

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

**BOTULİNUM TOKSİNİNİN VE NİKOTİNİN
SIÇAN KARIN DERİSİ PERFORATÖR FLEBİNDE
VİYABİLİTEYE VE ANJİYOGENEZE ETKİSİ**

(DENEYSEL ÇALIŞMA)

**UZMANLIK TEZİ
Dr. ENGİN YOSMA**

SAMSUN

Mart- 2017



T.C

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHI
ANABİLİM DALI

**BOTULİNUM TOKSİNİNİN VE NİKOTİNİN
SIÇAN KARIN DERİSİ PERFORATÖR FLEBİNDE
VİYABİLİTEYE VE ANJİYOGENEZE ETKİSİ**

(DENEYSEL ÇALIŞMA)

UZMANLIK TEZİ

Dr. ENGİN YOSMA

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. AHMET DEMİR

SAMSUN

Mart- 2017

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, bilgi ve tecrübesiyle meslek yaşantıma önemli katkıları bulunan, yanında çalışmaktan onur duyduğum, değerli hocam, Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet DEMİR'e,

Eğitimim boyunca bana her açıdan yardımcı olan, insani ve ahlaki değerleri ile örnek aldığım, ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş oldukları hoşgörü ve samimiyetlerinden dolayı değerli hocalarım Doç. Dr. Tekin ŞİMŞEK'e ve Doç. Dr. İsmail Küçüker'e

Kıymetli tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Lütfi EROĞLU'na,

Üzerimde emekleri olan Doç. Dr. Yener DEMİRTAŞ'a, Doç. Dr. Murat Sinan ENGİN'e ve Yrd. Doç. Dr. Çağlayan YAĞMUR'a,

Tezimi yapmamda büyük yardımları olan Prof. Dr. Murat YARIM'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına,

Uzun süren asistanlık sürecinde; umutlarımızı, sevinçlerimizi, acılarımızı, kısaca hayata dair her şeyi paylaştığımız birlikte çalışmaktan zevk aldığım sevgili asistan arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında güvenini ve desteğini esirgemeyen, yoğun ve yorucu uzmanlık eğitiminin yükünü birlikte taşıdığımız eşim Dr. Arzu YOSMA'ya, beni her zaman destekleyen, bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMALAR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Flep cerrahisinin tarihi	3
2.2. Fleplerin sınıflandırılması	3
2.3. Deri fleplerinin kanlanması fizyopatogenezi	4
2.4. Perforatör Flepler	6
2.5. Flep yaşayabilirliğini artırmak için yapılan deneysel araştırmalar	9
2.5.1. Geciktirme (Delay) Fenomeni	9
2.5.2. Mikrocerrahi yöntemlerle ekstra arter ve ven anastomozları	10
2.5.3. Fiziksel uygulamalar	10
2.5.4. Antikoagülanlar	11
2.5.5. Antiadrenerjik ilaçlar ve Sempatik Reseptör blokörleri	11
2.5.6. Direkt düz kaslara etki ederek damar genişleten ilaçlar	12
2.5.7. Kanın reolojik özelliğini değiştiren ajanlar	12
2.5.8. İskemiye toleransı artıran ajanlar	12
2.6. Sigara Kullanımının Flep Üzerine olan Etkileri	13
2.6.1. Nikotin ve Kan Basıncı	14
2.6.2. Nikotin ve Endotelial Disfonksiyon	14
2.6.3. Nikotin ve Tromboz	15
2.6.4. Nikotin ve Kan Lipidleri	15
2.6.5. Nikotin ve İnflamasyon	16
2.6.6. Nikotin ve Serbest Oksijen Radikalleri	16
2.6.7. Nikotin Etkilerinin Klinik Yansıması	16
2.7. Botulinum Toksin A	17
2.8. Sıçanlarda karın derisi beslenmesi	20

3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Deney gruplarının isimlendirilmesi	22
3.2. Cerrahi öncesi hazırlık	23
3.3. Perforatör bazlı abdominal deri flebinin kaldırılması	23
3.4. Hayvanların bakımı	24
3.5. Fleplerde yaşayan alan ölçümü	24
3.6. Histopatolojik spesmen alınması ve spesmenlerin incelenmesi	24
3.6.1. Gen ekspresyon analizinin yapılması	25
3.6.2. Sıçan Karın ön duvarı Cilt RNA izolatlarından cDNA sentezi	27
3.6.3. Biyoinformatik analiz	29
3.6.4. Q-PCR Çalışması	30
3.6.5. Beta 2 mikroglobulin için Q-PCR Çalışması	31
3.6.6. CD34 için Q-PCR Çalışması	32
3.6.7. VEGF alfa için Q-PCR Çalışması	33
3.6.8. HIF1 alfa için Q-PCR Çalışması	34
3.6.9. Komparatif Ct Metodu ile Gen Ekspresyon Analizi	35
3.7.1. Histopatolojik inceleme	36
3.7.2. İmmunohistokimyasal inceleme	36
3.8. Hayvanların sakrifiye edilmesi	38
3.9. İstatistiksel analiz	38
4.BULGULAR	39
4.1. Fleplerin yaşayan alanlarının değerlendirilmesi	39
4.2. Kantitatif Real Time-PCR Sonuçları	41
4.3.1. Deri fleplerinin histopatolojik değerlendirilmesi	44
4.3.2. İmmunohistokimya bulguları	48
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	58
7. KAYNAKLAR	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	Gen Ekspresyon Çalışma Planı	26
Tablo 3.2	RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlığı	27
Tablo 3.3	Template-primer miks (1 reaksiyon için)	28
Tablo 3.4	Template-primer karışımını içeren tüpün sırasıyla pipetlenmesi	28
Tablo 3.5	Beta 2 mikroglobulin, CD34, VEGF alfa ve HIF1 alfa ekspresyonunun primer-prob dizaynı	29
Tablo 3.6	Beta 2 mikroglobulin Q-PCR için Master Mix İçeriği	31
Tablo 3.7	Beta 2 mikroglobulin Q-PCR programı	32
Tablo 3.8	CD34 Q-PCR için Master Mix İçeriği	32
Tablo 3.9	CD34 Q-PCR programı	33
Tablo 3.10	VEGF alfa Q-PCR için Master Mix İçeriği	33
Tablo 3.11	VEGF alfa Q-PCR programı	34
Tablo 3.12	HIF1 alfa Q-PCR için Master Mix İçeriği	34
Tablo 3.13	HIF1 alfa Q-PCR programı	35
Tablo 3.14	Çalışmada kullanılacak antikorlar ve özellikleri	38
Tablo 4.1	Cerrahi sonrası 7. günde yapılan tüm deneklerin nekroz oranları ölçümü	39
Tablo 4.2.1	Grupların 7. gündeki ortalama nekroz oranları ve standart sapmaları	40
Tablo 4.2.2	Grupların 7. gündeki ortalama nekroz ve yaşayan alan yüzdeleri	40
Tablo 4.3	Sıçan karın duvarı örneklerinde yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri	41
Tablo 4.4	Sıçan karın duvarı örneklerinde subkutan nikotin uygulama sonrası REST analizi	43
Tablo 4.5	Sıçan karın duvarı örneklerinde subkutan botulinum toksin uygulama sonrası REST analizi sonuçları	44
Tablo 4.6	Sıçan karın duvarı örneklerinde subkutan nikotin ve botulinum toksin uygulama sonrası REST analizi sonuçları	44
Tablo 4.7	Kontrol ve deneme grubundaki sıçanların deri fleplerinde inflamatuvar hücre, fibroblast ve yeni oluşan damar sayıları ile kollajen yoğunlukları	46
Tablo 4.8	Kontrol ve deney grubundaki sıçanların deri fleplerinde ortalama inflamatuvar hücre, fibroblast ve yeni oluşan damar sayıları ve standart sapmaları	47
Tablo 4.9	Kontrol ve deneme grubundaki sıçanların deri fleplerindeki farklı kısımlarda CD34 ekspresyonları	49
Tablo 4.10	Kontrol ve deneme grubundaki sıçanların deri fleplerinde Hif1 alfa ekspresyonları	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Kanlanmasına göre deri flepleri; Random ve Aksiyel flepler	4
Şekil 2.2	Deri fleplerinin sınıflaması	5
Şekil 2.3	İnsan vücudundaki perforatörler	7
Şekil 2.4	Perforatör flep tanımlamaları	8
Şekil 2.5	BTx'nin moleküler yapısı	18
Şekil.2.6	Sıçan karın ön duvar anatomisi	21
Şekil 3.1	Tek perforatör kullanılarak yapılan flep	22
Şekil 3.2	a) Flep kaldırılırken disseke edilen perforan damarlar b) Süperior derin epigastrik arterin sağ ikinci kraniyal perforatörünün üzerinde kaldırılmış hali	24
Şekil 3.3	Alan hesaplanması için kullanılan programın görünümü	25
Şekil 4.1	Kontrol, nikotin, BTx, nikotin + BTx gruplarının postoperatif 7. günde nekroz alanlarının gösterimi	41
Şekil 4.2	Sıçanların deri örneklerinin dermisindeki histolojik bulgular	47
Şekil 4.3	Sıçanların deri örneklerinin dermisinde kollajen yoğunluğu	48
Şekil 4.4	Kontrol ve deneme gruplarındaki sıçan deri fleplerinde CD34 immunopozitiflikleri	50
Şekil 4.5	Kontrol ve deneme gruplarındaki sıçan deri fleplerinde Hif-1 alfa immunopozitiflikleri	52
Şekil 4.6	Kontrol ve deneme gruplarındaki sıçan deri fleplerinde Hif-1 alfa immunopozitiflikleri	53

KISALTMALAR

AA	Araşidonik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BT	Bilgisayarlı tomografi
Btx	Botulinum toksin
CD34	Kök hücre belirteci
CO	Karbonmonoksit
COX	Siklooksijenaz
CO ₂	Karbondioksit
c-AMP	Siklik adenozin monofosfat
DEHEK	Deney Hayvanları Etik Kurulu
DIEAP	Derin inferior epigastrik arter perforatör
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EPO	Eritropoetin
FDA	Food and Drug Administration
HCN	Hidrojen siyanür
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
Hif-1-alfa	Hypoxia-inducible factor 1-alfa
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
N	Azot
NE	Norepinefrin
NH ₃	Amonyak
NO	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
SNARE	Soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment proteine receptor
Sc	Subkutan
TENS	Transkutanöz elektriksel sinir uyarısı
TXA ₂	Tromboksan A ₂
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein

ÖZET

Deri flepleri, doku defektlerinin onarımında sık başvuru alan onarım yöntemlerindedir. Flep cerrahisinde başarılı bir onarım için flebin beslenme yeteneği oldukça önemlidir. Son yıllarda plastik cerrahide doku kayıplarının onarılmasında perforatör flepler giderek artan sıklıkta kullanılmaktadır. Perforatör fleplerde meydana gelen kayıplar, tedavi süresi ve maliyeti artırmanın yanında ek morbidite de yaratmaktadır. Cerrahi komplikasyonların en önemli önlenilebilir nedenlerinden biri sigara kullanımımıdır. Botulinum toksini günümüzde estetik amaçlı kullanımının dışında başka alanlarda da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada nikotin ve botulinum toksininin perforatör fleplere olan etkileri kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada 40 adet sıçanda, sağ süperior derin epigastrik arter ikinci kranial perforatör bazlı 6 cm x 6 cm boyutlarında perforatör deri flebi kaldırıldı. Bütün gruplarda flepler kaldırılıp tekrar yerine adapte edildi. Kontrol grubunda hiçbir ilaç uygulanmadı. Nikotin grubuna bir ay boyunca günlük olarak 2 mg/kg subkutan/deri altına nikotin verildi. Botulinum toksin (BTx) grubuna cerrahi işleminden 5 gün önce, pedikülün gireceği bölge dışında kalan toplam 8 adet noktaya 1 IU intradermal botulinum toksin uygulandı. Nikotin + BTx grubuna nikotin ve BTx grubundaki işlemler kombine olarak uygulandı. Çalışmada cerrahi sonrası 7. günde çekilen fotoğraflarda fleplerin nekroz oranları ölçüldü, bu alanlar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Ayrıca alınan doku örnekleri gen ekspresyonu, histopatolojik ve immunhistokimyasal olarak değerlendirildi.

Gruplarda nekrotik flep alanının tüm flebe oranı sırasıyla, kontrol grubunda % 43,43± 18,79 nikotin grubunda % 46,29± 23,36, botulinum toksin grubunda % 25,15± 6,23, nikotin+ botulinum toksin grubunda % 30,20± 5,31 olarak hesaplandı. Nekroz oranları bakımından kontrol ve nikotin grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı (p=0,089). Kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında nekroz oranının anlamlı şekilde azaldığı (p= 0,01), kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında nekroz oranının anlamlı şekilde azaldığı görüldü (p= 0,041).

Gen ekspresyon analizinde ise; nikotin grubunda Beta 2 Mikroglobulin, CD 34, Hif 1 alfa ve VEGF A genlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p>0,05). Botulinum toksin grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında Beta 2 Mikroglobulin ve VEGF A gen ekspresyon analiz sonuçlarında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (p >0,05). Botulinum toksin grubunda bakılan CD 34 ve Hif 1 alfa gen ekspresyon analizi sonuçları ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük çıkmıştır (p=0,009, p=0,047).

Nikotin+ botulinum toksin grubunda Beta 2 Mikroglobulin ve VEGF A gen ekspresyon analizi sonuçlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Nikotin + botulinum toksin grubunda çalışılan CD 34 ve Hif 1 alfa gen ekspresyon analizi sonuçları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p=0,001$, $p =0,027$).

Histopatolojik değerlendirmede ise; inflamatuvar hücre sayısı, fibroblast sayısı, kollajen yoğunluğu ve yeni oluşan damar sayıları hesaplanmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında hiçbir grupta inflamatuvar hücre sayısı, fibroblast sayısı, kollajen yoğunluğu bakımından anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Yeni oluşan damar sayısı kıyaslandığında ise; kontrol grubu ve nikotin grubu karşılaştırıldığında nikotin grubunda anlamlı şekilde azaldığı ($p=0,013$), kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında botulinum toksin grubunda anlamlı şekilde arttığı ($p= 0,03$), kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında nikotin+ botulinum toksin grubunda anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p= 0,003$).

İmmunhistokimyasal değerlendirmede ise; CD 34 açısından kontrol grubu ve nikotin grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,084$). Kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında bu değer anlamlı şekilde arttığı ($p=0,001$), yine kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p=0,02$). Hif 1 alfa açısından kontrol grubu ve nikotin grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,09$). Kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında bu değer anlamlı şekilde arttığı ($p=0,003$), yine kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p=0,05$). VEGF antikoru ile yapılan immun boyamalar farklı sulandırma oranları ve farklı sürelerde tutulmasına rağmen başarılı olmadığından değerlendirme yapılamamıştır.

Sonuç olarak, bu deneysel çalışmada, perforatör flep yapılan sıçanlarda botulinum toksininin tek başına veya nikotin ile beraber uygulanmasının kontrol grubuna göre flep yaşayabilirliğine ve anjiogeneze olumlu etkilerini göstermiş olduğumuz için ileride ameliyat öncesi uygulanmasının faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: perforatör flep, botulinum toksin, nikotin, sağkalım

ABSTRACT

Skin flaps are commonly used to resurface tissue defects, and perforator flaps have an increasing popularity in this field. The flap's blood supply is critical for the success of the procedure and flap failure imposes additional cost, duration of treatment and morbidity. Many agents have been tested for their effects on flap sustainability but difficulties of their availability and accessibility are limited their clinical use. Smoking is the most preventable reason of surgical complications. Botulinum toxin injections are often used besides their aesthetic applications. In this study, effects of botulinum toxin and nicotine in perforator flap viability and angiogenesis are investigated.

In this study, 40 rats were used in four groups. In each subject, 6x6 cm in sized, skin flaps based on the right second cranial perforators of the superior deep epigastric arteries were raised and adapted back on their places. In the control group no further measures were undertaken. In the nicotine group, 2 mg/kg/day subcutaneous nicotine was injected for a month. In the botulinum toxin group, 1 IU intradermal toxin was injected for 8 points expect pedicle zone at preoperative 5- day. In the nicotine + botulinum toxin group nicotine and botlinum toxin were injected as described in group 2 and 3. In postoperative 7 days, flaps were photographed and the necrotic areas were measured and compared. Also tissue specimens were harvested for gene expression, histopathological and immunohistochemical analyses.

The ratio of necrotic areas were % 43.43 ± 18.79 , % 46.29 ± 23.36 , % 25.15 ± 6.23 , % 30.20 ± 5.31 or the control, nicotine, botulinum toxin and nicotine + botulinum toxin groups, respectively. While there is no significant difference between control and nicotine group ($p=0,089$), however, in botulinum toxin and nicotine+ botulinum toxin group flap, necrotic areas were significantly lesser than those of the control group ($p=0.001$, $p=0.041$).

In the gene expression analysis, the levels of Beta 2 Mikroglobulin, CD 34, Hif 1 alpha and VEGF A genes were compared between the groups. There is no significant difference between control and nicotine group ($p>0.05$). In the botulinum toxin group, there is no significant difference at the levels of Beta 2 Mikroglobulin and VEGF A in comparison to the control group ($p>0.05$), but CD 34 and Hif 1 alpha levels shown significant difference. ($p= 0.009$, $p=0.047$) In the nicotine + botulinum toxin group, there is no significant difference at the levels of Beta 2 Mikroglobulin and VEGF A in comparison to the control group ($p>0.05$), but CD 34 and Hif 1 alpha levels shown significant difference ($p=0.001$, $p=0.027$).

Histologically; the numbers of inflammatory cell, fibroblast, neoangiogenesis and collagen density were evaluated. There is no significant difference in terms of the

inflammatory cell numbers, fibroblast numbers and collagen density among the all groups ($p>0,05$). In comparison to the control group, nicotine group yielded significantly decreased neoangiogenesis ($p=0.013$) while botulinum toxin and nicotine + botulinum toxin groups, these values were significantly increased ($p=0.03$, $p=0.003$).

Immunohistochemically; levels of CD 34, Hif 1 alpha proteins were compared between the groups. There is no significant difference between control and nicotine group ($p=0.084$, $p=0.09$). In comparison to the control group, botulinum toxin group yielded significantly increased of CD 34, Hif 1 alpha proteins ($p=0.001$, $p=0.003$). In comparison to the control group, nicotine + botulinum toxin group yielded significantly increased of CD 34, Hif 1 alpha proteins ($p=0.02$, $p=0.05$).

In conclusion, our experimental study has shown that preoperative intradermal injection of botulinum toxin increases the perforator flap viability and angiogenesis when compared with control group. Also botulinum toxin injection can reverse harmful effects of nicotine when compared with controls. Our findings suggest that preoperative botulinum toxin injection can improve the surgical outcomes while using perforator flap.

Keywords: Perforator flap, botulinum toxin, nicotine, flap viability

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi dalının en önemli ve en zorlayıcı konusu doku defektlerinin rekonstrüksiyonudur (1). Başarılı bir rekonstrüksiyon; fonksiyonu restore etmenin yanı sıra donör saha morbiditesinin de en aza indirilmesini amaçlar. Tarihsel olarak değerlendirildiğinde doku kayıplarının rekonstrüksiyonu amacıyla yeni yöntemlerin, ihtiyaçlara cevap verecek şekilde geliştiği gözlenmiştir (2).

Daha basit defektlerin aksine kompleks doku kayıplarının onarımı için kendine ait vasküler desteğe sahip olan, birden fazla dokuyu içerebilen, fonksiyonel ve estetik yönden memnun edici sonuçları olan, defekt bölgesine komşu ya da uzak bölgelerden defekt bölgesine aktarılabilen flepler sıklıkla kullanılır (3).

Perforatör flep kavramı, ilk defa 1989 yılında Koshima ve Soeda tarafından ortaya konmuştur. Perforatör flep basitçe kendine ait izole perforatör damarlardan beslenen flep olarak tanımlanabilir. Perforatör flepler sahip olduğu avantajları ile günümüzde de giderek yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Perforatör flepler, flebin perfüzyonunu sağlayan artere göre isimlendirilir. Çoğunlukla fasyokutan flepler olmalarına rağmen kas, kemik ve sinir yapılarını da içerebilirler (4).

Perforatör flepler lokal olarak pediküllü kullanılabildiği gibi, mikrocerrahinin gelişmesiyle beraber uzak bölge rekonstrüksiyonunda serbest flep olarak da kullanılabilmektedirler. Yapılan anatomik çalışmalar sonucunda vücudumuzda çapları 0,5 mm'den büyük 374 adet perforatör damar tanımlanmıştır (5). Teorik olarak bu damarların hepsinden perforatör flep kaldırılması mümkündür.

Perforatör flep diseksiyonu öğrenme eğrisi gerektirmekle beraber bazen bizler için birtakım beklenmedik durumlar içerir. Perforatör fleplerde insanlardaki anatomik farklılıklar nedeniyle perforatörler farklı lokalizasyonda bulunabilir (4). Bazen de boyutları geniş hazırlanan fleplerde ya da perforatör çapının beklenenden daha ince olması gibi durumlarda flebin perforatör damar pedikülüne uzak kısımlarında kısmi ya da tam nekroz görülebilir (6).

Perforatör flep kayıpları hastanede kalma sürelerini ve maliyet yükünü artırmakla beraber hasta açısından daha fazla morbiditeye yol açabilecek komplike ameliyatlarında gerçekleşmesine neden olabilmektedir.

Perforatör flep kayıplarının başlıca nedenleri; pedikülün diseksiyon sırasında hasar görmesi veya pedikülün defekt sahasında torsiyone olması, perforatör çapının ince olması, perforatör sayısının az olması, vazospazm, flep boyutlarının geniş olması, vasküler trombüs

oluşması, venöz konjesyon, flep altında veya flep pedikülüne yakın bölgede hematoma ya da seroma oluşması ve enfeksiyon gelişmesi olarak sıralanabilir (6, 7, 8).

Günümüzde perforatör flep yaşayabilirliğini artırmaya yönelik deneysel olarak birçok çalışma yapılmış olup, botulinum toksininin tek başına ve ayrıca ağır sigara içicilerinde etkisini gösterecek çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada derin inferior epigastrik arter bazlı perforatör fleplerdeki nekrozları önlemek için, perforatör flep bölgesine cerrahi öncesinde intradermal olarak uygulanan botulinum toksininin flep canlılığına etkileri deneysel perforatör flep modelinde incelenmiştir. Ayrıca nikotin uygulanan sıçanlarda BTx uygulanmasının flep yaşayabilirliğine etkileri incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Plastik cerrahinin temel uğraşlarından olan "*flep*" vasküler desteği ile birlikte vücudun herhangi bir bölgesinden lokal veya uzak bölgelere taşınan dokuyu tanımlar. Köken olarak 16. yy'da Hollanda dilinde kullanılan, "geniş ve gevşek asılıp tek tarafından tutturulmuş" anlamına gelen "*flappe*" kelimesinden gelmektedir (9).

Joe McCarthy başarılı rekonstrüksiyonu "beraberinde şekil ve fonksiyonun restore edildiği güvenli defekt kapatılması ve donör saha deformitesinden kaçınılması" olarak tanımlamıştır (1). Flepler, defektin özelliklerine göre tasarlanır, damarsal beslenmesi korunarak deri, kas, kemik, yağ ya da fasya dokularından ihtiyaç durumuna göre birini veya birkaçını beraber içerebilir (10).

2.1. Flep cerrahisinin tarihi

Tarihte ilk defa antik Hindistan'da burun rekonstrüksiyonunda kullanılan cilt flebi ilk flep olarak Sushruta yazıtlarında geçmektedir (2,11). Flep cerrahisinde tarihsel olarak ikinci en önemli kilometre çalışmalardan biri Tagliacozzi'nin çalışmasıdır. Ancak kilise tarafından tanrının işine karışılması olarak değerlendirilip yasaklanmıştır (11).

19. yüzyılda modern tıbbın başlangıcıyla anestezi tekniklerinin gelişmesiyle cerrahi gelişim hız kazandı. 1869 yılında kısmi kalınlıkta deri greftleme ile ilgili makale yayınlandı ve dikkatleri üzerine çekti (12).

