



**T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA MCFARLANE FLEP MODELİNDE
MIDAZOLAMIN FLEP YERİ ÜZERİNDE
ETKİLERİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
DR. UMUT ÖZBEK**

KAYSERİ – 2007



T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA MCFARLANE FLEP MODELİNDE

M DAZOLAMIN FLEP YAKINAMI ÜZERİNDE

ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. UMUT ÖZBEBEK

DANIŞMAN

DOÇ. DR. ATILTAÇ ÇORUH

KAYSERİ – 2007

Ç NDEK LER

	Sayfa No
KISALTMALAR	II
TABLO L STES	III
EK L L STES	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
G R VE AMAÇ	1
GENEL B LG LER	3
FLEPLERLE LG L GENEL B LG LER	3
FLEP NEKROZUNUN NEDENLER VE ÖNLEMENE YÖNEL K	
ÇALI MALAR.....	5
FLEP CANLILI İNİ DE ERLEND RME YÖNTEMLER	7
ANJ OGENEZ.....	8
M DAZOLAM	13
MATERYAL VE METOT	16
BULGULAR	20
SONUÇLAR	20
TARTI MA	25
SONUÇ	31
KAYNAKLAR	32
TEZ ONAY SAYFASI	36

KISALTMALAR

Ang	:	Angiopoietin
ECM	:	Ekstrasellüler Matriks
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü
EPO	:	Eritropoietin
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
GABA	:	Gamma Aminobütirik Asit
GCSF	:	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
HGF	:	Hepatosit Büyüme Faktörü
IL-8	:	Interlökin-8
JNK	:	c-Jun N-terminal Kinaz
MAP	:	Mitojen-aktivasyon Protein
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz
NO	:	Nitrik Oksit
PBS	:	Phosphat Buffered Saline
PLGF	:	Plasental Büyüme Faktörü
PDGF	:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
RHuEPO	:	Rekombinant human erythropoietin
SAPK	:	Stres-Aktivasyon Protein Kinaz
TGF	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör
Tie	:	Tyrosine kinase with Immunoglobulin and Epidermal growth factor homology
VEGF	:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

TABLO L STES

	Sayfa No
Tablo 1 : Flep ya am oranlarını arttırmak için kullanılan farmakolojik ajanlar.....	6
Tablo 2 : Anjiogenik ve anjiogenezi önleyen faktörler	10
Tablo 3 : Gruplardaki flep ya am alanları	21
Tablo 4 : Flep ya am alanlarının kar ıla tırılması.....	21
Tablo 5 : Fleplerden alınan kesitlerdeki yeni olu an damar sayıları	22
Tablo 6 : Fleplerden alınan kesitlerdeki yeni olu an damar sayılarının kar ıla tırılması	22

EK L L STES

Sayfa No

ekil 1	: Derinin venöz drenajı	5
ekil 2	: Midazolamın kimyasal yapısı.....	13
ekil 3	: Rat dorsal Mc Farlane flebi	17
ekil 4	: Fleplerden alınan doku kesitlerinin yerlerinin ematik görünümü..	20
Resim 1	: Kontrol grubundaki ratlarda 5.günde izlenen nekroz alanları	23
Resim 2	: Midazolam grubundaki ratlarda 5.günde izlenen nekroz alanları ..	23
Resim 3	: Kontrol grubunda yeni olu an damarlar	24
Resim 4	: Midazolam grubunda yeni olu an damarlar	24

ÖZET

Giri ve Amaç: Plastik cerrahi teknikleri arasında sık kullanılan flep uygulamalarında, flep nekrozunu azaltmaya yönelik çe itli farmakolojik yöntemler denenmiştir. VEGF'ün flep ya amı üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Midazolamın ise VEGF düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Bu deneysel çalışmanın amacı anestezisi pratiğinde çok sık kullanım alanı bulan midazolamın flep ya amı üzerine olası etkilerini göstermektir.

Materyal ve metod: Ağırlıkları 224–262 gram arası olan 50 adet dişi Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlarla yapılan ön çalışmalar sonrasında, ratlar 10'arlı 2 ayrı gruba ayrıldı. 1.grup kontrol grubu, 2.grup ise midazolam grubu olarak belirlendi. Ratlarda 8x3 cm.lik McFarlane flep modeli kullanıldı. Midazolamı tekrarlayan dozlarda (cerrahi işlemden önceki 2 ve 10. saate, cerrahi işlem sırasında, postoperatif 24. ve 48. saatlerde) uyguladık.

Midazolam intraperitoneal olarak ve 15mg/kg olacak şekilde verildi. Kontrol grubunda ise midazolam yerine aynı sıvı hacminde serum fizyolojik kullanıldı. Postoperatif 5. günde tüm ratlardan kaldırılan fleplerdeki ya am alanları milimetrekare olarak ölçüldü ve bu flepler alınarak 48 saat % 10' luk formaldehit solüsyonu içinde bekletildiler. Her flebin distal, kritik ve proksimal zonlarından alınan tam kat kesitlerden immunohistokimyasal preparatlar hazırlanarak yeni oluşan damar sayıları karşılaştırıldı.

Bulgular: Flep ya am alanları kontrol grubunda ortalama 1071 ± 89.49 mm², midazolam grubunda ise 1080 ± 93.80 mm² olarak hesaplandı. Her iki gruptaki canlı flep alanları karşılaştırıldığında $p > 0.05$ olarak bulundu ve istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi. Immunohistokimyasal olarak yapılan çalışmada ise fleplerin distal zon, kritik zon ve proksimal zonlarından alınan kesitlerdeki damar sayıları her bir büyütme sahasında sayılarak gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Her iki grupta da yeni oluşan damar sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Sonuçlar: Sonuç olarak, tekrarlayan midazolam uygulamasının flep ya am alanlarını arttırmadığını, fleplerden yapılan kesitlerin immunohistokimyasal incelemelerinde ise yeni olu an damar sayıları açısından kontrol grubu ile tedavi grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığını gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Midazolam, büyüme faktörleri, VEGF, anjiogenez, flep.

ABSTRACT

THE EFFECT OF MIDAZOLAM ON FLAP SURVIVAL ON RAT MCFARLANE FLAP MODEL

Background and aim: Flap applications which are often used among plastic surgery techniques, various pharmacologic methods were tested to reduce the flap necrosis. VEGF is known that it has positive effects on flap survival. It was also shown that midazolam increases VEGF levels. Our literature review showed that there are no studies about effects of midazolam on flap survival. The aim of this experimental study is to show the effect of midazolam which is often used in anesthesia practice on flap survival.

Materials and methods: 50 Wistar Albino rat weighing between 224–262 gr were used. The rats were separated into two groups after the pre-studies. Each group has 10 rats. The first group was determined as the control group and the second group as the midazolam group. 8x3 cm of Mc Farlane flap model was used on the rats. Based on this work we used midazolam 2–10 hour preoperation, in operation and postoperative 24–48 hour. Midazolam was applied at dosage of 15 mg/kg intraperitoneally. In the control group however saline was used instead of midazolam. Survival areas of flaps in all rats were calculated as square millimeter in postoperative fifth day. These flaps were taken and have been waited to in 10% of formaldehyde for 48 hours. New formed vessels were compared using immunohistochemical samples of distal, critical, proximal zones of all flaps.

Findings: The rate of flap life for each group was determined by calculating as square millimeter. It was determined that the average life of the control group as $1071 \pm 89.49 \text{ mm}^2$ and in the Midazolam group as $1080 \pm 93.80 \text{ mm}^2$. Comparing the flap life in each group it was found that $p > 0.05$ and was statistically seen as not significant. In the immunohistochemical studies the number of vessels in the distal zone, critical zone and proximal zone were counted in each microscopic area and the

groups were compared. The number of vessels in each group were statistically not significant.

Conclusion: In result it is shown that practicing midazolam doesn't increase flap life rates and that statistically there are no differences between the control group and the treatment group in the immunohistochemical experiments of the cross sections of the flaps.

Key words: Midazolam, VEGF, growth factors, angiogenesis, flap.

G R VE AMAÇ

Plastik cerrahide flep uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır. Flep ya am oranlarını arttırmak için çe itli yöntemler kullanılmı ve farklı teknikler geli tirilmi tir. Doku iskemisi nedeniyle flepte nekroz geli mesi doku transferi sırasında kar ıla ılabilen bir problemdir. Flep kaybı, cerrahi rekonstrüksiyonun önceden tahmin edilemeyen hasta morbidite ve mortalitesini artıran önemli bir komplikasyonudur. Flep planlamasında yapılan hatalar nedeniyle yetersiz kan akımına ba lı olarak ortaya çıkan iskemi, enfeksiyon ve serbest radikaller gibi bir çok etken flep ya amını olumsuz yönde etkilemektedir (1).

Flep ya am oranlarını arttırmak için oksitosin (2), endotelial hücre büyüme faktörü (ECGF) (3), anjiotensin II (AII) (4), basık fibroblast büyüme faktörü (b-FGF) (5), eritropoietin (EPO) (6–9), salvianolik asit-B (Sal B) (10), trombosit kanaklı büyüme faktörü B (PDGF-B) (11), L-arjinin (12), granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör (GM-CSF) (13,14), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β) (15) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) (12,16–18) ile birçok çalı ma yapılmı tir. Bu çalı malarda en etkili anjiogenik molekülün VEGF oldu u gösterilmi se de plazma yarı ömrü 3–5 dakika ile sınırlı oldu u için cerrahi uygulamalarda yer bulamamı tir (18).

Kumiko ve ark. (21) midazolam infüzyonunun rat plazma VEGF düzeylerini uygulamadan 10 saat sonra arttırdı ını ve bu artı ın midazolam infüzyonu devam etti i sürece 12–24 saat arasında da devam etti ini göstermi lerdir.

Midazolamın, VEGF düzeylerini in vivo ve in vitro arttırması ve uzun süre bu etkisini devam ettirmesi nedeniyle biz de bu çalı mamızda midazolamı kullanarak flep ya am alanları ve damar yapıları üzerine olan etkilerini ara tırmayı planladık.

GENEL B LG LER

FLEPLERLE LG L GENEL B LG LER

Flep Tarihçesi

Fleplerin tarihsel geli imini dörde ayırabiliriz (22):

1- *Birinci dönem:* Sekizinci yüzyıldan I. ve II. Dünya Sava ı'na kadar olan dönemdir. Bu dönem pediküllü deri fleplerinin, cerrahi geciktirme yapılmı fleplerin ve tüp pediküllü fleplerin yo unca kullanıldı ı dönemdir

2- *kinici dönem:* 1950'li ve 1960'lı yıllar arasındaki dönemdir. Bu dönem bölgesel aksiyel patern fleplerin özellikle ba -boyun rekonstrüksiyonunda kullanıldı ı dönemdir. Ayrıca, bu dönemin ortalarında kas-deri flepleri, sonlarına do ru kemik-kas-deri flepleri tanımlanmı tır.

3- *Üçüncü dönem:* 1970'li dönemleri içerir. Random ile aksiyel paternli fleplerin arasındaki farklılıkların irdelendi i, kas, kas-deri fleplerinin geli ti i ve serbest fleplerin uygulanmaya ba landı ı dönemdir.

4- *Son dönem:* 1980'lerden sonraki dönemi kapsar. Fasyakütanöz sistem perforatörlerinin tanımlandı ı, osteofasyakütanöz fleplerin geli tirildi i dönemdir. Venöz fleplerin ve perforatör sistemin incelendi i ve perforatör bazlı fleplerin ilk tanımlandı ı ve geli ti i dönem de bu döneme rastlar.

