi. Anlamlı bulunan çoklu karşılaştırma durumlarında Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Çalışmanın tamamında $p < 0,1$ istatistiksel olarak önemli ancak istatistiksel olarak anlamlı değilken, $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma, operasyon sonrası 7. günde sonlandırıldı. Hayvanlarda anestezi veya cerrahi işleme ilişkin herhangi bir komplikasyon izlenmedi. Cerrahi sonrası 5. günde NAC+ Astaksantin grubundan bir sıçan nedeni bilinmeyen bir şekilde kaybedildi.

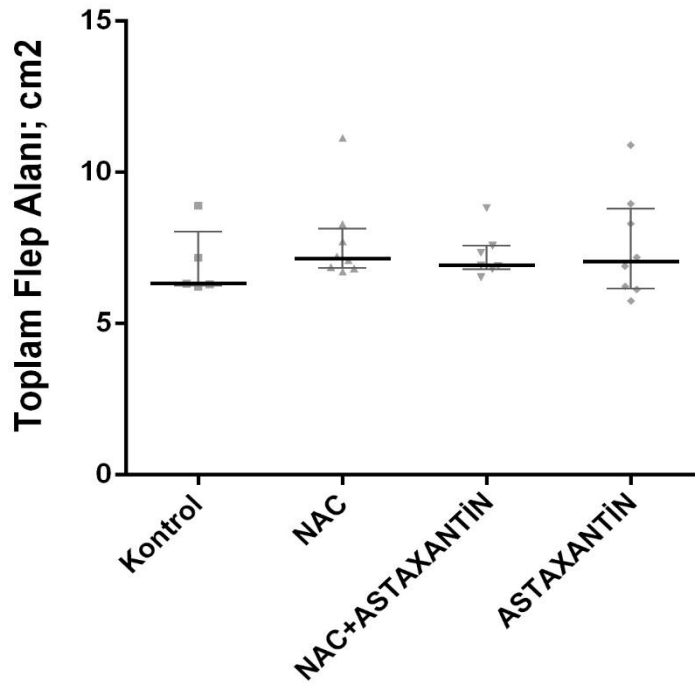
4.1 Yaşayan Flep Alanlarının Değerlendirilmesi

Operasyon sonrası 7.günde bütün fleplerde nekroz hattı belirgin şekilde oluştu. Canlı flep alanı pembe-beyaz renkte ve normal tonusta iken nekroz alanı siyah renkli ve sert idi. Epidermolizli sahaların reepitelize olacağı kabul edilerek nekrotik olarak değerlendirilmedi. 7.gün sonunda sham grubu hariç tüm gruplardaki sağ inguinal alandan kaudal pediküllü olarak kaldırılan flepler ayak bileği düzeyinden ayrıldı. Yaşayan ve nekroze alanlar, makroskopik olarak incelenip toplam flep alanı, nekroz alanı ve nekroz yüzdeleri ($[\text{nekroz alanı} / \text{toplam flep alanı}] \times 100$) digital ortamda hesaplandı. Çalışma gruplarında; toplam flep alanı, nekroz alanı ve nekroz yüzdeleri karşılaştırıldı. Toplam flep alanı açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,683$) (Şekil 9). Nekroz alanı ve nekroz yüzdesi açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırası ile $p=0,003$ ve $p=0,001$). Nekroz alanı median değeri NAC grubunda daha yüksek iken, ASTA grubunda ise belirgin şekilde düşüktü (Şekil 10). Nekroz yüzdesi median değeri kontrol grubunda belirgin şekilde yüksek iken, ASTA grubunda ise daha düşüktü (Tablo 1) (Şekil 11).

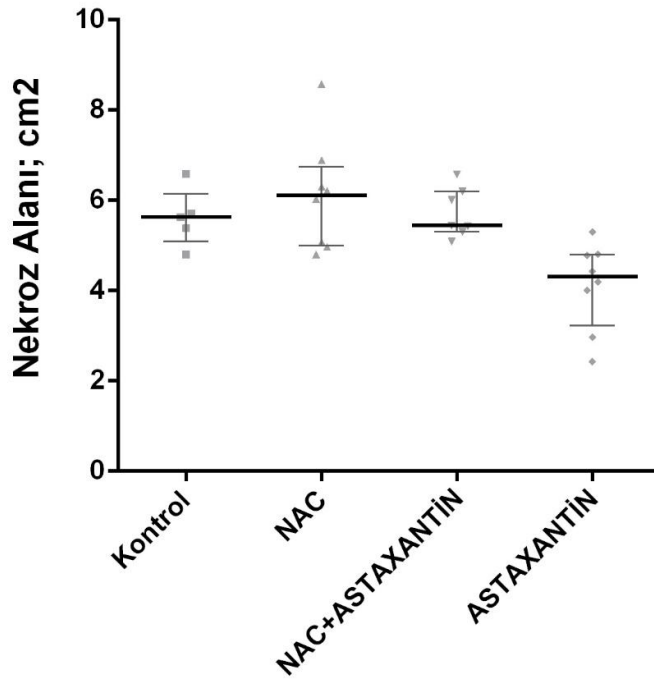
Tablo.1 Veriler

	Sham (N=8)	Kontrol (N=8)	NAC (N=8)	NAC+ASTAXANTHİN (N=7)	ASTAXANTHİN (N=8)	<i>P</i> değeri
Nativ TiyoL; µmol/L	305,7 (145,95)	260,2 (161,9)	197,65 (117,85)	162,5 (28,4)	158,05 (29,18)	0,006
Toplam TiyoL; µmol/L	350,2 (173,05)	345,5 (184,3)	255,9 (161,95)	191,1 (61,1)	185,3 (38,63)	0,005
Disülfıt; µmol/L	26,95 (15,9)	35,90 (14,58)	27,1 (19,39)	15,25 (9,65)	14,68 (7,16)	0,020
Disülfıt/Nativ TiyoL yüzde oranı; %	8,17 (3,9)	11,37 (5,29)	11,93 (5,45)	10,49 (6,16)	9,79 (4,03)	0,137
NPUAP skalası; evre		4,00 (1)	3,5 (2)	3 (1)	2 (0,75)	0,024
Toplam Flep Alanı; cm²		6,33 (1,78)	7,16 (1,31)	6,93 (0,76)	7,06 (2,64)	0,683
Nekroz Alanı; cm²		5,63 (1,06)	6,12 (1,75)	5,44 (0,9)	4,32 (1,57)	0,003
Nekroz Yüzdesi; %		84,99 (20,13)	76 (13,7)	78,5 (7,38)	59,97 (20,34)	0,001

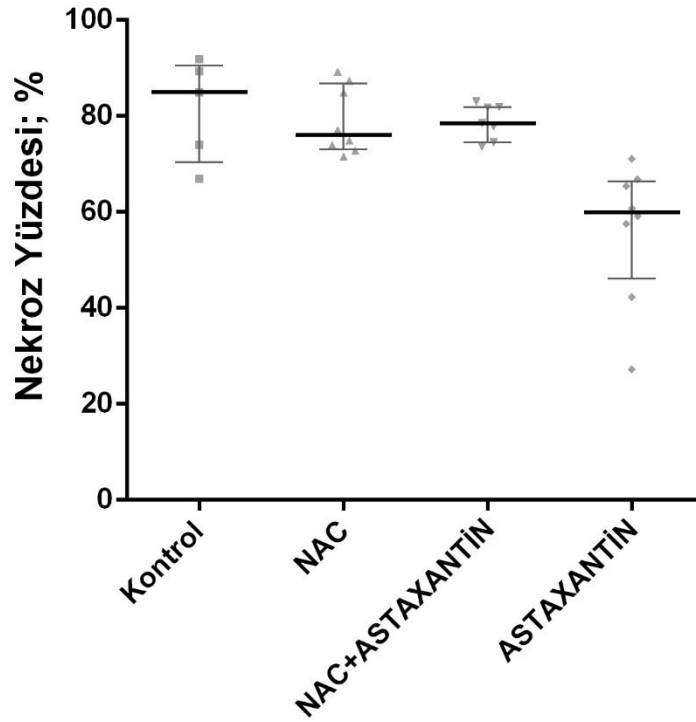
Değerler median ve parantez içi değer interquartile range şeklinde gösterildi. *P* değeri Kruskal-Wallis testi ile hesaplandı. *P* değerinin <0,05 anlamlı olarak kabul edildi.



Şekil. 9 Grupların Toplam Flep Alanı Değerlerinin Grafikselleştirilmesi (ortadaki çizgiler ortanca değeri, error barlar çeyrekler arası açıklığı ve her simge ölçülen değeri ifade etmektedir.)



Şekil. 10 Grupların Nekroz Alanı Değerlerinin Grafikselleştirilmesi (ortadaki çizgiler ortanca değeri, error barlar çeyrekler arası açıklığı ve her simge ölçülen değeri ifade etmektedir.)