1889 yılında Manhot'un vasküler yapıların yerini gösteren makalesi ile flep sağkalımının anlaşılmasına olanak sağladı. Daha sonraki yıllarda Salmon daha sofistike bir çalışma ile damarları gösterdi. 1. Dünya savaşı sırasında cerrahlar flep cerrahisine birçok katkıda bulundular. Yapılan flepler çoğunlukla alt ekstremité yaralanmalarının sıklığına bağlı olarak alt ekstremité rekonstrüksiyonu için kullanılan çapraz bacak ya da tüp fleplerdi (12).

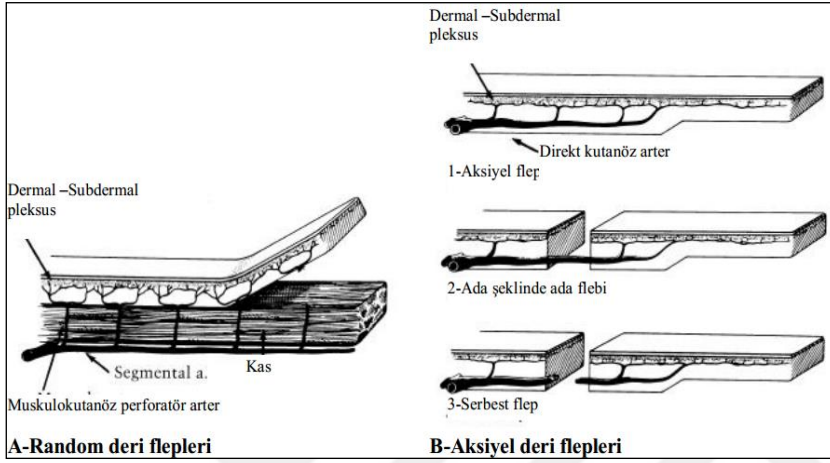
1979 yılında modern plastik cerrahi gelişimi açısından en önemli makalelerden biri olan bir dermofat flebin serbest olarak mikroskop kullanılmaksızın transfer edilmesi anlatılmıştı (13). Sonrasında mikroskopun kullanılmaya başlanması ile plastik cerrahide yenilikçi kapıların açılmasını sağlamıştır (14).

2.2. Fleplerin sınıflandırılması

Flep kendine ait vasküler anatomisi üzerinde mobilize edilen doku veya dokulardan oluşur. Flepler deri, fasya, kas ve kemikten ya da bu yapıların kombinasyonlarından

oluşabilir. Mobilize edilen dokunun perfüzyonu önemli olduğu için flep tekniklerinin gelişimi vasküler anatominin tanımlanmasına bağlıdır (11).

Flep sınıflaması, çok çeşitli şekillerde yapılabilmektedir. En klasik sınıflama Daniel ve Kerrigan tarafından yapılmış olup flepleri; hareket yeteneğine, perfüzyon durumuna ve içerdiği yapılara göre sınıflandırmışlardır (7) (Şekil 2.1- Şekil 2.2).



Şekil 2. 1. Kanlanmasına göre deri flepleri; Random ve Aksiyel flepler (15)

Daniel ve Kerrigan'ın sınıflaması bugün genel hatlarıyla kabul görmeye devam etmektedir. Ancak perforatör fleplerdeki gelişmelerle birlikte sınıflandırmalara perforatör flepler de dahil edilmektedir (11).

2.3. Deri fleplerinin kanlanmasında fizyopatogenez

Bilinen bir vasküler pedikülü olan aksiyel paternli fleplerin kullanıma girmesi ile derinin intrinsik kan akımının, flep sağkalımında çok önemli olduğu görülmüştür. Kerrigan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sonucunda fleplerde distalde kan akımının ilk 6-12 saat içinde %20 azaldığı, normale dönüşün 3-4 hafta sonra olduğu gözlenmiştir (7).

Flebin yaşayabilmesi için yeterli perfüzyon sağlanmalı ve iskeminin etkileri en aza indirilmelidir (7,10).

Daniel ve Kerrigan'a göre deri kan akımı sistemik ve lokal faktörlerin, makroskobik düzeyde arter-ven, mikroskobik düzeyde ise arteriol-kapiller-venül ve arteriovenöz anastomozlara yaptığı etkilerle düzenlenmektedir (7).

Deri fleplerinin sınıflaması

Transfer tekniğine göre flepler:

- Lokal flepler
- İlerletme flepleri
- Rotasyon ve transpozisyon flepleri
- İnterpolasyon flepleri
- Pediküllü flepler
- Subkutanöz flepler
- Uzak flepler
- Direkt flepler (ör: Kasık flebi)
- Tüp flepler
- Mikrovasküler flepler (ör: Serbest flepler)

Beslenme tipine göre flepler:

- Muskulokutanöz arterden beslenen flepler
- Random kutanöz flepler
- Myokutanöz flepler
- Septokutanöz flepler
- Fasyokutanöz flepler
- Aksiyel arteriyel flepler

Flepte bir araya gelen dokulara göre flepler:

- Kutanöz flepler
- Fasyokutanöz flepler
- Myokutanöz flepler
- Kas flebi ±deri greftleri
- Osteokutanöz flepler
- Sensoriyel flepler

Şekil 2.2. Deri fleplerinin sınıflaması (7)

Deri kan akımını etkileyen sistemik faktörler; sempatik adrenerjik sinirler (vazokonstrüktör), Tromboksan_{A2} (vazokonstrüktör), Serotonin (vazokonstrüktör), Prostaglandin F_{2a} (vazokonstrüktör), Prostaglandin E₁ (vazodilatasyon), Prostaglandin I₂ (prostosiklin) (vazodilatasyon), Bradikinin (vazodilatatör), Histamin (vazodilatatör), Lökotrien C₄ ve D₄ (vazodilatasyon) gibi nöromediatörler ve anemi (hemodilüsyonla kan akımı artışı) gibi durumlardır (7).

Deri kan akımını etkileyen lokal metabolik faktörler; hiperkapni (vazodilatatör), hipoksi (vazodilatatör), asidoz (vazodilatatör) ve hiperkalemi (vazodilatatör) dir (7,10).

Deri kan akımını etkileyen lokal fiziksel faktörler; lokal hipertermi (vazodilatasyon), lokal hipotermi (vazokonstrüktör), miyojenik refleks (vazokonstrüksiyon) dir (7,10).

Deri flepleri 6 saat süreye kadar iskemiye dayanıklıdırlar, 6-12 saat arası iskemilerde flepte geridönüşlü hemodinamik ve hücreyel olaylar gözlenir, 12 saati aşan iskemi sonunda geridönüşsüz hasarlanma oluşur (10).

İskemik dokuda hızlı bir şekilde karbondioksit (CO₂) ve laktik asit seviyeleri artarken; oksijen (O₂), glukoz ve ATP (adenozin trifosfat) seviyelerinin düşmesiyle birlikte anaerobik

metabolizmaya dönüş gerçekleşmektedir. Glukoz ve glikojen tüketimi iskeminin derecesiyle orantılı olarak artar; glukoz tüketimi 3 günde pik yapar ve 7. günde normale döner (10).

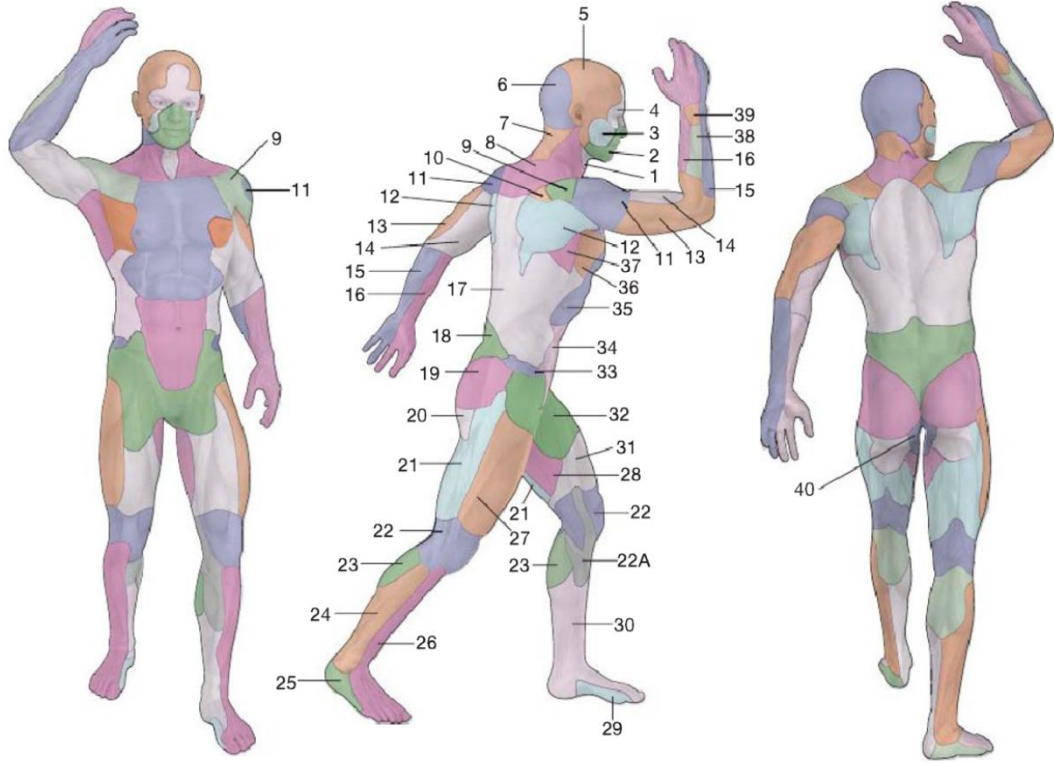
İskemik periyod sonrasında reperfüzyon sırasında O₂ yeniden dokuya ulaştığında iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri üretilir. Bu radikaller inflamasyon, endotelial hasar, lökositlerin adezyonu ve lökositlerin birikimini gibi etkilerle, hücrel hasara neden olurlar (10).

2.4. Perforatör Flepler

Perforatör, delmek manasına gelen latince "*perforate*" den gelmektedir. Perforatör flep kendine ait bir veya daha fazla sayıda damar tarafından perfüze edilen deri ve subkütanöz dokudan oluşan flep olarak tanımlanır (16). Yapılan anatomik çalışmalarda vücudumuzda çapları 0,5 mm den büyük 374 adet perforatör damar olduğu gösterilmiştir (5) (**Şekil 2. 3**).

1989 yılında Koshima ve Soeda, derin inferior epigastrik damarların paraumblikal perforatörleri ile beslenen oldukça ince paraumblikal flep için "*Perforatör flep*" tanımlamasını yapmışlardır (17).

Hallock, perforatör damarı kaynağına bakmaksızın derin fasyadan fenestrasyonla geçerek süperfisyal plana giren herhangi bir damar olarak tanımlamıştır (18). Taylor, üsteki subkutan dokuyu ve deriyi beslemek için derin fasyanın dış tabakasını delen herhangi bir damarı perforatör olarak tanımlamıştır (5). Wei ise perforatör damarı, kası delip geçen ve ayrıca üsteki deriyi beslemek için derin fasyayı delen herhangi bir kütanöz damar olarak tanımlamıştır (19).



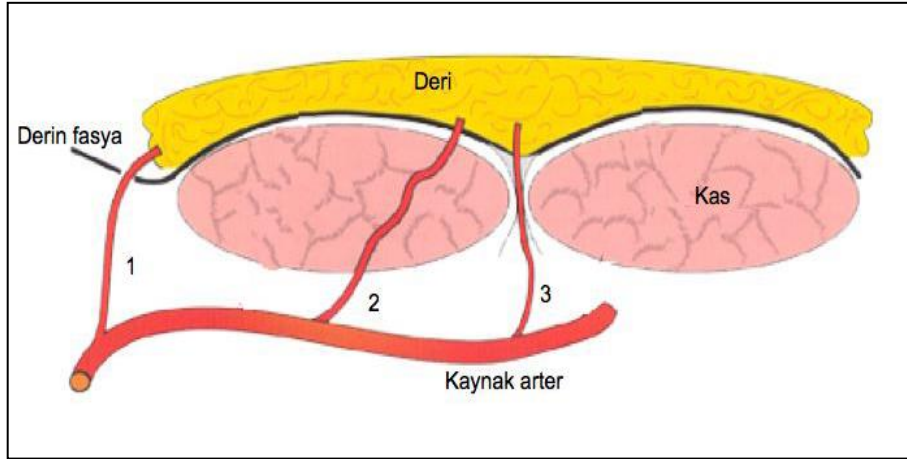
Şekil 2. 3. İnsan vücudundaki anjiozomlar (5)

2002 yılında ki toplantı da "*perforatör flep, cilt ve subkutan yağ dokusunu içerir*" olarak tanımlanmıştır. Ayrıca aşağıdaki üç farklı tip perforatör damar tanımlı yapıldı:

1. Direkt perforatörler, sadece derin fasyayı penetre ederek cilte ulaşırlar (ör: Kasık flebi)

2. İndirekt kas perforatörleri (perimisyal perforatörleri de içerir) kas içerisinde ilerledikten sonra derin fasyayı penetre ederek cilde ulaşırlar (ör: Derin Inferior Epigastrik Arter Perforatör flebi).

3. İndirekt septal perforatörler, intermusküler septumdan ilerledikten sonra derin fasyayı penetre ederek cilte ulaşırlar (ör. Anterolateral uyluk flebi). (16,19) (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. Perforatör flep tanımlamaları. 1- Direkt perforatör 2- Kasta geçen indirekt perforatör 3- İntermuskuler septumdan geçen indirekt perforatör (20).

Perforatör fleplerin günümüzde en yalın isimlendirme şekli; flebi besleyen kaynak artere göre yapılanıdır. Örneğin; Derin İnférieur Epigastrik Arter Perforatör (DİEAP) flebi gibi (4).

Eğer bir damardan multipl perforatör flep kaldırılabilirse her bir flebin adı anatomik bölgeye veya içerdiği kasa göre olacaktır. Bunun tipik örneği lateral circumflex femoral arterden beslenen tensor fasya lata perforatör flebi ve anterolateral uyluk flebidir (19).

Perforatör flepler günümüzde meme rekonstrüksiyonu, gövde-kol-bacak yumuşak doku defektleri rekonstrüksiyonu, baş-boyun rekonstrüksiyonu gibi hemen hemen tüm alanlarda kullanılmaktadırlar.

Perforatör flepler kaldırılırken cilt-cilt altı insizyonundan sonra flebin perforatör damarı korunarak nazik mikrocerrahi tekniklerle perforatör damar kaynak artere doğru veni ile birlikte diseksiyon edilir. Perforatörün diseksiyonu sırasında perforatörün çıkış yerine göre kas içi veya septal mesafe geçilir. Böylece flebin damar pedikülü mümkün olduğunca uzatılarak 10-12 cm uzunlukta pedikül elde edilebilir (19,21,22). Daha sonra pedikül üzerinden defektif alana doku nakledilir. Eğer istenirse perforatör flepler serbest flep olarak da kullanılabilirler (19).

Perforatör fleplerin en önemli avantajı verici alan morbiditesinin düşük olması, işlevsel ve estetik olarak başarılı sonuçların olması, ameliyat sonrası dönemde iyileşme zamanının kısa olması olarak sıralanabilir. Eğer onarım için sadece deri gerekli ise kas, fasya ve sinirler korunabilir (19,4).

Perforatör fleplerin önemli dezavantajları arasında çok titiz diseksiyonlarının gerekliliği bulunmaktadır ve indirek muskükütan perforatörlerin diseksiyonu indirek

septokütan perforatör disseksiyonuna göre daha zordur (21,23). Perforatör disseksiyonu ameliyat zamanını uzatmaktadır (4). Ayrıca perforatör damarların pozisyon ve boyutundaki değişiklikler nedeniyle tekniğin zorlaşması da dezavantaj olarak sayılabilir.

Perforatör fleplerde, perforatörlerin ince ve nazik yapıları nedeniyle disseksiyon sırasında travmatize olmaya eğilim artmakta ve çevresindeki yumuşak doku desteğini kaybeden perforatörlerde bükülme ve dirsekleşme oluşabilmekte, bu durum trombus ve vazospazm gibi komplikasyonların gelişme eğilimini artırmaktadır (8, 4, 24).

Perforatör fleplerde muskulokutan fleplere göre daha fazla yağ nekrozu riski vardır (25). İdeal perforatör flebin güvenilir kan desteği olmalıdır, 0,5 mm'den daha geniş bir veya daha fazla sayıda perforatör olmalıdır, flep kaldırıldıktan sonra donör alan primer kapatılabilir ve pediküller yeterli uzunlukta olmalıdır (4).

Operasyondan önce perforatör damarların yerlerinin tespiti için doppler ultrasonografi, renkli duplex ultrasonografi, multidedektör spiral bilgisayar tomografi (BT), magnetik rezonans angiografi kullanılabilir (21, 26). Doppler ultrasonografi pratik bir uygulamadır, cerrahi disseksiyonu kolaylaştırır, ancak spesifikliği düşüktür (21, 27, 28, 29). Magnetik rezonans angiografi ayrıntılı bilgi verir, aynı zamanda multidedektör spiral BT nin taşıdığı radyasyon ve kontrast madde risklerini taşımaz (21).

2.5. Flep yaşayabilirliğini artırmak için yapılan deneysel araştırmalar

Deri flep yaşayabilirliğini artırmaya yönelik şimdiye kadar yapılan başlıca deneysel uygulamalar; geciktirme işlemi, serbest flep cerrahisinde ekstra arter ve ven anastomozları, fiziksel uygulamalar, antikoagülanların, antiadrenerjik ilaçların ve sempatik reseptör blokörlerin, direkt düz kaslara etki ederek damar genişleten ilaçların, kanın reolojik özelliğini değiştiren ajanların, iskemiye toleransı artıran ajanların kullanıldığı çalışmalardır (7).

2.5.1. Geciktirme (Delay) Fenomeni

Geciktirme işlemi özellikle vasküler sistemi etkileyen ek hastalığı olan hastalarda distal flep canlılığını artırmak için uygulanan güvenilir bir yöntemdir. Geleneksel geciktirme işlemi planlanan cerrahi öncesinde flebin her iki kenarının insizyonunu ve distal kısmının yatağından ayrılmasını takiben uygun bir bekleme dönemi sonrası transferini kapsar. Geciktirme işleminde, fleplerin uzun aksı boyunca küçük damarlarda uzunlamasına yeniden yapılanmalar, damar boyutlarında artış ve subdermal pleksuslardaki küçük damarlarda sayıca artış tespit edilmiştir (10, 30, 31).

Dhar ve Taylor, geciktirme işlemiyle flepte oluşan ilk olayın yeni damar gelişimi değil, mevcut damarlarda genişleme olduğunu iddia etmişlerdir. Operasyon sonrası 3 saat içinde vazokonstriksiyonun geçtiğini ve 48-72 saatte fizyolojik kapalı damarlarda (choke) progresif olarak genişleme yaşandığını belirtmişlerdir ve bu genişlemenin sürekli ve geri dönüşümsüz olarak oluştuğunu iddia etmişlerdir (32, 33, 34).

Coşkunfırat ve arkadaşları, deneysel olarak delay fenomeni ile perforatör flep sağkalımını arttığını tespit etmiştir (35).

Rees, distal flep nekrozuyla ilgili yaptıkları çalışmalarda fleplerde nötrofil ve ürünlerinin birikiminin geciktirme işlemi ve iskemi periyotlarıyla azaltıldığını, dolayısıyla distal flep canlılığında artış sağladığını bildirmiştir (36).

Hooper ve arkadaşları, protein kinaz aktivasyonunun iskemik koşullandırma kavramını taklit ettiğini bulmuştur (farmakolojik delay) (37). Diğer potansiyel farmakolojik geciktirme metodu ise bu işlemin geç fazını taklit eden ve sentetik bir bileşik olan Monofosforil Lipid-A'dır (38).

2.5.2. Mikrocerrahi yöntemlerle ekstra arter ve ven anastomozları

Erkan, epigastrik perforatör flep modelinde ekstra venöz süperdrenej ve arteryel süperşarj işlemlerinin perforatör flep canlılığını artırdığını tespit etmiştir (9). Hallock ve arkadaşları, epigastrik perforatör flep modelinde ilave venöz süperşarj işleminin flep canlılığını artırdığını tespit etmişlerdir (39).

2.5.3. Fiziksel uygulamalar

Sasaki, fleplerin kenarların nemli tutulmasını önermiştir (40). Hipotermimin vazokonstriksiyona, kan vizkozitesinde artışa ve vazospazm süresinde uzamaya neden olarak deri kan akımını azalttığını, flebin ısınmasının ise tam tersine olumlu etkiler yaptığını tespit etmiştir (41, 42).

Liu ve arkadaşları ile intraoperatif hafif hipotermimin serbest flep cerrahisi vakalarında tromboz riskini azalttığını göstermişlerdir (43).

Koenig ve arkadaşları, ısı şokunun deney hayvanlarında flep canlılığını artırdığını iddia etmişlerdir (44).

Özyazgan ve arkadaşları transkutanöz elektiriksel sinir uyarısının (TENS) random patern fleplerde sağkalımı arttırdığını göstermişlerdir (45).

2.5.4. Antikoagülanlar

Rothkopf ve arkadaşları, kan vizkozitesini azaltan, trombosit agregasyonunu ve adezyonunu inhibe eden, kanama zamanını uzatarak prokoagülan aktiviteye sahip olan Dextran'ın etkilerini vurgulamışlardır (46). Fleplerde venöz yetmezlik, venöz kanalların olmadığı veya anastomoz için uygun olmadığı venöz konjesyon durumlarında sülükler (*Hiruda medicinalis*) flep canlılığının artırılması için kullanılmaktadır. Sülüklerde bulunan Hirüdin, heparinin aksine aktive olabilmek için Antitrombin-3 e ihtiyaç duymaz (47).

2.5.5. Antiadrenerjik ilaçlar ve Sempatik Reseptör blokörleri

Antiadrenerjik etkili Guanetidin'in (48) flep canlılığını artırdığı gösterilmişken, Rezerpin'in flep canlılığını artırmadığı gösterilmiştir (49).

Cordeiro ve arkadaşları, Fenilepinefrin ve Dopamin'in flep canlılığına etki etmediğini, Dobutamin ile hem flep kan akımı hem de kardiyak outputta artış olduğunu açıklamışlardır (50).

Suárez Nieto ve Garcia yaptıkları çalışmalarda; Terbutalin (β_2 adrenerjik reseptör agonisti), Naftidrofuryl (arteriyal vazodilatör), Trimetazidin kadar Fenoksibenzamin'in flep yaşayabilirliğini artırdığını tespit etmişlerdir (51).

Cordeiro ve arkadaşları, L-Arginin'in flep yaşayabilirliğini artırdığını bildirmişlerdir (52).

Goshen ve arkadaşları, Fenoksibenzamin ve Fentolamin'le tedavi edilen dorsal sıçan deri fleplerinde yaşayabilirliğin arttığını göstermişlerdir (53). α -1 ve α -2 adrenerjik reseptör blokörü olan Fentolamin adrenalinin periferik etkilerini geri çevirerek flep yaşamına katkı sağlar (54).

Angel ise direk vazodilatör etkisi olan antipsikotik etkisi olan Klorpromazin'in flep canlılığında yararlı etkileri olduğunu bulmuştur (55).

Seçici olmayan β -adrenerjik bloker olan Propranolol'un araştırıldığı sıçan çalışmalarında veriler çelişkili olarak bulunmuş, domuz çalışmalarında yararlı etkileri görülmemiştir (7).

2.5.6. Direkt düz kaslara etki ederek damar genişleten ilaçlar

Hydralazin'in intrasellüler siklik adenzin monofosfat (c-AMP), konsantrasyonlarını artırılarak arteriyal düz kaslarda relaksasyona neden olduğu böylece flep canlılığını önemli ölçüde artırdığını tespit etmişlerdir (56, 51).

Nitrogliserin asıl olarak venodilatasyona neden olan ilaçtır. Nitrogliserin'in transdermal uygulanmasıyla aksiyel fleplerdeki flep canlılığında artış görülmüşken, random bazlı fleplerin canlılığına etkili olmadığı görülmüştür (57,58).