KANLANMALARINA GÖRE FLEP SINIFLAMASI

Fleplerin kanlanmaları farklı iki ana damar grubu ile olur (23).

1-Muskülokütanöz arterler: ki ayrı deri flebinin hazırlanmasına olanak sağlar.

a- Random kütanöz flep: Muskülokütan perforatör ile beslenir.

b- Miyokütanöz flep: Perforatör, kas ile kasın üzerindeki deriyi besler.

2-Septokütanöz arterler: ki ayrı deri flebinin hazırlanmasına olanak sağlar.

a- Fasyakütanöz flep: Fasyakütan arterden beslenir.

b- Aksiyel (Arteriye) flep: Aksiyel bir damardan beslenir.

DERİNİN KANLANMASI

insanda derinin kanlanması muskülokütanöz arterler ve septokütanöz arterler aracılığı ile olur. Muskülokütanöz arterler random patern fleplerin kaldırılabilmesine olanak tanırken septokütanöz arterler, aksiyel patern fleplerin olumasını sağlarlar.

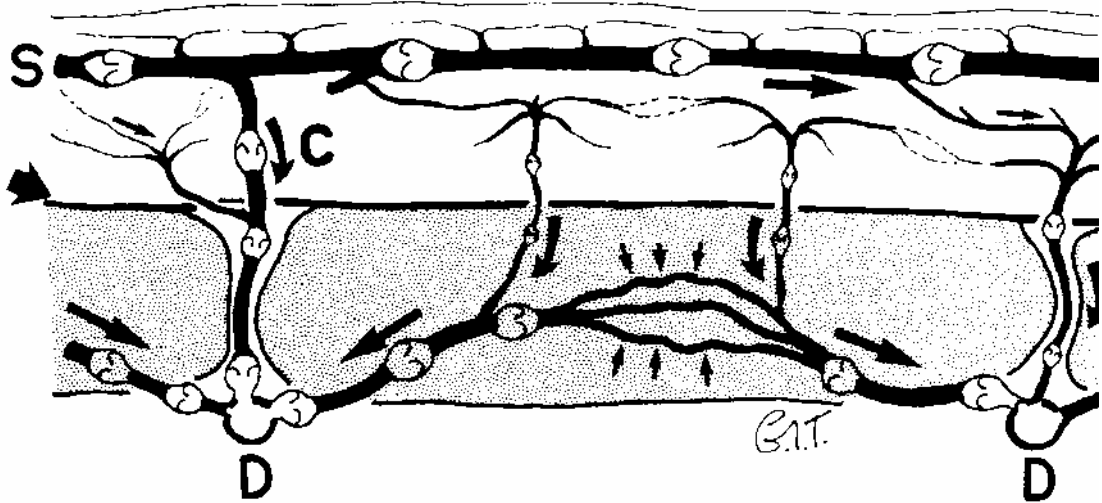
Deri, kan desteğini üç farklı anatomik seviyede bulunan beş ayrı katmanın birbiri ile köprü oluşturmaları ile meydana getirdiği damar ağı ile sağlar. Bu anatomik seviyeleri fasya, subkütan yağ dokusu ve deri oluştururken, damar ağı ise, fasyal pleksus, subkütanöz pleksus, subdermal pleksus, dermal pleksus ve subepidermal pleksustan oluşur.

Deri perfüzyonunu sağlayan mikrosirkülasyon ünitesi arteriol, prekapiller sfinkter, kapiller, postkapiller sfinkter, venül ve bu yapının önünde (proksimalinde) yer alan arteriyo-venöz bağlantıdır. Arteriyo-venöz bağlantıları kanın kapiller yatağına ulaşmasını ve böylece deriye gelen kan akımının artmasını sağlarlar. Sempatik inervasyondan zengindirler. Poiseuille kanununa göre damarlardan geçen kan miktarı, damar çapının dördüncü kuvveti ile orantılıdır. Bu nedenle, damar çaplarını değiştiren vasküler düz kaslar mikrosirkülasyonda önemli rol oynarlar (24).

Deriye gelen kan miktarını düzenleyen iki ana fizyolojik regülasyon sistemi vardır. Bu regülasyon sistemleri derinin mikrosirkülasyonunu değiştirerek deriye gelen kan akımını ayarlarlar. Dolayısıyla deri fleplerinin yaymaları ile direkt ilişkilidirler. Bunlar *sistemik* ve *lokal* kontrol sistemleridir. *Sistemik kontrol* nöral ve hormonal regülasyonla sağlanır. *Lokal kontrol* ise metabolizma yıkım ürünleri, sıcaklık değişimi ve lokal faktörlerin devreye girmesi ile oluşur (24).

Deri ve subkutanöz dokuların venöz drenajı iki sistemle gerçekleşir; birincisi geniş kapasiteli olan yüzeysel subdermal venöz sistem, ikincisi ise kutanöz arterlere eşlik eden vena kominikanterlerdir (25). Derinin venöz drenajı, vena kominikanlar ve vena kominikanterlerden oluşan perforatör venler aracılığıyla derin venlere doğru yönlendirilir (ekil 1).

Kominikan venler subkutanöz venöz pleksusu derin venlere bağlayan büyük venlerdir. Beraberinde kutanöz arter eşlik edebilir. Vena kominikanterler subkutanöz yağ dokunun derin kısmını direnebilir, direkt veya indirekt yollarla derin venlere dökülürler. İndirekt yolu izlerken yağ vena kominikanterese veya kas içindeki venlere dökülerek derin venlere ulaşırlar (24).



ekil 1: Derinin venöz drenajı. D: Derin venöz sistem, S: Yüzeysel venöz sistem, C: Vena communicantes

FLEP NEKROZUNUN NEDENLER VE ÖNLEMENE YÖNELİK ÇALIŞMALAR

Flep kaybı, plastik cerrahide önemli bir sorundur. Kerrigan (25) deri flep kaybını iç ve dış faktörlere bağlamıştır. Dış faktörler; enfeksiyon, arterioskleroz, hipotansiyon, hipovolemi, hipotermi, malnütrisyon gibi sistemik durumları ve basınç, gerilim, damar içi trombus oluşumu ve pedikül katlanması gibi lokal nedenleri içerir.

Bu nedenler iyi planlanmış ameliyat öncesi hazırlıklar ve ameliyat sonrası müdahalelerle önlenebilir.

Bilinen tek iç faktör ise deri flebindeki besleyici kan akımının uygunsuzluudur. Bu durum, flepte kısmi ya da tam iskemiye neden olur ve flep nekrozu olur (26). İç faktörlere bağlı flep kayıplarında birçok farmakolojik ajan hem flep canlılığını artırmak hem de cerrahi geciktirme olayını anlamak için kullanılmıtır. 1960'dan bu yana 75 farklı ajan ve 100'ü aşkın deney, İngilizce literatürde yer almıtır. Tablo 1'de bunların önemli olanları sıralanmıştır.

Tablo 1: Flep yaşam oranlarını arttırmak için kullanılan farmakolojik ajanlar (26,27)

Adrenarjik nöron blokörleri	Guanetidin Bretilyum
Alfa adreno reseptör blokörler	Fenoksibenzamin Fentolamin Timoksamin
Noradrenalin deplesyonu yapanlar	Reserpin
Beta adreno reseptör stimülatörler	soksipirin
Beta adreno reseptör blokörler	Propanolol
Metabolizma modulatörleri	Diflorometilornitin (DFMO)
Prostaglandin ve/veya tromboksan üzerinden etkili ajanlar	Prostasiklin Pentoksifilin Dipiramidol bubrufen
Serbest O ₂ radikal temizleyiciler ve üretim inhibitörleri	Allopürinol Süperoksit dismutaz Merkaptopropionilglisin AICA ribosid

Cerrahi geciktirme bugün için flep yaşam alanlarını en etkin şekilde artıran bir yöntemdir. Her ne kadar son yıllarda, aksiyel pattern flepler tariflenmiş olsa da, cerrahi geciktirmenin sağlamı oldu u flep yaşam oranlarına ulaşamamılardır. Bu nedenle problemlı vakalarda tüm dezavantajlarına rağmen zaman zaman kullanılmı için halen popülaritesini devam ettirmektedirler (26).

FLEP CANLILI İNİ DE ERLENDİRME YÖNTEMLERİ (28)

Subjektif testler

Flep renginin gözlenerek canlılığının de erlendirilmesi sınırlı klinik kullanıma sahiptir. Flep dokusunda tespit edilen sıcaklık, kıl büyümesi subdermal ve dermal kanamanın gözlenmesi de flep canlılığı hakkında fikir verebilir.

Kapiller dolma ise dokuya bası uygulanıp kaldırılarak uygulanan bir test olup, kapiller dolma gözlenmesi deneyimli kişilerce yapıldığı takdirde perfüzyonu gösteren faydalı bir testtir.

Objektif testler

1-Vital boya testleri: Vital boyalar sistemik olarak verildiğinde dokuda yeterli kanlanma var ise deriyi boyarlar. Bu boyalar fluorescein, disulphine mavisi ve vital yeşildir.

2-Radyoizotop Testleri: Dokudan radyoaktif maddenin temizlenmesi esasına dayanırlar. Xe^{133} , Na^{22} , Kr^{85} , Tc^{99} sık kullanılan radyoaktif maddelerdir.

3-Radyoaktif Mikrosferler: Yalnızca hayvan deneylerinde kan akım miktarını belirlemek için kullanılırlar.

4-Elektromagnetik flowmetre: Bu teknik yalnızca hayvan araştırmalarında kullanılmak üzere geliştirilmiş olup kan akımını elektriksel alanda etkilemesi esasına dayanır.

5-Kapilleroskopi: Vasküler yatakta dinamik değişiklikleri belirlemek için mikroskop ve video kamera kullanılarak kapillerlerin incelenmesidir. Özel bir donanım ve deneyim gereklidir.

6-Fotoelektrik testler: Lazer doppler, ışık deplasman sıklığını ölçer. Lazer ışığı sınırlı penetrasyona sahiptir ve yalnızca 1,5 mm derinliğinde erlendirebilir.

7-Doku Biyopsileri: Oksijen, glukoz ve fosforlu bileşiklerin dokular tarafından kullanılmasının tespiti yanısıra laktat ve hidrojen gibi atılım ürünlerinin tespiti de yapılır.

8-Mikroanjiyografi: %5-10 jelatin içeren radyopak mikrosferlerin flep dolaşımına verildikten sonra X ışını altında direkt grafilerinin alınmasıdır.

9-Doku oksijeninin direkt ölçümü: Doku içine gömülen prob ile yapılır.

10- İmmunohistokimyasal yöntemler: Ameliyat sonrası dönemde doku canlılığını, vasküler yapıların durumunu ve yatak ile flep revaskülarizasyonunu de erlendirmek için kullanılır.

ANJİJENİZ

Mevcut kan damarlarından yeni kan damarlarının gelişmesi demek olan anjiyogenez, vücutta doğal olarak ortaya çıkan bir süreç olup, bazı durumlarda patolojik de olabilir. Fizyolojik anjiyogenez; embriyogenez, yarı iyileşmesi ve kadın üreme sisteminde gözlenir. Proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiyogenez kontrol edilemez. İnflamatuvar hastalıklarda (artrit, kronik inflamasyon, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, psöriazis), çeşitli kanserlerde (meme, mesane, kolon, akciğer, nöroblastom, melanom, böbrek, pankreas, uterus, serviks, glioblastom) ve göz hastalıklarında (yaşla ilişkili maküler dejenerasyon, proliferatif retinopati) anjiyogenez patolojik olarak ortaya çıkmaktadır. Periferik arter hastalıklarında ve gecikmiş yarı iyileşmesinde ise anjiyogenezin yetersizliği söz konusu olmaktadır (31,32).