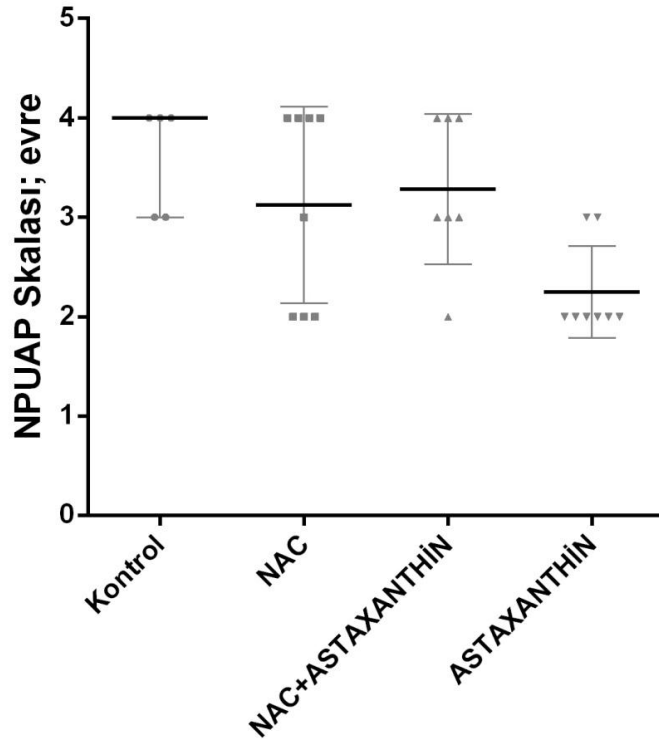
Şekil. 11 Grupların Nekroz Yüzdesi Değerlerinin Grafikselleştirilmesi (ortadaki çizgiler ortanca değeri, error barlar çeyrekler arası açıklığı ve her simge ölçülen değeri ifade etmektedir.)

4.2 Histopatolojik Değerlendirme

Olgular histopatolojik olarak Hematoksilen-Eozin boyası ile boyanarak, ışık mikroskobu altında NPUAP (National Pressure Ulcer Advisory Panel) skalasına göre evrelendirildi (Tablo.2). NPUAP evreleme sistemine göre gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p= 0,024$) (Tablo.1) (Şekil.12).

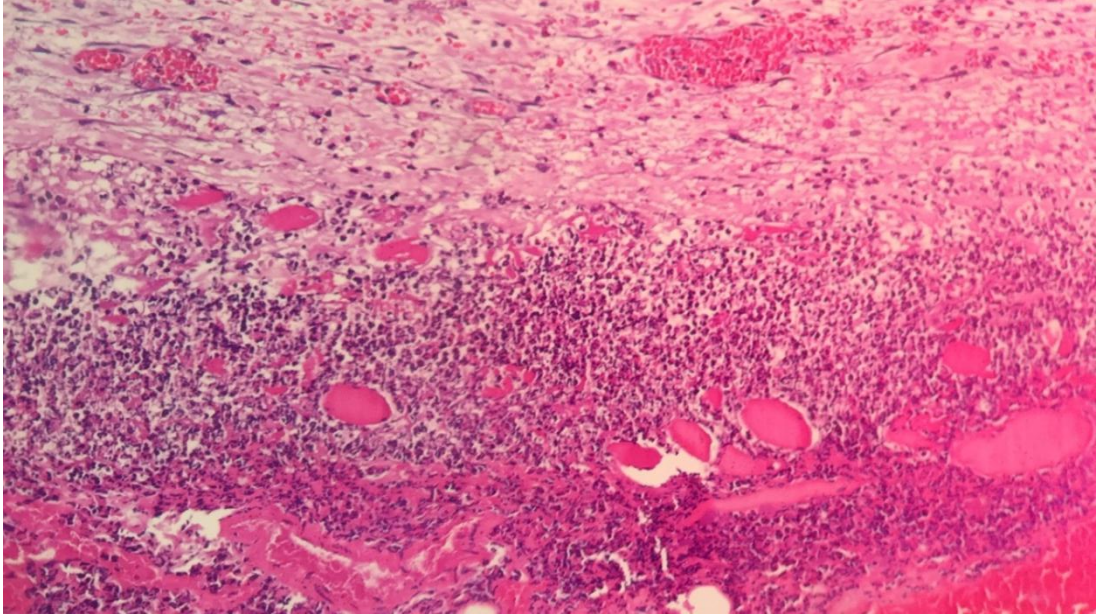
Tablo 2. Histopatolojik Değerlendirmede Nekroz Skorları

Rat	Kontrol	NAC	NAC+ASTA	ASTA
1	3	4	2	3
2	3	4	3	3
3	4	2	4	2
4	4	3	3	2
5	2	4	4	2
6	4	4	4	2
7	4	4	3	2
8	3	3		2

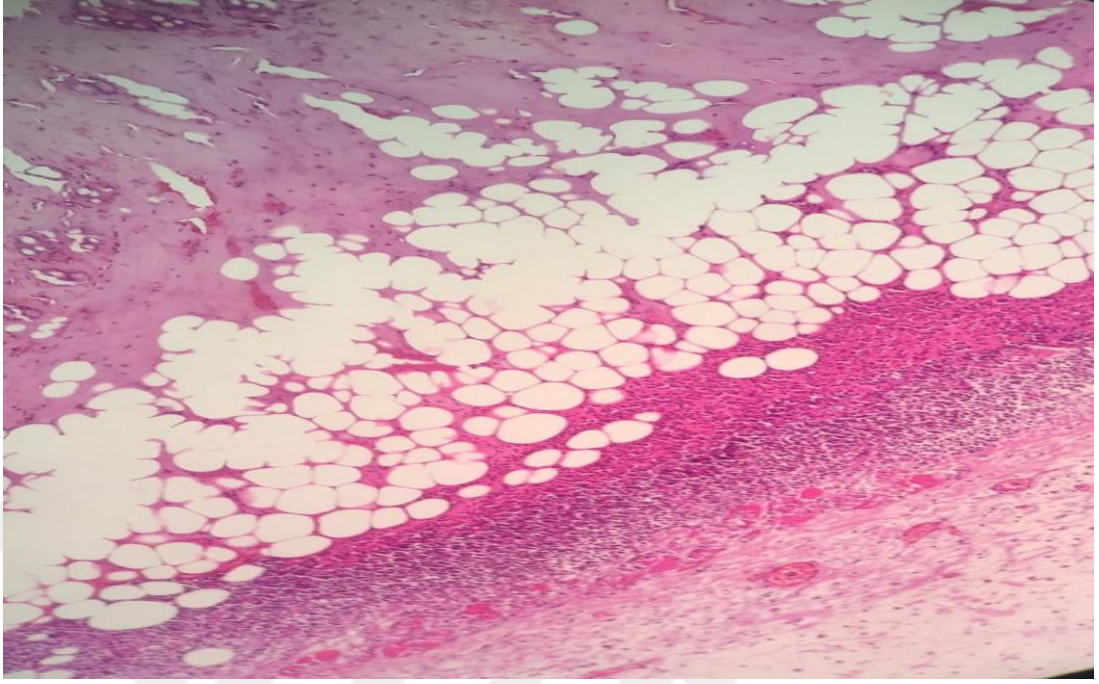


Şekil. 12 Grupların NPUAP Evre Değerlerinin Grafikselleştirilmesi

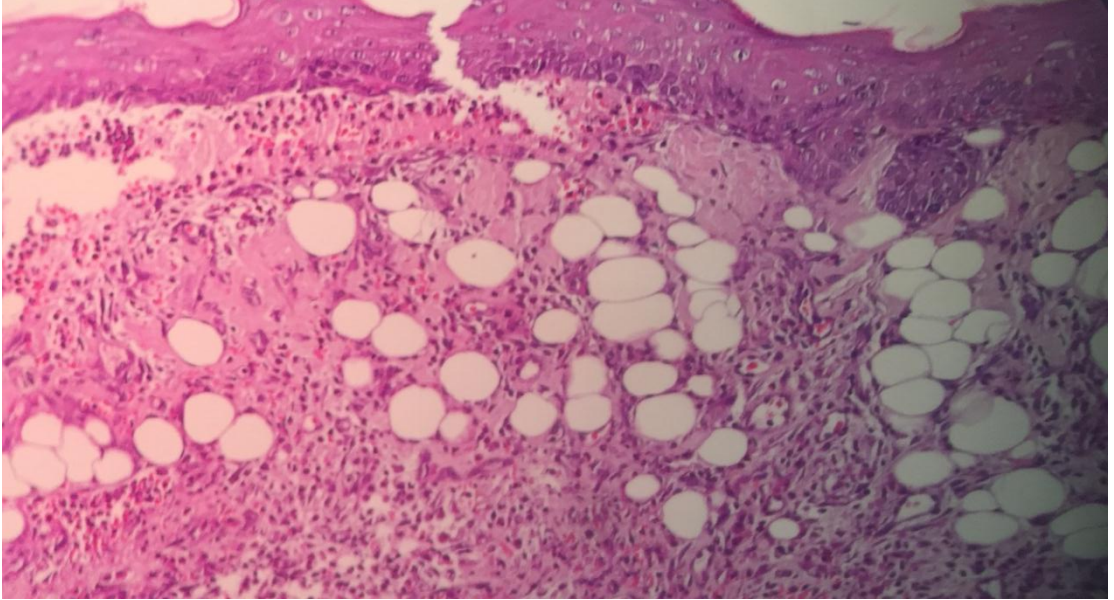
Grup 2 (kontrol grubu) 'de kas dokuya kadar uzanan nekroz alanları dikkat çekmekte iken (Şekil.13), Grup 4 (ASTA grubu) de ise epidermis intakt görünümde olup, subepidermal alanda inflamatuvar hücre (PMNL) artışı gözlemlenmiştir (Şekil 15).