Birçok çalışmada Nifedipin (59,60), Verapamil (61) gibi damar düz kaslarında vazodilatasyona neden olan kalsiyum kanal blokörleri ile tedavi edilen sıçanlarda, flep canlılığının arttığı gösterilmiştir.

Ibuprofen'in, araşidonik asit metabolizmasındaki siklooksijenazı inhibe ederek sıçan flep yaşayabilirliğini artırdığı tespit edilmiştir (7).

Heden, Kalsitonin geniyle ilişkili peptidin arteriyel dilatasyon yaptığını ve deri flebi yaşayabilirliğini artırdığını tarif etmiştir (62).

Saetzler ve arkadaşları, periferel vasküler hastalıklarda kullanılan Buflomedil'in iskemi-reperfüzyon hasarına maruz kalan flepleri koruduğunu keşfetmişlerdir (63).

Fosfodiesteraz 5 inhibisyonunda vasodilatasyon ve anjiogenezi arttırarak flep sağkalımı artırdığı gösterilmiştir (64).

2.5.7. Kanın reolojik özelliğini değiştiren ajanlar

Fluosol (kanın oksijen taşıma kapasitesini artırır) uygulaması sonrası flep canlılığının artmadığı bildirilmiştir (65).

Pentoksifilin eritrositlerin deforme olma özelliğini artırarak kan akım özelliğini düzelten bir hemorajik ajandır. Pentoksifilin'in flep canlılığını artırdığı görülmüştür (66).

Tuncer ve arkadaşları, sistemik olarak verilen eritrositlerin damar endoteline yapışmasını azaltan, eritrositlerin deforme olma özelliğini artıran Piracetamin sıçan epigastirik perforator fleplerde sağ kalımı artırdığını göstermişlerdir (67).

2.5.8. İskemiye toleransı artıran ajanlar

Angel ve arkadaşları, Allopurinol'un flep canlılığını artırdığını bildirmişlerdir (68).

Kuru ve arkadaşları, ameliyat sonrası steroid kullanımının flep canlılığını artırdığını belirtmişlerdir (69). Schmidt ve arkadaşları, Metil prednisolonun ödemi azalttığını bildirmişlerdir (70). Nakatsuka ve arkadaşları, Metil prednisolon'un deri kan akımını artırarak myokutanöz flep canlılığını artırdığını bildirmişlerdir (71).

Deferoxamin'i; serbest radikalleri bağlaması nedeniyle flep nekrozunu azalttığı tespit edilmiştir (72,73).

Anisodamin ve Mannitol (74), Fosfokreatin'in (75), CoenzimQ (76) fleplerde iskemiye toleransı artırdığı tespit edilmiştir.

2.6. Sigara Kullanımının Flep Üzerine olan Etkileri

Tütün kullanımının vücutta yarattığı etkiler iyi bilinmektedir. Sigara içilmesi veya tütün çiğnenmesi aterosklerotik periferik damar hastalıkları ve tromboanjitis obliterans (Buerger hastalığı) ile yakın ilişkilidir (78, 79). Tütün kullanımı yara iyileşmesini geciktirir ve flepler üzerinde olumsuz etkiler oluşturur (80, 81).

Sigara dumanında hem gaz hem de sıvı halde bileşikler mevcuttur. Gaz fazı sigara dumanı ağırlığının %95'ini oluşturur. Sigara dumanının gaz fazı başta azot (N), karbonmonoksit (CO), karbondioksit (CO₂), amonyak (NH₃), hidrojen siyanür (HCN) ve benzen olmak üzere 500 civarında toksik gaz içermektedir (82). Sigara içilmesinin flep yaşayabilirliğine olan olumsuz etkilerini CO, hidrojen siyanür ve nikotin nedeniyle oluşur (83). CO, hemoglobine geri dönüşsüz olarak bağlanarak karboksihemoglobin oluşturur ve dokulara oksijen bırakamayan karboksihemoglobin, hipoksiye neden olur, diğer taraftan hidrojen siyanür oksijen transport sistemini bloke eder ve yine dolaylı yoldan hipoksiye yol açar. Nikotin ise periferik vasküler yapılar üzerinde vazokonstrüksiyona neden olarak doku dolaşımını bozar (83,84).

Bir sigara ortalama 0.5-2 mg nikotin içerir. Buna karşın, sigara içildiğinde çok düşük dozda nikotin alınır. Tek bir adet sigara içilmesi sonrası kanda nikotin seviyesi arterlerde yaklaşık 100 ng/ml ve beyinde 40 ng/ml düzeyine erişir (85). Nikotin farmakokinetiğini inceleyen çalışmalar, nikotinin pik plazma seviyesinin 30-50 ng/ml olduğunu göstermiştir (86,87). Plazmada bulunan nikotinin yarılanma ömrü yaklaşık olarak 2,2 saat olarak ölçülmüştür. Gerek yarılanma ömrü, gerek ise plazmada nikotin seviyesi, sigarayı inhale etme derinliği ve sıklığına göre çok değişen miktarlarda olabilmektedir (87). Tütün çiğneyen insanlarda ise plazmada ölçülen ortalama pik değerinin 22 -30 ng/ml olduğu saptanmıştır (88).

Yapılan çalışmalarda sigara içiciliğine bağlı oluşan kardiyovasküler patolojilerin nikotin nedeniyle oluştuğu anlaşılmıştır (89-91). Kronik nikotin uygulamasının hemodinamik parametreler ve vasküler sistem üzerinde olan olumsuz etkilerinin nikotinin direkt olarak damarsal yapıların duvarında yaptığı hasar nedeniyle oluştuğu anlaşılmıştır (92-94). Deneysel hayvan modellerinde kronik nikotin uygulanması; sigara içilmesi ile ciltte oluşan dolaşımsal etkileri bire bir taklit etmektedir (95). Nikotinin flep viyabilitesini azaltması; doku

hemodinamisini bozması ve yapımına öncü olduğu serbest oksijen radikallerinin etkileriyle dokuda yıkımı arttırması nedeniyle oluşmaktadır. Günümüzde yapılan deneysel çalışmalarda kronik nikotin uygulamasının hemodinamik parametreler ve vasküler sistem üzerindeki olumsuz etkileri kanıtlanmıştır (92-94). Nikotinin bu etkileri ise vazoaaktif nörohumeral maddelerin salınımı ve sentezini etkileyerek vazospazma neden olması, endotel üzerinde direkt hasar oluşturması ve trombosit agregasyonunu hızlandırması, inflamatuvar süreç tetikleme, iskemi reperfüzyon hasarına yol açması, oksidan stres oluşturması nedeniyledir (96-98). Aşağıda nikotinin bu etkileri incelenmiştir.

2.6.1. Nikotin ve Kan Basıncı

Nikotine bağlı olarak, kan basıncı 10 dakikada 110/70mmHg'dan 300/103 mmHg'ya ve kalp atımı dakikada 70'den 110'a yükselir (99). Sigara içmek tek başına kronik hipertansiyon için bir risk faktörü olmamakla birlikte nikotin, sempatik nöral aktiviteyi doğrudan artırarak veya dolaylı olarak da selektif norepinefrin (NE) bağımlı arteriyol kontraksiyonunu potansiyalize ederek, vazodilatatör prostaglandin (PGI₂) sentezini baskılayarak, kronik hipertansiyon gelişimine veya sürecin hızlanmasına katkıda bulunur (100).

2.6.2. Nikotin ve Endotelyal Disfonksiyon

Endotel hücreleri vasküler homeostazın ve doku perfüzyonunun sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Endotel hücrelerinin pıhtılaşma üzerine olan etkileri yanında damar tonüsünü ve bölgesel gereksinimlere göre kan akımını ayarlama, kandan sıvı, hücre ve yaşamsal maddelerin dokulara geçişini düzenleme gibi görevleri vardır.

Endotel hücreleri iskemi reperfüzyon hasarında da önemli bir role sahiptir (101). Nitrik oksit (NO), kan akımının ve vasküler tonusun sürekliliğini sağlayan ve endotelyal nitrik oksit sentaz enzimi (eNOS) tarafından sentezlenen vazoaaktif bir maddedir. NO vazodilatatör özelliği haricinde, düz kas hücresi fenotipini, trombosit ve lökosit adezyonunu da kontrol eder. NO hem lümeninde, hem de damar düz kas hücrelerinde etki gösterir. NO'nun aterogenezi engelleyici rolü bulunmaktadır. Bunu trombosit adezyon ve agregasyonunu ve lökosit adezyonunu engelleyerek ayrıca düz kas hücresi çoğalmasını ve göçünü önleyerek gerçekleştirir (101).

Nikotin, endotel fonksiyonunu endotel bağımlı vazodilatasyona zarar vererek bozmaktadır. Nikotine maruz kalan damarlarda NO biyosentezi azalmıştır (102). Nikotin ayrıca endotelde süperoksit artışını, NO yıkımındaki artışı, vazokonstrüktör olan

prostanoidlerin ve endotelin 1 ve 2 gibi endotel reseptörlerindeki artışı, prostosiklinin azalmasına öncül olarak endotelyal disfonksiyona neden olur (103).

İnsanlarda yapılan bir çalışmada (104), akut nikotin uygulamasının el dorsalinde bulunan venlerde sigara içimi nedeniyle oluşan endotelyal disfonksiyonu taklit ettiği gösterilmiştir. Sigara içen insanların kanında ölçülen dozda transdermal yolla veya lokal olarak verilen nikotinin insan el sırtı venlerinde endotel bağımlı vazodilatasyonu engellediği saptanmıştır.

Endotelyal disfonksiyon endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulma, vazospazm, trombüs oluşmasının engellenememesi olarak tanımlanabilir. Endotelyal disfonksiyon sonucu ateroskleroz gelişimi ve arterioler düzeyinde kan akımına karşı direnç gelişmesi ile doku perfüzyonu bozulur (105).

2.6.3. Nikotin ve Tromboz

Nikotin, trombosit reaktivitesini artıran norepinefrin salınımını uyararak trombositleri etkiler. Sigara içenlerde, pıhtılaşma içmeyenlere kıyasla daha hızlıdır. Yapılan çalışmalar, sigara içenlerin trombositlerinin içmeyenlerinkine göre daha reaktif ve daha kısa ömürlü olduğunu göstermiştir (106). Araşidonik asit (AA) metabolizmasının esas ürünlerinden biri olan Tromboksan A₂'nin (TXA₂), trombositler üzerinde potent bir proagregatör aktivitesi vardır. Nikotin, anti-agregatör ve vazodilatör PGI₂ ve pro-agregatör TXA₂ arasındaki dengeyi TXA₂ lehine bozar (106,107). Nikotin ve sigaranın diğer aktif bileşenleri dokularda hipoksi yaratır ve hipoksiye yanıt olarak artan eritropoetin (EPO), eritrosit üretimini arttırarak hematokriti arttırır (108). Artan kan viskozitesi de tromboza meyil oluşturur. Nikotin tüm bu etkileri ile mikrovasküler trombüslere neden olarak doku perfüzyonunu bozabilir.

2.6.4. Nikotin ve Kan Lipidleri

Nikotin, katekolaminlerin salıverilmesi yoluyla lipolizi arttırır ve karaciğer tarafından tutulan serbest yağ asitleri dolaşıma salınır. Bunun sonucu olarak VLDL (çok düşük dansiteli lipoprotein) ve LDL (düşük dansiteli lipoprotein) sentezi artar. HDLnin (yüksek dansiteli lipoprotein) hem sentezini azaltarak hem de klirensini arttırarak kandaki miktarını azaltır. VLDL, LDL'deki artış ve HDL kolesteroldeki azalışla birlikte lipit dağılımındaki değişiklikler, nikotinin aterosklerozu indüklediği önemli mekanizmalardır. İnsanlarda yapılan çalışmalar da hayvan çalışmalarını desteklemektedir (109,110).

2.6.5. Nikotin ve İnflamasyon

Nikotin, vasküler inflamatuvar proçesi tetikler. İnflamasyon, NO sentezini ve siklooksijenazı (COX) kapsayan genlerin aktivasyonunu içeren karmaşık bir mekanizmadır. COX aktivasyonu ile pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımı artar. Serum, Lökotrien B4 konsantrasyonları içicilerde içmeyenlere göre daha yüksektir ve sigara içimi akut olarak kan LTE4, LTC4, LTD4, LTB4 seviyelerini artırır. Nikotinin, Araşidonik asit (AA) metabolizması üzerindeki etkileri ile PGI2 sentezini ve AA'nin PGI2'ye dönüşümünü inhibe ettiği bulunmuştur. Sigara bağımlılarında TXA2'nin idrarda atılımı artar (107, 111).

Nikotin inflamatuvar kaskadı aktive eder, oksijen radikalleri miktarını artırır ve bu etkileri beraberce yapısal proteinlerde, lipitlerde ve DNA'da hasara yol açar ve bunların sonucu olarak apoptoz tetiklenir. Nikotinin vazokonstriktör etkileri ile oluşan iskemi sonrası dokularda mitokondriyal geçirgenliğin de artması ile programlı hücre ölümü gerçekleşir (112).

2.6.6. Nikotin ve Serbest Oksijen Radikalleri

Sigaranın gaz ve katran fazı büyük oranda reaktif serbest radikaller ve radikal oluşturan bileşikler içermektedir. Nikotin bunlar arasında en potent olanıdır. Nikotinin kana geçmesi ile oluşan serbest radikallerin antioksidan savunma sistemlerini baskılayarak protein ve lipit gibi makromoleküllerde hasara, trombosit hiperaktivitesini artırarak doku hasarına neden olurlar.

Nikotinin neden olduğu serbest radikal oluşum mekanizmasının tam aydınlatılmamasına karşın yapılan çalışmalar nikotinin mitokondriyal solunum zincirini etkileyerek süperoksit anyonlarının ve hidrojen peroksit radikalinin oluşumunu artırdığını, iskemi reperfüzyon hasarına yol açtığını, lipit peroksidasyon ürünlerinde artışa neden olurken, serbest radikal süpürücü enzim aktivitelerinde azalmaya yol açtığını göstermektedir (113, 114-116).

2.6.7. Nikotinin Etkilerinin Klinik Yansıması

Nikotinin araşidonik asit metabolizmasını etkileyerek ve katekolamin düzeylerini artırarak, kan lipid profilini değiştirerek, lökosit ve trombositlerin aktive olmalarını sağlayarak, endotel disfonksiyonuna neden olarak mikro ve makroanjiopatilerin gelişmesine neden olur (106, 117, 118). Yapılan klinik çalışmalar sonucu yapılan cilt fleplerinin ortalama % 11'i, replantasyonların ise % 21'inin nekroza gittiği ve iskemi reperfüzyon hasarının ve

mikroanjiopatilerin doku nekrozunun en önemli nedenleri olduğu saptanmıştır (119,120). Nikotinin ayrıca katekolaminler ve diğer vazoaaktif mediatörler üzerinden vazokonstüksiyon yaparak cilt kan akımını % 30-40 kadar azalttığı gösterilmiştir (80). Nikotin yukarıda açıkladığımız mekanizmalarla doku nekrozunun gelişmesi için her türlü şartı yerine getirebilmektedir (121).

Nikotinin flepler üzerinde olan etkileri doz ve zaman bağımlı olarak ortaya çıkar (84). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda 2 mg/kg ve daha yüksek dozlarda verilen subkutan nikotin uygulamasının 4. hafta sonunda kaldırılan fleplerde, flep beslenebilirliğini azalttığı saptanmıştır (84, 122). Nikotine bağlı endotelyal değişimler en erken 4. haftada ortaya çıkmaktadır (95). 7 gün boyunca uygulandığında ise özellikle karaciğer, böbrekte ve genel olarak tüm dokularda anti-oksidan sistemin sekteye uğradığı tespit edilmiştir (121).

2.7. Botulinum Toksin A

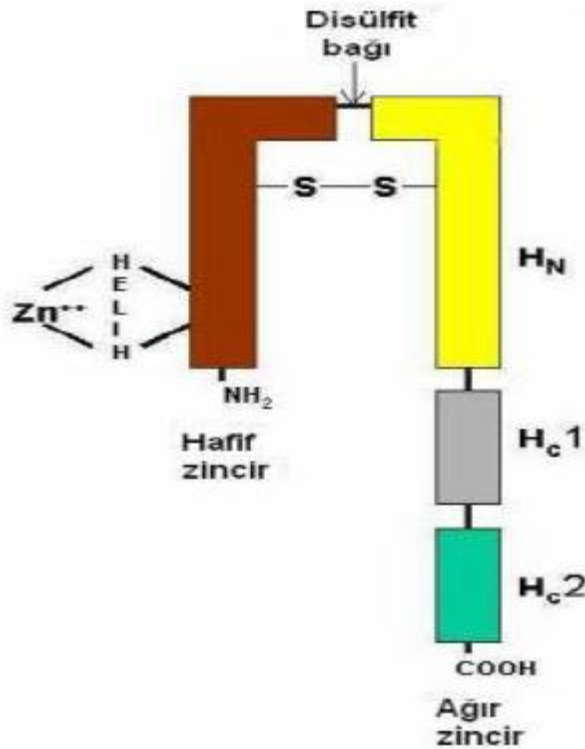
Justinus Kerner botulinum toksin (Btx) zehirlenmesini 1817 yılında klinik olarak ilk tanımlayan kişidir. Daha sonra Van Ermengen botulinum toksininin kaslarda paralizisi yaparak ölüme sebep olduğunu bildirmiştir. Toksinin kaynağı olan anaerobik sporlu basil 'Bacillus botulinus' olarak adlandırmış ve ilerleyen zaman içinde ismi değişerek "Clostridium botulinum" haline gelmiştir. Botulizm için ilk antiserum 1897'de W. Kemper tarafından geliştirilmiştir. Botulinum toksininin ikinci serotipi (tip B) 1910'da Leuchs tarafından bulunmuştur. Burgen 1949'da botulinum toksininin etki mekanizmasını tanımlamıştır. Scott tarafından 1973'de hayvanlarda test edilen nörotoksin 1978'de yapılan pilot çalışmaların ardından, 1989'da strabismus, hemifasyal spazm ve blefarospazm tedavisi için ABD'de FDA (Food and Drug Administration) onayı ile kullanılmaya başlanmıştır. Botulinum toksin tip A'nın kozmetik kullanımı ise ilk olarak Jean Carruthers ve Alastair Carruthers tarafından rapor edilmiştir (123) (**Şekil 2.5**).

Botulizmin 5 farklı klinik formu vardır;

1. İnfantil (intestinal) botulizm: Basil sporlarının yutulması sonrası bu sporların kalın barsakta açılması ile olur.
2. Besin (klasik) botulizmi: Basille kontamine yiyeceklerin tüketilmesi ile olur.
3. Yara botulizmi: Basille enfekte yaralarda oluşur.
4. İnhalasyon botulizmi: Biyolojik silah olarak kullanım sonrası literatürde üç olguda bildirilmiştir (124).

5. İyatrojenik botulizm: Tedavi amaçlı BTx uygulaması sonrasında bölgesel veya sistemik botulizm bulguları görülmesidir. Literatürde iki olguda bildirilmiştir (125).

Botulinum toksininin immünolojik olarak 8 serotipi tanımlanmıştır ve bunlar A, B, C1, C2, D, E, F ve G olarak adlandırılmıştır. Bütün serotipler, periferik sinir sisteminde, nöromüsküler bileşkenin presinaptik terminallerinden asetilkolin salınımını inhibe ederek flask bir paraliziye sebep olurlar (126). Toksin 150 kD molekül ağırlığında olup, ısıya duyarlı disülfid köprüleri ile birbirine bağlanmış, çinko bağlayıcı metalloendoproteaz içerir. Bu proteaz ile toksin aktif formuna dönüştürülür. Molekül ağırlığı 100 kD olan ağır ve molekül ağırlığı 50 kD olan hafif zincir polipeptid alt birimlerinden oluşmaktadır (127,128). Ağır zincirde C ve N terminalleri bulunmaktadır. C terminali; kolinerjik sistem terminaline afiniteden ve presinaptik reseptörlerin aracılık ettiği nörona bağlanmadan sorumludur. N terminali; hafif zincirin endozomal membrana geçişini sağlar. Hafif zincir toksinin intrasellüler etkili parçasını oluşturmaktadır. Bu parça, endozom membranı ile presinaptik membranın birleşmesinden sorumlu SNARE (soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment proteine receptor) proteinlerine bağlanır (127,129).



Şekil.2.5. BTx'nin moleküler yapısı. BTx çinko endopeptidi olup, çinko bağlayıcı metalloendoproteaz içeren molekül ağırlığı 100 kD olan ağır ve molekül ağırlığı 50 kD olan hafif zincirden oluşmaktadır.

Normal fizyolojide, hücre sitoplazmasında yer alan bu proteinlerin bir bölümü endozom membranına, bir bölümü de bunlara karşılık olarak presinaptik hücre membranına yerleşir ve kalsiyum kanalı aracılığı ile hücre içerisine kalsiyum girişi ve sintagmin proteinin katkısıyla membranların füzyonu gerçekleşir. Böylece asetilkolin sinaptik aralığa salınır. Endozom; Klatrin gibi kılıf proteinlerinin membranı çevreleyip çukurcuk ve tomurcuklanarak vezikül oluşturması ile meydana gelir. Asetilkolin içeren sinaptik veziküller endozomdan tomurcuklanarak oluşur ve asetilkolin havuzuna katılır. Bu veziküller daha sonra asetilkolinin sinaptik aralığa boşalması için birleşim ve füzyon aşamalarından geçer.

Botulinum toksininin yol açtığı paralizi üç adımda gerçekleşir;

1. Bağlanma: Reseptörlere Presinaptik kolinerjik geri dönüşsüz olarak bağlanır.

2. Hücre içine giriş: Nörotoksin reseptör bağımlı endositoz ile hücre içine girdikten sonra ağır ve hafif zinciri bağlayan disülfid bağları bilinmeyen bir mekanizma ile kırılır. Daha sonra ağır zincirin N terminali toksinin hücre içinde yer değiştirmesini ve hafif zincirin endozomal membrana geçişini sağlar.

3. Nörotransmitter salınımının inhibisyonu: Asetilkolin taşıyan veziküllerin hücre zarı ile birleşerek, içerdiği asetilkolini nöromusküler kavşağa veya ekrin bezlerinin otonomik boşluklarına bırakması için hücre içinde aktif SNARE kompleksinin bulunması gereklidir.

BTx A'nın hafif zinciri intrasellüler etkili nörotoksin parçasını oluşturmaktadır. Bu parça, endozom membranı ile presinaptik membranın birleşmesinden sorumlu SNARE (soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment proteine receptor) proteinlerine bağlanır (130,131). Daha sonra çinko bağımlı endopeptidaz aktivitesi ile birkaçını parçalayarak kalsiyum kanalı aracılığı ile olan membran füzyonunu önler ve böylece asetilkolin salınımı engellenmiş olur (132,133).

BTx A'nın çocuklarda güvenilirlik ve etkinliği kanıtlanamadığından gebelik ve emzirme dönemlerinde kullanımı önerilmemektedir (134). Botulinum toksinlerin teratojenitesi hakkında kesin bir bilgi yoktur. Ancak C kategorisinde bir ajan olarak kabul edilmektedir (135,136). Botulinum enjeksiyonunun bazı avantajları; uygulama kolaylığı, duyu bozukluk yaratmaması, sistemik yan etki azlığı, etkilerinin 2-3 ayda geriye dönüşlü olması sayılabilir. Pahalı olması ve toksine karşı antikor gelişme olasılığı ise bazı dezavantajlarıdır (137). Tekrarlanmış tedavilerden sonra bazı hastalarda botulinum toksini enjeksiyonunun beklenen etkisine karşı klinik direnç olduğu gösterilmiş olup bu durum bioassay olarak botulinum toksinine karşı varlığı gösterilen antikorlar ile ilişkilidir (138). Nötralizan antikor gelişimi % 5'den az oranda görülebilmektedir. Enjeksiyon dozu ve sıklığı ile ilişkili olabileceği, tekrarlanan dozların 300 mU'yi aşması durumunda riskin artabileceği düşünülmektedir (139).