Primordial damarsal sistemin gelişimi "vaskülogenez" olarak tanımlanır ve ilkel damarsal ağın oluştuğu üzere endotelial progenitor hücrelerin embriyonik ve embriyondaki mezoderm içerisinde farklılaşmasını kapsar. Damarsal ağların uzanması ve gelişimi için yeni kapillerlerin oluşması, venüllerden başlayan tomurcuklanma ve önceden oluşan damar ağının yeniden düzenlenerek küçük ve büyük damarları oluştuğu gereklidir. Gelişen damarsal yapıların birbiri ardı sıra olgunlaşmaları ise perivasküler hücrelerin yeniden yapılanmasına ve bazal membran üzerinde yapılanmasını sağlayan faktörlerin varlığına bağlıdır. Embriyonik damarsal sistemin gelişmesi esnasında meydana gelen olaylar ve embriyonun oksijen ve besin ihtiyacı, aynen erişkin bir organizmada anjiyogenez oluşumunda, özellikle hipoksinin aktive ettiği metabolik cevaplarla benzerlik gösterir (31,32).

Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstraselüler matriks ve bu matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynar. Damar endotelini oluşturan endotel hücreleri, anjiyogenez süreci içinde yer alan temel hücrelerdir. Perisitler ile birlikte kapiller damar duvarlarını oluştururlar ve ana damarları, dalları ve kapiller ağın oluştuğu genetik bilgileri içerirler. Erişkin insanlardaki endotelial hücreler tipik olarak düşük turnover hızında olmalarına rağmen, yaşamları boyunca yeni kan damarları oluşturacak çoğalma kapasitesine sahiptirler (31,32).

Anjiyogenik uyarıların artışı ve anjiyogenez inhibitörlerinin azalması anjiyogenezin başlamaktadır. Anjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler Tablo II' de

gösterilmektedir. Yeni damar oluşumu a a ıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir:

1. Bazal Membranın Proteolitik Enzimler Tarafından Yıkılması:

Anjiyogenez süreci damar endotelini dö eyen kollajen, laminin gibi glikoproteinlerden ve heparan sülfat gibi proteoglikanlardan olu an bazal membranın proteolitik yıkımı ile ba lar. Endotel hücreleri göç etmek ve ço almak üzere uyarıldı ında bazal membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir. Normalde, endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka olu tururlar. Ancak anjiyogenez sırasında ço alıp yayılma gösterirler. Anjiyogenik büyüme faktörleri yakınındaki önceden var olan kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere ba lanırlar. Büyüme faktörleri tarafından aktive edilen proteolitik enzimler bazal membranın ve endotel hücrelerini dö eyen ekstraselüler matriks (ECM) bile enlerinin yıkımına neden olur. ECM'nin enzimatik yıkılımını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme izler. Ürokinaz-tip (uPA) ve doku-tip (tPA) plazminojen aktivatörleri plazminojeni plazmine çeviren serin proteazları grubuna aittirler. ECM bile enlerinin yıkılması ve MMP-1, MMP-3, MMP-9, elastaz gibi matriks metaloproteinazlarının aktivasyonu da plazminin i levleri arasındadır.

2. Endotel Hücrelerde Göçme ve Ço alma:

Anjiyogenik uyarı, proteolitik yıkım ile kısa bir süre sonra endotel hücreleri aktive eder. Normal, hastalıklı ya da hasarlı dokularda üretilip salgılanan anjiyogenik büyüme faktörleri kom u dokulara difüzyon yolu ile geçer. Endotel hücreleri ekstraselüler matrikse göç eder ve ço alır. Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metaloproteinaz (MMP) sisteminin i birli i içinde aktive olmasını gerektirir.

3. Kapiller Olu umu ve Damar Olgunlaşması:

Endotel hücre ço almasından sonra ECM bile enlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstraselüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Kapiller filizlenme olu tuktan sonra yine bu filizlenmenin ucunda yeni olu mu ECM'de yıkılma ortaya çıkar ve bu sayede daha ileri yayılımı mümkün olur. Endotelin yol alması ve uzaması sırasında hücre içi ve hücreler arası bo lukta, sonunda kendilerinden damarların olu tuğu lümenler geli ir. Bunun sonucunda ekstraselüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler olu ur (32,33).

Tablo II: Anjiyogenik ve anjiyogenezi önleyen faktörler

Anjiyogenik Faktörler	Anjiyogenezi Önleyen Faktörler
VEGF (Vasküler endotelyal büyüme faktör)	Trombospondin- 1
PGF (Plasental büyüme faktör)	Anjiostatin
FGF (Asidik, bazik fibroblast büyüme faktör)	Endostatin
FGF-3 (Fibroblast büyüme faktör-3)	Vazostatin
FGF-4 (Fibroblast büyüme faktör-4)	VEGF inhibitörü
TGF- (Transforme edici büyüme faktör-) fragmanı	Trombosit faktör-4
TGF- (Transforme edici büyüme faktör-)	Prolaktin derivesi
EGF (Epidermal büyüme faktör)	Restin
HGF (Hepatosit büyüme faktör)	Proliferinle ilgili protein
TNF- (Tümör nekroz faktör-)	Interferon- -
PDGF (Trombosit kaynaklı büyüme faktör)	Anjiopoetin-2
GCSF (Granülosit koloni uyaran faktör)	Antitrombin-3 fragmanı

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF): Özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir. Endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve farklılaşmasına neden olur. VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülojeniz ve anjiogenez için önemli ve gereklidir. Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır (34).

Üyeleri ve Yapısı

Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri (PDGF) süper ailesinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Aynı zamanda VEGF ailesinin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Placenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PIGF) adı verilen altı üyeden meydana geldiğini göstermiştir (34).

VEGF-A geni, 6. kromozomda kodlanmıştır. Aynı zamanda Human-VEGF olarak bilinir. VEGF-A bazı makalelerde sadece VEGF olarak adlandırılmaktadır.

VEGF-B, başlangıçta VEGF-A ile %23'ü homologdur. VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol alır.

VEGF-C, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 amino asitten oluşur. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogenez) rol oynamaktadır.

VEGF-D, 334 amino asitten oluşur ve VEGF-A'ya %31 oranında aynı amino asitler içeren bir proteindir. C-terminal uçlarında zengin sistein domainleri içerir. Burada VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak VEGF-C ile benzeri leveller yapar.

VEGF-E, VEGF-A ile amino asit dizilimi %25 oranında aynı olan bir polipeptittir. Güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür. VEGFR-1'e bağlanmayı başaramaz ama VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etkisini gösterir.

PIGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahiptir. Daha sonra yeni amino asitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında benzer ve 152 amino asit içeren son ekli oluşur. VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir.

VEGF Sentezi

Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır. Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde oldukça yükselir. Yetimkinde alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede

de olsa karaciğer ve beyinde VEGF, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde ise VEGF yapımına ait mRNA'ların sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'ün demonstrasyonu için yapılan immunositokimyasal çalışmalarda aktive makrofajlarda, arteriollerini çevreleyen fibroblastlarda, bronşiyol, koroid pleksus ve renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir.

VEGF mRNA'sının transkripsiyonu, PDGF-BB, FGF-7, EGF, TNF, TGF- β 1 ve interleükin- β 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Böylece bu maddelerin mitojenik olmadığı, VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir.

Ayrıca protein büyüme faktörlerinin haricinde, forbol esterleri ve prostaglandin E₂ gibi bazı mediatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri gösterilmiştir.

Hipoksi, belki de, hem VEGF hem de reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiyogenezi başlatan en etkili uyarılardan biridir. Buna örnek olarak büyüyen tümörlerin hipoksik bölgelerinin oluşması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilebilir. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, karbonmonoksit tarafından da inhibe edilmektedir. Ayrıca düşük pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır (34).

VEGF kullanılarak yapılan deneysel çalışmalarda VEGF'in fleplerde hem yama oranlarını hem de yeni oluşan damar sayılarını arttırdığı gösterilmiştir (12,16–20).

DİR ANJİJENİK FAKTÖRLERİN ÖZELLİKLERİ :

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF): Primer kaynağı submaksiller glandlar ve Brunner's glandlarıdır. Polipeptit yapılı olup trombositlerin alfa granüllerinde bulunur ve trombosit degranülasyonu sırasında salgınır. Epitel hücreler, endotel ve fibroblastlar için kemotaktiktir. Anjiyogenezi ve kollagenaz aktivitesini uyarır (35).

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF): Makrofajlardan, lenfositlerden ve damar endotelinden salgılanır. Mezenkimal hücreler için mitojendir. Endotel proliferasyonu ve motiliteyi arttırarak yeni damar oluşumunu hızlandırarak anjiyogeneizde etki eder. Ayrıca heparinin etkilerini güçlendirmek, kollajen sentezini uyararak, yaranın kontraksiyonunu ve epitelizasyonu sağlamak ve fibronektin ve proteoglikan sentezini uyararak adhezyonu kolaylaştırmak gibi etkileri vardır (36).

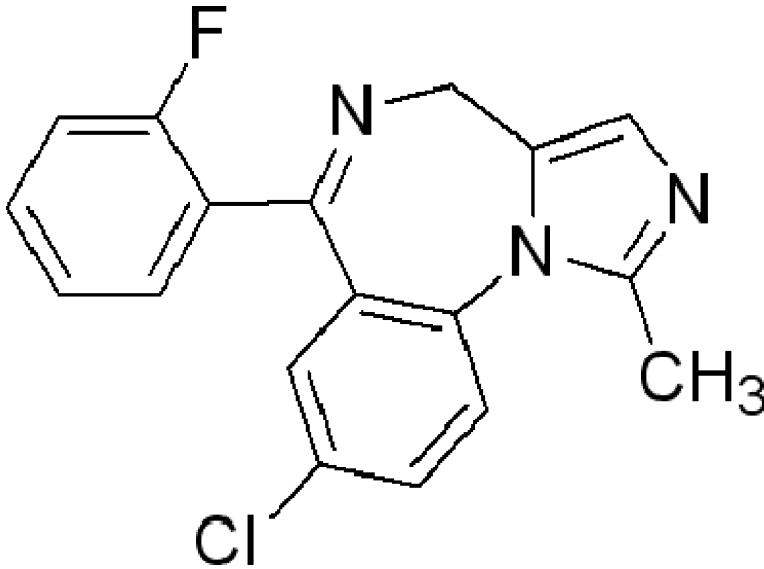
Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF): Trombositlerin alfa granülleri içinde bulunur. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF benzeri büyüme faktörleri salgırlar. Makrofajlar ve polimorf nüveli lökositlerin kemotaksisini uyarır. Fibroblast ve düz kas hücrelerinde hem kemotaksis hem mitogenezi uyarır. Kollajen ve fibronektin sentezini uyarır, ayrıca kollajenaz aktivitesini artırır (37).

Transforme Edici Büyüme Faktörü-β (TGF-β): Trombositler, makrofajlar, lenfositler, kemik ili i, böbrek tubülü gibi farklı dokulardan izole edilmi tir. Trombositlerin alfa granülleri içinde yo un miktarda bulunur, hasarlanan bölgede degranülasyonla salınır. Dü ük dozda anjiogenik, yüksek dozda antianjiogenik özellikler gösterir (38).