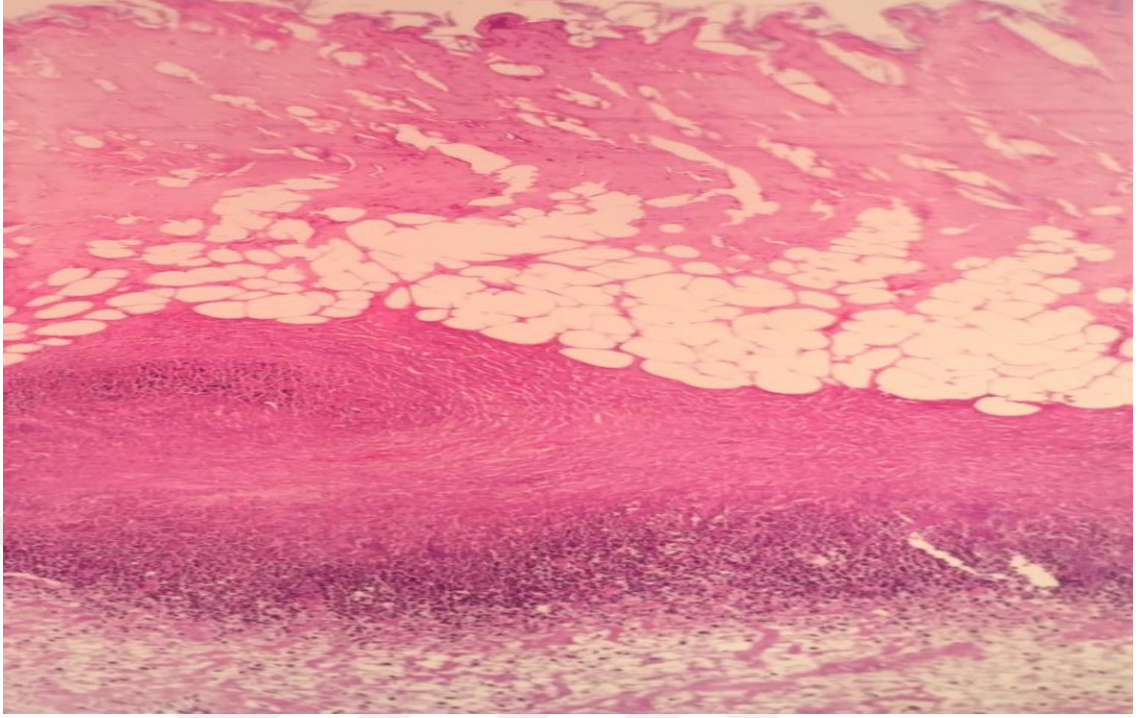
Şekil 13 . Grup 2 (kontrol grubu) Kas Dokuya Kadar Uzanan Nekroz (x200)



Şekil 14. Grup 3 (NAC grubu) Cilt ve Subkutan Dokuda Nekroz Alanları (x100)



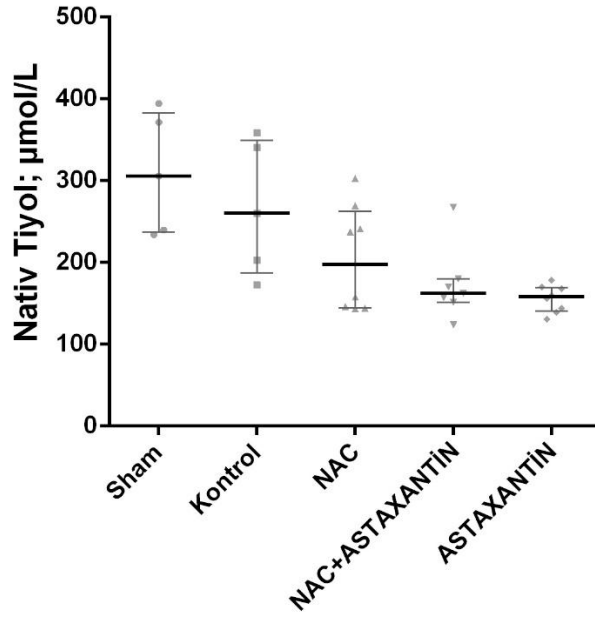
Şekil 15. Grup 4 (ASTA) Subepidermal Alanda İnflamasyon, Epidermis İntakt Görünümde (X200)



Şekil 16. Grup 5 (NAC+ ASTA) Subkutan Dokuda Nekroz Alanları (x40)

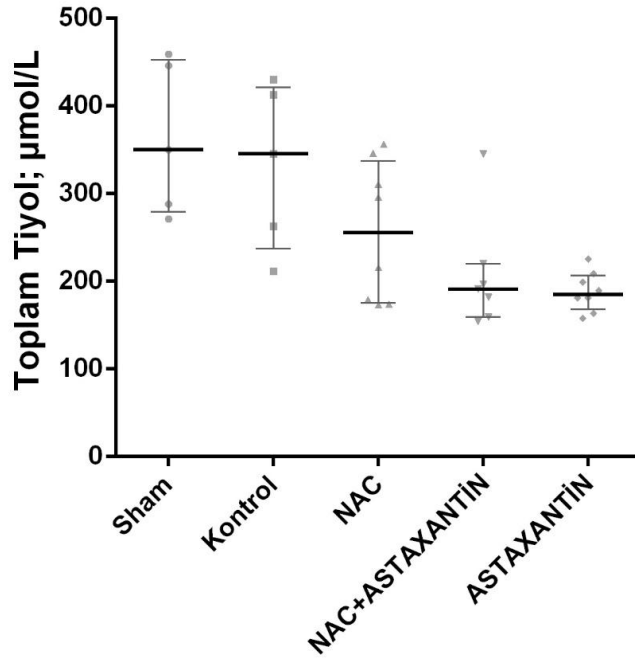
4.3 Biyokimyasal Değerlendirme

Sıçanlardan alınan serum örneklerinden Nativ Tiyol değeri hesaplandı. Nativ Tiyol değerleri açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,006$). Nativ Tiyol median değerleri Sham grubunda en yüksek iken, ASTA grubunda ise daha düşüktü (Tablo.1) (Şekil.17).



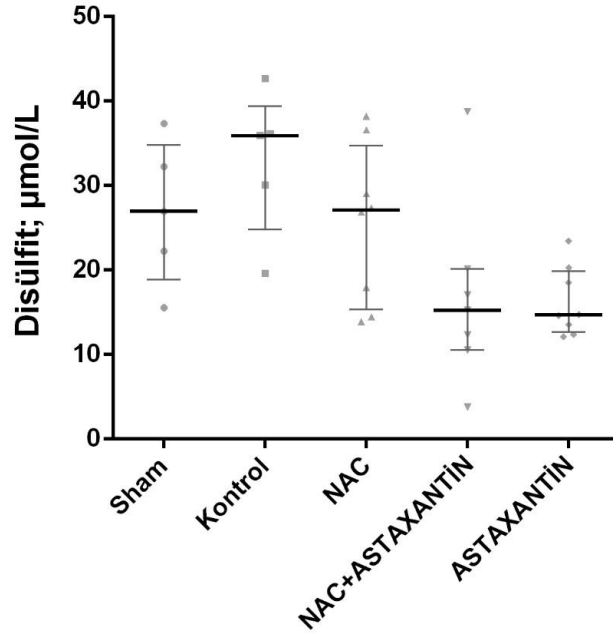
Şekil. 17 Grupların Nativ TiyoL değerlerinin grafiksel gösterimi (ortadaki çizgiler ortanca değeri, error barlar çeyrekler arası açıklığı ve her simge ölçülen değeri ifade etmektedir.)