Btx A'nın toksik dozları, toksine hangi yöntem ile maruz kalındığına bağlı olarak değişir. 3500 mU insan zehirlenmesine yol açarken 30000 mU ağır zehirlenmeye neden olur. Yapılan çalışmalarda insan LD50'sinin 30-40 mU/kg olduğu gösterilmiştir (140).

BTx A hedef dokudan atıldığında ya da yanlılıkla kan damarına enjekte edildiğinde sistemik yan etkiler oluşabilir (139). Yapılan insan ve hayvan çalışmalarında immunolojik ve karsinojenik yan etkiler tespit edilmemiştir (141,142).

Tedavide kullanılan BTx, Clostridium Botulinum'un çok miktarda toksin üreten suşlarından kültür yapılarak elde edilir. Elde edilen toksin ayrılır, çökeltilir, saflaştırılır ve amonyum sülfatla kristalize edilir. Saflaştırılmış toz halindeki nörotoksin kompleksi 100 IU BTX A içeren flakonlar halinde ambalajlanmıştır. En sık kullanılan BTx preparatlarından Botox® -5°C, Dysport® +2- +8°C'de saklanmaktadır. Serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra her ikisi de +2- +8°C'de aseptik şartlarda korunmalıdır. Botox® sulandırılırken çalkalanıp köpürdüğünde denatüre hale geçtiğinden, oldukça dikkatli ve nazikçe serum fizyolojik solüsyonu flakon iç duvarına doğru verilmelidir. Sulandırılmış bir flakon Botox® 100 IU içerir ve bir kişiye uygulama için yeterli gelir. Botox® 1-10 ml serum fizyolojik ile seyreltilerek kullanılır. Buna göre 2 ml serum fizyolojik ile seyreltilen Botox®, 0,1 ml'de 5 IU toksin bulunmaktadır. +4°C'de saklanan sulandırılmış Botox® preparatlarının aktivitesi 1. günün sonunda % 90-100, 3. gün % 70-80, 7. gün % 40-50, 14. günde minimal olarak bulunmuştur. Sulandırıldıktan sonra buzdolabında 24 saatten fazla tutulmaması ve dondurucuda hiç saklanmaması önerilmektedir (126, 143, 144). BTx A, enjeksiyon bölgesinde 3 cm kadar etraf cilde yayılabilir (145). BTx A'nın sıçanlardaki etkin dozu 4 IU/kg, yüksek dozu ise 16 IU/kg'dır (146). Geniş alana yapılacak uygulamalar için örnek olabilecek uygulama, hiperhidrozis tedavisinde uygulandığı şekilde 1 cm aralıklarla 'elek düzeni' şeklinde enjeksiyon uygulamasıdır (145, 147). BTx A uygulandıktan sonra hücre içinde aktivitesinin başlaması ile klinik etkilerinin görülmesi 3-5 gün arasında olmaktadır. Maksimum etkisi ise yaklaşık 30. günde görülür (145, 148). Tek noktaya en fazla 50 IU Botox® yapılabilir. Enjeksiyonlar 3 aydan önce tekrarlanmamalıdır (128).

2.8. Sıçanlarda karın derisi beslenmesi

Sıçanlarda karın derisinin dolaşımında 5 ayrı damar sistemi katkıda bulunur (77) (**Şekil 2. 6**).

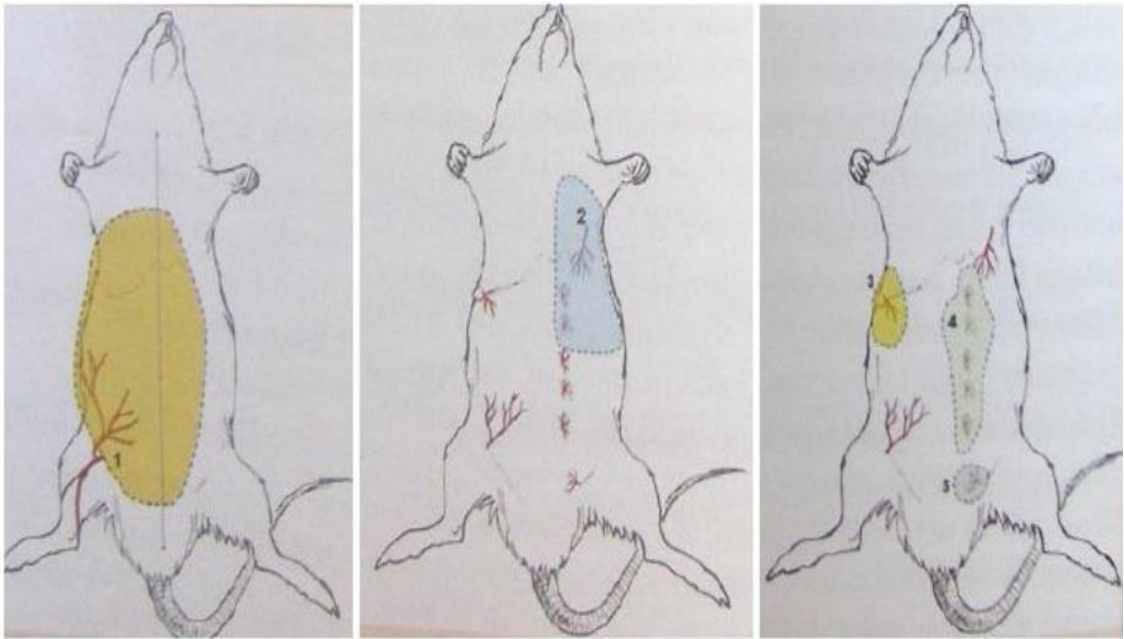
1-Yüzeyel epigastrik arter: Femoral arterden çıkan yüzeyel epigastrik arter karın derisinin en güçlü dolaşım kaynağıdır.

2-Uzun torasik arter: Uzun torasik arter özellikle göğüs derisini besler, aynı zamanda kot kavsinin aşağısında karın derisinin yukarı bölümünü kanlandırır.

3-Lateral torasik arter: Lateral torasik arter dalları panniculus carnosus kası içinde dağılırken aksiler çizginin önüne geçip karın derisinin yukarı lateral bölgesine kan verir.

4-Süperior derin epigastrik arterin perforatörleri: İnternal mamarial arterin devamı olan süperior (kranial) derin epigastrik arterin rektus abdominis kası boyunca çıkan perforatörleri oldukça geniş karın derisini besleyebilirler.

5-Derin inferior epigastrik arterin perforatörleri: Femoral arterden çıkan derin inferior epigastrik arterlerin perforatörleri kasık bölgesinde küçük bir alanı kanlandırırlar.



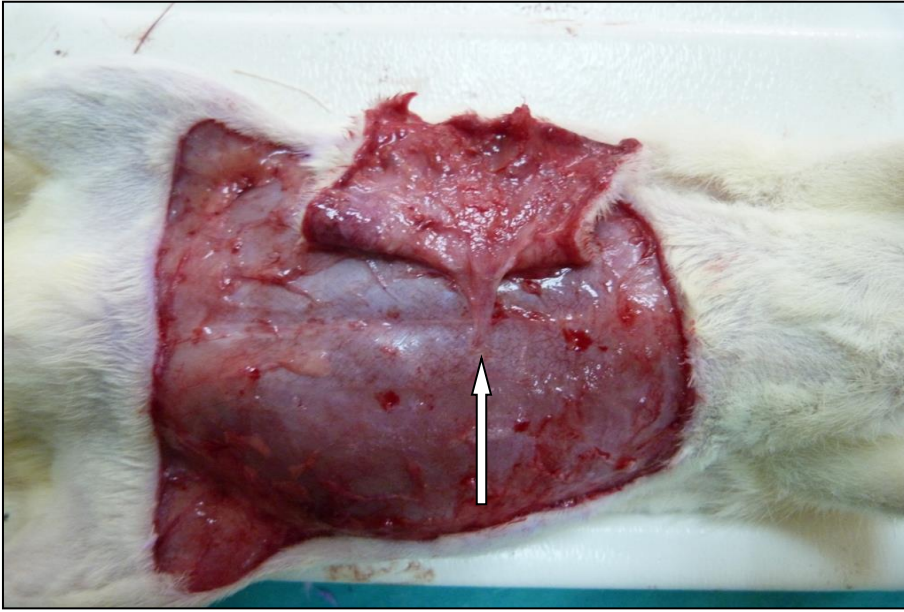
Şekil 2. 6. Sıçan karın ön duvar anatomisi (77)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada deney hayvanlarına uygulanan tüm cerrahi işlemler ve hayvanların bakımı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu (DEHEK) 2015/20 no'lu onayı ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlüğü bünyesindeki Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DEHAM) gerçekleştirildi. *Çalışma 215S537 no'lu proje olarak 1002 no'lu Ulusal Destek Programı kapsamında Tübitak tarafından desteklenmiştir.*

Çalışmada deney hayvanı olarak 215-312 gram arasındaki ağırlığa sahip toplam 40 Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Çalışma süresince 4 sıçan öldü (anestezi komplikasyonu), 1 sıçan kendi flebini yemesi nedeniyle çalışmadan çıkarıldı, sonuçta çalışmaya 35 sıçan dahil edildi.

Sıçanların hepsine süperior derin epigastrik arterden çıkan sağ ikinci kranial perforatör bırakılacak şekilde 6 cm (dikey düzlem) x 6 cm (yatay düzlem) boyutlarında perforatör cilt flebi uygulandı (**Şekil 3.1**).



Şekil 3. 1. Tek perforatör (beyaz ok) kullanılarak yapılan flep.

3.1. Deney gruplarının isimlendirilmesi

Çalışmada 40 sıçan, her grupta 10 tane sıçan olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Grupların hepsine tek pediküllü perforatör bazlı abdominal deri flebi uygulandı.

Tek pediküllü perforatör flep uygulanan gruplar:

-Grup 1 (Kontrol grubu): Tek pediküllü perforatör bazlı abdominal flep uygulandı. Flep daha sonra yerine sütüre edildi.

-Grup 2 (Nikotin grubu): Tek pedikül üzerinden perforatör bazlı abdominal deri flebi uygulandı. Bu gruptaki sıçanlara bir ay boyunca günlük olarak 2 mg/kg sc nikotin verildi

-Grup 3 (BTx grubu): Tek pedikül üzerinden perforatör bazlı abdominal deri flebi uygulandı. Flep cerrahisi işleminden 5 gün önce içinde 100 IU botulinum toksin A bulunan 1 adet flakon BTx A (Botox®) 10 ml serum fizyolojik ile sulandırıldı. Her bir 6x6 cm'lik flebin pedikülün gireceği bölge dışındaki kalan toplam 8 adet noktaya 26 Gauge 1 ml' lik insülin şırıngaları ile 1'er IU (her biri 0.10 ml, toplam 8 IU) intradermal enjeksiyonlar yapıldı.

-Grup 4 (Nikotin + BTx grubu): Tek pedikül üzerinden perforatör bazlı abdominal deri flebi uygulandı. 2 ve 3. gruptaki uygulamalar kombine olarak uygulandı.

3.2. Cerrahi öncesi hazırlık

Sıçanlara intraperitoneal Ketamine 75 mg/kg ve Xylazin 0,2 ml/kg uygulanarak anestezi sağlandı. Anestezi derinliği iskelet kas tonusuyla izlendikten sonra, sıçanlar supin pozisyonda yatırıldı, ekstremiteleri flaster ile zemine tespit edildi.

Sırt üstü yatırılan hayvanın karın duvarı kılları tıraş edildikten sonra flep boyutları cilt kalem ile çizildi. 6x6 cm boyutlarında perforatör flep tasarlandı.

Çizim işleminden sonra cerrahi alan Povidon-iodin solüsyonu ile boyandı. Uygun örtme işlemi yapıldıktan sonra cerrahi işleme başlandı.

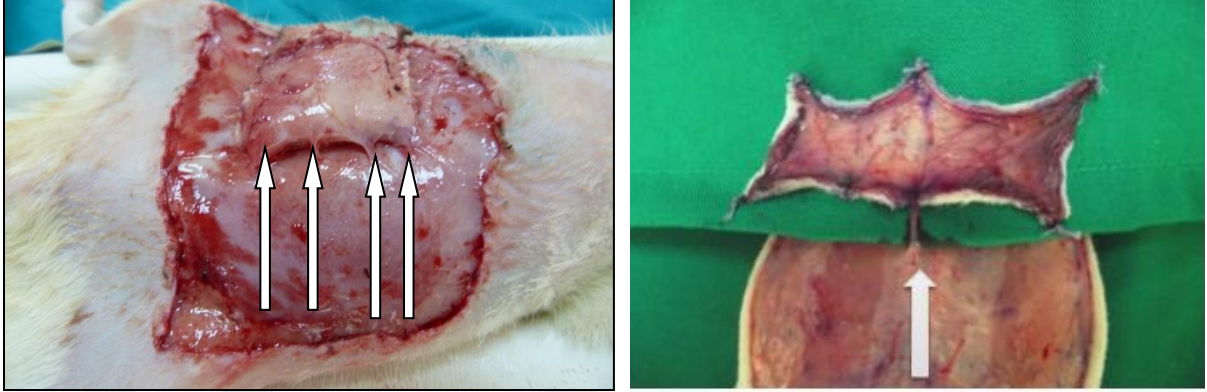
3.3. Perforatör bazlı abdominal deri flebinin kaldırılması

Perforatör bazlı abdominal deri flebini kaldırmak için 6x6 cm boyutlarındaki çizime uygun olarak, cilt flebinin sınırları deri kası (panniculus carnosus) flebe dahil olacak şekilde kesildi.

Daha sonra flebin önce sol sonra sağ tarafı ortadaki rektus kaslarına doğru, karın kasları üzerindeki kansız plandan disseke edildi. Bu sırada her iki yüzeyel epigastrik, lateral torasik ve uzun torasik arterler kesilerek kanama kontrolü sağlandı. Böylece sol ve sağ taraftaki rektus abdominis kasının içinden çıkan derin süperior epigastrik damardan köken alan perforatörler ortaya kondu. Daha sonra her bir deney grubuna uygun olacak şekilde tek taraflı sağ perforatör korundu diğerleri koterize edildi. Pedikülün etrafında ince bir bağ dokusu

bırakıldı, bunun dışında flebi tutan herhangi bir doku bırakılmadı (**Şekil 3.2 a, b**). Daha sonra flep 2-0 keskin ipek suturelerle her grup için ayrı ayrı yerine dikildi.

Cerrahi sonrası Povidon-iodin ile pansuman yapıldı.



Şekil 3. 2. a) Flep kaldırılırken disseke edilen perforan damarlar. b) Süperior derin epigastrik arterin sağ ikinci kraniyal perforatörünün üzerinde kaldırılmış hali

3.4. Hayvanların bakımı

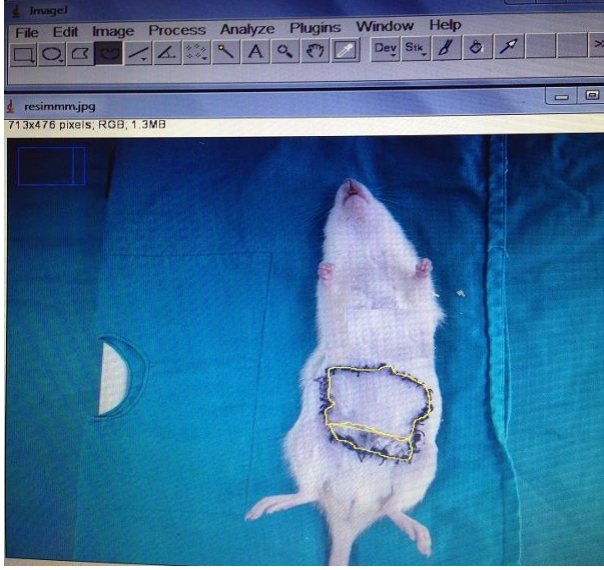
Sıçanlar sabit oda sıcaklığında (20°C), 12 saat aydınlık- 12 saat karanlık sistemine uygun ortamda tutuldu, su ve yeme istedikleri zaman ulaşabilecekleri kafesler içine tek tek barındırıldı.

3.5. Fleplerde yaşayan alan ölçümü

Cerrahi sonrası 7.günde flep fotoğrafları çekildi. İmaj dosyası haline gelen görüntüler üzerinde bilgisayarda İmage J (Free software, an open source Java image processing program inspired by NIH Image, USA) programı kullanılarak fleplerin yaşayan ve nekroz alanları hesaplandı (**Şekil 3. 3**).

3.6. Histopatolojik spesmen alınması ve spesmenlerin incelenmesi

Cerrahi sonrası 7. günde fleplerin yaşayan kısmından 1,5x2 cm boyutlarında deri spesmeni alındı. Gen ekspresyonu, histolojik ve immunhistokimyasal açıdan incelenme amacıyla spesmenler alındı.



Şekil 3.3. Alan hesaplanması için kullanılan programın görünümü

3.6.1. Gen ekspresyon analizinin yapılması

Kullanılan malzemeler;

1. High-pure RNA tissue kit (001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
2. Transcriptor first strand complementary DNA (cDNA) synthesis kit (Cat no. 04 379 012 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
3. LightCycler 480 Probe Master (04 707 494 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
4. Sıçan Beta-2 mikroglobulin forward-reverse (20/20 b) primer çifti- LNA Taqman probe seti (UPL6, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
5. Sıçan CD34 forward-reverse (20/22) primer çifti-LNA Taqman probe seti (UPL2, Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Germany)
6. Sıçan HIF1 alfa forward reverse (23/20) primer çifti- LNA Taqman probe seti UPL95 Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Germany)
7. Sıçan VEGF-A forward reverse (25/20) primer çifti- LNA Taqman probe seti UPL4 Roche Diagnostics GmbH, Berlin, Germany)

Gen ekspresyon çalışma planı Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Gen Ekspresyon Çalışma Planı

1 örnek	
RNA izolasyonu 50 µl	
RT (cDNA) 50 µl	
PCR	PCR

RNA İzolasyon Protokolü

High Pure RNA tissue kiti (001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) kullanılarak RNA izolatları elde edildi.

High Pure RNA tissue izolasyon protokolü

Protokol sıçan karın ön duvarından elde edilen cilt örneklerine uygulandı. -80⁰C derin dondurucudan çıkarılan sıçan karın ön duvarı cilt örneklerinden 50-75 mg doku tartıldı. Sıvı azot kullanılarak pulvarize edildi. Pulvarize doku 2 ml' lik eppendorf tüpe alındı. Lysis/-Binding Buffer'dan 400 µl (yeşil kapak) eklendi ve 120 s. vortekslendi. Lizat 2 dakika maksimum hızda santrifüj edilir. Süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı. 200 µl (Lizat süpernatantın yarı volümü kadar) absolut etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

Nümuneyi High Pure filtreli tüpe transfer etmek için high filtreli tüp, toplayıcı tüpe yerleştirildi. Numunenin tamamı filtreli tüpe pipetlendi (maksimum 700 µl). Numuneler oda sıcaklığında, 1 dakika, 14000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplayıcı tüpten artık uzaklaştırıldı ve filtreli tüp tekrar yerleştirildi. Filtreli tüp yerleştirildikten sonra steril bir reaksiyon tüpüne her numune için 90 µl DNase Incubation Buffer (beyaz kapak) pipetlenir, üzerine 10 µl DNase I eklenerek karıştırıldı. Solüsyon filtreli tüpe transfer edildi. 15 dakika, +15 +25°C'de inkübe edildi. Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer I pipelendi ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Artık uzaklaştırıldıktan sonra filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirildi.

Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlendi ve oda sıcaklığında 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Artık uzaklaştırıldı ve filtreli tüp toplayıcı tüpe yerleştirildi. Filtreli tüpe 200 µl Wash Buffer II (mavi kapak) pipetlendi ve oda sıcaklığında 2

1 dakika maksimum hızda (~14000 rpm) santrifüj edilerek gerideki Wash buffer'ın uzaklaşması sağlandı. Ekstra santrifügasyon ile rezidü wash bufferın uzaklaşması sağlandı. Toplayıcı tüp atılarak filtreli tüp temiz, steril 1,5 ml'lik mikro-santrifüj tüpüne yerleştirildi. RNA'yı elüe etmek için filtreli tüpe 50 µl Elution Buffer pipetlendi. Oda sıcaklığında 1 dakika, 14000 rpm'de santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpte biriken elüe RNA'dır. Elüe RNA direk RT-PCR için kullanıldı ya da -80°C'de daha sonra analiz edilmek üzere saklandı.

Tablo 3.2. RNA izolasyon çalışma solüsyonlarının hazırlığı

İçerik	Rekonstitüsyon/Hazırlama	Saklama /Stabilite	Kullanım alanı
DNase 1	DNase I, 0,55 ml Elüsyon Buffer içinde çözülür.	Alikotlanır ve -15 – 25 °C'de saklanır. 12 ay stabildir.	DNA kontaminasyonunu engellemek için kullanılır.
Wash Buffer 1	20 ml absöüt etanol, Wash Buffer I üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15 –25 °C'de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.
Wash Buffer II	40 ml absöü etanol, Wash Buffer II üzerine eklenir ve iyice karıştırılır. Etanol eklendiği tarih şişenin üzerine not edilmelidir.	15–25 °C'de saklanır. Kitin üzerindeki son kullanma tarihine kadar stabildir.	Rezidüel kirlilikleri uzaklaştırmak için kullanılır.

3.6.2.Sıçan Karın ön duvarı Cilt RNA izolatlarından cDNA sentezi

Transcriptor first strand cDNA synthesis kiti (Roche Diagnostics, Germany) kullanılarak Thermal Cycler cihazında Tablo 3.4'de gösterilen protokol ile cDNA sentezi yapıldı.

Her bir RNA izolatından Revers Transkriptaz ile 1'er tane cDNA elde edildi.

Thermal Cycler’da cDNA sentez Protokolü

Kullanmadan önce tüm reaktifler çözüldü. Protokol uygulamadan önce tüm reaktifler kısa süreli santrifüj edildi. Reaksiyon düzenlenirken tüm reaktifler buz üzerinde tutuldu. Buz üzerinde ya da soğuk kolon üzerinde tutulan steril, nuclease-free, thin-walled PCR tüpte, aşağıdaki sırada pipetleme yapılarak template-primer karışımı reaksiyon başına 50 µl olacak şekilde hazırlandı. RNA numunesine daima eldiven ile temas edildi. Her bir örnek için kullanılan total RNA ve PCR-grade distile su miktarları final konsantrasyonu 600-1000 ng total RNA olacak şekilde düzenlendi.

Tablo.3.3. Template-primer miks (1 reaksiyon için)

	Komponent	Hacim	Final konsantrasyonu
1	PCR-grade distile su	20 µl	Total hacmi oluşturmak için = 32,5 µl
2	Total RNA	5 µl	1 µg total RNA
3	Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/µl	2,5 µl	2,5 µM
	Random hexamer	5 µl	
	Total Hacim	32,5 µl	

Template-primer karışımı içeren tüp 10 dakika 65 °C’de termal cycler cihazında tutularak denatürasyon sağlandı. Bu basamak RNA sekonder yapısının denatürasyonunu sağlar. Bu amaçla GeneAmp 9700 Thermal Cycler, ‘**cdna1**’ (Cat no. 04 379 012 001 Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) programı kullanıldı. Tüp daha sonra acele olarak soğutulmuş alüminyum bloğa alındı.

Tablo.3.4. Template-primer karışımını içeren tüpün sırasıyla pipetlenmesi

Komponent	Hacim (1 reaksiyonluk)	Final kons.
Transkriptör Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer, 5×kons.	10 µl	1×(8mM MgCl ₂)
Protektör RNaz İnhibitör, 40 U/µl	1,25 µl	20 U
Deoksinükleotid Miks, 10 mM her biri	5 µl	1 mM her biri
Transkriptör Revers Transkriptaz 20 U/µl	1,25 µl	10 U (reaks başına)
Total Hacim	17,5 µl	
Final Hacim	50 µl	

Tüpteki reaktifler iyice karıştırıldı. Vorteks yapılmadı. Tüp termal Cyler cihazına yerleştirildi. 60 dakika, 50°C’de inkübasyona bırakıldı. Transcriptor Reverse Transcriptase inaktivasyonu için tüp, 85°C’de 5 dakika bekletildi. GeneAmp 9700 Thermal Cyler cihazında ‘**cdna-oligo-trans**’ programı kullanıldı. Tüp buz üzerine alınarak reaksiyon durduruldu. Bu noktada reaksiyon tüpü +2 +8°C’de 1-2 saat ya da -15 -25°C’de daha uzun süre saklandı. cDNA purifikasyona gerek olmadan PCR için kullanıldı. PCR için bir LightCycler® aleti için 20 µl reaksiyon hacmi içinde 2–5 µl cDNA kullanıldı.