Tümör Nekroz Faktörü - Alfa (TNF): Aktive monosit, makrofaj, nötrofil ve endotelial hücrelerden salınır. Kanser ka eksisi ve endotoksik okta yer alır. Ate yükseltici özelli i bulunur. Dü ük dozda endotelial hücre ço almasını ve tubul olu umunu sa larken, yüksek dozda zıt etki gösterir (39).

M DAZOLAM

Midazolam (8- Kloro - 6- (2-florofenil) - 1 - metil - 4H -imidazo[1,5a] [1,4] benzodiazepin hidroklorid), imidazobenzodiazepinler ailesine ait olup, klasik benzodiazepinlerden imidazol halkası ta ımasıyla ayrılır. Benzodiazepin grubunun en yeni ilacıdır ve 1976' da Fayer ve Walser tarafından bulunmu tur (40,41).



ekil 2: Midazolamın kimyasal yapısı (C₁₈H₁₃ClFN₃ · HCl)

Midazolamın imidazol halkası, dü ük pH düzeylerinde bir hidrojen iyonunun eklenmesine olanak sa lar. Bu nedenle midazolam dü ük pH'da suda çözünür ve stabil bir sulu solüsyon olarak hazırlanabilir. Fizyolojik pH'da molekül bu yükünü kaybederek lipofilik hal alır ve kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçer (8).

Midazolam anksiyolitik, hipnotik, antikonvülzan, kas gev etici ve anterograd amnezik etki gibi karakteristik benzodiazepin özelliklerine sahiptir. Diazepamdan 1,5 -2 kat daha güçlüdür. Midazolam tahminen di er benzodiazepinler gibi glisine benzer nörotransmitteri arttırarak anksiyolitik etki yapar. Anksiyolitik etki gücü, beyin sapındaki glisin reseptörlerine olan afinitesiyle ili kilidir (63). Midazolamın antikonvülzan etkisi farelerde gösterilmi tir. Muhtemel mekanizması beyinde motor dola ım üzerine GABA' nın artmı etkisidir (64).

Midazolamın motor performansı azalttı ı hayvan deneylerinde gösterilmi tir. Di er benzodiazepinlere benzer kas gev etici etkisi vardır. Bu etki spinal kordda glisin reseptörleri aracılı ıyla olur (64).

Farmakokinetik

Midazolam, di er benzodiazepinlerden, etkisinin hızlı ba laması ve kısa sürmesi ile ayrılır. Oral alımında 0,5–1 saat sonra maksimum plazma düzeyine ula ır. ntramusküler uygulamadan sonra sedatif etki 15 dk. içinde ortaya çıkmakta olup maksimal etkinlik 45 dakikada görülür. Eliminasyon yarı ömrü 1,5–3 saattir. Proteinlere ba lanma oranı %96'dır (40,42).

Metabolizma ve eliminasyon

Midazolamın eliminasyon hızı, tüm uygulama yollarında yakla ık olarak aynıdır. Midazolamın imidazol halkası, ilacın karaci erde sitokrom P450 3A4 enzimi aracılı ı ile hızla inaktif metabolite yıkılmasını mümkün kılar. Bu iki adımda olu ur: hidroksi metabolizması ve glukoronid formasyonu. Hidroksi metabolizması üç farklı ürüne yol açar (40).

1. -hidroksi-midazolam
2. 4-hidroksi-midazolam
3. , 4-hidroksi-midazolam

Plazmadaki ana metabolit -hidroksi-midazolamdır. Bu metabolit bazı farmakolojik aktivitelere sahiptir ancak idrarla atılmadan önce hızla glukuronidizasyona u raması nedeniyle midazolamın klinik etkilerine katkıda bulunmaz (40).

Uygulama Alanları

Midazolam genellikle premedikasyon, sedasyon, anestezi indüksiyonu ve total intravenöz anestezi için kullanılır. (43)

ORGAN S STEMLER NE ETK LER

Kardiyovasküler: Midazolamın uyku dozları sistolik, diyastolik ve ortalama arter basıncında bir miktar azalma yaparken, nabız basıncında belirgin bir de i ime yol açmaz. Miyokardiyal oksijen gereksinimini belirgin olarak azaltır. (43).

Solunum sistemi: Hipoksiye solunumsal cevabı deprese eder (43).

Santral sinir sistemi: Midazolam serebral oksijen tüketimini, serebral kan akımını ve intrakraniyal basıncı azaltır.

Endokrin sistem: Strese ba lı epinefrin artı nını minimale indirir.

M DAZOLAMIN VEGF PLAZMA DÜZEYLER ÜZER NE ETK LER

Kumiko ve ark. (21) rat ve A-10 (fetal rat aort düz kasından elde edilen) hücre kültüründe propofol, ketamin ve midazolamın VEGF düzeyleri üzerine olan etkilerini ara tırmı lardır. Rat plazmasında midazolamın verilmeye ba ladıktan sonraki 10- 12 saat arasında VEGF düzeylerini arttırdı nı, ancak propofolün arttırmadı nı göstermi lerdir. A-10 kültür hücrelerinde ise midazolamın 72 saate kadar zamana ba lı olarak VEGF salınımını arttırdı nı ancak propofol ve ketaminin bu etkiyi göstermedi ini ortaya koymı lardır. Damar düz kas hücrelerinin VEGF için esas kaynak olmalarından yola çıkarak midazolamın aktif metaboliti olan - hidroksi-midazolamın A-10 kültür hücrelerinde VEGF salınımını arttırdı nı ve bu artı nı bazı zaman dönemlerinde olması gerekti ini belirtmi lerdir. Sürekli midazolam infüzyonu ile rat plazma VEGF de erlerinin 50-150 ng/ml arasında seyretti ini (serbest konsantrasyon 13,9-41,4 ng/ml) ancak A-10 kültür hücrelerinde ise aynı etki için klinikte kullanılan düzeylerin üzerinde midazolam verilmesi gerekti ini belirtmi lerdir (21).

Bu çalı ma sonuçları, klinik olarak in vivo yarı ömrü çok kısa olması nedeniyle kullanım alanı bulamayan VEGF'nin uzun süre salınımını sa laması ve belirli bir süre plazma VEGF seviyelerini yüksek tutması açısından son derece önemlidir.

MATERYAL VE METOT

Bu deneysel çalı ma, Tıp Fakóltesi Deneysel ve Klinik Ara tırma Kurulu (proje no: TT-05-14) ve Tıp Fakóltesi Etik Kurulu izniyle Erciyes Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hakan etinsaya Deneysel ve Klinik Ara tırma Merkezinde 01 Mayıs 2006 ile 04 Aralık 2006 tarihleri arasında yapıldı.

Çalı mada, a ırlı ı 224-262 gram olan 50 adet di i Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Tüm ratlar standart rat yemi ve su ile beslendi, ı ık düzeni 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olan ve 21 ± 3 °C sıcaklıkta tutuldular.

A- ÖN ÇALI MALAR:

1- Midazolam tek ba ına aneljezi sa lamayaca ı için ratlarda ketaminin flep ya amı üzerine etkisi olmadı ını gösteren çalı madan yola çıkararak (44) kontrol grubunda sadece ketaminle, midazolam grubunda ise ketamin ile beraber midazolamla anestezi uygulanmasına karar verildi.

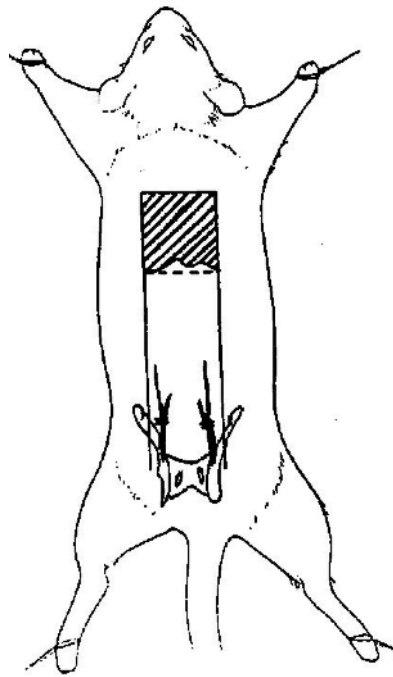
Deneklerde midazolam dozu ve ketaminle beraber uygulanacak olan midazolam dozu için ön çalı malar yapıldı ve doz aralı ı belirlendi. Midazolam ve ketaminin beraber kullanılaca ı grup için midazolamın 15 mg/kg, ketaminin de 15 mg/kg dozunda aynı anda güvenli bir ekilde verilebilece i saptandı. Daha yüksek dozlarda midazolam kullanıldı ında ise ratların bunu tolere etmedi i ve öldükleri

saptandı. Kontrol grubunda ise ketamin dozu 90 mg/kg olarak belirlendi. Teknik imkânsızlık ve rat kuyruk veninden tekrarlayan enjeksiyonlarda ortaya çıkan trombüse ba lı tıkanma nedeniyle midazolamı intraperitoneal yolla uygulamaya karar verdik.

2- Ratların sırt bölgesinde, flep kaldırılacak alanlarda laser doppler flowmeter (Biopac-LDF-100 A) ile kan akımları ölçülerek de erlendirildi. Ancak elde edilen kan akımı sonuçlarının, çe itli parametrelerle birlikte de erlendirilmesine ra men istatikselsel olarak, farklı alanlarda benzer sonuçlar vermesi veya aynı alanda farklı denemelerde farklı sonuçlar vermesi nedeniyle güvenilir olmayaca ı kanaatine varılarak laser doppler flowmeter ile yapılacak olan flep kan akımındaki de i imlerin saptanması yöntemi çalı madan çıkartıldı. Parametre olarak immunohistokimyasal çalı manın ve flep nekrozunun makroskobik olarak de erlendirilmesinin uygun olaca ına karar verildi.

B-DENEY PLANI:

Denekler her bir grupta 10 rat olacak ekilde kontrol ve midazolam gruplarına ayrıldı. Flep modeli olarak McFarlane'in rat sırtında tarif etti i model seçildi (ekil 3) .



ekil 3: Rat dorsal Mc Farlane flebi

Kontrol grubu

Ratlara cerrahi müdahaleden 10 ve 2 saat önce intraperitoneal yolla 1cc serum fizyolojik verildi. 90 mg/kg dozunda ketamin intraperitoneal verilerek anestezi sağlandı ve daha sonra 1 cc serum fizyolojik intraperitoneal yoldan verilip operasyona geçildi. Ratların sırt dorsal bölgeleri elektrikli tra makinesi ile temizlendikten sonra %10'luk povidine-iodine solüsyonu, sonrasında da steril serum fizyolojik ile silindi ve steril örtüler ile örtüldü. Ratların sırtından iliak kanatlardan ba layan kaudal bazlı 8 x 3 cm boyutlu flep, 15 no. bistüri ile deri, derialtı ve pannikulus karnosus geçilerek kaldırıldı. Fleplerin random patern olmaları için, iliak kanatların süperior kenarından bilateral olarak flebe giren damarlar kesildi. Kaldırılan flepler yerlerine 4/0 ipekle suture edildi. Postoperatif 24 ve 48'inci saatlerde yeniden 1 cc serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi. Postoperatif 5'inci günde ratlar lethal doz tiopental sodyumun intraperitoneal yolla verilmesi ile kurban edildi. Fleplerdeki canlı ve nekroz gelişen alanlar milimetrik bölümlü transparan film kullanılarak ölçüldü. Daha sonra flepler eksize edilerek immunohistokimyasal değerlendirme için % 10' luk formaldehit solusyonunda 48 saat bekletildiler.