Sıçanlardan alınan serum örneklerinden Toplam TiyoL değeri hesaplandı. Toplam TiyoL değerleri açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,005$). Toplam TiyoL median değerleri Sham grubunda en yüksek iken, ASTA grubunda ise daha düşüktü (Tablo.1) (Şekil.18).



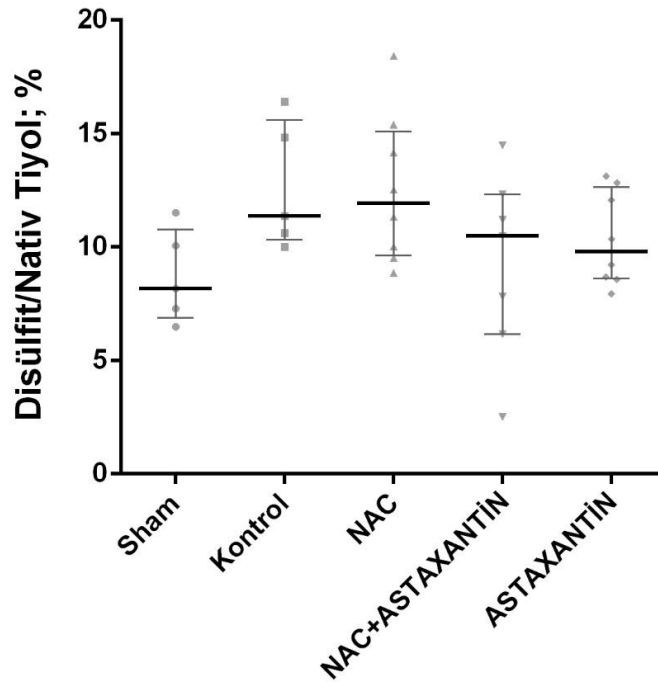
Şekil. 18 Grupların Toplam Tiyol değerlerinin grafiksel gösterimi (ortadaki çizgiler ortanca değeri, error barlar çeyrekler arası açıklığı ve her simge ölçülen değeri ifade etmektedir.)

Sıçanlardan alınan serum örneklerinden Disülfid değeri hesaplandı. Disülfid değerleri açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,020$). Disülfid median değerleri kontrol grubunda en yüksek iken, Astaksantin grubunda ise daha düşüktü (Tablo. 1) (Şekil. 19).



Şekil. 19 Grupların Disülfid değerlerinin grafiksel gösterimi (ortadaki çizgiler ortanca değeri, error barlar çeyrekler arası açıklığı ve her simge ölçülen değeri ifade etmektedir.)

Sıçanlardan alınan serum örneklerinden Disülfid / Nativ Tiyol yüzde oranı hesaplandı. Disülfid / Nativ Tiyol yüzde oranı değerleri açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,137$) (Tablo.1) (Şekil.20).



Şekil. 20 Grupların Disülfit/Nativ Tiyol yüzde oran değerlerinin grafiksel gösterimi (ortadaki çizgiler ortanca değeri, error barlar çeyrekler arası açıklığı ve her simge ölçülen değeri ifade etmektedir.)

Nativ Tiyol değerlerine bakıldığında, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,006$) (Tablo.2). Anlamlılığın hangi gruplar arasından kaynaklandığını saptamak için Dunn- Bonferoni pairwise comparison testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Sham-Kontrol, Sham-NAC, Sham-NAC+ASTA, Kontrol-NAC, Kontrol-NAC+ASTA, NAC-NAC+ASTA, NAC-ASTA ve NAC+ASTA-ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırası ile $p=1,000$; $p=0,363$; $p=0,110$; $p=1,000$; $p=0,443$; $p=1,000$; $p=1,000$ ve $p=1,000$). Kontrol-ASTA arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p=0,075$). Sham-ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,013$) (Tablo.3).

Tablo. 3 Nativ Tiyol değerlerinin gruplar arası ikili karşılaştırması

Grup 1-Grup 2	p değeri
Sham-Kontrol	1,000
Sham-NAC	0,363
Sham-NAC+Astaxanthin	0,110
Sham-Astaxanthin	0,013
Kontrol-NAC	1,000
Kontrol-NAC+Astaxanthin	0,443
Kontrol-Astaxanthin	0,075
NAC-NAC+Astaxanthin	1,000
NAC-Astaxanthin	1,000
NAC+Astaxanthin-Astaxanthin	1,000

P değeri Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile hesaplanmıştır. <0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Toplam Tiyol değerlerine bakıldığında, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,005$) (Tablo.1). Anlamlılığın hangi gruplar arasından kaynaklandığını saptamak için Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Sham-Kontrol, Sham-NAC, Kontrol-NAC, Kontrol-NAC+ASTA, NAC-NAC+ASTA, NAC-ASTA ve NAC+ASTA-ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırası ile $p=1,000$; $p=0,711$; $p=1,000$; $p=0,229$; $p=1,000$; $p=1,000$ ve $p=1,000$). Sham-NAC+ASTA ve Kontrol-ASTA arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır (sırası ile $p=0,062$ ve $p=0,092$). Sham-ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,021$) (Tablo.4).

Tablo. 4 Toplam Tiyyol değerlerinin gruplar arası ikili karşılaştırması

Grup 1-Grup 2	p değeri
Sham-Kontrol	1,000
Sham-NAC	0,711
Sham-NAC+Astaxanthin	0,062
Sham-Astaxanthin	0,021
Kontrol-NAC	1,000
Kontrol-NAC+Astaxanthin	0,229
Kontrol-Astaxanthin	0,092
NAC-NAC+Astaxanthin	1,000
NAC-Astaxanthin	1,000
NAC+Astaxanthin-Astaxanthin	1,000

P değeri Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile hesaplanmıştır. <0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Disülfid değerlerine bakıldığında, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,020$) (Tablo.1). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Sham-Kontrol, Sham-NAC, Sham-NAC+ASTA, Sham-ASTA, Kontrol-NAC, Kontrol-NAC+ASTA, NAC-NAC+ASTA, NAC-ASTA ve NAC+ASTA-ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırası ile $p=1,000$; $p=1,000$; $p=0,670$; $p=0,450$; $p=1,000$; $p=0,111$; $p=1,000$; $p=0,664$ ve $p=1,000$). Kontrol-ASTA arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p=0,063$) (Tablo.5).

Tablo. 5 Disülfit değerlerinin gruplar arası ikili karşılaştırması

Grup 1-Grup 2	<i>p</i> değeri
Sham-Kontrol	1,000
Sham-NAC	1,000
Sham-NAC+Astaxantin	0,670
Sham-Astaxantin	0,450
Kontrol-NAC	1,000
Kontrol-NAC+Astaxantin	0,111
Kontrol-Astaxantin	0,063
NAC-NAC+Astaxantin	1,000
NAC-Astaxantin	0,664
NAC+Astaxantin-Astaxantin	1,000

P değeri Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile hesaplanmıştır. <0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Olgular histopatolojik olarak Hematoksilen-Eozin boyası ile boyanarak, ışık mikroskobu altında NPUAP (National Pressure Ulcer Advisory Panel) skalasına göre evrelendirildi (Tablo.2). NPUAP evreleme sistemine göre gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,024$) (Tablo. 1). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile ikili karşılaştırılmalar yapıldı. Kontrol-NAC, Kontrol-NAC+Astaxantin, NAC-NAC+Astaxantin, NAC-Astaxantin ve NAC+Astaxantin-Astaxantin arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırası ile $p=1,000$; $p=1,000$; $p=1,000$; $p=0,420$ ve $p=0,201$). Kontrol-Astaxantin arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p=0,059$) (Tablo. 6)

Tablo.6 NPUAP evre değerlerinin gruplar arası ikili karşılaştırması

Grup 1-Grup 2	<i>p</i> değeri
Kontrol-NAC	1,000
Kontrol-NAC+Astaxanthin	1,000
Kontrol-Astaxanthin	0,059
NAC-NAC+Astaxanthin	1,000
NAC-Astaxanthin	0,420
NAC+Astaxanthin-Astaxanthin	0,201

P değeri Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile hesaplanmıştır. <0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Nekroz alanı değerleri arasında, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,003$) (Tablo.1). Anlamlılığın hangi gruplar arasından kaynaklandığını saptamak için Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Kontrol-NAC, Kontrol-NAC+ASTA, Kontrol-ASTA ve NAC-NAC+ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırası ile $p=1,000$; $p=1,000$; $p=0,137$ ve $p=1,000$). NAC-ASTA ve NAC+ASTA-ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırası ile $p=0,010$ ve $p=0,033$) (Tablo.7).