3.6.3. Biyoinformatik analiz

İyi düzenlenmiş primerler ve probler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon sağlamak ve genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilmektedirler. Primer ve problerin düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır:

Termometre dereceleri, primer için 58-60°C, prob için 68-70°C olmalıdır. G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalıdır. Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalıdır. Primerin 3’ ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2’yi aşmamalıdır. Maksimum ampikon büyüklüğü 400 bp’i aşmamalıdır (ideali 50-150 bp). Problar ardışık benzer nükleotit içermemelidir (özellikle 4 veya daha fazla G). Problardaki %30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G’den fazla olmalı. Probların 5’ ucunda G olmamalıdır.

Çalışmada Referans gen olarak Beta 2 mikroglobulin kullanıldı. Beta 2 mikroglobulin, CD34, VEGF alfa ve HIF1 alfa ekspresyonunun belirlenmesi için primer-prob dizaynı, Roche Universal Probe Library (UPL) programı kullanılarak yapıldı. BLAST (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ile doğrulukları teyit edildi.

Tablo.3.5. Beta 2 mikroglobulin, CD34, VEGF alfa ve HIF1 alfa ekspresyonunun primer-

Gen	Left Primer	Right Primer
Beta 2 mikroglobulin	5'- agcaggttctctcaacaagg	5'- ttctgccttggagtccttcc
CD34	5'- cggtatttctctgatgaacc	5'-ccgtgtaataagggtcttcacc
VEGF alfa	5'- agaaagatagaacaagccagaaaa	5'- tctagttcccgaacctga
HIF1 alfa	5'- aagcactagacaaagctcacctg	5'- ttgaccatatacgtgtccac

prob dizaynı

3.6.4. Q-PCR Çalışması

Quantitative (Q-PCR) çalışmasında relatif gen ekspresyon analizi yapılırken dikkat edilmesi gereken konular:

1. RNA izolasyonu High Pure RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmalı ve elüsyon hacmi hücre sayısı az ise RNA dilüsyonunu önlemek amacıyla düşük volümlle yapılmalı (~ 50 µl)
2. İzolasyon sonrası RNA'lar nanospektrofotometre ile ölçülerek cDNA sırasında kullanılacak RNA miktarı belirlenmeli. Eğer düşük miktarda RNA izole edilmişse cDNA sentezi sırasında olabildiğince yüksek RNA kullanılmalı.
3. cDNA sentezi için kullanılacak RNA konsantrasyonları, farklı gruplar arasında birbirine yakın olmalıdır. Gerekirse RNA dilüsyonu yapılarak yakın konsantrasyonlara getirilebilir.
4. cDNA sentezi Transkriptör First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak yapılmalı.
5. cDNA sentezi oligod(T) primer kullanılarak, her bir mRNA'ya ait tek bir cDNA sentezi sağlanarak daha spesifik yapılabilir. (Random hegzamer ile bir mRNA'dan birkaç cDNA oluşabilir).
6. Düşük konsantrasyondaki RNA kullanılarak yapılan cDNA sentezinde Random hegzamer kullanılarak verim arttırılabilir.
7. Quantitative PCR (QPCR)'da kullanılacak primer ve proplar Roche UPL programı kullanılarak dizayn edilebilir.
8. Kullanılacak primerler sipariş edilmeden önce mutlaka biyoinformatik analize tabi tutulmalı.
9. Primerler 100 pmol/µl olacak şekilde sulandırıldıktan sonra alikotlanarak saklanmalı. PCR çalışılacağı zaman alikot 10 pmol/µl'e dilüe edilerek kullanılmalı.
10. Proplar tekrarlayan dondur-çözlerden kaçınmak için alikotlanarak saklanmalı.
11. Normalizasyon için kullanılacak referans genin ekspresyonu, hücrenin maruz kaldığı koşullardan etkilenmeden eksprese olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'lerden en sık kullanılanları GAPDH, β-actin, siklofilin ve 28S ribozomal RNA'dır.
12. Seçilen referans gen, çalışılacak genin ekspresyon düzeyine yakın olmalıdır. Örneğin yüksek oranda eksprese olan bir gen için düşük düzeylerde ekspresyonu olan bir referans gen uygun değildir.
13. Yapılan çalışmada numuneler standart deviasyonun hesaplanabilmesi için en az 3 tekrarlı olarak çalışılmalı.

14. Çalışılacak olan her bir gen background hesabında yanlışlığa yol açmaması için mutlaka ayrı pleytte çalışılmalı veya aynı pleytte çalışılacaksa ayrı ayrı subsetler tanımlanarak çalışılmalı.
15. QPCR relative kantitasyon komparatif crossing point (CP) Metodu ($\Delta\Delta CP$ metodu) ile çalışılacaksa Efficiency mutlaka 2'ye ayarlanmalı.
16. 15 CP'nin altı ve 40 CP'nin üzeri analizde değerlendirmeye alınmamalıdır. 35-40 CP gri zondur gen ekspresyonu çok düşük düzeydedir ve "0" kabul edilebilir.
- Yapılan çalışmada her bir cDNA'dan 2'şer tane QPCR çalışılarak her bir ilaç grubu 4 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

3.6.5. Beta 2 mikroglobulin için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µl olacak şekilde master mix hazırlandı (**Tablo 3.6**).
- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 4'er µL cDNA Template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

Tablo 3.6. Beta 2 mikroglobulin Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Hacim (73 numune için)	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µl	423,4 µl		
Beta 2 mikroglobulin Forward Primer	1 µl	73 µl	10 µM	0,5 µM
Beta 2 mikroglobulin Reverse Primer	1 µl	73 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (LNA 6)	0,2 µl	14,6 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	730 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl			

Beta 2 mikroglobulin Q-PCR programı aşamaları Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. Beta 2 mikroglobulin Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Quantification
		55 °C	15 sn	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

3.6.6. CD34 için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (**Tablo 3.8**).
- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18'er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 4'er µL cDNA Template pipetlendi.

Tablo 3.8. CD34 Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1numune için)	Hacim (73 numune için)	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µl	423,4 µl		
CD34 Forward Primer	1 µl	73 µl	10 µM	0,5 µM
CD34 Reverse Primer	1 µl	73 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (Prob 2)	0,2 µl	14,6 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	730 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl			

- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

CD34 Q-PCR programı aşamaları Tablo 3.9’da verilmiştir.

Tablo 3.9. CD34 Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Quantification
		55 °C	15 sn	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

3.6.7. VEGF alfa için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (**Tablo 3.10**).

Tablo 3.10. VEGF alfa Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Hacim (73 numune için)	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µl	423,4 µl		
VEGF alfa Forward Primer	1 µl	73 µl	10 µM	0,5 µM
VEGF alfa Reverse Primer	1 µl	73 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (prob 4)	0,2 µl	14,6 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	730 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl			

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18’er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 4’er µL cDNA Template pipetlendi.
- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg’de santrifüj edildi.

- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

VEGF alfa Q-PCR programı aşamaları Tablo 3.11’de verilmiştir.

Tablo 3.11. VEGF alfa Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Quantification
		55 °C	1 dk	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

3.6.8. HIF1 alfa için Q-PCR Çalışması

- Her reaksiyon için toplam 18 µL olacak şekilde master mix hazırlandı (**Tablo 3.12**).

Tablo 3.12. HIF1 alfa Q-PCR için Master Mix İçeriği

Malzeme	Hacim (1 numune için)	Hacim (73 numune için)	Başlangıç Kons.	Final Kons.
PCR-grade distile su	5,8 µl	423,4 µl		
HIF1 alfa Forward Primer	1 µl	73 µl	10 µM	0,5 µM
HIF1 alfa Reverse Primer	1 µl	73 µl	10 µM	0,5 µM
LNA Hidroliz Prob (prob 95)	0,2 µl	14,6 µl	10 µM	0,1 µM
LC 480 Prob Master	10 µl	730 µl	2X	1X
Toplam Hacim	18 µl			

- Çalışılacak tüm pleytin kuyucuklarına 18’er µL master mix pipetlendi.
- Her numune için uygun kuyucuklara 4’er µL cDNA Template pipetlendi.

- Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatıldı.
- 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de santrifüj edildi.
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Germany) cihazında aşağıdaki programa göre PCR çalışması yapıldı.

HIF1 alfa Q-PCR programı aşamaları Tablo 3.13'de verilmiştir.

Tablo 3.13. HIF1 alfa Q-PCR programı

Program adı	Siklus	Sıcaklık (°C)	Süre	Analiz modu
Pre-inkübasyon	1	95 °C	10 dk	None
Amplifikasyon	45	95 °C	10 sn.	Quantification
		55 °C	15 sn	
		72 °C	1 sn	
Soğutma	1	40 °C	10 sn.	None

Çalışma gruplarının relatif gen ekspresyon analizi, beta-2 mikroglobulin geni referans gen ve kontrol grubu da kalibratör olarak kabul edilerek, komparatif crossing threshold (Ct) metodunu esas alan QIAGEN 2009 relative expression software (REST) programı kullanılarak yapıldı.

3.6.9. Komparatif Ct Metodu ile Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyonunun relatif kantitasyonu, farklı dokulardaki spesifik genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemeye izin verir. Bu farklılık, absölu kantitasyonda olduğu gibi bir değer olarak değil, n-katı şeklinde ifade edilir. Real-time PCR kantitasyonunda hedef numunenin başlangıç miktarındaki küçük farklılıklar, amplifikasyon ürününe katlanarak yansır. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bu relatif kantitasyonda yanlış sonuçlara sebep olur. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol tüm dokulardan ekspresse olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık GAPDH, β actin, Asidik ribozomal fosfoprotein (36B4) ve rRNA kullanılmaktadır. Bu genler referans gen olarak da isimlendirilmektedir. Çalışmamızda referans gen olarak GAPDH kullanıldı.

$\Delta\Delta Ct$ metodu olarak da isimlendirilen bu metot, standart eğri metoduna benzer ancak konsantrasyonların yerine Ct değerleri kullanılır. Hedef genin Ct değeri bir referans genin Ct değerine oran olarak normalize edilir. Daha sonra normalize Ct değerleri kalibratöre oranlanır. Sonuçlar kalibratörün n-katı şeklinde verilir. Komparatif Ct metodu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile ifade edilir. Burada:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{hedef gen}) - \Delta Ct(\text{kalibratör})$$

$$\Delta Ct(\text{hedef gen}) = Ct(\text{hedef gen}) - Ct(\text{referans gen})$$

$$\Delta Ct(\text{kalibratör}) = Ct(\text{kalibratör}) - Ct(\text{referans gen})$$

Karşılaştırmalı Ct metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Bunun için iki şart gereklidir: Birincisi, hedef gen amplifikasyonunun verimliliği ile referansın gen amplifikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit ve %100'e yakın olmasıdır. İkincisi de farklı başlangıç konsantrasyonlarında ΔCt değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı ΔCt grafiğinde slope değerinin sifıra yakın (<0,1) olmasıdır.

3.7.1. Histopatolojik inceleme

Doku örnekleri %10'luk tamponlu formalinde fikse edilip, parafinde bloklandı. Parafin bloklardan alınan 4-5 μm 'lik kesitler HxE boyama metodu uygulanarak derideki histopatolojik değişiklikler fibrosis, vaskülarizasyon, inflammatuar hücre infiltrasyonu yönünden ve Masson' üçlü boyama metodu ile boyanan kesitler kollajen yoğunluğu yönünden incelendi. Değerlendirmeler Lee ve arkadaşları (2009)'nın derecelendirme kriterleri modifiye edilerek derecelendirildi. Fibroblast hücre sayıları, yeni oluşan damar sayıları ve inflammatuar hücre sayıları için 400x büyütmede rastgele 10 alanda sayım yapılarak aritmetik ortalamaları alındı. Masson trikrom boyama yapılan kesitlerde ise dermisteki kollajen yoğunluğu değerlendirildi. Kollajen yoğunluğu boyanma yok ise negative (0), boyanma hafif ise (1), boyanma orta yoğunlukta ise (2) ve boyanma şiddetli yoğun ise (3) olarak değerlendirildi. Değerlendirmeler iki patolog tarafından tarafından bağımsız olarak yapılmıştır (MY ve SBİ).

3.7.2. İmmunohistokimyasal inceleme

Parafinde hazırlanan doku bloklarından alınan kesitlere Hypoxia-inducible factor 1-alfa (Hif-1-alfa), Kök hücre belirteci (CD34) ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) proteinlerinin varlığını belirlemek için Strepto Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks

tekniki (SABK) uygulandı. Primer antikorlar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen oranlarda phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) ile sulandırıldı. (**Tablo 3.14**) İmmunohistokimyasal boyamalarda SABK teknik için alınan hazır kit ticari kit kullanıldı ve tüm uygulamalar önerilen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikorların üretici firmalarının önerileri doğrultusunda pozitif kontroller ile negatif kontrol olarak PBS (pH 7.4) kullanıldı. Buna göre kesitler, aseton-3-etoksipropilamin (Merck, katalog no: 8.21619, 100 ml aseton, 2 ml 3-etoksipropilamin) ile kaplanmış lamlara alındı. 30 dakika 58 °C'lik etüvde kurutuldu. Kesitler ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için kesitler, sitrat tamponlu solüsyonda mikrodalga fırında 600 watta 20 dakika kaynatıldı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış % 3'lük H₂O₂'te 7 dakika bekletildi ve protein bloke edici serumda 10 dakika tutuldu. Daha sonra primer antikorlar ile Tablo 3.13'de belirtilen sulandırma oranları ve sürelerde inkubasyona bırakıldı. Kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dakika bekletildikten sonra Streptavidin peroksidaz enzimi ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler 2 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) kromojen ile mikroskop altında kontrollü olarak 10 dakika süreyle boyandı. Gill's hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı immun yapıştırıcı ile kesitler kapatıldı ve Nikon Eclips E600 (Japonya) araştırma mikroskobunda incelendi ve fotoğraflandı.

Hif 1-alfa, CD34 ve VEGF immunohistokimyasal boyama yapılan deri kesitleri x20 objektif altında immun boyanmaların yoğunluğuna ve dağılımına göre değerlendirildi. Pozitif boyanma yok ise 0, kesitte sadece bir bölgeye sınırlı hafif ya da orta derecede boyanma var ise +1, kesitte 2-3 bölgede hafif ya da orta derecede boyanma var ise +2 ve kesitte değişen derecelerde yaygın boyanmalar var ise +3 olarak değerlendirildi.

Tablo 3.14. Çalışmada kullanılacak antikorlar ve özellikleri

Antikor (Klon)	Antikor türü	Antikor konağı	Antijeni açığa çıkarma yöntemi	Kullanılan dilüsyon	İnkubasyon süresi
HIF1-alfa NB110- 74679 Novus Biological	Polyclonal	Tavşan	Sitratlı	1/250	1 gece
CD34 Bs-2038R, Bioss	Polyclonal	Tavşan	Sitratlı	1/250	1 gece
VEGF GTX22992 Gene Tex	Monoklonal	Tavşan	Sitratlı	1/250	1 gece

3.8. Hayvanların sakrifiye edilmesi

Biyopsi alma işleminin uygulanmasından sonra sıçanlar Ketalar HCl 75 mg/kg ve Xylazin 0,5 ml/kg ile oluşturulan derin anestezi altında sakrifiye edildi.

3.9. İstatistiksel analiz

Veriler SPSS 15,0 paket programına aktarıldı, ortalama ve standart sapma şeklinde ifade edildi.

Deneklerin nekroz alanları karşılaştırılmasında *Mann-Whitney testi* ile değerlendirme yapıldı.

Gen ekspresyonu karşılaştırılmasında *Rest analizi* uygulandı. Histopatolojik ve immunhistokimya değerlendirmede gruplar arası karşılaştırmada *Oneway testi* ve fark çıkan parametrelerin ikili karşılaştırmasında *Tukey testi* kullanıldı.

$p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Fleplerin yaşıyan alanlarının değeriendirilmesi

Cerrahi sonrası 7. günde fleplerin fotoğrafları çekildikten sonra image j programı ile nekroze olan flep alanları tüm flep alanına oranlanarak ölçüldü (**Tablo 4.1**).

Tablo 4.1. Cerrahi sonrası 7.günde yapılan tüm deneklerin flep yüzey alanı inceleme sonuçları

Grup	7.günde nekroze alanın tüm flebe oranı	Grup	7.günde nekroze alanın tüm flebe oranı
Grup1-1	% 31,31	Grup 3-1	% 18,80
Grup 1-2	% 35,55	Grup 3-2	% 19,60
Grup 1-3	% 26,04	Grup 3-3	% 26,60
Grup 1-4	% 45,66	Grup 3-4	% 32,51
Grup 1-5	% 29,29	Grup 3-5	% 23,40
Grup 1-6	% 37,29	Grup 3-6	% 20,82
Grup 1-7	% 44,76	Grup 3-7	% 34,30
Grup 1-8	% 87,89	Grup 4-1	% 28,72
Grup 1-9	% 53,07	Grup 4-2	% 33,20
Grup 2-1	% 45,06	Grup 4-3	% 26,95
Grup 2-2	% 28,20	Grup 4-4	% 40,28
Grup 2-3	% 50,16	Grup 4-5	% 25,34
Grup 2-4	% 25,20	Grup 4-6	% 29,92
Grup 2-5	% 17,88	Grup 4-7	% 31,45
Grup 2-6	% 66,82	Grup 4-8	% 27,30
Grup 2-7	% 34,30	Grup 4-9	% 22,50
Grup 2-8	% 56,94	Grup 4-10	% 36,30
Grup 2-9	% 92,03		

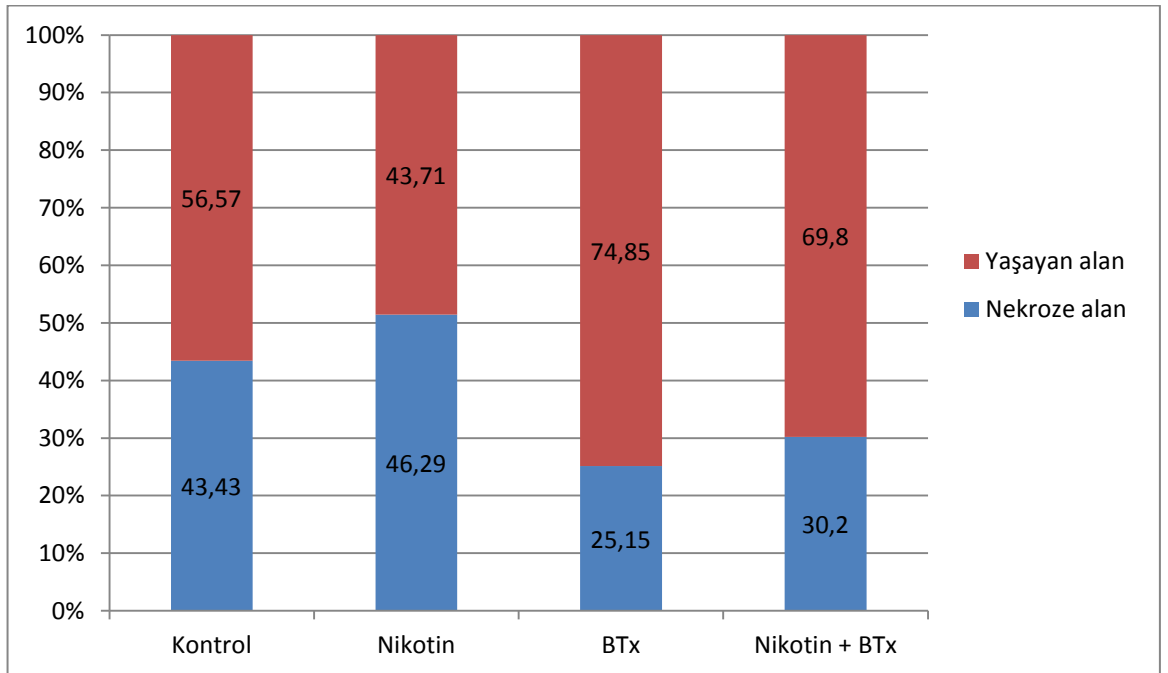
Fleplerde gruplara göre ortalama flep nekroz oranları sırasıyla ; Kontrol grubunda % 43,43± 18,79, nikotin grubunda % 46,29± 23,36, botulinum toksin grubunda % 25,15± 6,23, nikotin+ botulinum toksin grubunda % 30,20± 5,31 olarak hesaplandı (**Tablo 4.2.1** ve **Tablo 4.2.2**). Gruplara ait flep örnekleri gösterilmiştir (**Şekil 4.1**).

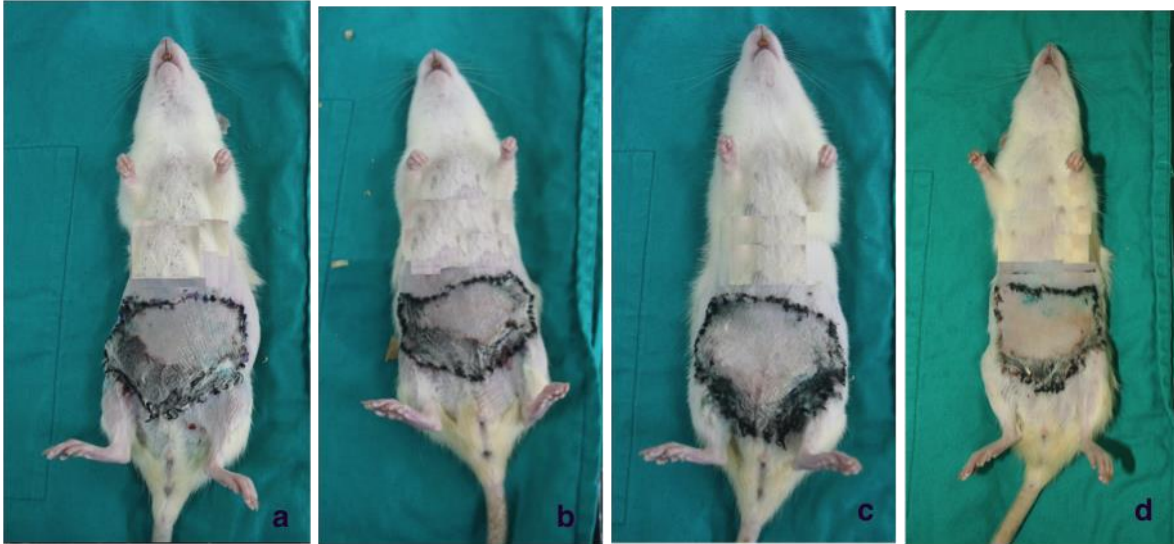
Tablo 4.2.1. Grupların 7. gündeki ortalama nekroz oranları, standart sapma ve p değerleri

Grup	Ortalama	Standart sapma	p değeri
Kontrol	% 43,43	18,79	
Nikotin	% 46,29	23,36	0,089
BTx	% 25,15	6,23	0,01
Nikotin + BTx	% 30,20	5,31	0,041

Nekroz oranları bakımından kontrol ve nikotin grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı (p=0,089). Kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu (p=0,01). Kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu (p= 0,041).