Midazolam grubu

Ratlara cerrahiden 10 ve 2 saat önce intraperitoneal olarak 15 mg/kg midazolam verildi. Kontrol grubunda uygulanan serum fizyolojik miktarının 1 cc olması nedeniyle gruplar arasında e it volüm sağlamak için ratların a ırlıklarına göre uygulanan midazolam dozu hesaplandıktan sonra uygulanacak olan midazolamın sıvı hacmi her uygulamada serum fizyolojik ile 1 cc'ye tamamlandı. Cerrahi i leme ba lamadan önce 15 mg/kg dozunda ketamin ve 15 mg/kg midazolam intraperitoneal olarak verilerek anestezi sağlandı. Daha sonra kontrol grubunda uygulanan cerrahi i lem aynı ekilde tekrar edildi. Postoperatif 24 ve 48'inci saatlerde yeniden 15 mg/kg midazolam serum fizyolojik ile 1cc'ye tamamlandıktan sonra intraperitoneal olarak verildi. Postoperatif 5'inci günde ratlar lethal doz tiopental sodyumun intraperitoneal yolla verilmesi ile kurban edildi. Fleplerdeki canlı ve nekroz gelişen alanlar milimetrik bölümlü transparan film kullanılarak ölçüldü. Daha sonra flepler eksize edilerek immunohistokimyasal değerlendirme için % 10' luk formaldehit solusyonunda 48 saat bekletildiler.

mmunohistokimyasal çalı ma

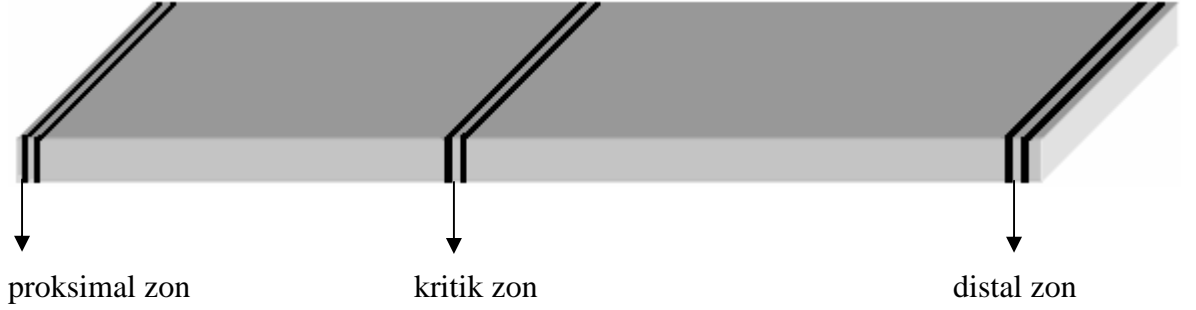
Her iki grupta tüm flepler 48 saat % 10'luk formaldehit içinde bekletildikten sonra yeni olu an damar sayıları açısından immunohistokimyasal yöntem kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalında incelendi.

Her iki gruptaki tüm fleplerden, distal zondan, kritik zondan ve proksimal zondan olmak üzere üçer adet tam kat kesit alındı. Ortamda midazolam ve hipoksiye ba lı olarak yükselmesini bekledi imiz VEGF etkisiyle fleplerde özellikle sa lam dokudan nekrotik dokuya geçi in oldu u kritik zonda yeni damar olu umunun en fazla olmasını bekledik. Aynı ekilde proksimal zondan ve nekroz geli meden önce olu an yeni damar yapılarını da belirlemek için de distal zondan tam kat kesitler alındı.

Dokular tespit edildikten sonra parafin bloklar hazırlandı. Lizinli lama 4 mikronluk kesitler alındı. Daha sonra lamlar 60 derece ısıdaki etüvde 1 saat bekletilip, ksilol solüsyonu içine alınıp burada 15 dakika bekletildiler. % 100 etanolde iki kez 3 dakika, %95 etanolde 3 dakika, % 70 etanolde 3 dakika bekletildikten sonra distile suda 10 dakika yıkandılar. Tripsin solüsyonu damlatılıp 10 dakika beklenen preparatlar distile su ile yıkandılar. Antijen retrieval solüsyonu içinde 10 dakika % 50 'lik güç seviyesinde mikrodalgada ısıtıldı ve so umaya bırakıldı. 5 dakika distile suda yıkandı. % 3'lük hidrojenperoksit damlatılıp 10 dakika bekletildi. 5 dakika PBS'te yıkandı. VEGF antikoru damlatılıp 30 dakika beklendi. 10 dakika PBS'te yıkandı. Streptavidin damlatılıp 10 dakika beklendi. 10 dakika PBS'te yıkandı. Kromojen damlatılıp 10 dakika bekletildi. 10 dakika distile suda yıkandı. Meyer hematoksilen damlatılıp 2 dakika bekletildi. Alkolde 10 dakika, ksilolde 15 dakika bekletildi. Daha sonra balsam ile kapatılıp 40 büyütme ile mikroskopta yeni olu an damarlar sayıldı.

Kesitlerde yeni olu maya ba layan damar yapılarının lümensiz ya da kısmen lümenli ve kahverengi a ırlıkta boyanan epitel adacıkları ekinde belirdi i gözlemlendi. Her gruptan yapılan kesitlerin tamamında en fazla boya tutan 5 alan sayıldıktan sonra ortalamaları alınarak yeni olu an damar sayıları saptandı. Resim 3' te kontrol grubunda, Resim 4' te ise midazolam grubunda yeni olu an damarlar gösterilmi tir.

Verilerin istatistiksel de erlendirmesi Microsoft Windows 98 i letim sistemi altındaki SPSS 10. 0 istatistik programı kullanılarak unpaired *t* testi ile yapıldı ve $p < 0.05$ de eri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



ekil 4: Fleplerden alınan doku kesitlerinin yerlerinin ematik görünümü

BULGULAR

Postoperatif dönemde fleplerde ve insizyon hatlarında enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Ratlardan hiç birisi ölmedi ve buldukları ortam koşullarında sıcaklık, ılk ve nem oranlarında bir değişim olmadı. Üçüncü günde fleplerde nekroz belirginleşti ve beşinci günde demarkasyon hattı oluştu. Resim 1’de kontrol grubundaki, Resim 2’de ise midazolam grubundaki nekroz alanları izlenmektedir.

SONUÇLAR

Flep yaşam alanları

Her iki grupta da milimetrik bölümlü transparan film kullanılarak flep üzerindeki canlı alan çizilip ölçülerek milimetrekare olarak hesaplandı. Tablo 3’te gruplardaki flep yaşam oranları gösterilmiştir. Daha sonra ortalamaları ve standart sapmaları bulundu. Kontrol grubunda ortalama yaşam alanı $1071 \pm 89.49 \text{ mm}^2$, midazolam grubunda ise $1080 \pm 93.80 \text{ mm}^2$ olarak bulundu. Her iki gruptaki canlı flep alanları karşılaştırıldığında ise yaşam alanları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız kabul edildi ($p > 0.05$). Tablo 4’te bulunan değerler, ortalamaları ve standart sapmaları gösterilmektedir.

Her iki grupta da yeni oluşan damar sayıları Tablo 5’te gösterilmiştir. Gruplar arasında yeni oluşan damar sayıları arasındaki fark ise Tablo 6’da gösterildiği gibi istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Tablo 3: Gruplardaki flep ya am alanları (mm²)

Rat No	Midazolam grubu	Kontrol grubu
1	925	960
2	960	930
3	1027	1016
4	1053	1045
5	1073	1053
6	1083	1082
7	1110	1110
8	1175	1106
9	1194	1200
10	1200	1208
Ortalama \pm SD	1080 \pm 93.80	1071 \pm 89.49

Tablo 4: Flep ya am alanlarının kar ıla tırılması

	Kontrol grubu (X \pm SD)	Midazolam grubu (X \pm SD)	p
Ya am alanları (mm ²)	1071 \pm 89.49	1080 \pm 93.80	p >0.05

Tablo 5: Fleplerden yapılan kesitlerdeki yeni olu an damar sayıları

											Ortalama
M 1	28	60	35	26	38	18	25	63	38	42	37.30
M 2	40	72	46	46	59	45	45	45	35	86	51.90
M 3	15	40	32	33	40	32	30	25	23	28	29.80
K 1	25	87	75	35	18	58	55	42	62	55	51.20
K 2	32	62	88	65	42	60	60	55	43	66	57.30
K 3	16	22	50	45	38	55	39	38	38	35	37.60