Tablo. 7 Nekroz alanı değerlerinin gruplar arası ikili karşılaştırması

Grup 1-Grup 2	<i>p</i> değeri
Kontrol-NAC	1,000
Kontrol-NAC+Astaxantin	1,000
Kontrol-Astaxantin	0,137
NAC-NAC+Astaxantin	1,000
NAC-Astaxantin	0,010
NAC+Astaxantin-Astaxantin	0,033

P değeri Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile hesaplanmıştır. $<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Nekroz yüzdesi değerlerine bakıldığında, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,001$) (Tablo.1). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Kontrol-NAC, Kontrol-NAC+ASTA ve NAC-NAC+ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırası ile $p=1,000$; $p=1,000$ ve $p=1,000$). Kontrol-ASTA, NAC-ASTA ve NAC+ASTA-ASTA arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırası ile $p=0,009$; $p=0,016$ ve $p=0,015$) (Tablo. 8).

Tablo.8 Nekroz yüzdesi değerlerinin gruplar arası ikili karşılaştırması

Grup 1-Grup 2	p değeri
Kontrol-NAC	1,000
Kontrol-NAC+Astaxantin	1,000
Kontrol-Astaxantin	0,009
NAC-NAC+Astaxantin	1,000
NAC-Astaxantin	0,016
NAC+Astaxantin-Astaxantin	0,015

P değeri Dunn-Bonferoni pairwise comparison testi ile hesaplanmıştır. <0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

Nativ Tiyol, Total Tiyol, Disülfit ve Disülfit/Nativ Tiyol Yüzde Oranı ile Nekroz Alanı, Total Flep Alanı, Nekroz Yüzdesi ve NUPAP Evreleme Skalası arasında korelasyon olup olmadığına bakıldı. Bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.

Tablo.9 Korelasyon (N=28)

		Nekroz Yüzdesi	Nekroz Alanı	NPUA P	Total Flep Alanı
Nativ Tiyol	rho	0,294	0,13	-0,170	-0,116
	p Değeri	0,128	0,509	0,388	0,556
Total Tiyol	rho	0,286	0,116	-0,141	-0,105
	p Değeri	0,141	0,557	0,475	0,596
Disülfit	rho	0,244	0,076	0,002	-0,096
	p Değeri	0,211	0,700	0,993	0,627
Disülfit/Nativ tiyol	rho	0,186	0,043	0,204	-0,003
	p Değeri	0,343	0,828	0,298	0,988
NPUAP	rho	0,242	0,201		-0,036
	p Değeri	0,215	0,304		0,855

rho: Spearman korelasyon katsayısı, p değeri <0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada iyi bilinen ve klinik pratikte sık kullanılan bir ajan olan NAC ve nispeten daha yeni olan ve şu an doğadaki en güçlü antioksidanlardan biri olarak kabul edilen ASTA' nın, klinik uygulamada sık karşılaşılan cilt degloving yaralanmaları üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Beyin, kalp, akciğer, karaciğer gibi solid organlarda iskemi- reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilen bu moleküllerin, ciltte oluşturulan bir reperfüzyon modelinde etkileri morfolojik, histokimyasal olarak ve biyokimyasal açıdan dinamik plazma tiyol / disülfid dengesine bakılarak değerlendirilmiştir ve bu değerlendirme sonucunda ASTA uygulanan grupta hem morfolojik, hem de biyokimyasal olarak flep yaşayabilirliğinin arttığı saptanmıştır.

“Degloving tipi yaralanmalar” tanımı ilk olarak 1952 yılında MacCollum tarafından kullanılmış, cildin altta yatan kemik ve kastan avülziyonu olarak tanımlanmıştır (62). 2010 yılında Arnez'in yaptığı bir sınıflama hariç, degloving tipi yaralanmalar için literatürde tanımlayıcı bir çalışmaya rastlamadık. Bu sınıflamaya göre degloving tarzı yaralanmalar için 4 ayrı tip tanımlanmıştır (abrazyon/ avülziyonla sınırlı, sirküferansiyel olmayan, tek planda sirküferansiyel ve çok planda sirküferansiyel degloving yaralanmalar) (44).

Hayvanlarda cilt degloving yaralanma modelleri de literatürde fazla tanımlanmamıştır. Yaptığımız literatür taramasında belli başlı 4 degloving yaralanma modeli tespit ettik. Bunlar Kurata'nın tavşan derisinde oluşturduğu model (55), Öztuna ve arkadaşlarını sıçan kuyruğunda oluşturdukları ve pentoksifilin etkilerini araştırdıkları model (56), Wang ve arkadaşlarının sıçan derisinde gerçekleştirdikleri model (63), ve son olarak uygulanabilirliği ve klinik pratikte en sık görülen tip olması açısından bizim de diğer çalışma modellerinden üstün bulup temel aldığımız Milcheski ve arkadaşlarının, sıçan arka bacağında gerçekleştirdikleri degloving modelidir (64).

Çalışmamızda hem laboratuvarımızın temel şartlara sahip olması hem de çalışmamıza dahil olan hayvan sayısı düşünülerek mikrocerrahi eğitimi ve araştırmalarında en yaygın olarak kullanılan hayvanlar olan sıçanlar tercih edilmiştir.

Sıçanlar arasındaki biyolojik varyasyonları en aza indirmek için aynı soydan, cinsiyeti ve yaşı (ağırlık yaş açısından yaklaşık bir gösterge sayılmaktadır) aynı, homojen bir gruptan alınan hayvanlar tercih edilmiştir. Çalışmamızda tüm bu değişkenler düşünülerek tüm sıçanların soyunun Wistar olmasına, tüm sıçanların dişi olmasına ve ağırlıklarının 240 ile 260 gram arasında olmasına dikkat edilmiştir. Değerlendirme sonucumuza göre de toplam flep alanına bakıldığında gruplar arası anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,683$). Çalışmada literatürde sıçan çalışmalarında sık kullanılan ve istenilen doku konsantrasyonunu sağlayan 300 mg/kg NAC (n-acetyl-cistein) (65, 66) ve daha önce literatürde tanımlanmış flep çalışması olmayan ancak kliniğimizde yapılmış bir çalışma baz alınarak uygulanan 8 mg/kg Astaxanthin (ASTA) uygulamadan 3 gün önce başlanıp, sakrifikasyon işlemine kadar toplamda 10 gün boyunca peroral nazogastrik sonda yardımıyla uygulanmış, deney süresi akut etkilerin değerlendirilmesi baz alınarak, yine literatürde sık kullanılan 7 günlük takip süresi ile sınırlı tutulmuştur (64, 67). Çalışmamızda antioksidan ajanları hayvanlara 3 gün önceden vermeye başlamamızın nedeni son zamanlarda yapılan literatürdeki çalışmalarda iskemi oluşturulmadan önceki dönemde verilen antioksidan tedavinin vücuttaki antioksidan kapasitenin artmasına bağlı olarak, flep yaşayabilirliğini anlamlı derecede artırdığının saptanmasıdır (68). Fasyokutan fleplerde kaspaz inhibitörleriyle yapılan başka bir çalışmada preiskemik verilen tedavinin primer iskemiye flep toleransını artırarak flep yaşayabilirliğini artırdığı bulunmuştur (12).

Çalışmada daha iyi tanımlanmış ve çalışılmış iyi bilinen hayvan cilt flebi modelleri yerine degloving yaralanma modelini tercih etmemizin nedeni bu tarz yaralanma modeliyle ilgili çalışmalara literatürde oldukça az rastlamış olmamızdır. Arnez'in de çalışmasında belirttiği gibi alt ekstremitelerde yaralanmalarında; açık kırıklarda yapılması gerekenler net olarak ortaya konulmuş olmasına rağmen, sadece deri zarfının etkilendiği durumlar tartışma konusu olarak devam etmektedir (44). Deglove olan cildin direk vizüel inspeksiyonu, yaralanmanın boyutunu gösteren zayıf bir belirteçtir (69). Ekstremitelerde degloving tarzı yaralanmalarda rekonstrüksiyon seçenekleri merkezlere göre farklılıklar göstermektedir. Geleneksel "bekle ve gör" yaklaşımı sıkça uygulansa da bekleme aşamasının ne kadar sürmesi gerektiği, o zaman çerçevesinde farmakolojik ajanların kullanımı tartışmaya açıktır. Rekonstrüksiyon yönünden incelendiğinde Arnez kendi sınıflamasında tip 1 ve tip 3

yaralanmalarda serbest flep, tip 2 yaralanmalarda flebin direkt sütürasyonunu, tip 4 yaralanmalarda ise seri debridmanı takiben rekonstrüksiyonu savunmaktadır (44). Hudson tarafından 1992 yılında yayınlanan bir makalede, degloving tarzı yaralanması olan 16 hastada cilt altı hematoma ve seroma boşaltılıp, kompresyon bandajıyla konservatif takip uygulanmış, sadece 1 hastada cilt flebinde nekroz gözlemlenmiştir (70). Degloving yaralanmalarında yaygın diğer bir yaklaşımda avülze dokunun total eksizyonu ve bunun bir tam kalınlıkta deri greft donörü olarak kullanılmasıdır (71, 72). Kliniğimizde bu tarz yaralanmalara yaklaşımımız erken sütürasyonu takiben reolojik bir ajan olan Dekstran 40 ile izlem ve demarkasyon hattının oluştuğu noktada yumuşak doku debridmanını takiben defekt alanının rekonstrüksiyonu yönündedir.