Tablo.4.2.2. Grupların 7. gündeki ortalama nekroz ve yaşayan alan yüzdeleri





Şekil.4.1. Kontrol, nikotin, BTx, nikotin+ BTx gruplarının postoperatif 7. günde nekroz alanlarının gösterimi

4.2.Kantitatif Real Time-PCR Sonuçları

Farklı çalışma gruplarındaki Beta 2 Mikroglobulin, CD 34, HIF1 A ve VEGF A gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için sıçan karın duvarından alınan hücrelerin ile yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Sıçan karın duvarı örneklerinde yapılan PCR çalışmalarından elde edilen Ct değerleri

	Beta 2 mikroglobulin	CD 34	Hif-1A	VEGF-alfa
Grup1-1	23,87	28,23	26,16	28,24
Grup1-1	23,99	28,26	26,15	28,59
Grup1-2	21,54	26,37	23,70	25,70
Grup1-2	21,61	26,39	23,71	25,73
Grup1-3	19,51	24,12	21,61	23,73
Grup1-3	19,50	24,05	21,56	23,78
Grup1-4	20,32	24,76	22,77	24,95
Grup1-4	20,34	24,91	22,72	24,96
Grup1-5	21,08	26,60	23,47	25,53
Grup1-5	20,95	26,79	23,43	25,51
Grup1-6	22,02	27,34	24,02	25,34
Grup1-6	22,11	27,38	24,01	25,34
Grup1-7	23,77	28,77	25,71	27,45
Grup1-7	23,74	28,57	25,75	27,45
Grup1-8	23,04	28,74	25,93	26,97
Grup1-8	23,12	28,64	25,93	26,99

Grup1-9	22,81	27,18	24,64	26,23
Grup1-9	22,88	27,12	24,64	26,22
Grup2-1	22,54	26,77	24,52	26,62
Grup2-1	22,61	26,72	24,57	26,57
Grup2-2	22,62	26,92	24,57	26,91
Grup2-2	22,67	27,31	24,51	26,96
Grup2-3	23,25	28,79	24,71	26,49
Grup2-3	23,24	28,81	24,69	26,53
Grup2-4	22,19	27,82	24,53	25,74
Grup2-4	22,27	27,76	24,64	25,74
Grup2-5	23,32	27,80	25,43	27,44
Grup2-5	23,35	27,86	25,35	27,53
Grup2-6	23,92	28,26	25,45	26,98
Grup2-6	23,99	28,23	25,43	26,96
Grup2-7	24,86	29,99	26,96	28,5
Grup2-7	24,91	29,98	26,92	28,53
Grup2-8	26,32	31,76	28,96	31,11
Grup2-8	26,30	31,91	29,15	31,26
Grup2-9	24,33	30,75	27,24	28,81
Grup2-9	24,44	30,72	27,28	28,82
Grup3-1	23,31	28,37	25,31	26,97
Grup3-1	23,39	28,23	25,47	27
Grup3-2	22,30	29,05	26,05	26,92
Grup3-2	22,51	29,11	26,1	26,94
Grup3-3	32,48	45,00		
Grup3-3	32,78			40
Grup3-4	22,18	29,21	24,81	25,79
Grup3-4	22,18	29,14	24,99	25,88
Grup3-5	25,49	34,10	30,21	31,31
Grup3-5	25,50	33,87	30,05	31,47
Grup3-6	22,24	29,41	25,48	26,35
Grup3-6	22,32	29,00	25,52	26,35
Grup3-7	23,04	29,78	26,02	26,8
Grup3-7	23,09	29,55	26,02	26,88
Grup4-1	23,61	29,97	26,46	27,52
Grup4-1	23,61	30,22	26,46	27,58
Grup4-2	23,80	29,51	26,56	27,79
Grup4-2	23,89	29,47	26,63	27,87
Grup4-3	23,71	29,32	26,19	27,85
Grup4-3	23,76	29,42	26,35	27,85
Grup4-4	23,87	30,19	26,71	27,98
Grup4-4	23,94	30,01	26,73	27,96

Grup4-5	23,97	29,88	26,23	28,34
Grup4-5	24,00	29,89	26,21	28,44
Grup4-6	25,19	30,56	27,55	28,49
Grup4-6	25,25	30,78	27,6	28,53
Grup4-7	25,85	31,14	28,36	29,35
Grup4-7	25,82	31,09	28,24	29,48
Grup4-8	24,78	29,57	26,97	28,52
Grup4-8	24,83	29,28	26,99	28,59
Grup4-9	24,26	30,38	28,7	29,85
Grup4-9	24,09	30,44	28,77	29,79
Grup4-10	23,48	29,23	26,31	27,37
Grup4.10	23,48	29,37	26,18	27,28

Çalışma gruplarının relatif gen ekspresyon analizi, Beta 2 mikroglobulin geni referans gen ve kontrol grupları da kalibratör olarak kabul edilerek, QIAGEN 2009 relative expression software (REST) programı (Technical University, Munich) kullanılarak yapıldı.

Nikotin grubu sıçan karın ön duvar hücrelerinde çalışılan Beta 2 Mikroglobulin, CD 34, HIF1 A ve VEGF A gen ekspresyon analizi sonuçları tablo 4.4'de gösterilmiştir. Beta 2 Mikroglobulin, CD 34, HIF1 ve VEGF genlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.4. Sıçan karın duvarı örneklerinde subkutan nikotin uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P
Beta 2 mikroglobulin	1			
Cd34	0,891	0,469 - 1,643	0,267 - 2,657	0,424
HIF-1A	1,077	0,717 - 1,576	0,518 - 2,069	0,42
VEGF-alfa	1,086	0,629 - 1,914	0,412 - 2,778	0,503

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı)

BTx grubunda sıçan karın ön duvar hücrelerinde çalışılan Beta 2 Mikroglobulin ve VEGF gen ekspresyon analizi sonuçları kontrole göre anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. CD 34 ve HIF1 A gen ekspresyon analizi sonuçları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük çıkmıştır. (p 0.009, 0047) Çalışmanın sonuçları da Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Sıçan karın duvarı örneklerinde subkutan botulinum toksin uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
Beta 2 mikroglobulin	1				
CD 34	0,554	0,218 - 1,359	0,071 - 2,481	0,009	DOWN
HIF-1A	0,792	0,454 - 1,404	0,170 - 1,993	0,047	DOWN
VEGF-alfa	0,986	0,574 - 1,769	0,251 - 2,550	0,913	

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı, Down=Düşük

Nikotin + BTx grubunda sıçan karın ön duvar hücrelerinde çalışılan Beta 2 Mikroglobulin ve VEGF gen ekspresyon analizi sonuçları kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. (p >0,05) CD 34 ve HIF1 A gen ekspresyon analizi sonuçları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük çıkmıştır. (p 0.001, 0027) Çalışmanın sonuçları da Tablo 4.6’da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Sıçan karın duvarı örneklerinde subkutan nikotin ve botulinum toksin uygulama sonrası REST analizi sonuçları

Gen	Ekspresyon	Standart Hata	95% C.I.	P	Sonuç
Beta 2 mikroglobulin	1				
Cd34	0,639	0,349 - 1,162	0,241 - 2,194	0,001	DOWN
HIF-1A	0,771	0,559 - 1,183	0,175 - 1,803	0,027	DOWN
VEGF-alfa	0,986	0,586 - 1,636	0,297 - 2,506	0,899	

P: Anlamlılık değeri, UP: Upregülasyon, C.I.: Confidens İntervale, Güven Aralığı, Down=Düşük

4.3.1. Deri fleplerinin histopatolojik değerlendirilmesi

Gruplarda her bir sıçana ait deri flep örneğinde hematoksilin-eosin boyama metodu kullanılarak inflamatuvar yanıt, fibrozis ve vaskülarizasyon analize edildi. Tüm grupların deri örneklerinde vaskülarizasyon, fibrozis ve inflamatuvar hücre yanıtı yönünden Tablo 4.7’de karşılaştırıldı.

İnflamatuvar hücre sayısı kontrol grubunda $8,7 \pm 2,95/400$ büyütme alanında, nikotin grubunda $10,91 \pm 9,52/400$ büyütme alanında, botoks grubunda $7,91 \pm 2,80/400$ büyütme alanında), ve nikotin botoks grubunda $7,13 \pm 2,86/400$ büyütme alanında) idi. İnflamatuvar hücre sayıları Tablo 4.7’de verildi.

Fibroblast ücree sayısı kontrol grubunda $22,98 \pm 5,68/400$ büyütme alanında, nikotin grubunda $25,86 \pm 7,00/400$ büyütme alanında, botoks grubunda $22,30 \pm 7,92/400$ büyütme alanında, ve nikotin botoks grubunda $26,85 \pm 6,74/400$ büyütme alanında idi. Fibroblast hücre sayıları Tablo 4.7’de verildi.

Yeni oluşan damar sayısı kontrol grubunda $4,42 \pm 2,51/400$ büyütme alanında, nikotin grubunda $3,93 \pm 0,92/400$ büyütme alanında, botoks grubunda $6,04 \pm 1,21/400$ büyütme alanında, ve nikotin botoks grubunda $5,56 \pm 1,23/400$ büyütme alanında idi. Yeni oluşan damar sayıları Tablo 4.7’de verildi.

İnflamatuvar hücre sayısı bakımından kontrol, nikotin, botulinum toksin ve nikotin + botulinum toksin grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$) (**Tablo 4.7, Şekil 4.1**).

Fibroblast hücre sayısı bakımından kontrol, nikotin, botulinum toksin ve nikotin + botulinum toksin grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$) (**Tablo 4.7, Şekil 4.2**).

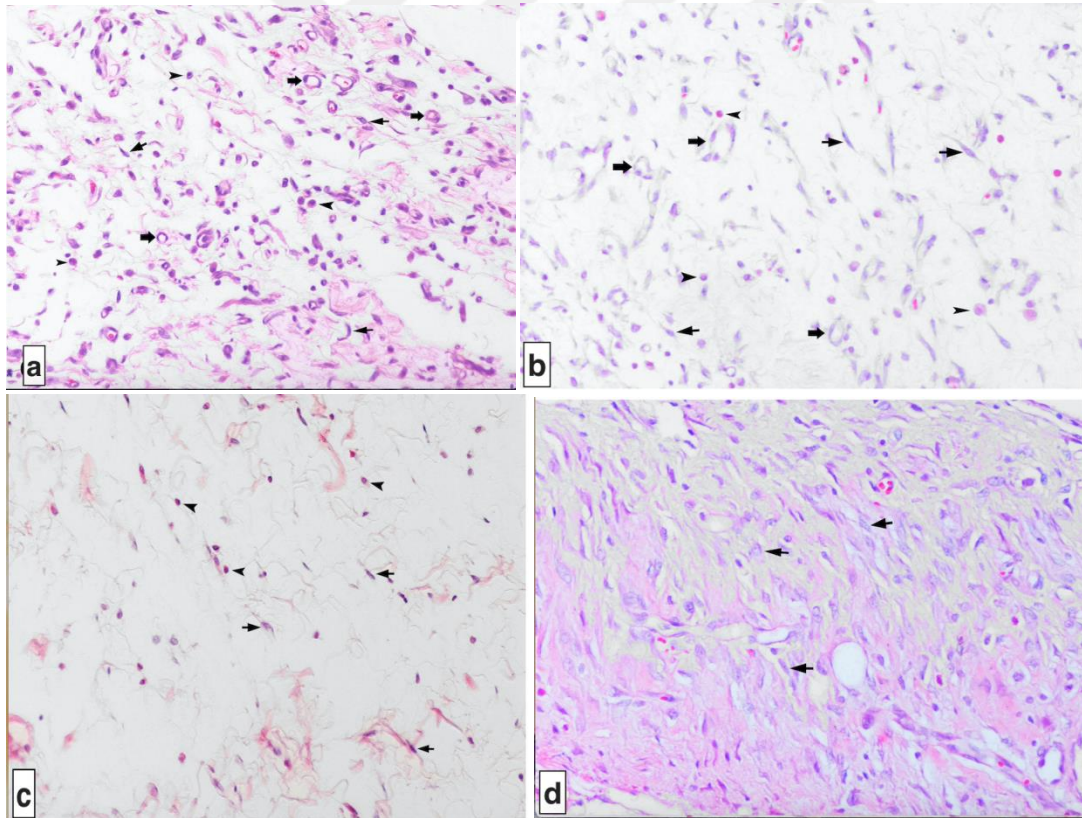
Yeni oluşan damar sayısı bakımından kontrol ve nikotin grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p=0,013$), kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p=0,03$), kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p= 0,003$) (**Tablo 4.7, Şekil 4.2**).

Tablo 4.7. Kontrol ve deney grubundaki sıçanların deri fleplerinde inflamatuvar hücre, fibroblast ve yeni oluşan damar sayıları ile kollajen yoğunlukları

Olgu No.	İnflamatuvar hücre sayısı	Fibroblast sayısı	Yeni oluşan damar sayısı	Kollajen yoğunluğu
Grup1-1	11,1	28,7	4,7	3
Grup 1-2	2,6	29,3	4,8	2
Grup 1-3	7,5	18,1	5,2	2
Grup 1-4	6,8	13,7	3,8	1
Grup 1-5	11	24	3,3	3
Grup 1-6	11,6	22	6	2
Grup 1-7	11,2	21	7,6	2
Grup 1-8	9,1	19,5	7,2	2
Grup 1-9	7,4	30,6	6,2	3
Grup 2-1	8,8	15,3	4,4	1
Grup 2-2	4,5	14,7	4	2
Grup 2-3	6,6	17,4	2,6	1
Grup 2-4	12,2	25,5	5,2	2
Grup 2-5	7,2	37	5,7	3
Grup 2-6	5,4	20,1	4,2	1
Grup 2-7	10,7	26,1	4,2	3
Grup 2-8	6,8	36,8	4,4	2
Grup 2-9	6,5	17,9	12,1	1
Grup 3-1	7,5	21,2	3	1
Grup 3-2	7,4	29,1	3,3	2
Grup 3-3	3,2	21,8	7,1	2
Grup 3-4	6,8	18,1	4,4	3
Grup 3-5	32	22,7	4,7	3
Grup 3-6	6,1	32,2	5,7	2
Grup 3-7	21,9	33	6,7	2
Grup 4-1	3	20,4	6,4	2
Grup 4-2	5,2	33,7	8,6	3
Grup 4-3	10	35,4	8	3
Grup 4-4	9,7	34,8	3,8	2
Grup 4-5	10,2	31,8	7,2	2
Grup 4-6	4,7	21,4	3,3	2
Grup 4-7	7,6	19,6	6,3	2
Grup4-8	8,1	29	4,5	2
Grup 4-9	3,2	23,4	4,1	2
Grup4-10	9,6	19	6,4	2

Tablo.4.8. Kontrol ve deney grubundaki sıçanların deri fleplerinde ortalama inflammatuar hücre, fibroblast ve yeni oluşan damar sayıları ve standart sapmaları

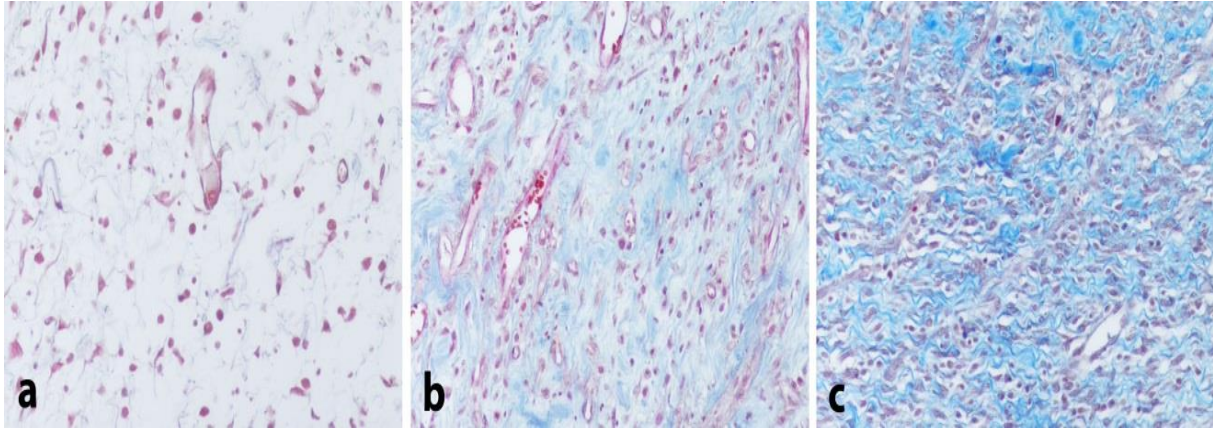
Grup	Ortalama	Standart Sapma
İnflammatuar hücre sayısı		
Kontrol	8,7	2,95
Nikotin	10,91	9,52
BTx	7,91	2,80
Nikotin + BTx	7,13	2,86
Fibroblast hücre sayısı		
Kontrol	22,98	5,68
Nikotin	21,86	7,0
BTx	22,30	7,92
Nikotin+ BTx	26,85	6,74
Yeni oluşan damar sayısı		
Kontrol	4,42	2,51
Nikotin	3,93	0,92
BTx	6,04	1,21
Nikotin+ BTx	5,56	1,23



Şekil 4.2. Sıçanların deri örneklerinin dermisindeki histolojik bulgular. Dermiste (a) kontrol grubu, orta yoğunlukta fibroblastlar (ince oklar) ile çok sayıda yeni damar oluşumları (kalın oklar) ve inflammatuar hücreler (ok başları), (b) nikotin grubu, az sayıda yeni damar oluşumu (kalın oklar), orta yoğunlukta inflammatuar hücreler (ok başları) ve fibroblastlar (ince oklar), (c) botoks grubu, az sayıda fibroblastlar (oklar) ve inflammatuar hücreler (ok başları), (d)

nikotin-botoks grubu, çok fazla miktarda fibroblastlar (oklar), Hematoksilen-Eozin boyama, x400.

Dermisteki kollajen yoğunluğu ve miktarının değerlendirilmesinde Masson'un üçlü boyama metodu kullanıldı. Dermisteki kollajen yoğunluğu açısından kontrol, nikotin, botulinum toksin ve nikotin + botulinum toksin grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$) (**Tablo 4.7, Şekil 4.3**).



Şekil 4.3. Sıçanların deri örneklerinin dermisinde kollajen yoğunluğu. Dermiste (a) hafif yoğunlukta kollajen boyanma, (b) orta yoğunlukta kollajen boyanma (c) şiddetli yoğunlukta kollajen boyanma, Masson'un üçlü boyası, x400.

4.3.2.İmmunohistokimya bulguları

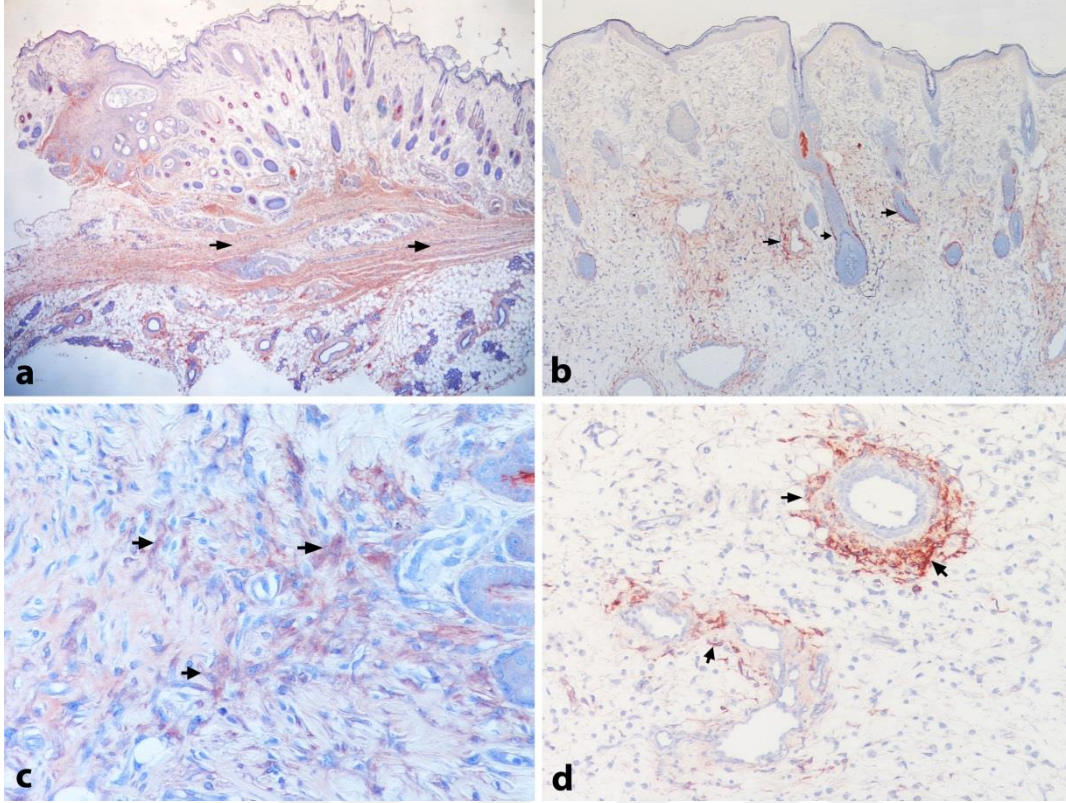
CD34 immün boyanma bulguları:

CD34 immunopozitifliği kırmızı renkli ve sitoplazmik boyanmalar halinde gözlemlendi. CD34 immün boyanmaları tüm gruplarda dermiste kıl follikülü ve kan damarı çevresindeki fibroblastlarda, granülasyon dokusu ile sağlam doku arasındaki sınır bölgelerdeki fibroblastlarda ve subkutiste fibroblastlarda sitoplazmik homojen boyanmalar halinde görüldü (**Şekil 4.4 a,b,c,d**).

İmmunohistokimyasal boyamalarda, kontrol grubu ve nikotin grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,084$), kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,001$), kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu ($p=0,02$) (**Tablo 4.9**).

Tablo 4.9. Kontrol ve deneme grubundaki sıçanların deri fleplerindeki farklı kısımlarda CD34 ekspresyonları

Grup	Fibroblast	Grup	Fibroblast
Grup1-1	2	Grup 3-1	3
Grup 1-2	2	Grup 3-2	6
Grup 1-3	2	Grup 3-3	3
Grup 1-4	3	Grup 3-4	4
Grup 1-5	2	Grup 3-5	5
Grup 1-6	3	Grup 3-6	2
Grup 1-7	2	Grup 3-7	3
Grup 1-8	3	Grup 4-1	3
Grup 1-9	3	Grup 4-2	6
Grup 2-1	1	Grup 4-3	4
Grup 2-2	1	Grup 4-4	5
Grup 2-3	1	Grup 4-5	3
Grup 2-4	1	Grup 4-6	4
Grup 2-5	1	Grup 4-7	2
Grup 2-6	1	Grup4-8	5
Grup 2-7	1	Grup 4-9	3
Grup 2-8	1	Grup4-10	3
Grup 2-9	3		



Şekil 4.4. Kontrol ve deney gruplarındaki sıçan deri fleplerinde CD34 immunopozitiflikleri. Sıçan derisinde (a) nikotin grubu, subkutisteki fibroblastlarda CD34 immünpozitifliği, (b) nikotin grubu, dermiste kıl follükülleri ve damarlar çevresindeki fibroblastlarda CD34 immünpozitifliği (oklar), (c) nikotin-botoks grubu, dejenere epidermise komşu dermis sınırındaki fibroblastlarda CD34 immünpozitifliği (oklar), (d) nikotin grubu dermiste damarlar çevresindeki fibroblastlarda CD34 immünpozitifliği (oklar), SABK, Gill's hematoksilen karşıt boyama, (a) x40, (b) x80, (c) x200, (d) x200.