M 1: Midazolam grubu distal zon

M 2: Midazolam grubu kritik zon

M 3: Midazolam grubu proksimal zon

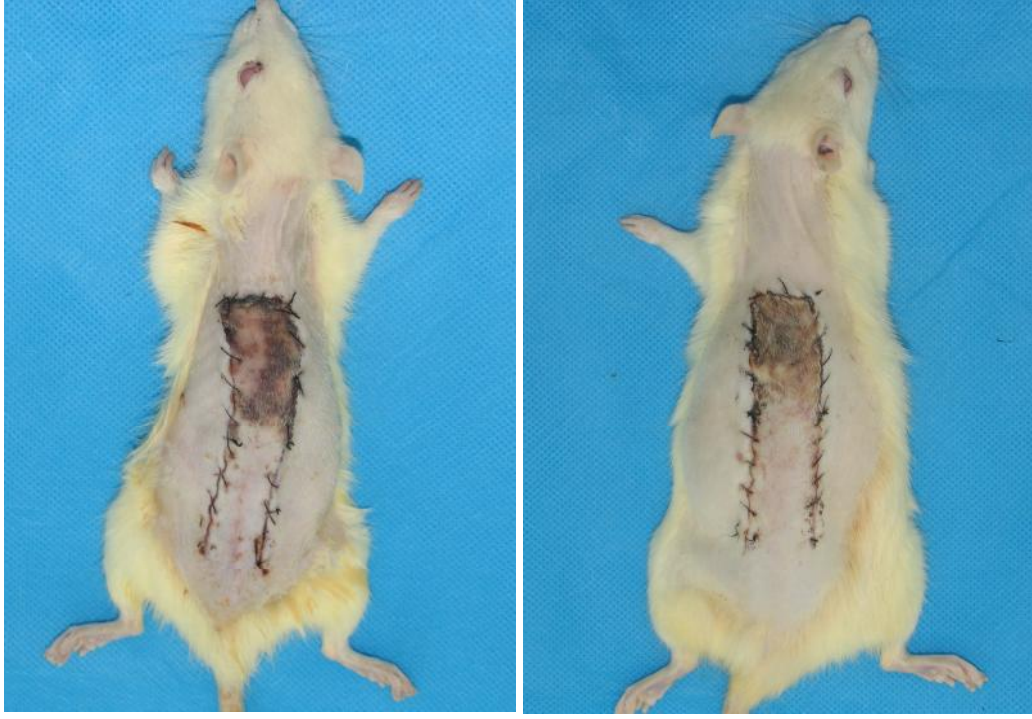
K 1: Kontrol grubu distal zon

K 2: Kontrol grubu kritik zon

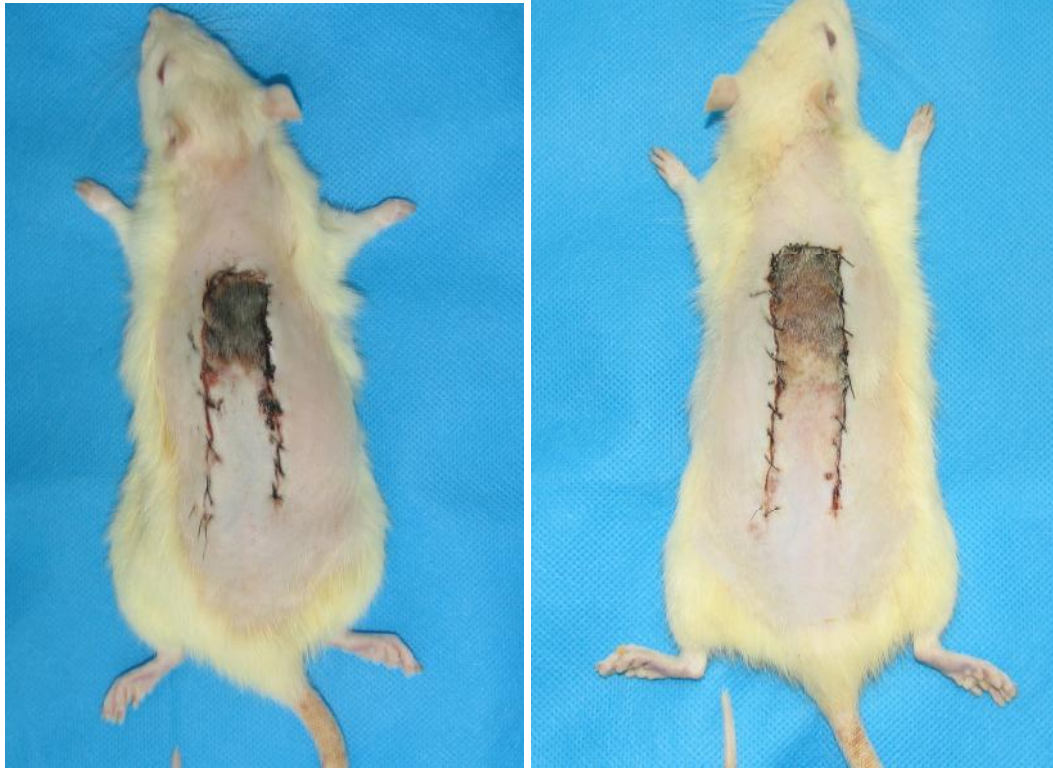
K 3: Kontrol grubu proksimal zon

Tablo 6: Fleplerden alınan kesitlerdeki yeni olu an damar sayılarının karşılaştırılması

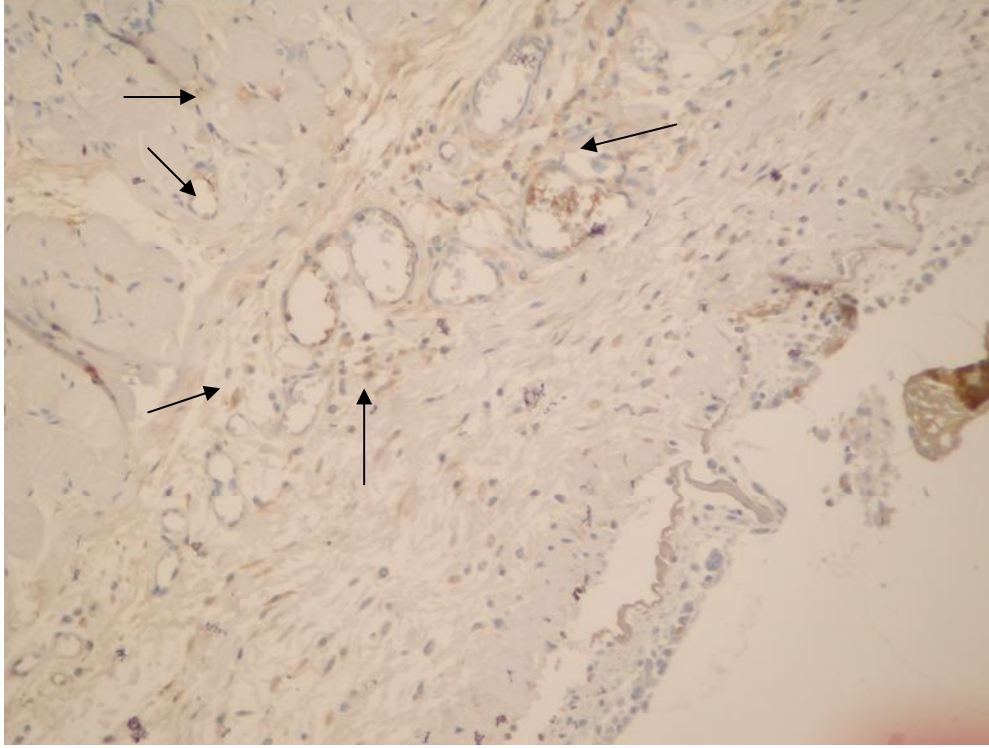
	Kontrol grubu (X ± SD)	Midazolam grubu (X ± SD)	p
Distal zon	51.20 ± 21.53	37.30 ± 14.69	p >0.05
Kritik zon	57.30 ± 15.62	51.90 ± 15.83	p >0.05
Proksimal zon	37.60 ± 11.69	29.80 ± 7.59	p >0.05



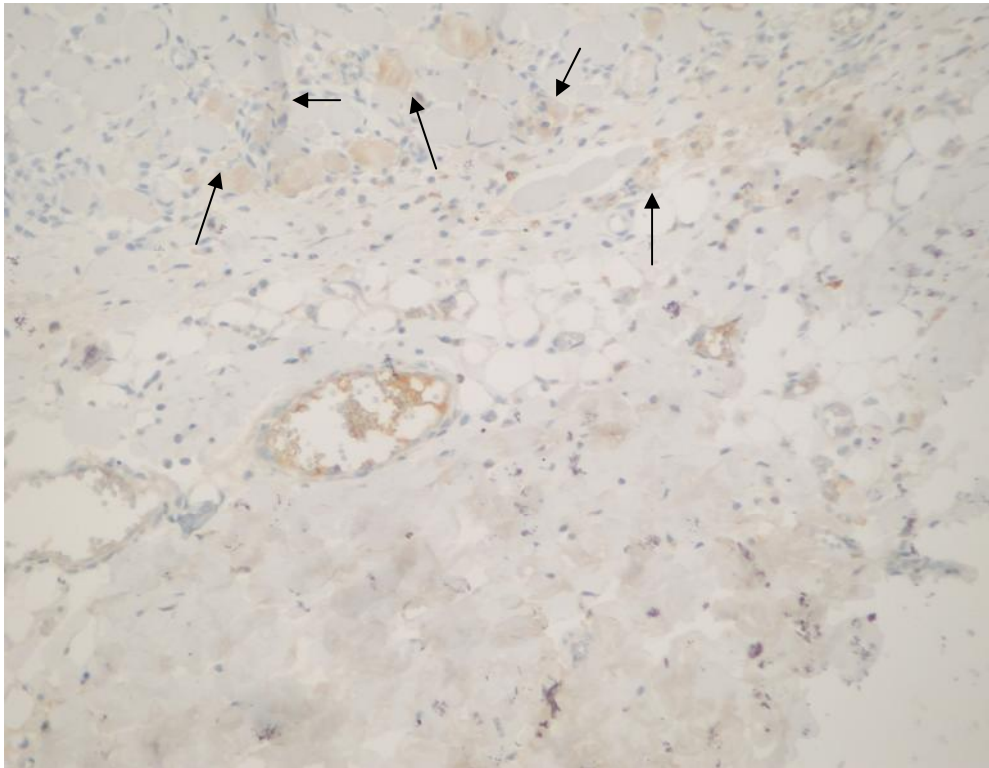
Resim 1: Kontrol grubundaki ratlarda 5.günde izlenen nekroz alanları



Resim 2: Midazolam grubundaki ratlarda 5.günde izlenen nekroz alanları



Resim 3: Kontrol grubunda yeni olu an damarlar



Resim 4: Midazolam grubunda yeni olu an damarlar

TARTI MA

Biz bu çalı mamızda midazolamın sürekli infüzyonunun rat plazmasında VEGF düzeylerini artırması bilgisinden yola çıkarak, tekrarlayan dozlarda intraperitoneal midazolam uygulamasının etkilerini ara tırdık. Flep ya am alanlarını ve fleplerden yapılan kesitlerde yeni olu an damar sayılarını kontrol grubu ile kar ıla tırdık. Ancak yaptı ımız çalı mada tekrarlayan midazolam uygulamasının flep ya am alanları ve yeni damar olu umları üzerine etkisi olmadı ını gösterdik.

Flep cerrahisinde, cerrahi geciktirmenin flep ya am alanlarında sa ladı ı ba arıyı elde edebilmek için oksitosin, ECGF, anjiotensin II, b-FGF, eritropoietin, salvianolik asit-B, PDGF-B, L-arginin, GM-CSF, TGF-beta ve VEGF ile birçok çalı ma yapılmı tır (2–20). Bu çalı malarda özellikle angiogenezin flep ya amını olumlu olarak etkiledi i gösterilmi tir.

Petersson ve ark. (2) muskülökutanöz fleplerde intravenöz ve subkutan oksitosin kullanarak yaptıkları çalı mada flep ya am alanlarının oksitosin kullanılmayan kontrol gruplarına göre anlamlı derecede arttı ını ayrıca oksitosin uygulanan gruplarda plazmadaki insülin-like growth hormon (IGF–1) seviyelerinde önemli bir artı oldu unu göstermi lerdir.

Pu ve ark. (3) ratlarda transvers rektus abdominis muskülökutanöz flebinde ECGF ile çalı mı lardır. Çalı malarında postoperatif 7. günde flep ya am alanlarının ve neovaskülarizasyon oranlarının ECGF uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre önemli derecede arttı ını göstermi lerdir (3).

Okuyama ve ark. (4) AII ile yaptıkları çalı mada flep ya am alanlarının anlamlı ekilde arttı ını göstermi lerdir.

Lu ve ark. (5) 42 rat ile yaptıkları çalı mada bFGF uygulanan gruplarda flep ya am alanlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttı nı göstermi lerdir.

Buemi ve ark.'nın (6,7) ratlarda ve Galeano ve ark.'nın (8) diabetik farelerde recombinant human eritropoetin (rHuEPO) kullanarak yaptıkları çalı malarda EPO'nun VEGF düzeylerini ve protein sentezini arttırdı nı ayrıca yara iyile mesini ve angiogenezi hızlandırdı nı göstermi lerdir. Saray ve ark. (9) ise rat McFarlene flep modelinde EPO'nun etkilerini ara tırmı lardır. Çalı malarında ratlara uzun süreli ve kısa süreli EPO enjekte etmi ler ve sonuçlarını kontrol grubu ile kar ıla tırmı lardır. Sistolik kan basıncının ve hematokrit de erlerinin EPO uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttı nı göstermi lerdir. Kısa süreli EPO uygulanan gruptaki flep ya am alanları kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla olmasına ra men uzun süreli EPO uygulanan grupta ise flepte distal nekroz alanı kontrol grubuna göre daha fazla olmu tur. Nekroz geli en alandaki artı nı ise uzun süre EPO uygulaması sonucu geli en vazokonstrüksiyondan kaynaklandı nı belirtmi lerdir (9).