Hayvan çalışmalarında degloving modellerinde uygulanan farmakolojik ajanlar değerlendirildiğinde, Milcheski kendi çalışmasında Allopurinol ve Pentoksifilin cilt fleplerindeki nekroza etkisini değerlendirmiş ve her iki ajanın etkilerini de nekrozu sınırlandırmak yönünde anlamlı olarak bulmuş olup, Allopurinolün bu konuda daha etkili olduğunu belirtmiştir (58). Pentoksifilin cilt degloving yaralanmalarında etkinliğini değerlendiren başka bir çalışmada pentoksifilin doku nekrozunu azalttığı makroskopik ve histopatolojik olarak kanıtlanmıştır (56). Enoxaparin ve Rivaroxabanın cilt degloving yaralanmasında doku yaşamına etkilerini araştıran başka bir çalışmada iki grup arasında anlamlı fark bulunmamış olmakla birlikte, kontrol grubuna göre nekroz oranının anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir (59). Yine bir hayvan cilt degloving yaralanması modelinde heparin ve hiperbarik oksijenin nekroz oranını azaltmaktaki etkisine bakılmış olup, her iki değişkenin de nekroz oranını azaltmada etkili olduğu, ancak hiperbarik oksijenin nekroz oranını azaltmada kontrol grubuna göre anlamlı olduğu bulunmuştur (73). Sıçanlarda random paternli cilt fleplerinde hiperbarik oksijen ve NAC'ın flep yaşayabilirliğine etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada hiperbarik oksijenin tek başına kullanımının kontrol grubuna göre flep yaşayabilirliğini artırmada daha etkili olduğu bulunmuştur (65). Asetil sisteinin random paternli cilt fleplerinde etkinliğinin araştırıldığı başka bir çalışmada, kontrol grubuna göre NAC kullanılan grubun fleplerde distal nekroz oranını azalttığı gösterilmiştir (66). İki güçlü antioksidan olan Melatonin ve N-asetil sisteinin McFarlane flep modelinde

flep viabilitesini değerlendirildiği bir çalışmada her iki antioksidanın da flep yaşayabilirliğini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırmış olduğu bulunmuş olup, iki grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır (74). Biz bu çalışmada kendi literatür taramamız neticesinde henüz degloving yaralanmalarında kullanımına rastlamadığımız, sadece kliniğimizde yapılan bir deneysel çalışmada MacFarlane flep modelinde nekrozu azaltmakta oldukça etkili bulunduğumuz Astaksantin ve hem klinik pratikte hem de deneysel çalışmalarda flep viabilitesini arttırdığı kanıtlanmış, ancak daha önce degloving tipi avülziyon yaralanmalarında kullanımına rastlamadığımız NAC etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Degloving yaralanma modelinin tercih edilmesinin bir diğer sebebi de literatürde çok sayıda hayvan modelinde, çok farklı n ve ard koşullama modelleri çalışılmış olsa da (75, 76), klinik uygulamada zaman ve uygulanabilirliğin zor olması (tekrarlayan klemplemelerde pedikül yada vasküler yapılara hasar gelişebilirliği), laboratuvar koşullarının yetersizliği sebebiyle, bu deneysel modeller yerine, klinik uygulamada nispeten sık karşılaştığımız bu tarz yaralanmaların, benzer bir modelinin kullanılabilirliğidir.

Degloving tarzı yaralanmalarda, cilt bütünlüğü ve bazen kas ve tendon bütünlüğünün bozulmasının da eşlik ettiği bir yaralanma gelişebilmektedir. Ekstremiteler cildinin ve hasarlanmış dokularının, flebin adaptasyonunu takiben, distalden ters akımlı olarak kanlanmasıyla iskemi sürecini takip eden bir reperfüzyon süreci yaşanmaktadır. Bu reperfüzyon sürecinde reaksiyonlar neticesinde oluşan reaktif oksijen radikallerini azaltmak amaçlı literatürde çok sayıda antioksidan ve farmakolojik ajan denenmektedir. İyi bilinen ve sık kullanılan bir antioksidan olan NAC verilen grupta, beklediğimizin aksine nekroz alanı kontrol grubuna ve ASTA verilen gruba göre anlamlı derecede artmış olarak bulundu. ASTA'nın ise beklediğimiz gibi makroskobik olarak karşılaştırdığımızda kontrol grubuna göre nekroz yüzdesini anlamlı derecede azalttığını tespit ettik. NAC ve ASTA, farklı mekanizmalarla etki ederek oksidatif yükü azaltan ilaçlardır. N-asetil-sistein, intrasellüler antioksidan sistemlerin en önemli komponentlerinden biri olan glutatyon depoları için sistein sağlayan bir n iladır (31). Bir karotenoid türevi olduğu bilinen ASTA ise serbest oksijen radikallerinin enerjilerini absorbe ederek, membranöz

fosfolipidleri ve diğer lipidleri peroksidasyona karşı koruyan ekzojen bir antioksidandır (24, 25). Çalışmamızda random paternli fleplerin aksine, degloving yaralanma modelinde ratlara uygulanan NAC tedavisinin fleplerde nekroz alanını artırması oldukça şaşırtıcıdır.

Histopatolojik olarak Hematoksilen- Eozin boyama ile yaptığımız değerlendirme neticesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,024$). ASTA uygulanan grupta, diğer gruplara ve kontrol grubuna göre derin nekroz olarak tabir edilen evre 4 nekrozla karşılaşmamış olmamız kaydedeğerdir. Bu grupta bulunan hayvanların çoğunda nekroz alanları histopatolojik inceleme neticesinde evre 2 nekroz olarak yorumlanmıştır. Evre 2 nekrozun, kısmi dermis kaybı olduğu düşünülecek olursa yeterli süre bekleyecek olursak muhtemelen bu tarz cilt kayıpları reepitelizasyonla sonuçlanacaktır.

Oksidan- antioksidan dengesi, organizmada homeostazis için oldukça önemlidir. Oksidan ve antioksidan durum arasındaki denge oksidan taraf yönüne doğru kaydığında oksidatif stresten bahsedilir (77). Degloving yaralanması oluşturulan bir flepte de oksidatif süreç başlar. Tiyol grupları reaktif oksijen radikallerini ve diğer serbest radikalleri enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarla parçalayan antioksidan kaskadın önemli bir üyesidir (78) ve oksidatif stres koşullarında redükte tiyol konsantrasyonunun arttığı, nativ (redükte olmayan) tiyol (SH) konsantrasyonunun azaldığı ve disülfid (SS) değerlerinin korele bir şekilde arttığı Erel ve Neşelioğlu tarafından rapor edilmiştir (39). Tiyol/ disülfid homeostazisinin bozulmasının literatürde pek çok hastalıkla ilişkili olduğu bulunmuş olsa da, çalışmamızın bu durumun değerlendirildiği ilk hayvan çalışması olması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda nativ tiyol ve toplam tiyol düzeyleri, beklediğimiz üzere sham grubunda en yüksekken, beklemediğimiz şekilde ASTA uygulanan grupta en düşük olarak tespit edilmiştir. Nativ tiyol düşüklüğü insanlarda oksidatif stres durumunun iyi bir belirteci olmasına rağmen, güçlü bir antioksidan olan ASTA uyguladığımız grupta düşük çıkmasının nedeni tiyol gruplarının ASTA ile hücresel düzeyde reaksiyona girmiş olması ya da hayvanlarda insanlardakinden farklı hücresel reaksiyonların olması olabilir diye düşünmekteyiz. Disülfid miktarı ise insan çalışmalarında gördüğümüz gibi kontrol grubunda

yüksekken, ASTA uygulanan grupta en düşük olarak tespit edilmiştir. Bu durumu tiyol grubu hayvanlarda çeşitli ilaçlarla reaksiyona girerken, disülfid grubu reaksiyona girmediği için oksidatif durumun olmadığı durumlarda en düşük olarak bulundu şeklinde yorumlayabiliriz. Belki de sıçanlarda tiyol yerine disülfid oksidatif durumu gösteren daha iyi bir belirteçtir.