Hif 1 alfa immun boyanma bulguları

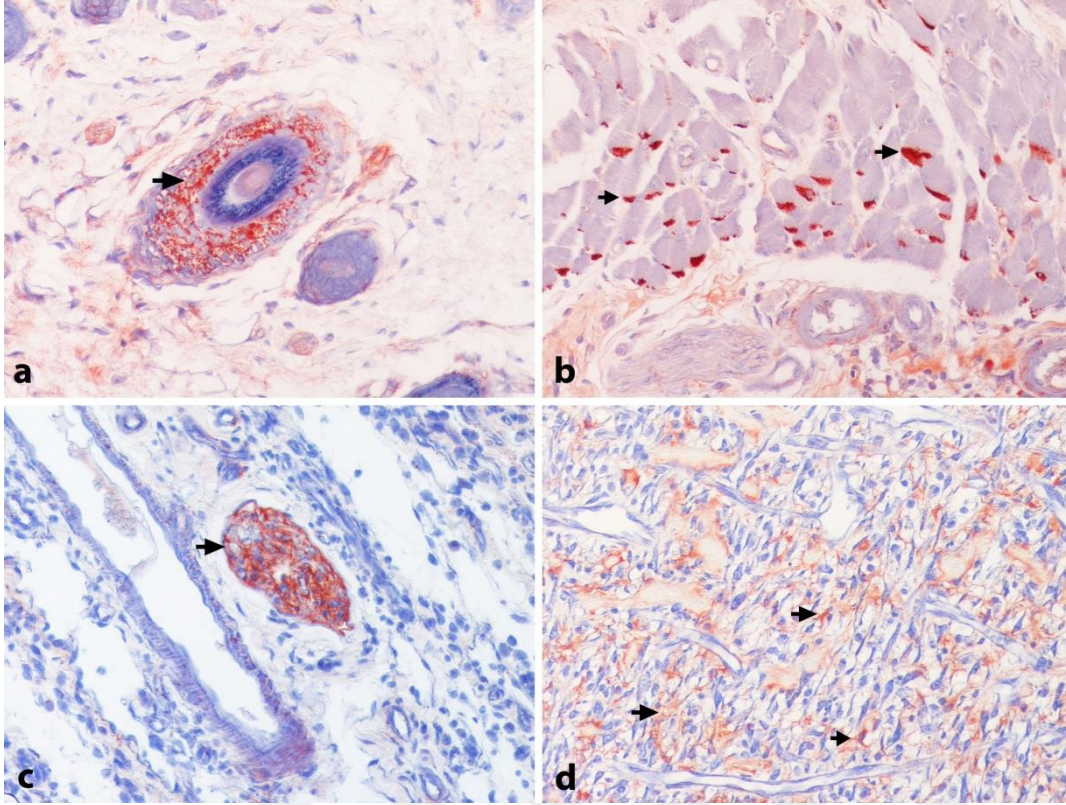
Hif 1-alfa immunopozitifliği kırmızı renkli ve sitoplazmik boyanmalar halinde gözlendi. Hif 1-alfa immun boyanmaları kıl follükülü dış kök kılıfı hücrelerinde (Şekil 4.5a), deri kas katında (Şekil 4.5b), perifer sinir hücrelerinde (Şekil 4.5c), fibroblastlarda (Şekil 4.5d), dermisteki makrofajlarda ve epidermiste granüler ya da homojen sitoplazmik şekilde gözlendi. Hif 1-alfa immun boyanmaları granülasyon dokusu sınırındaki fibroblastlar (Şekil 4.6a) ile dermiste rejenere epidermise komşu fibroblastlarda (Şekil 4.6 b,c,d) ve rejenere epidermisteki keratinositlerde (Şekil 4.6d) rastlandı.

İmmunohistokimyasal boyamalarda, kontrol grubu ve nikotin grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,09$), kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında

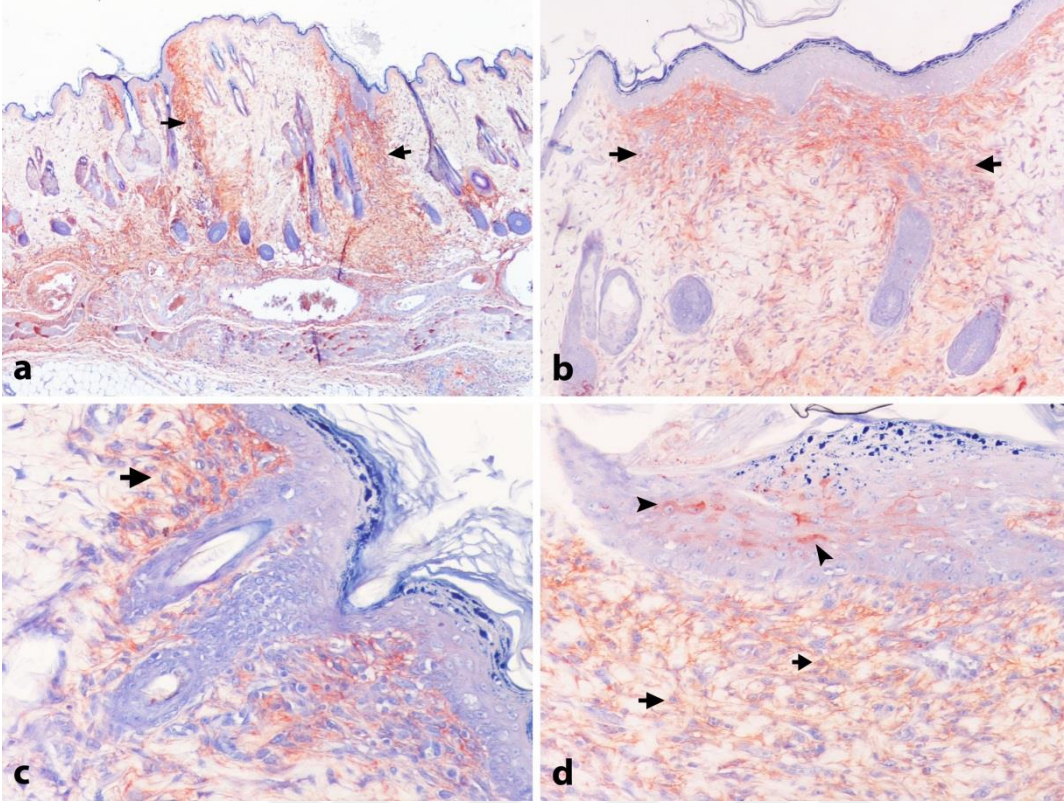
anlamli fark bulunmuştur ($p=0,003$), kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamli fark bulundu ($p=0,05$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Kontrol ve deney grubundaki sıçanların deri fleplerinde Hif1 alfa ekspresyonları

Grup	Epidermisteki keratinositler	Fibroblastlar	Deri kas tabakası hücreleri	İnflammatuar Hücreler (makrofajlar)	Periferik sinir hücreleri	Kıl Follikülü dış kök kılıf epitel hücreleri
Grup 1-1	–	2	2	–	2	2
Grup 1-2	–	2	2	–	2	3
Grup 1-3	–	1	2	–	2	2
Grup 1-4	–	2	2	–	3	2
Grup 1-5	1	2	2	–	2	3
Grup 1-6	–	2	2	–	2	3
Grup 1-7	–	2	2	–	2	2
Grup 1-8	1	2	2	–	2	3
Grup 1-9	–	2	2	–	2	3
Grup 2-1	–	3	3	–	2	3
Grup 2-2	–	2	2	–	2	2
Grup 2-3	–	2	2	–	1	3
Grup 2-4	–	3	1	–	2	2
Grup 2-5	–	2	2	2	2	3
Grup 2-6	–	2	2	–	3	3
Grup 2-7	1	3	2	–	2	3
Grup 2-8	2	3	2	–	1	3
Grup 2-9	2	1	2	1	3	3
Grup 3-1	–	4	2	–	3	2
Grup 3-2	2	3	2	–	2	3
Grup 3-3	1	4	2	–	2	3
Grup 3-4	–	3	1	–	2	3
Grup 3-5	1	3	2	–	2	2
Grup 3-6	1	4	2	1	2	3
Grup 3-7	1	2	2	2	1	3
Grup 4-1	1	2	2	1	1	3
Grup 4-2	–	2	2	1	1	2
Grup 4-3	–	3	2	–	2	3
Grup 4-4	1	2	1	–	3	2
Grup 4-5	1	4	2	–	3	3
Grup 4-6	–	3	2	–	3	3
Grup 4-7	–	4	3	–	3	3
Grup 4-8	–	3	2	–	3	3
Grup 4-9	1	3	2	–	2	2
Grup 4-10	–	4	2	–	2	3



Şekil 4.5. Kontrol ve deney gruplarındaki sıçan deri fleplerinde Hif 1 alfa immunopozitiflikleri. Sıçan derisinde (a) botoks grubu, kıl follikülü dış kök kılıfı hücrelerinde Hif 1 alfa immunopozitifliği (ok), (b) nikotin-botoks grubu, deri kas tabakası hücrelerinde sınırlı Hif 1 alfa immunopozitifliği (oklar), (c) kontrol grubu, dermiste perifer sinirde Hif 1 alfa immunopozitifliği (ok), (d) nikotin grubu, dermiste damarlar çevresindeki fibroblastlarda Hif 1 alfa immunopozitifliği (oklar), SABK, Gill's hematoksilen karşıt boyama, (a),(b),(c),(d) x400.



Şekil 4.6. Kontrol ve deney gruplarındaki sıçan deri fleplerinde Hif 1 alfa immünpozitiflikleri. Sıçan derisinde (a) nikotin-botoks grubu, granülasyon dokusu sınırındaki (oklar) ve subkutiste fibroblastlarda Hif 1 alfa immünpozitifliği, (b) nikotin-botoks grubu, dermiste rejenere epidermise yakın bölgedeki fibroblastlarda Hif 1 alfa immünpozitifliği (oklar), (c) kontrol grubu, dejenere epidermise komşu dermis sınırındaki fibroblastlarda Hif 1 alfa immünpozitifliği (ok), (d) nikotin-botoks grubu, rejenere epidermisteki keratinositlerde (ok başları) ve dermisteki fibroblastlarda (oklar) Hif 1 alfa immünpozitifliği, SABK, Gill's hematoksilen karşıt boyama, (a) x80, (b) x200, (c) x400, (d) x400.

VEGF immün boyama bulguları:

VEGF antikoruna ile yapılan immün boyamalar farklı sulandırma oranları ve farklı sürelerde tutulmasına rağmen istenilen sonuç elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA

Perforatör flepler, plastik cerrahi literatüründe ilk olarak 1989 yılında Koshima ve Soeda tarafından tanımlanmıştır (17). Ancak geriye dönük olarak bakıldığında literatürde; Asko-Seljavaara tarafından 1983 yılında tanımlanan “serbest stil flepler” ve Taylor tarafından 1987’ de tanımlanan “anjiozom konsepti”, perforatör flep teriminin atası olarak yorumlanabilir (19). Özellikle son yıllarda popülaritesi giderek artan perforatör flepler, günümüzde artık güvenli bir rekonstrüksiyon seçeneği oluşturmuşlardır. Ayrıca donör saha morbiditesini kas, sinir ve derin fasya korunmasını sağlayarak azaltmaktadırlar (19), serbest ve pediküllü olarak çok rahat kullanılabilirler (21). Serbest stil planlanabilmesi alıcı sahanın ihtiyacına göre flep dizaynı, boyutu ve içerdiği yumuşak doku hacmi planlanarak donör alan seçimi özgürlüğü sağlamaktadır (149). Çünkü flep planı muskulokutan perforatör bulunan her yerde yapmak mümkündür (150). Pediküllü olarak perforatör flepler, defektin kompozisyonuna, şekline ve lokalizasyonuna en uygun doku ile örtüm fırsatını vermektedir (151).

Diğer geleneksel fleplere göre donör saha avantajı bulunması ve mikrocerrahi tekniklerinin çok ilerlemesine rağmen her flepte olduğu gibi perforatör flep kayıpları da rekonstrüktif cerrah ve hasta için oldukça üzücü olabilmekte, tekrarlayan cerrahi girişimlere, maliyet artışı ve hastane yatış süresinin uzamasına sebep olmaktadır (56). Deneysel perforatör flep modeli ise ilk olarak 2001 yılında Oksar ve ark. tarafından tanımlanmıştır (152). Ancak hala flep yaşayabilirliği üzerine yapılan çalışmaların birçoğunda random bazlı deri flepleri kullanılmaktadır. Medikal ajanların flep yaşayabilirliği üzerine etkilerinin araştırılmasında literatürde genelde random bazlı deri flepleri kullanılmıştır. Random bazlı fleplerin bilinen bir aksiyel damarı yoktur ve ağırlıklı olarak subdermal pleksustan beslenirler. Bunun yanında perforatör flepler tanımlanmış bir pedikül üzerinde kaldırılır. Perforatör flep kayıplarının nedeni de en çok bu damar pedikülü seviyesinde olan trombüs, spazm, konjesyon ve dış baskı gibi sorunlardır. Bu nedenlerle bir medikal tedavinin etkisi random bazlı fleplerde farklı, aksiyel ve perforatör fleplerde farklı olmaktadır.

Son yıllarda giderek yaygın şekilde kullanılan perforatör fleplerin yaşayabilirliğini araştırmaya yönelik, botulinum toksin ve nikotinin birlikte uygulamasına verecekleri yanıtı araştıran çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Son zamanlarda botulinum toksisinin kozmetik kullanımı dışında yaygın olarak farklı kullanım amaçları oluşmuştur. Biz bu çalışmamızda botulinum toksisinin perforatör flepler üzerinde sağkalıma ve anjiogeneze etkisini araştırmayı amaçladık. Ayrıca flep cerrahisinde önemli bir risk faktörü olan sigara

kullanımının zararlı etkilerini toksin uygulayarak ne derece önleyebileceğimizi araştırmayı amaçladık.

Botulinum toksisinin son yıllarda flep cerrahisine etkilerinin gösteren bazı güncel çalışmalara bakıldığında; derin inferior epigastrik arter perforatör flebi pedikül torsiyonunda cerrahi öncesi toksin uygulamanın yaşayabilirliği arttırdığı gösterilmiştir (153). Daha önce yapılan bir çalışmada ise transvers rektus abdominis myokutan flep oluşturulan deney gruplarında cerrahi öncesi toksin uygulamasının anjiogenezi arttırdığı gösterilmiştir (154). Botulinum toksininin vazodilatasyon yaptığına dair literatürdeki çalışmalara bakıldığında ise; reyno fenomeni olan hastaların ellerine botulinum toksin A enjeksiyonu yapılan araştırmada hastaların ağrılarında belirgin azalma, parmak uçlarındaki ülserlerde iyileşme ve atak sıklığında azalma olduğunu tesbit etmiştir. Böylece araştırmacı botulinum toksin A'nın düz kas hücrelerinde nöromusküler blokaj yaparak vazodilatasyona neden olduğunu savunmuştur (155). Yapılan başka bir çalışma da ise; iskemik parmaklarda botulinum toksin A tedavisini araştırılmış ve BTx A'nın norepinefrin, substans-P, glutamat, kalsitonin gen ilişkili protein gibi ağrı ile ilgili nörotransmitterleri etkilediği varsayılmış ve bu nörotransmitterlerin salınımında bloğa neden olarak sempatik stimulasyonu ve ağrıyı azalttığı gösterilmiştir. Böylece BTx A'nın iskemik parmaklarda vaskülariteyi düzelttiğini varsaymıştır (156).

Forrest ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1, 2, 4 veya 8 mg/kg dozda 0.5 ml serum fizyolojik içinde eritilerek pre-op 4 hafta ve post-op 1 hafta olacak şekilde toplam 5 hafta subkutan yolla nikotin verilen sıçanlardan, 2mg/kg ve yüksek dozda nikotin uygulanan gruplarda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı miktarda distal flep nekrozu saptanmıştır. Ancak pre-op 2 hafta uygulanan grupta bu etkisi olmamıştır. Sonuç olarak, akut olarak verildiğinde, fleplerde hipoperfüzyona yol açabilen nikotinin, flepte nekroz oluşturabilme etkisinin zaman bağımlı olduğu anlaşılmıştır (84).

2mg / kg nikotin verilen sıçanlarda plazmada saptanan ortalama nikotin seviyesinin 8.1 ± 0.4 mikrogram / dl olarak saptanmış ve bu seviyenin ağır sigara içicisi olan insanlarla aynı miktarda olduğu görülmüştür (83). Çalışmamızda nikotinizasyon metodumuz sigara içiminin flepler üzerindeki etkilerini yaratabilmek için kullanılmıştır.

Karayel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; her sıçana random patern McFarland flebi uygulanmış olup botulinum toksin + nikotine uygulanan grupta nekroz oranının nikotin grubuna göre anlamlı şekilde az olduğu gösterilmiştir (157).

Arnold ve arkadaşlarının çalışmasında ise; pediküllü superior epigastrik arter karın flebinde perivasküler botulinum toksin uygulamasının flep perfuzyonunun arttırıp, antiinflamatuvar etkisi olduğu gösterilmiştir (158).

Park ve arkadaşlarının çalışmasında ise; pediküllü transvers rektus abdominis myokutan flebinde cerrahi öncesi botulinum toksin uygulamasının flep yaşayabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir (159).

Park ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışma da ise; femoral damarların etrafına uygulanan botulinum toksin uygulaması sonrası yapılan femoral arter ve ven anastomozlarında toksin uygulanan grupta damar çaplarının daha yüksek olduğu gösterilmiş (160).

Çalışmamızda “gerçek perforatör flep” olduğu kabul edilen kraniyal epigastrik muskulokutan perforatörlerine ait flep modeli kullanıldı (29, 151). Flep boyutları tanımlayıcı yazarlardan daha büyük tutularak (6x6 cm) oluşacak yaşam alanlarının gruplar arasında daha iyi değerlendirilmesi amaçlandı. Bu arterden perfüzyonu sağlanan flepler oluşturuldu. Deney grupları üç farklı grup olacak şekilde oluşturuldu ve daha önce anlatılan şekilde gruplara kendi içlerinde aynı işlemler uygulandı.

Postoperatif 7. günde flep alanları değerlendirilirken her gruptaki nekroze flep alanının tüm flep alanına göre oranına bakılarak her gruptaki nekroz oranları hesaplandı. Nekroz oranları karşılaştırıldığında botulinum toksin uygulanan 3. grubun ve daha önce nikotinize edilen 4. grubun, kontrol grubu ve nikotin grubuna göre anlamlı ölçüde nekroz oranlarının daha düşük olduğu görüldü. Bu durum toksin uygulamasının perforatör fleplerde sağkalım üzerine olumlu etkilerini işaret etmektedir. Kontrol grubu ve nikotin grubu arasında nekroz oranları farklı olsada istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Gen ekspresyon analizinde ise mRNA düzeyleri hesaplanarak gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Yapılan karşılaştırma sonucunda ise botulinum toksin uygulanan 3. grubun ve daha önce nikotinize edilen 4. grubun, kontrol grubuna göre VEGF alfa ekspresyonunda fark görülmezken, CD34 ve HIF 1 alfa düzeyleri anlamlı olarak düşük hesaplandı. Bu durumun son ürün olan CD 34 ve HIF 1 alfa proteinlerin üretilmesiyle negatif feed back mekanizması ile mRNA gen ekspresyonunun azalmasını işaret ettiğini düşünmekteyiz. Çalışmanın bu yönü eksik olmakla birlikte western blot tekniği ile son ürünlerin değerlendirilip karşılaştırılmasının daha anlamlı olacağını düşünmekteyiz. Kontrol grubu ile nikotin grubu karşılaştırıldığında gen ekspresyon açısından anlamlı fark bulunamadı.

Histopatolojik değerlendirmede ise gruplar arasında; inflamatuvar hücre sayısı bakımından, fibroblast hücre sayısı bakımından ve dermisteki kollajen yoğunluğu açısından anlamlı fark bulunamadı. Fakat yeni oluşan damar sayısı bakımından kontrol ve nikotin grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu. Kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu, kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu

karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu. Bu durumun önceki çalışmalara paralel olarak botulinum toksin uygulamasının anjiogenezi arttırdığını düşündürmektedir.

İmmunhistokimyasal değerlendirmede ise; CD34 ve HIF 1 alfa açısından kontrol grubu ve nikotin grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır, kontrol grubu ve botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmuştur, kontrol grubu ve nikotin + botulinum toksin grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu. Bu durumun önceki çalışmalara paralel olarak botulinum toksin uygulamasının anjiogenezi HIF1 alfa yolunu kullanarak arttırdığını düşünmekteyiz. VEGF antikoru ile yapılan immün boyamalar farklı sulandırma oranları ve farklı sürelerde tutulmasına rağmen başarılı olamadığımızdan gruplar arasında karşılaştırma yapamadık.



6. SONUÇLAR

Bu çalışma ile Őu sonuçlara ulaşılmıştır;

1- Bu deneysel çalışmada botulinum toksininin intradermal uygulanmasının perforatör flep yaşayabilirliğini arttırdığı bulunmuştur.

2- Bu deneysel çalışmada botulinum toksininin intradermal uygulanmasının perforatör flepte anjiyogenezi arttırdığı bulunmuştur.

3- Bu deneysel çalışmada botulinum toksininin intradermal uygulanmasının sigara içicilerde de perforatör flep yaşayabilirliğini arttırdığı bulunmuştur.

4- Bu deneysel çalışmada subkutan nikotin uygulamasının perforatör flep yaşayabilirliğini azalttığı bulunmuştur.



7. KAYNAKLAR

1. Thorhe CH. Techniques and principles in plastic surgery. In: Aston SJ, Beasley RW, Bartlett SP, Thorhe CH. (Eds.). *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 6th Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2007.
2. Santoni Rugiu P, Sykes PJ. *A history of plastic surgery*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2007.
3. Hoopes JE. Pedicle flaps-An overview. In: Krizek J, Hoopes JE (Eds.). *Symposium on Basic Science in Plastic Surgery*. St Louis, Mosby. 1976; 28(15): 241-259.
4. Geddes, Christopher R., Steven F. Morris, and Peter C. Neligan. "Perforator flaps: evolution, classification, and applications." *Ann Plast Surg*. 2003; 50.1: 90-99.
5. Taylor, G. Ian. "The angiosomes of the body and their supply to perforator flaps." *Clinics in plastic surgery* 2003; 30.3: 331-342.
6. Gill, Paul S., et al. "A 10-year retrospective review of 758 DIEP flaps for breast reconstruction." *Plast Reconstr Surg*. 2004; 113.4: 1153-1160.
7. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and physiology of skin surgery. In: McCarthy JG. (Ed). *Plastic Surgery*. Philadelphia. WB Saunders, 1990; 275-328.
8. Celik N, Wei FC, Lin CH, Cheng MH, Chen HC, Jeng SF, Kuo YR. Technique and strategy in anterolateral thigh perforator flap surgery, based on an analysis of 15 complete and partial failures in 439 cases. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 109 (7): 2211-2216.
9. Erkan M. Perforatör fleplerde arteriyal supercharging ve venöz superdrainage gerekli mi? Abdominal flep modelinde hemodinamik bir çalışma, (Tıpta Uzmanlık Tezi, Tez danışmanı: Erçöçen AR). Cumhuriyet Üniversitesi. Sivas. 2008.
10. Vedder NB. Flap physiology. In: Mathes SJ (Eds.), *Plastic Surgery*. 2th Edidion. Saunders Elsevier. Philadelphia, 2006; 483-506.
11. Mathes SJ, Hansen SL. Flap classification and applications. In: Mathes SJ (Eds.), *Plastic Surgery*. 2th Edition. Saunders Elsevier. Philadelphia, 2006; 365-481.
12. Taylor GI, Dahar S. Vascular territories. In: Mathes SJ (Eds.), *Plastic Surgery*. 2th Edidion. Saunders Elsevier. Philadelphia, 2006; 317-363.
13. Antia NH. Buch VI. Transfer of an abdominal dermofat graft by direct anastomosis of blood vessels. *Br J Plastic Surg* , 1971; 4; 15.
14. Daniel RK, Willims HB. The free transfer of skin flaps by microvasculer anastomoses. An experimental study and a reappraisal. *Plast Reconstr Surg*, 1973; 52: 16.
15. Thorhe CH. Techniques and Principles in Plastic Surgery. In: Aston SJ, Beasley RW, Bartlett SP, Thorhe CH. (Eds.). *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 7th Edition. 2014

16. Blondeel, Phillip N., et al. "The "Gent" consensus on perforator flap terminology: Preliminary definitions." *Plast Reconstr Surg.* 2003; 112.5: 1378-1383.
17. Koshima I, Soeda S. Inferior epigastric artery skin flaps without rektus abdominis muscle. *Br J Plast Surg.* 1989; 42: 645-648.
18. Hallock GG. Anatomic basis of the gastrocnemius perforator-based flap. *Ann Plast Surg.* 2001; 47(5): 517-522.
19. Wei FC, Celik N. Perforator flap entity. *Clin Plast Surg.* 2003; 30.3: 325-329.
20. Blondeel, Phillip N., et al. "Perforator flap terminology: update 2002." *Clinics in plastic surgery* 2003; 30.3: 343-346.
21. Dancey A, Blondeel PN. Technical tips for safe perforator vessel dissection applicable to all perforator flaps. *Clin Plastic Surg.* 2010; 37: 593–606.
22. Neligan PC, Lannon DA. Versatility of the pedicled anterolateral Thigh Flap. *Clin Plastic Surg.* 2010; 37: 677–681.
23. Pribaz JJ, Chan RK. Where do Perforator flaps fit in our armamentarium? *Clin Plastic Surg.* 2010; 37: 571–579.
24. Demir A, Acar M, Yıldız L, Karacalar A. The effect of twisting on perforator flap viability; an experimental study in rats. *Ann Plast Surg.* 2006; 56: 186-189.
25. Kroll SS. Fat necrosis in free transverse rectus abdominis myocutaneous and deep inferior epigastricperforator flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 106(3): 576-583.
26. Mathes DW, Neligan PC. Preoperative imaging techniques for perforator selection in abdomen-B-based microsurgical breast reconstruction. *Clin Plastic Surg.* 2010; 37: 581-591.
27. Giunta RE, Geisweid A, Feller AM. The value of preoperative doppler sonography for planning free perforator flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105 (7): 2381-2386 .
28. Blondeel, Phillip N., et al. "Doppler flowmetry in the planning of perforator flaps." *British journal of plastic surgery* 1998; 51.3: 202-209.
29. Hallock, Geoffrey G. "Doppler sonography and color duplex imaging for planning a perforator flap." *Clinics in plastic surgery* 2003; 30.3: 347-357.
30. Reinisch JF. The pathophysiology of skin flap circulation: The delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg.* 1974; 54(5): 585-98.
31. Guba Jr, Alexander M. "Study of the delay phenomenon in axial pattern flaps in pigs." *Plast Reconstr Surg.* 1979; 63.04: 550-554.
- 32: Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG. An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89(3): 408-16.