Sal B, *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) bitkisinden elde edilir ve özellikle Çin'de kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için kullanılır (10). Lay ve ark. (10) ratlarda Sal B' nin flep ya amı üzerine etkilerini ar tırmı lar ve Sal B' nin flepteki nekroz alanlarını anlamlı derecede azalttı ı göstermi lerdir.

Hijjawi ve ark. (11) deneysel rat TRAM flep modelinde PDGF-B uygulaması sonrası flep ya am alanlarının istatikselsel olarak anlamlı bir ekilde arttırdı nı göstermi lerdir.

Komorowska-Timek ve ark. (12) ratlarda yaptıkları 8x8 cm. boyutlarındaki epigastrik deri flebinde L-arginin ve VEGF' nin flep ya amı üzerine etkilerini ara tırmı lardır. Yaptıkları bu çalı mada L-arginin ve VEGF uygulanan gruplardaki flep nekroz alanlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede az oldu unu göstermi lerdir.

Ergun ve ark. (13), Kuru ve ark. (14) deneysel olarak rat random patern fleplerinde yaptıkları çalı malarda GM-CSF' nin fibroblast proliferasyonunu, anjiogenezisi ve kollajen sentezini arttırdıklarını flep nekroz alanlarını ise azalttı nı göstermi lerdir.

Huemer ve ark. (15) TGF- β kullanarak rat epigastrik flebinde yaptıkları çalı mada ise fleplerde ortalama ya am alanlarının ve kapiller sayısının kontrol grubuna göre önemli derecede arttı nı göstermi lerdir.

Kryger ve ark. (16) random patern flep kullanarak yaptıkları çalı mada ratları; tek doz sistemik VEGF uygulanan grup, tekrarlayan dozlarda VEGF uygulanan grup, subdermal VEGF uygulanan grup, subfasyal VEGF uygulanan grup, topikal VEGF uygulanan grup ve kontrol grubu olarak 6 ayrı gruba ayırmı lardır. Daha sonra VEGF etkisinin uygulama yolları arasındaki farkın flep ya amı üzerine olan etkilerini incelemi lerdir. VEGF uygulanan tüm gruptaki ya am oranlarının kontrol grubuna göre daha fazla oldu unu ancak sistemik olarak tekrarlayan dozlarda uygulanan VEGF grubunda flep ya am oranlarındaki artı nın en fazla oldu unu belirtmi lerdir. Fleplerden alınan tam kesitlerden yapıtlıkları histolojik çalı mada ise nekrotik flep alanlarından yapılan kesitlerde tüm grupta benzer olarak nötrofil ve monosit artı nı, VEGF uygulanan grupta ise yeni olu an damar sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttı nı göstermi lerdir. Tekrarlayan VEGF uygulanan gruptaki ya am oranının tüm grupta göre fazla olmasının nedeni olarak ise VEGF yarı ömrünün in vivo olarak çok kısa olmasına ra men ve tekrarlayan uygulamalarda plazma konsantrasyonunun yükselmesine ba lamı lardır. Biz de bu çalı manın sonucunda tekrarlayan VEGF dozlarının flep ya am süresini en fazla uzattı ndan yola çıkarak tekrarlayan dozlarda midazolam uyguladık. Yeni olu an damarları göstermek için ise bu çalı mada yapıldı ı ekilde fleplerden aldı mız kesitlerde immunohistokimyasal inceleme yaptık (16).

Zhang ve ark. (17) inferior epigastrik arter bazlı rat transvers rektus abdominus muskulo-kutanöz flebinde VEGF'in farklı yollardan preoperatif ve postoperatif verilme göre etkisini incelemi lerdir. Çalı malarında subkutanöz olarak preoperatif 7 gün önce VEGF uyguladıkları gruptaki flep ya am alanlarının ve yeni olu an damar sayılarının kontrol grubuna göre ve operasyon sırasında intraarteryel ve sistemik VEGF verdikleri grupta göre anlamlı derecede arttı nı göstermi lerdir. Preoperatif olarak subkutanöz VEGF uygulanan gruptaki flep ya am alanlarının en fazla olmasının nedenini ise lokal uygulama sonrası 7 gün önceden angiogenезin artmaya ba laması olarak belirtmi lerdir (17).

Machens ve ark. (18) VEGF uyguladıkları rat inferior epigastrik arter bazlı flep modelinde VEGF uygulanan fleplerin ya am oranlarının uygulanmayan grupta

göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla oldu unu göstermi lerdir. Ayrıca VEGF uygulanan gruptaki kapiller damar çaplarının ve sayılarında arttı nı göstermi ler ve flep ya am oranlarındaki artı ı bu etkinin sa ladı nı belirtmi ledir.

Seify ve ark. (19) yaptıkları deneysel çalı mada ise ratlarda TRAM flebi modeli üzerinde cerrahi geciktirme ve farklı yollardan VEGF uygulamalarını kar ıla tırmı lardır. Çalı malarında ratları; kontrol grubu, cerrahi geciktirme grubu, cerrahi geciktirmeyeyle beraber intramüsküler VEGF uygulanan grup, cerrahi geciktirmeyeyle beraber intraarteryel VEGF uygulanan grup, intramüsküler VEGF uygulanan grup ve intraarteryel VEGF uygulanan grup olarak sınıflandırmı lardır. Cerrahi geciktirme grubunda flep ya am oranlarının ortalama de erini %83, cerrahi geciktirmeyeyle beraber intramüsküler VEGF uygulanan grupta %96.6, cerrahi geciktirmeyeyle beraber intraarteryel VEGF uygulanan grupta %90.6, sadece intramüsküler VEGF uygulanan grupta %87 ve sadece intraarteryel olarak verilen grupta ise %90,6 olarak belirtmi lerdir. VEGF uygulanan gruplardaki damar sayısı artı nı ise mikroanjiyografik olarak göstermi lerdir (19).

Kumiko ve ark. (21) midazolamın VEGF salınımını üzerine etkilerini gösteren bir çalı ma yapmı lardır. Çalı malarında rat plazmasında ve A-10 (fetal rat aort düz kasından elde edilen) hücre kültürlerinde propofol, ketamin ve midazolamın VEGF düzeylerinde yaptı ı de iimleri kar ıla tırmı lardır. Midazolamın sürekli infüzyonunun rat plazmasında VEGF konsantrasyonunu anlamlı olarak arttı rdı nı ancak propofolün bu etkiyi göstermedi ini ortaya koymu lardır. Çalı malarında midazolam infüzyonunun ba lamasının 8. saatinde VEGF plazma konsantrasyonunun ilk artma e ilimi gösterdi ini ve plazma midazolam seviyesi dü meye ba lamı olsa bile en yüksek seviyeye infüzyon sona erdikten 2 saat sonra ula ıldı nı göstermi lerdir. A-10 kültür hücrelerinde ise midazolamın 72 saate kadar zamana ba lı olarak VEGF salınımını arttı rdı nı ancak propofol ve ketaminin bu etkiyi göstermedi ini ortaya koymu lardır. Midazolam uyarımının p44/42 MAP kinaz ve SAPK/JNK üzerine belirgin fosforilasyon artı ı sa larken, p38 MAP kinaz üzerinde etki etmedi ini ve midazolam ile uyarılmı VEGF salınımının MAP kinaz kinazın spesifik inhibitörleri olan PD98059 ve U0126 ile azaldı nı göstermi lerdir. Damar düz kas hücrelerinin VEGF için esas kaynak olmalarından yola çıkarak midazolamın ve aktif metaboliti olan -hidroksi-midazolamın A-10 kültür hücrelerinde VEGF salınımını arttı rdı nı ve bu artı nın bazı zaman periyotlarında olması gerekti ini, sürekli midazolam infüzyonu ile rat plazma VEGF de erlerinin 50-150 ng/ml

arasında seyretti ini (serbest konsantrasyon 13,9–41,4 ng/ml) ancak A–10 kültür hücrelerinde ise aynı etki için klinikte kullanılan düzeylerin üzerinde midazolam verilmesi gerekti ini ortaya koymu lardır. Aradaki bu farkın ise in vivo ve in vitro deneysel ko ulların arasındaki olası farklılardan kaynaklandı ını vurgulamı lardır.

VEGF ile yapılan çalı malarda özellikle tekrarlayan dozlarda sistemik VEGF uygulamasının flepte ya am oranlarını ve yeni damar olu umlarını anlamlı ekilde arttırdı ı gösterilmi tir (16). Ancak VEGF'in yarı ömrünün çok kısa olması (3 ile 5 dakika arası), tekrarlayan dozlara ihtiyaç duyulması nedeniyle klinikte pratik olarak uygulanmasını imkânsız kılmı tır. Bununla beraber Kumiko ve ark. tarafından anestezi prati inde çok sık uygulama alanı bulan midazolamın, VEGF plazma düzeylerini uygulama sonrası 8. saatte ba layarak yükseltti ini ve infüzyonun kesilmesinden sonraki 2. saatte plazmada en yüksek seviyeye ula tı ını göstermeleri ile midazolamın flep ya am oranlarını artırabilece ini dü ünerek bu çalı mayı yaptık (21).

Yapılan çalı malarda VEGF'in flep ya am oranlarını ve özellikle kritik zonda yeni olu an damar sayılarını anlamlı ekilde arttırdı ı ortaya konmu tur. Biz de bu artı ın en fazla tekrarlayan sistemik dozlarda VEGF uygulaması sonrası görüldü ü ve midazolam uygulaması sonrası VEGF düzeylerindeki artı ın 8 saat sonra ba layıp infüzyonun kesilmesinden sonraki 2. saatte en yüksek seviyeye çıkması nedeniyle preoperatif 10 ve 2 saat önce, operasyona ba larken ve postoperatif 24 ve 48'inci saattlerde midazolam uyguladık. Biz flep modeli olarak tekrarlayan VEGF dozlarının verildi i çalı madaki modeli uyguladık (16). Uyguladı ımız midazolam dozunu ise daha önce yapmı oldu umuz ön çalı manın sonuçlarından yola çıkarak ratlarda ketaminle beraber kullanılacak en yüksek doz olan 15mg/kg olarak belirledik. Midazolam dozunu daha fazla yükseltti imizde ise ratların öldü ünü gözledik.

Kumiko ve ark. midazolam uygulamasını sürekli infüzyon ekinde intravenöz yoldan yapmı ve damar endotelinden VEGF salınımında midazolamın ve aktif metaboliti olan –hidroksimidazolamın etkili oldu unu bildirmi lerdir (21). Biz ise çalı mamızda intraperitoneal yolu kullandık. Bu uygulama yolu ile midazolam öncelikle portal sistemden geçmesine ra men aktif metabolitine karaci erde dönü tü ü için çalı mamızı olumsuz yönde etkilemeyece ini dü ündük. Ancak midazolamın ve aktif metabolitinin kan düzeyini de erlendiremedik.

Ancak çalı mamız sonrasında midazolam uygulamasının ratlarda random pattern fleplerde nekroz alanlarını azaltmadı ını, ya ayan flep alanlarında kontrol grubu ile tedavi grubu arasında bir fark bulunmadı ını gösterdik. Ayrıca fleplerden aldı ımız kesitlerden yaptı ımız immunohistokimyasal çalı malarda kontrol grubu ile midazolam grubu arasında yeni olu an damar sayıları açısından da fark olmadı ını saptadık.