Çalışmamızda iki farklı mekanizma ile etki eden antioksidanların kombine kullanımının flep yaşayabilirliğine olumsuz etki ettiğini gözlemledik.

Oksidatif durumun belirteci olarak plazma tiyol disülfid düzeyinin kullanıldığı ilk hayvan çalışması olması açısından çalışmamızın oldukça değerli olduğu kanaatindeyiz, lakin bu durumun daha doğru değerlendirilmesi için daha fazla hayvanın kullanılması gerektiği mutlak bir gerçektir. Hayvan sayısının yetersizliği çalışmamızın en önemli kısıtlılıklarından biridir.

Tiyol düzeyinin insandaki farklı oksidatif duruma göre değişkenliği iyi anlaşılmış olmasına rağmen, sıçanlarda bu durumun anlaşılabilmesi için daha ileri ve geniş hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır. Belki de daha geniş hayvan çalışmalarında tiyol ve disülfid dengesinin oksidatif durumu gösteren iyi bir belirteç olduğu anlaşılacak ve oksidatif durumun değiştiği koşulları belirlemek için iyi bir belirteç olarak kullanılacaktır.

6. SONUÇ

Çalışmamızda N-Asetil-Sistein ve Astaksantinın sıçan ekstremitesinde oluşturulan distal bazlı degloving modelinde distal nekroz alanına etkisi değerlendirilmiştir ve Astaksantinın tek başına kullanımının distal nekroz alanını anlamlı derecede azalttığı ve yara iyileşmesine olumlu katkı sağladığı saptanmıştır. Bu nedenle plastik cerrahinin büyük bir parçası olan flep cerrahisi operasyonlarında flep yaşayabilirliğini arttırıcı bir ilaç olarak kullanılabilceği kanaatindeyiz. Ancak literatürde Astaksantinın flep sağ kalıma etkisi üzerine yapılmış başka çalışma olmaması nedeni ile bu ilacın değişik dozlarda etkileri, minimum ve maksimum etkinliğin görüldüğü dozlar, topikal veya oral uygulamada etkinliği hakkında yeterince bilgi yoktur. Klinik kullanım öncesi çeşitli doz aralıkları ve uygulama yolları ile yapılacak çalışmaların gerekli olduğun kanaatindeyiz. Flep yaşayabilirliğine etkileri bakımından ön ve ard koşullama modellerinin ışığında, farmakolojik ajanlara olan ihtiyacın giderek arttığı kanısını taşımaktayız.

KAYNAKLAR

1. Neligan PC, Warren RJ. Plastic Surgery-Aesthetic: Elsevier Health Sciences; 2012.
2. Kayser M. Selected readings in plastic surgery. Surgical Flaps. 1999;9(2):1.
3. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. Microsurgery. 1993;14(3):165-75.
4. Çetİn C, Köse AA, Aral E, Çolak Ö, Erçel C, Karabagli Y, et al. Protective effect of fucoïdin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. Annals of plastic surgery. 2001;47(5):540-6.
5. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. Microsurgery. 2004;24(6):468-75.
6. Ozmen S, Ayhan S, Demir Y, Siemionow M, Atabay K. Impact of gradual blood flow increase on ischaemia-reperfusion injury in the rat cremaster microcirculation model. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2008;61(8):939-48.
7. Aydogan H, Gurlek A, Parlakpınar H, Askar I, Bay-Karabulut A, Aydogan N, et al. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery. 2007;60(5):563-8.
8. Feng G-M, Yang W-G, Chen SH-T, Chu Y-M, Tsai L-M, Chang T-M, et al. Periodic alterations of jejunal mucosa morphology following free microvascular transfer for pharyngoesophageal reconstruction. Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery. 2006;59(12):1312-7.
9. Manson PN, Narayan KK, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. Improved survival in free skin flap transfers in rats. Surgery. 1986;99(2):211-5.
10. Coban YK, Kurutas EB, Ciralik H. Ischemia-reperfusion injury of adipofascial tissue: an experimental study evaluating early histologic and biochemical alterations in rats. Mediators of inflammation. 2005;2005(5):304-8.

11. Ramires P, Ji L. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001;281(2):H679-H88.
12. Sumer BD, Gastman BR, Gao F, Haughey BH, Paniello RC, Nussenbaum B. Caspase inhibition enhances ischemic tolerance of fasciocutaneous flaps. *The Laryngoscope*. 2005;115(8):1358-61.
13. Yoshida WB, Campos EBPd. Ischemia and reperfusion in skin flaps: effects of mannitol and vitamin C in reducing necrosis area in a rat experimental model. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20(5):358-63.
14. O'Shaughnessy KD, Mustoe TA. The surgical TRAM flap delay: reliability of zone III using a simplified technique under local anesthesia. *Plastic and reconstructive surgery*. 2008;122(6):1627-30.
15. Mathes SJ, Hentz VR. *Plastic surgery: Saunders Elsevier*; 2006.
16. Morris SF, Yang D. Effect of vascular delay on viability, vasculature, and perfusion of muscle flaps in the rabbit. *Plastic and reconstructive surgery*. 1999;104(4):1041-7.
17. Daniel R. Principles and physiology of skin flap surgery. *Plastic surgery*. 1990;1:275-328.
18. Kayser MR, Hodges P. Surgical flaps. *Selected readings in plastic surgery*. 1999;8(3):1-58.
19. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu Klinik Gelişim. 1995;8:3906.
20. Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in biotechnology*. 2000;18(4):160-7.
21. Olaizola M, Huntley ME. Recent advances in commercial production of astaxanthin from microalgae. *Biomaterials and Bioprocessing (Fingerman, M and Nagabhushanam, R, eds) Science Publishers*. 2003.
22. Jyonouchi H, Sun S, Gross M. Effect of carotenoids on in vitro immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells: Astaxanthin, a carotenoid without vitamin a activity, enhances in vitro immunoglobulin production in response to at- dependent stimulant and antigen. 1995.
23. Papas AM. *Antioxidant status, diet, nutrition, and health: CRC press*; 1998.

24. Mortensen A, Skibsted LH, Sampson J, Rice-Evans C, Everett SA. Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS letters*. 1997;418(1-2):91-7.
25. Beutner S, Bloedorn B, Frixel S, Hernández Blanco I, Hoffmann T, Martin HD, et al. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of β - carotene in antioxidant functions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2001;81(6):559-68.
26. Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiological chemistry and physics and medical NMR*. 1990;22(1):27-38.
27. Gershon D. The mitochondrial theory of aging:: Is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations? *Experimental gerontology*. 1999;34(5):613-9.
28. Chew B, Park J, Wong M, Wong T. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Research*. 1999;19(3A):1849-53.
29. Tanaka T, Morishita Y, Suzui M, Kojima T, Okumura A, Mori H. Chemoprevention of mouse urinary bladder carcinogenesis by the naturally occurring carotenoid astaxanthin. *Carcinogenesis*. 1994;15(1):15-9.
30. Anderson M. Method of Inhibiting 5-a Reductase with Astaxanthin to Prevent and Treat Benign Prostate Hyperplasia (BPH) and Prostate Cancer in Human Males. US Patent. 2001;6277417.
31. Kunnavatana SS, Quan SY, Koch RJ. Combined effect of hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine on fibroblast proliferation. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*. 2005;131(9):809-14.
32. Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clinical pharmacokinetics*. 1991;20(2):123-34.
33. Takhtfooladi MA, Jahanshahi A, Sotoudeh A, Khansari M, Takhtfooladi HA. The antioxidant role of N-acetylcysteine on the testicular remote injury after skeletal muscle ischemia and reperfusion in rats. *Polish Journal of Pathology*. 2013;64(3):204-9.

34. Shimizu MHM, Danilovic A, Andrade L, Volpini RA, Libório AB, Sanches TR, et al. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008;23(10):3067-73.
35. Eren Y, Dirik E, Neşelioğlu S, Erel Ö. Oxidative stress and decreased thiol level in patients with migraine: cross-sectional study. *Acta Neurologica Belgica*. 2015;115(4):643-9.
36. Liebler DC. Antioxidant reactions of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;691(1):20-31.
37. Kundi H, Erel Ö, Balun A, Çiçekçioğlu H, Cetin M, Kiziltunç E, et al. Association of thiol/disulfide ratio with syntax score in patients with NSTEMI. *Scandinavian Cardiovascular Journal*. 2015;49(2):95-100.
38. Lunn G, Dale G, Beutler E. Transport accounts for glutathione turnover in human erythrocytes. *Blood*. 1979;54(1):238-44.
39. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical biochemistry*. 2014;47(18):326-32.
40. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;65:244-53.
41. Wójcicki P, Wojtkiewicz W, Drozdowski P. Severe lower extremities degloving injuries-medical problems and treatment results. *Polish Journal of Surgery*. 2011;83(5):276-82.
42. Antoniou D, Kyriakidis A, Zaharopoulos A, Moskoklaidis S. Degloving injury. *European Journal of Trauma*. 2005;31(6):593-6.
43. Krishnamoorthy R, Karthikeyan G. Degloving injuries of the hand. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2011;44(2):227.
44. Arnez Z, Khan U, Tyler M. Classification of soft-tissue degloving in limb trauma. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2010;63(11):1865-9.
45. Archier E, Grillo J, Fourcade S, Gaudy C, Grob J, Richard M, editors. Morel-Lavallée syndrome of the lower leg. *Annales de dermatologie et de venerologie*; 2012.