33. Morris SF, Taylor GI. The time sequence of the delay phenomenon: when is a surgical delay effective: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 1995; 95(3): 526-33.
34. Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 104(7): 2079-91.
35. Coşkunfirat OK, Okşar HS, Özgentaş HE. Effect of the delay phenomenon in the rat single - perforator based abdominal skin flap model. *Ann Plast Surg.* 2000; 45: 42-47.
36. Rees R, Punch J, Shaheen K, Cashmer B, Guice K, Smith DJ Jr. The stress response in skin: The role of neutrophil products in preconditioning. *Plast Reconstr Surg.* 1993; 92(1): 110-7.
37. Hopper RA, Forrest CR, Xu H, Zhong A, He W, Rutka J, Neligan P, Pang CY. Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279(2): 666-676.
38. Maldonado C, Stadelmann WK, Ramirez S, Quan EE, Barker JH. Preconditioning of Latissimus Dorsi Muscle Flaps with Monophosphoryl Lipid A. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111(1): 267-74.
39. Hallock GG, Rice DC. Efficacy of venous supercharging of the deep inferior epigastric perforator flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 116(2): 551-555.
40. Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1980; 65(2): 152-158.
41. Awwad AM, White RJ, Webster MH, Vance JP. The effect of temperature on blood flow in island and free skin flaps: an experimental study. *Br J Plast Surg.* 1983; 36(3): 373-382.
42. Wadstrom, Jonas, and Bengt Gerdin. "The influence of body temperature on traumatic vasospasm." *Upsala journal of medical sciences.* 1990; 95(1): 63-74.
43. Liu, Yuen-Jong, et al. "Mild intraoperative hypothermia reduces free tissue transfer thrombosis." *Journal of reconstructive microsurgery* 2011; 121-126.
44. Koenig WJ, Lohner RA, Perdrietz GA, Lohner ME, Schweitzer RT, Lewis VL. Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 90.4:659-664.
45. Özyazgan, Irfan, and Halit Baykan. "The Effect of TENS on Random Pattern Flap Survival in Nicotinized Rats." *Ann Plast Surg.* 2015; 74.3: 365-370.
46. Rothkopf DM, Chu B, Bern S, May JW Jr. The effect of dextran on microvascular thrombosis in an experimental rabbit model. *Plast Reconstr Surg.* 1993; 92(3): 511-515.
47. Lee C, Mehran RJ, Lessard ML, Kerrigan CL. Leeches: controlled trial in venous

compromised rat epigastric flaps. *Br J Plast Surg.* 1992; 45(3): 235-238.

48. Finseth F, Adelberg MG. Prevention of skin flap necrosis by a course of treatment with vasodilator drugs. *Plast Reconstr Surg.* 1978; 61(5): 738-743.

49. Kennedy TJ, Pistone G, Miller SH. The effects of reserpine on microcirculatory flow in rat flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1979; 63(1): 101-110.

50. Cordeiro PG, Santamaria E, Hu QY, Heerdt P. Effects of vasoactive medications on the blood flow of island musculocutaneous flaps in swine. *Ann Plast Surg.* 1997; 39(5): 524-531.

51. Suárez Nieto C, Suárez García MJ, Barthe García P. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flap in the rat. *Br J Plast Surg.* 1992; 45(2): 113-116.

52. Cordeiro PG, Mastorakos DP, Hu QY, Kirschner RE. The protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 100(5): 1227-1233.

53. Goshen J, Wexler MR, Peled IJ. The use of two alpha blocking agents, phenoxybenzamine and phentolamine, in ointment and injection form to improve skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg.* 1985; 15(5): 431-435.

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

55. Angel MF, Schieren G, Jorysz M, Knight KR, O'Brien BM. The beneficial effect of chlorpromazine on dorsal skin flap survival. *Ann Plast Surg.* 1989; 23(6): 492-497.

56. Söylemez F. Birbirinden Farklı Mekanizmalarla Arter, Prekapiller, Ven Düzeyinde Etki Eden Medikal Ajanların Perforator Flep Yasayabilirliğine Etkisinin Araştırılması: Deneysel Çalışma. (Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Tıpta Uzmanlık Tezi) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2010.

57. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. Enhancement of skin-flap survival using nitroglycerin ointment. *Plast Reconstr Surg.* 1984; 73(6): 943-948.

58. Nichter LS, Sobieski MW, Edgerton MT. Efficacy of topical nitroglycerin for random pattern skin-flap salvage. *Plast Reconstr Surg.* 1985; 75(6): 847-852.

59. Emery FM, Kodey TR, Bomberger RA, McGregor DB. The effect of nifedipine on skin flap survival. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 85(1): 61-63.

60. Hira M, Tajima S, Sano S. Increased survival length of experimental flap by calcium antagonist nifedipine. *Ann Plast Surg.* 1990; 24(1): 45-48.

61. Nichter LS, Sobieski MW. Efficacy of verapamil in the salvage of failing random skin flaps. *Ann Plast Surg.* 1988; 21(3): 242-245.
62. Hedén P, Jernbeck J, Kjartansson J, Samuelson UE. Increased Skin Flap Survival and Arterial Dilation by Calcitonin Gene-Related Peptide: A Study in the Pig. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1989; 23(1): 11-16.
63. Saetzler RK, Lehr HA, Barker JH, Kamler M, Galla TJ, Messmer K. Visualization of nutritive perfusion following tourniquet ischemia in arterial pattern skin flaps: Effect of vasoactive medication. *Plast Reconstr Surg.* 1994; 94(5): 652-660.
64. Shah, Ajul, et al. "PDE-5 inhibition improves skin flap viability in rats that are exposed to nicotine." *Microsurgery* 2014; 34.5: 390-397.
65. Ramasastry SS, Waterman P, Angel MF, Futrell JW. Effect of Fluosol-DA (20%) on skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg.* 1985; 15(5): 436-442.
66. Mauad RJ Jr, Shimizu MH, Mauad T, de Tolosa EM. Buflomedil and pentoxifylline in the viability of dorsal cutaneous flaps of rats treated with nicotine. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006; 59(4): 387-392.
67. Tuncer S. Sistemik pirasetam tedavisinin iskemi reperfüzyon hasarına ve vasküler endotelyal büyüme faktörü yanıtına etkisi (Tıpta Uzmanlık Tezi, Tez Danışmanı: Ayhan S). Gazi Üniversitesi. Ankara. 2005.
68. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Narayanan K, Basford RE, Futrell JW. Augmentation of skin flap survival with allopurinol. *Ann Plast Surg.* 1987; 18(6): 494-498.
69. Kuru B, Dinc S, Çamlıbel M, Durmuş E, Alagöl H. Efficacy of postoperative steroids on ischemic skin flap survival in rats. *Eur J Plast Surg.* 2003; 26: 79-81.
70. Schmidt JH, Caffee HH. The efficacy of methylprednisolone in reducing flap edema. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 86(6): 1148-1151.
71. Nakatsuka T, Pang CY, Neligan P, Lindsay WK, Zuker RM. Effect of glucocorticoid treatment on skin capillary blood flow and viability in cutaneous and myocutaneous flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg.* 1985; 76(3): 374-385.
72. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, Ramasastry SS, Kuhns DB, Basford RE, Futrell JW. Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischaemic flap surgery. *British journal of plastic surgery.* 1986; 39(4): 469-472.
73. Morris SF, Pang CY, Lofchy NM, Davidson G, Lindsay WK, Zuker RM, Boyd B. Deferoxamine attenuates ischemia-induced reperfusion injury in the skin and muscle of myocutaneous flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg.* 1993; 92(1): 120-132.

74. Fu W, Jiao X. The effect of mannitol and anisodamin on the prevention of free radical injury to post-ischaemia flaps: an experimental study. *Br J Plast Surg*. 1995; 48(4): 218-221.
75. Cuono CB, Cortes A, Marquetand R, Weisberg V, Armitage IM. Augmentation of experimental skin flap survival via postoperative phosphocreatine replacement. *Surgery*. 1987; 102(2): 263-268.
76. Yokoyama K, Itoman M, Takagishi K, Yamamoto M. Protective effects of coenzyme Q10 on ischemia-induced reperfusion injury in ischemic limb model. *Plast Reconstr Surg*. 1992; 90(5): 890-898.
77. Bayramiçli M. Karın derisi flepleri. *Deneyisel Mikrocerrahi*. 2005; 465-482.
78. Olin, Jeffrey W. "Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease)." *New England Journal of Medicine* 343.12 (2000): 864-869.
79. Lie JT, Tromboangiitis obliteran and smokeless tobacco. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 812-813.
80. Mosley LH, Finseth F. Hand. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. 1977; 9(2): 97-101.
81. Rees TD, Liverett DM, Guy CL. The effect of cigarette smoking on skin-flap survival in the face lift patient. *Plast Reconstr Surg* 1984; 73(6): 911-915.
82. Baker, R.R., Massey, E.D., Smith, G. : An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 2004; 42(1): 53-83, 2004.
83. Forrest CR , Pang CY , Lindsay WK. Pathogenesis of ischemic necrosis in random pattern skin flap induced by long term low dose nicotin treatment in the rat. *Plast. Reconstr Surg* 1991; 87: 518- 528.
84. Forrest CR , Pang CY , Lindsay WK. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random pattern skin flap. *Br J Plast Surg* 1984; 40: 295- 299.
85. Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 2005; 79: 115-124.
86. Benowitz NL, Kuyt F, Jacob B. Circadian blood concentrations during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1982; 32: 758-764.
87. Feyerebend C, Ings RMJ, Russel MAH. Nicotine pharmacokinetics and its application to intake from smoking. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 19: 239-247.

88. Gritz ER, Baer- Weiss V, Benowitz NL, Van Vuyakis H, Jarwick ME. Plasma nicotine and cotinine concentration in habitual smokeless tobacco users. *Clin Pharmacol Ther* 1981; 30: 201-209.
89. Richardson D, Morton R, Howard J. Effects of chronic nicotine administration on RBC velocity in mesenteric capillaries of the rat. *Blood Vessels* 1977; 14: 318.
90. Aronow WS, Swansen AJ. The effect of low- nicotine cigarettes on angina pectoris. *Ann Intern Med* 1969; 71: 599- 601.
91. Auerback O, Carter HW, Garfinkle L, Hammond EC. Cigarette smoking and coronary artery disease. *Chest* 1976; 70: 697- 705.
92. Booyse FM, Ouikowicz G, Quarfoot AJ. Effects of chronic oral consumption of nicotine on the rabbit aortic endothelium. *Am J Pathol* 1981; 102: 229-238.
93. Hladove CJ. Endothelial injury by nicotine and its prevention. *Experientia* 1978; 35: 1585- 1586.
94. Zimmerman M, McGeachie J. The effect of nicotine on aortic endothelium: a quantitative ultrastructural study. *Atherosclerosis* 1987; 63: 33-41.
95. Pittilo RM, Mackie IJ, Rowles PM, Machin SJ, Woolf N. Effects of cigarette smoking on the ultrastructure of rat thoracic aorta and its ability to produce prostacyclin. *Thromb Haemost* 1982; 48(2): 173-176.
96. Armitage AK. Effects of nicotine and tobacco smoke on blood pressure and release of catecholamines from the adrenal glands. *Br J Pharmacol* 1965; 25: 515-526.
97. Seidler FJ, Slotkin TA. Effects of chronic nicotine administration on the denervated rat adrenal medulla. *Br Pharmacol* 1976; 56: 201-208.
98. Su C, Bevan JA. Blockade of the nicotine- induced norepinephrine release by cocaine, phenoxybenzamine and desipramine. *J Pharmacol Exp Ther* 1970; 175: 533-540.
99. Swislocki ALM, Tsuzuki A, Tait M, Khuu D, Fann K. Smokeless nicotine administration is associated with hypertension but not with a deterioration in glucose tolerance in rats. *Metabolism* 1997; 46(9): 1008-1012.
100. Benowitz NL, Gourlay SG. Cardiovascular toxicity of nicotine: Implications for nicotine replacement therapy. *J American College of Cardiology* 1997; 29(7): 1422-1431.
101. Shireman PK, Pearce WH. Endothelial cell function: biologic and physiologic functions in health and disease. *AJR Am J Roentgenol* 1996; 166: 7-13.
102. Conklin BS, Surowiec SM, Ren Z et al. Effects of nicotine and cotinine on porcine endothelial cell function. *J Surg Res* 2001; 95: 23-31.

103. Goligorsky MS, Budzikowski S, Tsukhara H. Cooperation between endothelin and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26: 269-271.
104. Sabha M, Tanus-Santos JE, Toledo JC, Cittadino M, Rocha JC, Moreno H Jr. Transdermal nicotine mimics the smoking-induced endothelial dysfunction. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68(2): 167-174.
105. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
106. Benowitz NL. The role of nicotine in smoking-related cardiovascular disease. *Prev Med* 1997; 26: 412-417.
107. Saareks V. Nicotine-induced changes in eicosanoid synthesis in man. Effects of smoking cessation, nicotine substitution, pyridoxine and nicotinic acid. Tampere: Tampere University Press 2000; 1-33.
108. Folts JD, Bonebrake FC. The effects of cigarette smoke and nicotine on platelet thrombus formation in stenosed dog coronary arteries: inhibition with phentolamine. *Circulation* 1982; 65(3): 465-70.
109. Moffatt RJ, Chelland SA, Pecott DL. Acute exposure to environmental tobacco smoke reduces HDL-C and HDL2-C. *Preventive Medicine* 2004; 38(5): 637- 641.
110. Cluette BJ, Mulligan J, Doyle K, Hagan S et al: Oral nicotine induces an atherogenic lipoprotein profile. *Proc Soc Exp Biol Med* 1986; 182(3): 409-413.
111. Saareks V, Mucha I, Sievi E, Vapaatalo H, et al. Nicotine stereoisomers and cotinine stimulate prostaglandin E2 but inhibit tromboxane B2 and leukotriene E4 synthesis in whole blood. *Eur J Pharmacol* 1998; 353: 87-92.
112. Thomas GA, Davies SV, Rhodes J. Is transdermal nicotine associated with cardiovascular risk? *J R Coll Physicians* 1995; 29(5): 392.
113. Shayna TB, Svetlana MS, Roj SD, Richard FC, Anuska VA. Nicotine aggravates brain postischemic inflammatory response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300: 1518-1529.
114. Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, et al. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sci* 2002; 71: 2807-2820.
115. Yıldız D, Ercal N, Armstrong DW. Nicotine enantiomers and oxidative stress. *Toxicology* 1998; 130: 155-165.

116. Yanpallewar S, Rai S, Kumar M, Chauhan S, et al. Neuroprotective effect Of *Azadirachta indica* on cerebral post-ischemic reperfusion and hypoperfusion in rats. *Life Sci* 2005; 76(12): 1325-1338.
117. Tall AR, Blum CB, Forester GP, Nelson CA. Changes in the distribution and composition of plasma high density lipoproteins after ingestion of fat. *The Journal of Biological Chemistry* 1982; 257(1): 198-207.
118. Zevin S, Gourlay SG, Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin Dermatol* 1998; 16: 557-564.
119. Granger DN, Kvietys PR, Perry MA. Leucocyte- endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71: 67.
120. Kerringan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: A review. *Microsurgery* 1993; 14: 165.
121. Freitas FA, Piccinato CE, Cherri J, Marchesan WG. Effects of pentoxifylline and heparin on reperfusion injury island skin flaps in rats exposed to tobacco. *J Surg Res* 2010; 164(1): 139-145.
122. Aker JS, Mancoll J, Lewis B et al. The Effect of Pentoxifylline on Random-Pattern Skin Flap Necrosis Induced by Nicotine Treatment in the Rat. *Plast Reconstr Surg* 1997;100: 66-71.
123. Shelosky, L. History of the clinical use of Botulinum toxin type A. In Sommer, B. Sattler, G. (Eds.), *Botulinum Toxin in Aesthetic Medicine*. 1st edition. Berlin-Vienna: Blackwell Science, 2001; 1-7.
124. Esra Çelik Soylu, Doktora tezi, Pediküllü kas fleplerinin stabilizasyonunda Botulinum Toksin-A'nın kullanılması T.C.Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği İstanbul 2005.
125. Lam, S.M. The basic science of botulinum toxin. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.* 2003; 11: 431-438.
126. Huang, W, Foster, J.A., Rogachefsky, A.S. Pharmacology of botulinum toxin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000; 43: 249-259.
127. Kane, MAC. Botulinum Toxin. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CH, Sixth Edition. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. Philadelphia: Lippincott WilliamsWilkins, 2007; 475-479.
128. Kirazlı Y, Çeliker R, Elibol B ve ark. Spastisite Konsensus Bildirisi. *Romatol Tıp Rehab.* 2004; 15: 137-147.

129. Levinson, W. Temel Bakteriyoloji. In: Levinson W, Jawetz E, 5. Baskı. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Barış kitabevi, 1999; 34: 97.
130. Cattin T, Govender S. Botulinum toxin for tethering of breast implant. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 116: 686-688.
131. Celik E, Tercan M, Uzunismail A, Sağlam A. Versatility of botulinum toxin: a use in stabilization of pedicled muscle flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117: 462-467.
132. Baumann L, Black L. Botulinum toxin type B (Myobloc). *Dermatol Surg* 2003; 29: 496-500.
133. Davletov B, Bajohrs M, Binz T. Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual Botulinum neurotoxin. *Trends Neurosci.* 2005; 28: 44652
134. Mannor GE. Practical aspects of cosmetic Botulinum toxin. *Int Ophthalmol Clin.* 2005; 43: 99-106.
135. Aoki R. The development of BOTOX –Its history and pharmacology. *Pain Digest*, 1998; 337-341.
136. Aoki RK. Preclinical update of BOTOX (botulinum toxin type -A) purified neurotoxin complex relative to other botulinum toxin preparations. *Eur J Neurology.* 1999; 6: 3-10.
137. Aras MD, Çakıcı A. İnme Rehabilitasyonu İçinde; Oğuz H, Dursun E, Dursun N (yazarlar), Tıbbi Rehabilitasyon, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004; 589-617.
138. Karatepe AG. Spastisite Tedavisi. *Ege Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi.* 2004; 10: 93-102.
139. Klein AW. Complications with the use of Botulinum toxin. *Int Ophthalmol Clin.* 2005; 43: 163-169.
140. Schantz EJ, Johnson EA. Preparation and Characterization of Botulinum Toxin Type A for Human Treatment. In: Joseph Jankovic, Mark Hallet. *Therapy with Botulinum Toxin*, New York: Marcel Dekker: 1994; 41-50.
141. Vartanian AJ, Dayan SH. Complications of botulinum toxin A use in facial rejuvenation. *Facial Plast. Surg. Clin. N. Am* 2003; 11: 483-492.
142. Carruthers JD, Lowe NJ, Menter MA, Gibson J, Eadie N. Double-Blind, Placebo-Controlled Study of the Safety and Efficacy of Botulinum Toxin Type A for Patients with Glabellar Lines. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 112: 21-30.
143. Lowe, N.J. Botulinum toxin type A for facial rejuvenation. *Dermatol. Surg.* 1998; 24: 1216-1218.

144. Kim HS, Hwang JH, Jeong ST, Lee YT, Lee PK, Suh YL, Shim JS. Effect of muscle activity and botulinum toxin dilution volume on muscle paralysis. *Dev Med Child Neurol*, 2003; 45: 200-206.
145. Rohrich RJ, Janis JE, Fagien S, Stuzin JM. The Cosmetic Use of Botulinum Toxin. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 112: 177-187.
146. Allergan Corporation. Botox Cosmetic (Botulinum Toxin Tipe A) Purified Neurotoxin complex. Irvine, Clif: Allergan corporation 2002.
147. Lam DGK, Choudhary S. Use of a Grid to Simplify Botulinum Toxin Injection for Axillary Hyperhidrosis. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 112: 1741-1742.
148. Kane M. Nonsurgical Treatment of Platysmal Bands with Injection of Botulinum Toxin A. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 112: 115-122.
149. Bravo FG, Schwarze HP. Free-style local perforator flaps: concept and classification system. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. , 2009; 62(5): 602-608.
150. Coşkunfirat OK, Ozgentaş HE. Gluteal perforator flaps for coverage of pressure sores at various locations. *Plast Reconstr Surg*. , 2004; 113(7): 2012-2017.
151. Demirtaş Y, Oztürk N, Kelahmetoglu O, Demir A. Pedicled Perforator Flaps. *Ann Plast Surg*, 2009; 63(2): 179-183.
152. Okşar HS, Coşkunfirat OK, Ozgentaş HE. Perforator-based flap in rats: a new experimental model. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 108(1): 125-131.
153. Kim, Sung Young, et al. "The Protective Effects of Botulinum Toxin A Against Flap Necrosis After Perforator Twisting and Its Underlying Molecular Mechanism in a Rat Model." *Ann Plastic Surg*. 2016; 77.2: 242-248.
154. Park, Tae Hwan, et al. "Presurgical botulinum toxin A treatment increases angiogenesis by hypoxia-inducible factor-1 α /vascular endothelial growth factor and subsequent superiorly based transverse rectus abdominis myocutaneous flap survival in a rat model." *Ann Plast Surg*. 2016; 76.6: 723-728.
155. Van Beek AL, Lim PL, Gear AJ. Management of Vasospastic Disorders with Botulinum Toksin A. *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119: 217-226.
156. Neumeister MW, Chambers CB, Herron, MS. Botoks Therapy for Ischemic Digits. *Plast Reconstr Surg*. 2009; 124: 191-200.
157. Karayel, Hikmet, et al. "Prevention of unfavourable effects of cigarette smoke on flap viability using botulinum toxin in random pattern flaps: An experimental study." *Plastic Surgery* 2015; 23.3: 177.

158. Arnold, Peter B., et al. "Inflammatory response and survival of pedicled abdominal flaps in a rat model after perivascular application of botulinum toxin type A." *Plast Reconstr Surg.* 2014; 133.4: 491e-498e.

159. Park, Tae Hwan, et al. "The effects of botulinum toxin A on survival of rat TRAM flap with vertical midline scar." *Ann Plast Surg.* 2015; 74.1: 100-106.

160. Park, Bo Young, et al. "The effect of botulinum toxin B pretreatment to the blood flow in the microvascular anastomosis." *Ann Plast Surg.* 2014; 72.2: 214-219.