Her ne kadar midazolamın rat plazmasında ve A-10 kültür hücrelerinde VEGF düzeylerini arttırdı ı gösterilmi olsa da, biz yaptı ımız bu çalı mada midazolamın flep ya am alanlarını ve yeni olu an damar sayılarını arttırmadı ını gösterdik. Uyguladı ımız flep modeli ve flep kesitlerinde yeni olu an damarları gösterme yöntemimiz genelde VEGF çalı malarında tercih edilen ve tekrarlayan VEGF uygulanması modelindeki ile aynıydı (21). Ancak midazolamı uygulama yöntemimiz intravenöz infüzyon yerine tekrarlayan intraperitoneal biçimindeydi. Uygulama yöntemindeki farklılı a ba lı olarak flep ya am oranlarının az olabilece i dü ünülse de biz bu durumda intraperitoneal olarak uyguladı ımız midazolamın aktif metaboliti üzerinden VEGF düzeylerini arttırmasını bekledik.

Anestezi için yaptı ımız ek ketamin uygulamasının ise flep ya amı üzerine etkisi olmadı ını gösteren çalı madan yola çıkarak olumlu ya da olumsuz etki etmeyece ini dü ündük(44). Özellikle kritik zonda beklenen yeni damar olu umlarının sayısının kontrol grubuna göre farklılık göstermemesi plazma VEGF düzeyinin yeterli olamayabilece i konusunda önemli bir bulgu oldu. Ancak plazmada VEGF düzeylerini ve de i imlerini ayrıca midazolamın ve metabolitlerinin seviyelerini teknik olarak gösterme imkânımız olmadı ı için belirleyemedik.

Literatür taramamızda midazolamın VEGF düzeyleri üzerine etkisini gösteren ba ka bir çalı maya rastlamadık. Midazolamın ketaminle kimyasal reaksiyona girdi ini ve yapısının bozuldu unu gösteren bir çalı ma olmaması nedeniyle kontrol grubunu olumsuz olarak etkilemedi ine karar verdik.

Sonuç olarak, VEGF' in flep ya amını ve midazolamında plazma VEGF düzeyini arttırdı ını belirten çalı malardan yola çıkarak yaptı ımız bu deneyde tekrarlayan intraperitoneal midazolam uygulamasının flep ya am alanları ve anjiogenez üzerine etki etmedi ini gösterdik.

SONUÇ

Tekrarlayan intraperitoneal midazolam uygulaması ile random pattern rat flep modelinde rat ya am alanlarında kontrol grubuna göre artı yoktur ($p > 0,05$).

Fleplerden yapılan kesitlerde yeni olu an damar sayıları açısından gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).

KAYNAKLAR

1. Nicholas B. Vedder, MD. Flap physiology. In: Stephen J. Mathes, MD, Plastic surgery general principles (2nd ed), Volume I. WB Saunders Company, Philadelphia 2006; pp: 483–506.
2. Petersson M, Lundeberg T, Sohlstrom A, Wiberg U, Uvnas-Moberg. Oxytocin increases the survival of musculocutaneous flaps. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998; 357: 701–4.
3. Pu LL, Ahmed S, Thomson JG, Reid MA, Madsen JA, Restifo RJ. Endothelial cell growth factor enhances musculocutaneous flap survival through the process of neovascularization. *Ann Plast Surg.* 1999; 42: 306–12.
4. Okuyama N, Roda N, Sherman R, Guerrero A, Dougherty W, Nguyen T, diZerega G, Rodgers K. Angiotensin II improves random-flap viability in a rat model. *Ann Plast Surg.* 1999; 42: 313–9.
5. Lu WW, Ip WY, Jing WM, Holmes AD, Chow SP. Biomechanical properties of thin skin flap after basic fibroblast growth factor (bFGF) administration. *Br J Plast Surg.* 2000; 53: 225–9.
6. Michele Buemi, Mariarosaria Galeano, Alessio Sturiale, et. al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock.* 2004; 22: 169–173.
7. Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, et. al. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol.* 2002; 82: 411–7
8. Mariarosaria Galeano, Domenica Altavilla, Domenico Cucinotta, et. al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes,* 2004; 53: 2509-2517.
9. Saray A, Ozakpinar R, Koc C, Serel S, Sen Z, Can Z. Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study. *Laryngoscope.* 2003; 113: 85–9.
10. Lay IS, Hsieh CC, Chiu JH, Shiao MS, Lui WY, Wu CW. Salvianolic acid B enhances in vitro angiogenesis and improves skin flap survival in Sprague-Dawley rats. *J Surg Res.* 2003; 115: 279–85.

11. Hijjawi J, Mogford JE, Chandler LA, Cross KJ, Said H, Sosnowski BA, Mustoe TA. Platelet-derived growth factor B, but not fibroblast growth factor 2, plasmid DNA improves survival of ischemic myocutaneous flaps. *Arch Surg.* 2004; 139: 142–7.
12. Komorowska-Timek E, Timek TA, Brevetti LS, Zhang F, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effect of single administration of vascular endothelial growth factor or L-arginine on necrosis and vasculature of the epigastric flap in the rat model. *Br J Plast Surg.* 2004; 57: 317–25.
13. Ergun SS, Kyran B, Su O, Bilgic B, Yssever H, Kucuk M. Effects of granulocyte macrophage colony stimulating factor on random flap healing and immune profile in rats with impaired wound healing by glucocorticoids. *Ann Plast Surg.* 2004; 52: 80–8.
14. Kuru B, Dinc S, Elitok O, Gulcelik MA, Alagol H. Efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the survival of ischaemic skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2005; 39 (4): 193–6.
15. Huemer GM, Meirer R, Gurunluoglu R, Kamelger FS, Dunst KM, Wanner S, Piza-Katzer H. Comparison of the effectiveness of gene therapy with transforming growth factor-beta or extracorporeal shock wave therapy to reduce ischemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats. *Wound Repair Regen.* 2005; 13: 262–8.
16. Z Kryger, F Zhang, T Dogan, C Cheng, W C Lineaweaver and H J Buncke. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *British Journal of Plastic Surgery* 2000; 53: 234–239.
17. Feng Zhang, Kenneth Fischer, Ewa Komorowska. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Annals of Plastic Surgery* 2001; 46: 314–9.
18. Hans-Gunther Machens, Jila Salehi, Herbert Weich, Susanne Munch. Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGFR-1 (sFLT-1) in a rat flap model. *Journal of Surgical Research* 2003; 111: 136–142.

19. Hisham Seify, Ufuk Bilkay and Glyn Jones. Improvement of TRAM flap viability using human VEGF-Induced Angiogenesis: A comparative study of delay techniques. *Plast Reconstr Surg* 2003; 112:1032–1039.
20. William C Lineaweaver, Man-Ping Lei, William Mustain. Vascular endothelium growth factor, surgical delay and skin flap survival. *Annals of Surgery* 2004; 239: 10–29.
21. Kumiko Tanabe, Shuji Dohi, Hiroyuki Matsuno, Kouseki Hirade. Midazolam stimulates vascular endothelial growth factor release in aortic smooth muscle cells. *Anesthesiology* 2003; 98: 1147–54.
22. Cormack CG, Lamberty GH. Introduction. In: *The arterial anatomy of skin flap* (2nd ed). Livingstone C, Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo. 1994; pp:2–6
23. Cutting BC., Robson C.M., Koss N. Denervation supersensitivity and the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 1978; 61:881.
24. Taylor GI, Palmer JH, Mc Manamy D. The vascular territories of the body (angiosome) and their clinical applications. In: Mc carthy JG, May JW, littler JW (eds), Volume I WB Saunders company, Philadelphia. 1990; pp: 353-355.
25. Kerrigan CL. Skin flap failure: Pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 1983; 72: 766–774.
26. Fisher J, Gingrass MK. Basic principles of skin flaps. n: Georgiade GS, Georgiade NG, Riefkohn R, Barwick WJ (Eds.) *Text book of Plastic Maxillofacial and Reconstructive Surgery* (3 rd Ed.) Williams and Wilkins, Baltimore 1997 pp:19–29.
27. Cormack GC, Lamberty BGH. *The arterial anatomy of skin flaps* (2 nd Ed.) Churchill Livingstone, Edinburg 1994. pp:47.
28. Danie RK, Kerrigan CL. Principles and physiology of skin flap surgery In: Mc Carthy JG, May JW, (Eds) *Plastic Surgery Volume 1*. WB. Saunders Company, Philadelphia, 1990, pp: 275–328.
29. Snell SR. *Clinical Anatomy* (5 th ed). Little and Brown Company, Washington 1997, pp. 224–30.
30. Williams PL, Warwick R. *Gray’s Anatomy* (36 th ed). Churchill Livingstone, Edinburgh 1980, pp. 1396–1424.
31. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9: 653- 660.

32. Dildar Konuko lu, Mehtap Sultan Turhan. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiogenezi. Cerrahpa a tıp dergisi. 2005; 36: 42–48.
33. eref Olgar, Sevgi Yetkin. Çocuk sa lı ı ve hastalıkları dergisi. Anjiogenezis. 2003; 46: 139–147.
34. Yusufhan Yazır, Süheyla Gonca, Serdar Filiz, Hakkı Dalçık. Endotel hücreleri için önemli bir protein ailesi; vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF),ailenin üyeleri, yapısı ve sentezi. C.Ü. tıp fakültesi dergisi 2004; 26: 181–184.
35. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004; 59: 21- 6.
36. Steiling H, Werner S. Fibroblast growth factors: Key players in epithelial morphogenesis, repair and cytoprotection. Curr Opin Biotechnol. 2003; 14: 533- 537.
37. Betsholtz C. Biology of platelet-derived growth factors in development. Birth Defects Res Part C Embryo Today. 2003; 69: 272- 285.
38. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. Pharmacol Ther. 2003; 98: 257- 265.
39. Enas Atef El Naggar, Fumio Kanda, Shiho Okuda, et. al. Direct effects of tumor necrosis factor alpha (TNF-) on L6 myotubes. Kobe J. Med. Sci. 2004; 50: 39-46.
40. P. Marquet, O. Baudin, J.M. Gaulier, et.al. Sensitive and specific determination of midazolam and 1-hydroxymidazolam in human serum by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry.
41. Revers JG, Frangen RJ, Vinik R. Midazolam pharmacology and uses. Anesthesiol 1985; 62: 310–324.
42. O.R. Hung, J.B. Dyck, J. Varvel, S.L. Shafer, D.R. Stanski. Comparative absorption kinetics of intramuscular Midazolam and diazepam. Can J Anaesth. 1996; 43: 450-455.
43. Reves JG, Fragen RJ, Vinik HR, Gteenblat DJ. Midazolam Pharmacology and uses. Anesthesiology 1985; 62:310-324.
44. Tim R. Tyner, Randy Shahbazian, Jared Nakashima, Saben Kane, Kenty Sian, and Kent T. Yamaguchi. Propofol Improves Skin Flap Survival in a Rat Model. Annals of Plastic Surgery 2004; 53: 273–277.

TC.
ERC YES ÜN VERS TES
TIP FAKÜLTES DEKANLI İNA

Dr. Umut ÖZBEB T'e ait, Rat McFarlane Flep Modelinde Midazolamın Flep Ya amı Üzerine Etkileri adlı çalı ma, jürimiz tarafından Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmi tir.

Tarih :

mza

Ba kan: Prof. Dr. Galip K. GÜNAY

Üye: Doç. Dr. Atilla ÇORUH (Danı man)

Üye: Doç.Dr. rfan ÖZYAZGAN

Üye: Yrd. Doç. Dr. Teoman ESK TA CIO LU

Üye: Doç.Dr. Engin OK