46. Tejwani SG, Cohen SB, Bradley JP. Management of Morel-Lavallee Lesion of the Knee. *The American journal of sports medicine*. 2007;35(7):1162-7.
47. Yan H, Gao W, Li Z, Wang C, Liu S, Zhang F, et al. The management of degloving injury of lower extremities: technical refinement and classification. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2013;74(2):604-10.
48. Künzel R, Marathovouniotis N, Kellner M, Boemers T. Severe degloving injury to both feet in a child. *Der Unfallchirurg*. 2013;116(2):171-5.
49. Liu D-x, Li X-d, Wang H, Qiu K-f, Du S-x. Reconstruction of total degloving injuries of the foot in children. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 2012;73(1):209-14.
50. McGrouther D, Sully L. Degloving injuries of the limbs: long-term review and management based on whole-body fluorescence. *British journal of plastic surgery*. 1980;33(1):9-24.
51. Van Vugt J, Beks S, Borghans R, Hoofwijk A. The Morel-Lavallée-lesion: Delayed symptoms after trauma. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2013;157(23):A5914-A.
52. Guang Y, LEI H-y, Shuang G, Hao Y, HUANG J-h. Treatment of degloving injury of three fingers with an anterolateral thigh flap. *Chinese Journal of Traumatology (English Edition)*. 2011;14(2):126-8.
53. Kim YH, Ng S-W, Youn SK, Kim CY, Kim JT. Use of latissimus dorsi perforator flap to facilitate simultaneous great toe-to-thumb transfer in hand salvage. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2011;64(6):827-30.
54. Latifi R, El-Hennawy H, El-Menyar A, Peralta R, Asim M, Consunji R, et al. The therapeutic challenges of degloving soft-tissue injuries. *Journal of emergencies, trauma, and shock*. 2014;7(3):228.
55. Kurata T, O'Brien BM, Black MJ. Microvascular surgery in degloving injuries: an experimental study. *British journal of plastic surgery*. 1978;31(2):117-20.
56. Oztuna V, Eskandari MM, Unal S, Colak M, Karabacak T. The effect of pentoxifylline in treatment of skin degloving injuries: an experimental study. *Injury*. 2006;37(7):638-41.

57. Milcheski DA, Ferreira MC, Nakamoto HA, Tuma Jr P. Development of an experimental model of degloving injury in rats. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2012;27(4):514-7.
58. Milcheski DA, Nakamoto HA, Tuma Jr P, Nóbrega L, Ferreira MC. Experimental model of degloving injury in rats: effect of allopurinol and pentoxifylline in improving viability of avulsed flaps. *Annals of plastic surgery*. 2013;70(3):366-9.
59. Azboy I, Demirtas A, Bulut M, Alabalik U, Uçar Y, Alemdar C. Effects of enoxaparin and rivaroxaban on tissue survival in skin degloving injury: an experimental study. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2014;48(2):212-6.
60. Cebesoy O, Isik M, Erzincan T, Pamukcu U, Bilgin F, Subasi M. Analysis of the effects of heparin and enoxaparin on degloving injuries. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(9):550-3.
61. Altun S, Orbay H, Ekinçi M, Cetinbas A, Bal A, Arpacı E, et al. A comparison of rat degloving injury models. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 2017.
62. MacCollum DW, Bernhard WF, Banner RL. The treatment of wringer-arm injuries. *New England Journal of Medicine*. 1952;247(20):750-4.
63. Wang Z, Guo S, Xiu Z, Lu K, Li Q. A new model of skin avulsion injuries in rats. *Zhonghua zheng xing wai ke za zhi= Zhonghua zhengxing waikē zazhi= Chinese journal of plastic surgery*. 2008;24(3):212-5.
64. Milcheski D, Ferreira M, Nakamoto H. Modelo experimental para estudo de desenlramento cutâneo no membro inferior. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*. 2001;26(2):328-31.
65. da Rocha FP, Fagundes DJ, Pires JA, da Rocha FST. Effects of hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine in survival of random pattern skin flaps in rats. *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2012;45(3):453.
66. Ablá LEF, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20(2):121-3.

67. Cetinkale O, Bilgic L, Ayan F, Kandilci A. Neutrophil-mediated injury in ischemic skin flaps: amelioration of ischemic injury by cyclosporine in the rat. *Annals of plastic surgery*. 1996;37(1):66-74.
68. van den Heuvel MG, Buurman WA, Bast A, van der Hulst RR. Ischaemia–reperfusion injury in flap surgery. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2009;62(6):721-6.
69. Kudsk KA, Sheldon GF, Walton RL. Degloving injuries of the extremities and torso. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 1981;21(10):835-9.
70. Hudson D, Knottenbelt J, Krige J. Closed degloving injuries: results following conservative surgery. *Plastic and reconstructive surgery*. 1992;89(5):853-5.
71. Khan A. Degloving injuries of the lower limb. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*. 2004;14(7):416-8.
72. Minten L, Hovius S, Gilbert P. Degloving injuries. A retrospective study at the University Hospital Rotterdam. *Acta Chirurgica Belgica*. 1992;92(4):209-12.
73. Menon DN, Teixeira L, Paurosi NB, Barros ME. Effects of heparin and hyperbaric oxygenation on necrosis reduction in an animal model for degloving injuries. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2017;44(1):64-71.
74. Tunç S, Kesiktas E, Yilmaz Y, Açikalin A, Oran G, Yavuz M, et al. Assessing the effects of melatonin and N-acetylcysteine on the McFarlane flap using a rat model. *Plastic Surgery*. 2016;24(3):204-8.
75. Takhtfooladi HA, Hesaraki S, Razmara F, Takhtfooladi MA, Hajizadeh H. Effects of N-acetylcysteine and pentoxifylline on remote lung injury in a rat model of hind-limb ischemia/reperfusion injury. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2016;42(1):9-14.
76. Mase VJ, Roe JL, Christy RJ, Dubick MA, Walters TJ. Postischemic conditioning does not reduce muscle injury after tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *The American journal of emergency medicine*. 2016;34(11):2065-9.
77. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*. 2004;84(4):1381-478.
78. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*. 1989;58(1):79-110.

EKLER



T.C.
Sağlık Bakanlığı
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi
“Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Karar Defteri”

Toplantı No: 0042

22.09.2017

PROJENİN ADI (Varsa Kodu): NAC(n-acetyl-cystein)ve astaksantin'in rat degloving tarzı yaralanma modelinde flep yaşayabilirliği üzerine etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmesi.

SORUMLU ARAŞTIRMACI : Dr.Koray GÜRSOY. Tıpta Uzmanlık Tezi

T.C.S.B.Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi **Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği**
(Dr.Fethiye Berna Gökteş Demircan, Dr.Koray Gürsoy, Dr.Hakan Teymur, Dr.Murat Alışık, Dr.Hilal Özakıncı, Prof.Dr.Özcan Erel, Prof.Dr.Uğur Koçer)


ARAŞTIRMAYI DESTEKLEYEN KURULUŞ(LAR):


KARAR:


485.Çalışmanın Protokol, usul, yaklaşım ve yöntem yönünden “ETİK” değerlendirmesinde “UYGUN” “OLDUĞUNA”/“OLMADIĞINA” “OYBİRLİĞİ” / “OYÇOKLUĞU” ile karar verilmiş ve araştırma için belirlenen tüm hayvan, uygulama, tetkik ve girişimlerin bedellerinin araştırma grubunca karşılanması kaydı ile çalışmanın yapılmasına ve Hastanemiz arşiv bilgi ve belgelerinin ve Hayvan Deneyleri Laboratuvarı'nın kullanılmasına “İZİN” “VERİLMİŞTİR” / “VERİLMEMİŞTİR”.



Prof.Dr.Uğur KOÇER


Doç.Dr.Nezih SUNGUR


Doç.Dr.Kemal KİSMET
(Raportör)


Veteriner Hek. Cengiz YALÇIN
(Raportör ve Kurul Seretery)


Ahmet Zeki GÜLER
(Sivil Toplum Örgütü Üyesi)


Gülcan BAŞEĞMEZ
(Sivil Üye)